

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BEYAZ ÇÜRÜKÇÜL FUNGUSDAN MANGAN
PEROKSİDAZ VE LAKKAZ ENZİM
ÜRETİMLERİNİN İNCELENMESİ

ŞEYMA ÖZÇIRAK

Haziran, 2012
İZMİR

**BEYAZ ÇÜRÜKÇÜL FUNGUSDAN MANGAN
PEROKSİDAZ VE LAKKAZ ENZİM
ÜRETİMLERİNİN İNCELENMESİ**

Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Bölümü

Şeyma ÖZÇIRAK

Haziran, 2012

İZMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

ŞEYMA ÖZÇIRAK, tarafından PROF. DR. RAZİYE ÖZTÜRK ÜREK yönetiminde hazırlanan “BEYAZ ÇÜRÜKÇÜL FUNGUSDAN MANGAN PEROKSİDAZ VE LAKKAZ ENZİM ÜRETİMLERİNİN İNCELENMESİ” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Raziye ÖZTÜRK ÜREK

Yönetici



Prof. Dr. Leman TARHAN

Jüri Üyesi



Prof. Dr. Ayşegül PALA

Jüri Üyesi



Prof.Dr. Mustafa SABUNCU

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmamın her aşamasında destek ve yardımını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Raziye ÖZTÜRK ÜREK'e en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Desteklerinden dolayı değerli hocam Prof. Dr. Leman TARHAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Yardımlarından dolayı tüm laboratuvar arkadaşlarıma ve emeği geçen herkese teşekkür ederim.

Her zaman maddi ve manevi desteklerini esirgemedi ve daima yanımda olan, hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan sevgili annem, Gülgün ÖZÇIRAK'a, sevgili babam Zafer ÖZÇIRAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Şeyma ÖZÇIRAK

BEYAZ ÇÜRÜKÇÜL FUNGUSDAN MANGAN PEROKSİDAZ VE LAKKAZ ENZİM ÜRETİMLERİNİN İNCELENMESİ

ÖZ

Beyaz çürükçül funguslar, oksidatif ekstrasellüler enzimleri sentezleme yetenekleri nedeniyle lignosellülozun tüm bileşenlerini degrade etme yetenekleri açısından eşsizdirler. Bu tez çalışmasında, beyaz çürükçül fungus *Pleurotus ostreatus* HK-35 den derin kültür fermentasyonu ile lakkaz (Lak) ve mangan peroksidaz (MnP) gibi ligninolitik enzim üretimi, 25 derecede ve inkübasyon zamanı boyunca kültürasyon modu, bakır (0,5; 1; 2,5; 5 mM) ve mangan (0,15; 0,29; 0,5; 0,75; 0,1 mM) iyonlarının farklı derişimleri, karbon kaynağı olarak nişastanın derişimleri (1, 5, 10, 20 g/L) ve non-iyonik bir deterjan olan Tween-80 nin derişimlerine (yüzde 0,025; 0,05; 0,1; v/v) bağı olarak araştırılmıştır. Aynı zamanda, protein, pH, biyokütle, indirgen şeker ve azot seviyeleri de belirlenmiştir. Bu ligninolitik enzimlerin üretimleri durağan kültürasyonda 20 günlük bir periyotta organizmanın büyümesi süresince incelenmiştir. En yüksek Lak ve MnP aktiviteleri sırasıyla 10 ve 12. günde 2900 U/L ve 2637,5 U/L olarak elde edilmiştir. Dolayısıyla, optimum büyüme koşulları 10 g/L glukoz varlığında 0,5 mM Cu (II) and 0,29 mM Mn (II) olarak saptanmıştır. pH seviyesi yaklaşık olarak 7-8 aralığında gözlenmiştir. Ayrıca, indirgen şeker ve azot düzeylerinde azalma 3. günde belirlenmiştir. Karbon kaynağı olarak nişasta varlığında (10 g/L), elde edilen en yüksek Lak ve MnP aktiviteleri sırasıyla yüzde 49 ve 25 olarak azalmıştır. Farklı Tween-80 derişimlerinin kullanımına bağımlı, *P.ostreatus* tarafından Lak ve MnP enzim üretimleri üzerine anlamlı olmayan bir etki saptanmıştır.

Anahtar Sözcükler: *Pleurotus ostreatus*, derin kültür fermentasyonu, lakkaz, mangan peroksidaz

INVESTIGATION OF PRODUCTIONS MANGANESE PEROXIDASE AND LACCASE ENZYMES FROM WHITE ROT FUNGUS

ABSTRACT

White rot fungi are unique in the ability to degrade all components of lignocellulose due to their capability to synthesize the oxidative extracellular enzymes. In this thesis, ligninolytic enzyme production such as laccase (Lac) and manganese peroxidase (MnP) by submerged fermentation (SF) of white rot fungus, *Pleurotus ostreatus* HK-35 was investigated depending on cultivation mode, different concentrations of copper (0.5; 1; 2.5; 5 mM) and manganese (0.15; 0.29; 0.5; 0.75; 0.1 mM) ions, starch concentrations (1, 5, 10, 20 g/L) as a carbon source and Tween-80 (0.025; 0.05; 0.1 percent, v/v) concentrations as a non-ionic detergent with respect to incubation time at degree of 25. In addition, protein, pH, biomass, reducing sugar and nitrogen levels were also determined. The production patterns of these ligninolytic enzymes were studied during the growth of the organism for a period of 20 days in the stationary cultivation. The highest Lac and MnP activities were obtained as 2900 U/L and 2637.5 on day 10 and 12, respectively. Therefore, optimal growth conditions were specified as in presence of 10 g/L glucose, 0.5 mM Cu (II) and 0.29 mM Mn (II). pH levels were observed approximately at 7-8. In addition, decreases in reducing sugar and nitrogen levels were observed on the third day. In presence of starch (10 g/L) as a carbon source, the obtained highest Lac and MnP enzyme activities were decreased as 49 and 25 percent, respectively. With regard to use of different Tween 80 concentrations, no significant effect on the Lac and MnP enzyme productions by *P. ostreatus* were observed.

Keywords: *Pleurotus ostreatus*, submerged fermentation, laccase, manganese peroxidase

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ SINAV SONUÇ FORMU	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZ	iv
ABSTRACT.....	v

BÖLÜM BİR - GİRİŞ..... 1

1.1 Lignin	1
1.2 Lignin Biyodegradasyonu ve Ligninolitik Sistem.....	6
1.2.1 Lignin Degrade Eden Funguslar.....	7
1.2.1.1 Beyaz Çürükçül Funguslar	7
1.2.1.2 Pleurotus ostreatus.....	8
1.2.2 Ligninolitik Enzimler	9
1.2.2.1 Lakkaz	10
1.2.2.2 Mangan Peroksidaz	15
1.2.2.3 Lignin peroksidaz	18
1.2.2.4 Aril Alkol Oksidaz	20
1.3 Derin Kültür Fermentasyon.....	21
1.4 Ligninolitik Enzimlerin Biyoteknolojik Uygulamaları	22
1.4.1 Sentetik Boyaların ve Atık Suyu Dekolorizasyonu.....	22
1.4.2 Biyolojik kağıt hamuru.....	23
1.4.3 Biyo-beyazlatma.....	24
1.4.4 Toksik Bileşiklerin biyodegradasyonu	24
1.4.5 Biyoanalitik ve Nanobiyoteknoloji Uygulamaları	24

BÖLÜM İKİ – MATERYAL VE METOD 26

2.1 Materyal.....	26
2.2 Yöntem	26

2.2.1 Mikroorganizmaların Saklanması	26
2.2.2 Büyüme Ortamı ve Derin Kültür Fermentasyonu	27
2.2.3 Ham Enzim Ekstraktının Hazırlanması	29
2.2.4 Örneklerin Analizi	29
2.2.4.1 Kuru Kütlenin Belirlenmesi	29
2.2.4.2 İndirgen şeker konsantrasyonunun belirlenmesi	29
2.2.4.3 Azot Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	30
2.2.4.4 pH seviyelerinin Belirlenmesi	31
2.2.4.5 Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi	31
2.2.4.6 Ligninolitik Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	32

BÖLÜM ÜÇ – SONUÇLAR..... 34

3.1 Spor Üretiminin Optimizasyonu	34
3.2 Derin Kültür Fermentasyonu	34
3.2.1 Kultivasyon Modunun Etkisi.....	34
3.2.2 Cu^{+2} ve Mn^{+2} iyonlarının etkisi	38
3.2.3 Ortamdaki Cu^{+2} İyon Derişiminin Etkisi.....	41
3.2.4 Ortamdaki Mn^{+2} iyon derişimlerinin etkisi	44
3.2.5 Nişastanın Etkisi.....	47
3.2.6 Karbon kaynağı glukoz varlığında Tween-80 nin etkisi	49
3.2.7 Karbon kaynağı nişasta varlığında Tween-80 nin etkisi	53

BÖLÜM DÖRT – TARTIŞMA 57

KAYNAKLAR 61

BÖLÜM BİR

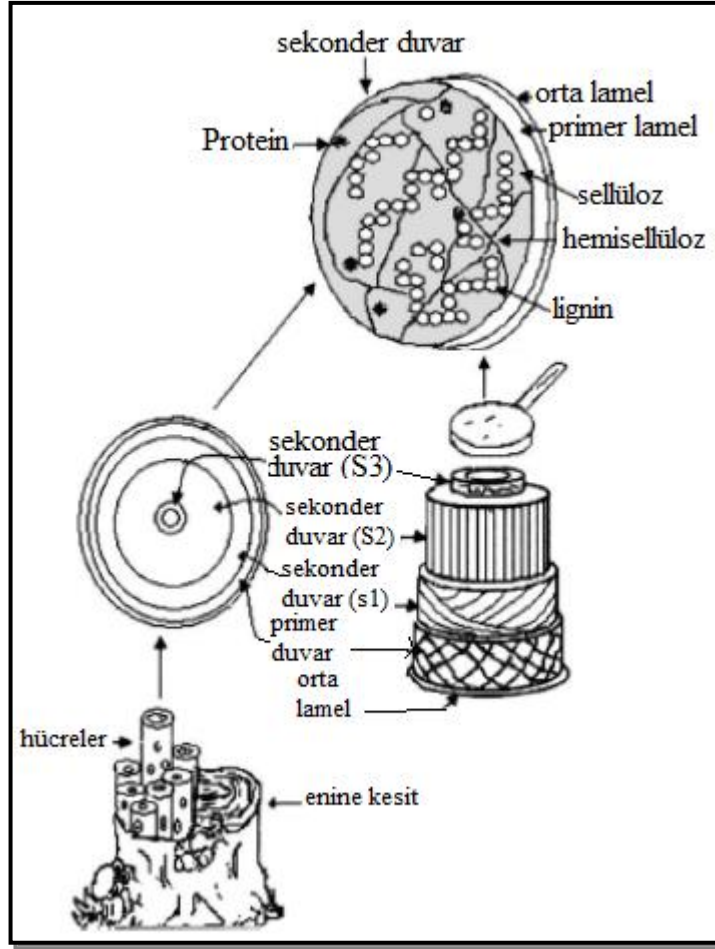
GİRİŞ

1.1 Lignin

Lignin, sellülozdan sonra toprakta en çok bulunan ikinci polimerdir ve biyosferdeki organik karbonun yaklaşık olarak %30 unu oluşturur. Lignin terimi, latincece odun, tahta anlamındaki “lignum” kelimesinden gelir (Brunow, 2001). Temel fonksiyonu bitkilerdeki selüloz fibrillerini güçlendirmek olan lignin, doğada bulunan en bol fenolik polimerdir (Lora ve Glasser, 2002). Lignin, bitki köklerinin kuvvetliliği ve sertliği, hücre duvarlarında yapısal bütünlülük için hayati öneme sahiptir (Chabannes ve diğer., 2001).

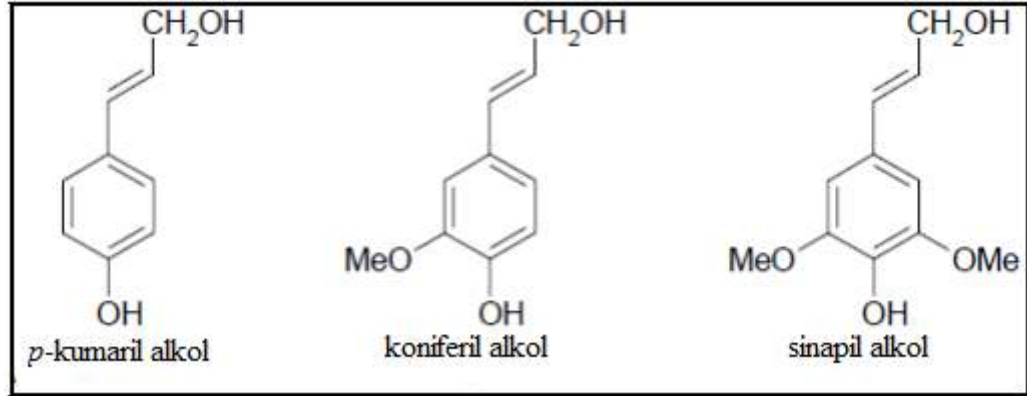
Lignin, bitki polisakkaritlerinden mikrofibril ve fiberleri birbirine bağlayan bir matriks materyal olarak rol oynadığından bitki kökünün dikey büyümesi için gerekli olan sertlik ve sağlamlılığı da kazandırmaktadır (Feldman, 2002). Ayrıca lignin, hücre duvarlarına su geçirmez özellik kazandırırken, bitki vasküler sistemi boyunca suyun transportunda ve patojenlere karşı korunmada çok önemli rol oynamaktadır (Sarkanen ve Ludwig, 1971).

Lignin birikimi hücre büyümesi tamamlandıktan sonra oluşur ve sekonder hücre duvarı en dış (S1), orta (S2) ve en iç (S3) olmak üzere üç kattır ve duvarın kalınlaşması boyunca bu parçalar birleşmektedir. S1 formu tamamlandığında orta lamelde ve primer hücre duvarının köşelerinde lignin depolanmaya başlar. Polisakkaritler depolandıktan sonra, lignifikasyon S2 ve S3 tabakaları vasıtasıyla iki farklı basamakta ilerler (Boerjan, Ralph ve Baucher, 2003) (Şekil 1.1).



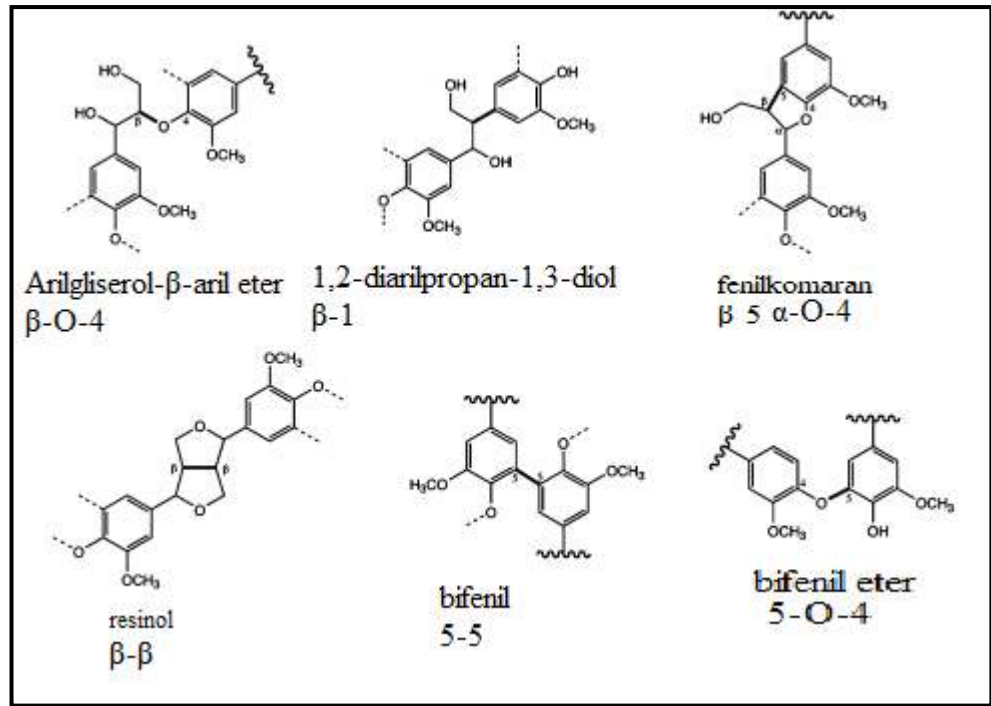
Şekil 1.1 Ligninoselülozik maddeler; selüloz, hemiselüloz ve lignin (Sánchez, 2009)

Lignin, vasküler elementlerin sekonder hücre duvarlarında selüloz ve hemiselülozla ilişkili olan fenolik bir heteropolimerdir. Lignin, özellikle yeryüzünde organik karbonun büyük bir rezervini oluşturan ağaçların yapısında bulunmaktadır. Bu polimer, koniferil alkol (guasil propanol, G), kumaril alkol (p-hidroksifenil propanol, H), sinapil alkol (şiringil propanol, S) gibi üç fenil propiyonik alkolün peroksidaz-aracılı dehidrasyonundan açığa çıkan serbest radikallerin oluşumuyla sentezlenir (Croteau, Kutchan ve Lewis, 2000) (Şekil 1.2).



Şekil 1.2 Lignin ana yapısını oluşturan monomerler (Sarkanen ve Ludwig, 1971).

Bu monolignoller karbon-karbon ve eter bağları ile polimerize edilirler. Her bir fenolik birim farklı inter monomerik bir bağ tipiyle birbirine bağlanmaktadır. En yaygın olan bağ tipleri β -O-4, α -O-4, β -5, 5-5, 4-O-5, β -1, ve β - β dır (Şekil 1.3) (Dence ve Lin, 1992; Sjöström, 1993).



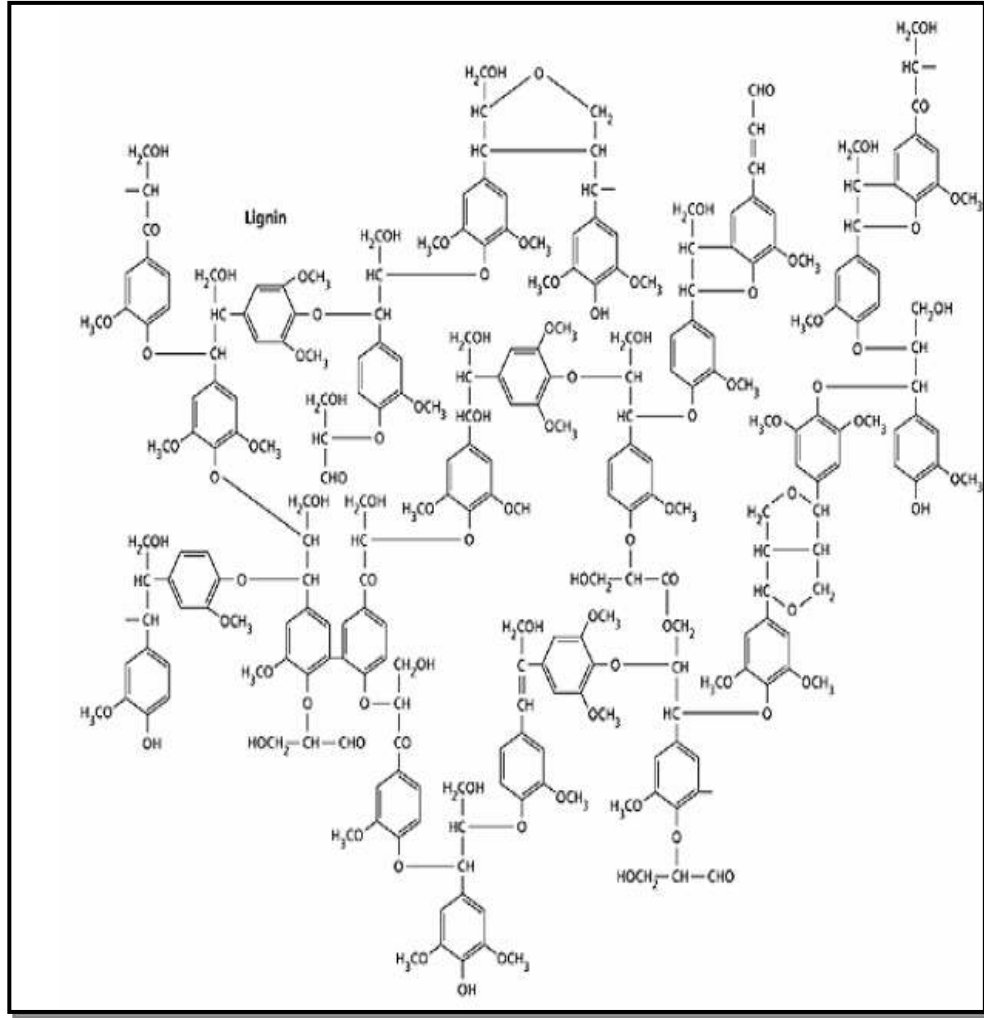
Şekil 1.3 Bir lignin molekülündeki yaygın inter monomerik bağlar (Wong, 2008).

Bu monolignoller üç fonksiyonlu olarak birbirlerine bağlanır ve polimerin içerisinde dallı bir yapı oluştururlar. Zincirin içerisindeki hem bağlanma tipi hem yapı olarak farklı olan birimler, lignini son derece düzensiz ve kompleks bir polimer haline getirirler (Dence ve Lin, 1992; Sjöström, 1993). Doğada ligninin miktar ve

özellikleri, bulundukları alanlara göre değişim göstermektedir (Campbell ve Sederoff, 1996). Odunsu bitki türlerine bağlı olarak lignin içeriği, kuru ağırlığın %15-36 civarında bir değişim meydana getirmektedir (Higuchi, 2006).

Lignin içeriği H:G:S oranları açısından, çeşitli vasküler bitki grupları arasında değişiklik göstermektedir (Fengel ve Wegener, 1984). Buna göre, lignin yapısal birimlerinin içeriklerine göre, yumuşak odunsu yapı lignini, sert odunsu yapı ve çim lignini olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır (Adler, 1977; Roberts, 1996). Yumuşak odunsu ağaçlarda, yani ladin, sedir ve baldıran gibi açık tohumlu, kozalaklı ağaçlarda, çoğunlukla G ve az miktarda H birimleri bulunur. Sert odunsu ağaçlarda, örneğin kavak, söğüt, huş, kızılâğaç gibi kapalı tohumlu bitkilerde, lignin içeriği bakımından G ve S birim sayısı benzer olup, eser miktarda H birimine de rastlanmaktadır. Çimlerde ise G birimi daha baskın olmak üzere üç monolignol birimi de bulunur (Fukushima, 2001; Higuchi, 2006).

Lignin, doğada en bol bulunan yenilebilir aromatik polimerdir ve degradasyonu karbon döngüsü için önemlidir ve hız sınırlandırıcı adımı oluşturmaktadır. Heterojen yapısından dolayı lignin, kimyasal ve biyolojik yıkıma karşı oldukça dirençlidir (Wong, 2009). Lignin, optikçe inaktif ve çapraz bağlara sahip olup, doğada nispeten hidrofobik ve fenolik yapıda bulunan, 10000 den fazla birimden meydana gelen bir makromoleküldür (Elisashvili, 1993) (Şekil 1.4).



Şekil 1.4 Ligninin genel yapısı (Adler, 1977).

1.2 Lignin Biyodegradasyonu ve Ligninolitik Sistem

Ormanlar dünyadaki karasal bölgelerin yaklaşık olarak %27 sini kaplar ve odunda ormanlardan sağlanan ticari bir üründür. Global odun tüketimi, 3500 milyon m³/yıl civarındadır ve 1960 yılından itibaren %65 üzerinde artış göstermektedir (Higuchi, 1997). Odun ve diğer ligninoseلولozik maddeleri oluşturan bileşenler başta selüloz olmak üzere, hemiselüloz ve lignindir (Sánchez, 2009). Ayrıca ligninoseلولoz, kompleks bir substrattır ve biyodegradasyonu yalnızca çevresel şartlara değil, aynı zamanda mikrobiyal populasyonun yıkım kapasitesine de bağlıdır (Waldrop, Balser ve Firestone, 2000).

Ligninoseلولoz degradasyonunda etkin olan organizmalar funguslardır. Bu grupta en hızlı degradasyonu gerçekleştirenler ise basidiomisetlerdir (Have ve Teunissen, 2001; Bennett, Wunch ve Faison, 2002; Rabinovich, Bolobova ve Vasil'chenko, 2004). Lignin-degrade eden funguslar oluşturdıkları çürüklük tipine göre üç grupta incelenirler; beyaz çürükçül, kahverengi çürükçül, yumuşak çürükçül. Beyaz ve kahverengi çürükçül funguslar basidiomisetler grubuna aitken, yumuşak çürükçül funguslar askomisetlerdendir ve aktiviteleri genellikle odunun düşük veya yüksek nem içeriği ile ilişkilidir (Blanchette, 1995).

Fungal degradasyon, lignin, selüloz ve hemiselüloz yıkımının zorluğundan dolayı ya en dış hücre zar tabakasıyla ilişkili ya da ekstrasellüler olarak hücre dışında gerçekleşir. Funguslar iki tip ekstrasellüler enzimatik sisteme sahiptir: biri polisakkarit degradasyonundan sorumlu olan hidrolitik sistem, diğeri ise fenil halkaları yıkan ve lignini degrade eden oksidatif ve ekstrasellüler ligninolitik sistemdir (Esterbauer, Steined, Labudova, Herman ve Hayn, 1991; Nieves, Ehrman, Adney, Elander ve Himmel, 1998; Jørgensen, Errikson, Børjesson, Tjerneld ve Olsson, 2003).

1.2.1 Lignin Degrade Eden Funguslar

Fungal olarak ligninin yıkımı kahverengi, yumuşak ve beyaz çürükçüllerle gerçekleşmektedir (Blanchette, 1995).

Kahverengi çürükçül funguslar; ağırlıklı olarak yumuşak ağaçlarda büyümektedir, çürükçül fungusların %7 sini kapsamaktadır. Bu funguslar, lignini kısmen parçaladıktan sonra odun polisakkaritlerini degradasyona uğratırlar. Ligninin oksidasyona uğramasıyla, rengi kahverengiye dönüşür ve bu materyal, ormanda stabil, organik madde kaynağı olarak kullanılabilir. *Postia placenta*, *Laetiporus portentosus*, *Piptoporus betulinus* ve *Gloeophyllum trabeum* kahverengi çürükçüllere örnek olarak verilebilir (Martínez ve diğer., 2005; Wong, 2009).

Yumuşak çürükçül funguslar ise, diğer fungusların faaliyetinin durduğu ekstrem çevre koşulları altında lignini degrade ederler (Martínez ve diğer., 2005). Ascomycetes ve Deuteromycetesler yumuşak çürükçül sınıfına girer. Bunlar tercihen odunun polisakkarit kısmına atak yaparlar, fakat lignini çürütme yeteneklerine sahip değildirler, kahverengi ve beyaz çürükçüllere göre kantitatif duyarlılıktadırlar (Dix ve Webster, 1995). Yumuşak çürükçül funguslardan *Chaetomium* ve *Fusarium* türleri, genelde toprakta bulunurlar (Carlile ve Watkinson, 1994).

Beyaz çürükçül funguslar; ligninin depolimerizasyonunu gerçekleştirirler ve lignin, hemisellüloz, sellüloz gibi odunun bütün komponentlerini CO₂ ve H₂O 'ya kadar mineralize edebilme özelliğindedirler (Kersten ve Cullen, 2007).

1.2.1.1 Beyaz Çürükçül Funguslar

Beyaz çürükçül funguslar, lignini ve çeşitli atıkları aerobik olarak depolimerize ve mineralize eden, basidiomisetler sınıfında yer alan ayrı bir ekofizyolojik gruptur (Pointing, 2001). Beyaz çürükçül funguslar, etkili bir lignin degradasyonu için gerekli olan bileşiklere ilaveten lignini modifiye eden çeşitli enzimleri de ortama salgırlar (Wesenberg, Kyriakides ve Agathos, 2003). Funguslar tarafından

salgılanan spesifik olmayan bu üç tip ekstrasellüler enzim; lignin peroksidaz (LiP), mangana bağımlı peroksidaz (MnP) ve lakkazdır (Lak). Lignini etkili bir şekilde degrade ederek hücre duvarlarındaki sellüloza giriş için kullanırlar. Bu funguslar içerdikleri enzimleriyle bazı atık organik kimyasal maddeleri mineralize ya da degrade edebilmektedirler (Pease, Aust, Tien, 1991). Yani, lignin ürünlerinin oksidasyonu ile enerji kazanılmaz ve lignin primer metabolizmaları için gerekli olan bir substrat değildir. Bundan dolayı, lignin-karbohidrat kompleksindeki polisakkaritlere ulaşabilmek için sekonder metabolizma boyunca lignin degrade edilir (Jeffries, 1990). Böylece fungal degradasyona katılan enzimler sayesinde savaş malzemeleri, pestisidler, poliklorlu bisfeniller, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, bitkisel atıklar, sentetik boyalar, sentetik polimerler ve ahşap koruyucu gibi çevre için zararlı etkenlerin aerobik oksidatif proseslerle uygun bir şekilde uzaklaştırılması gerçekleşmektedir (Pointing, 2001).

En etkili lignin-degrade sistemine sahip beyaz çürükçül funguslara örnek olarak *Coriolus versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus eryngii* verilebilir (Wang, Yan, Chen, Huang ve Gao, 2008; Ozturk Urek ve Kasikara Pazarlioglu, 2007; Moredo ve diğer., 2003; Akpınar ve Ozturk Urek, 2012).

1.2.1.2 *Pleurotus ostreatus*

Pleurotus türleri, önemli biyoteknolojik ve çevresel uygulamaları olan, medikal özelliklere sahip yenilebilir, lezzetli ve yüksek besinsel değerli ligninolitik mantar gruplarını oluşturmaktadırlar. Latince, kenarı kulaklı ve istridye-şekilli anlamlarına gelmektedir. Bu fungus, özellikle ılıman tropikal ormanlarda yayılım göstermektedir. *Pleurotus* türleri en kolay kültive edilen mantar türlerindendir (Hilber, 1997). *P. ostreatus*, doğada, genellikle kurumuş ağaçlar veya kütükler üzerinde yayılım göstermektedirler (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. *Pleurotus ostreatus*

(http://en.wikipedia.org/wiki/Pleurotus_ostreatus)

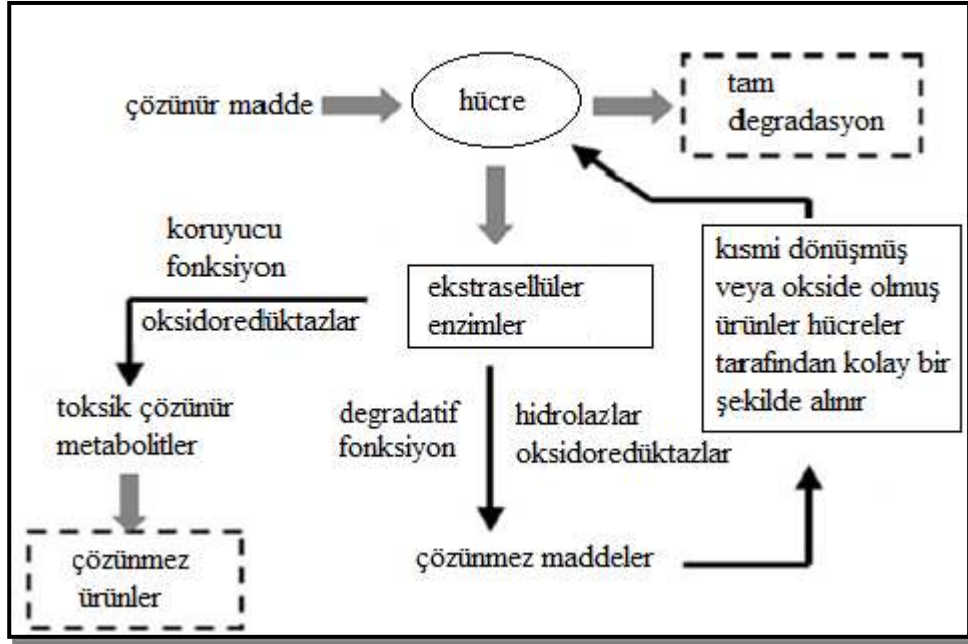
Günümüzde, *Pleurotus* türleri kültivasyonunun gıda endüstrisinde de ekonomik önemi gittikçe artmaktadır. *P. ostreatus* gıda amaçlı olarak kültive edilen en önemli mantarlardandır. Doğal olarak, eşsiz tadı ve aromatik özellikleri yanında, protein, karbohidrat, vitamin ve mineraller açısından da oldukça zengin bir içeriğe sahiptir (Cohen, Persky ve Hadar, 2002). *Pleurotus* türleri hematolojik, antiviral, antitümör, antibiyotik, antibakteriyel, hipokolestrolik ve immünomodülasyon gibi etkiler gösteren medikal özelliklere sahip önemli bir mantar türüdür. Farklı funguslardan da izole edilen bu biyoaktif moleküller polisakkarid yapısındadır. *Pleurotus* türleri aynı zamanda, endüstriyel kontaminantlar, ksenobiyotikler ve organokirliliklerin biyodegradasyonu, hayvan yiyecikleri ve diğer tarımsal atıkların biyokonversiyonu için kullanılan ligninolitik enzimlerin kullanımı ile ilişkilendirilmektedir (Cohen, 2002).

1.2.2 Ligninolitik Enzimler

Ligninolitik enzimler, lignin ve benzeri kimyasal yapıları degrade edebilen spesifik olmayan enzimatik sistemlerdir (Rodríguez, 2009). Ligninolitik enzimler, ligninin kompleks yapısından dolayı, ekstrasellüler olmalı, fakat spesifik ve hidrolitik olmamalıdır (Kirk ve Farrell, 1987).

Beyaz çürükçül funguslar etkili bir lignin biyodegradasyonu ve mineralizasyonu için, üç farklı tipte ekstrasellüler enzim salgırlar (Şekil 1.6) (Kuhad, Singh ve Ericsson, 1997; Leonowicz ve diğer., 1999; Rabinovich, Bolobova ve Vasil'chenko, 2004). Lignin-modifiye eden bu enzimler, ikisi glikozillenmiş demir içeren

peroksidazlardan LiP ve MnP (Orth ve Tien, 1995) iken diğeri bakır iyonu içeren fenol oksidazlardan Lakdır (Thurston 1994). Beyaz çürükçül funguslardan ligninolitik enzimlerin salgılanması genelde karbon, azot gibi besinlerin sınırlı olduğu koşullarda gerçekleşir (Cabaleiro ve Couto, 2007).



Şekil 1.6 Hücre metabolizmasında ekstrasellüler enzimlerin rolleri (Sánchez, 2009)

1.2.2.1 Lakkaz

Lakkazlar (Lak; EC 1.10.3.2) çoklu bakır ailesine aittir (Hoegger, Kilaru, James, Thacker ve Kües, 2006; Alcalde, 2007). Bu bakır içeren enzimler, eş zamanlı olarak moleküler oksijenin suya indirgenmesiyle çeşitli substratların oksidasyonunu katalizlemektedirler (Yaropolov, Skorobogatko, Vartanov ve Varfolomeyev, 1994). Lakkaz ilk olarak 1883'te Japon vernik ağacında bulunmuştur (Call ve Mücke, 1997; Gianfreda, Xu ve Bollag, 1999). Bu tarihten itibaren Lak aktivitesinin diğer bitki, böcek ve bakteride az da olsa varlığı tespit edilmiştir (Kramer ve diğer 2001; Claus, 2003; Claus, 2004; Dittmer ve diğer, 2004).

Fungal fenoloksidazlar, total lignin polimerinde %10 düzeyinden daha az bulunan fenolik lignin birimlerinin doğrudan oksidasyonunu gerçekleştirebilmek için gerekli

düşük redoks potansiyeline sahiptir (Martínez ve diğer, 2005). Fungal lakkazlar genelde %10-30 luk karbohidrat içeren ekstrasellüler glikoproteinlerdir (Mayer ve Staples, 2002), molekül ağırlıkları 60-80 kDa arasında olup asidik pI değerlerine (3-6) sahiptirler (Hildén, Hakala ve Lundell, 2009). Enzimin optimum sıcaklık değerleri ise organizmaya bağımlı olarak 40-65 °C arasında değişim göstermektedir (Asgher, Kausara, Bhattia, Shah ve Ali, 2008).

Farklı fungus türleri arasında Lak enziminin sadece katalitik bölgesi oldukça iyi korunmuştur (Gochev ve Krastanov, 2007). Enzimin N-terminali 520-550 aminoasitden oluşan peptid zinciridir (Gianfreda, Xu ve Bollag, 1999). Lakkazlar multinükleer enzimlerdir (Gayazov ve Rodakiewicz-Nowak, 1996; Heinzkill, Bech, Halkier, Scheider ve Anke, 1998; Bertrand ve diğer, 2002; Piontek, Antorini ve Chomowski, 2002). Lak, dimerik veya tetramerik yapıda olabilir ve üç redoks alanına dağılmış halde bulunan her bir monomer 4 bakır iyonu içerir (Gianfreda, Xu ve Bollag, 1999). Bununla birlikte; 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) (ABTS) veya 1-hidroksibenzotriazol gibi medyatörler varlığında, fenolik olmayan bileşikleri de okside etme yeteneğine sahiptirler (Eggert, Temp, Dean ve Eriksson, 1996).



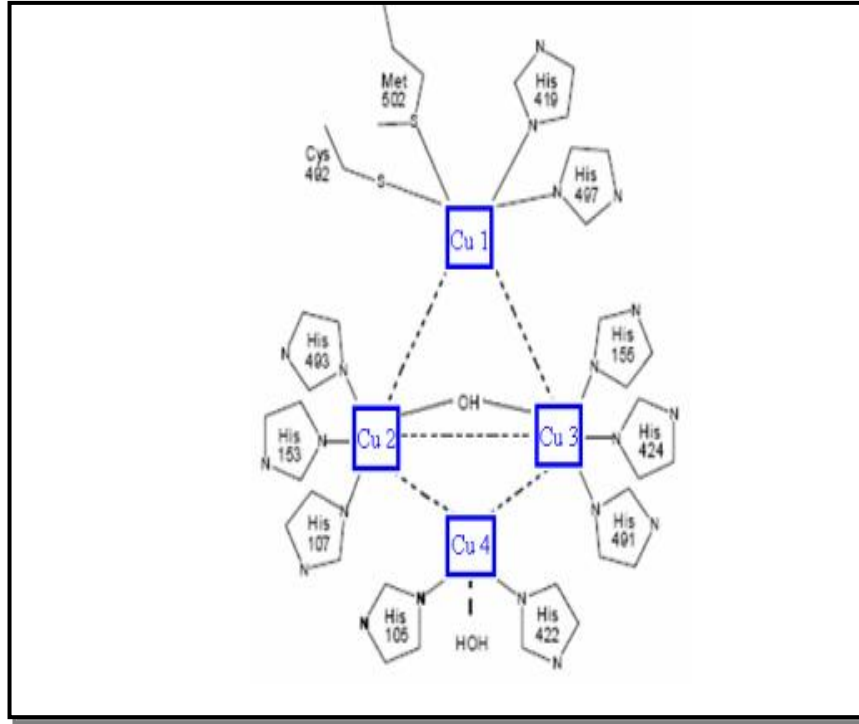
Şekil 1.7. *Coprinus cinereus*' dan elde edilen Cu-2 bağımlı lakkazın yapısı (Bar, 2001).

Lakkazın aktif merkezi dört tane bakır iyonu içerir: mononükleer ‘‘mavi’’ bakır iyonu (T1), T2 bakır iyonu ve iki tane T3 bakır iyonu içeren üçlü nükleer bakır ailesindendir (T2/T3) (Şekil 1.7 ve 1.8). Lakkazın aktif merkezini oluşturan bu bakır iyonları spektral ve elektroparamanyetik rezonans (EPR) karakteristiklerine göre sınıflandırılırlar.

Tip I bakır (T1); Lak enzim çözeltisinin mavi renk içermesini sağlar ve 600 nm dalga boyunda optik absorbans bandı ve spesifik EPR spektrumuyla karakterize edilir. Bu T1 merkezi, ligand olarak iki histidinin imidazol ve sisteinin sülfidril grubuna sahip trigonal bir yapıdır. Civa ve kobalt iyonları, bu bakır iyonunun yerine geçebilir (Palmer, Lee ve Solomon, 2001; Enguita, Martins, Henriques ve Carrondo, 2003; Garavaglia ve diğer, 2004).

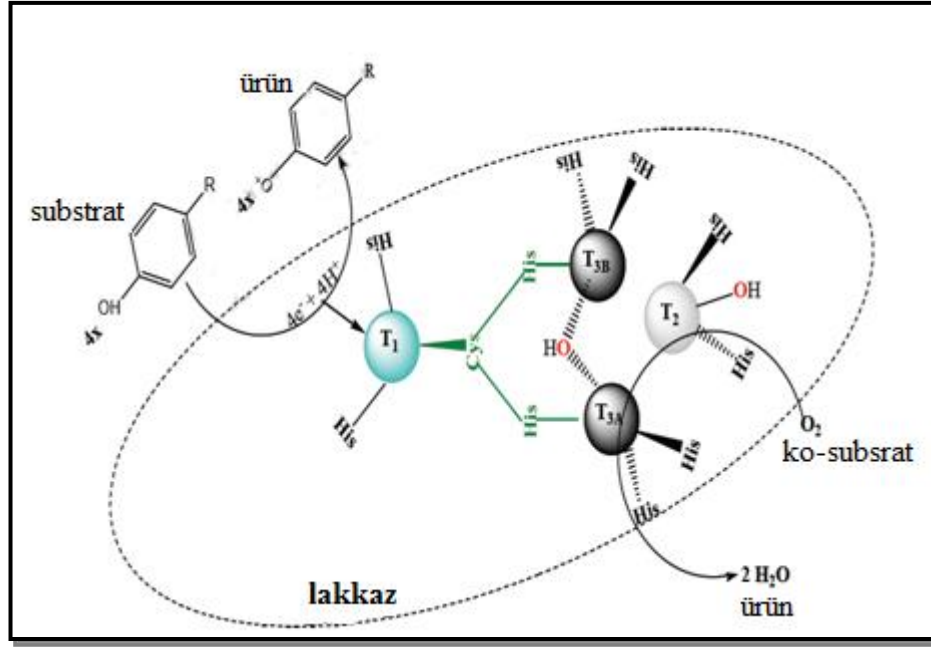
Tip II bakır (T2); renksizdir. Görünür bölgede çok zayıf absorbans vermesine karşılık EPR ile belirlenebilir (Solomon, Baldwin ve Lowery, 1992; Quintanar ve diğer, 2005).

Tip III bakır (T3); Lakkazın T3 merkezi, hidroksil köprüleri ile antiferromanyetik bir çift bakır iyonu içeren çift çekirdekli bakır merkezidir ve bu alan diyamanyetiktir, EPR spektrasında belirlenemez. Histidinin 8 tane imidazolü T2/T3 kümesinin ligandları olarak görev alır (Messerschmidt ve Huber, 1990; Solomon, Sundaram ve Machonkin, 1996).



Şekil 1.8 Lakkazın bakır merkezleri (Enguita, 2003).

Lakkaz katalizli tepkimeler, üç temel basamakta gerçekleşir. İlk adımda, substrat yükseltgenirken, T1 bakırı indirgenir. Bu sırada ortaya çıkan elektron, T1 deki bakır bölgesinden, T2/T3 deki bakır bölgesine transfer olur. Daha sonra bu T2/T3 deki bakır bölgesinde bulunan O_2 suya indirgenir ve böylece Lak ın katalitik döngüsü tamamlanmış olur (Şekil 1.9). Kinetik, spektroskopik ve EPR verileri T1 ve T2 bakır atomlarının elektron alımını ve T2 ile T3 bakır atomlarının da oksijen bağlanmasında etkin olduğunu göstermektedir (Gianfreda, Xu ve Bollag, 1999).

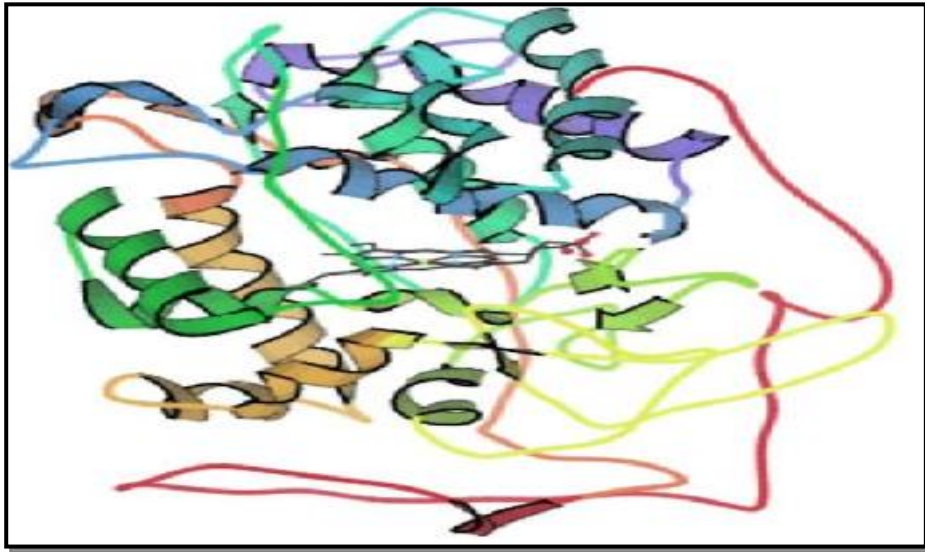


Şekil 1.9 Lakkaz kataliz mekanizması (Baldrian, 2006).

Lakkaz ile gerçekleştirilen oksidasyon işlemleri, kağıt hamuru ve kağıt, tekstil ve gıda endüstrileri gibi pek çok endüstriyel alanda büyük bir potansiyele sahiptir. Bu enzim aril diaminler, ligninler, poliaminler, polifenoller, aminofenoller, para ve orto difenollerin oksidasyonunu katalizlemede kullanılmaktadır (Yaropolov ve diğer, 1994; Solomon, Sundaram ve Machonkin, 1996). Ayrıca Lak; petrokimyasal ve tekstil endüstrileri (Setti, Giuliani, Spinozzi ve Pifferi, 1999), kağıt ve kağıt hamuru endüstrisindeki atıkların detoksifikasyonu (Camarero, Garcia, Vidal, Colom ve Rio, 2004), topraktaki bazı patlayıcıların ve pestisid-herbisitlerin degradasyonunda (Durán ve Esposito, 2000), ve medikal ajan (Kurisawa, Chung, Uyama ve Kobayashi, 2003; Nicotra ve diğer, 2004) olarak kullanımına yönelik biyoteknolojik uygulama imkanlarını da sunar. Lakkazın aynı zamanda, su arıtma tesislerinde, anti-kanser ilaçların üretiminde katalizör (Couto ve Herrera, 2006) ve hatta kozmetik sanayinde katkı maddesi olarak kullanımı da mevcuttur (Golz-Berner, Walzel, Zastrow, Doucet ve diğer., 2004). Buna ilaveten Lak, ksenobiyotiklerin uzaklaştırılmasında ve polimerik ürünlerin biyoremediasyon amaçlı yararlı alternatiflere dönüştürülmesinde de kullanılmaktadır (Couto ve Herrera, 2006).

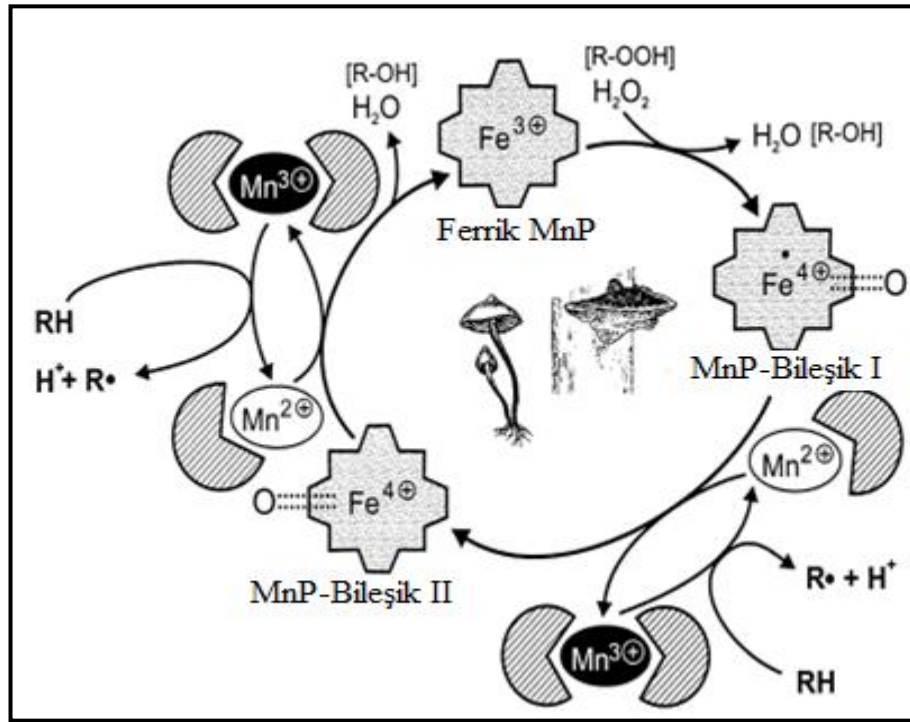
1.2.2.2 Mangan Peroksidaz

Mangan peroksidaz (MnP) (EC 1.11.1.13), lignin degrade eden basidiomiset funguslar tarafından üretilir. MnP ler, demir protoporfirin IX (hem) grubu içeren ekstrasellüler glikoproteinlerdir (Şekil 1.10) (Asgher, Kausara, Bhattia, Shah ve Ali, 2008). Bu hem-içeren glikoproteinler yaklaşık 25 yıl kadar önce ilk defa *P. chrysosporium* beyaz çürükçül fungusunda bulunmuştur (Kuwahara ve diğer, 1984, Glenn ve Gold, 1985; Paszcynski, Huynh ve Crawford, 1985; 1986). MnP in temel fonksiyonu, oksidant olarak H_2O_2 kullanarak, Mn (II)' yi Mn (III)'e oksitlemektir. Oluşan Mn (III) bileşiği, malat veya okzalit gibi organik asitler tarafından şelatlanır. Oluşan Mn (III) kompleksleri de MnP in çeşitli substratlarını oksitlemektedirler (Hofrichter, 2002). Genelde bu enzim *P. chrysosporium*, *Pleurotus eryngii*, *Bjerkandera* sp. BOS55 ve *Bjerkandera adusta* gibi funguslar tarafından üretilir (Ozturk Urek ve Kaşıkara Pazarlıoğlu, 2007; Akpınar ve Ozturk Urek, 2012; Mester, Field 1998; Heinfling, Martı'nez, Berbaguer ve Szewzyk, 1998).



Şekil 1.10 MnP kristal yapısı (Sundaramoorthy, Kishi, Gold ve Poulos, 1997).

MnP in katalitik döngüsü doğal ferrik enzime organik veya hidrojen peroksit katılması ile oksidasyon ve Fe-peroksit kompleksinin oluşumu ile başlar (Şekil 1.11). Daha sonra peroksit oksijen-oksijen bağ yarılması Fe^{+4} oksoporfirin radikal kompleksinin (MnP-bileşik I) oluşumu için hem grubundan $2e^-$ transferinin gerçekleşmesi gerekir. Bir sonraki basamakta, dioksijen bağı heterolitik bir şekilde yarılır ve bir su molekülü meydana gelir. Sonraki indirgeme Fe^{+4} okzo porfirin kompleks olan (MnP-bileşik II) vasıtasıyla ilerler (Hofrichter, 2002; Dizge, 2007). Oluşan MnP-bileşik II'nin indirgenmesi için, substrat olarak Mn^{+2} iyonu gerekir. Böylece enzimin katalitik döngüsü sırasında iki Mn^{+2} iyonu Mn^{+3} e yükseltgenir. Çürükçül funguslarda üretilen bir metabolit olan okzalik asit gibi organik asitlerle, Mn^{+3} şelat oluşturur. (Kuan, Johnson ve Tien, 1993). Mn^{+2} iyonu porfirin arabileşiği için $1e^-$ donörü olarak davranır ve diğer taraftan Mn^{+3} iyonuna oksitlenir. MnP-bileşik II'nin indirgenmesi de benzer bir yolla ilerler ve diğer Mn^{+2} iyonunun Mn^{+3} iyonuna oksidasyonu da doğal enzimin eldesi ve iki su molekülünün açığa çıkmasıyla yürütülür ve MnP katalitik döngüsü tamamlanmış olur (Hofrichter, 2002).

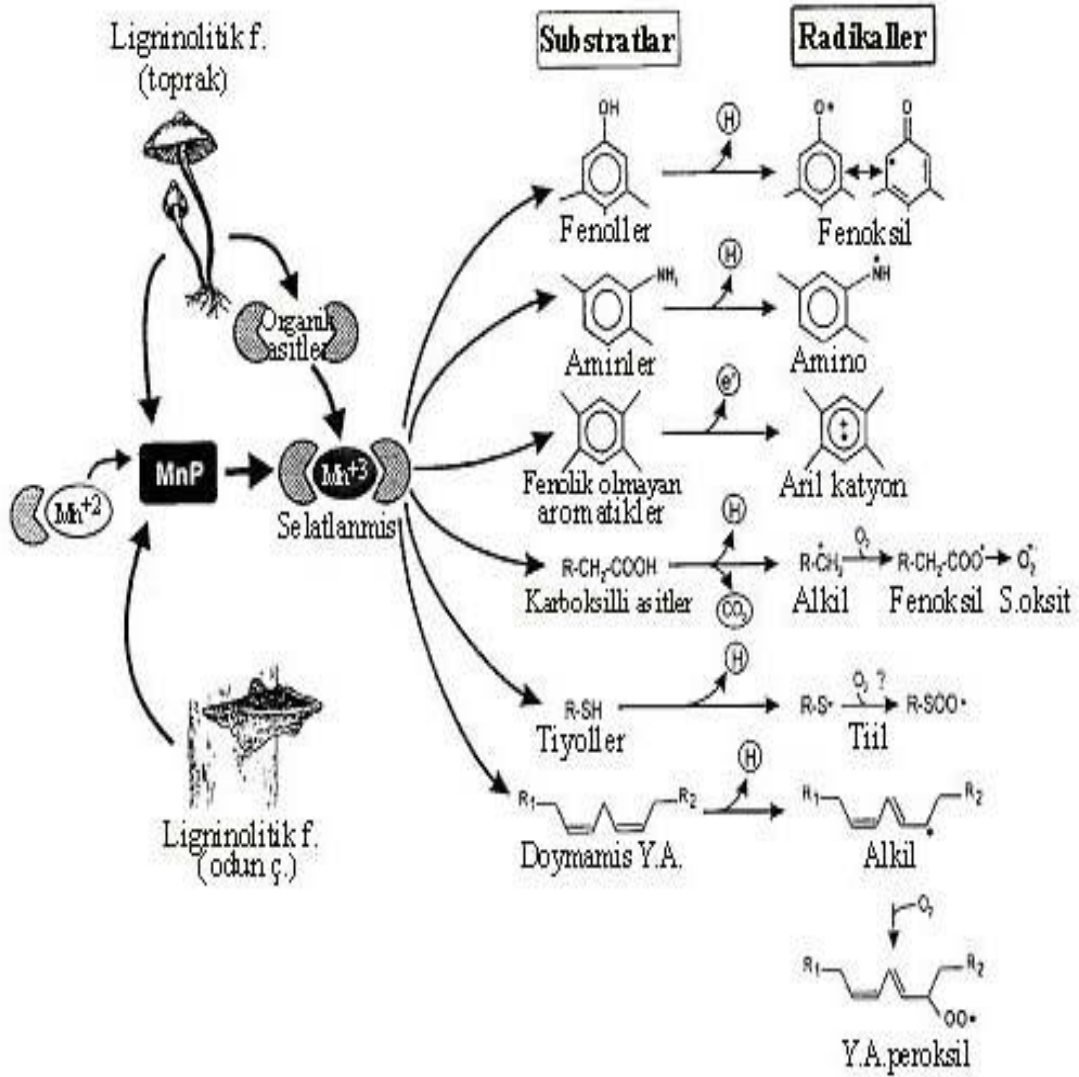


Şekil 1.11 MnP nin katalitik döngüsü (Kirk ve Cullen, 1998).

Ekstrasellüler fungal MnP lerin molekül ağırlığı 40-50 kDa civarında değişir ve izoelektrik noktası genellikle asidiktir. Fakat aynı zamanda nötral MnP lar da mevcuttur. MnP ın optimum pH ı 4-7 ve optimum sıcaklığı ise 40-60 °C aralığında saptanmıştır (Ozturk Urek ve Kaşıkara Pazarlioglu, 2007; Baborova, Moder, Baldrian, Cajthamlova ve Cajthaml, 2006).

MnP, ligninden polisiklik aromatik hidrokarbonlara kadar çok sayıda bileşikleri oksitlemektedir (Steffen, 2003). MnP, polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), poliklorlu bisfeniller ve sentetik boyalar gibi çeşitli kimyasal maddeleri, düşük substrat-spesifikliği sayesinde degrade edebilir (Levin, Herrmann ve Papinutti, 2008). Son zamanlarda, bu enzimler biyoremediasyon, kağıt endüstrisinde, ağartma ve biyoetanol üretiminde kullanılmaktadırlar (Rodríguez, 2004).

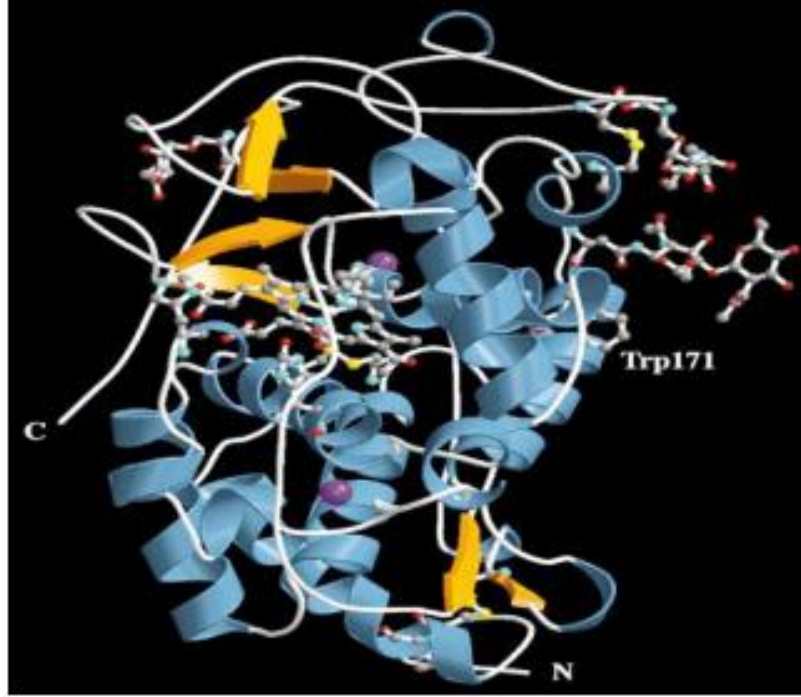
Şekil 1.12 den görüldüğü gibi, oksalat, malat, tartarat, laktat gibi karboksilik asitli Mn^{+3} şelatları çeşitli substratların 1 elektron oksidasyonuna uğrar (Hatakka, 2001). Fenolik ve amino-aromatik bileşikler, fenoksil ve amino radikallerinden hidrojen alımıyla oksitlenirler (Glenn ve Gold, 1985; Paszcynski, Huynh ve Crawford, 1985;1986; Kishi, Wariishi, Marquez, Dunford ve Gold 1994). Bazı düşük redoks potansiyelli tetrametoksibenzen veya antrasen gibi fenolik olmayan aromatik maddeler, aril katyon radikallerini meydana getiren aromatik halkadan bir elektron alımına neden olur. Okzalot, malat gibi karboksilik asitli Mn^{+3} şelatları birbiriyle reaksiyona girebilir ve diğer radikallerin oluşumuyla sonuçlanabilir. Bu radikaller, peroksit kaynaklarını oluşturarak H_2O_2 varlığında MnP ile katalizlenirler (Kuan ve Tien, 1993; Urzu'a, 1998; Hofrichter ve diğer., 1998)



Şekil 1.12 Farklı substratlar varlığında MnP ile radikallerin oluşumu (Hatakka ve Hofrichter, 2001).

1.2.2.3 Lignin peroksidaz

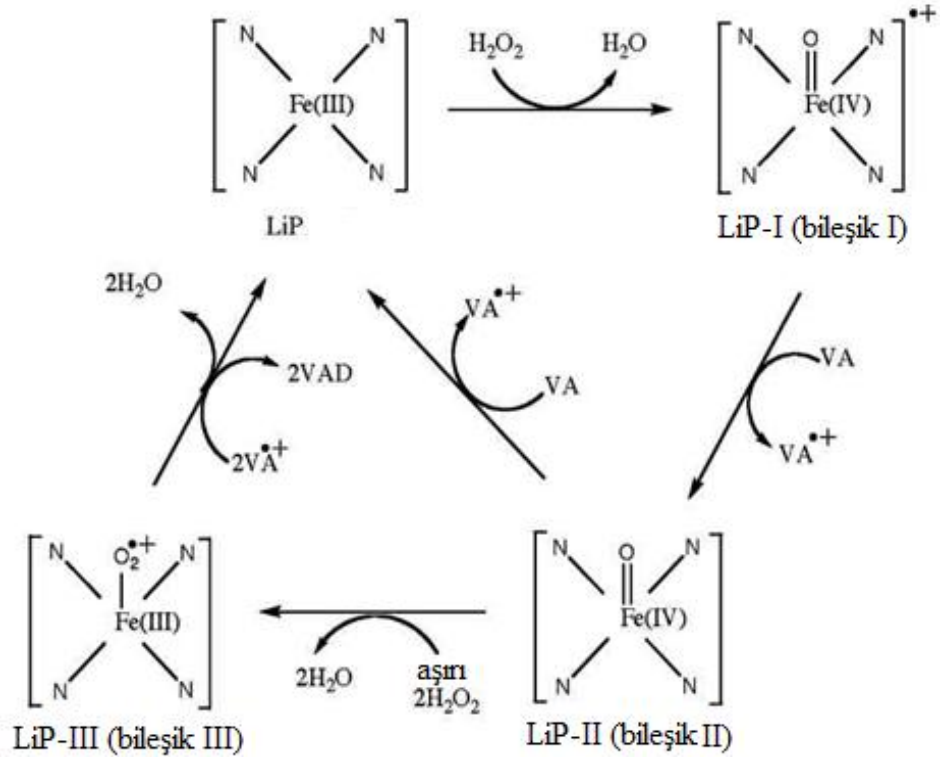
Lignin peroksidaz enzimi (LiP, E.C. 1.11.1.14) çürükçül funguslar tarafından üretilen monomerik hem-glikoproteindir (Şekil 1.13) (Orth ve Tien 1995). LiP, ilk defa *P.chrysosporium* dan elde edilmiştir (Venkatadri ve Irvine, 1993). Fungal LiP ler globülerdir ve çoğu zaman karbohidrat içeren 40 kDa luk heliks şeklindedirler. 343-344 amino asite sahip olup izoelektrik noktası genelde 4,5 dur (Piontek, Smith ve Blodig, 2001).



Şekil 1.13 LiP üç boyutlu yapısı (Kraulis, 1991).

LiP ile substratlarının etkileşimi, ping-pong mekanizmasına benzer (Şekil 1.14); H_2O_2 , iki elektron vasıtasıyla ferrik enzimi oksitleyen Bileşik-I ara ürününü oluşturur. Bileşik-II, Bileşik-I in bir elektron ile aromatik substratı oksitlemesiyle oluşur (bir elektron ile oksitlenmiş enzim ara ürünü) ve aromatik substratın tekrar oksitlenmesiyle enzim, tekrar temel haline geri döner (Farrell, Murtagh, Tien, Mozuch ve Kirk, 1989).

LiP, nonfenolik aromatik bileşiklerin oksidasyonunu katalizlemektedir (Conesa, Punt ve Hondel, 2002; Martínez, 2002). LiP, çoğu yıkıma dirençli aromatik bileşikleri mineralize ederken, çok sayıda polisiklik aromatik ve fenolik bileşikleri de oksidasyona uğratmaktadır (Aitken, Massey, Chen ve Heck, 1994).



Şekil 1.14 Lignin peroksidazın katalitik döngüsü (Tien ve Kirk, 1984).

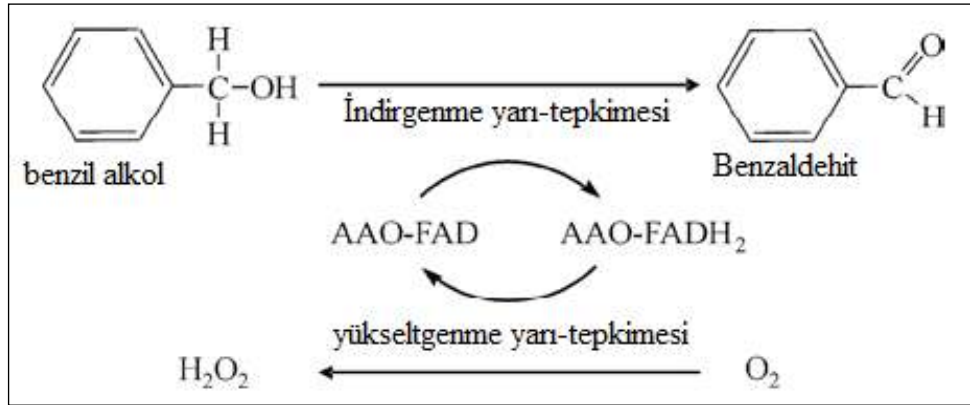
1.2.2.4 Aril Alkol Oksidaz

Aril alkol oksidaz (AAO, EC 1.1.3.7) enzimi ilk defa 1960 da, *Trametes versicolor* dan izole edilmiştir (Farmer, Henderson ve Russell, 1960). AAO, aromatik fungal metabolitlerin redoks çevrimine katılır (Guill'en ve Evans, 1994; Guti'errez, Caramelo, Prieto ve Mart'inez, 1994).

AAO, 73 kDa lık monomerik glikozillenmiş proteindir ve kovalent bağlı olmayan FAD kofaktörü içeren flavoenzimlerden biridir (Şekil 1.15) (Hefti, Vervoort ve Berkel, 2003). *Pleurotus eryngii* den elde edilen bu enzim geniş substrat spesifikliğine sahiptir (Guill'en, Mart'inez ve Mart'inez, 1992). AAO ün kataliz mekanizması, substratın oksidatif reaksiyonu ile başlar ve hidrojen peroksit üretimi ile moleküler oksijen tarafından flavin reoksidasyonu ile tamamlanır (Şekil 1.16).



Şekil 1.15 AAO un yapısı (Hernández-Ortega ve diğer., 2011)



Şekil 1.16 AAO kataliz mekanizması (Ruiz-Dueñas ve diğer., 2009).

1.3 Derin Kültür Fermentasyon

Derin kültür fermentasyonu (DKF), sıvı besin ortamı ile mikroorganizmaların kültivasyonudur. Genellikle su, enerji kaynakları, karbon, azot, mineraller ve vitamin ve oksijen içerir.

Ayrıca havalandırma, biyokütlenin büyümesi ve enzimlerin üretimi için önemlidir. Enzim üretimi amaçlı fermentasyon işlemini optimize etmek için sıcaklık,

pH, oksijen tüketimi ve karbondioksit oluşumu gibi parametrelerin kontrol edilmesi önemlidir. İlk olarak, fermentasyon ortamından enzimlerin eldesi için mikrobiyal hücreler gibi çözünmeyen ürünlerin uzaklaştırılması genelde santrifüj ile gerçekleştirilir. Biyokütleyi uzaklaştırdıktan sonra, çoğu endüstriyel enzim ekstrasellüler olduğu için, sıvı ortamda bulunurlar. DKF de, işlem parametrelerinin ölçüm kolaylığı avantaj sağlarken, sıvı ortam besiyeri maliyetinin pahalı olması dezavantaj oluşturmaktadır (Deindoerfer, Mateles ve Humphrey, 1962).

1.4 Ligninolitik Enzimlerin Biyoteknolojik Uygulamaları

1.4.1 Sentetik Boyaların ve Atık Suyu Dekolorizasyonu

Sentetik boyaların, tekstil endüstrisinin çeşitli dallarında (Gupta, Shukla, Prasad ve Singh, 1992; Sokolowska-Gajda, Freeman ve Reife, 1996), deri tabaklama endüstrisi (Tünay, Kabdasıl, Ohron ve Cansever, 1999), kağıt üretimi (Ivanov, Gruber, Schempp ve Kirov, 1996), gıda teknolojisi (Bhat ve Mathur, 1998), tarımsal araştırmalar (Cook ve Linden, 1997), fotoelektrokimyasal hücreler (Wrobel et al., 2001), saç renklendirme (Scarpi, Ninci, Centini ve Anselmi, 1998) gibi birçok alanda kullanımı mevcuttur. Ayrıca, sentetik boyalar, atık su etki kontrolü (Morgan-Sagastume, Jimenez ve Noyola, 1997) ve atık su arıtımı (Hsu ve Chiang, 1997; Orhon, Sözen, Görgün, Çokgör ve Artan, 1999), çamurun spesifik yüzey alanı ile belirlenmesi (Sorensen ve Wakeman, 1996), yeraltı sularının takibi (Field, Wilhelm, Quinlsn ve Aley, 1995) gibi farklı alanlarda kullanım imkanı sağlamaktadır.

Bu kadar çok yaygın olan boyarmadde ve tekstil endüstrileri, boyanın büyük ölçekte kullanıcıları ve üreticileri anlamına gelmektedir. Bu endüstrilerden oldukça renkli olan atıkların uzaklaştırılması, sadece estetik olarak hoş olmayan bir durum değil, aynı zamanda biyolojik sucul sistemi etkileyen ve ışık geçirgenliğini engelleyen bir durumdur. Üstelik yeraltı sularının yanı sıra yerüstü suları için de büyük tehlike arz etmektedir. Bu atıkların renklerinin uzaklaştırılması, başlıca problemler arasında yer almaktadır. Adsorpsiyon, koagülasyon, yumuşatma, oksidasyon, filtrasyon ve elektrokimyasal yöntemler gibi fiziksel ve kimyasal

metodlar ile renkli atık suların arıtımı için oldukça pahalı ve zor olan işlemlerdir (Kapdan, Kargi, McMullan ve Marchart, 2000; Hao, Kim ve Chiang, 2000; Robinson, McMullan, Marchant ve Nigam, 2001; Forgacs, Cserhati ve Oros, 2004; Joshi, Bansal ve Purwar, 2004). Bu boyaların kompleks aromatik yapısı ışığa, biyolojik aktiviteye, ozona ve diğer degradatif çevresel şartlara dirençlidir. Bu sebeplerden dolayı geleneksel yollarla atık su arıtımı çok etkili olamamaktadır (Joshi, Bansal ve Purwar, 2004).

Günümüzde mikrobiyal dekolarizasyonun düşük maliyetli oluşu, tekstil boya atık suyunun arıtımı yönünden oldukça dikkat çekmektedir (Banat, Nigam ve Singh, 1996; Zee ve Villaverde, 2005). Fungus, boya uzaklaştırılması ve tekstil atığının arıtılması için uygun bir mikroorganizmadır. Fungal miselyumların, ürettikleri ekstrasellüler enzimleri ile yıkıma dirençli substratları çözünür hale getirebilmeleri önemli avantajlarını oluşturmaktadır (Tobin, White ve Gadd, 1994).

1.4.2 Biyolojik kağıt hamuru

Biyolojik kağıt hamuru işlemi, kağıt hamuru endüstrisinde kimyasal kullanımını azaltmak ve bu işlem sırasında çevreye verilen zararın azalması anlamına gelmektedir (Singh, Sulaiman, Hashim, Rupani ve Peng, 2010). Bu prosedürün amacı, ligninin giderilmesi ve sellülozun ayrıştırılmasından kaçınmaktır. Biyolojik kağıt hamuru üretim metodları, odun liflerini çözmek ve kağıt hamurundan lifleri mekanik olarak ayırmaktır (Eriksson, Johnsrud ve Vallander, 1983). Biyolojik kağıt hamuru üretimi, geleneksel yöntemlerle gerçekleştirilen işlemler ile ilişkili olan çevresel etkiyi ve enerji maliyetini azaltmak ve kağıdın özelliklerini, kağıdın kalitesini geliştirme yönünde bir potansiyele sahiptir (Breen ve Singleton, 1999; Guerra, Mendonca ve Ferraz, 2003). Enerji tasarrufu yalnızca proseslerin ekonomik olarak uygulanabilirliği ile mümkündür. Bu teknoloji, sellüloz liflerini elde etme ve lignini değiştirme ya da seçici olarak ortamdan uzaklaştırmayı sağlayan kompleks ekstrasellüler enzim sistemine sahip olan beyaz çürükçül funguslara odaklanmaktadır (Wesenberg, Kyriakides ve Agathos, 2003). Pirinç, buğday ve arpa samanı ile *Ceriporiopsis subvermispora* kullanılarak gerçekleştirilen biyolojik işlemlerden

sonra, kontrol örnekleri ile kıyaslandığında, kappa sayısında sırasıyla % 34, 21 ve 19 azalma görülmektedir (Yaghoubi, Mohammad ve Seyed, 2008).

1.4.3 Biyo-beyazlatma

Yumuşak elementel klor veya tamamen klor içermeyen yeni çevre dostu beyazlatma teknolojileri, kağıt hamuru içinde çözünmeyen sellüloz içeriğini en aza indirme, yüksek miktarlarında parlaklığını ayarlama ve geliştirme için gereklidir. Bu amaçla, beyaz çürükçül fungusların ligninolitik enzimleri kağıt hamuru ağartma işleminde kullanılırken, klor içermeyen ağartma işlemi gerçekleştirme ve kimyasal kullanımına sınırlama getirir (Scott, Akhtar ve Kirk, 2000). Çürükçül fungus *Trametes (Coriolus) versicolor* 'un yardımıyla klorlama yapılmaksızın kağıt hamuru parlaklığı, % 2 oranında arttırılabilmektedir (Reid, Paice ve Jurasek, 1990).

1.4.4 Toksik Bileşiklerin biyodegradasyonu

P. chrysosporium dan elde edilen ligninolitik enzimler çok geniş bir aralık içerisinde dirler. Organik toksik bileşikler, toksik olmayan metabolitlere ya da CO₂ ve H₂O ya dönüştürme kapasitesine sahiptir (Bumpus ve Aust, 1987). *P. chrysosporium* gibi beyaz çürükçül funguslar, aynı zamanda 2,4,6-trinitrotoluen, poliklorlu bisfeniller, organoklorlar, PAHlar ve ağaç koruyucuları gibi çevreye zararlı organokirliliklerin yıkımında da etkindirler (Pointing, 2001; Leonowicz ve diğer., 2001).

1.4.5 Biyoanalitik ve Nanobiyoteknoloji Uygulamaları

Son 20 yıldır, biyoelektrokimyanın önemi artmış ve çevre ve klinik analizlere yönelik biyosensör çalışmaları analitik uygulamalara örnek olarak verilebilir (Haghighi, Gorton, Ruzgas ve Jönsson, 2003). Günümüzde, lakkazlar elektron transfer reaksiyonlarını, herhangi bir kofaktöre gereksinim duymadan katalizledikleri için, azid, oksijen veya çeşitli bileşikler tayin etmek için biyosensör çalışmalarında kullanılmaktadır. Ayrıca bu enzimin, morfin ve kodein (Bauer ve diğer., 1999)

katekolaminler (Lisdat ve diğeri., 1997; Leite, Lupetti, Fatibello, Vieira ve Barbosa, 2003; Ferry ve Leech, 2005), bitki flavonoidlerin (Jarosz-Wilkolazka, Ruzgas ve Gorton., 2004) tayinlerinde biyosensör olarak kullanımı mevcuttur. Ayrıca, lakkazlar mikro ve nano boyutta farklı yüzey tiplerine biyomoleküllerin spesifik adsorpsiyonun ve depolanmasının kontrolünü sağlayan daha etkili ve küçük biyosensörlerin yapımında rol oynayarak nanobiyoteknolojiye katkı sağlamaktadırlar (Couto ve Herrera, 2006).

BÖLÜM İKİ

MATERYAL ve YÖNTEM

Bu bölümde tez çalışmasıyla ilgili olarak kullanılan malzemeler ve deneysel işlemler açıklanmaktadır.

2.1 Materyal

Bu tez kapsamında, Agromantar (Denizli) firmasından sağlanan *Pleurotus ostreatus* HK-35 beyaz çürükçül fungusu, Lak ve MnP ligninolitik enzimlerinin derin kültür fermentasyonunda üretimi amacıyla kullanılmıştır.

2.2 Yöntem

Bu tezde, tayin yöntemleri spektrofotometrik olarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca biyokütle ve pH ölçümleri de belirlenmiştir.

2.2.1 Mikroorganizmaların Saklanması

P. ostreatus un spor üretimi için 3 farklı agar ortamı denenmiştir. Bu ortamların bileşenleri aşağıda verilmektedir;

- ✓ 30 g/L malt ekstrakt, 3 g/L pepton ve 15 g/L agar (pH 5,6) içeren MPA ortamı,
- ✓ 20 g/L malt ekstrakt ve 20 g/L agar (pH 6,0) içeren MEA ortamı,
- ✓ 39 g/L patates dekstrozu agar (pH 5,6) içeren PDA ortamı.

P. ostreatus spor üretimi için bu üç ortamdan en iyisi PDA olarak belirlenmiştir. Böylece, *P. ostreatus*, PDA ortamında (pH=5,6) 25 °C’de 7 gün inkübe edildi. Katı ortamın hazırlanması için, PDA distile suda tamamen çözülüp, pH 5,6 ya ayarlandı. Daha sonra bu ortamın otoklavda 121°C de 20 dk boyunca sterilizasyonu gerçekleştirildi. Soğuduktan sonra, UV-flow kabinin içerisinde ortam petri kaplarına

boşaltıldı. Ortam katılaştıktan sonra, aşılama yapıldı ve inkübasyon 25°C’de gerçekleştirildi. *P. ostreatus*, PDA ortamı içinde yaklaşık 1 haftada petri kabını kaplamıştır (Şekil 2.1). Ayrıca, her ay taze agar ortamına geçirilerek *P. ostreatus* +4°C’ de depolanmıştır.



Şekil 2.1 *P. ostreatus* PDA ortamında petri kabını tamamen kaplayışı.

2.2.2 Büyüme Ortamı ve Derin Kültür Fermentasyon

Bu çalışmada kullanılan sıvı ortam bileşenleri aşağıda verilen tablodaki değerler ile hazırlanmıştır (Téllez-Téllez ve diğer., 2008).

Tablo 2.1 *P. ostreatus* DKF ortam bileşenleri.

Sıvı Ortam Bileşenleri (litrede);	g
Glukoz	10
Yeast ekstrakt	5
KH ₂ PO ₄	0,4
K ₂ HPO ₄	0,4
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,5
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,05
MnSO ₄ .H ₂ O	0,05
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,001
CuSO ₄	0,25

P. ostreatus dan Lak ve MnP enzim üretimleri için, DKF yöntemi kullanılmıştır. Sıvı ekim ortam bileşenleri istenilen hacimde hazırlandıktan sonra pH 6,0 'ya ayarlanarak, otoklavda 121°C de, 20 dk boyunca sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Ortam oda sıcaklığına geldikten sonra, sıvı ekim için, aşılama 1 cm² lik pluglar ile yapıldı. Her bir 100 ml lik erlenmayere, büyüme ortamından 10 mL eklenerek, 3 adet 1 cm² lik pluglarla aşılama 25°C de gerçekleştirilmiştir.

- ✓ Tablo 2.1 de verilen sıvı besi ortamı bileşimlerine göre, karbon kaynağı olarak 10 g/L glukoz kullanılarak gerçekleştirilen DKF de Lak ve MnP enzim üretimlerinde durağan ve çalkalamalı kültürasyon modunun,
- ✓ Ayrıca, Cu⁺², Mn⁺² iyonlarının varlığının ve derişimlerinin,
- ✓ Farklı karbon kaynağı olarak nişastanın varlığı ve derişimlerinin ve
- ✓ Non-iyonik deterjan olarak Tween 80 nin karbon kaynağı olarak glukoz ve nişasta varlığında *P. ostreatus* DKF şartlarında Lak ve MnP enzim üretimlerine etkileri incelenmiştir.

2.2.3 Ham Enzim Ekstraktının Hazırlanması

DKF deki ham enzim ekstraktı, buz banyosunda 1 saat boyunca 180 rpm de, çalkalanarak elde edildi. Daha sonra, 5000 rpm de +4°C de 10 dk santrifüjleme işleminden geçirildi. Elde edilen süpernatant, ham enzim ekstraktı olarak adlandırıldı.

2.2.4 Örneklerin Analizi

Derin kültür fermentasyonundan elde edilen örneklerde, ortamdaki indirgen şeker, azot seviyelerinin yanı sıra kuru kütle, Lak ve MnP enzim aktiviteleri ve protein tayinleri gerçekleştirildi. Aynı zamanda, pH daki değişimler izlendi.

2.2.4.1 Kuru Kütlenin Belirlenmesi

Kuru kütle tayini için, darası alınmış saat camlarına santrifüj sonrası süpernatantdan 1 ml alınarak, sabit tartıma gelene kadar, 105°C de etüvde 2 saat boyunca bekletildi. Örnekler etüvden çıkınca, desikatörde soğuduktan sonra tartılıp, dara ve örnekler arasından çıkan farktan kuru kütle miktarı hesaplandı.

2.2.4.2 İndirgen şeker konsantrasyonunun belirlenmesi

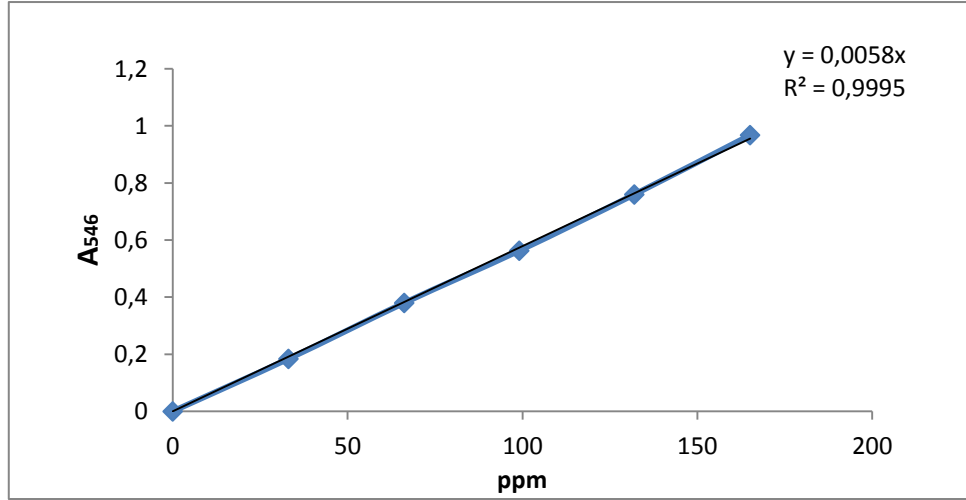
Ham enzim ekstraktını elde ettikten sonra, bu süpernatantdaki indirgen şeker analizi için dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemi kullanılmıştır (Miller, 1959). Bu yöntem indirgen şeker olarak adlandırılan serbest karbonil grubu (C=O) nun varlığını tespit eder. DNS yönteminde kullanılan çözeltiler ;

Çözelti A: 1g dinitrosalisilik asit, 20 mL 2N NaOH çözeltisinde çözöldü.

Çözelti B: 30 g sodyum-potasyum tartarat, 50 mL distile suda çözöldü.

B çözeltisi, A çözeltisine eklenerek karıştırılır ve daha sonra toplam hacim 100 mL ye tamamlanır. Elde edilen DNS çözeltisi karanlıkta saklanır. Analiz metodunun ilk adımında, 500 µL süpernatant ile 500 µL DNS çözeltisi karıştırılır. Bu karışım 10 dk kaynar su banyosunda bekletilir ve ardından 1 dk boyunca buzda soğutulur. 5 mL

distile su eklenip karıştırılır. Spektrofotometrede 546 nm de köre karşı okunur. Köre 500 µL süpernatant yerine distile su eklenir, aynı işlem uygulanır. Standart eğrisi 0-165,1 µg/mL aralığında glukoz monohidrat çözeltisi kullanılarak çizilmiştir. Kalibrasyon grafiği Şekil 2.2 de verilmiştir.



Şekil 2.2 İndirgen şeker tayinin standart eğrisi

2.2.4.3 Azot Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Elde edilen ham enzim ekstraktının azot içeriği fenol-hipoklorid yöntemi ile belirlenmiştir (Weatherburn, 1967). Fenol-hipoklorid yönteminde kullanılan çözeltiler;

- ✓ Fenol reaktif çözeltisi, çözelti A ve B den eşit hacimlerde karıştırılarak hazırlanmıştır;

Çözelti A: 50 mL distile suda 5 g fenol çözöldü.

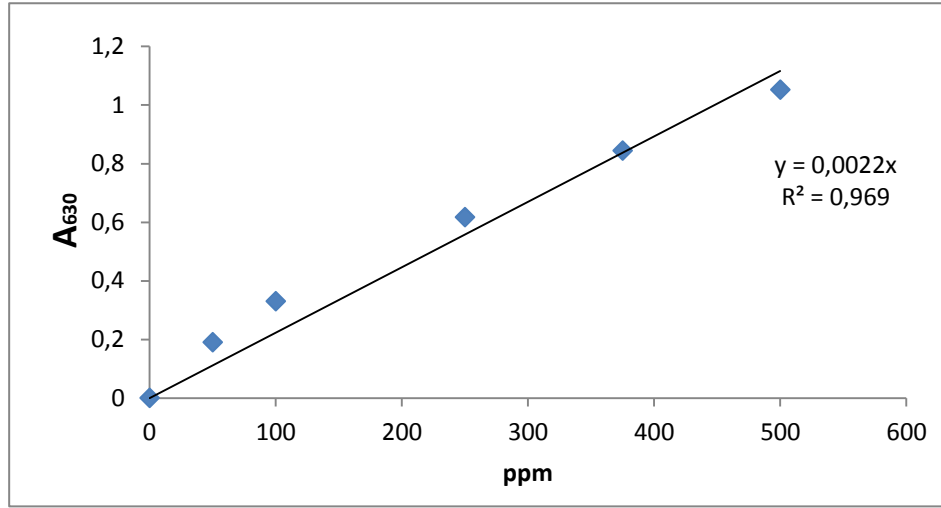
Çözelti B: 50 mL distile suda 25 mg sodyum-nitroprusit çözöldü.

- ✓ Alkali hipoklorit çözeltisi için A ve B çözeltileri eşit hacimlerde karıştırılır.

Çözelti A: 5 g sodyum hidroksit 100 mL saf suda çözöldü.

Çözelti B: 26g/L lik ticari hipoklorit çözeltisi (NaOCl) hazırlandı.

Analizin ilk adımında, 2 mL lik supernatant 15 dk boyunca oda koşullarında inkübe edilir. Daha sonra, inkübasyondaki örnekler 500 µL fenol çözeltisi ve 500 µL alkali hipoklorit çözeltisi sırayla eklenerek, karışım vortekslenir. Bu karışım 60°C de su banyosunda 5 dk inkübe edilir. Ardından spektrofotometrede 630 nm de köre karşı örneklerin absorbansı okunur. Kör ise yine supernatant yerine distile su eklenerek hazırlanır. Standart eğrisi 0-500 µg/mL aralığındaki amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄) çözeltisi hazırlanarak, yine aynı adımlar uygulanarak hazırlanan kalibrasyon eğrisi şekilde gösterildiği gibi çizildi (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 Azot standart eğrisi

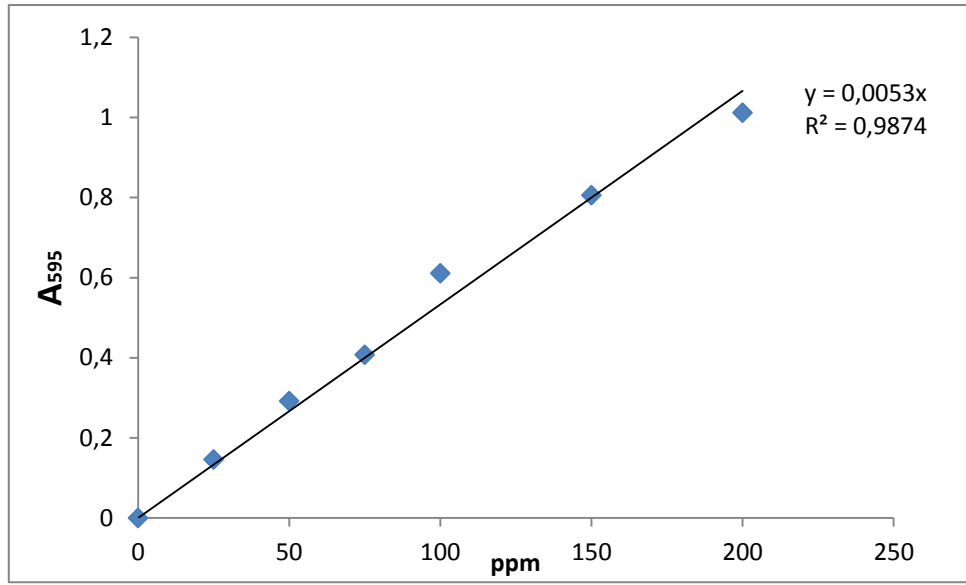
2.2.4.4 pH Seviyelerinin Belirlenmesi

P. ostreatus DKF örneklerinin pH düzeyleri, pH-metre kullanılarak ölçülmüştür.

2.2.4.5 Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi:

Ham ekstraktı elde ettikten sonra, bu süpernatantın protein içeriği Bradford metoduyla belirlenmiştir (Bradford, 1976). Bradford yönteminde kullanılan çözeltilerin hazırlanışı:

Boya stok reaktifi: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, %95 lik 50 mL etanol çözeltisi ile çözülür. Bu çözeltiye %85 lik H_3PO_4 eklenir ve toplam hacim 1000 mL ye distile su ile tamamlanır. Bu çözelti karanlık reaktif şişesinde 4°C de saklanır. Örneklerin protein konsantrasyonunun absorbansı 595 nm de okunmuştur. 100 μ L örneğe 900 μ L boya reaktifi eklendikten 2 dk sonra absorbansı köre karşı okunur. Köre ise örnek yerine 100 μ L distile su ve 900 μ L boya reaktifi eklenir. Kalibrasyon eğrisi 0-200 μ g/mL aralığında sığır serum albumini kullanılarak çizilmiştir (Şekil 2.4) Kalibrasyon eğrisi aşağıda grafiği verilmiştir.



Şekil 2.4 Protein kalibrasyon grafiği

2.2.4.6 Ligninolitik Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Lak enzim aktivitesi, 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit) ABTS nin oksidasyonu ile belirlenir ($\epsilon_{\max} = 36000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$). Bu reaksiyon karışımı toplamda 1 mL olacak şekilde ayarlanır: 700 μ L 100 mM sodyum asetat tamponu (pH 4,5), 100 μ L distile suda hazırlanan 2,0 mM (ABTS-(NH_4)₂) ve 200 μ L enzim örneği eklenir, iyice karıştırılır ve reaksiyonun absorbansı UV-spektrofotometresinde 420 nm ve 25°C de izlenir. 1 ünite enzim aktivitesi, örneğin her 1 mL sinde 1 dakikada, 1 μ mol ABTS nin oksidasyonu için gerekli olan enzim miktarıdır. Bu enzim aktivitesi U/L biriminde verilmektedir (Johannes ve Majcherczyk , 2000).

MnP enzim aktivitesi, 2,6- dimetoksifenolün (DMP) $\epsilon_{\text{max}}=27500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) oksidasyonu ile ölçülür (Kuwahara, Glenn, Morgan ve Gold, 1984). 600 μL 250 mM Na-tartarat tamponu (pH 4,5), 50 μL 20 mM 2, DMP, 50 μL 20 mM $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 100 μL 4 mM H_2O_2 ve 200 μL enzim ekstraktı eklenerek toplamda 1 mL olacak şekilde reaksiyon karışımı hazırlanır. Bu reaksiyon, H_2O_2 ilavesiyle başlar ve 469 nm ve 25°C de 3 dk izlenir. 1 ünite enzim aktivitesi, örneğin her 1 mL sinde 1 dakikada, 1 μmol 2, 6-DMP nin oksidasyonu için gerekli olan enzim miktarıdır. Bu enzim aktivitesi U/L biriminde verilmektedir.

BÖLÜM ÜÇ

SONUÇLAR

3.1 Spor Üretiminin Optimizasyonu

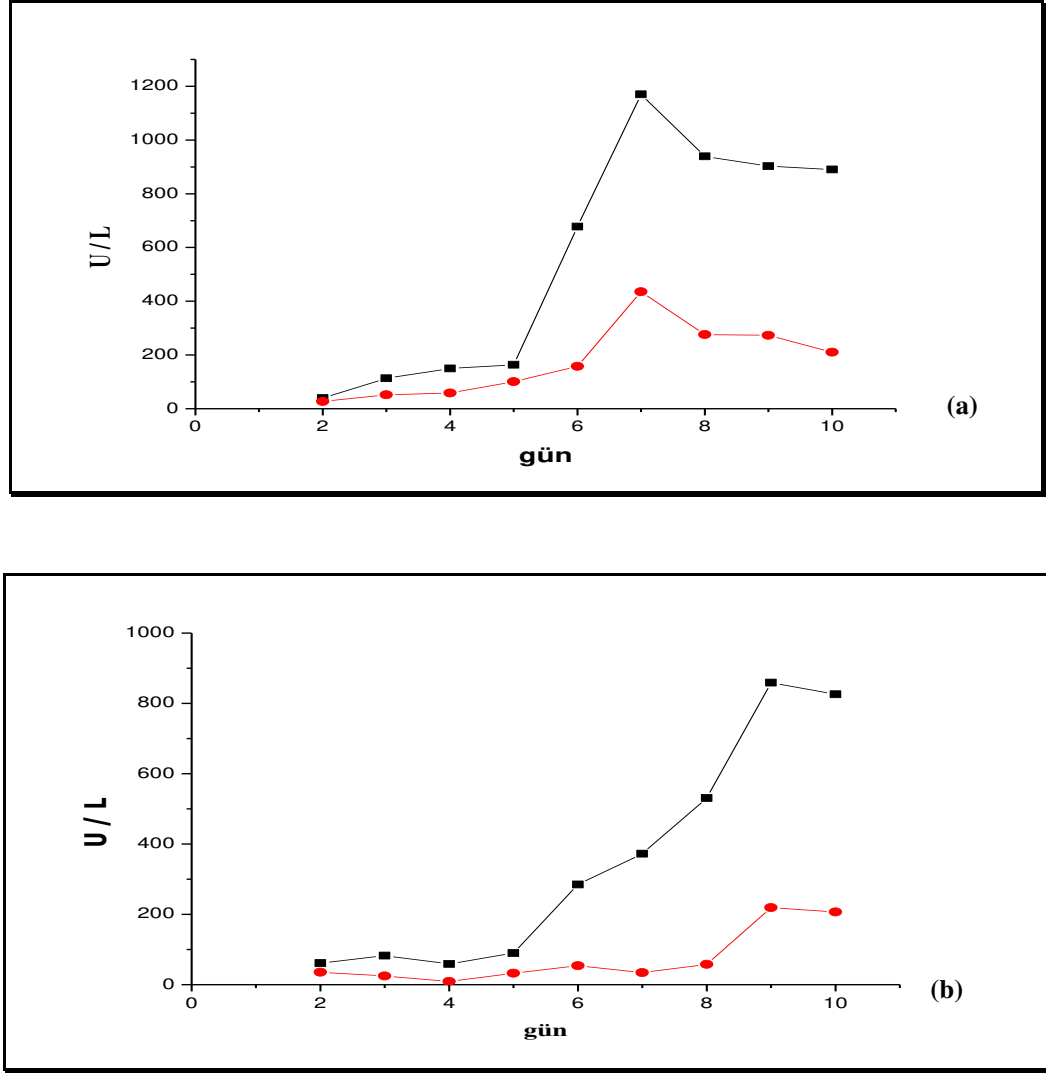
P. ostreatus un spor üretimi için PDA, MEA ve MPA olmak üzere üç farklı katı agar ortamı denenmiştir. *P. ostreatus*, PDA ortamında, 25°C de, 7 günde petri kabının yüzeyini tamamen kapladığından en iyi katı agar ortamı olarak belirlenmiştir. Ayda bir pasajlanan fungus, +4 °C de depolandı.

3.2 Derin Kültür Fermentasyonu

Bu tez çalışmasında, *P. ostreatus* dan DKF nda üretilen Lak ve MnP enzim aktiviteleri üzerine çalkalamalı ve durağan kültürasyon modunun, sentetik büyüme ortamındaki Cu^{+2} ve Mn^{+2} iyonlarının, farklı karbon kaynağı olarak nişastanın ve non-iyonik deterjan olan Tween-80 nin etkileri incelenmiştir. Bu amaçla, maksimum düzeyde Lak ve MnP enzim üretimi için, sentetik büyüme ortamının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Ayrıca inkübasyon periyoduna bağlı olarak pH, kuru kütle, indirgen şeker (glukoz), azot ve protein düzeyleri de belirlenmiştir.

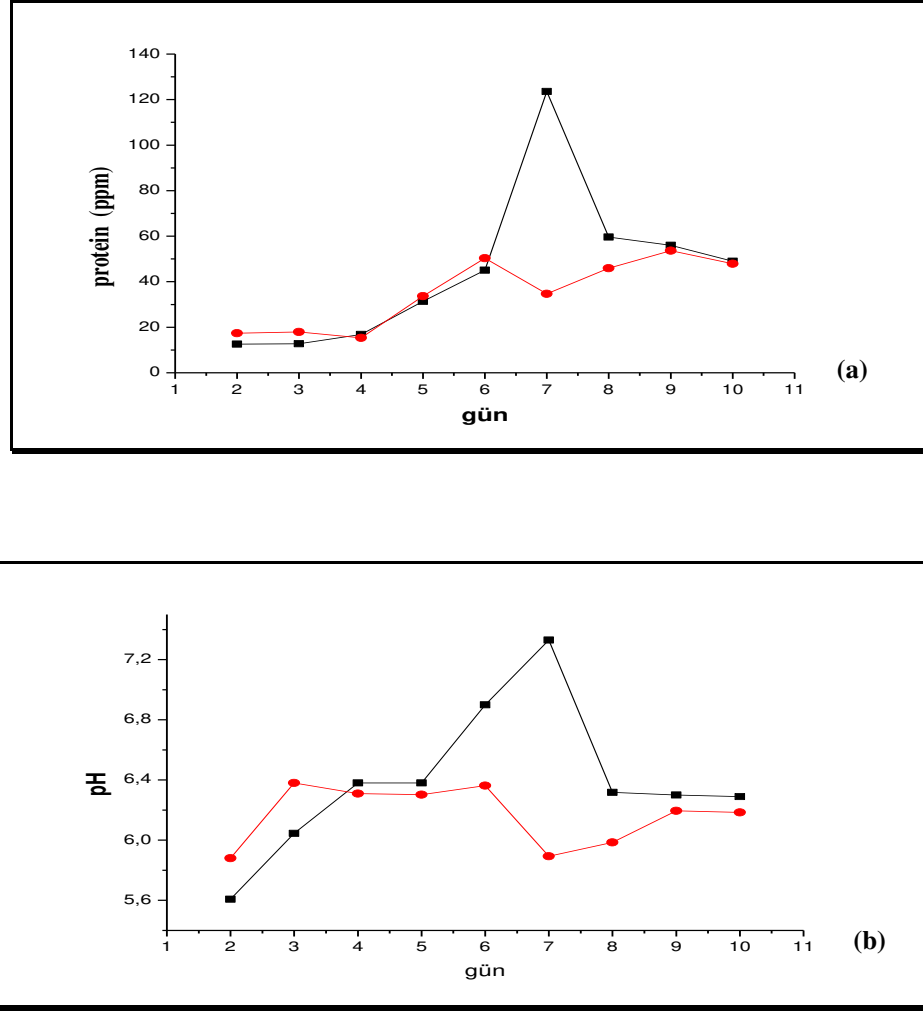
3.2.1 Kültivasyon Modunun Etkisi

P.ostreatus tarafından DKF de Lak ve MnP enzim aktivite düzeylerine durağan ve çalkalamalı (120 rpm) kültürasyon modunun etkisi 25°C de incelendi (Şekil 3.1 a ve b)



Şekil 3.1 Durağan (a) ve Çalkalamalı (b) kultivasyon modunun Lak ve MnP enzim üretimlerinin etkisi (-■-; Lak, -●-; MnP).

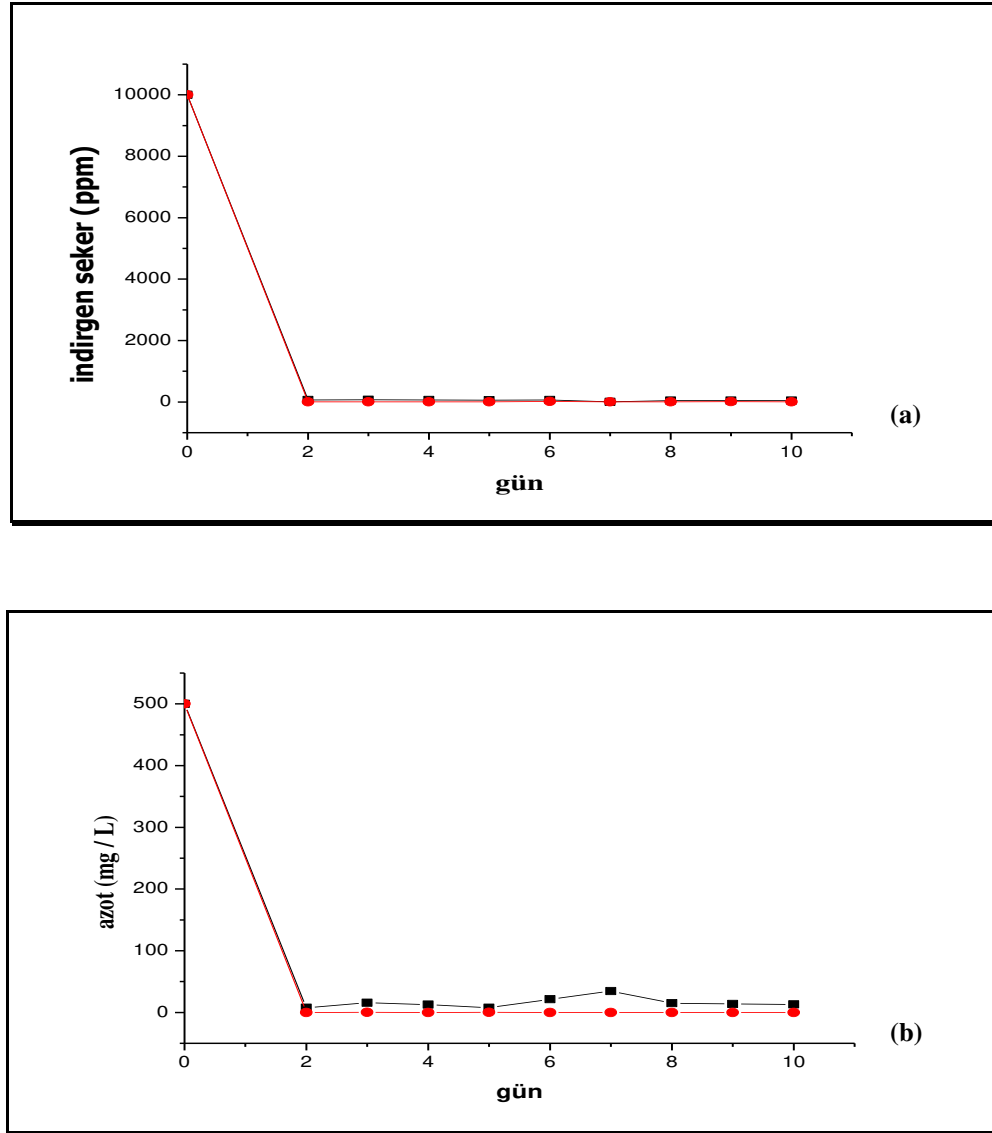
Şekil 3.1 a ve b den görüldüğü gibi; en yüksek enzim aktivitelerine durağan kültürasyon modunda ulaşılmaktadır. Durağan koşulda en yüksek Lak aktivitesi 8.günde 939,15 U/L ve MnP aktivitesi ise 7.günde 435 U/L olarak saptanmıştır. 120 rpm lik çalkalamalı kültürasyon modunda ise maksimum Lak aktivitesi 9.günde 859,15 U/L ve MnP aktivitesi 218,9 U/L değerlerinde bulunmuştur.



Şekil 3.2 Durağan ve çalkalamalı kültivasyon modunun, protein (a) ve pH (b) düzeyine etkisi (-■-;Durağan, -●-; Çalkalamalı).

Şekil 3.2 a dan görüldüğü gibi, protein düzeyi durağan ve çalkalamalı kültivasyon modlarında, 6.güne kadar benzer şekilde devam etmiş, 7.günde durağan koşulda maksimum protein düzeyine ulaşılmış, ardından düşüş gözlenmiştir.

DKF de inkübasyona bağımlı pH değişimi, durağan modta, 2. günden 4.güne 5,6 dan 6,38'e yükselerek, 7.günde 7,33 lük değere ulaşmış, ardından hızlı bir düşüş göstermiştir (Şekil 3.2 b). Çalkalamalı modta ise, 7.günde pH değeri 6,36 den 5,98 e düşmektedir.

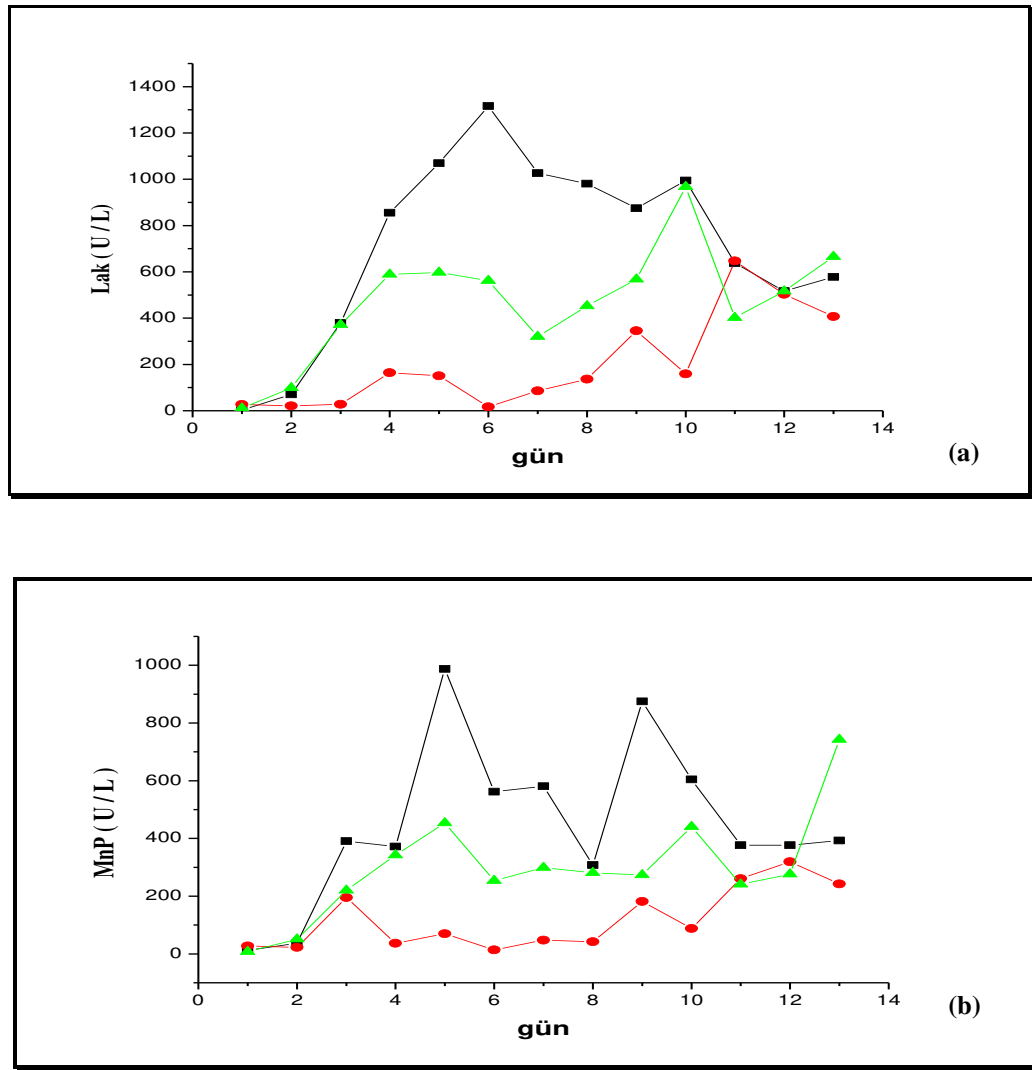


Şekil 3.3 Durağan ve çalkalamalı kültürasyon modunun, glukoz (a) ve azot (b) düzeyine etkisi (-■-;Durağan, -●-; Çalkalamalı).

P.ostreatus un DKF ortamında kullanılan karbon ve azot kaynakları, inkübasyonun 2. gününden itibaren çok hızlı bir düşüşle karbon ve azot sınırlı koşullara ulaşmıştır (Şekil 3.3 a ve b). Böylece, genelde beyaz çürükçül fungusların ligninolitik enzimleri üretmedeki ortam koşulu sağlanmış oldu. İncelenen koşullarda Lak ve MnP aktivite düzeylerinin de 3.günden sonra anlamlı bir artış gösterdiği saptanmıştır. Elde edilen bu sonuçlara göre; *P.ostreatus* tan maksimum Lak ve MnP üretimi için kültürasyon modu, durağan olarak belirlenmiştir.

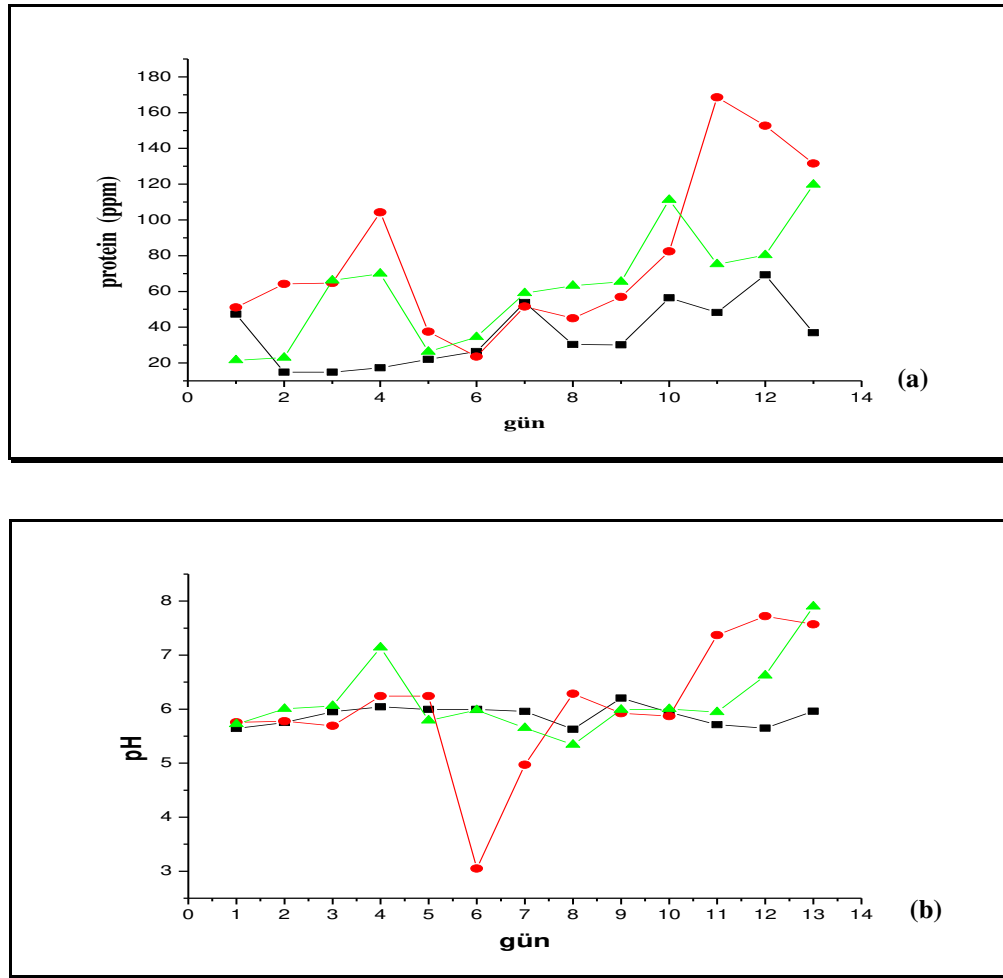
3.2.2 Cu^{+2} ve Mn^{+2} iyonlarının etkisi

Büyüme ortamı içinde Cu^{+2} ve Mn^{+2} iyonlarının varlığı, beyaz çürükçül funguslardan ligninolitik enzim üretimini etkilemektedir. Bu amaçla, *P. ostreatus* un sentetik büyüme ortamında sadece Cu^{+2} , sadece Mn^{+2} ve hem Cu^{+2} hem Mn^{+2} varlığında enzim aktivite değişimleri inkübasyon sürecine bağımlı olarak 25°C ve durağan koşulda incelenmiştir. Kullanılan sentetik büyüme ortamındaki, Cu^{+2} konsantrasyonu 1mM iken, Mn^{+2} konsantrasyonu 0,29 mM dır.



Şekil 3.4 Cu^{+2} ve Mn^{+2} varlığındaki sentetik büyüme ortamının Lak (a) ve MnP (b) enzim aktiviteleri üzerine etkisi. (■-; Cu^{+2} , -●-; Mn^{+2} , -▲-; Cu^{+2} ve Mn^{+2})

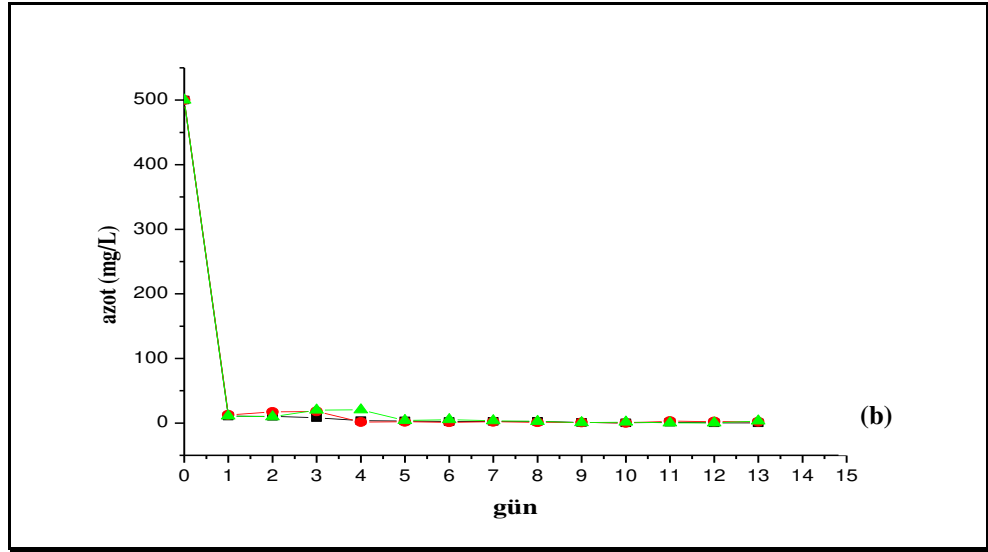
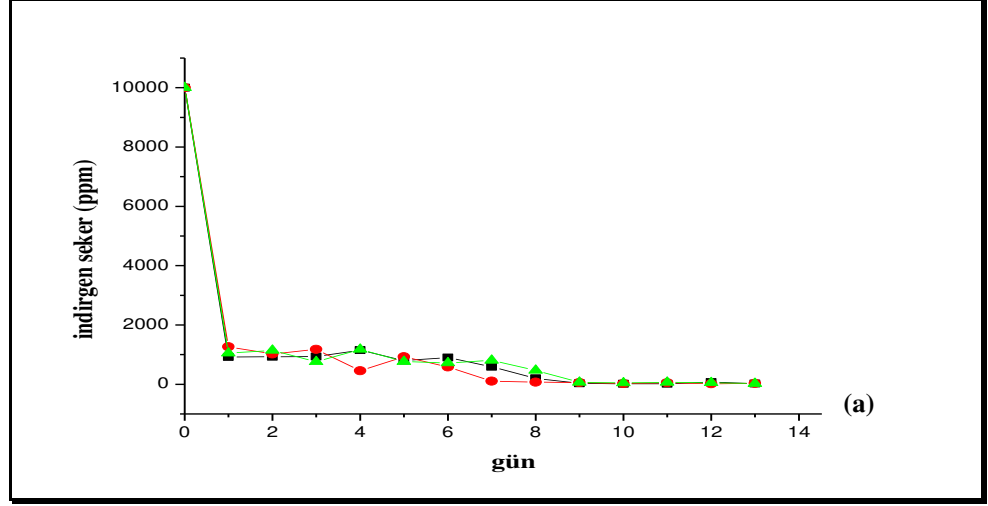
Şekil 3.4 (a ve b) den görüldüğü gibi, sadece 1 mM Cu^{+2} içeren büyüme ortamında, maksimum Lak aktivitesi 6.günde 1316,6 U/L saptanırken, MnP aktivitesi ise, 5.günde 987,4 U/L olarak bulunmuştur. Sadece 0,29 mM Mn^{+2} varlığındaki DKF ortamında, Lak aktivitesi 11.günde 647,5 U/L, MnP aktivitesi 12.günde 319,6 U/L saptanmıştır. Her iki iyonun bulunduğu ortamda ise maksimum Lak ve MnP aktivitesi 13.günde belirlenmiştir.



Şekil 3.5 Cu^{+2} ve Mn^{+2} varlığındaki sentetik büyüme ortamının protein (a) ve pH (b) düzeylerine etkisi. (-■-; Cu^{+2} , -●-; Mn^{+2} , -▲-; Cu^{+2} ve Mn^{+2}).

Şekil 3.5 (a) da incelenen parametrelere göre en yüksek protein düzeyi, sadece 0,29 mM Mn^{+2} varlığında 11. günde 168,6 ppm olarak saptanmıştır. Bu koşullarda inkübasyon periyoduna bağımlı pH düzeyleri incelendiğinde; Cu^{+2} varlığında anlamlı bir değişim gözlenmezken, Mn^{+2} ortamında 6. günde ani düşüş ve sonrasında artış

belirlenmiştir. Her iki iyonun bulunduğu ortamda ise pH düzeyi, 4. günde bir birimlik artışın ardından, 10. günden sonra artış göstermiş ve 7,9 değerine ulaşmıştır.

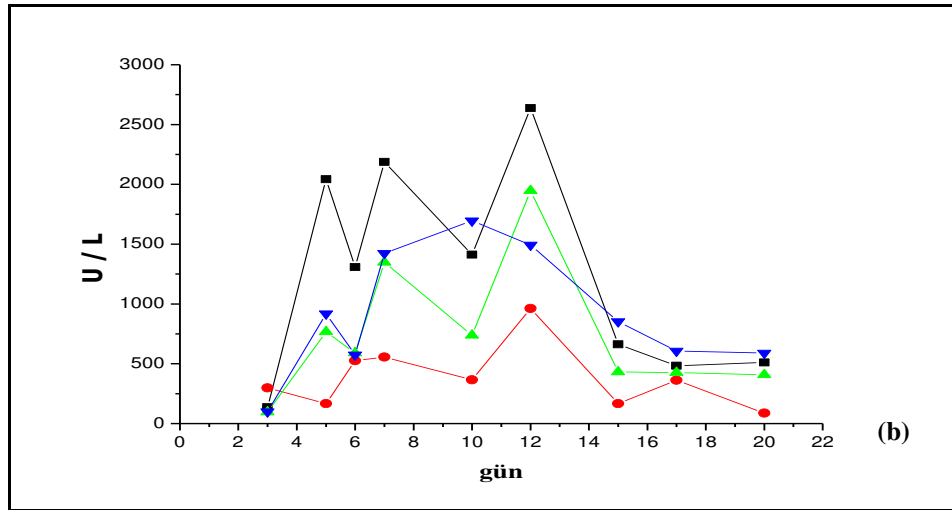
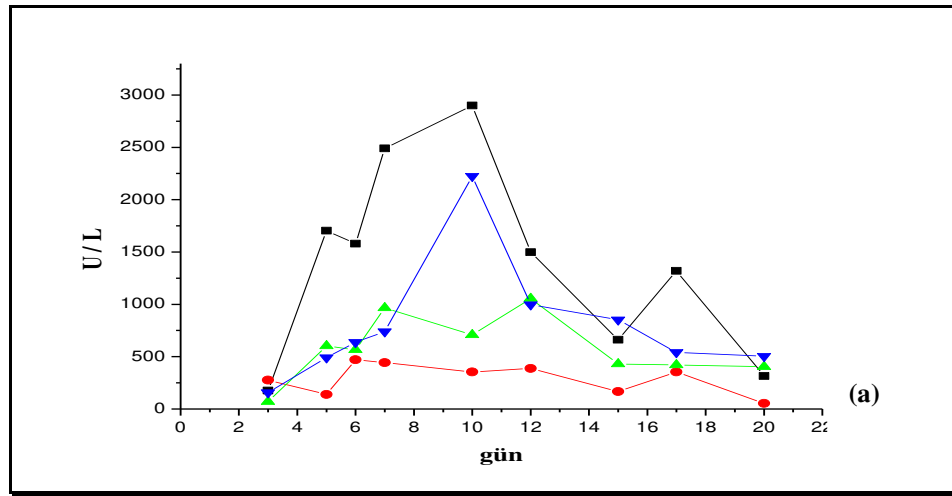


Şekil 3.6 Cu²⁺ ve Mn²⁺ varlığındaki sentetik büyüme ortamının azot düzeyi üzerine etkisi (-■-; Cu²⁺, -●-; Mn²⁺, -▲-; Cu²⁺ ve Mn²⁺).

Şekil 3.6 (a) ve (b) den görüldüğü gibi, ortamdaki glukoz ve azot düzeyleri, ilk günden itibaren hızla azalmış ve *P. ostreatus* büyüme ortamı sınırlı karbon ve azot düzeylerine ulaşmıştır.

3.2.3 Ortamdaki Cu^{+2} iyon derişiminin etkisi

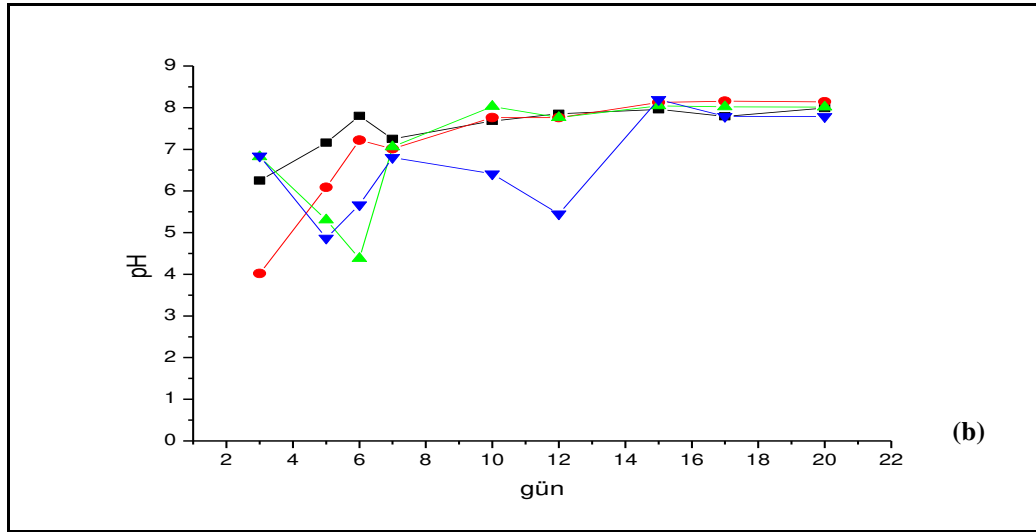
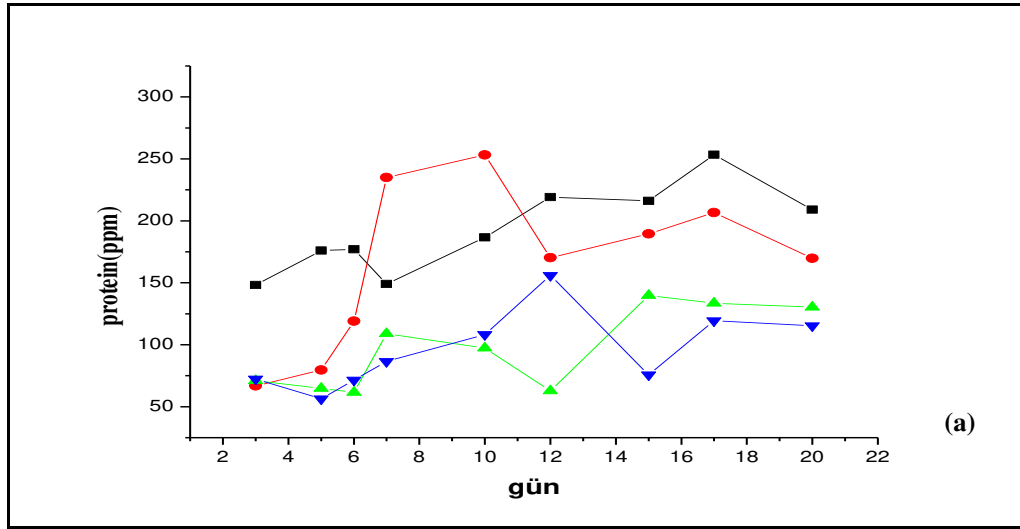
Çalışmanın bu adımında; Cu^{+2} iyonunun Lak ve MnP enzim üretiminde etkin olduğu belirlendikten sonra farklı (0,5; 1,0; 2,5 ve 5 mM) derişimlerinin bu enzimlerin üretimine etkisi de incelenmiştir. Bu ortamda Mn^{+2} derişimi, 0,29 mM olarak sabit tutulmuştur.



Şekil 3.7 Cu^{+2} derişimlerinin Lak (a) ve MnP (b) enzim üretimi üzerine etkisi (■-; 0,5 mM Cu^{+2} , -●-; 1 mM Cu^{+2} ; -▲-; 2,5 mM Cu^{+2} ; -▼- 5 mM Cu^{+2}).

Şekil 3.7 (a) ve (b) den görüldüğü gibi, 0,5 mM Cu^{+2} varlığında en yüksek Lak ve MnP enzim aktiviteleri, sırasıyla 10. günde 2900 U/ L ve 12.günde 2637,5

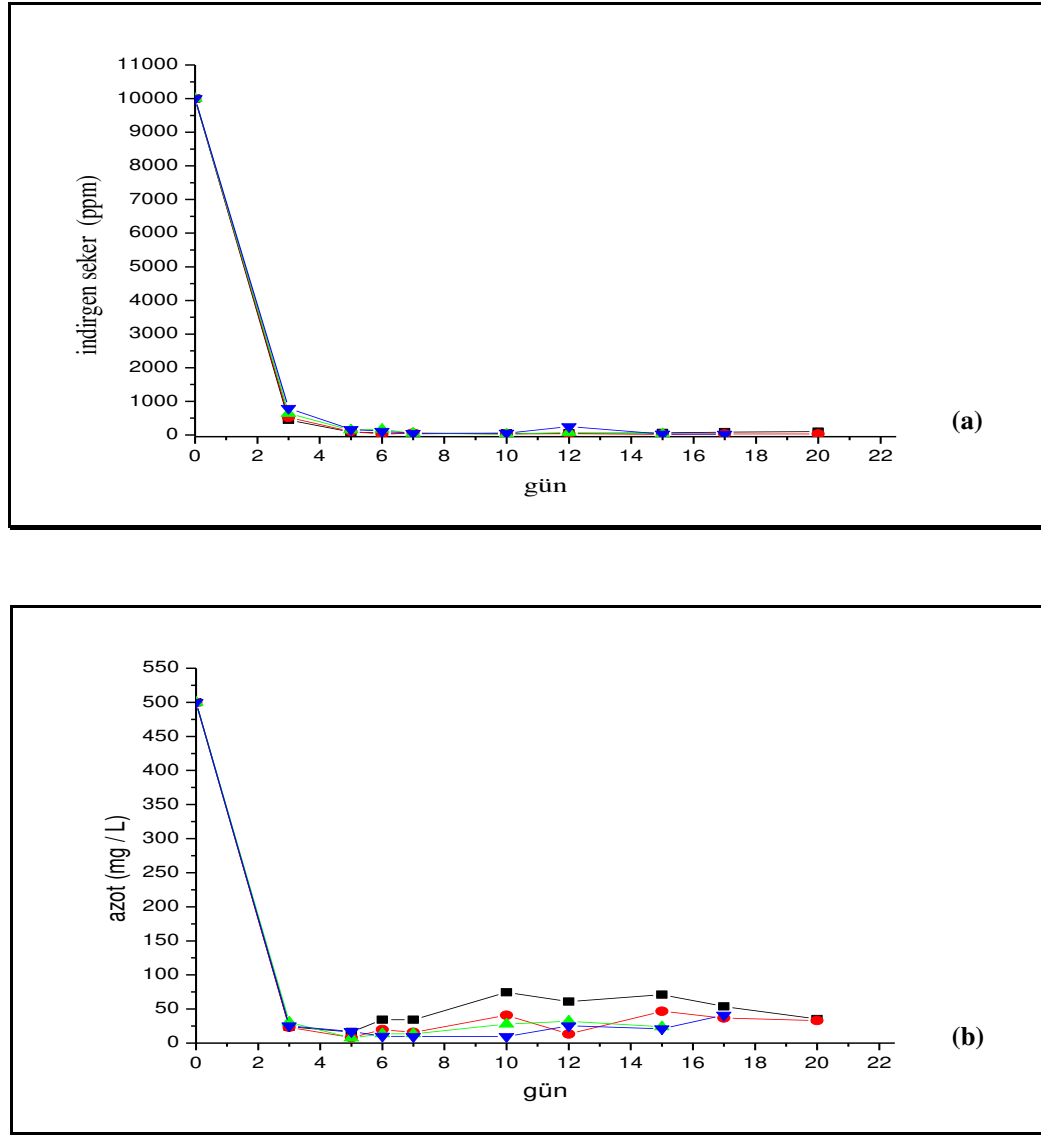
U/L olarak belirlenmiştir. 1 mM Cu^{+2} varlığında, maksimum Lak aktivitesi 6.gün 470 U/L iken, MnP aktivitesi ise 12.gün 962,2 U/L olarak saptanmıştır. 2,5 mM Cu^{+2} varlığında, en yüksek Lak ve MnP aktivitesi 12.günde sırasıyla, 1054,2 ve 1947 U/L bulunmuştur. Son olarak 5 mM Cu^{+2} varlığında ise, maksimum Lak aktivitesi 10.gün 2224 U/L ye ulaşırken, 12.günde MnP aktivitesi 1493,4 U/L olarak saptanmıştır.



Şekil 3.8 Cu^{+2} derişimlerinin protein (a) ve pH (b) düzeylerine etkisi. (■-; 0,5 mM Cu^{+2} , ●-; 1 mM Cu^{+2} ; ▲-; 2,5 Mm Cu^{+2} ; ▼-; 5 Mm Cu^{+2})

En yüksek protein düzeyi, 1 mM Cu^{+2} varlığında 10. günde 253,2 ppm olarak saptanmıştır. 2,5 ve 5 mM Cu^{+2} varlığında ise inkübasyona bağımlı olarak diğer Cu^{+2} derişimlerine göre daha düşük protein düzeyleri belirlenmiştir. İnkübasyon süresine

bağımlı olarak 0,5 ve 1 mM Cu^{+2} varlığında pH düzeyi genelde 6 ve üzerinde gözlenirken, 2,5 mM Cu^{+2} için, 6.günde ve 5 mM Cu^{+2} için ise 12.günde ani düşüşler saptanmıştır.

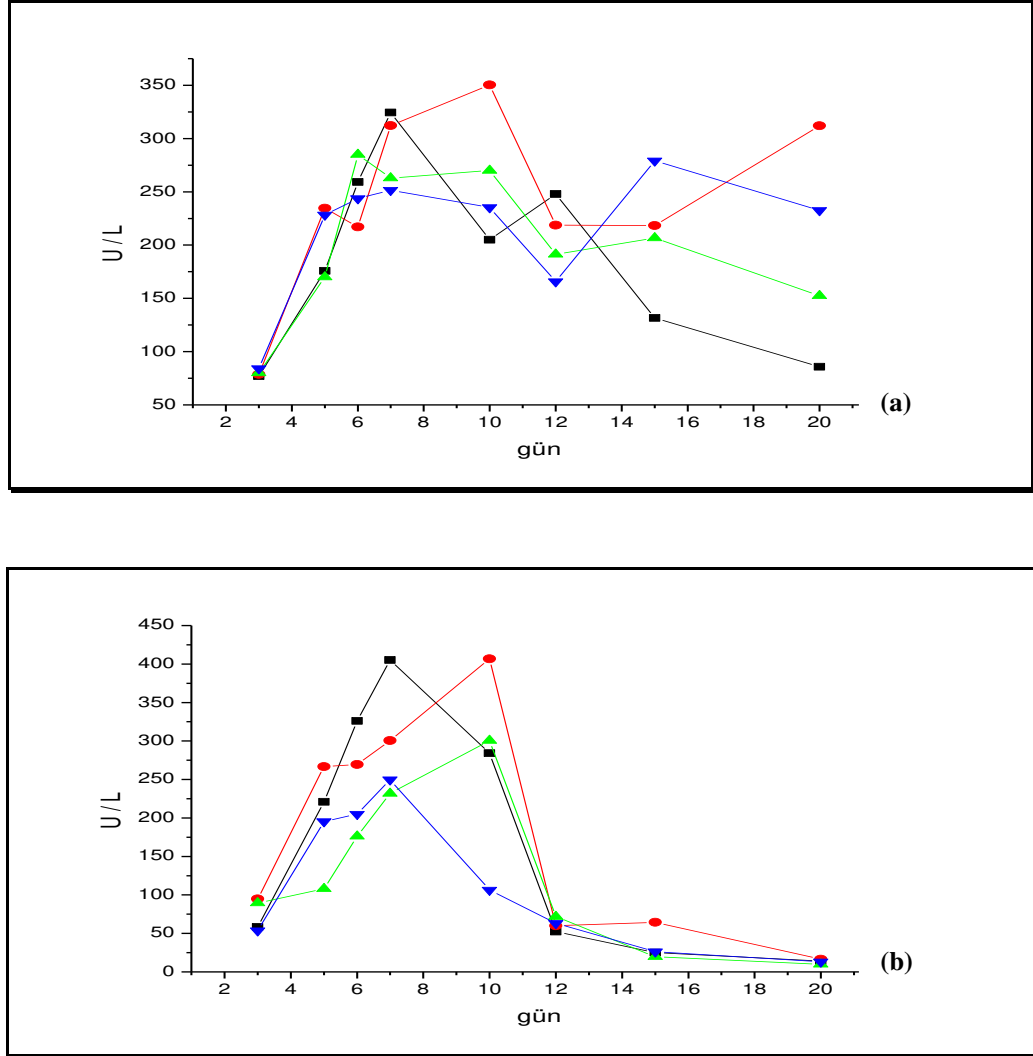


Şekil 3.9 Cu^{+2} derişimlerinin indirgen şeker (a) ve azot (b) düzeylerine etkisi (-■-; 0,5 mM Cu^{+2} , -●-; 1 mM Cu^{+2} ; -▲- 2,5 mM Cu^{+2} ; -▼- 5 mM Cu^{+2}).

İncelenen Cu^{+2} derişimine bağımlı olarak glukoz ve azot miktarları, inkübasyonun 3.gününde ani düşüşler göstererek DKF ortamının karbon ve azot sınırlı koşula ulaşması sağlanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, optimum Cu^{+2} derişimi 0,5 mM ve Mn^{+2} derişimi 0,29 mM olarak belirlenmiştir.

3.2.4 Ortamdaki Mn^{+2} iyon derişimlerinin etkisi

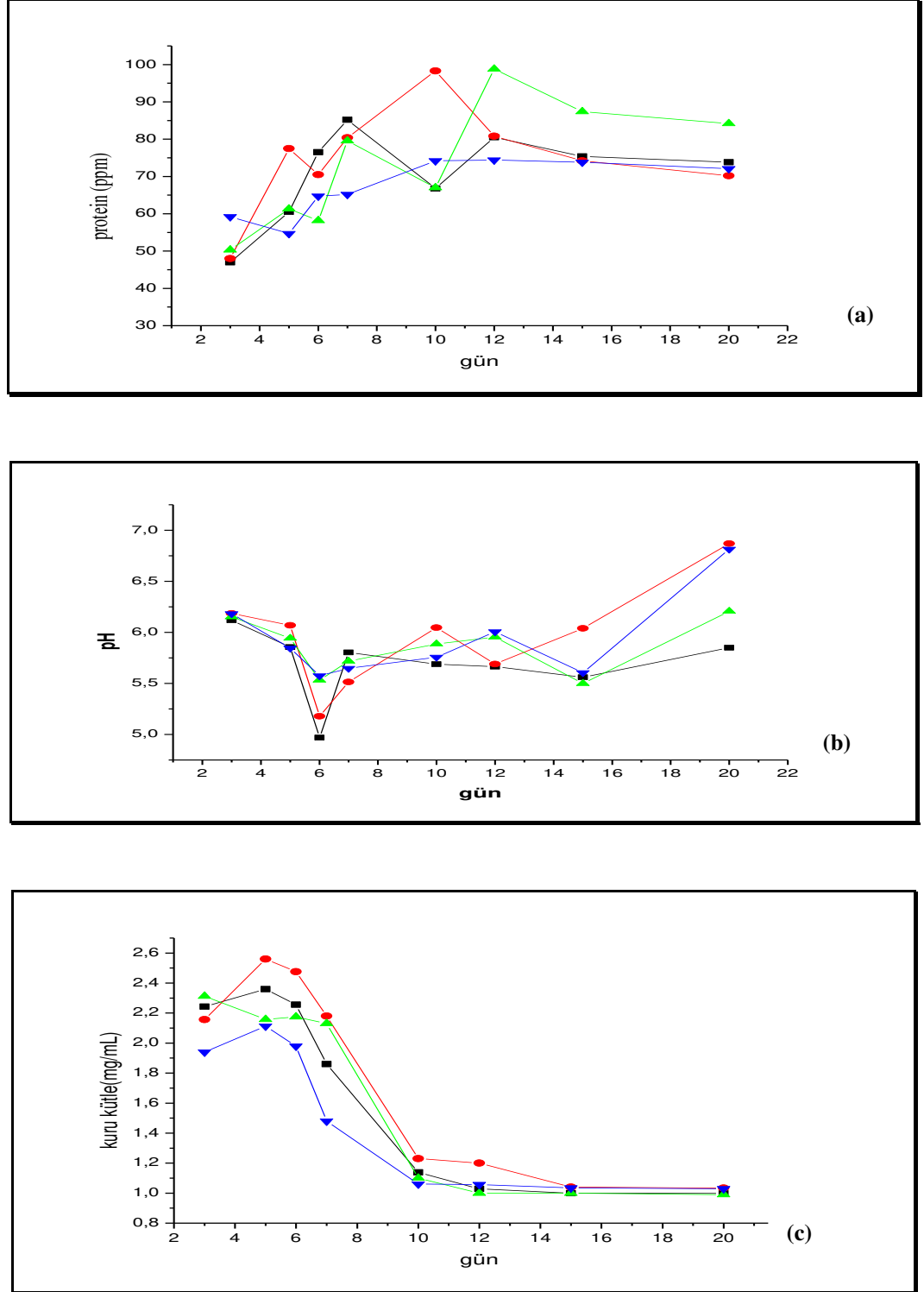
Tez çalışmasının bu aşamasında, 0,15; 0,5; 0,75 ve 1 mM Mn^{+2} derişimlerinin *P. ostreatus* dan üretilen Lak ve MnP enzim aktivitelerine etkisi incelendi.



Şekil 3.10 Mn^{+2} derişimine bağımlı Lak (a) ve MnP (b) enzim aktivite değişimleri (-■-; 0,15 mM Mn^{+2} , -●-; 0,5 mM Mn^{+2} , -▲-; 0,75 mM Mn^{+2} , -▼-; 1 mM Mn^{+2}).

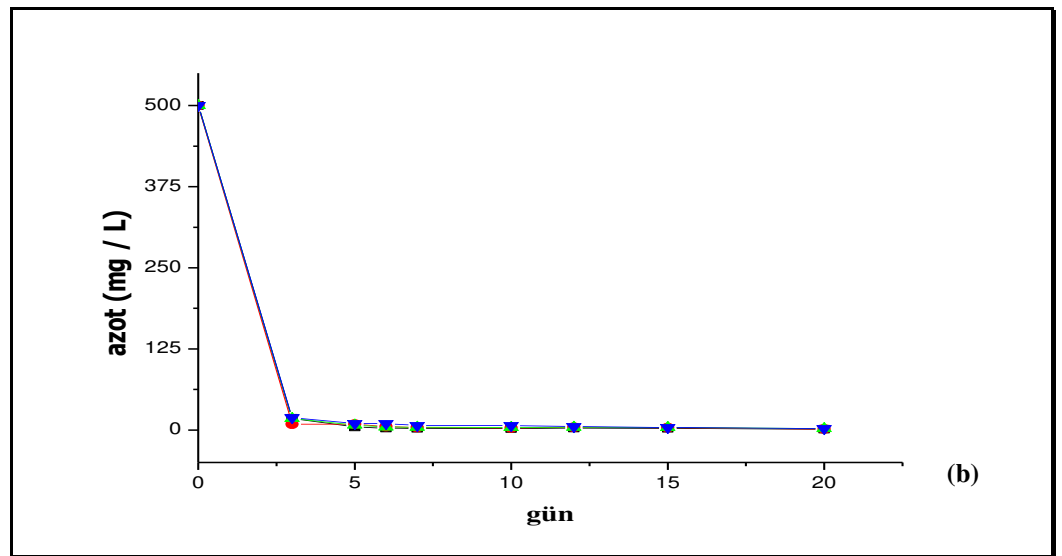
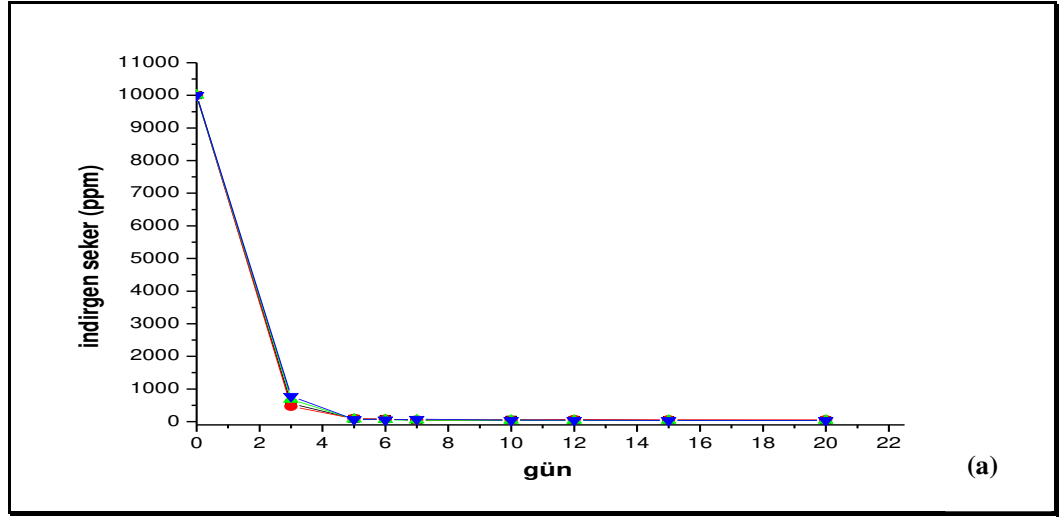
P. ostreatus DKF ortamındaki, şekil 3.10 (a) ve (b) den görüldüğü gibi, Mn^{+2} derişimi arttıkça maksimum Lak enzim aktivite değerleri düşmektedir. İncelenen Mn^{+2} derişimine bağımlı olarak en yüksek Lak aktivitesi; 0,5 mM Mn^{+2} derişiminde 10.günde 350,4 U/L olarak saptanmıştır. 0,15 ve 0,5 mM Mn^{+2} MnP enzim aktivitesi

hemen hemen benzer değerlerde maksimuma ulaşırken 0,75 ve 1 mM Mn^{+2} derişiminde ise daha düşük MnP enzim aktiviteleri saptanmıştır.



Şekil 3.11 Mn^{+2} derişimine bağımlı protein (a), pH (b) ve kuru kütle (c) düzey değışimleri (-■-; 0,15 mM Mn^{+2} , -●-; 0,5 mM Mn^{+2} , -▲-; 0,75 mM Mn^{+2} , -▼-; 1 mM Mn^{+2}).

Şekil 3.11 (a), (b), (c) den görüldüğü gibi; 0,5 mM; 0,75 mM Mn^{+2} varlığında sırasıyla, 10. günde ve 12. günde hemen hemen benzer değerlerde 98,3; 98,7 ppm olarak en yüksek protein düzeylerine ulaşmıştır. *P. ostreatus* inkübasyon periyodunun 6. gününde azalan Mn^{+2} derişimiyle azalan pH değerleri saptandıktan sonra inkübasyon süresine bağımlı artışlar gözlenmiştir. Kuru kütle miktarı ise 0,5 mM Mn^{+2} varlığında 5.günde 2,5 mg/mL olarak belirlendi. 0,75 ve 1,0 mM Mn^{+2} varlığında daha düşük kuru kütle değerleri saptanırken inkübasyonun 10.günden itibaren incelenen tüm Mn^{+2} derişimine bağımlı kuru kütlede önemli bir değışim gözlenmedi.

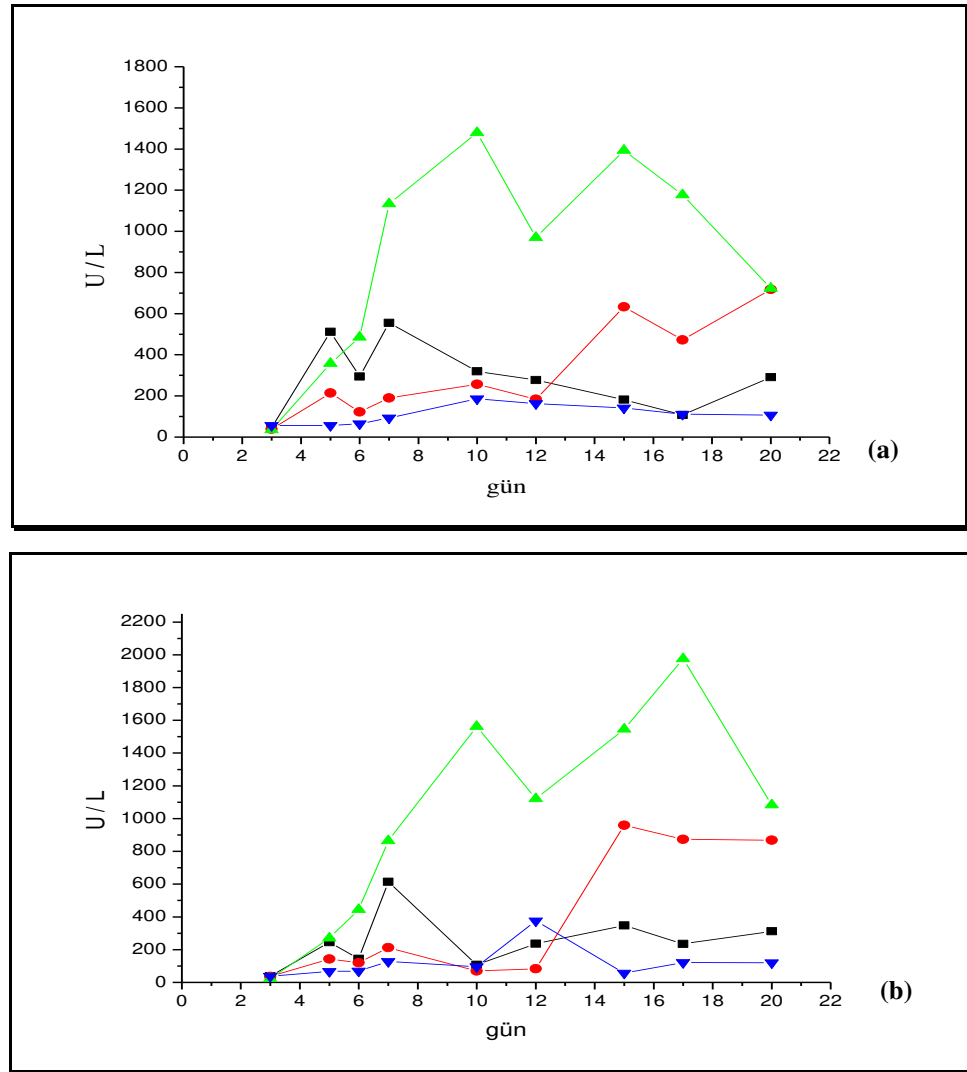


Şekil 3.12 Mn^{+2} derişimine bağımlı indirgen şeker (a), azot (b) düzey değışimleri (-■-; 0,15 mM Mn^{+2} , -●-; 0,5 mM Mn^{+2} , -▲-; 0,75 mM Mn^{+2} , -▼-; 1 mM Mn^{+2}).

Şekil 3.12 (a) ve (b) den görüldüğü gibi incelenen Mn^{+2} derişimlerine bağımlı olarak *P. ostreatus* DKF ortamında glukoz ve azot miktarları inkübasyonun 3. gününden itibaren sınırlı düzeye ulaşmışlardır. İncelenen Mn^{+2} derişimiyle elde edilen sonuçlara göre *P. ostreatus* DKF ortamındaki Mn^{+2} derişimi 0,29 mM olarak belirlenmiştir.

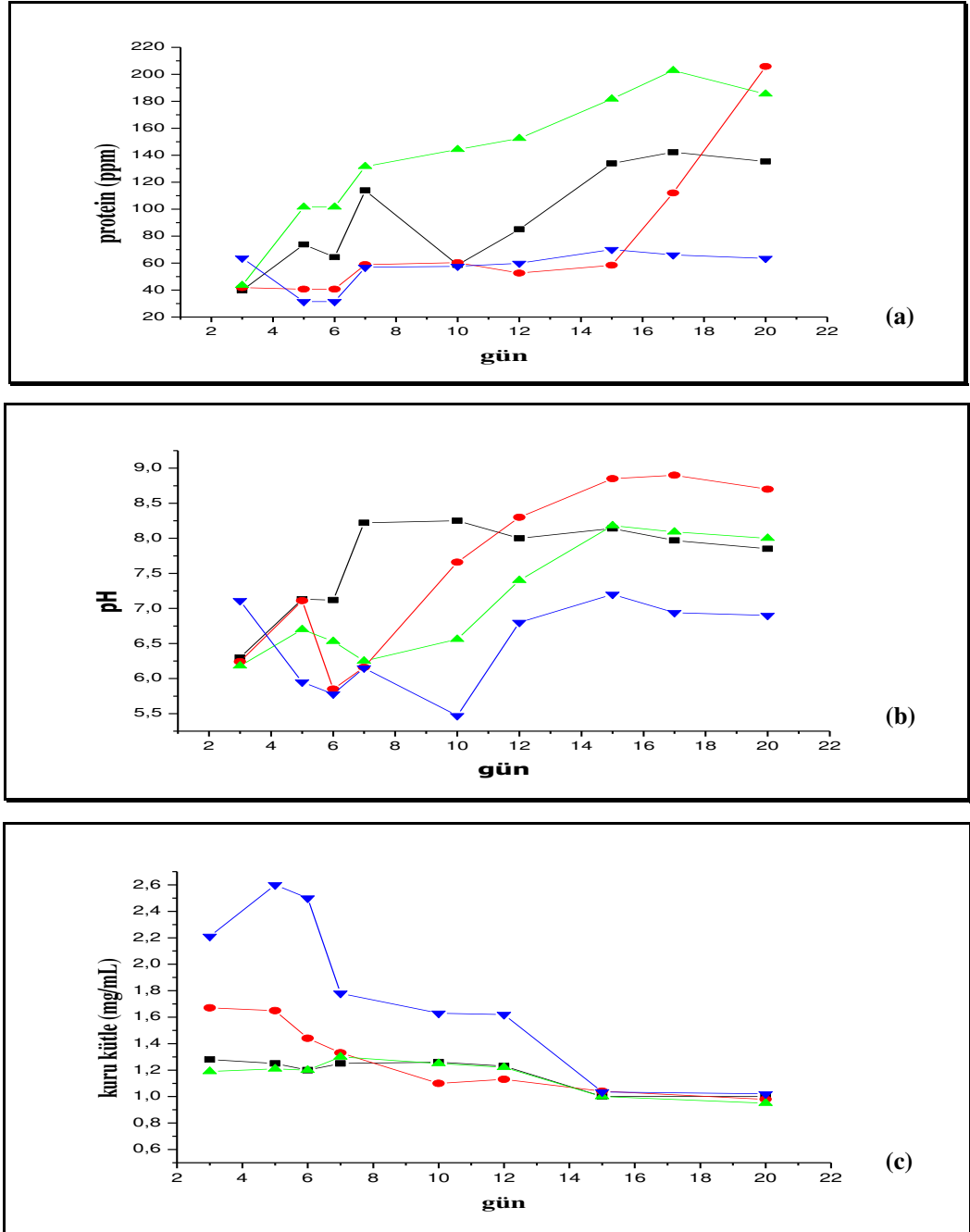
3.2.5 Nişastanın Etkisi

P. ostreatus DKF ortamında karbon kaynağı olarak glukozun yerine değışen nişasta derişimlerinin (1; 5; 10; 20 g/L) Lak ve MnP enzim aktivitelere etkisi inkübasyon sürecine bağımlı olarak 25 °C de incelendi.



Şekil 3.13 Nişasta derişimlerine bağımlı Lak (a) ve MnP (b) enzim aktivite değışimleri (-■-; 1 g/L , -●-; 5 g/L , -▲-; 10 g/L , -▼-; 20 g/L nişasta).

Şekil 3. 13 den görüldüğü gibi nişasta derişiminin 1 den 10 g/L ye artışıyla maksimum Lak ve MnP enzim aktiviteleri de artmış ve 20 g/L de ise azalış göstermişler. 10 g/L nişasta varlığında Lak ve MnP enzim aktiviteleri sırasıyla 10.günde 1479 ve 17. günde 1976 U/L olarak saptanmıştır.



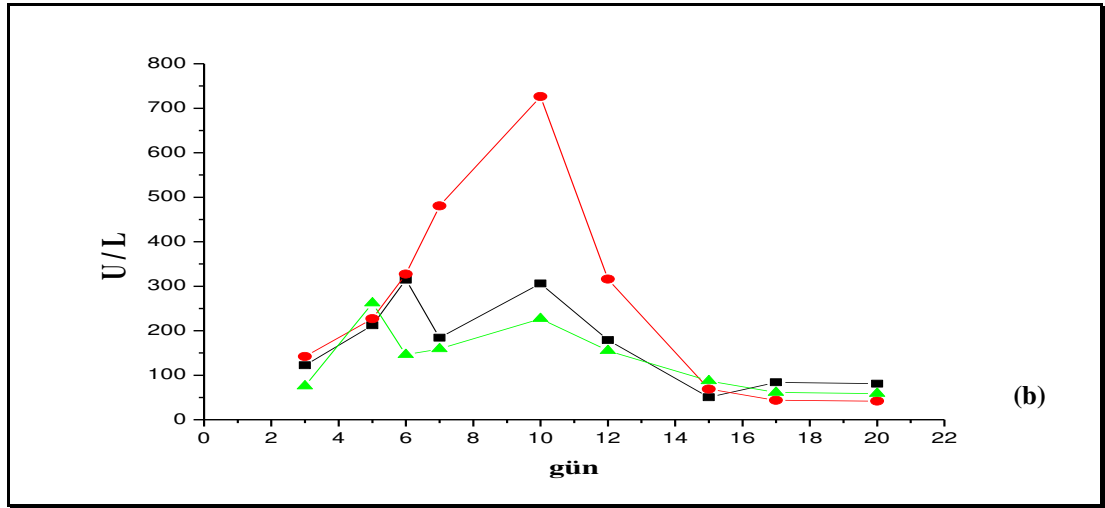
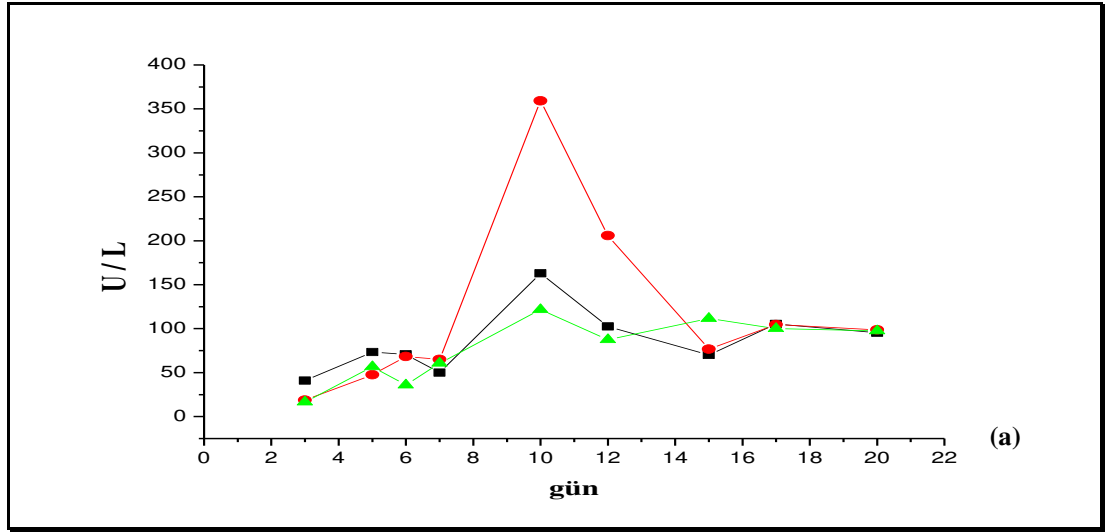
Şekil 3.14 Nişasta derişimlerine bağımlı protein (a) pH (b) ve kurukütle (c) değışimleri (-■-; 1 g/L , -●-; 5 g/L , -▲- ; 10 g/L , -▼-; 20 g/L nişasta).

İncelenen nişasta derişimlerine bağımlı olarak *P. ostreatus* DKF de inkübasyon sürecine bağımlı olarak protein, pH ve kuru kütle değişimleri Şekil 3.14 de görölmektedir. En yüksek protein düzeyi, 10 g/L nişasta varlığında elde edilmiştir. pH düzeyleri incelendiğinde ise, 15. günden itibaren 8 ve üzerinde belirlenmiştir. En yüksek kuru kütle değerleri 20 g/L nişasta varlığında elde edilmiş olup inkübasyonun 10. gününden sonra önemli bir değişim saptanmamıştır.

İncelenen nişasta derişimlerine bağımlı olarak glukoz ve azot derişimleri, glukoz ile benzer Şekilde 3. günde DKF ortamında, sınırlı düzeylere ulaşmıştır.

3.2.6 Karbon kaynağı glukoz varlığında Tween-80 nin etkisi

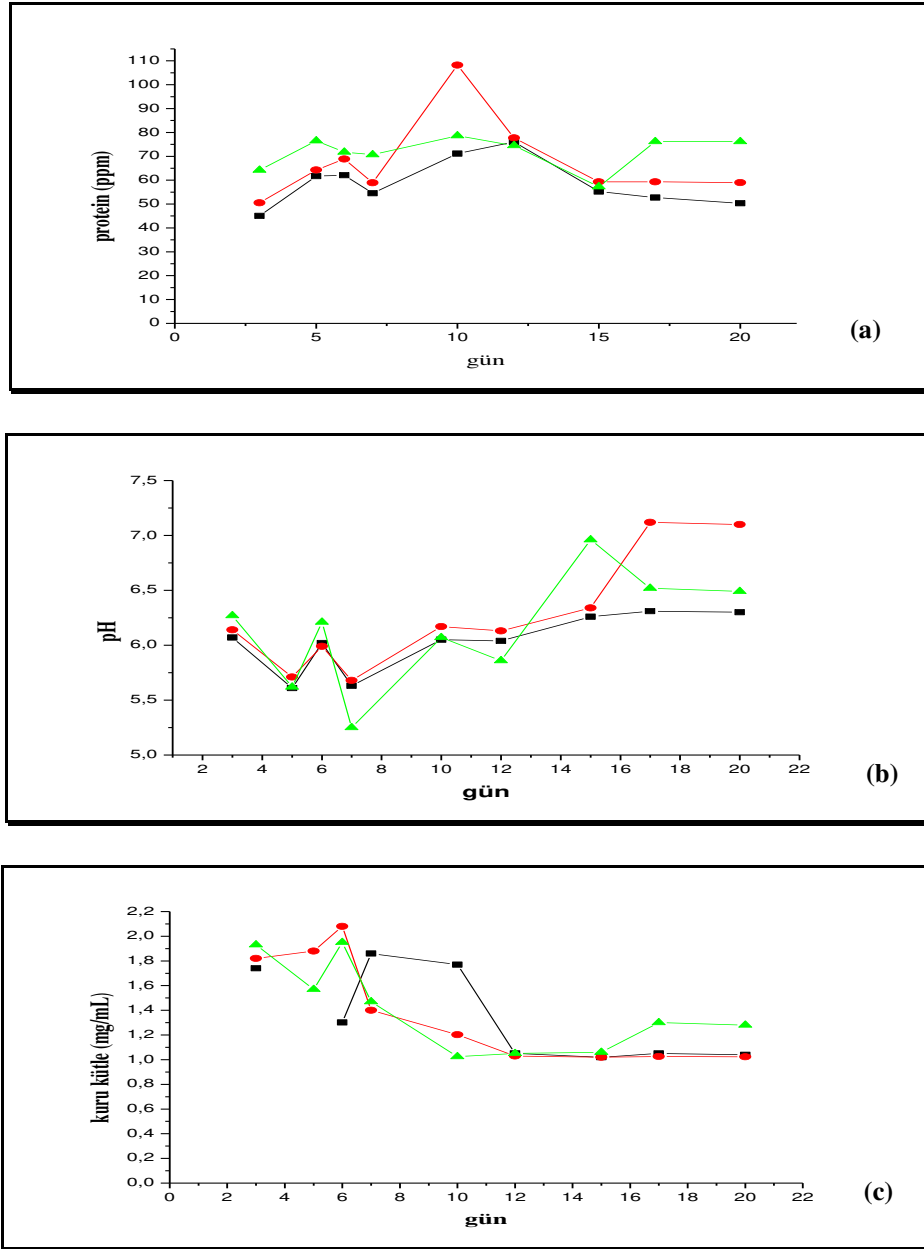
Tez çalışmasının son aşamasında non-iyonik deterjan olan Tween-80 nin (% 0,1; % 0,05; % 0,025) Lak ve MnP enzim aktivitelerine etkisi Őimdiye kadar belirlenen optimum koşullarda uygulandı. *P. ostreatus* DKF için, optimum koşullar, karbon kaynağı glukoz ve iyon derişimleri 0,5 mM Cu⁺² ve 0,29 mM Mn⁺² olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.15 Tween-80 nin, (a) Lak aktivitesi ve (b) MnP aktivitesi üretimleri üzerine etkisi.

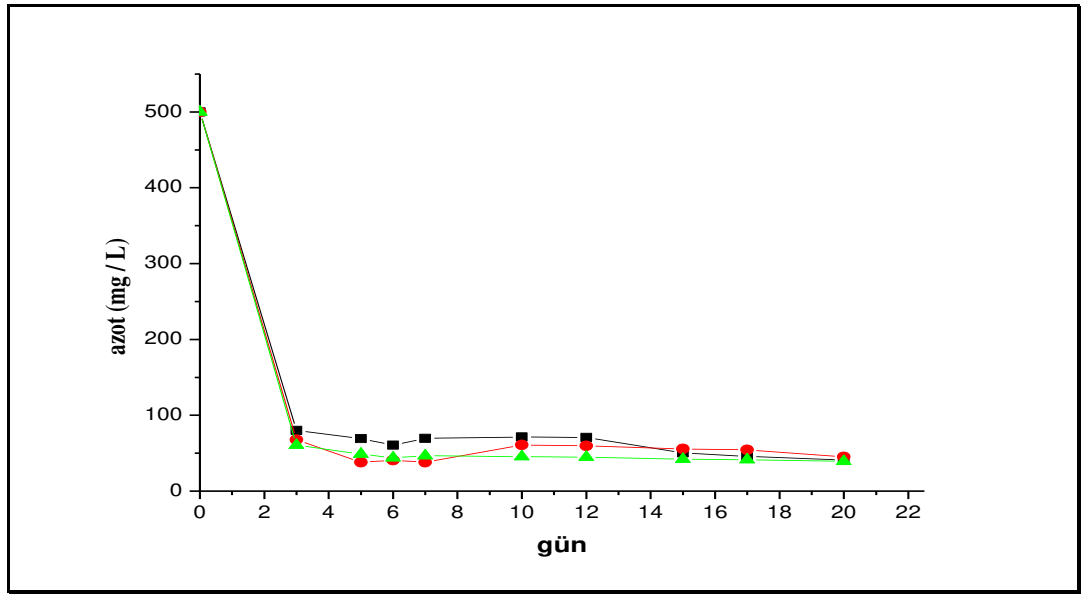
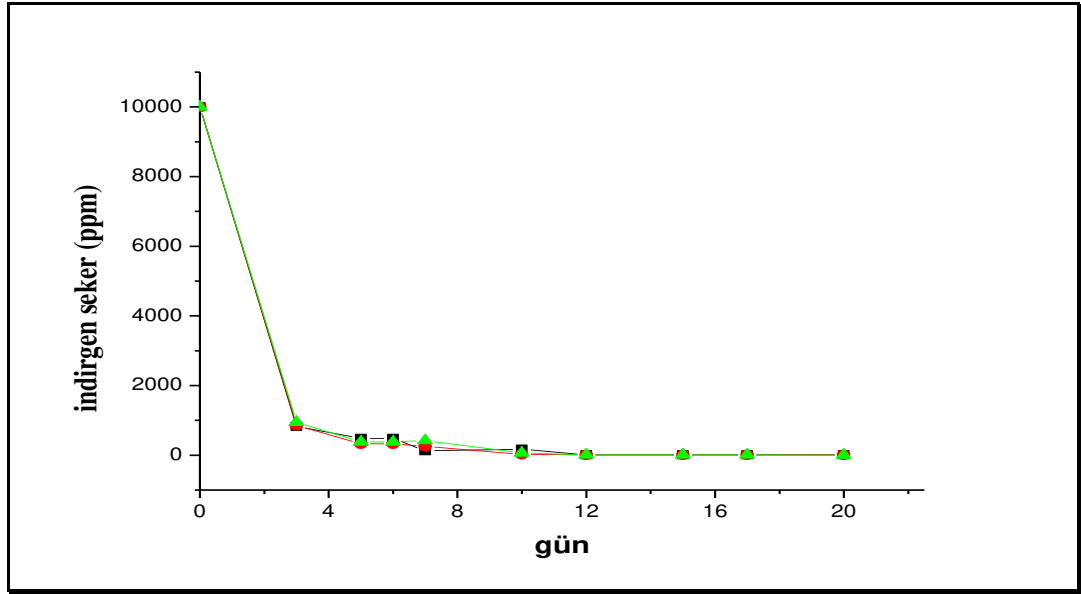
(-■-; % 0,025; -●-; % 0,05; -▲- % 0,1 lik Tween-80)

Şekil 3.15 (a) ve (b) den görüldüğü gibi; % 0,05 lik Tween 80 derişiminde inkübasyonun 10. gününde Lak ve MnP aktiviteleri maksimum düzeylerine ulaşmıştır. Diğer incelenen Tween 80 derişimlerinin bu enzim aktiviteleri üzerine herhangi bir etkisi saptanamamıştır. Elde edilen bu sonuçlara göre Tween 80 nin Lak ve MnP enzim aktiviteleri üzerine önemli bir etki göstermediği belirlenmiştir.



Şekil 3.16 Tween-80 nin, (a) protein (b) pH (c) kuru kütle düzeylerine etkisi (-■-; % 0,025, -●-; % 0,05, -▲-; % 0,1 lik Tween-80).

Şekil 3.16 (a), (b) ve (c) de görülen, % 0,05 lik Tween 80 derişiminde 6.günde maksimum kuru kütle ve 10. günde ise maksimum protein düzeyine ulaşılmıştır. Yine aynı derişimde, 17. günde pH değeri 7,12 lerde saptanırken, Tween 80 nin % 0,025 ve % 0,1 lik derişimlerinde sırasıyla 6,31; 6,96 olarak belirlenmiştir.

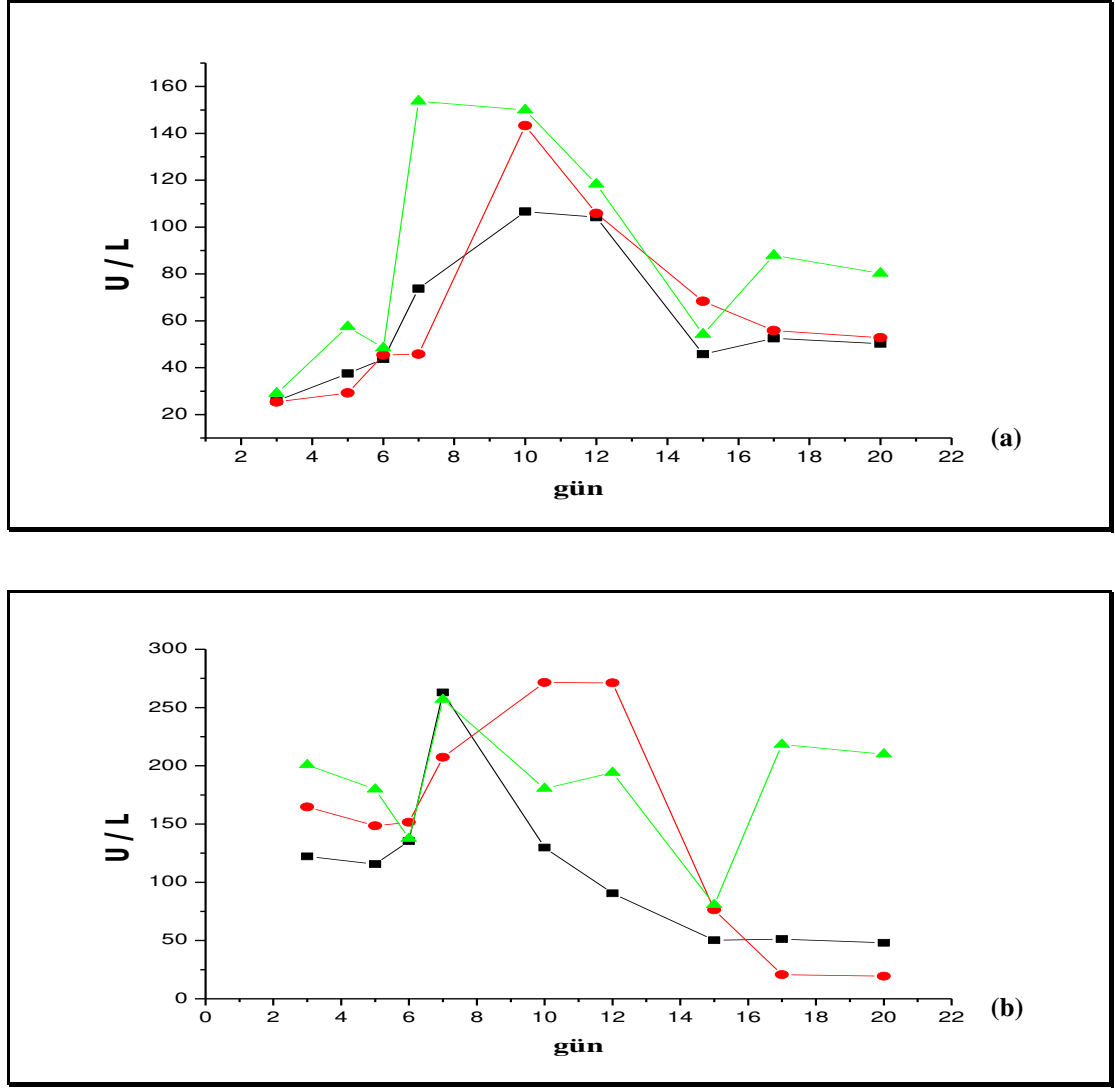


Şekil 3.17 % 0,025; % 0,05; % 0,1 lik Tween-80 içeren sentetik büyüme ortamını indirgen şeker (a) ve azot düzeyinin belirlenmesi (■-; % 0,025; -●-; % 0,05; -▲- ; % 0,1 lik Tween-80).

P. ostreatus DKF ortamında Tween 80 derişimine bağımlı olarak glukoz ve azot kullanımında da anlamlı bir değişim gözlenmemiştir.

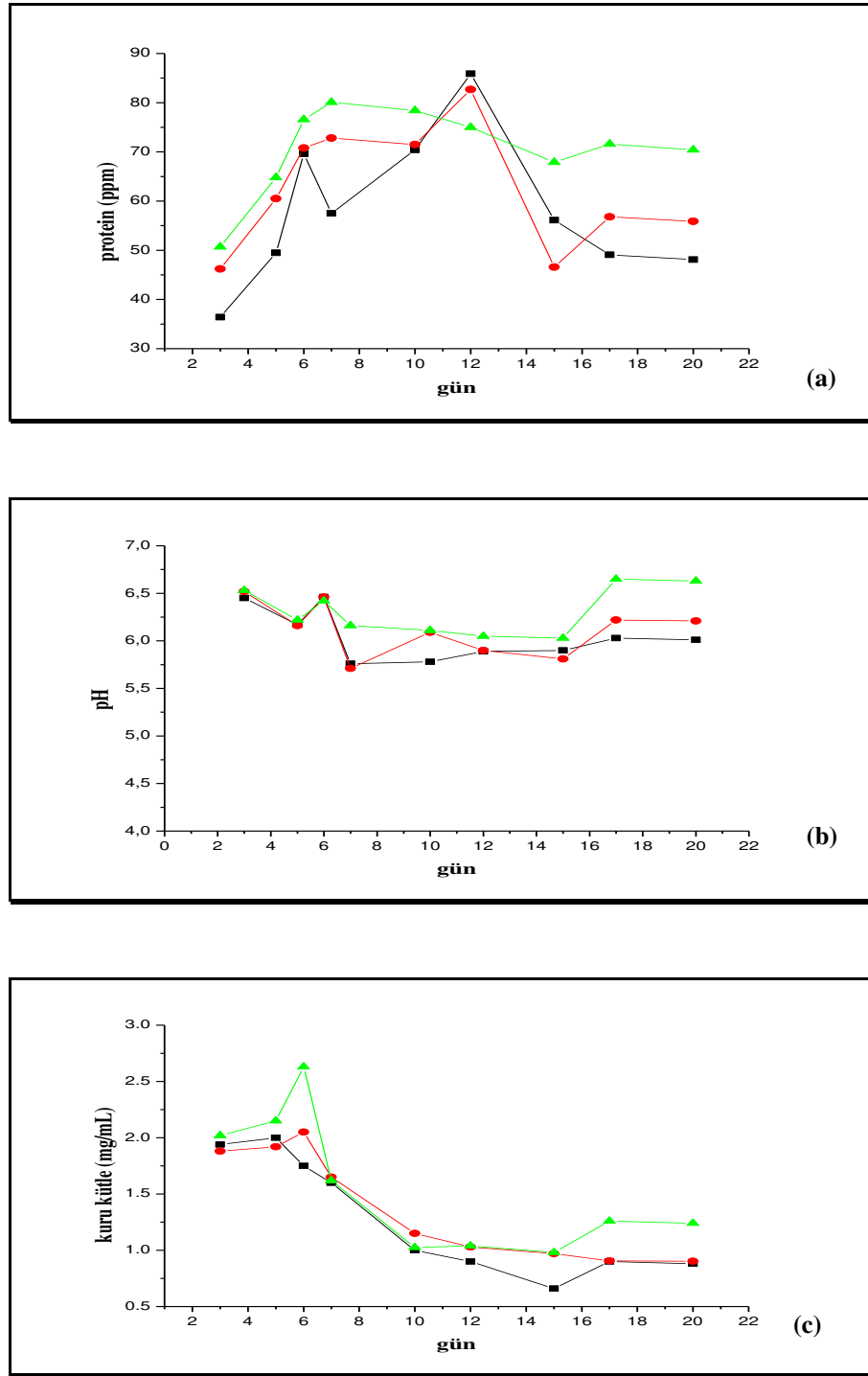
3.2.7 Karbon kaynağı nişasta varlığında Tween-80 nin etkisi

Elde edilen sonuçlara göre; en iyi Lak ve MnP enzim aktivitelerinin saptandığı 10 g/L nişasta varlığında değişen Tween 80 derişimlerinin bu enzim aktivitelerine etkisi DKF koşullarında incelendi.



Şekil 3.18 Karbon kaynağı olarak nişasta varlığında Tween-80 nin (a) Lak aktivitesi ve (b) MnP aktivitesi üzerine etkisi. (-■-; % 0,025, -●-; % 0,05, -▲- ; % 0,1 lik Tween-80).

Maksimum Lak ve MnP aktiviteleri, sırasıyla % 0,1 lik Tween-80 derişiminde 153,7 U/L ve % 0,05 lik Tween-80 derişiminde ise 271,6 U/L olarak saptanmıştır. Elde edilen bu sonuçlara göre, karbon kaynağı olarak nişasta kullanıldığında *P. ostreatus* DKF ortamında Tween 80 nin pozitif bir yönde etkisi görülmemiştir.



Şekil 3. 19 Karbon kaynağı olarak nişasta varlığında Tween-80 nin (a) protein ve (b) pH (c) kuru kütle düzeylerine etkisi. (-■-; % 0,025, -●-; % 0,05, -▲-; % 0,1 lik Tween-80).

Şekil 3.19 (a), (b) ve (c) den görüldüğü gibi, yüksek protein değerleri, % 0,025; % 0,05 lik Tween 80 *P. ostreatus* DKF de 12. günde, sırasıyla 85,9; 82,7 ppm olarak belirlenmiştir. % 0,01 lik Tween 80 değerinde ise, 6.günde 80,7 ppm değerinde saptanmıştır. pH değerleri ise genelde 6 civarında seyretmiş ve anlamlı bir farklanma gözlenmemiştir. En yüksek kuru kütle miktarına 2,63 mg/mL olarak, % 0,01 lik Tween 80 varlığında 6.günde ulaşılmıştır. Ayrıca, 3.gün ortamdaki glukoz ve azot düzeyleri ani bir düşüşle sınırlı seviyeye ulaşmışlardır.

P. ostreatus dan Lak ve MnP enzim üretimine yönelik DKF ortamında elde edilen sonuçlara göre; kültürasyon modunun durağan, karbon kaynağı olarak glukoz, 0,5 mM Cu^{+2} ve 0,29 mM Mn^{+2} derişimleri, optimum koşullar olarak belirlenmiştir. Non-iyonik deterjan olarak değişen derişimlerde Tween 80 nin büyüme ortamında bulunmasının enzim üretimlerine katkısının olmadığı gözlenmiştir.

BÖLÜM DÖRT

TARTIŞMA

Pleurotus türleri, çevresel ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanılan ve önemli medikal özelliklere sahip olan yenilebilir beyaz çürükçül fungus grubuna aittirler (Cohen, Persky ve Hadar, 2002). Bu tez çalışmasında, Lak ve MnP enzimlerinin üretimi amacıyla organizma olarak *P. ostreatus* kullanılmıştır.

Bu tez çalışmasında, *P. ostreatus* dan 25°C de DKF de üretilen Lak ve MnP enzim aktiviteleri üzerine çalkalamalı ve durağan kültürasyon modunun, sentetik büyüme ortamındaki Cu^{+2} ve Mn^{+2} iyonlarının, farklı karbon kaynağı olarak nişastanın ve non-iyonik deterjan olan Tween-80 nin etkileri incelenmiştir. Bu amaçla, maksimum düzeyde Lak ve MnP enzim üretimi için, sentetik büyüme ortamının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Ayrıca inkübasyon periyoduna bağlı olarak pH, kuru kütle, indirgen şeker (glukoz), azot ve protein düzeyleri de belirlenmiştir. Lak ve MnP enzimlerinin katalitik döngülerinde sırasıyla Cu^{+2} ve Mn^{+2} iyonlarının bu enzimlerin üretiminde önemli regülatör görevleri olduğu belirtilmektedir (Sterckeman, Douay, Proix ve Fourrier 2000; Tuomela ve diğer., 2005). Bu nedenle, Lak ve MnP enzim üretimlerinde bu iyon derişimlerinin büyüme ortamında optimize edilmesi büyük önem arz etmektedir. Lak ve MnP gibi ligninolitik enzimler indüklenebilen enzimlerdir ve bu enzimlerin üretimi ilişkili oldukları metallerin derişimlerine bağlıdır (Baldrian, 2003). Gerçekleştirilen çalışmada, *P. ostreatus* DKF ortamındaki 0,5; 1; 2,5; 5 mM Cu^{+2} ve 0,15; 0,29; 0,50; 0,75; 1 mM Mn^{+2} derişimlerine bağımlı en yüksek Lak ve MnP enzim aktiviteleri 0,5 mM Cu^{+2} ve 0,29 mM Mn^{+2} içeren büyüme ortamında saptanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre *P. ostreatus* dan bu enzimlerin üretimi için optimum koşullar; durağan kültürasyon modunda, karbon kaynağı olarak glukoz kullanılarak 0,5 mM Cu^{+2} ve 0,29 mM Mn^{+2} derişimleri olarak belirlenmiştir.

Gerçekleştirilen bu çalışmada, Lak ve MnP enzimlerinin üretimi amacıyla ilk olarak durağan ve çalkalamalı olmak üzere iki farklı kültürasyon modunun etkisi incelendi. *P. ostreatus*, DKF şartları altında durağan kültürasyon modunda her iki enzim aktivitesi de daha yüksek saptanmıştır. Bu sonuç birçok araştırma sonuçlarıyla da desteklenmektedir (Muñoz, Guillén, Martínez ve Martínez, 1997). Bunun sebebi ise, fungusların doğadaki normal yaşam koşullarında ağaç diplerinde hareket etmeden yaşadıkları için, laboratuvar koşullarında da buna bağımlı olarak durağan kültürasyon modunda enzim üretiminin daha yüksek bulunmasıdır (Cohen, Persky ve Hadar, 2002)

Optimize edilen bu koşullarda, en yüksek Lak ve MnP enzim aktiviteleri, sırasıyla inkübasyonun 10. gününde 2900 U/L ve 12.gününde 2637,5 U/L olarak belirlenmiştir. Elde edilen Lak enzim aktivitesi, *P. ostreatus* 98, 108 ve f6, *P. ostreatus* (ATCC 32783), *Ganoderma adspersu*, *Cerena maxima*, *Pseudotrametes gibbosa* ve *Phellinus robustus* türlerindeki Lak enzim aktivitelerine göre sırasıyla 50; 32,2; 89,2; 1,2; 29; 5,8; 2,9 ve 2,9 kat daha yüksek bulunmuştur (Mikiashvili Wasser, Nevo, Elisashvili, 2006; Eichlerova ve diğer., 2000; Tellez, Fernandez, Gonzalez, Diaz-Godinez, 2008; Songulashvili, Elisashvili, Wasser, Nevo, Hadar, 2006; Elisashvili, Kashlishvili 2009, Songulashvili ve diğer., 2006). *Pleurotus sajor-caju* ile gerçekleştirilen çalışmada karbon kaynağı olarak glukoz kullanıldığında bile Lak enzim üretimi sağlanamamıştır (Massadeh, Fraij, Fandi, 2010). Elde edilen MnP enzim aktivitesi ise, *P. ostreatus* 98 ve f6, *P. sajor-caju*, *P.chrysosporium* türlerindeki MnP enzim aktivitelerine göre sırasıyla 154,2; 303,1; 32,5 ve 7,4 kat daha yüksek bulunmuştur (Mikiashvili Wasser, Nevo, Elisashvili, 2006; Eichlerova ve diğer., 2000; Ozturk Urek ve Pazarlıoğlu, 2007). Bu durum *P. ostreatus* büyüme koşullarının optimize edilmesiyle ligninolitik enzim düzeylerinin arttırılmasını göstermesi açısından önemlidir.

Ligninolitik enzimlerin üretimi; sıcaklık, pH, indükleyiciler, kültür şartları ve ortam bileşenleri gibi birçok faktörden etkilenir (Giardina ve diğer., 1999; Téllez-Téllez, Fernandez, Montiel-Gonzalez, Sanchez ve Díaz-Godinez, 2008). Tüm fermentasyon proseslerinde pH, ligninolitik enzim aktivitesi için çok önemli bir

faktördür. Genelde ligninolitik enzimlerin üretimleri için ortam pH değerleri, asidik bölgede saptanmasına rağmen bu çalışmada en yüksek enzim üretimleri için pH'nın 6-8 aralığına kaydığı gözlenmiştir. *Lentinus tigrinus* ile Cu^{+2} iyon derişimleri üzerine yapılan bir çalışmada, maksimum aktivite 1,5-2 mM Cu^{+2} varlığında iken, pH asidik bölgede saptanmıştır (Shutova, Revin ve Myakushina, 2008). Bu durum, Cu^{+2} iyonlarının ortamdaki hidroksil grupları ile $\text{Cu}(\text{OH})_2$ meydana getirerek ortamın pH'ını asidik bölgeye kaydırıldığı şeklinde yorumlanmıştır. Fakat bu pH değerinin aksine, bizim sonuçlarımızla benzer şekilde *Trametes pubescens* ile yapılan çalışmada pH değeri 4-8 aralığında gözlemlenmiştir (Galhaup ve Haltrich, 2001). *Cerrena unicolor* ile gerçekleştirilen çalışmada da benzer pH değışimleri (4,1-8,5) saptanmıştır. Ligninolitik enzim üretiminde inkübasyon sürecinde pH değerinin asidik bölgeden kayması, ortamda alkali metabolitlerin oluşumu veya organik asitlerin uzaklaşması şeklinde yorumlanabilir (Michniewicz, Ullrich, Ledakowicz ve Hofrichter, 2006). *P. ostreatus* dan elde edilen Lak'ın hafif alkali pH koşullarını tolere ettiği bulunmuştur (Palmieri, Giardina, Bianco, Capasso ve Sannia, 1997).

P.ostreatus dan Lak ve MnP enzim üretimleri için önemli olan bu metal iyonlarının aşırısı fungus için toksik etki oluşturabilir (Labbe ve Thiele, 1999; Hughes ve Poole, 1991; Gadd, 1993). Bu durum özellikle çalışılan organizma türüne ve fermentasyon koşullarına da bağlıdır. Özellikle bakır, çevrede biyojenik bir metal olarak bulunduğundan derişimi enzimin fonksiyonu ve stabilitesi üzerine de etki gösterebilir (Baldrian ve Gabriel, 2002). Ayrıca peroksidaz sınıfından bir enzim olan MnP için H_2O_2 ve kofaktörü olması sebebiyle Mn^{+2} nin varlığı ve ortamdaki derişim oranları da çok önemlidir. Bu sebeple yıkımı zor bileşiklerin etkin degradasyonu için, Mn^{+2} ve H_2O_2 in kullanımı, MnP'nin katalitik özelliklerini geliştirmede önemli rol oynamaktadır (Lema, Moreira, Feijoo ve Palma, 1996).

P.ostreatus DKF de durağan koşullarda optimize edilen, 0,5 mM Cu^{+2} ve 0,29 mM Mn^{+2} iyon derişimlerinde 25°C de glukoz yerine karbon kaynağı olarak nişasta derişimlerinin (1;5;10;20 g/L) Lak ve MnP enzim üretimlerine etkisi incelendiğinde maksimum Lak ve MnP aktiviteleri 10 g/L de 10. günde sırasıyla 1479 U/L ve 1976 U/L olarak belirlenmiştir. Karbon kaynağı olarak nişasta kullanıldığında elde edilen

bu sonuçlar, glukozla saptananlarla kıyaslandığında sırasıyla 1,96 ve 1,33 katlık bir azalma göstermiştir. Bu durum, aynı zamanda *P. ostreatus* un nişastayı karbon kaynağı olarak kullanabildiğinin de göstergesidir. Lak ve MnP gibi ligninolitik enzimlerin üretiminde fermentasyon ortamındaki karbon kaynakları da önemli rol oynamaktadır. Karbon kaynağı olarak nişasta kullanıldığında elde edilen sonuçlar *P. sajor-caju* ile nişasta karbon kaynağı olarak gerçekleştirilen çalışmadaki Lak aktivitesiyle kıyaslandığında 211,3 kat; MnP aktivitesinin ise 94,1 kat arttığı saptanmıştır (Massadeh, Fraij, ve Fandi, 2010). Ayrıca, 10 g/L nişasta varlığında % 0,1; % 0,05; % 0,025 lik üç farklı derişimde Tween-80 nin etkisi incelendiğinde anlamlı bir değışim belirlenmedi. *P.chrysosporium* ile yapılan çalışmada Tween 80 gibi deterjanların etkisiyle MnP enzim salınım sürecinin pozitif bir şekilde etkilendiğı görülmüştür. Bu durum, Tween 80 uygulanan kültürlerde hücre membran yapısının, MnP enziminin hücreden ortama doğru geçişini kolaylaştırması şeklinde yorumlanabilir (Pozdnyakova, Rodakiewicz-Nowak ve Turkovskaya, 2004; Rancano, Lorenza, Morales, Couto, Sanroman, 2003). Tween 80 gibi non-iyonik deterjanların genelde büyük ölçekli ligninolitik enzim üretiminde etkili olduğı söylenebilir. Karbon kaynağının glukoz olduğı durumda üç farklı derişimdeki Tween-80 nin *P. ostreatus* tarafından Lak ve MnP enzim üretimi üzerine herhangi anlamlı bir etki göstermediğı saptandı. Tween 80 varlığında elde edilen bu sonuçlarla benzer şekilde DKF de *P. sajor-caju* ve *Botryosphaeria* den Lak enzim üretimi üzerine de anlamlı bir etki gözlenmemiştir (Bettin ve diğ., 2008).

Beyaz çürükçül funguslar, lignini degrade etmede oldukça etkili olan Lak, MnP ve LiP gibi spesifik ligninolitik enzimlere sahiptirler (Revankar ve Lele, 2007). Uygun şartlar altında Lak ve MnP enzimleri fenolik ve fenolik olmayan substratları okside edebilirler (Cabaleiro, Rodriguez, Sanroman ve Willsion, 2006). Bu enzimler ancak ortamdaki azot, glukoz ve sülfür kaynakları sınırlı seviyeye ulaştığında tetiklenerek sekonder metabolizma boyunca sentezlenirler (Cabaleiro ve Couto, 2007). Bu bakımdan, *P.ostreatus* DKF koşullarında, glukoz ve azot kaynakları genellikle 3. günden sonra ani bir düşüş ile sınırlı seviyeye ulaşmış ve bununla uyumlu olarak 3. günden sonra Lak ve MnP enzimlerinin üretimi de başlamıştır.

KAYNAKLAR

- Adler, E. (1977). Lignin chemistry: past, present and future. *Wood Science Technology*, 11, 169–218.
- Aitken, M.D., Massey, I.J., Chen, T.P. ve Heck, P.E. (1994). Characterization of reaction products from the enzyme catalyzed oxidation of phenolic pollutants. *Water Research*, 28, 1879-1889.
- Akpınar M. ve Öztürk Ürek, R. (2012). Production of ligninolytic enzymes by solid state fermentation using *Pleurotus eryngii*. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*. DOI:10.1080/10826068.673528.
- Alcalde, M. (2007). Laccase: Biological functions, molecular structure and industrial applications. Industrial enzymes: Structure, function and applications. *Netherlands-Springer*, 26, 461-476.
- Asgher, M., Kausara, S., Bhattia, H.N., Shah, S.A.H. ve Ali, M. (2008). Optimization of medium for decolourization of solar golden yellow R direct textile dye by *Schizophyllum commune* IBL-06. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61, 189–93.
- Baborova, P., Moder, M., Baldrian, P., Cajthamlova, K., ve Cajthaml, T. (2006). Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Irpex lacteus* and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the enzyme. *Research in Microbiology*, 157, 248–253.
- Baldrian, P. (2003). Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Techonolgy*, 32, 78-79.
- Baldrian, P. (2006). Fungal laccases– occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*, 30, 215–242.

- Baldrian P. ve Gabriel J. (2002). Copper and Cadmium increase laccase in *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiology Letters*, 206, 69-74.
- Banat, I.M., Nigam, P. ve Singh, D. (1996). Microbial decolourization of textile-dye containing effluents: a review. *Bioresource Technology*, 58, 217–27.
- Bar, M. (2001). *Kinetics and Physico-Chemical Properties Of White-Rot Fungal Laccases*. Magister Scientiae, In the Faculty of the Requirements for the degree.
- Baucher, M., Chabbert, B., Pilate, G., Doorsselaere, J.V., Tollier, M.T. ve diğer. (1996). Red xylem and higher lignin extractability by down-regulating a cinnamyl alcohol dehydrogenase in poplar (*Populus tremula x P. alba*). *Plant Physiology*, 112, 1479–90.
- Bauer, C.G., Kuhn, A., Gajovic, N., Skorobogatko, O., Holt, P.J., Bruce, N.C. ve diğer. (1999). New enzyme sensors for morphine and codeine based on morphine dehydrogenase and laccase. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 364, 179-83.
- Bennett, J.W., Wunch, K.G. ve Faison, B.D. (2002). Use of fungi in biodegradation. *Manual of Environmental Microbiology*, 87, 960–71.
- Bertrand, T., Jolival, C., Briozzo, P., Caminade, E., Joly, N., Madzak, C. ve Mougin, C. (2002). Crystal structure of four-copper laccase complexed with an arylamide: insights into substrate recognition and correlation with kinetics. *Biochemistry*, 41, 7325-7333.
- Bettin, F., Montanari, Q., Calloni, R., Gaio, T.A., Silveira, M.M., Dillon, A.J.P., (2008). Production of laccases in submerged process by *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 in relation to carbon and organic nitrogen sources, antifoams and Tween 80. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36, 1–9.

- Bhat, R.V. ve Mathur, P. (1998). Changing scenario of food colours in India. *Current Science*, 74, 198–202.
- Biermann, C.J. (1993). *Essentials of Pulping and Papermaking*. Academic Press, USA.
- Blanchette, R.A. (1995). Biodeterioration of archeological wood. *CAB Biodeterioration Abstracts*, 9, 113-127.
- Blanchette, R.A., Shaw, C.G. ve Cohen, A.L. (1978). A SEM study of the effects of bacteria and yeasts on wood decay by brown- and white-rot fungi. *Scanning electron microscope*, 2, 61–68.
- Boerjan, W., Ralph, J. ve Baucher, M. (2003). Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 519–546.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Breen, A. ve Singleton, F.L. (1999). Fungi in lignocellulose and biopulping. *Current Opinion in Biotechnology*, 10, 252–258.
- Brunow, G. (2001). Methods to reveal the structure of lignin. In M. Hofrichter, & A. Steinbüchel, (Ed.). *Lignin, Humic Substances and Coal*, 1, 89-116. Weinheim: Wiley-VHC.
- Bumpus, J.A. ve Aust, S.D. (1987). Biodegradation of environmental pollutants by *Phanerochaete chrysosporium*: Involvement of the lignin degrading system. *BioEssays*, 6, 166-170.
- Cabaleiro, D.R., Rodriguez, S., Sanroman, A. ve Willsion, W. (2006). Characterisation of deactivating agents and their influence on manganese-

- dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Environmental Sciences*, 18, 867-872.
- Cabaleiro, D.R. ve Couto, S.R. (2007). Comparison between the protease production ability of ligninolytic fungi cultivated in solid-state media. *Journal of Environmental Sciences*, 19, 1017-1023.
- Cairney, J.W.G. ve Burke, R.M. (1998). Do ecto- and ericoid mycorrhizal fungi produce peroxidase activity. *Mycorrhiza*, 8, 61–5.
- Call, H.P. ve Mücke, I. (1997). History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems. *Journal of Biotechnology*, 53, 163-202.
- Camarero, S., Garcia, O., Vidal, T., Colom, J., Rio, J.C.D. (2004). Gutierrez A, et al. Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system. *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 113-20.
- Campbell, M.M. ve Sederoff, R.R. (1996). Variation in lignin content and composition-mechanisms of control and implications for the genetic improvement of plants. *Plant Physiology*, 110, 3-13.
- Carlile, M.J. ve Watkinson, S.C., (1994). *The Fungi*, San Diego: Academic Press.
- Chabannes, M., Ruel, K., Yoshinaga, A., Chabbert, B., Jauneau, A., Joseleau, J.P., Boudet, A.M. (2001). In situ analysis of lignins in transgenic tobacco reveals a differential impact of individual transformations on the spatial patterns of lignin deposition at the cellular and subcellular levels. *The Plant Journal*, 28(3), 271-82.
- Claus, H. (2003). Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Archives of Microbiology*, 179, 145-150.

- Claus, H. (2004). Laccases: Structure, reactions, distribution. *Micron*, 35, 93-96.
- Cohen, R., Hadar, Y. ve Yarden, O. (2001). Transcript and activity levels of different *Pleurotus ostreatus* peroxidases are differentially affected by Mn^{2+} . *Environmental Microbiology*; 3, 312-322.
- Cohen, R., Persky, L. ve Hadar, Y. (2002). *Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus Pleurotus*. Springer-Verlag.
- Conesa, A., Punt, P.J. ve Hondel, C.A.V.D. (2002). Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. *Journal of Biotechnology*, 93, 143-158.
- Cook, S.M.F. ve Linden, D.R. (1997). Use of rhodamine WT to facilitate dilution and analysis of atrazine samples in short-term transport studies. *Journal of Environmental Quality*, 26, 1438–41.
- Couto S.R. ve Herrera J.L.T. (2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnology Advances*, 24, 500-513.
- Croteau, R., Kutchan, T.M. ve Lewis, N.G. (2000). Natural products (secondary metabolites). In B. Buchanan, R. Jones, & W. Gruissem, (Ed.). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (1250-1318). Rockville: American Society of Plant Physiologists.
- Deindoerfer, F.H., Mateles, R.I. ve Humphrey, A.E. (1962). Fermentation process review. *Applied Microbiology*, 10, 273-303.
- Dence, C.W. ve Lin, S.Y. (1992). *Introduction*. In “*Methods in Lignin Chemistry*” Springer-Verlag: Berlin.
- Dittmer, N.T., Suderman, R.J., Jiang, H., Zhu, Y.C., Gorman, M.J., Kramer, K.J. ve Kanost, M.R. (2004). Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like

multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34, 29-41.

Dix, N.J. ve Webster, J. (1995). *Fungal Ecology*. London, UK: Chapman & Hall.

Dizge, M.G. (2007). *Trametes versicolor* beyaz çürükçül fungusundan lakkaz enziminin saflaştırılması ve kısmi nitelendirilmesi. Gebze Yüksek Teknoloji Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi.

Durán, N. ve Esposito, E. (2000). Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied Catalysis B: Environmental*, 28, 83-99.

Eggert, C., Temp, U., Dean, J.F.D. ve Eriksson, K.E.L. (1996). A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Letters*, 391, 144–148.

Eichlerova, I., Homolka, L., Nerud, F., Zadrazil, F., Baldrian, P. ve Gabriel, J. (2000). Screening of *Pleurotus ostreatus* isolates for their ligninolytic properties during cultivation on natural substrates. *Biodegradation*, 11, 279-287.

El, E.K., Blanchette, R.A., Ander, P. (1990). *Biochemistry and molecular biology of Wood*. Springer Verlag, London.

Elisashvili, V.I. (1993). Physiological regulation of ligninolytic activity in higher basidium fungi. *Microbiology*, 62(5), 480-487.

Elisashvili, V. ve Kachlishvili, E. (2009). Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot Basidiomycetes. *Journal of Biotechnology*, 144, 37–42.

- Enguita, F.J., Martins, L.O., Henriques, A.O. ve Carrondo, M.A. (2003) Crystal structure of a bacterial endospore coat component, a laccase with enhanced thermostability properties. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 19416-19425.
- Eriksson, K.E., Johnsrud, S.C. ve Vallander, L. (1983). Degradation of lignin and lignin model compounds by various mutants of the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Archives of Microbiology*, 135, 161–168.
- Esterbauer, H., Steined, W., Labudova, I., Herman, A. ve Hayn, M. (1991). Production of *Trichoderma cellulase* in laboratory and pilot scale. *Bioresource Technology*, 36, 51–65.
- Farmer, V.C., Henderson, M.E.K. ve Russell, J.D. (1960). Aromatic-alcohol-oxidase activity in the growth medium of *Polystictus versicolor*. *Biochemical Journal*, 74, 257–262.
- Farrell, R.L., Murtagh, K.E., Tien, M., Mozuch, M.D. ve Kirk, T.K., (1989). Physical and enzymatic properties of lignin peroxidase isozymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme and Microbial Technology*, 11, 322-328.
- Feldman, D. (2002). Lignin and its polyblends a review. In T. Q. Hu, (Ed.) *Chemical modification, properties, and usage of lignin* (81–100). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Fengel, D. ve Wegener, G. (1984). *Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions*. De Gruyter: Berlin.
- Ferry, Y. ve Leech, D. (2005). Amperometric detection of catecholamine neurotransmitters using electrocatalytic substrate recycling at a laccase electrode. *Electroanalysis*, 17, 2113-9.

- Field, M.S., Wilhelm, R.G., Quinlan, J.F. ve Aley, T.J. (1995). An assessment of the potential adverse properties of fluorescent tracer dyes used for groundwater tracing. *Environmental Monitoring and Assessment*, 38, 75–97.
- Forgacs, E., Cserhati, T. ve Oros, G. (2004). Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. *Environment International*, 30, 953–71.
- Fukushima, K. (2001). Regulation of syringyl to guaiacyl ratio in lignin biosynthesis. *Journal of Plant Research*, 114, 499–508.
- Gadd, G.M. (1993). Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytologist*, 124, 25–60.
- Galhaup, C. ve Haltrich, D. (2001). Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56, 225–232.
- Garavaglia, S., Cambria, M.T., Miglio, M., Ragusa, S., Iacobazzi, V., Palmieri, F., D'Ambrosio, C., Scaloni, A. ve Rizzi, M. (2004). The structure of rigidoporus lignosus laccase containing a full complement of copper ions reveals an asymmetrical arrangement for the T3 copper pair. *Journal of Molecular Biology*, 342, 1519-1531.
- Gayazov, R. ve Rodakiewicz- Nowak, J. (1996). Semi-continuous production of laccase by *Phlebia radiata* in different culture media. *Folia Microbiologica*, 41, 480-484.
- Gianfreda, L.; Xu, F. ve Bollag, J.M. (1999). Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal*, 3, 1-26.

- Giardina, P., Palmieri, G., Scaloni, A., Fontanella, B., Faraco, V., Cennamo, G., ve diğeri. (1999). Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochemical Journal*, 34, 655-663.
- Glenn, J.K. ve Gold, M.H. (1985). Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 242, 329-41.
- Gochev, V.K. ve Krastanov, A.I. (2007). Isolation of laccase producing *Trichoderma* spp. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 13, 171-176.
- Golz-Berner, K., Walzel, B., Zastrow, L. ve Doucet, O. (2004). Cosmetic and dermatological preparation containing copper binding proteins for skin lightening. *International Patent Application*, WO2004017931.
- Guerra, A., Mendonca, R. ve Ferraz, A. (2003). Molecular weight distribution of wood components extracted from pinustaeda biotreated by *Ceriporiopsis subvermispora*. *Enzyme Microbial Technology*, 33, 12-18.
- Guill'en, F. ve Evans, C.S. (1994). Anisaldehyde and veratraldehyde acting as redox cycling agents for H₂O₂ production by *Pleurotus eryngii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 2811-2817.
- Guill'en, F., Mart'inez, A.T. ve Mart'inez, M.J. (1992). Substrate specificity and properties of the aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *The Journal of Biological Chemistry*, 209, 603-611.
- Guill'en, F., Mart'inez, A.T., Mart'inez, M.J. ve Evans, C.S. (1994). Hydrogen peroxide-producing system of *Pleurotus eryngii* involving the extracellular enzyme aryl-alcohol oxidase. *Applied and Environmental Microbiology*, 41, 465-470.

- Gupta, GS., Shukla, SP., Prasad, G. ve Singh, VN. (1992). China clay as an adsorbent for dye house wastewaters. *Environmental Technology*, 13, 925–36.
- Gutiérrez, A., Caramelo, L., Prieto, A., Martínez, M.J. ve Martínez, A.T. (1994). Anisaldehyde production and aryl-alcohol oxidase and dehydrogenase activities in ligninolytic fungi from the genus *Pleurotus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 1783–1788.
- Haghighi, B., Gorton, L., Ruzgas, T. ve Jönsson, L.J. (2003). Characterization of graphite electrodes modified with laccase from *Trametes versicolor* and their use for bioelectrochemical monitoring of phenolic compounds in flow injection analysis. *Analytica Chimica Acta*, 487, 3-14.
- Hao, O.J., Kim, H. ve Chiang, P.C. (2000). Decolourization of wastewater. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 30, 449–505.
- Hatakka, A. ve Hofrichter, M. (2001). *Biodegradation of lignin*. In: Steinbüchel A, editors. Biopolymers. Lignin, humic substances and coal. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 1, 129–80.
- Have, T.R. ve Teunissen, P.J.M. (2001). Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by white-rot fungi. *Chemical Reviews* 101, 3397-3413.
- Hefti, M.H., Vervoort, J. ve Berkel, W.J.H.V. (2003) Deflavination and reconstitution of flavoproteins – tackling fold and function. *European Journal of Biochemistry*, 270, 4227–4242.
- Heinfling, A, Martinez, MJ., Martinez, AT., Bergbauer, M., Szewzyk, U. (1998). Purification and characterization of peroxidases from the dye-decolorizing fungus *Bjerkandera adusta*. *FEMS Microbial Letters*, 165, 43–50.

- Heinzkill, M., Bech, L., Halkier, T., Schneider, P. ve Anke, T. (1998). Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (Family Coprinaceae). *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 1601-1606.
- Hernández-Ortega, A., Borrelli, K., Ferreira, P., Medina, M., Martínez, A.T. ve Guallar, V. (2011). Substrate diffusion and oxidation in GMC oxidoreductases: an experimental and computational study on fungal aryl-alcohol oxidase. *Biochemical Journal*, 436, 341 – 350.
- Higuchi, T. (1997). In *Biochemistry and Molecular Biology of Wood*. Springer: New York, 131–233.
- Higuchi, T. (2006). Look back over the studies of lignin biochemistry. *Journal of Wood Science*, 52, 2–8.
- Hilber, O. (1997). The genus *Pleurotus* (Fr.) Kummer. Erschienenim Selbstverlag.
- Hildén, K., Hakala, T.K. ve Lundell, T. (2009). Thermotolerant and thermostable laccases. *Biotechnology Letters*, 31, 1117–1128.
- Hildén, K., Hatakka, A. ve Lundell, T.K. (2009). Oxalate decarboxylase of the white-rot fungus *Dichomitus squalens* demonstrates a novel enzyme primary structure and non-induced expression on wood and in liquid cultures. *Microbiology*, 155, 2726-2738.
- Hoegger, P.J., Kilaru, S., James, T.Y., Thacker, J.R. ve Kües, U. (2006). Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *The FEBS Journal*, 273, 2308-2326.
- Hofrichter, M. (2002). Review: Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology*, 30, 454-466.

- Hofrichter, M., Ziegenhagen, D., Vares, T., Friedrich, M., Jager, MG., Fritsche, W. ve Hatakka, A. (1998). Oxidative decomposition of malonic acid as basis for the action of manganese peroxidase in the absence of hydrogen peroxide. *FEBS Letters*, 434, 362–6.
- Hossain, S.M., Das, M., Ibrahim, S.H. ve Anantharaman, N. (2004). Studies on biopulping of jute stick using *Phanerochate chrysosporium*. *Quarterly Journal of Indian Pulp and Paper Technical Association*, 16(2), 47-56.
- Hsu, T.C. ve Chiang, C.S. (1997). Activated sludge treatment of dispersed dye factory wastewater. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 32, 1921–32.
- Hughes, M.N. ve Poole, R.K. (1991). Metal speciation and microbial growth the hard (and soft) facts. *Journal of General Microbiology*, 137, 725–34.
- Ivanov, K., Gruber, E., Schempp, W. ve Kirov, D. (1996). Possibilities of using zeolite as filler and carrier for dyestuffs in paper. *Das Papier*, 50, 456–60 [in German].
- Jarosz-Wilkolazka, A. ve Ruzgas, T. ve Gorton, L. (2004). Use of laccase-modified electrode for amperometric detection of plant flavonoids. *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 238-41.
- Jeffries, T.W. (1990). Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes. *Biodegradation*, 1, 163–176.
- Johannes, C., ve Majcherczyk, A. (2000). Laccase activity tests and laccase inhibitors. *Journal of Biotechnology*, 78, 193–199.

- Jones, L., Ennos, A.R. ve Turner, S.R. (2001). Cloning and characterization of irregular xylem4 (irx4): a severely lignin-deficient mutant of *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 26, 205–16.
- Jørgensen, H., Errikson, T., Børjesson, J., Tjerneld, F. ve Olsson, L. (2003). Purification and characterisation of five cellulases and one xylanases from *Penicillium brasilianum* IBT 20888. *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 851–61.
- Joshi, M., Bansal, R. ve Purwar, R. (2004). Colour removal from textile effluents. *Indian Journal of Fibre & Textile Research*, 29, 239–59.
- Kapdan, I., Kargi, F., McMullan, G. ve Marchart, R. (2000). Comparison of white-rot fungi cultures for decolorization of textile dye stuffs. *Bioprocess Engineering*, 22, 347.
- Karl-Erik, E., Johnsrud, S.C. ve Lars, V. (1983) Degradation of lignin and lignin model compounds by various mutants of the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Archives of Microbiology*, 135, 161–168.
- Kersten, P. ve Cullen, D. (2007). Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Fungal Genetics and Biology*, 44, 77–87.
- Kilic, NK., Nielson, JP., Yuce, M. ve Donmez, G. (2007). Characterization of a simple bacterial consortium for effective treatment of wastewaters with reactive dyes and Cr(VI). *Chemosphere*, 67, 826–31.
- Kirk, T.K. ve Farrell, R.L. (1987). Enzymatic ‘combustion’: the microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology*, 41, 465–505.

- Kirk, T.K. ve Cullen, D. (1998). *Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi*. In: Young RA, Akthar M, editors. Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry. New York, NY: John Wiley & Sons, 273–307.
- Kishi, K., Wariishi, H., Marquez, L., Dunford, B.H. ve Gold, M.H. (1994). Mechanism of manganese peroxidase II reduction. Effect of organic acid and chelators and pH. *Biochemistry*, 34, 8694–701.
- Kramer, K.J., Kanost, M.R., Hopkins, T.L., Jiang, H., Zhu, Y.C., Xu, R., Kerwin, J.L. ve Turecek, F. (2001). Oxidative conjugation of catechols with proteins in insect skeletal systems. *Tetrahedron*, 57, 385–392.
- Kraulis, P.J. (1991). Molscript: A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 24, 946–950.
- Kuan, I.C. ve Tien, M. (1993). Stimulation of manganese peroxidase activity: a possible role for oxalate in lignin biodegradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 1242–6.
- Kuan, I.C., Johnson, K.A. ve Tien, M. (1993). Kinetic analysis of manganese peroxidase. The reaction with manganese complexes. *The Journal of Biological Chemistry*, 268, 20064–70.
- Kuhad, R.C., Singh, A. ve Ericsson, K.E.L. (1997). Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 57, 45–125.
- Kurisawa, M., Chung, J.E., Uyama, H. ve Kobayashi, S. (2003). Enzymatic synthesis and antioxidant properties of poly (rutin). *Biomacromolecules*, 4, 1394–9.

- Kuwahara, M., Glenn, J.K., Morgan, M.A. ve Gold, M.H. (1984). Separation and characterization of two extracellular H_2O_2 dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters*, 169, 247–50.
- Labbe, S., ve D. J. Thiele. (1999). Pipes and wiring: the regulation of copper uptake and distribution in yeast. *Trends Microbiology*, 7, 500-505.
- Leite, O.D., Lupetti, K.O., Fatibello-Filho, O., Vieira, I.C. ve Barbosa, A.M. (2003). Synergic effect studies of the bi-enzymatic system laccase-peroxidase in a voltammetric biosensor for catecholamines. *Talanta*, 59, 889-96.
- Lema, J.M., Moreira, M.T., Feijoo, G. ve Palma, C. (1996). In: *Fronteras en Biotecnología y Bioingeniería*. E. Galindo (ed). *Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería*, 287–293.
- Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtas-Wasilewska, M. ve Cho, N.S. (1999). Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 27, 175–85.
- Leonowicz, A., Cho, N.S., Luterek, J., Wilkolazka, A., Matuszewska, A., Hofrichter, M., ve diğer. (2001). Fungal laccase: properties and activity on lignin. *Journal of Basic Microbiology*, 41, 185–227.
- Levin, L., Herrmann, C. ve Papinutti, V.L. (2008). Optimization of lignocellulolytic enzyme production by the white-rot fungus *Trametes trogii* in solid-state fermentation using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 39, 207-214.
- Lisdar, F., Wollenberger, U., Makower, A., Hortnagl, H., Pfeiffer, D. ve Scheller, F.W. (1997). Catecholamine detection using enzymatic amplification. *Biosensors and Bioelectronics*, 12, 1199-211.

- Lora, J.H. ve Glasser, W.G. (2002). Recent industrial applications of lignin: a sustainable alternative to nonrenewable materials. *Journal of Polymers and the Environment*, 10, 39–48.
- Martinez, A.T., Speranza, M., Ruiz-Duenas, F.J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillen, F., Martinez, M.J., Gutierrez, A. ve del Rio, J.C. (2005). Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*, 8, 195-204.
- Martínez, A.T. (2002). Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme and Microbiological Technology*, 30, 425-444.
- Massadeh M.I., Fraij, A. ve Fandi, K. (2010). Effect of carbon sources on the extracellular lignocellulolytic enzymatic system of *Pleurotus sajor-caju*. *Jordan Journal of Biological Science*, 3, 51-54.
- Mayer, A.M. ve Staples, R.C. (2002). Laccase: New functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, 60, 551-565.
- Messerschmidt, A. ve Huber, R. (1990). The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin. Modelling and structural relationships. *European Journal of Biochemistry*, 187, 341-352.
- Mester, T. ve Field, J.A. (1998). Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera species* strain BOS55 in the absence of manganese. *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 15412–7.
- Michniewicz, A., Ullrich, R., Ledakowicz, S. ve Hofrichter, M. (2006). The white-rot fungus *Cerrena unicolor* strain 137 produces two laccase isoforms with different physico-chemical and catalytic properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69, 682-688.

- Mikiashvili, N., Elisashvili, V., Wasser, S. ve Nevo, E. (2005). Carbon and nitrogen sources influence the ligninolytic enzyme activity of *Trametes versicolor*. *Biotechnology Letters*, 27, 955–959.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.
- Moredo, N., Lorenzo, M., Domínguez, A., Moldes, D., Cameselle, C. ve Sanroman, A. (2003). Enhanced ligninolytic enzyme production and degrading capability of *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19, 665–669.
- Morgan-Sagastume, J.M., Jimenez, B. ve Noyola, A. (1997). Tracer studies in a laboratory and pilot scale UASB reactor. *Environmental Technology*, 18, 817–26.
- Muñoz, C., Guillén, F., Martínez, A. T. ve Martínez, M. J. (1997). Induction and characterization of laccase in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Current Microbiology*, 34, 1–5.
- Nieves, R.A., Ehrman, C.I., Adney, W.S., Elander, R.T. ve Himmel, M.E. (1998). Technical communication: survey and commercial cellulase preparations suitable for biomass conversion to ethanol. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14, 301–4.
- Orhon, D., Sözen, S., Görgün, E., Çokgör, E. ve Artan, N. (1999). Technological aspects of wastewater management in coastal tourist areas. *Water Science and Technology*, 39/8, 177–84.
- Orth, A. B. ve Tien, M. (1995). *Biotechnology of lignin degradation*. In U. Kück, (Ed.). *The Mycota*, 2, 287-302). Germany: Springer-Verlag.

- Ozturk Urek, R. ve Kasikara Pazarlioglu, N. (2007). Production of manganese peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50, 913-920.
- Palmer, A.E., Lee, S.K. ve Solomon, E.I. (2001) Decay of the peroxide intermediate in laccase: Reductive cleavage of the O–O bond. *Journal American Chemical Society*, 123, 6591-6599.
- Palmieri G., Giardina, P., Bianco C., Capasso A. ve Sannia G. (1997). A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 31301-31307.
- Paszczynski, A., Huynh, V.B. ve Crawford, R. (1985). Enzymatic activities of an extracellular, manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiology Letters*, 29, 37–41.
- Paszczynski, A., Huynh, V.B. ve Crawford, R. (1986). Comparison of ligninase-1 and peroxidase-M2 from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 244, 750–65.
- Pazarlioğlu N., Öztürk-Ürek R. ve Ergün F. (2005). Biodecolorization of Direct Blue 15 by Immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. *Process Biochemistry*, 40/5, 1923-1929.
- Pease, E.A., Aust, S.D. ve Tien, M. (1991). Heterologous expression of active manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* using the baculovirus expression system. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 179, 897–903.
- Piontek, K., Antorini, M. ve Choinowski, T. (2002). Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90 Å resolution containing a full complement of coppers. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 37663-37669.

Piontek, K., Smith, A. T. ve Blodig, W. (2001). Lignin peroxidase structure and function. *Biochemical Society Transactions*, 29, 111–116.

Pleurotus ostreatus, http://en.wikipedia.org/wiki/Pleurotus_ostreatus, 14.05.2012.

Pointing, S.B. (2001). Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, 20–33.

Pozdnyakova N.N, Rodakiewicz-Nowak J. ve Turkovskaya O.V. (2004). Catalytic properties of yellow laccase from *Pleurotus ostreatus* D1. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 30, 19-24.

Quintanar, L., Yoon, J., Aznar, C.P., Palmer, A.E., Andersson, K.K., Britt, R.D. ve Solomon, E.I. (2005). Spectroscopic and electronic structure studies of the trinuclear Cu cluster active site of the multicopper oxidase laccase: Nature of its coordination unsaturation. *Journal American Chemical Society*, 127, 13832-13845.

Rabinovich, M.L., Bolobova, A.V. ve Vasil'chenko. (2004). Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 40, 1–17.

Rancano G., Lorenzo M., Morales N., Couto S.R. ve Sanroman, M.A. (2003). Production of laccase by *Trametes versicolor* in airlift fermentor. *Process Biochemistry*, 39, 467-473.

Reid, I.D., Paice, M.G. ve Jurasek, L. (1990). Biological bleaching of softwood kraft pulp with the fungus *Trametes (Coriolus) versicolor*. *Tappi Journal*, 73, 14-153.

Revankar, M.S. ve Lele S.S. (2007). Synthetic dye decolorization by white rot fungus, *Ganoderma* sp. WR-1. *Bioresource Technology*, 98, 775-780.

- Roberts, J.C. (1996). *The Chemistry of Paper*. The Royal Society of Chemistry, UK.
- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R. ve Nigam, P. (2001). Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology*, 77,247–55.
- Rodríguez, C.S (2009). Dye removal by immobilised fungi. *Biotechnology Advances* 27, 227-235.
- Ruiz-Dueñas, F.J., Morales, M., García, E., Miki, Y., Martínez, M.J. ve Martínez, A.T. (2009). Substrate oxidation sites in versatile peroxidase and other basidiomycete peroxidases. *Journal of Experimental Botany*, 60,441 – 452.
- Sánchez, C. (2009). Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*. 27, 185–194.
- Sarkanen, K.V. ve Ludwig, C.H. (1971). Definition and nomenclature. In *Lignins, occurrence, formation, structure and reactions*, 1–18. New York: Wiley-Interscience.
- Scarpi, C., Ninci, F., Centini, M., Anselmi, C. (1998). High-performance liquid chromatography determination of direct and temporary dyes in natural hair colourings. *The Journal of Chromatography*, 796, 319–25.
- Scott, G.M., Akhtar, M. ve Kirk, T.K. (2000). An update on biopulping commercialization. In *Proceedings of the 2000 Pulping Conference*. Atlanta: Tappi Press.
- Setti, L., Giuliani, S., Spinozzi, G., Pifferi, P.G. (1999). Laccase catalyzed-oxidative coupling of 3-methyl 2-benzothiazolinone hydrazone and methoxyphenols. *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 285 – 9.

- Shutova, V. V., Revin, V.V. ve Myakushina, Yu. A.(2008). The Effect of Copper Ions on the Production of Laccase by the Fungus *Lentinus (Panus) tigrinus*. *Applied Biochemistry & Microbiology*, 44, 619-623.
- Singh, P., Sulaiman, O., Hashim, R., Rupani, P.F. ve Peng, L.C. (2010). Biopulping of lignocellulosic material using different fungal species: A review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 9, 141-151.
- Sjöström, E. (1993). *Wood Chemistry, Fundamentals and Applications*, 2nd ed. New York/London: Academic Press.
- Sokolowska-Gajda J., Freeman H.S ve Reife A. (1996). Synthetic dyes based on environmental considerations: 2. Iron complexed formazan dyes. *Dyes and Pigments*, 30, 1–20.
- Solomon E.I, Sundaram U.M. ve Machonkin T.E. (1996). Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemistry Reviews*, 96, 2563 – 605.
- Solomon, E.I., Baldwin, M.J., ve Lowery, M.D. (1992) Electronic structures of active sites in copper proteins: contributions to reactivity. *Chemical Reviews*, 92, 521-542.
- Songulashvili, G., Elisashvili, V., Wasser, S., Nevo, E. ve Hadar, Y. (2006). Laccase and manganese peroxidases activities of *Phellinus robustus* and *Ganoderma adspersum* grown on food industry wastes in submerged fermentation. *Biotechnology Letters*, 28, 1425–1429.
- Sundaramoorthy, M., Kishi, K., Gold M.H. ve Poulos, T.L. (1997). Crystal structures of substrate binding site mutants of manganese peroxidase. *Journal Biology Chemistry*, 272, 17574-17580.

- Steffen, K.T. (2003). Degradation of recalcitrant biopolymers and polycyclic aromatic hydrocarbons by litter-decomposing basidiomycetous fungi, *Dissertationes Biocentri Viikki Universitatis Helsingiensis*, 23. (Doctoral Thesis).
- Sterckeman, T., Douay, F., Proix, N., Fourrier, H. (2000). Vertical distribution of Cd, Pb and Zn in soils near smelter in the North of France, *Environmental Pollution* 107, 377-389.
- Tellez-Tellez, M., Fernandez, F.J., Montiel-Gonzalez, A.M., Sanchez, C. ve Diaz-Godinez, G. (2008). Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81, 675-679.
- Thurston, C.F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 140, 19–26.
- Tien, M. ve Kirk, T., (1984). Lignin-Degrading Enzyme From *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, Characterization, And Catalytic Properties Of A Unique H₂O₂ -Requiring Oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A*, 81, 2280-2284.
- Tobin, J.M., White, C. ve Gadd, G.M. (1994). Metal accumulation by fungi: applications in environment biotechnology. *Journal of Industrial Microbiology*, 13, 126–30.
- Toumela, M., Steffen, K.T, Kerko, E., Hartikainen, H., Hofrichter, M. ve Hatakka, A. (2005). Influence of Pb contamination in boreal forest soil on the growth and ligninolytic activity of litter-decomposing fungi. *FEMS Microbiology Ecol.*, 1;53(1), 179-86.
- Tünay, O., Kabdasli, I., Ohron, D. ve Cansever, G. (1999). Use and minimalization of water in leather tanning processes. *Water Science Technology*, 40, 7–44.

- Urzu' a, U., Kersten, P.J. ve Vicun~ R. (1998). Manganese peroxidase-dependent oxidation of glyoxylic acid synthesized by *Ceriporiopsis subvermispora* produces extracellular hydrogen peroxide. *Applied Environmental Microbiology*, 64, 68–73.
- Venkatadri, R. ve Irvine, R.L. (1993). Cultivation of *Phanerochaete chrysosporium* and production of lignin peroxidase in novel biofilm reactor system: hollow fibre reactor and silicone membrane reactor. *Water Research*, 27, 591–596.
- Waldrop, M.P., Balser, T.C. ve Firestone, M.K. (2000). Linking microbial community composition to function in a tropical soil. *Soil Biology and Biochemistry*. 32,1837–1846.
- Wang. L., Yan. W., Chen. J., Huang. F ve Gao, P. (2008). Function of the iron-binding chelator produced by *Coriolus versicolor* in lignin biodegradation. *Science in China Series C: Life Sciences*; 51, 214-221.
- Weatherburn, M. W. (1967). Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry*, 39, 971-974.
- Wesenberg, D., Kyriakides, I. ve Agathos, W. (2003). White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances*, 22, 161-187.
- Wong, D.W. (2009). Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 157, 174-209.
- Yaghoubi, K., Mohammad, P. ve Seyed, A.S (2008). Variable optimization for biopulping of agricultural residues by *Ceriporiopsis subvermispora*. *Bioresources Technology*, 99, 4321–4328.

Yaropolov, A.I., Skorobogatko, O.V., Vartanov, S.S. ve Varfolomeyev, S.D. (1994). Laccase: Properties, catalytic mechanism, and applicability. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 49, 257-280.

Zee, F.P. ve Villaverde, S. (2005). Combined anaerobic-aerobic treatment of azo dyes — a short review of bioreactor studies. *Water Resources*, 39, 1425–40.