

**ERZİNCAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BAZI ZARARLI TEKSTİL BOYALARININ *PLEUROTUS*
OSTREATUS İLE BİYOGİDERİMİ VE OPTİMİZASYONU**

Hüseyin Özkan CANÇELİK

**BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**ERZİNCAN
2015**

Her Hakkı Saklıdır

Doç. Dr. Murat Çankaya danışmanlığında, Hüseyin Özkan CANÇELİK tarafından hazırlanan bu çalışma 29/09/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başka : Doç. Dr. Murat ÇANKAYA

İmza:

Üye : Yrd. Doç. Dr. Harun BUDAK

İmza:

Üye : Yrd. Doç. Dr. Esra DİLEK

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

29/09/2015

Prof. Dr. Ali SÜLÜN

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans

BAZI ZARARLI TEKSTİL BOYALARININ *PLEUROTUS OSTREATUS* İLE BİYOGİDERİMİ VE OPTİMİZASYONU

Hüseyin Özkan CANÇELİK

Erzincan Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Murat ÇANKAYA

Ticari olarak kullanılan sentetik boyaların büyük bir kısmını toksik, karsinojenik ve mutajenik özelliklere sahip olan azo boyalar oluşturmaktadır. Bu boyaların fabrika deşarj sularından arıtılması için kullanılan kimyasal ve fiziksel arıtım teknolojileri yetersiz kalmaktadır. Özellikle kimyasal arıtım yöntemlerinde kullanılan bazı oksidant moleküller çevre için ayrıca bir tehlike oluşturmaktadır. Bir beyaz çürükçül fungus olan *Pleurotus ostreatus*'un tekstil endüstrisinde yaygın olarak kullanılan bazı azo boyar maddelerinin atık sulardan gideriminin de kullanılması için denemeler yapılmıştır.

Pleurotus ostreatus, dünyanın hemen hemen bütün ılıman iklim bölgelerinde; kavak, kayın, meşe, karaağaç, akçaağaç, ihlamur, söğüt, ceviz ve kestane gibi birçok ağaç türünün çürümüş gövdelerinde çürükçül olarak yaşar. *Pleurotus ostreatus*, üzerinde bulunduğu bitkinin hemiselüloz, selüloz ve lignin gibi yapı polisakaritlerini ekstraselüler olarak degrede ederek karbon kaynağı olarak kullanır.

Genel olarak beyaz çürükçül fungusların büyük bir çoğunluğu tarafından üretilebilen ligninoseleülotik enzimler sayesinde özellikle tekstil endüstrisi işletmeleri tarafından kullanılan ve bu işletmelerden çevreye bırakılan atık su içerisindeki önemli kirlilik faktörü olan sentetik boyar maddelerin düşük maliyetle ve kısa sürede biyolojik olarak arıtılması sağlanabilmektedir. Denemelerimizde; Direct Black 22, Direct Brown 2 ve Direct Orange 26 gibi azo boyaların *Pleurotus ostreatus* ile biyogiderimi incelenmiştir. Çalışmamızda bu üç azo boya için uygun sıvı enzim üretim ortamları tespit edilmiş ve *Pleurotus ostreatus* ile 14 gün boyunca boyaların biyogiderimi sağlanmıştır. Aynı zamanda bu süre içerisinde Polifenol Oksidaz, Lakkaz, Mangan Peroksidaz ve Lignin Peroksidaz enzimlerinin de aktiviteleri takip edilmiştir.

2015, 87 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Pleurotus ostreatus*, Biyogiderim, Tekstil Boyalar

ABSTRACT

Master Thesis

**SOME HARMFUL *PLEUROTUS OSTREATUS* OF TEXTILE DYES WITH
BIOREMEDIATION AND OPTIMIZATION**

Hüseyin Özkan CANÇELİK

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

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Murat ÇANKAYA

Synthetic commercial dyes used in a large portion of of toxic constitute the azo dyes have mutagenic and carcinogenic properties. This chemical and physical treatment technologies are used for the purification of water dye factory discharges are inadequate. Some oxidant molecules, especially used in chemical refining method also poses a danger to the environment. *Pleurotus ostreatus* is a white rot fungi for textile use of certain azo dyes commonly used in the industry attempts have been made in the removal from wastewater.

Pleurotus ostreatus, almost all temperate regions of the world; lives as the rot in the rotten body of many tree species such as poplar, beech, oak, elm, maple, linden, willow, walnut and chestnut. *Pleurotus ostreatus*; is located on the plant's degree by the structure of the extracellular polysaccharide such as cellulose and lignin and hemicellulos is used as a carbon source.

In general, thanks to ligninoseelütik enzyme can be produced by a majority of white rot fungi mainly used by businesses in the textile industry and synthetic dyes with significant pollution factor in wastewater released to the environment from these businesses at low cost and can be provided as soon as purifying biodegradable. In our experiment; Direct Black 22, Direct Brown 2 and Direct Orange 26 as azo dyes of *Pleurotus ostreatus* with biological removal were investigated. In our study, suitable liquid enzyme production environments have been identified for the three azo dyes and biological removal of dyes is provided for 14 days with *Pleurotus ostreatus*. Also during this time, the activities of Polyphenol Oxidase, Laccase, Manganese Peroxidase and Lignin Peroxidase enzymes was monitored, too.

2015, 87 pages**Keywords :** *Pleurotus ostreatus*, Bioremediation, Textile Dyes

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum bu çalışmada bilgi, öneri ve yardımlarıyla yol gösterip sabrı ve anlayışıyla benden desteğini esirgemeyen Erzincan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim üyelerinden tez danışmanım değerli hocam sayın Doç. Dr. Murat ÇANKAYA'ya derin minnet ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarında beni destekleyen, laboratuvar imkânlarını kullanmamı sağlayan bilim insanı olma çabamda beni yüreklendiren Erzincan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölüm Başkanı sayın Prof. Dr. Salih DOĞAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Denemelerimi yaptığım tekstil boyalarını tedarik eden, çalışmamda teorik olarak yardım eden Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü Öğretim üyelerinden sayın Doç. Dr. Alper AKKAYA'na teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmaları ve tez yazımında yardımlarını esirgemeyen Erzincan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim elemanlarından Arş.Gör. Mehmet KUZUCU'ya çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans sürecinde maddi açıdan destek sağlayan Türkiye Çevre Koruma Vakfı'na teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmanın alt yapısı sarf malzeme giderleri Erzincan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu (BAP) tarafından desteklenen FEN-A-070114-0057 numaralı proje ile karşılanmıştır. Erzincan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonuna desteklerinden ötürü teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında yanımda olan, sevgilerini ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli AİLEME sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım süresinde her zaman yanımda olan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli arkadaşım Hülya KARADEMİR'e teşekkürlerimi sunarım.

Hüseyin Özkan CANÇELİK

Eylül, 2015

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
TABLolar LİSTESİ	x
GRAFİK LİSTESİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Biyolojik İyileştirme	2
1.1.1. Biyoremediasyon	2
1.1.2. Türkiye’de biyoremediasyon.....	3
1.1.3. Biyosorpsiyon.....	4
1.1.4. Biyosorpsiyon kinetiği.....	4
1.1.5. Biyodegradasyon	5
1.2. Basidiomycota (basidiomisetler = basidiumlu mantarlar)	5
1.2.1. Basidiomisetlerde genel yaşam devresi	7
1.2.2. Odunun yapısı.....	8
1.2.3. Fungusların adaptasyon özelliği.....	10
1.2.4. Beyaz çürükçül funguslar.....	11
1.2.5. Beyaz çürükçül funguslarla gerçekleştirilen arıtım yöntemi	13
1.2.6. Beyaz çürükçül fungusların salgıladığı lignolitik enzimler	13
1.2.7. <i>Pleurotus ostreatus</i> ve boyar madde.....	16
1.2.8. <i>Pleurotus ostreatus</i>	17
1.2.8.1. Sistematiği	17
1.2.8.2. Morfolojisi.....	18

1.2.8.2.1. Pileus.....	18
1.2.8.2.2. Lameller	18
1.2.8.2.3. Sap	18
1.2.8.2.4. Sporlar.....	18
1.2.9. Habitatı.....	18
1.2.10. Yetiştirme yeri ve zamanı (doğal ortamı)	20
1.3. Tekstil Boyaları	20
1.3.1. Azo boyalar	20
1.4. Enzimler	23
1.4.1. Ligninin yapısı ve özellikleri.....	23
1.4.2. Lakkaz enzimi	25
1.4.2.1. Lakkazın biyokimyası	25
1.4.2.2. Reaksiyon ve etki mekanizması.....	27
1.4.2.3. Lakkazın fizyolojik önemi ve uygulamaları.....	29
1.4.3. Peroksidazlar	30
1.4.3.1. Mangan peroksidaz	31
1.4.3.2. Lignin peroksidaz.....	32
2. MATERYAL ve YÖNTEM.....	34
2.1. Materyal	34
2.1.1. Kimyasallar	34
2.1.2. Mikroorganizma	34
2.1.3. Cihazlar	35
2.2. Yöntem.....	36
2.2.1. Uygun stok ortamını belirleme yöntemi.....	36
2.2.2. Petri stok kültürü	36
2.2.2.1. Rose Bengal Agar (RBA).....	36
2.2.2.2. Potato Dekstroz Agar (PDA).....	37
2.2.3. Yatık agar	38
2.2.4. Büyüme ortamı	38
2.2.5. Uygun enzim üretim ortamını belirleme yöntemi	39

2.2.6.	Enzim aktivite tayin yöntemi	42
2.2.6.1.	Polifenol oksidaz aktivitesinin tayin yöntemi.....	42
2.2.6.2.	Lakkaz aktivitesinin tayin yöntemi	42
2.2.6.3.	Mangan peroksidaz aktivitesinin tayin yöntemi	43
2.2.6.4.	Lignin peroksidaz aktivitesinin tayin yöntemi	44
2.2.7.	Boyaların spekturum taraması.....	44
2.2.8.	Boyaların standart grafiklerinin oluşturulması.....	45
2.2.9.	Boyaların gideriminin takibi	45
2.2.10.	Biyokütle (biyomas) tayin yöntemi	46
2.2.11.	Bradford yöntemi ile total protein tayini	46
3.	SONUÇLAR.....	47
3.1.	Uygun stok ortamını belirleme sonuçları.....	47
3.1.1.	Petri stok kültürü	47
3.1.2.	Yatık agar	47
3.2.	Uygun enzim üretim ortamını belirleme sonuçları.....	48
3.3.	Boyaların spekturum taraması.....	49
3.4.	Boyaların standart grafiklerinin oluşturulması.....	51
3.5.	Boyaların gideriminin takibi	53
3.6.	Enzim aktivite grafikleri	59
3.7.	Sıcaklık optimizasyon sonuçları.....	61
3.8.	Çalkalama hızı optimizasyon sonuçları	63
3.9.	Sıvı kültür fermantasyon sonuçları.....	65
3.10.	Biyokütle (biyomas) tayin sonucu	67
3.11.	Bradford yöntemi ile total protein tayini standart grafiği	67
3.12.	Bradford yöntemi ile total protein tayin sonucu.....	68
4.	YORUM ve TARTIŞMA.....	70

KAYNAKLAR.....	77
ÖZGEÇMİŞ.....	87

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ**Simgeler**

L	Litre
g	Gram
mg	Miligram
mL	Mililitre
μ L	Mikrolitre
μ g	Mikrogram
μ M	Mikromolar
rpm	Devir/Dakika

Kısaltmalar

MEB	Malt Ekstract Broth
RBA	Rose Bengal Agar
PDA	Patoto Dekstroz Agar
EÜO	Enzim Üretim Ortamı
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)
BSA	Sıyr Serum Albumin
PPO	Polifenol Oksidaz
MnP	Mangan Peroksidaz
LiP	Liğnin Peroksidaz

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Endüstri atıkları.....	1
Şekil 1.2. Mikroorganizmaların atık boyalarda etkinliği. A. Atık boyalar B. Bakteriler C. Mantarlar.....	2
Şekil 1.3. Bazı basidiomisetler; A) Şapkalı mantarlar, B) Pafboller, C) Raf mantarları, D) Yer yıldızı mantarları, E) Kuş yuvası mantarları, F) Kurt mantarları	7
Şekil 1.4. Şapkalı mantarlar da üreme	7
Şekil 1.5. Hemiselülozun molekül yapısı.	9
Şekil 1.6. <i>Pleurotus ostreatus</i>	17
Şekil 1.7. <i>Pleurotus ostreatus</i>	19
Şekil 1.8. Azo boyaları	20
Şekil 1.9 Azo boyalar	23
Şekil 1.10. Ligninin genel yapısı.....	24
Şekil 1.11. Lakkaz enzimi.....	26
Şekil 1.12. Mangan peroksidazın kristal yapısı.....	31
Şekil 1.13. Lignin peroksidazın moleküler yapısı	33
Şekil 3.1. RBA petri stok kültürü	47
Şekil 3.2. RBA yatık stok kültürü	48
Şekil 3.3. Direct Black 22 boya giderimi.....	56
Şekil 3.4. Direct Brown 2 boya giderimi	57
Şekil 3.5. Direct Orange 26 boya giderimi	58
Şekil 3.6. Hücrelerin Biyosorbsiyonu.....	59
Şekil 4.1. Hücrelerin farklı azo boyalardaki biyokütle artışı.	73
Şekil 4.2. Bazı azo gurubu boyaların 32 °C sıcaklıktaki kontaminasyonu.....	76

TABLULAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 1.1. Kullanılacak azo boyaların özellikleri.....	23
Tablo 2.1. Kullanılan cihazlar.....	35
Tablo 2.2. RBA'nın içeriği.....	37
Tablo 2.3. PDA'nın içeriği.....	37
Tablo 2.4. Birinci ortamın içeriği (pH:6.6).....	39
Tablo 2.5. İkinci ortam içeriği (pH:6.6).....	40
Tablo 2.6. Üçüncü ortam içeriği (pH:6.0).....	40
Tablo 2.7. Dördüncü ortam içeriği (pH:4.5).....	41
Tablo 2.8. Polifenol oksidaz enziminin aktivite tayin protokolü.....	42
Tablo2.9. Lakkaz enziminin aktivite tahin protokolü.....	43
Tablo 2.10. Mangan peroksidaz enziminin aktivite tahin protokolü.....	43
Tablo 2.11. Lignin peroksidaz enziminin aktivite tahin protokolü.....	44
Tabo 3.1. Boyaların spekturum taraması.....	51

GRAFİK LİSTESİ

	Sayfa
Grafik 3.1. Uygun enzim üretim ortam grafiği	48
Grafik 3.2. Direct Black 22 spektrum taraması.....	49
Grafik 3.3. Direct Brown 2 spektrum taraması	50
Grafik 3.4. Direct Orange 26 spektrum taraması.....	50
Grafik 3.5. Direct Black 22 standart grafiği.....	52
Grafik 3.6. Direct Brown 2 standart grafiği	52
Grafik 3.7. Direct Orange 26 standart grafiği	53
Grafik 3.8. Direct Black 22 boya giderim grafiği.....	54
Grafik 3.9. Direct Brown 2 boya giderim grafiği	54
Grafik 3.10. Direct Orange 26 boya giderim grafiği	55
Grafik 3.11. Direct Black 22 lakkaz aktivite grafiği	59
Grafik 3.12. Direct Brown 2 lakkaz aktivite grafiği.....	60
Grafik 3.13. Direct Orange 26 lakkaz aktivite grafiği.....	60
Grafik 3.14. Direct Black 22 sıcaklık optimizasyon grafiği	61
Grafik 3.15. Direct Brown 2 sıcaklık optimizasyon grafiği.....	62
Grafik 3.16. Direct Orange 26 sıcaklık optimizasyon grafiği.....	62
Grafik 3.17. Direct Black 22 çalkalama hızı (rpm) optimizasyon grafiği	63
Grafik 3.18. Direct Brown 2 çalkalama hızı (rpm) optimizasyon grafiği.....	64
Grafik 3.19. Direct Orange 26 çalkalama hızı (rpm) optimizasyon grafiği.....	64
Grafik 3.20. Direct Black 22 sıvı kültür fermantasyonu optimizasyon grafiği.....	65
Grafik 3.21. Direct Brown 2 sıvı kültür fermantasyonu optimizasyon grafiği	66
Grafik 3.22. Direct Orange 26 sıvı kültür fermantasyonu optimizasyon grafiği	66
Grafik 3.23. Bradford yöntemi ile total protein tayini standart grafiği.....	67
Grafik 3.24. Direct Black 22 bradford yöntemi ile total protein tayin grafiği	68
Grafik 3.25. Direct Brown 2 bradford yöntemi ile total protein tayin grafiği.....	69
Grafik 3.26. Direct Orange 26 bradford yöntemi ile total protein tayin grafiği.....	69

1. GİRİŞ

Günümüzde uluslararası çevre sorunlarından biri de sucul ekosistemlerin kirlenmesidir. Sucul ekosistemlerde kirliliğin büyük kısmı endüstriyel atıklar nedeni ile meydana gelmektedir. Genellikle tekstil boya endüstrisi fabrikalarından deşarj edilen atıklar göller ve akarsular gibi sucul sistemlere verilmektedir. Bu atıkların bazı arıtım proseslerinden geçirilip en zararsız hale dönüştürülerek doğaya verilmesi gerekmektedir. Ancak gelişmekte olan ülkelerin çoğunda ürün maliyetini düşük tutmak amacıyla gerek üretim gerek arıtım prosesinde eski teknolojiler kullanılmaktadır. Eskiden fiziksel ve kimyasal arıtım yapılırken şimdi ise biyolojik arıtım yapılmaktadır. Günümüzün en büyük problemlerinden biri haline gelen çevre kirliliğinde başrolü, zehirli atıklar oynamaktadır. Bu maddeler çoğu zaman petrol, kimyevî maddeler, gıda maddeleri ve tekstil fabrikaları gibi çeşitli sanayilerin atıklarıdır. Zehirli atıklar, insanlara olduğu kadar diğer canlılar için de büyük tehlike teşkil etmektedirler. Son zamanlarda bilim insanları bu maddelerle yeni bir mücadele sistemi gerçekleştirdiler. Bu mücadele sistemini de "Biyoremediasyon" diye adlandırdılar.

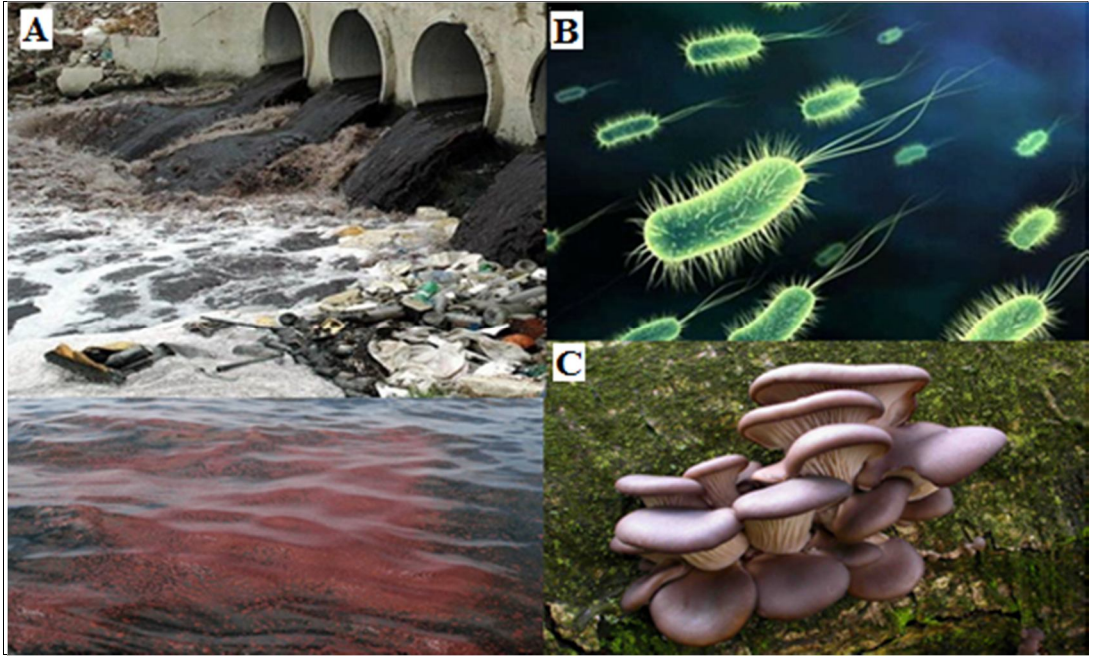


Şekil 1.1. Endüstri atıkları

1.1. Biyolojik İyileştirme

1.1.1. Biyoremediasyon

Tehlikeli maddeleri, zararsız (su ve karbondioksit) veya daha az zararlı maddelere parçalamak için mikroorganizmaların kullanıldığı uzun süreli arıtım prosesleri biyoremediasyon olarak bilinmektedir (Esmeray, 2012).



Şekil 1.2. Mikroorganizmaların atık boyalarda etkinliği. A. Atık boyalar B. Bakteriler C. Mantarlar

Çevre biyoteknolojisi uygulamaları çoğunlukla, doğal mikroorganizmalarla (bakteri, mantar vb.) atıkların arıtımında kullanılır. Biyoremediasyon; mikroorganizmaların kirleticileri çevreden alma kapasitesine sahip olmaları ve bunları büyüme ve metabolik faaliyetleri için kullanmaları esasına dayanmaktadır.

Biyoremediasyon tasarımının asıl amacı, mikrobiyal büyüme ve aktivite için en uygun şartların sağlanmasıdır.

Biyoremediasyon yöntemi iki biçimde uygulanır.

1. Atıkların döküldüğü bölgeye besin aktarımı yapılarak, toprağın mikroorganizma kompozisyonuna göre, toprakta bulunan mikroorganizmalar etkin duruma geçirilir.
2. Çevresel koşullar kontrol edilir toprağa yeni mikroorganizmalar aktararak veya mikroorganizmaların metabolik aktivitelerini ve büyümelerini optimize etmek için koşullar değiştirilir.

Bakteriler, zararlı atıkları, zararsız yan ürünlere dönüştürdükten sonra ortamda yeterli miktarda besin kalmadığından ya ölürlere ya da sayıları normal popülasyon düzeyine gelir. Böylece ekolojik denge bozulmaz.

Bakterilere benzer bir biçimde, kirlenen bölgelerdeki metaller ve atıklarla beslenmesi için bitki ve mantarlar da kullanılabilir.

1.1.2. Türkiye’de biyoremediasyon

Türkiye gerek karadan gerekse denizden olmak üzere son yıllarda petrol taşımacılığında bir geçiş ülkesi konumuna gelmiş durumdadır. Özellikle, İstanbul ve Çanakkale Boğazlarındaki sıkışık petrol tanker trafiği başta olmak üzere, Bakü-Tiflis-Ceyhan Boru hattı ve diğerleri olası petrol ve petrol türevleri ile ilgili çevresel kirlenmeler açısından ülkemizin risk faktörünü epey yükseltmiştir. Bunun yanında; hızla gelişmekte olan sanayimizin yarattığı su ve karada meydana gelen ağır metal kirlenmeleri diğer bir acil çözüm bekleyen problemlerdendir. Biyoremediasyon olarak adlandırılan, bu kirliliğin temizlenmesinde bakteri, mantar ve bitkilerin kullanılmasına dayanan teknolojiler bu konuda en umut verici çözüm yollarındandır (Ceyhan, 2012).

Sonuç olarak biyoremediasyon, günümüzde büyük bir problem olan çevre kirliliği ve zehirli atıklara çare olabilir.

İnsanoğlunun çıplak gözle göremediği bu minik yaratıklar, çaresini bulamadığımız büyük problemlerimizi çözümlenebilirler. Bu nedenle her geçen gün önem kazanmakta ve insanoğluna fayda sağlamaktadırlar.

1.1.3. Biyosorpsiyon

Kimyasal maddelerin mikrobiyal kütle tarafından adsorpsiyonu veya kütlede birikimi biyosorpsiyon olarak ifade edilmektedir.

Biyosorpsiyon yönteminin avantajı ise bu yöntemin yerinde uygulanabilen bir yöntem olması, çok özel dizaynlar ve endüstriyel işlemler gerektirmemesi ve birçok sistemle ekonomik bir şekilde birleştirilebilmesidir.

Biyosorpsiyon kirlilik etkeni olan moleküllerin biyokütle ile pasif olarak hareketsizleştirilmesidir (Aslan vd., 2007).

1.1.4. Biyosorpsiyon kinetiği

Biyosorpsiyon olayının kinetiği iki basamaktan oluşur. Birinci basamak, organizma yüzeyinde gerçekleşen adsorpsiyondur. Bu basamak çok hızlıdır. Bu basamağa pasif giderim denir.

İkinci basamağa ise aktif giderim denir. Bu basamak; hücre zarından içeri taşınımını içeren, metabolik aktiviteye bağlı, daha yavaş, hücre içi giderim basamağıdır (Aslan vd., 2007).

1.1.5. Biyodegradasyon

Biyodegradasyon, yaşıyan mikrobiyal organizmalar tarafından organik bileşiklerin enzimler kullanılarak küçük parçalara ayrılması işlemidir.

Mikrobiyal organizmalar metabolik ya da enzimatik süreçlerle maddeleri dönüştürürler. Bakteri, mantar, alg ve bitki gibi organizmaların çeşitli bileşikleri parçalayarak mineralize etme işlemidir. Bu mekanizma doğal mikroorganizma popülasyonları tarafından gerçekleştirilen biyolojik parçalanma olarak tanımlanır.

Sıcaklık, pH, su, besin miktarı ve biyolojik olarak parçalanacak kimyasalın sudaki çözünürlüğü, kimyasala bağlı yan gruplar, molekül büyüklüğü, toksisitesi gibi fizikokimyasal parametreler biyodegradasyonu etkileyen en önemli parametrelerdir.

Biyodegradasyon, kimyasalın hücre dışında parçalanması veya hücre içine metabolize edilmesi şeklinde olmaktadır (Bilgin, 2003).

1.2. Basidiomycota (basidiomisetler = basidiumlu mantarlar)

Funguslar doğada oldukça yaygın olarak bulunurlar. Yaklaşık 400,000 çeşitten oluşan, oldukça gelişmiş hücresel yapıya sahip ökaryotik canlılardır (Murray, 1990).

Basidiomycota da mantarların ikinci büyük grubudur. Sınıfın ismi, hiflerin uçlarında farklılaşarak oluşan bazidyum yapılarından gelir (Öner, 2004).

Bu sınıf fungusların en gelişmiş türlerini içerir. Sınıf içinde şapkallı mantarlar, kurt mantarları, raf mantarları, yer yıldızları, pafboller, kuş yuvaları (Bkz. Şekil 1.3.) gibi birçok yüksek formlu mantarların yanında *Uredinalis* ve *Ustinaginales* gibi yapıları yukarıda bahsedilenlerden oldukça ilkel yapıda funguslarda girer. Bunun sebebi tüm basidiumlu mantarların bu sınıf altında toplanmasıdır (Öner, 2004).

Bu sınıf üyelerinin esas tipik sporları olan basidiosporlar plazmogami, karyogami ve meiosis sonucu oluşurlar (Öner, 2004).

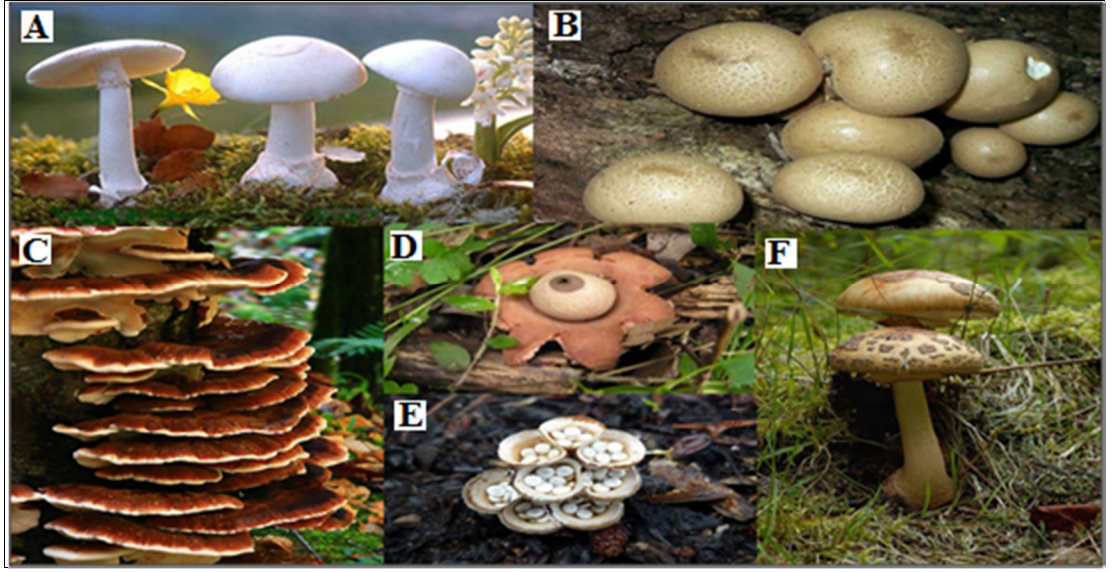
Bazidyumlar, temel olarak 3 tiptir:

1. *Holobazidyum*: Bir hücrelidir ve çeşitli şekillerde olabilir. Basidiumları bölmesizdir (Aysel vd., 2006).
2. *Fragmobazidyum*: Bir ya da daha fazla sayıda, enine ya da boyuna bölme taşır. Basidiumları bölmelidir (Aysel vd., 2006).
3. *Teliobazidyum*: Sıklıkla kalın duvarlı, dinlenme halindeki spordan ve bu spordan oluşan geçici çimlenme tütünden oluşur (Öner, 2004).

Yaklaşık 12.000 tür içeren Basidiomisetler sınıfı, tüm mantarların % 20'sini oluşturmaktadır. Saprotik ya da parazitlerdir. Bazı türleri ise bitkilerde hastalık oluşturmaktadır (Aysel vd., 2006).

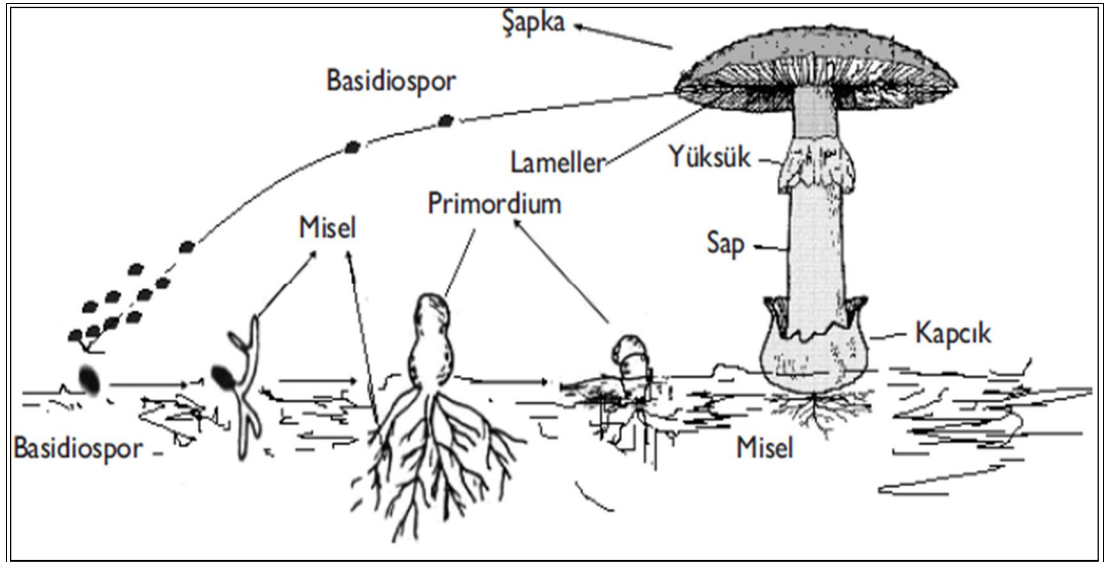
Grubun en önemli ortak özelliği, yaşam döngülerinde, hücrelerin iki çekirdek taşıdığı bir evre görülmesidir. Bir diğer ortak özellikleri de, hücre duvarlarının çift tabakalı olmasıdır.

Sınıf üyelerinin çoğu çürükçül canlılardır. Bir kısmı bitkilerle simbiyoz ilişkisi kurarak, bir kısmı da patojen olarak yaşamaktadır (Öner, 2004).



Şekil 1.3. Bazı basidiomisetler; A) Şapkali mantarlar, B) Pafboller, C) Raf mantarları, D) Yer yıldızı mantarları, E) Kuş yuvası mantarları, F) Kurt mantarları

1.2.1. Basidiomisetlerde genel yaşam devresi



Şekil 1.4. Şapkali mantarlar da üreme (Özata vd., 2009)

Basidiomisetler eşeysiz olarak geliştiğinde basit bir haploid misel yapısındadır (Bkz. Şekil 1.4.). Eşeyli olarak geliştiğinde ise bilinen şapkali mantarı meydana getirmektedir (Kıvanç ve Güven, 2009).

Özel eşey organları olmamasına rağmen hemen hemen hepsi eşeyli çoğalırlar. Birleşme, basit hif hücreleri arasında, iki özel hücre arasında veya özel sperm benzeri yapılarla alıcı hifler arasında olur. Bazı türler heterotalliktir. Yani dişi ve erkek olarak farklı hifler birleşir. Bazıları ise homotalliktir. Yani herhangi iki hifin iki hücresi hatta aynı hifin iki hücresi birleşir. Her iki tipte de birleşmeden önce vejetatif misel hücreleri tek çekirdeklidir.

Birleşmeden sonra oluşan hücre 2 haploid çekirdeklidir ($n+n$). Her hücredeki bu 2 çekirdek mayoz'a kadar birleşmez. İki çekirdeğin birleşmesi ve sonuçta mayoz, basidium denilen özel hücrelerde olur. Bu basidiumlarda meydana gelen meiosporlara basidiospor denir.

Basidiumlar ya çubuk şeklinde tek bir hücre veya kısa iplikli tek bir hücre ya da kısa bir 4 hücreli iplik şeklindedir. Çubuk şeklindeki basidiumlar şapkaklı mantarlarda özel spor taşıyan yapılarda bulunur. Bu tip basidium *homobasidiomycetidae* alt sınıfını oluşturur. Her iki tipte de basidiosporlar basidiumlara sterigma denilen kısa bir sapla bağlanmıştır (Özata vd., 2009).

1.2.2. Odunun yapısı

Ağaç (odun), yapısında selüloz, hemiselüloz ve hidrosifenil-propan alt birimlerinden oluşan kompleks bir polimer olan ligninden oluşan uzun ve ince fiberlerin yığılması olarak tanımlanabilir (Sernek vd., 2008).

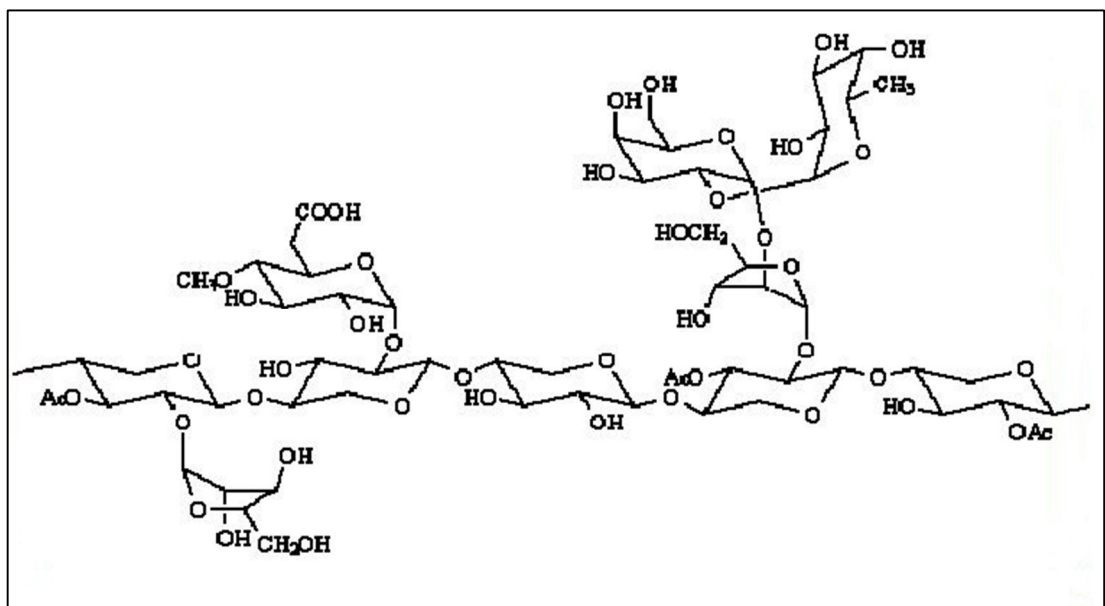
Odun bileşenleri içerisinde lignin ısıya en iyi karşı koyabilendir. Sıcaklık ancak 200 °C'yi aştığı zaman lignin kütlesinde azalma ve β -aril-eter bağları kırılmaya başlar. Yüksek sıcaklıklarda ligninin metoksi içeriği azalır ve yoğunlaşmamış ünitelerinden bazıları difenilmetan tipi ünitelere dönüşür (Sernek vd., 2008).

Defenilmetan tipi yoğunlaşma 120-220 °C aralığında tipik bir reaksiyon olup renk, reaktivlik ve çözünme gibi lignin özellikleri üzerine önemli bir etkiye sahiptir.

Isıl işlem suresince lignin bozunmaya aynı zamanda kondenzasyon veya polimerizasyon reaksiyonlarına uğramaktadır. Lignin ve hemiselüloz arasındaki kovalent bağlar (atomlar arasında veya atomlar ile diğer kovalent bağlar arasında elektron çiftlerinin paylaşılması) kırılır ve yüksek reaktivlikle düşük molekül ağırlığında lignin parçaları üretilir (Sernek vd., 2008).

Odun hemiselülozları, odunun tam kuru ağırlığının %20-30'unu oluşturur ve öncelikle D-glikoz, D-galaktoz ve D-mannoz gibi 6 karbonlu (heksoz) ve L-arabinoz ve D-ksiloz gibi 5 karbonlu (pentoz) halka şeklindeki çeşitli basit şeker ünitelerinden oluşan dallanmış amorf polimerlerdir.

Orta lamelde %27, sekonder hücre çeperinin S1 tabakasında %35 ve S2 tabakasında yaklaşık %15 oranında bulunur. İğne yapraklı ağaçlarda %20 galaktoglukomannan ve %5-10 arabinoglukoronoksilan ve yapraklı ağaçlarda %15-30 glukoronoksilan ve %2-5 glukomannan ana hemiselülozları oluşturur. İğne yapraklı ağaçlarda basınç odununda yaklaşık %10 oranında galaktan vardır. Ksilanlar glukomannanlardan farklı olarak asidik gruplar (glukuronik asid içerir ve moleküler yapısı selüloza benzerdir (Sjostrom, 1993).



Şekil 1.5. Hemiselülozun molekül yapısı (Gürten, 2008).

Yaklaşık olarak odun ağırlığının %45'ini oluşturan selüloz, odunun temel yapısı olan hücre duvarını kararlı yapar. Bu $\beta(1\rightarrow4)$ glikozit bağla bağlı sellobiyoz birimlerinin lineer bir polimeridir (Kirk ve Cullen, 1998).

Selüloz moleküllerini, Van Der Waals kuvvetleri ve hidrojen bağları bir arada tutar. Bu etkileşim sonucu doğal selülozik yapıda; selüloz zinciri mikrofibrilleri olarak bilinen demetler halinde sıralanıp her mikrofibril yaklaşık 40 ayrı selüloz zinciri içerir (Kirk ve Cullen, 1998).

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

1.2.3. Fungusların adaptasyon özelliği

Fungus ve bakteri gibi mikrobiyolojik materyaller ile boyarmaddelerin uzaklaştırıldığı bildirilmiştir. Ancak, boyarmadde atık sularının biyolojik iyileştirilmesinde bakterilerinin kullanımı ana bileşikten daha toksik olan aromatik aminlerin oluşturulması ile sonuçlanabilir. Bununla birlikte, bakteriler funguslara kıyasla daha zayıf adaptasyon özelliği göstermektedirler. Dolayısıyla boyarmadde biyosorpsiyonunda bakteriler sınırlı kullanım alanına sahiptir. Biyokütle olarak kullanım potansiyeli olan makrofunguslar, kolay bulunabilir, ekonomik, asidik ve bazik koşullarda kimyasal stabiliteye sahip ve kurutulduğunda sert bir yapı gösterdiği için biyosorpsiyon çalışmalarında tercih sebebi olmaktadır. Sentetik boyarmadde içeren atık suların iyileştirilmesinde en etkili mikroorganizma gruplarından biri de beyaz çürükçül funguslardır. Bu funguslar basidiomisetlerin çok geniş bir ekofizyolojik grubunu oluşturmaktadır.

1.2.4. Beyaz çürükçül funguslar

Ağaçta beyaz çürümeye neden olan, basidiomiset fungusları doğadaki en verimli lignin parçalayıcı ve muhtemelen doğadaki lignin içeren dokuların karbon döngülerini sağlayan birincil ajanlardır (Kirk ve Farrell, 1987; Erikson vd., 1990).

Basidiomiset ve askomisetler, odunda beyaz çürükçüllüğün başlıca nedenidir. Beyaz çürükçüllüğe sebep olan türler kahverengi çürükçüllüğe neden olanlardan çok daha fazladır. Bu türler genelde basidiomisetler içinde yer almaktadır. Beyaz çürükçül funguslar hem lignini hem de selülozu parçalamaktadır. Bu funguslar, kahverengi çürükçüllerin bıraktığı toz gibi kahverengi lekelerden tamamen farklı olarak beyaz ve daha çok lifli kalıntılar bırakır (Michael vd., 2001).

Fakat bazıları önce lignini uzaklaştırır sonra selüloza atak yapar bu da seçici delignifikasyon olarak tanımlanır (Michael vd., 2001).

Beyaz çürükçül mantarların kullanabildiği en kolay karbon kaynağı glikozdur. Mantar ile yapılan renk giderim çalışmalarında kullanılan glikoz derişimi ise genellikle 1-5 g/L'dir (Kapdan ve Kargi, 2001; Zhang vd., 1999). Basidiomisetler sınıfına ait olan beyaz çürükçül mantarların sentezledikleri lakkaz, Mn-peroksidaz, lignin peroksidaz ve NADH peroksidaz (NADH oksidaz) ekstrasellüler enzimleri biyoteknolojik çalışmalarda yoğun olarak kullanılmaktadır (Wesenberg vd., 2002).

Ralp ve ark., birçok beyaz çürükçül mantarın linyit kömürlerini oksidatif enzimleri yardımıyla çözebildikleri ve lignin mineralizasyonunu kolaylaştıran ortamda, düşük kaliteli kömürlerin depolimerizasyonu ve dekolarizasyonu gerçekleştirebildikleri belirlenmiştir (Ralp vd., 1996). Stolz atık su arıtımında beyaz çürükçül fungusların kullanımı ile ilgili olarak aşağıdaki tespitleri yapmıştır (Stolz, 2001).

Atık su arıtım tesisleri beyaz çürükçül mantarların doğal habitatu değildir ve bu nedenle bu fungusları bir atık su arıtım sisteminde geliştirebilmek için oldukça dikkatli olunmalıdır (Stolz, 2001).

Beyaz çürükçül mantarlar lignolitik enzimlerini çoğunlukla sadece karbon ve /veya azot kaynağı sınırlayıcı hale geldiğinde salgırlar (Stolz, 2001).

Enzimler tarafından parçalanan lignin veya polutantlardan herhangi birinin karbon veya enerji kaynağı olarak kullanıldığı gösterilememiştir ve bu organizmaların kùltivasyonu için farklı bir karbon kaynağı gereklidir (Stolz, 2001).

Gözlenen degradasyon hızları genellikle düşüktür. Tipik deneylerde 50- 150 mg/L boya 5-10 gün içinde dekolarize edilmektedir (Stolz, 2001).

Aromatik ve ksenobiyotik bileşiklerin oksidasyonu için lignin peroksidaz oldukça unspezifiktir. Bu nedenle endüstriyel atık arıtım sistemlerindeki gibi kompleks substrat karışımları ve diğer substratlar lignin peroksidazlar tarafından okside edilebilir (Kapdan ve Kargi, 2001).

Lignin peroksidazlar için optimum pH 4.5-5 'dir. Bu nedenle atık su arıtım sisteminde nispeten asidik bir pH'ya ihtiyaç vardır ki bu da diğer bazı yararlı mikroorganizmaların gelişimini inhibe etmektedir (Stolz, 2001).

Pleurotus türleri, beyaz çürükçül mantarlar içerisinde katı lignoselülozik artıkları en etkili şekilde ayrıştıran türlerdir. Bu yüzden, birçok tarımsal ve endüstriyel artık, *Pleurotus* türlerinin üretimi için substrat olarak kullanılabilir (Zadrazil ve Brunnert, 1981; Platt vd., 1984).

1.2.5. Beyaz çürükçül funguslarla gerçekleştirilen arıtım yöntemi

Bugüne kadar boyar maddelerinin biyolojik ayrışması ile ilgili yapılan bilimsel araştırmalarda, en yaygın olarak kullanılanı saf mikroorganizma kültürleri beyaz çürükçül mantarlardır.

Bu organizma grubu, kompleks polimerik yapıya sahip olan bitki materyali olan ligninin ayrışmasında önemli rol oynadığından dolayı küresel karbon döngüsünün merkezinde yer almaktadır.

Beyaz çürükçül mantarlar, ligninin yanı sıra, zor biyolojik ayrışmaya uğrayan geniş bir spektruma sahip organik kirleticilerin biyolojik ayrışmasında da rol oynarlar. Bu mikroorganizmalar, spesifik olmayan polifenol oksidaz (PPO), lignin peroksidaz (LiP), mangan peroksidaz (MnP) ve lakkaz enzimleri yardımıyla bu geniş spektruma sahip organik kirleticileri biyolojik olarak ayrıştırırlar.

1.2.6. Beyaz çürükçül fungusların salgıladığı lignolitik enzimler

Ligninolitik funguslar ağaçların köklerinde beyazlığa sebep olarak doğada yıkımı güç olan birçok bileşiği substrat özgünlüğü geniş olan enzimlerle parçalayabilmektedirler (Pointing, 2001).

Bu yıkımı güç (recalcitrant) bileşiklerden böcek zehirleri (pestisit), polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), poliklorlubifeniller (PCB), organoklorlar, sentetik boyalar, cephane atıkları, sentetik polimerler gibi birçoğu büyük çevre kirliliklerine sebep olurlar (Pointing, 2001).

Beyaz çürükçül mantarların, ligninolitik enzimlerin düşük pH değerlerinde (pH= 4.5-5.0) aktif olması ve atık sularda bulunma ihtimali düşük olan tiamin ile veratril alkol maddelerine ihtiyaç duyması gibi dezavantajları vardır (Kapdan ve Kargı, 2000).

Beyaz çürükçül funguslar lignin, aromatik bileşikler ve tekstil boya gibi mikrobiyal ataklara karşı dayanıklı bileşikler salgıladıkları spesifik olmayan ekstraselüler enzimlerle oksitleyebilirler (Cripps vd., 1990).

Genellikle parçalanmaya dayanıklı (rekalsitran), çözünmez kimyasallar bu funguslarla mineralize edilirler. Bu funguslar oksitlenmiş bazı kimyasalları da mineralize edebilir. Bu fungusların lignini parçalama yeteneğinin, bu fungusların lignini parçalama yeteneği ile bağlantılı olduğu düşünülür (Tien ve Kirk, 1983; Tien ve Kirk, 1984).

Ancak, saf oksidatif peroksidaza dayalı sistem lignini bütünüyle yıkmada kullanılamaz (Crawford, 1981).

Lignin yüksek derecede okside olduğundan daha ileri oksidasyonu zordur. Lignin sterokimyasal düzen içermeyen heteropolimer bir komplekstir (Crawford, 1981).

Pleurotus türleri en etkili ligninolitik aktiviteye sahip beyaz çürükçül mantarlar grubu içerisinde. İçerisinde tarımsal artıkların da yer aldığı geniş bir substrat grubunu kullanabilirler (Ardon vd., 1998).

Pleurotus türlerinin lignoselülozları parçaladıkları ve kolayca kolonize oldukları belirlenmiştir (Ardon vd., 1998).

Pleurotus türleri tarımsal artıkların lignoselüloz kısımlarını ve organik çevre kirletici maddeleri ksilanaz, endoglukonaz, β -glukosidaz, laminarinaz, lakkaz ve polifenol oksidaz gibi enzimlerini kullanarak parçalayabildikleri bildirilmiştir (Ardon vd., 1998).

Beyaz çürükçül mantarların ve bu mantarlardan saflaştırılan enzimlerin kullanıldığı biyoteknolojik çalışmalara pek çok örnek vermek mümkündür.

Bunlar arasında;

- a) Boyar maddelerin ve tekstil fabrikası atık sularının renginin gideriminde kullanımı (Nyanhango vd., 2002; Swami ve Ramsay, 1999).
- b) Ağır metallerin biyolojik adsorpsiyonunda kullanımı (Dhawale vd., 1996; Gabriel vd., 1996).
- c) Mikrobiyal protein kaynağı olarak kullanımı (Yeşilada ve Bozcuk, 1990).
- d) Enzim üretiminde kullanımı (Cardoso ve Nicoli, 1981).
- e) Kâğıt ve kâğıt hamuru üreten endüstrilerde ligninin parçalanmasında kullanımı (Rogalski vd., 1991).
- f) Kâğıt, tekstil ve petrokimya endüstrilerinden alıcı ortama bırakılan endüstriyel atıkların toksisitesinin azaltılmasında kullanımı (Kuhad vd., 1997).
- g) Zeytinyağı fabrikası atık suyunun arıtımında ve renginin giderimin de kullanımı (Couto ve Herrera, 2006; Jaouani vd., 2006).
- h) Hormon üretiminde kullanımı (Jaouani vd., 2006)
- i) Pestisid ve herbisidlerin biyolojik yıkımında kullanımı (Duran ve Esposito, 2000).
- j) Anti-kanser ilaçlarının üretiminde katalizör olarak kullanımı (Kuhad vd., 1997).
- k) Son zamanlarda kozmetik ve dermatolojik ürünlerin hazırlanmasında kullanımı (Golz-Berner vd., 2004).

l) Nanobiyoteknoloji alanında biosensor olarak kullanımı (Haghighi vd., 2003).

1.2.7. *Pleurotus ostreatus* ve boyar madde

Günümüzde boyar maddelerin giderimleri çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemler arasında en kullanışlı ve ekonomik olanı ise biyolojik sistemlerdir. Bugüne kadar arıtım amacı için kullanılan mikroorganizma grubu içerisinde algler de dâhil olmak üzere çeşitli bakteri, maya, mantar türleri bulunmaktadır. Mantarlardan özellikle *Pleurotus* türleri bu tip çalışmalarda sıkça kullanılmaktadır.

Son yıllarda fungusların tekstil boyalarını biyosorpsiyon ile uzaklaştırdığı ve dekolorizasyon (renk giderme) çalışmalarında kullanılacağı üzerine birçok çalışma bulunmaktadır.

Bir hücrenin biyodegradasyon yapabilmesi için yaşayan bir hücre olması gerekir. Çünkü yaşayan organizmalar, polifenol oksidaz (PPO), lakkaz, mangan peroksidaz (MnP) ve lignin peroksidaz (LiP) gibi lignin modifiye enzimleri lignini ve boyar maddeyi mineralize edebilmek için sentezleyebilirler.

Literatür taramaları, bu enzimlerin dekolorizasyona katılımının türler arasında farklı olabileceğini göstermektedir.

Pasti-Grigsby ve ark. (1992) *Phanerochaete chrysosporium* boyar maddenin dekolorizasyonundan sorumlu enzimin lignin peroksidaz olduğunu bildirmiştir.

Ollikka ve ark.'ları ise (1993) azo bayalarının, trifenilmetanın, heterosiklik ve polimerik boyaların dekolorizasyonunda lignin peroksidazın temel rolü oynadığı ancak bu boyaların degradasyonunun başlamasında mangan peroksidaza gereksinim duyulmadığını bildirmişlerdir (Young ve Yu, 1997).

Dekolorizasyon türler arasında farklı olabileceğinden bizim çalıştığımız *Pleurotus ostreatus* türünde de lignin peroksidaz, mangan peroksidaz, polifenol oksidaz ve lakkaz'ın biyosorbsiyon ve biyodegradasyon ölçümlerini yaptık ve lakkaz enziminin rol aldığını belirledik.

1.2.8. *Pleurotus ostreatus*

1.2.8.1. Sistematığı

Pleurotus mantarları, 'oyster mushroom' (istiridye mantarı) veya 'hiratake' olarak adlandırılır. Latince 'Pleurotus', kulak arkası, 'ostreatus' ise istiridye şeklinde olan demektir (Cohen vd., 2002). *Pleurotus* türleri, botanik sınıflandırmada Hymenomycetes sınıfının, Agaricales takımı, Tricholomataceae familyası ve *Pleurotus* cinsine dahildirler (Alexopoulos vd., 1996).



Şekil 1.6. *Pleurotus ostreatus*

1.2.8.2. Morfolojisi

1.2.8.2.1. Pileus

Baş kısım 5-25 cm genişliğinde yelpaze şeklinde, geniş ölçüde dışbükey bazen olgunluk evresinde neredeyse düzdür; özellikle genç iken kenarlar kulak memesi gibi yuvarlak olup dalgalıdır; yüzey pürüzsüz, beyazdan gri kahveye dönük; et beyaz renkli ve anason kokuludur (Champ, 1872).

1.2.8.2.2. Lameller

Gills içe kıvrımlı olarak sapa bağlanır, beyaz renkli olup yaşlanınca sarımsı renk alır ve zar yoktur (Champ, 1872).

1.2.8.2.3. Sap

Genelde bir sap yoktur. Olduğu zaman ise kısa ve kalın olup. 5-3.0 cm uzunluğunda, 0.5-2.0 cm kalınlığındadır, dik ya da yan olarak bulunan sap dibinde tüyler yoğunluktadır ve beyaz renklidir (Champ, 1872).

1.2.8.2.4. Sporlar

Sporlar 7,5-9 x 3,5-4,5 μm , pürüzsüz, elips şeklinde, amiloitsizdir. Spor baskısı beyaz renklidir (Champ, 1872).

1.2.9. Habitatı

Birçok özellikten dolayı, *Pleurotus* dünyanın değişik ülkelerindeki araştırmacılar tarafından çalışılmıştır.

Yüksek gastronomik değerleri, çok değişik lignoselülozik atıklar üzerinde kolonize olabilmeye ve yüksek oranda biyolojik parçalama kabiliyetleri, diğer mantar türleri ile karşılaştırıldığında yetiştirme sürelerinin kısalığı, çevresel koşullara karşı yüksek tolerans özellikleri, yenilen kısmın olan bazidiokarplarının diğer mantar türlerine göre hastalıklara karşı daha dayanıklı olması yanında, kolay ve ucuz bir yolla kültürünün yapılabilmesi, bu türleri değerli kılan sebepler olarak belirtilmiştir (Jwanny vd., 1995; Patrabansh ve Madan, 1997).



Şekil 1.7. *Pleurotus ostreatus*

Ülkemiz florasında da bulunan ve halk arasında kavak, kayın, dil, kulak, melek mantarı vb. yöresel isimlerle anılan *Pleurotus* türleri dünyanın hemen hemen bütün ılıman iklim bölgelerinde; kavak, kayın, meşe, karaağaç, akçaağaç, ıhlamur, söğüt, ceviz ve kestane gibi birçok ağaç türünün çürümüş gövdelerinde yabani olarak kendiliğinden yetişmektedir (Ağaoğlu ve Güler, 1991).

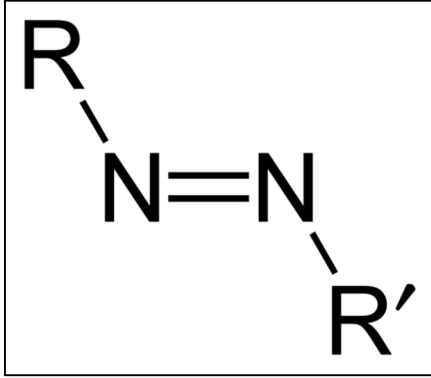
Genellikle geniş yapraklı, karışık ve konifer ormanlardaki ağaçların kütük ve ölü kalıntıları üzerinde yetişir (Breitenbach ve Kränzlin, 1984 - 2005; Jordan, 1995). Ülkemizde Akdeniz bölgesinde, *Morus*, *Populus* ve *Salix* üzerinde tespit edilmiştir (Işıloğlu ve Watling 1992).

1.2.10. Yetiştirme yeri ve zamanı (doğal ortamı)

Üst üste ya da kümeler halinde kütük ve sert tahtalı ağaçların kütüklerinin üzerinde görülürler, kozalaklı ağaçlarda rastlanmazlar, bahar başından kış ortasına kadar meyve verirler. *Pleurotus ostreatus* yaz boyunca uzun kıyılarda görülen “fog floa” ailesi üyesidir. Bazı insanların alerjisi olmasına rağmen, yenilebilir ve çok popülerdir (Champ, 1872).

1.3. Tekstil Boyaları

1.3.1. Azo boyalar



Boyalar tekstil, gıda ve diğer birçok endüstriyel ürünlere besin renk vermek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Ticari olarak kullanılan sentetik boyaların büyük bir kısmını toksik, karsinojenik ve mutajenik özelliklere sahip olan azo boyalar oluşturmaktadır (Seesuriyachana vd., 2007).

Şekil 1.8. Azo boyaları

Sentetik boyalar tekstil, boya, kâğıt ve baskı endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Günümüzde 100.000'in üzerinde sentetik boya ticari olarak kullanılmakta ve yılda 700.000 ton boya üretimi yapılmaktadır (Kapdan ve Kargı, 2000).

Son zamanlarda tekstil atık sularının renk gideriminde anaerobik ve aerobik sistemlerin beraber kullanılması üzerine çalışmalar yoğunlaşmaktadır. Aerobik prosesler tek başına azo boyalarının parçalanması için yetersizdir (Kuai vd., 1998).

Azo boyalarının parçalanmasında ilk basamağı boyaya rengini veren elektrofilik azo bağının indirgen koşulların sağlandığı anaerobik ortamda kırılması ve renksiz hale gelmesidir. Anaerobik koşullarda azo boyalarının parçalanması ile aromatik aminlere kolaylıkla parçalanabilmektedir. Ancak oluşan bu aromatik aminler genellikle anaerobik koşullarda daha ileri parçalanmaya dirençlidir (Kuai vd., 1998). Oluşan bu aromatik aminlerin aerobik kademede giderimi ile boyar maddelerin anaerobik/aerobik proseslerle mineralizasyonu gerçekleştirilmiştir (Zaoyan vd., 1992; An vd., 1996).

Günümüzde tekstil ürünleri, deri, plastikler, kozmetik ürünleri ve gıda maddeleri gibi çeşitli materyalleri boyamak amacıyla kullanılan 2000 kadar farklı azo boya bulunmaktadır (Zollinger, 1991). Dünya çapında pamuk kullanımının artmasının bir sonucu olarak reaktif azo boyaların kullanımı da artmıştır. Azo reaktif boyalar en fazla renk ve yapı çeşitliliğine sahip olan sentetik boya grubudur (Sumathi ve Manju, 2000).

Genel bir sınıflandırma yapmak gerekirse boyar maddeler üç grupta incelenebilir (Fu ve Viraraghavan, 2002).

1. Katyonik boyar maddeler: Bazik boyar maddeler
2. Anyonik boyar maddeler: Direkt, asit ve reaktif boyar maddeler
3. İyonik olmayan boyar maddeler: Dispers boyar maddeler

Bu boyar madde çeşitleri ve uygulama tipleri göz önünde tutulacak olunursa, en çok kullanılan boyar maddeler azo-reaktif boyar maddelerdir. Kullanılan bu boyar maddelerin %15'i yıkama gibi işlemler sonrasında çevreye karışmaktadır (Carliell vd., 1995; Philips, 1996; Swamy, 1998). Organik boyar maddelerin en önemli sınıfını oluşturan azo boyar maddelerinin sayısı oldukça fazladır (Cebecioğlu, 2010; Başer ve İnanıcı, 1990).

Küpe ve kükürt boyar maddeleri dışında, diğer tüm boyama yöntemlerinde kullanılan boyar maddelerin yapısında azo grubu bulunur (Başer ve İnanıcı, 1990).

Bunlar, yapılarındaki kromofor grup olan azo (-N=N-) grubu ile karakterize edilir (Başer ve İnanıcı, 1990). Doğal boyar maddelerin hiç birinde azo grubuyla karşılaşmaz. Bu sınıf boyar maddelerin hepsi sentetik olarak elde edilirler. Sentezlerinin sulu çözelti içinde ve basit olarak gerçekleştirilmesi ve başlangıç maddelerinin sınırsız olarak değiştirilebilmesi çok sayıda azo boyar maddesinin elde edilmesine olanak sağlamaktadır (Başer ve İnanıcı, 1990; Taner, 2006).

Azo grubu içerdiği bilinen tek bir doğal ürün, 4,4'- dehidroksiazobenzen mevcuttur (Pagga ve Brown, 1986).

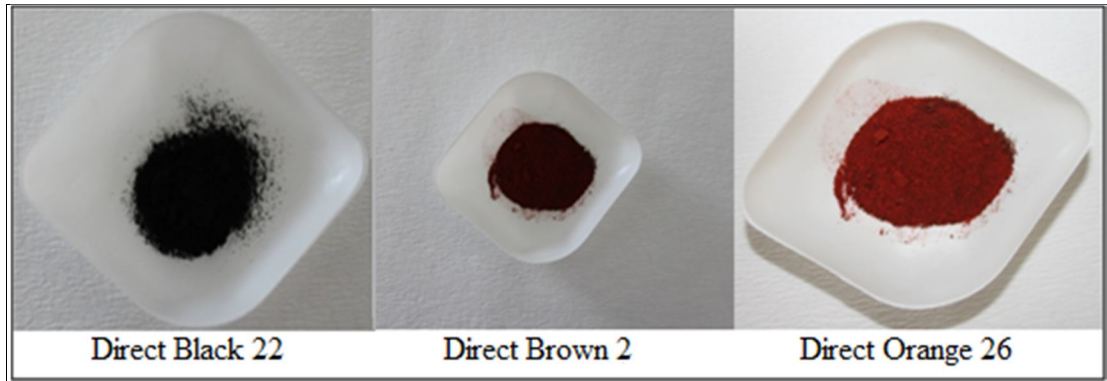
Endüstriyel olarak üretilen azo boyaların tümü ksenobiyotik bileşiklerdir. Dolayısıyla bu boyaların geleneksel aerobik kanalizasyon arıtım tesislerinde biyolojik parçalanmaya karşı çoğunlukla direnç göstermeleri şaşırtıcı değildir (Pagga ve Brown, 1986).

Reaktif boyar maddeler uygun koşullar altında lif ile kimyasal reaksiyona girerek, kovalent bağ özelliğine sahip tek boyar madde sınıfıdır. Küçük ve basit molekül yapısına sahiptirler. Molekül ağırlıkları genellikle 69-221 g/mol'dür. Küçük partikül özelliği life hızlı bir şekilde nüfuz etmelerini sağlar. Reaktif boyar maddeler suda kolay çözünürler. Selülozun (-OH), poliamidin (NH₂), protein esaslı liflerin (NH₂) ve SH (merkaptan) grupları ile gerçek kovalent bağlar oluşturarak liflere bağlanırlar. Reaktif grup molekülün renkli kısmına bağlıdır.

Selülozik elyafın boyanmasında kullanılan, son yıllarda geliştirilen, bu boyar maddeler yün, ipek, orlon, akrilik karışımları ve poliamid boyanmasında da kullanılırlar (Başer ve İnanıcı, 1990).

Tablo 1.1. Kullanılan azo boyaların özellikleri

Boyanın Adı	Absorbans Değeri (nm)	Moleküler Ağırlığı (g/mol)
Direct Black 22	496	1083,97
Direct Brown 2	541	760,108
Direct Orange 26	494	756,67

**Şekil 1.9** Azo boyalar

1.4. Enzimler

1.4.1. Ligninin yapısı ve özellikleri

Lignin biyosferdeki enerji akışlarının önemli bir maddesidir. Güneş enerjisi bitkilerdeki diğer herhangi fonksiyonel gruplardan daha fazla lignin de depolanır (şayet selüloz ve hemiselüloz ayrı bileşikler olarak göz önüne alınırsa). Buna rağmen, lignin (genel olarak fenolikler) biyolojik sistemlerdeki biyokütle ve enerji akışlarının tartışmalarında sık sık ihmal edilir.

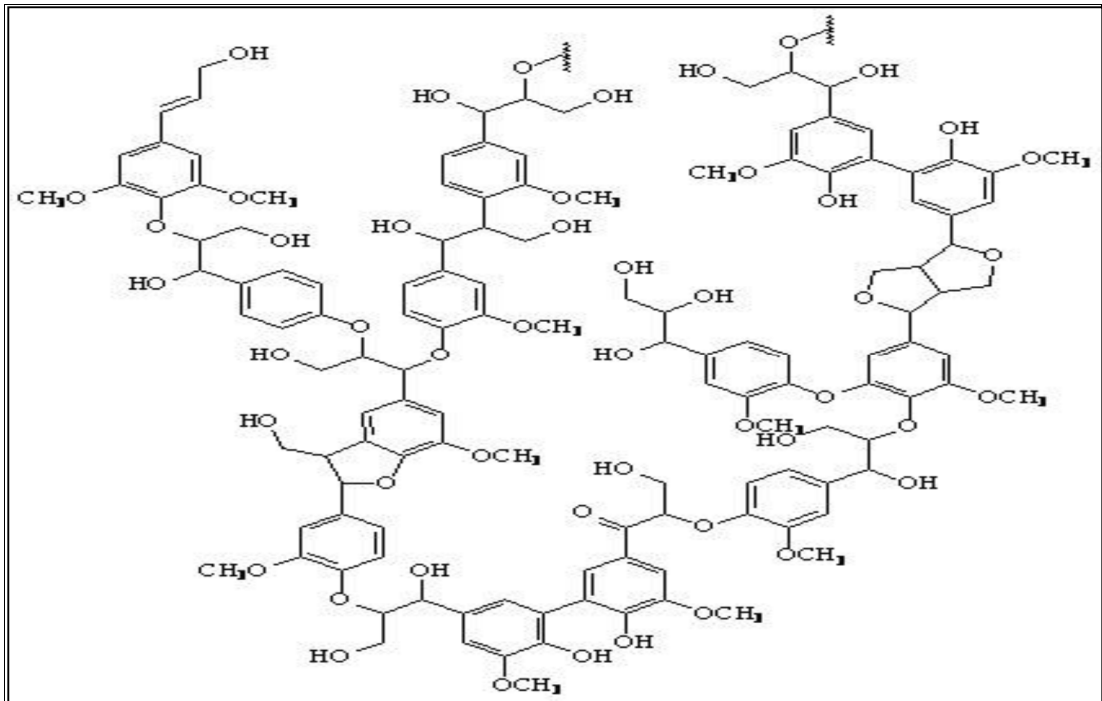
Güneş enerjisinin depolanması için bitki sistemlerindeki ana bir bileşik olmayı tamamlayan lignin, odunda kompozit bir materyal bileşiği olarak önemli bir rol oynar. Daha önemlisi, lignin ağaca uygulanan kuvvetlerin kontrolünde de değişik fonksiyonlara sahiptir (Sarkanen ve Ludwig, 1971).

Lignin konfigürasyonunda geniş bir değişim ile üç boyutlu aromatik amorf bir polimer olup hücre çeperinin en hidrofobik bileşenidir. Karbonhidratların etrafında ve üzerin de kabuk bağlama birimi olarak görülür.

Odunda lignin miktarı %20-40'tır. Lignin fenolik bir bileşik olup lignin biyosentezinin ilk basamağı olarak hidroksil (–OH) ve metoksi (OCH₃) ikame eden para-kumaril alkol, koniferilalkol ve sinapil alkol gibi fenil propan unite tipleri farklı olarak bağlanmış asimetrik yapı olarak düşünülebilir.

Siringil uniteleri C₃ ve C₅'te 2 adet metoksi grubuna, guayesil uniteleri C₃'te 1 adet metoksi grubuna ve p-hidroksifenil ünitelerinde ise metoksi grubuna rastlanmaz.

Aromatik halkaya bağlı serbest fenolik grup her uç fenil propan tipinde de C₄'te bulunur. Serbest fenolik gruplarının mevcudiyeti lignin bozunma oranını açık olarak desteklemektedir. İğne yapraklı lignininde fenil propan ünitesinin %10-30'u ve yapraklı ağaçlarda %9-15'i fenolik (–OH) grup içermektedir (Sjostrom, 1993).



Şekil 1.10. Ligninin genel yapısı (Palonen, 2004)

Kükürtlü ve kükürtsüz olmak üzere iki temel lignin yapısı vardır. Bugüne kadar ticari olarak kullanılan ligninler, kükürt içeren ligninlerdir. Bunlar lignosülfonatlar ve kraft ligninidir. Kükürt içermeyen ligninlerin henüz ticari değeri yoktur. Lignin ve lignin kaynaklı ürünler, toprakların oluşumunda ve hayvan besiciliğinde önemli rol oynar.

Lignin içerdiği hidrofilik ve hidrofobik gruplarından ötürü gıda ve kozmetik sektöründe jelleşmede veya emülgator ve dispergatörlerin özelliklerinin iyileştirilmesinde kullanılır. Uygun maliyetinden ötürü doğal ve yenilenebilir hammadde olarak, günümüzde petrokimyasal maddelerin yerine kullanılabilir. Ligninlerin antioksidan, antibakteriyal ve antiviral özelliklere de sahip olduğu belirtilmiştir (Bademkırın, 2011).

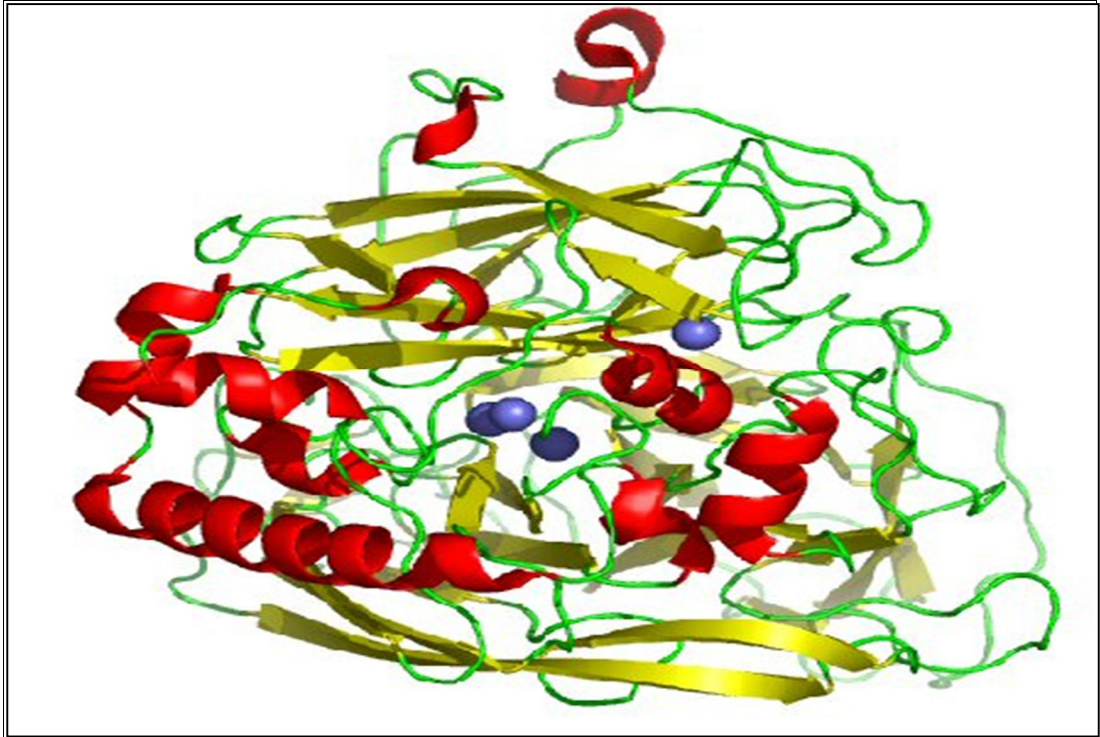
1.4.2. Lakkaz enzimi

1.4.2.1. Lakkazın biyokimyası

Lakkaz (EC 1.10.3.2, p-difenol:dioksijen oksidoredüktaz), oksidoredüktaz olup multinükleer bakır içeren mavi bakır oksidazlar sınıfına ait glikoprotein yapılı bir enzimdir (Jean-Claude vd., 1999).

Lakkaz enzimlerin indüksiyon mekanizmaları, fiziko-kimyasal özellikleri (örneğin, izoelektrik noktaları ve karbonhidrat içerikleri) ve biyokimyasal özellikleri değişse de lakkaz enzimlerinin bakır-bağlama bölgeleri (domainleri) sıkı bir şekilde korunmuştur (Paloheimo vd., 2004). Ortalama 60-80 kDa arasında moleküler ağırlığa sahiptir. Lakkaz enziminin önemi; lignin artıklarının sentezi ve biyodegradasyonunda rol oynamasından ileri gelmektedir. Bu nedenle üzerinde çalışılan önemli bir enzim grubudur. Lakkaz zararlı madde olan fenol türevlerini oksitleyerek endüstriyel kirli suların temizlenmesinde kullanılmaktadır. Lakkaz aynı zamanda organik sentezlerde de kullanılır, substrat olarak fenol ve aminlerin kullanılmasıyla, dimerler ve oligomerlerde reaksiyon ürünü, reaktif radikallere bağlanmasıyla oluşturulur (Ünal, 2005).

Lakkaz, fenolik ve metoksifenolik asitleri oksitleyebilir ve dekarboksilleyebilir. Ayrıca metoksi grubunu demetilasyon ya da oksidasyon ile modifiye edebilir. Bu reaksiyonlar ligninin polimere transformasyonu için önemli bir adımı oluşturur. Lignin sentezi ve degradasyonu doğadaki karbon döngüsünde önemli bir rol oynar. Ağaç yapısındaki ligninin iki görevi vardır. Yapısal sağlamlılığı sağlar, selüloz ve hemiselülozu mikrobiyal ataklara karşı korur. Bu yüzden ligninolitik enzimler, doğada önemli bir yere sahiptir. Ayrıca, lakkaz enzimi odunun doğasında bulunan trigliseridlerin parçalanmasını da başlatabilir. Ligninoselülotik sistem enzimleri bütünüyle ekstraselüler olmalarına rağmen, beyaz çürükçül funguslarda intraselüler lakkazların varlığı da kanıtlanmıştır. İntraselüler enzimler, beyaz çürükçül funguslarda fenolik bileşikler ile ilgili tepkimeleri katalizler (Ünal, 2005).



Şekil 1.11. Lakkaz enzimi (Stepanova, 2009)

1.4.2.2.Reaksiyon ve etki mekanizması

Lakkaz enziminin amino asit zinciri 520-550 amino asit arasında değişmektedir. Aynı türün farklı soylarının ürettiği lakkaz izoformlarının moleküler ağırlıklarının farklılık gösterdiği belirlenmiştir (Ünal, 2005).

2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), lakkaz tarafından katyon radikale oksitlenir. Katyon radikal oksitlenmesiyle oluşan mavi yeşil renk enzim aktivitesiyle doğru orantılıdır. Görünür bölgedeki bu renk yoğunluğu 415 ila 420 nm arasında spektrofotometrede okunur (Bourbonnais vd., 1997; Fışkın vd., 1989).

Lakkaz ve izole edilmiş enzimlerin aktivitesi fenolik substratların kullanıldığı ve renkli oksidasyon ürünlerinin absorbansının izlendiği otometrik testlerle ölçülmektedir.

En çok kullanılan testler guaiacol; 2,6-dimetoksifenol; elektron bakımında zengin, fenolik olmayan substrat ABTS 2,2'-azino-bis (3-etilbenzothiazoline-6-sülfonik asit) (Ünal, 2005).

Diğer yöntemlerle (fenolik substratlarla) kinonlar açığa çıkarken ABTS nin oksidasyon potansiyeli pH 2-11 arasında pH ya bağımlı değildir ve tek bir adımda renkli ürün olan $ABTS^+$ radikal katyonunun oluşması ile sonlanır (Ünal, 2005).

Lakkaz enzimleri spektroskopik olarak farklı olan 3 tip bakır iyonuna (Tip1, Tip2 ve Tip3) sahip olmaları nedeniyle bu enzimler, çoklu-bakır içeren mavi proteinler sınıfına dâhil edilmektedirler. Diğer yandan tirozinaz enzimleri ise sadece bir çift Tip3 bakır iyonlarına sahiptirler (Solomon vd., 1996).

Lakkaz enzimlerinin UV-Vis spektrumları ise 330 ile 340 nm arasında bir omuz oluşturacak şekilde 600 nm civarında maksimum pik vermektedirler (Solomon vd., 1996).

Lakkazın bakır merkezlerini oluşturan 3 bölgenin özellikleri:

- Tip1: Mavi bakır, 610 nm'de spesifik bir absorbans verir. Elektron paramagnetik rezonans ile belirlenir. Cu^{2+} iyonu enzimin koyu mavi renginden sorumludur (Hakan vd., 1998).
- Tip2: Normal bakır UV görünür bölgede bir rezonans bandı vermez ancak Elektron paramagnetik rezonans ile belirlenir (Hakan vd., 1998).
- Tip3: Birleşmiş binükleer bakır merkezidir. Diamagnetik olarak belirlenir. 330 nm'de spesifik absorbans verir. Elektron paramagnetik rezonans ile belirlenemez (Hakan vd., 1998).

Tip1; proteinin bakırın tipik mavi rengini ve substrat oksidasyonunun meydana geldiği kısımdır. Tip2 ve Tip3; merkezlerinin dış kaynaklı ligand etkileşimi ve dioksijen ile reaksiyon vermek üzere bakırın üçlü nükleer grubunu oluşturur (Hakan vd., 1998).

Tip2 bakır merkezinde 2 histidin amino asidi ve Tip3 bakır merkezinde de 6 histidin aminoasidi bulunmaktadır (Hakan vd., 1998).

Lakkazlar lignin veya hümitik asit gibi kompleks doğal polimerlerin degradasyonunda görev alırlar (Claus ve Filip, 1998). Reaktif radikallerini oluştururlar, kovalent bağların ve monomerlerin serbest kalmasını sağlarlar. Küçük organik bileşikler ve metaller lakkazı oksitleyebildiği gibi aynı zamanda da aktive edebilir (Claus vd., 2002).

Veratril alkol ve 3-hidroksi antranilik asid, mangan mediatörleri ile radikal-katalizli depolimerizasyona neden olurlar. Fizyolojik olmayan redoks mediatörleri biyoteknolojik proseslerde kullanılarak lakkazın oksidasyonunu azaltır (Claus vd., 2002).

1.4.2.3.Lakkazın Fizyolojik Önemi ve Uygulamaları

Lakkaz çeşitli fizyolojik proseslerde görev alır: Fungal şapka gelişimi, fungal sporların pigmentasyonu, bitki patojenitesi, seksüel farklılaşma, rizomorf oluşumu, lignin parçalanması, böcek sklerotizasyonu, bakteriyel melanizasyon, insan için melanin ilişkili ölüm ile sonlanır (Ünal, 2005).

Fenol türevlerinin doğrudan substrat oksidasyonu ile endüstriyel kirli suların zararlı maddelerden arındırılmasında kullanılır (Cameron vd., 2001).

Polimerik polifenolik türevleri lakkaz-kataliz oksidatif bağları her zaman çözünmez ama filtrasyon ve çöktürme ile ayrılabilir özelliktedir (Juan vd., 2005).

İçeceklerin stabilizasyonunda, meyve suları, şarap ve birada fenol türevlerinin uzaklaştırılmasında bu enzim istenir. Gerçi, burada enzim immobilize olmalıdır, çünkü katkı maddelerinin kullanılmasından dolayı enzimin immobilize halde bulunması gereklidir (Juan vd., 2005). Şimdilerde lakkaz tekstilde teknolojik uygulamalarda, boya ve baskı endüstrisinde boyaların dekolarizasyonundaki uygulamalarda (Sophie vd., 2007) kâğıt hamuru ve kâğıt endüstrisinde beyazlatma proseslerinde kullanılır (Lomascolo vd., 2003).

Çoğu uygulamalar lakkaz ile beraber kimyasal mediatörlerin de kullanılmasına dayanır (Juan vd., 2005).

Odunun yapısı, ince lif (sellüloz ve hemisellüloz) ve ligninden oluşur. Hidroksifenilpropan çeşitli tiplerde bağlar ile bağlanarak kompleks polimerler oluşturur (Juan vd., 2005).

Kâğıt hamuru üretiminde, ligninin yok edilmesi gerekir. Bu olay, mekanik veya kimyasal metotlarla gerçekleştirilmektedir (Susana vd., 2004).

NaOH ve Na₂S ile pişirilerek kâğıt üretimi gerçekleştirilmektedir. Kâğıt üretimi prosesinde kuvvetli kimyasallar ile liflerdeki lignin parçacıklarının uzaklaştırılması gerekmektedir. Klor kâğıt beyazlatma prosesinde en yaygın olarak kullanılan kimyasal ajandır. Ancak çevre açısından problemler yaratır (Susana vd., 2004).

Çünkü klorlamadan sonra gelen alkalinizasyon işlemi klorofenoller ve klogualkoller gibi toksik bileşiklerin oluşması ile sonuçlanır. Fungal lakkaz bu bileşikleri deklorlayarak polimerize eder, çözünürlüğünü azaltır ve toksik etkilerin daha düşük düzeyde kalmasını sağlar. Böylece bu atıklar filtrasyon ya da çöktürme yolu ile uzaklaştırılır (Juan vd., 2005).

1.4.3. Peroksidazlar

Peroksidazlar Hem (Heme) grubu içeren enzimlerdir. Substrat spektrasına dayalı olarak ikiye ayrılır. Birinci tür mangan peroksidaz (MnP)'dir ve Mn²⁺ onun için en iyi indirgen substrattır (Murray, 1990).

Peroksidazlar aynı zaman da hidrojen peroksid veya türevlerini kullanarak çok sayıda organik veya inorganik maddenin oksidasyonunu katalizleyen, Fe(III) porfirinler sınıfında yer alan, oksidoredüktazlardır (Yapaöz, 2013).

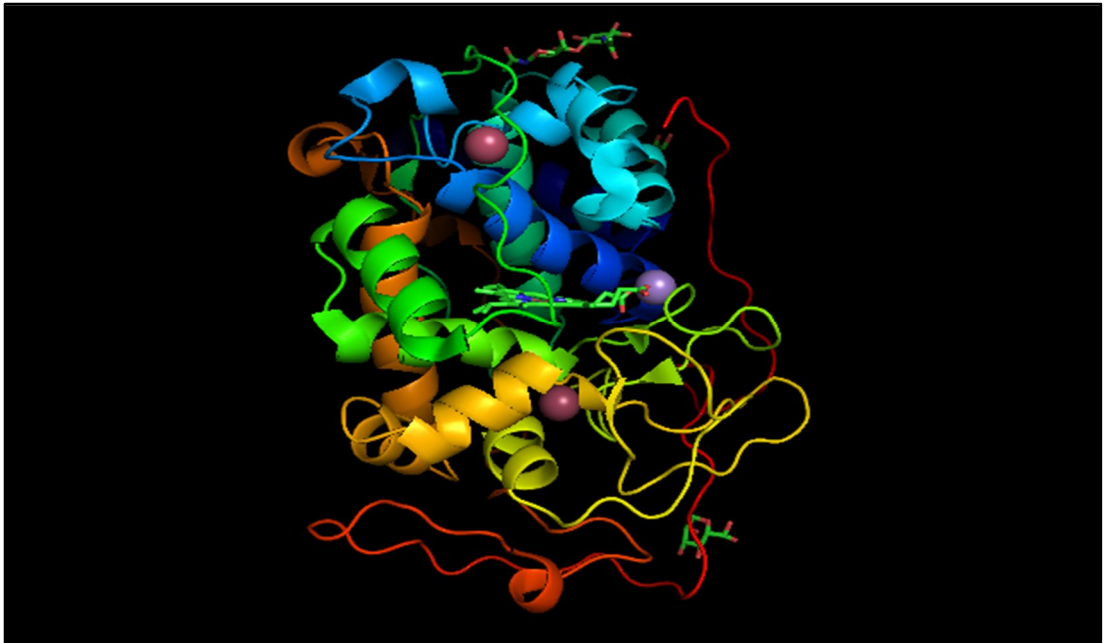
Peroksidazların çoğu N-bağlı oligosakkarid bulunduran glikoproteinlerdir (Akardere, 2012).

1.4.3.1.Mangan Peroksidaz

Mangan peroksidaz ligninolitik funguslar tarafından salgılanan, oksidoredüktaz sınıfına ait hücre dışı bir enzimdir. Mangan peroksidaz, *in vitro* çalışmalarda tüm lignoselülozları olduğu gibi doğal ve sentetik ligninleri de okside eder ve depolimerizasyonunu sağlar (Akardere, 2012).

Mangan peroksidaz enzimi, dikkat çekici bir parçalama potansiyeline sahiptir. Ligninle birlikte çeşitli organik kirlilikleri oksitler ve lignin sülfonik asitlerinin uzaklaştırılması için atık su arıtımı gibi biyoteknolojik uygulamalarda, tehlikeli kimyasalların eliminasyonunda kullanılır (Akardere, 2012).

MnP hemen hemen tüm beyaz ve kahverengi çürükçül fungusların en yaygın ürettiği ligninolitik peroksidazdır. Mn^{2+} bağlanma bölgesi, bir Hem propiyonik asit, üç asidik ligand ve iki su molekülü içerir. Mangan peroksidaz iki domainden oluşur ve Hem grubu bu iki domain arasında sıkışıp kalmıştır. Domainlerin her biri 10 büyük ve 1 adet küçük heliks yapı içerir (Murray, 1990).



Şekil 1.12. Mangan peroksidazın kristal yapısı (Sundaramoorthy, 2005)

1.4.3.2.Lignin Peroksidaz

Lignin peroksidaz bazı fungus türleri tarafından üretilen, lignin yıkımından sorumlu hücre dışı bir enzimdir. Lignin peroksidaz, lakkaz ve mangan peroksidaz enzimleri gibi düşük substrat spesifikliğine sahiptir (Akardere, 2012).

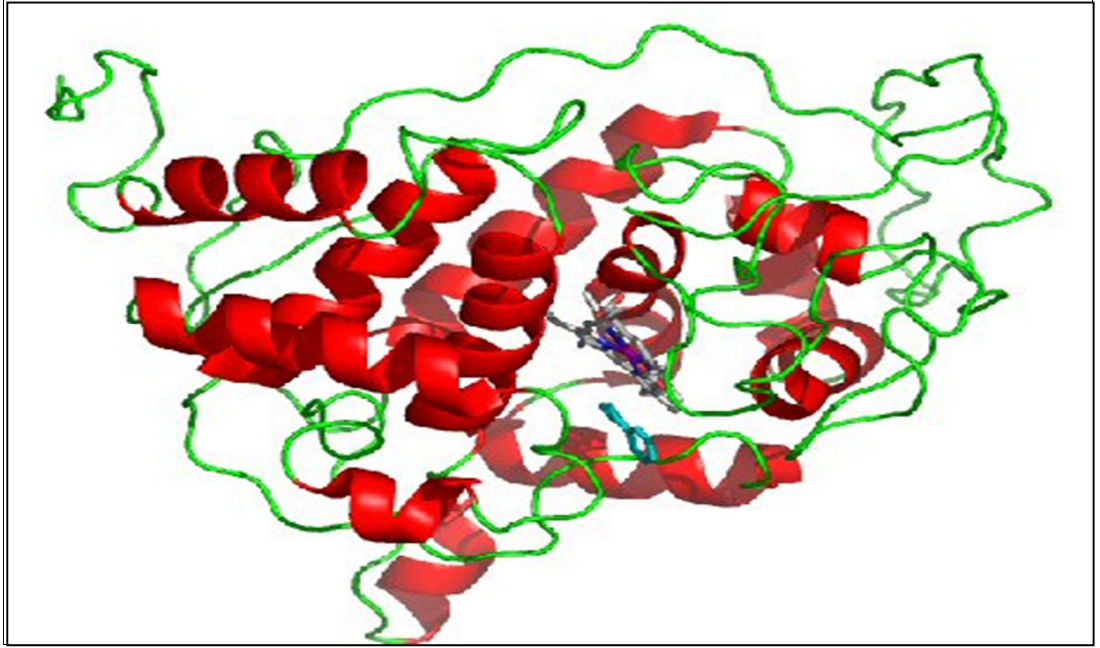
Lignin yüksek derecede okside olduğundan daha ileri oksidasyonu zordur. Lignin sterokimyasal düzen içermeyen heteropolimer bir koplekstir (Crawford, 1981).

Lignin peroksidazlar birçok peroksidazlardan daha yüksek potansiyele sahiptir. Bu durumda bu enzimler, çok geniş yelpazedeki kimyasalları okside edebilirler.

Ancak bu, çok sayıdaki kimyasalların bu funguslar tarafından okside edilmesini açıklamaz. Başka oksidatif mekanizmaların olduğu açıktır.

Bir başka alternatif yol da bazı kimyasalların lignin peroksidaz tarafından oksitlenmeden önce indirgenmeleridir. Bu reaksiyonun meydana gelmesinde birçok yol olduğu görülmektedir fakat en önemlisi beyaz çürükçül fungusların son derece okside olmuş TNT (2,4,6-trinitrotoluene) ve DDT (1,1,1-trichloro -2,2-bis (4-chlorophenyl) ethane) gibi kimyasalları mineralize etmesidir.

Bir diğer yöntem veratril alkol katyon radikali üzerinden olan indirekt oksidasyondur. Bileşikler oldukça düşük oksidasyon potansiyeline sahip olabilirler ama lignin peroksidazların hem geçişi olmadan, veratril alkolün indirekt oksidasyonu olur (Anonim, 1995; Steven, 1996).



Şekil 1.13. Lignin peroksidazın moleküler yapısı (Saloheimo, 1989)

Bu yol Kurek ve ark. tarafından amino triazol (Tuisel vd., 1992) ve lignin (Kurek vd., 1990) için laboratuarda gösterilmiştir.

Oksidasyonu yukarıda tartışılan mekanizmalarda ancak yüksek derecede oksitlenmiş kimyasallar beyaz çürükçül funguslarla oksitlenir. Örneğin beyaz çürükçül funguslarla oksitlenen TNT (Fernando vd., 1990), indirgeyici değil oksitleyicidir. Diğer organizmalardaki metabolizma temelde nitro redüktazlar tarafından indirgenmeyi içerir (Parrish, 1997).

İndirgenmeden sonra lignin peroksidazlar üretildiğinde, TNT mangan bağımlı peroksidazlar tarafından oksitlenip mineralize edilebilir (Stahl ve Aust, 1993).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kimyasallar

2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzo-tiazoline-6-sülfonik asit), ABTS (Sigma), Potato Dekstroz Agar PDA (Fluka), Malt Ekstrakt (Merck), Agar (Sigma), Yeast Ekstrakt (Merck), Sodyum Asetat (Sigma), Potasyum sodyum tartarat (Merck), Bakır (II) sülfat (Sigma), Glukoz (Sigma), Pepton (Sigma), Amonyum Nitrit (Sigma), Potasyum Bisfosfat (Merck), Magnezyumsülfat-7-hidrat (Sigma), Potasyum Klorür (Sigma), Demir(II)sülfat-7-hidrat (Riedel_de Haen), Çinko(II)sülfat-7-hidrat (Sigma), Kalsiyum Klorür (II) hidrat (Sigma), Tiamin (Sigma), Sodyum Malonat (Sigma), Mangan (II) sülfat (Sigma), Hidrojen Peroksit (Sigma), Velatril Alkol (Sigma) kullanılan kimyasallar ve temin edildikleri firmalardır.

2.1.2. Mikroorganizma

Çalışmada lakkaz enziminin üretiminde kaynak olarak beyaz çürükçül fungus *Pleurotus ostreatus* kullanılmıştır. *Pleurotus ostreatus* Erzincan'da Kredi Yurtlar Kurumu Yüksek Öğrenim Öğrenci Yurdu'nun bahçesinden izole edilmiştir. Mantar örneği laboratuvara getirildikten sonra spor tozlarının renklerini saptamak ve sporları mikroskop altından incelemek için şapkanın sapı şapkaya yakın bir yerden kesilerek himenium tabakası aşağı gelecek şekilde beyaz bir kâğıt üzerine bir süre bırakılmıştır. Böylelikle sporların dökülmesi sağlanmış ve spor baskısı tespit edilmiştir.

Sporlar mikroskop altında 10x100 büyütme ile sporların şekli, boyutları, rengi, çeperlerinin kalınlığı, yüzeylerinin düz veya pürüzlü oluşu, apikulus taşıyıp taşımadığı, siğillerinin bulunup bulunmadığı ve basidium üzerinde kaç tane spor bulunduğu verileri ile teşhis edilmiştir.

Mantarın etli kısmından alınan enine kesitte ise hiflerin yapısına bakılarak bunların sadece uzun silindirik hiflerden mi yoksa bununla birlikte küresel hiflerin bir karışımından mı meydana geldiği tespit edilerek familya ayırımında kullanılmıştır. Ayrıca lamellerden alınan enine kesitte sistitlerin varlığı varsa şekli ve büyüklüğü hiflerin konumları familya ve cins ayırımında veri olarak kullanılmıştır.

2.1.3. Cihazlar

Tablo 2.1. Kullanılan cihazlar

Cihaz	Marka
Steril Kabin	Safe FAST Classic 212
Masa Tipi Otoklav	Nüve OT 012
Dik Tip Otoklav	Sümer
Vortex	Heidolph
Çalkalamalı İnkübatör	Heidolph
Hassas Terazî	AGN220C AXIS
Mikropipet	Axygen
pH Metre	PHM201 Meterlab
Lambda 35 UV/VIS Spektrometre	Perkin Elmer
Santrifüj	Smart R17

2.2.Yöntem

2.2.1. Uygun Stok Ortamını Belirleme Yöntemi

P. ostreatus'un stoklayabilmek için kullanılacak besiyeri seçiminde RBA ve PDA olmak üzere iki farklı besiyeri kompozisyonu belirlenmiştir.

Bu stok ortamlarında yapılan denemelerde besiyerlerin ekilen hücreler 14 gün boyunca 28 °C inkübasyona bırakılarak gelişim süreçleri ve kontaminasyon olup olmadığı takip edilmiştir.

2.2.2. Petri Stok Kültürü

2.2.2.1.Rose Bengal Agar (RBA)

Rose Bengal Agar hazır besiyeri olduğundan 32,2 g/L olarak aldık.

RBA ortamı hazırlanışında 1 litre çözeltide 32,2 gram RBA olacak şekilde 100 ml'lik ortam hazırlandı.

Hazırlanan çözelti 121°C de 1 atm'de 20 dakika otoklavda sterilize edildi. 9 cm çaplı petrilere 12,5 ml olacak şekilde aseptik koşullarda aktarıldı.

Ortam İçeriği Tablo 2.2'de verildiği şekildedir.

Tablo 2.2. RBA'nın içeriği

Bileşen	Miktar (g/L)
Soya Fasulyesi Ekstraktı	5
Dekstroz	10
Mono Potasyum Fosfat	1
Magnezyum Sülfat	0,5
Rose Bengal (4,5,6,7- tetrakloro- 2',4',5',7'- tetraiyodoflorosein	0,05
Kloramfenikol	0,1
Agar	15
Son pH'sı 7.2 + /- 0,2 (25 °C)	

2.2.2.2.Potato Dekstroz Agar (PDA)

Potato Glukoz Agar (PGA) [PDA = potato dekstroz agar da denilebilir.]

Ortam İçeriği Tablo 2.3'de verildiği şekildedir.

Tablo 2.3. PDA'nın içeriği

Bileşen	Miktar (g/L)
Patates Ekstraktı	4
Dekstroz	20
Agar	15
Son pH'sı 5.4 + /- 0,2 (37 °C)	

PGA ortamı hazırlanışında 1 litre çözeltilde 39 gram PGA olacak şekilde 100 ml'lik ortam hazırlandı.

Hazırlanan çözeltili 121°C de 1 atm'de 20 dakika sterilize edildi.

2.2.3. Yatık Agar

Katı besiyerinden sıvı besiyerine hücre inokülasyonu için yatık agar kullanıldı.

Yatık agar besiyeri için Rose Bengal Agarı kullanıldı. Litresinde 32,2 g/L Rose Bengal olacak şekilde 100 ml saf su ile rouks şişesinde 121 °C' de 15 dakika otoklavda sterilizasyon yapıldı, bu işlemin ardından 55 °C kadar soğutulan besiyerine vidalı deney tüplerine 5' er ml aktarıldı.

Besiyeri aktarılmış deney tüpleri tekrar 121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edip 30 derecelik açıda yatık vaziyette donması sağlandı.

2.2.4. Büyüme Ortamı

Büyüme ortamı olarak Malt Ekstrakt Brooth (MEB) kullanıldı (1,7 g/100 ml). Hazırlanan Malt Ekstrakt Brooth (MEB) 250 ml erlenlere 95 ml olacak şekilde koyuldu.

Ağızları pamuklu gazlı bez ile tıkaç yapılraka kapatıldı. Bu hali ile otoklavda sterilize edilen erlenler kulşlanılacağı zamana kadar +4 °C muhafaza edildi.

Yatık agara ekimi yapılan mikroorganizmalar 5 ml % 0,9'luk serum fizyolojik yardımı ile aseptik koşullarda alındı ve 95 ml'lik malt ekstrakt brooth büyüme ortamına yine aseptik koşullarda ilave edildi. 6 gün 28 °C de 125 rpm'de çalkalayıcılı inkübatörde inkübe edildi.

2.2.5. Uygun Enzim Üretim Ortamını Belirleme Yöntemi

P.ostreatus tarafından üretilen PPO, lakkaz, MnP, LiP üretim ortamının belirlenmesi için, dört farklı ortamda bu enzimlerin aktivitesi 14 gün boyunca izlendi.

(Ortam içerikleri Tablo 2.4.-2.5.- 2.6. ve 2.7.'te verilmiştir.)

Tablo 2.4. Birinci ortamın içeriği (pH:6.6)

Bileşen	Miktar (g/L)
Glukoz	2,5
Yeast ekstrakt	1
Potasyum sodyum tartarat	2,3
Pepton	1
CuSO ₄	0,00639

*Ortama glukoz ekim sırasında aseptik koşullarda eklenmektedir.

Tablo 2.4'de gösterildiği gibi kimyasallar (glukoz hariç) sırasıyla saf suya eklendi ve karıştırıcıda çözüldü.

Tablo 2.5. İkinci ortam içeriği (pH:6.6)

Bileşen	Miktar (g/L)
Mannitol	2,5
Yeast ekstrakt	1
Potasyum sodyum tartarat	2,3
Pepton	1
CuSO ₄	0,00639

*Ortama mannitol ekim sırasında aseptik koşullarda eklenmektedir.

Tablo 2.5’de gösterildiği gibi kimyasallar (mannitol hariç) sırasıyla saf suya eklendi ve karıştırıcıda çözüldü.

Tablo 2.6. Üçüncü ortam içeriği (pH:6.0)

Bileşen	Miktar (g/L)
Glukoz	10
NH ₄ NO ₂	0,724
KH ₂ PO ₄	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	1
KCl	0,5
Yeast ekstrakt	0,5
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,001
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0028
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,033
Pepton	10

*Ortama glukoz ekim sırasında aseptik koşullarda eklenmektedir.

Tablo 2.6'de gösterildiği gibi kimyasallar (glukoz hariç) sırasıyla saf suya eklendi ve karıştırıcıda çözüldü.

Tablo 2.7. Dördüncü ortam içeriği (pH:4.5)

Bileşen	Miktar (g/L)
Glukoz	5
KH_2PO_4	2
NH_4NO_3	0,05
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,05
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,1
Tiamin	0,0001
Eser element solüsyonu	100 ml'lik karışıma 10 ml ilave edildi.
MnSO_4	0,5
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1

*Ortama glukoz ekim sırasında aseptik koşullarda eklenmektedir.

Tablo 2.7'de gösterildiği gibi iki farklı karım yapılarak kimyasallar (glukoz hariç) sırasıyla saf suya eklendi ve karıştırıcıda çözüldü.

2.2.6. Enzim Aktivite Tayin Yöntemi

Her gün erlenlerden aseptik koşullar altında 1 ml örnek steril pipet ile alınacaktır. Daha sonra alınacak olan bu örnek santrifüjlenerek askıda katı maddelerden arındırılır. Daha sonra aktivite tayini için kullanılır.

2.2.6.1. Polifenol Oksidaz Aktivitesinin Tayin Yöntemi

Kültürdeki Difenol oksidaz aktivitesi, kateşolün oksidasyon hızının 420 nm deki değişiminin izlenmesi ile ölçülecektir. Havaya ve köre karşı 10 sn aralıklarla toplam 3 dakika absorbans ölçümü alınacaktır. Absorbansındaki 0,05 nm lik artış 1 Unit aktiviteye karşılık gelmektedir (Sisler ve Evans, 1958).

Tablo 2.8. Polifenol oksidaz enziminin aktivite tayin protokolü

Bileşen	Kör(ml)	Örnek(ml)
Kateşol 175 mM	0,3	0,3
Sitrat 0,5M-pH: 5.3 Tamponu	0,7	0,4
Enzim	--	0,3

2.2.6.2. Lakkaz Aktivitesinin Tayin Yöntemi

Kültürdeki lakkaz aktivitesi, ABTS'nin oksidasyon hızının 420 nm deki değişiminin izlenmesi ile ölçülecektir. Havaya ve köre karşı 10 sn aralıklarla toplam 3 dakika absorbans ölçümü alınacaktır. ($\epsilon = 3,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) Lakkaz aktivitesi, 1 ml enzim tarafından dakikada 1 μmol substratı dönüşüme uğratan enzim miktarı olarak tanımlanır (Wolfenden ve Robin, 1982).

Tablo2.9. Lakkaz enziminin aktivite tahin protokolü

Bileşen	Kör(ml)	Örnek(ml)
Na-Asetat (100 nM-pH: 4.5)	0,9	0,8
1mM ABTS	0,1	0,1
Enzim	--	0,1

2.2.6.3.Mangan Peroksidaz Aktivitesinin Tayin Yöntemi

Kültürdeki mangan peroksidaz aktivitesi, H_2O_2 'nin oksidasyon hızınının 270 nm deki değişiminin izlenmesi ile ölçülecektir. Havaya ve köre karşı 10 sn aralıklarla toplam 3 dakika absorbans ölçümü alınacaktır. ($\epsilon = 11900 M^{-1} \times cm^{-1}$) mangan peroksidaz, 1ml enzim tarafından dakikada 1 μ mol substratı dönüşüme uğratan enzim miktarı olarak tanımlanır (Paszczyński vd., 1988).

Tablo 2.10. Mangan peroksidaz enziminin aktivite tahin protokolü

Bileşen	Kör(ml)	Örnek(ml)
Na-Malonat (50 mM-pH: 4.5)	0,8	0,7
MnSO ₄ 10 mM	0,1	0,1
H ₂ O ₂ (1 mM)	0,1	0,1
Enzim	--	0,1

2.2.6.4. Lignin Peroksidaz Aktivitesinin Tayin Yöntemi

Kültürdeki lignin peroksidaz aktivitesi, H_2O_2 'nin oksidasyon hızının 310 nm deki değişiminin izlenmesi ile ölçülecektir. Havaya ve köre karşı 10 sn aralıklarla toplam 3 dakika absorbans ölçümü alınacaktır. ($\epsilon = 9,3 M^{-1} \times cm^{-1}$) lignin peroksidaz, 1 ml enzim tarafından dakikada 1 μ mol substratı dönüşüme uğratan enzim miktarı olarak tanımlanır (Tien ve Kirk, 1988).

Tablo 2.11. Lignin peroksidaz enziminin aktivite tahin protokolü

Bileşen	Kör(ml)	Örnek(ml)
Veratril Alkol (200 mM)	0,1	0,1
H_2O_2 (4mM)	0,1	0,1
Na-Tartarat (100 mM-pH: 2.5)	0,8	0,7
Enzim	--	0,1

2.2.7. Boyaların Spekturum Taraması

Biyogiderimi yapılan boyaların saf hallerinin maksimum absorbans değerlerini bulmak amacı ile spekturum taraması yapıldı.

Spekturum taraması yapılırken boyaların saf hallerinden hazırlanan 2 g/L çözeltilerden spektrofotometri küvetine 10 μ l aktarıldı, üzerine 990 μ l saf su ilave edildi. 700 nm-200 nm arasında spekturum taraması yapıldı.

Böylelikle boya moleküllerinin maksimum absorbans verdiği dalga boyları bulundu. Spekturum taraması yapılırken kör olarak saf su kullanıldı.

2.2.8. Boyaların Standart Grafiklerinin Oluşturulması

Enzim üretim ortamında biyogiderimin takip edilebilmesi için, günlük olarak sıvı kültürden alınan numunelerde ne kadar boya kaldığını; standart grafiği oluşturularak tespiti yapıldı. Standart grafiği oluşturmak için saf boya maddelerinden 0,4-0,2-0,1-0,05-0,025-0,0125-0,00625 mg/ml konsantrasyonda çözeltiler hazırlandı.

Hazırlanan çözeltilerin, her boya için maksimum absorbans verdikleri dalga boylarında ölçümleri yapıldı. Bu boya çözeltilerinin konsantrasyonlarıyla, absorbans-konsantrasyon grafiği çizildi.

Bu grafikler sonucu oluşturulan $y = ax + b$ grafik denklemlerinden faydalanarak numunelerin sıvı kültürlerdeki günlük kalan boya miktarları bulundu.

2.2.9. Boyaların Gideriminin Takibi

Enzim üretim ortamında bulunan boya miktarının takibi için günlük olarak sıvı kültürlerden 1'er ml aseptik koşullarda numune alındı.

Alınan bu numuneler 16000 xg santrifüj yapıldı.

Santrifüj yapılan numunelerin süpernetant kısmı alınarak her biri için özğü dalga boylarında absorbansları alındı.

Kör olarak sterilize edilmiş sıvı kültür kullanıldı.

2.2.10. Biyokütle (Biyomas)Tayin Yöntemi

Hücre sayısının deneysel tespiti zor olduğundan hücre büyümesi biyokütle artışıyla izlenir. Bu durumda tüm hücrelerin aynı kütlede oldukları kabul edilir. Gerçekte öyle olmasa bile ortalama değer olarak tüm hücrelerin aynı kütlede kabul edilmeleri, toplam hücre sayısının belirlenmesinde genelde önemli hatalara neden olmaz.

Biyokütle tayini için ekimi yapılan *Pleurotus ostreatus* hücrelerinin 14 gün boyunca 28 °C sıcaklıkta 125 rpm çalkalama hızında inkübe edilecektir. Bunun sonucunda Whattman kağıdı ile süzülerek elde edilen misel 60 °C de 24 saat etüvde kurutulacaktır. Kurutulan örnek tartılarak kuru ağırlığı kayıt edilecektir.

2.2.11. Bradford Yöntemi İle Total Protein Tayini

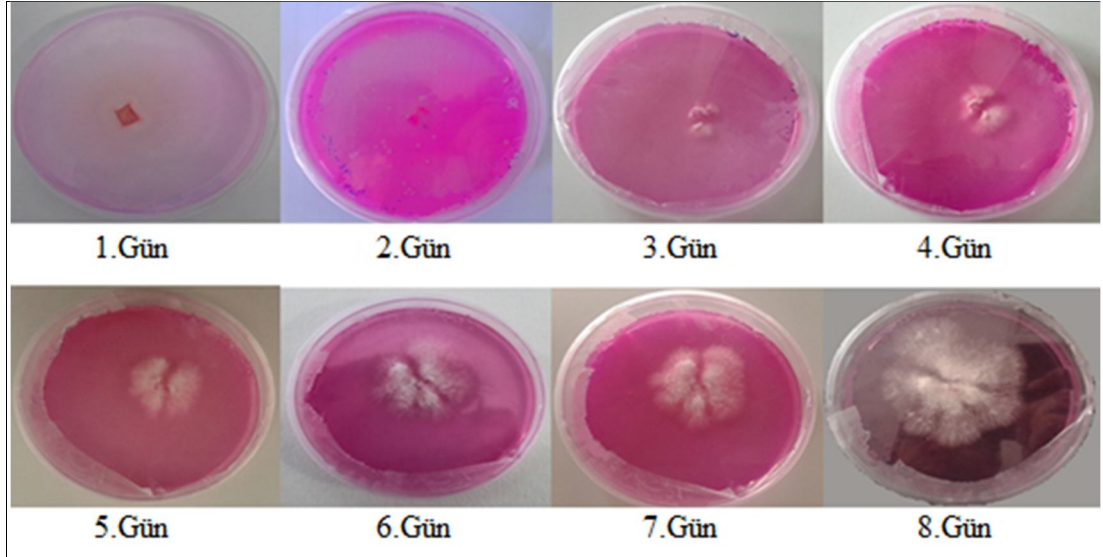
Yöntem, Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının proteinlere bağlanması sonucunda oluşturduğu renkli çözeltilerin 595 nm'de absorbansının ölçülmesine dayanır. Sığır serum albumini (BSA) standartları hazırlanır, 595 nm'de absorbansları ölçülüp bir standart grafiği çizilir. 0,1 g Bradford reaktifi, %95'lik 50 mL etil alkol, %85'lik 100 mL fosforik asit çözeltileri karıştırılarak toplam hacim 1000 mL'ye tamamlanır. Çözelti bir gece boyunca karanlıkta bekletildikten sonra filtre kağıdından süzülür. Deney tüplerine analizi yapılacak örneklerden 100 µL örnek konulur. Tüpün üzerine hazırlanan Bradford çözeltisinden 5 mL eklenerek 5 dakika inkübasyonda bırakılır. Bu sürenin sonunda 595 nm'de absorbanslar okunur. Okunan absorbanslar standart grafiğinden elde edilen denklemde yerine yazılarak konsantrasyon cinsinden ne kadar protein olduğu belirlenir (Sedmak ve Sidney, 1977).

3. SONUÇLAR

3.1.Uygun Stok Ortamını Belirleme Sonuçları

3.1.1. Petri Stok Kültürü

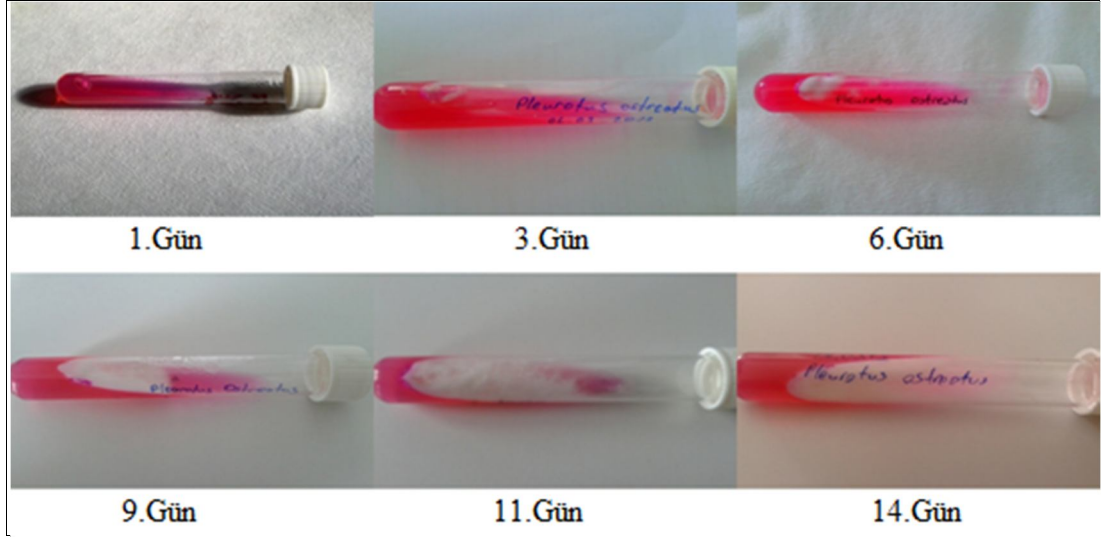
PDA'da kontaminasyon riski yüksek olduğundan dolayı petri stok kültüründe Rose Bengal Agar seçilmiştir. Her PDA ve RBA da *P. ostreatus* aynı gelişimi göstermiş herhangi bir morfolojik ve biyokimyasal değişime uğramamıştır.



Şekil 3.1. RBA petri stok kültürü

3.1.2. Yatık Agar

Yatık agar besiyeri olarak kullanılan RBA da *Pleurotus ostreatus* 14 günün sonun da tamamıyla yüzeyde misel oluşturmuştur. Misel oluşumu tamamlanan yatık ağarlar sıvı kültüre hücre geçişine kadar +4 °C buzdolabında muhafaza edilmiştir.

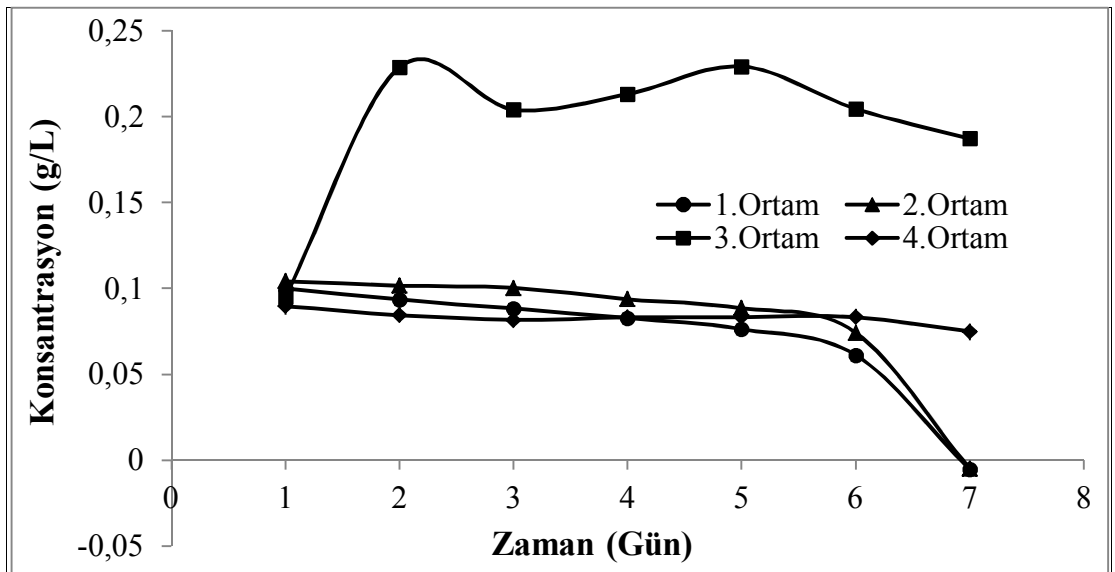


Şekil 3.2. RBA yatık stok kültürü

3.2.Uygun Enzim Üretim Ortamını Belirleme Sonuçları

Denemesi yapılan enzim üretim ortamlarından 1 numaralı besiyerinde boya giderimi ve enzim aktiviteleri yüksek olduğundan dolayı çalışmalarımıza bu kompozisyon ile devam edilmiştir.

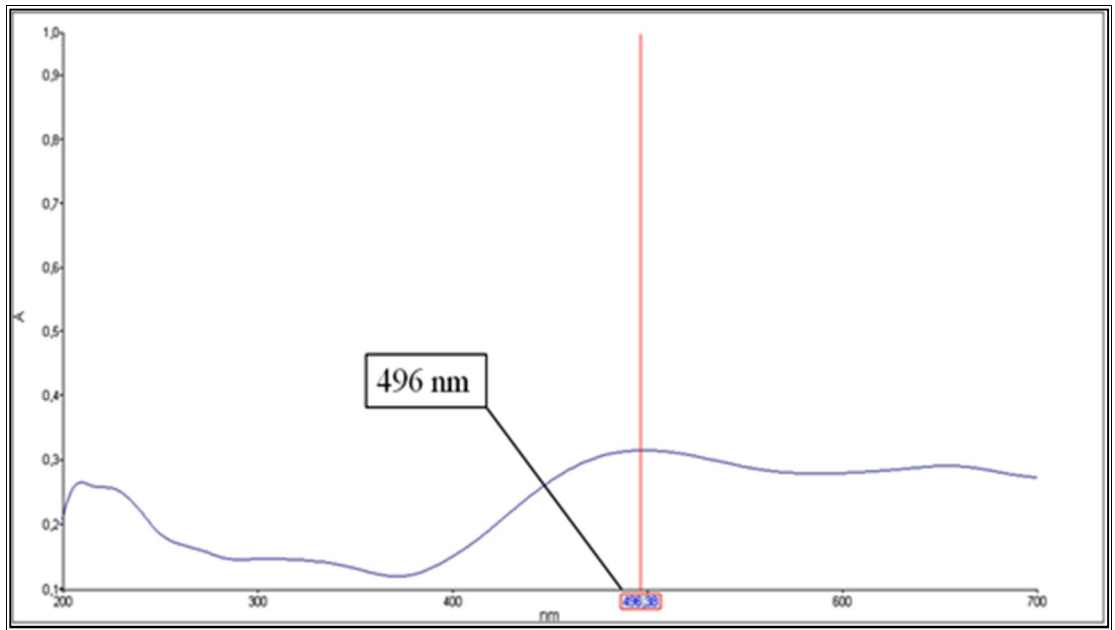
Grafik 3.1. Uygun enzim üretim ortam grafiği

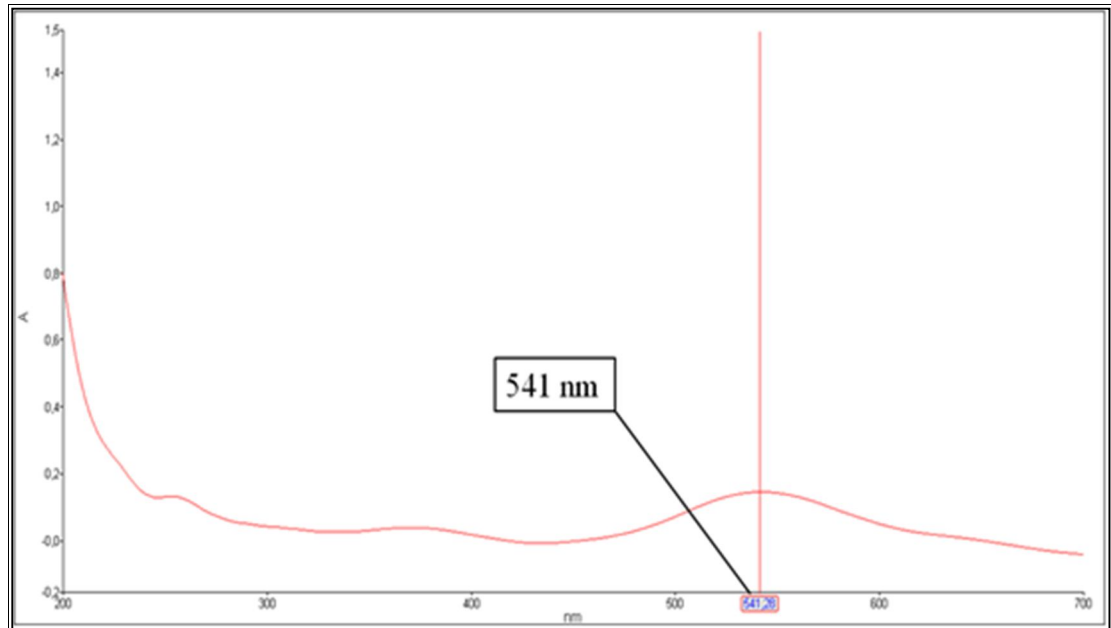
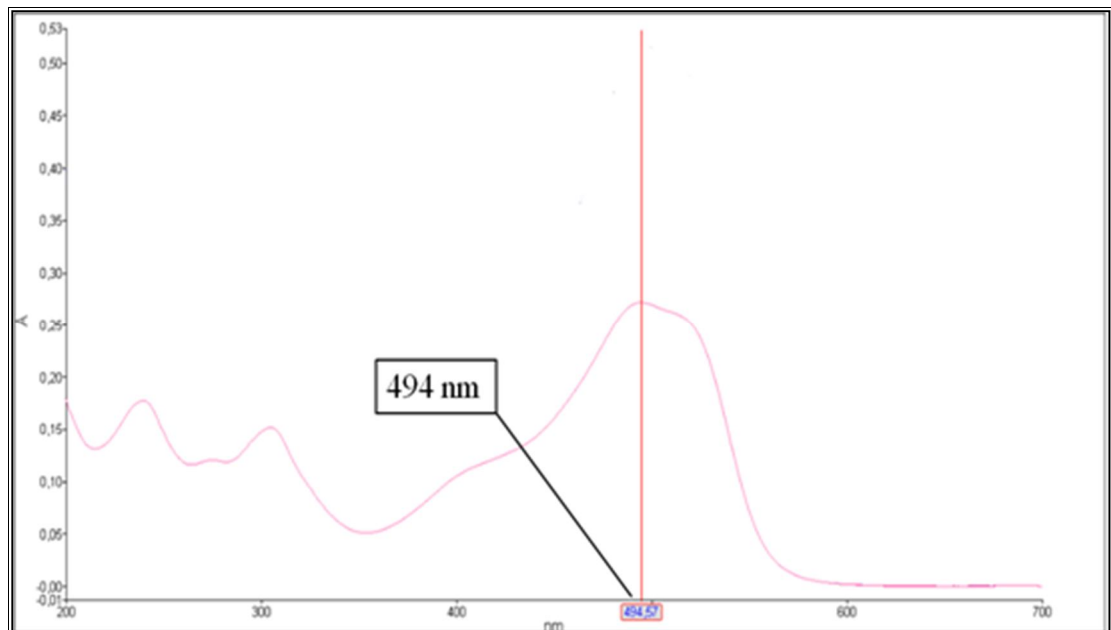


3.3.Boyalarnn Spekturum Taraması

Boyalarnn saf halde 0,02 g/L ve 0,04 g/L konsantrasyonlar da çözeltilerin 700 nm-200 nm aralığında spekturum taramaları yapıldı. Yapılan bu taramalar sonucu her boya için maksimum absorbans veren dalga boyu tespit edildi.

Grafik 3.2. Direct Black 22 spekturum taraması



Grafik 3.3. Direct Brown 2 spekturum taraması**Grafik 3.4.** Direct Orange 26 spekturum taraması

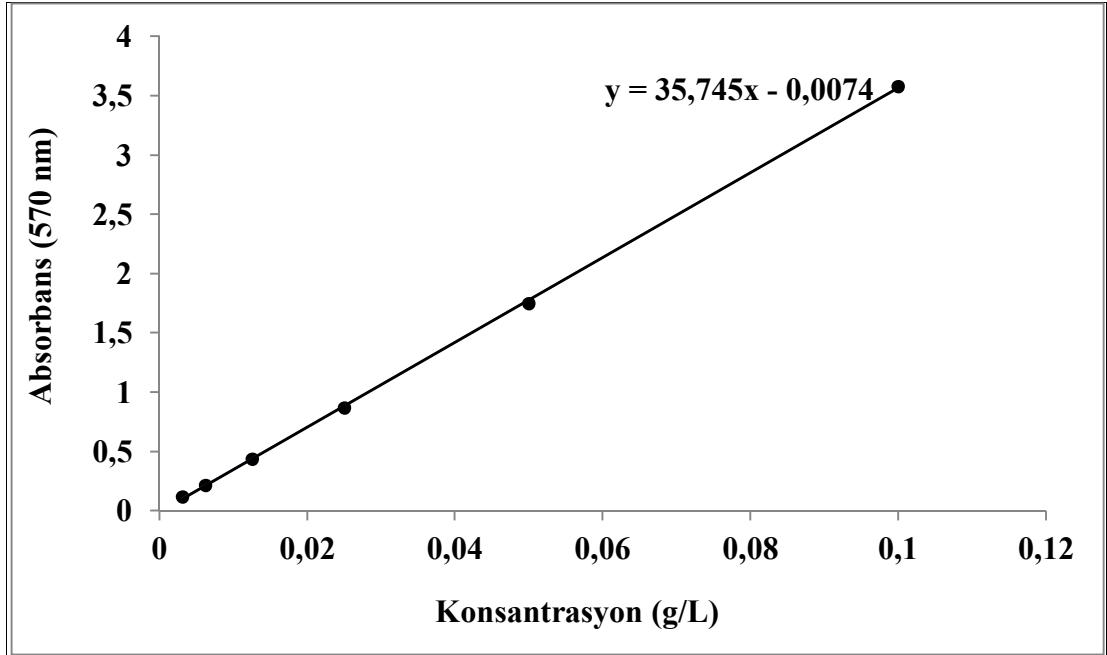
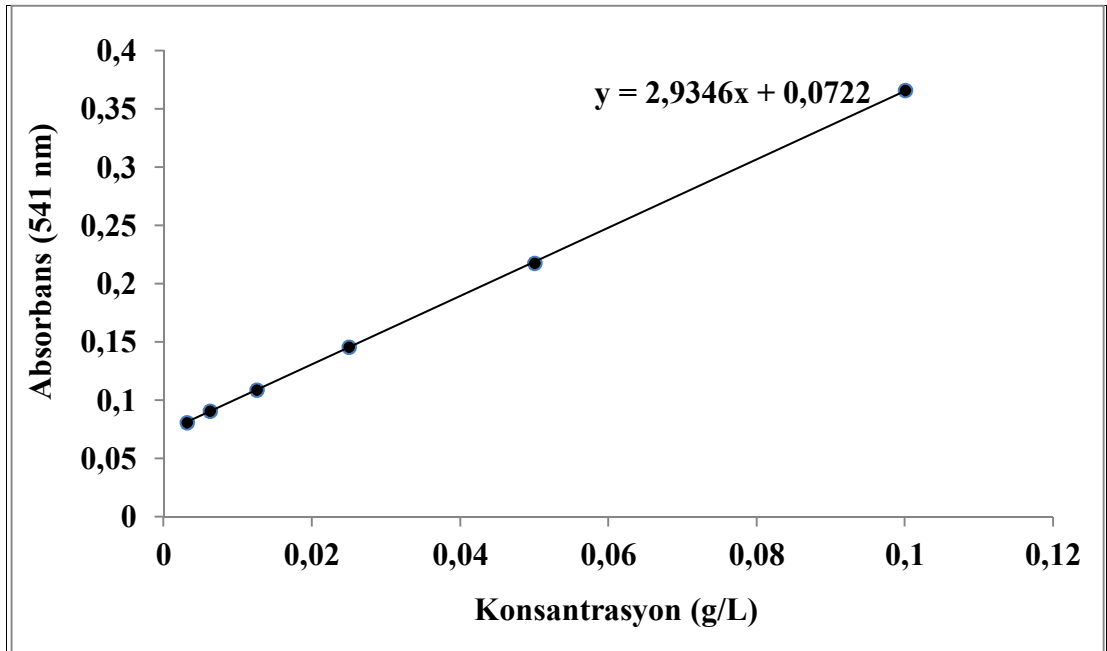
Tabo 3.1. Boyaların spekturum taraması

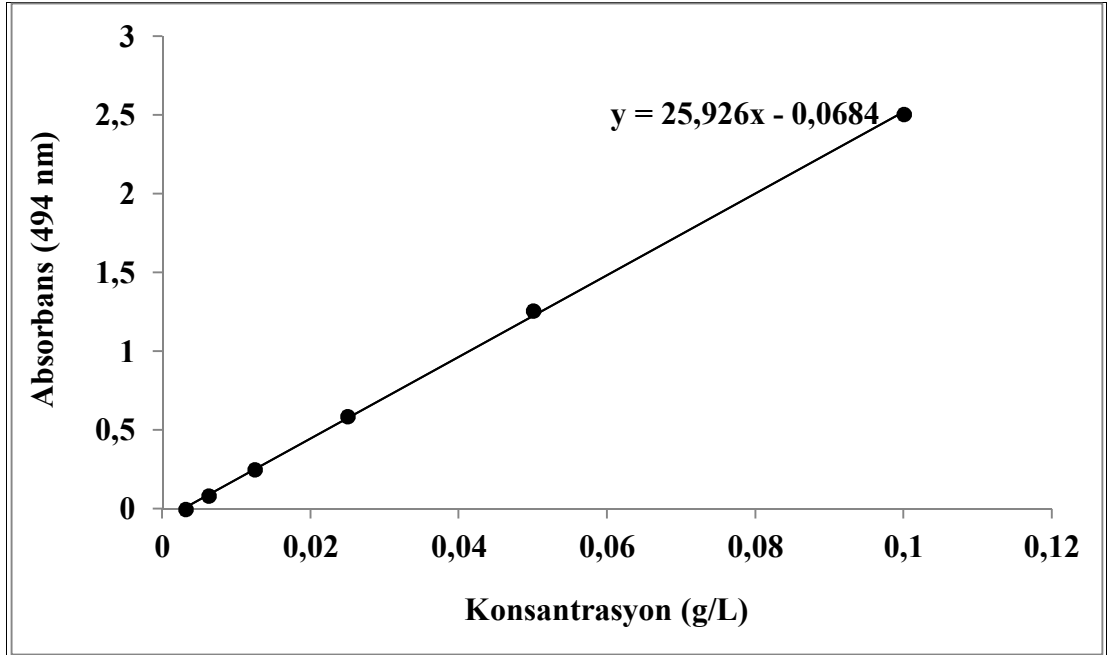
Boya Molekülü	Maksimum absorbans (nm)
Direct Black 22	496
Direct Brown 2	571
Direct Orange 26	494

3.4.Boyalarn Standart Grafiklerinin Olusturulmasi

Yöntemler bölümünde belirtildiği şekilde 0,4-0,2-0,1-0,05-0,025-0,0125-0,00625 mg/ml olacak şekilde hazırlanan boyaların çözeltilerinin, maksimum absorbans verdikleri dalga boylarında teker teker absorbansları okundu.

Böylelikle elde edilen değerlerle absorbansla konsantrasyon grafikleri çizildi. Bu grafiklerin denklemleri de standart grafik denklemi olarak kullanıldı.

Grafik 3.5. Direct Black 22 standart grafiği**Grafik 3.6.** Direct Brown 2 standart grafiği

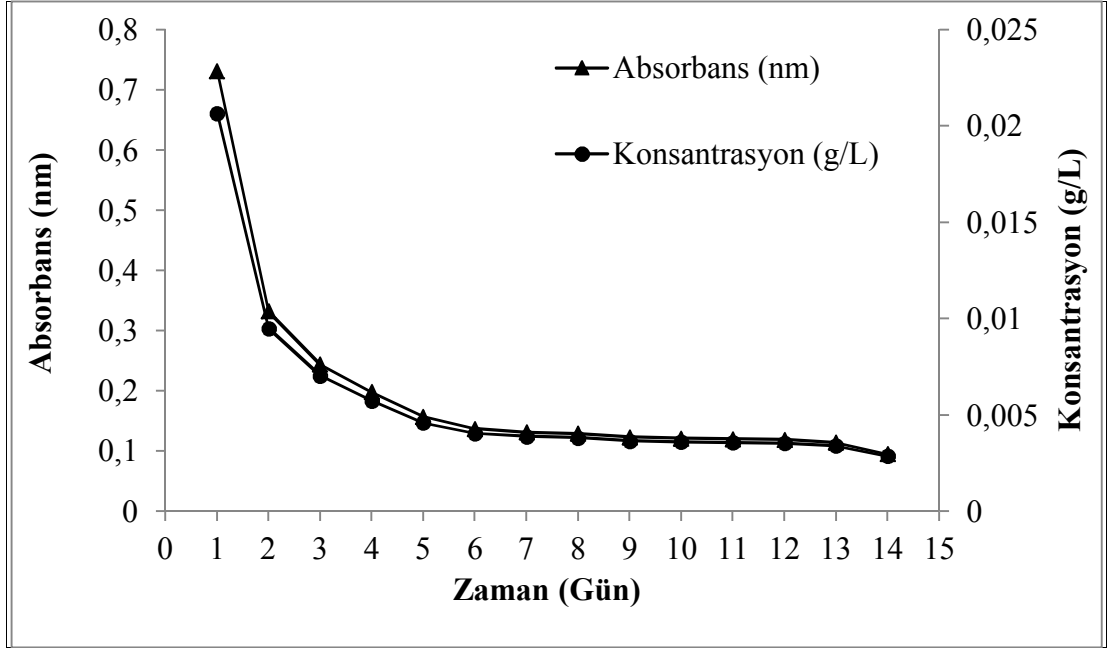
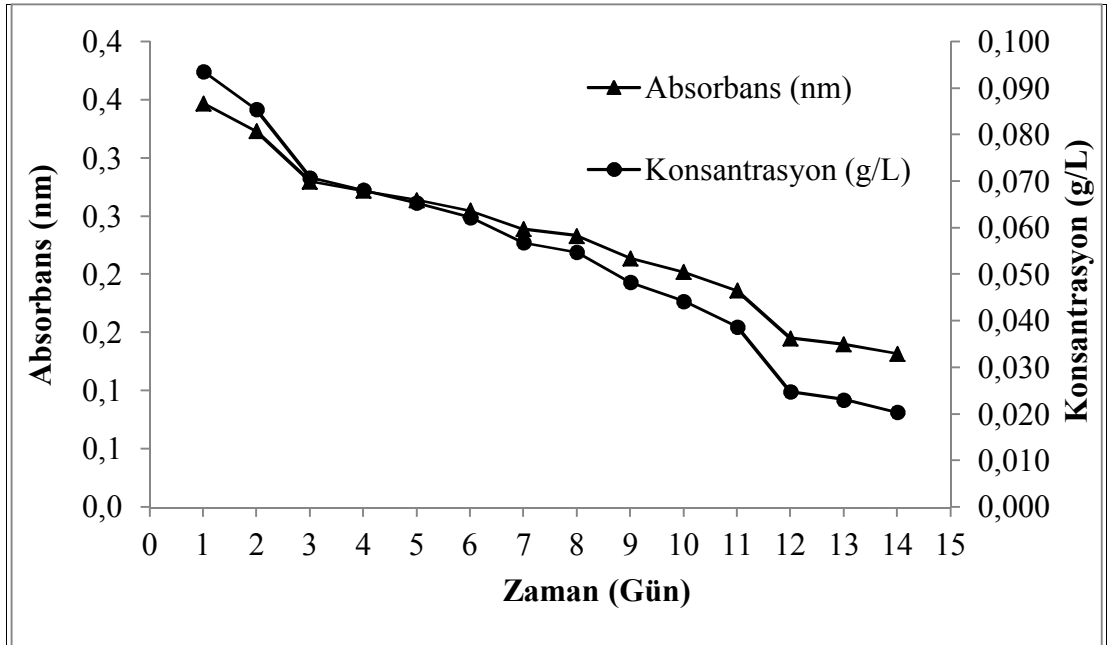
Grafik 3.7. Direct Orange 26 standart grafiği

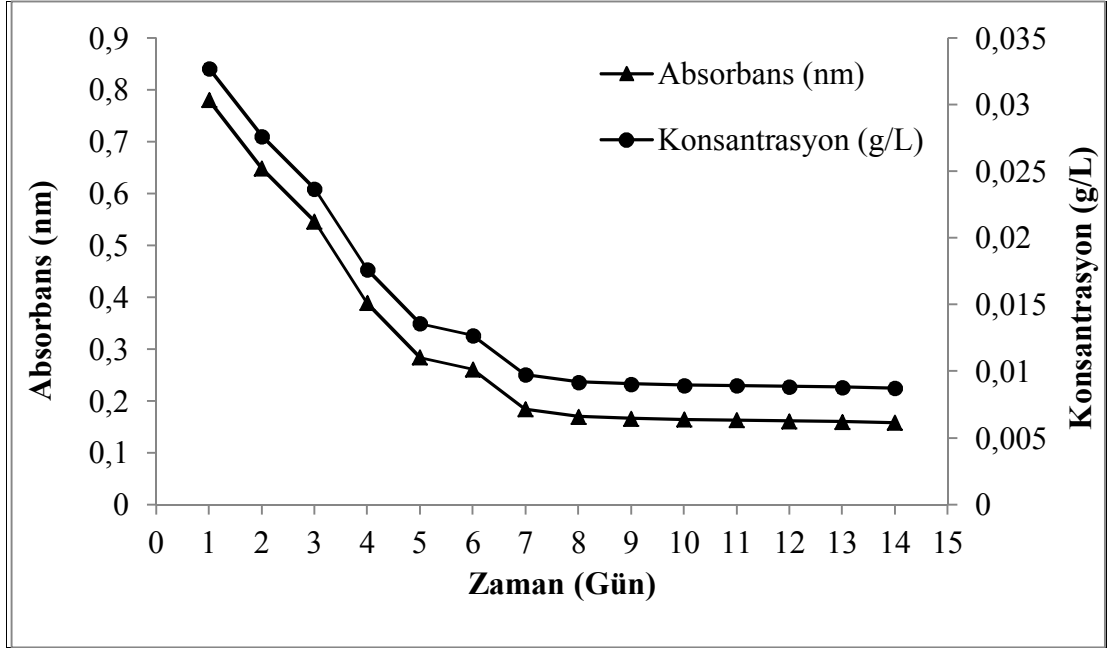
3.5.Boyalarnın Gideriminin Takibi

Enzim üretim ortamında bulunan boya miktarının takibi için günlük olarak sıvı kültürlerden 1'er ml aseptik koşullarda numune alındı. Alınan bu numuneler 16000 xg'de santrifüj yapıldı.

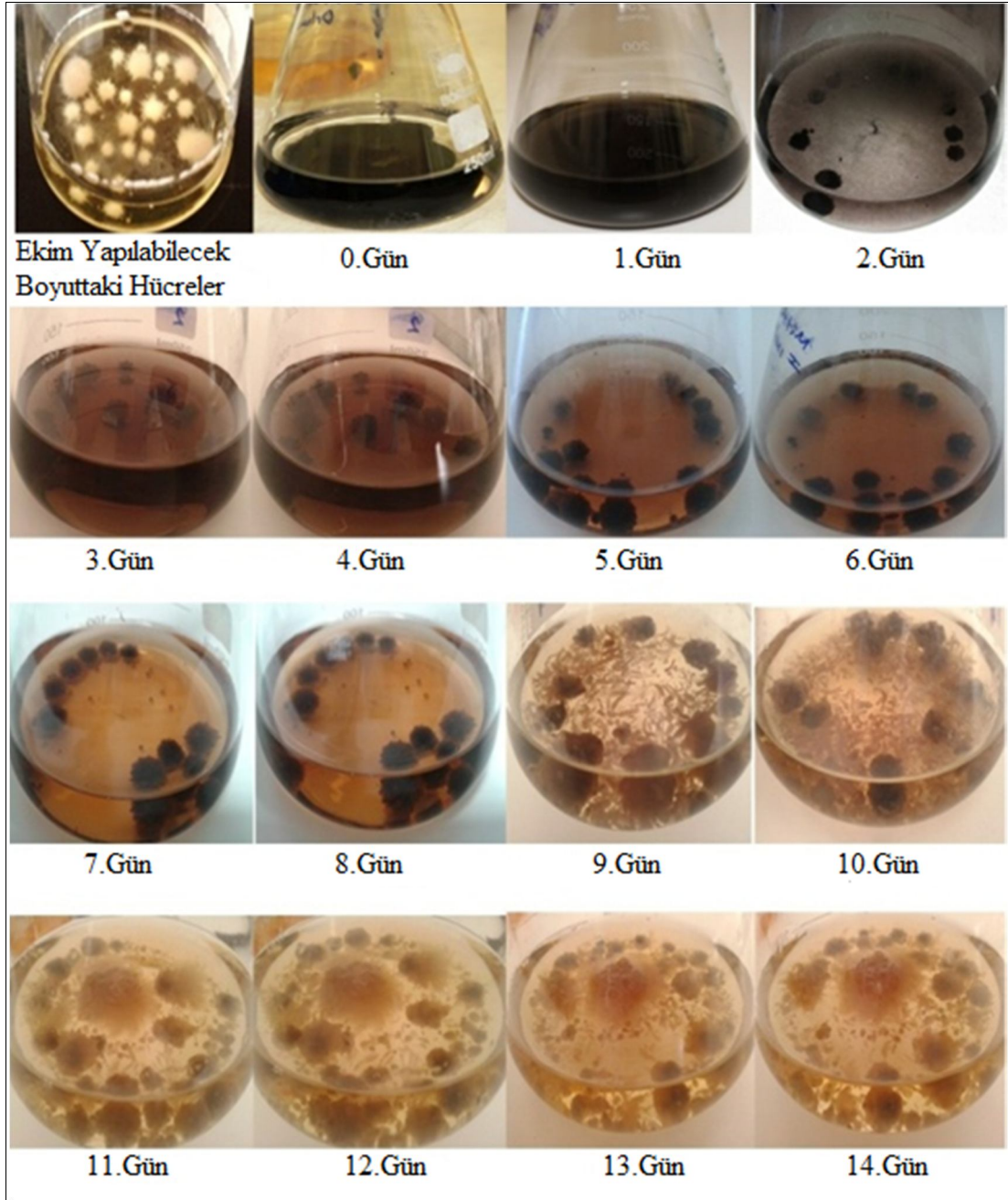
Santrifüj yapılan numunelerin süpernetant kısmı alınarak her biri için özgül dalga boylarında absorbansları alındı.

Kör olarak sterilize edilmiş sıvı kültür kullanıldı. Sonuç olarak grafik 3.8., 3.9., 3.10.'da belirtilen sonuçlar elde edildi.

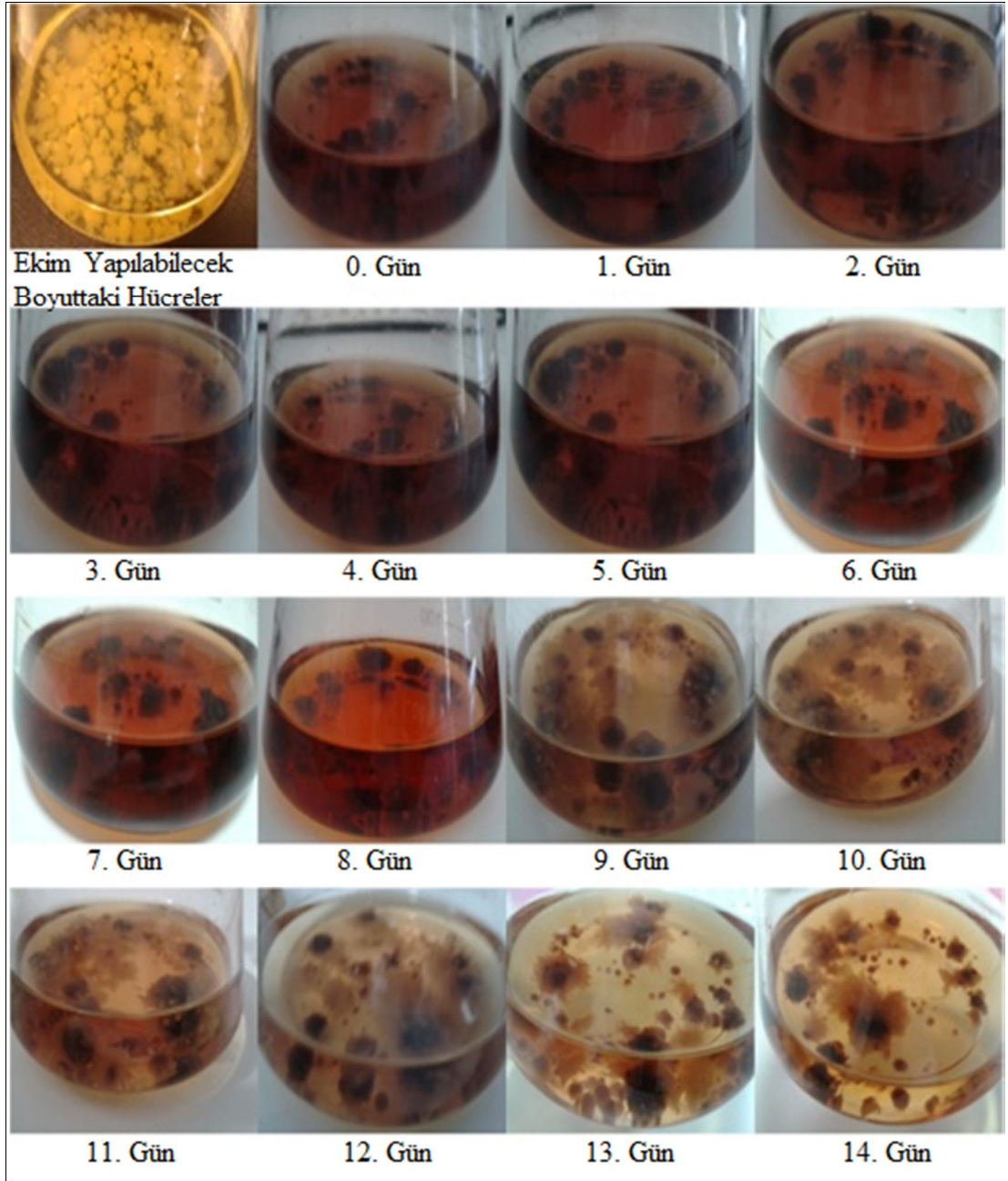
Grafik 3.8. Direct Black 22 boya giderim grafiği**Grafik 3.9.** Direct Brown 2 boya giderim grafiği

Grafik 3.10. Direct Orange 26 boya giderim grafiği

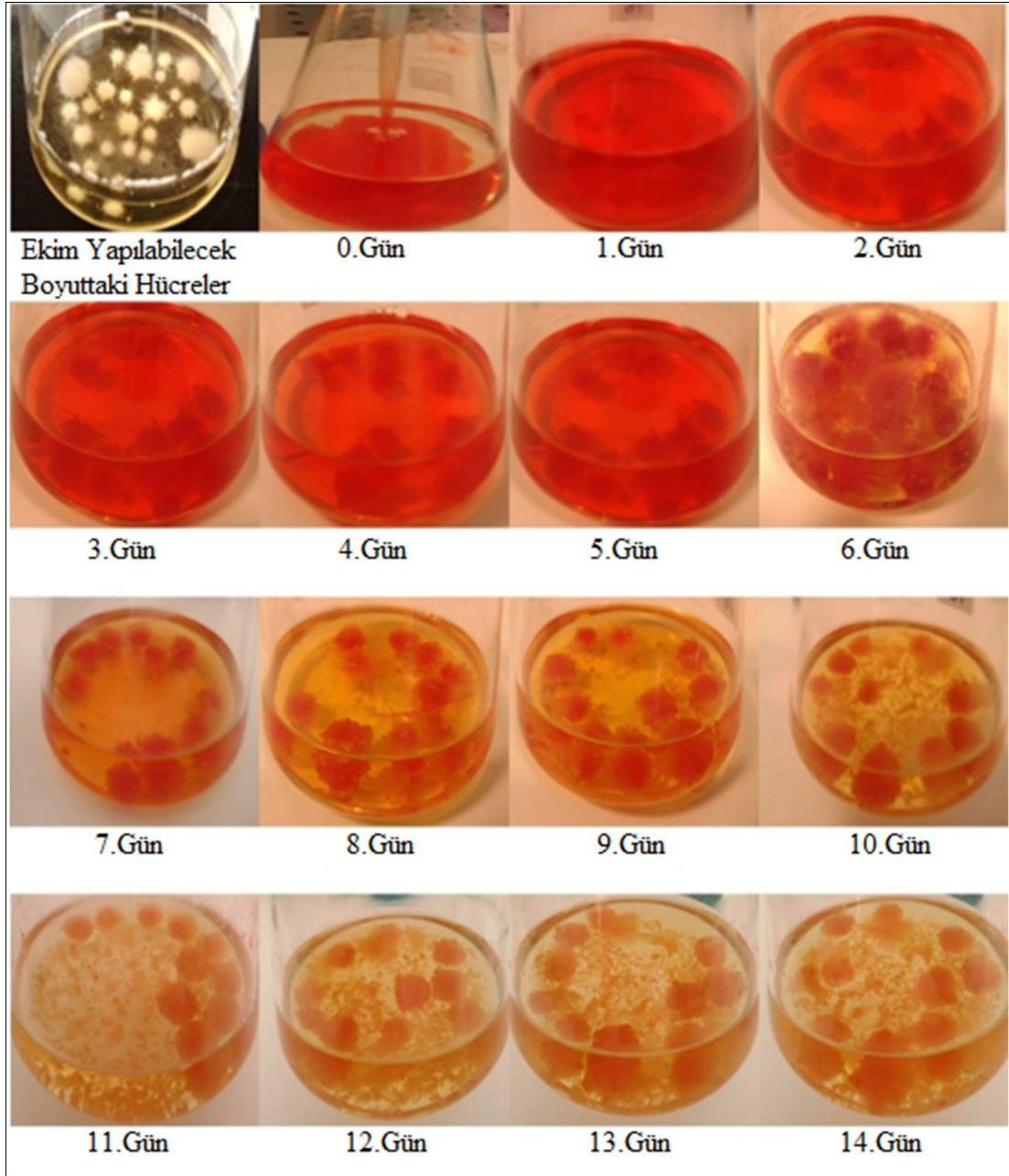
Denemesi yapılan boyaların biyogiderimi gün gün fotoğraflar ile takip edilmiştir.



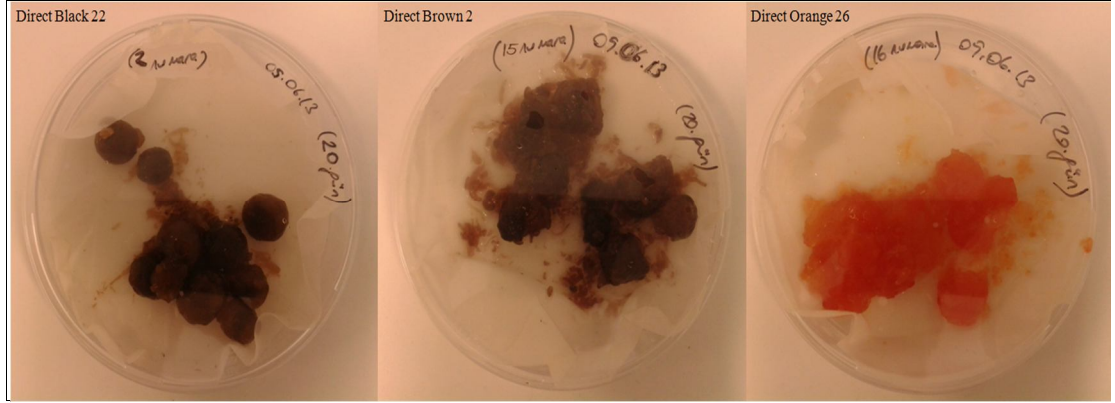
Şekil 3.3. Direct Black 22 boya giderimi



Şekil 3.4. Direct Brown 2 boya giderimi



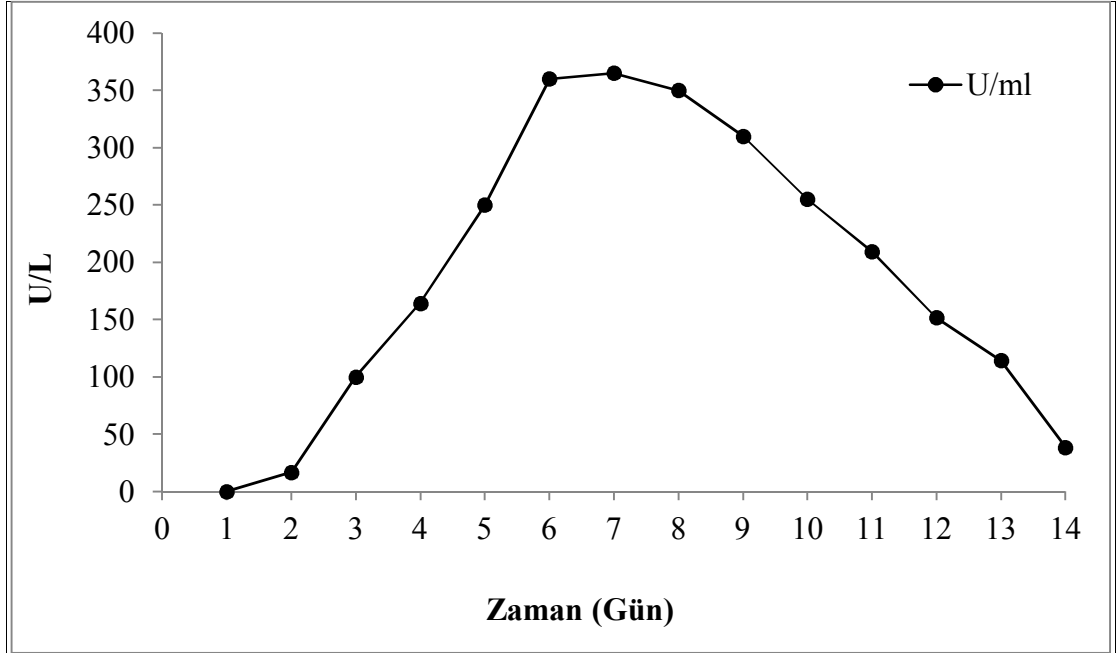
Şekil 3.5. Direct Orange 26 boya giderimi

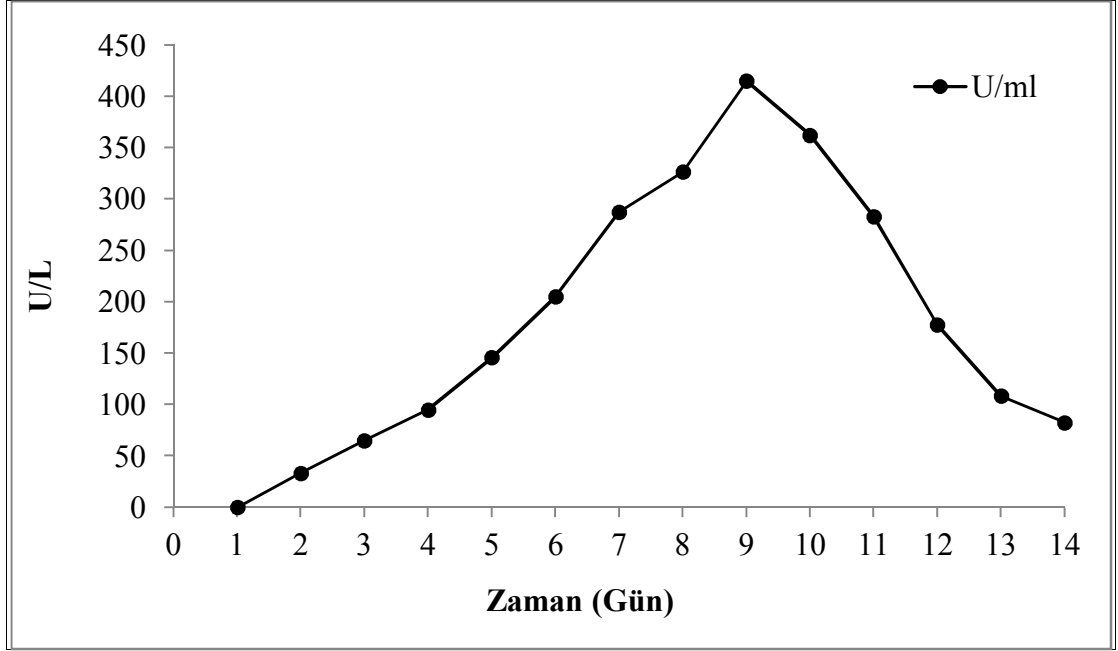
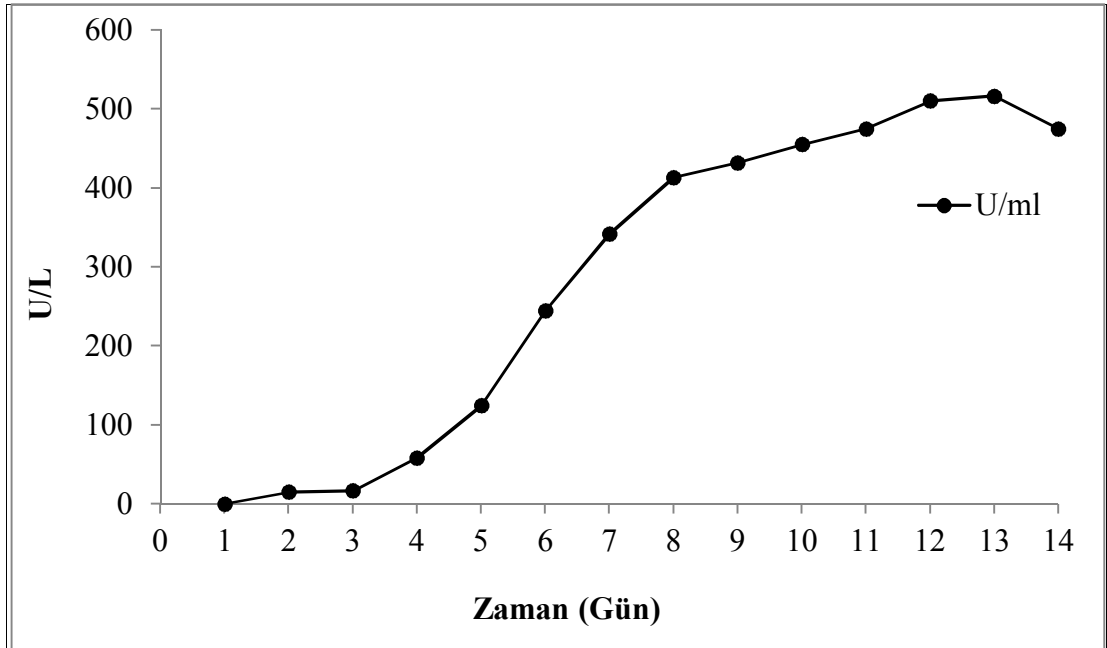


Şekil 3.6. Hücrelerin Biyosorbasyonu

3.6.Enzim Aktivite Grafikleri

Grafik 3.11. Direct Black 22 lakkaz aktivite grafiği

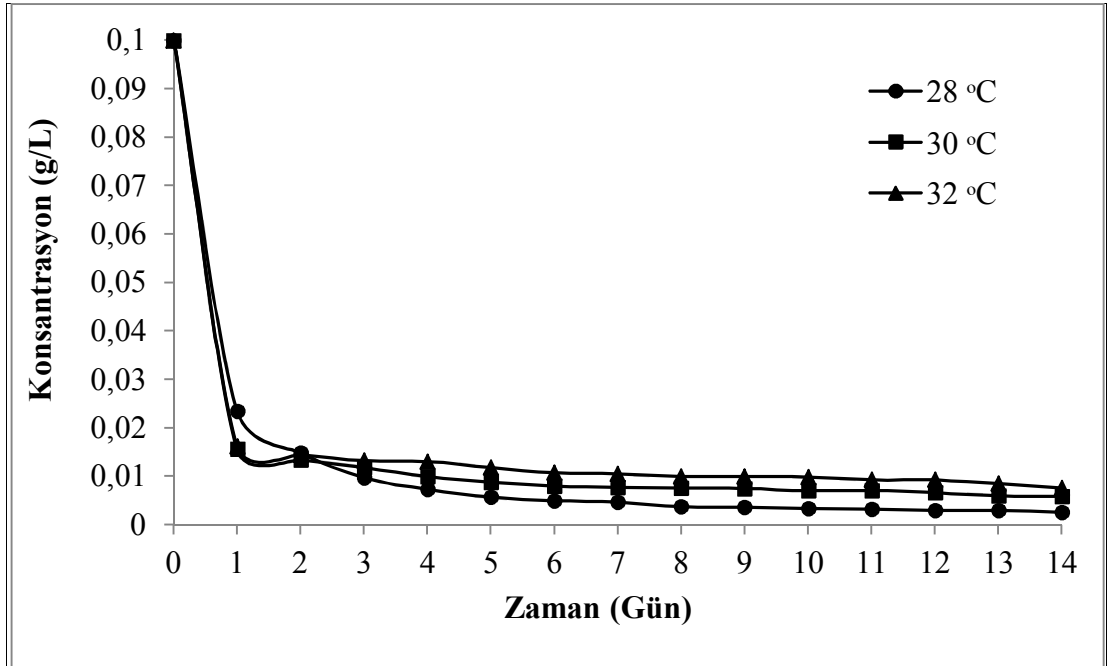


Grafik 3.12. Direct Brown 2 lakkaz aktivite grafiği**Grafik 3.13.** Direct Orange 26 lakkaz aktivite grafiği

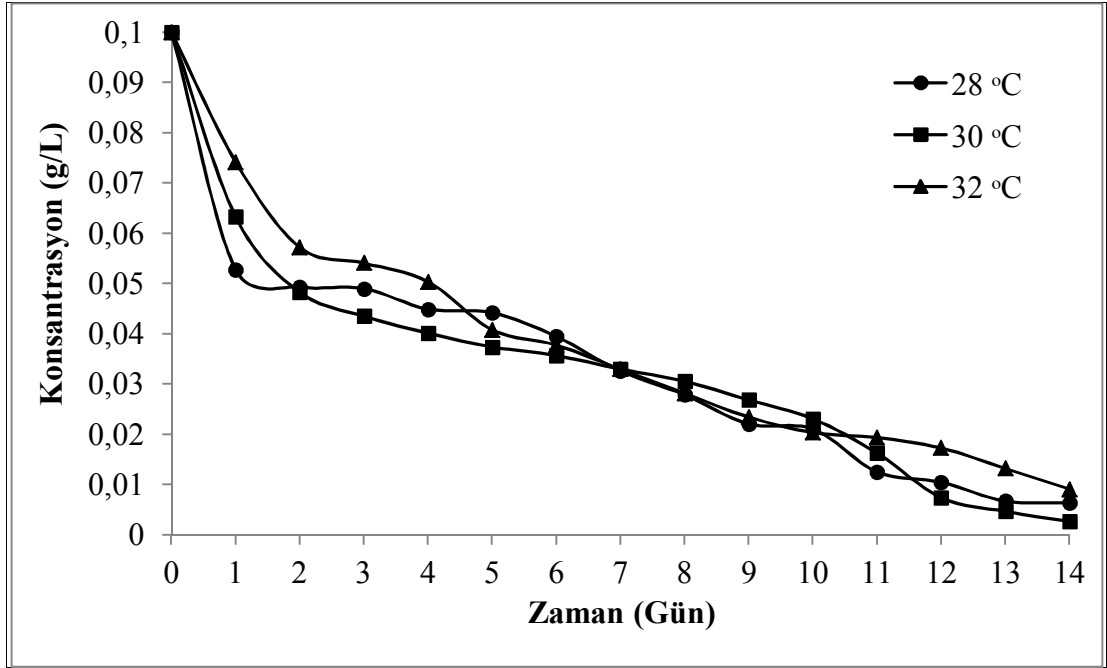
3.7. Sıcaklık Optimizasyon Sonuçları

Azo boyalarının *Pleurotus ostreatus* tarafından parçalanmasının sıcaklık artışıyla ilişkisini belirlemek için laboratuvar şartlarında üç farklı sıcaklıkta deney seti kurularak sıcaklığın etkisi araştırıldı. Farklı sıcaklıklar olarak 28 °C, 30 °C, 32 °C seçildi. *Pleurotus ostreatus* 28 °C de yetiştiği için bu sıcaklıklara yakın aralık tercih edildi. Deney sonuçları değerlendirilirken sıcaklık seviyeleri karşılaştırıldı. Elde edilen sonuçlar biyodegradasyon grafikleri ile gösterildi. Yapılan deneyler sonucunda üç farklı sıcaklıkta elde edilen verilere göre *Pleurotus ostreatus*'un yetiştirme sıcaklığından farklı bir sıcaklık, azo boyalarının parçalanma miktarının azalmasını göstermiştir. Yani en yüksek verime 28 °C'de gerçekleştirilen deney şartlarında ulaşılmıştır.

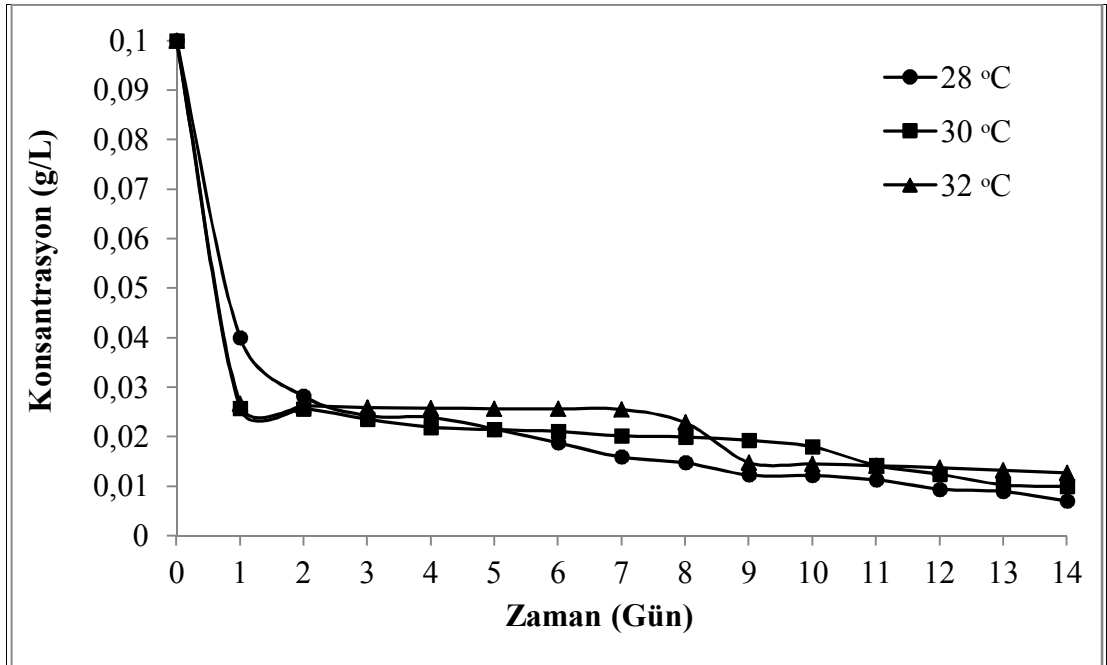
Grafik 3.14. Direct Black 22 sıcaklık optimizasyon grafiği



Grafik 3.15. Direct Brown 2 sıcaklık optimizasyon grafiği



Grafik 3.16. Direct Orange 26 sıcaklık optimizasyon grafiği



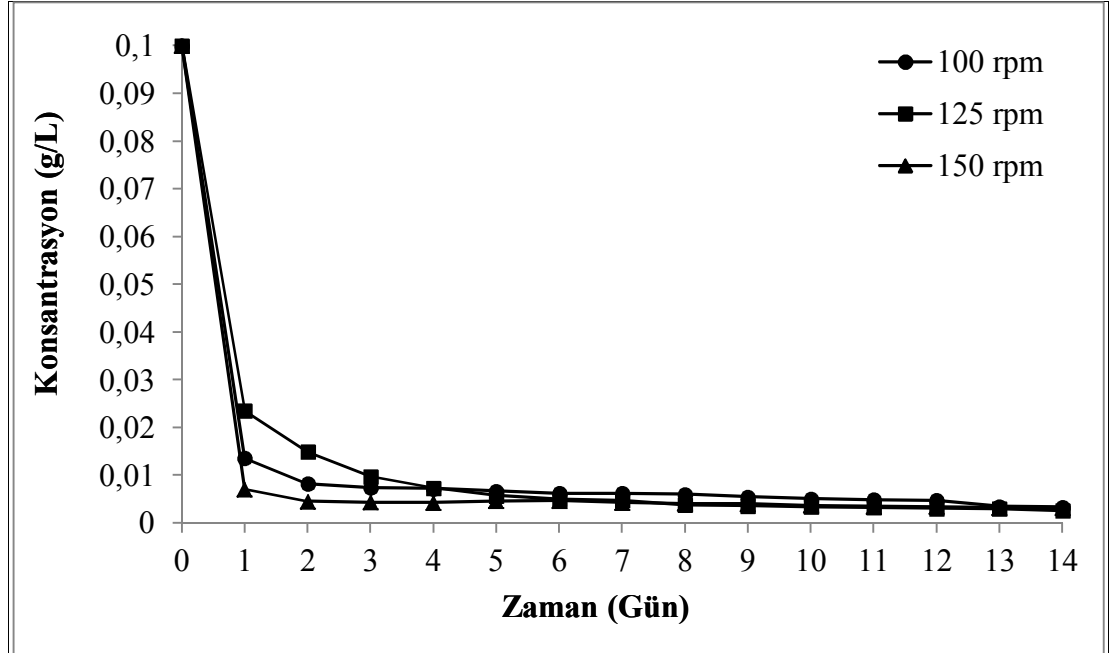
3.8. Çalkalama Hızı Optimizasyon Sonuçları

Sıvı ortamda gerçekleştirilen *Pleurotus ostreatus*'un azo boyaların degradasyonun da maksimum verim için çalkalama hızı (rpm) şartları belirlenmeye çalışılmıştır.

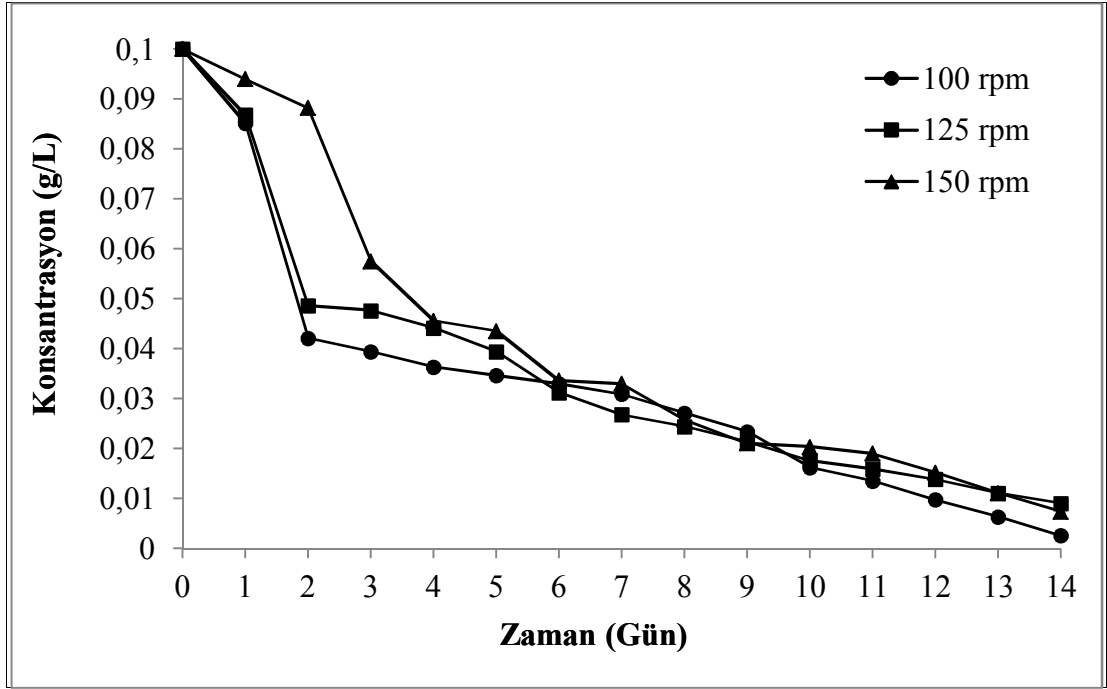
Literatür taraması sonucu *Pleurotus ostreatus* ile yapılan başka çalışmalarda 125 rpm optimum çalkalama hızı olarak belirlenmiştir. Bu amaçla 100 rpm, 125 rpm ve 150 rpm seçilerek optimum rpm aralıkları tercih edildi.

Elde edilen sonuçlar biyodegradasyon grafikleri ile gösterildi. Yapılan deneyler sonucunda maksimum enzim aktivite veriminin 125 rpm de gerçekleştirilen deney şartlarında ulaşıldı.

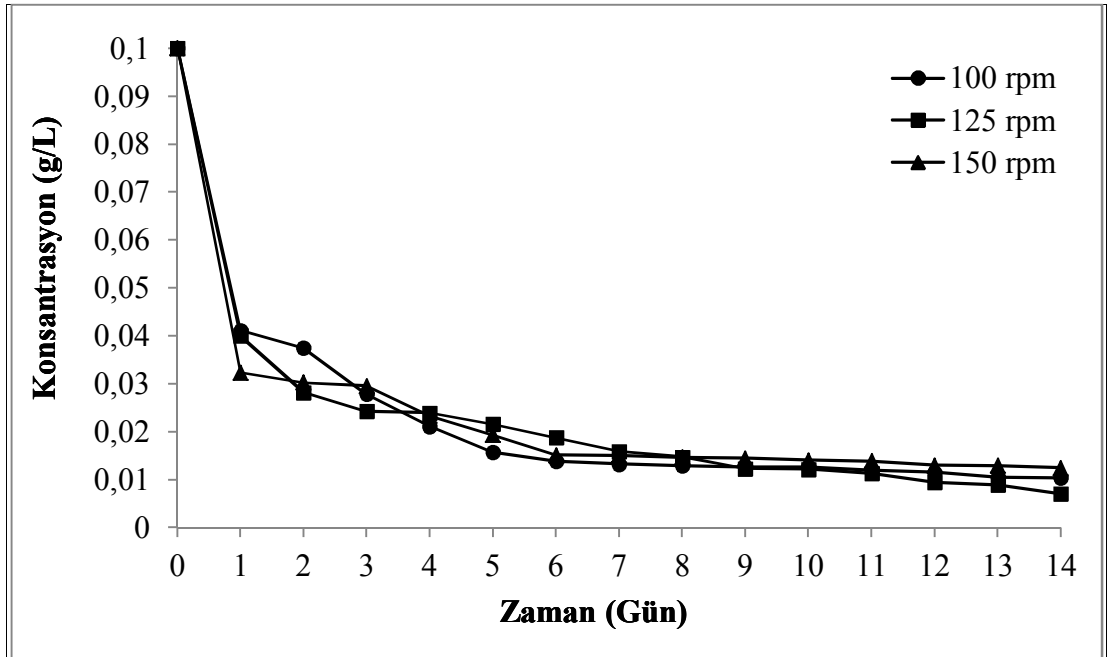
Grafik 3.17. Direct Black 22 çalkalama hızı (rpm) optimizasyon grafiği



Grafik 3.18. Direct Brown 2 çalkalama hızı (rpm) optimizasyon grafiği



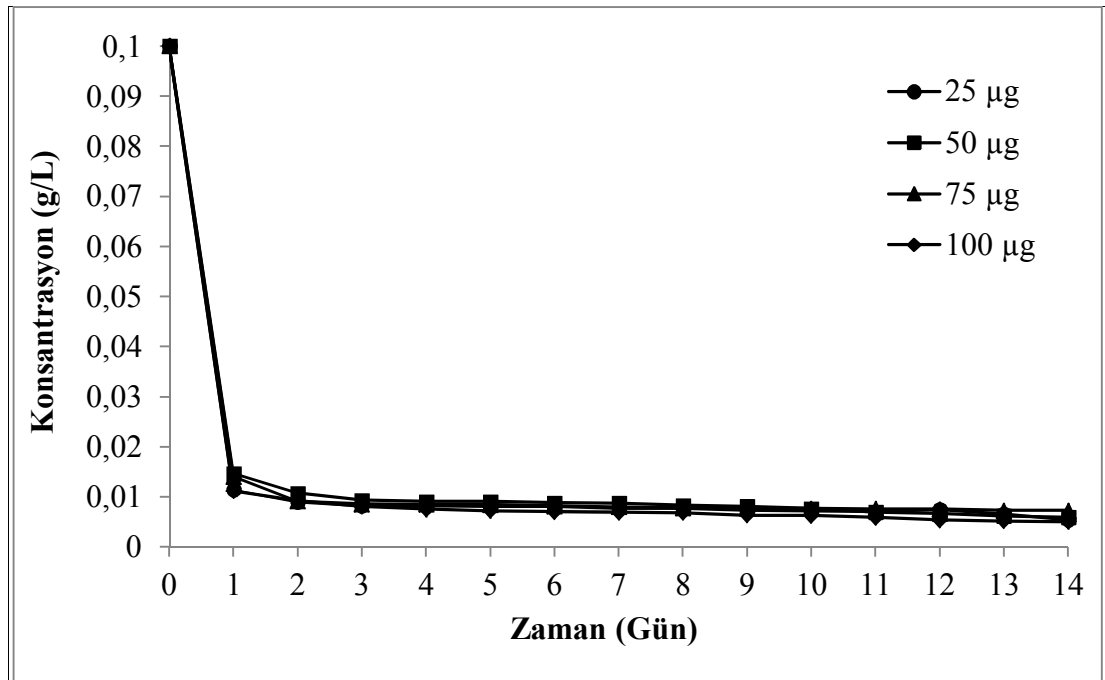
Grafik 3.19. Direct Orange 26 çalkalama hızı (rpm) optimizasyon grafiği



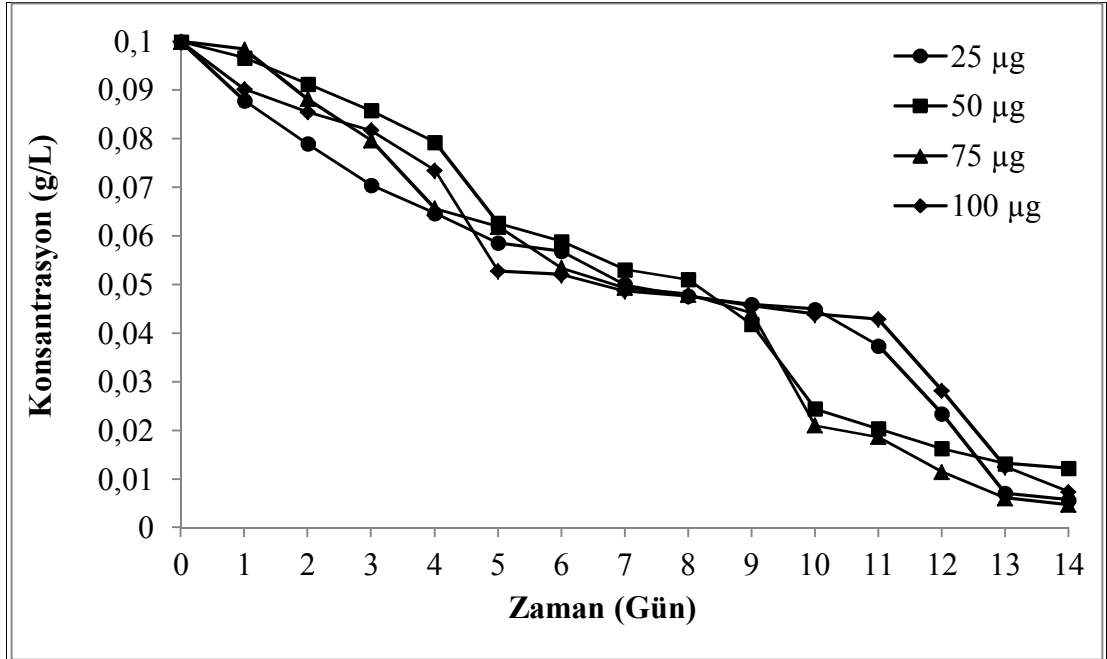
3.9. Sıvı Kültür Fermantasyon Sonuçları

Sıvı kültür fermantasyonu, avantaj ağaç endüstrisinin de atık olan malzemeyi kullanarak *Pleurotus ostreatus* ile azo boyalarının giderimini gerçekleştirdik. Buradaki avantaj ise atık bir maddenin giderimini yine atık bir madde ile sağlamış olmamızdır. Deney seti oluşturularak 25 µg, 50 µg, 75 µg ve 100 µg ağaç partiküllerini tartarak enzim üretim ortamlarına aktarıp parçalanmaya nasıl etkisi olacağı araştırılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda maksimum enzim aktivite verimi 25 µg olarak belirlendi. Elde edilen sonuçlar biyodegradasyon grafikleri ile gösterildi. Kullanılan ekipman, kullanılan canlı, azo boyanın parçalanması için gerekli süre ve benzer faktörler göz önüne alındığında bu yöntem uygun bir yöntem olarak belirlendi.

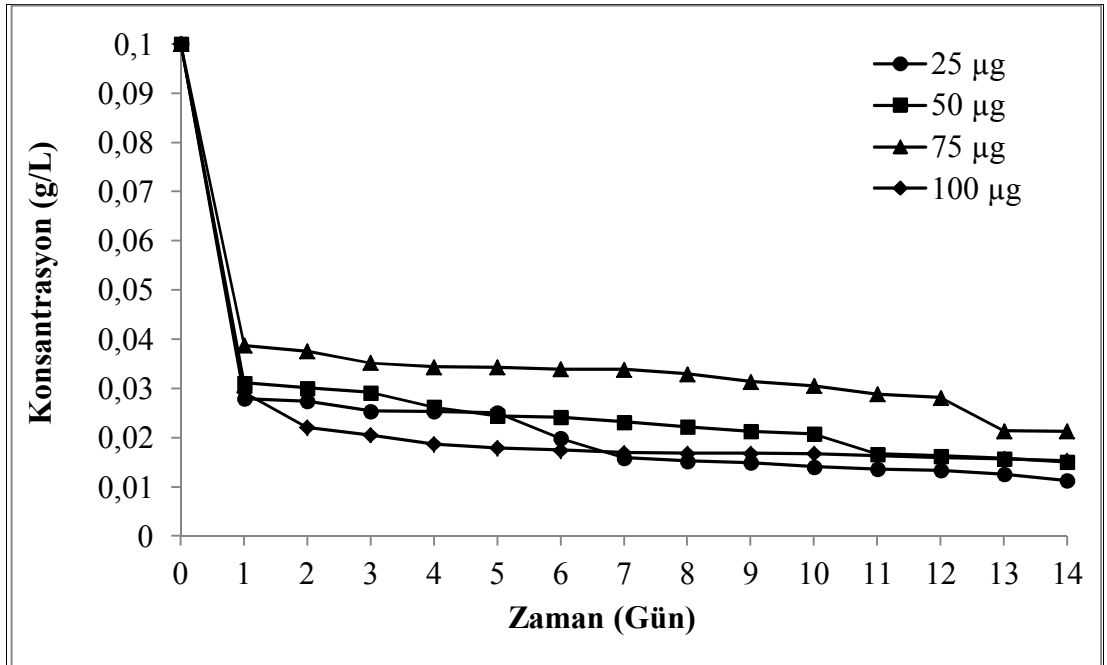
Grafik 3.20. Direct Black 22 sıvı kültür fermantasyonu optimizasyon grafiği



Grafik 3.21. Direct Brown 2 sıvı kültür fermantasyonu optimizasyon grafiği



Grafik 3.22. Direct Orange 26 sıvı kültür fermantasyonu optimizasyon grafiği



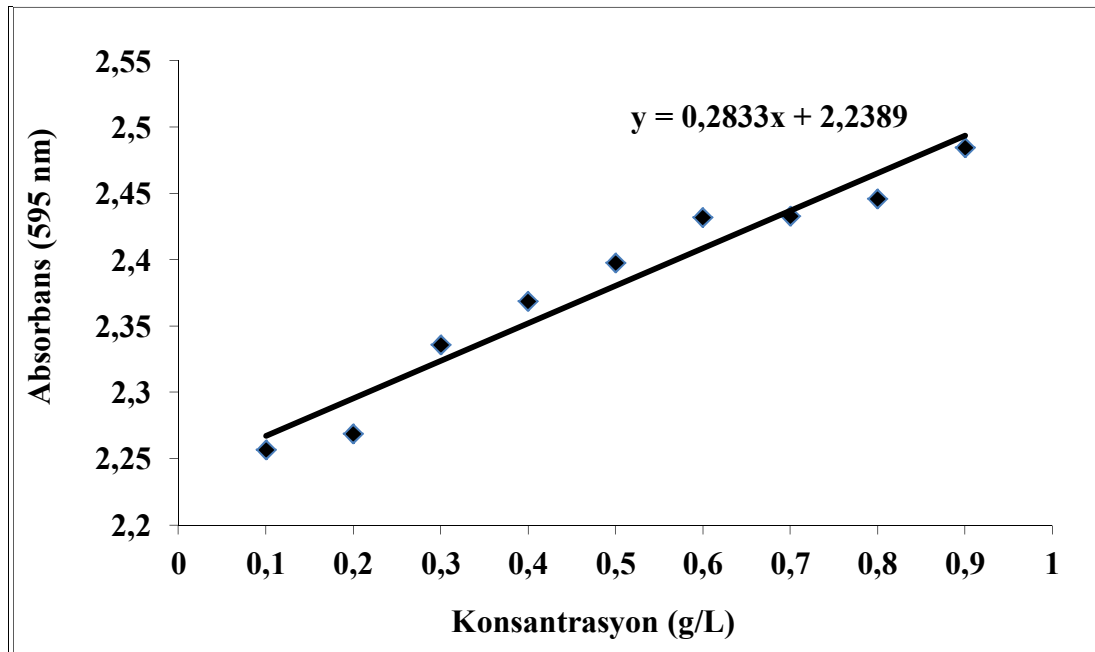
3.10. Biyokütle (Biyomas)Tayin Sonucu

Bir canlı ortamdaki maddeyi rahat bir şekilde kullanıp toksik etki görmüyorsa biyokütlesini arttırır. Çünkü bu ortam onun için elverişli bir yaşam alanıdır. Eğer toksik etki görüyorsa canlı toksik etkiyi metabolize edebilecek seviyede biyokütlesini sabitler. Denemelerimizde kullandığımız mantar koloni hücrelerinden her düzenek için 10 koloni hücresi alıp kuru ağırlıklarını tartarak canlı hücre miktarındaki artışa baktık. Toplam 10 koloni hücresinin kuru ağırlığı 0,0137 g olarak tartılmıştır. Bu 10 koloni hücresi 14 günün sonunda toplam hücre miktarındaki artışı 0,142 g olmuştur.

Üç farklı azo grubu boyaların üzerinde denemeler sonucunda hücrelerin kuru ağırlığı ise; Direct Black 22'de 0,128 g, Direct Brown 2'de 0,114 g, Direct Orange 26'da 0,129 g olarak tartılmıştır. Bunları Yüzde(%) olarak verecek olursak, Direct Black 22 % 90.14, Direct Brown 2 %80.28, Direct Orange 26 %90.49 oranında hücre artışı nicel olarak belirlenmiştir.

3.11. Bradford Yöntemi İle Total Protein Tayini Standart Grafiği

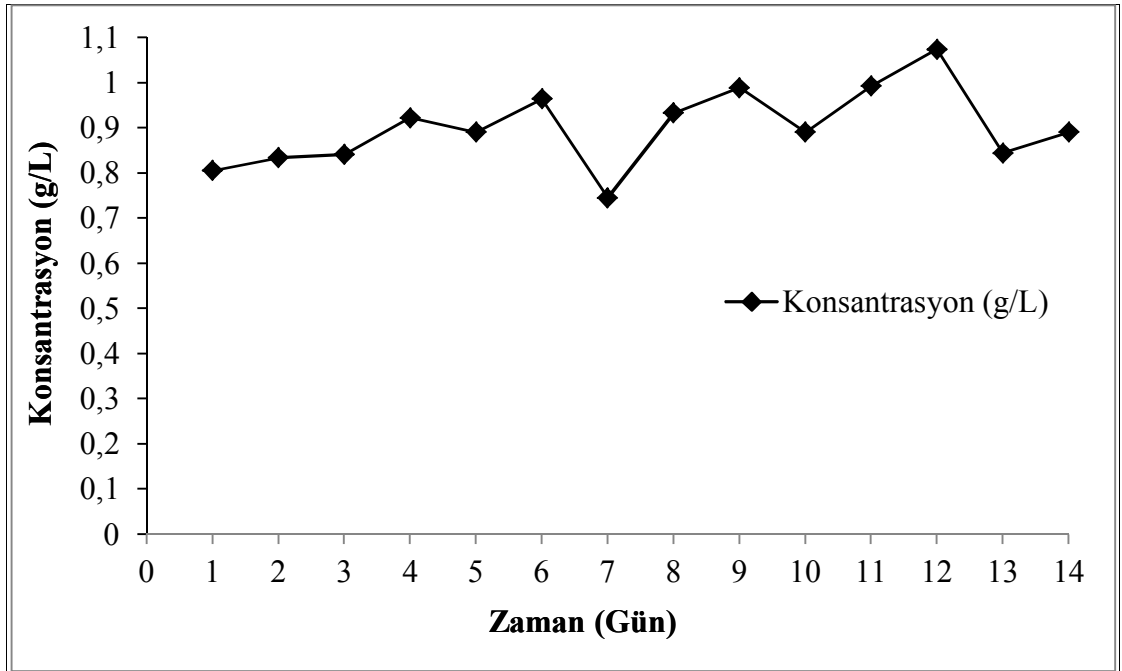
Grafik 3.23. Bradford yöntemi ile total protein tayini standart grafiği



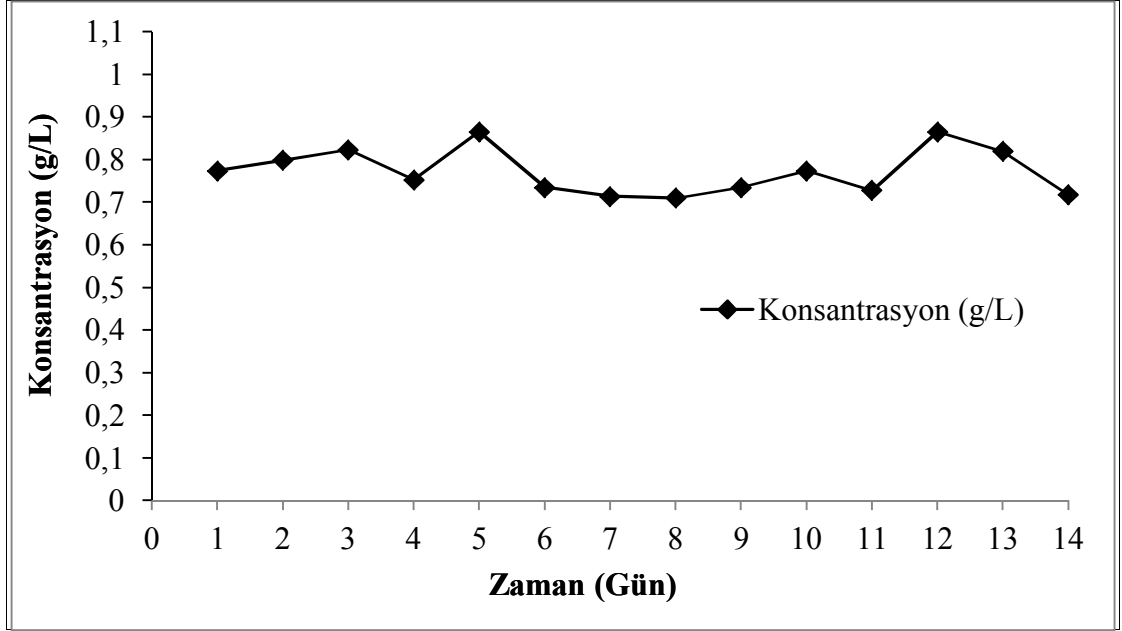
3.12. Bradford Yöntemi İle Total Protein Tayin Sonucu

Pleurotus ostreatus'un yapılan deney sonucunda üç farklı boya ortamında ne kadar protein ürettiği 14 günlük takip sonucun da belirlenmiş oldu.

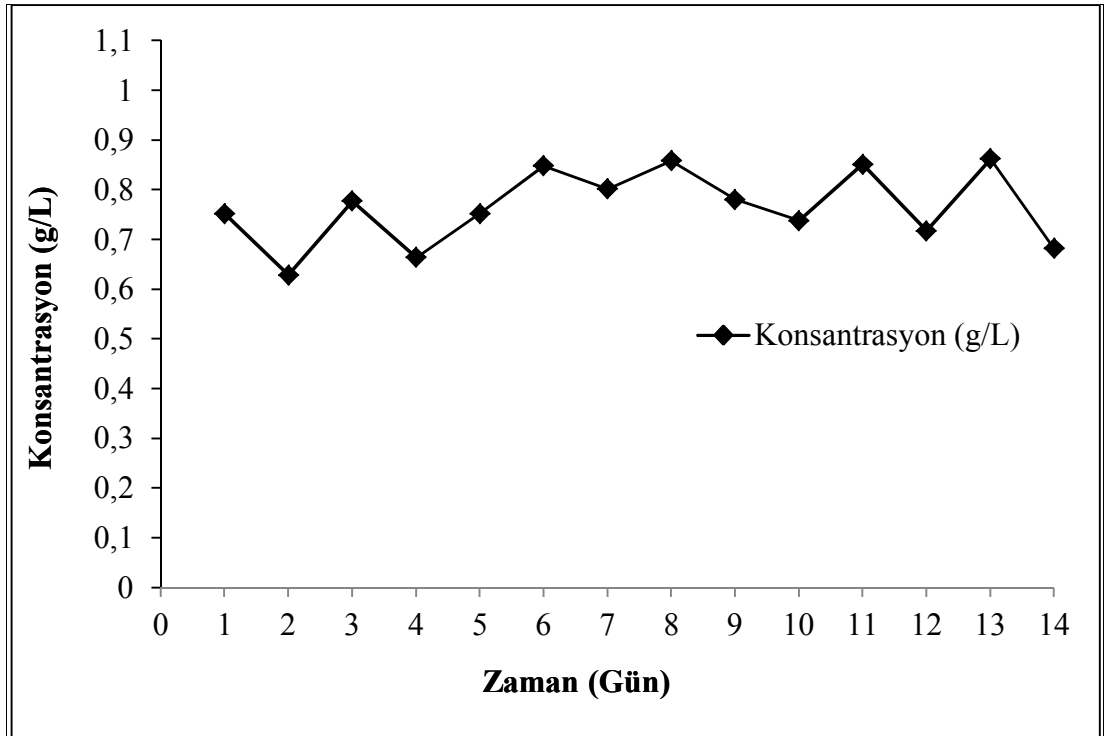
Grafik 3.24. Direct Black 22 bradford yöntemi ile total protein tayin grafiği



Grafik 3.25. Direct Brown 2 bradford yöntemi ile total protein tayin grafiği



Grafik 3.26. Direct Orange 26 bradford yöntemi ile total protein tayin grafiği



4. YORUM ve TARTIŞMA

Çalışmada kullanılan üç farklı toksik azo grubu boyaların spektrofotometrede hangi dalga boylarında pik verdiklerini ve boyanın hangi spektrum aralığında olduklarını belirledik. Belirlenen dalga boylarında ölçümler yaparak enzim üretim ortamında *Pleurotus ostreatus*'un parçaladığı boya miktarlarını hesapladık.

Bu hesap boyaları tekstil fabrikalarının deşarj sularının boya konsantrasyonuna göre enzim üretim ortamına ne kadar boya ilave edilmesi gerektiğini baz alınarak yapılmıştır.

Literatür taramaları sonucu çeşitli enzim üretim ortamları deneyerek hangilerinde daha fazla biyosorpsiyon ve biyodegradasyon olduklarını tesbit etmeye çalıştık. Ancak bu seçimi yaparken de boya giderim işleminin farklı besi ortamlarında birbirine yakın çıkma ihtimalini düşünerek çalışmayı yaparken de hangi ortamın daha az maliyetli malzeme kullandığımızı da göz önünde bulundurduk.

Enzim üretim ortamını belirlerken dört farklı içerik kompozisyonuna sahip ortamlar kullandık. Bunlardan;

Birinci ortamda (Bkz. Grafik 3.1 de görüldüğü gibi) boya miktarı 1. gün 0,0997 g/L konsantrasyona sahipken 7. günün sonunda 0,0054 g/L'ye düştüğü belirlenmiştir.

İkinci ortamda ise (Bkz. Grafik 3.1 de görüldüğü gibi) boya miktarı 1. gün 0,104 g/L konsantrasyona sahipken 7. günün sonunda 0,0051 g/L'ye düştüğü belirlenmiştir. Bu ortamda karbon kaynağı olarak mannitol kullanılmaktadır. Bu nedenle bu ortamı kullanmamamızdaki neden mannitol'ün çözünmesinin glukoza göre daha yavaş olduğudur.

Üçüncü ortamda ise (Bkz. Grafik 3.1 de görüldüğü gibi) boya miktarı 1. gün 0,0949 g/L konsantrasyona sahipken 7. günün sonunda 0,1873 g/L'ye yükseldiği belirlenmiştir. Bu ortamda boya giderimi gözlenmedi ve aynı zamanda kontaminasyon gerçekleşti.

Dördüncü ortamda ise (Bkz. Grafik 3.1 de görüldüğü gibi) boya miktarı başlangıçta 0,0896 g/L konsantrasyona sahipken 7. günün sonunda 0,0759 g/L'ye düştüğü belirlenmiştir. Bu ortamda boya gideriminin çok yavaş ve ortama konulan malzeme (Bkz. Tablo 2.7.) çok fazla olduğundan tercih etmedik.

Bu deney sonucunda birinci ortam bizim çalışmalarımız için daha az maliyet ile optimum verimi sağlamıştır.

Pleurotus ostreatus'un laboratuvar ortamında gelişimi ve stok olarak saklanabilmesi için Rose Bengal Agarı (RBA) seçtik. Rose Bengal Agarın özelliği içerisinde antibiyotik bulunduğundan bakteriler tarafından kontaminasyon ihtimalini düşürdüğünden ve aynı zamanda *Pleurotus ostreatus*'un hiflerinin RBA'da gelişiminin daha iyi olduğundan bu stok besiyerini seçtik. Potato Dekstroz Agarda (PDA) kontaminasyon riski yüksek olduğundan dolayı bu besiyerini stok ortamı olarak tercih etmedik.

Denemesi yapılan boyaların gün gün boya giderimine bakılarak; lakkaz, mangan peroksidaz ve lignin peroksidaz enzimlerinin aktiviteleri takip edildi.

Enzim üretim ortamlarındaki boyaların boya giderimini yüksekten düşüğe doğru karşılaştırdığımızda boya giderimi başlangıçta Direct Black 22'de 100 ml de 0,01 g boya varken 14.günün sonucunda 0,00286 g/ml kadar boya kalmıştır. Direct Brown 2'de başlangıçta 100 ml de 0,01 g boya varken 14.günün sonucunda 0,00203 g/ml kadar boya kalmıştır. Direct Orange 26'da başlangıçta 100 ml de 0,01 g boya varken 14.günün sonucunda 0,00873 g/ml kadar boya kalmıştır.

Yaptığımız çalışmalarda gün gün takip edilen polifenol oksidaz (PPO), lakkaz, lignin peroksidaz (LiP) ve mangan peroksidaz (MnP) enzimlerinin aktivite tayinlerinde lakkaz enziminin aktivitesinde gözle görülür bir şekilde değişiklik saptandı.

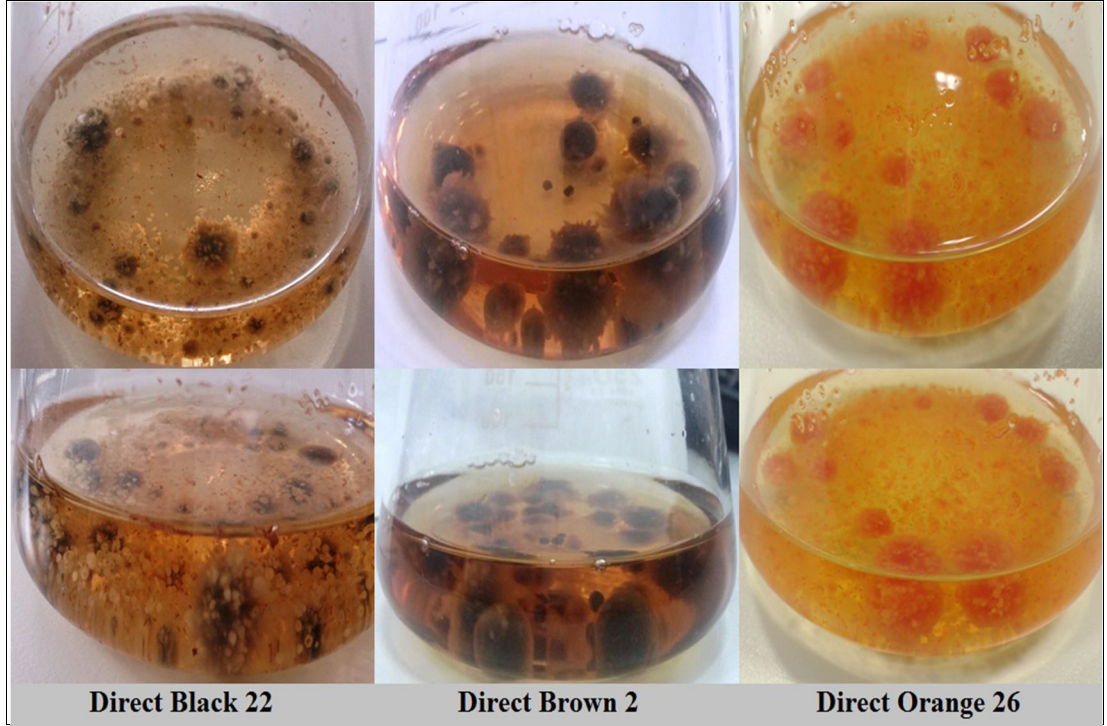
Boyaların maksimum aktivite verdiği günler belirlendi. Direct Black 22 maksimum lakkaz aktivitesi verdiği 7. gün 365 U/L'de boyanın %97,1 kadarı çözülmüştür. Direct Brown 2 maksimum lakkaz aktivitesi verdiği 9. gün 415 U/L'de boyanın %79,6 kadarı çözülmüştür. Direct Orange 26 maksimum lakkaz aktivitesi verdiği 13. gün 516 U/L'de boyanın %91,2 kadarı çözülmüştür.

Denemelerimizde kullanacağımız mantar koloni hücrelerinin gelişimleri 250 ml'lik erlenlerde gerçekleştirileceği için sabit 10 koloni hücresi olarak çalışmalarını gerçekleştirdik. Bu hücreleri 60 °C'de kurularak bunların kuru ağırlıklarını tartıp canlı hücre miktarındaki artışı inceledik.

Kütle artışındaki değişimler izlenmiş olup Şekil 4.1.' de mevcuttur. Bu artışın önemi ise eğer bir canlı ortamdaki maddeyi rahat bir şekilde kullanıp da toksik etki görmüyorsa canlı ortamda biyokütlesini arttırarak yaşamına devam eder.

Çünkü bu ortam canlı için yaşama uygun bir ortamdır. Bu da canlının biyokütlesini çoğaltması ve protein miktarının artması anlamına geldiğinden ortamda bulunan toksik maddenin parçalanması da o kadar çabuk gerçekleşir.

Ancak canlı biyokütlesini arttırmayıp sabit tutuyorsa ortamın toksisitesi fazla olduğundan büyüme ve gelişme işlemi için gerekli enerji sağlayamadı için canlı toksik etkiyi metabolize edebilecek seviyede biyokütlesini sabitleyerek giderimi az bir verimle gerçekleştirir.



Şekil 4.1. Hücrelerin farklı azo boyalardaki biyokütle artışı

Hücrelerin enzim üretim ortamların da sıcaklık optimizasyonu, çalkalama hızı optimizasyonu, doğal besinini olan ağaç parçalarını kullanarak sıvı kültür fermentasyonu ve hangi enzimlerin biyodegradasyon da rol oynadıkları belirlendi.

- Sıcaklık optimizasyonunu, toksik boyaların hangi sıcaklıkta daha iyi degrede olduklarını ve hücrelerin hangi sıcaklık aralığında maksimum aktivite verdiğini belirlemek amacı ile yapıldı.
- Çalkalama hızı optimizasyonu, erlenlerde bulunan enzim üretim ortamlarının çalkalama hızlarını sabitleyerek oksijen transferinin hangi aralıkta olduğunu belirleyip maksimum enzim aktivite verimini arttırma amacıyla yapıldı.

- c. Sıvı kültür fermantasyon optimizasyonu, bu yöntemin avantajı ağaç endüstrisinde atık olan malzemeyi kullanarak parçalamak istediğimiz azo boyalarını parçalayarak atık bir maddenin giderimini yine bir atık madde ile sağlamış olduk. Ayrıca, enerji olarak kullanabileceğimiz karbon kaynağını ağaç artıklarından sağlamış olduğumuzdan glikoz olarak kullandığımız karbon kaynağından biraz daha tasarruf etmiş olduk.
- d. Bir başka yaklaşım olarak da kullandığımız ağaç parçacıkları canlının yani enzimin doğal substratı olduğundan dolayı bir gen induksiyonuna neden olarak ekspresyon düzeyinin hızlanması ile genin daha fazla çalışacağı düşünülmüş verimin artması sağlanmıştır.

Enzimler sıcaklık arttıkça veya azaldıkça katlanmaları değişmeye yani açılmaya başlar. Primer yapıdaki amino asit zincirleri birbirinden uzaklaşmaya başlar. Çünkü hidrojen bağlarının, van der waals bağlarının, dipol-dipol etkileşimlerin, iyon-dipol etkileşimlerin, iyonik etkileşimlerin hepsinin bağ yapabilmesi ve birbirlerinin arasında etkileşim olabilmesi için enerji ihtiyacının olması gerekir. Ancak bu enerji ihtiyacı ısı tarafından verildiğinden dolayı protein artık bağ yapma isteğini ortadan kaldırmaya başlar. Ortamın ısınmasıyla da enerjiye gerek kalmadı için amino asitler birbirinden uzaklaşmaya başlar.

Açıldıkça aktif merkezde görev alan amino asit rezidüleri yani amino asitlerin R grupları birbirlerinden uzaklaşır ve substratı dönüşüme uğratma mekanizması zayıflamaya ve gecikmeye başlar bu durumda aktivite düşer.

Ancak burada proteinin tamamı ile denature olduğu anlamına gelmiyor katlanmaların açılması anlamına geliyor. Çünkü denatürasyon en son aşamadır ve bu aşamaya gelen protein artık geri kullanılamaz. Bu işlemde sıcaklık artmasıyla proteinin konformasyonunun bozulması sonucu aktivitesini tam yerine getiremeyecek düzeyde etkilenir. Konformasyonel bozulmadan ötürü de aktivite azalır.

Boya giderimi olur ama %100 aktivite ile gerçekleşmediğinden boya giderimi biraz daha az gözlemlenir.

Boya gideriminin de sorumlu olan bazı mekanizmalar vardır. Bu mekanizmaların etkilenmesi sonucu biyodegradasyon durur veya azalır. Bu mekanizmaların başında RNA polimeraz enzimi gelir. Bu enzim boya gideriminden sorumlu olan mekanizmaya ait olan enzimin gen bölgesini transkripsiyonunu sağladığından sıcaklık değişimlerinde sistem zarar görür yani enzimlerin ve proteinlerin sıcaklıkları 28 °C ise bunun üzerindeki bir sıcaklıkta bütün sistem durur. Biyodegradasyon için gerekli enzim üreten genler çalışmadığından aktivite durur veya yavaşlamaya başlar.

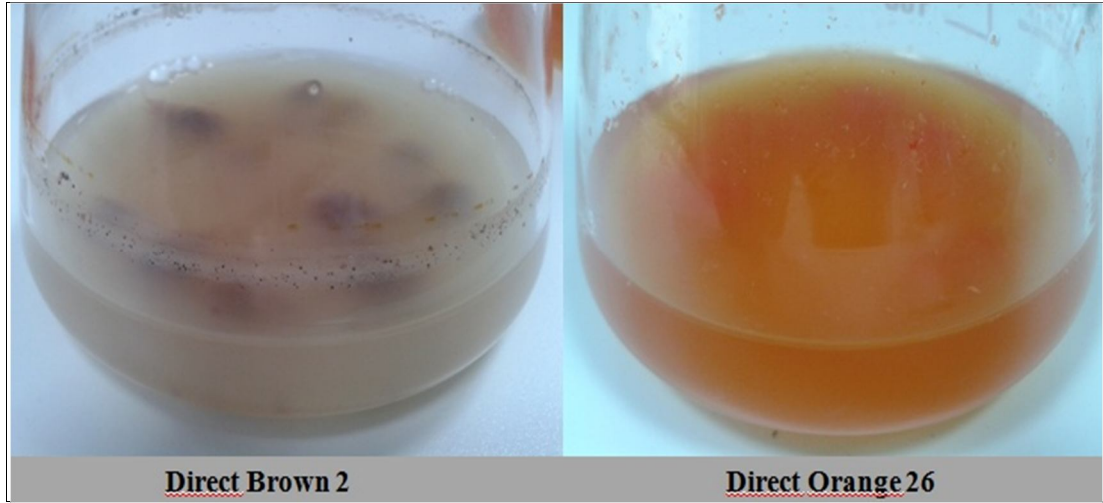
Biyosorpsiyon için ise hücre kanal proteinleri olan taşıyıcı proteinlerin optimum çalışma sıcaklıkları vardır. Farklı bir sıcaklık bu proteinlerin yapısında değişikliğe neden olabilir. Ayrıca farklı bir sıcaklık beklide kanalın yapısını bozacağından por çapını küçülterek boya geçmesini engelleyecek veya por da boyayı tanınması için gerekli ve hücre yüzeyinde olan glikozaminoglikanların yapısı bozulacak bu durumda sıcaklık yükselince biyosorpsiyon elemanları da etkilenmiş olacak ve bu durumda biyosorpsiyonda yavaşlamaya başlayacak.

Sıcaklık diğer bir etkisi de artınca gazların sudaki çözünürlüğünü azaltmasıdır. Bu durumda gaz sudan havaya geçer. Dolayısıyla ortamda oksijen olmadığında enzim aktivitesini gösteremez. Böylelikle biyodegradasyon azalır.

Başka bir açıdan baktığımızda ise sıcaklığın artması ile ortamda bulunan oksijenin uzaklaşması sonucunda ortamda H⁺ yoğunluğu fazlalaşır ve pH düşer. Bu durumda asidik değer arttığından hücre ölür.

Yaptığımız çalışmalarda sistematik hata ile karşılaştık 32 °C deki ortamı her türlü olasılıkları gözden geçirerek tekrar tekrar yaptık ancak yine de kontaminasyon gözlemlendi bu durum bize boyanın kimyasal özelliğinden kaynaklanabileceğini gösterdi.

Bazı boyaların kimyasal özelliği bazı bakterilerin gelişimini engeller. Zaten boyaların azo gurubu boyalar toksik boyalardır. Mantarlar bu boyalara karşı direnç gösterebiliyor ancak bazı bakteriler direnç gösteremiyor. Kullandığımız Direct Brown 2 ve Direct Orange 26 boyalarında 32 °C kontaminasyon gözlemlendi (Bkz. Şekil 4.2.). Bu boyaların bakteriye karşı toksisitesi daha az olduğundan sıcaklık arttıkça bakterinin sıcaklık ile bölünme sayısı fazlalaşacağından daha çabuk çoğalmıştır. Bu nedenle ortamı kontamine etmiştir. Bu durum tamamen boyanın kimyasal özelliği ile alakalıdır.



Şekil 4.2. Bazı azo gurubu boyaların 32 °C sıcaklıktaki kontaminasyonu

Bu nedenle Boya degradasyonu ve biyosorpsiyonu açısından biz 28 °C de olmasına karar verdik.

KAYNAKLAR

- Esmeray, N. C. E., “Petrol Kirliliği ve Biyoremediasyon”, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi Muğla Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü*, Muğla, 5 (1): 95-101, (2012).
- Ceyhan, Esmeray, “Petrol Kirliliği ve Biyoremediasyon”, *Muğla Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü*, Muğla, (2012).
- Aslan, S., Bozkurt, Z., Tekeli, A. N., “Review Paper Removal Of Cu (I), Ni (I), Cd (I) And Cr (VI), Ions From Aqueous Solutions By Biosorption Processes”, *Journal of Engineering and Natural Sciences Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi Derleme Makalesi*, 4 (2):69-77 (2007).
- Bilgin, C., “Gemi Kökenli Petrol Kirliliğinin Biyolojik Yöntemlerle Giderilmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Deniz Teknolojisi Mühendisliği*, İstanbul, Sayfa 39-43, Haziran, (2003).
- Murray, P. R., “Medical Microbiology”, *St. Louis: mosbay*, 616, (1990).
- Öner, M., “Genel Mikrobiyoloji Kitabı” *Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi*, İzmir, (2004).
- Aysel, V., Güner, H., Sukatar, A., “Tohumuz Bitkiler Sistematığı”, *Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi*, 2.cilt, 96-114-115-120-121, İzmir, (2006).
- Kıvanç, M., Güven, K., “Genel Biyoloji Kitabı”, *Anadolu Üniversitesi*, Eskişehir, (2009).
- Sernek, M., Boonstra, M., Pizzi, A., Despres, A., Gerardin, P., “Bonding performance of heat treated wood with structural adhesives”, *European Journal of Wood and Wood Products*, 66(3): 163-242, (2008).
- Sjostrom, E., “Wood Chemistry: Fundamentals and Applications”, *Second Edition, Academic Press*, San Diego-California 92101-4495 USA, 293, (1993).

- Kirk, K., Cullen, K., Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry”, *John Wiley And Sons*, Inc. New York. 273-307, (1998).
- Palonen, H., “Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose”, *Journal of Biotechnology*, 107(1):65-72, (2004).
- Sarkanen, K. V., Ludwig C. H., “Lignins”, *Wiley-Interscience*, New York, (1971).
- Bademkiran, P., “*Trametes versicolor* ve *Phanerochaete chrysosporium* BKM-f 1767 lakkazlarının; indükleyiciye bağlı verimli salgılanma koşullarının ve indigo boyalar üzerindeki etkilerinin iyileştirilmesinde uygun medyatörün araştırılması”, Yüksek lisans tezi, *Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Diyarbakır, sayfa 3, (2011).
- Kirk, T., Farrell, R., “Enzymatic “combustion” the microbial degradation of lignin”, *Annu Rev Microbiol*, (41): 465–505, (1987).
- Erikson, K., Blanchette, R. A., Ander, P., “Biodegradation of Lignin. In: Timell TE (ed), Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components”, *Springer-Verlag*, New York, 225-399, (1990).
- Michael, J., Carlile, S. C., Watkinson, G. W. G., “The Fungi”, *Academic Press 2. baskı*, 588, *San Diego (calif.)*, (2001).
- Kapdan, K. I., Kargi, F., “Biological Decolorization of Textile Dye stuff Containing Wastewater by *Coriolus versicolor* in Rotating Biological Contactor”, *Enzyme and Microbial Technology*, 30, 195-199, (2001).
- Zhang, F., Knapp, J. S., Tapley, K. N., “Decolourisation of Cotton Bleaching Effluent with Wood Rotting Fungus”, *Water Resources*, 33, 919-928, (1999).
- Wesenberg, D., Buchon, F., Agathos, S. N., “Degradation of Dye Containing Textile Effluent by Agaric White - Rot Fungus *Clitocybula dusenii*”, *Biotechnology Letters*, 24: 989-993, (2002).
- Ralp, J. P., Graham, L. A., Catcheside, D. E. A., “Extracellular Oxidases and the Transformation of Solubilised Low-rank Coal by Wood-rot Fungi”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46: 226-232, (1996).

- Stolz A., "Basic and Applied Aspects in the Microbial Degradation of Azo Dyes, App.", *Microbiol Biotechnol.* 56: 69-80, (2001).
- Zadrazil, F., Brunnert, F., "Investigation of Physical Parameters Important for Solid State Fermentation of Straw by White Rot Fungi, Eur. J. Appl.", *Microbiol Biotechnol.*, 11, 183-188, (1981).
- Platt, M. K., Hadar, Y., Chet, I., "Fungal Activities Involve in Lignocellulose Degradation by *Pleurotus*", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 20: 150-154, (1984).
- Pointing, S. B., "Feasibility of bioremediation by white-rot fungi", *Appl Microbiol Biotechnol.* (57):20-33, (2001).
- Kapdan İ. A., Kargı, F., "Atıksulardan Tekstil Boyar Maddesinin *Coriolous versicolor* ile Dolgulu Kolon Reaktörde Giderimi", *İ.T.Ü. 7. Endüstriyel Kirlenme Kontrolü Sempozyumu*, İstanbul, 1-7, (2000).
- Cripss, C., Bumpus, J. A., Aust, S. D., "Biodegradation of azo and hetero- cyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*", *Appl. Environ. Microbiol.*, (56): 1114-1118, (1990).
- Tien, M., Kirk, T. K., "Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds.", *Science* 221:661-663, (1983).
- Tien, M, Kirk, T. K., "Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium*: purification, charecterization, and catalytic properties of a unique H^2O^2 - requiring oxygenase", *Proc natl acad sci* 81: 2280-2284, (1984).
- Crawford, R. L., "The chemical structure of lignin and tye use of various lignin preparations for microbial studies In: Lignin Biodegradation and Transformation", New York, *Wiley and Sons*, 7-19, (1981).
- Ardon, O., Kerem, Z., Hadar, Y., "Enhancement of Lignin Degradation and Laccase Activity in *Pleurotus ostreatus* by Cotton Stalk Extract", *Canadian Journal of Microbiology*, 44: 676-680, (1998).
- Nyanhango, G. S., Gomes, J., Gübitz, G. M., Zvauya, R., Read, J., Steiner, W., "Decolorization of Textile Dyes by Laccase From a Newly Isolated Strain of *Trametes modesta*", *Water Res.*, 36: 1449-1465, (2002).

- Swami, J., Ramsay, J.A., “The Evaluation of White – Rot Fungi in The Decolorization of Textile Dyes. Enzyme”, *Microb. Technol.*, 24: 130-137, (1999).
- Dhawale, S. S., Lane, A. C., Dhawale, S. W., “Effects of Mercury on White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*”, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 56: 825-832, (1996).
- Gabriel, J., Kofronova, O., Rychlovsky, P., Krenzelok, M., “Accumulation and Effect of Cadmium in The Wood-Rotting Basidiomycete *Daedalea quercina*”, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 57: 383-390, (1996).
- Cardoso, M. B., Nicoli, J. R., “Single Cell Protein From The Thermotolerant Fungus *Phanerochaete chrysosporium* Grown in Vinasse”, *Nutrition Reports International*, 24(2): 249-255, (1981).
- Rogalski, J., Lundell, T., Leonowicz, A., Hatakka, A., “Production of Laccase Lignin Peroxidase by Various Strains of *Trametes versicolor* Depending on Culture Condition”, *Acta Microbiologica Polonica*, 40: 221-234, (1991).
- Kuhad, R.C., Singh, A., Eriksson, K., “Microorganisms and Enzymes Involved in The Degradation of Plant Fiber Cell Wall”, *In: Eriksson KEL, Editor. Biotechnology in The Pulp and Paper Industry. Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*. Berlin: Springer Verlag: (1997).
- Couto, S. R., Herrera, J. L. T., “Industrial and Biotechnological Applications of Laccase”, *A Review. Biotechnology Advances*, 24: 500-513, (2006).
- Jaouani, A., Tabka, M. G., Pennickx, M. J., “Lignin Modifying Enzymes of *Coriopholis polyzona* and Their Role in Olive Oil Mill Wastewater Decolourisation”, *Chemosphere*, 9: 1421-1430, (2006).
- Yeşilada, Ö., Bozcuk, A. N., “Alkol Fabrikası Atığının Renginin Gideriminde Bazı Beyaz Çürükçül Fungusların Kullanımı”, *Çevre Biyolojisi Sempozyumu*, Ankara, (1990).
- Duran, N., Esposito, E., “Potential Applications of Oxidative Enzymes and Phenoloxidase-Like Compounds in Wastewater and Soil Treatment”, *A Review. Appl. Catal B Environ.*, 28: 83-99, (2000).

- Golz-Berner, K., Walzel, B., Zastrow, L., Doucet, O., “Cosmetic and Dermatological Preparation Containing Copper- Binding Proteins for Skin Lightening”, *Int Pat Appl.* WO2004017931, (2004).
- Haghighi, B., Gorton, L., Ruzgas, T, Jonsson, L. J., “Characterization of Graphite Electrodes Modified With Laccase From *Trametes versicolor* and Their Use For Bioelectrochemical Monitoring of Phenolic Compounds in Flow Injection Analysis”, *Anal. Chim. Acta*, 487: 3-14, (2003).
- Cohen, R., Persky, L., Hadar, Y., “Biotechnological Applications and Potential of Wood-Degrading Mushrooms of the Genus *Pleurotus*”, *Appl. Microbiol Biotechnol.*, 58:582- 594, (2002).
- Alexopoulos, C. J., Mims, C. W., Blackwell, M., “Introductory Mycology”, *Fourth Edition, John Willey and Sons, Inc.* New York, (1996).
- Champ, Q., “Oyster mantarı”, *Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Sakarya İl Müdürlüğü Mantar Yetiştiriciliği*, Jura. Vosg.; 1: 112. (1872).
- Jwanny, E. W., Rashad, M. M., Abdu, H. M., “Solid State Fermentation of Agricultural wastes into Food through *Pleurotus* Cultivation”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 50: 71- 78, (1995).
- Patrabansh, S., Madan, M., “Studies on Cultivation, Biological Efficiency and Chemical Analiysis of *Pleurotus sajor-caju* (FR.) Singer on Different bio-wastes”, *Acta Biotechnology*, 17(2), 107-122, (1997).
- Ağaoğlu, Y., S., Güler, M., “Doğal ve Kültüre Alınabilir Mantar Türleri-II”, *Kayın Mantarı (Pleurotus spp.) Yetiştiriciliği. T.C. Orman Bakanlığı, Orman GenMüd.*, Ankara, 46 s, (1991).
- Breitenbach, J., Kränzlin, F., “Fungi of Switzerland”, *Vol. 1-6, Verlag Mykologia Lucerne*, Switzerland [35], (1984 – 2005).
- Jordan, M., “The Encyclopedia of Fungi of Great Britain and Europe”, *David& Charles Book Co.*, UK. 384s [110], (1995).
- İşiloğlu, M., Watling R., “Macromycetes of Mediterrenean Turkey”, *Edinburg Journal of Botany*, 49 (1): 99–121 [100], (1992).

- Seesuriyachana, P., Takenakab, S., Kuntiyaa, A., Klayraungc, S., Murakamib, S., Aokib, K., “Metabolism of azo dyes by *Lactobacillus casei* TISTR 1500 and effects of various factors on decolorization”, *Water Research*, 41: 985 – 992, (2007).
- Kapdan, İ. K., Kargı, F., “Atık Sulardan Tekstil Boyar Maddelerinin Adsorpsiyonlu Biyolojik Arıtım İle Giderimi”, *Turk J. Engin. Environ. Sci.*, 24: 161-169, (2000).
- Kuai, L., De Vreese, I., Vandevivere, P., “GAC-Amended UASB Reactor for The Stable Treatment of Toxic Textile Wastewater”, *Environmental Technology*, 19: 1111-1117, (1998).
- Zaoyan, Y., Ke, S., Guangling, S., Fan, Y., Jinshan, D., Huanian, M., “Anaerobic – Aerobic Treatment of a Dye Wastewater by Combination of RBC With Activated Sludge”, *Water Sci. Technol.*, 26(9-11): 2093-2096, (1992).
- An, H., Qian, Y., Gu, X., Tang, W. Z., “Biological Treatment of Dye Wastewater using Anaerobic-Oxic System”, *Chemosphere*, 33(12): 2533-2452, (1996).
- Zollinger, H., “Color Chemistry”, *VCH, Weinheim*, Germany, 496, (1991).
- Sumathi, S., Manju, B. S., “Uptake of Reactive Textile Dyes *Aspergillus foetidus*”, *Enzyme and Microbial Technology*, 27: 347-355, (2000).
- Fu, Y., Viraraghavan, T., “Removal of Congo Red From an Aqueous Solution by Fungus *Aspergillus niger*”, *Advances in Environmental Research*, 7: 239-247, (2002).
- Carliell, C. M., Barclay, S. J., Naidoo, N., Buckley, C. A., Mulholland, D. A., Senior, E., “Microbial Decolourisation of a Reactive Azo Dye Under Anaerobic Conditions”, *Water(SA)*, 21: 61-69, (1995).
- Philips, D., “Environmentally Friendly, Productive and Reliable: Prioritized for Cotton Dyes and Dyeing Processes”, *J. Soc. Dyers Color.*, 12: 183- 186, (1996).
- Swamy, J., “The Biodecoloration of Textile Dyes by White – Rot Fungus *Trametes versicolor*”, *A Master Thesis Submitted to The Department of Chemical Engineering*, 1-100, (1998).

- Cebecioğlu, F. N., “Reaktif Orange 14 Ve Reaktif Blue 2 Tekstil Boyalarının İle Giderimi”, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi Çevre Bilimleri*, Eylül, Ankara, 10-12, (2010).
- Başer, İ., İnancıcı, Y., “Boyar Madde Kimyası”, *Yayın No:2, Marmara Üniversitesi Teknik Eğitim Fakültesi Yayınları*, İstanbul, 47-52, 35-37, 90-187, (1990).
- Taner, T., “Katyonik Alkiltrimetilamonyum Bromür Sürfaktantlar İle C.I. Reactive Orange 16 Etkileşimi”, *Yüksek Lisans Tezi Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Edirne, 4-11, (2006).
- Pagga, U., Brown, D., “The Degradation of Dyestuffs: Part II Behaviour of Dyestuffs in Anaerobic Biodegradation Tests”, *Chemosphere*, 15(4): 479-491, (1986).
- Jean-Claude, S., Isabelle H. È. L., Pierre F., Serge M., Laurence L. M., Asther M., “Laccase production by a monokaryotic strain of *Pycnoporus cinnabarinus* derived from a dikaryotic strain”, *Journal of Microbiology and Biothechnology*, 15, 481-484, (1999).
- Paloheimo, M., Valtakari, L., Puranen, T., Kruus, K., Kallio, J., Mantyla, A., Fagerstrom, R., Ojapalo, P., Vehmaanpera, J., “Novel laccase enzyme and use thereof”, *USPTO Applicaton*: 20060063246 Class: 435183000 (USPTO), (2004).
- Ünal, Yıldız D., “*Trametes versicolor* tarafından üretilen Lakkaz enzimi kullanılarak Ticari Bitkisel Preparatlardaki Fenolik Asitlerin Kantitatif Tayini”, *Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 1.*, (2005).
- Bourbonnais, R., Paice, M. G., Freiermuth, B., Bodie, E., Borneman, S., “Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds”, *Appl Environ Microbiol* 63:4627-32, (1997).
- Fışkın, K., Ünyayar, A., Yeşilada, Ö., “Beyaz Çürükçül Fungusların Lakkaz ve Peroksidaz Aktivitelerine Bağlı Ligninin Degradasyonu”, *Doğa Türk Biyoloji Dergisi*, 13:3, 141-148, (1989).
- Solomon, E. I., Sundaram, U. M., Machonkin, T. E., “Multicopper oxidases and oxygenases”, *Chem. Rev.*, 96 2563–2605, (1996).

- Hakan, B., Kaichang, L., Karl, E., Eriksson, L., “Laccase-less mutants of the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus* can not delignify kraft pulp”, ***Journal of Biotechnology*** 66, 117–124, (1998).
- Claus, H., Filip, Z., “Degradation and transformation of aquatic humic substances by laccase-producing fungi *Cladosporium cladosporioides* and *Polyporus versicolor*”, ***Acta Hydrochim, Hydrobiol***, 26, 180–185, (1998).
- Claus, H., Faber, G., König, H., “Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases”, ***Appl. Microbiol Biotechnology***, 59, 672– 678, (2002).
- Cameron, L. J., Warren, L. B., Greg, T. L., “Dimethylsulfoxide elevates extracellular laccase (phenol oxidase) activity of grown on a low nutritional newspaper medium”, ***Journal of Chemical Technology and Biothechnology***, 76, 494-500, (2001).
- Juan, C. M., Anne L., Laurence C., Richard, A. J., Claude, S., “Laccase production by *Pycnoporus cinnabarinus* grown on sugar-cane bagasse: Influence of ethanol vapours as inducer”, ***Process Biochemistry*** 40, 3365– 3371, (2005).
- Sophie, V., Estelle, E., Marie, T., Nancy, N., Christian-Marie, B., Tajalli, K., Thierry, T., Giovanni, S., Anne-Marie, C., “Overlap of laccases/cellobiose dehydrogenase activities during the decolourisation of anthraquinonic dyes with close chemical structures by *Pycnoporus* strains”, ***Enzyme and Microbial Technology*** 40, 1723–1731, (2007).
- Lomascolo, E., Record, I., Herpœl-Gimbert, M., Delattre, J.L., Robert, J., Georis, T., Dauvrin, J. C., Sigoillot and Asther M., “Overproduction of laccase by a monokaryotic strain of *Pycnoporus cinnabarinus* using ethanol as inducer”, ***Journal of Applied Microbiology***, 94.618 – 624, (2003).
- Susana, C., Olga, G., Teresa, V., Jose, C., Jose, C., Ana, G., Jose, M. G., Rebeca, M., Maria, J. M., Angel, T. M., “Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system”, ***Enzyme and Microbial Technology*** 35, 113–120, (2004).
- Yapaöz, M. A., “Yaygın olarak kullanılan enzimler ve özellikleri”, ***YTÜ Biyokimya***, ABD, (2013).
- Akardere, E., “Zeytinyağı Fabrikası Sıvı Atığının Biyoarıtımında Fenol Parçalayıcı Enzim Aktivitelerinin İncelenmesi”, ***Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı***, 6 – 14, (2012).

Crawford, R. L., "The chemical structure of lignin and the use of various lignin preparations for microbial studies In: Lignin Biodegradation and Transformation", *New York : Wiley and Sons*, USA, 7-19, (1981).

Bu makale "Mechanisms of Degradation by White Rot Fungi", adı ile *Environ Health Perspect* 103 (suppl 5): 59-61, (1995), künyeli dergide yayınlanmış makalenin çevirisidir.

Steven D., "Biotechnology Center, *Utah State University, Biotechnology center*, USA, Logan, UT 84322-4705, USA, (1996).

Tunsel, H., Grover, T. A., Bumpus, J. B., Aust, S. D., "Inhibition of veratryl alcohol oxidase activity of lignin peroxidase H₂ by 3-amino-1,2,4- triazole", *Arch Biochem Biophys* 293: 287-291, (1992).

Kurek, B., Monties, B., Odier, E., "Influence on the physical state of lignin on its degradability by lignin peroxidase of Phanerochaete chrysosporium Enzyme", *Microbiol Technol*, 12: 771-777, (1990).

Fernando, T., Bumpus, J. A., Aust, S. D., "Biodegradation of TNT (2,4,6- trinitrotoluene) by Phanerochaete chrysosporium", *Appl Environ Microbiol* 56: 1666-1671, (1990).

Parrish, F. W., "Fungal transformation of 2,4-dinitrotoluene and 2,4,6- trinitrotoluene", *App Environ Microbiol* 34: 232-233, (1997).

Stahl, J. D., Aust S. D., "Metabolism and detoxification of TNT by Phanerochaete chrysosporium", *Biochem Biophys Res commun* 192: 477-482, (1993).

Young, L. and Yu, J., "Ligninase-catalyzed decolorization of synthetic dyes", *Water Research*, 31(5), 1187-1193, (1997).

Sisler, E. C. and Evans, H. J., "A Comparison of Chlorogenic Acid and Catechol as Substrates for the Polyphenol Oxidase from Tobacco and Mushroom", *Plant physiology* 33.4: 255, (1958).

Wolfenden, B. S. and Robin, L. W., "Radical-cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2, 2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate)", *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*, 2 7: 805-812, (1982).

- Paszczyński, A., Crawford, R.L. and Huynh, V.B., “Manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: Purification”, *Methods in enzymology*, 161C: 264-270, (1988).
- Tien, M. and Kirk, T. K., “Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*”, *Methods Enzymol*, 161, 238-299, (1988).
- Sedmak, J. J. and Sidney E. G., “A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250”, *Analytical biochemistry*, 79.1: 544-552, (1977).
- Sundaramoorthy, M. vd., “High-resolution crystal structure of manganese peroxidase: substrate and inhibitor complexes”, *Biochemistry*, 44, 6463-6470, (2005).
- Saloheimo, M. vd., “A lignin peroxidase-encoding cDNA from the white-rot fungus *Phlebia radiata*: characterization and expression in *Trichoderma reesei*”, *Biotechnical Laboratory*, SF-02150 Espoo Finland, 28 December, Pages 343–351, (1989).
- Stepanova, E.V. vd., “Effect of solvent phase transitions on enzymatic activity and structure of laccase from *Coriolus hirsutus*”, *Biochemistry*, Volume 74, Issue 4, pp 385-392, Moscow, April, (2009).
- Gürten, İ. I., “Çay atığından adsorbent Üretimi ve Üretilen Adsorbentin Adsorpsiyon Özelliklerinin incelenmesi”, Yüksek lisans tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı*, Ankara, Sayfa 8, (2008).
- Özata, A., Kutlu, M., Kılıç, A. Y., Türk, A., Kıvanç, M., Güven, K., Türe, C., Tanatmış, M., Yamaç, E., Candan, M., Özkütük, R. S., Sivas, H., Tüylü, B., Yücel, E., Demisoy, A., “Genel Biyoloji, 1. Baskı”, Editör Ali Yavuz Kılıç, *Anadolu Üniversitesi Yayını ve Açık Öğretim Fakültesi Yayını*, Eskişehir, Sayfa 79, Eylül, (2009).

ÖZGEÇMİŞ

Hüseyin Özkan CANÇELİK 1988 yılında Kilis’de doğdu. Gaziantep’de ikamet etmektedir. İlk, orta ve lise öğrenimini Gaziantep’de tamamladıktan sonra 2009 yılında Erzincan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde başladığı lisans öğrenimini 2013 yılında tamamladı. Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında tezli yüksek lisansa öğrenimine 2013 yılında başladı.