

Çeşitli Basidiomycetes İzolatları İle Klorofenolik Bileşiklerin Biyolojik Yıkımı

Özge Tabak

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Eylül, 2008.

Biodegradation of Chlorophenolic Compounds by Various Basidiomycetes Isolates

Özge Tabak

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

September, 2008.

Çeşitli Basidiomycetes İzolatları İle Klorofenolik Bileşiklerin Biyolojik Yıkımı

Özge Tabak

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Genel Biyoloji Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Ahmet Çabuk

Eylül, 2008.

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Özge TABAK'ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Çeşitli Basidiomycetes İzolatları ile Klorofenolik Bileşiklerin Biyolojik Yıkımı" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Ahmet ÇABUK

İkinci Danışman : -

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

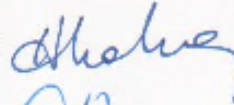
Üye : Yrd. Doç. Dr. Ahmet ÇABUK



Üye : Prof. Dr. Nazif KOLANKAYA



Üye : Doç. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ



Üye : Yrd. Doç. Dr. Mustafa YAMAÇ



Üye : Yrd. Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU



Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve
sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Nimetullah BURNAK

Enstitü Müdürü

ÖZET

Ksenobiyoteiklerin önemli bir sınıfı olan klorofenollerin, pestisit, herbisit ve odun koruyucu olarak yaygın bir kullanım alanları vardır. Yüksek toksisiteleri, kanser oluşturabilmeleri ve dayanıklılıkları nedeni ile toprak, sediment, yüzey suları ve atık sularda yaygın olarak bulunan önemli kirleticiler olarak bilinirler. Bununla birlikte, bazı mikroorganizmalar klorofenollerin biyolojik yıkımından ve aynı zamanda klor uzaklaştırılmasında sorumludurlar.

Bu çalışmada, beş farklı besiyeri kullanılarak lakkaz üretim yetenekleri açısından *Polyporus arcularius* (T 438), *Schizophyllum commune* (T 701), *Clavariadelphus truncatus* (T 192), *Pleurotus eryngii* (M 102), *Ganoderma applanatum* (M 105), *Trametes versicolor* (D 22), *Cerrena unicolor* (D 30), *Schizophyllum commune* (D 35), *Ganoderma lucidum* (D 33) ve *Trametes versicolor* ATCC (200801)'i içeren bazı basidiyomicetes suşlarından potansiyel lakkaz üreticisi seçilmiştir.

Trametes versicolor ATCC (200801)'in lakkaz üretim yeteneği denenilen diğer funguslardan tüm besiyerlerinde ve özellikle Modifiye Vogel Ortamında daha yüksek olarak bulunmuştur. Pentaklorofenol ve 2,6 diklorofenolden klor uzaklaştırılması işleminde inkübasyon süresi, pH, başlangıç substrat konsantrasyonu ve enzim miktarı parametreleri incelenmiştir. Belirlenen optimum koşullarda oksijen tüketimi ile klor uzaklaştırılması arasındaki korelasyon araştırılmıştır.

Optimum deklorasyon koşulları pentaklorofenol için 5 dakika inkübasyon süresi, pH 5.0, başlangıç substrat konsantrasyonu 200 µM ve enzim miktarı 4 ml; 2,6 diklorofenol için 2 dakika inkübasyon süresi, pH 5.0, başlangıç substrat konsantrasyonu 600 µM ve enzim miktarı 4 ml olarak belirlenmiştir.

Trametes versicolor ATCC (200801)' den elde edilen lakkaz enziminin pentaklorofenol ve 2,6 diklorofenol'den klor uzaklaştırılmasında etkin olarak kullanılabileceğini düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Basidiomycetes, lakkaz, *Trametes versicolor*, klor uzaklaştırılması, pentaklorofenol, 2,6 diklorofenol.

SUMMARY

Chlorophenols are an important class of xenobiotics that have been extensively used in the production of pesticides, herbicides and wood preservatives. They are therefore commonly found in soil, sediments, surface water and waste water and are known as priority environmental pollutants because of their high toxicity, carcinogenicity and persistence. However, some microorganisms are responsible for the degradation and also dechlorination of chlorophenolics.

In this study, was the selection of the potent strain from the point of view laccase production in some basidiomycetes strains including *Polyporus arcularius* (T 438), *Schizophyllum commune* (T 701), *Clavariadelphus truncatus* (T 192), *Pleurotus eryngii* (M 102), *Ganoderma applanatum* (M 105), *Trametes versicolor* (D 22), *Cerrena unicolor* (D 30), *Schizophyllum commune* (D 35), *Ganoderma lucidum* (D 33) and *Trametes versicolor* ATCC (200801) by using five different media.

The laccase production activity of *Trametes versicolor* ATCC (200801) was found to be more than that of the other fungi examined with all media especially Modified Vogel Medium. The parameter including incubation period, pH, initial substrate concentration and amount of enzyme were tested for dechlorination process for pentachlorophenol and 2,6 dichlorophenol. It was investigated that, correlation with oxygen consumption and dechlorination processes under the determined optimum conditions.

The optimum dechlorination was obtained after 5 min of incubation period, pH 5.0, 200 μ M initial substrate concentration and 4 ml amount of enzyme for pentachlorophenol, and 2 min of incubation period, pH 5.0, 600 μ M initial substrate concentration and 1ml amount of enzyme for 2,6 dichlorophenol.

We propose that according to its ability to dechlorination of pentachlorophenol and 2,6 dichlorophenol, laccase from *Trametes versicolor* ATCC (200801) might be effective in the dechlorination process.

Keywords: Basidiomycetes, laccase, *Trametes versicolor*, dechlorination, pentachlorophenol, 2,6 dichlorophenol

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca ve her zaman yakın ilgi ve desteğini gördüğüm, bilgilerini benden esirgemeyen, her konuda beni yönlendiren, danışmanlık ederek tüm olanakları sağlayan değerli danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr Ahmet ÇABUK'a,

Daima desteğini ve yardımlarını hissettiğim hocalarım Sayın Prof. Dr. Yalçın ŞAHİN ve Prof. Dr. Nazif KOLANKAYA ve Yrd. Doç. Dr. Mustafa YAMAÇ'a,

Tüm çalışmalar sırasında hep yanımda olup bana destek olan ve yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım, Serap GEDİKLİ, Yasemin Kevser ÖZEL, Gökhan GÜNGÖRMEDİ, Pınar BAYTAR ve diğer laboratuvar arkadaşlarıma,

Her konuda olduğu gibi çalışmalarım ve tüm öğrenim hayatım boyunca sabır ve özveriyle beni destekleyen, daima yanımda olan Canım Aileme Sonsuz Teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	4
2.1.Basidiomycetes.....	4
2.1.1.Beyaz Çürükçül Funguslar ve Kullanım Alanları.....	5
2.1.2. <i>Trametes versicolor</i>	7
2.1.2.1. Sistematik Yeri ve Sinonimleri.....	7
2.1.2.2. Biyolojik Özellikleri.....	8
2.1.2.3. Ekolojisi.....	9
2.1.2.4. Enzimleri ve Etkileri.....	9
2.2. Fenol Oksidaz Grubu Enzimler ve Uygulama Alanları.....	10
2.3. Lakkaz Enzimi (EC 1.10.3.2 para-difenol: oksijen oksidoredüktaz).....	13
2.3.1 Lakkaz Enziminin Moleküler Yapısı.....	13
2.3.2. Lakkaz Enziminin Aktif Bölgesinin Yapısı.....	16
2.3.3. Lakkaz Enziminin Katalitik Aktivitesi.....	16
2.3.3.1. Lakkaz Enzimi İçin Katalitik Etki Mekanizması.....	17
2.3.4. Lakkaz Enziminin Biyolojik Fonksiyonları.....	18
2.3.5. Lakkaz Enziminin Farklı Organizmalarda Dağılışı.....	19
2.3.6. Lakkaz Enziminin Uygulama Alanları.....	24
2.4. Organik Klorofenolik Toksik Bileşikler ve Çevre Üzerine Etkileri.....	31

2.5. Çalışmalarda Kullanılan Klorofenoller.....	33
2.5.1 Pentaklorofenol (PCP).....	33
2.5.1.1. Kullanım Alanları.....	34
2.5.1.2. Kaynakları ve Potansiyel Etkileri.....	34
2.5.1.3. İnsan Sağlığı Üzerindeki Etkileri.....	35
2.5.1.3.1. Akut Etkileri.....	35
2.5.1.3.2. Kanserojenik Olmayan Kronik Etkiler	35
2.5.1.3.3. Kanser Oluşturma Riski.....	36
2.5.1.4. Fiziksel Özellikleri.....	36
2.5.2. 2,6 Diklorofenol (2,6 DCP).....	36
2.5.2.1. Fiziksel Özellikleri.....	36
2.5.2.2. Kullanım Alanları.....	36
2.5.2.3. İnsan Sağlığına Etkileri.....	37
3.YÖNTEM VE GEREÇLER.....	38
3.1. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar	38
3.2. Tarama Çalışması	38
3.3. Kullanılan Besiyerleri ve İçerikleri.....	38
3.3.1. Stok Basal Medium (SBM):.....	39
3.3.2. Mikolojik Sıvı Besiyeri.....	39
3.3.3. Potato Dextrose Broth (PDB):.....	40
3.3.4. Modifiye Vogel Besiyeri:.....	40
3.3.5. Mikiashivali (2006) Tarafından Önerilen Besiyeri:.....	41
3.4. Lakkaz Aktivitesinin Ölçümü.....	42
3.5. Serbest Klor Ölçümleri.....	42
3.6. Çözünmüş Oksijen Ölçümleri.....	43
3.7. Deklorinasyon Çalışmaları.....	43
3.7.1. Deklorinasyon Çalışmalarında Kullanılan Biyoreaktörün Özellikleri.....	43

3.8. Biyoreaktörde Deklorinasyon İçin Optimum Koşulların Belirlenmesi.....	44
3.8.1. İnkübasyon Süresinin Enzimatik Deklorinasyona Etkisi.....	45
3.8.2. Ortam pH'sının Enzimatik Deklorinasyon Etkisi.....	45
3.8.3. Substrat Konsantrasyonunun Enzimatik Deklorinasyona Etkisi.....	46
3.8.4. Enzim Miktarının Enzimatik Deklorinasyona Etkisi.....	46
4. BULGULAR.....	47
4.1. Çalışmada Denenen Kültürlerin Lakkaz Üretim Yetenekleri Açısından Karşılaştırılması	47
4.2. Lakkaz Enzimi ile Pentaklorofenol Deklorinasyonu için Optimum Koşulların Belirlenmesi	52
4.2.1 Sürenin Pentaklorofenol Deklorinasyonuna Etkisi.....	52
4.2.2. pH'ın Pentaklorofenol Deklorinasyonuna Etkisi.....	53
4.2.3. Substrat Konsantrasyonunun pentaklorofenolün Deklorinasyonuna Etkisi.....	54
4.2.4. Enzim Miktarının pentaklorofenolün Deklorinasyonuna Etkisi.....	55
4.3. Lakkaz Enzimi ile 2,6 Diklorofenol Deklorinasyonu için Optimum Koşulların Belirlenmesi	56
4.3.1. Sürenin 2,6-diklorofenol Deklorinasyonuna Etkisi.....	56
4.3.2. pH'ın 2,6-diklorofenol Deklorinasyonuna Etkisi.....	57
4.3.3. Substrat Konsantrasyonunun 2,6-diklorofenolün Deklorinasyonuna Etkisi.....	58
4.3.4. Enzim Miktarının 2,6-diklorofenolün Deklorinasyonuna Etkisi.....	59
4.4. Belirlenen Optimum Koşullarda Deklorinasyon Sırasında Oksijen Tüketiminin Belirlenmesi	60
5.SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	63
6.KAYNAKLAR DİZİNİ.....	69

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1.2.1. <i>Trametes versicolor</i> 'un yaşam alanından bir görüntüsü.....	7
2.3.1.1. A. Lakkazın üç boyutlu şekli (Bakır atomları gölgeli daireler şeklinde gösterilmiştir)	
B. Lakkazın moleküler yapısı.....	15
3.7.1.1. Deklorinasyon çalışmalarında kullanılan reaktörün görünümü (A: Isıtıcı manyetik karıştırıcı, B: Reaktör kabı, C: Isı probu, D: O ₂ elektrodu, E: Oksijen metre).....	44
4.1.1. Denemede kullanılan fungal kültürlerin Potato dekstroz broth besiyerinde, lakkaz aktivite değerlerinin karşılaştırılması (çalışma koşulları: 30° C, 150 rpm, 10 gün).....	47
4.1.2. Denemede kullanılan fungal kültürlerin Modifiye Vogel besiyerinde, lakkaz aktivite değerlerinin karşılaştırılması (çalışma koşulları: 30° C, 150 rpm, 10 gün).....	48
4.1.3. Denemede kullanılan fungal kültürlerin Mikolojik Sıvı besiyerinde, lakkaz aktivite değerlerinin karşılaştırılması (çalışma koşulları: 30° C, 150 rpm, 10 gün).....	49
4.1.4. Denemede kullanılan fungal kültürlerin Stok Basal Medium besiyerinde, lakkaz aktivite değerlerinin karşılaştırılması (çalışma koşulları: 30° C, 150 rpm, 10 gün).....	50
4.1.5. Denemede kullanılan fungal kültürlerin Mikiashvili 2006 tarafından önerilen besiyerinde, lakkaz aktivite değerlerinin karşılaştırılması (çalışma koşulları: 30° C, 150 rpm, 10 gün).....	51
4.1.6. Modifiye Vogel Besiyerinde üretilen <i>Trametes versicolor</i> (ATCC200801)'in lakkaz aktivitesinin zamana bağlı değişimi (hata çubukları standart sapmayı göstermektedir).....	52
4.2.1.1. Lakkaz enzimi ile pentaklorofenolden klor uzaklaştırılmasında sürenin etkisi.(çalışma koşulları: başlangıç substrat konsantrasyonu, 200µM; enzim aktivitesi 6,91;1 ml enzim miktarı;3 dakika; pH 5).....	53
4.2.2.2. Lakkaz enzimi ile pentaklorofenolden klor uzaklaştırılmasında ortam pH değerinin etkisi. (çalışma koşulları: başlangıç substrat konsantrasyonu, 200µM; enzim aktivitesi 6,91; 1 ml enzim miktarı;5 dakika; pH 5).....	54
4.2.3.1. Lakkaz enzimi ile pentaklorofenolden klor uzaklaştırılmasında substurat konsantrasyonunun etkisi. (çalışma koşulları; başlangıç substrat konsantrasyonu, 200µM; enzim aktivitesi 6,91; 1 ml enzim miktarı;5 dakika; pH 5).....	55
4.2.4.1. Lakkaz enzimi ile pentaklorofenolden klor uzaklaştırılmasında enzim miktarının etkisi (çalışma koşulları: başlangıç substrat konsantrasyonu, 200µM; enzim aktivitesi 6,91; 1 ml enzim miktarı;5 dakika; pH 5.0).....	xii 56
4.3.1.1. Lakkaz enzimi ile 2,6-diklorofenolden klor uzaklaştırılmasında sürenin etkisi. (çalışma koşulları: başlangıç substrat konsantrasyonu, 200µM; enzim aktivitesi 7,6; 1 ml enzim miktarı;5 dakika; pH 5).....	57

4.3.2.1 Lakkaz enzimi ile 2,6-diklorofenolden klor uzaklaştırılmasında ortam pH'ının etkisi. (Çalışma koşulları: başlangıç substrat konsantrasyonu, 200 μ M; enzim aktivitesi 7,6; 1 ml enzim miktarı;2 dakika; pH 5).....	58
4.3.3.1. Lakkaz enzimi ile 2,6-diklorofenolden klor uzaklaştırılmasında substrat konsantrasyonunun etkisi. (çalışma koşulları: başlangıç substrat konsantrasyonu, 200 μ M; enzim aktivitesi 7,6; 1 ml enzim miktarı;2 dakika; pH 5;).....	59
4.3.4.1 Lakkaz enzimi ile 2,6-diklorofenolden klor uzaklaştırılmasında enzim miktarının etkisi (çalışma koşulları: başlangıç substrat konsantrasyonu, 200 μ M; enzim aktivitesi 7,6; 1 ml enzim miktarı;2 dakika; pH 5).....	60
4.4.1. Lakkaz enzimi ile pentaklorofenol'den klor uzaklaşması sırasında ortamdaki çözünmüş oksijen konsantrasyonundaki değişim (çalışma koşulları: pH 5, 200 μ M başlangıç substrat konsantrasyonu, enzim miktarı 1 ml).....	61
4.4.2. Lakkaz enzimi ile 2,6 diklorofenol'den klor uzaklaşması sırasında ortamdaki çözünmüş oksijen konsantrasyonundaki değişim (çalışma koşulları: pH 5, 600 μ M başlangıç substrat konsantrasyonu, enzim miktarı 1 ml).....	62

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.3.1.1. Değişik kaynaklardan elde edilen lakkaz enziminin moleköl ağırlıkları	14
2.3.5.1. Lakkazların fungal üreticileri	20
2.3.6.1.Farklı lakkaz uygulamaları.....	25

1.GİRİŞ

İçinde yaşadığımız yüzyıl birçok teknolojik olanakları insanlığın hizmetine sunarken, bir yandan da çevre sağlığı ve biyoçeşitlilik üzerinde düzeltilmesi zor olan tahribatlar oluşturabilmektedir. Doğanın temel fiziksel unsurları olan hava, toprak ve su üzerinde zararlı etkilerin oluşması ile ortaya çıkan canlıların yaşamsal etkinliklerini olumsuz yönde etkileyen çevre sorunlarının tümü çevre kirliliğini meydana getirmektedir (Karpuzcu, 1991).

Nüfusu hızla artmakta olan dünyamızda endüstrileşmenin yol açtığı başlıca sorunlardan biri de endüstriyel atıklardır. Endüstriyel atıkların yanı sıra, insan ve hayvan kaynaklı artıklar da dünyamız için büyüklüğü giderek artan bir sorun oluşturmaktadır. İster endüstriyel kaynaklı ister insan ve hayvan kaynaklı olsun, bu atıkların yol açtıkları veya açacakları sorunların önlenmesi hem dünyamız açısından hem de gelecek nesiller açısından oldukça büyük önem taşımaktadır. İçinde bulunduğumuz yüzyılda çevre bilincinin dünyamızda halen tam olarak yerleşmemiş olması, gelecek kuşaklar açısından büyük bir kayıptır. Şu bir gerçektir ki, çevre kalitesinin kontrolü bireysel bir istek olmaktan çok toplumsal bir gerekliliktir.

Son yirmi yıl içerisinde, atıkların arıtımında enzimlerin kullanımına yönelik oldukça dikkate değer çalışmalar yürütülmüştür. Enzimlerin atık arıtımında sundukları yeni olanaklar üzerindeki çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir.

Enzimler günlük yaşantımızda önemli rolü olan biyomoleküller haline gelmiştir. Bugün enzimlerden; gıda, ilaç ve kimya endüstrisinde, dericilik, boya ve temizlik maddeleri üretimi gibi özel konularda, biyoloji ve biyoteknoloji bilim dallarında, tıp, tarım ve veterinerlik alanlarında yaygın olarak yararlanılmaktadır.

Biyoteknolojide yaşanan gelişmelere bağlı olarak, daha iyi izolasyon ve saflaştırma yöntemlerinin kullanılması ile daha ucuz ve daha kolay elde edilebilir enzimlerin üretimi sağlanmaktadır (Öztan, 2007).

Kimya endüstrisinin günümüzde üretmiş olduğu klorlufenolik veya aromatik bileşiklerin geniş kullanım alanları vardır. Ancak bu bileşiklerin doğal çevre ortamlarında biyoyıkımı oldukça yavaş seyreden bir süreçtir. Klorlu aromatikler toksik ve rekalsitran (biyoyıkıma dirençli) olmaları nedeniyle kazandıkları ksenobiyotik özelliklerinden dolayı çevre sağlığı açısından önemli sorunlar yaratır. Bu grup bileşiklerin deklorinasyonu, bunların detoksifikasyonlarında ve biyoyıkımında önemli bir aşama olarak karşımıza çıkmaktadır.

Endüstriyel kaynaklı pek çok ürün doğada yaygın olarak bulunan fenol miktarının artmasına neden olmaktadır. Fenol ve türevleri sentetik reçine, plastik, biyosid, dezenfektan, boya, antioksidan, patlayıcı ve fotoğrafçılıkta kullanılan bazı kimyasalların üretiminde kullanılırlar. Bazı fenoller katı ve sıvı yakıtların işlenmesi sırasında yan ürün olarak üretilirler. Klorlu aromatik bileşikler, önemli miktarlarda üretilmeleri, parçalanmaya direnç göstermeleri, toksik olmaları ve sediment ve biyotada birikmeleri gibi nedenlerden dolayı çevre kirleticilerinin başında gelmektedirler. Klorlu fenoller ve türevlerinin yıllık üretimi binlerce tonla ifade edilen miktarlara ulaşmıştır (Ünal, 2001).

Yukarıda sözü edilen kimyasallar, gelişmiş ülkelerin endüstriyel aktivitelerinin bir sonucu olarak atıksularında bulunurlar. Bu atıklar organizmalar üzerinde önemli toksik etkilere neden olurlar ve kimyasal yapıları gereği biyolojik ayrışmaya karşı direnç göstermektedirler.

Biyolojik arıtma klorofenollerin güç ayrışabilir yapılarına rağmen, ekonomik nedenler ve yan ürün oluşumunun düşük olmasından dolayı, diğer arıtma yöntemlerine göre önemli ve ekonomik bir alternatiftir (Uysal, 2006)

Funguslar arasında Basidiomycetes grubu pek çok alanda kullanılacak önemli türleri içeren ve bu nedenle üzerinde çok çalışılan bir gruptur. Nitekim, bu grup fungusların çeşitli üyeleri kullanılarak klorlu aromatik yapıdaki çok çeşitli rekalsitran (biyoyıkıma-dayanımlı) kimyasalın metabolize edilebileceği gösterilmiştir. Söz konusu fungusların birçoğu ksenobiyotik (doğaya yabancı-yeni sentez) ve rekalsitran

özelliğindeki kimyasalları sahip oldukları geniş substrat-özgüllüğü gösteren peroksidaz ve polifenoloksidaz grubu enzimlerle metabolize etmeleri bazı bilim adamlarını bu enzimler konusunda araştırma yapmaya yöneltmiştir. Ancak, başta klorlu aromatik yapıdaki kimyasallar olmak üzere değişik rekalsitran bileşiklerin biyoyıkımı konusunda yapılan çalışmalar daha çok bu enzimleri sentezleyen beyaz-çürükçül funguslarla hücresel boyutta gerçekleştirilmiştir. Beyaz-çürükçül funguslar arasında yer alan çeşitli cins ve türler her iki gruba giren enzimleri sentezleme yeteneği ve potansiyeli bakımından farklılık gösterirler. Bu grup enzimleri yüksek verim ve çeşitlilikte sentezleyen beyaz-çürükçül funguslar hem çeşitli rekalsitran bileşiklerin ve diğer pek çok çevresel kirleticilerin biyoyıkımında etkin olmaları hem de enzimlerin üreticisi olmaları nedeni ile önemli biyolojik kaynaklardır. Literatür incelendiğinde; beyaz-çürükçül funguslar içinde *Trametes versicolor*' in en çok tercih edilen tür olduğu dikkat çekmektedir.

Bu çalışmada, farklı besiyerlerinde üretilen çeşitli fungal kültürlerin lakkaz üretim yeteneği ve dolayısı ile üretilen enzimlerin aktiviteleri kıyaslanmıştır. Tarama çalışması 5 farklı besiyerinde yapılarak en uygun besiyeri belirlenmiş ve seçilen besiyeri ile türün inkübasyon sürecinde en etkili üretimin olduğu dönem gün bazında araştırılmıştır. Tarama çalışmasının sonunda *Trametes versicolor* ATCC 200801 diğerleri arasından etkin lakkaz üreticisi olarak seçilmiş ve üretilen lakkazın çevresel kirleticilerin arıtımında kullanılabilirliği araştırılmıştır. Çevresel kirletici olarak endüstriyel aktivitelerin önemli bir atığı olan klorofenolik bileşikler arasından pentaklorofenol ve 2,6-diklorofenol seçilmiştir. Üretilen lakkaz enzimi ile pentaklorofenol ve 2,6-diklorofenolden klor uzaklaştırılması ile bu bileşiklerin detoksifikasyonu için optimum koşullar belirlenmiştir.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Basidiomycetes

Basidiomyceteler, odun ve diğer bitkisel maddelerin önemli ayrıştırıcılarıdır. Şapkalı mantarlar, raf mantarları, kurtmantarları ve küfler basidiomycota şubesi içerisinde sınıflandırılmıştır. Bu mantarlar isimlerini bazidiyumdan alır. Bazidiyum, organizmanın yaşam döngüsünde geçici bir diploid evreyi oluşturur. Bazidiyumun şekli kadeh şeklinde olduğu için, kadeh mantarları da denmektedir (Campbell ve Reece, 2006).

Bu şube, aynı zamanda mikoriza oluşturan mutualistleri ve bitki parazitlerini içerir. Mantarlar arasında basidiomycetler odunda en fazla bulunan ve kompleks bir monomer olan ligninin en iyi ayrıştırıcılarıdır. Pek çok raf mantarı zayıf ya da zarar görmüş ağaçların odun kısmında parazit yaşar ve ağaç öldükten sonra odunu ayrıştırır. Paslar ve odunların oluşturduğu iki basidiomycet grubu özellikle çok zararlı bitki parazitlerini içerir (Campbell ve Reece, 2006).

Kadeh şeklindeki bir mantarın yaşam döngüsünde, uzun ömürlü bir dikoryatik miselyum yer alır. Periyodik olarak, çevresel uyarılara yanıt olarak bu miselyum eşeyli olarak ürer ve özel üreme yapıları oluşturur. Bu üreme yapıları bazidiyokarp olarak isimlendirilir. Bir bazidiyokarpta bulunan çok sayıda basidiyum, eşeyssel sporların kaynaklarıdır. Tipik bir basidiyomiset hayat çemberinde, basidyosporlar çimlenerek miselleri oluştururlar ve misel hücreleri bir dikaryon üretmek üzere birleşirler. Dikaryon misel büyür ve basidiyospor üreten basidia üretir. Eşeyssiz üreme, basidiomycetlerde ascomycetlerdekine göre daha az yaygındır (Demirbağ, 2006).

Bir şapkalı mantar, bir basidiokarp örneğidir. Şapkalı mantarların şapkası, şapkanın altında geniş bir yüzey alanı oluşturan basidiyumları taşır ve korur. Sporlar, şapkanın altından düşer ve rüzgarla taşınır (Campbell ve Reece, 2006).

Bir basidiomycetin miselyumu, şapkalı mantarların hiflerindeki büyümeyi artırarak, birkaç saat içinde üreme yapılarını dikleştirebilir. Bu mantarlar, popüler olarak peri halkası olarak isimlendirilen bir halkayı bir gecede oluşturur. Bu tür bir halkanın merkezindeki çimenlerin normal görünüşlü olmalarına karşın, birkaç gün sonra halkanın altındaki çimenin boyunun kısaldığını ve şapkalı mantarların oluşturduğu halkanın hemen dışındaki çimenlerin özellikle canlandıkları fark edilir. Yeraltındaki miselyum dışı doğru büyüdükçe, onun merkezi kısmı ve merkezi kısmın üzerindeki şapkalı mantarlar ölürler. Çünkü miselyum kullanılabilir tüm besin maddelerini tüketmiştir. Böylece, canlı miselyum, üstte şapkaları oluşturan, genişleyen bir halkadır. Şapkalı mantarların altındaki çimenlerin boyu kısalmıştır. Çünkü çimenler, mineraller için aktif miselyum ile rekabet edemezler. Fakat gelişen miselyum topraktaki organik maddeyi parçalayan maddeler salgılar. Bunun sonucunda kullanılabilir hale gelen mineralleri absorblayan çimenler iyi gelişir. Miselyumun yılda yaklaşık 30 cm'lik bir hızda geliştikçe peri halkasının çapı yavaşça artar (Campbell ve Reece, 2006).

2.1.1. Beyaz Çürükçül Funguslar ve Kullanım Alanları

Saprotit funguslar, doğal olarak meydana gelmiş lignin gibi bitkisel kökenli büyük moleküllerin neredeyse tümünü parçalayabilen çok sayıda hücre dışı enzim üretirler. Bu özelliklerinden dolayı, biyojeokimyasal döngülerin gerçekleşmesinde önemli rol oynarlar. Az da olsa bu tip enzimleri oluşturan bakterilerde vardır.

Odunun yapısında bulunan maddeleri parçalama özelliğine göre funguslar ikiye ayrılır. Kahverengi çürükçüller, selüloz ve hemiselülozu parçalarken lignine dokunmazlar, böylelikle odun daha koyu bir renk alır.

Kahverengi çürükçüllere örnek olarak *Serpula lacrymans*, *Laetiporus portentosus* ve *Fomitopsis lilacino-gilva* verilebilir. Beyaz çürükçüller ise hücre çeperini oluşturan selüloz ve hemiselüloz gibi polisakkaritlerin yanında lignini de

parçalar. Dolayısı ile lignin uzaklaştırıldığı için odun daha açık renk alır. Beyaz çürükçül funguslara örnek olarak *Chrysosporium lignorum*, *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Stereum hirsutum*, *Pleurotus ostreatus*, *Hebeloma crustuliniform*, ve *Armillaria luteobubalina*, *Schizophyllum commune* ve *Daldinia concentrica* verilebilir. Özellikle *T.versicolor* ve *P. chrysosporium*'un kullanımı çeşitli biyoteknolojik uygulamalar için, özellikle çevresel açıdan yaygındır. Beyaz çürükçül funguslar, organik moleküller üzerinde rol oynayan çeşitli enzimleri üretirler. Özgül olmayan bu enzimler parçalanmaya karşı dirençli olan kirleticilerin yıkımında etkin olarak kullanılabilirler.

Beyaz çürükçül funguslar, biyoteknolojide pestisit, trinitrotoluen (TNT) içeren atık su boşaltımları ve kağıt endüstrisi tarafından üretilen klorlanmış lignin atıkları gibi çeşitli kompleks fenol içeren bileşikler parçalamakta da kullanılır. Bu funguslar lakkaz, lignin peroksidaz ve mangan peroksidaz gibi enzimlere sahip olmaları nedeni ile, polisiklik aromatikleri, poliklorlanmış bifenil ve dioksinleri, DDT'yi ve birçok klorlu fenolik bileşikler parçalayabilir, tekstil boyalarının renk gideriminde kullanılabilirler.

Beyaz çürükçül funguslar, fenol oksidazlar ve peroksidazlar dışında enzimlerde salgırlar. Bu funguslar sahip olduğu enzimleri üçe ayırmak mümkündür. İlki oduna atak yapan enzimlerdir. Bunlar karbonhidrat bileşenleri (selüloz, hemiselüloz) üzerinde hem de lignin üzerinde rol oynarlar. İkinci grup, süperoksit dismutaz ve gliksidaz içerir. Bunlar birinci gruptaki enzimlerle birlikte çalışır ancak tek başına odunu etkilemezler. Üçüncü grup ise glukoz 1-oksidad, piranoz 2-oksidad, sellobioz dehidrogenazı kapsar. Bu enzimlerin hepsi lignin degradasyonunda rol oynar (Leonowicz, vd. 1999).

Lignin, kağıt endüstrisinde de istenmeyen bir bileşiktir. Lignin bu endüstride pahalı ve çevreye zarar veren kimyasal bir işlemle uzaklaştırılmaktadır (Alain-Boudet, 2000). Bu nedenle beyaz çürükçül funguslar kağıt endüstrisinde kullanım alanı

bulmaktadırlar. Beyaz çürükçül funguslar, biyoteknolojide pestisit, trinitrotoluen (TNT) içeren atık su boşaltımları ve kağıt endüstrisi tarafından üretilen klorlanmış lignin atıkları gibi çeşitli kompleks fenol içeren bileşikleri parçalamakta ve tekstil boyalarının yıkımında da kullanılmaktadır (Wainwright, 1992; Kirk vd., 1992; Yesilada vd 2003).

2.1.2. *Trametes versicolor*



Şekil 2.1.2.1. *Trametes versicolor*'un yaşam alanından bir görüntüsü

2.1.2.1. Sistematik Yeri ve Sinonimleri

Şube: Mycophyta

Sınıf: Basidiomycetes

Alt sınıf: Holobasidiomycetidae (Homobasidiomycetidae, Hymenomycetidae)

Takım: Poriales (Aphyllophorales)

Familya: Polyporaceae

Cins: Trametes

Tür: *Trametes versicolor* (Esser, 1986).

Sinonimleri:

Boletus versicolor L.

Agarico -suber versicolor (L.) J.J. Paulet

Agaricus versicolor (L.) J.B. de Lamarck

Bjerkandera versicolor (L.) P.A. Karsten

Coriolus versicolor (L.) L. Quelet

Hansenia versicolor (L.) P.A. Karsten

Microporus versicolor (L.) K.E.O. Kuntze

Polyporus versicolor (L.) E.M. Fries

Polystictus versicolor (L.) E.M. Fries

Poria versicolor (L.) G.A. Scopoli

Sistotrema versicolor (L.) L. Trattinnick

Trametes versicolor (L.) A. Pilat (online: <https://fungalgenomics.concordia.ca/fungi/>, erişim tarihi: 4-4-2008).

2.1.2.2. Biyolojik Özellikleri

Fruktifikasyon organı çoğunlukla bantlı yapılardan oluştuğu için hindi kuyruğu fungusu olarak bilinen bu tür bir basidiomycete üyesidir (Volk, T. J. “*Trametes versicolor*”, online: <http://www.tomvolkfungi.net/>, erişim tarihi: 9/3/2007). Bantlar genellikle açık-koyu kahverenkli. Ancak beyazdan sarımsı kahverengiye hatta mavi, turuncu, kestane rengine kadar değişebilir. Bu değişiklik genetik polimorfizmden kaynaklanır. Ancak güneş ışığı gibi çevresel faktörlerden de etkilenebilir. Yelpaze şeklinde olan basidiyokarp, 10 cm çap, 0.5 cm kalınlığa kadar ulaşabilir ve üst üste binmiş raf şeklinde büyür. Basidiyokarpın yüzeyi açık ve koyu konsantrik bantlar şeklindedir, yüzeyi düzden kadifemsiye kadar değişir. Basidiyokarpın yüzeyinde küçük, dairesel ya da köşeli biçimde olan, mm’de 3-5 adet 20 spor tübü bulunmaktadır. Olgun basidiyosporlar zarsı ve 2x6 µm kadardır. *T. versicolor*, trimitik hif sistemine sahiptir. Vegetatif hif aralığı 3-10 µm uzunluğundadır (online: <https://fungalgenomics.concordia.ca/fungi/> erişim tarihi: 4-4-2008).

2.1.2.3. Ekolojisi

T. versicolor, tropik ve subtropik ormanlarda çok yaygın bir türdür. Sert odunlu ağaçlarda lignini parçalayan (delignifikasyon) önemli bir fungus türüdür. Bu nedenle beyaz çürükçül funguslar arasında sınıflandırılır. Bazen canlı ağaçlarda da odunun çürümesine neden olabilir (online: <https://fungalgonomics.concordia.ca/fungi/>, erişim tarihi: 4-4-2008).

2.1.2.4. Enzimleri ve Etkileri

T. versicolor, odun lignoselulozunun parçalanmasında rol oynayan birçok enzimi sentezlemektedir. Bunlar lignin peroksidazın (LiP) 16 izoformu, mangan peroksidazın (MnP) 5 izoformu, lakkaz, karboksimetil sellülaz, aviselaz ve sellobiyoz dehidrogenazdır. *T. versicolor*'un lignini parçalayan enzimlerinin ekspresyonunu düzenleyen mekanizmaları yaygın bir şekilde çalışılmıştır. LiP ve MnP'nin izozimlerini kodlayan genler tek bir gen grubu olarak toplanmıştır. Hücre içi ve hücre dışı proteazlar, lakkaz ve peroksidaz aktivitesinin düzenlenmesinde rol oynar. Bakır alışverişi enzimleri tahA ve CtaA, protein katlanması sırasında bu kofaktörün hücre içi varlığını kontrol ederek lakkazın üretimini düzenlerler. *T. versicolor* potansiyel olarak toksik metalleri şelatlamak için oksalik asit salgılar ve MnP ile Mn(III)'u stabilize eder. *T. versicolor*'un ürettiği lakkaz poliklorinlenmiş bifeniller (PCB), tekstil boya ve poliaromatik hidrokarbonlar (PAH) gibi biyolojik yıkıma dirençli birçok yeni sentez kimyasalı (ksenobiyotikleri) parçalamada kullanılabilir. Ayrıca *T. versicolor*'un enzimleri kağıt endüstrisinde de kendine yer bulmaktadır. Kağıt hamurunu biyolojik olarak beyazlatmak için *T.versicolor* kullanılmaktadır. Bu türün kültürleri, antibiyotikleri sentezleyebilir ya da parçalayabilir, karoten türevli aroma bileşiklerini üretebilir veya petrolün yüksek moleküler ağırlıklı asfalt bileşenlerini biyolojik olarak parçalayabilir (Ünal ve Kolankaya, 2001).

2.2. Fenol Oksidaz Grubu Enzimler ve Uygulama Alanları

Bitkilerdeki fenolik bileşiklerin oluşum metabolizması üzerine yapılan çalışmalar sırasında adına “fenol oksidazlar” denilen yeni bir enzim grubu tanımlanmıştır. Bu tanımlamanın ardından fenol oksidazların basit fenolik bileşikler üzerine etki mekanizmaları ve biyolojik rolleri üzerine pekçok araştırma yürütülmüştür.

Fenol oksidazlar günümüzde lakkaz ve tirozinaz tipi fenol oksidazlar olmak üzere iki gruba ayrılır. Fenol oksidazlar içerisinde dikkatleri ilk çeken lakkaz enzimidir. İlk olarak Schoenbein 1856 yılında, *Boletus luciferus* adlı bir mantarın ekstratında mavi bir pigment oluşumunu bildirmiş ve bundan 30 yıl sonra Yoshida (1886), lak ağacının lateksinde lakkazın varlığını gözlemiştir. Bu enzim ayrıca, Bertrand (1896) tarafından birkaç mantar varyetesinde de tanımlanmıştır. Bourquelot and Bertrand (1895,1896) tarafından yürütülen daha sonraki çalışmalarda, bazı mantar varyetelerinin, *Russula fortens* ve *R. nigricans* ekstratlarının renginin oksidasyon sürecinde önce kırmızıya, daha sonra koyu kahverengi ve siyaha dönüştüğünü gözlemlemişlerdir (Zawistowski vd., 1991). Bu araştırmacılar, yaptıkları daha sonraki araştırmalarda *R.nigricans*'in ekstratından, ekstrattaki bir oksidaz sisteminin varlığında melanin benzeri ürünler oluşturan bir maddeyi kristalize etmişlerdir. Bu madde, Bertrand (1896) tarafından tirozin aminoasidi olarak olarak tanımlanmıştır. Lakkaz tirozine karşı inaktif olduğundan Bertrand (1896) daha sonra tirozinaz olarak adlandırılan p-hidroksifenil amin, p-hidroksifenil metil amin, p-kresol ve fenolü de içeren çeşitli monohidroksi fenolik bileşiklerin aerobik oksidasyonlarını katalizleyen yeni bir oksidaz sistemi keşfettiğini anlamıştır (Bertrand 1908). Bertrand'ın lakkaz ve tirozinaz ile ilgili yaptığı çalışmaların ardından, fenol oksidazlar üzerine yapılan çalışmalar oldukça artmıştır. Kubowitz (1938); Keilin ve Mann (1938) yaptıkları çalışmalarda her iki enzim grubunda bakır içerdiklerini göstermişlerdir. Ayrıca, her iki enzim grubu da aktiviteleri için moleküler oksijenin varlığına ihtiyaç duyarlar. Buna karşılık, stearik etkiden dolayı tirozinaz p-fenollere karşı daha aktif iken, lakkaz o-fenollere karşı daha aktiftir. Lakkaz enzimi fenolik bileşikleri polimerize ederek toksisitelerini azaltabilme özelliğine

sahiptir. Bunun yanısıra lakkaz, fenolik bileşikler oldukça reaktif olan serbest anyonik radikallerine oksitler. Yapılan çalışmalar sonucunda hem tirozinaz hem de lakkaz enzimlerinin kresolaz ve kateşolaz aktiviteden sorumlu aktif merkezlerinin olduğu sonucuna varılmıştır (Burges, 1963).

Son yirmi yıl içerisinde, gerek organoklorlu fenolik bileşiklerin detoksifikasyonunda gerekse atık arıtımında enzimlerin kullanımına yönelik oldukça dikkate değer çalışmalar yürütölmüştür. Bu konudaki araştırmalar halen yoğun bir şekilde devam etmektedir. Enzimlerin, özellikle atık arıtımında sundukları yeni olasılıkların yoğun bir şekilde araştırılmaya devam edilmesinin başlıca üç temel nedeni vardır: Bunlardan birincisi çevreye deşarjları her geçen gün artan ksenobiyotik ve rekalsitrant nitelikteki atıkların arıtımında konvansiyonel arıtım süreçlerinin yetersiz kalması ve bu nedenle halihazırda kullanılmakta olan süreçlerden daha ucuz, daha hızlı, daha güvenilir ve uygulaması daha basit yöntemlerin geliştirilmesine gereksinim duyulmasıdır. İkinci temel neden enzimlerin belirli bir kirleticinin arıtımı için daha özgül amaçlı kullanılabilmeleri, üçüncüsü ise son zamanlarda biyoteknolojide yaşanan gelişmelere bağlı olarak daha iyi izolasyon ve saflaştırma yöntemleri kullanılarak daha ucuz ve daha kolay elde edilebilir enzimlerin üretimine olanak sağlamış olmasıdır (Karam ve Nicell, 1997).

Konvansiyonel tipteki atık arıtım teknolojileri fiziko-kimyasal ve mikroorganizmal etkinliğe dayanan biyolojik süreçleri içerir. Konvansiyonel arıtım teknikleriyle kıyaslandığında enzimatik arıtımın potansiyel avantajları şunlar olacaktır; biyolojik ataklara dayanıklı kirleticilere uygulanabilmesi; düşük ve yüksek kirletici konsantrasyonlarında işlev görebilmesi; çok geniş pH, sıcaklık ve tuzluluk aralıklarında çalışabilmesi; biyokitlenin yeni ortama uyumuna bağlı olarak meydana gelebilecek gecikmelerin olmayışı; biyokitle oluşmaması nedeniyle arıtım sonrası ortaya çıkabilecek atık miktarında azalma ve sürecin kontrolünün basit ve kolay olmasıdır (Karam ve Nicell, 1997).

Bu potansiyel avantajların ortaya konmasına bağılı olarak, araştırmacılar çalışmalarını, atıksuların katı atıkların, zehirli atıkların, toprakların iyileştirilmesi ve detoksifikasyona yönelik enzimatik arıtım yöntemlerinin geliştirilmesi üzerine odaklanışlardır.

Klorlu fenoller ve aromatik aminleri içeren aromatik bileşikler önemli bir kirletici grubunu oluştururlar ve bu kimyasalların yarattığı evre kirlilikleri birçok ülkede daha önce de belirtildiği gibi sıkı bir şekilde kontrol altında tutulmaktadır. Fenolik kirleticiler kömür, petrol, odun, metal kaplama, reçine ve plastik, boya, tekstil, maden, kağıt ve kağıt hamuru gibi çok çeşitli endüstrilerin atıksularında bulunurlar (Nicell vd., 1993). Aslında hemen hemen bütün fenolik bileşikler ve türevleri toksik bileşikler olup; evre için tehlikelidirler .Bu nedenle çevreye deşarjlarından önce atıksulardan uzaklaştırılmaları gereklidir. Endüstriyel atıksulardaki klorlu organik bileşikleri ve fenolleri gidermede kullanılan başlıca enzimler perosikdaz ve fenol oksidaz grubu enzimlerdir (Karam ve Nicell, 1997). Peroksidaz oksidoredüktaz sınıfından enzimleri içeren bir grup olup; hidrojen peroksidi oksitleyici olarak kullanmak suretiyle fenolleri okside edebilirler. Bu oksidasyon sonucunda fenoksi radikaller ortaya çıkar. Söz konusu fenoksi radikaller daha sonra çözelti içerisindeki diğer fenol molekülleriyle veya aromatik bileşiklerle tepkimeye girerek, poli-aromatik yapıda polimerler oluştururlar. Bu polimerler suda çözünmeyen bileşiklerdir ve bu nedenle sucul ortamlarda çökerler (Atlow vd., 1984). Fenolik bileşiklerin peroksidaz ile katalizlenen presipitasyonu, bu kirleticilerin giderimini oldukça kolaylaştırmaktadır. Çünkü znr olmayan polimerler basit filtrasyon yöntemleri kullanılarak atıksudan kolayca uzaklaştırılabilirler. Peroksidaz grubu enzimleri kullanarak atıksulardaki çeşitli fenolleri, aromatik aminleri, hidrokarbonları ve poliklorlu fenilleri uzaklaştırmak olanaklıdır (Klibanov vd., 1980; Alberti ve Klibanov, 1981; Klibanov ve Morris, 1981; Klibanov vd., 1983). Ancak ekonomik açıdan bakıldığında, yukarıda sözü edilen yöntemin en önemli dezavantajlarından birisi, oksitleyici ajan olarak kullanılan H₂O₂'in pahalı olması ve tepkime sırasında yüksek miktarlarda tüketildiğinden bu şekildeki arıtım sürecinin işletim maliyetini artırmasıdır. Bu nedenle son yıllarda peroksidaz enzimine alternatif olarak, fenol gideriminde fenol oksidazların kullanılması gündeme

gelmiştir. Bu tercihin başlıca nedeni, fenol oksidazların oksitleyici ajan olarak H_2O_2 yerine moleküler oksijeni (O_2) kullanmalarındır. Böylece, peroksidaz enziminin kullanıldığı fenol giderimi sürecinde, H_2O_2 kullanımına bağlı olarak karşı karşıya kalınan yüksek maliyet sorunu fenol oksidaz grubu enzimlerin kullanılmasıyla ortadan kalkmaktadır (Atlow vd., 1984).

Fenol oksidazlar oksidoredüktaz sınıfında yer alan enzimlerin oluşturduğu bir grup olup; fenolik bileşiklerin oksidasyon tepkimelerini katalizler. Daha önce de belirtildiği gibi bu enzim grubu, lakkaz ve tirozinaz tipi fenol oksidazlar olmak üzere başlıca iki gruba ayrılır. Her iki enzim grubu da aktivite göstermek için moleküler oksijenin varlığına gereksinim duyar. Ayrıca her iki enzimin de koenzimi yoktur (Karam ve Nicell, 1997).

2.3. Lakkaz Enzimi (EC 1.10.3.2 para-difenol: oksijen oksidoredüktaz)

Çok bakırlı mavi bir oksidazdır. Orto ve parafenollerini oksitleme yeteneğindedir (D'Annibale vd., 2000). Aromatik bileşiklerin hidroksil gruplarından bir proton ve elektronun ayrılması ile serbest radikal formlar oluşturur (Mason, 1955). Lakkazlar doğada geniş çaplı bir dağılım gösterirler ve pek çok bitki ve fungus türlerinde bulunurlar. Ekstrasellüler fungal lakkazlarla karşılaştırmalı çalışmalar çeşitli araştırmacılar tarafından yapılmıştır. Çeşitli basidiomycetes, ascomycetes ve deuteromycetes grubu mikroorganizmalar oldukça yüksek miktarlarda lakkaz enzimi üretme yeteneğindedirler. 2,5 xylidine lakkaz üretimi için indükleyici bir etki gösterirler (Berry vd., 1991; Zawistowski vd., 1991).

2.3.1 Lakkaz Enziminin Moleküler Yapısı

Lakkazlar, moleküler oksijeni suya indirgemek suretiyle özellikle fenol ve anilinler olmak üzere bir çok aromatik bileşiğin oksidasyonunu katalizleyebilen çok

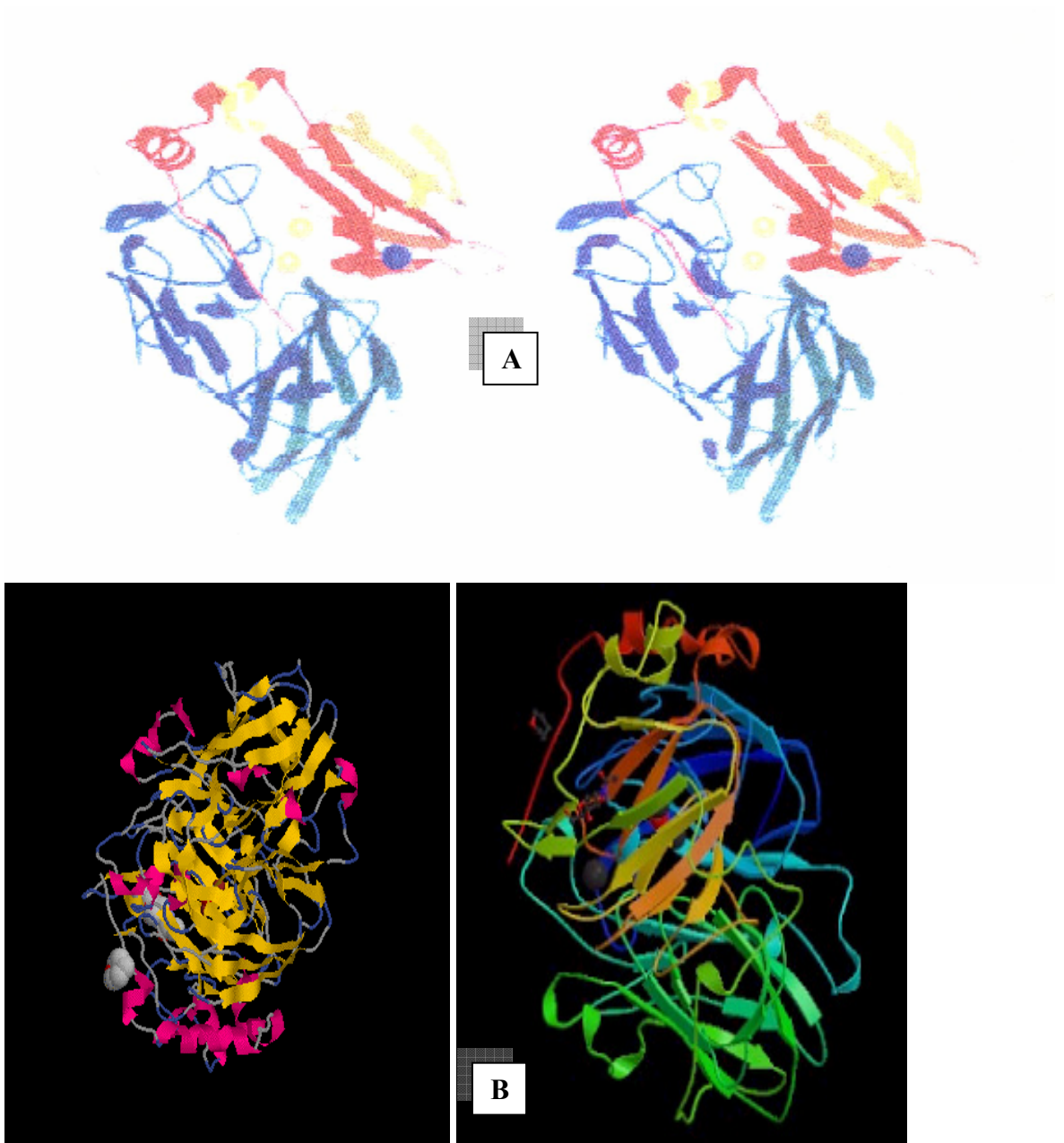
bakırlı enzimlerdir. Aynı reaksiyon birçok tarımsal ve endüstriyel kimyasal maddenin transformasyonunda da örölmektedir. (Gienfreda vd 1999).

Lakkaz enzimi yapısal olarak bir glikoproteindir. Enzimin karbonhidrat içeriği, protein molekülünün ağırlıkça %15-45'ini oluşturur. Enzimin içerdiği karbonhidratlar, heksozamin, glikoz, mannoz, galaktoz, fruktoz ve arabinozdur. Değişik kaynaklardan elde edilen lakkazın molekül ağırlığı geniş bir aralıkta değişir (Çizelge 2.3.1.1) (Yarapolov vd., 1994).

Çizelge 2.3.1.1. Değişik kaynaklardan elde edilen lakkaz enziminin molekül ağırlıkları (Yarapolov vd., 1994).

Lakkaz Kaynağı	Molekül Ağırlığı, kDa
<i>Pleurotus osreatus</i>	59
<i>Botrytis cinerea</i>	72
<i>Phellinus noxius</i>	70
<i>Trametes versicolor</i>	66
<i>Rhus vemicifera</i>	140
<i>Sycamore</i>	95

Farklı kaynaklardan elde edilen lakkazların izoelektrik noktaları 2.9 ile 4.5 arasında değişmektedir. Lakkaz molekülü genellikle dört adet bakır atomu içerir.



Şekil 2.3.1.1. A. Lakkazın üç boyutlu şekli (Bakır atomları gölgeli daireler şeklinde gösterilmiştir) (Mayer ve Staples, 2002). **B.** Lakkazın moleküler yapısı (www.bioeng.cstm.kyushu-ac.jp/enzyme/sankalangenkauso.htm)

2.3.2. Lakkaz Enziminin Aktif Bölgesinin Yapısı

Hidrojen peroksit oluşturmadan doğrudan suya katılan oksijene dört elektron aktaran oksidazlar genellikle kompleks enzimlerdir. Lakkaz bu tip enzimlerin en basitlerinden birisidir. Bakır 1'in ligandlarından biri, sistein veya metiyonin (lakkaz kaynağına bağlı olarak) olabilir.

Elektron Paramanyetik Rezonans (EPR) analizleri bakır 2'nin üç azot atomuna bağlandığını göstermektedir. Dördüncü bakır 2 ligandının da bir su molekülü olduğu gösterilmiştir (Winkler vd., 1982).

Lakkaz enzimine anyonların bağlanması üzerine yapılan kimyasal ve spektral analizler N_3^- , O_2^{2-} ve F^- iyonları için bakır 2 ve bakır 3 tipi bölgelerin yüksek afinite gösterdiklerini ortaya koymuştur.

Bakır 2 ve 3 atomlarının azot ile bağlanması da olasıdır. Lakkaz içine bir elektron bakır 1 üzerinden girebilir ve bakır 2'ye geçebilir. Bakır 2'nin ayrılması Bakır 2 ve Bakır 3 atomları arasında elektron geçişini engeller. Bakır 2 ve bakır 3 molekülleri muhtemelen birlikte çalışmaktadır ve oksijenin indirgenmesinden sorumludur (Winkler vd., 1982).

2.3.3. Lakkaz Enziminin Katalitik Aktivitesi

Bakır aktif bölgesi bulunan lakkazlar fenol bileşikleri, polifenoller, lignin poliamin gibi pek çok bileşiğin oksidasyon reaksiyonlarını katalizlerler. Enzimatik reaksiyonun ikinci substratı moleküler oksijendir. Diğer oksidoredüktazlarla katalizlenen reaksiyonlardan farklı olarak lakkaz tarafından katalizlenen reaksiyonlarda

moleküler halde bulunan oksijene elektronların transferi ile su molekülü oluşturulur (Baybalı, 2003).

2.3.3.1. Lakkaz Enzimi İçin Katalitik Etki Mekanizması

Değişik lakkaz çeşitlerinin reaksiyon verdiği substratların dağılımı çok geniştir. Basit olarak, p-difenol ile benzer özellikler gösteren substratlar lakkazlar tarafından oksitlenirler. Ancak bazı mantar kökenli lakkazların kresol gibi monofenolleri oksitlediği ve bazılarının da askorbik asiti oksitleme yeteneği olduğunu da belirtmek gerekir.

Dairesel dikroizm ve EPR gibi fiziksel yöntemler mantar kökenli lakkazların metal merkezlerini incelemek için kullanılmıştır. Bu incelemeler sonucu, lakkazların, proteinin ikincil yapısına göre daha kararlı olduğu ortaya çıkmıştır (Bonomo vd., 2001).

Ne elektron transfer mekanizması ne de oksijenin suya indirgenmesi tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Fakat bilinen bazı gerçekler mevcuttur.

- 1) Lakkazlar bir elektronun çıkarılması şeklinde T1 Cu^{+2} tarafından indirgenen substratı okside etme reaksiyonunu gerçekleştirirler. Sonuç olarak serbest (katyonik) bir radikal oluşturulur. Bu radikal, lakkazın katalizlediği oksidasyon ya da enzimatik olmayan reaksiyonlarla (hidrasyon veya polimerizasyon vb) ilerde işletilebilir.
- 2) Bir elektron substrat oksidasyonu, oksijenin 4 elektron indirgenmesine eşlik ettiğinde reaksiyon mekanizması tamamen açıklanamaz. Lakkazlar moleküler oksijeni indirgemek için tek oksidasyon reaksiyonlarından elektronları depolayan bir pil gibi düşünülebilir. Bu nedenle 4 tane indirgenen substrat molekülünün oksidasyonu, moleküler oksijenin suya tamamen okside edilmesi için gereklidir.
- 3) T1 bölgesinde 4 monoelektronik oksidasyondan ekstrakte edilen her bir elektron O_2 'nin bağlandığı üç çekirdekli gruba transfer edilir. Bu nedenle T2

ve T3 bölgeleri, moleküler oksijenin indirgendiği ve suyun serbest kaldığı lokasyonlardır.

Lakkaz için yeni substratların bağlanması olmadan önce ürünlerin salındığı anlamına gelen 2 bölgeli Ping-Pong Bi-Bi reaksiyon mekanizması önerilmiştir. Mavi bakır oksidazların solvent kanalları; üç çekirdekli gruba dioksijen moleküllerinin hızlı girişine ve sonuçta da suyun kolayca açığa çıkmasına imkan veren uygunluktur. Bunun için birçok katalitik mekanizma önerilmesine rağmen döngünün indirgeyici kısmı çok iyi bilinmemektedir.

2.3.4. Lakkaz Enziminin Biyolojik Fonksiyonları

Lakkazlar için bitki yaralanmasına cevap, fruktifikasyon organlarının geliştirilmesi, hücre duvarının yeniden yapılanması ve topraktaki humik maddenin metabolik dönüşümü gibi birçok farklı fizyolojik rol önerilmiştir. Aynı zamanda lakkazların genel olarak patogeneziste (fungal virulans faktörleri), sporulasyon, fungal spor pigmentasyonu ve fungal morfogeneziste rol oynadıklarına inanılmaktadır. Lakkazların en tartışılan ve en çok çalışılan biyolojik fonksiyonlarından biri bitki hücre duvarlarının ligninleşme prosesi ve odunun beyaz çürümesi süresince lignin polimerizasyonu ile alakalıdır.

Bitki hücre duvarının yapısal bileşeni olan lignin, hidrolizlenemeyen C-C ve C-O bağları ile bağlanmış fenil propanoid birimlerinden oluşan heterojen ve kompleks bir polifenolik biyopolimerdir. Lakkaz üreticileri olarak odun çürütmede Bacidiomycete funguslarının fazla olması fungal lakkazların lignin depolimerizasyonunda başlıca rolü oynadıklarını göstermektedir. Fakat bu fonksiyon, lignin sentezleyen sistemin komponentleri olarak bitkisel kaynaklı lakkazlar ile çalışmaktadır. Oysa ki genelde enzimler çok iyi bir şekilde substrata spesifiktir, fakat lignin parçalayan enzimlerin önemli bir özelliği de substrat aralığının geniş olmasıdır. En önemli ligninolitik enzimler lignin peroksidaz, mangan peroksidaz ve lakkazdır yine de sellobioz:quinon oksidoredüktaz, sellobioz dehidrogenaz, glioksalat oksidaz, glukoz oksidaz (glukoz-1-oksidad ve piranoz 2-oksidad), veratril alkol oksidaz ve bazı esterazlar gibi diğer bazı

enzimler de odunun doğal bozunmasının kompleks sürecinde rol almaktadır. Sonuç olarak ligninin biyolojik olarak parçalanması; enzimatik polimerizasyon ile depolimerizasyon arasındaki denklige ulaşmak birbirini etkileyen birçok enzimin ve enzimatik olmayan bileşenin sinerjik etkisi ile meydana gelmektedir. Gerçekte de bazı deneysel kanıtlar lignin üzerinde her iki aktivitenin de rol oynayabileceğini göstermektedir. Lakkazın fonksiyonlarından biri de onlar hife girmeden önce polimerizasyonu ilerleterek bu bileşikleri işe yarar hale getirmek olabilir.

2.3.5. Lakkaz Enziminin Farklı Organizmalarda Dağılışı

Çizelge 2.3.5.1.'de lakkaz üretimi açısından kanıtlanmış fungusların bir listesi verilmiştir. Özellikle bacidiomycete sınıfından beyaz çürükçül funguslar bu enzim sayesinde substratları mineralize edebilir. *Azospirillum lipoferum* gibi mikroorganizmalardan elde edilen bakteriyel lakkazlar da mevcuttur. *Azospirillum* bakterileri toprakta, ot ve tahılların rizosfer kısmında bulunmaktadır. Bitki büyümesini arttırmak amacı ile kültürü yapılan bitkilere bu bakteriler aşılanır. Freire ve arkadaşları, çeşitli substrat ve inhibitörleri kullanarak *A.lipoferum* 'den elde edilen lakkaz ile fungal lakkazların benzer oksidatif özelliklere sahip olduklarını göstermişlerdir. Malliga ve arkadaşları ile Uyama 2002 ve arkadaşları da bir siyanobakteri olan *Anabaena azollae*'da lakkaz aktivitesini kanıtlamışlardır.

Yoshida tarafından ilk olarak *Rhus vernicifera*'da lakkaz varlığının tespit edilmesinden sonra diğer bitki hücrelerinde de lakkaz aktivitesi saptanmıştır. Çınarın (*Acer pseudoplatanus*) hücre süspansiyon kültürlerinde, kayısıda, fasulye hipokotil hücre duvarlarında, mango meyvesinin öz suyunda ve tütünün ksileminde lakkaz ve lakkaz benzeri aktiviteler bulunmuştur. Bitkisel lakkazlarla ilgili yapılan çalışmalar da daha çok bu enzimlerin nerelerde lokalize olduğu, bitki iletim sisteminde nasıl taşındığı, enzim regülasyon noktaları üzerine yoğunlaşmıştır. Bu enzimlerin bitkilerde lignin birikmesine öncülük eden son oksidatif basamakta rol oynadığı yönünde yorumlar yapılmaktadır.

Çizelge 2.3.5.1. Lakkazların fungal üreticileri (Gienfreda vd 1999'a göre)

FUNGUS	SINIF	REFERANS
<i>Abortiporus biennis</i>	Bacidiomycete	Nerud ve Misurcova, 1996
<i>Agaricus bisporus</i>	Bacidiomycete	Giovannozzi-Sermanni vd., 1982; Matcham ve Wood, 1992; Perry vd., 1993; Ratcliffe vd., 1994; Wood, 1980
<i>Agaricus brunnescens</i>	Bacidiomycete	Fagan ve Fergus, 1984
<i>Armillara mellea</i>	Bacidiomycete	Bilal ve Thurston, 1996; Rehman ve Thurston, 1992; Worrall vd., 1986
<i>Aspergillus nidulans</i>	Askomiset	Aramayo ve Timberlake, 1990; Kurtz ve Champe, 1982; Law ve Timberlake, 1980
<i>Botryosphaeria sp.</i>	Askomiset	Barbosa vd., 1996
<i>Botrytis cinerea</i>	Deuteromiset	Bollag ve Leoowicz, 1984; Fortina vd., 1996; Marbach vd., 1983; Nun vd., 1988; Slomczynski vd., 1995; Viterbo vd., 1993b
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	Bacidiomycete	Fukushima ve Kirk, 1995; Ruttiman-Johnson vd., 1992, 1993
<i>Cerrena maxima</i>	Bacidiomycete	Gindilis vd., 1990
<i>Cerrena unicolor</i>	Bacidiomycete	Bekker vd., 1990; Gianfreda vd., 1998; Pelaez vd., 1995; Zakariashvili ve Elisashvili, 1993
<i>Chaetomium thermophile</i>	Askomiset	Ishigami vd., 1988
<i>Coriolopsis occidentalis</i>	Bacidiomycete	Nerud ve Misurcoba, 1996
<i>Coriolus consicolor</i>	Bacidiomycete	Zhou vd., 1993
<i>Coriolus hirsutus</i>	Bacidiomycete	Gindilis vd., 1988; Kojima vd., 1990
<i>Coriolus verllereus</i>	Bacidiomycete	Zhou vd., 1993
<i>Curvularia sp.</i>	Deuteromiset	Banerjee ve Vohra, 1991
<i>Cyathus bulleri</i>	Bacidiomycete	Vasdev ve Kulad, 1994
<i>Daedalea flavida</i>	Bacidiomycete	Arora ve Sandhu, 1985

Çizelge 2.3.5.1. Lakkazların fungal üreticileri (Gienfreda, 1999'a göre)
(devam).

FUNGUS	SINIF	REFERANS
<i>Flammulina velutipes</i>	Bacidiomycete	Lee ve Suh, 1985a
<i>Fomes annosus</i>	Bacidiomycete	Bollag ve Leonowicz, 1984; Hars ve Hüttermann, 1983; Hars vd., 1981; Kaufmann ve Wellendorf, 1980
<i>Ganoderma lucidum</i> PTK3	Bacidiomycete	Perumal ve Kalaichelvan, 1996
<i>Inonotus hispidus</i>	Bacidiomycete	Nerud ve Misurcova, 1996
<i>Junghuhnna separabilima</i>	Bacidiomycete	Vares vd., 1992
<i>Lentinus edodes</i>	Bacidiomycete	Buswell vd., 1995; Crestini vd., 1996; Ikegaya vd., 1993; Leatham ve Stahman, 1981
<i>Lentinus tigrinus</i>	Bacidiomycete	Nerud ve Misurcova, 1996
<i>Deniz fungusu</i>	Çeşitli ırklar	Raghukumar vd., 1994, 1996; Rohrmann ve Molitoris, 1992
<i>Monocillium indicum saxena</i>	Askomiset	Thakker vd., 1992
<i>Myceliophthora thermophila</i>	Deuteromiset	Berka vd., 1997; Xu, 1996
<i>Neurospora crassa</i>	Askomiset	Schilling vd., 1992; Shuttleworth ve Bollag, 1986; Tamaru ve Inonue, 1989
<i>Ophiostoma novo-ulmi</i>	Askomiset	Binz ve Canevascini; 1996
<i>Panellus stipticus</i>	Bacidiomycete	Nerud ve Misurcova, 1996
<i>Panus tigrinus</i>	Bacidiomycete	Maltseva vd., 1991
<i>Penicillium chrysogenum</i>	İmperfekt fungus	Rodriguez vd., 1996
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Bacidiomycete	Dittmer vd., 1997; Srinivasan vd., 1995
<i>Phanerochaete flavido-alba</i>	Bacidiomycete	Perez vd., 1996

Çizelge 2.3.5.1. Lakkazların fungal üreticileri (Gienfreda, 1999'a göre) (devam)

FUNGUS	SINIF	REFERANS
<i>Phellinus igninarius</i>	Bacidiomycete	Szklarz vd., 1989
<i>Phellinus torulosus</i>	Bacidiomycete	Pelaez vd., 1995
<i>Phlebia brevispora</i>	Bacidiomycete	Ruttiman-Johnsın vd., 1992
<i>Phlebia ochraceofulva</i>	Bacidiomycete	Vares vd., 1993
<i>Phlebia radiata</i>	Bacidiomycete	Kantelinel vd., 1989; Lundell vd., 1990; Moilanen vd., 1996; Niku-Paavola vd., 1990; Rogalski vd., 1991
<i>Phlebia tremellosa</i>	Bacidiomycete	Vares vd., 1994
<i>Pholiota aegerita</i>	Bacidiomycete	Von Hunolstein vd., 1986
<i>Pholiota mutabilis</i>	Bacidiomycete	Bollag ve Leonowicz, 1984; Leonowicz ve Malinowska, 1983; Leonowicz vd., 1979
<i>Pleurotus eryngii</i>	Bacidiomycete	Munoz vd., 1997; Pelaez vd., 1995
<i>Pleurotus spp.</i>	Bacidiomycete	Sanjust vd., 1991
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Bacidiomycete	Ardon vd., 1996; Bollag ve Leonowicz, 1983; Lee ve Suh, 1985b; Marzullo vd., 1995; Nerud ve Misurcova , 1996; Palmieri vd., 1993; Platt vd., 1984; Sannia vd., 1986.
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Bacidiomycete	Masaphy ve Levanon, 1992
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	Bacidiomycete	Fu vd., 1997; Kumaran vd., 1997; Nerud ve Misurcova, 1996; Sollai vd., 1996
<i>Pleurotus tigrinus</i>	Bacidiomycete	Akhmedova vd., 1994
<i>Polyporus anceps</i>	Bacidiomycete	Peire ve Gold, 1991; Petroski vd., 1980
<i>Polyporus anisoporus</i>	Bacidiomycete	Vaitkyavichyus vd., 1984
<i>Polyporus brumalis</i>	Bacidiomycete	Trojanowski vd., 1995

Çizelge 2.3.5.1. Lakkazların fungal üreticileri (Gienfreda, 1999'a göre) (devam)

<i>Polyporus ciliatus</i>	Bacidiomycete	Nerud ve Misurcova, 1996
FUNGUS	SINIF	REFERANS
<i>Polyporus hirsutus</i>	Bacidiomycete	Amin vd., 1985
<i>Polyporus pinsitus</i>	Bacidiomycete	Xu vd., 1996; Yaver vd., 1996
<i>Podospora anserina</i>	Askomiset	Bollag ve Leonowicz, 1984; Hoffmann ve Eser, 1997; Minuth vd., 1978;
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Bacidiomycete	Eggert vd., 1996a; Gomez-Alarcon vd., 1989; Qin vd., 1996
<i>Pycnoporus coccineus</i>	Bacidiomycete	Oda vd., 1991
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Bacidiomycete	Esposito vd., 1993; Nerud ve Misurcova, 1996
<i>Rhizoctonia praticola</i>	Deuteromiset	Bollag vd., 1979; Bollag ve Leonowicz, 1984; Shuttleworth vd., 1986
<i>Rhizoctonia solani</i>	Deuteromiset	Wahleithner vd., 1996; Xu vd., 1996
<i>Rigidoporus lignosus</i>	Deuteromiset	Galliano vd., 1991; Nicole, 1982
<i>Schizophyllum commune</i>	Bacidiomycete	De Vries vd., 1986
<i>Scytalidium thermophilum</i>	Bacidiomycete	Berka vd., 1995; Xu vd., 1996
<i>Trametes hirsuta</i>	Bacidiomycete	Arora ve Sandhu, 1984
<i>Trametes sanguinea</i>	Bacidiomycete	Nishizawa vd., 1995
<i>Trametes versicolor</i>	Bacidiomycete	Bollag ve Leonowicz, 1984; Katase ve Bollag, 1991; Milstein vd., 1989; Paice vd., 1993; Pelaez vd., 1995; Rogalski vd., 1991b; Von Hunolstein vd., 1986
<i>Trichocladium canadense</i>	Deuteromiset	Durrant, 1996
<i>Trichoderma spp.</i>	Deuteromiset	Assavanig vd., 1992
<i>Tyromyces incarnatus</i>	Bacidiomycete	Tsujiyama ve Nakano, 1996

2.3.6 Lakkaz Enziminin Uygulama Alanları

Trametes versicolor'dan elde edilen lakkaz enzimi ile klorofenolik bileşiklerin direkt deklorinasyonu gerçekleştirilmiştir (Arcand ve Archibald, 1991; Ünal, 2004). Basidiomycetes grubu içerisinde yer alan beyaz-çürükçül funguslardan olan *Trametes (Coriolus) versicolor*'dan elde edilen lakkaz enzimi, tetrakloroguaiakol gibi çeşitli klorlu aromatiklerin klor gideriminde (deklorinasyon) kullanılmıştır. Klorlu organik maddede yaklaşık %85 oranında bir yıkım gözlenmiştir (Iimura vd., 1996). Literatürde yer alan bir diğer çalışma ise fenolik bileşiklerin lakkaz enzimi aracılığıyla detoksifikasyonudur (Bollag vd., 1988). Esmer selüloz hamurunun enzimatik olarak biyolojik ağartımının yanısıra, poliüretan köpüklere tutuklanmış *Trametes versicolor*'ın direkt kullanımı ile de biyolojik ağartım çalışmaları yapılmıştır (Kirkpatrick vd., 1990). Ancak direkt organizmanın kullanılmasıyla gerçekleştirilen ağartma işleminin enzimatik sürece kıyasla daha uzun bir sürede gerçekleştiği pekçok çalışmada gösterilmiştir. Özellikle kraft selüloz hamurunun enzimatik ağartımının ve klorolignin gideriminin 15 dakika gibi kısa bir sürede gerçekleştiği bildirilmiştir (Taşpınar and Kolankaya, 1998). Yapılan literatür taramasına göre, bugüne kadar etkin olarak lakkaz enzimi ile yapılan uygulama alanları ve literatür listesi Çizelge 2.3.6.1.' de verilmiştir.

Çizelge2.3.6.1.Farklı lakkaz uygulamaları

Uygulama	Lakkaz kaynağı	Referans
Boyaların dekolorizasyonu	<i>Aspergillus</i> (genetiği modifiye edilmiş)	Soares vd., 2001a, Soares vd., 2001b, Soares vd., 2002
	<i>Aspergillus niger</i>	Michniewicz vd., 2003
	<i>Cerrena unicolor</i>	Reyes vd., 1999
	<i>Coriolopsis gallica</i>	Gomez vd., 2005
	<i>Coriolopsis rigida</i>	Ünyayar vd., 2005
	<i>Funalia trogii</i>	Kasinath vd., 2003
	<i>Irpex lateus</i>	Claus vd., 2002
	<i>Myceliophthorathermophila</i> ,	
	<i>Polyporus pinsitus</i> , <i>T. versicolor</i>	Camarero vd., 2004
	<i>Pleurotus eryngii</i> , <i>Pycnoporus pinsitus</i> , <i>Trametes versicolor</i>	Hou vd., 2004
	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Palmieri vd., 2005
	<i>P.ostreatus</i>	Mccarthy vd., 1999
	<i>P.cinnabarinus</i>	Scliephake vd., 2000
	<i>P.cinnabarinus</i>	Campos vd., 2001
	<i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Trametes hirsuta</i>	Arias vd., 2003
	<i>Streptomyces cyaneus</i>	Abadulla vd., 2000
	<i>T.hirsuta</i>	Dominguez vd., 2005
	<i>T.hirsuta</i>	Moldes vd., 2003
	<i>T.hirsuta</i>	Rodriguez Couto vd., 2004a
	<i>T.hirsuta</i>	Rodriguez Couto vd., 2004c
<i>T.hirsuta</i>	Rodriguez Couto vd., 2005	
<i>T.hirsuta</i>	Rodriguez Couto vd., 2006	
<i>T.hirsuta</i>	Rodriguez Couto ve	
<i>T.hirsuta</i>	Sanroman, 2006	

Çizelge2.3.6.1.Farklı lakkaz uygulamaları (devam)

Uygulama	Lakkaz kaynağı	Referans
Boyalarm Dekolorizasyonu	<i>T.hirsuta</i> <i>T.hirsuta, T.versicolor</i> <i>Trametes modesta</i> <i>T.modesta</i> <i>Trametes trogii</i> <i>T.versicolor</i> <i>T.versicolor</i> <i>T.versicolor</i> <i>T.versicolor</i> <i>T.versicolor</i> <i>T.versicolor</i> <i>Trametes villosa</i> <i>T.villosa</i>	Rodriguez Couto ve Sanroman, 2005 Rodriguez Couto vd., 2004b Nyanhongo vd., 2002 Rehorek vd., 2004 Levin vd., 2005 Maceiras vd., 2001 Lorenzo vd., 2002 Rodriguez Couto vd., 2002 Peralta-Zamora vd., 2003 Blanquez vd., 2004 Tavares vd., 2004 Zille vd., 2003 Knutson ve Ragauskas, 2004
Ksenobiyotiklerin Degradasyonu	<i>Chaetomiacea familyasının 1-4 ırkı</i> <i>Cladosporium sphaerospermum</i> <i>Coprinus cinereus, Myceliophthora thermophila, P.pinsitus, Rhizoctonia solani</i> <i>C.gallica</i> <i>C.gallica</i> <i>Coriolus hirsutus</i> <i>Coriolus versicolor</i> <i>C.versicolor</i> <i>Myceliophthora thermophyta,</i> <i>Trametes pubescens</i> <i>Panus tigrinus</i>	Saito vd., 2004 Potin vd., 2004 Kulys vd., 2003 Pickard vd., 1999 Vandertol-Vanier vd., 2002 Cho vd., 2002 Itoh vd., 2000 Okazaki vd., 2002 Nicotra vd., 2004 Zavarzina vd., 2004

Çizelge2.3.6.1.Farklı lakkaz uygulamaları (devam)

Uygulama	Lakkaz kaynağı	Referans
Ksenobiyotiklerin degradasyonu	<i>P.ostreatus</i>	Eggen, 1999
	<i>P.ostreatus</i>	Hublik ve Schinner, 2000
	<i>P.ostreatus, T.versicolor</i>	Keum ve Li, 2004
	<i>P.cinnabarinus</i>	Mougin vd., 2002
	<i>Pyricularia oryzae</i>	Lante vd., 2000
	<i>P.oryzae</i>	Carunchio vd., 2001
	<i>Rhus vernicifera</i>	Moeder vd., 2004
	<i>T.hirsuta</i>	Niku-Paavola ve Viikari, 2000
	<i>T.hirsuta</i> D10	Böhmer vd., 1988
	<i>Trametes</i> sp.	Tanaka vd., 2001
	<i>Trametes</i> sp.	Tanaka vd., 2003
	<i>T.versicolor</i>	Collins vd., 1996
	<i>T.versicolor</i>	Johannes vd., 1998
	<i>T.versicolor</i>	Majcherczyk vd., 1998
	<i>T.versicolor</i>	Johannes ve Majcherczyk, 2000
	<i>T.versicolor</i>	Majcherczyk ve Johannes, 2000
	<i>T.villosa</i>	Castro vd., 2003
	<i>T.villosa</i>	Dodor vd., 2004
	<i>T.villosa</i>	Fabbrini vd., 2001
	<i>Trichophyton</i> sp. LKY-7	Fukuda vd., 2001
Tanımlanmamış	Kang vd., 2002	
	Cantarella vd., 2003	
	Jung vd., 2003	
	Zhang vd., 2002	

Çizelge2.3.6.1.Farklı lakkaz uygulamaları (devam)

Uygulama	Lakkaz kaynağı	Referans
Biyosensörler	<i>Agaricus bisporus</i> , <i>A.niger</i> ,	Timur vd., 2004
Biyosensörler	<i>T.versicolor</i>	
	<i>A.bisporus</i> , <i>R.vernicifera</i> ,	Vianello vd., 2004
	<i>Rigidoporus lignosus</i> , <i>T.versicolor</i>	
	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Myceliophthora</i>	Kulys ve Vidziunaite, 2003
	<i>thermophila</i> , <i>P.pinsitus</i>	
	<i>C.unicolor</i>	Jarosz-Wilkolazka vd., 2004
	<i>C.unicolor</i>	Jarosz-Wilkolazka vd., 2005
	<i>C.hirsutus</i>	Marko-Varga vd., 1995
	<i>C.hirsutus</i>	Lisdat vd., 1997
	<i>C.hirsutus</i>	Bauer vd., 1999
	<i>C.hirsutus</i>	Kuznetsov vd., 2001
	<i>C.hirsutus</i>	Freire vd., 2002
	<i>C.hirsutus</i> , <i>R.vernicifera</i>	Gupta vd., 2003
	<i>C.versicolor</i>	Gomes ve Rebelo, 2003
	<i>P.ostreatus</i>	Leite vd., 2003
	<i>P.oryzae</i>	Palmore ve Kim, 1999
	<i>R.vernicifera</i>	Gardiol vd., 1996
	<i>T.versicolor</i>	Leech ve Daigle, 1998
	<i>T.versicolor</i>	Freire vd., 2001
	<i>T.versicolor</i>	Gomes ve Rebelo, 2003
	<i>T.versicolor</i>	Haghighi vd., 2003
	<i>T.versicolor</i>	Gomes vd., 2004
	<i>T.versicolor</i>	Roy vd., 2005
	<i>T.versicolor</i>	Ferry ve Leech, 2005

Çizelge2.3.6.1.Farklı lakkaz uygulamaları (devam)

Uygulama	Lakkaz kaynağı	Referans
Atık iyileştirme	<i>C.gallica</i> <i>Gliocladium virens</i> <i>Lentinula edodes</i> <i>L.edodes</i> <i>L.edodes</i> <i>P.tigrinus</i> <i>P.ostreatus</i> <i>Pleurotus spp.</i> <i>Pycnoporus coccineus</i> <i>R.vernicifera</i> <i>Trametes sp. AH28-2</i> ırkı <i>T.versicolor</i> <i>T.versicolor</i> <i>T.versicolor</i>	Calvo vd., 1998 Murugesan, 2003 D'Annibale vd., 1999 D'Annibale vd., 2000 Casa vd., 2003 D'Annibale vd., 2004 Aggelis vd., 2003 Tsioulpas vd., 2002 Jaouani vd., 2005 Durante vd., 2004 Xiao vd., 2003 Jolivald vd., 2000 Edwards vd., 2002 Lucas vd., 2003
Biyopulping Biyopulping	<i>Fomes fomentarius</i> , <i>Ganoderma collosum</i> , <i>Lentinus edodes</i> , <i>Merulius tremellosus</i> , <i>Phlebia radiata</i> <i>P.ostreatus</i> , <i>T.versicolor</i> <i>C.versicolor</i> <i>Peniophora sp.</i> , <i>Pycnoporus sanguineus</i> , <i>T.hirsuta</i> , <i>T.versicolor</i> <i>T.versicolor</i> <i>T.versicolor</i> Tanımlanmamış Tanımlanmamış Tanımlanmamış Tanımlanmamış Tanımlanmamış	Bourbonnais vd., 1997 Bourbonnais vd., 1997 Call ve Mücke, 1997 (Lignozym®-prosesi) Kandioller ve Christov, 2001 Archibald vd., 1997 Crestini ve Argyropolus, 1998 Jacob vd., 1999 Scaley vd., 1999 Chakar ve Ragauskas, 2001 Poppius-Levlin vd., 2001 Tamminen vd., 2003

Çizelge2.3.6.1.Farklı lakkaz uygulamaları (devam)

Uygulama	Lakkaz kaynağı	Referans
Organik sentez	<i>C.hirsuta</i> <i>C.hirsutus</i> <i>P.cinnabarinus</i> <i>P.cocconeus</i> <i>P.oryzae</i> <i>T.versicolor</i> <i>T.versicolor</i> <i>T.versicolor</i> <i>T.versicolor</i> <i>T.villosa</i>	Baker vd., 1996 Karamyshev vd., 2003 Mikolasch vd., 2002 Uyama ve Kobayashi, 2002 Setti vd., 1999 Fritz-Langhals ve Kunath, 1998 Aktaş vd., 2001 Schafer vd., 2001 Aktaş ve Tanyolaç, 2003 Uchida vd., 2001
Gıda endüstrisi	Çin lak ağacı reçinesi <i>Myceliophthora thermophili</i> , <i>P.pinsitius</i> <i>P.cinnabarinus</i> <i>T.hirsuta</i> <i>T.versicolor</i> Tanımlanmamış Tanımlanmamış Tanımlanmamış	Huang vd., 1995 Micard ve Thibault, 1999 Georis vd., 2003 Kuuva vd., 2003 Crecchio vd., 1995 Mathiasen vd., 1996 Petersen ve Mathiasen, 1997 Norsker vd., 2000
Biyolojik ağartma	<i>C.versicolor</i> <i>P.eryngii</i> , <i>T.versicolor</i> <i>P.cinnabarinus</i> <i>T.versicolor</i> <i>T.versicolor</i> Tanımlanmamış Tanımlanmamış	Balakshin vd., 2001 Camaero vd., 2004 Georis vd., 2003 Paice vd., 1995 Archibald ve ark, 1997 Balakshin vd., 2001 Han vd., 2002

Çizelge2.3.6.1.Farklı lakkaz uygulamaları (devam)

Uygulama	Lakkaz kaynağı	Referans
Kumaş (kot) beyazlatma	<i>T.versicolor</i> Tanımlanmamış	Pazarlıoğlu vd., 2005 Vinod, 2001

2.4. Organik Klorofenolik Toksik Bileşikler ve Çevre Üzerine Etkileri

Günümüzde geniş kullanım alanlarına sahip olan organotoksik kimyasalların ekosfere verildiklerinde çok düşük konsantrasyonlarda dahi toksik etkilere neden olmaları bu bileşikler üzerinde çalışmaların artmasına neden olmuştur. Endüstriyel kaynaklardan kontrollü bir şekilde emisyonların yanında bu kimyasal kirleticiler, yeraltı depo tankları, istemeden meydana gelen sızıntılar ve tarım amaçlı kullanılan pestisitler aracılığı ile ekosferin toprak kompartmanına girebilmekte ve gerek yeraltı sularında gerekse toprakta yaşayan mikroorganizmalar üzerinde toksik etkilerini göstermektedir (Regno vd., 1998).

Bunun yanında organik toksikantlar arıtma tesislerinde bulunan organizmalar için oldukça toksik etkiye sahip bileşiklerdir. Bu maddeler sayesinde nitrifikasyon süreci inhibe olabilmekte veya biyojenik organik bileşiklerin ortamdan uzaklaştırılması engellenmektedir (Bitton, 1994).

Özellikle fenolik bileşikler gerek arıtım tesisleri gerekse alıcı ortamlar üzerinde yüksek toksisiteye sahiptir. Fenoller, petrol rafinerileri, rezin, plastik, odun ve boya endüstrilerinin, yüksek sıcaklıklarda kömür dönüşümü gerçekleştiren endüstrilerin atık sularında sıklıkla rastlanılan bileşiklerdir. Yüksek seviyelerde bulunmaları halinde toksik ve kanserojen olan bu bileşiklerin endüstriyel atıklardan uzaklaştırılması büyük bir önem taşımaktadır (Singh ve Singh, 2002). Bu inhibitörler olumsuz etkilerini,

mikroorganizmalarda substrat tüketimini etkileyerek üreme faaliyetlerini bozar ve ayrıca enzim aktiviteleri üzerinde de etki göstererek gerçekleştirebilirler (Bitton, 1994).

İnsan, hayvan ve bitki sağlığını dış parazitlerden korumak, aynı zamanda tarımda verimin ve ürünün kalitesini artırmada tarım zararlılarına karşı zorunlu olarak kullanılan kimyasal maddeler genel olarak pestisit olarak tanımlanır. Toksik ve mutajenik özelliklerinden dolayı çevre ve sağlık sorunları yaratan pestisitler, uzun bir süredir pek çok bilimsel araştırmanın temelini oluşturmaktadır.

Pestisitler kullanım yerlerine göre insektisitler (böceklere karşı), herbisitler (yabancı otlara karşı), fungusitler (mantarlara karşı), molusisitler (yumuşakçalara karşı), rodendisitler (kemiricilere karşı), akarasitler (uyuz böcekleri ve parazitlere karşı) ismini alır (Vural, 1984, Arısoy, 1993).

Pestisitler organik toksikantlar arasında yer almaktadırlar. Bunlar arasında organoklorür ve organofosfat insektisitleri ilk olarak sinir sistemi fonksiyonları üzerinde yıkıcı etkiye sahipken, herbisitler fotosentez reaksiyonları üzerinde etki eder. Pestisitlerin mikroorganizmalar üzerindeki etkileri her bir hedef tür için farklı olmaktadır. Mikroorganizmalar üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda pestisitlerin solunum, fotosentez, biyosentetik reaksiyonlar, hücre büyümesi ve bölünmesi ve moleküler kompozisyonlar üzerinde etki gösterdikleri tespit edilmiştir (DeLorenzo vd., 2001).

Pestisitler içerisinde sınıflandırılan klorofenoller, sıklıkla kullanılan, geniş spektrumlu biyositlerdir. Klorofenoller, gerek endüstriyel atıklarda, gerekse yaşadığımız çevrede bulunan kirleticilerdir. Suda kısmen çözünürler, dolayısıyla bu toksikantlara nehirlerde, göllerde ve toprakta kolaylıkla rastlanılmaktadır. Çevrede bulunan fenoksiasetik asit, klorobenzenler gibi kompleks moleküllerin yıkımı sonucu

oluşabilirler. Bu nedenle çevrede bulunan organizmalar üzerinde gösterdikleri olumsuz etkilerin değerlendirilmesi büyük önem taşımaktadır (Miyazaki vd., 2002).

Klorofenollerin çevreye karışmasında en önemli kaynaklar arasında suyun dezenfeksiyon işlemleri, atıkların yakılması ve biyositlerin kontrolsüz kullanımı gibi endüstriyel ve tarımsal faaliyetler bulunmaktadır. Bu bileşikler ayrıca, yapılarındaki klorofenoksi bileşikler içeren herbisitlerin biyokimyasal reaksiyonları sonucunda ara ürünler olarak da oluşabilmektedir (Jardim vd., 1997).

Klorofenoller, canlılardaki oksidatif fotofosforilasyon, protein sentezi ve lipid biyosentezi gibi faaliyetler üzerinde etkilerini gösterirler. Klorofenollerin sucul ortamlar üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla gerçekleştirilen akut toksisite çalışmaları sonucunda, bu bileşiklerin mg/l düzeyindeki konsantrasyonlarında sudaki organizmalara yüksek oranda toksik olduğu gösterilmiştir (Guerra, 2001).

Fenolik bileşiklere maruz kalmaları halinde balıklarda sinir ve dolaşım sistemlerinin etkilendiği ve kan hücrelerinin sayısında azalma olduğu belirlenmiştir. Bu toksik fenolik bileşiklerin çevredeki yükünü azaltmak için bu maddelerin atık sularından deşarjlarının engellenmesi veya deşarj sularının zararlı etkilerinin azaltılması gerekmektedir (Guerra, 2001).

2.5 Çalışmalarda Kullanılan Klorofenoller

2.5.1 Pentaklorofenol (PCP)

Pentaklorofenol, endüstride fungusid olarak kullanılan ve heksaklorobenzen (HCB), pentaklorobenzen (PCB) ve Pentaklo-ronitro-benzen (PCNB) gibi diğer fungusidler ana metaboliti olan bir pestisit. İnsanların sözü edilen fungusidler ile bunların içerdiği dioksin kirlilikleri ve poliklorlu bifenil bileşiklerine gıdalarla veya

çalışma ortamlarında doğrudan maruz kalmaları sonucu, tiroid bezinde hipertrofi ve serum tiroksin (T4) seviyesinde ise bir azalmanın olduğu ortaya konmuştur (Arslan vd., 1999).

Pentakloofenol, dünyada en yaygın kullanılan biyositlerden bir tanesiydi. Fakat günümüzde bu pestisidin kullanımı sınırlandırılmıştır. PCP akut olarak gıdalarla ve solunum yoluyla alındığında insanlarda oldukça toksik etki göstermektedir. PCP insanlar tarafından solunum yoluyla alındığında sinir ve dolaşım sistemi ile karaciğer üzerinde etkili olup gözlerde de tahrişe neden olmaktadır.

Kronik olarak insanlara solunum yoluyla alınan PCP, solunum dolaşım, bağışıklık sistemi, göz, burun, deri, böbrek ve karaciğer üzerinde etki gösterir. İnsanlar üzerinde yapılan çalışmalar kanser ile PCP' ye maruz kalma arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda ise bileşiğin ağız yoluyla alındığında karaciğer tümörlerinde bir artış gözlemlenmiştir.

2.5.1.1. Kullanım Alanları

PCP, endüstriyel birçok alanda yaygın kullanımı olan genel biyosit ajandır. Bakterisid, fungusid, insektisid, herbisid ve molluskisid etkilere sahiptir. PCP ve tuzları günümüzde, başlıca ağaç koruyucu ve daha az oranlarda deri ve tekstil koruyucu olarak uygulanmaktadır. PCP farklı amaçlarla çok çeşitli uygulama alanlarına sahip olması nedeniyle, ekosistemde geniş bir dağılım göstermektedir (online: <http://www.epa.gov/ttn/atw/hlt/hef/pentachl.html>, erişim tarihi: 9/3/2008).

2.5.1.2. Kaynakları ve Potansiyel Etkileri

Kapalı alanlarda PCP' ye maruz kalma 0,0005 – 0,01 µg/l olarak ölçülmüştür. Açık alanlarda bu değer çok daha düşüktür. Genel olarak insanların yaklaşık 0,063

mg/gün soluduğu tahmin edilmektedir. Ağaç sanayisinde çalışan işçilerin günde yaklaşık olarak 10,5 – 154 mg PCP soluduğu tahmin edilmektedir.

PCP içme suyu ve gıdalarda düşük düzeyde bulunduğu belirlenmiştir. Maruz kalma ise ya PCP ile işlem görmüş odun ya da direk PCP'ye temasla deri yolu ile olmaktadır. PCP ve onun yıkım ürünleri kan, idrar ve dokularda ölçülebilmektedir. EPA, PCP için izin verilen Referans Konsantrasyonunu henüz belirlememiştir. Fareler üzerinde karaciğer ve böbrek hastalıkları baz alınarak yapılan çalışmalarda referans dozu 0,03 mg/kg/gün olarak belirlemiştir. Kaliforniya Çevre Koruma Ajansı (CalEPA) kronik olarak solunum yoluyla maruz kalınan değer 0,1 mg/m³ olarak hesaplamıştır. Yapılan bir çalışmada 90 kadından 22 tanesinde düşük ve kısırlık görüldüğü rapor edilmiştir. Kanda yüksek düzeyde PCP ve /veya lindane tespit edildiğinde ise menstrual düzensizlikler görülmüştür.

2.5.1.3. İnsan Sağlığı Üzerindeki Etkileri

2.5.1.3.1. Akut Etkileri

İnsanlar tarafından akut olarak solunum yoluyla maruz kalındığı zaman kardiovasküler sistemi, dolaşım sistemi, karaciğeri (sarılık), gözü (anlaşılır bir etki ve tahriş) etkiler. PCP'ye yüksek derecede maruz kalındığı zaman gözlenen nörolojik değişiklikler; uyuşukluk, solunumun hızlanması taşikardi, sayıklama ve titremedir. Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda PCP ağız yoluyla alındığında daha toksik etki gösterdiği görülmüştür.

2.5.1.3.2. Kanserojenik Olmayan Kronik Etkiler

İnsanlarda solunum yoluyla maruz kalma üst solunum yolları enfeksiyonlar, bronşit, aplastik anemi, böbrek, karaciğer, bağışıklık sistemi göz, burun, deri tahrişine neden olmaktadır.

2.5.1.3.3. Kanser Oluşturma Riski

Yapılan alışmalar PCP'nin solunum yoluyla alınması ile kanser (Hodgkins hastalığı sarkoma akut lösemi) arasında muhtemel bir ilişki olduğunu göstermiştir. PCP ile diğer toksik maddelere maruz kalma kanser açısından sinerjistik etki göstermektedir. Hayvanlar üzerinde oral yolla yapılan çalışmalarda karaciğer tümörleri (hepataselller adenomlar ve karsinomlar) oluşumunu artırmaktadır. EPA PCP'nin oral yolla alındığı durumda kansere eğilim faktörünü $0,12 \text{ (mg/kg/gün)}^{-1}$ olarak hesaplamıştır.

2.5.1.4. Fiziksel zellikleri

PCP saf haldeyken renksiz ya da beyaz kristaller halinde, sıcak ortamlarda keskin fenolik bir kokuya sahiptir. Ortamda PCP yaklaşık olarak 12 mg/l olduğu zaman koku duyulmaya başlamaktadır. Kimyasal formülü C_6HCl_5O ve moleküler ağırlığı 266,35 g/mol dür.

2.5.2. 2,6 Diklorofenol (2,6 DCP)

2.5.2.1. Fiziksel zellikleri

Moleküler formülü $C_6H_4Cl_2O$ ve moleküler ağırlığı 163 g/mol dür. 2,6 DCP beyaz ya da açık mor kristal halde görülmektedir. Erime sıcaklığı 68-69 C kaynama sıcaklığı ise 218-220 C'dir (online: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/>, erişim tarihi: 9/3/2008).

2.5.2.2. Kullanım Alanları

2,6 DCP insektisit, herbisit yapımında katkı maddesi olarak, ayrıca antiseptik dezenfektan ve diğer organik bileşiklerde bulunmaktadır. Genellikle ağaç endüstrisi,

tabakhane tekstil fabrikası, pulp ve kağıt fabrikalarında çalışan işçilere ilaveten pestisit sprey operatörleri 2,6 DCP' ye maruz kalmaktadırlar (online: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/>, erişim tarihi: 9/3/2008)

2.5.2.3. İnsan Sağlığına Etkileri

Ağız ve boğaz yanması ve ağrısı. Ağız, özefagus ve midede beyaz nekrotik lezyonlar olmaktadır. Abdominal ağrı, bulantı ve kanlı ishal görülmektedir. Terleme, baş ağrısı, baş dönmesi görülmektedir. Zayıf düzensiz nabız, düşük tansiyon, zayıf solunum ve vücut sıcaklığında ciddi bir düşüş gözlemlenmektedir. Muhtemel kısa süreli heyecan ve düzensizlik daha sonrasında da baygınlık görülmektedir. Koyu renkli idrar görülmektedir. Methemoglobini, hemolitik anemi ve hiperbilirubinemi görüldüğü rapor edilmiştir.

3. YÖNTEM VE GEREÇLER

3.1. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar

Çalışmalarda, *Basidiomycetes* sınıfına ait *Polyporus arcularius* (T 438), *Schizophyllum commune* (T 701), *Clavariadelphus truncatus* (T 192), *Pleurotus eryngii* (M 102), *Ganoderma applanatum* (M 105), *Trametes versicolor* (D 22), *Cerrena unicolor* (D 30), *Schizophyllum commune* (D 35), *Ganoderma lucidum* (D 33) ve *Trametes versicolor* ATCC (200801) kullanılmıştır. Mikroorganizmalar Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Mustafa Yamaç ve Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Nazif Kolankaya'dan temin edilmiştir. Çalışma süresince kültürler potato dekstroz agarda +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2. Tarama Çalışması

Öncelikle çalışmada kullanılması öngörülen kültürlerin lakkaz üretim yetenekleri 5 farklı besiyeri kullanılarak karşılaştırılmıştır. Bu amaçla, Stok Bazal Medium, Mikolojik Sıvı Besiyeri, Potato-Dekstroz Broth (PDB), Modifiye Vogel Ortamı ve Mikiashvili 2006 tarafından önerilen besiyeri olmak üzere 5 farklı besiyeri ortamı denendi.

3.3. Kullanılan Besiyerleri ve İçerikleri

Çalışmalarda, *Basidiomycetes* sınıfına ait *Polyporus arcularius* (T 438), *Schizophyllum commune* (T 701), *Clavariadelphus truncatus* (T 192), *Pleurotus eryngii* (M 102), *Ganoderma applanatum* (M 105), *Trametes versicolor* (D 22), *Cerrena unicolor* (D 30), *Schizophyllum commune* (D 35), *Ganoderma lucidum* (D 33) ve *Trametes versicolor* ATCC (200801) lakkaz üretme yetenekleri 5 farklı besiyerinde test edilmiştir. Bu besiyerleri; Stok Basal Medium, Mikolojik Sıvı Besiyeri, Potato-

Dekstroz Broth(PDB), Modifiye Vogel Ortamı, ve Mikiashivali (2006) tarafından önerilen besiyeridir.

3.3.1. Stok Basal Medium (SBM): Forney ve Reddy (1979)

<u>Bileşimi</u>	<u>g/100 ml</u>
KH ₂ PO ₄	0,02
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05
NH ₄ H ₂ PO ₄	0,05
Maya Özü	0,001
Glukoz	1,0

Stok Mineral Medium (SMM) Besiyeri

<u>Bileşimi</u>	<u>g/100 ml</u>
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,14
FeSO ₄	0,1

Hazırlanan SMM besiyeri, SBM besiyeri ortamına % 0.1 olarak ilave edildi. Hazırlanan besiyeri ortamlarının pH'sı 4.9'a ayarlandı. SBM besiyerinin sterilizasyonu 110 °C'de 25 dakika süreyle otoklavda gerçekleştirildi. SMM besiyerinin sterilizasyonunda ise milipor filtrasyon tekniği kullanıldı.

3.3.2. Mikolojik Sıvı Besiyeri Paice ve Jurasek (1989)

<u>Bileşimi</u>	<u>g/100 ml</u>
Bacto-trypton	1,0
Bacto-dextrose	4,0

Besiyeri bileşenleri, 100 mL distile su içinde çözüldükten sonra besiyeri ortamının pH değeri 5.6 olacak şekilde ayarlandı ve 121 °C'de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edildi.

3.3.3. Potato Dextrose Broth (PDB):

Hazır besiyeri kullanılmıştır (Acumedia).

<u>Bileşimi</u>	<u>g/100 ml</u>
Potato Infusion Solids	4,0
Dextrose	20

Hazır karışımdan 24 g tartılarak son hacim 1,000 mL olacak şekilde distile su ile hazırlanmıştır. pH=5,1, 121 °C'de 15 dk, otoklavda steril edilmiştir.

3.3.4. Modifiye Vogel Besiyeri:

<u>Ana Stok Çözeltisi</u>	<u>g/100 mL</u>	<u>İz Element Çözeltisi</u>	<u>g/100 mL</u>
Na-sitrat	15,0	Sitrik asit.H ₂ O	2,5
KH ₂ PO ₄	25,0	ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,0	Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ .6H ₂ O	0,5
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,2	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,125
NH ₄ NO ₃	0,8	MnSO ₄ .H ₂ O	0,025
		H ₃ BO ₃	0,025
		H ₃ (P(Mo ₃ O ₁₀)) ₄ .H ₂ O	0,0025

Karbon ve vitamin kaynakları değiştirilerek elde edilen Modifiye-Vogel sıvı besiyerinin hazırlanması için iz element çözeltisinden 1 mL ana stok çözeltiye ilave

edilmiştir. Elde edilen karışım 1 N HCL ile pH=4,7'ye ayarlanmıştır. Bu şekilde hazırlanıp 1000 ml'lik Erlen-Mayer şişelerine 500 ml hacminde dağıtılan ve daha sonra 1.5 atmosfer basınç altında 110 °C de 25 dakika süreyle otoklavda sterilize edilen glukoz-mineral tuz çözeltilerine milipor filtrasyonu ile sterilize edilmiş % 0.1 tiamin-HCl çözeltisinden % 0.1 oranında (v/v) eklendi.

3.3.5. Mikiashivali vd., (2006) Tarafından Önerilen Besiyeri:

<u>Basal Ortam</u>	<u>g/100 ml</u>
Glukoz	10
KH ₂ PO ₄	0,8
NH ₄ NO ₃	2
Na ₂ HPO ₄	0,4
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,5
maya özütü	2
<u>Mikro Elementler</u>	<u>g/L</u>
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,001
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,005
CuSO ₄ 7H ₂ O	0,005
MnSO ₄ H ₂ O	0,005

Bazal ortam 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edildi. Daha sonra bazal ortama mikro elementleri membran filtreden geçirilerek eklendi (Mikiashvili vd 2006).

Her bir besiyerine 3 paralel olacak şekilde denemede kullanılması planlanan tüm fungal kültürlerden aseptik koşullarda ekimler yapılarak inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonunda lakkaz aktiviteleri ölçülerek fungal türlerin lakkaz üretim potansiyelleri belirlendi.

Tarama çalışması sonucunda seçilen tür ve besiyerinde günlük lakkaz aktivitesi değişimi takip edilerek en uygun gün belirlendi.

3.4. Lakkaz Aktivitesinin Ölçümü

Lakkaz aktivitesi ölçümünde Taşpınar ve Kolankaya (1998)'de belirtilen yöntem izlenmiştir. Lakkaz aktivitesi ölçümü için tepkime tüplerinde toplam hacim 5 ml olacak şekilde substrat olarak 4.9 ml ve 1 mM Guaiakol içeren 50 mM Sodyum-Asetat tamponu (pH: 4.5) ve enzim kaynağı olarak 0.1 ml kültür süpernatantı kullanıldı. 37 °C'de 15 dakika inkübasyondan sonra 465 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Sp-2102UVP Spectrum UV Visspectrophotometer) absorbans ölçüldü (Taşpınar ve Kolankaya, 1998).

Çalışmada, 37 °C, 1 dakika, 465 nm dalga boyunda absorbansı 0.1 birim artıran enzim aktivitesi 1 Unit aktivite olarak tanımlandı.

3.5. Serbest Klor Ölçümleri

Deklorinasyon çalışmalarında yapılan klor ölçümleri literatürde civa tiyosiyanat yöntemi olarak bilinen ve serbest klor ölçümüne dayanan bir yöntemle gerçekleştirilmiştir. Bu yönteme göre, 9 M (100ml) HNO₃, 0,25 M (100ml) Fe(NH₄)(SO₄)₂ 12 H₂O ve doymuş Hg(SCN₂) çözeltileri hazırlanmıştır (Greenberg vd., 1992).

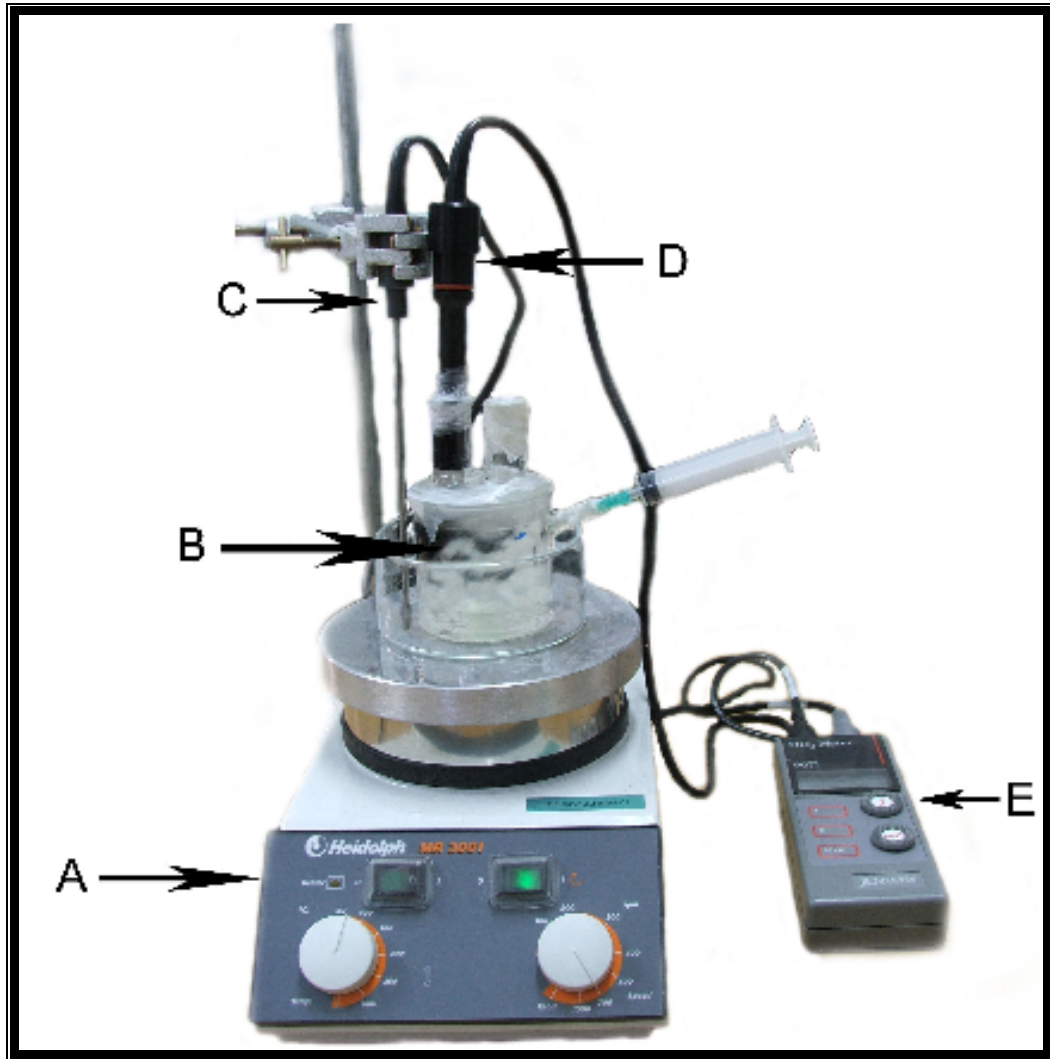
3.6. Çözünmüş Oksijen Ölçümleri

Deklorinasyon koşullarının optimizasyonu çalışmalarında elde edilen veriler sabit tutularak deklorinasyona koştur olarak ortamda tüketilen oksijen miktarı (Jenway 9071 Model) oksijen metre ile ölçülerek takip edildi.

3.7. Deklorinasyon Çalışmaları

3.7.1. Deklorinasyon Çalışmalarında Kullanılan Biyoreaktörün Özellikleri

Enzimatik deklorinasyon çalışmaları için gerekli olan biyoreaktör, reaktör-kabı, karıştırıcılı-ısıtıcı sistem, ısı kontrollü su-banyosundan oluşmaktadır. Bu çalışmada Ünal, (2004) tarafından tasarlanan biyoreaktör kullanılmıştır. Biyoreaktör kabı borosilikat camdan yapılmış ve toplam çalışma hacmi 100 ml'dir. Karıştırıcılı-ısıtıcı sistem ise, digital ısıtıcılı tablası olan ve reaktör-kabı'nın içine yerleştirildiği su banyosunda sıcaklık-probu ile sıcaklık kontrolü yapabilen termostatlı bir manyetik karıştırıcıdan oluşmaktadır (Şekil 3.5.1.1).



Şekil 3.7.1.1. Deklorinasyon çalışmalarında kullanılan reaktörün görünümü (A: Isıtıcı manyetik karıştırıcı, B: Reaktör kabı, C: Isı probu, D: O₂ elektrodu, E: Oksijen metre)

3.8. Biyoreaktörde Deklorinasyon İçin Optimum Koşulların Belirlenmesi

Biyoreaktörde enzimatik deklorasyonun optimizasyon koşullarının belirlenmesi amacıyla inkübasyon süresi, ortam pH'sı, substrat konsantrasyonu ve enzim konsantrasyonlarının etkisi her iki bileşik (pentaklorofenol ve 2,6-diklorofenol) için ayrı ayrı denendi. Denemelerde enzim kaynağı olarak tarama çalışmasında etkin tür olarak seçilen fungal tür ve besiyerinde elde edilen lakkaz kullanıldı.

3.8.1. İnkübasyon Süresinin Enzimatik Deklorinasyona Etkisi

İnkübasyon süresinin enzimatik deklorinasyona etkisinin belirlenmesi amacıyla klorofenolik bileşikler (pentaklorofenol, 2,6-diklorofenol) ile enzimin etkileşim süresi 0-10 dakika arasında değiştirildi. Sürenin etkisinin belirlenmesi sırasında diğer koşullar, reaksiyon hacmi 100 ml, klorofenolik bileşik miktarı 1 ml ve 200 µM, serbest enzim miktarı 1 ml, ortam sıcaklığı 25±1 °C, ortam pH'sı 5.0 ve enzim aktivitesi pentaklorofenol denemeleri için 6.9 ve 2,6-diklorofenol denemeleri için 7.6 U/mL olarak sabit tutuldu. Klorofenolik bileşiklerin çözünürlüğünü sağlamak için ortama %1 etanol ilave edilmiştir.

3.8.2. Ortam pH'sının Enzimatik Deklorinasyona Etkisi

Araştırmanın bu bölümünde ortam pH'sının enzimatik deklorinasyona etkisi incelendi. Bu amaçla çeşitli tampon çözeltilerle farklı pH'larda ortamlar hazırlandı ve pH 3-10 aralığında değiştirildi. pH 3-5 için 0.2 M asetat tamponu, pH 6-8 için 0.2 M fosfat tamponu, pH 9-10 için ise 0.2 M Tris-HCl tamponları seçildi ve kullanıldı. Bu deneyler sırasında reaktördeki reaksiyon hacmi 100 ml, klorofenolik bileşik (pentaklorofenol, 2,6-diklorofenol) miktarı 200 µM, serbest enzim miktarı 1 ml, deklorinasyon süresi 3.6.1'de belirlenen sürede, ortam sıcaklığı 25±1°C'de ve enzim aktiviteleri pentaklorofenol denemeleri için 6.9 ve 2,6-diklorofenol denemeleri için 7.6 U/mL olarak sabit tutuldu. Klorofenolik bileşiklerin çözünürlüğünü sağlamak için ortama %1 etanol ilave edilmiştir.

3.8.3. Substrat Konsantrasyonunun Enzimatik Deklorinasyona Etkisi

Substrat konsantrasyonunun enzimatik deklorinasyona etkisinin belirlenmesi amacıyla klorofenolik bileşik (pentaklorofenol, 2,6-diklorofenol) miktarı 50-700 μM arasında değiştirildi. Substrat konsantrasyonunun etkisinin belirlenmesi sırasında diğer koşullar; reaksiyon hacmi 100 ml, serbest enzim miktarı 1 ml, ortam sıcaklığı 25 ± 1 $^{\circ}\text{C}$, enzim aktiviteleri pentaklorofenol denemeleri için 6.9 ve 2,6-diklorofenol denemeleri için 7.6 U/mL olarak sabit tutuldu. Klorofenolik bileşiklerin çözünürlüğünü sağlamak için ortama %1 etanol ilave edilmiştir.

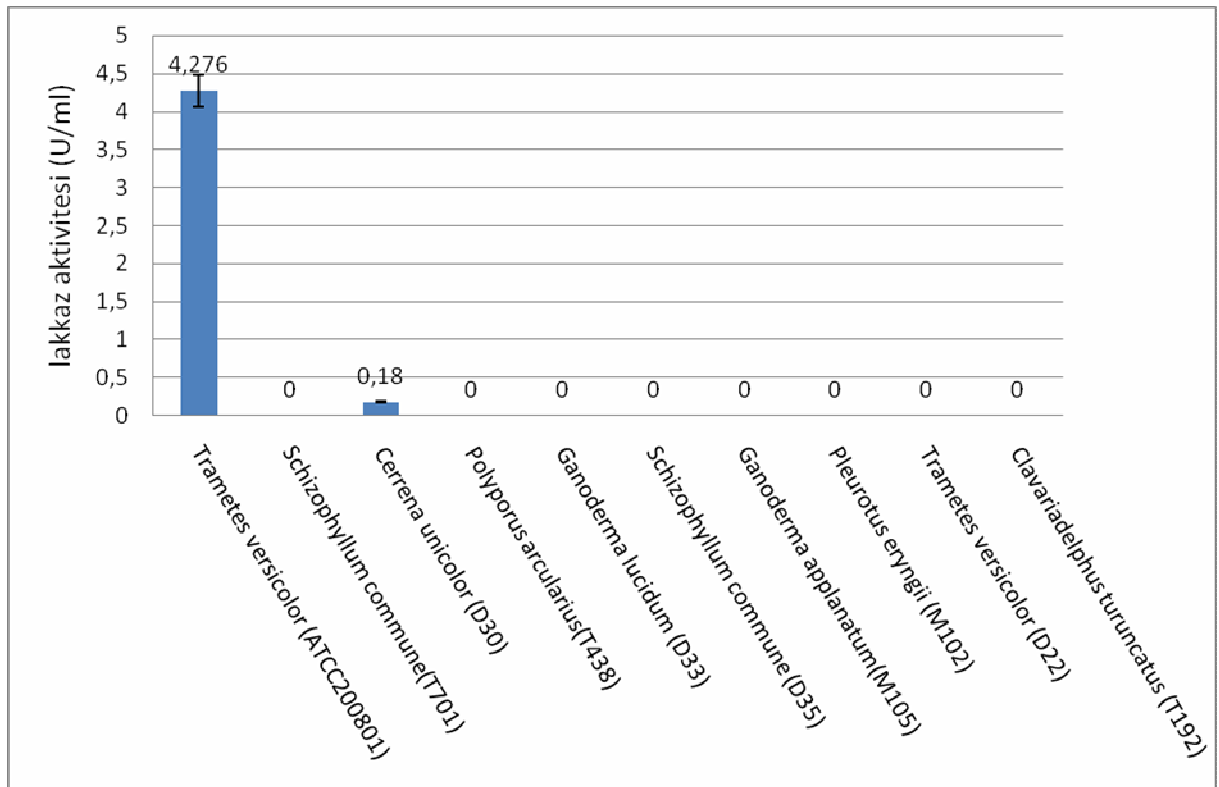
3.8.4. Enzim Miktarının Enzimatik Deklorinasyona Etkisi

Enzim aktivitesinin enzimatik deklorinasyona etkisinin belirlenmesi amacıyla 0.5-4 ml aralığında değişen farklı miktarlardaki lakkaz enzimi, klorofenolik bileşikler olarak pentaklorofenol ve 2,6-diklorofenol ile ayrı ayrı muamele edildi. Enzim miktarının etkisinin belirlenmesi sırasında diğer koşullar; reaksiyon hacmi 100 ml, ortam sıcaklığı 25 ± 1 $^{\circ}\text{C}$ ve ortam pH'sı 5.0 olarak sabit tutuldu.

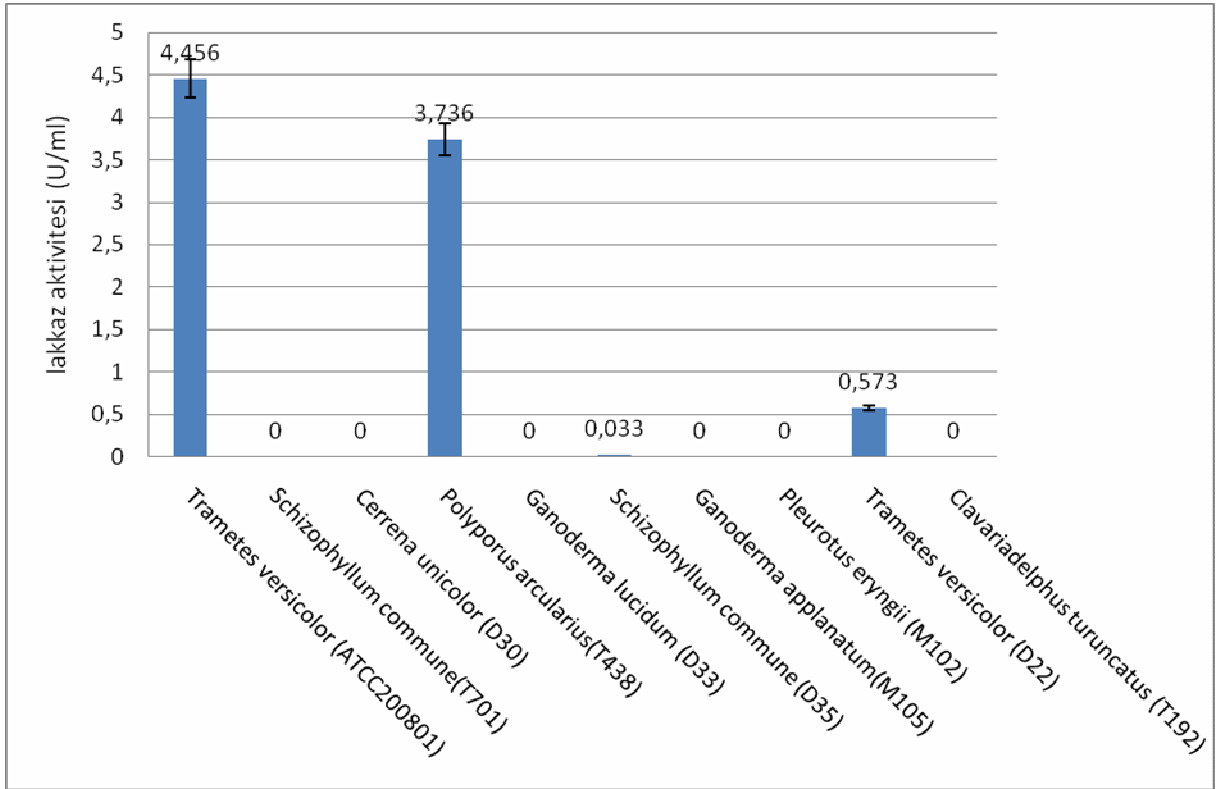
4. BULGULAR

4.1. Çalışmada Denenen Kültürlerin Lakkaz Üretim Yetenekleri Açısından Karşılaştırılması

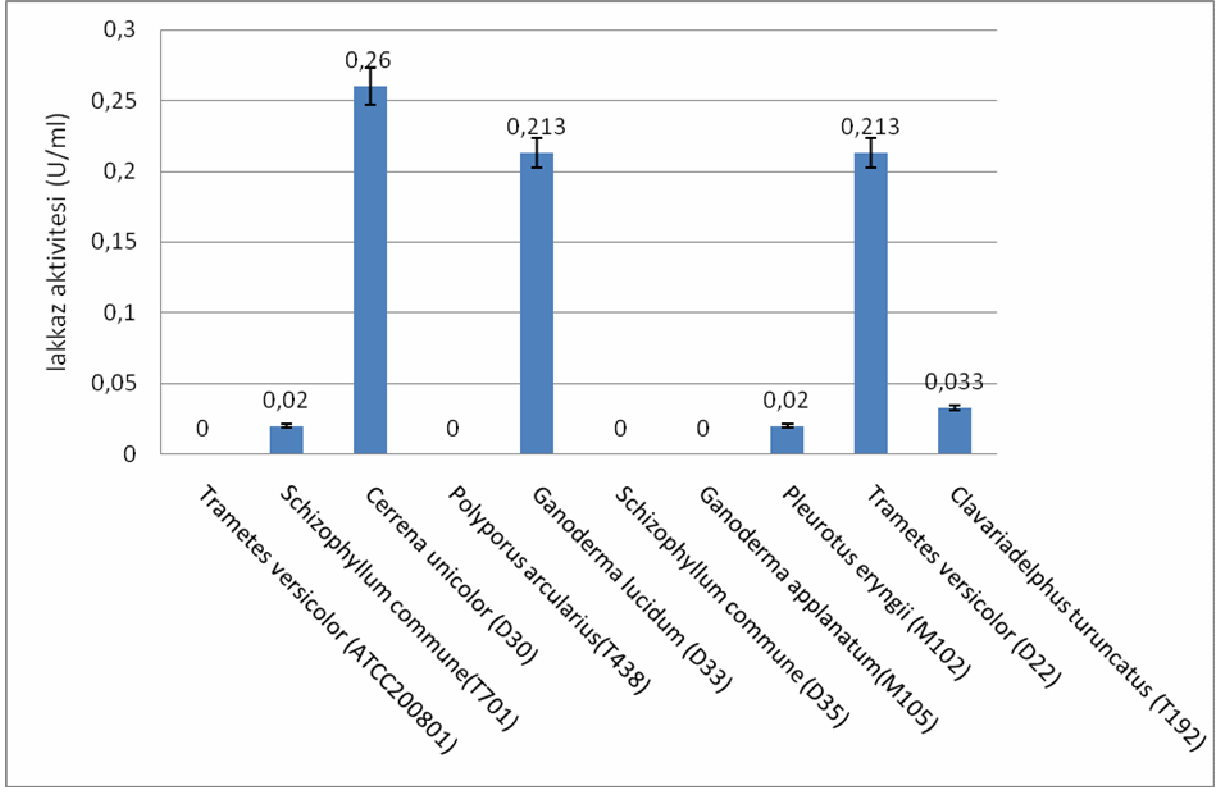
Tarama çalışmasında, lakkaz üretim yeteneklerini belirlemek amacıyla toplam 10 fungal kültür kullanılmıştır. Bu türlerin lakkaz üretim yetenekleri her biri için 5 farklı besiyerinde yapılan lakkaz aktivitelerinin ölçümlerine göre karşılaştırılmıştır. Tarama çalışması sonucunda *Trametes versicolor* ATCC (200801) kültürü ile Modifiye Vogel besiyerinde en yüksek aktivite elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.1.1, 4.1.2, 4.1.3, 4.1.4, 4.1.5'te verilmiştir. Ayrıca yüksek lakkaz aktivitesinin elde edildiği *Trametes versicolor* ATCC (200801) Modifiye vogel besiyerinde geliştirilerek günlük lakkaz üretme yeteneği takip edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.1.6'da verilmektedir.



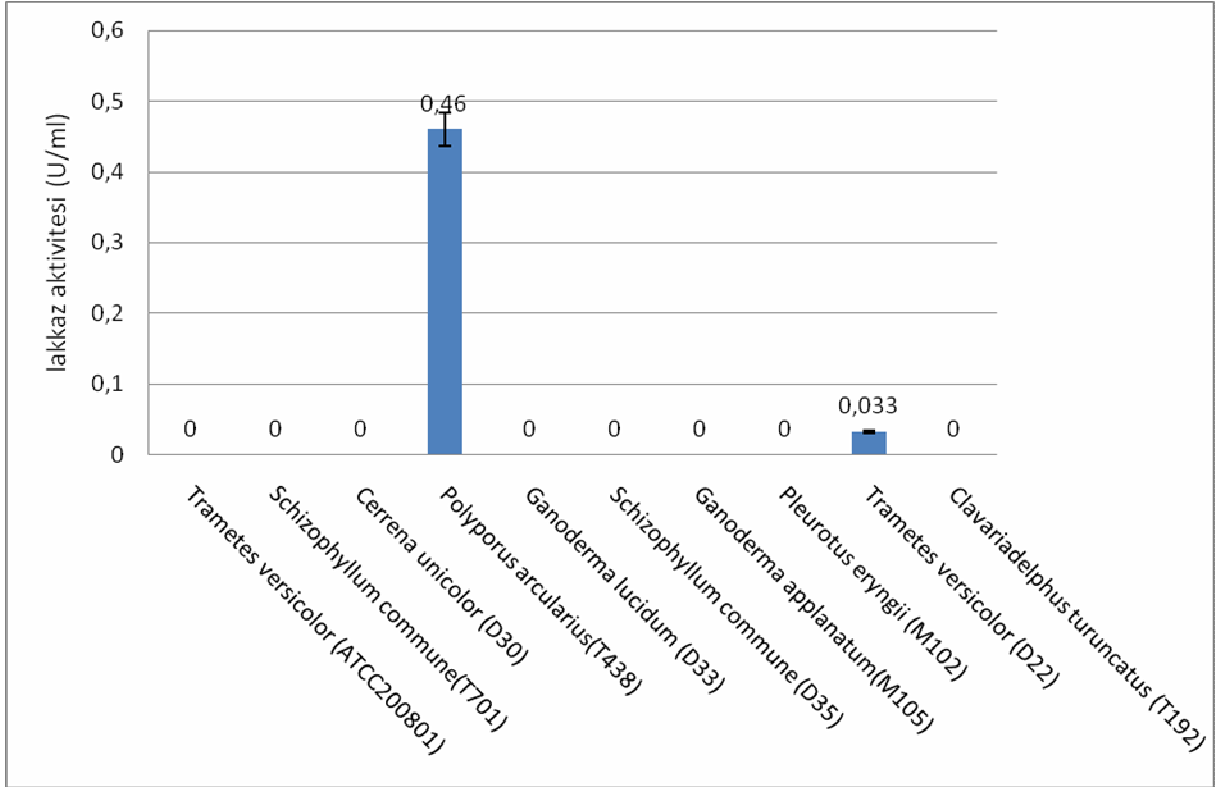
Şekil 4.1.1. Denemede kullanılan fungal kültürlerin Potato Dekstroz Broth besiyerinde, lakkaz aktivite değerlerinin karşılaştırılması (çalışma koşulları: 30° C, 150 rpm, 10 gün)



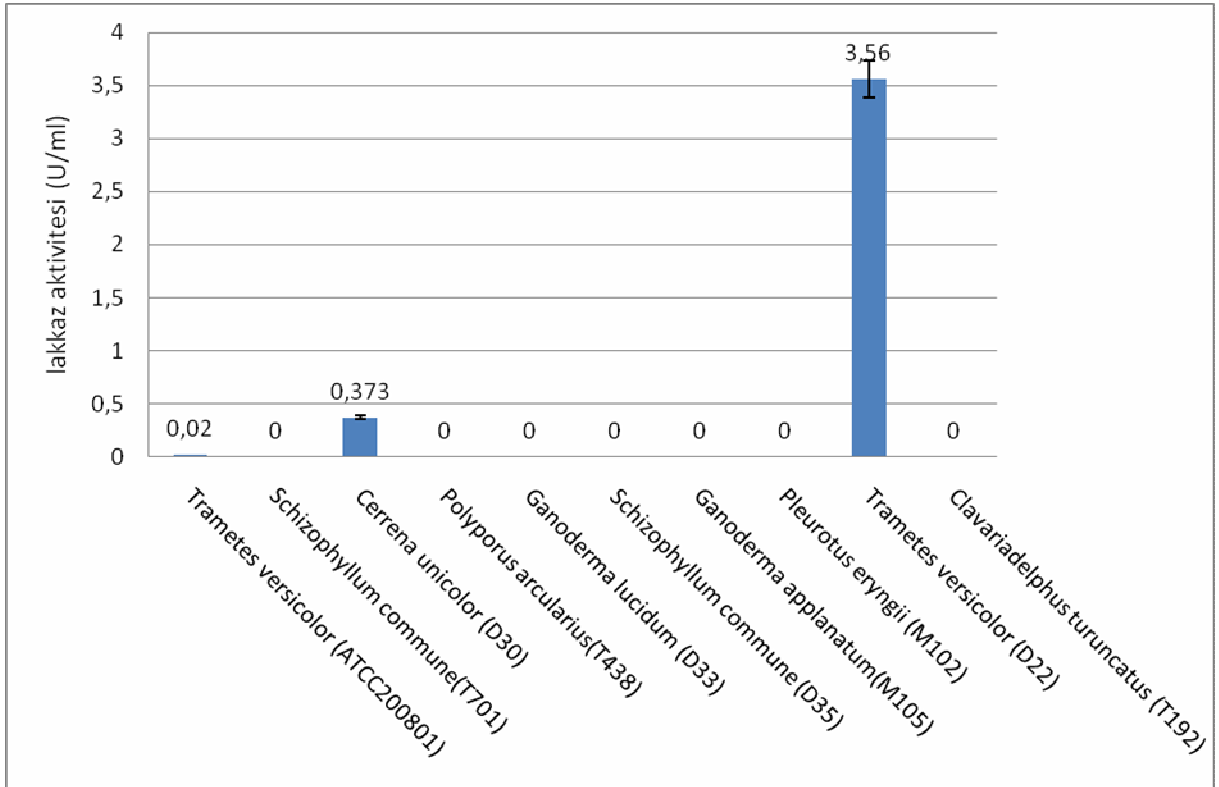
Şekil 4.1.2. Denemede kullanılan fungal kültürlerin Modifiye Vogel besiyerinde, lakkaz aktivite değerlerinin karşılaştırılması (çalışma koşulları: 30° C, 150 rpm, 10 gün)



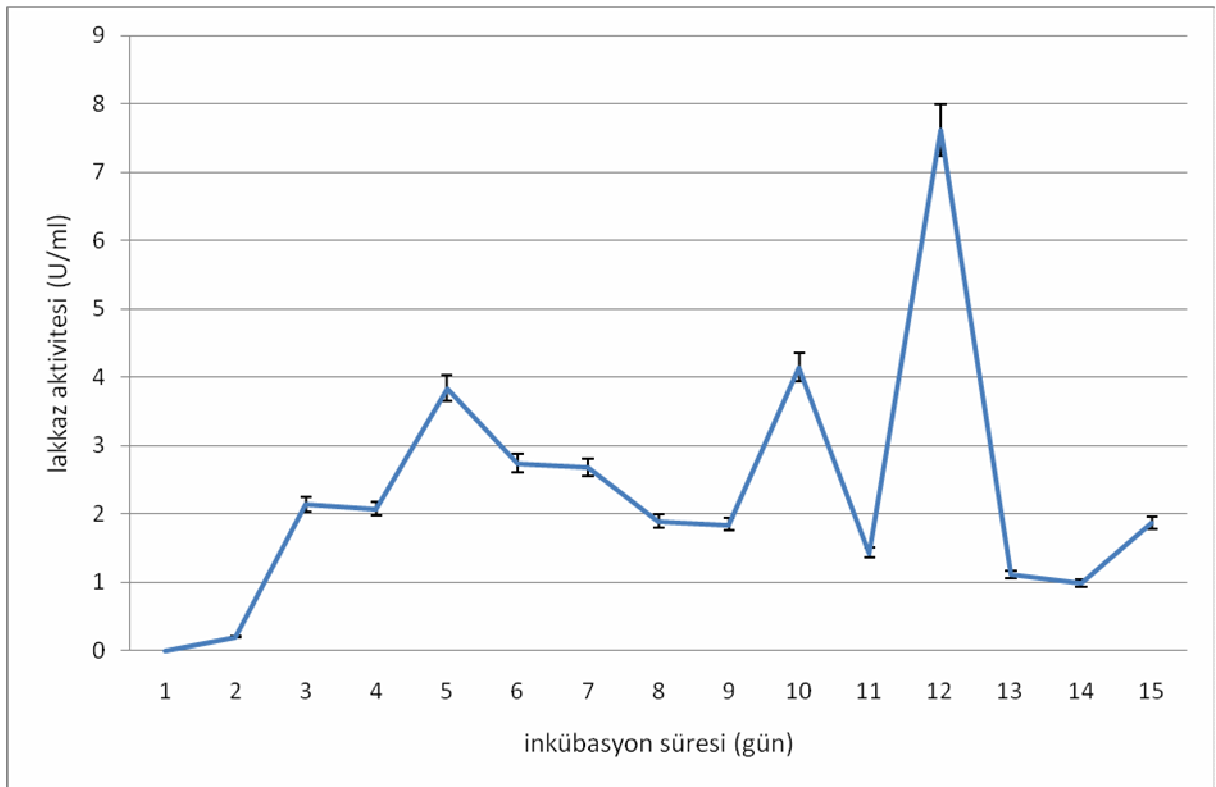
Şekil 4.1.3. Denemede kullanılan fungal kültürlerin Mikolojik Sıvı besiyerinde, lakkaz aktivite değerlerinin karşılaştırılması (çalışma koşulları: 30° C, 150 rpm, 10 gün)



Şekil 4.1.4. Denemede kullanılan fungal kültürlerin Stok Basal Medium besiyerinde, lakkaz aktivite değerlerinin karşılaştırılması (çalışma koşulları: 30° C, 150 rpm, 10 gün)



Şekil 4.1.5. Denemede kullanılan fungal kültürlerin Mikiashvili 2006 tarafından önerilen besiyerinde, lakkaz aktivite değerlerinin karşılaştırılması (çalışma koşulları: 30° C, 150 rpm, 10 gün)

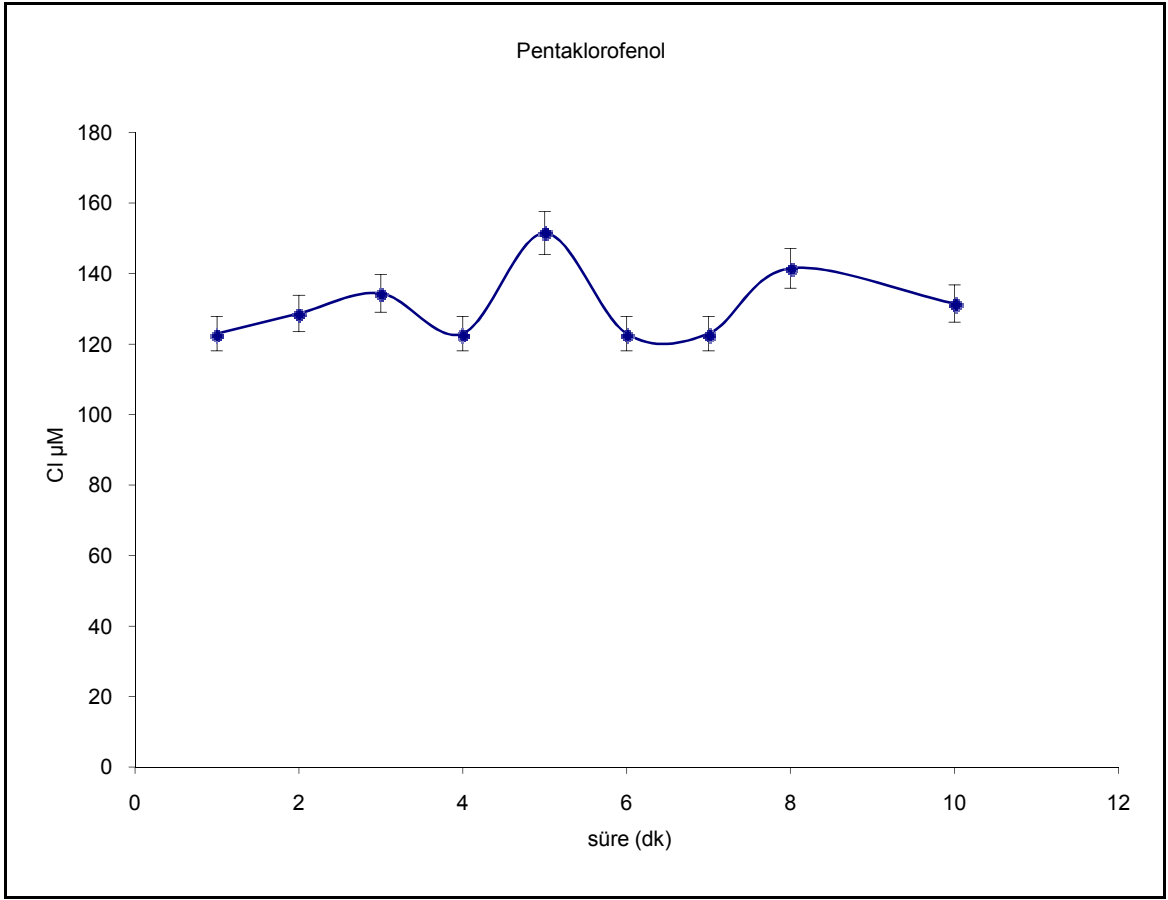


Şekil 4.1.6. Modifiye Vogel Besiyerinde üretilen *Trametes versicolor* (ATCC200801)'in lakkaz aktivitesinin zamana bağlı değişimi (hata çubukları standart sapmayı göstermektedir)

4.2. Lakkaz Enzimi ile Pentaklorofenol Deklorinasyonu için Optimum Koşulların Belirlenmesi

4.2.1 Sürenin Pentaklorofenol Deklorinasyonuna Etkisi

İnkübasyon süresinin pentaklorofenolün enzimatik deklorinasyonuna etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışma sonucunda en uygun süre 5 dakika olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.2.1.1.'de verilmiştir.

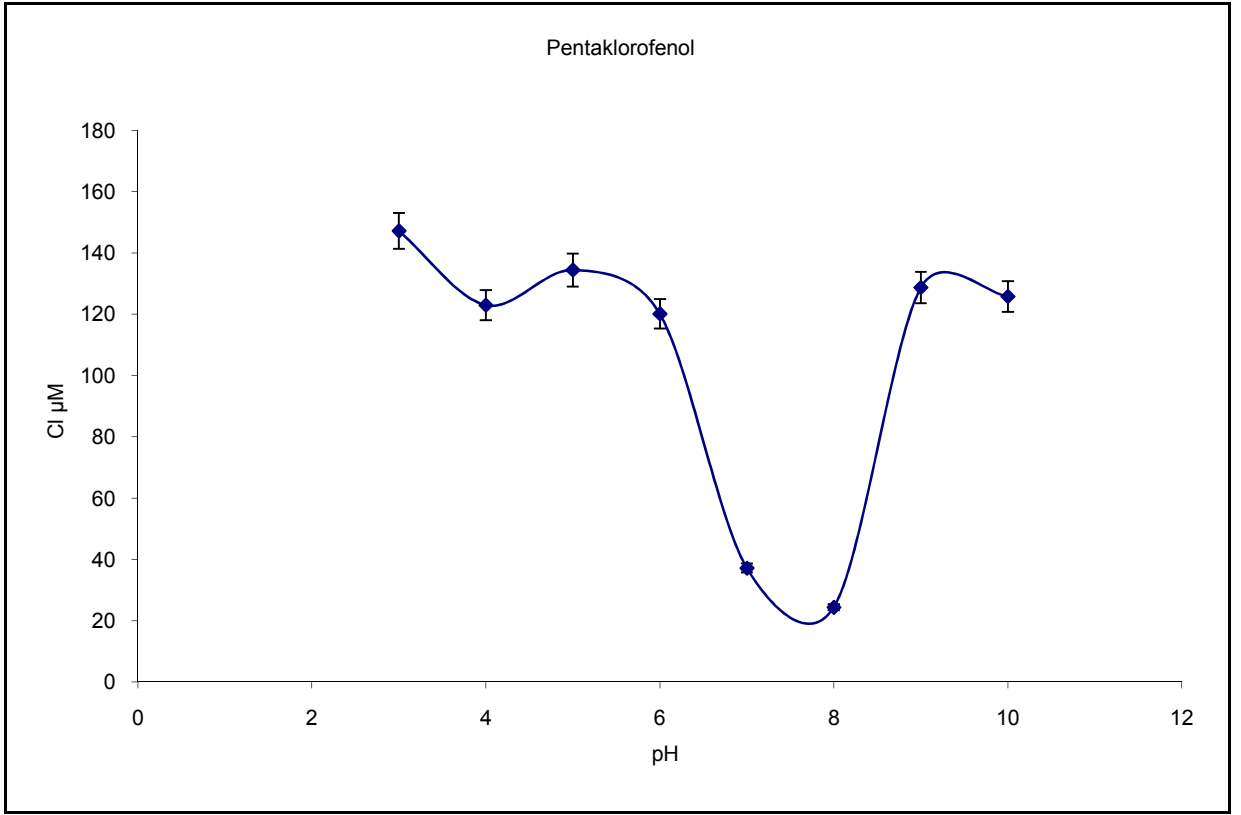


Şekil 4.2.1.1. Lakkaz enzimi ile pentaklorofenolden klor uzaklaştırılmasında sürenin etkisi.

(çalışma koşulları: başlangıç substrat konsantrasyonu, 200µM; enzim aktivitesi 6,91U/ml; 1 ml enzim miktarı;5 dakika; pH 5)

4.2.2. pH'ın Pentaklorofenol Deklorinasyonuna Etkisi

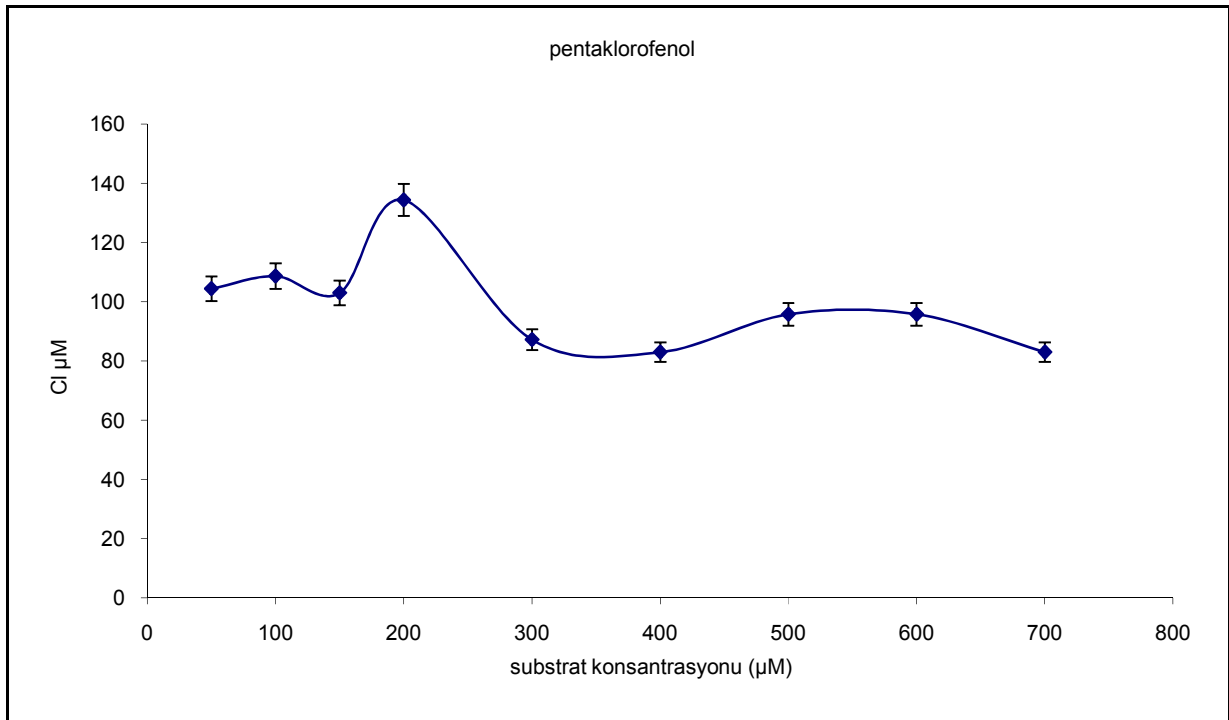
Pentaklorofenolden klor uzaklaştırılmasında pH'ın etkisini belirlemek için geniş bir pH aralığında yapılan çalışma sonucunda en uygun değer pH 5 olduğu görülmüştür. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.2.2.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2.2.2. Lakkaz enzimi ile pentaklorofenolden klor uzaklaştırılmasında ortam pH değerinin etkisi. (çalışma koşulları: başlangıç substrat konsantrasyonu, 200µM; enzim aktivitesi 6,91; 1 ml enzim miktarı;5 dakika; pH 5;)

4.2.3. Substrat Konsantrasyonunun Pentaklorofenolün Deklorinasyonuna Etkisi

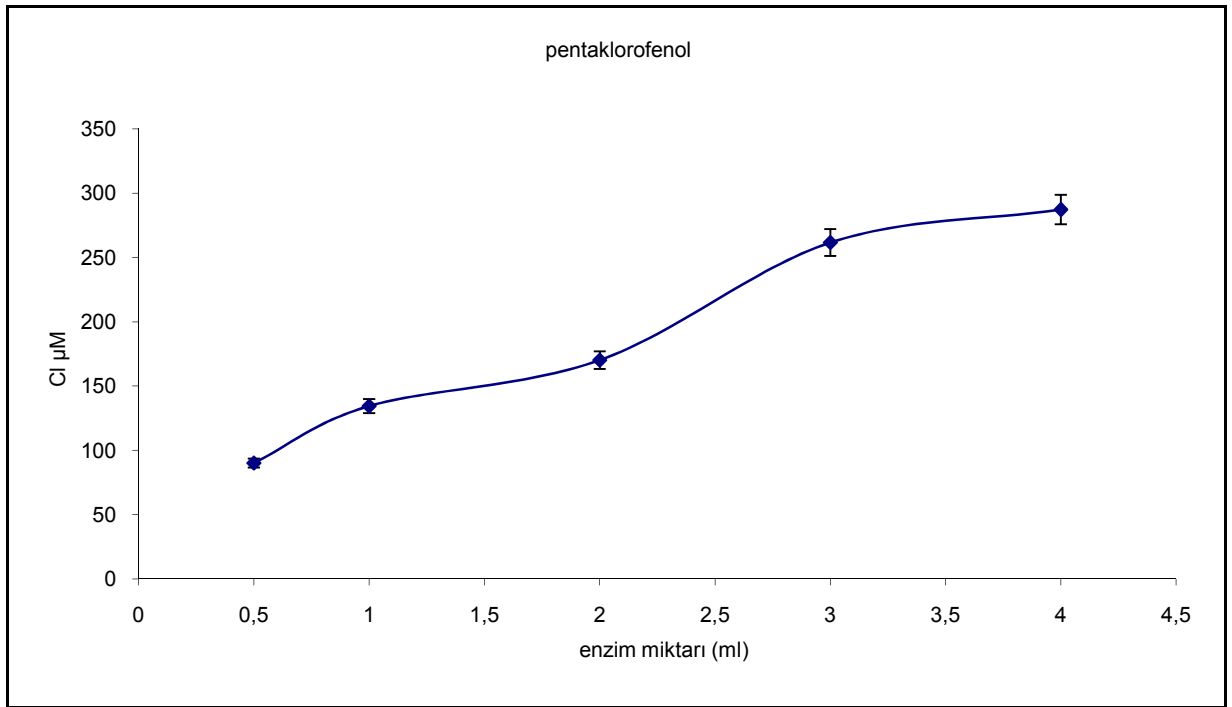
Substrat konsantrasyonunun enzimatik deklorinasyona etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan deneysel çalışmanın sonucunda en uygun başlangıç substrat konsantrasyonu 200 µM olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar şekil 4.2.3.1’de verilmiştir.



Şekil 4.2.3.1. Lakkaz enzimi ile pentaklorofenolden klor uzaklaştırılmasında substrat konsantrasyonunun etkisi. (çalışma koşulları; başlangıç substrat konsantrasyonu, 200µM; enzim aktivitesi 6,91; 1 ml enzim miktarı; 5 dakika; pH 5).

4.2.4. Enzim Miktarının Pentaklorofenolün Deklorinasyonuna Etkisi

Enzim miktarının enzimatik deklorinasyona etkisinin belirlenmesi amacıyla farklı miktarlarda enzim kullanılarak yapılan çalışmanın sonucunda 2 ml enzim miktarından başlayarak önemli bir artış görülmüştür. 3 ml enzim miktarından sonra neredeyse önemli bir değişim gözlenmemiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.2.4.1’de verilmektedir.

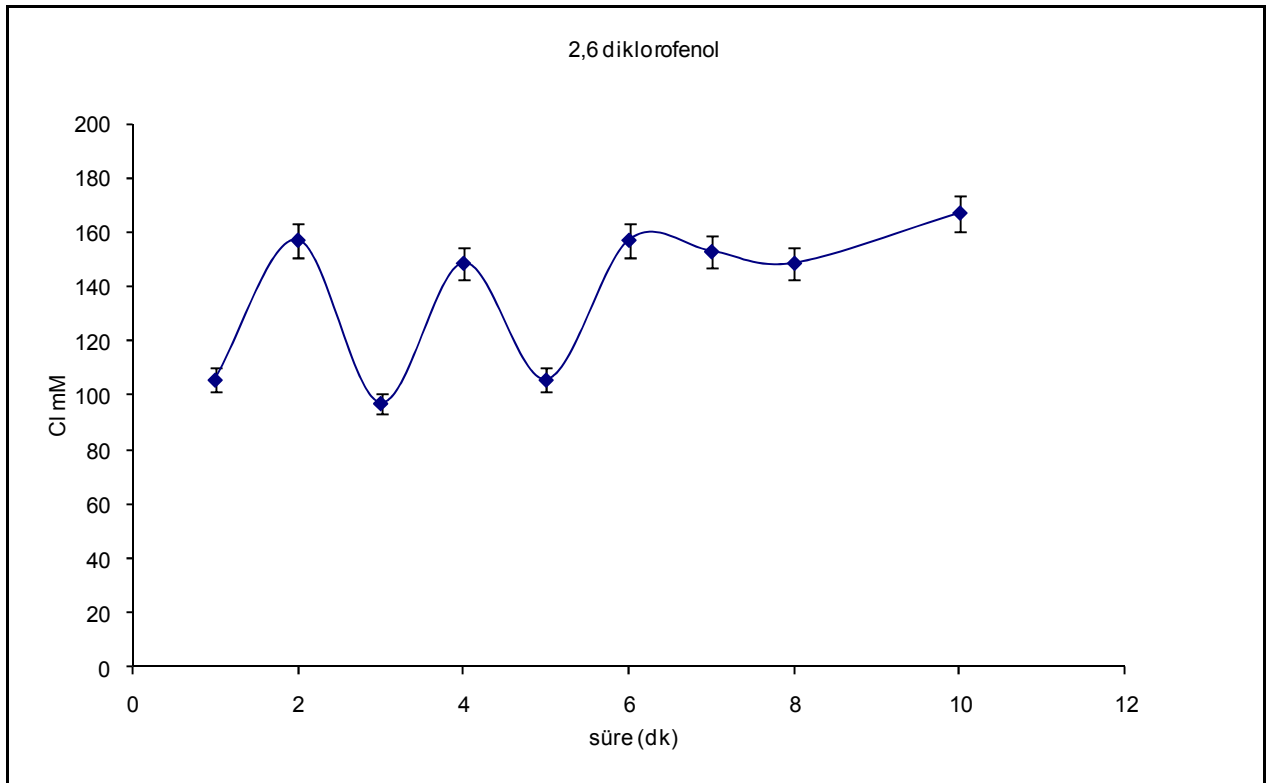


Şekil 4.2.4.1. Lakkaz enzimi ile pentaklorofenolden klor uzaklaştırılmasında enzim miktarının etkisi (çalışma koşulları: başlangıç substrat konsantrasyonu, 200µM; enzim aktivitesi 6,91; 1 ml enzim miktarı;5 dakika; pH 5.0)

4.3. Lakkaz Enzimi ile 2,6 Diklorofenol Deklorinasyonu için Optimum Koşulların Belirlenmesi

4.3.1. Sürenin 2,6-diklorofenol Deklorinasyonuna Etkisi

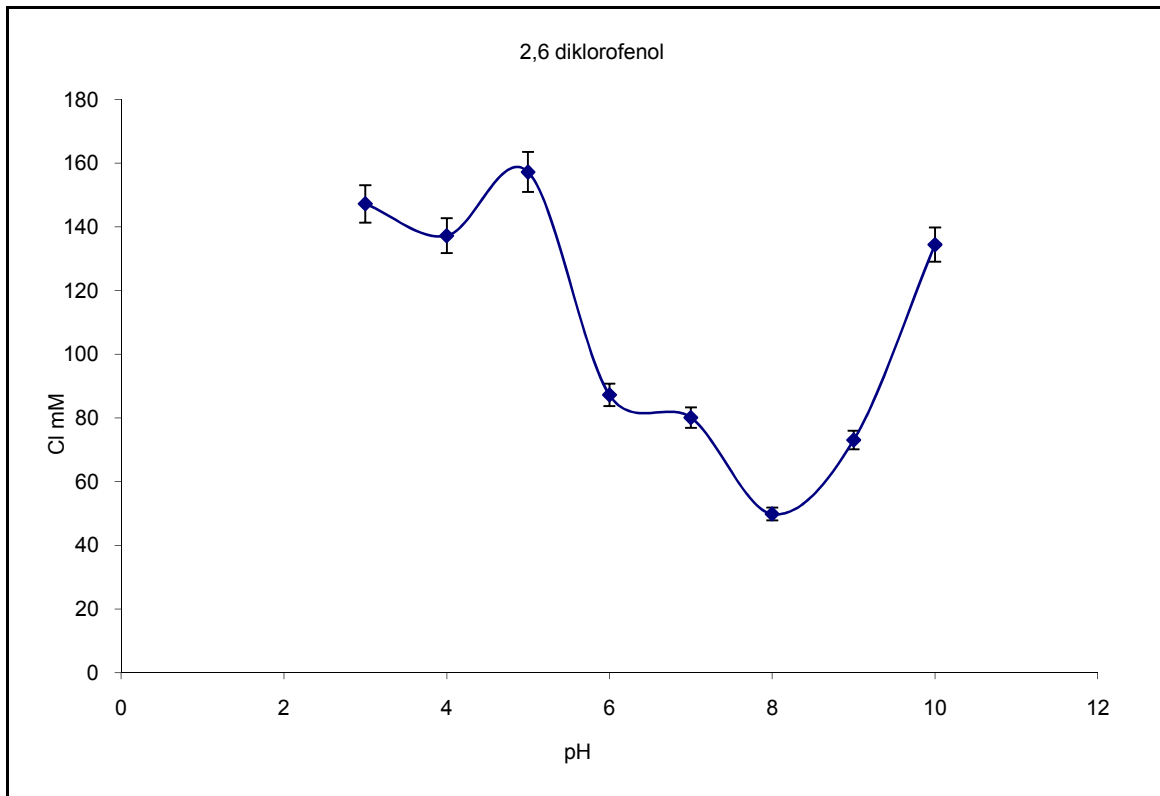
İnkübasyon süresinin 2,6-diklorofenolün enzimatik deklorinasyonuna etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışma sonucunda en uygun süre olarak 2 dakika belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.3.1.1’de verilmiştir.



Şekil 4.3.1.1. Lakkaz enzimi ile 2,6-diklorofenolden klor uzaklaştırılmasında sürenin etkisi. (çalışma koşulları: başlangıç substrat konsantrasyonu, 200 μ M; enzim aktivitesi 7,6; 1 ml enzim miktarı;2 dakika; pH 5;)

4.3.2. pH'ın 2,6-diklorofenol Deklorinasyonuna Etkisi

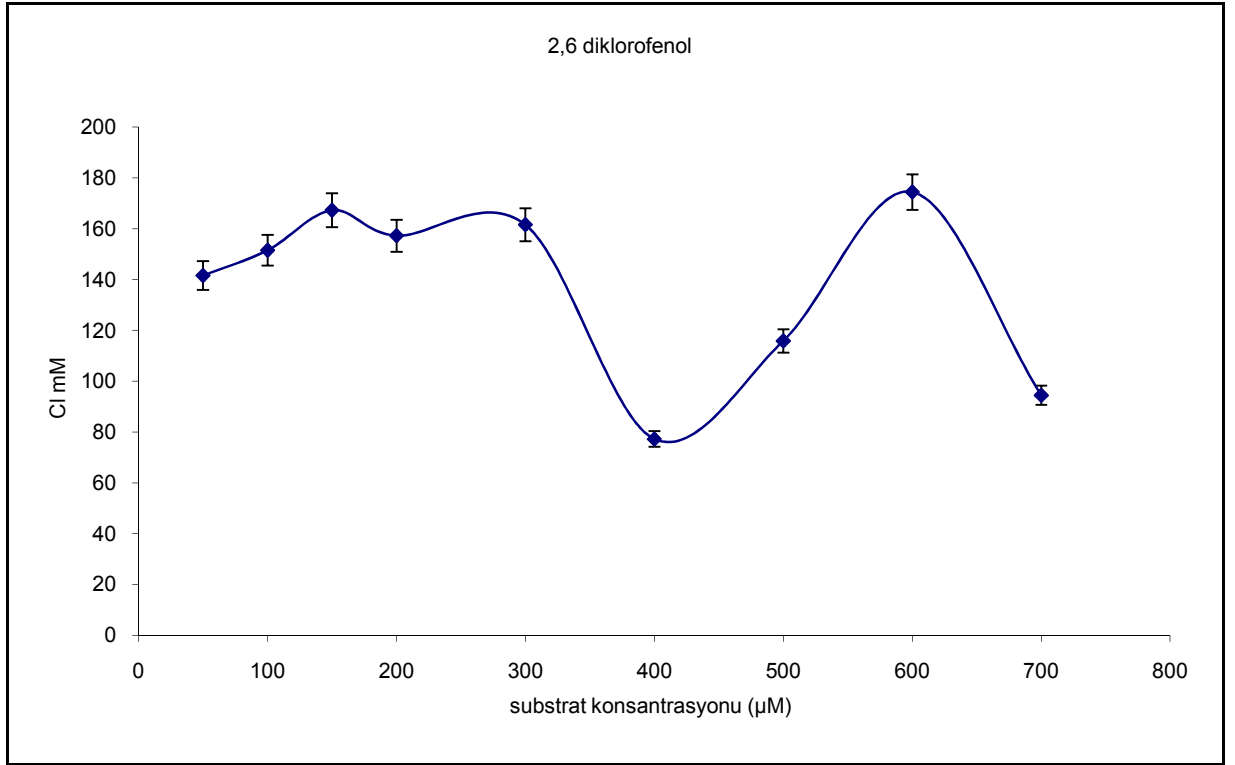
Pentklorofenolden klor uzaklaştırılmasında pH'ın etkisini belirlemek için geniş bir pH aralığında yapılan çalışma sonucunda en uygun değer pH 5.0 olduğu görülmüştür. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.3.2.1'de verilmiştir.



Şekil 4.3.2.1 Lakkaz enzimi ile 2,6-diklorofenolden klor uzaklaştırılmasında ortam pH'nın etkisi. (Çalışma koşulları: başlangıç substrat konsantrasyonu, 200 μ M; enzim aktivitesi 7,6; 1 ml enzim miktarı;2 dakika; pH 5;)

4.3.3. Substrat Konsantrasyonunun 2,6-diklorofenolün Deklorinasyonuna Etkisi

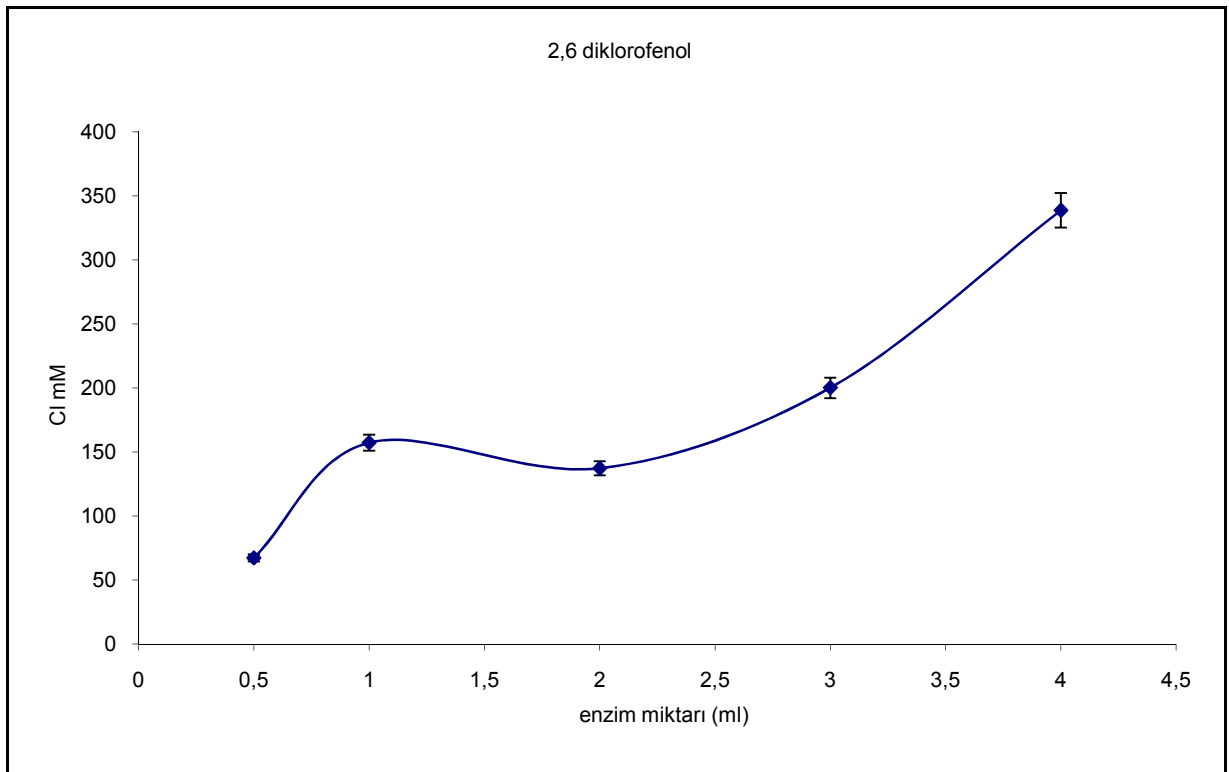
Substrat konsantrasyonunun enzimatik deklorinasyona etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan deneysel çalışmanın sonucunda en uygun başlangıç substrat konsantrasyonu 600 μ M olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.3.3.1'de verilmiştir.



Şekil 4.3.3.1. Lakkaz enzimi ile 2,6-diklorofenolden klor uzaklaştırılmasında substrat konsantrasyonunun etkisi. (çalışma koşulları: başlangıç substrat konsantrasyonu, 200µM; enzim aktivitesi 7,6; 1 ml enzim miktarı;2 dakika; pH 5;)

4.3.4. Enzim Miktarının 2,6-diklorofenolün Deklorinasyonuna Etkisi

Enzim miktarının enzimatik deklorinasyona etkisinin belirlenmesi amacıyla farklı miktarlarda enzim kullanılarak yapılan çalışmanın sonucunda 2 ml enzim miktarından başlayarak önemli bir artış görülmüştür. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.3.4.1’de verilmektedir.

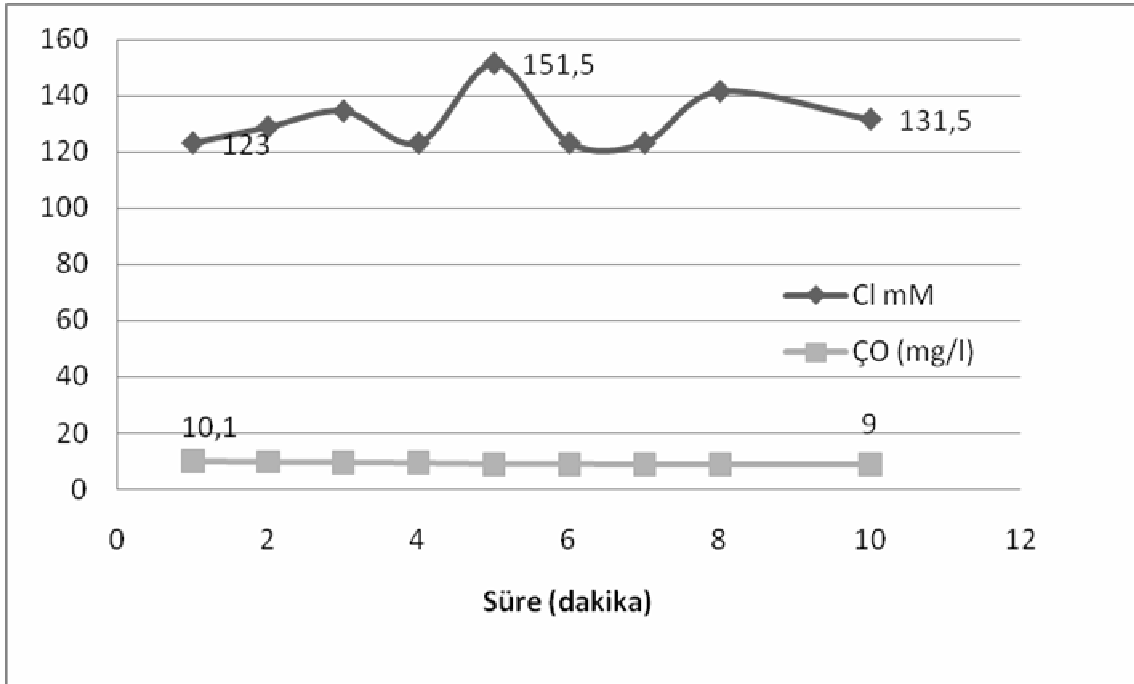


Şekil 4.3.4.1 Lakkaz enzimi ile 2,6-diklorofenolden klor uzaklaştırılmasında enzim miktarının etkisi (çalışma koşulları: başlangıç substrat konsantrasyonu, 200 μ M; enzim aktivitesi 7,6; 1 ml enzim miktarı;2 dakika; pH 5)

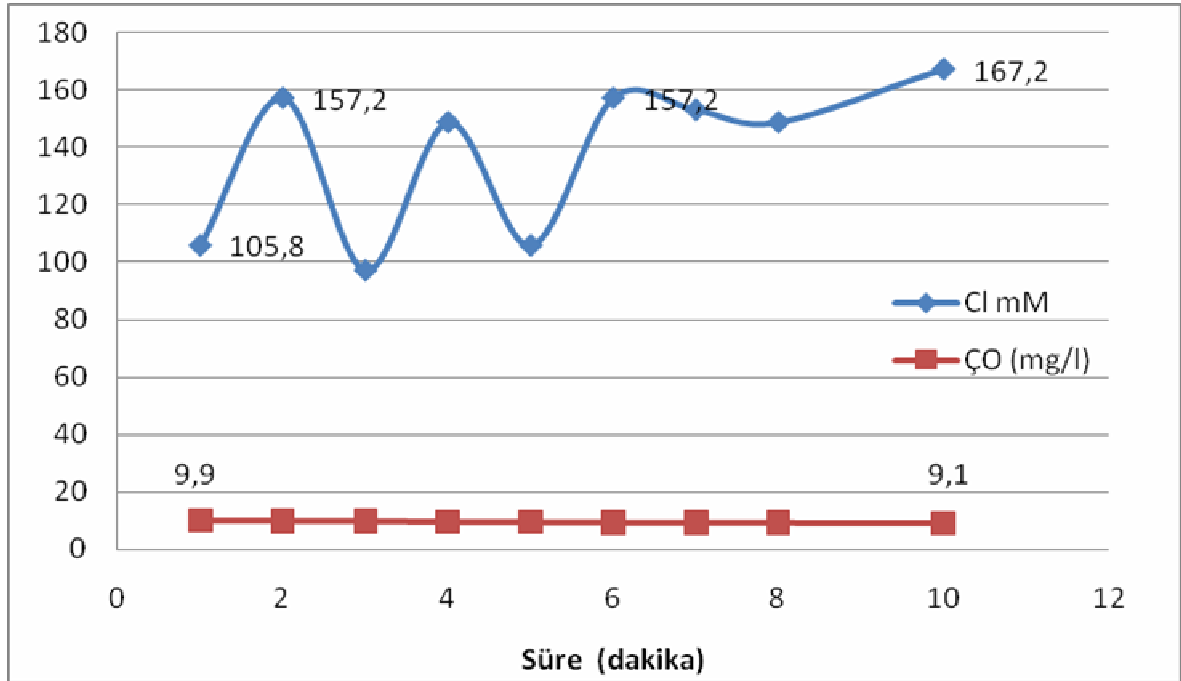
4.4. Belirlenen Optimum Koşullarda Deklorinasyon Sırasında Oksijen

Tüketiminin Belirlenmesi

Belirlenen optimum koşullar sabit tutulmak kaydı ile PCP ve 2,6 DCP bileşiklerinin lakkaz enzimi ile deklorinasyonları sürecinde ortamda bulunan çözünmüş oksijen miktarındaki değişim takip edilmiştir. Elde edilen veriler Şekil 4.4.1. ve 4.4.2.'de verilmektedir.



Şekil 4.4.1. Lakkaz enzimi ile pentaklorofenol'den klor uzaklaşması sırasında ortamdaki çözülmüş oksijen konsantrasyonundaki değişim (çalışma koşulları: pH 5, 200 μ M başlangıç substrat konsantrasyonu, enzim miktarı 1 ml)



Şekil 4.4.2. Lakkaz enzimi ile 2,6 diklorofenol'den klor uzaklaşması sırasında ortamdaki çözülmüş oksijen konsantrasyonundaki değişim (çalışma koşulları: pH 5, 600 μ M başlangıç substrat konsantrasyonu, enzim miktarı 1 ml)

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Çevre ve insan sağlığı açısından sahip oldukları toksik ve mutajenik özelliklerinden dolayı benzer sorunlar oluşturan pestisitler de organik toksikantlar arasında yer almaktadır. Pestisitler içerisinde sınıflandırılan, klorofenoller sıklıkla kullanılan geniş spektrumlu biyositlerdir. Klorofenoller gerek endüstriyel atıklarda ve gerekse yaşadığımız çevrede bulunan kirleticilerden sadece bir grubu temsil etmektedir. Suda kısmen çözünmeleri nedeniyle bu toksikantlara nehir, göl ve diğer sucul alanlarda bol miktarda rastlanılmaktadır. Endüstriyel aktivitelerin yoğun olduğu gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde, benzer kirleticilere rastlanması, bu gelişim süreci ile koşut olarak insanların yaşamlarında yer eden doğal bir süreçtir. Çevrede bulunan fenoksiasetik asit, klorobenzenler gibi kompleks moleküllerin yıkımı sonucu oluşabilir. Bu nedenle çevrede bulunan organizmalar üzerinde gösterdikleri olumsuz etkilerin değerlendirilmesi büyük bir önem taşımaktadır (Miyazaki vd., 2002).

Klor iyonu çevresel kirleticiler açısından ilginç bir özelliğe sahiptir. Organik bileşiklerle kompleks oluşturduğunda ortaya çıkan klorlu-organik bileşik toksik bir özellik kazanır. Klorun organik bileşiklerin yapısına girmesiyle ortaya çıkan diğer bir özellik de kloru yapısında taşıyan organik bileşiğin rekalsitrant (biyolojik yıkıma dayanıklı) bir nitelik kazanması, elektron alma potansiyelinin artmasıdır. Klorlu organik bileşikte organik molekülün aromatik yapıda olması durumunda rekalsitrant özelliği daha da artar. Nitekim, tarımsal savaşımında kullanılan klorlu-organik bileşiklerin klorlu-aromatik yapıda olanları, kullanıldıkları doğal ortamlarda çok daha uzun süre yıkılmadan kalabilmektedirler (Matsumura, 1985). Öte yandan klorlu bileşiklerin oluşturduğu polimer yapılar doğal koşullarda uzun süre kalabilme özelliği gösterirler. Vinil klorür monomerinin oluşturduğu polivinil klorür (PVC) buna bir örnek oluşturur (Brock vd., 1994). Birçok klorlu aromatik yapının rekalsitrant ve toksik özelliklerinin yanısıra mutajenik ve kanserojen özelliklerinin de bulunduğu gösterilmiştir (Shoham vd., 1992). Lipofilik karakterde olmaları da bunların yağ dokularında birikim göstermelerinin nedenini oluşturmaktadır (Ünal, 2004).

Çevresel kirleticilerin nitelik ve nicelik olarak artışının yanı sıra bu kirleticilerin toksik özelliklerini azaltıcı ve/veya tamamen detoksifiye edici enzim veya enzim sistemleri de canlılar tarafından özellikle mikrobiyal türler tarafından geliştirilmektedir. Bu etkileşim içerisinde belirli organizma grupları sahip oldukları geniş substrat spesifitesi gösteren enzim ve ilişkili sistemleri ile önemli avantajlar sunmaktadır. Bu organizmalar arasında hemen ilk akla gelenler bakterilerden *Pseudomonas* genusu ve funguslardan *Basidiomycetes* üyeleridir. Söz konusu hücreleri saf kültür veya bir konsorsiyum halinde pek çok çevresel kirleticiyi yıkıma uğratma yetenekleri bu alanda çalışan araştırmacılar tarafından ortaya çıkartılmıştır.

Basidiomycetes üyeleri ve özellikle beyaz çürükçül funguslar, pestisit, trinitrotoluen (TNT) içeren atık su deşarjları ve kağıt endüstrisi tarafından üretilen klorlanmış lignin atıkları gibi çeşitli kompleks fenol içeren bileşikler parçalamakta da kullanılmaktadırlar. Bu funguslar lakkaz, lignin peroksidaz ve mangan peroksidaz gibi sekonder metabolitleri aracılığıyla polisiklik aromatikleri, poliklorlanmış bifenil ve dioksinleri, ve hatta DDT'yi ve birçok klorlu fenolik bileşikler parçalayabilirler. Bu özellikleri nedeni ile araştırmacıların yoğun olarak çalışmalarını sürdürdükleri bazı türler vardır ki, literatürde sıklıkla rastlanılan ve hatta çevresel uygulamalarda da karşımıza çıkan türlerdir. Bunların başlıcaları *Phanerochetae chrysosporium* ve *Trametes versicolor*'dur. Çevrede bulunan ve/veya yeni sentezlenen ve kullanılan pek çok çevresel kirleticiler söz konusu organizmaların sahip oldukları çeşitli enzim sistemleri aracılığıyla parçalanabilmektedir (Shah vd., 1992; Arisoy and Kolankaya, 1997; Taşpınar and Kolankaya, 1998; Yesilada vd., 1998; Tuomela vd., 2000; Ünal and Kolankaya, 2001; Lara vd., 2003; Çabuk vd., 2006; Leitao vd., 2007).

Bu çalışmada klorlu yapıları nedeni ile mikrobiyal yıkıma dirençli olan ve sahip oldukları toksik özellikleri ile biyosit olarak kullanılan pentaklorofenol ve 2,6-diklorofenolün deklorinasyonunda etkili bir enzimatik çözüm yolu aramak hedeflenmiştir.

Çalışmada 10 farklı fungal izolat, öncelikle lakkaz üretim yetenekleri açısından karşılaştırılarak etkin lakkaz üreticisi ya da üreticilerinin belirlenmesi sağlanmıştır. Burada amaç, elde edilecek yüksek lakkaz aktivitesi ile deklorinasyon arasında beklenen korelasyonun sağlanması düşüncesidir. Elde edilecek yüksek lakkaz aktivitesi ile deklorinasyonda başarılı olabilecek tür ya da türler enzim kaynağı olarak kullanılacaktır. Enzim üretiminde seçilecek besiyeri hem maliyet hem de aktiviteyi etkileyeceğinden tarama çalışması yapılırken 5 farklı besiyeri kullanılmıştır. Böylece yüksek aktivitede lakkaz üreticisi bir organizma ve uygun ortam belirlenmiş olacaktır. Bu tarama çalışmasında *Basidiomycetes* sınıfına ait *Polyporus arcularius* (T 438), *Schizophyllum commune* (T 701), *Clavariadelphus truncatus* (T 192), *Pleurotus eryngii* (M 102), *Ganoderma applanatum* (M 105), *Trametes versicolor* (D 22), *Cerrena unicolor* (D 30), *Schizophyllum commune* (D 35), *Ganoderma lucidum* (D 33) ve *Trametes versicolor* ATCC (200801) kullanılmıştır. Burada sıralanan her bir tür için Stok Bazal Medium, Mikolojik Sıvı Besiyeri, Potato-Dekstroz Broth (PDB), Modifiye Vogel Ortamı ve Mikiashvili vd. 2006 tarafından önerilen besiyeri olmak üzere 5 farklı besiyeri kullanılarak lakkaz üretim yetenekleri karşılaştırılmıştır (Şekil 4.1.1 – 4.1.5). Bu çalışmanın sonucunda *Trametes versicolor* ATCC (200801)'un Modifiye Vogel Ortamında lakkaz üretme potansiyelinin diğerlerine kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Literatürde de *Trametes versicolor* ATCC (200801)'un çeşitli basidiomycetes üyeleri ile yapılan karşılaştırmalarında genellikle en yüksek lakkaz üreticisi olduğu dikkat çekmektedir. Bulgularımız bu bilgi ile uyumludur (Pallerla ve Chambers, 1998; Ünal, 2004). Lakkaz üretiminde önemli bir belirteç de inkübasyon sürecidir. Literatürde inkübasyon sürecinde günlük olarak aktivitenin değişebileceği bildirilmektedir. Bu nedenle seçilen tür ve besiyerinde yapılan günlük lakkaz aktiviteleri ölçümleri 15 gün boyunca sürdürülmüş ve en uygun gün olarak 12. gün belirlenmiştir (Şekil 4.1.6). Bundan sonraki çalışmalarda *Trametes versicolor* ATCC (200801) ile Modifiye Vogel Ortamında lakkaz üretimleri 12 gün sürdürülmüştür.

Çalışmada deklorinasyonu hedeflenen pentaklorofenol ve 2,6 diklorofenol bileşikleri için, seçilen fungus, ortam ve belirlenen sürede üretilen lakkaz enzimi ile, ayrı ayrı optimizasyon çalışmaları yapılarak deklorinasyon için uygun koşullar

belirlenmiştir. Bu amaçla sırası ile süre, pH, substrat konsantrasyonu ve enzim miktarının deklorinasyona etkisi her iki bileşik için ayrı ayrı ve en az 3 tekrarlı olarak incelenmiştir.

Optimizasyon çalışmalarında 3.5.1.'de özellikleri anlatılan ve Şekil 3.5.1.1'de gösterilen reaktöre 100 ml klorofenolik bileşik konularak üzerine belirli miktarda enzim ilave edilmiş ve anında örnek alınarak başlangıç klor miktarı tespit edilmiştir. Tüm optimizasyon çalışmalarında denatüre enzim konularak kontrol grupları oluşturulmuş elde edilen sonuçlar kontrol grupları ile kıyaslanmıştır. Sürenin etkisini incelemek amacıyla toplam 10 dakika sürede çalışma sürdürülmüş ve her dakika örnek alınarak klor miktarı takip edilmiştir. Denemelerde kullanılan pentaklorofenol için en uygun süre olarak 5 dakika bulunurken, 2,6 diklorofenol için en uygun süre olarak 2 dakika olarak bulunmuştur. Şekil 4.2.1.1 incelendiğinde pentaklorofenolün deklorinasyonun süre arttıkça nispeten dengeli bir eğri elde edilirken, Şekil 4.3.1.1'den de görülebileceği gibi 2,6 dikloro fenolde 6. dakikaya kadar salınımların olduğu ve ancak 6. dakikadan sonra bir dengeye ulaşılabilirdiği söylenebilir. Literatür ile karşılaştırıldığında elde edilen optimum süre değerlerinin nispeten düşük olduğu söylenebilir (Zhang vd., 2008)). Burada kısa sürede elde edilen yüksek deklorinasyon değerleri çevresel uygulamalar açısından önemli bir avantaj sağlayacağı düşünülmektedir.

Enzimlerle yapılan deklorinasyon ve benzer çalışmalarda önemli bir çevresel etken de ortamın pH değeridir. Bu nedenle geniş bir pH aralığında (3-10) çalışma yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre hem pentaklorofenol hem de 2,6 diklorofenol bileşiklerinin *T. versicolor*'dan elde edilen lakkaz enzimi ile deklorinasyonu için en uygun pH değeri olarak 5.0 belirlenmiştir (Şekil 4.2.2.1 ve 4.3.2.1). Ünal (2004), yaptığı benzer bir çalışmada 2,4,6-triklorofenol, 2,4-diklorofenol, 4-klorofenol bileşiklerinin deklorinasyonunda yine lakkaz enzimini kullanmış ve optimum pH değerini 5.0 olarak belirlediğini bildirmiştir. Elde edilen bu değer literatürde de pek çok araştırmacı tarafından yapılan ve farklı substratlar kullanıldığında lakkaz enzimi için elde edilen optimum pH değerine yakın bir değer olduğu söylenebilir (Zhang vd., 2008).

Ortama ilave edilen substrat konsantrasyonunun etkisini belirlemek amacı ile 50 μM ile 700 μM aralığında değişen miktarlarda klorofenolik bileşik ilave edilmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.2.3.1 ve 4.3.3.1' de verilmektedir. Ortama ilave edilen pentaklorofenol miktarı 200 μM olduğunda en yüksek deklorinasyon değerine ulaşılmıştır. 200 μM 'dan sonra bir düşüş gözlenmiş ve 300 μM 'dan itibaren neredeyse dengeli deklorinasyon değerleri elde edilmiştir. 2,6 diklorofenol için substrat konsantrasyonu artıkça değişen deklorinasyon değerleri elde edilmiştir. 50-150 μM aralığında bir artış kaydedilmiş fakat 150-300 μM arasında ise bir denge görülmüştür. Başlangıç substrat konsantrasyonu 400 μM olduğunda bir düşüş gözlenmiş, ancak başlangıç substrat konsantrasyonu artıkça en yüksek deklorinasyon değerine 600 μM 'da ulaşılmıştır.

Enzim miktarının etkisinin araştırılması amacıyla yapılan çalışmada reaktöre ilave edilen enzim miktarları 0.5-4.0 ml arasında değiştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.2.4.1 ve 4.3.4.1'de verilmiştir. Pentaklorofenol ile yapılan çalışmada elde edilen veriler incelendiğinde, beklenildiği gibi enzim miktarının artışına koşut olarak deklorinasyon değerinde de artış kaydedilmiştir. En yüksek deklorinasyon değerine 4 ml enzim miktarı ile ulaşılmıştır. Benzer bir durum 2,6 diklorofenol ile yapılan çalışmalar içinde söylenebilir. Yine en yüksek deklorinasyon değerine 4 ml enzim ile ulaşılmıştır.

Her iki bileşik için elde edilen optimum koşullar sabit tutularak deklorinasyon çalışması sırasında çözünmüş oksijen miktarı ile klor oluşumunun korelasyonunun belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmanın sonuçları Şekil 4.4.1. ve 4.4.2'de verilmektedir. Her iki grafikten de görülebileceği gibi, her iki bileşik için deklorinasyon artıkça oksijenin tüketildiği görülmektedir. Burada oksijen tüketiminin az olduğu düşünülebilir. Ancak inkübasyon süresinin 10 dakika gibi çok kısa olması bu durumu açıklamaktadır.

Bu çalışma ile elde edilen veriler göstermektedir ki; *T. versicolor* ATCC (200801)'den üretilen lakkaz enzimi ile pentaklorofenol ve 2,6-diklorofenol bileşiklerinden etkin olarak klor uzaklaştırılması yapılabilmektedir. Pentaklorofenol için uygun koşullar sırası ile 5 dakika, pH 5.0, 200 µM başlangıç substrat konsantrasyonu ve 4 ml enzim miktarı olarak belirlenirken; 2,6 diklorofenol için, süre 2 dakika, pH 5.0, 600 µM başlangıç substrat konsantrasyonu ve 4 ml enzim miktarı olarak belirlenmiştir. Bu çalışmanın devamında belirlenen optimum koşullarda deklorinasyonu yapılan söz konusu bileşikler için detoksifikasyonun değişip değişmediği ve deklorinasyon sonucunda oluşan bileşiklerin belirlenmesi gerekmektedir. Ancak bu tez çalışmasının amacı öncelikle her iki bileşik için etkili bir enzim kaynağı belirlemek ve deklorinasyon süreci için optimum koşulları belirlemek ile sınırlı tutulmuştur. Bu tez çalışmasından elde edilen bulgular incelendiğinde literatürde pek çok klorofenolik bileşik ile yapılmış çalışmalara rastlanırken, pentaklorofenol ve 2,6 diklorofenol ile yapılan çalışmalar oldukça az sayıdadır. Bu nedenle elde edilen verilerin literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abadulla, E., Tzanov, T., Costa, S., Robra, K., Paulo, A.C., Gbbitz, G.M., 2000, Decolorization and Detoxification of Textile Dyes with a Laccase from *Trametes hirsuta*, Applied And Environmental Microbiology, 3357–3362.
- Aggelis, G., Iconomou, D., Christou, M., Bokas, d., Kotzailias, S., Christou, G., Tsagou, V., Papanikolaou, S., 2003, Phenolic removal in a model olive oil mill wastewater using *Pleurotus ostreatus* in bioreactor cultures and biological evaluation of the process, Water Research, 37, 3897–3904.
- Aktaş, N., iek, H., nal Taşpına, A., Kibarer, G., Kolanlaya, N. And Tanyola, A., 2001, Reaction kinetics for laccase-catalyzed polymerization of 1-naphthol. Bioresource Technology, 80, 29-36.
- Aktaş N., Tanyola, A. ,2003, Reaction conditions for laccase catalyzed polymerization of catechol, Bioresour Technol 87, pp. 209–214.
- Alain-M. Boudet, 2000, Lignin and Lignification, Plant Physiology and Biochemistry, 38, 1-2, 81-96
- Alberti, B.N. and Klibanov, A.M., 1981, Bitech. Bioeng. Symp., 11, 373.
- Arcand, R.L. and Archibald, F.S., 1991, Direct dechlorination of chlorophenolic compounds by laccases from *Trametes (Coriolus) versicolor*, Enzyme Microb. Technol., 13, 194- 203.
- Arceivala, S.J., Wastewater treatment for pollution control, (ev: Balman, A.H., Balman, V.) 2002.
- Archibald, F.S., Bourbonnais, R., Jurasek, L., Paice, M.G., Reid, I.D., 1997, Kraft pulp bleaching and delignification by *Trametes versicolor*, Journal of Biotechnology 53, 215–236.
- Arısoy, M., 1993, Bazı Karsinojenik ve Toksik Bileşiklerin Beyaz-rkl Funguslarla Biyolojik Yıkımı, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Ankara.

- Arisoy, M. and Kolankaya, N., 1997, Biodegradation of lindane by *Pleurotus sajor-caju* and toxic effects of lindane and its metabolites on mice, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 59, 352-359.
- Arias, M.E., Arenas, M., Rodriguez, J., Soliveri, J., Ball, A.S., and Hernandez, M., 2003, Kraft Pulp Biobleaching and Mediated Oxidation of a Nonphenolic Substrate by Laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335, Applied and Environmental Microbiology, 1953–1958.
- Arslan O., Meral İ., Bayıroğlu F., Aslan R., Baydaş B., 1999, Pentaklorofenolün Tavşanlarda Serum Tiroid Hormon Düzeyleri Üzerine Etkisi, PCP'nin Tiroid Hormon Düzeyine Etkisi, Van Tıp Dergisi, Cilt:6, Sayı 2.
- Atlow, S.C., Banadonna-Apora, L. and Klibanov, A. M., 1984, Dephenolization of industrial wastewaters catalysed by polyphenol oxidase, Biotechnology and Bioengineering, 26, 599-603.
- Baker, W.L. Sabapathy, K. Vibat M. and Lonergan G., 1996, Lactase catalyzes formation of an indamine dye between 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone and 3-dimethylaminobenzoic acid, Enzyme Microb Technol 18, pp. 90–94.
- Balakshin, M, Chen, C.L., Gratzl, J.S., Kirkman, A., Jakob, H., 2001, Biobleaching of pulp with dioxygen in laccase-mediator system—effect of variables on the reaction kinetics, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 16, 205–215.
- Bauer, C.G. ,Kühn, A., Gajovic, N., Skorobogatko, O., Holt, P., Bruce, N.C., Makower, A., Lowe. C. R., Scheller, F.W. ,1999, New enzyme sensors for morphine and codeine based on morphine dehydrogenase and laccase, Fresenius J Anal Chem, 364 :179–183.
- Baybalı, M., 2003, Resorsinol'ün Enzimatik Polimerizasyon Kinetiğinin İncelenmesi, Yüksek Mühendislik Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Berry, R.M., Luthe, C.E., Voss, R.H. and Wrist, P.E., 1991, The Effects of Recent Changes in Bleached Softwood Kraft Mill Technology on Organochlorine Emmissions, Pulp and Paper Can. 92, 155 p.

- Bertrand, G., 1908, Action of tyrosinase on some compounds similar to tyrosine, C. R. Acad. Sci. Paris, 145, 1352-1355.
- Birhanli, E., Yeşilada, O., 2006, Increased production of laccase by pellets of *Funalia trogii* ATCC 200800 and *Trametes versicolor* ATCC 200801 in repeated- batch mode, *Enzyme and Microbial Technology*, 39,1286-1293.
- Bitton, G., 1994, Biotransformation of Xenobiotics and Metals. In “Wastewater Microbiology” Ed. By G. Bitton John Willey and Sons Puplication 313p.
- Blanguiez, P., Casas, X.F., Gabarell, X., Sara, M., Caminal, G., Vicent, T., 2004, Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor*, *Water Research*, 38, 2166-2172.
- Bollag JM, Shuttleworth KL, Anderson DH., 1988, Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds, *Appl Environ Microbiol.*, 54(12): 3086–3091.
- Bonomo, R. P., Cennamo, G., Purrello, R., Santoro, A. M., Zappala, R., 2001, Comparison of Three Fungal Laccases From *Rigodoporus lignosus* and *Pleurotus ostreatus*: Correlation between conformational changes and catalytic activity. *Journal of Inorganic Chemistry*. 83, 67-73.
- Bourbonnais, R., Paice, M.G ., Freiermuth, B Bodie E.and Borneman S.,1997, Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds, *Appl Environ Microbiol* 63 pp. 4627–4632.
- Böhmer, S. Messner K. and Srebotnik E., 1988, Oxidation of phenanthrene by a fungal laccase in the presence of 1-hydroxybenzotriazole and unsaturated lipids, *Biochem Biophys Res Commun* 244, pp. 233–238.
- Brock, T.D., Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., 1994, Biodegradation of Xenobiotics. In “Biology of Microorganisms”, Seventh Edition, U.S.A., pp. 668-669.
- Burges, N.A., 1963, Enzymes Associated with Phenols. In: *Enzyme Chemistry of Phenolic Compounds*, J.B. Pridham, ed., Pergamon Press, Oxford, 1-7.

- Call, H.P., Mücke, I., 1997, History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym®-process), *Journal of Biotechnology* 53, 163–202.
- Calvo, A.M., Copa-Patino, J.L., Alonso, O., Gonzales, A.E., 1998, Studies of the production and characterization of laccase activity in the basidiomycete *Coriolopsis gallica*, an efficient decolorizer of alkaline effluents, *Arch Microbiol.*, 171, 31–36.
- Camarero, S., Garcia, O., Vidal, T., Colom, J., Rio, J.C., Gutierrez, A., Gras, J.M., Monje, R., Martinez, M.J., Martinez, A.T., 2004, Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system, *Enzyme and Microbial Technology* 35, 113–120.
- Campbell, N.A., Reece, J.B., 2006, *Biology*, Benjamin Cumming, Pearson Education.
- Campos R., Kandelbauer, A., Robra, K.H, Cavaco-Paulo, A., Gubitz, G.M., 2001, Indigo degradation with purified laccases from *Trametes hirsuta* and *Sclerotium rolfsii*, *Journal of Biotechnology* 89, 131–139.
- Cantarella, G., Gali, C., Gentili, P., 2003, Free radical versus electron-transfer routes of oxidation of hydrocarbons by laccase/mediator systems Catalytic or stoichiometric procedures, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 22, 135–144.
- Carunchio F, Crescenzi C, Gireli, A., Messina A., Tarola, A.M., 2001, Oxidation of ferulic acid by laccase: identification of the products and inhibitory effects of some dipeptides *Talanta* 55 (2001) 189–200.
- Casa, R., D'Annibale, A., Pieruccetti, F., Stazi, S.R., Sermanni, G.G., Cascio, B.L., 2003, Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability, *Chemosphere* 50, 959.
- Castro, A.I.R.P., Evtuguin, D.V., Xavier, A.M.N., 2003, Degradation of biphenyl lignin model compounds by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of 1-hydroxybenzotriazole and heteropolyanion $[\text{SiW}_{11}\text{VO}_{40}]^{5-}$, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 22, 13–20.

- Chakar F.S. Ragauskas A.J. 2001, Formation of quinonoid structures in laccase-mediator reactions. In: D.S. Argyropoulos, Editor, Oxidative delignification chemistry fundamentals and catalysis, ACS symposium series. vol. 785, Oxford University Press, USA, pp. 444–455.
- Cho, S., Park, S.J., Lim, J.S, Rhee, Y.H., Shin,K., 2002, Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase of *Coriolus hirsutus*, *Biotechnology Letters*, 24, 1337-1340.
- Claus, H., Faber, G., König, H., 2002, Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases, *Appl Microbiol Biotechnol*, 59, 672–678.
- Collins, P.J. Kotterman, M.J.J.. Field J.A and Dobson A.D.W.,1996, Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by laccases from *Trametes versicolor*, *Appl Environ Microbiol* 62 , pp. 4563–4567.
- Crecchio C., Ruggiero P. and Pizzigallo, M.D.R. 1995, Polyphenoloxidases immobilized in organic gels: properties and applications in the detoxification of aromatic compounds, *Biotechnol Bioeng* 48, pp. 585–591.
- Crestini, C., Argyropoulos, D. S., 1998, The Early Oxidative Biodegradation Steps of Residual Kraft Lignin Models with Laccase, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 6, 2161-2169.
- Çabuk, A., Unal, A.T., and Kolankaya, N., 2006, Biodegradation of cyanide by a white rot fungus, *Trametes versicolor*, *Biotechnology Letters*, 28, 1313-1317.
- D'Annibale, A. Stazi S.R., Vinciguerra, V. Mattia E. Di and Giovannozzi, S.G. 1999, Characterization of immobilized laccase from *Lentinula edodes* and its use in olive-mill wastewater treatment, *Process Biochem* 34, pp. 697–706.
- D'Annibale, A., Stazi, S.R., Vinciguerra, V. and Sermanni, G.G., 2000, Oxirane-immobilized *Lentinula edodes* laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater, *Journal of Biotech.*, 77, 265-273.
- D'Annibale, A., Ricci, M., Quaratino, D., Pieruccetti, F., Fenice, M., 2004, *Panus tigrinus* efficiently removes phenols, color and organic load from olive-mill wastewater, *Research in Microbiology* 155, 596–603.

- DeLorenzo, M.E., Scott, G.I., Ross, P.E., 2001, Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: a review, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 84-98.
- Demirbağ Z., 2006, Genel Mikrobiyoloji, Trabzon, 252-53.
- Dodor, D.E., Hwang, H.M., Ekunwe, S.I.N., 2004, Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by immobilized laccase from *Trametes versicolor*, *Enzyme and Microbial Technology* 35, 210–217.
- Dominguez, A., Coutto, S.R., Sanroman, M.A., 2005, Dye decolorization by *Trametes hirsuta* immobilized into alginate beads, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 405-409.
- Durante, D., Casadio, R., Martelli, L., Tasco, G., Portaccio, M., DeLuca, P., Bencivenga, U., Rossi, S., Martino, S.D., Grano, V., Diano, N., Mita, D.G., 2004, Isothermal and non-isothermal bioreactors in the detoxification of waste waters polluted by aromatic compounds by means of immobilised laccase from *Rhus vernicifera*, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 27, 191–206.
- Edwards, W., Leukes, W.D., Bezuidenhout, J.J., 2002, Ultrafiltration of petrochemical industrial wastewater using immobilised manganese peroxylase and lactase: application in the defouling of polysulphone membranes, *Desalination* 149, 275-278.
- Eggen, T., 1999, Application of fungal substrate from commercial mushroom production *Pleurotus ostreatus* for bioremediation of, creosote contaminated soil *International Biodeterioration & Biodegradation* 44, 117-126.
- Esser, K., 1986, *Cryptogams cyanobacteria algae fungi lichens*, Cambridge University Press, London, 486.
- Fabbrini, M., Gali, C., Gentili, P., Macchitella, D., 2001, An oxidation of alcohols by oxygen with the enzyme laccase and mediation by TEMPO, *Tetrahedron Letters* 42, 7551–7553.

- Ferry Y. and Leech D., 2005 Amperometric detection of catecholamine neurotransmitters using electrocatalytic substrate recycling at a laccase electrode, *Electroanalysis* 17, pp. 2113–2119.
- Forney, J.J. and Reddy, C.A., 1979, Bacterial degradation of kraft lignin: Develop. In. *Industrial. Microbiol.*, 20, 163-175.
- Freire R.S., Durán N. and Kubota L.T., 2001, Effects of fungal laccase immobilization procedures for the development of a biosensor for phenol compounds, *Talanta* 54 (2001), pp. 681–686.
- Freire R.S., Durán N and Kubota L.T, 2002, Development of a laccase-based flow injection electrochemical biosensor for the determination of phenolic compounds and its application for monitoring remediation of kraft E1 paper mill effluent, *Anal Chim Acta* 463 (2002), pp. 229–238.
- Fritz-Langhals, E., Kunath, B., 1998, Synthesis of aromatic aldehydes by laccase-mediator assisted oxidation, *Tetrahedron Letters* 39, 5955-5956.
- Fukuda, T., Uchido, H., Takashima, Y., Uwajima, T., Kabawabata, T., Suzuli, M., 2001, Degradation of Bisphenol A by Purified Laccase from *Trametes villosa*, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 284, 704–706.
- Gardiol, A.E., Hernandez, R.J. Reinhammar B and Harte, B.R Development of a gas-phase oxygen biosensor using a blue copper-containing oxidase, *Enzyme Microb Technol* 18, pp. 347–352.
- Georis, J Lomascolo A., Camarero, S. Dorgeo, V. Herpoel I. and Asther M. ,2003, *Pycnoporus cinnabarinus* laccases: an interesting tool for food or non-food applications, *Meded Fac Landbouwkd Toegep Biol Wet* 68, pp. 263–266.
- Gienfreda, L., Xu, F., Bollag J., Copyright 1999, CRC Pres LLC, *Laccase: A useful Group of oxidoreductive enzymes.*
- Gomes, S.A.S.S., Nogueira, J.M.F., Rebelo, M.J.F., 2003, An amperometric biosensor for polyphenolic compounds in red wine, *Biosensors and Bioelectronics* 20, 1211–1216.

- Gómez J., Pazos M., Rodríguez S. Couto and Sanromán M.A., 2005, Chestnut shell and barley bran as potential substrates for laccase production by *Coriolopsis rigida* under solid-state conditions, *J Food Eng* 68, pp. 315–319.
- Greenberg, A., 1992. *Standard Methods for the Examinations of Waters and Wastewaters*; 18th ed. American Public Health Association, Washington, 6-61–6-65.
- Guerra, R., 2001, Ecotoxicological and chemical evaluation of phenolic compounds in industrial effluents, *Chemosphere*, 44, 1737-1747.
- Gupta, G. Rajendran V and. Atanassov, P., 2003, Laccase biosensor on monolayer-modified gold electrode, *Electroanalysis* 15 pp. 1577–1583.
- Haghighi, B., Gorton, L., Ruzgasi T., Jönsson, L.J., 2003, Characterization of graphite electrodes modified with laccase from *Trametes versicolor* and their use for bioelectrochemical monitoring of phenolic compounds in flow injection analysis, *Analytica Chimica Acta* 487. 3–14.
- Han, S. Fang, G. Deng, Y. Li P., Asther M. and Sigoillot J.-C., 2002, Efficient effects on enhancement bleachabilities of soda-AQ wheat-straw pulps by laccase treatment, *Proceedings of the international symposium on emerging technologies of pulping and papermaking 2nd*, Guangzhou, China, *Oct. 9–11*
- Hou, H., Zhou, J. Wang J., Du C and Yan, B., 2004, Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye, *Process Biochem* 39 , pp. 1415–1419.
- Huang H., Cai, R. Du Y and Zeng Y., 1995, Flow-injection stopped-flow spectrofluorimetric kinetic determination of total ascorbic acid based on an enzyme-linked coupled reaction, *Anal Chim Acta* 309, 271–275.
- Hublik G., Schinner, F., 2000, Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants, *Enzyme and Microbial Technology* 27, 330–336.
- Iimura, Y., Hartikainen, P. and Tatsumi, K., 1996, Dechlorination of tetrachloroguaiacol by laccase of white-rot basidiomycetes *Coriolus versicolor*, *Applied Microbiol Biotechnology*, 45, 434-439.

- Itoh, K., Fujita, M., Kumano, K., Suyama, K., Yamamoto, H., 2000, Phenolic acids affect transformations of chlorophenols by a *Coriolus versicolor* laccase, *Soil Biology & Biochemistry* 32, 85-91.
- Jacob, H. Del Grosso M., Kuever, A. Nimmerfroh N. and Suess, H.U. 1999, Delignification of chemical pulp with laccase and mediators. A concept with a future, *Papier* 53, 85–95.
- Jardim, W.F., Moraes, S.G., Takiyama, M.M.K, 1997, Photocatalytic degradation of aromatic chlorinated compounds using TiO₂: toxicity of intermediates *Water Research*, 31, 1728-1732.
- Jaouani, At., Guillen, F., Penninckx, M.J., Martinez, A.T., Martinez, M.J., 2005, Role of *Pycnoporus coccineus* laccase in the degradation of aromatic compounds in olive oil mill wastewater, *Enzyme and Microbial Technology* 36, 478–486.
- Jarosz-Wilkolazka, A., ruzgas, T., Gorton, L., 2004, Use of laccase-modified electrode for amperometric detection of plant flavonoids, *Enzyme and Microbial Technology* 35, 238–241.
- Jarosz-Wilkolazka A., Ruzgas T and Gorton L., 2005, Amperometric detection of mono- and diphenols at *Cerrena unicolor* laccase-modified graphite electrode: correlation between sensitivity and substrate structure, *Talanta* 66, pp. 1219–1224.
- Johannes, C., Majcherczyk, A., Hüttermann, A., 1998, Oxidation of acenaphthene and acenaphthylene by laccase of *Trametes versicolor* in a laccase-mediator system, *Journal of Biotechnology* 61, 151–156.
- Johannes, C., Majcherczyk, A., 2000, Natural Mediators in the Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Laccase Mediator Systems, *Applied And Environmental Microbiology*, 524–528.
- Jolival, C., Brenon, S., Caminade, E., Mougine, C., Pontie, M., 2000, Immobilization of laccase from *Trametes versicolor* on a modified PVDF microfiltration membrane: characterization of the grafted support and application in removing a

- phenylurea pesticide in wastewater, *Journal of Membrane Science* 180, 103–113.
- Jung, H. Hyun K. and Park Ch., 2003, Production of laccase and bioremediation of pentachlorophenol by wood-degrading fungus *Trichophyton* sp. LKY-7 immobilized in Ca-alginate beads, *Polpu Chongi Gisul* **35** (2003), pp. 80–86.
- Kandioller and Christov, 2001 G. Kandioller and L. Christov, Evaluation of the delignification and bleaching abilities of selected laccases with HBT on different pulps. In: D.S. Argyropoulos, Editor, *Oxidative delignification chemistry fundamentals and catalysis, ACS symposium series, vol. 785*, Oxford University Press, USA (2001), pp. 427–443.
- Kang, K.H., Dec, J., Park, H., Bollag, J.M., 2002, Transformation of the fungicide cyprodinil by a laccase of *Trametes villosa* in the presence of phenolic mediators and humic acid, *Water Research* 36, 4907–4915.
- Karam, J. and Nicell, J.A., 1997, Potential applications of enzymes in waste treatment, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 69, 141–153.
- Karamyshev, A.V., Shleev, S.V., Koroleva, O.V., Yaropolov, A.I., Sakharov, I.Y., 2003, Laccase-catalyzed synthesis of conducting polyaniline, *Enzyme and Microbial Technology* 33, 556–564.
- Karpuzcu M., 1991, Çevre Kontrolünde Öncelik Kriterleri, B.Ü. Türkiyede Çev. Kir. öne. Semp., İstanbul.
- Kasinath A, Novotny C., Svobodova K., Patel K.C. and Sasek V. 2003, Decolorization of synthetic dyes by *Irpex lacteus* in liquid cultures and packed-bed bioreactor, *Enzyme Microb Technol* 32, pp. 167–173.
- Keilin, D. and Mann, T., 1938, Polyphenol Oxidase: Purification, Nature and Properties, *Proc. Royal Soc. Ser B*, 125, 187–204.
- Keum, Y., Li Q. X., 2004, Fungal laccase-catalyzed degradation of hydroxy polychlorinated biphenyls, *Chemosphere* 56, 23–30.

- Kirk TK., 1981, Physiology of lignin metabolism white-rot fungi:lignin degradation, Microbiology, Chemistry and Potential Applications, Kirk TK., Higuera T., Chang H. (Eds), CRC Press, Inc Boca Raton, Florida II, 4, 52-62.
- Kirk, T.K. and Joyce, T., 1983, Towards the tangible. Tappi., Journal, 66, 11, 7.
- Kirk, T.K., Lamar, T., Glaser, J.A., "The potential of white-rot fungi in bioremediation", Mongkolsuk, S., Lovett, P.S., Trempy J.E. (ed), Biotechnology and environmental science-molecular approaches, Plenum Press, New York, 131.
- Kirkpatrick, N., Reid, I.D., Ziomek, E., paice M.G., 1990, Biological leaching of hardwood craft pulp using *Trametes (Coriolus) versicolor*, immobilized polyurethane foam, Appl. Microbiol. Biotechnol., 33, 105-8.
- Klibanov, A. M., Alberti, B.N., Morris, E.D. and Felshin, L.M., 1980, Enzymatic Removal of Toxic Phenols and Anilines from Wastewater, J. Appl. Biochem., 2, 414-421.
- Klibanov, A. M. and Morris, E.D., 1981, Horseradish peroxidase for removal of carcinogenic aromatic amines from water, Enzyme Microb. Technol., 3, 119.
- Klibanov, A. M., Tu, T. M. and Scott, K.P., 1983, Peroxidase catalysed removal of phenols from coal conversion wastewater, Science, 221, 259-261.
- Knutson K. and Ragauskas, A. 2004, Laccase-mediator biobleaching applied to a direct yellow dyed paper, *Biotechnol Prog* 20, pp. 1893–1896.
- Kubowitz, F., 1938, Cleavage and Resynthesis of Polyphenol Oxidase and of Hemocyanin, Biochem. Z., 299, 32-57.
- Kulys, J., Vidziunaite, R., 2003, Amperometric biosensors based on recombinant laccases for phenols determination, Biosensors and Bioelectronics 18, 319-/325.
- Kulys, J., Vidziunaite, R, Scheider, P., 2003, Laccase-catalyzed oxidation of naphthol in the presence of soluble polymers, Enzyme and Microbial Technology 32, 455–463.

- Kuuva, T., Lantto, R., Reinikainen, T., Buchert, J., Autio, K., 2003, Rheological properties of laccase-induced sugar beet pectin gels, *Food Hydrocolloids* 17, 679–684.
- Kuznetsov, B.A., Shumakovich, G.P., Koroleva, O.V., Yaropolov, A.I., 2001, On applicability of laccase as label in the mediated and mediatorless electroimmunoassay: effect of distance on the direct electron transfer between laccase and electrode, *Biosensors & Bioelectronics* 16, 73–84.
- Lara, M.A., Malavar, A.J.R., Rojas, O.J., Holmquist, O., Gonzalez, A.M., Bullon, J., Peraloza, N. and Araujo, E., 2003, Black liquor lignin biodegradation by *Trametes elegans*, *Int. Biodet. And Biodeg.*, 52, 167-173.
- Lante A., Crapisi, A., Krastanov A., Spettoli, P., 2000, Biodegradation of phenols by laccase immobilised in a membrane reactor, *Process Biochemistry* 36 (2000) 51–58.
- Leech, D., Daigle, F., 1998, Optimization of a reagentless laccase electrode for the detection of the inhibitor azide, *Analyst*, 123, 1971–1974.
- Leitão A.L., Duarte M.P., Santos Oliveira J. (2007) Degradation of phenol by halotolerant strain of *Penicillium chrysogenum*. *Int. Biodeter. Biodegrad.* 59: 220–225.
- Leite, O.D., Lupetti, K.O., fatibello-Filho, O., Vieira, I.C., Barbosa, A.M., 2003, Synergic effect studies of the bi-enzymatic system laccase peroxidase in a voltammetric biosensor for catecholamines, *Talanta* 59, 889-896.
- Leonowicz A, Matuszewska A, Luterek J, Ziegenhagen D, Wojtas-Wasilewska M, Cho NS, Hofrichter M, Rogalski J (1999) Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genet Biol* 27:175–185.
- Levin, L. Forchiassin F. and Viale, A. 2005, Ligninolytic enzyme production and dye decolorization by *Trametes trogii*: application of the Plackett–Burman experimental design to evaluate nutritional requirements, *Process Biochem* 40 (2005), pp. 1381–1387.

- Lisdat, F., Wollenberger, U., Makower, A., Hörtnagl, H., Pfeiffer, D., Scheller, F.W., 1997, Catecholamine detection using enzymatic amplification, *Biosensors & Bioelectronics* Vol. 12, 1199-1211.
- Lorenzo, M. Moldes, D. Rodríguez S. Couto and Sanromán A., 2002, Improving laccase production by employing different lignocellulosic wastes in submerged cultures of *Trametes versicolor*, *Bioresources Technol* 82 (2002), pp. 109–113.
- Lucas, M. De La Rubia T. and Martinez J, .2003, Oxidation of low molecular weight aromatic components of olive-mill wastewaters by a *Trametes versicolor* laccase, *Polyphenols Actual* **23** (2003), pp. 36–37.
- Maceiras, R.. Rodríguez-Couto S., Sanromán, A, 2001, Influence of Several Activators on the Extracellular Laccase Activity and *In vivo* Decolourization of Poly R-478 by Semi-Solid-State Cultures of *Trametes versicolor*, *Acta Biotechnologica*, 21, 25264.
- McCarthy, J.T., Levy, V.C., Lonergan, G.T., Fecondo, J.V., 1999, Development of optimal conditions for the decolourization of a range of industrial dyes using *Pycnoporus cinnabarinus* laccase, *Hazardous and Industrial Wastes - Proceedings of the Mid-Atlantic Industrial Waste Conference*, 489-498.
- Majcherczyk, A., Johannes, C., Hüttermann, A., 1998, Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor* *Enzyme and Microbial Technology* 22:335–341.
- Majcherczyk, A Johannes, C., 2000, Radical mediated indirect oxidation of a PEG-coupled polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) model compound by fungal laccase *Biochimica et Biophysica Acta* 1474, 157-162.
- Marko-Varga, G. EmnCUS, J. Gotton L. and Ruzgas, T. 1995, Development of enzyme-based amperometric sensors for the determination of phenolic compounds, *Trends Anal Chem* **14** (1995), pp. 319–328.
- Mason, H.S., Fowlks, W.B. and Peterson, E.W., 1955, Oxygen transfer and Electron Transport by the Phenolase Complex, *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 2914-2915.

- Mathiasen, T.E. 1996, Laccase for improved beer storage, *Trends Food Sci Technol* 7, p. 272.
- Matsumura, F., 1985, Effects of Pesticides on Wildlife. In "Toxicology of Insecticides", Second Edition, NY, 437-444.
- Mayer, AM, Staples,RC (2002) Laccase: new functions for an old enzyme *Phytochemistry* 60: 551-565.
- Mazmanci, M.A, Ünyayar, A., 2004, Decolourisation of Reactive Black 5 by *Funalia trogii* immobilised on *Luffa cylindrica* sponge, *Process Biochemistry*, 40, 337–342.
- Micard, V., Thibault, J.F., 1999, Oxidative gelation of sugar-beet pectins: use of laccases and hydration properties of the cross-linked pectins, *Carbohydrate Polymers* 39, 265–273.
- Michniewicz A., Ledakowicz S., Jamroz T., Jarosz-Wilkolazka A., Leonowicz A.,2003, Decolorization of aqueous solution of dyes by the laccase complex from *Cerrena unicolor*, *Biotechnologia*, 4, 194-204.
- Mikiashvili, N., Wasser, S.P., Nevo, E., Elisashvili, V., 2006, Effects of carbon and nitrogen sources on *Pleurotus ostreatus* ligninolytic enzyme activity, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 999-1002.
- Mikolasch, A., Hammer, E., Jonas, U., Popowski, K., Stielow, A., Schaur, F., 2002, Synthesis of 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-propionic acid derivatives by N-coupling of amines using laccase, *Tetrahedron* 58, 7589–7593. ,
- Miyazaki, A., Amano, T., Saito, H., Nakano, Y., 2002, Acute toxicity of chlorophenols to earthworms using a simple paper contact method and comparison with toxicities to fresh water organisms, *Chemosphere*, 47, 65-69.
- Moldes, D., Gallego, P.P., Rodriguez, S., Sanroman, A., 2003, Grape seeds: the best lignocellulosic waste to produce laccase by solid state cultures of *Trametes hirsuta*, *Biotechnology Letters*, 491–495.

- Moeder M., Martin C., Koeller, G, 2004, Degradation of hydroxylated compounds using laccase and horseradish peroxidase immobilized on microporous polypropylene hollow fiber membranes, *Journal of Membrane Science* 245, 183–190.
- Mougin C.; Jolivald C.; Malosse. C.; Chaplain V.; Sigoillot J., Asther, M.,2002, Interference of Soil Contaminants with Laccase Activity During the Transformation of Complex Mixtures of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Liquid Media, *Polycyclic Aromatic Compounds*, 22:3, 673-688.
- Murugesan, 2003, K. Murugesan, Bioremediation of paper and pulp mill effluents, *Indian J Exp Biol* 41 (2003), pp. 1239–1248.
- Nicell, J.A., Al-Kassim, L., Bewtra, J. K. and Taylor, K. E., 1993, Wastewater treatment by enzyme catalysed polymerization and preccipitation, *Biodeterioration Abstracts*, 7(1), 1-8.
- Nicotra, S., Caramarossa, M.R., Mucci, A., Pagnoni, U.M., Riva, S., Forti,L., 2004, Biotransformation of resveratrol: synthesis of trans-dehydrodimers catalyzed by laccases from *Myceliophthora thermophyla* and from *Trametes pubescens*, *Tetrahedron* 60, 595–600.
- Niku-Paavola M.-L., Viikari, L., 2000, Enzymatic oxidation of alkenes, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 10, .435–444.
- Norsker, M., Jensen, M., Adler-Nissen, J., 2000, Enzymatic gelation of sugar beet pectin in food products, *Food Hydrocolloids* 14, 237–243.
- Nyanhongo, G.S., Gomes, J., Gübitz, G., Zvauya, R., Read, J.S., Steiner, W., 2002, Production of laccase by a newly isolated strain of *Trametes modesta*, *Bioresource Technology* 84, 259–263.
- Okazaki, S., Michizoe, J., Goto, M., Furusaki, S., Wariishi, H., Tanaka, H., 2002, Oxidation of bisphenol A catalyzed by laccase hosted in reversed micelles in organic media, *Enzyme and Microbial Technology* 31, 227–232.

- Öztan, D., 2007, Tirosinaz Enziminin Ekstraksiyonu, Saflaştırılması ve Fenollerin Gideriminde Kullanımı, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 126s.
- Paice, M.G., Jurasek, L., Ho, C., Bourbonnais, R. and Archibald, F., 1989, Direct biological bleaching of hardwood kraft pulp with the fungus *Coriolus versicolor*, *Tappi journal.*, 75, 217-221.
- Paice, M.G. Bourbonnais R. and Reid, I.D. 1995, Bleaching kraft pulps with oxidative enzymes and alkaline hydrogen peroxide, *Tappi J* 78 pp. 161–169.
- Pallerla, S., Chambers, R., 1998, reactor development for biodegradation of pentachloropentol, *Catalyses today*, 40, 103-111.
- Palmieri, G. Cennamo G. and Sannia, G. 2005, Remazol brilliant blue R decolourisation by the fungus *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzymatic system, *Enzyme Microb Technol* 36, pp. 17–24.
- Palmore and Kim, 1999, G.T.R. Palmore and H.-H. Kim, Electro-enzymatic reduction of dioxygen to water in the cathode compartment of a biofuel cell, *J Electroanal Chem* 565 pp. 110–117.
- Pazarlıoğlu, N.K. Sarişik M. and Telefoncu, A. 2005, Laccase: production by *Trametes versicolor* and application to denim washing, *Process Biochem* 40 (2005), pp. 1673–1678.
- Peralta-Zamora P., Pereira C.M., Tiburtius E.R.L., Moraes S.G., Rosa M.A. and Minussi R.C., (2003), Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase, *Appl Catal B Environ* 42 pp. 131–144.
- Petersen and Mathiasen, 1997 B.R. Petersen and T.E. Mathiasen, Deoxygenation using laccase enzyme, *Trends Food Sci Technol* 8p. 249.
- Pickard, M.A., Roman, R., Tinoco, R., Vazquez-Duhalt, R., 1999, Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Coriolopsis gallica* UAMH 8260 laccase, *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 3805-3809.

- Poppius-Levlin, K. Tamminen, T. Kalliola A. and Ohra-aho, T. 2001, Characterization of residual lignins in pulps delignified by laccase/*N*-hydroxyacetanilide. In: D.S. Argyropoulos, Editor, *Oxidative delignification chemistry fundamentals and catalysis*, ACS symposium series, vol. 785, Oxford University Press, USA , pp. 358–372.
- Potin, O., Veignie, E., Rafin, C., 2004, Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Cladosporium sphaerospermum* isolated from an aged PAH contaminated soil, *FEMS Microbiology Ecology*, 51, 71-78.
- Regno, V., Arulgnanendran, J., Nirmalakhandan, N., 1998, Microbial toxicity in soil medium, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 39, 48-56.
- Rehorek, A., Tauber, M., Gübitz, G., 2004, Application of power ultrasound for azo dye degradation, *Ultrasonics Sonochemistry* 11, 177–182.
- Reyes P., Pickard M.A., Duhalt R.V., 1999, Hydroxybenzotriazole increases the range of textile dyes decolorized by immobilized laccase, *Biotechnology Letters* 21, 875–880.
- Rodríguez S. Couto, Gundín, M. Lorenzo M. and Sanromán, A. 2002, Screening of supports for laccase production by *Trametes versicolor* in semi-solid-state conditions. Determination of optimal operation conditions, *Process Biochem* **38** (2002), pp. 249–255.
- Rodríguez Couto, S. Hofer, D. Sanromán M.A. and Gübitz, G.M., 2004, Production of laccase by *Trametes hirsuta* grown in an immersion bioreactor. Application to decolourisation of dyes from a leather factory, *Eng Life Sci* 4 (2004), pp. 233–238.
- Rodríguez Couto, S. Rosales, E. Gundín M. and Sanromán, M.A. 2004, Exploitation of a waste from the brewing industry for laccase production by two *Trametes* sp., *J Food Eng* **64** (2004), pp. 423–428.
- Rodríguez Couto, S. Sanromán, M.A. Hofer D. and Gübitz G.M., 2004, Stainless steel sponge: a novel carrier for the immobilisation of the white-rot fungus *Trametes hirsuta* for decolourisation of textile dyes, *Bioresour Technol* 95 (2004), pp. 67–72.

- Rodríguez Couto and Sanromán, 2005a, S. Rodríguez Couto and M.A. Sanromán, Coconut flesh: a novel raw material for laccase production by *Trametes hirsuta* under solid-state conditions. Application to Lissamine Green B decolourization, *J Food Eng* 71 pp. 208–213.
- Rodríguez Couto, S. Sanromán M.A. and Gübitz, G.M. 2005, Influence of redox mediators and metal ions on synthetic acid dye decolourization by crude laccase from *Trametes hirsuta*, *Chemosphere* 58 (2005), pp. 417–422.
- Rodríguez Couto and Sanromán, 2006 S. Rodríguez Couto and M.A. Sanromán, Effect of two wastes from groundnut processing on laccase production and dye decolourization ability, *J Food Eng* 73 (2006), pp. 388–393.
- Rodríguez Couto, S. López E. and Sanromán, M.A. 2006, Utilisation of grape seeds for laccase production in solid-state fermentors, *J Food Eng* 74 pp. 263–267.
- Roy, J.J., Abraham, T.E., Abhijith, K.S., Kumar, P.V.S., Thakur, M.S., 2005, Biosensor for the determination of phenols based on Cross-Linked Enzyme Crystals (CLEC) of laccase, *Biosensors and Bioelectronics* 21, 206–211.
- Rogalski, J., Lundell, T., Leonowicz, A., Hatakka, A., 1991, Production of laccase, lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase by various strain of *Trametes versicolor* depending on culture conditions, *Acta Microbiologica Polonica*, 40, 221-234
- Saito, T., Kato, k., Yokogawa, Y., Nishida, M., Yamashita, Nobuyoshi, 2004, Detoxification of Bisphenol A and Nonylphenol by Purified Extracellular Laccase from a Fungus Isolated from Soil, *Journal Of Bioscience And Bioengineering*, 98, 64–66.
- Schafer, A., Spetch, M, Hetzheim, A., Francke, W., Schauer, F., 2001, Synthesis of substituted imidazoles and dimerization products using cells and laccase from *Trametes versicolor*, *Tetrahedron*, 57, 7693-7699.
- Schliephake, K., Mainwaring, D.E., Lonergan, G.T., Jones, I.K., Baker, W.L., 2000, Transformation and degradation of the disazo dye Chicago Sky Blue by a purified laccase from *Pycnoporus cinnabarinus*, *Enzyme and Microbial Technology* 27, 100–107.

- Sealey, J. Ragauskas A.J. and Elder, T.J. 1999, Investigations into laccase-mediator delignification of kraft pulps, *Holzforschung* 53 (1999), pp. 498–502.
- Setti, L., Giuliani, S., Spinozzi, G., Pifferi, P.G., 1999, Laccase catalyzed-oxidative coupling of 3-methyl 2-benzothiazolinone hydrazone and methoxyphenols, *Enzyme and Microbial Technology* 25, 285–289.
- Shah MM, Grover TA, Aust SD. Metabolism of cyanide by *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Biochem Biophys*. 1991; 290 (1):173–178.
- Shoham, Y., Schwartz, Z., Khasin, A., Gat, O., Zosim, Z. and Rosenberg, E., 1992, Delignification of wood pulp by a thermostable xylanase from *Basillus stearo-thermophilus* strain T-6, *Biodegradation*, Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands, 3, 207-218.
- Singh, N. and Singh, J., 2002 An enzymatic method for removal of phenol from industrial effluent, *Prep Biochem Biotechnol*, 32, 127-133.
- Soares, G.M.B. Costa-Ferreira M. and Pessoa de Amorim, M.T. ,2001, Decolorization of an anthraquinone-type dye using a laccase formulation, *Bioresour Technol* 79 (2001), pp. 171–177.
- Soares, G.M.B. Pessoa de Amorim M.T. and Costa-Ferreira, M. ,2001, Use of laccase together with redox mediators to decolourize Remazol Brilliant Blue R, *J Biotechnol* 89 (2001), pp. 123–129.
- Soares, G.M.B. Pessoa, M.T. Amorim, Hrdina R. and Costa-Ferreira, M. 2002, Studies on the biotransformation of novel disazo dyes by laccase, *Process Biochem* 37 (2002), pp. 581–587.
- Tamminen, T. Kleen, M. Ohra-aho T. and Poppius-levlin, K., 2003, Chemistry of mediated-laccase delignification analyzed by pyrolysis-GC/MS, *J Pulp Pap Sci* 29 (2003), pp. 319–324.
- Tanaka, T., Tonosaki, T, Nose, M., Tomidokoro, N., Kadomura, N., Fijii, T., Taniguchi, M., 2001, Treatment of Model Soils Contaminated with Phenolic Endocrine-

Disrupting Chemicals with Lactase from *Trametes* sp. in a Rotating Reactor, *Journal Of Bioscience And Bioengineering*, 92, 312-316.

Tanaka, T., Nose, M., Ende, A., Fujii, T., Taniguchi, M., 2003, Treatment of Nonylphenol with Laccase in a Rotating Reactor, *Journal Of Bioscience And Bioengineering*, 96, 541-546.

Taşpınar, A. and Kolankaya, N., 1998, Optimization of enzymatic chlorine removal from Kraft pulp, *Bull. of Environ. Contamin. and Toxicol.*, 61, 15-21.

Tavares, A.P.M., Gamales, J.A.F, Gaspar, A.R., Evtuguin, D.V., Xavier, A.M.R.B, 2004, A novel approach for the oxidative catalysis employing polyoxometalate–laccase system: application to the oxygen bleaching of kraft pulp, *Catalysis Communications* 5, 485–489.

Tayhas, G., Palmore, R., Kim, H., 1998, Electro-enzymatic reduction of dioxygen to water in the cathode compartment of a biofuel cell, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 464, 110–117.

Timur, S., Pazarlıoğlu, N., Pilloton, R., Telefoncu, A., 2004, Thick film sensors based on laccases from different sources immobilized in polyaniline matrix, *Sensors and Actuators B* 97, 132–136.

Tsioulpas, A., Dimou, D., Icomou, D., Aggelis, G., 2002, Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains of *Pleurotus* spp. in respect to their phenol oxidase (laccase) activity *Bioresource Technology* 84, 251–257.

Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A. and Itavaara, M., 2000, Biodegradation of lignin in copost environment: a review, *Bioresource Tech.* 72, 169-183.

Uchida, H., Fukuda, T., Miyamoto, H., Kawabata, T., Suzuki, M., Uwajima, T., 2001, Polymerization of Bisphenol A by Purified Laccase from *Trametes villosa*, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 287, 355–358.

Uyama, H., Kobayashi, S., 2002, Enzyme-catalyzed polymerization to functional polymers, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 19–20, 117–127.

Uysal, A., Türkman, A., 2006, 4-Klorofenolün aktif çamurda kometabolik ayrışması