

T. C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİKROORGANİZMALARIN LAKKAZ ÜRETİMİNE  
ÇEŞİTLİ FAKTÖRLERİN ETKİSİ

131173

EMRE BİRHANLI

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

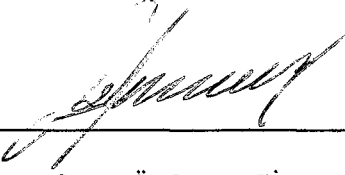
MALATYA  
AĞUSTOS 2003


131173


T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

Bu çalışma Jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

  
Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA  
Başkan

  
Yrd. Doç. Dr. Hikmet Geçkil  
Üye

  
Yrd. Doç. Dr. Sibel (Şık) KAHRAMAN  
Üye

Onay

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.

28.1.8.2003

  
Doç. Dr. Ali ŞAHİN  
Enstitü Müdürü  
T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

*En değerli varlıklarım anneme ve babama..*



## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### MİKROORGANİZMALARIN LAKKAZ ÜRETİMİNE ÇEŞİTLİ FAKTÖRLERİN ETKİSİ

Emre BİRHANLI

İnönü Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

59 + ix sayfa

2003

Danışman: Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA

*Trametes versicolor* dahil birçok beyaz çürükçül fungus, lakkaz adı verilen ekstraselüler bakır içeren fenoloksidaz üretir. Bu enzim çevresel kirleticiler olarak bilinen çeşitli ksenobiyotiklerin yıkımında ve boya, kağıt veya tekstil endüstrilerinde potansiyel uygulamalara sahiptir. İndükleyciler varlığında birçok beyaz çürükçül fungus ortama yüksek miktarda lakkaz salgılar.

Bu çalışmada, *Funalia trogii* ve *Trametes versicolor*' un sıvı kültürlerinde lakkaz üretim yeteneklerini artırmak için Cu, lignoselülozik materyal ve peyniraltı suyu denenmiştir. Metal içermeyen stok temel ortam veya distile su üreme ortamına özellikle 0.5-1.0 mM Cu ilavesi lakkaz aktivitesini artırmıştır. Lignoselülozik materyaller de bu iki fungusun lakkaz aktivitesini pozitif etkilemiştir.

Lakkaz üretimi için fungal peletlerin potansiyel kullanımı da araştırılmıştır. Peletler 5 gün boyunca tekrarlı kesikli olarak kullanılmıştır. Peletlerin lakkaz üretim yeteneği 5 gün boyunca yüksek ve kararlı kalmıştır. Bakır ilavesi büyük oranda lakkaz aktivitesini artırmıştır. Buna ek olarak hem peletler birçok kez kullanılmış hem de yüksek lakkaz aktivitesi elde edilmiştir. Peyniraltı suyu da tekrarlı kesikli üretim işleminde lakkaz üretim ortamı olarak kullanılmıştır.

Sonuçlar lakkaz üretiminde bu iki beyaz çürükçül fungusun potansiyelini göstermektedir. Bakır gibi ek materyallerin dikkatli seçimiyle bu iki fungusun lakkaz aktivitesini artırmak mümkündür. Bu sonuçlardan, fungal peletlerin tekrarlı kesikli işlemde yüksek miktarda lakkaz enzimi üretebileceği söylenebilir.

ANAHTAR KELİMELER: Lakkaz, beyaz çürükçül fungus, *Funalia trogii*,  
*Trametes versicolor*, bakır, lignoselülozik materyaller

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

## ABSTRACT

Master Thesis

### THE EFFECT OF VARIOUS FACTORS ON LACCASE PRODUCTION OF MICROORGANISMS

Emre BİRHANLI

Inonu University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

59 + ix pages

2003

Supervisor: Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA

Many white-rot fungi, including *Trametes versicolor*, produce extracellular copper-containing phenoloxidase, called laccase. This enzyme has potential applications in the dye, paper or textile industries, as well as for the degradation of various xenobiotics, which are recognized as environmental pollutants. In the presence of inducers many white rot fungi excrete large amount of laccase into the medium.

In this study, Cu, lignocellulosic materials and cheese whey have been assayed for their ability to enhance laccase production in liquid cultures of *Funalia trogii* and *Trametes versicolor*. Addition of, especially, 0.5-1.0 mM of Cu into the metal free stock and distilled water cultivation medium increased the activity of laccase. The lignocellulosic materials also positively affected the laccase activity of these two fungi.

The potential use of fungal pellets for laccase enzyme production was also examined. The pellets were used in a repeated batch mode for 5 d. The laccase production ability of pellets remained high and stable for 5 d. Cu supplementation greatly improved laccase activity. Additionally, not only the pellets could be used several times but also high laccase activity was obtained. Cheese whey was also used as a laccase production medium in a repeated batch operation.

The results suggest the potentiality of these two white rot fungi in laccase production. It is also possible to induce the laccase activity of these fungi by carefully choosing the supplementation material such as Cu. From these results, it can also be stated that fungal pellets can excrete high amount of laccase enzyme in a repeated batch mode.

**KEYWORDS:** Laccase, white rot fungus, *Funalia trogii*, *Trametes versicolor*, copper, lignocellulosic materials

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın hem deneysel hem de teorik aşamasında değerli katkılarda bulunan, yardım, öneri ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA' ya;

Çalışmalarına fikir ve önerileriyle katkıda bulunan Yrd. Doç. Dr. Dilek ASMA ve Yrd. Doç. Dr. Sibel KAHRAMAN' a;

Çalışmalarım esnasında yardım ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, değerli dostum Arş. Grv. Gülçin BEKER' e;

Çalışmalarım boyunca bana destek olan Arş. Grv. Dr. Ayşe BİRHANLI, Arş. Grv. Elif APOHAN, Arş. Grv. Seval CİNG ve Uzm. Ogün BİRHANLI' ya;

Bu tez çalışmasını 2003/54 nolu proje olarak destekleyen İnönü Üniversitesi BAPB' ye;

Tüm hayatım boyunca yardımlarını ve desteklerini gördüğüm AİLEM' e;

Teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Biyoteknoloji.....	1
1.1.1. Fermentasyon Biyoteknolojisi.....	1
1.1.2. Enzim Biyoteknolojisi.....	2
1.1.3. Çevre ve Atık Biyoteknolojisi.....	2
1.2. Biyoteknolojide Yaygın Olarak Kullanılan Mikroorganizmalar.....	3
1.2.1. Bakteriler.....	4
1.2.2. Funguslar.....	4
1.3. Çürükçül Funguslar.....	5
1.3.1. Kahverengi Çürükçül Funguslar.....	5
1.3.2. Yumuşak Çürükçül Funguslar.....	5
1.3.3. Beyaz Çürükçül Funguslar.....	6
1.4. Beyaz Çürükçül fungusların Lignolitik Enzimleri.....	7
1.4.1. Lignin-peroksidaz (Ligninaz) (LiP E.C.1.11.1.14).....	7
1.4.2. Mn-bağımlı peroksidaz (MnP E.C.1.11.1.13).....	8
1.4.3. Lakkaz (Lac E.C. 1.10.3.2).....	9
1.5. Lakkaz Enziminin Biyoteknolojide Kullanımı.....	10
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	15
2.1. Beyaz Çürükçül Fungusların Lakkaz Üretim Yeteneğinin Artırılmasına Yönelik Çalışmalar.....	15
2.1.1. Çeşitli Ağırmetallerin Lakkaz Üretimi Üzerine Etkisi.....	15
2.1.2. Çeşitli Ortamların ve Katkı Maddelerinin Lakkaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	17
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	22
3.1. Çalışmada Kullanılan Funguslar.....	22
3.2. Çalışmada Kullanılan Fungusların Üretimi ve Saklanması.....	22
3.3. Çalışmada Kullanılacak Stok Fungus Kültürlerinin Hazırlanması.....	22
3.4. Peletlerin Hazırlanması.....	22
3.5. Fungusların Lakkaz Aktivitesi ve Üremesi Üzerine $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ Etkisi.....	23
3.5.1. Fungus Üremesi Üzerine $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ Etkisinin Katı Besiyerinde Araştırılması.....	23
3.5.2. $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ İçeren Sıvı Besiyerinde Fungus Üretimi.....	23
3.6. Lignoselülozlu Hammaddelerin Lakkaz Aktivitesine Etkisinin Araştırılması.....	24
3.7. Tekrarlı Kesikli Süreçte $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ Etkisinin Saptanması.....	24
3.8. Çalışmada Kullanılan Atıksu.....	25
3.9. Analizler.....	25
3.9.1. Lakkaz Aktivitesinin Saptanması.....	25
3.9.2. Ağır Metal İçeren Katı Ortamlarda Fungus Üremesinin Değişiminin Saptanması.....	25
3.9.3. Kültür Ortamındaki Biyokütle Miktarının Saptanması.....	26
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	27
4.1. Beyaz Çürükçül Fungusların Katı Besiyerinde Üretimi Sürecinde $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ' in Üreme Üzerine Yaptığı % İnhibisyon Etkisi.....	27

4.2.	Beyaz Çürükçül Fungusların Bakır İçeren Sıvı Besiyerlerinde Üretimi Sürecinde Lakkaz Aktivite Değişimi.....	28
4.3.	Beyaz Çürükçül Fungusların Üremesi Üzerine Farklı Konsantrasyonlarda $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ' ın Etkisi.....	36
4.4.	Beyaz Çürükçül Fungusların Tekrarlı Kesikli Süreçte Lakkaz Aktivite Değişimi....	37
4.5.	Lignoselülozlu Hammadde İçeren Ortamlarda Beyaz Çürükçül Fungusların Lakkaz Aktivite Değişimi.....	40
4.6.	Beyaz Çürükçül Fungusların Peyniraltı Suyu İçeren Besiyerlerinde Tekrarlı Kesikli Üretim Sürecinde Lakkaz Aktivite Değişimi.....	48
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	51
6.	KAYNAKLAR.....	52
	ÖZGEÇMİŞ.....	59





## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1.	Farklı konsantrasyonlarda $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ içeren STO besiyerlerinde çalkalamalı koşullarda üretilen <i>F. trogii</i> ' nin lakkaz aktivite değişimi (U/ml).....	29
Şekil 4.2.	Farklı konsantrasyonlarda $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ içeren STO besiyerlerinde çalkalamalı koşullarda üretilen <i>T. versicolor</i> ' un lakkaz aktivite değişimi.....	30
Şekil 4.3.	Farklı konsantrasyonlarda $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ içeren STO besiyerinde statik olarak üretilen <i>F. trogii</i> ' nin lakkaz aktivite değişimi.....	31
Şekil 4.4.	Farklı konsantrasyonlarda $\text{CuSO}_4$ içeren STO besiyerinde statik olarak üretilen <i>T. versicolor</i> ' un lakkaz aktivite değişimi.....	32
Şekil 4.5.	Farklı konsantrasyonlarda $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ içeren distile su ortamında çalkalamalı olarak üretilen <i>F. trogii</i> ' nin lakkaz aktivite değişimi.....	33
Şekil 4.6.	Farklı konsantrasyonlarda $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ içeren distile su ortamında çalkalamalı olarak üretilen <i>T. versicolor</i> ' un lakkaz aktivite değişimi.....	34
Şekil 4.7.	Farklı konsantrasyonlarda $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ içeren distile su ortamında statik olarak üretilen <i>F. trogii</i> ' nin lakkaz aktivite değişimi.....	35
Şekil 4.8.	Farklı konsantrasyonlarda $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ içeren distile su ortamında statik olarak üretilen <i>T. versicolor</i> ' un lakkaz aktivite değişimi.....	36
Şekil 4.9.	<i>F. trogii</i> peletlerinin 0.5 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ içeren distile su ve STO ortamlarında tekrarlı kullanımı sürecinde lakkaz aktivite değişimi.....	38
Şekil 4.10.	<i>T. versicolor</i> peletlerinin 0.5 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ içeren distile su ve STO ortamlarında tekrarlı kullanımı sürecinde lakkaz aktivite değişimi.....	39
Şekil 4.11.	<i>F. trogii</i> ' nin lignoselülozlu hammadde içeren STO ortamlarında statik koşullarda üretimi sürecinde lakkaz aktivite değişimi.....	40
Şekil 4.12.	<i>T. versicolor</i> ' un lignoselülozlu hammadde içeren STO ortamlarında statik koşullarda üretimi sürecinde lakkaz aktivite değişimi.....	41
Şekil 4.13.	<i>F. trogii</i> ' nin farklı konsantrasyonlarda ceviz kabuğu tozu içeren STO ortamlarında çalkalamalı olarak 5 günlük üretim sırasında lakkaz aktivite değişimi.....	42
Şekil 4.14.	<i>F. trogii</i> ' nin farklı konsantrasyonlarda kamış tozu içeren STO ortamlarında çalkalamalı olarak 5 günlük üretim sırasında lakkaz aktivite değişimi.....	43
Şekil 4.15.	<i>F. trogii</i> ' nin farklı konsantrasyonlarda kayısı çekirdeği kabuğu tozu içeren STO ortamlarında çalkalamalı olarak 5 günlük üretim sırasında lakkaz aktivite değişimi.....	44
Şekil 4.16.	<i>F. trogii</i> ' nin farklı konsantrasyonlarda saman tozu içeren STO ortamlarında çalkalamalı olarak 5 günlük üretim sırasında lakkaz aktivite değişimi.....	44
Şekil 4.17.	<i>T. versicolor</i> ' un farklı konsantrasyonlarda ceviz kabuğu tozu içeren STO ortamlarında çalkalamalı olarak 5 günlük üretim sırasında lakkaz aktivite değişimi.....	45

Şekil 4.18.	<i>T. versicolor</i> ' un farklı konsantrasyonlarda kamış tozu içeren STO ortamlarında çalkalamalı olarak 5 günlük üretim sırasında lakkaz aktivite değişimi.....	46
Şekil 4.19.	<i>T. versicolor</i> ' un farklı konsantrasyonlarda kayısı çekirdeği kabuğu tozu içeren STO ortamlarında çalkalamalı olarak 5 günlük üretim sırasında lakkaz aktivite değişimi.....	47
Şekil 4.20.	<i>T. versicolor</i> ' un farklı konsantrasyonlarda saman tozu içeren STO ortamlarında çalkalamalı olarak 5 günlük üretim sırasında lakkaz aktivite değişimi.....	48
Şekil 4.21.	<i>F. trogii</i> peletlerinin peyniraltı suyu besiyerinde tekrarlı kesikli süreçte kullanımı sırasında lakkaz aktivite değişimi.....	49
Şekil 4.22.	<i>T. versicolor</i> peletlerinin peyniraltı suyu besiyerinde tekrarlı kesikli süreçte kullanımı sırasında lakkaz aktivite değişimi.....	50



## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1.	Stok temel ortam (STO) içeriği .....	23
Çizelge 4.1.	Farklı konsantrasyonlarda $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ içerecek şekilde hazırlanan SDA besiyerlerinde <i>F. trogii</i> ' nin üreme değişimi .....	28
Çizelge 4.2.	Farklı konsantrasyonlarda $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ içerecek şekilde hazırlanan SDA besiyerlerinde <i>T. versicolor</i> ' un üreme değişimi .....	28
Çizelge 4.3.	<i>F. trogii</i> ve <i>T. versicolor</i> ' un STO ortamında çalkalamalı koşullarda üretimi sürecinde 5 günlük ortalama üreme verimi.....	37
Çizelge 4.4.	<i>F. trogii</i> ve <i>T. versicolor</i> ' un STO ortamında statik koşullarda üretimi sürecinde 5 günlük ortalama üreme verimi .....	37

# 1.GİRİŞ

## 1. 1. Biyoteknoloji

Biyoteknoloji; bilim dalları arasında en geniş ve dallanmış bilim dalı olan Biyolojiden köken almış bir daldır. Biyoteknoloji en basit anlamda biyolojik sistemlerin (mikroorganizmalar, hayvan, bitki hücreleri ve bileşenleri) mal ve hizmet üretiminde kullanılması olarak ifade edilebileceği gibi çeşitli sorunların çözülmesi ve yararlı ürünlerin üretilmesi amacıyla organizmaların ve bileşenlerinin endüstriyel işlemlere uygulanması olarak da tanımlanabilir [1]. Biyoteknoloji, mikrobiyoloji, biyokimya, moleküler biyoloji, genetik mühendisliği gibi birçok alanla yoğun ilişkiler içinde olup bu bilimsel alanlarla karşılıklı ilişki içinde gelişmektedir. Biyoteknolojinin pek çok bilim dalıyla yakın ilişki içerisinde olmasına ek olarak, bir yanda yeni yaratıcı düşünceler ve buluşlarla beslenen teknolojinin itici gücü, öte yanda sürekli değişen hayat şartlarıyla yeni ürünlere olan gereksinim ve yeni arayışlar içindeki piyasa pek çok sektöre ticari gelişim ve kar olanakları sağlayan biyoteknolojiyi en hızlı gelişen bilim dallarından biri haline getirmiştir.

Biyoteknoloji oldukça geniş bir çalışma alanını içermektedir. Alkol, antibiyotik, aşı, organik asit, enzim, vitamin, hormon üretimi, atıkların arıtımı ve değerlendirilmesi, atıkları besiyeri olarak kullanarak hormon, enzim, aminoasit gibi son derece önemli ürünlerin üretilmesi, genetik mühendisliği teknikleriyle süper suşların elde edilmesi ve kullanılması, kömürün, atıkların, petrol ve yan ürünlerinin, pestisitlerin yıkılması, kömürden biyolojik işleme kükürdün uzaklaştırılması, ağır metallerin uzaklaştırılması, tek hücre protein üretimi gibi konular biyoteknolojinin çalışma alanları içindedir [1]. Bu derecede geniş çalışma alanına sahip biyoteknolojinin çeşitli uygulama alanları vardır. Fermentasyon biyoteknolojisi, enzim biyoteknolojisi ile çevre ve atık biyoteknolojisi bu alanlardan birkaçıdır.

### 1.1.1. Fermentasyon Biyoteknolojisi

Tarihsel olarak biyoteknolojinin en eski ve en önemli alanıdır. Çeşitli türde besin ve içeceklerin, biyopolimerlerin, antibiyotik ve önemli bazı ilaçların, endüstriyel açıdan son derece önemli pekçok kimyasal maddenin üretimi ile üretimi optimize etmek

için yeni fermentör dizaynı konuları içerisindedir. Fermentasyon biyoteknolojisinde biyolojik sistem olarak bitki hücreleri, hayvan hücreleri ve en yaygın olarak da mikroorganizmalar kullanılmaktadır [1].

### **1.1.2. Enzim Biyoteknolojisi**

Enzimler canlı hücreler tarafından meydana getirilen, biyokimyasal tepkimelerde katalizör olarak görev yapan protein yapısında kompleks moleküllerdir. Enzimler in vivo (hücre içi) ve in vitro (hücre dışı) koşullarda çeşitli maddelerde değişimler gerçekleştirebilirler. Enzimlerin özellikle in vitro şartlarda iş görebilmeleri endüstride kullanımlarını mümkün kılmıştır [2]. Bu da enzim biyoteknolojisi olarak tanımlanabilir.

Enzim biyoteknolojisi üretim, izolasyon, saflaştırma, çözünür halde kullanma, tutuklama (immobilizasyon) ve enzimleri reaktör sistemlerinde kullanma gibi alanları içermektedir. Enzim teknolojisi ayrıca tedavi, teşhis, besin üretimi, enerji kıtlığı önleme ve çevrenin geliştirilmesi gibi problemlere çözüm üretmektedir.

### **1. 1. 3. Çevre ve Atık Biyoteknolojisi**

Çevre; insan veya başka bir canlının yaşamı boyunca ilişkilerini sürdürdüğü dış ortamdır. Hava, su ve toprak bu çevrenin fiziksel unsurlarını, insanlar, hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalar ise biyolojik unsurlarını teşkil etmektedir. Doğanın temel fiziksel unsurları olan hava, su ve toprak üzerinde olumsuz etkilerin oluşması ile ortaya çıkan ve canlı öğelerin hayati aktivitelerini olumsuz yönde etkileyen çevre sorunlarına çevre kirliliği adı verilir.

Çevre bilimcilere göre iki çeşit kirlenme vardır;

A. Birinci Tip Kirlenme: Biyolojik olarak veya kendi kendine zararsız hale dönüşebilen maddelerin oluşturduğu kirliliktir. Hayvanların besin artıkları, dışkıları, ölüleri, bitki kalıntıları gibi maddeler birinci tip kirlenmeye neden olur. Kolayca ve kısa zamanda yok olan maddelerin meydana getirdiği kirliliğe geçici kirlilik de denir.

B. İkinci Tip Kirlenme: Biyolojik olarak veya kendi kendine yok olmayan ya da çok uzun sürede yok olan maddelerin oluşturduğu kirliliktir. Plastik, deterjan, tarım ilaçları, böcek öldürücüler (DDT gibi), radyasyon vb. maddeler ikinci tip kirlenmeye neden olur. Kalıcı kirlenme de denilen ikinci tip kirlenmeye neden olan maddeler, genellikle

önce bitki ve hayvanların vücutlarına katılır, daha sonra da besin zincirinin son halkasını oluşturan insana geçerek diğer canlılar gibi insanın yaşamını da tehlikeye sokar [3].

Bu yüzyılın başından itibaren birçok sanayi dalının gelişmesi, varolanların etkinliğini artırması ve sürekli artan şehir nüfusu doğal kaynakların kirlenmesine neden olmuş ve beraberinde çevre sorunlarının çözümüne yönelik teknolojilerin geliştirilmesini zorunlu kılmıştır. Bu teknolojilerden biri olan çevre biyoteknolojisi, canlı organizmaların ve onlardan elde edilen ürünlerin, zararlı atıkların arıtımında ve çevre kirliliğinin önlenmesinde kullanımını, atıklardan metal uzaklaştırılması veya kazanılmasını kapsamaktadır. Çevre biyoteknolojisi uygulamaları çoğunlukla, doğal mikroorganizmalarla (bakteri, mantar vb.) atıkların arıtımını da kapsar. Modern biyoteknolojiden yararlandığı kimi tekniklerde, parçalanması zor bazı atıklarla uğraşmak için genetik değişikliğe uğramış mikroorganizmaların kullanımı sağlanmaktadır. Geleneksel yöntemlerden çok daha verimli olan çevre biyoteknolojisi sayesinde, yüksek sıcaklıklarda yakma ve atık sahaları oluşturma gibi yöntemlere alternatifler oluşturulabilmektedir.

Günümüzde karşı karşıya olduğumuz en önemli problemlerden biri de atık sorunudur. Atık denilince çoğu belirli bir zaman ve yerde kullanılmayan, geri kazanılmayan ve dönüştürülemeyen madde ve enerji formu akla gelmektedir [1]. Bu atıkların pek çoğu ciddi çevre ve sağlık problemlerine yol açmaktadır. Bu nedenle atık biyoteknolojisi ile çevre biyoteknolojisi biyoteknolojinin iç içe girmiş uygulama alanlarıdır. Aslında bugün atıkları arıtmak, temizlemek ve yok etmek için kullanılan arıtım sistemleri doğada sürekli olarak gerçekleşmektedir. Yaşanan esas problem bu atıkların miktarının doğanın özümleyeceği kapasitenin üzerine çıkmış olmasıdır. Bu atıklardan özellikle ksenobiyotikler (insan yapımı sentetik maddeler) mikrobiyal yıkıma karşı dirençli olduklarından ekosistemde geriye dönülmez bozulmalar oluşturmaktadır. İşte atık biyoteknolojisiyle canlı organizmaların zararlı organik maddelerin (atıkların) yıkılması veya dönüştürülmesi sağlanır, bu işleme de biyolojik iyileştirme (biyoremediasyon) denir [1].

## **1. 2. Biyoteknolojide Yaygın Olarak Kullanılan Mikroorganizmalar**

Biyoteknolojinin tüm uygulama alanlarında kullanılan ana biyolojik sistemler mikroorganizmalardır. Bakteriler, funguslar, algler, protozoonlar ve virüsler

mikroorganizmalar içerisinde ele alınmaktadır. Virüsler tam bir hücreli yapı olmamalarına karşın bunlardan biyoteknolojik yöntemlerle aşı hazırlanması, mikrobiyal pestisit (*Baculovirüsler*' den) eldesi gibi uygulamalar virüsleri biyoteknolojide önemli kılmaktadır [1]. Fakat biyoteknolojik çalışmalarda en yaygın kullanılan mikroorganizmalar bakteriler ve funguslardır.

### 1.2.1. Bakteriler

Bakteriler mikroorganizmalar içinde en çok farklılaşan ve belki de en önemli mikroorganizmalardır. Çok azı hastalık etkenidir [4]. Hem doğal flora açısından hem de çeşitli döngülerin (karbon, azot, kükürt gibi) tamamlanması açısından yani hayatın sürmesi için bakteriler mutlaka bulunması gereken canlılardır [5]. Biyoteknolojide bakteriler pek çok alanda yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Bunun nedeni oldukça hızlı bir şekilde üremeleri, çok çeşitli metabolik ürünler meydana getirmeleri, birçok canlıya maruz kaldığında zarar gördüğü ya da öldüğü çeşitli kimyasal maddelere adapte olarak bu kimyasal maddeleri yararlı maddelere ya da en azından daha az zararlı formlara dönüştürebilmeleri, genetik mühendisliği teknikleri ile yeni özellikler kazandırılabilmesi ve bu özellikleri sayesinde heterolog proteinler sentezleyebilmeleridir. Genetik mühendislik teknikleri ile bazı genlerinin bitkilere aktarılmasıyla haşere ve hastalıklara, herbisitlere dirençli transgenik bitki meydana getirmede kullanılmaları ve enzimlerinin veya direkt kendisinin tekrar tekrar kullanılması önemli özellikleridir. Yine pekçok endüstriyel veya tıbbi önemi olan enzim üretiminde bakterilerden yararlanılmaktadır [1].

### 1.2.2. Funguslar

Ökaryotik kemoheterotrofik organizmalar olan funguslar klorofil içermezler. Çok azı insan patojeni olan funguslar içerisinde küfler, mayalar ve şapkalı funguslar dahil edilir. Çok farklı habitatları olan fungusların pek çoğu karasal olup toprakta ve ölü bitkiler üzerinde yaşarlar. Bazıları tatlı sularda az bir kısmı ise denizlerde bulunur. Funguslar da tıpkı bakteriler gibi biyoteknolojide oldukça yoğun bir şekilde kullanılmaktadır [6].

### Fungusların Biyoteknolojide Kullanım Alanları:

- a- Alkol üretimi [7]
- b- Antibiyotik üretimi [7, 8, 9]
- c- Tek hücre proteini olarak kullanılma [10, 11, 12]
- d- Ekmek yapımı [13]
- e- İçecek üretimi [13]
- f- Özel peynir yapımında [13, 14]
- g- Organik asit üretimi [7]
- h- Enzim üretimi [15]
- i- Mikrobiyal pestisit olarak kullanımı [1]

### 1. 3. Çürükçül Funguslar

Bazı funguslar selüloz, hemiselüloz ve lignin gibi özel bileşikleri sindiren enzimler salgılar ve odunda çürümeye neden olurlar. Bu yıkımla oluşan ürünler daha sonra besin olarak kullanılır. Odun başlıca % 40-50 selüloz, % 25-40 hemiselüloz, % 20-35 ligninden oluşur.

Odun çürüten funguslar kullanılan bileşeni ve çürüten odunun karakterlerini temel alan 3 gruba ayrılır. Bunlar;

- a-Kahverengi Çürükçül Funguslar
- b-Yumuşak Çürükçül Funguslar
- c-Beyaz Çürükçül Funguslar [16, 17, 18]

#### 1.3.1 Kahverengi Çürükçül Funguslar

Kahverengi çürükçül funguslar odunun selüloz ve hemiselüloz bileşenini tamamen parçalarken lignin bileşenini kısmen parçalar ve bunun sonunda odunda kahverengi renkte bir kalıntı oluşur [16].

#### 1.3.2. Yumuşak Çürükçül Funguslar

Yumuşak çürükçül funguslar odunun selüloz ve hemiselüloz bileşenini tamamen parçalarken lignin bileşenini tamamen olmasa da kahverengi çürükçül funguslara göre daha ileri basamaklara kadar yıkabilirler. Yumuşak çürükçül funguslar özellikle yüksek



nem şartlarında odunda çürümeye neden olup bu gruptan bir fungus tarafından etkilenen odun; ıslak, sünger gibi yumuşak ve çukurlu görünür [19].

### 1.3.3. Beyaz Çürükçül Funguslar

Beyaz çürükçül funguslar Basidiomycetes sınıfına dahil olup, odunun bütün bileşenlerini (selüloz, hemiselüloz ve lignin) parçalayarak, parçalanma sonunda odunda beyaz renkli bir kalıntı oluşumuna neden olurlar [20].

Beyaz çürükçül funguslar genellikle ağaçlarda yaşar ve esas enerji kaynağı olarak da bir polisakkarit olan selülozu kullanır. Ancak selüloz ağacın iç kısımlarında bulunurken dış kısımlarda selüloz ve hemiselülozla birlikte bitki hücrelerine sertlik ve dayanıklılık kazandıran lignin bulunmaktadır. Dolayısıyla fungusun selüloza ulaşabilmesi için lignin katmanını geçmesi gerekir. Bu nedenle fungus selüloza ulaşabilmek için fenolik yapıda olan lignin tabakasını yıkıma uğratar (CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O' ya) [21, 22] ve selüloza ulaşır.

Lignin yıkım yeteneklerinden dolayı lignolitik funguslar olarak da adlandırılan beyaz çürükçül funguslar bu yıkımı sekonder metabolizmaları esnasında meydana gelen fenoloksidazlar (lakkaz ve peroksidaz), Mn-peroksidaz, ligninaz (lignin peroksidaz), gibi ekstraselüler (hücre dışı) enzimler sayesinde gerçekleştirirler [23]. Bu enzimlerden biri, iki tanesi veya hepsi bir fungusta bulunabilir [21]. Örneğin beyaz çürükçül funguslardan *Phanerochaete chrysosporium* ligninaz, Mn-peroksidaz vb. enzimleri üretirken lakkaz enzimini üretemez. Bununla birlikte sınırlı sayıda çalışmada bu fungusun lakkaz ürettiği rapor edilmiştir [24]. Buna göre beyaz çürükçül funguslar fenolik yapıdaki lignini yıkabiliyorsa diğer fenolik yapıdaki maddeleri de yıkabilir, yapılan çalışmalar da bu düşüncüyü destekler niteliktedir. Bu durum beyaz çürükçül fungusların biyoteknolojinin pek çok alanında yoğun olarak kullanımını mümkün kılmıştır. *Phanerochaete chrysosporium*, *Funalia trogii*, *Coriolus versicolor* (*Polyporus versicolor*), *Pleurotus sajor-çaju*, *Pleurotus ostreatus* ve *Pleurotus eryngii* biyoteknolojide sıklıkla kullanılan beyaz çürükçül funguslardır.

Beyaz çürükçül fungusların biyoteknolojide kullanım alanları arasında;

- a- Bitkisel kütleden (saman, odun gibi) lignin gideriminde kullanımı [21]
- b- Kağıt hamurundan lignin gideriminde kullanımı [25, 26, 27]
- c- Çeşitli atıkların ve ksenobiyotiklerin (pestisit vb.) biyolojik iyileştirilmesinde (biyoremediasyon) kullanımı [28, 29]

- d- Poliaromatik hidrokarbonların yıkımında kullanımı [30, 31]
- e- Tekstil fabrikası [32, 33], alkol fabrikası [34] ve zeytinyağı fabrikası atıksularının arıtımında kullanımı [34, 35]
- f- Boyar maddelerin yıkımında kullanımı [36, 37]
- g- Ağır metallerin biyolojik adsorpsiyonunda kullanımı [38, 39]
- h- Kömürün sıvılaştırılmasında kullanımı [40, 41]
- i- Tek hücre proteini olarak kullanımı [42]
- j- Enzim üretiminde kullanımı [23, 34, 43]
- k-Peyniraltı suyunun değerlendirilmesinde kullanımı [44] sayılabilir.

#### 1.4. Beyaz Çürükçül fungusların Lignolitik Enzimleri

Beyaz çürükçül fungusların özellikle çevre ve atık biyoteknolojisinde yoğun olarak kullanımına yol açan 3 çeşit lignin yıkıcı (lignolitik) enzimi bulunmaktadır [45, 46].

##### 1.4.1. Lignin-peroksidaz (Ligninaz) (LiP E.C.1.11.1.14)

Lignine benzer yapıdaki bileşikleri yıkan lignin-peroksidazlar birçok beyaz çürükçül fungusun karakterize edilmiş olup ilk olarak 1983 yılında *Phanerochaete chrysosporium*' da saptanmıştır [47, 48]. Lignin-peroksidazlar sınırlı karbon ve azot ortamında gelişen fungusların sekonder metabolizmaları sonucu üretilen ekstraselüler (hücre dışı) enzimlerdir [49]. Lignin-peroksidaz üretmesi için yapılan *P. chrysosporium* kültürasyonu; yüksek oranda enzim üretimi için çalkalama oranının düşük devirde oksijen basıncının ise yüksek oranda tutulması gerektiğini göstermiştir. Her ne kadar oksijenlenmiş kültürlerde misel gelişimi hızlı olsa da lignin-peroksidaz üretimi %100 oksijen düzeyinde uyarıldığı rapor edilmiştir. [49]. *Phanerochaete chrysosporium* kültürlerinde sekonder bir metabolit olarak üretilen veratril alkolün lignolitik enzimlerin indüksiyonuna karıştığı düşünülmektedir. Buna göre kültürlerde, bu enzimlerin üretimini uyarmak amacıyla veratril alkol, enzimin bir substratı olarak kullanılabilir [50]. Lignin-peroksidaz, lignine benzer yapıdaki bileşiklerin propil yan zincirlerinin C-C bağlarını oksidatif olarak parçalar ve tek elektron oksidasyonu ile substratını okside eder. Bu enzim diğer peroksidazlara göre düşük sayılabilecek bir pH olan pH 2.5' da çalışabilmektedir.

40 kDa - 47 kDa moleküler ağırlığında pek çok lignin-peroksidaz izomeri olup çeşitli tekniklerle 15 kadar izomer ayrıştırılmıştır [51]. İzomerler arasındaki farklar aminoasit sayısı veya kompozisyonundaki değişikliklerden çok protein kısmının glikozilasyon seviyesindedir.

Günümüzde lignin-peroksidaz *Trametes versicolor* ve *Phlebia radiata* gibi beyaz çürükçül funguslardan da izole edilmektedir [52, 53].

Eşit oranda ürün elde etmek için kültür şartlarında küçük modifikasyonlar gerektirmesine rağmen bu funguslardaki proteinler temelde *Phanerochaete chrysosporium*'daki proteinler ile aynı karakteristiktirler.

#### 1.4.2. Mn-bağımlı peroksidaz (MnP E.C.1.11.1.13)

Kofaktör olarak mangana ihtiyaç duyan Mangan-bağımlı peroksidaz ilk kez *P. chrysosporium*'da tespit edilmiştir [54, 55]. Bu enzim odunda ve toprakta bulunan  $Mn^{2+}$ , yi yüksek oranda reaktif olan  $Mn^{3+}$ , e oksitler.  $Mn^{3+}$  ise düşük moleküler ağırlıklı araçlar (mediatörler) gibi davranıp fenolik lignin yapılarına saldırır. Mn-bağımlı peroksidaz; ligninaz ve lakkaz ile birlikte ligninin biyolojik parçalanmasından sorumludur. Mn-bağımlı peroksidaz'ın oksidasyon potansiyeli lignin-peroksidazlardan daha düşüktür. Lignin' in ve diğer fenollerin Mn-bağımlı peroksidaz tarafından oksidasyonu ortamdaki serbest mangan iyonlarına bağlıdır. Mn (II), Mn-bağımlı peroksidaz ya da lignin-peroksidaz için gerekli bir bileşen değildir ancak bu enzimlerin üretiminin düzenlenmesinde önemli bir etkiye sahiptir. Örneğin gelişme ortamında Mn (II)'nin düşük düzeyde bulunması hem lignin-peroksidaz'ın hem de Mn-bağımlı peroksidaz'ın üretimine izin verirken, Mn (II)'nin yüksek konsantrasyonları Mn-peroksidaz üretimini artırırken, lignin-peroksidaz üretimini baskılar. Gelişme ortamında Mn (II)'nin olmaması Mn-bağımlı peroksidaz'ın üretimini baskılamakta, lignin-peroksidaz üretimini transkripsiyonel seviyede düzenlediği bildirilmektedir [56]. Beyaz çürükçül fungusların tümü Mn-bağımlı peroksidaz'ı üretemez.

Eğer bir fungus lignini başarılı bir şekilde yıkıma uğratacaksa hem fenolik hem de fenolik olmayan lignin bileşenlerine atak etme kapasitesine sahip olmalıdır. Bazı kaynaklara göre; fenolik olmayan lignin bileşenlerinin yıkımında beyaz çürükçül funguslar tarafından üretilen esas enzimler lignin-peroksidazlar iken, fenolik lignin bileşenlerinin oksidasyonunda farklı türlerde ya lakkaz ya da Mn-peroksidaz görev alır.

Örneğin *T. versicolor* lignin-peroksidaz ve lakkaz salgıerken *P. chrysosporium* lignin-peroksidaz ve Mn-bağımlı peroksidaz salgılar [49].

#### 1.4.3. Lakkaz (Lac E.C. 1.10.3.2)

Lakkazlar yapısında bulunan bakır atomlarından dolayı çok bakırlı enzimler [57] olarak ifade edildiği gibi, yapılarında metal bulundurdukları için metaloenzimler olarak da ifade edilmektedirler.

Lakkaz ilk olarak 1883 yılında Yoshida tarafından *Rhus vernicifera*'nın özsuyundan elde edilmiş [58] ve 1985 yılında da Bertrand tarafından metal içeren bir oksidaz olarak karakterize edilmiştir. Bu nedenle lakkaz bilinen en eski enzimlerden biridir [59].

Lakkazlar, bakteriler [60, 61], böcekler [62, 63, 64], yüksek yapılı bitkiler [65] ve funguslar [66, 67, 68] olmak üzere temelde 4 canlı grubunda bulunan mavi bakır oksidazlarıdır.

Çeşitli kaynaklarda böcek ve bakterilerde de lakkaz enzimlerinin varlığından söz edilse de biyoteknolojide, yüksek yapılı bitkilerde ve özellikle de funguslarda bulunan lakkazlar ön plana çıkmaktadır.

Genellikle 4 bakır atomu içeren lakkaz enzimi diğer canlılara göre funguslarda daha yaygın olarak bulunmaktadır. Bir çok lakkaz geni klonlanarak elde edilen sekanslar uygun gen kütüphanelerinde depolanmıştır [59]. Lakkaz üreten hemen her fungus en az birkaç çeşit lakkaz üretmektedir. Örneğin *Rhizoctonia solani* [69] ve *Fusarium proliferatum*'da 4 [70], *Botrytis cinerea*'da [71-74] ise en az 3 farklı lakkaz saptanmıştır. Bunlar genellikle moleküler ağırlıklarıyla birbirlerinden ayrılırlar. Her geçen gün yeni tekniklerin geliştirilmesiyle yeni lakkaz türleri keşfedilmekte ve bunların da moleküler ağırlık, optimum pH, substrat özgülüğü vb. açıdan birbirlerinden farklı olabildiği saptanmaktadır [75, 76, 77]. Bu çeşitliliğin izolasyon ve saflaştırma işlemlerinin bir sonucu olup olmadığı ise henüz tam olarak bilinmemektedir [59].

Lakkaz enzimi funguslar içerisinde en fazla beyaz çürükçül funguslarda bulunur. Beyaz çürükçül funguslardan elde edilen lakkazların çoğu 55-85 kDa moleküler ağırlığındadır [78]. Çeşitli lakkazların saldırabildiği substrat dizisi oldukça geniş olup fenolikler (krezol gibi monofenoller; orto, meta, para difenoller; polifenoller), aromatik aminler bu substratların başında gelir. Lakkazlar ard arda 4 kez, 1 elektron oksidasyonunu katalizler sonra bu elektronları moleküler oksijene transfer ederek suya

indirger [68, 79]. Lakkazlar bu yolla lignindeki fenolik üniteleri fenoksi radikallerine oksitlerken belli yardımcı substratların (mediatörlerin=aracıların) varlığında fenolik olmayan lignin alt birimlerini de oksitleyebilir [57]. Bu substrat ABTS gibi yapay bir substrat [57] olabileceği gibi lakkaz üreten ancak Mn-peroksidaz veya lignin-peroksidaz üretemeyen *Pycnopus cinabarinus* beyaz çürükçül fungusunun fenolik olmayan lignin alt birimlerinin oksidasyonu için salgıladığı 3-hidroksi antranilat gibi doğal bir aracı da olabilir [79].

### 1.5. Lakkaz Enziminin Biyoteknolojide Kullanımı

Lakkaz enziminin oldukça fazla substratının olması ve dolayısıyla pek çok reaksiyonu katalizleyebilmesi biyoteknolojide pek çok alanda kullanılmasını sağlamıştır. Lakkaz enziminin biyoteknolojide kullanım alanları;

- a) Odunsu dokulardan lignin giderimi [46, 80]
- b) Etanol üretimi [81]
- c) İlaç analizi [82]
- d) Besin endüstrisi [83, 84]
- e) Biyolojik iyileştirme (Biyoremediasyon) [85]
- f) Atık su arıtımı [86, 87, 88]
- g) Giyim sanayisinde kullanılan kot kumaşının beyazlatılması [33, 89] şeklinde ifade edilebilir.

Odunsu dokulardan lignin giderimi (uzaklaştırılması) özellikle kağıt hamuru ve kağıt endüstrilerindeki öneminden dolayı oldukça ilgi çeken bir işlemdir. Kağıt hamuru hazırlamada kullanılacak odun liflerinden ligninin gideriminde 3 oksidatif enzim rol alır. Bu enzimler, lakkaz (polifenol oksidaz), Mn-peroksidaz (MnP) ve lignin-peroksidazdır. Kağıdın renginin ağartılmasında bu enzimlerin yararlı olduğu saptanmıştır. Bu konuda sunulan çoğu rapor fungal kültürlerce üretilen enzim karışımının uygulanmasının her bir enzimin ağartmadaki bireysel görevinin saptanmasını zorlaştırdığını bildirmektedir [90].

*T. versicolor* ile kağıt hamurunun ağartılmasının enzimolojisi incelendiğinde ağartma esnasında birkaç tipte lakkazın ve Mn-peroksidazların üretildiği lignin-peroksidazın ise üretilmediği tespit edilmiştir. Fungus ile ya da oksidatif enzimlerle ağartmada metoksil gruplarının demetilasyonu, ağartma çözeltisinde metanol oluşumuyla sonuçlanır. Buna göre lignin gideriminin indikatörü olan metanol oluşumu

izlenerek lignin uzaklaştırma oranı tespit edilebilir. *T. versicolor*' dan elde edilen lakkaz pH 3.5-6.5 arasında ve 60 °C' ye kadar aktivitesini sürdürebilir. Bu şartlar altında enzimin kararlılığını koruyabilmesi ağartma esnasında enzimin kağıt hamuruna bağlanmasıyla açıklanmaktadır. Kağıt hamuru içine oksijenin girmesi, hamurun çalkalanmasıyla sağlanırken hamur miktarının fazla olması durumunda hamur içine saf oksijen verilir. Reaksiyon ortamına ABTS ilavesi ile lignin gideriminin arttığı saptanmıştır. Çünkü ABTS odun lif duvarlarında bulunan artık lignin arasında bir elektron taşıyıcı olarak rol alıp oksitlenmeyi artırmakta dolayısıyla lignin giderimini de artırmaktadır [91].

Enzimin kullanım alanlarından biri de yenilenebilir ham materyallerden yakıt etanol üretimidir. Üretimi artırma çalışmalarında lignoselüloz hidrolizatlarında bulunan fenolik inhibitörlere karşı *S. cerevisiae*' nin direncini artırmak amacıyla *T. versicolor*' un lakkaz sentezinden sorumlu genleri *S. cerevisiae*' ye aktarılmıştır [81]. Bunun sonucunda *S. cerevisiae* ürettiği lakkazlarla fermentasyon inhibitörleri olan fenolik maddeleri yıkmış ve ortamda azalan fenolik madde miktarına bağlı olarak etanol üretimi de artmıştır [59].

Lakkaz ile yapılan diğer bir çalışma ilaç saptama sisteminin içine enjekte edilen ilaç örneklerinde kodeinden morfini ayırmak için lakkaz tabanlı yeni bir enzimatik metot kullanımıdır [82]. Buna göre bir Clark oksijen elektrotuna tutuklanmış glikoz dehidrojenaz ve lakkaza dayalı bir enzim sensörü yapılmış olup, morfin oksijen tüketimiyle lakkaz tarafından okside edilir ve glukoz dehidrojenaz tarafından da eski haline getirilir. Lakkaz kodeini oksitleyemediği için sensör morfin için seçicidir. Morfin 32 nM ve 10 µM arasında saptanabilmektedir. Hızlı ve teknik olarak basit olan metot, 20 dakikada bir miktar ölçümü için belli bir oranda numunenin enjeksiyonundan sonra 1 dakikadan daha kısa bir sürede morfin ile kodein arasındaki ayrımı sağlar [59].

Besin endüstrisinde lakkaz enzimi, şıra ve şaraptan fenol giderimi ve biyosensör üretimi gibi alanlarda kullanılmaktadır [84].

Şıra ve şarap; etanol, organik asitler, tuzlar ve fenolik bileşikler gibi birçok farklı kimyasal bileşiğin kompleks karışımlarıdır. Renk ve tat şarapta farklı türlerde bulunan belli fenolik bileşiklere bağlıdır. Fenolik bileşiklerin pek çok grubu şarapta bulunur. Sinamik asit türevleri ve Kateşinler tüm şaraplarda farklı miktarda bulunurlar. Kırmızı ve pembe şarap antosiyanin varlığıyla karakterize edilir [92].

Şarapta bulunan tüm fenolikler şarabın yıllanması esnasında çeşitli değişimlere uğrarlar ve çeşitli kimyasal reaksiyonlarla birlikte bazı problemler ortaya çıkabilir [83,

93]. Bu sebeple şarabı ve şırayı fenol bağımlı renksizleşme ve/veya tatsızlaşmadan korumak için farklı metotlar geliştirilmiştir. Bunlardan biri lakkaz ile polifenol oksidasyonunu sağlamaktır [94].

Lakkaz enzimi çeşitli alanlarda biyosensör olarak da kullanılmaktadır. Biyosensör; fizyolojik veya biyokimyasal bir değişim hakkında bilgileri saptayan, nakleden ve kaydeden bir cihazdır. Teknik olarak biyosensör, biyolojik bir kısım ile elektronik bir iletim sisteminin birbirini tamamladığı, biyokimyasal bir sinyali miktarı ölçülebilir bir elektriksel yanıtla dönüştüren bir probdur [84]. Bir biyosensörün fonksiyonu biyolojik olarak aktif materyalin biyokimyasal özgülüğüne bağlıdır. Aromatik amin [95] ve fenolik bileşik [96, 97] saptanması amacıyla lakkaz içeren pek çok biyosensör geliştirilmiştir.

Funguslardan elde edilen enzimler çevresel kirleticilerin büyük bir çeşidinin yıkımını sağladıkları için oldukça yararlı enzimlerdir. Kirleticilerin yıkımından sorumlu enzimlerin çoğu ekstraselüler olup odunun yıkımında da rol alır [59]. Yapılan bir çalışmada 2,4,6-triklorofenollerin izomerlerinin toksisitesi *Parus tigrinus* ve *Coriolus versicolor* beyaz çürükçül funguslarının sıvı kültürlerinde çalışılmış, triklorofenolün 2,6-dikloro-1,4-hidrokinole ve 2,6-dikloro-1,4 benzokinona dönüşümünden hem saf fungal kültürlerin hem de saflaştırılmış lignolitik enzimlerin (Mn-peroksidazlar ve lakkazlar) sorumlu olduğu tespit edilmiştir [98]. Ancak *P. tigrinus* kültürlerinde bulunan 2,4,6-triklorofenollere ilk atak Mn-peroksidaz tarafından olurken *C. versicolor* kültürlerinde bulunan 2,4,6-triklorofenollere ilk atak lakkaz tarafından gerçekleşmiştir. Buradan yola çıkarak her iki fungus tarafından da üretilen aynı enzimlerin regülasyonunun farklı olduğu düşünülebilir [59].

*Trametes hirsuta* beyaz çürükçül fungusundan elde edilen lakkaz ile alkenleri okside etmek mümkündür [99]. Oksidasyon iki basamaklı bir işlemde gerçekleşmektedir. İlk basamak reaksiyona bir aracı madde eklenmesiyle primer (ilk) substratın oksidasyonunun katalizlenmesi ve daha sonra oksitlenmiş aracı sekonder maddenin sekonder substrat olan alkeni uygun keton veya aldehite oksitlemesidir. En iyi sonuçlar aracı madde olarak hidroksibenzotriazol kullanılarak elde edilmiş olup bu işlemin sonunda aromatik alil alkoller 20 °C' de 2 saat içinde tamamen oksitlenmiştir. Alifatik alil alkoller ise 45 °C 20 dakikada %70' e kadar oksitlenmiştir.

*Flavodon flavus* düşük azot ortamında Azure B, Brilliant yeşil, Kongo kırmızısı, Kristal viyole ve Remazol Brilliant mavi R gibi birçok sentetik boyanın rengini gidermektedir [100]. *T. versicolor* kültürlerinin Poli R-478 polimerik boyasının yaklaşık

%90 oranında rengini giderdiği gösterilmiştir. Bu çalışmalar, lakkaz enziminin çevre kirliliğine neden olan pekçok boya ve renkli atıksuların renginin gideriminde alternatif bir yöntem olarak kullanılabilceğini göstermektedir.

*T. versicolor* lakkazları yine çevre kirliliğine neden olan linyitten (kahverengi kömür) köken alan hümik asitlerin rengini gidermek amacıyla da kullanılmaktadır [101]. İki azo boyanın (Orange G ve amaranth) kısmi renk giderimi ile iki trifenil metan boyasının (bromofenol mavi ve malaşit yeşili) tam olarak renginin giderimi tek fenoloksidaz olarak lakkaz üreten *Pycnoporus sanguineus* kültürleri tarafından başarılmıştır [102]. Enzim üretimi boyanın renginin giderimi ile ilişkili olup, boyanın misellere tutunması nedeniyle yalnızca %3 civarında boya uzaklaştırılmıştır. *Trametes hirsuta* ve bu fungustan saflaştırılan bir lakkaz ile 23 endüstriyel boya [103] ve boyama tekstillerinde kullanılan triarilmetan, azo ve antrakinonik boyaların yıkımı sağlanmıştır [104].

Bazı çalışmalarda kullanılan fungusun veya lakkaz enziminin çeşitli maddeler üzerine tutuklanmasıyla enzimin kararlılığının ve kullanım süresinin artırılabilceği de saptanmıştır. Örneğin bir çalışmada, alüminyum üzerine *T. hirsuta*'nın tutuklanması ile enzimin termal kararlılığı artmış ve halitler, bakır şelatörleri ve boyama katkı maddeleri gibi inhibitörlere karşı da tolerans sağlanmıştır. Buna ek olarak tutuklanmış lakkazın boyalara uygulanması ile toksisitenin %80'e kadar azaldığı *P. putida*'nın oksijen tüketme oranına bağlı olarak saptanmıştır. Aynı çalışmada tutuklanmış lakkaz ile rengi giderilen tekstil atık sularının yeniden boyama için kullanılabilceği de saptanmıştır [59].

Lakkaz enzimi toksik çevre kirleticileri olan herbisitleri [29] yapısal değişikliğe uğratarak inaktif analoglarına dönüştürebilmekte, böylece herbisitlerin hem toksikliği giderilmekte hem de bu toksisiteden pek çok canlının etkilenmesi önlenmektedir. Reaksiyon ortamına lakkaz aracı maddesi olan ABTS eklenmesiyle biyolojik yıkım daha da fazla gerçekleşebilmektedir.

Ülkemizde zeytinyağı fabrikaları, kağıt fabrikaları gibi pek çok ticari işletme atık sularını herhangi bir arıtıma tabi tutmadan direkt olarak doğaya boşaltmakta, bu atık sular da gerek alıcı çevrede gerekse o çevrede bulunan çeşitli canlılar üzerinde olumsuz etkilere neden olmaktadır. Bazı işletmeler ise kimyasal yollarla atık sularını arıtmaktadır. Ancak arıtmada kullanılan kimyasalların kendileri de birer kirleticidir. Bu nedenle atık su arıtılmasında kullanılabilcek en akıllıca yöntem biyolojik arıtım olup lakkaz enzimi bu alanda da kullanılabilir. Zeytinyağı fabrikası atık suları ve



kağıt fabrikası atık sularında (sülfite atık suyu) bulunan toksik fenolik bileşikler lakkaz enzimlerinin uygulanmasıyla daha az toksik hale getirilebilir. Ayrıca bu atık sular lakkaz enziminin başlıca kaynakları olan beyaz çürükçül fungusların gelişimi amacıyla besiyeri olarak da kullanılabilir [34, 87].

Çevre kirliliği açısından en büyük problemlerden biri de boya fabrikası atık sularıdır. Bu fabrikalar atık sularını genellikle sucul ortamlara boşaltırlar. Boya içerikli atık suların toksik olmasının yanı sıra renklenmeye sebep olması güneş ışınlarının sulara girişini engellemektedir. Güneş ışınlarının engellenmesiyle sularda yaşayan fotosentetik canlılar fotosentez yapamaz ve sulardaki oksijen seviyesi hızla düşerek sucul canlıların ve sucul canlılarla beslenen canlıların toplu ölümlerine neden olur. Bu nedenle renk giderimi ve genellikle de toksisiteyi azaltan lakkaz enzimleri bu atık suların arıtımında yoğun olarak kullanılabilir.

İndigo, tekstil endüstrisinde yaygın olarak kullanılmakta olup çevre kirliliğine neden olan biyolojik yıkıma dirençli bir maddedir [33]. Bu boya tekstil endüstrisinde özellikle kot kumaşlarının boyanmasında kullanılmakta olup, bazı kotların belirli bölgelerinde boyanın renginin açılması [89, 105] için taşlama yapılmaktadır. Her ne kadar taşlamanın amacı kotun belirli bölgelerinde indigo boyanın renginin açılması olsa da taşlama esnasında sürtünmeden dolayı kumaşta zedelenmeler gerçekleşmekte ve kotun kullanım süresi azalmaktadır. İndigo boyanın lakkaz enzimiyle kotun belirli bölgelerinde enzimatik olarak kısmi yıkımıyla kumaşta sürtünmeden dolayı meydana gelen dejenerasyon ortadan kaldırılmış olacaktır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. Beyaz Çürükçül Fungusların Lakkaz Üretim Yeteneğinin Artırılmasına Yönelik Çalışmalar

Lakkaz enzimi beyaz çürükçül funguslar tarafından ekstraselüler olarak üretilen çok bakırlı bir enzimdir. Lakkaz esas olarak Mangan bağımlı peroksidaz ve lignin peroksidaz enzimleriyle birlikte lignin yıkımında görev almaktadır. Enzimin substrat özgülüğünün geniş olması ve fenolik yapıdaki birçok bileşiği direkt, fenolik olmayan yapıdaki pekçok bileşiği ise çeşitli aracı maddeler vasıtasıyla yıkabilmesi lakkaz enziminin pekçok alanda kullanılabilmesine olanak sağlamıştır.

Bu nedenle pekçok araştırmacı hem çeşitli funguslarda lakkaz enziminin varlığını tespit etmeye hem de üretilen lakkazın miktarını maksimum seviyelere çıkarmaya çalışmaktadır.

#### 2.1.1. Çeşitli Ağırmetallerin Lakkaz Üretimi Üzerine Etkisi

Yapılan bazı çalışmalarda lakkaz enziminin yapısında bakır atomlarının bulunmasından yola çıkarak enzim üretimini artırmak amacıyla gelişim ortamına çeşitli oranlarda  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ilave edilmiş ve aktivitedeki değişim incelenmiştir.

Palmieri ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada *Pleurotus ostreatus*' un üreme ortamına 150  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ilave edilmiş ve buna bağlı olarak enzim aktivitesinin arttığı gözlenmiştir (30 U/ml). Bu şartlar altında gelişimin 6. gününden sonra  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ilave edilmemiş temel ortama kıyasla lakkaz aktivitesinde 50 katlık bir artış gerçekleşmiştir [106].

*Pleurotus ostreatus* ile yapılan diğer bir çalışmada, fungusun üretildiği azotça sınırlı sıvı ortama gelişimin 12. gününde 0.2, 0.5, 1 ve 5 mM  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ilave edilmiştir. 0.2 mM konsantrasyonda önemli bir aktivite artışı gözlenmezken kontrol ile kıyaslandığında en yüksek aktivite artışı 1 mM  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ortamında olup, aktivite 8 kat artmıştır. 0.5 mM bakır konsantrasyonunda aktivite 4.7, 5 mM bakır konsantrasyonunda ise 3.7 kat artmıştır.  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  üretimin ilk günlerinde ilave edildiğinde ise lakkaz aktivitesinde hemen artış gözlenmemiş, aktivite kültürlerin gelişiminin yavaşladığı 9. günden itibaren artmaya başlamıştır [107].

Levin ve arkadaşları yaptıkları çalışmada *Trametes trogii*' nin gelişim ortamına çeşitli konsantrasyonlarda bakır ilave etmiş ve buna bağlı olarak hem Mn-peroksidaz aktivitesinin hem de lakkaz aktivitesinin arttığını gözlemiştir. En yüksek lakkaz aktivitesi ise kullanılan en yüksek konsantrasyon olan 1.6 mM Cu ile elde edilmiştir [29].

Dittmer ve arkadaşları bakırın *Phanerochaete chrysosporium* beyaz çürükçül fungusunda üretilen lakkaz izoenzimleri için güçlü bir indükleyici etkisi olduğunu rapor etmiştir [108].

Baldrian ve Gabriel tarafından yapılan bir çalışmada, buğday sapı üzerinde gelişmekte olan *P. ostreatus* kültürlerinden kolonizasyonun erken basamağı olan 8., kolonizasyonun tamamlandığı basamak olan 22. ve bitkisel substrat yıkımının en hızlı basamağı olan 28. günlerde kültür sıvısı alınmış, bu ekstraktlara 0,01-50 mM bakır ilave edilmiş ve 18 saatlik inkübasyondan sonra ekstraktlardaki lakkaz aktivitesi ölçülmüştür. Sekiz günlük kültürden sadece 0.5-10 mM arasında bakır eklenmiş olan ekstraktlarda lakkaz aktivitesi yükselmiştir. Maksimum aktivite kontrolden %40 daha fazla olan 10 mM bakır bulunan ekstraktta gerçekleşmiştir. 22 günlük ve 28 günlük kültür ekstraktlarında ise en yüksek lakkaz aktivitesi 1 mM bakır içerenlerde gerçekleşmiş olup aktivite kontrole göre sırasıyla 3.2 ve 6.9 kat artmıştır [107].

Yapılan pekçok çalışma bakır ilavesinin pekçok farklı türde fungus tarafından üretilen lakkaz üzerine pozitif etkisini rapor etmektedir. Bunlara örnek olarak *Ceriopsis subvermispora* [109, 110], *T. versicolor* [111], *Marasmius quercophilus* [112], *P.ostreatus* [106], *P. chrysosporium* [108], *T. pubescens*, *T. multicolor*, *T. hirsuta*, *T. gibbosa*, *T. suaveolens*, *G. applanatum*, *Polyporus ciliatus*, *Panus tigrinus* [113], *P. sajor-caju* [114] ve *T. trogii* [29] beyaz çürükçül funguslarının lakkazları verilebilir. Enzimin transkripsiyon düzeyinde düzenlendiğini [106, 111, 114] ve *T. versicolor*' da bakır içermeyen ortamdaki kültürlerle, bakır ilavesinden sonra 15 dakika içerisinde transkripsiyon düzeyinin arttığı rapor edilmektedir [111].

Yapılan araştırmalar beyaz çürükçül fungusların normal gelişimleri için eser miktarda Cd, Mn veya Zn gibi ağır metallere ihtiyaç duyduğunu göstermektedir. Ancak bu metallerin ortamda gereğinden birkaç kat fazla olması durumunda fungal gelişimi baskıladığı, morfolojik ve fizyolojik değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir [39]. Ayrıca yapılan çalışmalarda, beyaz çürükçül funguslarla veya bu funguslardan izole edilmiş enzimlerle lignoselülozun ve ksenobiyotiklerin ekstraselüler yıkımı esnasında

ağırmetallerin hem ekstraselüler enzimlerin aktivitesine hem de fungal kolonizasyona etki ettiği saptanmıştır [39].

Galhaup ve Haltrich tarafından yapılan bir çalışmada, *Trametes pubescens*' in gelişim ortamına ilave edilen ağırmetallerden sadece mangan ve bakırın lakkaz oluşumunu artırdığı, buna karşın Ag, Cd, Hg ve Zn ağırmetallerinin ise lakkaz oluşumunun artırılmasında etkili olmadığı bildirilmiştir [113].

Baldrian ise *P.ostreatus*' da 1-5 mM Cd ilavesiyle lakkaz aktivitesinin önemli oranda arttığını, 1mM Ag, Hg, Pb, Zn ilavesinde ise enzim aktivitesinin azaldığını bildirmektedir [39]. *P.ostreatus*' un üretildiği azotça sınırlı sıvı ortama gelişimin 12. gününde son konsantrasyonda 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 ve 5 mM olacak şekilde Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> ilave edildiğinde, üretimin ilk haftasında sadece kontrol erlenlerinde bulunan funguslarda dikkate değer miktarda lakkaz üretimi gerçekleştiği (3 U/ml), aktivitenin üretimin 10. gününden sonra hızla arttığı rapor edilmektedir. En yüksek lakkaz aktivitesinin ise 14. günde kontrolden 18.5 kat daha fazla aktivitenin gözleendiği 2 mM' lık konsantrasyonda gerçekleştiği tespit edilmiştir [107].

*Stereum hirsutum* ve *Phanerochaete chrysosporium* ile yapılan bir çalışmada, kültür ortamına 0.1-1 mmol/L oranlarında kadmiyum nitrat ilave edilmiştir. 10. günde kültür sıvıları alınarak lakkaz aktiviteleri ölçülmüş ve mU/g olarak ifade edilmiştir. Aktivite değerleri kontrol ile kıyaslandığında tüm konsantrasyonlarda lakkaz aktivitesinin düştüğü, dolayısıyla kadmiyumun kullanılan konsantrasyonlarda *Stereum hirsutum* ve *Phanerochaete chrysosporium* beyaz çürükçül funguslarının lakkaz enzimleri üzerine inhibitör etki gösterdiği ifade edilmiştir [115].

### 2.1.2. Çeşitli Ortamların ve Katkı Maddelerinin Lakkaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Yapılan pekçok çalışma, farklı besiyerlerinin ve bu besiyerlerine ilave edilen katkı maddelerinin birçok türde beyaz çürükçül fungusta lakkaz enzimi aktivitesini artırdığını göstermektedir.

Arora ve Sandhu tarafından yapılan bir çalışmada, *Daedalea flavida*' nın üreme ortamlarına (lignin ve malt ekstrakt ortamları) lakkaz üretimi için farklı lignin örnekleri (indulin AT, polifon), fenolik bileşikler (gallik asit, tannik asit, salisilik asit, orsinol ve resorsinol) ve şekerler (D-glukoz, maltoz, laktöz, sorbitol ve sükröz) eklenmiştir. Enzim aktivitesi malt ekstrakt ortamında 7. günde maksimuma ulaşırken (1.50 CU), lignin ortamlarında 14. günde maksimum değerine ulaşmıştır (1.45 CU). Kullanılan

indükleyiciler içinde en etkili olan maddenin indulin AT olduğu saptanmıştır. 20 °C sıcaklık ve % 0.2' lik indulin AT *Daedalea flavida'* nın maksimum enzim aktivitesi için optimum bulunmuş olup, indulin AT' nin daha yüksek konsantrasyonlarında enzim üretiminin düşmesi indulin AT' nin toksisitesinden ileri gelmektedir. Farklı lignin preparasyonlarında ve fenolik bileşiklerde kısıtlı fungal gelişime rağmen yüksek, etkili fungal gelişimi destekleyen şeker içerikli ortamlarda ise düşük enzim aktivitesinin saptanması fungal kütle ile lakkaz üretimi arasında herhangi bir bağlantı olmadığını göstermektedir [116].

Arora ve Gill tarafından yapılan bir çalışmada, inkübasyon periyodunun, fungusların üretildiği farklı temel ortamların ve bu temel ortamlara ilave edilen farklı katkı maddelerinin *Phlebia fascicularia*, *P. floridensis* ve *Dichomitus squalens* beyaz çürükçül fungusları tarafından üretilen lakkaz enzimleri üzerine etkisi tespit edilmiştir. Lakkaz üretimi *P. floridensis'* de 8., *P. fascicularia'* da 10., *D. squalens'* de ise 18. günlerde maksimuma ulaşmış, oysaki maksimum biyokütle *D. squalens'* de 16., *Phlebia spp.'* de ise 8. günde elde edilmiştir. *Phlebia spp.'* de biyokütlenin azalışıyla birlikte 20. günde hem enzim üretiminde hem de spesifik lakkaz aktivitesinde bir artış gözlenmiştir. Bunun nedeni fungal otoliz esnasında açığa çıkan az miktarda intraselüler lakkaz olabilir [23].

Maksimum enzim üretimi *P. fascicularia'* da MSB-MEB ortamında, diğer funguslarda ise pekçok aminoasidi birarada bulunduran MEB (Malt Extract Broth) ortamında gerçekleşmiştir. Farklı temel ortamlara veratril alkolün ilavesi ile farklı funguslarda, 1.2 ile 16 kat arasında değişen oranlarda enzim üretiminin arttığı gözlenmiştir. Benzer şekilde guaiakol ilavesiyle enzim üretiminde 2 ile 38 kata kadar bir artış gerçekleşmiştir [23].

MSB (Mineral Salts Broth) ortamına lignin örneklerinin ilavesi ile lakkaz üretiminde 4-100 kat arasında artış gerçekleşmiştir. Benzer artış *Daedalea flavida*, *Lentinula edodes* ve *Polyporus sanguineus'* da da rapor edilmiştir [116, 117, 118].

Yine MSB ortamına çeşitli tarımsal atıkların ilavesiyle *P. floridensis'* de enzim üretimini 84 katına çıkaran şeker kamışı sapı en iyi substrat olurken, aynı fungusta buğday sapı ile 59 kat, pirinç sapı ile 22 katlık bir artış gerçekleşmektedir. Bu artıkların MEB ortamına ilavesiyle *P. floridensis'* in enzim üretiminde önemli bir artış gözlenmemiştir [23].

Arora ve Gill tarafından yapılan diğer bir çalışmada, *Phlebia radiata* beyaz çürükçül fungusunun inkübe edildiği MSB ortamına veratril alkol ilavesiyle lakkaz

üretimi 200 kattan daha fazla artmıştır. Diğer yandan MEB ortamına veratril alkol ilavesiyle *Daedalea flavida*, *Phlebia brevispora* ve *Polyporus sanguineus*' da lakkaz üretimi 2 ile 6 kat arasında artmıştır. Benzer şekilde MSB ortamına guaiakol eklenmesiyle *P. radiata*' da enzim aktivitesi 232 kat gibi oldukça yüksek bir oranda artmıştır. MEB ortamına ilave edilen guaiakol ise *D. flavida*' da lakkaz enzimi üretimini 20 kat artırmıştır [119].

Guaiakol ilavesiyle *P. florida* ve *P. cinnabarinus*' da lakkaz üretiminin baskılanmasına rağmen [120, 121], *Stereum hirsutum* ve *Marasmius graminium*' da [122] guaiakolün indükleyici etkisi olduğu rapor edilmiştir. Guaiakol' ün funguslardaki baskılayıcı etkisi bu çalışmalarda kullanılan guaiakolün yüksek konsantrasyonlarda olmasından kaynaklanabilir [119].

Test edilen funguslar içerisinde çeşitli tarımsal artıkların indükleyici etkisine en hassas olanları *P. radiata* ile *D. flavida*' dır. MSB ortamına şeker kamışı sapı ilavesiyle *P. radiata* ile lakkaz üretimi 222 kat artarken MEB ortamına buğday sapı ilavesiyle *D. flavida*' da lakkaz üretimi 170 kat artmıştır [119]. Raghukumar ve arkadaşları şeker kamışı sapının *Flavodon flavus*' un lakkaz üretimi için de oldukça iyi bir substrat olduğunu rapor etmektedir [123].

Farklı ortamlara eklenen çeşitli indükleyiciler içerisinde veratril alkol, guaiakol, şeker kamışı sapı ve buğday sapı iyi lakkaz indükleyicileridir.

Günümüzde çevre kirliliği açısından atık lignoselülozik maddeler oldukça önemli bir yere sahiptir. Çünkü bu maddelerin yapısında bulunan lignin polimeri, biyolojik ayrışmaya dirençli yani rekalsitranttır [124]. Bu nedenle çeşitli araştırmacılar, bu atıkların lignin bileşenini yıkabilen fungusları kullanarak hem lignini uzaklaştırmayı hem de ligninin yıkımı esnasında oluşturulan endüstriyel açıdan önemli bazı enzimlerin üretimini artırmayı amaçlamaktadır.

Şık ve Ünyayar tarafından yapılan bir çalışmada, kullanım alanı oldukça kısıtlı (sadece yakıt olarak) lignoselülozik bir atık olan pamuk sapının *Phanerochaete chrysosporium* ve *Funalia trogii* ile yarı-katı fermentasyonu sonucu hem pamuk sapından lignin gideriminin hem de bu esnada lakkaz, ligninaz ve selüloz gibi enzimlerin aktivitelerinin artırıldığı rapor edilmektedir. Yapılan çalışmada, fungusların inkübe edildiği stok temel ortamların bir bölümüne glukoz ilave edilirken, bir bölümüne ilave edilmemiş ve böylece glukozun da enzim üretimindeki etkisi test edilmiştir. Sonuç olarak, *F. trogii*' nin oldukça yüksek lakkaz aktivitesi gösterdiği saptanmıştır. Glukoz içeren ortamda lakkaz enzimi 10. ve 16. günlerde maksimum aktivite

gösterirken, glukoz içermeyen ortamda aynı enzim 18. günde maksimum aktiviteye ulaşmıştır. Bu durum, glukoz bulunmayan ortamda *F. trogii*' nin kolaylıkla metabolize edebileceği bir karbon ve enerji kaynağının olmaması ve dolayısıyla üreme hızı ile buna bağlı olarak enzim üretiminin glukoz içeren ortama kıyasla daha geç ve düşük olmasıyla açıklanabilir [124].

Kahraman ve Yeşilada tarafından yapılan benzer bir çalışmada, iki tip atıksu (alkol fabrikası atıksuyu, zeytinyağı fabrikası atıksuyu) ve bir lignoselülozik atık (pamuk sapı), *Funalia trogii* ve *Coriolus versicolor* için kültür ortamı olarak kullanılmıştır. Hem vinas (alkol fabrikası atıksuyu) hem de zeytinyağı üretimi esnasında ortaya çıkan atıksu, koyu rengi ve yüksek oranda toksik madde içeriğinden dolayı çevreye oldukça zarar vermektedir. Çalışmada kullanılan diğer bir atık olan pamuk sapı da pamuk yetiştirilen ülkelerde oldukça fazla miktarda çevreye atılmakta olup, bu atığın lakkaz üretimine etkisi de test edilmiştir. Funguslar hem pamuk saplarının eklendiği sentetik ortamlarda hem de pamuk saplarının eklendiği ya da eklenmediği doğal ortamlarda (vinas ve zeytinyağı atıksuyu) yüksek oranlarda lakkaz üretmiştir. En yüksek lakkaz aktivitesi düşük karbon yüksek azot içeren ve pamuk sapı eklenmiş sentetik ortamlarda inkübe edilen kültürlerle gerçekleşmiştir. Bu ortamda *C. versicolor*' da kontrole göre 43 kat daha fazla lakkaz aktivitesi saptanmıştır. Atıksulara pamuk sapının eklenmesiyle lakkaz üretimi önemli oranda artmıştır [34].

Yapılan pekçok çalışmada, çeşitli aromatik maddelerin çeşitli türde funguslarda lakkaz enziminin üretimini artırdığı ifade edilmektedir. Örneğin 2,5-kilidin ilavesiyle *Pycnoporus cinnabarinus*' un lakkaz üretimi maksimuma çıkarken [121], şiringaldazin ve guaiakol ile de *Coriolus hirsutus*' dan lakkaz salınımı artmaktadır [125]. Benzer şekilde *Botrytis cinerea*' nin lakkaz üretim yeteneği gallik asit ile indüklenirken [126], *Pleurotus sajor-caju*' nun ferulik asit ile artmaktadır [127]. Ancak bu aromatik bileşiklerin çoğu ya çok zararlı ya da pahalı olup, bu nedenle bu bileşiklerin endüstriyel uygulamalarda kullanımı neredeyse olanaksızdır. Buna göre lakkaz üretimini artıracak çevreci ve ekonomik olarak uygun bileşiklere olan ilgi oldukça artmıştır [128].

Kim ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, *Lentinus edodes* ve *Pleurotus ostreatus*' un gelişim ortamına çeşitli konsantrasyonlarda gallik asit, ferulik asit, vanillik asit, sikloheksimit ve puromisin eklenmiş ve lakkaz aktivitesindeki değişim incelenmiştir. Her iki fungus için de herhangi bir indükleyici maddenin eklenmediği kontrol kültürlerinde lakkaz aktivitesi saptanmazken, puromisin hariç diğer indükleyicilerin ilavesiyle lakkaz aktivitesi hızlı bir şekilde artmıştır. Elde edilen

sonuçlara göre; puromisin hariç tüm indükleyicilere *L. edodes*' den daha hassas olan *P. ostreatus* için en iyi indükleyici madde 1 mM konsantrasyondaki ferulik asit iken, *L. edodes* için en iyi indükleyici madde 2 mM konsantrasyondaki gallik asittir [129].

Lee ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, *Trametes versicolor*, *Coriolus hirsutus* ve *Grifola frondosa*' nın gelişim ortamına çeşitli alifatik alkollerin özellikle etanolün ilavesiyle lakkaz enziminin üretiminin artırılması amaçlanmış ve elde edilen sonuçlar aromatik indükleyici maddelerle kıyaslanmıştır. Çalışmada, alkolsüz ortamda *T. versicolor*' un 7 günlük üretiminden sonra lakkaz aktivitesi 0.11 ünite/ml iken, etanol ile lakkaz üretimi 1.25 ünite/ml' den daha fazla olmuştur. Bu da etanol ile üretilen lakkazın alkolsüz ortamda üretilen lakkazdan 11.4 kat fazla olduğunu göstermektedir. Aynı fungusun gelişim ortamına metanol ilavesiyle lakkaz aktivitesi alkolsüz ortamdan 3 kat daha fazla gerçekleşirken, 2-propanol ilavesiyle de lakkaz üretimi önemli oranda artmıştır. Bununla birlikte *T. versicolor*' un gelişim ortamına 2-metil-1-propanol ve 1-bütanol ilave edildiğinde hücre gelişimi şiddetle baskılanmış bu nedenle önemli bir lakkaz aktivitesi saptanamamıştır [128].

*C. hirsutus*' un 20g/l etanol ilave edilmiş ortamda 27 °C' de 7 gün inkübasyonu sonucunda, etanolsüz ortama göre 4 kat daha fazla lakkaz üretimi gerçekleşirken aynı şartlarda *G. frondosa*' da 0,58 ünite/ml enzim aktivitesi gerçekleşmiştir [128].

*T. versicolor*' un gelişim ortamına ilave edilen çeşitli konsantrasyonlarda etanolün 40 g/l' ye kadar lakkaz aktivitesini artırdığı saptanmıştır. 40 g/l etanol içeren ortamda lakkaz aktivitesi 2.6 ünite/ml olup, bu değer etanolsüz ortamdaki aktiviteden 24 kat daha fazladır. Ayrıca 20 g/l etanol içeren ortamdaki lakkaz aktivitesi aynı fungusun gelişim ortamına ilave edilen ferulik asit, gallik asit ve ksilidin kadar yüksektir. Ancak 50 g/l etanol konsantrasyonunda hücre gelişimi şiddetle inhibe olmakta ve lakkaz üretimi gözle görülür derecede azalmaktadır. Aynı fungusun gelişim ortamına veratril alkol ilavesiyle en yüksek lakkaz aktivitesi elde edilirken (60 ünite/ml) aynı ortama guaiakol ilavesiyle de yüksek aktivite (10 ünite/ml) gözlenmiştir. Her ne kadar elde edilen lakkaz aktiviteleri etanol ilavesiyle elde edilenden yüksek de olsa, etanolün veratril alkol ve guaiakolden daha güvenli ve ucuz olması nedeniyle lakkaz indükleyicisi olarak etanolün kullanımı daha ön plana çıkmaktadır [128].



### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1. Çalışmada Kullanılan Funguslar**

Çalışmada Basidiomycetes sınıfına dahil olan beyaz çürükçül funguslardan *Funalia trogii* ATCC 200800 ve *Trametes versicolor* ATCC 200801 kullanılmıştır. Bu funguslar İnönü Üniversitesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji/Biyoteknoloji laboratuvarında saf kültür olarak muhafaza edilmektedir.

#### **3.2. Çalışmada Kullanılan Fungusların Üretimi ve Saklanması**

Çalışmada kullanılan fungusların devamlılığını sağlamak için funguslar, Sabouraud dextrose agar (SDA) plaklarında 30 °C' de 4-6 gün inkübe edilmiş ve her 4-5 haftada bir taze besiyerine pasajlama yapılmıştır. Fungus kültürleri 4 °C' de buzdolabında saklanmıştır.

#### **3.3. Çalışmada Kullanılacak Stok Fungus Kültürlerinin Hazırlanması**

SDA plaklarında üremiş olan fungus kültürlerinden yatık agara pasajlama yapılmış ve 30 °C' de 4-6 gün inkübe edilmiştir. Yatık agarda üretilen fungus kültürlerine 10 ml steril distile su eklenerek misel süspansiyonu hazırlanmış ve misel süspansiyonundan 5 ml alınarak 100 ml Sabouraud dextrose broth (SDB) içeren 250 ml' lik erlene ekim yapılmıştır. 30 °C' de 150 rpm' de çalkalamalı etüvde 5 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kültür düşük devirde homojenize edilerek çalışmanın amacına uygun olarak ekim yapılmıştır.

#### **3.4. Peletlerin Hazırlanması**

Tekrarlı kesikli çalışmalarda Bölüm 3.3' de belirtildiği şekilde hazırlanan pelet formundaki stok fungus kültürleri, steril koşullarda homojenize edilmeden test ortamlarına eklenmiştir.

### 3.5. Fungusların Lakkaz Aktivitesi ve Üremesi Üzerine $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ Etkisi

#### 3.5.1. Fungus Üremesi Üzerine $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ Etkisinin Katı Besiyerinde Araştırılması

Bu çalışma,  $\text{CuSO}_4$ ' ın fungus üremesini inhibe edici konsantrasyonunun saptanması için yapılmış ve bu amaçla farklı konsantrasyonlarda  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0.5, 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mM) içeren SDA plakları hazırlanmıştır. *F. troglia* kültürü Bölüm 3.3' de belirtildiği şekilde hazırlandıktan sonra plakların merkezine 1 damla olacak şekilde ekim yapılmış ve 6 gün inkübe edilmiştir. Her gün koloni çapları ölçülerek kontrole göre inhibisyon %' si hesaplanmıştır.

Aynı çalışma *T. versicolor* için de (0.5, 1, 2, 3, 5 mM  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  olacak şekilde) yapılmıştır. Her gün koloni çapları ölçülerek kontrole göre inhibisyon %' si hesaplanmıştır.

#### 3.5.2. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ İçeren Sıvı Besiyerinde Fungus Üretimi

Bu amaç için  $\text{CuSO}_4$  içeren distile su ve stok temel besiyerleri hazırlanmıştır. Çalışmalarda kullanılan STO içeriği Çizelge 3.1' de verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Stok temel ortam (STO) içeriği

Kullanılan Bileşen	Miktar
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.2 (g)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1 (g)
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05 (g)
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0.5 (g)
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.035 (g)
Glukoz	2 (g)
Maya Özü	1 (g)
Distile su	1000 (ml)

Farklı konsantrasyonlarda  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0.5, 1, 2, 3, 5, 10 mM) içerecek şekilde hazırlanan besiyerleri 120 °C' de 1 atm basınçta 15 dakika otoklavize edilmiş ve besiyerlerine Bölüm 3.3' de belirtildiği şekilde hazırlanan farklı fungus kültürlerinden 2' şer ml ekim yapılarak 5 gün süresince statik ve çalkalamalı koşullarda inkübasyona tabi tutulmuştur. 5 gün boyunca lakkaz enzim aktivitesi ve fungus kuru misel ağırlığındaki artış tespit edilmiştir.

### 3.6. Lignoselülozlu Hammaddelerin Lakkaz Aktivitesine Etkisinin Araştırılması

Çalışmada çeşitli lignoselülozlu hammaddelerin lakkaz aktivitesine etkisinin test edilmesi amacıyla statik ve çalkalamalı koşullarda üretim yapılmıştır. Bitkisel materyal olarak ayçiçeği tablası, ceviz kabuğu, fındık kabuğu, kayısı çekirdeği kabuğu, mısır koçanı, saman ve talaş kullanılmıştır.

Statik çalışmalarda, 0.25 g saman, 0.5 g talaş, 2 g ayçiçeği tablası ve fındık kabuğu, 3 g ceviz kabuğu ve kayısı çekirdeği kabuğu, 4 g mısır koçanı ayrı ayrı olacak şekilde 30 ml STO içeren 250 ml erlenmayerlere eklenmiştir. Bu besiyerlerine 2' şer ml fungus (*F. trogii* ve *T. versicolor*) ekimi yapıldıktan sonra statik koşullarda 30 °C' de 10 gün inkübasyona bırakılmış ve 2 gün aralıklarla lakkaz enzim aktivitesi tespit edilmiştir.

Çalkalamalı koşullarda ise ceviz kabuğu, kamyş, kayısı çekirdeği kabuğu ve saman toz halinde kullanılmıştır. Bunun için öğütülmüş olan her bitkisel materyalden 0.15, 0.30, 0.50 g/50 ml STO olacak şekilde besiyerleri hazırlanmıştır. Fungus kültürlerinden (*F. trogii*, *T. versicolor*) 2' şer ml ekim yapılarak 30 °C' de, 150 rpm çalkalama hızında 5 gün inkübe edilmiş ve her gün lakkaz enzim aktivitesi saptanmıştır.

### 3.7. Tekrarlı Kesikli Süreçte $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ Etkisinin Saptanması

Tekrarlı kesikli çalışmalarda kullanılacak peletler Bölüm 3.4' de ifade edildiği gibi hazırlanmıştır. Bu çalışma distile su ve STO olmak üzere 2 farklı ortamda yürütülmüştür. 0.5 mM  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  içerecek şekilde hazırlanmış 50 ml STO ve distile su ortamlarına peletler eklenmiştir. Peletler 30 °C ve 150 rpm çalkalama hızında 24 saat inkübe edildikten sonra steril koşullarda süzülerek alınmış ve aynı miktarda  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  içeren STO ve distile su ortamlarına eklenmiştir. Bu koşullarda 24 saatlik sürelerde 5 uygulama yapılmıştır. Bu süreçte her gün lakkaz aktivitesi ölçülmüştür.

### 3.8. Çalışmada Kullanılan Atıksu

Çalışmalarda atıksu olarak peyniraltı suyu kullanılmıştır. Bu atıksu Kaçmazlar Yoğurtçuluk' tan temin edilmiştir. Çalışmalarda atıksu %25, %50, %75, %100' lük konsantrasyonlarda hazırlanmış ve tekrarlı kesikli süreçte peletler 5 gün süresince 24 saatlik kesimlerle 30 °C ve 150 rpm çalkalama hızında inkübe edilmiş ve her gün lakkaz aktivitesi saptanmıştır.

### 3.9. Analizler

#### 3.9.1. Lakkaz Aktivitesinin Saptanması

Lakkaz aktivitesi 2,2'-azino-bis (3- etilbenz-tiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) kullanılarak test edilmiştir.

Enzim aktivitesi ölçümünde reaksiyon karışımı 833 µl sodyum asetat tamponu (100mM, pH 5.0), 100 µl ABTS (5mM) ve ekstraselüler sıvı olacak şekilde hazırlanmış ve enzim aktivitesi 420 nm' de 1 dakikada okunan absorbans değişimi (Shimadzu-UV-1601, UV/Visible) olarak belirlenmiştir. 1 dakikada 1 µmol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarı 1 ünite olarak ifade edilmiştir.

#### 3.9.2. Ağır Metal İçeren Katı Ortamlarda Fungus Üremesinin Değişiminin Saptanması

Farklı konsantrasyonlarda CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O ile hazırlanmış SDA (Sabouraud Dextrose Agar) plaklarına fungus kültürleri (*F. trogii* ve *T. versicolor*) homojenize edildikten sonra ekilmiş ve 30 °C inkübasyona bırakılmıştır. Ağır metalin fungus üremesi üzerine yapmış olduğu inhibisyon etkisi kontrol plaklarındaki üremeye karşılaştırılarak hesaplanmış ve % inhibisyon olarak ifade edilmiştir.

### 3.9.3. Kültür Ortamındaki Biyokütle Miktarının Saptanması

Biyokütle miktarlarını saptamak için öncelikle 50 °C' de 24 saat pastör fırınında kurutulan filtre kağıtları (Schleicher & Schuell,110 mm çap) 1 saat desikatörde bekletilmiş ve hassas terazide kağıtların ağırlıkları saptanmıştır. Daha sonra biyokütle miktarını ölçmek için kültür, darası alınmış filtre kağıdından szlmştr. Fungus + filtre kağıdı 50 °C' de 24 saat bekletilmiş ve daha sonra 1 saat süresince desikatörde bırakılmıştır. Bu işlem sonrası hassas terazide tartım yapılmış ve biyokütle gravimetrik olarak saptanmıştır.

Tüm alışmalar en az 3 örnek olacak şekilde hazırlanmış ve enzim okumaları en az 3 kez tekrarlanmıştır.



## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Lakkaz enzimi beyaz çürükçül fungusların ekstraselüler olarak ürettikleri enzimlerden biridir. Enzimin substrat özgülüğünün geniş olması, fenolik maddeleri direkt, fenolik olmayan maddeleri ise bir aracı vasıtasıyla oksitlemesi [57] lakkaz enziminin, kağıt hamurundan lignin gideriminde, pekçok çevresel kirleticinin yıkımında, ilaç analizinde, etanol üretiminde vb. pekçok işlemden kullanılabilmek için oldukça geniş alanlar sağlamaktadır. Bu nedenle biyoteknolojik kullanım alanı oldukça geniş olan lakkaz enzimini üreten organizmaların saptanması, yüksek üretim yeteneği olanların belirlenmesi ve üretimin indüklenmesine yönelik çeşitli çalışmalar yapılmaktadır [43, 106, 119].

### 4.1. Beyaz Çürükçül Fungusların Katı Besiyerinde Üretimi Sürecinde $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ' in Üreme Üzerine Yaptığı % İnhibisyon Etkisi

Çalışmanın ilk kısmında  $\text{CuSO}_4$ ' in üreme üzerine etkisini test etmek amacıyla farklı konsantrasyonlarda  $\text{CuSO}_4$  içerecek şekilde hazırlanmış SDA besiyerlerinde Materyal ve Yöntemde belirtildiği şekilde funguslar ekilmiş ve günlere bağlı üreme takip edilmiştir.

Çizelge 4.1' de görülebileceği gibi *F. trogii* üremesi üzerine özellikle 5 mM konsantrasyondan sonra hızlı bir şekilde inhibisyon gerçekleşmiş olup 9 ve 10 mM konsantrasyonlarda % 100 inhibisyon saptanmıştır (Çizelge 4.1). *F. trogii* ile *T. versicolor*' un üreme değişimi karşılaştırıldığında aynı konsantrasyonda  $\text{CuSO}_4$  içeren ortamda *T. versicolor*' un daha fazla inhibe olduğu görülmüştür (Çizelge 4.2). *F. trogii* üzerine üreme inhibisyonu etkisi özellikle 3 mM' dan sonra belirgin bir şekilde artmakta ve 9 mM' da üreme tamamıyla engellenmekteyken, *T. versicolor*' da 4 mM' dan itibaren herhangi bir üreme gözlenmemiştir. Bu sonuçlar *T. versicolor*' un bakıra çok daha hassas olduğunu göstermektedir. Çeşitli ağır metallerin bu mikroorganizmaların üremesini negatif etkilediği rapor edilmiştir [39]. Ağır metallerin inhibe edici etkisinin miselyum morfolojisindeki değişimle ilişkili olduğu düşünülebilir [39].

**Çizelge 4.1.** Farklı konsantrasyonlarda  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  içerecek şekilde hazırlanan SDA besiyerlerinde *F. trogii*' nin üreme değişimi (kontrole göre % inhibisyon)

Zaman (Gün)	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (mM, son konsantrasyon)											
	Kontrol (SDA)	0.5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2	0	0	2.02	2.02	9.09	16.16	25.25	63.63	72.72	82.82	100	100
3	0	0	0	0	3.62	11.59	23.18	47.82	67.39	77.53	100	100
4	0	0	0	0	5.43	14.67	28.80	46.73	66.84	75.00	100	100
5	0	0	0	1.96	2.45	13.23	24.51	47.05	62.74	72.05	100	100
6	0	0	0	0	0	7.61	21.42	43.81	55.23	67.61	100	100

**Çizelge 4.2.** Farklı konsantrasyonlarda  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  içerecek şekilde hazırlanan SDA besiyerlerinde *T. versicolor*' un üreme değişimi (kontrole göre % inhibisyon)

Zaman (Gün)	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (mM, son konsantrasyon)						
	Kontrol (SDA)	0.5	1	2	3	4	5
2	0	0	0	1.58	26.38	100	100
3	0	0	0	0	23.23	100	100
4	0	0	0	9.92	24.82	100	100
5	0	0	0	8.87	27.21	100	100
6	0	0	0	7.53	23.61	100	100

#### 4.2. Beyaz Çürükçül Fungusların Bakır İçeren Sıvı Besiyerlerinde Üretimi

##### Sürecinde Lakkaz Aktivitesi Değişimi

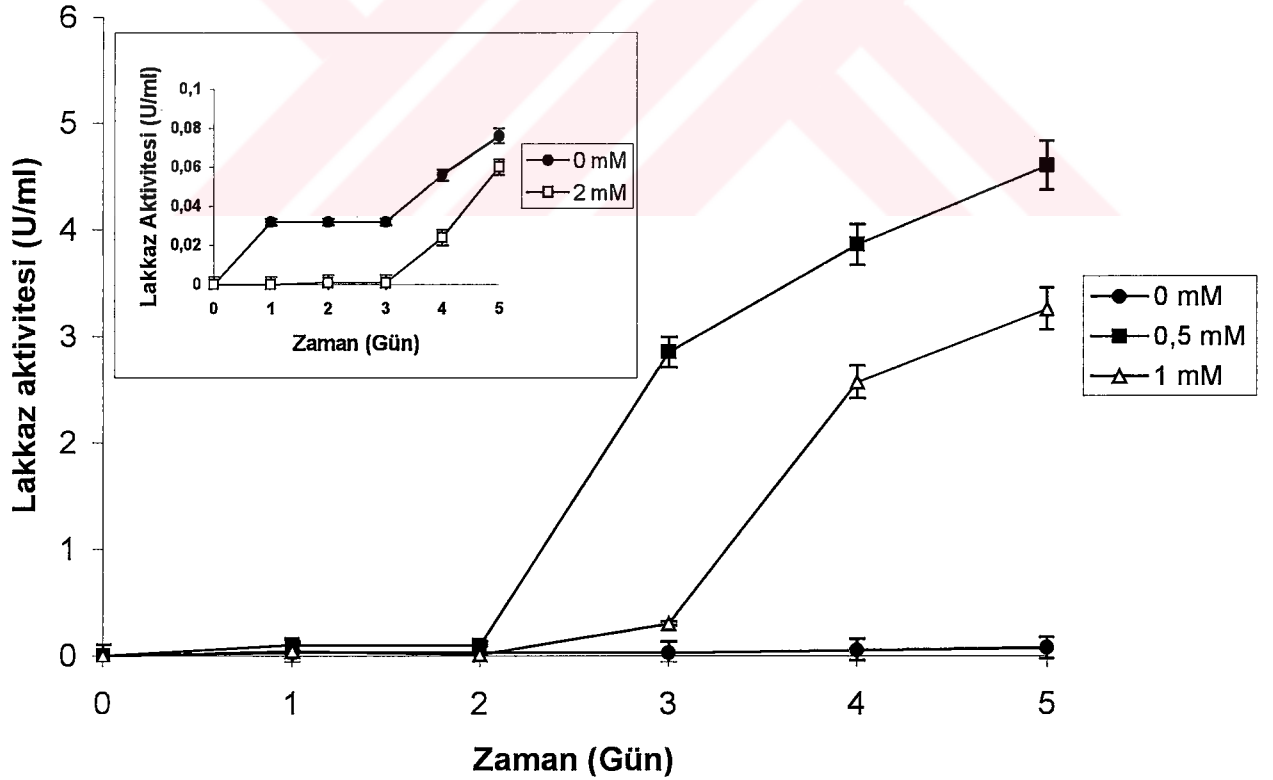
Çalışmanın ikinci kısmında funguslar sıvı besiyerlerinde üretilmiş ve üretim sürecinde lakkaz aktivitesi ve üreme saptanmıştır.

STO ortamına 0-5 mM olacak şekilde  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  eklenmiş ve sıvı ortamda 5 gün süresince *F. trogii* ve *T. versicolor*' un lakkaz aktivitesi çalkalamalı koşullarda saptanmıştır.  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  içeren STO besiyerlerinde çalkalamalı olarak üretilen *F. trogii*' nin lakkaz aktivitesi değişimi kontrol ile kıyaslandığında en yüksek aktivitenin 0.5 mM' da görüldüğü belirlenmiştir (kontrole göre yaklaşık %60 artış).

Aynı koşullarda üretilen *T. versicolor*' un ise lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında en yüksek aktivitenin 1mM' da olduğu görölmektedir (kontrole göre yaklaşık %28 artış). Hem *F. trogii* hem de *T. versicolor*' un 1 mM konsantrasyondan sonra lakkaz aktivitesinin artmadığı hatta azalabildiğı gözlenmiştir. Şekil 4.1 ve 4.2' de her iki fungusun  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  konsantrasyonuna bağılı olarak lakkaz aktivite değışimi verilmiştir. Lakkaz enziminin yapısında bakırın bulunması bu indüklemeyi açıklamaktadır. Belirli bir konsantrasyona kadar pozitif yönde olan bu etki, bu metalin toksik konsantrasyonlarına yaklaştıkça azalmaktadır. Bakırın lakkaz enziminin üretimi üzerine yaptığı pozitif etki yapılan diğer çalışmalar sonucunda da saptanmıştır.

Levin ve arkadaşları *Trametes trogii*' nin lakkaz aktivitesinin bakır ilave edilmiş ortamlarda arttığını gözlemiştir [29].

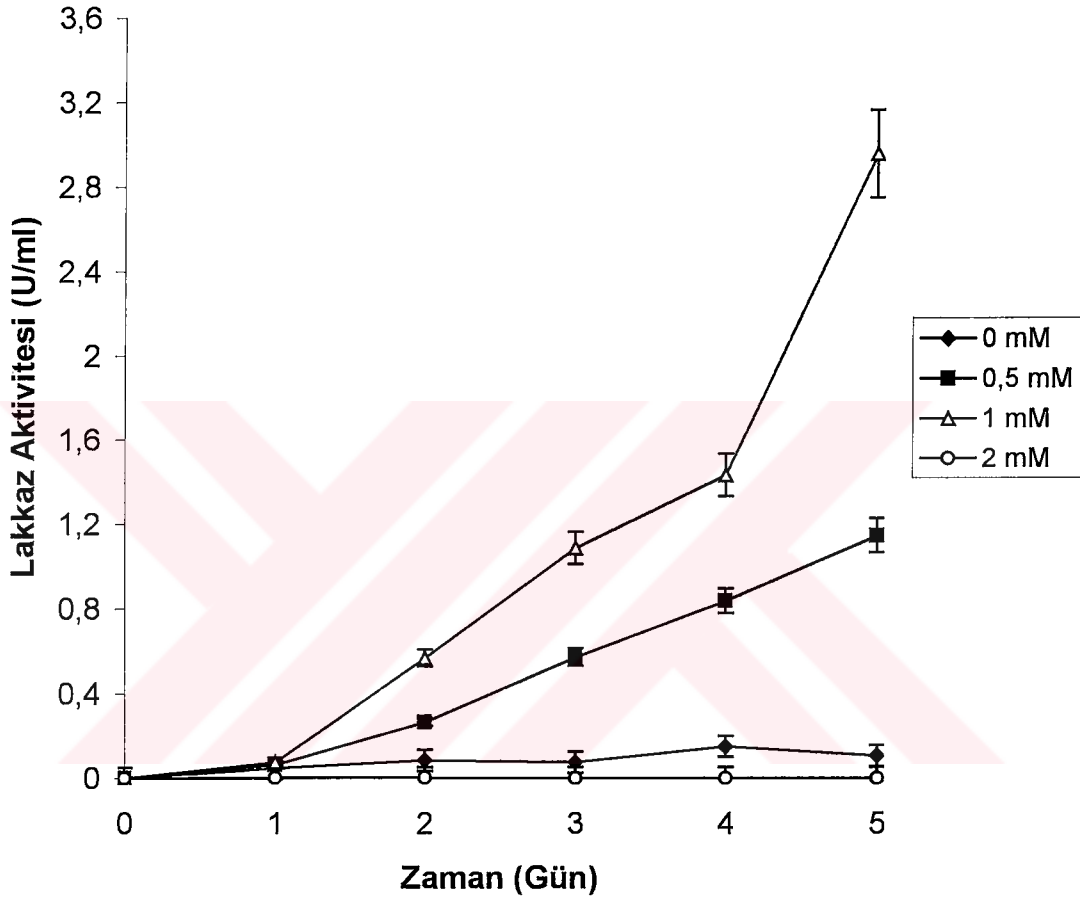
*Pleurotus ostreatus* ile yürütölen bir çalışmada üreme ortamına 150  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ilave edildiğı durumda lakkaz aktivitesinde üremenin 6. gününden sonra kontrole kıyasla 50 katlık bir artış olduğu bildirilmiştir (30 U/ml) [106].



**Şekil 4.1.** Farklı konsantrasyonlarda  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  içeren STO besiyerlerinde çalkalamalı koşullarda üretilen *F. trogii*' nin lakkaz aktivite değışimi (U/ml)



Baldrian ve Gabriel tarafından aynı fungusla yapılan benzer bir çalışmada, fungusun üretildiği azotça sınırlı sıvı ortama üremenin 12. gününde Palmieri ve arkadaşlarının çalışmasındakinden daha yüksek oranlarda  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 ve 5 mM ) ilave edilmiş ve kontrol ile kıyaslandığında en yüksek aktivite artışının 1 mM  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  içeren ortamda (8 kat) olduğu saptanmıştır [107].

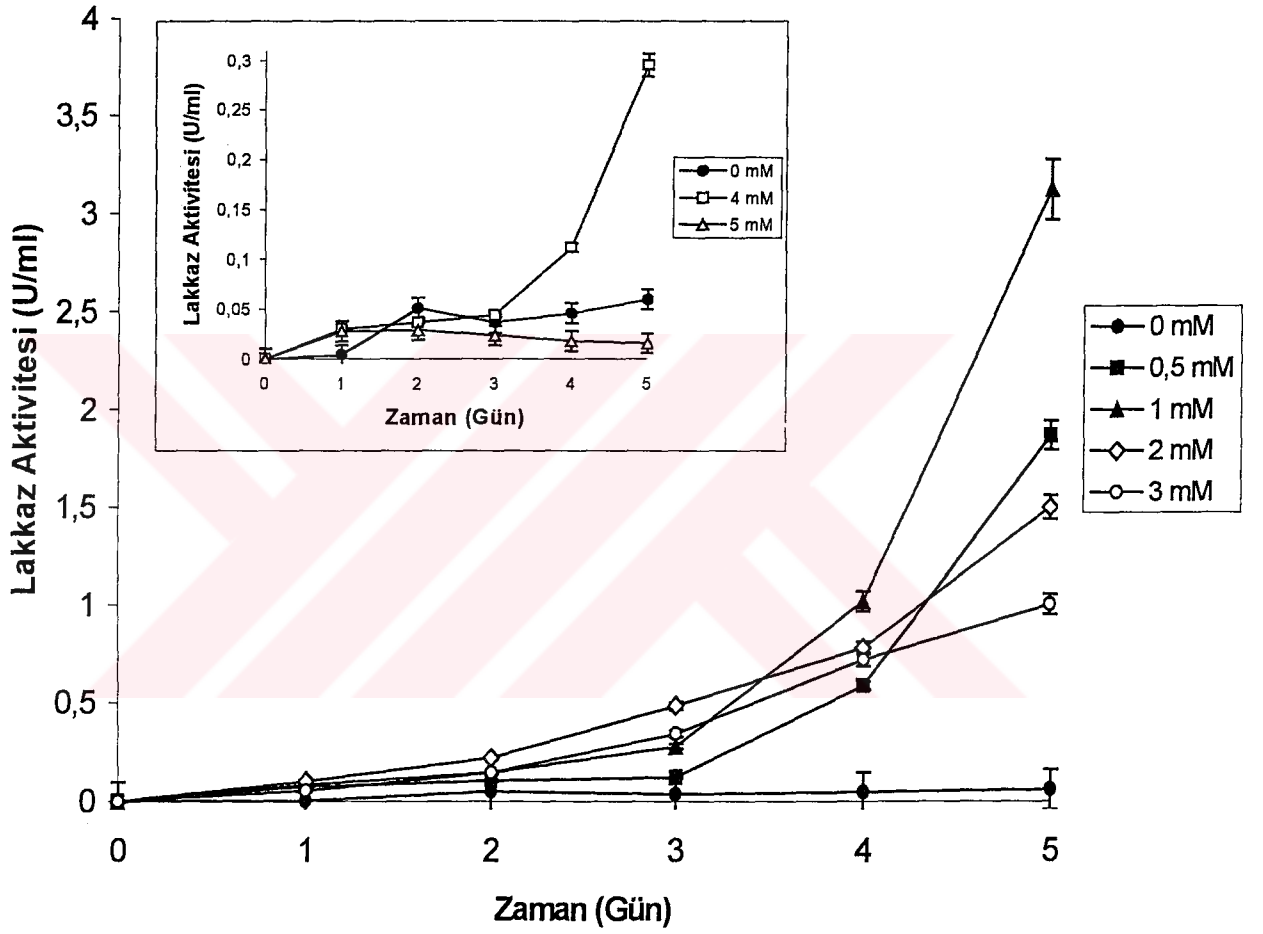


**Şekil 4.2.** Farklı konsantrasyonlarda  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  içeren STO besiyerlerinde çalkalamalı koşullarda üretilen *T. versicolor*' un lakkaz aktivite değişimi (U/ml)

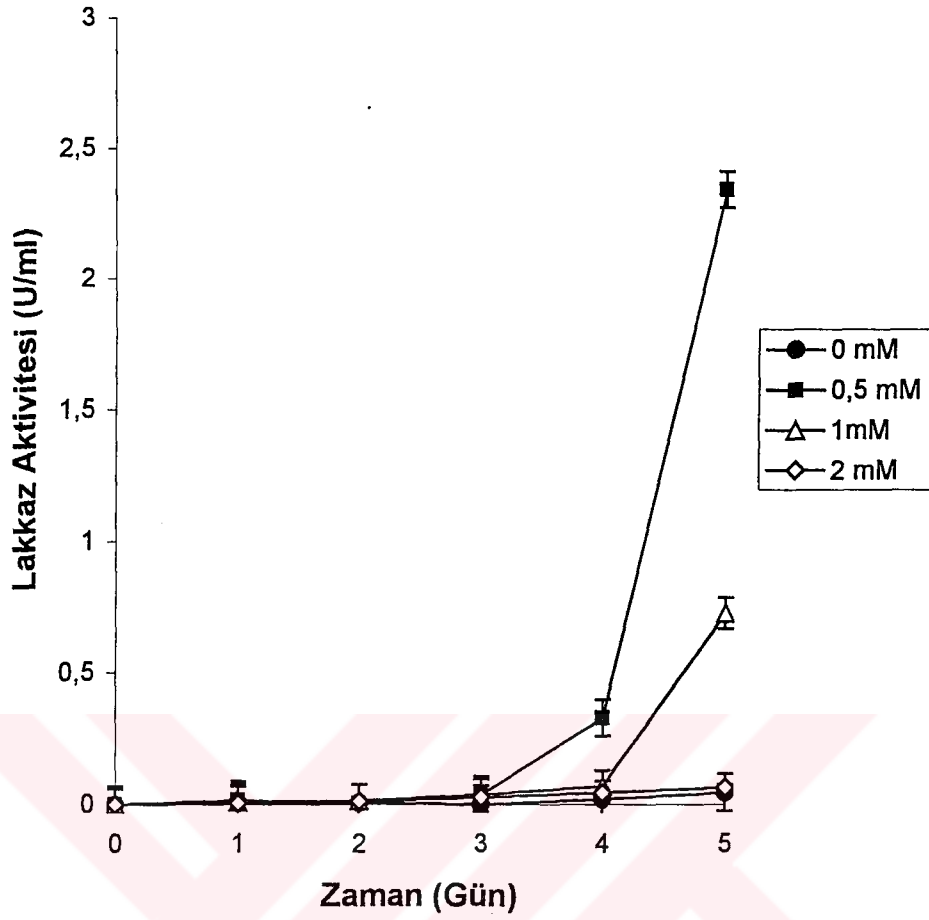
Benzer olarak bu iki fungusun statik koşullarda üretimi sırasında lakkaz aktivite değişimleri araştırılmış ve sonuçlar, Şekil 4.3 ve 4.4' de verilmiştir.

*F. trogii* için özellikle 1 mM  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  kullanıldığı durumda lakkaz aktivitesinin önemli oranda arttığı gözlenirken *T. versicolor*' da özellikle 0.5 mM konsantrasyonda önemli lakkaz değişimi gözlenmiştir.  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  içeren STO besiyerinde statik olarak üretilen *F. trogii*' nin lakkaz aktivite sonuçları ile çalkalamalı olarak üretilen *F. trogii*' nin lakkaz aktivitesi karşılaştırıldığında en yüksek aktivitenin

sırasıyla 1 mM ve 0.5 mM konsantrasyonlarda olduğu görülmektedir. Benzer şekilde statik olarak üretilen *T. versicolor*' un lakkaz aktivitesi ile çalkalamalı olarak üretilen *T. versicolor*' un enzim aktivitesi karşılaştırıldığında en yüksek aktivitenin 0.5 mM ve 1 mM konsantrasyonlarda olduğu tespit edilmiştir. Hess ve arkadaşları da yaptıkları çalışmada 0.5-1 mM Cu (II) konsantrasyonlarda yüksek lakkaz aktivitesinin gözlemlendiğini rapor etmiştir [130].



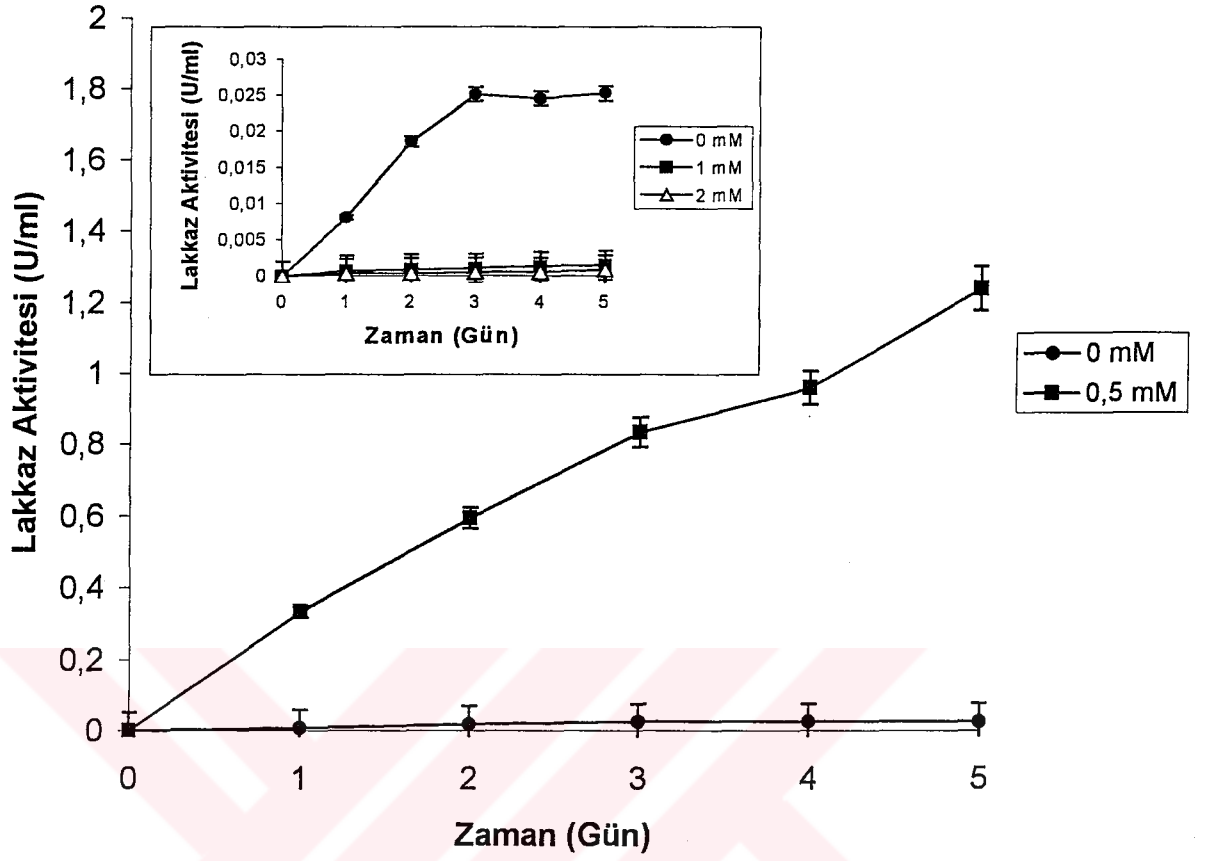
Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlarda  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  içeren STO besiyerinde statik olarak üretilen *F. trogii*' nin lakkaz aktivite değişimi (U/ml)



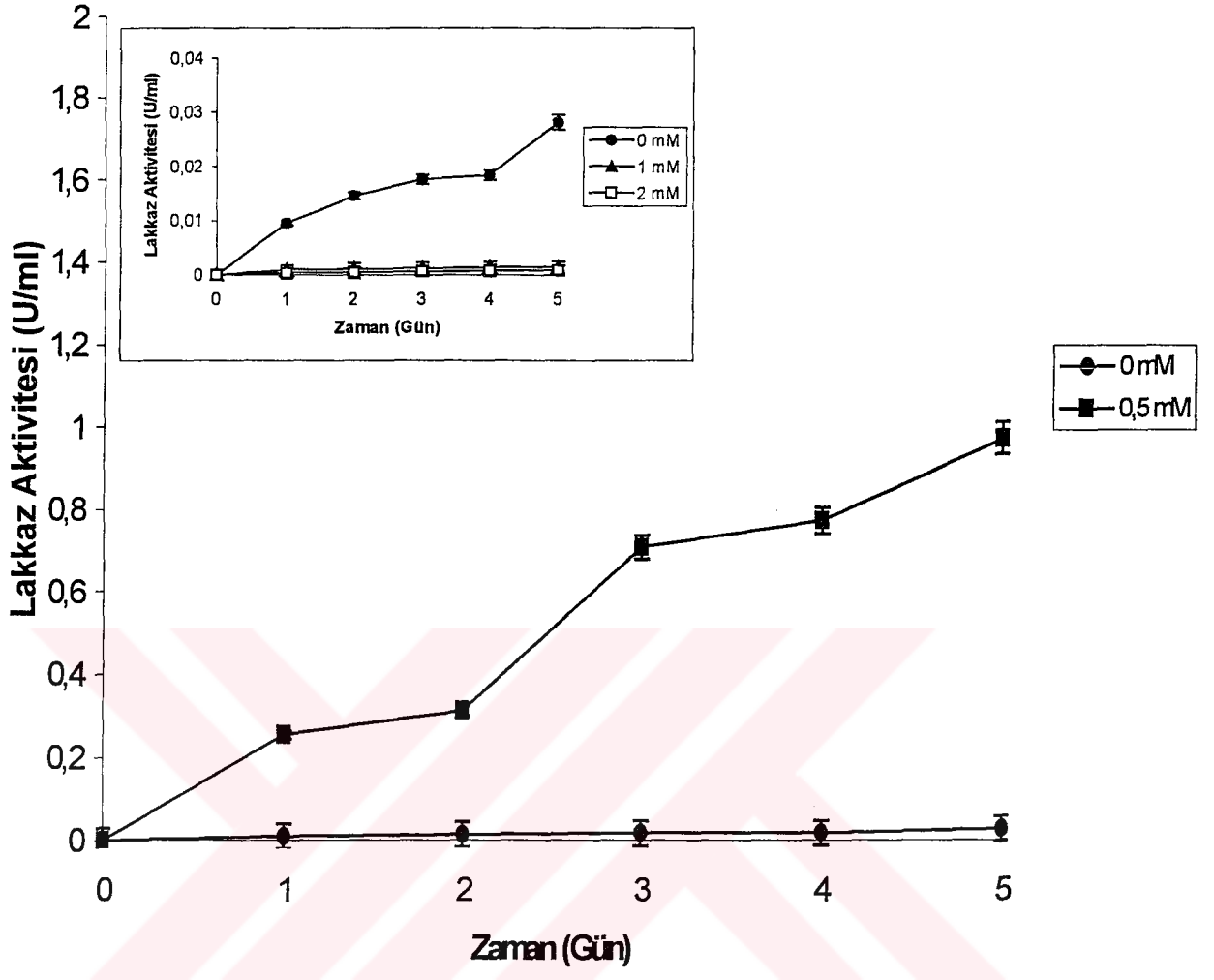
Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonlarda  $\text{CuSO}_4$  içeren STO besiyerinde statik olarak üretilen *T. versicolor*' un lakkaz aktivite değişimi (U/ml)

STO ortamının dışında funguslar (*F. trogii* ve *T. versicolor*), farklı konsantrasyonlarda  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  içeren distile su ortamlarına ekilmiş ve günlere bağlı lakkaz aktivite değişimi izlenmiştir.

Distile su ortamında 0.5 mM  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  konsantrasyonunun çalkalamalı koşullarda lakkaz aktivitesini önemli oranda artırdığı gözlenmiştir (Şekil 4.5 ve 4.6).

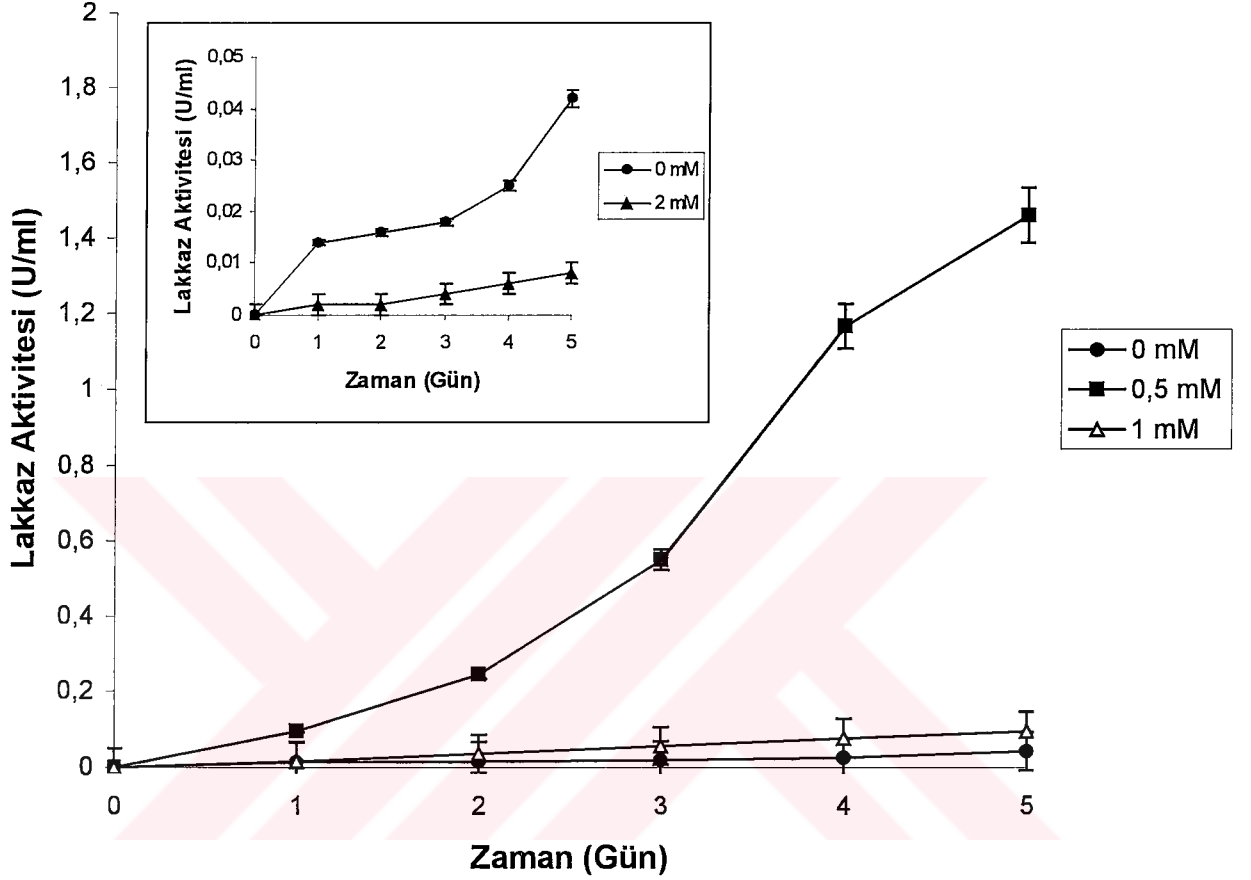


Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonlarda  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (mM, son konsantrasyon) içeren distile su ortamında çalkalamalı olarak üretilen *F. trogii*'nin lakkaz aktivite değişimi (U/ml)

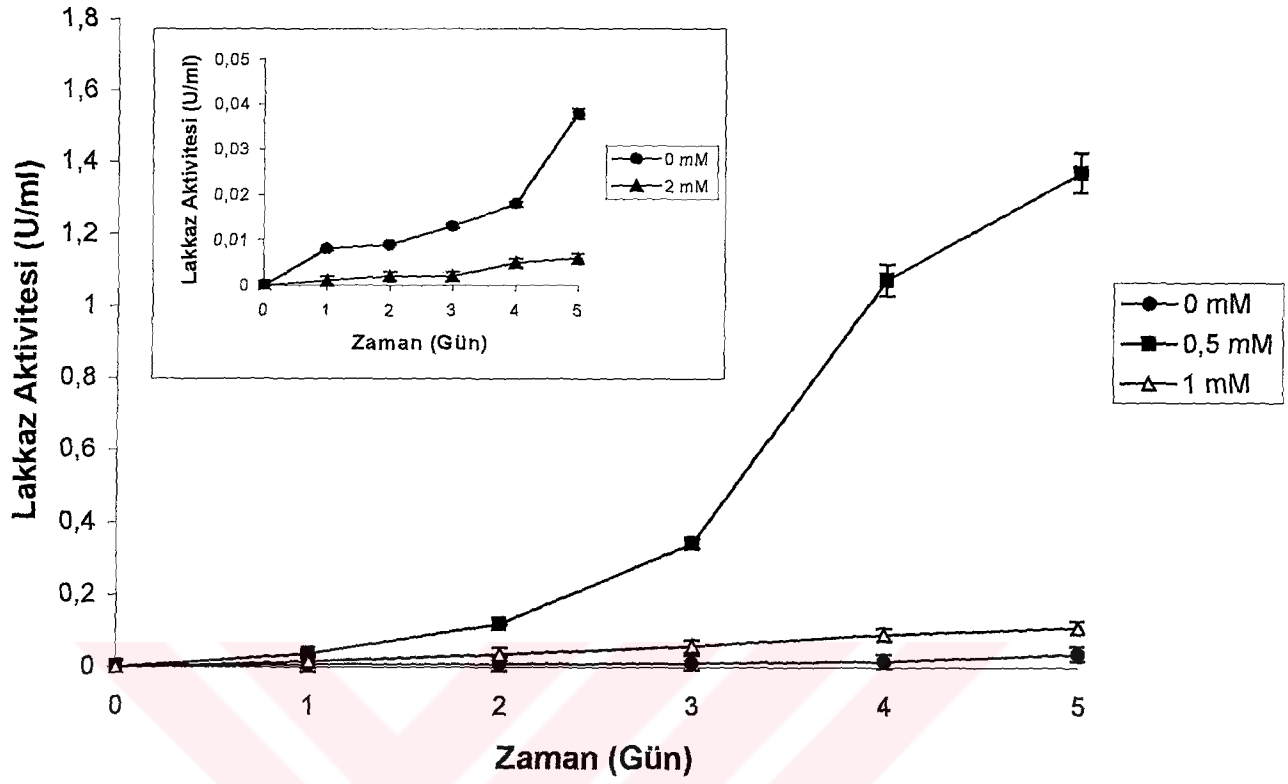


Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlarda  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (mM, son konsantrasyon) içeren distile su ortamında çalkalamalı olarak üretilen *T. versicolor*' un lakkaz aktivite değişimi (U/ml)

Benzer şekilde distile su ortamında statik koşullarda, *F. trogii*' nin 0.5 mM konsantrasyonda gösterdiği enzim aktivitesinin aynı koşullarda bulunan *T. versicolor*' a göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. (Şekil 4.7 ve 4.8).



Şekil 4.7. Farklı konsantrasyonlarda  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (mM, son konsantrasyon) içeren distile su ortamında statik olarak üretilen *F. trogii*' nin lakkaz aktivite değişimi (U/ml)



Şekil 4.8. Farklı konsantrasyonlarda  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (mM, son konsantrasyon) içeren distile su ortamında statik olarak üretilen *T. versicolor*' un lakkaz aktivite değişimi (U/ml)

#### 4.3. Beyaz Çürükçül Fungusların Üremesi Üzerine Farklı Konsantrasyonlarda $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ' ın Etkisi

Fungusların STO içeren ortamlarda çalkalamalı ve statik koşullarda üretimi sürecinde  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ' nun, lakkaz aktivitesindeki artırıcı etkisinin, üremeyi indüklemesine bağlı olup olmadığını test etmek amacıyla üretim aşamasında üreme değişimi de araştırılmıştır. Sonuçlar her bir konsantrasyon için 5 günlük ortalama değerler olarak verilmiştir (Çizelge 4.3 ve 4.4). Çizelgeler' den de görülebileceği gibi özellikle 0.5-1 mM konsantrasyonlarda gözlenen lakkaz aktivite artışı üremenin artışına bağlı bir artış değildir. Üreme ortamına ilave edilen  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  konsantrasyonu arttıkça çalkalamalı koşullarda üretilen *F. trogii* ve *T. versicolor*' un üreme oranlarının azaldığı görülmektedir (Çizelge 4.3). Benzer sonuçlar, statik koşullarda üretilen *F. trogii* ve *T. versicolor* için de elde edilmiştir (Çizelge 4.4). Çeşitli metallerin üreme

ve fungal morfoloji üzerine negatif etkileri çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir [39, 115].

**Çizelge 4.3.** *F. trogii* ve *T. versicolor*' un STO ortamında çalkalamalı koşullarda üretimi sürecinde 5 günlük ortalama üreme verimi (g/50 ml)

CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O (mM)	Üreme (g/50 ml)	
	<i>F. trogii</i>	<i>T. versicolor</i>
0	0.063±0.011	0.037±0.012
0.5	0.042±0.001	0.021±0.005
1	0.033±0.009	0.012±0.004
2	0.028±0.008	0.006±0.002
3	0.022±0.006	0.005±0.002
4	0.010±0.002	0.004±0.002
5	0.006±0.001	0.004±0.001

**Çizelge 4.4.** *F. trogii* ve *T. versicolor*' un STO ortamında statik koşullarda üretimi sürecinde 5 günlük ortalama üreme verimi (g/30 ml)

CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O (mM)	Üreme (g/30 ml)	
	<i>F. trogii</i>	<i>T. versicolor</i>
0	0.041±0.021	0.034±0.002
0.5	0.033±0.018	0.029±0.017
1	0.026±0.010	0.025±0.016
2	0.017±0.005	0.009±0.050
3	0.012±0.004	0.006±0.003
4	0.010±0.004	0.004±0.002
5	0.006±0.004	0.003±0.002

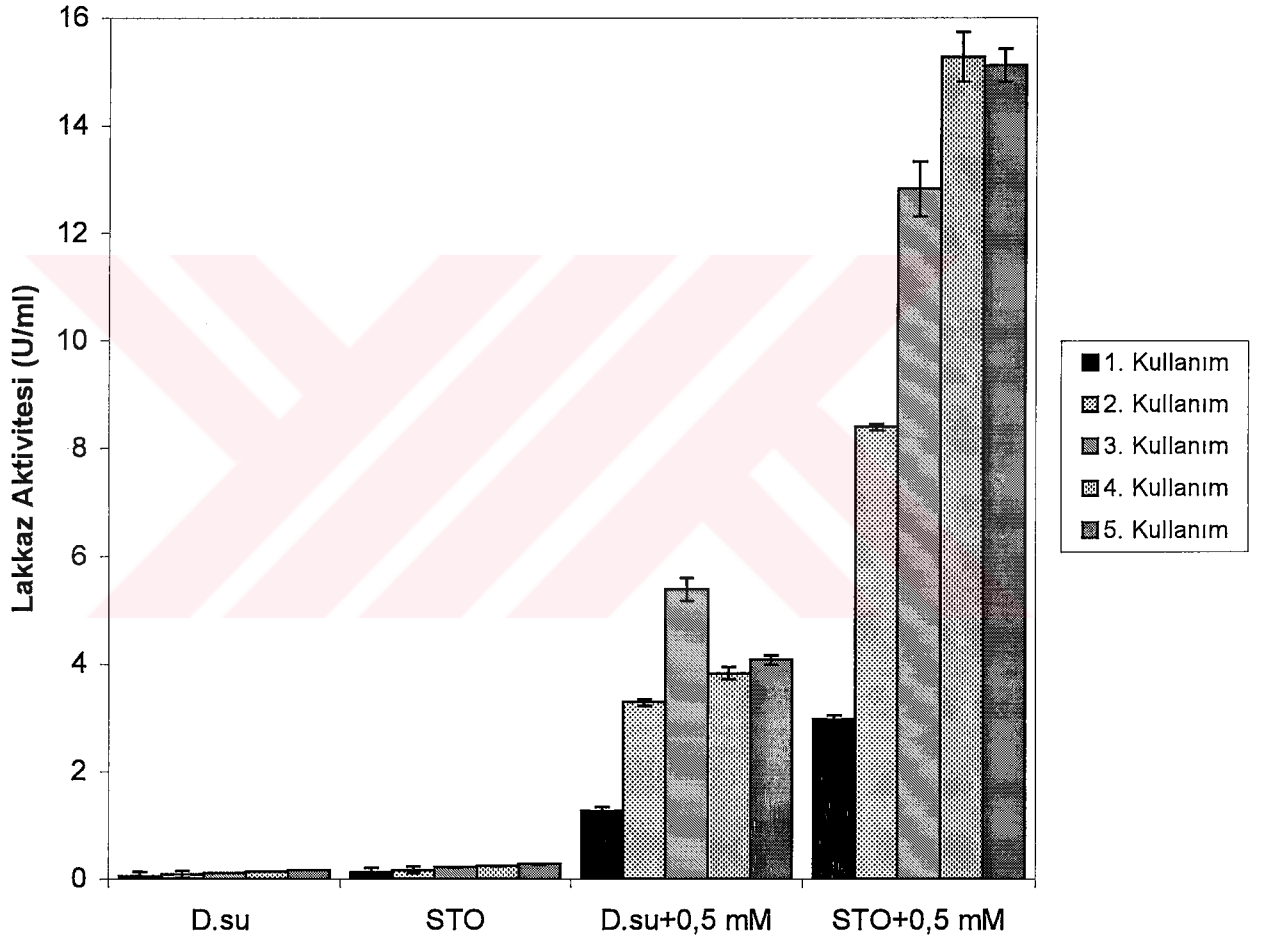
#### 4.4. Beyaz Çürükçül Fungusların Tekrarlı Kesikli Süreçte Lakkaz Aktivite Değişimi

Endüstriyel çalışmalarda bir mikroorganizmanın tekrar tekrar kullanılabilmesi ve buna bağlı olarak enzim üretiminin artırılabilmesi en önemli noktadır. Bu nedenle



üreme sürecinde önemli oranda lakkaz aktivite artışına neden olan bakır ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), tekrarlı kesikli uygulama sürecinde de indükleyici madde olarak test edilmiştir. Çalışma hem *F. trogii* hem de *T. versicolor* için yürütülmüştür.

Tekrarlı kesikli uygulamada da distile su ve STO besiyerleri ayrı ayrı kullanılmıştır. 0,5 mM  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  uygulaması her iki fungusun da lakkaz aktivitesini önemli oranda indüklemiştir. Özellikle *F. trogii* ile yürütülen tekrarlı kesikli çalışmalarda ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  uygulamasına bağlı olarak) çok yüksek oranda lakkaz aktivitesi gözlenmiştir (Şekil 4.9 ve 4.10).

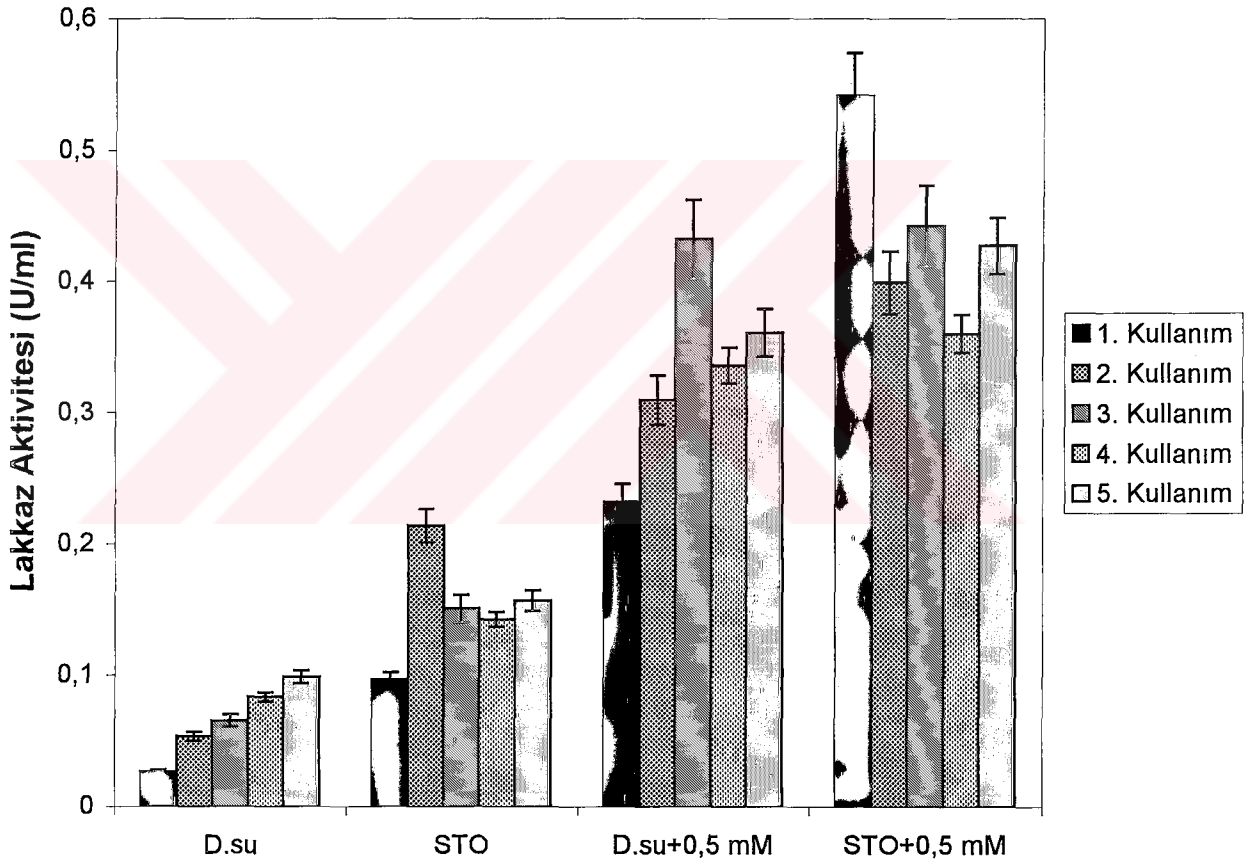


**Şekil 4.9.** *F. trogii* peletlerinin 0.5 mM  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  içeren distile su ve STO ortamlarında tekrarlı kullanımı sürecinde lakkaz aktivite değişimi (U/ml)

Şekil 4.9' da izlenebildiği gibi özellikle 0.5 mM  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  içeren STO ortamlarında 5 gün süresince çok yüksek lakkaz aktivitesi gözlenmiştir. Peletlerin 5. kullanımı sonucunda hala ~ 15 (U/ml) lakkaz aktivitesi saptanabilmektedir. Hem

çalkalamalı hem de statik koşullarda üretilen *F. trogii*' de elde edilen lakkaz aktivitelerine göre tekrarlı kesikli uygulamada elde edilen aktivite oldukça yüksek orandadır. *T. versicolor*' da da benzer şekilde tekrarlı kesikli uygulamada elde edilen aktivite diğer çalışmalarda elde edilen aktiviteye göre daha yüksektir. Her iki fungusu karşılaştırdığımızda, *F.trogii*' nin *T. versicolor*' a göre daha yüksek enzim aktivitesi gösterdiği söylenebilir.

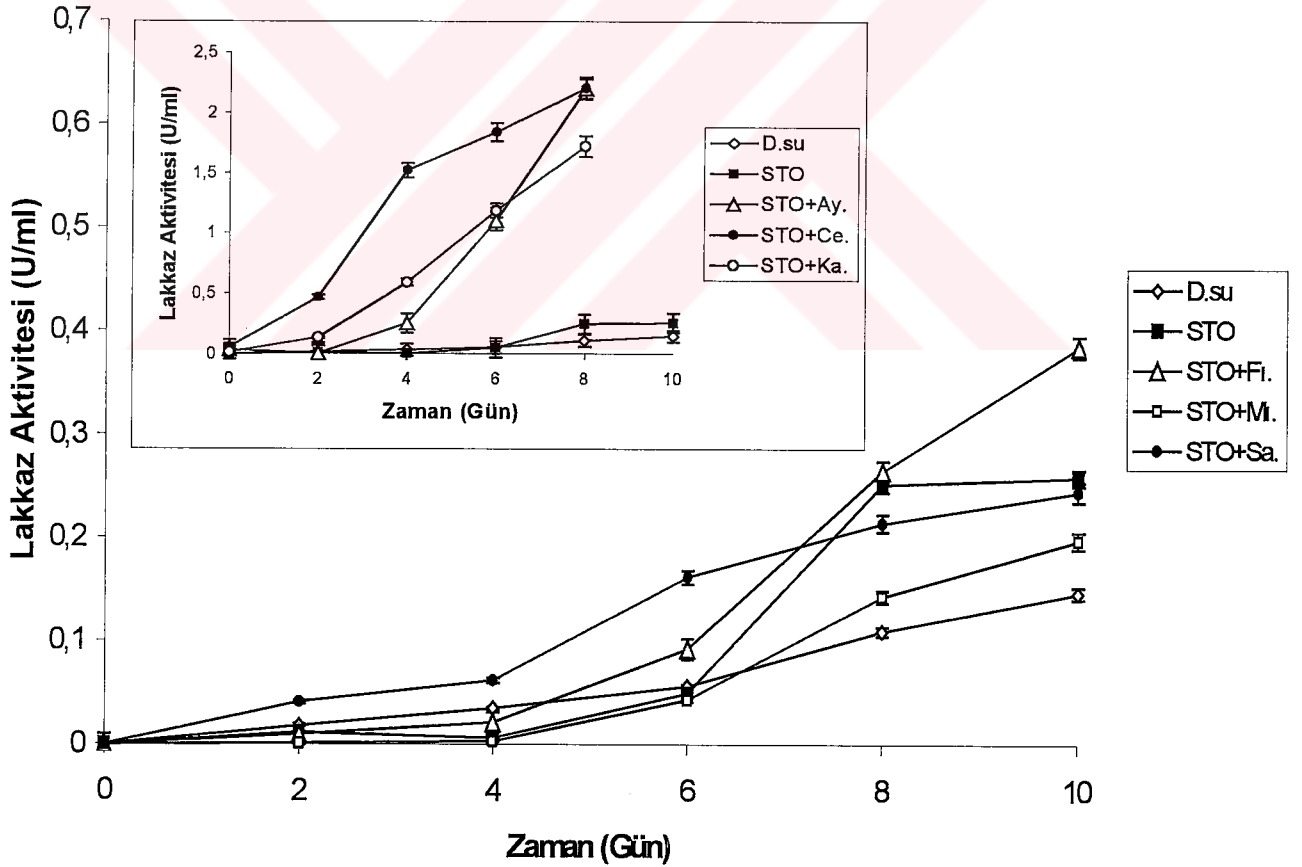
Buna göre peletlerin uzun süreli kullanımı önemli bir avantajdır. Beyaz çürükçül fungus peletlerinin uzun süreli kullanılabilirliğinden çeşitli ksenobiyotiklerin uzaklaştırımında da yararlanılabileceği rapor edilmiştir [131].



Şekil 4.10. *T. versicolor* peletlerinin 0.5 mM  $\text{CuSO}_4$  içeren distile su ve STO ortamlarında tekrarlı kullanımı sürecinde lakkaz aktivite değişimi (U/ml)

#### 4.5. Lignoselülozlu Hammaddede İçeren Ortamlarda Beyaz Çürükçül Fungusların Lakkaz Aktivite Değişimi

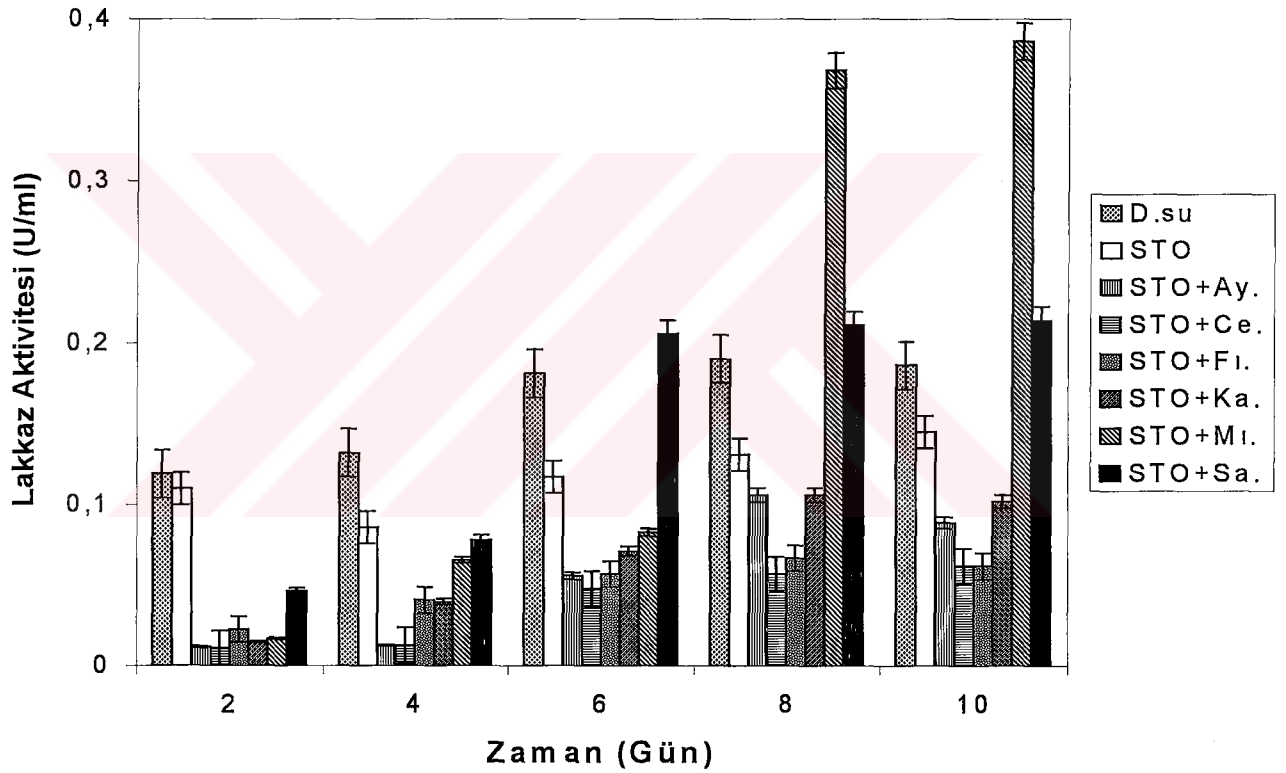
Beyaz çürükçül fungusların lakkaz üretim yetenekleri farklı ortamlarda ve farklı indükleyiciler kullanılarak araştırılmaktadır. Çeşitli araştırmacılar, atıksular, ksenobiyotikler, bitkisel hammaddeler ve pamuk sapı ekstraktının lakkaz aktivitesi üzerine pozitif etkisini rapor etmiştir [34, 132, 133, 134]. Bu çalışmada, çeşitli bitkisel hammaddelerin lakkaz aktivitesine olan etkisi test edilmiş ve daha önce yapılan çalışmalara benzer olarak bu fungusların lakkaz üretim yeteneklerinin arttığı saptanmıştır. Bu amaç doğrultusunda farklı oranlarda bitkisel ham materyal STO besiyerine eklenmiş ve 5 günlük üretim süresince lakkaz aktivitesi üzerine etkileri (statik ve çalkalamalı koşullarda) test edilmiştir (Şekil 4.11-4.20).



(Ay: Ayçiçeği tablası, Ce: Ceviz kabuğu, Fı: Fındık kabuğu, Ka: Kayısı çekirdeği kabuğu, Mı: Mısır koçanı, Sa:Saman)

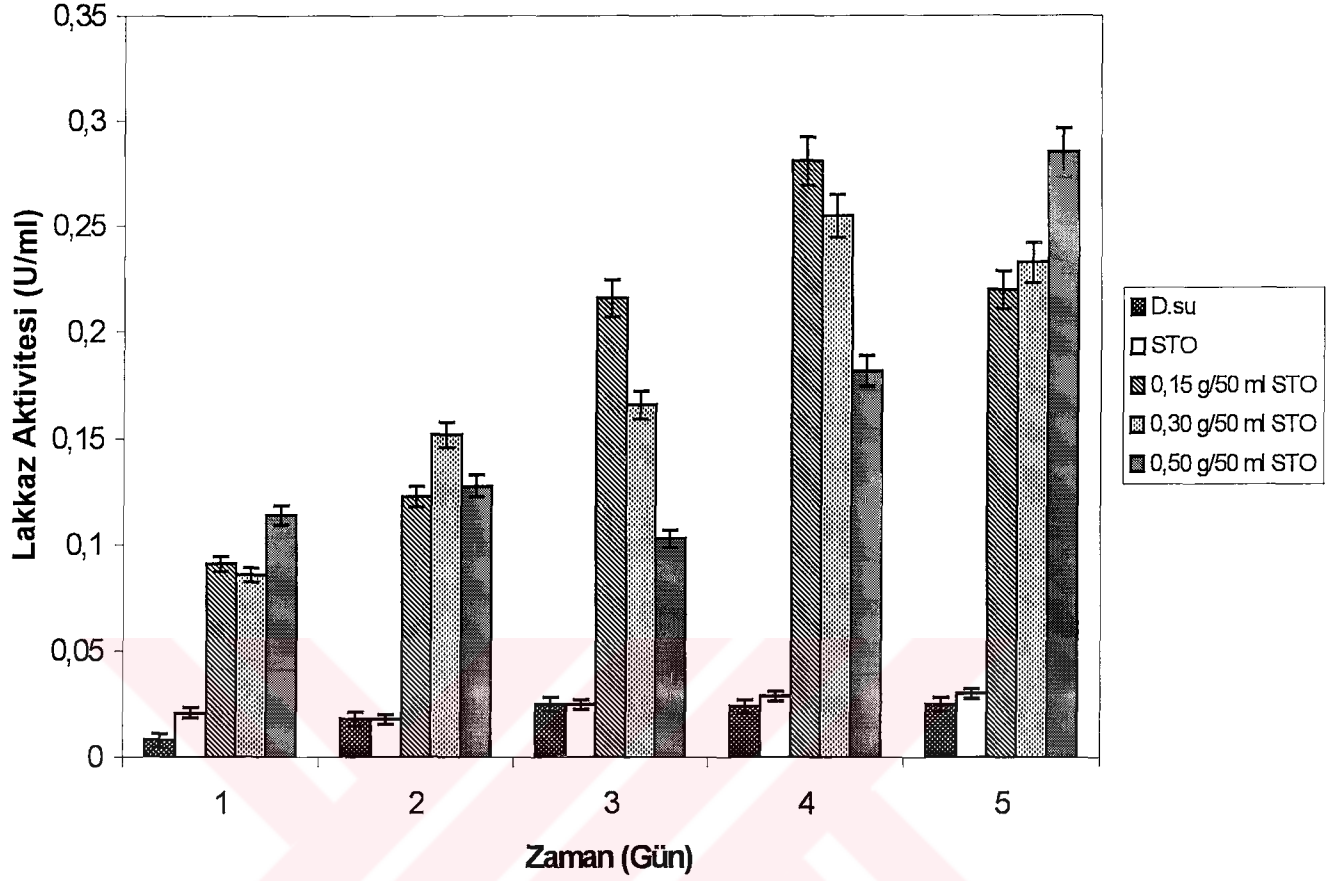
Şekil 4.11. *F. trogii*' nin lignoselülozlu hammaddede içeren STO ortamlarında statik koşullarda üretimi sürecinde lakkaz aktivite değişimi (U/ml)

Şekil 4.11 ve 4.12’ de görülebileceği gibi bazı bitkisel hammaddeler, özellikle *F. trogii*’ de, lakkaz enziminin sentezini statik koşullarda indüklemiştir. Ayçiçeği tablası, ceviz kabuğu ve kayısı çekirdeği kabuğu önemli oranda indükleme yapmıştır. *T. versicolor*’ da ise her ne kadar mısır koçanı ve saman eklenmiş ortamda enzim aktivitesinde kontrole göre bir artış gerçekleşmiş olsa da bu artış çok önemli oranda değildir.



(Ay: Ayçiçeği tablası, Ce: Ceviz kabuğu, Fı: Fındık kabuğu, Ka: Kayısı çekirdeği kabuğu, Mi: Mısır koçanı, Sa:Saman)

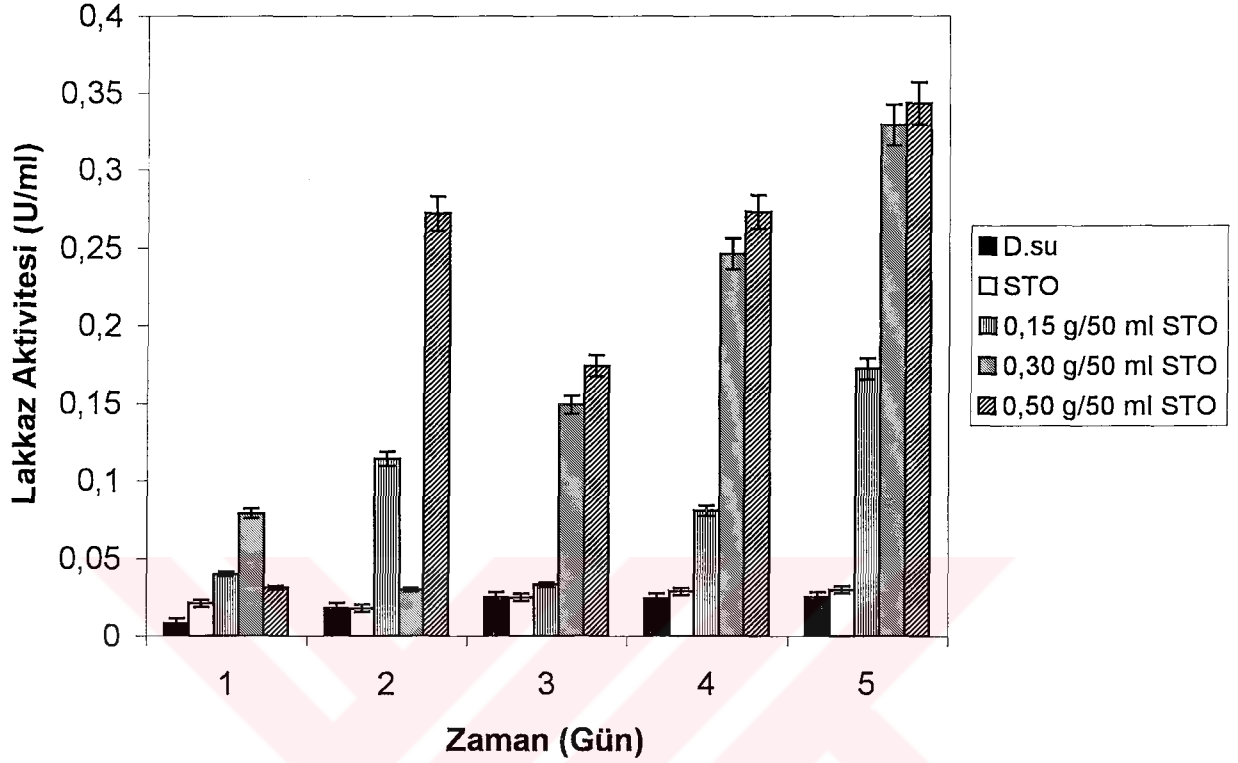
Şekil 4.12. *T. versicolor*’ un lignoselülozlu hammadde içeren STO ortamlarında statik koşullarda üretimi sürecinde lakkaz aktivite değişimi (U/ml)



**Şekil 4.13.** *F. trogii*' nin farklı konsantrasyonlarda ceviz kabuğu tozu içeren STO ortamlarında çalkalamalı olarak 5 günlük üretimi sırasında lakkaz aktivite değişimi (U/ml)

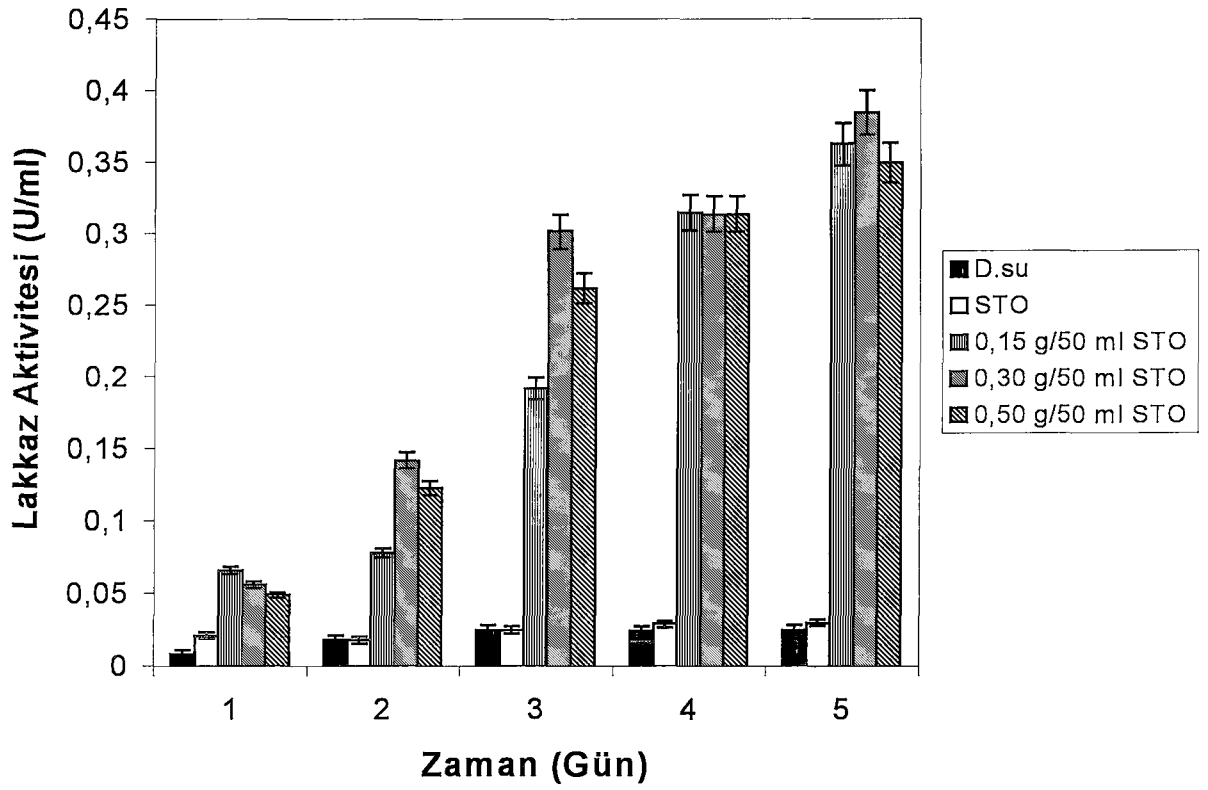
Çalkalamalı koşullarda yürütülen çalışmalarda da üreme ortamına lignoselülozlu hammadde eklenmesi enzim aktivitesini farklı oranlarda etkilemiştir (Şekil 4.13- 4.20). Ceviz kabuğu tozu içeren STO ortamlarındaki lakkaz aktivitelerinde günlere bağlı olarak farklılıklar gözlenmiştir. Enzim aktivitesi incelendiğinde en yüksek aktivitenin 5. günde 0.50 g/50 ml STO' da olduğu görülmektedir.

Kamış tozu içeren STO ortamlarındaki lakkaz aktiviteleri incelendiğinde benzer şekilde en yüksek aktivitenin 5. günde 0.50 g/50 ml STO' da olduğu görülmektedir.

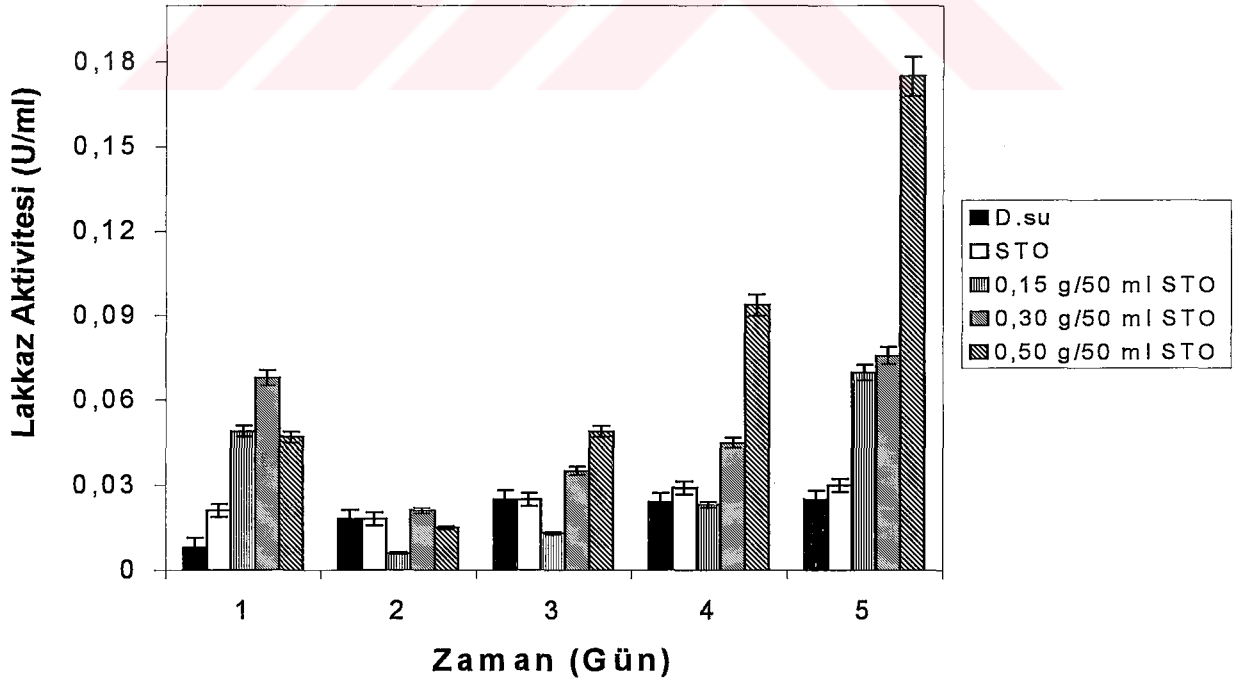


**Şekil 4.14.** *F. trogii*' nin farklı konsantrasyonlarda kamış tozu içeren STO ortamlarında çalkalamalı olarak 5 günlük üretimi sırasında lakkaz aktivite değişimi (U/ml)

*F. trogii*' nin farklı konsantrasyonlarda kayısı çekirdeği kabuğu içeren ortamlarda elde edilen lakkaz aktivitelere bakıldığında, en yüksek aktivitenin 5. günde 0,30 g/50 ml STO' da olduğu tespit edilmiştir. Saman tozu içeren ortamlarda ise en yüksek aktivite 5. günde 0,50 g/ml STO' da elde edilmiştir.

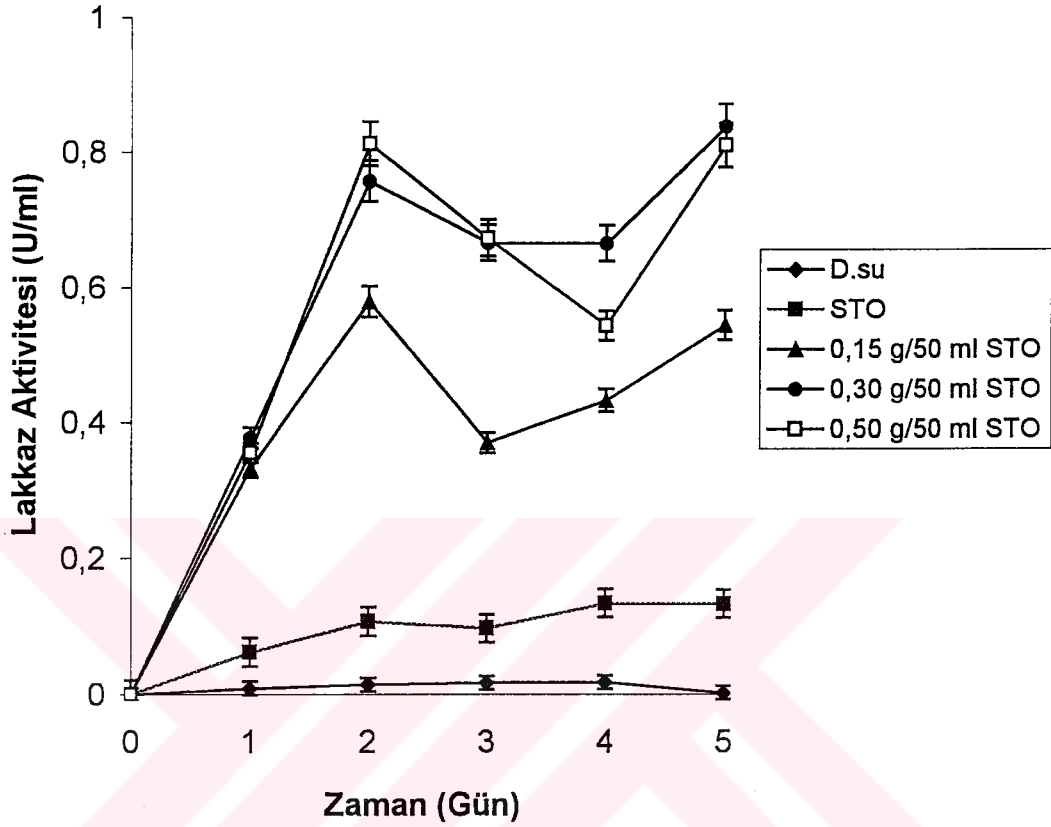


Şekil 4.15. *F. trogii*' nin farklı konsantrasyonlarda kayısı çekirdeği kabuğu tozu içeren STO ortamlarında çalkalamalı olarak 5 günlük üretimi sırasında lakkaz aktivite değişimi (U/ml)



Şekil 4.16. *F. trogii*' nin farklı konsantrasyonlarda saman tozu içeren STO ortamlarında çalkalamalı olarak 5 günlük üretimi sırasında lakkaz aktivite değişimi (U/ml)

*T. versicolor*' un farklı konsantrasyonlarda ceviz kabuğu tozu içeren STO ortamlarında çalkalamalı olarak üretimi sürecinde elde edilen en yüksek aktivite 5. günde 0.30 g/50 ml STO' da görülmüştür.

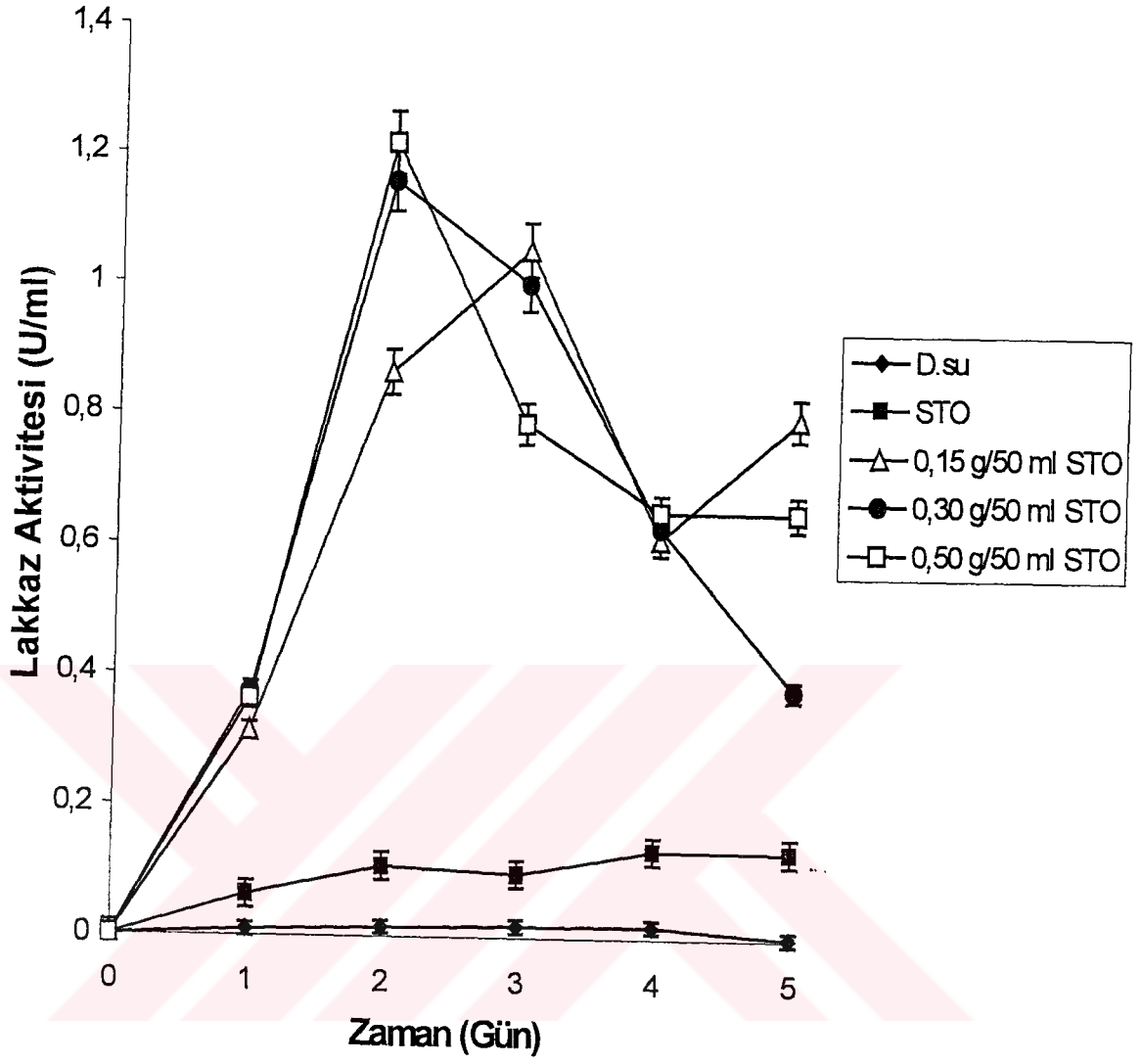


Şekil 4.17. *T. versicolor*' un farklı konsantrasyonlarda ceviz kabuğu tozu içeren STO ortamlarında çalkalamalı olarak 5 günlük üretimi sırasında lakkaz aktivite değişimi (U/ml)

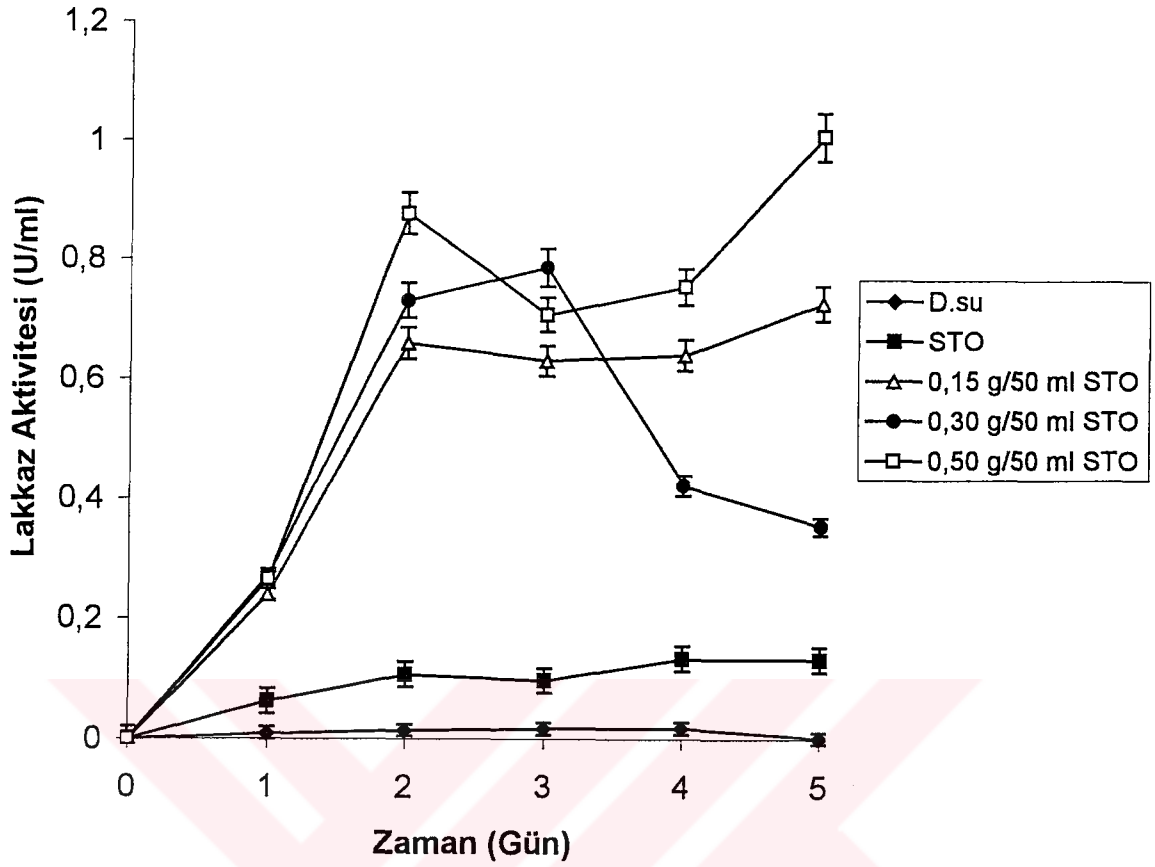
Çeşitli konsantrasyonlarda kamış tozu ilave edilmiş STO' da *T. versicolor*' un 5 günlük üretimi sırasında lakkaz aktivitelerine bakıldığında en yüksek aktivitenin 2. günde 0.30g/50 ml STO' da olduğu görülmektedir.

Aynı fungusun farklı konsantrasyonlarda kayısı çekirdeği kabuğu ilave edilmiş STO' da 5 günlük üretimi sırasında en yüksek aktivitenin 5. günde 0.50g/50 ml STO' da gerçekleştiği tespit edilmiştir.



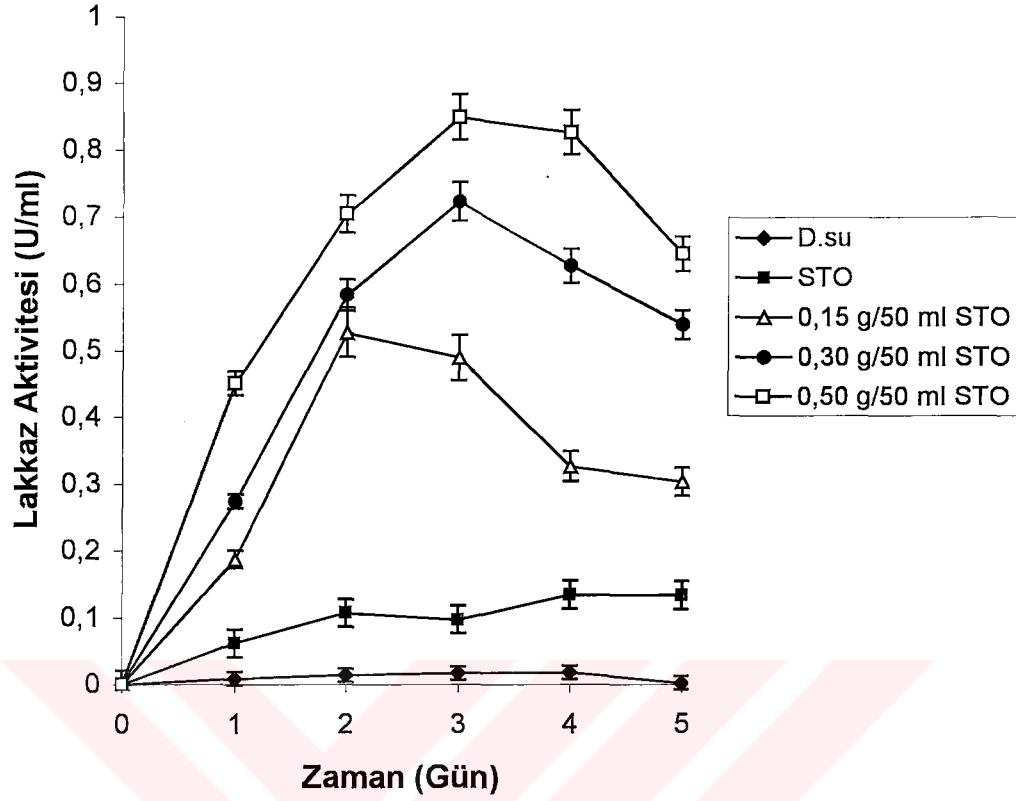


Şekil 4.18. *T. versicolor*' un farklı konsantrasyonlarda kamış tozu içeren STO ortamlarında çalkalamalı olarak 5 günlük üretimi sırasında lakkaz aktivite değişimi (U/ml)



Şekil 4.19. *T. versicolor*' un farklı konsantrasyonlarda kayısı çekirdeği kabuğu tozu içeren STO ortamlarında çalkalamalı olarak 5 günlük üretimi sırasında lakkaz aktivite değişimi (U/ml)

*T. versicolor*' un saman tozu içeren STO' da elde edilen lakkaz aktiviteleri incelendiğinde, en yüksek aktivitenin 3. günde 0.50 g/50 ml STO' da gerçekleştiği saptanmıştır.



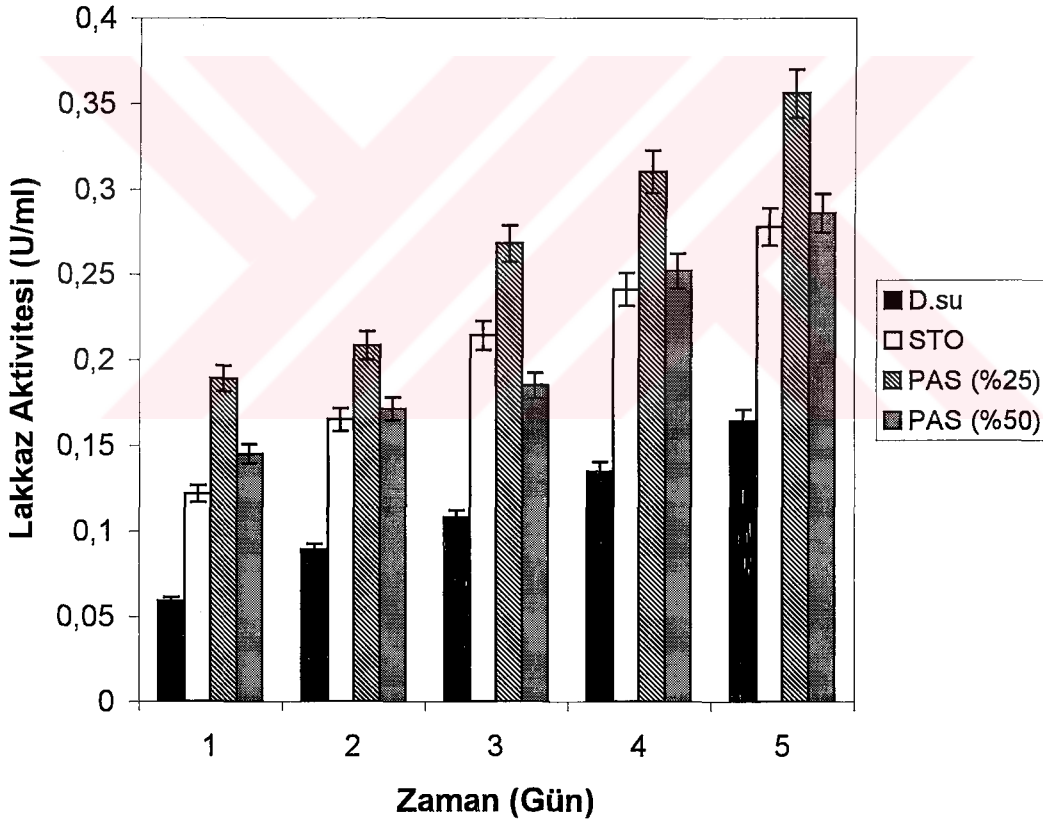
Şekil 4.20. *T. versicolor*' un farklı konsantrasyonlarda saman tozu içeren STO ortamlarında çalkalamalı olarak 5 günlük üretimi sırasında lakkaz aktivite değişimi (U/ml)

#### 4.6. Beyaz Çürükçül Fungusların Peyniraltı Suyu İçeren Besiyerlerinde Tekrarlı Kesikli Üretim Sürecinde Lakkaz Aktivite Değişimi

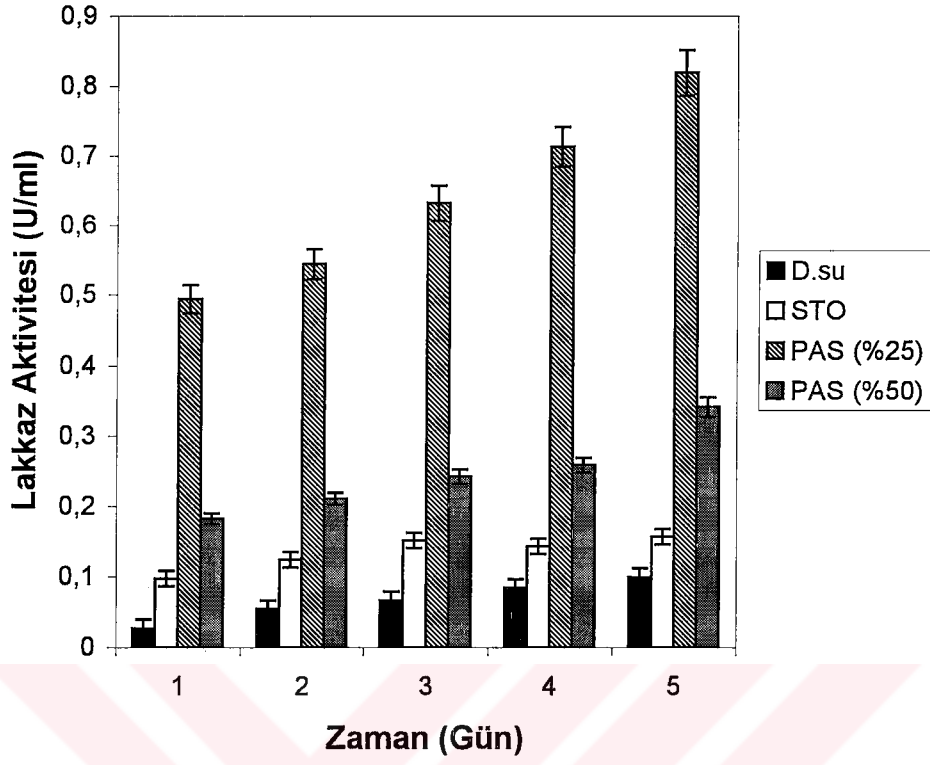
Çalışmamızın son kısmında Türkiye'de peynir üretimi sırasında 1 kg peynire karşılık yaklaşık olarak 9 kg gibi yüksek bir oranda oluşan ve önemli bir kısmı değerlendirilemeyen peyniraltı suyu (PAS), lakkaz üretimi için besiyeri olarak test edilmiştir. Çoğunlukla direkt veya dolaylı yollarla akarsulara karışan peyniraltı suyu oldukça zengin içeriğinden dolayı çevre kirliliğine neden olmaktadır. Bu nedenle bu atık suyun ya arıtılması ya da çeşitli şekillerde değerlendirilmesi gerekmektedir. Peynir altı suyu bileşiminde yaklaşık olarak %6.96 oranında süt kuru maddesi bulunmaktadır. Süt kuru maddesi içerisinde de %0.36 yağ, %0.84 protein, %5.76 laktoz ve tuzlar, %0.2 kadar laktik asit yer almaktadır. Bunlara ek olarak peyniraltı suyunda B1, B2, çok az miktarda da A ve D vitaminlerinin bulunduğu rapor edilmektedir [44]. Peyniraltı

suyunda ayrıca potasyum oksit %0.188, sodyum oksit %0.075, kalsiyum oksit %0.071, magnezyum oksit %0.018, demir oksit %0.001, fosforpentoksit %0.11, klor %0.107 ve %0.029 oranında kükürttrioksit bulunduğu saptanmıştır. Daha önce yapılan bir çalışmada [44] besiyeri olarak peyniraltı suyunun, üretim sürecinde, kullanılmasıyla *F. trogii*'de yüksek lakkaz aktivitesi bildirildiğinden, daha önce test edilmemiş olan tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi amacıyla *F. trogii* ve *T. versicolor* çalışmamızda kullanılmıştır.

Tekrarlı kesikli üretim sürecinde her iki fungusun lakkaz aktivitesinin özellikle %25' lik konsantrasyonda yüksek olduğu gözlenmektedir. *F. trogii* ile *T. versicolor*' un lakkaz aktiviteleri kıyaslandığında %25' lik PAS konsantrasyonunda *T. versicolor*' un enzim aktivitesinin daha yüksek olduğu görülmektedir (Şekil 4.21 ve Şekil 4.22).



Şekil 4.21. *F. trogii* peletlerinin peyniraltı suyu besiyerinde tekrarlı kesikli süreçte kullanımı sırasında lakkaz aktivite değişimi (U/ml)



Şekil 4.22. *T. versicolor* peletlerinin peyniraltı suyu besiyerinde tekrarlı kesikli süreçte kullanımı sırasında lakkaz aktivite değişimi (U/ml)

Peletlerin peyniraltı suyu ortamında uzun süreli lakkaz aktivitesini koruyabilmesinin sebebi peyniraltı suyunun zengin besinsel içeriğinden gelebilir. Yeşilada ve arkadaşları, peyniraltı suyu içeren ortamlarda fungal peletlerin oldukça kararlı kaldığını rapor etmiştir [131].

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada beyaz çürükçül funguslardan *F. trogii* ve *T. versicolor*' un çeşitli ortam ve faktörlere bağlı olarak lakkaz üretim yetenekleri araştırılmıştır. Bu fungusların lakkaz üretim yeteneklerinin kullanılan bakır, lignoselülozlu hammaddeler, ve peyniraltı suyu ortamında arttığı saptanmıştır. Özellikle bakır içeren ortamlarda yüksek enzim aktivitesi saptanmıştır. *F. trogii* ile tekrarlı kesikli süreçte bakır eklenmesine bağlı olarak kontrole göre oldukça yüksek enzim aktivitesi elde edilmiştir.

Bu çalışma, literatür bilgimize göre, daha önce test edilmemiş olan tekrarlı kesikli süreçte pelet kullanımı sonucu yüksek miktarda enzim üretilebileceğini de göstermiştir. Bu tip bir yöntemin ekonomikliğı ise ayrı bir avantajdır.



## KAYNAKLAR

- [1] Ö. Yeşilada, Biyoteknoloji ders notları, 2001.
- [2] M. Şam, *Beyaz çürükçül fungusların boyar maddelerin gideriminde kullanımının araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya, 1999.
- [3] <http://www.geocities.com/isitir/cevrekorum.htm>
- [4] <http://www.amnh.org/nationalcenter/youngnaturalistawards/1998/bacteria.html>
- [5] <http://www.ucmp.berkeley.edu/bacteria/bacteria.html>
- [6] W. B. Turner, *Commercially important secondary metabolites*. In : J. E. Smith, D. K. Berry, *The filamentous fungi, Industrial Mycology*, Wiley. 1: (1975) 122-142.
- [7] J. W. Bennett, *Mycotechnology: The role of fungi in biotechnology*, **Journal of Biotechnology**, 66: (1998) 101-107.
- [8] S. I. Umezawa, *Low-molecular weight enzyme inhibitors of molecular origin*. **Annu. Rev. Microbiol.**, 36: (1982) 75-99.
- [9] D. A. Lowe and R. P. Elander, *Contribution of mycology to the antibiotic industry*, **Mycologia**, 75: (1983) 361-373.
- [10] K. Bui and P. Galzy, *Food yeast, in yeast technology*, Eds Spenser, J. F. T. and Spenser, D. M. Berlin, **Springer**, 241-265.
- [11] H. Onishi, *Yeast in fermented foods, in yeast technology*, Eds Spenser, J. F. T. and Spenser, D. M. Berlin, **Springer**, 167-198.
- [12] H. Romantschuk and H. Lehtomak, *Operation experience of the first full scale Pekilo SCP-mill application*, **Process Biochem.**, March, 29: (1978) 16-17.
- [13] M. Wainwright, *An introduction to fungal biotechnology*, John Wiley and Sons Ltd., England (1992) 127-128, 144.
- [14] W. D. Gray, *The use of fungi as food and in food processing*, **CRC Crit. Rev. Food Technol.**, 1: (1970) 1-225.
- [15] P. W. Lambert, *Industrial enzyme production, in the filamentous fungi*, **Fungal Technology**, J. E. Smith, D. R. Berry and B. Kristiansen (Eds.), London (1983) 210-237.
- [16] S. Şık, *Tarımsal bir atık olan pamuk sapının bio-pulp yönünden kullanılabilirliğinin araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya, 1994.
- [17] <http://www.forestpathology.org>
- [18] <http://www.msn.com>
- [19] [http://www.germology.com/wood\\_rot.htm](http://www.germology.com/wood_rot.htm)
- [20] R.A. Eaton and M. D. C. Hale, *Wood: Decay, pests and protection*, **Chapman and Hall**, London. (1993) 546.
- [21] A. Hatakka, *Lignin-modifying enzymes from selected white rot fungi: production and role in lignin degradation*, **FEMS Microbiol. Rev.**, 13: (1994) 125-135.
- [22] G. D. Bending, M. Friloux and A. Walker, *Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential*, **FEMS Microbiology Letters**, 212: (2002) 59-63.
- [23] D. S. Arora and P. K. Gill, *Laccase production by some white rot fungi under different nutritional conditions*, **Bioresource Technology**, 73: (2000) 283-285.
- [24] C. Srinivasan, T. M. D'souza, K. Boominathan and C. A. Reddy, *Demonstration of laccase in the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F 1767*, **Appl. Environ. Microbiol.**, 61: (1995) 4274-4277.
- [25] R. A. Zabel and J. J. Morrel, *Wood microbiology: Decay and its prevention*, **Academic Press Inc.**, New York, (1992) 476.

- [26] D. I. Reid and G. M. Paice, *Biological bleaching of kraft pulps by white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium**, **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, 56: (1996) 825-832.
- [27] <http://www.ftns.wau.nl/imb/research/wrf/biobl.html>
- [28] D. P. Barr and S. D. Aust, *Pollutant degradation by white-rot fungi*, **Rev. Environ. Contam. T.**, 138: (1994) 49-72.
- [29] L. Levin, A. Viale and A. Forchiassin, *Degradation of organic pollutants by the white rot basidiomycete *Trametes trogii**, **International Biodeterioration and Biodegradation**, (2002) 1-4.
- [30] K. E. Hammel, B. Kalyanaraman and T. K. Kirk, *Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzo[p]dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase*, **J. Biol. Chem.**, 261: (1986) 16948-16952.
- [31] F. K. Higson, *Degradation of xenobiotics by white rot fungi*, **Rev. Environ. Contam. Toxicol.**, 122: (1991) 111-152.
- [32] W. L. Chao and S. L. Lee, *Decoloration of azo dyes by three white-rot fungi : influence of carbon source*, **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 10: (1994) 556-559.
- [33] Doralice S. L. Balan and Redina T. R. Monteiro, *Decolorization of textile indigo dye by ligninolytic fungi*, **Journal of Biotechnology**, 89: (2001) 141-145.
- [34] S. Kahraman and Ö. Yeşilada, *Industrial and agricultural wastes as substrates for laccase production by white-rot fungi*, **Folia Microbiologica**, 46: 2( 2001) 133-136.
- [35] S. Ş. Kahraman and Ö. Yeşilada, *Effect of spent cotton on color removal and chemical oxygen demand lowering in olive oil mill wastewater by white rot fungi*, **Folia Microbiologica**, 44: 6 (1999) 673-676.
- [36] J. K. Glenn and M. H. Gold, *Decolorization of special polymeric dyes by the lignin degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium**, **Appl. Environ. Microbiol.**, 45: (1983) 1741-1747.
- [37] M. Freitag and J. J. Morrell, *Decolourization of the polymeric dye Poly R-478 by wood inhabiting fungi*, **Can. J. Microbiol.**, 38: (1992) 811-822.
- [38] R. Say, A. Denizli and M. Y. Arica, *Biosorption of cadmium (II), lead (II) and copper (II) with the filamentous fungus *Phanerochaete chrysosporium**, **Biosource Technology**, 76: (2001) 67-70.
- [39] P. Baldrian, *Interactions of heavy metals with white-rot fungi*, **Enzyme and Microbial Technology**, 32: (2003) 78-91.
- [40] E. Apohan, *Biyoteknolojik işlemden geçmiş ve geçmemiş tekstil fabrikası boyalarının çeşitli organizmalar üzerine toksik etkisinin araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya, 2001.
- [41] M. S. Cohen and Gabriele, *Degradation of coal by the fungi *Polyporus versicolor* and *Poria monticola**, **Appl. Env. Microbiol.**, 44: (1982) 23-27.
- [42] R. A. Blanchette, J. R. Obst, J. I. Hedges and K. Weliky, *Resistance of hardwood vessels to degradation by white rot basidiomycetes*, **Canadian Journal of Botany**, 66: (1988) 1841-1847.
- [43] J. Rogalski, T. Lundell, A. Leonowicz and A. Hatakka, *Production of laccase, lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase by various strains of *Trametes versicolor* depending on culture conditions*, **Acta Microbiologica Polonica**, 40: (1991) 221-234.
- [44] B. Otlu, *Peyniraltı suyu ve alkol fabrikası atıksularının arıtımı ve değerlendirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya, 2002.



- [45] V. M. Kaluskar, B. P. Kapadnis, CH. Jaspers and M. J. Penninckx, *Production of laccase by immobilized cells of Agaricus sp.*, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 76: (1999) 161-170.
- [46] T. K. Kirk and R. L. Farrell, *Enzymatic combustion: The microbial degradation of lignin*, **Ann. Rev. Microbiol.**, 41 (1987) 465.
- [47] M. Tien, TK. Kirk, *Lignin degrading enzyme from the hymenomycete Phanerochaete chrysosporium*, **Burds Science**, 221: (1983) 661-663.
- [48] JK. Glenn, MA Morgan, MB. Mayfield, M. Kuwara, MH. Gold, *An extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white – rot basidiomycete Phanerochaete chrysosporium*, **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, 114: (1983) 1077-1083.
- [49] W. B. Betts, *Biodegradation: Natural and synthetic materials*, Springer Verlag, Germany, (1991) 177-178.
- [50] K. Lundquist and TK. Kirk, *De novo synthesis and decomposition of veratryl alcohol by a lignin-degrading basidiomycete*, **Phytochem.**, 17: (1978) 1676.
- [51] M. Leisola and R. Waldner, *Production, characterisation and mechanism of lignin peroxidases. In treatment of lignocellulosics with white-rot fungi*, F. Zadrazil, P. Reinigier, **Elsevier**, (1988) 37-42.
- [52] P. J. Dodson, CS. Evans, PJ. Harvey and JM. Palmer, *Production and properties of an extracellular peroxidase from Coriolus versicolor which catalyses C $\alpha$ -C $\beta$  cleavage in a lignin model compound*, **FEMS Microbiol. Letts.**, 42: (1987) 17-22.
- [53] A. I. Hatakka, VP. Lankinen TK. Lundell, P. Hietanen, BO Fabricus, J.Pellinen, *The ligninolytic system of white-rot fungi and potential applications in the treatment of bleach plant effluents. In: Cellulose sources and exploitation*, JF. Kennedy, GO. Phillips, PA William (Eds) publ., **Ellis Horwood Ltd.**, (1989) 149-154.
- [54] A. Paszczynski, VB. Huynh and RL. Crawford, *Enzymatic activities of an extracellular manganese dependent peroxidase from Phanerochaete chrysosporium*, **Arch. Biochem. Biophys.**, 29: (1985) 37-41.
- [55] V. Renganatham, K. Miki, MH. Gold, *Multiple molecular forms of diarylpropane oxygenase, an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring, lignin-degrading enzyme from Phanerochaete chrysosporium*, **Arch. Biochem. Biophys.**, 241: (1985) 304-314.
- [56] S. (Şik) Kahraman, *Endüstriyel ve tarımsal atıkların biyoteknolojik olarak değerlendirilmesinde yeni bir yaklaşım*, Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya, 1998.
- [57] R. Bourbonnais and M. Paice, *Oxidation of non-phenolic substrates, an expanded role for laccase in lignin biodegradation*, **FEBS Lett.**, 267: (1990) 99-102.
- [58] A. I. Yaropolov, O. V. Skorobogatko, S. S. Vartanov and S. D. Varfolomeyev, *Properties, catalytic mechanism and applicability*, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 49: (1994) 257-280.
- [59] A. M. Mayer and R. C. Staples, *Laccase: new functions for an old enzyme*, **Phytochemistry**, 60: (2002) 551-565.
- [60] H. Claus and Z. Filip, *The evidence for a laccase –like enzyme activity in a Bacillus sphaericus strain*, **Microbiol. Res.**, 152: (1997) 209-216.
- [61] A. Givaudan, A. Effosse, D. Faure, P. Potier, M. L. Boullant and R. Bally, *Polyphenol oxidase in Azospirillum lipoferum isolated from rice rhizosphere: Evidence for laccase activity in non-motile strains of Azospirillum lipoferum*, **FEMS Microbiol. Lett.**, 108: (1993) 205-210.
- [62] G. Diamantidis, A. Effosse, P. Potier and R. Bally, *Purification and characterization of the first bacterial laccase in the rhizospheric bacterium Azospirillum lipoferum*, **Soil Biol. Biochem.**, 32: (2001) 919-927.

- [63] T. L. Hopkins and K. J. Kramer, *Insect cuticle sclerotization*, **Annu. Rev. Entomol.**, 37: (1992) 273-302.
- [64] K.J. Kramer, M. R. Kanost, T. L. Hopkins, H. Jing, Y. C. Zhu, R. Xu, J. L. Kerwin and F. Turecek, *Oxidative conjugation of catechols with proteins in insect skeletal systems*, **Tetrahedron**, 57: (2001) 385-392.
- [65] G. F. Leatham and M. A. Stahmann, *Studies of the laccase of *Lentimus edodes*: Specificity, localization and association with the development of fruiting bodies*, **Journal of General Microbiology**, 125: (1981) 147-157.
- [66] B. M. Harvey and J. R. K. Walker, *Studies with plant laccases: Comparison of plant and fungal laccases*, **Biochem. Mol. Biol. Biophys.**, 3: (1999) 45-51.
- [67] A. M. Mayer and E. Harel, *Polyphenol oxidases in plants*, **Phytochemistry**, 18: (1979) 193-215.
- [68] E. I. Solomon, U. M. Sundaram and T. E. Machonkin, *Multicopper oxidases and oxygenases*, **Chem. Rev.**, 96: (1996) 2563-2605.
- [69] J. A. Wahleither, F. Xu, F. Brown, K. M. Brown, S. H. Golightly, E. J. Halkier, T. Kauppinen, S. Pederson and P. Schneider, *The identification and characterization of four laccases from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani** **Curr. Genet.**, 29: (1996) 395-403.
- [70] S. I. Kwon, and A. J. Anderson, *Laccase isozymes: Production by an opportunistic pathogen, a *Fusarium proliferatum* isolate from wheat*, **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, 59: (2001) 235-242.
- [71] I. Marbach, E. Harel and A. M. Mayer, *Molecular properties of extracellular *Botrytis cinerea* laccase*, **Phytochemistry**, 23: (1984) 2713-2717.
- [72] R. Pezet, V. Pont and K. Hoang-van, *Enzymatic detoxication of stilbenes by *Botrytis cinerea* and inhibition by grape berries proanthocyanidins*, In: K. Verhoeff, K. Malathrakis, N. E. Williamson, B. (Eds.) *Recent Advances in Botrytis Research*. **Pudoc Scientific**, Wageningen, (1992) 87-92.
- [73] A. Viterbo, R.C. Staples, B. Yagen and A. M. Mayer, *Selective mode of action of cucurbitacin in the inhibition of laccase formation *Botrytis cinerea**, **Phytochemistry**, 35: (1994) 1137-1142.
- [74] R. Pezet, *Purification and characterization of a 32-kDa laccase-like stilbene oxidase produced by *Botrytis cinerea**, **Pers.: Fr. FEMS Microbial. Lett.**, 167: (1998) 203-208.
- [75] C. F. Thurston, *The structure and function of fungal laccases*, **Microbiology**, 140: (1994) 19-26.
- [76] Y. Fukushima and T. K. Kirk, *Laccase component of the *Ceriporiopsis subvermispora* lignin degrading system*, **Appl. Environ. Microbiol.**, 61: (1995) 872-876.
- [77] G. Palmieri, P. Giardina, C. Blanco, A. Scaloni, A. Capasso and G. Sannia: *A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus**, **J. Biol. Chem.**, 272: (1997) 31301-31307.
- [78] M. Cambria, A. Cambria, S. Ragusa, E. Rizzarelli, *Production, purification and properties of extracellular laccase from *Rigidoporus lignosus**, **Protein Express Purifi.**, 18:(2000) 141-147.
- [79] C. Eggert, U. Temp and J. F. D. Dean and K.E. L. Eriksson, *A fungal metabolite mediates degradation of non phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase*, **FEBS Lett.**, 391: (1996b) 144-148.
- [80] H. Galliano, G. Gas, J. L. Seris and A. M. Boudet, *Lignin degradation by *Rigidoporus lignosus* involves synergistic action of two oxidizing enzymes: Mn peroxidase and laccase*, **Enzyme Microb. Technol.**, 13: (1991) 478-482.

- [81] S. Larsson, P. Cassland L. and L. J. Jonsson, *Development of a Saccharomyces cerevisiae strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase*, **Appl. Environ. Microbiol.**, 67: (2001) 1163-1170.
- [82] C. G. Bauer, A. Kuehn, N. Gajovic, O. Skorobogatko, P. J. Holt, N. C. Bruce, A. Makower, C. R. Lowe and F. W. Scheller, *New enzyme sensors for morphine and codeine based on morphine dehydrogenase and laccase*, **Fresenius' J. Anal. Chem.**, 364: (1999) 179-183.
- [83] O. Brenna and E. Bianchi, *Immobilised laccase for phenolic removal in must and wine*, **Biotechnology Letters**, 16: 1 (1994) 35-40.
- [84] R. C. Minussi, G. M. Pastore and N. Duran, *Potential applications of laccase in the food industry*, **Trends in Food Science and Technology**, 13: (2002) 205-216.
- [85] C. Bucke, *Biochemistry of bioremediation by fungi*, **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, 71: (1998) 356-367.
- [86] K. Vasdev, R. C. Kuhad, R. K. Saxena, *Decolorization of triphenylmethane dyes by the bird's nest fungus Cyathus bulleri*, **Current Microbiol**, 30: (1995) 269-272.
- [87] O. Yeşilada, S. Şık and M. Sam, *Biodegradation of olive oil mill wastewater by Coriolus versicolor and Funalia trogii: Effects of agitation, initial COD concentration, inoculum size and immobilization*, **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 14: (1998) 37-42.
- [88] S. S. Kahraman and I. H. Gurdal, *Effect of synthetic and natural culture media on laccase production by white rot fungi*, **Bioresource Technology**, 82: (2002) 215-217.
- [89] G. S. Nyanhongo, J. Gomes, G. M. Gübitz, R. Zvauya, J. Read and W. Steiner, *Decolorization of textile dyes by laccases from a newly isolated strain of Trametes modesta*, **Water Research**, 36: (2002) 1449-1456.
- [90] M. G. Paice, R. Bourbonnais, I. D. Reid, F. S. Archibald and L. Jurasek, *Oxidative Bleaching enzymes: a review*, **Journal Of Pulp And Paper Science**, 21: 8 (1995) 280-284.
- [91] R. Bourbonnais and M. G. Paice, *Demethylation and delignification of kraft pulp by laccase of Trametes versicolor*, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 36: (1992) 823-827.
- [92] J. J. Macheix, J. C. Sapis and A. Fleuriet, *Phenolic compounds and polyphenoloxidases in relation to browning in grapes and wines*, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 30: (1991) 441-486.
- [93] C. Cantarelli, O. Brenna, G. Giovanelli and M. Rossi, *Beverage stabilization through enzymatic removal of phenolics*, **Food Biotechnology**, 3: (1989) 203-213.
- [94] A. Zamorani, *Enzymatic processing of musts and wines*. In C. Cantarelli and G. Lanzarini (Eds.), *Biotechnology applications in beverage production*, **Elsevier Applied Science**: New York, (1989) 223-246.
- [95] R. A. Simkus and V. Laurinavicius, *Laccase containing sol-gel as a signal enhancer in optical bioassay of aromatic amines*, **Biologica**, (1-2) (1995) 44-46.
- [96] D. B. Papkovsky, A. L. Ghindilis and I. N. Kurochkin, *Flow-cell fiberoptic enzyme sensor for phenols*, **Analytical Letters**, 26: (1993) 1505-1518.
- [97] R. A. Simkus, V. Laurinavicius, L. Boguslavsky, T. Skotheim, S. Tanenbaum, S. Nakas and D. J. Slomczynski, *Laccase containing sol-gel based optical biosensors*, **Analytical Letters**, 29: (1996) 1907-1919.
- [98] A. A. Leontievsky, N. M. Myasoedova, B. P. Bawskunov, C. S. Evans, L. A. Golovleva, *Transformation of 2,4,6-trichlorophenol by the white rot fungi *Panus tigrinus* and *Coriolus versicolor**, **Biodegradation**, 11: (2000) 331-340.
- [99] P. M. L. Niku and L. Viikari, *Enzymatic oxidation of alkenes*, **Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic**, 10: (2000) 435-444.

- [100] C. Raghukumar, *Fungi from marine habitats: An application in bioremediation*, **Mycol. Res.**, 104: (2000) 1222-1226.
- [101] R. M. Fakoussa and P. J. Frost, *In vivo-decolorization of coal- derived humic acids by laccase-excreting fungus Trametes versicolor*, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 52: (1999) 60-65.
- [102] S. B. Pointing and L. L. P. Vrijmoed, *Decolorization of azo and triphenylmethane dyes by Pycnoporus sanguineus producing laccases the sole phenoloxidase*, **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 16: (2000) 317-318.
- [103] E. Rodriguez, M. A. Pickard and D. R. Vazquez, *Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi*, **Curr. Microbiol.**, 38: (1999) 27-32.
- [104] A. Abadulla, T. Tzanov, S. Costa, K. H. Robra, P. A Cavaco and G. M. Guebitz, *Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from Trametes hirsuta*, **Appl. Environ. Microbiol.**, 66: (2000) 3357-3362.
- [105] R. Campos, A. Kandelbauer, K. H. Robra, A. Cavaco-Paulo and G. M. Guebitz, *Indigo degradation with purified laccases from Trametes hirsuta and Sclerotium rolfsii*, **Journal of Biotechnology**, 89: (2001) 131-139.
- [106] G. Palmieri, P. Giardina, C. Bianco, B. Fontanella and G. Sannia, *Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus Pleurotus ostreatus*, **Appl. Environ. Microbiol.**, 66: (2000) 920-924.
- [107] P. Baldrian and J. Gabriel, *Copper and cadmium increase laccase activity in Pleurotus ostreatus*, **FEMS Microbiology Letters**, 206: (2002) 69-74.
- [108] J. K. Dittmer, N. J. Patel, S. W. Dhawale and S. S. Dhawale, *Production of multiple laccase isoforms by Phanerochaete chrysosporium grown under nutrient sufficiency*, **FEMS Microbiol. Lett.**, 149: (1997) 65-70.
- [109] C. Salas, S. Lobos, J. Larrain L. Salas, D. Cullen, R. Vicuna, *Properties of laccase isoenzymes produced by the basidiomycete Ceriporiopsis subvermispora*, **Biotechnol. Appl. Biochem.**, 21: (1995) 323-33.
- [110] E. Karahanian, G. Corsini, S. Lobos and R. Vicuna, *Structure and expression of a laccase gene from the ligninolytic basidiomycete Ceriporiopsis subvermispora*, **Biochim. Biophys. Acta**, 1443: (1998) 65-74.
- [111] P. J. Collins and A. D. W. Dobson, *Regulation of laccase gene transcription in Trametes versicolor*, **Appl. Environ. Microbiol.**, 63: (1997) 3444-3450.
- [112] AM. Farnet, S. Tagger and J. Lepetit, *Effects of copper and aromatic inducers on the laccases of the white-rot fungus Marasmius quercophilus*, **C. R. L. Acad. Sci. Ser. III, Sci. La Vie**, Life 322: (1999) 499-503.
- [113] C. Galhaup and D. Haltrich, *Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus Trametes pubescens in the presence of copper*, **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 56: (2001) 225-32.
- [114] DM. Soden and ADW Dobson, *Differential regulation of laccase gene expression in Pleurotus sajor-caju*, **Microbiology** 147: (2001) 1755-63.
- [115] P. Baldrian, J. Gabriel and F. Freud, *Effect of cadmium on the ligninolytic activity of Stereum hirsutum and Phanerochaete chrysosporium*, **Folia Microbiol** 41: 4 (1996) 363-367.
- [116] D. S. Arora and D. K. Sandhu, *Laccase production and wood degradation by a white rot fungus Daedalea flavida*, **Enzyme Microb. Technol.** 7: ( 1985) 405-408.
- [117] D. K. Sandhu and D. S. Arora, *Laccase production by Polyporus sanguineus under different nutritional and environmental conditions*, **Experientia**, 41: (1985) 355-356.
- [118] J. M. Savoie, G. Mata and C. Billette, *Extracellular laccase production during hyphal interactions between Trichoderma sp. and Shiitake Lentinula edodes*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 49: (1998) 589-593.

- [119] D. S. Arora and P. K. Gill, *Effects of various media and supplements on laccase production by some white rot fungi*, **Bioresource Technology**, 77: (2001) 89-91.
- [120] R. P. S. Dhaliwal, H. S. Garcha and P. K. Khanna, *High laccase producing mutants of *Pleurotus florida**, **World. J. Microbiol. Biotechnol.** 8: (1992) 39-41.
- [121] C. Eggert, U. Temp, K. E. L. Eriksson, *The ligninolytic system of white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and characterization of the laccase*, **Appl. Environ. Microbiol.**, 62: (1996a) 1151-1158.
- [122] G. Fahreus, V. Tullander and H. Ljunggren, *Production of high laccase yields in cultures of fungi*, **Physiologia Plantarum**, 11: (1958) 631-642.
- [123] C. Raghukumar, T. M. D'souza, R. G. Thorn and C. A. Reddy, *Lignin modifying enzymes of *Flavodon flavus*, basidiomycete isolated from a coastal marine environment*, **Appl. Environ. Microbiol.**, 65: (1999) 2103-2111.
- [124] S. Şik and A. Ünyayar, *Pamuk sapı ile *Phanerochaete chrysosporium* ve *Funalia trogii*'nin yarı-katı fermantasyonu sonucu oluşan lakkaz, peroksidaz, ligninaz ve selüloz aktiviteleri*, **Tr. J. of Biology**, 22: (1998) 287-298.
- [125] OV. Skorobogatko, EV. Stepanova, VP. Gavrilova and AI. Yaropolov, *Effects of inducers on the synthesis of extracellular laccase by *Coriolus hirsutus*, a basidial fungus*, **Prikl. Biokhim. Mikrobiol.**, 32: (1996) 545-548.
- [126] MG. Fortina, A. Acquati, P. Rossi, PL: Manachini and C. Di Gennaro, *Production of laccase by *Botrytis cinerea* and fermentation studies with strain F226*, **J. Ind. Microbiol.**, 17: (1996) 69-72.
- [127] A. Rescigno, F. Sollai, N. Curreli, A. Rinaldi and E. Sanjust, *An extracellular laccase from *Pleurotus sajor-caju**, **Ital. J. Biochem.**, 42: (1993) 227A-8A.
- [128] I. Y. Lee, K. H. Jung, C. H. Lee and Y. H. Park, *Enhanced production of laccase in *Trametes versicolor* by the addition of ethanol*, **Biotechnology Letters**, 21: (1999) 965-968.
- [129] K. J. Kim, K. S. Shin and S. W. Hong, *Induction of extracellular polyphenol oxidase from two white-rot fungi*, **Korean Journal of Mycology**, 14:1 (1986) 43-48.
- [130] J. Hess, C. Leitner, C. Galhaup, K. D. Kulbe, B. Hinterstoisser, M. Steinwender and D. Haltrich, *Enhanced formation of extracellular laccase activity by the white-rot fungus *Trametes multicolor**, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 98-100: (2002) 229-241.
- [131] O. Yesilada, D. Asma and S. Cing, *Decolorization of textile dyes by fungal pellets*, **Process Biochemistry**, 38: (2003) 933-938.
- [132] O. Ardon, Z. Kerem and Y. Hadar, *Enhancement of lignin degradation and laccase activity in *Pleurotus ostreatus* by cotton stalk extract*, **Can. J. Microbiol.**, 44: (1998) 676-680.
- [133] C. Mougín, A. Kollmann and C. Jolival, *Enhanced production of laccase in the fungus *Trametes versicolor* by the addition of xenobiotics*, **Biotechnology Letters**, 24: (2002) 139-142.
- [134] E. Rosales, S. R. Couto and A. Sanrom'an, *New uses of food waste: application to laccase production by *Trametes hirsuta**, **Biotechnology Letters**, 24: (2002) 701-704.

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Emre BİRHANLI  
Doğum Yeri ve Tarihi : Malatya-17.07.1978  
Mesleği ve Durumu : Biyolog- Araştırma Görevlisi

### EĞİTİM

İlkokul : Fatih İlkokulu, 1984-1989  
Ortaokul : Anadolu Ticaret Lisesi, 1989-1993  
Lise : Malatya Lisesi, 1993-1996  
Lisans : İnönü Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 1997-2001  
Yüksek Lisans : İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 2001-2003

### ÇALIŞTIĞI KURUMLAR

Eylül 2002.... : İnönü Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Araştırma Görevlisi

### BİLİMSEL FAALİYETLER

- 1- Çeşitli Tekstil Boyalarının Renginin Gideriminde Beyaz Çürükçül Fungus Kullanımı, XVI. Ulusal Biyoloji Kongresi, 4-7 Eylül, Malatya.
- 2- Lakkaz Enziminin Biyoteknolojide Kullanımı (Seminer).
- 3- Mikroorganizmaların Lakkaz Üretimine Çeşitli Faktörlerin Etkisi, 2003/54, İnönü Üniversitesi BAPB (Devam eden proje).