

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Ganoderma lucidum* İLE LAKKAZ ÜRETİMİ VE BOYA RENK GİDERİMİ**

SİNEM ERCAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MALATYA
AĞUSTOS 2014

Tezin Başlığı: *Ganoderma lucidum* ile Lakkaz Üretimi ve Boya Renk Giderimi

Hazırlayan: Sinem ERCAN

Sınav Tarihi: 13.08.2014

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jürisi Üyeleri

Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA İnönü Üniversitesi

Prof. Dr. Murat ÖZMEN İnönü Üniversitesi

Doç. Dr. Elif APOHAN İnönü Üniversitesi

İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. Mehmet ALPASLAN

Enstitü Müdürü

En kıymetli varlığım aileme...

ONUR SÖZÜ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum '***Ganoderma lucidum* ile Lakkaz Üretimi ve Boya Renk Giderimi**' başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım tüm kaynakların hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve bunu onurla doğrularım.



SİNEM ERCAN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Ganoderma lucidum İLE LAKKAZ ÜRETİMİ VE BOYA RENK GİDERİMİ

Sinem ERCAN

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

52 + ix sayfa

2014

Danışman: Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA

Biyoteknolojik uygulamalar için farklı beyaz çürükçüllerle yüksek düzeyde enzim üretimi önemlidir. Bu çalışmada bir beyaz çürükçül fungus olan *Ganoderma lucidum* kullanılmıştır. Öncelikle yeni izole edilmiş olan *G. lucidum* lakkaz substratı olarak 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) içeren Sabouroud dekstroz agarda üretilmiştir. ABTS'nin oksidasyon zonu bu fungusta lakkaz (EC 1.10.3.2) varlığını göstermiştir. Daha sonra bu fungusun lakkaz üretim yeteneği farklı üretim ortamlarında tekrarlı kesikli koşullarda araştırılmıştır. Melas ortamı lakkaz üretimi için en etkili üreme ortamı olarak saptanmıştır. Bu nedenle, melas ortamı lakkaz üretim ortamı olarak tercih edilmiş ve çeşitli indükleyicilerin (bakır, ABTS ve 2,5-ksilidin) bu fungusun lakkaz üretim verimine etkisi test edilmiştir. Bakır eklenmesi lakkaz üretimini indüklemiş ve 5mM bakır içeren melas ortamında 9.58 U/mL lakkaz aktivitesi elde edilmiştir. Diğer iki indükleyicinin (ABTS ve 2,5-ksilidin) bu fungusun lakkaz üretimine etkisi olmamıştır. Bakır, ABTS ve ayrıca 2,5-ksilidin+ bakır, *G.lucidum*'un lakkaz üretim aktivitesine sinerjistik etki yapmıştır. Zimogram tek bir bakır aktivite bandı göstermiştir. Bu fungusun, çeşitli boyar maddelerin renk giderim aktivitesi de araştırılmıştır.

ANAHTAR KELİMELELER: Boyar madde renk giderimi, enzim üretimi, *Ganoderma lucidum*, lakkaz, melas

ABSTRACT

Master Thesis

LACCASE PRODUCTION AND DYE DECOLORIZATION BY *Ganoderma lucidum*

Sinem ERCAN

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

52 + ix pages

2014

Supervisor: Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA

The production of high amount of laccase (EC 1.10.3.2) enzyme by different white rot fungi are very important for biotechnological applications. In this study, white rot fungus *Ganoderma lucidum* was used. First of all, this newly isolated *G. lucidum* was incubated on Sabouraud dextrose agar containing 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzathiozoline-6-sulphonic acid) (ABTS) as a laccase substrate to detect the possible laccase activity of this strain. The oxidation zone of ABTS showed the presence of laccase enzyme in this fungus. Then, laccase production ability of this fungus was investigated at different growth media under repeated batch conditions. Molasses medium was determined as the most effective growth medium for laccase production. Therefore, molasses medium was preferred as a laccase production medium and the effect of various inducers (copper, ABTS and 2,5-xyldine) on laccase production efficiency of this fungus was tested. Addition of copper induced the laccase production and 9.58 U/mL laccase activity was detected in molasses medium containing 5mM copper. The other two inducers (ABTS and 2,5-xyldine) had no effect on laccase production of this fungus. The possible synergistic effect of copper and ABTS, and also copper and 2,5-xyldine was also tested. Copper+2,5-xyldine exhibited a synergistic effect on laccase production activity of *G. lucidum*. Zymogram analysis showed only one band of laccase activity. The dye decolorization activity of this fungus against various reactive dyes was also investigated.

KEYWORDS: Dye decolorization, enzyme production, *Ganoderma lucidum*, laccase, molasses

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın seçimi ve planlanmasında olduğu kadar deneysel ve yazım aşamasında da fikirleriyle bana yol gösteren, hem bilim adamı kimliğiyle hem de dünya görüşüyle daima örnek aldığım ve öğrencisi olmaktan her zaman mutluluk duyacağım değerli Hocam Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA'ya

Tez çalışmasının deneysel kısmında desteğini benden esirgemeyen Dr. Emre BİRHANLI'ya

Çalışmalarım sırasında manevi destekleriyle her zaman yanımda olan hocam Dr. Filiz BORAN ve arkadaşım Ayfer SERİNDAG'a

Ganoderma lucidum ile lakkaz üretimi ve boya giderimi (BAP 2011/125) adlı projeyi destekleyen Bilimsel Araştırma Projeler Birimi Başkanlığı'na

Verdiğim bütün kararlarda yanımda oldukları gibi yüksek lisans çalışmam sırasında da desteklerini bir an olsun esirgemeyen, gölgesini hep üzerimde hissettiğim Annem, Babam ve Kardeşime

çok teşekkür ederim..

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Beyaz Çürükçül Funguslar	1
1.2. <i>Ganoderma lucidum</i>	2
1.3. Lakkaz	5
1.4. Lakkazın Yapısı.....	5
1.4.1. Lakkazın Katalizlediği Reaksiyonlar	7
1.4.2. Lakkazın Önemi ve Uygulama Alanları.....	8
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	11
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	18
3.1. Çalışmada Kullanılan Fungus.....	18
3.2. Çalışmada Kullanılan Fungusun Üretimi ve Saklanması.....	18
3.3. Çalışmada Kullanılan Fungusun Sıvı Besiyerinde Üretimi ve Peletlerin Üretilmesi	18
3.4. Fungusda Lakkaz Varlığının Agar Plaklarında Gösterilmesi.....	19
3.5. Çalışmada Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması	19
3.6. Lakkaz Üretimi İçin Kullanılan Üretim Yöntemleri.....	20
3.7. Lakkaz Aktivitesini İndüklemek İçin İndükleyici Maddelerin Kullanılması.....	20
3.8. Elektroforez Çalışması	20
3.9. Analiz.....	20

3.10.	<i>Ganoderma lucidum</i> 'un Renk Giderim Yeteneğinin Agar Plaklarında Gösterilmesi	21
3.11.	<i>Ganoderma lucidum</i> Renk Giderim Yeteneğinin Sıvı Ortamda Gösterilmesi	21
4.	BULGULAR	22
4.1.	<i>Ganoderma lucidum</i> 'un Lakkaz Üretimi	22
4.1.1.	<i>Ganoderma lucidum</i> 'un Agar Ortamında Lakkaz Üretim Yeteneği	22
4.1.2.	<i>G. lucidum</i> 'un Tekrarlı Kesikli Koşullarda Farklı Besiyerlerinde Lakkaz Üretim Yeteneği	23
4.1.2.1.	<i>G. lucidum</i> 'un STO besiyerinde lakkaz üretimi	23
4.2.2.2.	<i>G. lucidum</i> 'un SDB besiyerinde lakkaz üretimi	23
4.1.2.3.	<i>G. lucidum</i> 'un melas besiyerinde lakkaz üretimi	24
4.2.	<i>G. lucidum</i> 'un Melas Besiyerinde Tekrarlı Kesikli Süreçte Lakkaz Üretimine İndükleyicilerin Etkisi	25
4.2.1.	<i>G. lucidum</i> 'un Lakkaz Üretimine Bakırın Etkisi	25
4.2.2.	<i>G. lucidum</i> 'un Lakkaz Üretimine ABTS ve ABTS+Bakır'ın Birlikte Etkisi	26
4.2.3.	<i>G. lucidum</i> 'un Lakkaz Üretimine Ksilidin ve Ksilidin+ Bakır Birlikte Etkisi	27
4.3.	Statik Olarak Üretilen <i>G. lucidum</i> 'un Lakkaz Üretim Yeteneğinin Melas Ortamında Kesikli Koşulda Araştırılması	28
4.4.	<i>G. lucidum</i> 'un Lakkaz Enziminin Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi Sonucu	30
4.5.	<i>G. lucidum</i> Boyar Madde Renk Giderim Yeteneğinin Araştırılması	31
4.5.1.	<i>G.lucidum</i> 'un Boyar Madde Renk Giderim Yeteneğinin Agar Ortamında Araştırılması	31
4.5.2.	Sıvı Besiyerinde Tekrarlı Kesikli Süreçte <i>G. lucidum</i> 'un Boyar Madde Renk Giderim Aktivitesi	32
5.	TARTIŞMA	33
6.	KAYNAKLAR	40
7.	ÖZGEÇMİŞ	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Lakkaz enziminin yapısı.....	6
Şekil 1.2.	Fungal lakkaz enzimlerinin katalitik mekanizması.	7
Şekil 3.1.	Doğadan fotoğraflanan <i>Ganoderma lucidum</i>	18
Şekil 3.2.	<i>G. lucidum</i> peletlerinin etüvde üretim aşaması.....	19
Şekil 4.1.	ABTS içeren ve içermeyen SDA ortamlarında üretilen <i>G. lucidum</i> 'da lakkaz varlığı (A) ABTS içermeyen SDA ortamında üretilmiş <i>G. lucidum</i> , (B) ABTS içeren SDA ortamında üretilmiş <i>G. lucidum</i> (C) ABTS içeren SDA ortamında üretilmiş <i>P. chrysosporium</i>	22
Şekil 4.2.	Tekrarlı kesikli <i>G. lucidum</i> kültürüyle STO ve STO+bakır (5 mM Cu) ortamlarında lakkaz üretimi.....	23
Şekil 4.3.	Tekrarlı kesikli <i>G. lucidum</i> kültürüyle SDB ve SDB+bakır (5 mM Cu) ortamlarında lakkaz üretimi.....	24
Şekil 4.4.	Optimum (5mM) bakır konsatrasyonunda <i>G. lucidum</i> kültüründen tekrarlı kesikli yöntemle lakkaz üretimi	26
Şekil 4.5.	Melas besiyerinde üretilen <i>G. lucidum</i> 'un lakkaz üretimine ABTS ve ABTS+bakırın birlikte etkisi.....	27
Şekil 4.6.	Melas besiyerinde üretilen <i>G. lucidum</i> 'un lakkaz üretimine ksidilin ve ksidilin+bakırın birlikte etkisi	28
Şekil 4.7.	Statik koşullarda üretilen <i>G. lucidum</i> 'un 15 g/L melas besiyerinde günlere bağlı lakkaz aktivite (U/mL) ve üreme değişimi.....	29
Şekil 4.8.	Statik koşullarda üretilen <i>G. lucidum</i> 'un 15 g/L Melas+bakır (1mM) içeren besiyerinde günlere bağlı lakkaz aktivite (U/mL) ve üreme değişimi.....	29
Şekil 4.9.	Statik koşullarda üretilen <i>G. lucidum</i> 'un 15 g/L Melas+bakır(2 mM) içeren besiyerinde günlere bağlı lakkaz aktivite (U/mL) ve üreme değişimi.....	30
Şekil 4.10.	<i>G. lucidum</i> kültür sıvısındaki lakkaz enziminin aktivite bandı.....	30

Şekil 4.11.	<i>G. lucidum</i> 'un boyar madde içeren SDA ortamında 15 gün inkübasyonu sonrası besiyeri renk değişimi. A1: Kontrol Reaktif Siyah 5, A2: Uygulama Reaktif Siyah 5; B1: Kontrol Remazol Brilliant Mavi R, B2: Uygulama Remazol Brilliant Mavi R; C1: Kontrol Reaktif Mavi 171, C2: Uygulama Reaktif Mavi 171.....	31
Şekil 4.12.	<i>G. lucidum</i> 'un tekrarlı kesikli süreçte boyar madde renk giderim yeteneği.....	32

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.	Beyaz çürükçül funguslarla bazı biyoteknolojik yaklaşımlar.....	2
Çizelge 1.2.	<i>G. lucidum</i> 'un sağlık alanında kullanılabilirliğine yönelik bazı çalışmalar.....	4
Çizelge 4.1.	Farklı konsantrasyonlarda melas içeren besiyerlerinde elde edilen lakkaz aktivite değerileri.....	24
Çizelge 4.2.	Bakırın melas besiyerinde üretilen <i>G. lucidum</i> 'un lakkaz üretimine etkisi.....	25

SİMGELER VE KISALTMALAR

PAHs	Poliaromatik Hidrokarbonlar
PBCs	Polikarbonlu Bifenoller
PSs	Polisakkaritler
ATCC	Amerikan tip kültür koleksiyonu
STO	Stok temel ortam
mM	Milimolar
Cu	Bakır
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-etilbenziazolin-6-sülfonik asit)
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
kDa	kilodalton
HBT	Hidroksil benzo triazol
μM	Mikromolar
U	Ünite
U/mL	Ünite/mililitre
CuSO ₄ .5H ₂ O	Bakır sülfat penta hidrat
SDA	Sabouraud dekstroz agar
SDB	Sabouraud dekstroz broth
rpm	Dakikada dönme hızı

1. GİRİŞ

1.1. Beyaz Çürükçül Funguslar

Ağaçlardaki odunun kuru ağırlığının %35-50 selüloz, % 23-32 hemiselüloz ve % 15-25'i ligninden oluşmuştur. Özellikle lignin suyu geçirmeyen bir yapıya sahip ve mikrobiyal yıkıma dirençli olduğundan odunun yapısındaki bu bileşikler bitkiyi koruyucu bir bariyerdir (Betts, 1991; <http://www.anbg.gov.au/fungi/ecology-woodrot.html>).

Çoğu mikroorganizma odundaki lignini yıkamaz. Mikroorganizmalarda lignin yıkıcı enzimlerin bulunmaması ya da çok düşük seviyede olması lignin yıkımı açısından bu tip organizmaların dezavantajlarıdır. Bununla birlikte, doğadaki birçok mikroorganizmanın aksine beyaz çürükçül funguslar selüloz, hemiselüloz ve özellikle lignini yıkabilme özelliğine sahiptir (Siripong vd., 2009). Kahverengi çürükçül funguslar selüloz ve hemiselüloza özgü iken, beyaz çürükçül funguslar, aerobik koşullarda hücre dışı enzimlerini kullanarak lignin yıkabilmektedirler (<http://www.anbg.gov.au/fungi/ecology-woodrot.html>).

Beyaz çürükçül funguslar, *Basidiomycetes* sınıfında yer alan ayrı bir ekofizyolojik gruptur (Pointing, 2001). Bunlar lignini yıkım özelliklerinden dolayı lignolitik funguslar olarak da adlandırılırlar. Yıkımını sağladıkları lignini enerji kaynağı olarak kullanabilme özelliklerinden dolayı, doğadaki karbon döngüsünde önemli rol oynarlar (<http://www.anbg.gov.au/fungi/ecology-woodrot.html>). Beyaz çürükçül funguslar çeşitli ekstraselüler proteinler, organik asitler ve metabolitleri üretirler bunun yanı sıra, farklı çevre koşullarına adapte olabilirler. Bu funguslar lignini yıkabilme özelliği gösteren enzimlere bağlı olarak, endüstriyel uygulamalardan doğaya çıkabilen pek çok atıksu, zararlı madde ve ksenobiyotiği yıkabilmektedirler. Bu nedenle atıksuların biyolojik iyileştirmesinde de büyük önemleri vardır (Haritash ve Kaushik, 2009). Ayrıca lignin benzeri pestisit, poliaromatik hidrokarbonlar (PAHs), boyalar, polikarbonlu bifenoller (PCBs) gibi maddeleri de parçalayabilme yetenekleri de bilinmektedir. Bu fungusların substrat özgüllüğü olmadığından üzerlerindeki ilgi sürekli artmaktadır (Murugesan vd., 2009).

Biyolojik açıdan çok önemli olan bu funguslar bir anlamda doğadan elde edebileceğimiz biyoteknolojik oyunculardır. Yukarıda bahsettiğimiz gibi yıkım yeteneklerinin yanı sıra enzimler dahil pek çok önemli metabolit sentezleyebilmektedirler. Çizelge 1.1’de beyaz çürükçül funguslarla yürütülen bazı biyoteknolojik uygulamalar verilmiştir.

Çizelge 1.1. Beyaz çürükçül funguslarla bazı biyoteknolojik yaklaşımlar

UYGULAMA ALANLARI	REFERANSLAR
Zeytinyağı atık suyunun arıtımında ve renk gideriminde kullanımı	Yeşilada vd., 1998; Sampedro vd., 2007; D’Annibale vd., 2006
Alkol fabrikası atık suyunun arıtımında kullanımı	Yeşilada vd, 1995
Hormon üretiminde kullanımı	Yürekli vd., 1999
Ağır metallerin biyolojik adsorbsiyonunda kullanımı	Baldiran, 2003
Kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde lignin yıkımında	Kuhad vd., 1997
Boyar madde renk gideriminde kullanımı	Yeşilada vd., 2003; Chakraborty vd., 2013
Ksenobiyotiklerin biyolojik iyleştirmesinde kullanımı	Higson, 1991
Poliaromatik hidrokarbonların yıkımında kullanımı	Bezalel vd., 1996
Mikrobiyal protein üretiminde kullanımı	Cardoso ve Nicoli, 1981
Lakkaz, Mn-peroksidaz; ligninaz ve tirozinaz gibi enzimleri üretiminde kullanımı	Arora ve Gill, 2000
Ağır metal gideriminde kullanımı	Baldrian, 2003; Chen vd., 2013
Biyoyakıt üretiminde kullanımı	Yang vd., 2013

1.2. *Ganoderma lucidum*

Çalışmada kullandığımız *Ganoderma lucidum* beyaz çürükçül funguslardan *Ganodermatacea* ailesinin bir üyesidir ve adı şapka yüzeyindeki parlaklıktan dolayı Latince de ‘parlak’ anlamına gelen lucidus kelimesinden köken almaktadır.

Çinde Lingzi, Japonyada Reishi, Sachitake ve Kore’de Youngzi olarak adlandırılmaktadır (Yuen ve Gohel, 2009; Wachtel-Galor vd., 2011). Uzak doğu ülkelerinde 4.000 yıldır besin ve tedavi amaçlı olarak kullanılan bu fungusu (Ihayere vd., 2010), özellikle Çinde yaşayan halk uğurlu bir fungus olarak görmekte ve şansın, sağlığın, mutluluğun ve uzun bir hayatın simgesi olarak kabul etmektedir (Chang ve Miles, 2004).

G. lucidum’ un günümüzde kabul gören sistematığı aşağıdaki gibidir:

Alem: Fungi

Filum: Basidiomycota

Sınıf: Basidiomycetes

Ordo: Aphyllophorales

Familya: Ganodermataceae (Polyporaceae)

Cins: *Ganoderma*

Tür: *Ganoderma lucidum* (Yen F., 2008)

Polisakkaritler ve triterpenler *G. lucidum*’un fizyolojik olarak aktif olan bileşenleri arasındadır (Wachtel-Galor vd., 2011; Yuen ve Gohel, 2009). Bu fungus, yüksek molekül ağırlıklı polisakkarit yapılarının çeşitliliğinden dolayı dikkatleri üzerine çekmektedir. Bir polisakkaritin ortalama moleküler kütle dağılımı, protein içerip içermemesi, nötral veya yüklü olması çözünürlük, viskozite gibi fiziksel özellikleri ile birlikte biyolojik aktivitesini etkileyen en önemli unsurlardır (Xu vd., 2011). *G. lucidum* polisakkaritlerinin (GL-PSs) antienflamatuar, hipoglisemik, antiülserik, antitümörjenik ve bağışıklık artırıcı aktivitesi rapor edilmiştir. İçerdiği triterpenlere mentol ve β - karoten örnek verilebilir. Triterpenlerin; antienflamatuar, antitümörjenik ve hipolipidemik aktivitesi saptanmıştır. *G. lucidum*’dan izole edilen ilk triterpen, ganoderik asit A ve B’dir. Ganoderik ve lusidenik asit *G. lucidum* da en fazla bulunan triterpenlerdir (Wachtel-Galor vd., 2011). Tıbbi uygulamaları öne çıkan *G.lucidum*’un sağlık alanında kullanılabilirliğini vurgulayan bazı çalışmalar Çizelge 1.2’de verilmiştir.

Çizelge 1.2. *G. lucidum*'un sağlık alanında kullanılabilirliğine yönelik bazı çalışmalar.

UYGULAMA ALANLARI	REFERANSLAR
Anti-HIV aktivitesi	Russell ve Paterson, 2006
Antimikrobiyal aktivitesi	Keypour vd.,2010; Yoshida vd., 2012; Heleno vd., 2013
Antiviral aktivitesi	Oh vd., 2000; Liu vd., 2004
İmmün sistemin düzenlenmesi üzerine etkisi	Thakur vd., 2007; Xu vd., 2011; Lai vd., 2010
Kan şekeri düzenleyici etkisi	Meng vd., 2011; Pan vd., 2014
Karaciğeri koruması etkisi	Liu vd., 2012; Jin vd., 2013,
Antioksidan etkisi	Deepalakshmi vd., 2013; Ma vd. 2013; Chen vd., 2013
Kanser hücreleri üzerine etkisi	Zhang vd., 2010; Liu vd., 2012; Ruan vd., 2012; Gao vd., 2012
Hipertansiyon düzenleyici etkisi	Wheng ve Yen, 2010

G. lucidum sağlık alanında kullanımına yönelik uygulamaların yanı sıra pek çok biyoteknolojik uygulaması için de test edilmektedir. Su ve toprak kirliliğine sebep olan poliaromatik hidrokarbonların (PAHs), trikloroetilen ve farmasötikal maddelerin yıkımında, pestisitlerin ve fenolik bileşiklerin yıkımında *G. lucidum* kullanılabilir (Coelho vd., 2010; Ting vd. 2011). Bu fungus çeşitli boyaların renginin giderimin için test edilmektedir (Wachtel-Galor vd., 2011; Simonc vd., 2010). Diğer beyaz çürükçül funguslar gibi salgıladığı lignoselülozik enzimler sayesinde ligninin yıkımı ve modifikasyonunda da görev alırlar. Yürütülen çeşitli çalışmalarda da fungusun biyoteknolojik önemi olan lakkaz (EC.1.10.3.2) enzimini üretebildiği gösterilmiştir. Fungusların lakkaz üretim yetenekleri, üretim koşullarına, üretim sistemlerine, ortamda bulunan indükleyicilere, fungusun türüne ve hatta kullanılan fungusun suşuna bağlı olarak değişmektedir. Bu nedenle farklı bölgelerden elde edilen *G. lucidum* suşlarının lakkaz üretim ve biyoteknolojik

iyileştirme yetenekleri farklı olabilmektedir. Araştırmacılar günümüzde de lakkaz üretim ve biyolojik iyileştirme yeteneğine sahip mikroorganizma çeşitliliğini arttırmaya yönelik çalışmalarını yürütmektedir.

1.3. Lakkaz

Lakkaz (E.C 1.10.3.2) çoklu bakır bölgesine sahip oksidoredüktazlara dahil edilen ve glikoprotein yapısında bir enzimdir (Jaszeck vd., 2006 ; Kumar vd., 2012). Lakkaz; radikal katalizleme reaksiyonu ile, eş zamanlı olarak moleküler oksijenin suya indirgeyerek fenolik ya da fenolik olmayan bileşikleri oksitleyebilmektedir. Organizmalarda genellikle ekstraselüler olarak bulunan bir enzimdir. Yüksek oranda özgül olmayan oksidasyon yeteneğinden dolayı biyoteknolojik uygulamalarda dikkatleri üzerine çekmiştir (Claus, H. 2003; Kumar vd., 2012).

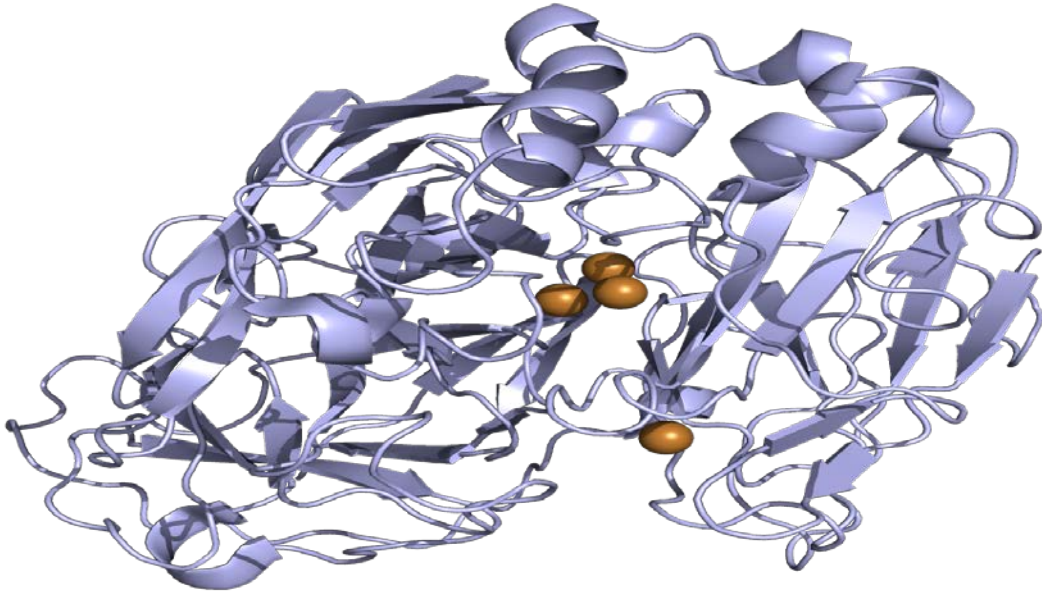
Lakkaz doğada yaygın olarak bulunan bir enzimdir ve ilk kez Yoshida tarafından 1883’de Japon vernik ağacı (*Rhus vernicifera*) özsuyundan elde edilmiştir (Piscitelli vd., 2011). Ancak yapılan araştırmalar bitkilerin yanı sıra, bakteri ve funguslarda lakkazın bulunduğunu göstermiştir. Birçok gram-pozitif ve gram-negatif bakterilerde ve aktinomiseteslerde lakkaz varlığı ispatlanmıştır (Claus, H., 2003). Çayın yeşil yapraklarında, tütün bitkisinin ksilem dokularında (Sharma vd., 2007) ve mango bitkisinde lakkaz varlığına rastlanmıştır. *Drosophila melanogaster*’in olgun ya da larvalarının kütikül tabakasında lakkaza rastlanmıştır. Organizmalarda lakkaz; patojenite, immünite, morfogenezde lignin ve kompleks organik bileşiklerin metabolize edilmesinde ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda görev alır. Bitkilerde ise lakkaz, hücre çeperinin oluşmasında rol almaktadır (Piscitelli vd., 2011).

Lakkaz bitkilerde yaygın olarak bulunmasına rağmen, bitkisel lakkazların belirlenmesi ve saflaştırılmasının zorluğu nedeniyle bu enzimlerin kullanımı mikrobiyal kaynaklı lakkaza oranla daha sınırlıdır (Ranocha, vd., 1999). Beyaz çürükçül funguslar en iyi lakkaz üreten organizmalardır (Fernández-Fernández vd., 2011).

1.4. Lakkazın Yapısı

Çoğu fungusun lakkazı kodlayan birden fazla geni bulunmaktadır. Bu enzimler genelde minomer yapıda iken homodimer veya heterodimer enzimler de

saptanmıştır (Min vd., 2001; Mayer ve Staples, 2002). Molekül ağırlıkları yaklaşık olarak 50-100 kDa arasındadır. Lakkazın önemli bir özelliği ise, protein kısmına kovalent olarak bağlanmış olan ve protein toplam kütlesinin % 10-45'ini oluşturan bir karbonhidrat kısmın da bulunmasıdır. Bu kısım, enzimin yüksek kararlılık göstermesine yardımcı olmaktadır (Claus, 2003; Claus, 2004). Lakkaz izoenzimlerinin metal içeriği farklı olabilmektedir. Bazıları dört bakır atomu içerirken bazıları farklı bakır oranlarındadır. Enzimlerin kofaktörü olan metaller katalitik özellik için önemlidir. Örneğin dört bakır atomu katalitik güç için gereklidir. Bu anlamda üç tip bakır merkezi bulunmaktadır (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Lakkaz enziminin yapısı (<http://armstrong.chem.ox.ac.uk/laccase.html>)

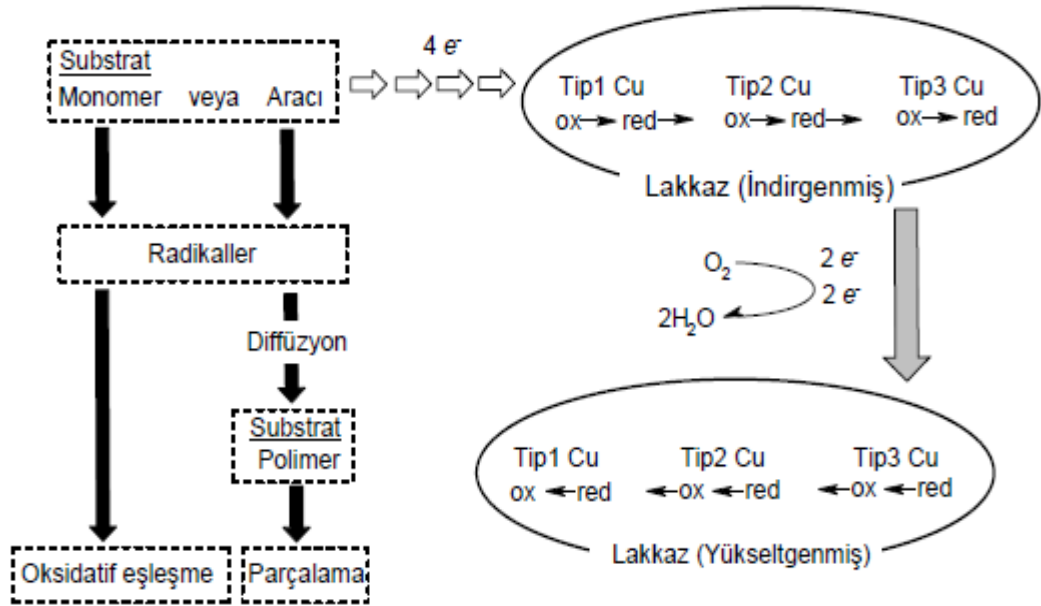
Tip 1: 610 nm’de absorpsiyon

Tip 2: mavi olmayan bakır merkezi

Tip 3: 330 nm’de absorpsiyon (Enguita, vd., 2003; Claus, 2004).

Tip 1 bakır bölgesi iki histidin ve bir sistein kısmı ile koordine edilir (Lyashenko vd., 2011). Tip 1 bakır, çoklu bakır içeren lakkazın tipik mavi renginden sorumludur. Bu mavi rengin nedeni ise, bakır-sistein kovalent bağının neden olduğu yoğun elektronik absorpsiyondur. Yüksek redoks potansiyeli nedeniyle bu bölgede substrat oksidasyonu gerçekleşir. Tip 2 ve Tip 3 bakır merkezleri bir bütün olarak değerlendirilebilir bu nedenle genellikle trinükleer küme olarak adlandırılır (Enguita vd., 2003, Decker ve Tervilliger, 2000). Tip 2 bakır bölgesi, iki histidin ligantı ve bir

su molekülü tarafından üçlü koordine edilir. Tip 3 bakır bölgeleri üç histidin ligantı ve bağlanmış hidroksitle dördü bir yapıyla yönetilmektedir (Lyashenko vd., 2011). Trinükleer küme moleküler oksijenin indirgendiği ve suyun serbest bırakıldığı merkezdir (Enguita vd., 2003; Decker ve Tervilliger, 2000). Lakkaz, Tip1 bakır aracılığı ile her defasında 1 elektron transferiyle dört-basamakta substrat moleküllerini oksitler. Lakkaz molekülünün yeniden oksidasyonu (yükseltgenmesi) ise diamanyetik Tip3 bakır çifti tarafından iki basamaklı olarak dört elektronun, moleküler oksijene (O_2) transferi ile sağlanır. Monomerlerin oksidasyonu sonucunda oluşan reaktif radikaller ise enzimatik-olmayan eşleşme reaksiyonlarına katılırlar. Polimerlerin parçalanması düşük moleküler kütleli aracı (redoks araçları) bileşikler tarafından katalizlenir. Bu aracı moleküllerin lakkaz tarafından aktivasyonu gerçekleştirildikten sonra, bu araçlar aktif enzim bölgesinden polimerlerin hedef bölgelerin diffüze edilirler (Şekil 1.2) (Claus H. 2003).



Şekil 1.2. Fungal lakkaz enzimlerinin katalitik mekanizması (Claus H. 2003)

1.4.1. Lakkazın Katalizlediği Reaksiyonlar

Substratların oksidasyonu ise reaktif radikallerin oluşmasına yol açmaktadır. Oluşan reaktif radikaller, enzimatik olmayan reaksiyonlar ile aşağıdaki reaksiyonlara katılır.

a) Monomerlerin çapraz-bağlanması: Guaikol, pirogallol, p-kresol, 2,6-dimetoksifenol gibi fenolik bileşiklerin ve aromatik aminlerin lakkaz ile enzimatik oksidasyonu, radikallerin oluşmasına yol açar. Oluşan radikaller birbiri ile tepkimeye girerek C-C, C-O ve C-N bağları aracılığı ile kovalent olarak bağlanarak dimer, oligomer veya polimer oluştururlar. Oluşan son ürünün yapısı, ara ürünlerin aktivitesi ve reaksiyonun gerçekleştiği pH tarafından belirlenir. Mikroorganizmalarda lakkazın, protein kalıntılarının çapraz-bağlanmasında fonksiyon gösterdiği düşünülmektedir. Örneğin, sıcaklık ve UV ışınlarına dirençli olan *Bacillus* sp. sporlarının birleşmesinde lakkazın rol oynadığı ileri sürülmektedir (Sjoblad ve Bollag, 1981; Filip ve Claus, 1995; Leonowicz vd., 2001)

b) Polimerin Parçalanması: Lakkaz, bu yolla lignin veya humik asit gibi kompleks doğal polimerlerin parçalanmasında rol almaktadır (Claus ve Filip, 1998). Üretilen reaktif radikaller, kovalent bağların kırılmasına ve monomerin serbest bırakılmasına yol açarlar. Sterik engelleme nedeniyle enzim, doğrudan doğruya polimer ile temas etmeyebilir. Bunun yerine, lakkaz tarafından okside ve aktive edilen küçük organik moleküller ya da metaller radikal katalizli polimerizasyonu saptayabilirler. Biyoteknolojik uygulamalarda ise lakkazın oksidasyon potansiyelini artırmak için çeşitli araçlar (mediatör) kullanılmaktadır (Claus, vd., 2002). Örneğin, özellikle fungal kaynaklı lakkazların ABTS gibi kimyasal araçların varlığında kraft hamurunun ağartılması ve boyar maddelerin renk gideriminde daha etkili oldukları rapor edilmiştir (Bourbonnais ve Paice, 1996; Wong vd., 1999, Mendoza vd., 2011).

c) Aromatik halkaların kırılması: Bazı çalışmalarda aromatik halkaların lakkaz aracılığı ile kırıldığı rapor edilmiştir (Kawal vd., 1988; Duran ve Esposito, 2000; Claus, vd., 2002).

1.4.2. Lakkazın Önemi ve Uygulama Alanları

Lakkaz, fenolik ve fenolik olmayan bileşikler ve ayrıca yıkıma direnci yüksek olan çevre kirleticileri okside edebilme yeteneklerinden dolayı araştırmacıların dikkatlerini üzerine toplamıştır. Bunun yanı sıra moleküler oksijeni elektron alıcısı olarak kullanması ve peroksite ihtiyaç duymaması da bir avantajdır. Lakkaz, bu özelliklerinden dolayı birçok biyoteknolojik uygulamada kullanılmaktadır (Jarosz-Wilkolazka vd., 2004). Bu enzimler kimyasal oksidasyon sistemlerine göre avantajlı

olması özellikleri ve biyolojik olarak parçalanabilir özellikleri önemlidir (Call ve Mücke 1997).

Lignin gezegende en bol ikinci doğal polimerdir (Gamelas vd, 2007; Crestini vd., 2009). Kağıdın endüstriyel olarak üretiminde kağıt hamurunda bulunan ligninin ayrıştırılması ve kağıt hamurundan uzaklaştırılması gereklidir. Geleneksel ağartma yöntemlerindeki klorid bazlı reaksiyonlar çevreye zarar verdiklerinden dolayı yerlerini gittikçe, oksijen bazlı ağartma yöntemlerine bırakmaktadır. Lakkazlar da içinde bulunduğu fenoloksidazların redoks potansiyelleri düşük olduğundan lignin polimerleri içindeki fenolik bileşenlerin oksidasyonunu doğrudan gerçekleştirebilir (Call ve Mücke 1997; Gamelas vd, 2007). Delignifikasyon işleminin lakkaz aracılığıyla yapılması; daha ılımlı koşullarda gerçekleşmesi, çevre dostu olması ve kağıdın ana yapısını bozmaması nedeni ile önemlidir. Fenolik bileşiklerin yalnızca lakkaz kullanılarak kağıt hamurundan uzaklaştırılması zor olabilir. Bu durumu ortadan kaldırmak için ABTS gibi bazı redoks araçları kullanılabilir (Faure vd., 1995; Wong vd., 1999). Günümüzde lakkaz kullanılarak kağıt hamurundan lignin giderimi uygulamaları yapılmaktadır (Moldes ve Vidal, 2011).

Lakkaz yiyecek ve içeceklerin renk giderimi işlemlerine de uygulanabilir. Bu yöntemle şarap, bira, meyve suyunun berraklaştırılmasında ve fenolik bileşiklerin giderilmesi sağlanabilmektedir. Lakkaz, biyopolimerlerin çapraz bağlanmasını sağladığından dolayı gıda endüstrisinde dikkatleri üzerine çekmiştir (Couto ve Herrera, 2006; Martinez-Periñan vd., 2011).

Boyama endüstrisinde sentetik boyalar yoğun olarak kullanılmaktadır. Piyasada 10000 kadar farklı boyar madde çeşidi vardır. Yıllık ortalama 7×10^5 tonun üzerinde boya kullanılmakta ve bunun %10'u endüstriyel atık olarak çıkmaktadır (Claus, vd., 2002). Bu boyalar kimyasal yapılarına bağlı olarak, farklı kimyasal oksitleyicilere ve ışığa bağlı renk solmalarına oldukça dirençlidir.

Boyalar; tümör oluşumu, kanser ve alerjik reaksiyonların yanı sıra, bakteri, bitki, alg ve protozoa üremesini de inhibe etmektedir (Manavalan vd., 2013). Mikrobiyal yıkıma dirençli olduklarından boyar maddelerin geleneksel biyolojik yöntemlerle giderimi güçtür. Kullanılan ürüne bağlı olarak oluşan ürünler, çok daha toksik olabilmektedir. Boya içeren atıksuların biyolojik iyileştirilmesinde kullanılan metotlar düşük etkili olduğundan enzimatik yöntemler öne çıkmaktadır (Couto ve Herrera, 2006).

Lakkaz; çeşitli boyar maddelerin renginin gideriminde, çeşitli boyaların arıtılmasında tercih edilmektedir. Tekstil atık suyunun yanı sıra zeytinyağı fabrika atıklarındaki renkli fenolik bileşiklerin oksidasyonunda da test edilmektedir (Dhillon vd., 2012). Ayrıca denim ağartılmasında hatta boya yapımında da lakkaz kullanılmaktadır (Claus, vd., 2002).

Lakkaz, klinik ve çevresel analizlerde kullanılabilecek biyosensörlerin yapımında da test edilmektedir. Lakkazlar ek kofaktörlere ihtiyaç duymadan elektron transfer reaksiyonlarını katalizleme yeteneğine sahip olduklarından, oksijen, fenolik bileşik ya da azidlerin belirlenmesinde bu enzimin biyosensör ürün kullanımına yönelik çalışmalar bulunmaktadır (Haghighi vd., 2003). Ayrıca morfin, kodein, kateşolamin ve bitki flavonoidlerinin saptanması için de biyosensörler geliştirilmiştir (Lisdar vd., 1997; Bauer vd., 1999; Gupta vd., 2003).

Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAHs) diğer ksenobiyotiklerle birlikte toprakta büyük ölçüde kontaminasyon yaratmaktadır. Çevreyi korumak için bu maddelerin yıkımı önemlidir. Fosil yakıtların kullanılmasından ve petrole bağlı açığa çıkan PAH'lar da lakkaz tarafından parçalanır (Collins vd., 1996; Wu vd., 2014).

Saç boyalarında H₂O₂ yerine oksitleyici ajan olarak lakkaz kullanılabilmektedir. Ayrıca, cilt beyazlatıcı olarak kullanılan ve çeşitli proteinleri içeren kozmetik ve dermatolojik uygulamalarda da yer alabilmektedir (Roure vd., 1992; Xu 1999; Shogren ve Biswas, 2013).

Lakkazın bunların yanı sıra çeşitli uygulamalarda kullanılan kullanımına yönelik çalışmalar bulunmaktadır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Galhaup vd. (2002) yapmış oldukları çalışmada Basidiomycetes sınıfına dahil olan *Trametes pubescens* MB 89'in lakkaz üretim yeteneğini araştırmıştır. Fungusun lakkaz üretim yeteneğinin, bakır içeren glikoz ortamında arttığını, karbon ve azot kaynağının da lakkaz üretimi üzerinde etkili olduğunu rapor etmiştir. Çalışmalar sonucunda glikoz, pepton ve Cu içeren ortamda 330 U/L lakkaz aktivitesine ulaşılmış ve biyoreaktör ölçeğinde de 123. saatlik inkübasyon sonucunda 740 U/L lakkaz aktivitesi elde edilmiştir. Ayrıca, lakkaz indükleyicisi olan 2,5-ksilidin, vanillik asit, guaikol, gallik asit, furelik asit, kateşol ve p-anisidin'in kullanıldığı çalışmalarda da bakırın benzer indükleyici etkisi rapor edilmiştir.

Jang vd. (2002) Kore'den izole ettikleri *Trametes* sp. misellerini tekrarlı kesikli uygulamada kullanmış ve çalkalamalı yürütülen tekrarlı kesikli koşullarda tutuklanmış miseller için 7800 U/L, serbest miseller için de 14600 U/L lakkaz aktivitesi saptanmıştır. Ayrıca, sıvı ortamda tekrarlı kesikli kültür 40 gün boyunca devam ettirilmiş ve lakkaz aktivitesi 12000 U/L'den 20000 U/L'ye ulaşmıştır. Yapılan çalışmalar tekrarlı kesikli yöntemin avantajını ortaya koymuştur.

Birhanlı ve Yeşilada (2006) *Funalia trogii* ATCC 200800 ve *Trametes versicolor* ATCC 200801 peletleriyle tekrarlı kesikli süreçte çalışmıştır ve fungal peletlerle yüksek lakkaz değerlerine ulaşılabilceğini dolayısıyla tekrarlı kesikli sürecin lakkaz üretiminde verimli olduğunu rapor etmiştir. Elde edilen kültür filtratlarının çeşitli boyar maddelerin rengini etkili bir şekilde giderdiğini bildirmiştir.

Birhanlı ve Yeşilada (2010) aynı fungusların tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimini optimize etmiştir ve alıkonma süresi, sıcaklık, çalkalama hızı, pH ve pelet miktarının lakkaz üretimi üzerine etkili olduğunu bildirmiştir. Tekrarlı kesikli koşullarda optimum şartlar altında *T. versicolor* ve *F. trogii* serbest peletleriyle maksimum aktivite için sırasıyla 12.08 U/mL ve 40.29 U/mL olarak saptanmıştır.

Hou vd. (2004), *Pleurotus ostreatus* soy 32'nin lakkaz üretimi üzerine statik ve çalkalamalı koşullar ve zenginleştirilmiş besiyerinin etkisini çalışmıştır. Besiyeri optimizasyonu çalışmalarında karbon ve azot kaynağı olarak kullanılan maddelerden en verimli sonucu sellobiyoz ve pepton ile elde etmiştir. Test edilen indükleyiciler içinde ABTS en iyi indüklemeyi yapmış ve ABTS'nin eklenmesi ile 400 U/mL lakkaz aktivitesine ulaşılmıştır. Bakırın da lakkaz üretimine önemli oranda pozitif bir etki yaptığı rapor edilmiştir (360 U/mL). Saf lakkaz, SV4R boyasının rengini %66

oranında giderirken mediatör olarak ABTS ilavesi sonunda renk giderimi % 90'a kadar ulaşmıştır.

Yeşilada vd. (2014) *Funalia trogii* ATCC 200800 peletleriyle tekrarlı kesikli süreçte ürettikleri lakkazı sıcaklık, pH ihtiyacı ve kararlılığını çalışmıştır. Çalışmalar sonucu, ham lakkazın 55-90 °C arasında yüksek aktivite gösterdiği ve maksimum lakkaz aktivitesinin de 80-85 °C'ler 160 U/mL olduğu gözlenmiştir. Lakkaz aktivitesi için optimum pH 2,5 olarak kaydedilmiştir. Ham lakkazın çeşitli metal iyonları, inorganik tuzlar, propanol gibi organik çözücülere karşı dirençli olduğu da gösterilmiştir. *F.trogii*'den elde edilen saf lakkazın yüksek kararlılık gösterdiği ve bu özelliklerinden dolayı biyoteknolojide birçok alanda kullanılabileceği rapor edilmiştir.

Rosales vd. (2007) katı faz fermentasyonu sürecinde lakkaz üretimini indüklemek için CuSO₄ ve şiringaldazin kullanmış ve en yüksek lakkaz aktivitesi 2,5 g portakal kabuğu + 5 mM CuSO₄ kullanılan besiyerinde 31.75 U/L olarak rapor etmiştir. Sabit yataklı ve tava tipi reaktörde ise maksimum aktivite sırası ile 3000 U/L ve 12000 U/L olarak belirlenmiştir.

Revankar ve Lele (2006a) *Coriolus versicolor* MTCC 138' in farklı besiyerlerinde lakkaz üretim yeteneğini araştırmış ve uygun azot ve karbon kaynağı ile yüksek lakkaz değerlerine ulaşmıştır. Glikoz içeren SBM ortamında 7. günde 155 U/mL lakkaz aktivitesi elde edilirken, azot kaynağı olarak maya özütü, karbon kaynağı olarak nişasta ve glikoz kullanıldığında lakkaz aktivitesi yaklaşık 2 kat (305 U/mL) artmıştır. Optimize edilmiş besiyerine 1 mM Cu ilavesi sonucu 400 U/mL aktiviteye ulaşılmıştır. Optimizasyon çalışmaları en iyi karbon kaynağının glikoz, azot kaynağının maya özütü ve en uygun bakır konsantrasyonunun 1 mM olduğunu göstermiştir. Bu ortamda yapılan çalışmada ise 460 U/mL lakkaz aktivitesine ulaşılmıştır. Farklı indükleyiciler eklendiğinde p-anisilin için 397 U/mL, gallik asit için 480 U/mL ve 2,5-ksilidin için de 511 U/mL lakkaz aktivitesi elde edilmiştir. 1 mM 2,5-ksilidin eklenmesi sonucunda 6. günde 820 U/mL lakkaz aktivitesine ulaşılmıştır.

Enayatzamir vd. (2009) paslanmış çelik süngere tutuklanmış *Trametes pubescens*' in lakkaz üretim ve Reaktif Siyah 5 renk giderim yeteneğini sabit yataklı biyoreaktörde test etmiştir. Boyar madde bulunan ortamda lakkaz aktivitesi 10 kat artmış ve 1025 U/L'ye ulaşılmıştır. 24 saatlik ardarda 4 kez kesikli inkübasyon

sonucunda yüksek renk giderimleri olduğu rapor edilmiştir ve boyar madde renk gideriminde etkinin fungus misellerine boyar madde adsorbsiyonu ve lakkaz aracılığıyla yıkımı şeklinde olduğu yorumlanmıştır.

Ma vd. (2014) *Ganoderma sp.* En3'ün Reaktif Turuncu 16 boyasının renk giderim yeteneği derin kültürde test etmiştir. Glikoz, sakkaroz, fruktoz, nişasta ve gliserolün kullanıldığı besiyerlerinde en iyi renk gideriminin gliserol bulunan ortamda 96. saate % 97 olduğu saptanmıştır. Azot kaynağı olarak malt özütü, L-asparjin, amonyum sülfat, amonyum tartarat, üre ve pepton karşılaştırılmış ve pepton bulunan besiyerinde 96. saate % 96 renk giderimine ulaşılmıştır. Renk gideriminin artışıyla birlikte lakkaz aktivitesinde de artış görülmüştür. Simule ve gerçek atık suların renkleri de etkili şekilde giderilmiştir.

Trametes versicolor'dan lakkaz enzimini saflaştırılmış ve bu enzim Remazol Brilant Mavi R (RBBR) ve Reaktif Siyah 5 renk giderim yeteneği araştırılmıştır. Bu enzim RBBR'in rengini Reaktif Siyah 5'e göre beş kat daha hızlı bir şekilde gidermiştir. Saflaştırılmış lakkaz RBBR boyasında 0.60 µm/min renk giderimine sebep olurken, Reaktif Siyah 5 boyasında 0.20 µM/min renk giderimi saptanmıştır. Ortama bir aracı eklenmesi durumunda renk giderim oranında herhangi bir değişim gözlenmemiştir (Champagne ve Ramsay, 2005).

Murugesan vd. (2007) *Ganoderma lucidum* KMK2'den elde ettikleri kararlı saf lakkazın boyar madde renk giderim yeteneğini araştırmıştır. Bu amaçla, buğday kepeği içeren besiyerinde katı faz fermentasyonu ile lakkaz üretilmiştir. Elde edilen saf enzim RBBR'nin aracısız ve RB-5'i de aracılı olarak renk giderimini gerçekleştirmiştir. Enzim RB-5 boyasının rengini iki saatte %77 oranında giderirken, RBBR boyasının rengini 20 saatte %90 oranında gidermiştir. Jel elektroforezi çalışmaları renk gideriminden lakkazın sorumlu olduğunu ortaya koymuştur. Lakkazın moleküler ağırlığı 43 kDa olarak belirlenmiştir. En yüksek lakkaz aktivitesi ise 7. günde 25 U olarak kaydedilmiştir.

Revenkar ve Lele (2006b) ağaç kabuğundan izole ettikleri ve *WR-1* olarak adlandırdıkları beyaz çürükçül fungusun lakkaz üretim yeteneğini incelemiş ve glikoz içeren stok temel ortamda 7. günde 124 U/mL lakkaz aktivitesine ulaşmıştır. Nişasta içeren besiyerinde 145 U/mL lakkaz aktivitesi elde edilmiştir. Azot kaynakları arasında ise en yüksek lakkaz aktivitesi 8. günde malt özütü içeren ortamda 130 U/mL olarak saptanmıştır. Karbon ve azot kaynağı optimize edilmiş

besiyerinde yaklaşık 300 U/mL aktivite belirlenirken, ortama 1 mM Cu eklendiğinde lakkaz aktivitesinin 410 U/mL'ye ulaştığı rapor edilmiştir. Kullanılan aromatik indükleyicilerin tümü Cp-anisidin, gallik asit, fumarik asit, kateşol, guaikol, HBT ve 2,5-ksilidin lakkaz üretimini indüklemiştir ve 2,5-ksilidin'in en etkili indükleyici olduğu bildirilmiştir. 0.8 mM 2,5-ksilidin'in 692 U/mL lakkaz aktivitesine ulaşmasını sağladığı rapor edilmiştir ve bu aromatik indükleyicinin bakırla birlikte eklenmesinin herhangi bir sinerjistik etki yapmadığı bildirilmiştir.

Hailei vd. (2013) çalışmalarında *Ganoderma lucidum*'un lakkaz üretimini derin kültür, biyomembran yüzey sıvı kültür ve biyomembran yüzey sıvı birlikte kültür yöntemiyle test etmiş ve birlikte kültür yöntemiyle lakkaz aktivitesi 23000 U/L'ye ulaşmıştır. 100 litrelik biyoreaktörde 8. günde 38000 U/L lakkaz aktivitesi elde edilebileceği de rapor edilmiştir.

Freixo vd. (2008) *Coriolus versicolor*'un lakkaz üretimi üzerine karbon kaynağı olarak patates posasının etkisini test etmiş ve en yüksek lakkaz aktivitesini 3. günde 362 U/L olarak belirlemiştir. En iyi lakkaz aktivite değeri pH 3-4 aralığında saptanırken, en uygun sıcaklığın 80 °C olduğu belirlenmiştir.

Manavalan vd. (2013) *G. lucidum*'un lakkaz üretimi üzerine çeşitli indükleyicilerin etkisini test etmiş ve gallik asiti iyi bir indükleyici olarak rapor etmiştir. Araştırmacılar, sinerjistik etkinin de önemli olduğunu bildirmiştir. Gallik asit, etanol ve bakır içeren ortamda başlangıça oranla aktivitenin 400 kat arttığı rapor edilmiştir. Elde edilen lakkaz enziminin boyar madde renk giderim yeteneğinin olduğu da vurgulanmıştır.

Murugesan vd. (2009) *G. lucidum* lakkaz enziminin aktivitesinin düşük konsantrasyonda (1 mM) Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} ve Zn^{2+} metal iyonu içeren ortamlarda arttığını bildirmiştir. Fe^{2+} 'nin lakkaz aktivitesi üzerine inhibe edici etkisi gözlenmiştir. Lakkazın bu metal iyonlarının karışımını tolere edebildiği tespit edilmiştir. Remazol Siyah 5 (RB5) ve Remazol Brilant Mavi 5 (RBBR5)'in renk giderimine metallerin etkisi de test edilmiştir. Fe^{2+} 'nin renk gideriminde herhangi bir etkisinin bulunmadığını fakat, Cu^{2+} ve Cr^{6+} metallerinin her iki boyanın renk giderimini de arttırdığı rapor edilmiştir. Ayrıca lakkazın reaktif boyalarla kontamine olmuş atıksu ile muamelesinde, etkili bir boya giderimi için aracıya ihtiyaç duyduğu gözlenmiştir. Yapılan çalışmalarda doğal bir redoks aracı olan şiringaldazinin, sentetik bir mediatör olan 1-hydroxybenzotriazole (HBT) den etkili bir aracı olduğu

kaydedilmiştir. Karışık metal iyonlarının atık su ile muamelesi sonucu önemli ölçüde renk giderimi görülmesine rağmen şiringaldazin bulunduğu atıksu ortamında daha etkili bir boya giderimi görüldü.

Jadhav vd. (2008) *Galactomyces geotrichum* MTCC 1360 fungusunun boya madde renk giderim yeteneklerini araştırmıştır. Toksik bir azo boya olan Metil Kırmızı fungus miselleriyle muamele edilmiştir. Çalkalamalı koşullarda, 30 °C’ de, 1 saat muamele sonucu %100 renk giderimine ulaşılmıştır. Ortama 1 g/L melas eklendiğinde %100 renk gideriminin yalnızca 10 dakika içinde gerçekleştiği rapor edilmiştir. pH, misel konsantrasyonu, sıcaklık, glikoz konsantrasyonu ve melas konsantrasyonu gibi çeşitli parametreler çalışmıştır. Metil Kırmızı boyasının pH 3-12 arasında ve 5-50 °C sıcaklık arasında renk gideriminin gerçekleştiği gözlenmiştir.

Boran ve Yeşilada (2011) katı substrat çalışmalarında buğday kepeğinin kullanıldığı besiyerlerini peyniraltı suyu, melas, vinas ve zeytinyağı atık suyu ile nemlendirmiştir. *Funalia trogii* ve *Trametes versicolor* ‘un lakkaz üretim yetenekleri izlenmiştir. Katı substrat kültürde vinas ve zeytinyağı atık suyunda yüksek lakkaz seviyesi elde edilmiştir. Lakkaz indükleyicisi olarak bakır ve ksilidin kullanılmış ve bakırın ksilidinden daha fazla indükleyici etki gösterdiği rapor edilmiştir. Maksimum lakkaz aktivitesi *F. trogii*’ den 5 mM CuSO₄.5H₂O, %25 oranında vinas ve buğday kepeği bulunan ortamda 14.18 U/mL olarak saptanmıştır. Azo boyaların renk gideriminin çalışıldığı aşamada ise 0,063 U/mL aktiviteye sahip *F. trogii* için dakikada renk giderimi % 66 iken, *T. versicolor* için bu değer % 14 olarak rapor edilmiştir. Bu çalışma ile endüstriyel atık suların katı substrat fermentasyonunda kullanılabileceği ve yüksek enzim aktivitesine ulaşılabilceği kanıtlanmıştır.

Khelifi vd. (2010) *Trametes trogii*’den elde ettikleri lakkaz enziminin aracılı ve aracısız tekstil atık suyu renk giderimi ve detoksifikasyon aktivitesini araştırmıştır. Lakkaz, aracı eklemekten renk gideriminde etkili olmamış ve 9 U/L’lik enzim aktivitesi ile atık sularda %10’dan daha az renk giderimini gerçekleştirmiştir. Kullanılan araçlar arasında en etkili olan 1-hidroksibenzatnazol (HBT) olmuştur. Fizyokimyasal faktörlerin lakkaz aktivitesini etkilediği saptanmıştır. Lakkazın asedosingon varlığında atıksuyun toksikliğini azalttığı bildirilmiştir.

Fonseca vd. (2010) beyaz çürükçül funguslar ile yaptıkları çalışmada bakırın lakkaz aktivitesi üzerine etkisini araştırmışlardır. Besiyeri olarak malt özütü ve mısır şurubu kullanılmıştır. Statik koşullarda gerçekleştirilen çalışmada ortama düşük

konsantrasyonlarda (0.5 mM) bakır eklenmesi sonucu lakkaz aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir. *Ganoderma applanatum*, *Peniophora sp.*, *Pycnoporus sanguineus* ve *Coriolus versicolor* funguslarından elde edilen lakkazın aktiviteleri kontrole oranla sırasıyla 42, 51, 25, 4 kat yüksek saptanmıştır. Her dört fungus türü için de bakırın lakkaz aktivitesi üzerine olumlu etkisi ispat edilmiştir.

Songulashvili vd. (2007) yiyecek endüstrisi atıklarının lakkaz aktivitesi üzerine etkisini araştırmıştır. *Ganoderma lucidum* 447 ile yapılan çalışmada karbon kaynağı olarak glukoz yerine mısır kepeği, buğday kepeği, soya kepeği, tavuk tüyü, kivi, muz kabuğu gibi atık maddeler kullanılmıştır. Çalışma batık kültür fermentasyonu ile çalkalamalı koşullarda gerçekleştirilmiştir. Maksimum lakkaz aktivitesi buğday kepeği ve soya kepeğinde gözlenmiş ve sırasıyla 93000 U/L ve 97000 U/L olarak kaydedilmiştir.

Ting vd. (2011) dört *G. lucidum* suşunun poliaromatik hidrokarbonların (PAH) yıkım yeteneği test etmiş ve tümünde penantren ve piren yıkım yeteneğini rapor etmiştir. Yıkım yeteneğinin çeşitli faktörlerden etkilendiği bildirilmiştir.

Sadhasivam vd.(2008) *Trichoderma harzianum* WL1 derin kültürde çalkalamalı koşullarda üretilmiş ve lakkaz aktivitesi üretim yeteneğine bakılmıştır. En yüksek lakkaz aktivitesi bakır içeren besiyerinde 4 günlük inkübasyon sonucu 4.36 U/mL olarak kaydedilmiştir. Optimum pH ve sıcaklık sırası ile 4.5 ve 35°C olarak belirlenmiştir. Üretilen lakkaz enziminin sıcaklık stabilitesi de araştırılmıştır. 35 °C' de 24 saat stabil kalmış ve 65 °C'de 60 dakika bekletildiğinde aktivitesinin yarısını koruduğu rapor edilmiştir.

Zhou vd. (2010) *Odontotermes formosus*'dan elde edip saflaştırdıkları lakkazı amonyum sülfatda çöktürmüştür. Elde edilen sonuçlara göre lakkaz aktivitesi 211.11 U/mg, lakkazın moleküler ağırlığı ise 65 kDa olarak belirlenmiştir. Optimizasyon çalışmaları sonucu bu enzim için en uygun pH 4, sıcaklık ise 10 °C olarak belirlenmiştir. Lakkazın stabil kaldığı sıcaklık aralığı 10-30 °C'dir. 30°C'nin üzerinde enzimin kararlılığını yitirdiği kaydedildi. Ayrıca %70 oranında etanol bulunan ortamda lakkaz aktivitesi %60 oranında kaybolmuştur. Metal iyonlarından Mg^{+2} , Ba^{+2} ve Fe^{+2} 'nin ortamda bulunması lakkaz aktivitesini negatif yönde etkilemiş ve sırasıyla %17.2, %5.3 ve %9.4 inhibisyon gözlenmiştir. Özellikle, ortama yüksek konsantrasyonlarda Fe^{+2} iyonunun eklenmesiyle lakkaz aktivitesinde %89 oranında inhibisyon gözlenmiştir.

Manavalan vd. (2012) bu çalışmada kompost hazırlanmış ve substrat olarak şeker kamışı küspesi kullanılmıştır. Hazırlanan komposta *Ganoderma lucidum* miselleri ekilmiş ve 50 gün boyunca oda sıcaklığında ve karanlık ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Her beş günde bir gelişmekte olan *G. lucidum* meyvelerinden hasat edilip toz haline getirilmiştir. Elde edilen bu tozdan enzim aktiviteleri kaydedilmiştir. Yapılan çalışma sonucu en yüksek enzim aktivitesi 40. günde 90 U/g olarak rapor edilmiştir.

Litthauer vd. (2007) çalkalamalı koşullarda *Pycnoporous sanguineus*'la lakkaz üretimi yapmayı amaçlamıştır. Üretim için besiyeri olarak seyreltilmiş melas (% 4) tercih edilmiştir. Üretilen lakkaz, amonyum sülfatta çöktürülmüştür. Lakkaz aktivitesi 32.9 U/mg olarak saptanırken, moleküler ağırlığı 58 kDa olarak belirlenmiştir. Konsantre edilmiş lakkaz için optimum pH 3-5 aralığında ve optimum sıcaklık 55 °C olarak belirlenmiştir. Sıcaklığa karşı kararlılığı yüksek olan bu enzim, 75 °C'de 170 dakika bekletildiğinde hala aktivitesinin yarısını koruduğu kaydedilmiştir.

Ashrafi vd (2013) saf lakkaz ile 13 farklı azo ve antron tabanlı boyanın renk giderimini HBT varlığında araştırmıştır. HBT eklenmesi Asit Sarı 36, Dispers Kırmızı 177, Direkt Mavi 71, Reaktif Siyah 5 ve Reaktif Turuncu 16 renk giderimi aktivitesini artırırken bazı boyar maddeler üzerinde artırıcı bir etki göstermemiştir. Bununla birlikte lakkazla muamele edilmiş boya çözeltisinin toksitesini de azalmıştır.

Chakraborty vd. (2013) *Alternaria alternata* CMERI F6 ile 25 °C, pH 5, 150 rpm ve 48 saatte Kongo Kırmızısının (600 mg/L) rengini %100 civarında gidermiştir. Araştırmacılar Kongo Kırmızısının renk gideriminde bu fungusun kullanılabileceğini vurgulamıştır.

Yeşilada vd. (2003) ve Yeşilada vd. (2010) fungal peletlerin tekrarlı kesikli süreçte boyar madde renk gideriminde kullanılabileceğini ve bu süreçte etkili renk giderimine ulaşabileceğini rapor etmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Fungus

Çalışmada Basidiomycetes sınıfına ait beyaz çürükçül funguslardan *Ganoderma lucidum* kullanıldı. Bu fungus doğadan izole edilmiş olup (Dr. Hakan Allı), İnönü Üniversitesi Biyoteknoloji Laboratuvarında saf kültür olarak muhafaza edilmektedir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Doğadan fotoğraflanan *Ganoderma lucidum*

3.2. Çalışmada Kullanılan Fungusun Katı Besiyerinde Üretimi ve Saklanması

Çalışmada kullanılan fungusun devamlılığını sağlamak için, fungus her 28-30 günde bir taze Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) plaklarında 30 °C’de statik inkübatörde 8 gün inkübe edildi ve daha sonra +4 °C’de buzdolabında muhafaza edildi.

3.3. Çalışmada Kullanılan Fungal Peletlerin Üretilmesi

Yatık agarda üretilen fungus kültürlerine distile su eklenerek öze yardımıyla kazındıktan sonra 100/250 mL Sabouraud Dekstroz Broth (SDB) sıvı besiyerlerine 10’ar mililitre transfer edildi. Kültürler 30 °C ve 150 rpm’de 8 gün üretildikten sonra kültürler homojenizatörde düşük devirde homojenize edildi. Homojenize fungus kültürlerinden 5’er mL 600 SDB/1000 mL erlen ortamlarına ekilerek 30 °C ve 150

rpm’de 8 gün inkübe edildi. Elde edilen peletler çalışmalarda amaca yönelik olarak kullanıldı (Şekil 3.2).



Şekil.3.2. *G. lucidum* peletlerinin etüvde üretim aşaması

3.4. Fungusda Lakkaz Varlığının Agar Plaklarında Gösterilmesi

ABTS içeren SDA plaklarına fungus ekildi ve 30 °C’de inkübe edildi. Lakkaz enziminin ABTS oksidasyonuna bağlı olarak oluşan renk değişimi lakkaz enziminin varlığı olarak değerlendirildi.

3.5. Çalışmada Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması

Çalışmada stok temel ortam, Sabouraud Dekstroz Broth ve melas besiyeri lakkaz üretim amacıyla besiyeri olarak kullanıldı. Bu besiyerlerinden SDB besiyeri hazır olarak alındı ve üzerindeki talimatlara bağlı olarak hazırlandı. Diğer iki besiyerinin içeriği ise tarafımızca hazırlandı.

Stok temel ortam (g/L): KH_2PO_4 0.2, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.035, Glikoz 2 g ve malt özütü 1g olacak şekilde hazırlandı ve otoklavda steril edildikten sonra kullanıldı.

Şeker fabrikası yan ürünü olan melas, Malatya Şeker Fabrikası’ndan temin edildi. Çalışma planına bağlı olarak istenilen konsantrasyonlarda hazırlanan melas besiyerleri otoklavda steril edildikten sonra kullanıldı.

3.6. Lakkaz Üretimi İçin Kullanılan Üretim Yöntemleri

Çalışmada kesikli ve tekrarlı kesikli üretim yöntemleri kullanıldı. Kesikli üretim yönteminde, 30 mL hazırlanan besiyerlerine homojenize edilmiş fungustan 2 mL ekim yapıldı. Hazırlanan kültür ortamı, 30 °C’de statik koşullarda inkübe edildi. Her 24 saatte bir besiyerinden 500 µl örnek alınıp lakkaz aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçüldü. Lakkaz üretimi için daha verimli olan tekrarlı kesikli yöntemde ise Şekil 3.2.’daki gibi üretilen peletler steril koşullarda süzülüp 250 mL’lik erlenlere 30 g transfer edildi. Üzerine 50 mL besiyeri eklendi. Hazırlanan erlenler, 30 °C ve 150 rpm’de inkübe edildi. Her 24 saatte bir steril koşullarda erlenlerdeki sıvı süzülüp yerine taze besiyeri eklendi. 24 saatte bir alınan süzüntülerden lakkaz aktivitesi spektrofotometre ile ölçüldü.

3.7. Lakkaz Aktivitesini İndüklemek İçin İndükleyici Maddelerin Kullanılması

İstenilen konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanan melas besiyerlerine lakkaz aktivitesini indüklemek amacıyla ayrı ayrı olmak koşuluyla 0, 0.5, 2, 3, 4, 5 ve 6 mM CuSO₄, 0.05 ve 0.1 mM ABTS ayrıca 0.01 ve 0.05 mM 2,5-ksilidin eklendi. Çalışmada ayrıca indükleyicilerin eş zamanlı kullanılmasının lakkaz üretimi üzerine sinerjistik etkisinin izlenmesi amacıyla ABTS+bakır ve 2,5-ksilidin+bakır kullanıldı.

3.8. Elektroforez Çalışması

Kültür sıvısında lakkaz varlığını göstermek için doğal jel elektroforezi çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla kültür sıvısı doğal jele yüklenmiş ve 40 mA’de yürütülmüştür. Yürütme işlemi sonrasında, jel ABTS içeren tampon (pH 4.8) içerisinde inkübe edilmiş ve ABTS oksidasyonuna bağlı olarak gerçekleşen renk değişikliğine bağlı olarak lakkaz varlığı belirlenmiştir (Birhanlı ve Yeşilada 2010).

3.9. Analiz

Lakkaz aktivitesi 420 nm’de enzimin ABTS oksidasyonuna bağlı olarak 1 dakikadaki oluşan absorbanans değişimi olarak izlendi ve 1 µmol substratın 1 dakikada oksidasyonunu katalizleyen enzim miktarı 1 Ünite U/mL olarak ifade edildi. Enzim aktiviteleri U/mL olarak tanımlandı (Birhanlı ve Yeşilada, 2010).

Fungusun üremesi gravimetrik olarak ölçüldü. Bunun için daha önceden hazırlanmış, 50 °C’de 24 saat bekletildikten sonra 2 saat desikatörde muhafaza edilip

tarası alınmış filtre kağıtları kullanıldı. Funguslar bu filtre kağıtlarından süzöldükten sonra postör fırınında 50 °C’de 24 saat bekletildikten sonra 2 saat desikatörde muhafaza edildi. Daha sonra, hassas terazide tartılarak biyokötle miktarı g/30 mL olarak ifade edildi.

3.10. *Ganoderma lucidum*’un Renk Giderim Yeteneğinin Agar Plaklarında Gösterilmesi

Otoklavda steril edilen SDA ortamına boyalar toz halinde eklendi. Boyalı agar plakları hazırlandıktan sonra fungus ekimi yapıldı. 15 gün 30 °C’de inkübe edilip renk giderimi makroskopik olarak incelendi.

3.11. *Ganoderma lucidum* Renk Giderim Yeteneğinin Sıvı Ortamda Gösterilmesi

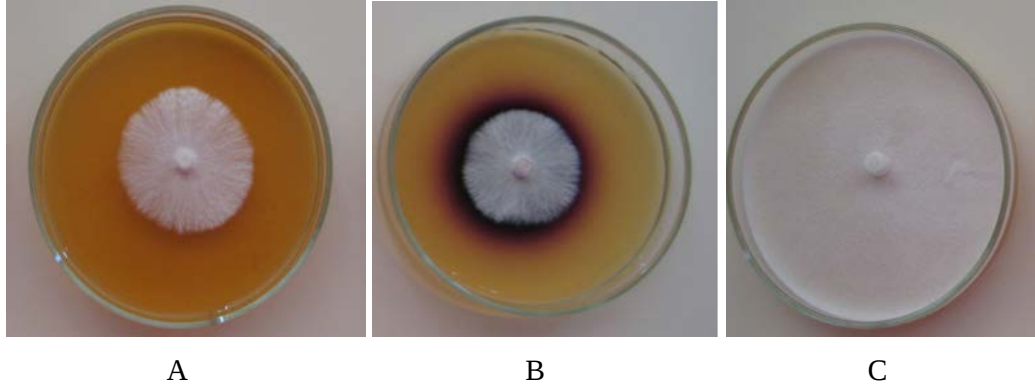
Hazırlanıp otoklavda steril edilen STO besiyerlerine Remazol Brilant Mavi R, Reaktif Siyah 5 ve Reaktif Mavi 171 boyaları toz halinde eklendi. Tekrarlı kesikli yöntemin kullanıldığı bu çalışmada *G.lucidum*’un renk giderim yeteneği spektrofotometrik olarak kaydedildi.

4. BULGULAR

4.1. *Ganoderma lucidum*'un Lakkaz Üretimi

4.1.1. *Ganoderma lucidum*'un Agar Ortamında Lakkaz Üretim Yeteneği

Çalışmada beyaz çürükçül bir fungus olan *Ganoderma lucidum* kullanılmıştır. Bu fungus doğadan izole edilip Dr. Hakan Allı tarafından tanımlanmış ve sonrasında da, Dr. Ozfer Yesilada tarafından saf kültür olarak izole edilmiştir. Çalışmada öncelikle fungusun lakkaz üretim yeteneği ABTS içeren ve içermeyen SDA ortamında izlenmiştir. Bu amaçla *G. lucidum*, ABTS içeren ve içermeyen SDA ortamlarında üretilmiş ve ayrıca lakkaz üretmediği bilinen *Phanerochaete chrysosporium*'da ABTS içeren SDA ortamında inkübe edilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. ABTS içeren ve içermeyen SDA ortamlarında üretilen *G. lucidum*'da lakkaz varlığı **(A)** ABTS içermeyen SDA ortamında üretilmiş *G. lucidum* , **(B)** ABTS içeren SDA ortamında üretilmiş *G. lucidum* **(C)** ABTS içeren SDA ortamında üretilmiş *P. chrysosporium*

Lakkaz enziminin ABTS oksidasyonuna bağlı olarak renkli bir ürün (ABTS+) oluşmaktadır. Şekil 4.1B'den görülebileceği gibi *G. lucidum* ABTS içeren ortamda 30 °C'de statik olarak 4 gün üretimi sürecinde ABTS'yi oksitlemiş ve bu oksidasyona bağlı renk değişimi oluşmuştur. Diğer yandan, *P. chrysosporium* ABTS'yi oksitlemediğinden herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Bu ön çalışma bize, lakkaz üretim yeteneği ve ayrıca boyar madde renk giderim aktivitesini araştıracağımız *G. lucidum*'un lakkaz üretebildiğini göstermiştir.

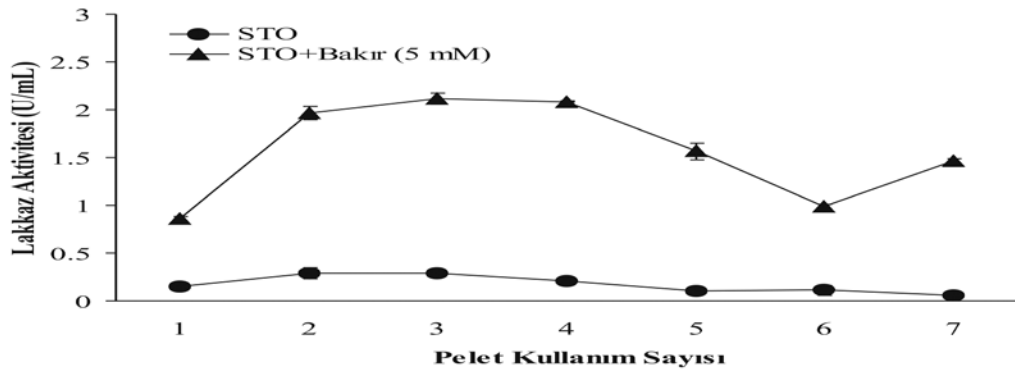
Bu aşamadan sonra fungusun lakkaz üretim yeteneği çeşitli ortamlar ve farklı kültür koşullarında araştırılmıştır.

4.1.2. *G. lucidum*'un Tekrarlı Kesikli Koşullarda Farklı Besiyerlerinde Lakkaz Üretim Yeteneği

Ön çalışmalarla lakkaz üretim yeteneği agar ortamında gösterilen fungusun, lakkaz aktivitesi tekrarlı kesikli koşullarda da araştırılmıştır. Bu amaçla öncelikli olarak; Stok temel ortam (STO), Sabouraud dekstrozo broth (SDB) ve şeker fabrikası yan ürünü melasın besiyeri olarak kullanılabilirliği test edilmiştir.

4.1.2.1. *G. lucidum*'un STO besiyerinde lakkaz üretimi

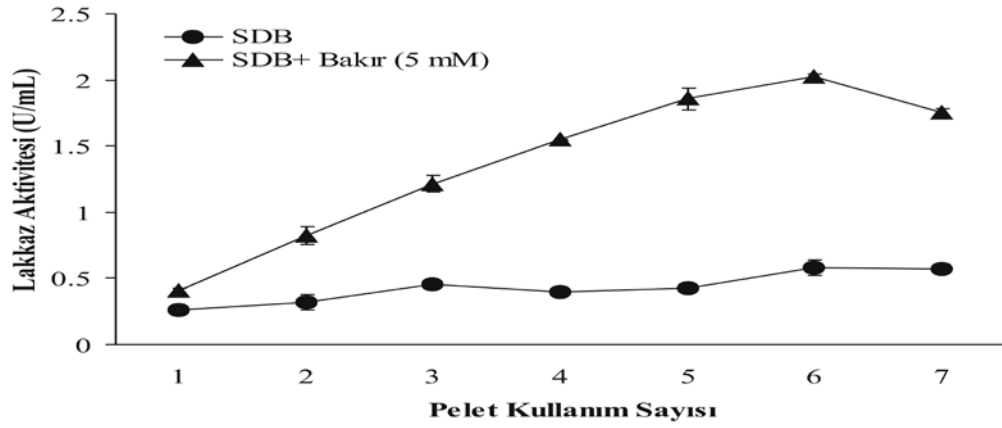
Çalışmanın bu kısmında *G. lucidum*'un lakkaz üretimi 5 mM bakır içeren ve bakır içermeyen STO besiyerinde 30 °C ve 150 rpm'de 7 gün sürecinde araştırılmıştır. Bakır içermeyen ortamda en yüksek lakkaz aktivitesi 3. günde 0.30 U/mL olarak kaydedilirken, bakır içeren ortamda 4. günde 2.09 U/mL olarak saptanmıştır (Şekil 4.2). Bu en yüksek aktivite açısından yaklaşık 7 katlık bir artış göstermektedir.



Şekil 4.2. Tekrarlı kesikli *G. lucidum* kültürüyle STO ve STO+bakır (5mM) ortamlarında lakkaz üretimi

4.1.2.2. *G. lucidum*'un SDB besiyerinde lakkaz üretimi

SDB, fungus üretiminde yaygın olarak kullanılan zengin bir besiyeridir. Bu nedenle çalışmamızda lakkaz üretimi için besiyeri olarak kullanılabilirliği açısından test edilmiştir. Çalışma bakır içeren ve içermeyen SDB besiyerlerinde 30 °C ve 150 rpm'de 7 gün süreyle yürütülmüştür. Çalışmada bakır içermeyen ortamda en yüksek aktivite 6. günde 0.58 U/mL olarak saptanırken, bakır içeren ortamda en yüksek aktivite 6. gün için 2.02 U/mL olarak bulunmuştur (Şekil 4.3). Bakır ilavesi yaklaşık 3.5 katlık bir enzim aktivitesi artışına neden olmuştur.



Şekil 4.3. Tekrarlı kesikli *G. lucidum* kültürüyle SDB ve SDB+bakır (5mM) ortamlarında lakkaz üretimi

4.1.2.3. *G. lucidum*'un melas besiyerinde lakkaz üretimi

Melas çeşitli uygulamalarda besiyeri olarak kullanılan zengin içerikli bir hammaddedir. Çalışmamızda da zengin içeriğinden dolayı lakkaz üretimi açısından besiyeri olarak kullanılabilirliği test edilmiştir. Çalışmada öncelikle en yüksek lakkaz üretimi açısından elde edilebilecek melas konsantrasyonu araştırılmıştır. Bu amaçla çalışmalar, farklı konsantrasyonlarda melas içerecek şekilde hazırlanmış besiyerlerinde yürütülmüştür (Çizelge 4.1). Fungus 15g/L melas içeren ortamda 1g/L ve 5 g/L melas içeren ortamlara göre daha yüksek düzeyde lakkaz üretmiş ve en yüksek lakkaz aktivitesi 15 g/L'lik melas ortamında 7. günde 0.55 U/mL olarak saptanmıştır. Bu nedenle çalışmanın bundan sonraki aşamaları 15g/L melas içeren besiyerinde sürdürülmüştür.

Çizelge 4.1. Farklı konsantrasyonlarda melas içeren besiyerlerinde elde edilen lakkaz aktivite değerleri (U/mL).

Pelet Kullanım Sayısı	Melas Miktarı (g/L)		
	1	5	15
1. Kullanım	0.48±0.16	0.50±0.15	0.48±0.16
2. Kullanım	0.37±0.09	0.41±0.05	0.35±0.01
3. Kullanım	0.20±0.02	0.27±0.02	0.38±0.02
4. Kullanım	0.11±0.02	0.10±0.06	0.16±0.01
5. Kullanım	0.11±0.01	0.10±0.00	0.37±0.04
6. Kullanım	0.04±0.01	0.10±0.01	0.51±0.03
7. Kullanım	0.02±0.00	0.05±0.00	0.55±0.08

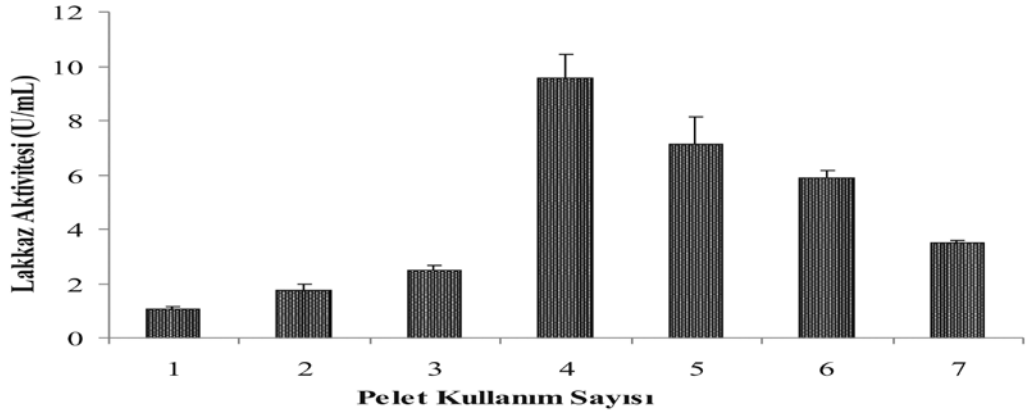
4.2. *G. lucidum*'un Melas Besiyerinde Tekrarlı Kesikli Süreçte Lakkaz Üretimine İndükleyicilerin Etkisi

4.2.1. *G. lucidum*'un Lakkaz Üretimine Bakırın Etkisi

Bakırın lakkaz üretimi üzerine pozitif etkisi bilinmektedir. Bu nedenle, yeni izole edilmiş bu fungusun lakkaz üretim verimi üzerine etkisi test edilmiştir. Bu amaçla, fungal peletler farklı konsantrasyonlarda bakır içerecek şekilde hazırlanmış 15g/L'lik besiyerlerinde tekrarlı kesikli süreçte 30 °C ve 150 rpm'de üretilmiş ve lakkaz aktivitesi saptanmıştır. Besiyerleri 0.5-6.0 mM bakır içerecek şekilde hazırlanmış ve çalışma 7 gün sürdürülmüştür. Çalışma sonucunda fungusun lakkaz üretiminin, kullanım sayısı ve ortamdaki bakır konsantrasyonuna bağlı olarak değiştiği saptanmıştır (Çizelge 4.2). Özellikle 2 mM üzerindeki konsantrasyonlarda bakır lakkaz üretimi üzerine çok etkili olmuştur. Şekil 4.4'de görülebileceği gibi, 5 mM bakır içeren ortamda en yüksek lakkaz aktivitesi 9.58 U/mL olarak saptanmıştır. Bakır içermeyen ortamda en yüksek aktivitenin 0.55 U/mL olduğu düşünüldüğünde bakır eklenmesinin yaklaşık 18 katlık bir artışa neden olduğu görülecektir. Yani uygun bakır konsantrasyonu ile bu ortamda yüksek lakkaz değerlerine ulaşılabilir. Çalışmanın bu kısmı, yeni izole edilen bu fungal suşun lakkaz üretimi açısından değerlendirme sürecinde bakırın etkili bir indükleyici olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Çizelge 4.2. Bakırın melas (15g/L) besiyerinde üretilen *G. lucidum*'un lakkaz üretimine etkisi.

Pelet Kullanım Sayısı	Bakır Konsantrasyonu (mM)						
	0	0.5	2	3	4	5	6
1. Kullanım	0.48±0.16	0.78±0.13	1.00±0.62	0.96±0.10	1.09±0.03	1.04±0.09	1.01±0.06
2. Kullanım	0.35±0.01	0.62±0.12	1.07±0.92	1.38±0.04	1.52±0.07	1.76±0.21	1.65±0.11
3. Kullanım	0.38±0.02	0.93±0.26	1.29±0.03	1.95±0.04	1.89±1.61	2.49±0.18	2.18±0.16
4. Kullanım	0.16±0.01	0.40±0.04	1.64±0.35	3.88±0.12	4.87±0.74	9.58±0.84	7.92±0.86
5. Kullanım	0.37±0.04	0.89±0.40	1.26±0.05	2.84±0.02	5.17±1.02	7.13±1.00	8.55±0.75
6. Kullanım	0.51±0.03	0.66±0.05	1.11±0.04	3.44±0.35	5.80±0.01	5.88±0.30	3.69±0.45
7. Kullanım	0.55±0.08	0.37±0.04	1.12±0.02	3.79±0.11	2.94±0.26	3.51±0.09	1.50±0.30



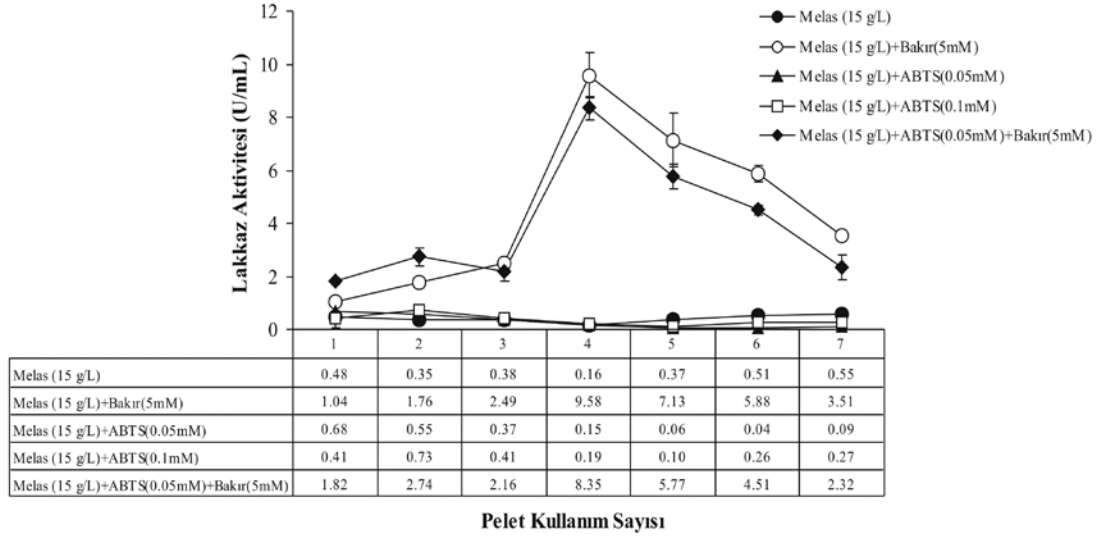
Şekil. 4.4. Optimum (5mM) bakır konsatrasyonunda *G. lucidum* kültüründen tekrarlı kesikli yöntemle lakkaz üretimi

Lakkaz üretimi için en uygun bakır konsantrasyonu 5mM olarak saptandığından, bundan sonraki bakır kullanılan çalışmalarda 5mM bakır kullanılmıştır.

4.2.2. *G. lucidum*'un Lakkaz Üretimine ABTS ve ABTS+Bakırın Birlikte Etkisi

ABTS'de lakkaz üretiminde indükleyici olarak test edilen bir bileşiktir. Bu nedenle çalışmanın bu kısmında ABTS'nin etkisi test edilmiştir. Çalışmada ayrıca, bir önceki kısımda iyi bir indükleyici olduğu saptanan bakırın ABTS ile birlikte etkisi de araştırılmıştır.

0.05mM ve 0.1mM ABTS içeren ortamlarda en yüksek lakkaz aktiviteleri sırasıyla 0.55 U/mL ve 0.73 U/mL olarak 2. günde saptanmıştır. ABTS (0.05mM)+bakır (5mM) bulunan ortamda ise en yüksek lakkaz aktivitesi 4. günde 8.35 U/mL olarak kaydedilmiştir (Şekil 4.5). İndükleyici olarak yalnızca bakır bulunan ortamda en yüksek lakkaz aktivitesi 4. günde 9.58 U/mL olarak elde edildiğinden burada ABTS'nin iyi bir indükleyici görevi görmediği vurgulanabilir.

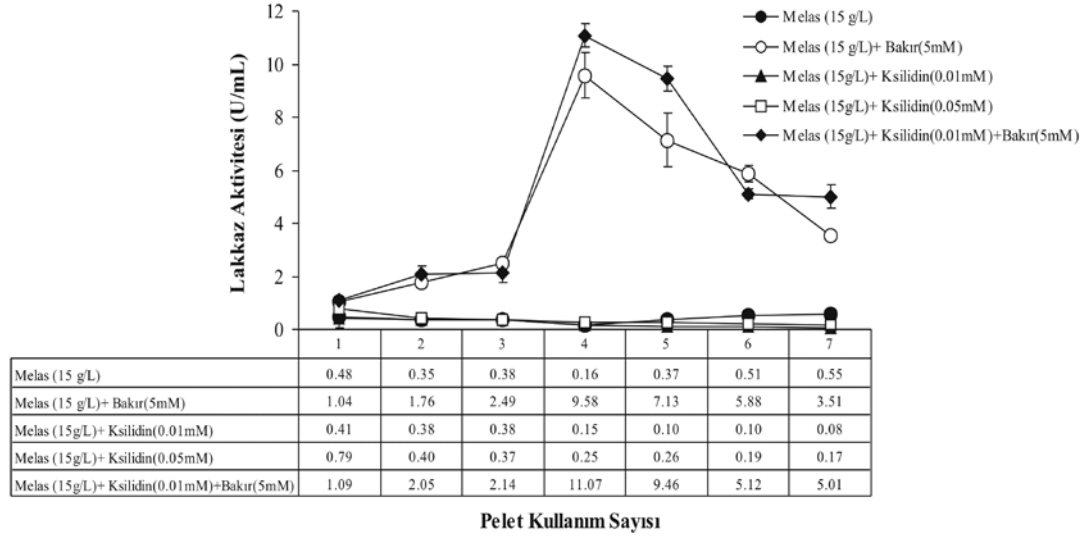


Şekil 4.5. Melas besiyerinde üretilen *G. lucidum*'un lakkaz üretimine ABTS ve ABTS+bakırın birlikte etkisi

4.2.3. *G. lucidum*'un Lakkaz Üretimine Ksilidin ve Ksilidin+Bakırın Birlikte Etkisi

Ksilidin pek çok çalışmada lakkaz ifadesini indükleyici olarak kullanılmıştır. Bu nedenle, bu fungusun lakkaz üretimini indüklemek amacıyla bizim çalışmamızın bu kısımda kullanılmıştır.

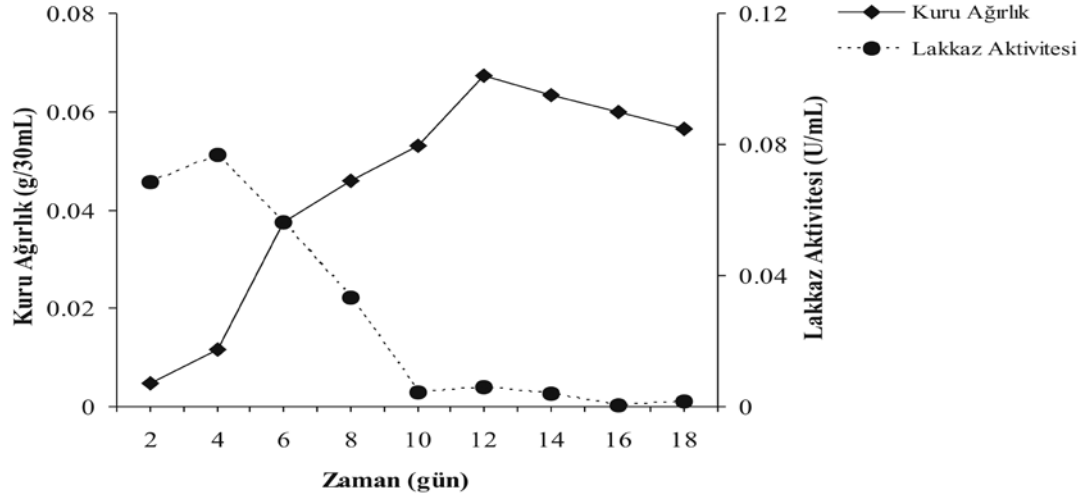
0.01mM ve 0.05mM ksilidin içeren ortamlarda en yüksek lakkaz aktiviteleri sırasıyla 0.15 U/mL ve 0.25 U/mL olarak 4. günde elde edilmiştir. Bu değerler indükleyici içermeyen ortamlarda elde edilen lakkaz aktivite değerlerinden daha düşük değerlerdir. Yani, yalnızca ksilidin içeren ortamlarda ksilidinin lakkaz üretimi üzerine herhangi bir pozitif etkisi gözlenmemiştir. Bununla birlikte, 0.01 mM ksilidin+5 mM bakır içeren ortamda en yüksek lakkaz aktivite değeri 4. günde 11.07 U/mL olarak saptanmıştır (Şekil 4.6). Bu değer indükleyici olarak yalnızca bakır (5mM) içeren ortamda elde edilen lakkaz aktivite değerinden daha yüksektir.



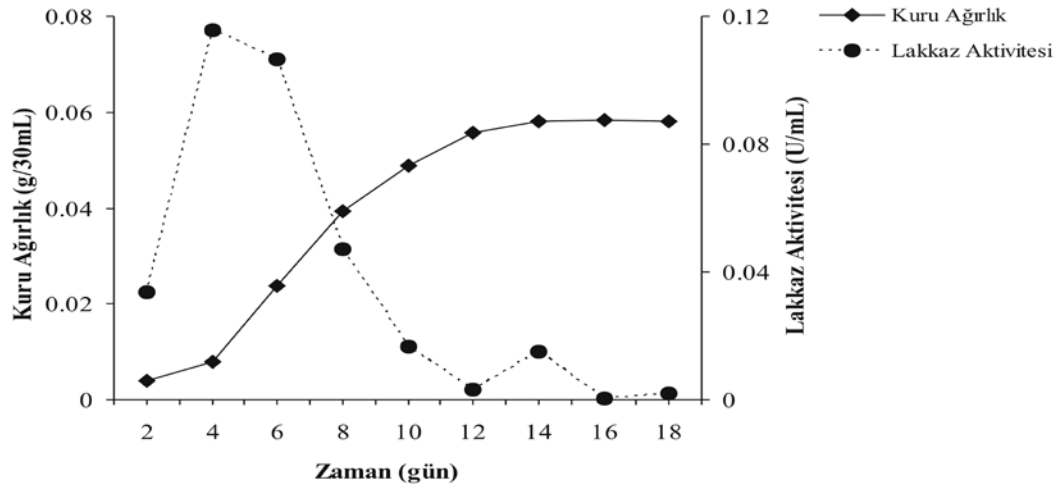
Şekil 4.6. Melas besiyerinde üretilen *G. lucidum*'un lakkaz üretimine ksilidin ve ksilidin+bakırın birlikte etkisi

4.3. Statik Olarak Üretilen *G. lucidum*'un Lakkaz Üretim Yeteneğinin Melas Ortamında Kesikli Koşulda Araştırılması

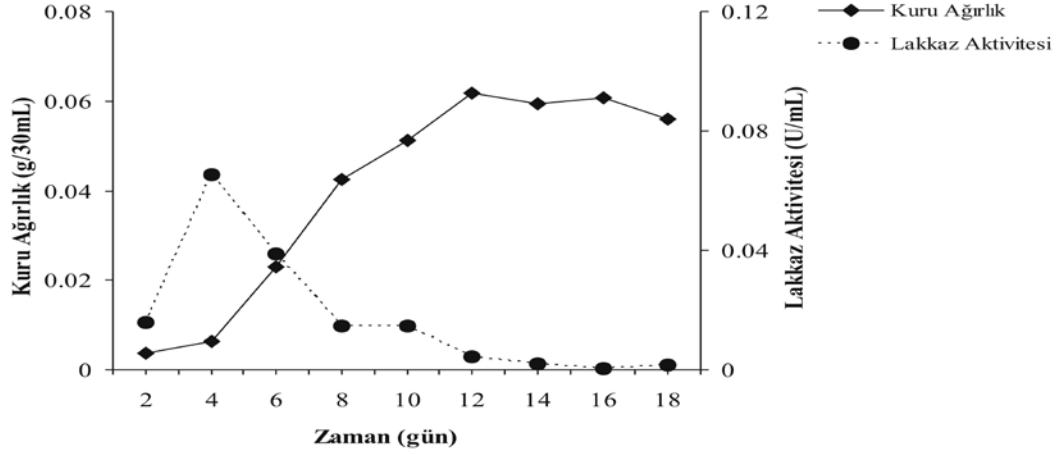
Çalışmanın bu kısmında melas ortamında bakırın statik koşullarda etkisi test edilmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda bakırın negatif etkisinden dolayı statik koşullarda kesikli yürütülen çalışmalarda 1 ve 2 mM bakır konsantrasyonları test edilmiştir. Bakır içermeyen melas ortamında statik olarak yürütülen çalışmada en yüksek lakkaz aktivitesi 2. günde 0.08 U/mL olarak saptanmıştır. Lakkaz üretimi primer fazda yüksek iken üretimin ilerleyen süreçlerinde (geç primer faz ve sekonder faz) hızla azalmıştır (Şekil 4.7). 1 mM bakır içeren melas ortamı lakkaz aktivitesini indüklerken (Şekil 4.8), 2 mM bakır konsantrasyonu lakkaz aktivitesini kısmen baskılamıştır (Şekil 4.9). Melas ortamında 1 mM bakır bulunduğu durumda en yüksek aktivite 0.12 U/mL civarında saptanmıştır. Bu değer tekrarlı kesikli yöntemle elde edilen lakkaz aktivitesinden çok düşüktür.



Şekil 4.7. Statik koşullarda üretilen *G. lucidum*'un 15 g/L melas besiyerinde günlere bağlı lakkaz aktivite (U/mL) ve üreme değişimi (g/30mL)



Şekil 4.8. Statik koşullarda üretilen *G. lucidum*'un 15 g/L melas+bakır (1 mM) içeren besiyerinde günlere bağlı lakkaz aktivite (U/mL) ve üreme değişimi (g/30mL)



Şekil 4.9. Statik koşullarda üretilen *G. lucidum*'un 15 g/L melas+bakır (2 mM) bakır içeren besiyerinde günlere bağlı lakkaz aktivite (U/mL) ve üreme değişimi (g/30mL)

Yürütülen çalışmalar tekrarlı kesikli süreçte uygun ortam ve uygun indükleyici kullanılarak bu suşla yüksek düzeyde lakkaz üretimi sağlanabileceğini göstermiştir.

4.4. *G. lucidum*'un Lakkaz Enziminin Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi Sonucu

Kültür sıvısındaki lakkaz enzimi varlığı doğal jel elektroforezi sonrası yapılan aktivite boyama çalışmasıyla da ortaya konmuştur. Çalışma sonucunda, jelde yalnızca tek bir aktivite bandı gözlenmiştir (Şekil 4.10). Bu sonuç kültür sıvısında spektrofotometrik olarak varlığı gösterilen lakkaz enziminin elektroforetik olarak da varlığının ortaya konmasını sağlamış ve tek bir izozimi desteklemiştir. Bu sonuç, Boran 2013'ün katı faz fermentasyonu ile elde ettiği sonucu desteklemektedir (Boran 2013).

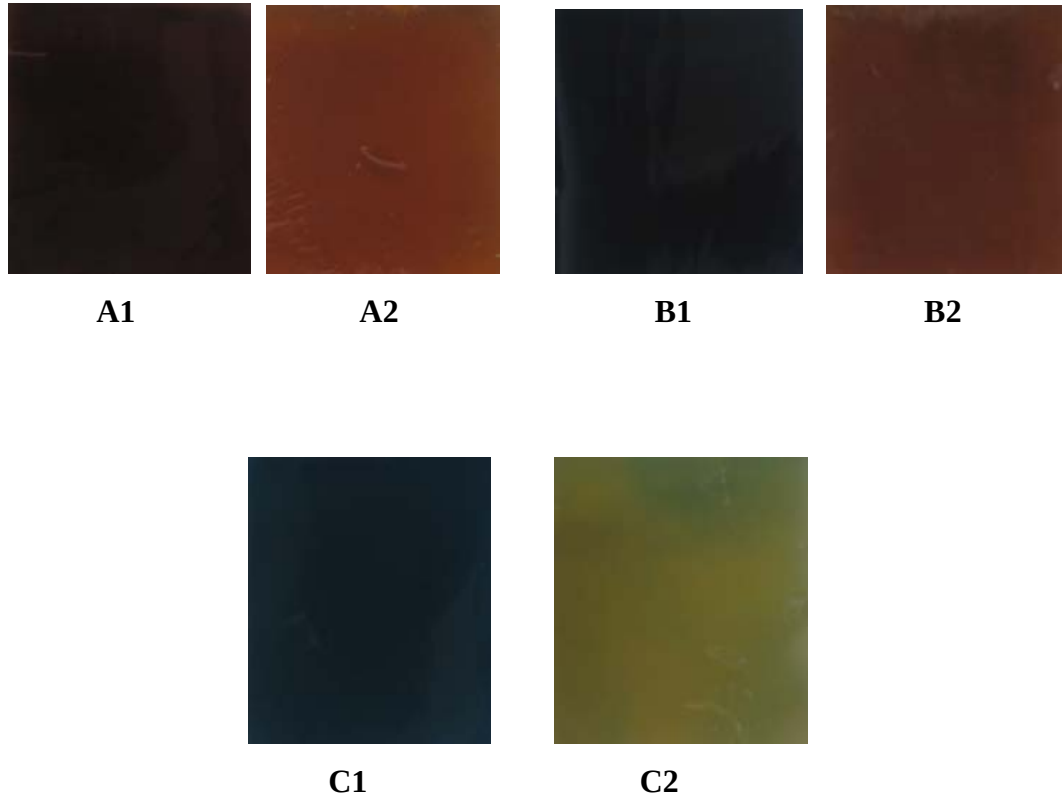


Şekil 4.10. *G. lucidum* kültür sıvısındaki lakkaz enziminin aktivite bandı

4.5. *G. lucidum*'un Boyar Madde Renk Giderim Yeteneğinin Araştırılması

4.5.1. *G.lucidum*'un Boyar Madde Renk Giderim Yeteneğinin Agar Ortamında Araştırılması

G. lucidum'un boyar madde renk giderim yeteneği boyar madde içeren SDA ortamlarında incelenmiştir. Bu amaçla, SDA besiyerleri 200mg/L boyar madde (Reaktif Siyah 5, Remazol Brilliant Mavi R, Reaktif Mavi 171) içerecek şekilde hazırlanmış ve plağın tam ortasına fungus ekildikten sonra 30 °C'de 15 gün inkübe edilmiştir. Çalışma sonuçları Şekil 4.11'de verilmiştir.



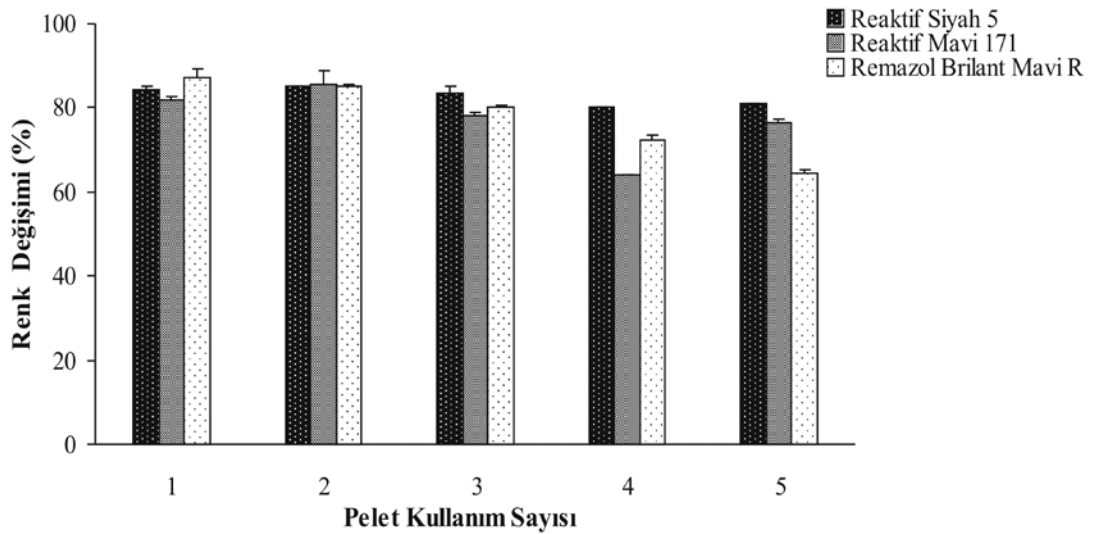
Şekil 4.11. *G. lucidum*'un boyar madde içeren SDA ortamında 15 gün inkübasyonu sonrası besiyeri renk değişimi. A1: Kontrol Reaktif Siyah 5, A2: Uygulama Reaktif Siyah 5; B1: Kontrol Remazol Brilliant Mavi R, B2: Uygulama Remazol Brilliant Mavi R; C1: Kontrol Reaktif Mavi 171, C2: Uygulama Reaktif Mavi 171

Şekil.4.11'den de görüldüğü gibi fungusla 15 gün muamele sonrasında boyar madde renk giderimine bağlı olarak besiyeri rengi açılmaktadır. Bu ön çalışma bize fungusun renk giderim aktivitesine sahip olduğunu göstermektedir. Fungusun boyar madde renk giderim aktivitesi sıvı besiyerinde de test edilmiştir. Bu amaçla fungal peletler hazırlanmış ve peletlerin renk giderim aktivitesi tekrarlı kesikli süreçte izlenmiştir.

4.5.2. Sıvı Besiyerinde Tekrarlı Kesikli Süreçte *G. lucidum*'un Boyar Madde Renk Giderim Aktivitesi

Katı ortamda yapılan ön çalışmalarda renk giderim aktivitesi izlenen *G.lucidum*'un bu aktivitesi sıvı ortamda da araştırılmıştır. Çalışma, SBM+ (5mM) bakır ortamında yürütülmüş ve besiyerleri 150 g/mL boyar madde içerecek şekilde hazırlanmıştır. Fungal peletler eklendikten sonra kültür tekrarlı kesikli süreçte 30 °C ve 150 rpm'de 5 gün tekrarlı olarak inkübe edilmiştir.

Fungus peletlerinin ilk kullanımda renk giderim aktivitesi her üç boya için de %80'nin üzerindedir (Şekil 4.12). Sonraki kullanımlarda da fungus peletlerinin renk giderim aktiviteleri yüksek kalmıştır. Beşinci kullanımda Reaktif Siyah 5, Remazol Brilliant Mavi R ve Reaktif Mavi 171 boyar maddelerinin rengi sırasıyla % 87.3 % 88.2 ve %87.4 azalmıştır. Sonuçlar, bu peletlerin hem yüksek renk giderim aktivitesine sahip olduğunu hem de tekrarlı kullanımda avantajlı olduklarını göstermektedir.



Şekil 4.12. *G. lucidum*'un tekrarlı kesikli süreçte boyar madde renk giderim yeteneği

5. TARTIŞMA

Lakkaz fenolik bileşikleri oksitleme yeteneğine sahip bir enzimdir. Normalde fenolik olmayan bileşiklere etkili olmadıkları halde bir aracı (mediatör) yardımıyla bu bileşikleri de oksitleyebilirler. Bu özelliklerinden dolayı endüstriyel anlamda büyük önem taşımaktadır. Yapılan literatür taramalarına göre, kağıt hamurundan lignin giderimi lakkazın öncelikli kullanım alanıdır. Gıda endüstrisinde içeceklerdeki fenolik bileşiklerin giderimi ile rengin berraklaştırılması, tekstil endüstrisinde tekstil fabrikası atık suyundan renk giderimi, kozmetik ve dermatolojik uygulamalarda kullanımı, poliaromatik hidrokarbonların yıkımı (PAHs), nanoteknolojik alanda biyosensör yapımı ve kimyasal üretiminde kullanılmaktadır.

Doğada birçok organizma lakkaz üretmektedir. Ancak, enzimin ekstraselüler olarak üretilmesi, yüksek konsantrasyondaki kirleticilere bile dirençli olması ve üretim için gerekli olan substratların oldukça ucuz olması beyaz çürükçül fungusların tercih edilmesini sağlamıştır (Yeşilada vd, 1995; Kapdan vd., 2000; Shah ve Nerud, 2002; Rojek vd., 2004). Beyaz çürükçül funguslar farklı miktarlarda lakkaz üretebilmektedir (Boran ve Yeşilada, 2011; Baldiran, 2006). Son zamanlarda doğadan yeni izole edilen suşlardan üretilen lakkaz, hem düşük maliyet gerektirdiğinden hem de çevre dostu olduğundan önemli hale gelmiştir (Yeşilada vd., 2014).

Lakkazın endüstride kullanım çeşitliliği enzim üretimi çalışmalarının artmasını sağlamıştır. Verim, iyi lakkaz üreticisi fungusların seçilmesi, besiyeri içeriğinin zengin olması, farklı üretim yöntemleri ya da lakkaz üretimini indükleyici maddelerin kullanılmasıyla arttırılmaktadır. Lakkaz üretimi için en önemli mikroorganizmalardan biri de Basidiomycetes sınıfına ait bir fungus olan *Ganoderma lucidum*'dur. *G. lucidum* yüzyıllardır tıbbi bir fungus olarak tanınmış ve tedavi amacıyla kullanılmıştır. Ancak son yıllarda, *G. lucidum*'dan lakkaz üretim çalışmaları yoğunluk kazanmıştır. *G. lucidum*'un lakkaz ürettiği bilinmektedir (Murugesan vd., 2007) ve bu tez çalışmasında yeni izole edilmiş bir suş kullanılarak, lakkaz üretimini indüklemeye yönelik çalışmalar yapılmıştır. Öncelikle doğadan izole edilmiş fungusun lakkaz üretim yeteneği ABTS içeren sabouraud dekstrozu katı ortamda kanıtlandı (Şekil 4.1).

Endüstriyel alanda büyük öneme sahip lakkazın üretimi yapılırken maliyetin düşürülmesi ve çevre dostu uygulamalarda kullanımına yönelik üretimin artırılması

önemlidir. Bu yüzden, üretim için daha çok doğal hammaddelerin besiyeri olarak kullanılması hedeflenmiştir. Bunlara örnek, bazı gıda endüstrisi atıkları, zeytinyağı fabrikası atık suyu (karasu), alkol fabrikası atık suyu (vinas), peynir altı suyu ve şeker fabrikası yan ürünü (melas) verilebilir (Apohan ve Yeşilada, 2011; Boran ve Yeşilada, 2011; Sitarz vd., 2013). Özellikle atık çevre kirliliği riski oluşturduklarından oldukça zararlıdır (Gonza'lez vd., 2008). Bu atık sular ya da yan ürünler, mikroorganizmaların üretimi için gerekli besin faktörlerini içerirler. Bu nedenle mikroorganizmaların üretimi için alternatif besiyeri olarak kullanılmaktadır (Boran ve Yeşilada, 2011). Melas, iyi bir karbon ve enerji kaynağıdır. Bu nedenle, hem endüstriyel işlemlerde besiyeri olarak kullanılmakta hem de çeşitli araştırmalarda karbon ve enerji kaynağı olarak değerlendirilmektedir (Birhanlı vd., 2013). Atık sular lakkaz üremi amacıyla çeşitli çalışmalarda kullanılmaktadır (Kahraman ve Yeşilada, 2001). Birhanlı vd. (2013) yaptıkları çalışmada lakkaz üretimi için melas besiyerinin kullanılabileceğini rapor etmiştir. *Funalia trogii* peletlerinden 0.39 U/mL lakkaz aktivitesi elde edilmiştir. Belirtilen nedenlerle çalışmada öncelikle lakkaz üretimi için sentetik ve doğal besiyerleri karşılaştırıldı. STO, SDB ve farklı konsantrasyonlarda melas besiyeri (5-15 g/L) kullanıldı. Elde edilen sonuçlara göre melaslı (15g/L) besiyerinde lakkaz üretiminin yüksek olduğu ve SDB'ye göre pelet kullanım süresinin uzadığı tespit edildi. En yüksek lakkaz aktivitesi 15g/L melas ortamında 7. günde elde edildi (Çizelge 4.1). Sonuçlar, melas besiyerinin bu suş için uygun karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Bu nedenle melas besiyeri daha sonraki lakkaz üretimi çalışmalarında kullanılmıştır.

Çeşitli indükleyiciler varlığında lakkaz üretiminin arttığı bilinmektedir (Claus, 2004). Bu bileşiklerin başında bakır gelir. Lakkaz, çoklu bakır oksidaz grubuna bağlı bir enzim olduğu için bazı metal iyonlarının, özellikle bakır eklenmesinin lakkaz aktivitesini indüklediği görülmüştür. Lakkaz enzimlerinin katalitik aktivitelerini gösterebilmeleri için aktif olan her bir lakkaz proteini için en az 4 bakır atomu gerekmektedir (Claus, 2004). Bu nedenle farklı çalışmalarda iyi bir lakkaz indükleyicisi olduğu bilinen bakır kullanılmış ve farklı konsantrasyonlardaki bakırın lakkaz üretimine etkisi izlenmiştir. Yine de, indükleyicilerin farklı funguslardan lakkaz üretimini farklı etkilediği ve bazılarında etkili olurken bazılarında sınırlı olduğu unutulmamalıdır.

Rosales vd., (2007) *Trametes hirsuta* ile yaptıkları çalışmada bakırın lakkaz üretimi üzerine etkisini araştırmıştır. Çalışma SBM besiyerinde, statik koşullarda ve 1- 5 mM bakır konsantrasyonlarında yürütülmüştür. 5. günde yaklaşık olarak 19000 U/L lakkaz aktivitesine ulaşılmıştır. Çalışmanın sonraki günlerinde lakkaz aktivitesi maksimum değere ulaşmış ve 20. günde 30000 U/L lakkaz aktivitesi kaydedilmiştir.

Birhanli ve Yeşilada, (2006) da *Funalia trogii* ve *Trametes versicolor*'un lakkaz üretimine bakırın pozitif etkisini bildirmiştir. *Funalia trogii* için çalkalamalı koşullarda 0.5 mM bakır içeren ortamda lakkaz aktivitesi kontrole oranla 60 kat artarak 4.61 U/mL'ye ulaşılırken, 1 mM Cu için 3.26 U/mL olara saptanmıştır. Yüksek konsantrasyonlarda (2 mM) bakır baskılama yapmış ve enzim aktivitesi kontrolden daha düşük çıkmıştır. *Trametes versicolor* için ise 1 mM bakır içeren çalkalamalı koşulda 2.96 U/mL lakkaz aktivitesi kaydedilirken, statik koşullarda 0.5 mM bakır içeren ortamda 2.34 U/mL lakkaz aktivitesi saptanmıştır. Murugesan vd., (2009) *G. lucidum*'da lakkaz aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisini araştırdığı bir çalışmada, 0.5, 1, 5 ve 10 mM Cu konsantrasyonlarıyla çalışmış ve bakır konsantrasyonlarına göre lakkaz aktivitesi sırasıyla; 105.5, 116.5, 136.1 ve 172.3 U/mL olarak belirlemiştir. Bu çalışmada yüksek konsantrasyonda bakır ortamında bile lakkaz aktivitesinin indüklendiği görülmüştür.

Manavalan vd., (2013)'de bir *Ganoderma lucidum* suşu ile çalışma yapmış ve lakkaz aktivitesini izlemiştir. Lakkaz aktivitesi 0.4 mM bakır konsantrasyonuna kadar artmış ve 0.4 mM bakır bulunan ortamda 1.5 U/mL olarak saptanmıştır. Daha yüksek konsantrasyonlarda ise lakkaz üretiminin baskılandığı gözlemlenmiştir.

Bizim yaptığımız çalışmada da 15g/L melas ortamında 0.5-10 mM bakır konsantrasyonları kullanıldı. Çalışma tekrarlı kesikli koşullarda yürütüldü ve peletler 7 defa kullanıldı. Bakır içermeyen ortamda lakkaz aktivitesi 0.55 U/mL iken 5 mM bakır bulunan ortamda 4. kullanımda 9.58 U/mL lakkaz aktivitesine ulaşıldı. Çalışma sonucunda en yüksek lakkaz aktivitesi kontrole oranla 17 kat artış gösterdi. 6 mM bakır kullanılan çalışmada ise lakkaz aktivitesinin baskılandığı gözlemlendi (Çizelge 4.2). Bakır konsantrasyonunun 10 mM olduğu çalışmada ise peletler parçalanıp bütünlüğünü yitirdiğinden dolayı çalışma sürdürülemedi.

2,5-ksilidin, ABTS, guaikol, gallik asit, ferulik asit, kateşol, p-anisidin gibi maddeler indükleyici olarak kullanılabilir (Galhaup vd., 2002; Revankar ve Lele, 2006b). Fenolik bileşiklerin kullanımıyla lakkaz üretiminin arttığı rapor

edilmiştir (Pazarlıoğlu vd., 2005). Sadhasivam vd., (2008) doğadan izole ettikleri *Trichoderma harzianum* WL ile yaptıkları çalışmada ABTS'nin lakkaz aktivitesi üzerinde olumlu etkisini bildirmiştir.

Hou vd., (2004) *Pleurotus ostreatus* ile yaptıkları çalışmada lakkaz üretimi üzerine ABTS ve ksilidinin etkisini araştırmış ve 28 °C' de, statik koşullarda yürüttükleri çalışmada indükleyici olarak 0.5-1 mM ABTS kullanmıştır. 18. günün sonunda lakkaz aktivitesi kontrole kıyasla yaklaşık 5 kat (410 U/mL) daha fazla bulunmuştur. 0.05 mM ksilidin eklenen ortamda ise lakkaz aktivitesinde yaklaşık 2.5 katlık bir artış gözlenmiştir. Ksilidinin *Ganoderma lucidum*'da lakkaz üretimi üzerine etkisinin bioreaktörle araştırıldığı başka bir çalışmada 1 mM ksilidin kullanılmış ve lakkaz aktivitesi 2.36 U/mL olarak saptanmıştır. Bu değer kontrole kıyasla yaklaşık 10 kat daha fazladır (Manavalan vd., 2013).

Jang vd., (2002) *Trametes* sp. ile derin kültürde yürüttükleri çalışmada 1 mM ksilidin bulunan besiyerinde lakkaz aktivitesini kontrole göre 8 kat indüklenmiş ve 12500 U/L olarak tespit edilmiştir. Bu değer 7. günde ise 14000 U/L'nin üzerine çıkmıştır. Revankar ve Lele (2006a) *Coriolus versicolor* ile yaptıkları çalışmada ksilidinin lakkaz üretimine pozitif etkisini bildirmiştir.

Lakkaz üretimini artırmaya yönelik olarak yapılan bu tez çalışmasında fenolik bileşiklerden ABTS ve ksilidin kullanıldı. Melas ortamına 0.05 ve 0.1 mM ABTS eklenerek tekrarlı kesikli süreçte yapılan çalışmada 7. günün sonunda ABTS bulunan kültürlerde belirgin bir indüksiyona rastlanmadı. Ksilidinin de (0.01 ve 0.05 mM) kontrole kıyasla lakkaz üretimine herhangi bir etkisi gözlenmedi.

Schückel vd., (2011) *Marasmius* sp. ile yaptıkları çalışmada bakır bulunan ortamda en yüksek lakkaz aktivitesini 7 U/mL olarak saptarken, ksilidin bulunan besiyerinde lakkaz aktivitesinin kontrole kıyasla düştüğünü bildirmiştir. Bu da bize ksilidinin farklı fungus suşlarında lakkaz üretimi üzerinde farklı etki yapabileceğini göstermiştir. Nakade vd., (2013) *Polyporus brumalis* ile yaptıkları çalışmada bakırın lakkaz üretimini önemli oranda artırır fakat ksilidinin önemli bir etki yapmadığını ortaya koymuştur.

Bu tez çalışmasında bakırın pozitif etkisi gözlemlendiğinden ve olası sinerjistik etkiden dolayı ABTS+bakır ve Ksilidin+bakırın etkisi araştırıldı. Ksilidin+bakır bulunan besiyerlerinde lakkaz aktivitesinde artış gözlemlendi. Ortamda yalnızca bakırın bulunduğu çalışmalarda lakkaz aktivitesi 4. günde 9.58 U/mL ölçülürken,

Ksilidin+bakır bulunan melaslı besiyerinde 4. günde bu değer 11.1 U/mL olarak kaydedildi. Bu sonuçlara göre Ksilidin+bakırın birlikte kullanımı sonucu sinerjistik bir etki olduğunu söyleyebiliriz. Revenka ve Lele (2006b) yalnızca bakır bulunan besiyerinde lakkaz aktivitesini yaklaşık 400 U/mL olarak saptarken, Ksilidin+bakır bulunan ortamda lakkaz aktivitesini yaklaşık 500 U/mL olarak belirlendi. Birhanlı (2008)'da sinerjistik etkiyi rapor etmiştir. ABTS ile bakır birlikte eklendiğinde ise lakkaz üretimi için herhangi bir pozitif etki gözlenmemiştir.

Bu suşun yüksek oranda lakkaz üretim yeteneğine sahip olduğu ve tekrarlı kesikli yöntemle uygun indükleyiciler eklenerek lakkaz üretiminin artırıldığı görüldü. Statik koşullarda kesikli yöntem kullanılarak lakkaz üretiminin araştırıldığı çalışmada düşük konsantrasyonlarda bakırdan yararlanıldı. 1 ve 2 mM bakır eklenen melas ortamlarında üretilen *Ganoderma lucidum*'un primer fazda lakkaz üretim yeteneğine sahip olduğu sekonder fazda ise bu yeteneğini kaybettiği gözlemlendi. Çalışmanın diğer bir basamağında bakır, ortama 8. günde ilave edildi. Bu koşullarda da fungusun lakkaz üretimi ve biyokütlesi üzerinde herhangi bir değişiklik gözlenmedi. *G. lucidum*'un bu suşunun lakkaz üretimi için kullanılmasında tekrarlı kesikli yöntemin kesikli yöntemle göre daha elverişli olduğu saptandı. Ortamda bulunan bakırın fungus biyokütlesi üzerinde herhangi bir olumsuz etkisinin olmadığı görüldü.

Endüstriyel alanda kullanılan boyar maddeler potansiyel olarak üretilmektedir. Endüstrinin birçok alanında kullanılan bu boyar maddeler, üretimleri ve tüketimleri süresinde çevreye oldukça zarar vermektedir. Çevreye verilen bu boyar maddeler ve atıkları ekolojik dengenin bozulmasına ve bu maddelerin bulunduğu ortamda doğrudan ya da oluşturdukları yan ürünlere bağlı olarak dolaylı yollarla doğal sürecin ilerlemesine engel olmaktadır. Günümüzde yıkıma oldukça dirençli ve farklı kimyasal yapıya sahip boyar maddeler kullanılmaktadır. Boyar maddelerin renk giderimi için kullanılan fiziksel ve kimyasal yöntemlerin yanı sıra biyolojik yöntemler de önemli yer tutmaktadır. Özellikle beyaz çürükçül funguslar bu anlamda büyük öneme sahiptir.

Yeşilada vd., (2002) ve Yeşilada vd., (2003) yaptıkları çalışmada farklı beyaz çürükçül fungusların peletlerini kullanmış ve 24 saat içinde sırasıyla, %75 ve %55 oranında renk giderimi gerçekleştirmişlerdi. Papadopoulou vd., (2013) çalışmalarında *Pleurotus*, *Ganoderma* ve *Lentinula* türlerini kullanmıştır. En yüksek

renk giderim değerini Remazol Brilant Mavi R (RBBR) boyasında *Pleutorus pulmonarius* AMRL 177 ile elde etmiştir.

Murugesan vd., (2007) *Ganoderma lucidum* ile yürüttüğü çalışmada, Remazol Brilant Mavi R (50 mg/L) boyasını kullanmıştır. Saflaştırdığı lakkaz ile (25 U/mL) 1 saat içinde %62, 2 saat sonra da %77.4 renk giderimi elde etmiştir. Daha etkili renk giderimi için HBT bulunan ortamda lakkaz ile çalışmış ve 2 saatte %92 renk giderimi saptamıştır. Hou vd., (2004) *Pleurotus ostreatus*'dan elde ettikleri saf lakkaz (30 U/mL) ile çalışmıştır. Yıkıma dirençli olan antrokinon boyalarda 10. saatte %66.3 renk giderimi görülürken, mediatör olarak ABTS'nin kullanılması ile bu değer 5. saatte %90 olarak saptanmıştır. Khelifi vd., (2010) *Funalia trogii* den elde ettikleri lakkaz (9 U/mL) ile yürüttükleri çalışmada tekstil fabrikası atık suyundan renk giderimi yapmış ancak %10'un altında bir renk giderimi sağlamışlardır. Ortama HBT eklenmesi durumunda bu değer 1. saatin sonunda %70'e ulaşmıştır.

Enzaymir vd., (2009) yıkıma dirençli Reaktif Siyah 5 bulunan ortamda lakkaz üretimi ve renk giderimi çalışmıştır. Ortamda boya bulunan kültürde *Trametes pubescens* 10 kat daha fazla lakkaz üretmiş ve 1025 U/L lakkaz aktivitesi kaydedilmiştir. Renk giderimi ise 24 saatte %74 olarak saptanmıştır.

Chakraborty vd., (2013) *Alternaria alternata* CMERI F6 ile çalışmasında Kongo Kırmızısında renk giderimini araştırmıştır. İçinde 800 mg/L boya bulunan besiyerine funguslar ekilmiş ve 25 °C, pH 5 ve 150 rpm'de renk giderimine bakılmıştır. Maksimum renk giderimi %78 olarak belirlenmiştir.

G. lucidum'un lakkaz yardımıyla boya giderim yeteneğine metal iyonlarının etkisinin araştırıldığı çalışmada ise, RBBR ve RB-5 boyası kullanılmıştır. Ortamda yalnızca lakkazın bulunmasıyla elde edilen boya giderimleri RBBR ve RB-5 boya ları için sırası ile, %33.5 ve %67.6'dır. RBBR için kullanılan metal iyonlarından Cu^{+2} yalnızca yüksek konsantrasyonda (10 mM) kullanıldığında renk giderimi için olumlu etki gösterip, %41.4 renk giderimi sağlarken, Ca^{+2} (1mM) ve Cr^{+2} (1mM) düşük konsantrasyonda renk giderimine pozitif etki göstermiştir. Bu değerler Ca^{+2} için %37.2 ve Cr^{+2} için %41.4 olarak kaydedilmiştir. RB-5 boyasının kullanımında ise kontrolde renk giderimi %67.6 olarak saptanmıştır. RB-5'in renk gideriminde kullanılan metallerden yalnızca Cu^{+2} 'nin etkili olduğu ve 1mM konsantrasyonda %94.0 renk giderimine ulaşıldığı belirtilmiştir (Muragesan vd., 2009).

Revankar ve Lele (2007) *Ganoderma* sp. WR-1 ile çalışma yapmış ve 100 ppm boya bulunan ortamda 8 saatte %96 renk giderimine ulaşmıştır. Ma vd., (2014) *Ganoderma* sp. En3 ile çalışmalarında tekstil fabrikası atık sularında bulunan reaktif Turuncu16 boyasının yıkımını çalışmıştır. Renk giderim değerini 8. günde %85.1 olarak kaydederken lakkaz aktivitesi de 8. günde en yüksek değere ulaşmış ve yaklaşık 45 U/L olarak saptanmıştır.

Bu tez çalışmasında ise lakkaz üretim yeteneği kanıtlanan *G. lucidum* suşunun boya giderim yeteneği araştırıldı. Remazol Brilant Mavi R, Reaktif Mavi 171 ve Reaktif Siyaf 5 reaktif özelliğe sahip boyalar kullanıldı. Öncelikle boyar madde içeren agar ortamına *G. lucidum* miselleri transfer edildi ve 15 gün inkübasyon sonunda renk giderim yeteneği makroskobik olarak incelendi. Kontrollere kıyasla her üç boyada da renk giderimi tespit edildi. Agar ortamında en etkili renk gideriminin Reaktif Mavi 171'e ait olduğu görüldü (Şekil 4.11). Bu çalışma bize *G. lucidum*'un renk giderim yeteneğine sahip olduğunu göstermektedir. Sıvı ortamda renk giderimini araştırmak için fungus peletler (Şekil 3.2) halinde üretildi. Üretilen peletler tekrarlı kesikli yöntem kullanılarak renk giderim aktiviteleri spektrofotometrik yöntemlerle saptandı.

Yapılan çalışmalar sonucunda peletlerle ilk kullanımda %80'in üzerinde renk giderimi elde edilmiştir. Peletlerin sonraki kullanımlarında da renk giderim özelliklerini yitirmedikleri, 5. kullanımda dahi %60'ın üzerinde renk giderimi gerçekleştiği kaydedildi. Bu sonuçlar 150 mg/L boya konsantrasyonunda kaydedildi. 50 mg/L ve 100 mg/L boya konsantrasyonunda yapılan çalışmalarda ise renk giderim yüzdesinin 150 mg/L'ye oranla daha düşük olduğu gözlemlendi. Bu da bize yüksek konsantrasyonda boya içeren ortamda daha etkili renk gideriminin olduğunu gösterdi. Sonuçlar, *G. lucidum*'un yüksek renk giderim aktivitesine sahip olduğunu ve peletlerde herhangi bir bozulma olmadan tekrar tekrar kullanılabilceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Anonymous. (2014). <http://www.anbg.gov.au/fungi/ecology-woodrot.html> (on-line access on 09 July, 2014).
- Anonymous. (2014). <http://armstrong.chem.ox.ac.uk/laccase.html> (on-line access on 09 July, 2014).
- Apohan, E, Yeşilada, Ö. (2011). Enhancement of laccase production of pre-grown fungal pellets in wastewater of olive oil mills. *Fresenius Environmental Bulletin*. **20**, 1216-1224
- Arora, D. S., Gill P. K. (2000). Laccase production by some white rot fungi under different nutritional conditions. *Bioresource Technology* **73**, 283-285
- Ashrafi, S. D., Rezaei S., Forootanfar H., Mahvi A. H., Faramarzi M. A. (2013). The enzymatic decolorization and detoxification of synthetic dyes by the laccase from a soil-isolated ascomycete, *Paraconiothyrium variabile*. *International Biodeterioration & Biodegradation* **85**, 173-181
- Baldiran, P. (2003). Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology* **32**, 78–91
- Baldrian, P. (2006). Fungal laccases- occurrence and properties. *FEMS Microbiol. Rev.*, **30**, 215-242.
- Bauer, C.G., Kuhn, A., Gajovic, N., Skorobogatko, O., Holt, P.J., Bruce, N.C., Makower, A., Lowe, C.R., Scheller, E.W. (1999). New enzyme sensors for morphine and codeine based on morphine dehydrogenase and laccase. *Fresenius' J. Anal. Chem.* **364**, 179–183
- Bezalel, L., Hadar, Y., Cemiglia, C.E. (1996). Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 292-295
- Betts, W. B. (1991). Biodegradation: Natural and syntetic materials, *Spinger Verlag, Germany* 139-150
- Birhanlı, E. (2008). *Tekrarlı kesikli işlemle lakkaz üretimi*. Doktora tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya.
- Birhanlı. E. ve Yeşilada, Ö. (2006). Increased production of laccase by pellets of *Funalia trogii* ATCC 200800 and *Trametes versicolor* ATCC 200801 in repeated-batch mode. *Enzyme and Microbial Technology* **39**, 1286–1293
- Birhanli. E. ve Yeşilada. Ö. (2010). Enhanced production of laccase in repeated-batch cultures of *Funalia trogii* and *Trametes versicolor*. *Biochemical Engineering Journal* **52**, 33–37

- Birhanlı, E., Erdogan, S., Yesilada, O., Onal, Y.(2013). Laccase production by newly isolated white rot fungus *Funalia trogii*: Effect of immobilization matrix on laccase production. *Biochemical Engineering Journal* **71**, 134– 139
- Bourbonnais, R., Paice, M.G., (1996). Enzymatic delignification of kraft pulp using laccase and a mediator. *Tappi J.* **79**, 199–204
- Boran, F. (2013) *Yeni izole edilmiş beyaz çürükçül funguslarla katı substrat fermentasyonu koşullarında lakkaz üretimi*. Doktora tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya
- Boran, F., Yeşilada, Ö. (2011). Enhanced production of laccase by fungi under solid substrate fermentation condition. *Bioresources* **6(4)**, 4404-4416
- Call, H.P., Mücke I. (1997). History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems. *Journal of Biotechnology* **53**, 163–202
- Cardoso, M.B., Nicoli, J.R. (1981) Single cell protein from to thermotolerant fungus *Phanerochaete chrysosporium* grown in vinase. **24**, 249-255
- Chakraborty, S., Basak, B., Dutta, S., Bhunia, B., Dey, A. (2013). Decolorization and biodegradation of congo red dye by a novel white rot fungus *Alternaria alternata* CMERI F6. *Bioresource Technology* **147**, 662–666
- Champagne P., Ramsay J. A. (2005). Contribution of manganese peroxidase and laccase to dye decoloration by *Trametes versicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol* **69** 276–285
- Chang, S. and Miles P.G. (2004). *Mushrooms Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact*. Department of Biology The Chinese University of Hong Kong.
- Chen, T., Wu, Y., Wu, J., Ma, L., Dong, Z., Wu, J. (2013). Efficient extraction technology of antioxidant crude polysaccharides from *Ganoderma lucidum* (Lingzhi), ultrasonic-circulating extraction integrating with superfine-pulverization. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers.* **45**, 57-62
- Claus, H., Filip, Z. (1998). Degradation and Transformation of aquatic humic substances by laccase-producing fungi *Cladosporium cladosporioides* and *Polyporus versicolor*. *Acta hydrochim. hydrobiol.* **(26):3**, 180 – 185
- Claus, H., Faber, G., König, H. (2002). Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. *Appl Microbiol Biotechnol.* **59**, 672–678
- Claus, H. (2003) Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Arch Microbiol* **179**, 145–150
- Claus, H. (2004) Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron* **35**, 93–96

- Coelho, J.S., Oliveria, A.L., Souza C.G.M., Bracht, A., Peralta R.M. (2010). Effect of the herbicides bentazon and diuron on the production of ligninolytic enzymes by *Ganoderma lucidum*. *International Biodeterioration & Biodegradation* **64**, 156-161
- Collins, P.J., Kotterman, M.J.J., Field, J.A., Dobson, A.D.W. (1996). Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by laccases from *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 4563–4567.
- Couto, S.R., Herrera, J.L.T. (2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnology Advances* **24**, 500-513
- Crestini, C., Perazzini, R., Saladino, R.(2009). Oxidative functionalisation of lignin by layer-by-layer immobilised laccases and laccase microcapsules. *Applied Catalysis A: General* **372**, 115–123
- D’Annibale, A., Quarantino, D., Federici, F., Fenice, M. (2006). Effect of agitation and aeration on the reduction of pollutant load of olive mill wastewater by the white-rot fungus *Panus tigrinus*. *Biochemical Engineering Journal* **29** ,243–249
- Decker, H.; Terwilliger, N. (2000) Cops and robbers: putative evolution of copper oxygen-binding proteins. *J. Exp. Biol.* **203**, 1777–1782.
- Deepalakshmi, K., Mirunalini, S., Krishnaveni, M., Arulmozhi, V. (2013). In vitro and in vivo antioxidant potentials of an ethanolic extract of *Ganoderma lucidum* in rat mammary carcinogenesis. *Chinese Journal of Natural Medicines* **11(6)**, 0621–0627
- Dhillon, G.S., Kaur, S., Brar, S.K. (2012). In-vitro decolorization of recalcitrant dyes through an ecofriendly approach using laccase from *Trametes versicolor* grown on brewer’s spent grain. *International Biodeterioration & Biodegradation* **72**, 67-75
- Durán, N., 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
- Enayatzamir K., Alikhani H.A., Couto S.R. (2009). Simultaneous production of laccase and decolouration of the diazo dye Reactive Black 5 in fixed-bed bioreactor. *Journal of Hazardous Materials* **164**, 296-300
- Enguita, F.J., Martins, L.O., Henrique, A.O., Carrondo, M.A. (2003). Crystal structure of a bacterial endospore coat component: a laccase with enhanced thermostability properties. *J. Biol. Chem.* **278 (21)**, 19416–19425.
- Faure, D., Bouillant, M.-L., Bally, R. (1995). Comparative study of substrates and inhibitors of *Azospirillum lipoferum* and *Pyricularia oryzae* laccases. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1144-1146.

- Fernández-Fernández, M., Sanromán, M.Á., Moldes D. (2011). Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotechnology Advances* **31**, 1808–1825
- Filip, Z., Claus, H. (1995). Effects of soil minerals on the microbial formation of enzymes and their possible use in remediation of chemically polluted sites. *In Environmental Impacts of Soil Component Interactions*. 407–419.
- Fonseca, M. I., Shimizu, E., Zapata, P. D., Villalba, L. L. (2010). Copper inducing effect on laccase production of white rot fungi native from Misiones (Argentina). *Enzyme and Microbial Technology* **46**, 534–539
- Freixo. M. R., Karmali. A, Frazza. C., Arteiro. J. M. (2008) Production of laccase and xylanase from *Coriolus versicolor* grown on tomato pomace and their chromatographic behaviour on immobilized metal chelates *Process Biochemistry* **43**, 1265–1274
- Galhaup, C., Wagnera H., Hinterstoisserb B., Haltricha D. (2002). Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme and Microbial Technology* **30**, 529–536
- Gamelas, J.A.F., Pontes, A.S.N., Evtuguin, D.V., Xavier, A.M.R.B., Esculcas, A.P.(2007) New polyoxometalate–laccase integrated system for kraft pulp delignification. *Biochemical Engineering Journal* **33**, 141–147
- Gao, P., Hirano, T., Chen, Z., Yasuhara, T., Nakata, Y., Sugimoto, A. (2012). Isolation and identification of C-19 fatty acids with anti-tumor activity from the spores of *Ganoderma lucidum* (reishi mushroom). *Fitoterapia* **83**, 490–499
- González, T., Terro'n, M. C., Yagu'e , S., Junca, H., , Carbajo, J.M., Zapico, E. J., Silva, R., Arana-Cuenca, A., Te'llez, A., González, A. E. (2008). Melanoidin-containing wastewaters induce selective laccase gene expression in the white-rot fungus *Trametes* sp. I-62. *Research in Microbiology* **159**, 103-109
- Gupta, G., Rajendran, V., Atanasov, P. (2003) Laccase biosensor on monolayermodified gold electrode, *Electroanalysis*, **15**, 1577–1583
- Haghighi, B., Gorton L., Ruzgas, T., Jönsson, L.J. (2003). Characterization of graphite electrodes modified with laccase from *Trametes versicolor* and their use for bioelectrochemical monitoring of phenolic compounds in flow injection analysis. *Analytica Chimica Acta* **487**, 3–14
- Hailei W., Chaozhi T., Guangli Y., Ping L. (2013) A novel mebrane-surface liquid co-culture to improve the production of laccase from *Ganoderma lucidum*. *Biochemical Engineering Journal* **80**, 27-36
- Haritash, A.K., Kaushik, C.P. (2009). Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials* **169**, 1–15

- Heleno, S. A., Ferreira, I. C.F.R, Esteves, A. P., Ciric, A., Glamoclija, J., Martins, A., Sokovic, M., Queiroz M. J. R.P. (2013). Antimicrobial and demelanizing activity of *Ganoderma lucidum* extract, p-hydroxybenzoic and cinnamic acids and their synthetic acetylated glucuronide methyl esters. *Food and Chemical Toxicology* **58**, 95-100
- Higson, F. K. (1991) Degradation of xenobiotics by white rot fungi. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **122**, 111-152
- Hou., H, Zhou. J., Wrang. J., Du. C., Yan. B. (2004). Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Process Biochemistry* **39**, 1415–1419
- Ihayere, C.A., Oghenekaro, A.O., Osemwegie, O.O., Okhuoya, J.A.(2010). Chemical nature of *Ganoderma lucidum* (Curtis) karsten from woodlands of Edo State, Nigeria. *Continental J. Biological Sciences* **3**, 8 - 15
- Jadhav, S.U., Kalmea, S.D., Govindwar, S.P. (2008). Biodegradation of Methyl red by *Galactomyces geotrichum* MTCC 1360. *International Biodeterioration & Biodegradation* **62**, 135–142
- Jang. M.Y., Ryu. W.R., Cho., M.H. (2002). Laccase production from repeated batch cultures using free mycelia of *Trametes* sp. *Enzyme and Microbial Technology* **30**, 741–746
- Jaszek, M., Grzywnowicz, K., Malarczyk, E., Leonowicz, A. (2006). Enhanced extracellular laccase activity as a part of the response system of white rot fungi: *Trametes versicolor* and *Abortiporus biennis* to paraquat-caused oxidative stress conditions. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **85**, 147– 154
- Jarosz-WilFkołazka, A., Ruzgas, T., Gorton, L.(2004). Use of laccase-modified electrode for amperometric detection of plant flavonoids. *Enzyme and Microbial Technology* **35**, 238–241
- Jin, H., Jin, F., Jin, J., Xu, J., Tau, T., Liu, J., Huang, H. (2013). Protective effects of *Ganoderma lucidum* spore on cadmium hepatotoxicity in mice. *Food and Chemical Toxicology* **52**, 171–175
- Kahraman, S., Yeşilada, Ö. (2001). Industrial and agricultural wastes as substrates for laccase production by white-rot fungi, *Folia Microbiol.*, **46(2)**, 133–136
- Kapdan, I.K., Kargi, F., McMullan, G., Marchant, R. (2000) Comparison of white-rot fungi cultures for decolorization of textile dyestuffs, *Bioproc Eng*, **22**, 347-351
- Kawal, S., Umezawa, T., Shimada, M., Higuchi, T.(1988). Aromatic ring cleavage of 4,6-di(tert-butyl)guaiacol, a phenolic lignin model compound, by lactase of *Coriolus versicolor*. *Published by Elsevier Science Publishers B. V.* **236(2)**, 309-311

- Keypour, S., Rafati H., Riahi, H., Mirzajani, M., Moradali, M.F.(2010). Qualitative analysis of ganoderic acids in *Ganoderma lucidum* from Iran and China by RP-HPLC and electrospray ionisation-mass spectrometry (ESI-MS). *Food Chemistry* **119**, 1704–1708
- Khlifia R., Belbahria L., Woodwarda S., Ellouza M., Dhouiba A., Sayadia S., Mechichia T. (2010). Decolourization and detoxification of textile industry wastewater by the laccase-mediator system. *Journal of Hazardous Materials* **175**, 802–808
- Kuhad, R. C., Singh, A. and Eriksson, K. (1997). Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls Berlin
- Kumar, V.V., Sathyaselvabala, V., Premkumar, M.P., Vidyadevi, T., Sivanesan, S.(2012). Biochemical characterization of three phase partitioned laccase and its application in decolorization and degradation of synthetic dyes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **74**, 63– 72
- Lai, C., H, J., Lin, H., Yu, A., Chen, S., Tsai, Y., Shao, L., Yang, W., Yu, J. (2010). Immunomodulatory and adjuvant activities of a polysaccharide extract of *Ganoderma lucidum* in vivo and in vitro. *Vaccine* **28**, 4945–4954
- Leonowicz, A., Cho, N.S., Luterek, J., Wilkolazka, A., Wojtas-Wasilewska, M., Matuzewska, A., Hofrichter, M., Rogalski, W.D., (2001). Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J. Basic Microbiol.*, **41**, 185-227
- Lisdat, F., Wollenberger, U., Makower, A., Hörtnagl H., Pfeiffer, D., Scheller, F.W. (1997). Catecholamine detection using enzymatic amplification. *Biosensors & Bioelectronics* **12**, 1199-1211
- Litthauer, D., Vuuren, M. J., Tonder, A., Wolfaardt, F.W. (2007). Purification and kinetics of a thermostable laccase from *Pycnoporus sanguineus* (SCC 108). *Enzyme and Microbial Technology* **40**, 563–568
- Liu, J., Yang, F., Ye, L., Yang, X., Timani, K.A., Zheng, Y., Wang, Y. (2004). Possible mode of action of antiherpetic activities of a proteoglycan isolated from the mycelia of *Ganoderma lucidum* in vitro. *Journal of Ethnopharmacology* **95**, 265–272
- Liu, Y., Shen, J., Xia, Y., Zhang, J., Park, H. (2012). The polysaccharides from *Ganoderma lucidum*: Are they always inhibitors on human hepatocarcinoma cells. *Carbohydrate Polymers* **90**, 1210– 1215
- Lyashenko, A.V., Belova, O., Gabdulkhakov, A.G., Lashkov, A.A., Leontievsky A.A., Mikhailov, A.M. (2011). Purification, crystallization and preliminary X-ray structure analysis of the laccase from *Ganoderma lucidum*. *Acta Cryst.* **F67**, 926–929

- Ma, C., Feng, M., Zhai, X., Hu, M., You, L., Luo, W., Zhao, M. (2013). Optimization for the extraction of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* and their antioxidant and antiproliferative activities. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* **44**, 886–894
- Ma L., Zhuo R., Liu H., Yu D., Jiang M., Zhang X., Yang Y. (2014). Efficient decolorization and detoxification of the sulfonated azo dye Reactive Orange 16 and simulated textile wastewater containing Reactive Orange 16 by the white-rot fungus *Ganoderma* sp. En3 isolated from the forest of Tzu-chin Mountain in China. *Biochemical Engineering Journal* **82**, 1– 9
- Manavalan, T., Manavalan, A., Thangavelu, K. P., Heese, K. (2012). Secretome analysis of *Ganoderma lucidum* cultivated in sugarcane bagasse. *Journal of proteomics*. **77**, 298-309
- Manavalan, T., Manavalan, A., Thangavelu K.P., Heese, K. (2013). Characterization of optimized production, purification and application of laccase from *Ganoderma lucidum*. *Biochemical Engineering Journal* **70**, 106– 114
- Martinez-Periñan, E., Hernández-Artiga, M.P., Palacios-Santander J.M., ElKaoutit, M., Naranjo-Rodriguez, I., Bellido-Milla, D. (2011). Estimation of beer stability by sulphur dioxide and polyphenol determination. Evaluation of a Laccase-Sonogel-Carbon biosensor. *Food Chemistry* **127**, 234–239
- Mayer, A.M., Staples R.C. (2002). Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* **60**, 551–565
- Mendoza L., Jonstrup, M., Hatti-Koul R., Mattiasson, B. (2011). Azo dye decolorization by a laccase/mediator system in a membrane reactor: Enzyme and mediator reusability. *Enzyme and Microbial Technology*. **49**, 478-484
- Meng, G., Zhu, H., Yang, S., Feng, W., Zheng, H., Chen, E, Xu, J. (2011) Attenuating effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on myocardial collagen cross-linking relates to advanced glycation end product and antioxidant enzymes in high-fat-diet and streptozotocin-induced diabetic rats. *Carbohydrate Polymers* **84**, 180–185
- Min K., Kim Y., Kim Y.W., Jung H.S., and Hah Y.C. (2001) Characterization of a novel laccase produced by the Wood-Rotting fungus *Phellinus ribis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **392**, 279-286
- Moldes, D., Vidal, T. (2011). New possibilities of kraft pulp biobleaching with laccase and sulfonated mediators. *Process Biochemistry* **46**, 656–660
- Murugesan K., Nam I., Kim Y., Chang Y. (2007) Decolorization of reactive dyes by a thermostable laccase produced by *Ganoderma lucidum* in solid state culture. *Enzyme and Microbial Technology* **40**, 1662-1672

- Murugesan, Y. Kim, J. Jeon, Y. Chang (2009) Effect of metal ions on reactive dye decolorization by laccase from *Ganoderma lucidum*. *Journal of Hazardous Materials* **168**, 523-529
- Nakade, K., Nakagawa, Y., Yano, N. Sato, T., Sakamoto, Y. (2013). Effective induction of pblac1 laccase by copper ion in *Polyporus brumalis* ibrc05015. *fungus biology* **117**, 52-61
- Oh, K., Lee, C., Kim, Y., Eo, S., Han, S. (2000). Antiherpetic activities of acidic protein bound polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum* alone and in combinations with acyclovir and vidarabine. *Journal of Ethnopharmacology* **72**, 221-227
- Pan, D., Zhang, D., Wu, J., Chen, C., Xu, Z., Yang, H., Zhou, P. (2014). A novel proteoglycan from *Ganoderma lucidum* fruiting bodies protects kidney function and ameliorates diabetic nephropathy via its antioxidant activity in C57BL/6 db/db mice. *Food and Chemical Toxicology* **63**, 111-118
- Papadopoulou, K., Kalagona, I.M., Philippoussis, A., Rigas, F. (2013) Optimization of fungal decolorization of azo and anthraquinone dyes via Box-Behnken design. *International Biodeterioration & Biodegradation* **77**, 31-38
- Pazarlıoğlu, N.K., Sarioşık, M., Telefoncu, A. (2005). Laccase: production by *Trametes versicolor* and application to denim washing. *Process Biochemistry* **40**, 1673-1678
- Piscitelli, A., Vecchio, C.D., Faraco, V., Giardina, P., Macellaro, G., Miele, A., Pezzella, C., Sannia, G. (2011). Fungal laccases: Versatile tools for lignocellulose transformation. *C. R. Biologies* **334**, 789-794
- Pointing, S.B. (2001) Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl. Microbiol Biotechnol* **57**, 20-30
- Ranocha, P., McDougall, G., Hawkins, S., Stergiades, R., Borderies, G., Stewart, Derek., Cabanes-Macheteau, M., Boudet, A., Goffner, D. (1999). Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases - a divergent gene family - in poplar. *Eur. J. Biochem.* **259**, 485-495
- Revankar M. S. ve Lele S.S. (2006a) Increased production of extracellular laccase by the white rot fungus *Coriolus versicolor* MTCC 138. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **22**, 921-926
- Revankar M. S. ve Lele S.S. (2006b) Enhanced production of laccase using a new isolate of white rot fungus WR-1 *Process Biochemistry* **41** 581-588
- Revankar, S.M., Lele, S.S (2007). Synthetic dye decolorization by white rot fungus, *Ganoderma* sp. WR-1. *Bioresource Technology* **98**, 775-780

- Rojek, K., Roddick F.A., Parkinson, A. (2004) Decolorisation of natural organic matter by *Phanerochaete chrysosporium*: the effect of environmental conditions, *Water Sci Technol: Water Supply*, **4:4** 175-182
- Rosales E., Couto S. R. , Sanromán M. A. (2007) Increased laccase production by *Trametes hirsuta* grown on ground orange peelings. *Enzyme and Microbial Technology* **40**, 1286–1290
- Ruan, W., Popovich, D.G. (2012). *Ganoderma lucidum* triterpenoid extract induces apoptosis in human colon carcinoma cells (Caco-2). *Biomedicine & Preventive Nutrition* **2**, 203–209
- Russell, R., Paterson, M. (2006). *Ganoderma*– A therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry* **67**, 1985–2001
- Roure, M., Delattre, P., Froger, H., (1992) . Composition for an enzymic coloration of keratin fibres, especially for hair and its use in a dyeing process. *Eur Pat Appl EP0504005*
- Sadhasivam, S., Savitha, S., Swaminathan, K., Lin, F. (2008). Production, purification and characterization of mid-redox potential laccase from a newly isolated *Trichoderma harzianum* WL1. *Process Biochemistry* **43**, 736–742
- Sampedro, I., Marinari, S., D’Annibale, A., Grego, S., Ocampo, J.A., García-Romera, I. (2007). Organic matter evolution and partial detoxification in two-phase olive mill waste colonized by white-rot fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation* **60**, 116–125
- Schückel, J., Matura, A., Pée K. (2011) One-copper laccase-related enzyme from *Marasmius* sp.: Purification, characterization and bleaching of textile dyes. *Enzyme and Microbial Technology* **48**, 278–284
- Shah V., Nerud, F. (2002). Lignin degrading system of white-rot fungi and its exploitation for dye decolorization, *Can J Microb*, **48:10** 857-870
- Sharma, P., Goel, R., Capalash, N. (2007). Bacterial laccase. *World J Microbiol Biotechnol.* **23**, 823-832
- Shogren, R. L., Biswas, A. (2013). Preparation of starch–sodium lignosulfonate graft copolymers via laccase catalysis and characterization of antioxidant activity. *Carbohydrate Polymers* **91**, 581– 585
- Simonic, J., Vukojevic, J. Stajic, M., Glamoclija, J. (2010). Intraspecific diversity within *Ganoderma lucidum* in the production of laccase and Mn-Oxidizing peroxidases during plant residues fermentation. *Appl Biochem Biotechnol* **162**, 408–415

- Siripong, P., Orophin, B., Sanro. T., Duanporn, P. (2009). Screeing of fungi from national sources in Thailand for degradation of polychlorinated hydrocarbons. *American-Eurasian J. Agric & Environ. Sci.* **5**, 466-472
- Sitarz, A. K., Mikkelsen, J.D., Hojrup, P., Meyer A. S. (2013). Identification of a laccase from *Ganoderma lucidum* CBS 229.93 having potential for enhancing cellulase catalyzed lignocellulose degradation. *Enzyme and Microbial Technology* **53**, 378– 385
- Sjoblod, R.D., Bollag, J.M., (1981). Oxidative coupling of aromatic compounds by enzymes from soil microorganisms. *Soil biochemistry.* **5**, 113-152
- Songulashvili, G., Elisashvili, V., Wasser, S. P., Nevo, E., Hadar, Y. (2007). Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes. *Enzyme and Microbial Technology* **41**, 57– 61
- Thakur, A., Rana, M., Lakhanpal, T.N., Ahmad, A., Khan, M.I. (2007). Purification and characterization of lectin from fruiting body of *Ganoderma lucidum* lectin from *Ganoderma lucidum*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1770**, 1404–1412
- Ting, W.T.E., Yuan, S.Y., Wu, S.D, Chang, B.V. (2011). Biodegradation of phenanthrene and pyrene by *Ganoderma lucidum*. *International Biodeterioration & Biodegradation.* **65**, 328-242
- Xu, F., (1999). Recent progress in laccase study: properties, enzymology, production and applications. In *The encyclopedia of bioprocessing technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation*, Flickinger, M.C., Drew, S.W., Ed., JohnWiley & Sons New York, 1545–1554
- Xu, Z., Chen, X., Zhong, Z., Chen, L., Wang, Y. (2011). *Ganoderma lucidum* polysaccharides: Immunomodulation and potential anti-tumor activities. *The American Journal of Chinese Medicine.* **39(1)**, 15–27
- Wachtel-Galor, S., Yuen J., Buswell J.A., Benzie F.F.I. (2011). *Ganoderma lucidum* (Lingzhi or Reishi). Medical Mushroom Chapter 9 in *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*. 2nd edition. Edt Benzie, I.F.F and Whactel-Galor S.
- Weng, C., Yen, G. (2010). The in vitro and in vivo experimental evidences disclose the chemopreventive effects of *Ganoderma lucidum* on cancer invasion and metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* **27**, 361–369
- Wong, K.K.Y., Anderson, K.B., Kibblewhite R.P. (1999). Effects of the laccase-mediator system on the handsheet properties of two high kappa kraft pulps. *Enzyme and Microbial Technology.* **25**, 125–131

- Wu, Y., Jianga, Y., Jiaoa, J., Liua, M., Hu F., Griffithsb, B.S., Li, H. (2014). Adsorption of *Trametes versicolor* laccase to soil iron and aluminum minerals: Enzyme activity, kinetics and stability studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **114**, 342– 348
- Yang, X., Laskar, D.D., Ma, F., Zhang, X., Shulin, C. (2013). Medium-Temperature pyrolysis of corn stover improvement by biopretreatment with white-rot fungi. *Bioresources* **8(4)**, 6383-6394
- Yen F. (2008). *Farklı Ganoderma lucidum suşlarının sıvı ve katı besin ortamlarında misel ve karpofor gelişimi ile verim ve bazı kalite özelliklerinin karşılaştırılması*. Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Yeşilada, Ö., Cing, S. ve Asma, D. (2002) Decolourisation of the textile dye Astrazon Red FBL by *Funalia trogii* pellets. *Bioresource Technology* **81**, 155-157
- Yeşilada, Ö., Asma, D. ve Cing, S. (2003) Decolorization of textile dyes by fungal pellets. *Process Biochemistry* **38**, 933-938
- Yeşilada, Ö., Birhanli, E., Ozmen., N., Ercan., S. (2014). Highly stable laccase from repeated batch culture of *Funalia trogii* ATCC 20080. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **50**, 55–61.
- Yeşilada, Ö., Fışkın, K. ve Yeşilada, E. (1995) Decolorization of alcholic waste water by white rot fungi *Coriolus versicolor*, *Funalia trogii* and *Phanerochaete chrysosporium* ME446 **19**, 191-200
- Yeşilada, Ö., Şık, S. ve Sam, M. (1998) Biodegradation of olive oil mill wastewater by *Coriolus versicolor* and *Funalia trogii*: effects of agitation, initial COD concentration, inoculum size and immobilization. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **14**, 37-42
- Yeşilada, Ö., Yildirim, S.C., Birhanli, E., Apohan, E., Asma, D., Kuru, F.(2010) The evaluation of pre-grown mycelial pellets in decolorization of textile dyes during repeated batch process. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **26**, 33-39
- Yürekli, F., Yeşilada, Ö., Yürekli, M., Topçuoğlu, S.F. (1999) Plant growth hormone production from olive oil mill and alcohol factory wastewaters by white rot fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **15**, 503-505
- Yoshida, H., Suzuki, M., Sakaguchi, R., Tani, I., Kotani H., Shudo, N., Yoshimura, A. (2012). Preferential induction of Th17 cells in vitro and in vivo by Fucogalactan from *Ganoderma lucidum* (Reishi). **422**, 174-180
- Yuen, J. W. M., Gohel, M. D. I. (2009). Anticancer Effects of *Ganoderma lucidum*: A Review of Scientific Evidence *Nutrituon and Cancer* **53(1)**, 11–17

- Zhang, J., Tang, Q., Zhou, C., Jia, W., Silva, L., Nguyen, L., Reutter, W., Fan, Hua. (2010). GLIS, a bioactive proteoglycan fraction from *Ganoderma lucidum*, displays anti-tumour activity by increasing both humoral and cellular immune response. *Life Sciences* **87**, 628–637
- Zhou, Y., Deng, T., Pana, C., Chena, C., Mo, J. (2010). Purification of a laccase from fungus combs in the nest of *Odontotermes formosanus*. *Process Biochemistry* **45**, 1052–1056

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Sinem ERCAN

Doğum Yeri ve Tarihi: 14.12.1986 MALATYA

Adres: Zafer Mahallesi Badıllı Camii Sokak Türkyılmaz Apartmanı No:23
MALATYA

E-Posta: sinemercan86@hotmail.com

Lisans: İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yayın Listesi:

Yeşilada Ö., Birhanlı, E., **Ercan, S.**, Özmen, N. (2014). Reactive dye decolorization activity of crude laccase enzyme from repeated-batch culture of *Funalia trogii*. *Turkish Journal of Biology*. **38**, 103-110

Yeşilada Ö., Birhanlı, E , Özmen, N., **Ercan, S.** (2013). Highly stable laccase from repeated batch culture of *Funalia trogii* ATCC 2008001. *Applied Biochemistry and Microbiology*. **50(1)**, 55-61

TEZDEN TÜRETİLEN YAYINLAR/SUNUMLAR

Ercan, S., Yeşilada., Ö. (2014). Yeni izole edilmiş *Ganoderma lucidum*'un lakkaz üretim yeteneğinin araştırılması. 22. *Ulusal Biyoloji Kongresi*, Osmangazi Üniversitesi,, 23-27 Haziran, Eskişehir