

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YENİ İZOLE EDİLMİŞ *BJERKANDERA ADUSTA*'NİN Mn PEROKSİDAZ
ÜRETİM VE BOYAR MADDE RENK GİDERİM YETENEĞİNİN
ARAŞTIRILMASI

ARİFE ATİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MALATYA
EKİM 2018

Tezin Başlığı: Yeni İzole Edilmiş *Bjerkandera adusta*'nın Mn Peroksidaz Üretim ve Boyar Madde Renk Giderim Yeteneğinin Araştırılması

Tezi Hazırlayan: Arife ATİK

Sınav Tarihi:

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

Sınav Jüri Üyeleri

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA

: Prof. Dr. Birgül ÖZCAN

: Doç. Dr. Emre BİRHANLI

İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. Halil İbrahim ADIGÜZEL
Enstitü Müdürü

ONUR SÖZÜ

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum “**Yeni İzole Edilmiş *Bjerkandera adusta*’nın Mn Peroksidaz Üretim ve Boyar Madde Renk Giderim Yeteneğinin Araştırılması**” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Arife ATİK



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Yeni İzole Edilmiş *Bjerkandera adusta*'nın Mn Peroksidaz Üretim ve Boyar Madde Renk Giderim Yeteneğinin Araştırılması

Arife ATİK

İnönü Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

58 + xi sayfa

2018

Danışman: Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA

Bu çalışmada yeni izole edilmiş beyaz çürükçül fungus olan *Bjerkandera adusta*'nın peroksidaz üretim ve renk giderim aktivitesi çeşitli koşullarda araştırılmıştır. İlk olarak, mangan kaynağı olarak $MnSO_4$ içeren SDA ortamlarında peroksidaz aktivitesi test edilmiştir. Fungus üremesi kahverengi renk oluşumuna neden olmuştur. Kahverengi renk oluşumunun fungusların mangan peroksidaz aktivitesine bağlı olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, sıvı ve katı faz fermentasyonu koşullarında turp peroksidazına benzer aktivite saptanmıştır. Bu fungusun ham kültür filtratının, Reaktif Mavi 171 renk giderim aktivitesi gösteren peroksidaz enzimine sahip olduğu gösterilmiştir. Ham enzim kaynağı 4-50 °C ve pH 2.6-4.5 aralığında yüksek peroksidaz aktivitesi göstermiştir. Bu fungusun Reaktif Mavi 171 (RB 171), İndigo Karmin, Remazol Brilliant Mavi R, Astrazon Mavi ve Astrazon Siyah gibi çeşitli boyalara karşı renk giderim aktivitesi de araştırılmıştır. *Bjerkandera adusta* kesikli koşullarda bütün boyaların rengini giderebilmiştir.

Fungus pelletleriyle steril olmayan koşullarda çeşitli boyaların renginin giderimi de çalışılmış ve fungal pelletlerin kullanılan tüm boyaların rengini giderebildiği gösterilmiştir. Pelletlerin renk giderim aktivitesinin uzunluğu tekrarlı kesikli koşullarda da araştırılmıştır. Pelletler tekrarlı kesikli deneylerde RB 171 için 30 dakika ve diğer boyalar için 24 saat bekletme süresinde en az 3 kez kararlı kalmıştır. Ayrıca, bu pelletler tekrarlı kesikli koşullarda yüksek boya renk giderim aktivitesi göstermiştir. Pelletler steril olmayan koşullarda da boya renk giderim aktivitesi göstermiş ve bu aktiviteyi korumuştur. Sterilizasyon ve steril ortamın kullanımı pratik olmadığından steril olmayan koşullarda renk gideriminin büyük önemi vardır.

ANAHTAR KELİMELEER: Boya renk giderimi, Fungal pelletler, Peroksidaz, Beyaz çürükçül fungus

ABSTRACT

Master Thesis

Investigation of Mn Peroxidase Production and Dye Decolorization Ability of Newly Isolated *Bjerkandera adusta*

Arife ATİK

Inonu University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

58 + xi pages

2018

Supervisor: Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA

In this study, peroxidase production and dye decolorization activity of the newly isolated white rot fungus *Bjerkandera adusta* were investigated under various conditions. Firstly, its peroxidase activity was tested on SDA media containing MnSO₄ as manganese source. Fungal growth caused brown color. It was stated that the formation of brown color was due to the manganese peroxidase activity of the fungi. Moreover, horseradish peroxidase like activity was determined during liquid and solid phase fermentation conditions. It was shown that crude culture filtrate of this fungus possess peroxidase enzyme with Reactive Blue 171 dye decolorization activity. This crude enzyme source showed high peroxidase activity at 4-50 °C and pH 2.6-4.5. The dye decolorization activity of this fungus against various dyes such as Reactive Blue 171 (RB 171), Indigo Carmine, Remazol Brilliant Blue R, Astrazon Blue and Astrazon Black was also investigated. *Bjerkandera adusta* could decolorize all of the dyes under batch conditions.

Decolorization of various dyes by fungal pellets was also studied under non-sterile conditions and it was shown that fungal pellets could decolorize all the dyes used. The longevity of decolorization activity of the pellets was also investigated under repeated-batch conditions. The pellets were stable at least for three times with residence time of 30 min for RB 171 and 24 h for the other dyes, during repeated-batch experiments. Moreover, these pellets had high dye decolorization activity under repeated-batch conditions. The pellets showed and maintained the dye decolorization activity under non-sterile conditions. Because it is unpractical to use the sterilization and sterile medium, decolorization under non-sterile conditions has great value.

KEYWORDS: Dye decolorization, Fungal pellets, Peroxidase, White rot fungus

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamı yönlendiren, araştırmalarımın her aşamasında bilgi, öneri, yardımlarını esirgemeyerek anlayışı ve sabrıyla akademik ortamda olduğu kadar beşeri ilişkilerde de engin fikirleriyle yetişme ve gelişmeme katkıda bulunan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA'ya

İnönü Üniversitesi'ne yatay geçiş yaparak tez çalışmamı gerçekleştirmeme vesile olan Ankara Üniversitesi' ndeki danışman hocam Sayın Prof. Dr. Cumhuri ÇÖKMÜŞ'e

Hem laboratuvar çalışmalarım sırasında hem de tez yazım aşamasında öneri ve desteğiyle değerli vaktini ayırarak bana yol gösteren hocam Sayın Doç. Dr. Emre BİRHANLI'ya

Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda yardımlarıyla bana destek olan arkadaşım Dr. Ayfer SERİNDAG KILIÇ'a ve bu laboratuvarda birlikte çalıştığım tüm arkadaşlarıma

Güler yüzlü ve paylaşımcı tavırlarıyla bana yardımcı olan Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda görev yapan tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma

Tez sürecinde manevi desteklerini esirgemeyen Malatya Eğitim Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı'nda birlikte mesai yaptığım tüm uzmanlarıma ve arkadaşlarıma

Bu tez çalışmasını, 2014/30 nolu proje ile maddi destek sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi'ne

Hayatım boyunca olduğu gibi tez çalışmalarım sırasında da manevi desteklerini hep hissettiğim aileme

Bana olan desteği ve güveniyle her daim yanımda duran, beni sevgisiyle yücelten, varlığıyla güçlü kılan ve hayat arkadaşım olmasından onur duyduğum, eşim Utku ATIK'e

Bu çalışmamın size armağan olması dileğiyle evlatlarım, Derin ve Doruk'a

çok teşekkür ederim...

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Beyaz Çürükçül Funguslar.....	1
1.2. Beyaz Çürükçül Fungusların Uygulama Alanları.....	1
1.3. <i>Bjerkandera adusta</i>	2
1.4. Ligninolitik Enzimler.....	4
1.4.1. Lakkaz.....	4
1.4.2. Lignin Peroksidaz	5
1.4.3. Mangan Peroksidaz	6
1.4.4. Turp Peroksidazına Benzer Peroksidaz	7
1.5. Boyar Madde.....	7
1.6. Boyar Maddelerin Renk Giderim Metotları.....	8
1.7. Funguslarla Boyar Maddelerin Renginin Giderimi	10
2. KAYNAK ÖZETLERİ	11
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	21
3.1. Çalışmada Kullanılan Fungus	21
3.2. Çalışmada Kullanılan Fungusun Devamlılığının Sağlanması	21
3.3. Fungus Stok Kültürünün Hazırlanması.....	21
3.4. Fungus Pelletlerinin Hazırlanması	21

3.5.	Fungusun Enzim Üretim Yeteneğinin Araştırılması.....	22
3.5.1.	Fungusun Sabouraud Dekstroz Agar Besiyerinde Enzim Üretim Yeteneğinin Saptanması	22
3.5.2.	Fungusun Kesikli Süreçte Sıvı Besiyerinde Enzim Üretim Yeteneğinin Saptanması	22
3.5.3.	Fungusun Katı Faz Fermentasyonu Sürecinde Enzim Üretim Yeteneğinin Saptanması	23
3.6.	Enzim Aktivitelerinin Saptanması	23
3.7.	Ham Enzim Kaynaklarının Optimum pH Aralığının Saptanması	24
3.8.	Ham Enzim Kaynağının Optimum Sıcaklık Aralığının Saptanması	24
3.9.	Fungusun Renk Giderim Yeteneğinin Saptanması	24
3.9.1.	Fungusun Renk Giderim Yeteneğinin Boyar Madde İçeren Sabouraud Dekstroz Agar Ortamlarında Saptanması	24
3.9.2.	Fungusun Renk Giderim Yeteneğini Sıvı Ortamda Saptanması.....	24
3.9.3.	Fungal Pelletlerin Renk Giderim Yeteneğinin Saptanması	25
3.10.	Ham Enzim Kaynağının Renk Giderimi Aktivitesinin Saptanması	26
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA	27
4.1.	<i>Bjerkandera adusta</i> 'nın Mangana İçeren ve İçermeyen Katı Besiyerlerinde Üretimi Sürecinde Enzim Varlığının İzlenmesi.....	27
4.2.	<i>Bjerkandera adusta</i> 'nın Sıvı Besiyerinde Üremesi ve Enzim Üretimi.....	28
4.2.1.	<i>Bjerkandera adusta</i> 'nın Statik Koşullarda Üretim Sürecinde Enzim Üretimi.....	28
4.2.2.	<i>Bjerkandera adusta</i> 'nın Çalkalamalı Koşullarda Üretimi Sürecinde Enzim Üretimi	30
4.3.	<i>Bjerkandera adusta</i> 'nın Katı Faz Fermentasyonu Sürecinde Enzim Üretimi.....	31
4.4.	Ham Peroksidaz Enziminin Optimum Çalıştığı pH ve Sıcaklık Aralığı.....	33

4.4.1.	pH'nin Optimizasyonu	33
4.4.2.	Sıcaklığın Optimizasyonu	34
4.5.	<i>Bjerkandera adusta</i> 'nın Renk Giderim Yeteneği	35
4.5.1.	<i>Bjerkandera adusta</i> 'nın Boyar Madde İçeren Katı Besiyerinde Renk Giderim Yeteneği	35
4.5.2.	<i>Bjerkandera adusta</i> 'nın Boyar Madde İçeren Sıvı Ortamlarda Kesikli Üretim Sürecinde Renk Giderim Yeteneği	36
4.5.2.1.	<i>Bjerkandera adusta</i> 'nın RB 171 İçeren Stok Temel Ortamda Kesikli Üretim Sürecinde Renk Giderim Yeteneği	36
4.5.3.	<i>Bjerkandera adusta</i> Pelletlerinin Boyar Madde İçeren Distile Su Ortamlarında Renk Giderim Yeteneği	40
4.5.3.1.	<i>Bjerkandera adusta</i> Pelletlerinin RB 171 İçeren Distile Su Ortamlarında Renk Giderim Yeteneği	41
4.5.3.2.	<i>Bjerkandera adusta</i> Pelletlerinin İndigo Karmin İçeren Distile Su Ortamlarında Renk Giderim Yeteneği	42
4.5.3.3.	<i>Bjerkandera adusta</i> Pelletlerinin Remazol Brilliant Mavi R İçeren Distile Su Ortamlarında Renk Giderim Yeteneği	44
4.5.3.4.	<i>Bjerkandera adusta</i> Pelletlerinin Astrazon Mavi İçeren Distile Su Ortamlarında Renk Giderim Yeteneği	45
4.5.3.5.	<i>Bjerkandera adusta</i> Pelletlerinin Astrazon Siyah İçeren Distile Su Ortamlarında Renk Giderim Yeteneği	46
4.6.	Ham Enzim Kaynağının Renk Giderim Yeteneği	48
5.	SONUÇ VE ÖNERİ.	50
6.	KAYNAKLAR	51
7.	ÖZGEÇMİŞ.	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	<i>B. adusta</i> 'nın görüntüsü	3
Şekil 4.1.	Farklı konsantrasyonlarda mangan içeren ve içermeyen SDA ortamlarında üretilen <i>B. adusta</i> 'da peroksidaz varlığının renk oluşumuna bağlı olarak izlenmesi.....	27
Şekil 4.2.	Mangan içeren ve içermeyen SDA ortamlarında üretilen <i>B. adusta</i> 'da misel çapı değişimi.	28
Şekil 4.3.	<i>B.adusta</i> 'nın farklı konsantrasyonlarda mangan içeren STO'larda statik koşullarda 10 gün üretimi sonrası kültürlerdeki renk ve üreme değişimi.....	29
Şekil 4.4.	<i>B.adusta</i> 'nın farklı konsantrasyonlarda mangan içeren STO'larda statik koşullarda 10 gün üretimi sonrası saptanan peroksidaz aktiviteleri (U/L).	29
Şekil 4.5.	<i>B.adusta</i> 'nın farklı konsantrasyonlarda mangan içeren STO'larda çalkalamalı koşullarda 10 gün üretimi sonrası kültürlerdeki renk değişimi.....	30
Şekil 4.6.	<i>B.adusta</i> 'nın farklı konsantrasyonlarda mangan içeren STO'larda çalkalamalı koşullarda 10 gün üretimi sonrası saptanan peroksidaz aktiviteleri (U/L)	31
Şekil 4.7.	<i>B.adusta</i> 'nın katı faz fermentasyonu sürecinde 5 gün üretimi sonrası saptanan peroksidaz aktiviteleri (U/L).....	32
Şekil 4.8.	<i>B.adusta</i> 'nın katı faz fermentasyonu sürecinde 10 gün üretimi sonrası saptanan peroksidaz aktiviteleri (U/L).....	32
Şekil 4.9.	<i>B.adusta</i> 'nın 40 mM mangan içeren katı ortamda 5 gün üretimi sonrasında renk oluşumu	33
Şekil 4.10.	Reaksiyon pH'sının enzim aktivitesine etkisi.....	34
Şekil 4.11.	Reaksiyon sıcaklığının enzim aktivitesine etkisi	34
Şekil 4.12.	(A) RB 171, (B) İndigo Karmin ve (C) RBBR içeren SDA ortamlarında <i>B.adusta</i> 'nın üremesine bağlı renk giderimi.....	36

Şekil 4.13.	<i>B.adusta</i> 'nın statik koşullarda üretimi sürecinde RB 171 renk değişimi.....	37
Şekil 4.14.	<i>B.adusta</i> 'nın çalkalamalı koşullarda üretimi sürecinde RB 171 renk değişimi.....	37
Şekil 4.15.	<i>B. adusta</i> 'nın RB 171 içeren STO'larda statik ve çalkalamalı koşullarda üretimi sürecinde zamana bağlı renk giderimi.....	38
Şekil 4.16.	<i>B. adusta</i> 'nın statik koşullarda 48 saat üretim sonrası İndigo Karmin renk değişimi.....	38
Şekil 4.17.	<i>B. adusta</i> 'nın çalkalamalı koşullarda 48 saat üretimi sonrası İndigo Karmin renk değişimi	39
Şekil 4.18.	<i>B. adusta</i> 'nın İndigo Karmin içeren STO'larda statik ve çalkalamalı koşullarda üretimi sürecinde zamana bağlı renk giderimi	39
Şekil 4.19.	<i>B. adusta</i> 'nın çalkalamalı koşullarda 48 saat üretimi sonrası RBBR renk değişimi.....	40
Şekil 4.20.	<i>B. adusta</i> 'nın 150 mg/L RBBR içeren STO'larda statik ve çalkalamalı koşullarda üretimi sürecinde zamana bağlı renk giderimi	40
Şekil 4.21.	Fungal pelletlerin farklı konsantrasyonlarda RB171 içeren distile su ortamlarında inkübasyonu sürecinde renk giderimi.....	41
Şekil 4.22.	Fungal pelletlerle tekrarlı kesikli süreçte RB171'in renginin giderimi.	42
Şekil 4.23.	Fungal pelletlerle kesikli süreçte İndigo Karmin'in renginin giderimi	43
Şekil 4.24.	Fungal pelletlerle tekrarlı kesikli süreçte İndigo Karmin'in renginin giderimi	43
Şekil 4.25.	Fungal pelletlerle kesikli süreçte RBBR'nin renginin giderimi	44
Şekil 4.26.	Fungal pelletlerle tekrarlı kesikli süreçte RBBR'nin renginin giderimi.	45
Şekil 4.27.	Fungal pelletlerle kesikli süreçte Astrazon Mavi'nin renginin giderimi.	45
Şekil 4.28.	Fungal pelletlerle tekrarlı kesikli süreçte Astrazon Mavi'nin renginin giderimi	46
Şekil 4.29.	Pellet uygulaması sonucu Astrazon Siyah içeren distile su ortamlarında renk giderimi.....	47

Şekil 4.30. Fungal pelletlerin farklı konsantrasyondaki Astrazon Siyah boyasının renginin giderimi.....	47
Şekil 4.31. Fungal pelletlerin tekrarlı kesikli süreçte Astrazon Siyah'ın renginin giderimi	48
Şekil 4.32. Ham enzim kaynağının boyar madde renk giderimi.....	49



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Boyar maddelerin çeşitli özelliklerine göre sınıflandırılması.....	8
Çizelge 1.2. Boyar maddelerin renk giderim metotları.....	9
Çizelge 3.1. Stok temel ortamın (STO) içeriği	22



SİMGELER VE KISALTMALAR

ABTS	2,2'-Azino-bis (3-etilbenztiazolin-6-sülfonik asit)
DMP	Dimetoksifenol
DyP	Peroksidatif renk giderim
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HRP	Turp peroksidazı
kDa	Kilodalton
Lac	Lakkaz
LiP	Lignin peroksidaz
mM	Milimolar
MnP	Mangan peroksidaz
MnSO ₄	Mangan sülfat
PAHs	Poliaromatik hidrokarbonlar
RBBR	Remazol Brilliant Mavi R
RB171	Reaktif Mavi 171
RBP	RBBR <i>Bjerkandera</i> peroksidaz
rpm	Dakikada dönme hızı
SDA	Sabouraud Dekstrozu Agar
SDB	Sabouraud Dekstrozu Broth
STO	Stok temel ortam
TP	Turp peroksidazına benzer peroksidaz
U/L	Ünite/Litre
U/mg	Ünite/Miligram
VA	Veratril alkol

1. GİRİŞ

1.1. Beyaz Çürükçül Funguslar

Funguslar besinsel değerleri ve sentezledikleri sağlık açısından önemli metabolitlerden dolayı uzun yıllardır ilgi çekmektedir. Bunun yanı sıra, endüstriyel uygulamalardaki potansiyel yönleriyle de öne çıkan önemli biyolojik sistemlerdir [1]. Fungusların biyolojik iyileştirme (biyoremediasyon) ajanı olarak da önemli potansiyeli bulunmaktadır [2].

Funguslar arasında çürükçül funguslardan olan beyaz çürükçül funguslar biyoteknolojik açıdan büyük bir öneme sahiptirler [3]. *Basidiomycetes* sınıfına dahil olan beyaz çürükçül funguslar, odunsu dokuları (selüloz, hemiselüloz ve lignin) besin kaynağı olarak kullanarak ağaçlarda çürümeye neden olur ve ligninolitik aktiviteleri sonucu ürettiği kısımda beyaz renk oluşumuna yol açar [4].

Beyaz çürükçül fungusların güçlü bir karbon ve enerji kaynağı olan selüloza ulaşabilmeleri için öncelikle kompleks ve heterojen aromatik biyopolimer olan sert yapıdaki lignin tabakasını aşması gerekir [5]. Bu funguslar lignini yıkmak için özgüllükleri düşük olan ve güçlü oksidatif aktivite gösteren çeşitli hücre dışı enzimleri kullanırlar [6]. Beyaz çürükçül fungusların ligninin yıkımından sorumlu olan, kendilerine özgü karakteristik enzim sistemleri vardır ve sekonder metabolizmaları esnasında üretilen hücre dışı oksidatif enzimlerine lakkaz ve peroksidaz enzimleri örnek verilebilir. Bunlar arasında lignin peroksidaz (LiP), mangan bağımlı peroksidaz (MnBP), mangan bağımsız peroksidaz (MnBsP) ve lakkaz (Lac) enzimlerini sayabiliriz [7]. Bu enzimlerin substrat özgüllükleri düşük olduğundan, bu funguslar ligninin yanı sıra farklı ksenobiyotikleri ve kirleticileri de yıkabilmektedir.

1.2. Beyaz Çürükçül Fungusların Uygulama Alanları

Beyaz çürükçül funguslarla özellikle çevre biyoteknolojisi açısından yoğun araştırmalar yürütülmektedir. Funguslar odundan lignin giderimi, boyar madde renk giderimi ve atıksuların biyolojik iyileştirilmesi çalışmalarında biyolojik sistem olarak kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra özellikle son yıllarda fungusların aromatik

maddeler veya ksenobiyotik maddelerin arıtımında ve yıkımında kullanımı üzerine yoğun araştırmalar vardır [8-16].

Beyaz çürükçül fungusların biyoteknolojide uygulamalarının bir kısmını aşağıdaki gibi örneklendirebiliriz:

- a) Medikal etkiler [1]
- b) Biyolojik kağıt hamuru üretimi [17]
- c) Biyolojik beyazlatma [18]
- d) Ksenobiyotiklerin biyolojik iyileştirilmesi [8, 9]
- e) Poliaromatik hidrokarbonların yıkımı [10]
- f) Boyar madde yıkımı [14, 15]
- g) Enzim üretimi [3, 19-21]
- h) Ağır metal giderimi [22]
- i) Atık suların biyolojik iyileştirilmesi [11, 23-25]
- j) Biyoyakıt üretimi [26]
- k) Sentezledikleri enzimlerin nanobiyoteknolojide biyosensör olarak kullanımı [27, 28]
- l) Bitkisel kütleden lignin giderimi [29]

1.3. *Bjerkandera adusta*

Çalışmada kullanılan *Bjerkandera adusta* (*B. adusta*), *Meruliaceae* ailesine dahil bir beyaz çürükçül fungustur. Fungusun 1800'lü yıllarda Petter Adolf Karsten tarafından *Bjerkandera adusta* olarak adlandırılması günümüzde de kabul gören bilimsel adıdır [30].

B. adusta'nın günümüzde kabul gören sistematigi aşağıdaki gibidir:

Alem:	Fungi
Filum:	Basidiomycota
Sınıf:	Basidiomycetes
Ordo:	Polyporales
Familya:	Meruliaceae
Cins:	<i>Bjerkandera</i>
Tür:	<i>Bjerkandera adusta</i>

B. adusta, doğada, genellikle kurumuş ağaç ve kütükler üzerinde gözlenir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. *B. adusta*'nın görüntüsü

B. adusta, diğer birçok beyaz çürükçül fungus gibi salgıladığı ligninolitik enzimleri (lakkaz, lignin peroksidaz, mangan peroksidaz gibi) sayesinde lignin yıkım ve mineralizasyonunda rol oynar [3]. Ligninolitik enzimler, boya ve tekstil atık sularında renk gideriminin sağlanmasıyla da çevre kirliliğinin önlenmesine katkıda bulunmaktadır [31, 32].

B. adusta ile biyolojik iyileştirme, tarım ve endüstrinin sebep olduğu pestisit, toksik ksenobiyotikler, poliaromatik hidrokarbonlar (PAHs) ve klorofenoller gibi çevre kirleticilerinin biyoarıtımına yönelik çalışmalar da yapılmaktadır.

Fungusların ligninolitik enzimleri üretme kabiliyetleri, fungus türleri hatta suşları arasında bile değişkenlik göstermektedir. Bu nedenle *B. adusta* ile yapılan çalışmalarda da farklı enzimatik aktiviteler görülebilmektedir [33]. Ayrıca kültür koşullarının *B. adusta* üzerinde lakkaz üretim yeteneğini değiştirdiği de bilinmektedir. *B. adusta* ile yapılan çalışmalarda, Tripathi vd. statik koşullarda yüksek besinli ortamda oldukça az lakkaz aktivitesi gözlemlenirken, Kaal vd.

ortama farklı miktarlarda eklenen besin kaynağına rağmen lakkaz aktivitesi saptanmadığını rapor etmişlerdir [3, 33]. Bununla birlikte, Mtui vd. biyolojik kontaktör kullanarak *B. adusta* ile yaptıkları çalışmada 50 U/mL lakkaz aktivitesi saptadıklarını rapor etmişlerdir [34].

1.4. Ligninolitik Enzimler

Bu enzimler, lignini ve çeşitli kimyasal yapıları yıkabilen özgül olmayan sistemlerdir. Bu enzimlerin düşük substrat özgülükleri çeşitli bileşiklerini oksitleyebilmelerini sağlar.

1.4.1. Lakkaz

Lakkazlar (Lac, E.C.1.10.3.2; *p*-difenol:oksijen oksidoredüktaz) çoklu bakır bölgeleri bulunan hücre dışı glikoprotein yapıda oksidoredüktaz enzimlerdir. İlk kez 1883’ de Yoshida tarafından *Rhus vernicifera* öz suyundan elde edilmiştir [35]. Lakkaz molekülü, üç redoks bölgesine dağılmış monomer başında genellikle dört bakır atomu içerir [27]. Katalitik aktivite gösterebilen bakır bağlanma bölgelerindeki bakır iyonları ışık Emilimi bakımından birbirlerinden farklıdır. Lakkaz enzimleri farklı spektrofotometrik yapıda bakır iyonuna (Tip 1, Tip 2 ve Tip 3) sahip olduklarından çoklu bakır içeren mavi proteinler olarak sınıflandırılırlar [36].

Lakkazlar, düşük substrat özgülüklerine bağlı olarak çok çeşitli difenolik bileşiklerin oksidasyonlarını katalizlemektedirler. Çoklu-bakır içeren lakkaz enzimleri, moleküler oksijeni kullanarak aromatik olan ve olmayan çeşitli bileşiklerin oksidasyonunu sağlarlar [37]. Lakkaz enzimlerinin oksidasyon potansiyelini arttıran sentetik aracı (mediatör) substratları vardır ve bunlar arasında ABTS, şiringaldazin, dimetoksifenol (DMP) ve hidroksibenzotriazol (HBT) başta gelmektedir [27]. Bu enzimler substrattan dört elektronu bir oksijen molekülüne transfer ederek oksijenin suya indirgenmesini sağlarlar.

Yapılan çalışmalarda; funguslar, bitkiler ve bakterilerden lakkaz enziminin izole edildiği gösterilirken, biyoteknolojik uygulama alanlarında fungal lakkaz kullanımının yaygınlığı göze çarpmaktadır. Funguslar içerisinde ise en çok beyaz çürükçül funguslarda lakkaz bulunmaktadır [38]. Beyaz çürükçül funguslardan elde edilen lakkazların pek çoğu 55-85 kDa molekül ağırlığında ve yaklaşık 500

aminoasitten oluşmaktadır. Lakkaz enziminin optimum pH aralığı 3.0-7.5; optimum sıcaklık aralığı ise 48-80°C arasında değişiklik göstermektedir. Lakkaz enziminin optimum pH değeri kullanılan substrata göre de değişmektedir [39].

Lakkaz enziminin endüstriyel ve biyoteknolojik kullanım alanları arasında;

- a) Atık su arıtımı [40, 41]
- b) Gıda endüstrisi [27, 42]
- c) Kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi [43, 44]
- d) Nanoteknolojide biyosensör [41, 45]
- e) Biyolojik iyileştirme-biyoremediasyon [11, 46-48]
- f) Kozmetik [49]
- g) Ksenobiyotiklerin biyoremediasyonu [50]
- h) Kot kumaşının beyazlatılması [51] sayılabilir.

1.4.2. Lignin Peroksidaz

Lignin peroksidaz (LiP, EC 1.11.1.14) ligninaz olarak da bilinmektedir. İlk kez *P. chrysosporium* 'un sınırlı azot kaynağı içeren besiyerinde üretimi ile keşfedilmiş olan hücre dışı bir enzimdir [52].

Lignin peroksidaz, glikoprotein yapısındadır ve yaklaşık olarak moleküler ağırlığı 40 kDA'dır. Bu enzim, oksidatif lignin yıkımını tek elektron aktarımıyla gerçekleştiren hidrojen peroksit (H_2O_2) bağımlı bir enzimdir. Klasik peroksidazlardan farkı ise, elektron yönünden zengin aromatik lignin bileşiklerinin oksidasyonunu gerçekleştirmesidir [53].

Lignin peroksidaz veratril alkolü veratraldehite oksitlemesiyle de bilinmektedir. Veratril alkolün kültür ortamına eklenmesinin, LiP üretimini arttırdığı ve fazla miktarda H_2O_2 'nin ortamda bulunmasının bile LiP aktivasyonunu engelleyemediği rapor edilmiştir [54]. Dolayısıyla veratril alkolün birçok substratın oksidasyonunda yararlı ya da zorunlu bir kofaktör olduğu söylenebilir [55]. Ayrıca ligninaz kararlılığı veratril alkol varlığında artmaktadır [56].

Beyaz çürükçül fungusların bir kısmında lignin peroksidaz varlığı rapor edilmiştir. Bu funguslara *P.chrysosporium*, *T. cervina*, *T. versicolor* ve *Bjerkandera* sp. örnek verilebilir [16, 57]. Çeşitli çalışmalarda LiP'nin dayanıklı aromatik

bileşikleri mineralize edebildiği ve polisiklik aromatik hidrokarbonları okside edebildiği gösterilmiştir [58, 59].

1.4.3. Mangan Peroksidaz

Mangan peroksidaz (MnP, EC 1.11.1.13) ilk kez *P. chrysosporium*'da bulunmuştur [60]. Ekstrasellüler glikoprotein olan bu enzimler demir protoporfirin IX (hem) grubu içerirler. MnP izoenzimlerinin moleküler ağırlıkları 40-50 kDa arasında değişmektedir [61, 62]. Yani çeşitli izozimleri vardır.

Bu enzim adını, ortamda H_2O_2 varlığında mangani kofaktör olarak kullanmasından almaktadır. MnP'ler, mangan iyonları ile indüklenip Mn^{2+} 'yi Mn^{3+} 'e oksitleyerek ligninin ve fenolik lignin polimerlerinin oksidasyonunu ve depolimerizasyonunu sağlamaktadırlar [63]. Birçok beyaz çürükçül fungusun da bu enzimi ürettiği rapor edilmiştir [13, 61, 64, 65].

MnP'in katalizlediği reaksiyon H_2O_2 ve Mn^{2+} 'ya bağımlıdır. H_2O_2 ve organik peroksitin doğal ferrik enzime bağlanması sonucunda Demir-peroksit kompleksinin oluşumu ve hem grubundan 2 elektron transfer ile peroksit oksijen-oksijen bağının kırılması sonucunda MnP I (Fe^{4+} -oksoporfirin radikal kompleksi oluşumudur. Bu süreçte bir su molekülü meydana çıkar. Sonraki süreçler MnP II (Fe^{4+} -oksoporfirin kompleksi) ile yürür. Süreçlerde Mn^{2+} elektron verici olarak rol oynar ve Mn^{3+} oluşur. Döngünün bütününde doğal enzim tekrar oluşur [61]. Yani sürecin bütününde okside olan MnP I ve MnP II yer alır. MnP I esas olarak Mn^{2+} 'yi Mn^{3+} 'e oksitlerken MnP II'de fenolik bileşiklerin oksidasyonunu sağlar.

MnP enzimi aromatik hidrokarbonlar ve boyar maddeler gibi çeşitli maddeleri, düşük substrat özgülüğüne bağlı olarak yıkabilmektedir [66-68].

1.4.4. Turp Peroksidazına Benzer Peroksidaz

Turp peroksidazı (HRP, Horseradish peroksidaz) substrat olarak o-dianisidine gibi substratları oksitleyebilen tipik bir bitki peroksidazıdır. Turp peroksidazına (TP) benzer katalitik aktivite gösteren hücre dışı peroksidaz aktivitesi birçok fungusla yapılan çalışmada da rapor edilmiştir. *Bjerkandera adusta* CCBAS 930 (R59) suşu ile yapılan çalışmalarda peroksidaz aktivitesine bağlı olarak antrakininik boyalar, daunomisin, hümik asit ve lignin gibi kompleks bileşiklerin renk giderimi ve yıkımı

bildirilmiştir. Bunun TP benzeri bir aktive olduğu vurgulanmaktadır. 2005 yılında daunomisinin renginin giderimi ile ilgili bir çalışmada TP benzeri aktivitenin düşük de olsa farklı kültür koşullarında varlığı rapor edilmiştir [69]. Daunomisin renk gideriminin peroksidaz değişimine ya da artışına bağlı olduğu, 2006 yılında yapılan bir çalışmada belirtilmiştir [70]. Yine, 2008 yılında yapılan bir çalışmada da lignin ve hümik asitin renk gideriminde ekstraselüler aktivitenin önemi vurgulanmıştır [71]. Benzer olarak, RBBR ve Poly-R gibi antrakinonik boyaların renk gideriminde TP benzeri peroksidazın etkin rol oynadığı da bildirilmiştir [72]. Yabanıl ve mutant *Bjerkandera adusta* CCBAS 930 (R59) suşlarının enzim aktivitelerinin karşılaştırıldığı 2014 yılında yapılan bir çalışmada, boyar madde içermeyen kültür ortamlarında hem yabanıl hem de mutant suşta TP benzeri ve mangan bağımlı peroksidaz aktivitesi saptanamamıştır. Boyar madde içeren koşullarda ise dikkat çeker düzeyde enzim aktiviteleri elde edilmiştir [73]. Mikroskobik funguslarla yapılan diğer bir çalışmada da endüstriyel ligninin (%0.2) yıkımında TP benzeri bir aktivitenin varlığı rapor edilmiştir [74].

1.5. Boyar Madde

Bir materyale kendiliğinden veya uygun reaksiyon maddeleri aracılığıyla renk veren maddelere "boya" denir. Renkli organik bileşikler kromofor grupları taşırlar. Işığın absorblandığı dalga boyu kromoforik ve oksokrom bileşenlerine göre değişmektedir. Boyar maddeler çeşitli özelliklerine göre (köken, kimyasal ve fiziksel özellikler, çözünürlük ve boyama özellikleri gibi) göre sınıflandırılabilirler (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Boyar Maddelerin Çeşitli Özelliklerine Göre Sınıflandırılması [75]

Boyar Maddelerin Sınıflandırılması		
Çözünürlüklerine Göre	Kimyasal Yapılarına Göre	Boyama Özelliklerine Göre
*Suda çözünen boyar maddeler - Anyonik - Katyonik - Noniyonik *Suda çözünmeyen boyar maddeler - Substratta çözünen -Organik çözücülerde çözünen -Geçici çözünürlüğü olan -Polikondenzasyon -Elyaf içinde oluşturulan - Pigmentler	*Azo boyar maddeler *Nitro ve nitrozo boyar maddeler *Polimetin boyar maddeler *Arilmetin boyar maddeler *Aza (18) annulen boyar maddeler *Karbonil boyar maddeler *Kükürt boyar maddeler	* Küpe boyar maddeleri *Direkt boyar maddeler *Reaktif boyar maddeler *Dispers boyar maddeler *Asit boyar maddeler *Bazik boyar maddeler

1.6. Boyar Maddelerin Renk Giderim Metotları

Boyaların çoğu sentetik olup, bu boyalar tekstil sanayinin birçok alanı, deri tabaklama, kağıt üretimi, gıda teknolojisi, tarımsal araştırmalar, fotoelektrokimyasal hücreler, saç boyası gibi birçok endüstriyel alanda kullanılmaktadır [76, 77].

Boya Sanayicileri Derneği, BOSAD'ın bildirdiğine göre, küresel boya pazarının büyüklüğü, günümüzde 130 milyar dolara ulaşmıştır ve dünya boya üretimi bugün 51 milyon ton civarında gerçekleşmektedir [78]. Dünya çapında yıllık olarak 7×10^5 ton ve yaklaşık 10000 farklı boya ve pigment üretilmektedir [79]. Üretilen boyaların üçte ikisi tekstil sektöründe kullanılmaktadır. Türkiye dünya pazarının yaklaşık %2'sine

sahiptir ve 2014’de Türk boya ve hammaddeleri sektöründe yaklaşık 903 bin ton üretim oluşmuştur [78].

Dünyada her yıl 80000 tondan daha fazla reaktif boya üretilmekte ve tekstil boyamasında kullanılmaktadır [80]. Tekstil endüstrisinde boyaların karıştığı atık suyun her yıl en az 280 ton olduğu rapor edilmiştir [77].

Tekstil endüstrisinde kullanılan azo boyalar, boyaların %60-70’lik kısmını oluşturan en geniş gruptur. Azo boyaların, anaerobik yıkımı sonucunda toksik ve karsinogenik etkilerinin ortaya çıktığı bilinmektedir [81, 82].

Boyar madde ve tekstil endüstrisinden oluşan atık sular, önemli derecede çevre kirliliği problemlerini beraberinde getirmiş ve dolayısıyla çevre sağlığını tehdit eder hale gelmiştir. Bu nedenle atık suların arıtımı ve renk giderimi araştırmacıların ilgisini çekmektedir.

Boyar maddelerin gideriminde fiziksel, kimyasal ve biyolojik metotlar kullanılabilmektedir (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. Boyar Maddelerin Renk Giderim Metotları [82, 83]

Boyar Maddelerin Renk Giderim Metotları		
Fiziksel Yöntemler	Kimyasal Yöntemler	Biyolojik Yöntemler
- Adsorpsiyon - Membran filtrasyonu - İyon değişimi - Radyasyon	- Oksidasyon - H ₂ O ₂ -Fe(II) tuzları (Fenton ayırıcı) - Ozon - Fotokimyasal yöntem - Sodyum hipoklorit (NaOCl) - Elektrokimyasal yöntem - Kimyasal flokleştirme ve çöktürme yöntemi	- Aerobik yöntem (Beyaz çürükçül funguslar dahil mikroorganizmalar) - Anaerobik yöntem - Biyosorpsiyon (Beyaz çürükçül funguslar dahil çeşitli organizmalar)

Kimyasal ve fiziksel yöntemlerin biyolojik yöntemlere göre çeşitli dezavantajları bulunmaktadır. Biyolojik yöntemlerin özellikle özgül biyolojik yöntemlerin çevre dostu uygulamalar olduğu bilinmektedir. Biyolojik yöntemler içerisinde de uygulamaya göre dezavantajlı olanlar bulunmaktadır. Örneğin boyar maddelerin yıkıma karşı dirençli dizayn edilmeleri aktif çamur sisteminin boyar maddelerin iyileştirilmesinde yetersiz kalmasına yol açmaktadır. Yine, azo boyar maddelerin anaerobik süreçle biyolojik yıkımı sonucunda aromatik aminlerin oluşması ciddi bir problemdir. Çünkü aminler sitotoksik, mutajenik ve/veya karsinogenik özellikler gösterebilmektedir. Bu sorunun anaerobik uygulamadan sonra aerobik bir uygulamanın yapılmasıyla aşılabileceği belirtilmektedir.

Biyosorpsiyon ise kullanılan biyokütleyle herhangi bir maddenin adsorbsiyonu ve bunun sonucunda uzaklaştırılması olarak ifade edilebilir. Canlı veya ölü organizmalar bu amaçla kullanılabilir. Tekstil atıksularının farklı içerikleri ve boyaların çeşitliliği mikrobiyal renk giderimini etkilemektedir. Boyar madde renk giderimi/yıkımı mikroorganizmaya ve boyar maddeye bağlı olarak değişmektedir. Boyar madde içeren atıksuyun toksikliği de ayrıca bir problemdir. Bu açılardan biyosorpsiyon uygulamaları da boyar madde giderimi için test edilmektedir [83-86].

1.7. Funguslarla Boyar Maddelerin Renginin Giderimi

Fiziksel ve kimyasal yöntemlerin dezavantajları ve geleneksel biyolojik yöntemlerin yetersiz kalmasından dolayı boyar madde yıkımında kullanılabilecek alternatif mikroorganizmalar ve enzimler test edilmektedir. Biyolojik arıtmada hedeflenen sonuca yani etkin renk giderimine ulaşmak için öncelikle uygun mikroorganizmayı saptamak gerekmektedir. Beyaz çürükçül fungusların boyar madde renk gideriminde kullanılabilecek etkili organizmalar olduğu bildirilmektedir. Bu fungusların lakkaz ve peroksidaz enzimleriyle pek çok ksenobiyotiği yıkabildiği bilinmektedir. Funguslar ve enzimlerinin geniş substrat özgüllükleri biyoremediasyonda etkili olmalarını sağlamaktadır. Bu özelliklerine bağlı olarak da literatürde pek çok boyar maddenin rengini giderebildiklerini gösteren çalışmalar mevcuttur. Araştırmalar özellikle etkili boyar madde renk giderimi yapan beyaz çürükçül fungus suşlarının saptanması ve bu amaçla kullanılması üzerine yoğunlaşmıştır. *B. adusta* da etkili boyar madde renk giderimi yapabilecek beyaz çürükçül fungus türlerinden biridir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Kaal vd. yaptıkları bir çalışmada *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes* ve ayrıca *Bjerkandera* sp.'ye ait iki farklı suş ile azot sınırlı ortamda ligninolitik enzim aktivitelerini araştırmışlardır. Mangan bağımlı peroksidaz 5 fungusta da tüm kültür koşullarında saptanırken, mangan bağımsız peroksidaz yalnızca *Bjerkandera* suşlarında yüksek azotlu besiyerinde gözlenmiştir. Lakkaz ise *P. ostreatus* ile *L. edodes*'de yalnızca yüksek azotlu besiyerinde saptanmıştır. Sonuçlar, besiyeri azot miktarının ligninolitik enzim aktivitelerini etkilediğini ortaya koymuştur [33].

Wang vd. *Bjerkandera adusta* UAMH 8258'in ürettiği mangan bağımlı peroksidazın saflaştırma, karakterizasyon ve kimyasal modifikasyonu üzerine yaptıkları bir çalışmada 10 farklı *B. adusta* suşunu çalkalamalı koşullarda 16 gün inkübe etmişlerdir. Üreme ortamında lakkaz veya lignin peroksidaz aktivitesi gözlenmemiştir. Diğer yandan, *B. adusta* UAMH 8258 suşunda en yüksek mangan bağımlı peroksidaz aktivitesi (2.5 U/mL) 8. günde belirlenmiştir. Bu suşun 5 farklı substrat ile pH'ya bağlı katalitik aktivitesi incelenmiş ve tüm substratlarla en yüksek mangan bağımlı peroksidaz aktivitesi pH 5'de iken, DMP, ABTS ve VA için mangan bağımsız peroksidazın optimum pH'sı 3 olarak saptanmıştır. Modifiye edilen enzim, doğal enzime kıyasla hidrojen peroksit ve organik solventlere rağmen aktivite kaybına daha dirençli olmuştur. Modifiye edilen enzimin yüksek kararlılık özelliğinden dolayı, PAH yıkımı gibi pek çok alanda kullanılabileceği öne sürülmüştür [87].

Dinis vd. çeşitli beyaz çürükçül fungusları (*Trametes versicolor*, *Bjerkandera adusta*, *Ganoderma applanatum* ve *Phlebia rufa*) katı faz fermentasyonu sürecinde buğday samanını modifiye etmek için kullanmış ve 28 günlük katı faz fermentasyonu sonucunda en yüksek mangan bağımlı peroksidaz aktivitesi *P. rufa* (2.95 U/mL) ve *B. adusta*'dan (1.95 U/mL) elde edilmiştir. En düşük lakkaz aktivitesi *B. adusta*'da olup, kültürün 7. gününe kadar aktivite gözlenmiş ve sonrasında herhangi bir değişiklik kaydedilmemiştir. Hidroksisinnamik asit bileşenlerinin ve ligninin en fazla yıkımı fermentasyonun 14-21. günlerinde gerçekleşmiştir. Çalışmada fungal enzimlerin, ticari enzimlere nazaran biyolojik yıkımda daha etkin olduğu vurgulanmıştır [88].

Tripathi vd. *Bjerkandera adusta* ve *Lentinus squarrosulus* 'un lakkaz ve mangan bağımlı peroksidaz aktivitesini incelemişlerdir. ABTS içeren agar ortamında *L. squarrosulus* lakkaz aktivitesine bağılı olarak yüksek oksidasyon yapmış ve koyu yeşil renk zonu oluşturmuştur. *B. adusta* ise düşük oksidasyon yeteneği göstermiştir. Bu funguslar $MnCl_2$ içeren agar ortamında üretildiklerinde mangan bağımlı peroksidaz aktivitesine bağılı olarak gerçekleşen oksidasyon sonucu kahverengi renk oluşturmuştur. Lakkaz aktivitesi, sıvı kültür çalışmalarında yalnızca statik koşulda *B. adusta* için zengin içerikli ve *L. squarrosulus* için de zayıf içerikli besin kaynağı bulunan ortamda bulunmuştur. *B. adusta*'da en yüksek mangan bağımlı peroksidaz aktivitesi (215.9 U/L) zengin içerikli ortamda statik koşulda 15. günde kaydedilirken, *L. squarrosulus*'da yüksek besinli ortamda hem statik hem de çalkalamalı koşullarda saptanmıştır. Sonuç olarak, hücre dışı enzim aktivitesinin besiyeri içeriği ve kültür koşullarına bağılı olarak değişebileceği vurgulanmıştır [3].

Jarvinen vd. çeşitli beyaz çürükçül fungusların çalkalamalı koşullarda, farklı sıcaklık ve besiyerinde mangan bağımlı peroksidaz aktivitelerini araştırdığı diğer bir çalışmada besiyeri glikoz miktarına bağılı olarak en hızlı gelişim ve en yüksek mangan bağımlı peroksidaz aktivitesi, 800 U/L olarak *B. adusta*'da kaydedilmiştir [65].

Heinfling vd. *Pleurotus eryngii* ve *Bjerkandera adusta*'nın mangan oksitleyici peroksidazlarının farklı substratlarla etkileşimlerini incelemiş ve *B. adusta* MnP1'e Mn^{2+} eklendiğinde 180 U/mg, veratril alkol eklendiğinde 19 U/mg, Reaktif Siyah 5 eklendiğinde 6 U/mg ve ABTS eklendiğinde de 25 U/mg aktivite ölçülmüştür. Ayrıca *B. adusta* MnP'nin düşük konsantrasyonda ABTS'ye bile yüksek ilgisi olduğu saptanmıştır. Dolayısıyla, MnP izoenzimlerinin substrata göre farklı affinite gösterdiği vurgulanmıştır [89]. Yürütülen diğer bir çalışmada *B. adusta* ligninolitik peroksidazlarının, farklı konsantrasyonlarda Mn^{2+} ve veratril alkol varlığında RB5, RV5 ve RB38 renk giderim aktivitesi araştırılmıştır. RB5 için Mn^{2+} konsantrasyonu arttıkça renk giderim aktivitesi de artarken, RV5 için Mn^{2+} ilavesi (3mM) ile %42'lik renk giderimi sağlanmasına rağmen Mn^{2+} yokluğunda %87'lik renk giderimi elde edilmiştir. RB38 için ise Mn^{2+} konsantrasyonu arttıkça renk giderimi daha kısa zamanda gerçekleşmiştir. Bu durum, ortama eklenen manganın boyar madde renk

giderimi aktivitesi üzerine indükleyici ya da inhibe edici etki yapabileceğini göstermiştir [31].

Rodriguez vd. beyaz çürükçül fungusların metabolik ve enzimatik renk giderim aktivitesini 23 endüstriyel boya için incelemiş ve seçilen 16 suş ile katı faz fermentasyonunda enzim üretimi ve ham kültür özütüyle 5 farklı boyanın renk giderim aktivitesini araştırmışlardır. Katı faz fermentasyonunda doğal lignin kaynağı olan yulaf tahılı kullanılmıştır. *B. adusta* suşları yüksek mangan bağımlı peroksidaz aktivitesi, düşük lakkaz ve renk giderim aktivitesi göstermiştir. Sonuç olarak, katı faz fermentasyonu kaynaklı ham kültür özütündeki hücre dışı enzimler ile renk gideriminin, sıvı kültür koşullarına göre daha avantajlı olduğu vurgulanmıştır [47].

Swamy ve Ramsay, beyaz çürükçül fungus pelletlerinin boya karışımlarına karşı renk giderim yeteneklerini farklı kültür koşullarında araştırmış ve en yüksek renk gideriminin çalkalamalı koşullarda olduğu belirtilmiştir. *Bjerkandera* sp. BOS55 agar ortamında, kullanılan 5 boyanın rengini etkili bir şekilde giderirken, sıvı kültür ortamında statik koşullarda oldukça etkisiz kalmıştır. Bu fungus, çalkalamalı koşullarda ise 3 boya için yüksek renk giderim aktivitesi göstermiştir. Buna bağlı olarak, boyar maddenin yanı sıra kültür koşullarının da fungusun renk giderimini etkilediği rapor edilmiştir. Ayrıca *P. chrysosporium*, *Bjerkandera* sp. BOS55 ve *T. versicolor* ile çalkalamalı koşullarda ve tekrarlı süreçle yürütülen çalışmalarda, boyar maddeler ve boyar madde karışımlarının tekrarlı eklendiği uygulamalarda en etkili fungus *T. versicolor* olmuştur [90].

Moreira vd. yaptıkları bir çalışmada *Bjerkandera* sp.'nin (B33/3) Remazol Brilliant Mavi R (RBBR) renk giderim aktivitesi ve enzim üretimini çalkalamalı koşullarda araştırmışlardır. RBBR içeren ortamda ilk 5 güne kadar önemli oranda bir renk giderimi gözlenmezken, 11. günde %96 renk giderimine ulaşılmıştır. RBBR içeren ve içermeyen her iki kültür ortamında da lignin peroksidaz, mangan bağımlı peroksidaz ve mangan bağımsız peroksidaz aktivitesi saptanmıştır. Ham kültür özütüyle yapılan çalışmada RBBR konsantrasyonu 25 µM'a kadar arttıkça renk giderim oranı da artmıştır. Bunun üzerindeki konsantrasyonlarda ise düşmeye başlamıştır. RBBR renk giderimi mangan eksikliğinde gerçekleşmiştir. RBBR renk giderimini yapan enzim mangani, veratril alkolü ve 2,6 dimetoksifenolü mangan

bağımsız reaksiyonla oksitleyebilmekte ve RBBR'ye yüksek affinite göstermektedir. [91].

Moreira vd. yaptıkları diğer bir çalışmada *Bjerkandera* sp. B33/3 suşu tarafından üretilen ve RBBR renk giderimi sağladığı bilinen versatil peroksidazın saflaştırma, karakterizasyon ve tanımlanmasını araştırmıştır. RBP (RBBR *Bjerkandera* peroksidaz) olarak da adlandırılan bu enzimin Mn(II) varlığında DMP ile oksidasyonunda optimum pH 4.5-5.0 saptanırken, Mn(II) yokluğu ve EDTA varlığında optimum pH 3.0-3.5 olarak saptanmıştır. Bu enzim veratril alkol ve DMP'yi de mangan bağımsız reaksiyonlarla oksitlemektedir [92].

Axelsson vd. *Bjerkandera* sp. BOL13 suşunun Reaktif Kırmızı 2 ve Reaktif Mavi 4 ve bu boyar maddelerin karşımının renk giderim aktivitesini incelemiştir. Kesikli olarak yürütülen çalışmalar, fungusun her iki boyar maddenin rengini de giderdiğini göstermiştir. Bu fungusun sürekli sistemde, döner biyolojik bioreaktörde, Reaktif Kırmızı 2 ve Reaktif Mavi 4 boyar madde karışımı renk giderim yeteneği incelendiğinde ise 50 mg/L konsantrasyonda %96, 100 mg/L konsantrasyonda %94'e yakın renk giderim oranı saptanırken, 200 mg/L konsantrasyonda %80 renk giderimi saptanmıştır. Buna göre boyar madde konsantrasyonu arttıkça renk gideriminin azaldığı rapor edilmiştir. Ayrıca değişen glikoz konsantrasyonun renk giderimine etkisi araştırılmış, düşük boyar madde konsantrasyonunda glikoz konsantrasyonunun etkisi yokken, yüksek boyar madde konsantrasyonunda yüksek glikoz konsantrasyonu renk giderimini azaltmıştır [93].

Mohorcic vd. yaptıkları bir çalışmada çeşitli fungusların sentetik boyar madde renk giderim aktivitesini agar ortamında ve ayrıca sıvı çalkalamalı koşullarda incelemiş ve en etkili renk gideriminin *B. adusta* ve *T. versicolor* suşlarında olduğunu rapor etmişlerdir. Altı fungal suşun sentetik boya banyolarında renk giderimi aktivitesi incelendiğinde ise fungus gelişiminin oldukça yavaş olduğu gözlenmiş ve yine en iyi renk giderim aktivitesini *B. adusta*'nın gösterdiği rapor edilmiştir. *B. adusta*'dan elde edilen MnP enzimi içeren enzim örneği bazı boya banyolarının rengini farklı oranda giderebilmiştir. Sonuç olarak, *B. adusta* ve izole edilmiş MnP'nin çeşitli azo ve antrakinon boyar maddeleri içeren boya banyolarının renginin gideriminde kullanılabileceği yorumlanmıştır [94].

Eichlerova vd. çeşitli suşların sentetik boya renk giderimi yeteneklerini agar ortamında araştırmıştır. *B. adusta*, *P. chrysosporium* ve *P. ostreatus*'un en iyi renk giderimini sağladığı ve misel gelişiminde bir baskılama olmadığı rapor edilmiştir. Bu funguslarla agar ortamında boya konsantrasyonları arttırılarak yapılan çalışmada, yine etkili renk giderimi ve üreme (RBBR içeren ortam hariç) izlenmiştir. *B. adusta*'nın statik koşullarda farklı konsantrasyonlarda sentetik boya içeren ortamlarda renk giderim aktivitesi 28 gün süresince incelenmiştir. Artan boyar madde konsantrasyonunun biyokütle oluşumu üzerine oldukça az baskılama yaptığı rapor edilmiştir. Fungus, farklı kimyasal yapılarda olan boyar maddelerin yüksek konsantrasyonlarında (4 g/L) bile renk giderimi yapabilmektedir. Sonuçlar bu fungusun etkili renk giderimi yaptığını göstermiştir. *B. adusta*'da lakkaz ve mangan bağımlı peroksidaz aktivitesi saptanırken, lignin peroksidaz aktivitesi tespit edilmemiştir [95].

Tinoco vd. *B. adusta* UAMH 8258'den elde edilen versatil peroksidazın endüstriyel boyar maddelere karşı renk giderim aktivitesini incelemiştir. Mangan yokluğunda 27 boyanın, mangan varlığında ise 15 boyanın renk giderimi gerçekleşmiştir. Buna bağlı olarak, versatil peroksidaz redoks aracı molekül yokluğunda dahi direkt boya ile oksidasyona girdiğinden "boya peroksidazı" olarak adlandırmıştır. Yüksek renk giderimi sağlanan boyalarda ortama ilave olarak aracı molekül eklenmesi sonuç değiştirmemişken, düşük renk giderim elde edilen boyalarda ise aracı molekülün eklenmesi renk giderimini hızlandırmıştır. Ayrıca renk giderim oranındaki bu artışın seçilen aracı molekülün yanı sıra aracı molekülün konsantrasyonuna da bağlı olduğu saptanmıştır [96].

Robinson ve Nigam, arpa kabuğuna tutturulan boyar madde karışımının renk giderimini *Bjerkandera adusta* ve *Coriolopsis gallica* ile katı faz fermentasyonu sürecinde incelemiştir. Bu süreçte, *B. adusta* en iyi gelişim ve renk giderimini sağlamıştır. *B. adusta*'nın enzim aktiviteleri boya adsorbe edilen katı faz fermentasyonu koşullarında (%85 nem) 21 gün boyunca izlenmiştir. Çalışmada lakkaz aktivitesi oldukça az gözlenirken, 6. günden sonra hiç aktivite kaydedilmemiştir. Mangan bağımlı peroksidaz ise 9-15. günlerde en yüksek renk giderim aktivitesine (%80) ulaşmıştır. *B. adusta* 21. günde %53'lük renk giderimi sağlamıştır. Böylece, *B. adusta* ve ürettiği ligninolitik enzimlerin boya adsorbe

edilmiş çeşitli lignoselülozik atıkların biyoarıtımında kullanılabileceği vurgulanmıştır [21].

Nordström vd. *Bjerkandera adusta* BOL 13'ün tek tek ya da karışım şeklindeki boyar madde renk giderim yeteneğini farklı miktarlarda azot kaynağı içeren katı ve sıvı ortamlarda incelemiştir. Farklı oranlarda da olsa tüm boyalarda renk giderimi sağlanmıştır. Renk giderimini belirleyici etken ortamdaki azot miktarı olmuştur. Bu fungus kullanılarak "Döner biyolojik kontaktör" ile yapılan çalışmada, üçlü boyar madde karışımının (Reaktif Mavi 21, Reaktif Siyah 5 ve Reaktif Turuncu 13) renk giderimi glikoz miktarına bağlı olarak araştırılmış ve ortamdaki glikozun renk gideriminde etkisiz olduğu saptanmıştır. Bu koşullarda, %60-66 oranında renk giderimi rapor edilmiştir. En yüksek mangan bağımlı peroksidaz aktivitesinin glikoz yokluğunda pH 4.5'de olduğu saptanmıştır. Bu enzimin farklı pH'larda H₂O₂ varlığında aktivite sonuçları kaydedilmiş ve reaksiyona eklenen H₂O₂'nin oksidasyonu arttırdığı ve pH 5-6'da da yüksek olduğu ifade edilmiştir. Sonuçta, alkali pH'ya sahip tekstil atık sularının biyoremediasyonunda bu suşun kullanımının avantaj teşkil edeceği vurgulanmıştır [97].

Anastasi vd. farklı ekolojik gruplara ait fungus suşlarının renk giderim aktivitesini ve enzim üretimini agar ortamında ve statik koşullarda araştırmışlar ve her iki kültür ortamında da *B. adusta*'nın 3 suşu (MUT 2295, MUT 2843, MUT 3060) tüm boyaların renk giderimini sağlamıştır. *B. adusta* suşlarında statik koşullarda Lac, LiP ve AAO yok ya da yok denecek kadar az iken, MnBP ve MnBsP aktivitesi saptanmıştır. Bununla birlikte suşlar arasında farklı enzim aktivitesi ve renk giderimi rapor edilmiştir. Ayrıca seçilen 9 suşun çalkalamalı koşullarda 30 günlük süreçte boya karışımı renk giderimi araştırılmış ve yine *B. adusta* MUT 3060 ile en yüksek renk giderimi rapor edilmiştir. *B. adusta* MUT 3060 ile karışım boyanın renk giderim optimizasyonu yapılarak, en yüksek renk giderim aktivitesi 2. günde saptanmış ve kültürün 14. gününde ise %94'lük boyar madde yıkımı tespit edilmiştir. Bu fungusun çalkalamalı koşullarda enzim aktivitesi ise MnBP 363 U/L, MnBsP 57 U/L, Lac 6 U/L iken, LiP ve AAO aktiviteleri saptanmamıştır. Bu durum, kültür koşullarının funguslar ve ürettikleri enzimler üzerine farklı etkiler oluşturduğunu ortaya koymaktadır. *L. minor* ile yapılan detoksifikasyon testinde ise toksisite azalarak büyüme inhibisyon oranı düşmüştür. Dolayısıyla bu çalışmada, karsinogenik

ve toksik madde içeren atık suların biyoarıtımında fungusların kullanımının etkili bir alternatif olacağı vurgulanmıştır [98].

Anastasi vd. yaptıkları diğer bir çalışmada ise *B. adusta* MUT 3600'ün tekstil atık suyu biyoremediasyon yeteneğini incelemiştir. Bu fungusun çok zorlu ortamlarda üreyebileceği vurgulanmış ve fungus farklı atık suların renginin gideriminde yüksek düzeyde etkili olmuştur. En iyi renk gideriminin (%96) düşük besin koşullarında kaydedilmesinin yanı sıra tüm ortamlarda lakkaz ve lignin peroksidaz aktivitesi yok ya da yok denecek kadar az bulunmuştur. Mangan bağımlı peroksidaz ile renk giderimi arasında iyi bir ilişki olduğu gözlenmiş ve böylece bu enzimin tekstil boyalarının yıkımında anahtar rol oynadığı vurgulanmıştır. Mangan bağımsız peroksidaz ise ortamdaki besin miktarı ve atık su kaynağına göre aktivite ve pH değişkenliği göstermiştir. Dolayısıyla, ortam pH'sının fungus üzerinde önemli rol oynadığı da rapor edilmiştir. Ölü fungus ile renk giderimine bakıldığında ise ilk saatlerde hızlı renk giderimi oluşurken (%30), ardından renk giderimi hızla azalmıştır. Fakat bu durum canlı fungusta farklılık göstermiş ve çalışma sonlandırılana kadar renk giderimi devam etmiştir [99].

Qi-he vd. çeşitli beyaz çürükçül fungusların agar ortamında üreme yeteneklerini araştırmış ve *B. adusta*'nın *P. ostreatus* ile birlikte üretimi sırasında kahverengi hif oluşturduğunu saptamışlardır. Ayrıca RBBR içeren agar ortamında, tek petride farklı kombinasyonlarla 4 fungusun üretimi yapılmış ve renk giderimi gözlemlenmiştir. *P. eryngii* ve *P. ostreatus* net bir renk giderim zonu oluşturmuş ancak *H. fragiforme* renk giderimini uyarıcı etki göstermemiştir. *B. adusta*'da çalkalamalı koşullarda, lakkaz ve lignin peroksidaz aktivitesi saptanmamış bunun yanı sıra mangan bağımlı peroksidaz aktivitesi kaydedilmiştir. Enzim üretim farklılıklarının araştırılması için çalkalamalı koşullarda, ikili kombinasyonlarla funguslar üretilip, çeşitli enzim (Lac, LiP ve MnBP) aktiviteleri rapor edilmiştir. Fungusların ikili (birlikte) üretimine bağlı olarak farklı enzim aktiviteleri saptanmıştır. Sonuç olarak, fungusların birbirleriyle etkileşimlerinin enzim üretimine uyarıcı etki oluşturabileceği vurgulanmıştır [100].

Gomi vd. yaptıkları bir çalışmada *Bjerkandera adusta* Dec 1'in mangan bağımlı peroksidazı ile azo boyalara öncülük eden amaranth boyanın yıkımını incelemiştir. Kültürün ilk iki gününde mangan bağımlı peroksidaz aktivitesi kaydedilmemiş ancak renk giderimi gözlenmiştir. Bununla birlikte kültürün 10.

gününde %94 renk giderimi rapor edilmiştir. Ayrıca peroksidatif renk giderim (DyP) aktivitesinin oldukça düşük olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak, kültürün 10. gününde boyar maddedeki naftalin yapısı tamamen yıkılarak aromatik aminlerin oluşumu engellendiği belirtilmiştir. Yani enzimin renk giderimine etkisinin olmadığı, boyar madde azo bağlarının fungus tarafından indirgenme ya da hidroliz yoluyla yıkıldığı vurgulanmıştır. [101].

Jonstrup vd. çeşitli beyaz çürükçül fungusların çalkalamalı koşullarda azo boyaların renk giderim aktivitelerini araştırdıkları bir çalışmada ilk beş gün içerisinde tüm boyalarda ve hatta boya karışımında dahi %60'dan fazla renk giderimi kaydedilmiştir. *P. chrysosporium* ve *Bjerkandera* sp. BOL13'de en hızlı renk giderimi gözlenmiştir. Sonra *Bjerkandera* sp. BOL13'ün Remazol Kırmızı RR renk gideriminde pH optimizasyonu yapıp, yüksek pH'da bile renk giderim aktivitesi saptanmıştır. Bu fungusun ortamda Remazol Kırmızı RR varlığında lignin peroksidaz, lakkaz ve mangan bağımlı peroksidaz aktiviteleri de ölçülerek kültürün 5. gününde yüksek pH'da (pH 6.0) en yüksek mangan bağımlı peroksidaz aktivitesi ve renk giderimi rapor edilmiştir. Böylece alkali pH'ya sahip tekstil boyaları içeren atık suların renk gideriminde bu fungusun kullanımının avantaj olacağı vurgulanmıştır. Karbon kaynağının yardımcı substrat olarak etkin rol oynamasından dolayı ladin, söğüt ve buğday samanı ile ortama Remazol Kırmızı RR eklenerek alternatif kültür koşulları oluşturulup, bu kaynakların renk giderimi ve enzim aktivitesine etkisi de incelenmiştir. Buğday samanında en yüksek renk giderim aktivitesinin (%84, 13. gün) olduğu kaydedilirken, MnP ve Lac aktivitesi saptanmış ancak LiP aktivitesi bulunamamıştır. Ayrıca bu çalışmada *Bjerkandera* sp. BOL13'ün doğal koşullardaki çalışmalarda uygulanabilirliğinin teyit edilmesi amacıyla steril olmayan koşullarda, kapalı biyoreaktörde plastik ve lignoselülozik artık materyaller kullanılarak Remazol Kırmızı RR renk giderim aktivitesi de araştırılmıştır. Plastik biyoreaktörde renk giderimi yüksek iken, lignoselülozik biyoreaktörde de enzim aktiviteleri yüksek olarak bulunmuştur [102].

Kornillowicz-Kowalska ve Rybczyńska, *Bjerkandera adusta* CCBAS 930'ün agar ortamında glikoz miktarına bağlı, RBBR ve Poly R-478 boyalarının renk giderim yeteneğini inceledikleri bir çalışmada bu fungusun misel gelişimi ve renk gideriminde benzer sonuçlar gösterdiğini rapor etmişlerdir. RBBR için 7. günde ve

Poly R-478 için 10. günde %100 renk giderimi sağlanmıştır. Bununla birlikte yapılan sıvı kültürdeki renk gideriminin katı kültüre göre daha yavaş olduğu izlenmiştir. Glikoz içeren sıvı besiyerinde RBBR'nin 18. günde, Poly R-478'in 30. günde %95'lik renk giderimi sağlanmıştır. Renk gideriminde peroksidaz aktivitesine bakıldığında inkübasyonun 18. gününde RBBR içeren ortamda en yüksek peroksidaz aktivitesi 12.94 mU/mL iken, Poly R-478 içeren ortamda en yüksek peroksidaz aktivitesi 26.55 mU/mL olarak saptanmıştır. Bu fungusun turp peroksidazına benzer peroksidazının RBBR ve Poly R-478 gibi antrakinonik boyaların renk gideriminde kullanılabileceği vurgulanmıştır [72].

Kornilowicz-Kowalska ve Rybczyńska, *Bjerkandera adusta* CCBAS 930 ile yaptıkları diğer bir çalışmada, yabancı suş ile mutant suşun antrakinonik boyalar (AC ve Poly R-478) renk giderimini ve enzim aktivitelerindeki farklılıkları statik kültür koşullarında araştırmışlardır. Bu fungusun boyar madde renk gideriminde (4. günde AC %72, Poly R-478 %47 renk giderimi) etkinliği saptanırken, mutant suşlar renk gideriminde aktif olmamıştır. Ortamda boya olmadığında, yabancı suşun turp peroksidazına benzer peroksidaz ve mangan bağımlı peroksidaz aktivitesi saptanmamıştır. Ancak ortama boya eklendiğinde her iki enzim de kaydedilmiş ve turp peroksidazına benzer peroksidaz aktivitesinin mangan bağımlı peroksidaz aktivitesine göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Özellikle, ortama boya (Poly R-478) eklendiğinde mangan bağımlı peroksidaz aktivitesinin dikkat çekici düzeyde arttığı rapor edilmiştir. Mutant suşta ise ortamda boya olsa dahi turp peroksidazına benzer peroksidaz aktivitesi saptanmamış, ancak Poly R-478 varlığında mangan bağımlı peroksidaz aktivitesi az da olsa kaydedilmiştir. Bu durumdan farklı olarak ortamda boya varlığında hem yabancı hem de mutant suşda lakkaz ve lignin peroksidaz aktivitelerinin var olduğu rapor edilmiştir. Sonuç olarak, bu suşun ortamına belirli indükleyiciler eklendiğinde enzim aktivitesinin değişebileceği vurgulanmıştır [73].

Tiberius ve Catalin, *Bjerkandera adusta* ve *Trametes hirsuta*'nın çeşitli karbon ve azot kaynaklarıyla hazırlanan katı besiyerinde üreme yetenekleri ve boyar madde renk giderim aktivitelerini araştırmışlardır. *B. adusta*, on günlük kültür sürecinde tüm boyalarda renk giderimi göstermiş ve özellikle karbon kaynağı olarak sorbitol, mannitol ve sükroz kullanıldığında en yüksek üreme yeteneği ve renk giderim

aktivitesi kaydedilmiştir. Diğer yandan karbon kaynağı olarak laktoz kullanıldığında misel gelişimi ve renk gideriminin minimal olduğu görülmüştür. *B. adusta*, en iyi üreme yeteneğini azot kaynağı olarak malt özütü, bira mayası özütü ve pepton kullanıldığında göstermiş ancak peptonlu ortamdaki renk giderim aktivitesinin diğerlerine göre daha az olduğu kaydedilmiştir. Malt özütünün 10 g/L olduğu ortamda en iyi renk gideriminin olduğu rapor edilmiştir. Ancak, ortamdaki besin kaynaklarının konsantrasyonu arttıkça boyar madde renk giderim aktivitesinin düştüğü de vurgulanmıştır [32].

Choi vd. çeşitli beyaz çürükçül fungusların katı ve sıvı kültür koşullarında sentetik ve endüstriyel boyaların renk giderim aktivitesini incelemiş ve 222 beyaz çürükçül fungus suşundan pek çoğunun katı ortamda %70'den daha fazla renk giderim yeteneğine sahip olduğunu rapor etmiştir. Bilhassa *B. adusta* KUC 9065, *C. lacerata* KUC 8090, *P. calotricha* KUC 8003 ve *P. spadiceum* KUC 8602 suşları, hem katı hem de sıvı ortamda kullanılan tüm boyaların yüksek renk giderimini sağlamış ve bu 4 fungus suşu ile gerçek atık suyun renk giderimi araştırılmıştır. Atık suda en etkili renk giderimi *B. adusta* KUC 9065'de kaydedilmiştir. Bu fungus atık su ile hazırlanan besiyerinde 3 hafta süresince kültüre edilip enzim aktiviteleri ölçülmüştür. En yüksek lakkaz aktivitesi 6. günde (4.2 U/mL) ve mangan bağımlı peroksidaz aktivitesi 12. günde (48.3 U/mL) kaydedilmiştir (LiP aktivitesi bulunamamıştır). Atık su içermeyen sıvı besiyerinde ise oldukça düşük enzim aktiviteleri saptanmıştır. Ayrıca *Daphnia magna* ile yapılan toksisite testi sonucu, 24. saatte belirgin bir fark görülmezken, 48. saatte toksik birim (TB) 3.5'den 2.6'ya düşmüştür [103].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Fungus

Çalışmada, Prof. Dr. Özfer Yeşilada (İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü) tarafından doğadan toplandıktan sonra saf kültür olarak üretilmiş olan *Bjerkandera adusta* suşu kullanılmıştır. Bu suş bir beyaz çürükçül fungustur. Fungus, İnönü Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji laboratuvarında muhafaza edilmektedir.

3.2. Çalışmada Kullanılan Fungusun Devamlılığının Sağlanması

Bjerkandera adusta'nın kararlılık ve devamlılığının sağlanması için fungus ayda bir kez Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) besiyerlerine pasajlanmış ve 30 °C'de 6-7 gün inkübatörde üretildikten sonra +4 °C'de buzdolabında depolanmıştır.

3.3. Fungus Stok Kültürünün Hazırlanması

Petri kabında SDA besiyerlerinde üretilmiş *Bjerkandera adusta* öncelikle yatık agar ortamına transfer edilmiş ve 30 °C'de 6-7 gün inkübe edilmiştir. Yatık agarda üretilen kültüre steril koşullarda distile su eklenmiş ve öze ile steril koşullarda besiyeri yüzeyinden kazınarak misel süspansiyonu hazırlanmıştır. Bu süspansiyondan 100 mL Sabouraud Dekstroz Broth (SDB) içeren 250 mL'lik erlen ortamına 5 mL ekilmiş ve 30 °C ve 150 rpm'de 6-7 gün inkübe edilmiştir. Çalışmaya bağlı olarak stok kültür düşük devirde homojenize edilip kullanılmıştır.

3.4. Fungus Pelletlerinin Hazırlanması

Çalışmada kullanılacak fungal pelletlerin hazırlanması için Kısım 3.3'de belirtildiği şekilde hazırlanmış olan stok kültür düşük devirde homojenize edilmiş ve 7'er mL olacak şekilde 600 SDB/1000 mL erlen ortamına ekilerek 30 °C ve 150 rpm'de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Üretim sonrası pelletler steril koşullarda süzölmüş ve pellet çalışmalarında kullanılmıştır.

3.5. Fungusun Enzim Üretim Yeteneğinin Araştırılması

3.5.1. Fungusun SDA Besiyerinde Enzim Üretim Yeteneğinin Saptanması

Fungusun Mn-peroksidaz (MnP) üretilip üretilmediğinin saptanması için öncelikle agar ortamında ön çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla, 0, 2, 4, 6, 8, 10 mM MnSO₄ içerecek şekilde hazırlanmış SDA besiyerlerine *B. adusta* ekimi yapılmıştır. Ekim sonrası kültürler 30 °C’de inkübe edilmiş ve olası mangan oksidasyonuna bağlı olarak oluşan renk değişimi (kahverengi) izlenmiştir [104]. Çalışmada manganın fungus üremesine etkisinin izlenmesi amacıyla misel gelişimi izlenmiş ve misel gelişimi kontrole göre günlük olarak değerlendirilmiştir.

3.5.2. Fungusun Kesikli Süreçte Sıvı Besiyerinde Enzim Üretim Yeteneğinin Saptanması

Fungusun sıvı besiyerinde enzim üretim yeteneğini araştırmak için Birhanlı ve Yeşilada, 2010 tarafından önerilen stok temel ortam (STO) modifiye edilerek kullanılmıştır. STO içeriği Çizelge 3.1’de verilmiştir [105].

Çizelge 3.1. Stok temel ortamın (STO) içeriği

İçerik	Miktar
KH ₂ PO ₄	0.2 (g)
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.1 (g)
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.05 (g)
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.5 (g)
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.035 (g)
Glukoz	2 (g)
Maya Özütü	1 (g)
Distile su	1000 (mL)

Statik ve çalkalamalı koşullarda yürütülecek deneyler için sırasıyla 20 mL besiyeri/250 mL erlen ve 100 mL besiyeri/250 mL erlen olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda MnSO_4 (0, 2, 4, 10, 40 mM) içeren STO besiyerleri hazırlanmıştır. Kısım 3.3’de belirtildiği şekilde hazırlanmış stok kültürler düşük devirde homojenize edildikten sonra besiyerlerine steril koşullarda 3’er mL olacak şekilde ekim yapılmıştır. Kültürler statik koşullarda ve çalkalamalı koşullarda da 150 rpm’de 30 °C’de 10 gün üretilmiştir.

3.5.3. Fungusun Katı Faz Fermentasyonu Sürecinde Enzim Üretim Yeteneğinin Saptanması

Çalışmada katı faz olarak buğday kepeği ve soya unu kullanılmıştır [106]. Öncelikle buğday kepeği ve soya unu 24 saat boyunca 50 °C’de kurutulmuştur. Daha sonra, 3.5 g buğday kepeği + 1.5 g soya unu / 250 mL erlen olacak şekilde hazırlanmış ortamlara farklı konsantrasyonlarda MnSO_4 (0, 2, 4, 10, 40 mM) içeren 15 mL distile su eklenmiş ve 121 °C, 1 atm’ de 20 dakika otoklavda steril edilmiştir. Otoklav sonrası her bir ortama Kısım 3.3’de belirtildiği şekilde hazırlanmış ve homojenize edilmiş stok kültürden 3’er mL ekim yapılmıştır. Hazırlanan örnekler 30 °C’de statik olarak 5 ve 10 günlük süreçte inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 5. ve 10. gününde kültürlerin üzerine 30 mL distile su eklenmiş ve öze yardımı ile karıştırılmıştır. Erlenler 30 °C ve 150 rpm’de 90 dakika süreyle çalkalamalı etüvde çalkalandıktan sonra süzülerek sıvı filtrat ayrılmıştır. Filtrat 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiş ve elde edilen süpernatant enzim aktivitesi ölçümlerinde kullanılmıştır.

3.6. Enzim Aktivitelerinin Saptanması

Çalışmada fungusun üretim sürecinde lakkaz, mangan bağımlı peroksidaz (MnP) ve turp peroksidazına benzer peroksidaz (TP) aktivitesi araştırılmıştır. Lakkaz ölçümünde reaksiyon karışımı substrat olarak 2,2’-azino-bis (3-etilbenz-tiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) içeren asetat tamponu (100 mM, pH 5.0) ve uygun miktarda enzim kaynağı içerecek şekilde hazırlanmıştır. TP aktivitesi ölçümü için reaksiyon karışımına H_2O_2 eklenmiş ve MnP aktivitesini saptamak için reaksiyon karışımına ayrıca mangan eklenmiştir. Enzim aktiviteleri, 1 dakika süresince gerçekleşen ABTS

oksidasyonuna bağlı olarak 420 nm'deki absorbans değişimi ile izlenmiş ve enzim aktiviteleri U/L olarak ifade edilmiştir [105].

3.7. Ham Enzim Kaynaklarının Optimum pH Aralığının Saptanması

Ham enzim kaynaęı olarak katı faz fermentasyonu sūrecinde elde edilen sūpernatant kullanılmıřtır. pH optimizasyonunu saptayabilmek için farklı pH'larda (2.6-7.0) sitrat fosfat tamponları hazırlanmıřtır. Lakkaz aktivitesinin lūmūnde reaksiyon karıřımı 800 μL sitrat fosfat tamponu, 100 μL ABTS ve uygun miktarda sūpernatant iercek řekilde hazırlanmıřtır. TP aktivitesi lūmū için reaksiyon karıřımına ayrıca H₂O₂ eklenirken, MnP aktivitesinin lūmūnde reaksiyon karıřımı H₂O₂ ve mangan iercek řekilde hazırlanmıřtır. Enzim aktiviteleri 420 nm'de 30 °C'de 1 dakikada oluřan absorbans deęiřimine baęlı olarak saptanmıřtır.

3.8. Ham Enzim Kaynağının Optimum Sıcaklık Aralığının Saptanması

Enzim kaynaklarının optimum sıcaklık aralığının saptanması amacıyla enzim aktivite lūmleri pH çalışmasında saptanan optimum pH'da ve 4-70 °C arasında yapılmıştır. Enzim aktivite lūmleri Kısım 3.7'de belirtildiği şekilde yapılmıştır.

3.9. Fungusun Renk Giderim Yeteneğinin Saptanması

3.9.1. Fungusun Renk Giderim Yeteneğinin Boyar Madde İçeren SDA Ortamlarında Saptanması

Çalıřmada kullanılan fungusun renk giderim aktivitesi 100 mg/L Reaktif Mavi 171 (RB171), İndigo Karmin ve RBBR eklenmiř SDA besiyerlerinde arařtırılmıřtır. Bu amaçla hazırlanan ortamlara *B. adusta* ekilmiř ve 30 °C'de 7 gūn boyunca inkūbe edilmiřtir. Renk giderimi makroskobik olarak incelenmiřtir.

3.9.2. Fungusun Renk Giderim Yeteneğinin Sıvı Ortamda Saptanması

Otoklavda steril edilen STO'ya, toz haldeki RB171'den 100 mg/L olacak şekilde eklenmiştir. Statik ve kesikli çalkalamalı koşullar için sırasıyla 20 mL/250mL ve 100 mL/250mL olacak şekilde erlenlere aktarılmıştır. Hazırlanan ortamlara *B. adusta* ekildikten sonra statik koşullarda 30 °C, çalkalamalı koşullarda da 30 °C ve 150 rpm'de inkūbe edilmiştir. *B. adusta*'nın metabolik aktivitesine bağlı olarak oluşan renk giderimi 619 nm'de absorbans değişimi izlenerek saptanmış ve % renk giderimi

olarak ifade edilmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada *B. adusta*'nın İndigo Karmin ve RBBR renk giderim yeteneği de araştırılmıştır. Bu amaçla RB171 uygulamasındaki gibi boyar madde içerecek şekilde STO'lar hazırlanmıştır. Bu boyalar için son konsantrasyon 150 mg/L olacak şekilde uygulama yapılmıştır. Daha sonra bu ortamlara fungus ekilmiş ve üst kısımda belirtildiği şekilde inkübe edilmiştir. Fungusun kesikli statik ve çalkalamalı koşullarda renk giderim yeteneği 24. ve 48. saatlerde, İndigo Karmin için 613 nm'deki ve RBBR için 597 nm'deki absorbans değişiminin saptanmasıyla yapılmıştır.

3.9.3. Fungal Pelletlerin Renk Giderim Yeteneğinin Saptanması

Kısım 3.4'de belirtildiği şekilde hazırlanan pelletler 30g/250 mL erlen olacak şekilde erlenlere aktarılmış ve farklı konsantrasyonlarda (100, 150, 200 mg/L) RB171 içerecek şekilde hazırlanmış steril olmayan distile su eklenmiştir. Bu kültürler kesikli çalkalamalı koşullarda inkübe edilmiştir. Fungal pelletlerin, 100 mg/L RB171 içeren steril olmayan distile su ortamlarında tekrarlı kesikli çalkalamalı koşullarda da renk giderimi araştırılmıştır.

B. adusta pelletlerinin renk giderim aktivitesi farklı konsantrasyonlarda (100 ve 200 mg/L) İndigo Karmin ve RBBR içeren steril olmayan distile su ortamlarında da kesikli çalkalamalı koşullarda araştırılmıştır. Çalışma, tekrarlı kesikli çalkalamalı koşullarda da yürütülmüş ve 100 mg/L İndigo Karmin ve RBBR içeren steril olmayan distile su ortamlarında renk giderim aktivitesi saptanmıştır.

Çalışmada ayrıca pelletlerin Astrazon boya (Astrazon Mavi ve Astrazon Siyah) renk giderim aktivitesi de araştırılmıştır. Bu çalışmalar da kesikli çalkalamalı ve tekrarlı kesikli çalkalamalı koşullarda yürütülmüştür. Kısım 3.4'de belirtildiği şekilde hazırlanan pelletler 30 g/250 mL erlen olacak şekilde hazırlanmış ve üzerlerine farklı Astrazon Mavi için 100 ve 200 mg/L ve Astrazon Siyah için 50, 100, 150, 200 mg/L şekilde steril olmayan distile su eklenmiştir. Bu kültürler kesikli çalkalamalı koşullarda inkübe edilmiştir. Tekrarlı kesikli çalkalamalı koşullarda yapılan çalışmalarda ise 100 mg/L Astrazon Mavi ve 50 mg/L Astrazon Siyah kullanılmıştır. Astrazon Mavi ve Astrazon Siyah için sırasıyla 601 nm ve 600 nm dalga boyları kullanılmıştır. Tekrarlı kesikli çalışmalarda RB171 için kültür sıvısı değişimi 30 dakikada bir yapılırken, diğer boyalar için 24 saatte bir yapılmıştır.

3.10. Ham Enzim Kaynağının Renk Giderimi Aktivitesinin Saptanması

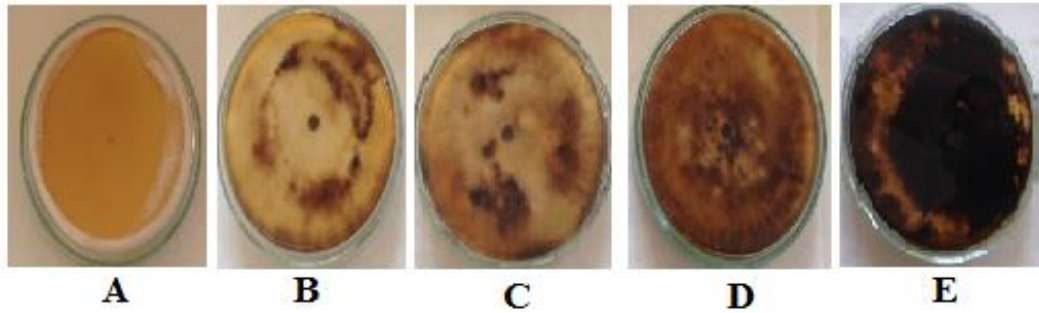
Çalışmamızda ham enzim kaynağı olarak katı faz fermentasyonundan elde edilen süpernatant kullanılmıştır. Ham enzimin RB171 renk giderim aktivitesi (distile su içerisinde 200 mg/L olacak şekilde hazırlanmış) 1 dakika sürecinde izlenmiştir. Çalışmada 3 deney seti kurulmuştur: 1- Enzim (100µL)+boyar madde, 2- H₂O₂ (100µL)+boyar madde ve 3- Enzim+boyar madde+H₂O₂. Renk giderimi RB171'in maksimum absorpsiyonun yaptığı dalga boyunda 1 dakika süresince saptanmış ve yüzde renk giderimi olarak ifade edilmiştir.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

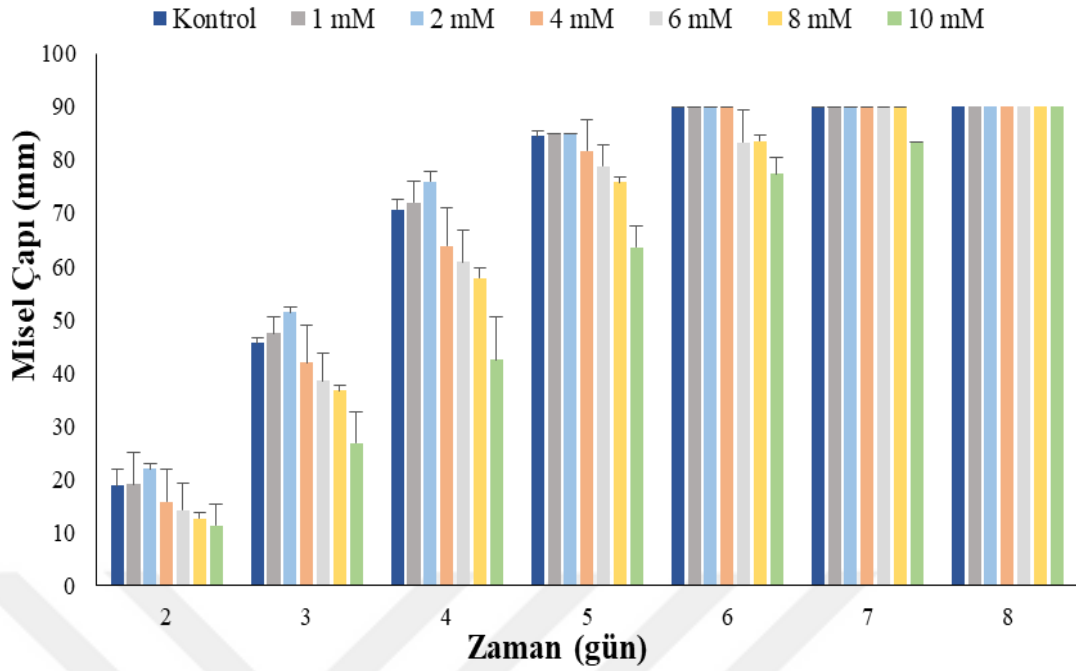
4.1. *Bjerkandera adusta*'nın Mangan İçeren ve İçermeyen Katı Besiyerlerinde Üretimi Sürecinde Enzim Varlığının İzlenmesi

Materyal ve Yöntem kısmında belirtildiği gibi farklı konsantrasyonlarda $MnSO_4$ içerecek şekilde hazırlanan Sabouraud Dekstroza Agar (SDA) besiyerlerine *B. adusta* ekilerek ve zamana bağlı üreme ve enzim değişimi izlenmiştir. Şekil 4.1'de görülebileceği gibi mangan miktarı arttıkça renk oluşumu (kahverengi renk) artmıştır. Çalışmada, mangan konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak renk oluşum hızının arttığı izlenmiştir. Örneğin, 10 mM mangan ($MnSO_4$ olarak) içeren ortamda 5. günden itibaren renk oluşumu izlenirken, daha düşük konsantrasyonlarda renk oluşum hızının yavaşladığı gözlenmiştir. Renk oluşumunun peroksidaz aktivitesine bağlı olarak ortamdaki manganın oksitlenmesi sonucu gerçekleştiği çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir [104].



Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlarda mangan içeren ve içermeyen SDA ortamlarında üretilen *B. adusta*'da peroksidaz varlığının renk oluşumuna bağlı olarak izlenmesi. A) Kontrol, B) 1 mM, C) 2 mM, D) 4 mM, E) 10 mM

Fungusun mangan içeren ve içermeyen katı besiyerlerinde zamana bağlı üreme değişimi misel çapındaki değişim olarak Şekil 4.2'de verilmiştir. Şekilden de görüleceği gibi 1 mM ve 2 mM mangan ($MnSO_4$ olarak) içeren ortamlarda üreme çok az indüklenirken, bunun üzerindeki konsantrasyonlarda konsantrasyon artışına bağlı olarak üreme azalmıştır. Fakat inkübasyonun 8. gününde tüm ortamlarda fungus üreyerek tam olarak petriyi kaplamıştır.



Şekil 4.2. Mangane içeren ve içermeyen SDA ortamlarında üretilen *B. adusta*'nın misel çapı değişimi

Yapılan bu ön incelemeye bağlı olarak fungusun mangane varlığında peroksidaz üretim yeteneği çeşitli ortam ve farklı kültür koşullarında da araştırılmıştır.

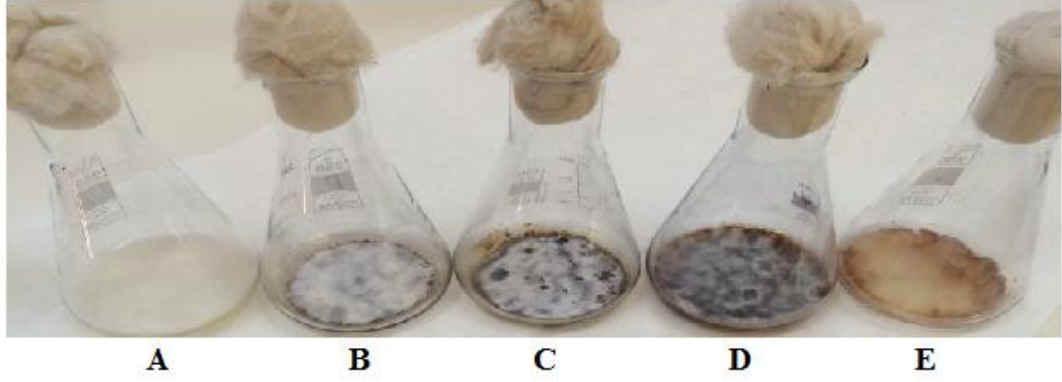
4.2. *B. adusta*'nın Sıvı Besiyerinde Üremesi ve Enzim Üretimi

Fungus öncelikle Sabouraud Dextrose Broth (SDB) besiyerinde üretilmiş ve daha sonra farklı konsantrasyonlarda mangane içeren stok temel ortamlara (STO) aktarılıp enzim üretimi izlenmiştir.

4.2.1. *B. adusta*'nın Statik Koşullarda Üretim Sürecinde Enzim Üretimi

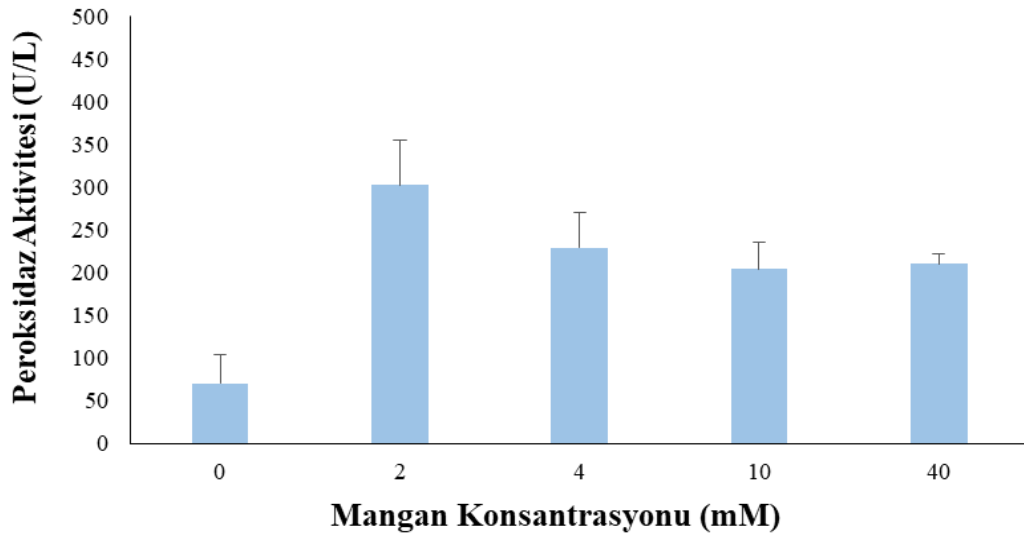
Fungus, farklı konsantrasyonlarda mangane (0-40 mM) içeren STO'lara ekilmiş ve 30 °C' de statik olarak üretilmiştir.

Katı besiyerlerinde gözlenen sonuçlara benzer olarak besiyerindeki mangane miktarının artması üremeyi yavaşlatmıştır. Ayrıca mangane oksidasyonuna bağlı olarak gerçekleştiği belirtilen kahverengi renk oluşumu da mangane varlığı ve konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir. Şekil 4.3'de bu renk değişimi verilmiştir.



Şekil 4.3. *B. adusta*'nın farklı konsantrasyonlarda mangan içeren STO'larda statik koşullarda 10 gün üretimi sonrası kültürlerdeki renk ve üreme değişimi. A) Kontrol, B) 2 mM, C) 4 mM, D) 10 mM, E) 40 mM

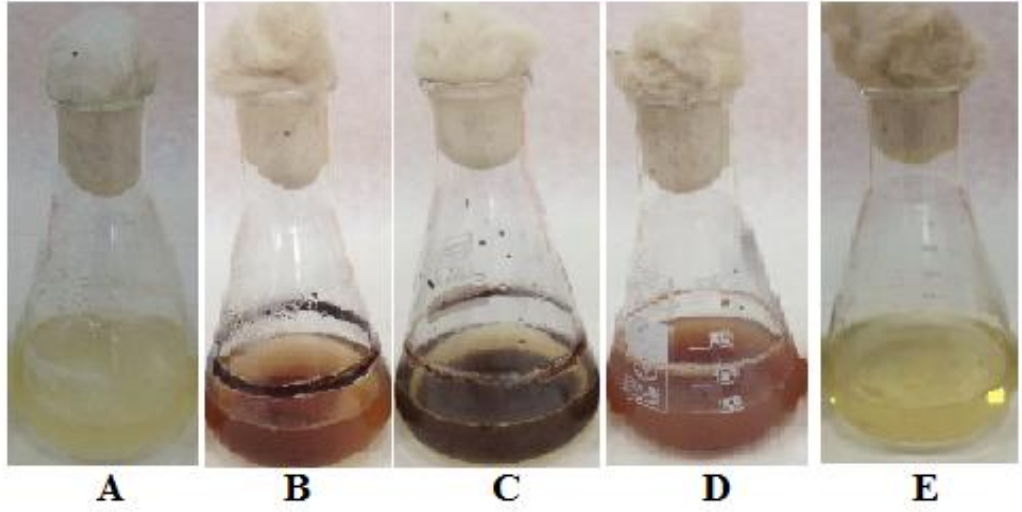
Fungusun bu ortamlarda 10 gün üremesi sonucunda saptanan peroksidaz aktiviteleri Şekil 4.4'de verilmiştir. Çalışma sonuçları mangan varlığının peroksidaz aktivitesini indüklediğini göstermiştir. Bununla birlikte, 2 mM'ın üzerindeki konsantrasyonların peroksidaz üretimini kademeli olarak azalttığı gözlenmiştir. Mangan içermeyen ortamda 71 U/L peroksidaz aktivitesi saptanırken, 2mM mangan içeren ortamda 302,66 U/L enzim aktivitesi elde edilmiş ve mangan miktarı arttıkça enzim aktivitesi azalmıştır. Bunun bir nedeni de mangan artışına bağlı olarak üremenin azalması olabilir.



Şekil 4.4. *B. adusta*'nın farklı konsantrasyonlarda mangan içeren STO'larda statik koşullarda 10 gün üretimi sonrası saptanan peroksidaz aktiviteleri (U/L)

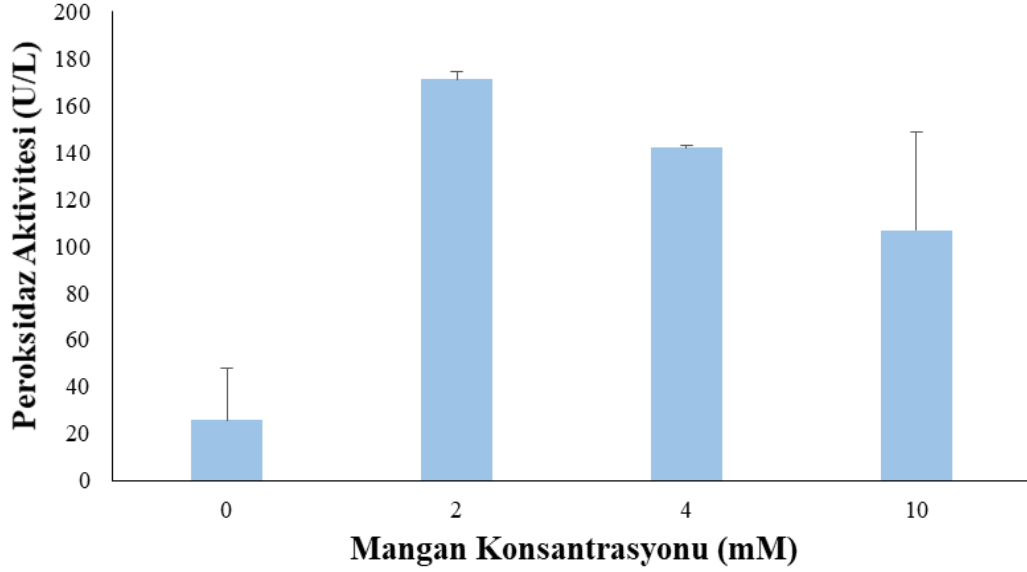
4.2.2. *B. adusta*'nın Çalkalamalı Koşullarda Üretimi Sürecinde Enzim Üretimi

Fungus farklı konsantrasyonlarda mangan (0-40 mM) içeren STO'lara ekilmiş ve kesikli süreçte 30 °C'de, 150 rpm'de 10 gün boyunca çalkalamalı olarak üretilmiştir. Bu çalışmada da mangan konsantrasyonundaki artış fungusun üremesi üzerine olumsuz etki yapmış ve mangan oksidasyonuna bağlı olarak da renk oluşumu artmıştır. Özellikle, 40 mM mangan içeren STO'da fungusun üremesi belirgin oranda baskılanmıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. *B. adusta*'nın farklı konsantrasyonlarda mangan içeren STO'larda çalkalamalı koşullarda 10 gün üretimi sonrası kültürlerdeki renk değişimi. A) Kontrol, B) 2 mM, C) 4 mM, D) 10 mM, E) 40 mM

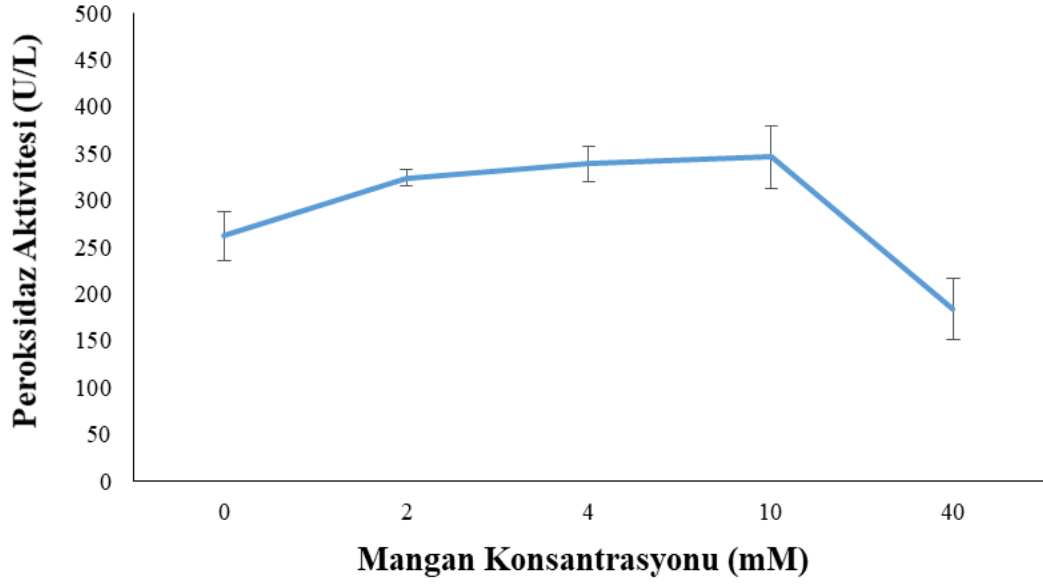
Bu ortamlarda en yüksek peroksidaz aktivitesi 171 U/L olarak 2 mM mangan içeren STO'da gözlenmiş ve mangan konsantrasyonu arttıkça peroksidaz aktivitesinde düşüş saptanmıştır. Özellikle 40 mM'lık ortamda çok düşük peroksidaz aktivitesi elde edilmiştir (Şekil 4.6).



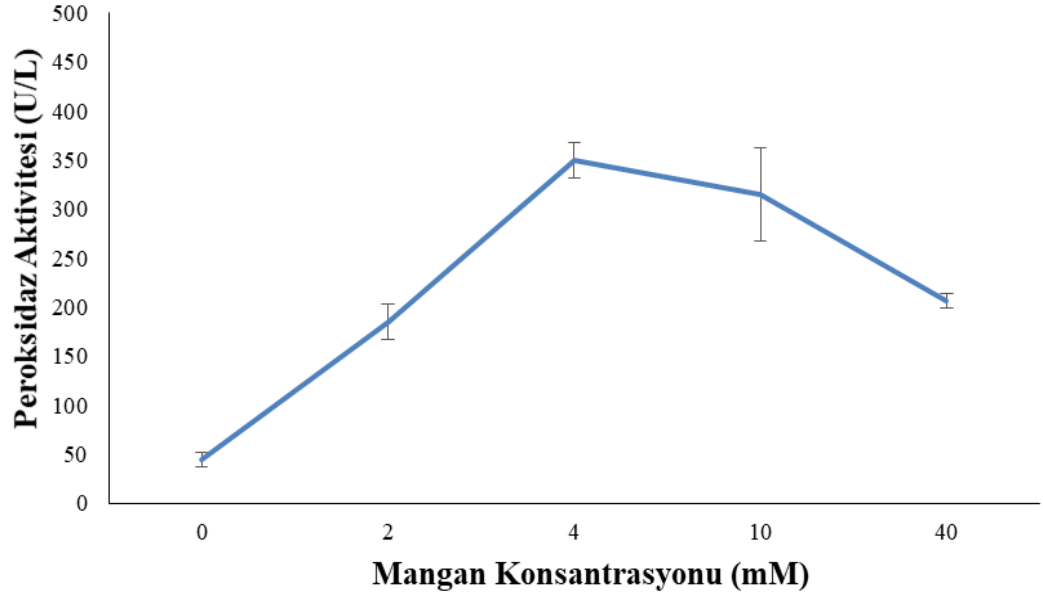
Şekil 4.6. *B. adusta*'nın farklı konsantrasyonlarda mangan içeren STO'larda çalkalamalı koşullarda 10 gün üretimi sonrası saptanan peroksidaz aktiviteleri (U/L)

4.3. *B. adusta*'nın Katı Faz Fermentasyonu Sürecinde Enzim Üretimi

Çalışmada katı substrat olarak buğday kepeği+soya unu kullanılmış ve hazırlanan katı substrat farklı konsantrasyonlarda (0-40 mM) mangan içeren distile su ile nemlendirilmiştir. Sterilizasyon sonrası farklı konsantrasyonlarda mangan içeren bu ortamlara *B. adusta* ekilerek 30°C'de statik olarak üretim yapılmış ve 5. ile 10. günlerde peroksidaz aktiviteleri saptanmıştır (Şekil 4.7 ve 4.8). Özellikle 40 mM mangan içeren distile su ile nemlendirilen ortamda 5. günde mangan oksidasyonuna bağlı olarak renk oluşumu izlenmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.7. *B. adusta*'nın katı faz fermentasyonu sürecinde 5 gün üretimi sonrası saptanan peroksidaz aktiviteleri (U/L)



Şekil 4.8. *B. adusta*'nın katı faz fermentasyonu sürecinde 10 gün üretimi sonrası saptanan peroksidaz aktiviteleri (U/L)



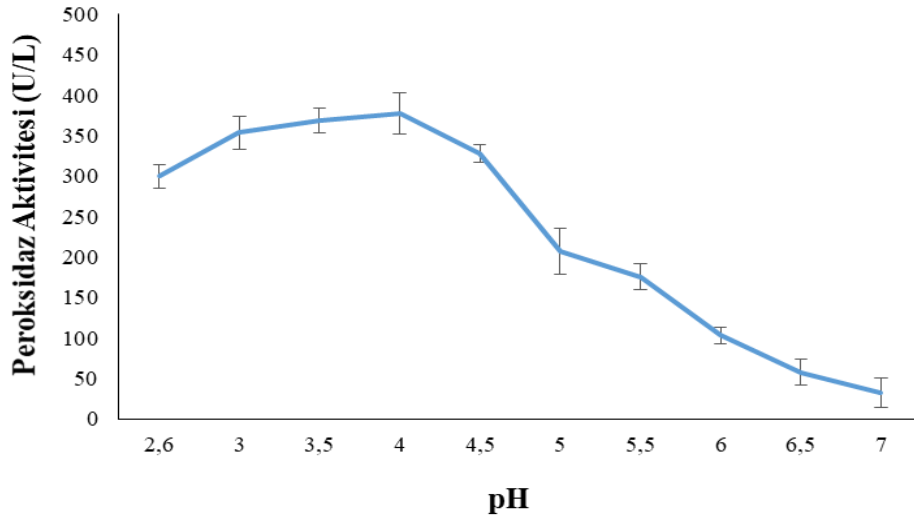
Şekil 4.9. *B. adusta*'nın 40 mM mangan içeren katı ortamda 5 gün üretimi sonrasında renk oluşumu.

4.4. Ham Peroksidaz Enziminin Optimum Çalıştığı pH ve Sıcaklık Aralığı

pH ve sıcaklık enzim aktivitesini etkileyen önemli parametrelerdir [107]. Bu nedenle elde edilen ham enzim kaynağının optimum çalıştığı pH ve sıcaklık aralığı saptanmıştır.

4.4.1. pH'nın Optimizasyonu

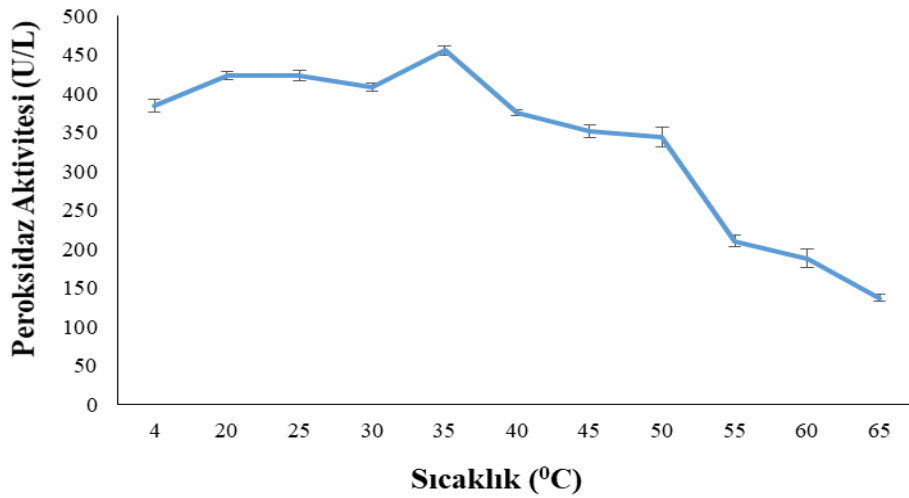
Ham peroksidaz enziminin optimum pH aralığı farklı pH'larda hazırlanmış sitrat fosfat tamponunda 30 °C'de ABTS ve H₂O₂ varlığında spektrofotometrede çalışılmıştır. Enzimin optimum çalışma pH'sı pH 3.5-4.0 olarak saptanmıştır (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Reaksiyon pH'sının enzim aktivitesi üzerine etkisi

4.4.2. Sıcaklığın Optimizasyonu

Ham enzim için optimum sıcaklık aralığını belirleme çalışmaları en iyi pH değeri olarak saptanan pH 4.0'de ve 4-70 °C aralığında yürütülmüştür. Enzim geniş bir sıcaklık aralığında çalışabilmiştir. Özellikle 4-50 °C aralığında yüksek enzim aktiveleri gözlenirken, 50 °C'nin üzerinde enzim aktivitesi düşmüştür. En yüksek peroksidaz aktivitesi 35 °C'de saptanmıştır. Sonuçlar, bu enzim kaynağının 4-50 °C aralığında verimli olarak kullanılabileceğini göstermektedir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Reaksiyon sıcaklığının enzim aktivitesi üzerine etkisi

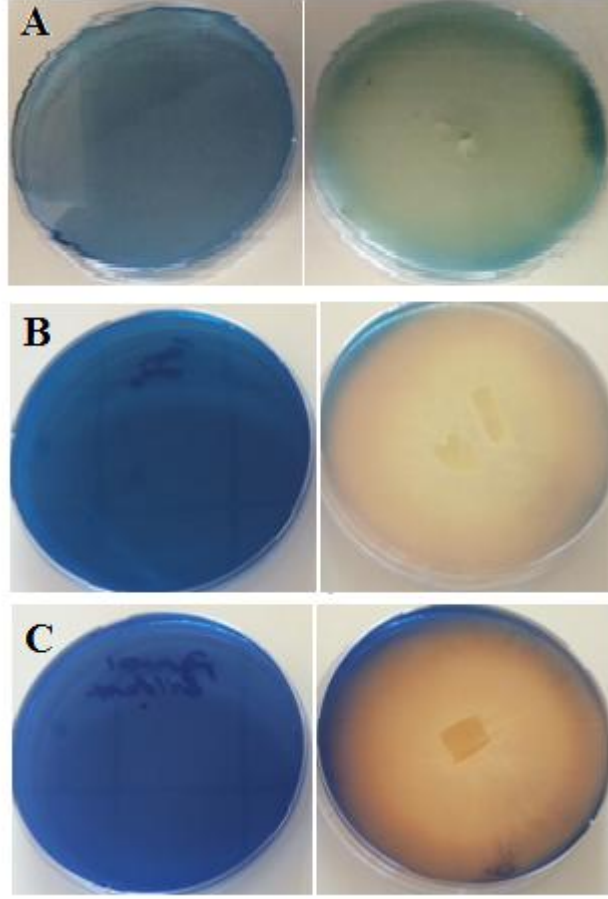
4.5. *B. adusta*'nın Renk Giderim Yeteneği

Renkli atık sular alıcı su ortamlarına verildiklerinde su ortamlarında renklenmeye neden olup fotosentez solunum dengesini bozmakta ve buna bağlı olarak ekolojik dengeyi etkilemektedir [108]. Bu nedenle rengin giderimi önemli bir yaklaşımdır. Bununla birlikte, geleneksel biyolojik arıtım yöntemleri boyar madde içeren atık suların renginin gideriminde yetersiz kalmaktadır. Bunun temel nedeni boyar maddelerin biyolojik yıkıma dirençli olmalarıdır. Boyar madde gideriminde kullanılan fiziksel ve geleneksel biyolojik yöntemlerin de önemli dezavantajları bulunmaktadır. Bundan dolayı, boyar madde renk gideriminde kullanılabilecek özgül biyolojik sistemlere ihtiyaç vardır.

Boyar madde renk giderim yetenekleri öne çıkmış olan beyaz çürükçül funguslar çeşitli boya ların yıkımında test edilmektedir [109, 110]. Çalışmanın bu kısmında bu suşun renk giderim potansiyeli çeşitli tekstil boya ları kullanılarak farklı koşullarda araştırılmıştır.

4.5.1. *B. adusta*'nın Boyar Madde İçeren Katı Besiyerinde Renk Giderim Yeteneği

Çalışmanın bu aşamasında fungusun renk giderim yeteneği öncelikle boyar madde içeren SDA besiyerlerinde incelenmiştir. Bu amaçla ayrı ayrı olmak üzere Reaktif Mavi 171 (RB171), İndigo Karmin (Asit Mavi 74) ve Remazol Brilliant Mavi R (RBBR) içeren SDA besiyerlerine *B. adusta* ekildikten sonra 30 °C'de üretilmiş ve kültür ortamındaki renk değişimi izlenmiştir. Şekil 4.12'den de görülebileceği gibi fungus renk giderimine neden olmuştur.



Şekil 4.12. (A) RB171, (B) İndigo Karmin ve (C) RBBR içeren SDA ortamlarında *B. adusta*'nın üremesine bağlı renk giderimi

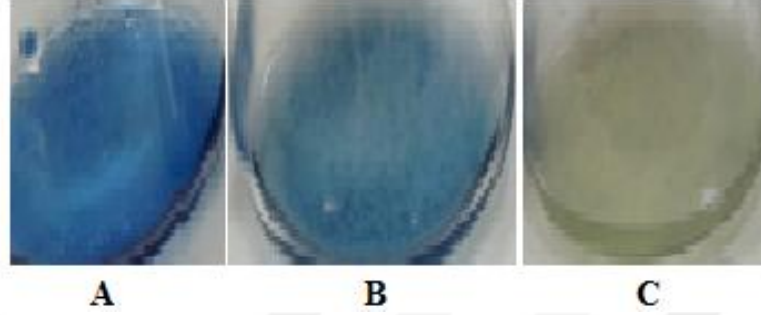
4.5.2. *B. adusta*'nın Boyar Madde İçeren Sıvı Ortamlarda Kesikli Üretim Sürecinde Renk Giderim Yeteneği

Çalışmada farklı boyar madde içeren sıvı ortamlarda da statik ve çalkalamalı koşullarda fungusun renk giderim aktivitesi araştırılmıştır. Bu amaçla Sabouraud Dextrose Broth (SDB) besiyerinde üretilen fungal kültür homojenize edilmiş ve boyar madde içeren stok temel ortamlarına (STO) ekim yapılarak fungusun renk giderim potansiyeli ortaya konmuştur.

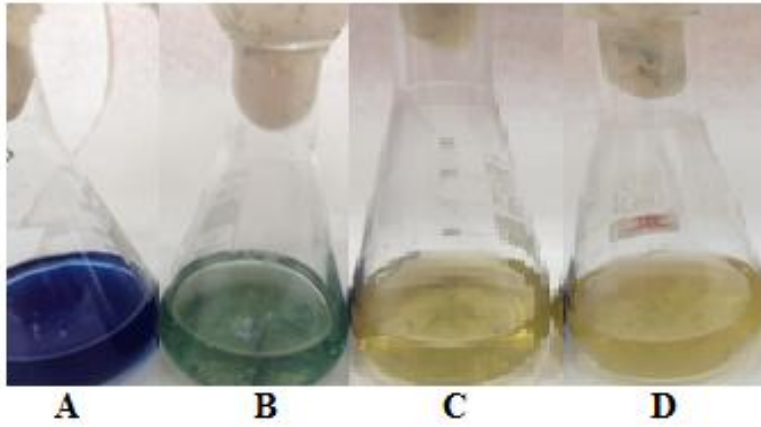
4.5.2.1. *B. adusta*'nın RB171 İçeren STO'da Kesikli Üretim Sürecinde Renk Giderim Yeteneği

B. adusta 100 mg/L RB171 içeren STO ortamlarında 30 °C'de statik ve çalkalamalı koşullarda üretilmiş ve zamana bağlı olarak renk giderimi izlenmiştir.

Çalkalamalı koşullarda statik koşullara göre daha hızlı ve yüksek miktarda renk giderimi saptanmıştır. Renk değişimi makroskobik olarak da gözlenmektedir (Şekil 4.13 ve Şekil 4.14).

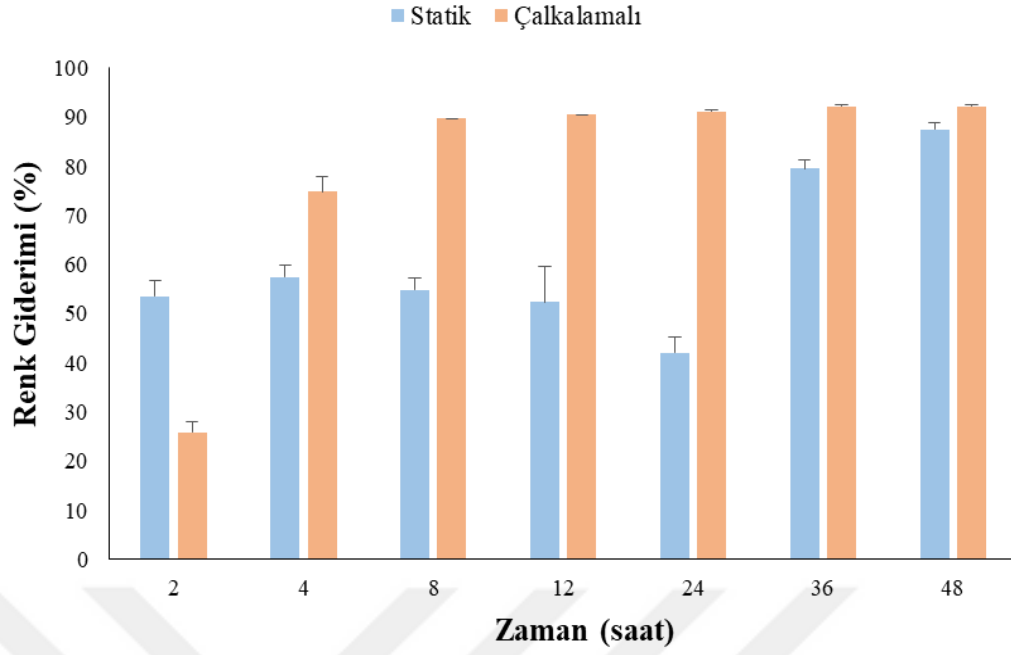


Şekil 4.13. *B. adusta*'nın statik koşullarda üretimi sürecinde RB171 renk değişimi. A) Kontrol, B) 24. saat, C) 48. saat



Şekil 4.14. *B. adusta*'nın çalkalamalı koşullarda üretimi sürecinde RB171 renk değişimi. A) Kontrol, B) 4. saat, C) 8. saat, D) 24. saat

İlk saatlerden itibaren renk değişimi başlamış ve özellikle çalkalamalı koşullarda ilerleyen saatlerde hızlı bir renk giderimi gözlenmiştir. İlk saatlerde gözlenen renk değişiminin temel nedeni başlangıçta biyosorpsiyonun gerçekleşmesi ve biyokütlenin boyanmasıdır. İlerleyen zaman dilimlerinde mikrobiyal metabolizmaya bağlı olarak hücre yüzeyinde tutunmuş olan boyanın metabolize olduğu ve biyokütlenin renginin de açıldığı gözlenmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. *B. adusta*'nın RB171 içeren STO'larda statik ve çalkalamalı koşullarda üretimi sürecinde zamana bağlı renk giderimi

Benzer olarak fungus 150 mg/L İndigo Karmin ve RBBR içeren STO'larda statik ve çalkalamalı koşullarda üretilmiş ve zamana bağlı olarak renk giderimi izlenmiştir (Şekil 4.16-Şekil 4.17).

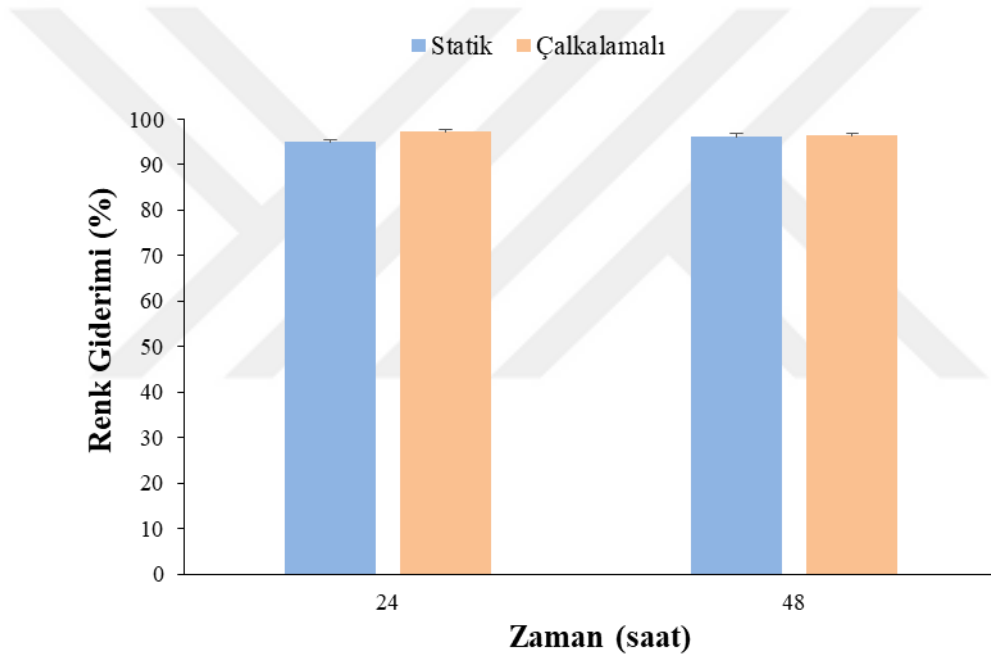


Şekil 4.16. *B. adusta*'nın statik koşullarda 48 saat üretim sonrası İndigo Karmin renk değişimi. A) Kontrol, B) 48. saat



Şekil 4.17. *B. adusta*'nın çalkalamalı koşullarda 48 saat üretimi sonrası İndigo Karmin renk değişimi. A) Kontrol, B) 48. saat

Her iki koşulda da, 24. ve 48. saatler İndigo Karmin için %100'e yakın renk giderimine ulaşılmıştır (Şekil 4.18).

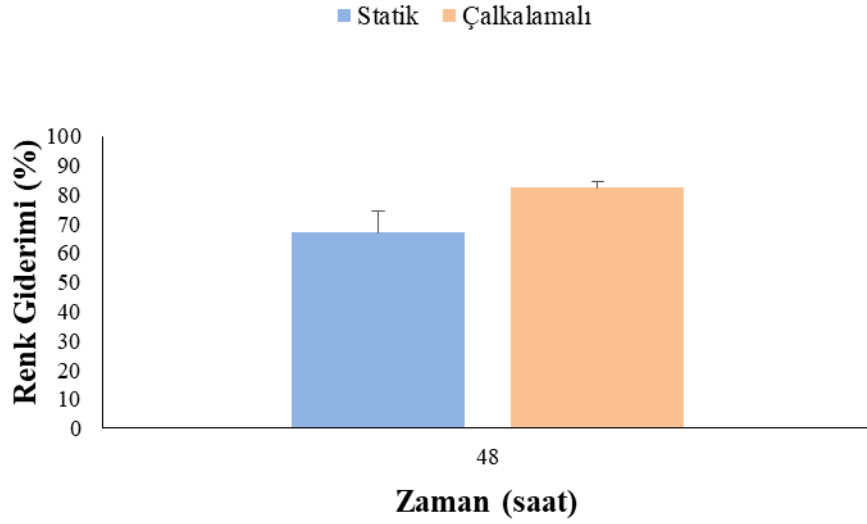


Şekil 4.18. *B. adusta*'nın İndigo Karmin içeren STO'larda statik ve çalkalamalı koşullarda üretimi sürecinde zamana bağlı renk giderimi

RBBR içeren STO'larda yapılan çalışmada ilk 24 saatte önemli bir renk giderimi gözlenmemiştir. Bununla birlikte, 48. saatte renk açılmış (Şekil 4.19) ve 48. saatte statik koşullarda %67 ve çalkalamalı koşullarda da %82 renk giderim değerlerine ulaşılmıştır (Şekil 4.20). Çeşitli çalışmalarda da bu fungusun RBBR ve Poly R-478 renk giderim yeteneği rapor edilmiştir [72, 91].



Şekil 4.19. *B. adusta*'nın çalkalamalı koşullarda 48 saat üretimi sonrası RBBR renk değişimi. A) Kontrol, B) 48. saat



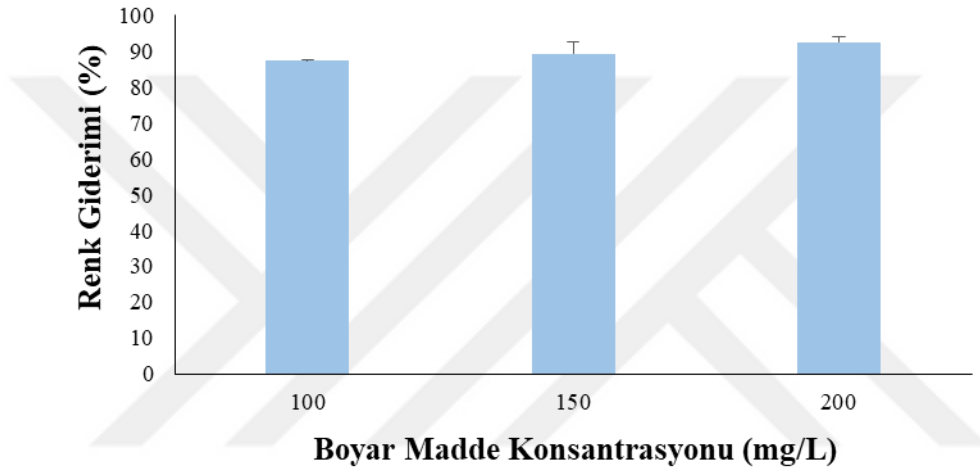
Şekil 4.20. *B. adusta*'nın 150 mg/L RBBR içeren STO'larda statik ve çalkalamalı koşullarda üretimi sürecinde zamana bağlı renk giderimi

4.5.3. *B. adusta* Pelletlerinin Boyar Madde İçeren Distile Su Ortamlarında Renk Giderim Yeteneği

Çalışmanın bu kısmı steril olmayan koşullarda yürütülmüştür. Bu kısımda boyar madde içeren distile su ortamları hazırlanmış ve bu ortamlara daha önce üretilmiş olan *B. adusta* pelletleri eklenmiştir. Pelletler eklendikten sonra renk giderim aktiviteleri izlenmiştir.

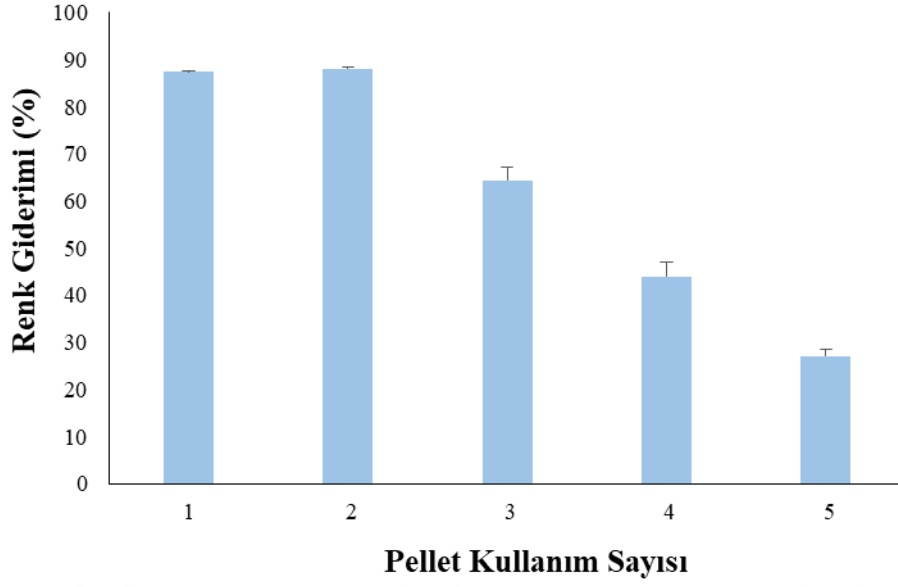
4.5.3.1. *B. adusta* Pelletlerinin RB171 İçeren Distile Su Ortamlarında Renk Giderim Yeteneği

Çalışmanın bu kısmında farklı konsantrasyonlarda (100-200 mg/L) RB171 içeren distile su ortamları hazırlanmış ve bu ortamlara uygun miktarda *B. adusta* pelletleri eklenerek öncelikle hazır pelletlerin renk giderim aktivitesi kesikli süreçte izlenmiştir (Şekil 4.21). Şekil 4.21’de de görüldüğü gibi kullanılan pelletler 1 saatte %90 civarında renk giderim aktivitesine ulaşmıştır.



Şekil 4.21. Fungal pelletlerin farklı konsantrasyonlarda RB171 içeren distile su ortamlarında inkübasyonu sürecinde renk giderimi

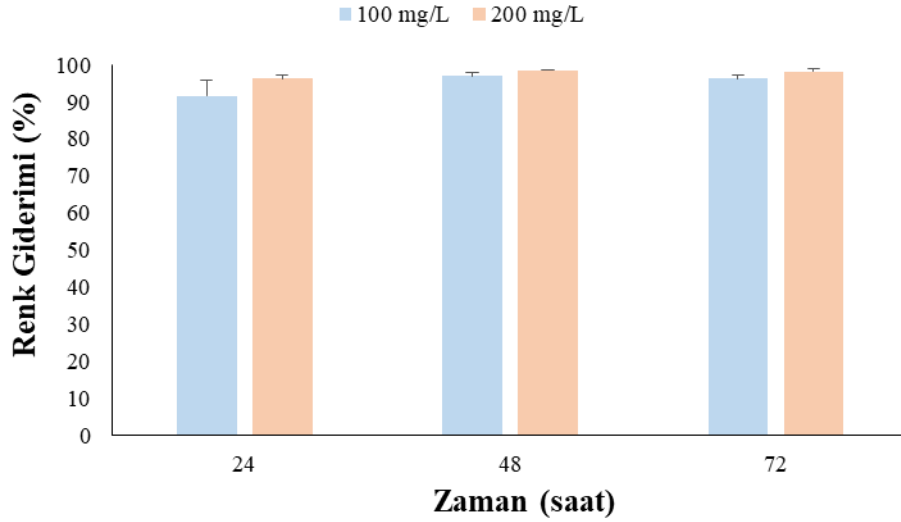
Hazır pelletler yüksek renk giderim yeteneği gösterdiği için tekrarlı kesikli süreçte pelletlerin renk giderim yeteneğini saptamak amacıyla 2. bir çalışma kurulmuştur. Bu kısımda 100 mg/L RB171 içeren distile su ortamları yarım saatte bir boyaz madde içeren distile su ortamıyla değiştirilerek çalışmalar yürütülmüştür (Şekil 4.22). Pelletlerin ilk iki kullanımında %88 renk giderimi elde edilirken, 3. kullanım ve sonrasında renk giderim aktivitesi azalmıştır.



Şekil 4.22. Fungal pelletlerle tekrarlı kesikli süreçte RB171'in renginin giderimi

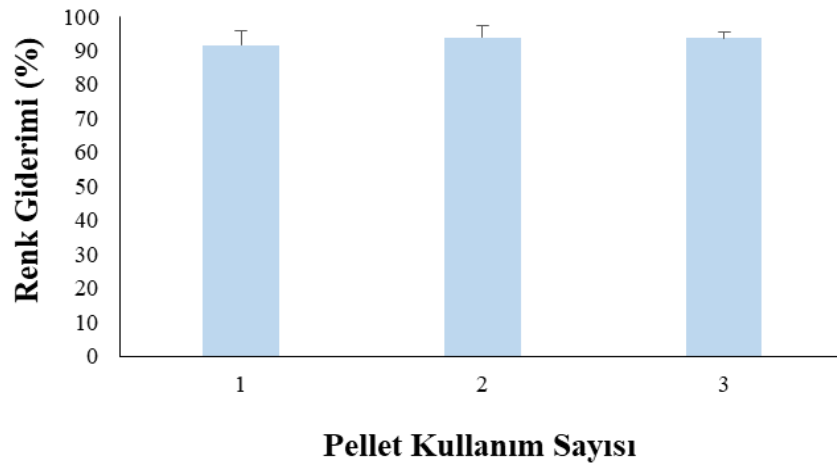
4.5.3.2. *B. adusta* Pelletlerinin İndigo Karmin İçeren Distile Su Ortamlarında Renk Giderim Yeteneği

Farklı konsantrasyonlarda İndigo Karmin (100 ve 200 mg/L) içeren distile su ortamlarında yapılan kesikli çalışmada *B. adusta* pelletleri 24 saatte %95'in üzerinde renk giderimi yapmıştır (Şekil 4.23). Hem 100 mg/L hem de 200 mg/L boyar madde içeren ortamlarda %92-99 arasında renk giderim değerlerine ulaşılmıştır.



Şekil 4.23. Fungal pelletlerle kesikli süreçte İndigo Karmin'in renginin giderimi

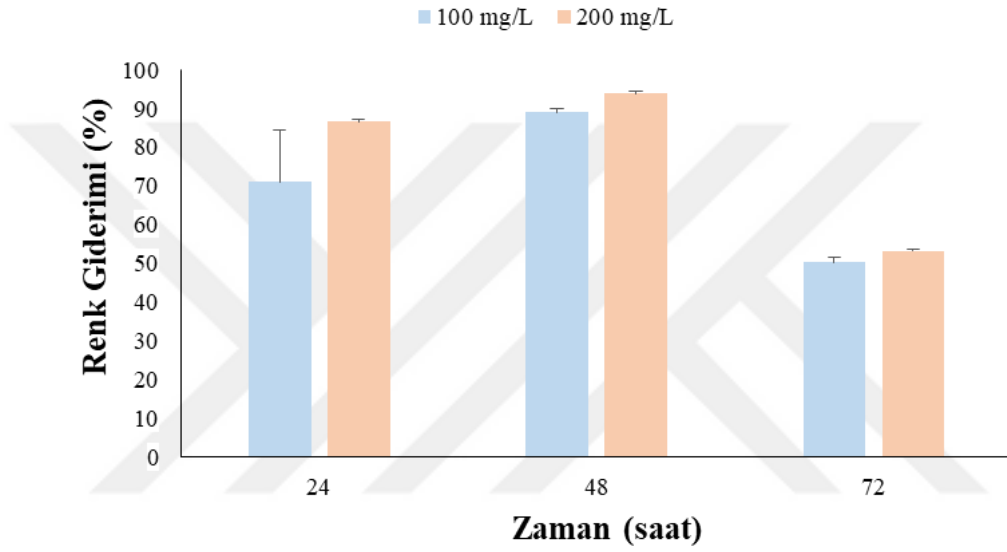
Tekrarlı kesikli yürütülen çalışma ise 24 saatlik aralıklarla boyar madde (100 mg/L) içeren taze besiyeri (distile su) değişimi yapılarak yürütülmüş ve pelletlerin 3 kez tekrarlı kullanımına bağlı olarak renk giderim verimi incelenmiştir. Çalışma sonuçları pelletlerin 3 kez kullanımı sürecinde renk giderim aktivitesini koruduğunu ve 3 kullanımda bile %94 renk giderimi yaptığını ortaya koymuştur (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. Fungal pelletlerle tekrarlı kesikli süreçte İndigo Karmin'in renginin giderimi

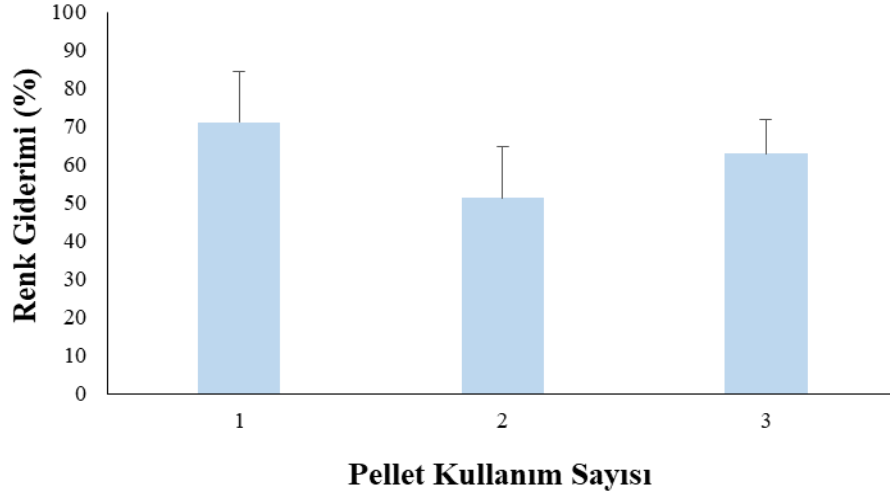
4.5.3.3. *B. adusta* Pelletlerinin RBBR İçeren Distile Su Ortamlarında Renk Giderim Yeteneği

Farklı konsantrasyonlarda RBBR içeren distile su ortamlarında yapılan kesikli çalışmada *B. adusta* pelletleri 48. saatte %90 civarında renk giderimi yapmış, 72. saatte ise giderimi %50 civarına düşmüştür. Düşüşün sebebi pelletlere kısmen adsorbe olmuş boyanın çözünmesi olabilir (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. Fungal pelletlerle kesikli süreçte RBBR'nin renginin giderimi

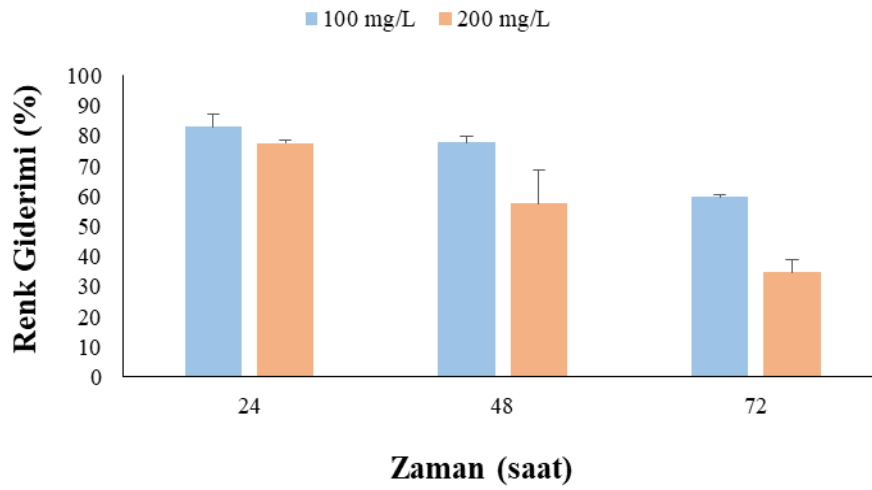
Tekrarlı kesikli yürütölen çalışma 24 saatte bir boyar madde içeren taze besiyeri (distile su) değışimi yapılarak yürütölmüş ve pelletlerin 3 kez tekrarlı kullanımında renk giderim verimi incelenmiştir. Bu süreçte, 1. kullanımda %70'in üzerinde renk giderimi gözlenirken, 3. kullanımda %60'ın üzerinde renk giderimi saptanmıştır (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. Fungal pelletlerle tekrarlı kesikli süreçte RBBR'nin renginin giderimi

4.5.3.4. *B. adusta* Pelletlerinin Astrazon Mavi İçeren Distile Su Ortamlarında Renk Giderim Yeteneği

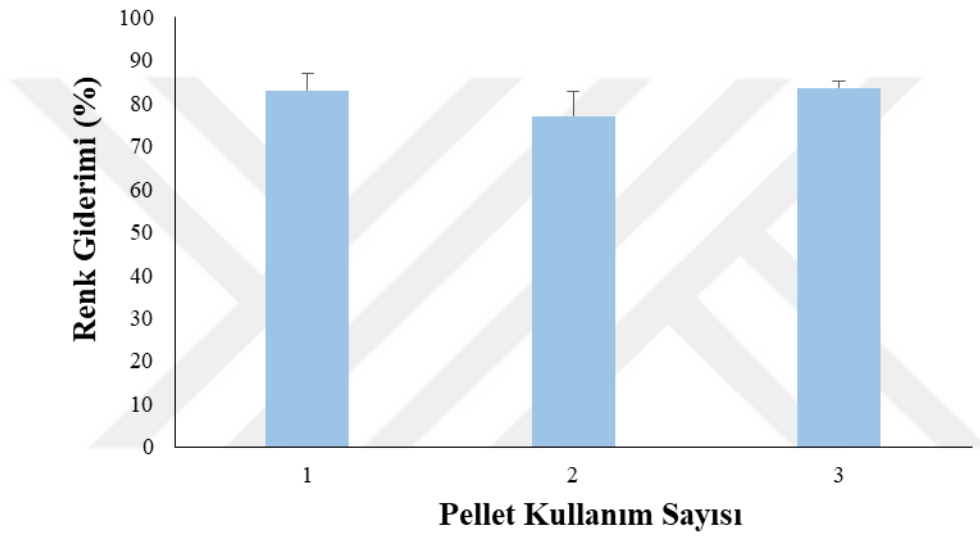
Çalışmada öncelikle hazır pelletlerin kesikli süreçte zamana bağlı renk giderim aktivitesi izlenmiştir (Şekil 4.27). 100 mg/L Astrazon Mavi içeren distile su ortamında 24 saatte %83 renk giderimi saptanmıştır. 200 mg/L Astrazon Mavi içeren ortamda 24 saatte %78 renk giderimi saptanmıştır.



Şekil 4.27. Fungal pelletlerle kesikli süreçte Astrazon Mavi'nin renginin giderimi

Tekrarlı kesikli yürütülen çalışmada 24 saatte bir boyar madde içeren taze besiyeri (distile su) değişimi yapılarak yürütülmüş ve pelletlerin 3 kez tekrarlı kullanımında renk giderim verimi incelenmiştir. Bu süreçte, 1. kullanımda %83 renk giderimi gözlenirken, 3. kullanımda %84 renk giderimi saptanmıştır (Şekil 4.28).

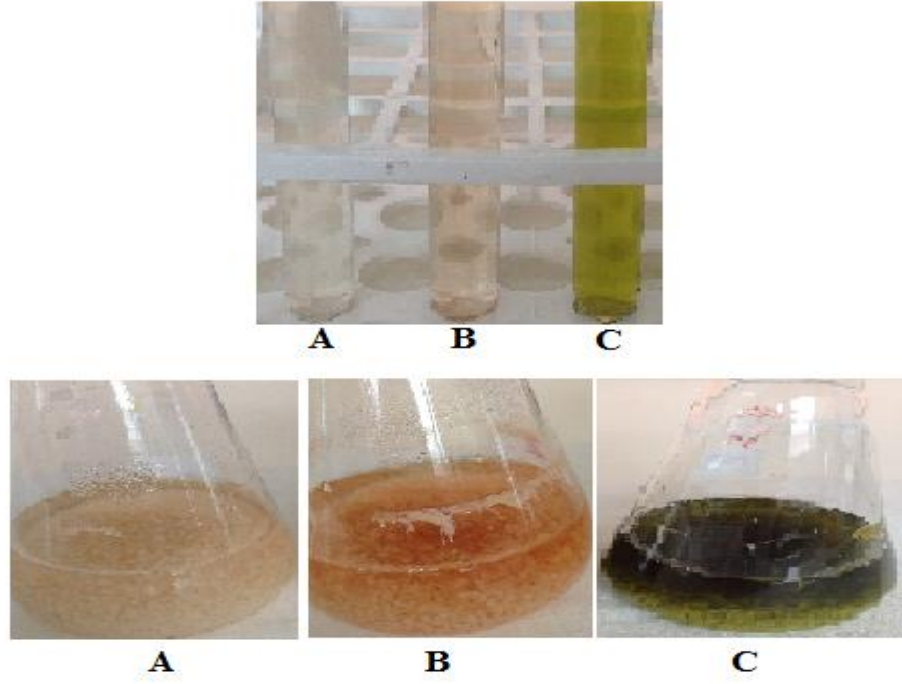
Bu çalışma pelletlerin bu boyar maddenin renginin gideriminde etkili olduğunu göstermiştir. Literatürde de fungal pelletlerle Astrazon grubu boyaların renginin etkili bir şekilde giderilebildiği rapor edilmiştir [110].



Şekil 4.28. Fungal pelletlerle tekrarlı kesikli süreçte Astrazon Mavi'nin renginin giderimi

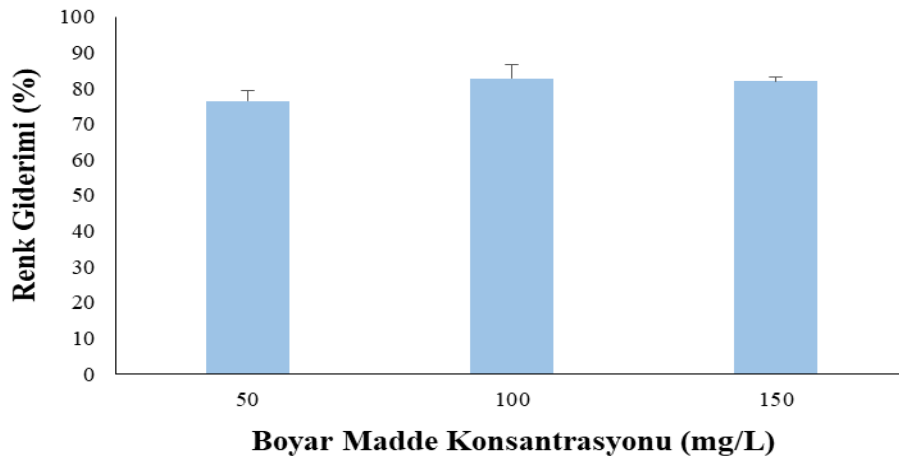
4.5.3.5. *B. adusta* Pelletlerinin Astrazon Siyah İçeren Distile Su Ortamlarında Renk Giderim Yeteneği

Çalışmamızda distile su ile farklı konsantrasyonda (50, 100, 150 ve 200 mg/L) Astrazon Siyah hazırlanmış ve *B. adusta* pelletleri kullanılarak steril olmayan koşullarda kesikli süreçte renk giderimi incelenmiştir. İlk 24 saatlik süreçte *B. adusta* pelletleri 50, 100, 150 mg/L boyar madde içeren ortamlarda renk giderimi yaparken, 200 mg/L Astrazon Siyah içeren ortamda renk giderimi gözlenmemiştir (Şekil 4.29).



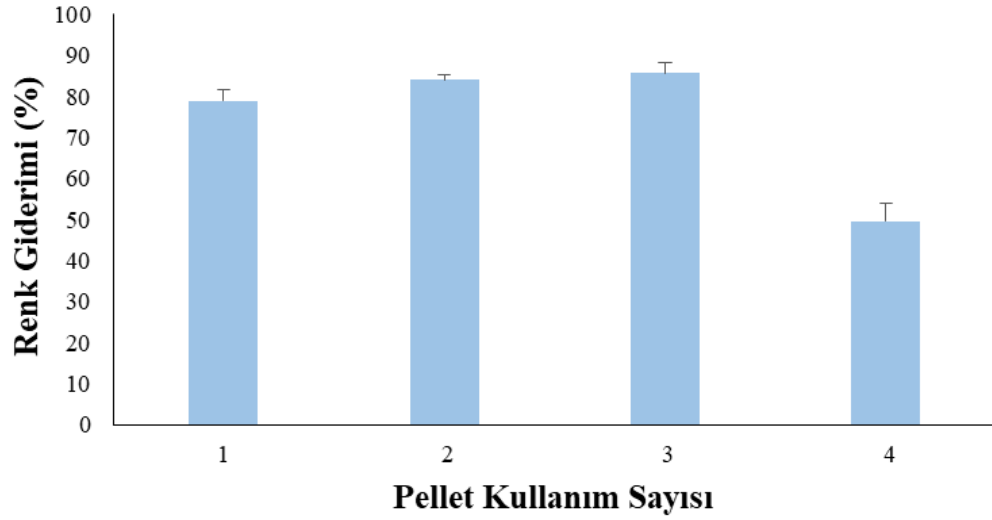
Şekil 4.29. Pellet uygulaması sonucu Astrazon Siyah içeren distile su ortamlarında renk giderimi. A) 50 mg/L Astrazon Siyah, B) 100 mg/L Astrazon Siyah, C) 150 mg/L Astrazon Siyah

Bu süreçte 50-150 mg/L Astrazon Siyah içeren ortamlarda 24 saatte %76-83 renk giderimi elde edilmiştir (Şekil 4.30).



Şekil 4.30. Fungal pelletlerin farklı konsantrasyondaki Astrazon Siyah boyasının renginin giderimi

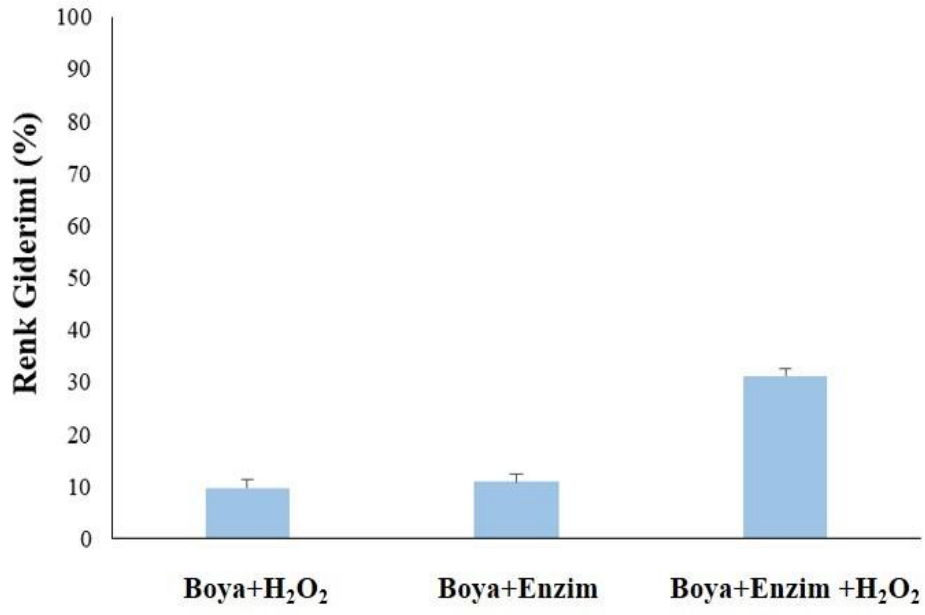
Pelletlerin Astrazon Siyah renk giderim yeteneği saptandıktan sonra 50 mg/L Astrazon Siyah içeren distile su ortamında tekrarlı kesikli süreçte renk giderim verimi araştırılmıştır. Pelletler ilk 3 kullanımda %86 renk giderim aktivitesini korurken, 4. kullanımda renk giderimi %50'ye düşmüştür (şekil 4.31).



şekil 4.31. Fungal pelletlerin tekrarlı kesikli süreçte Astrazon Siyah'ın renginin giderimi

4.6. Ham Enzim Kaynağının Renk Giderim Yeteneği

Çalışmanın bu kısmında katı faz fermentasyonu sürecinden elde edilmiş ham enzim kaynağının boyar madde renk giderim yeteneği araştırılmıştır. Ham enzim kaynağı 200 mg/L RB171 içeren distile su ortamına eklenmiş ve 1 dakika süresinde renk giderimi saptanmıştır. Bu amaçla, yalnızca H_2O_2 eklenmiş boyar madde, yalnızca enzim eklenmiş boyar madde ve enzim+ H_2O_2 eklenmiş boyar madde ortamlarında renk giderimi araştırılmıştır (şekil 4.32). şekil 4.32'den de görülebileceği gibi enzim kaynağına H_2O_2 eklenmesi renk giderim aktivitesini arttırmış ve %31 renk giderimi elde edilmiştir.



Şekil 4.32. Ham enzim kaynağının boyar madde renk giderimi

5. SONUÇ VE ÖNERİ

Beyaz çürükçül funguslar enzim üretim yetenekleri ve boyar madde renk giderim potansiyelleri açısından ilgi çekmektedir. Bu nedenle çalışmada Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA tarafından doğadan izole edilip tanımlanan bir beyaz çürükçül fungus olan *Bjerkandera adusta*'nın enzim üretim ve renk giderim yeteneği araştırılmıştır. Bu suş bu açıdan ilk kez kullanılmıştır.

Peroksidaz enzimleri endüstriyel ve sağlık uygulamaları da dahil olmak üzere pek çok uygulamada kullanılabilen önemli enzimlerdir. Bu nedenle çalışmamızda yeni izole edilmiş bu suşun peroksidaz aktivitesine sahip enziminin üretim potansiyeli farklı koşullarda araştırılmıştır. Mangan içeren ortamlardaki kahverengi renk oluşumu manganın peroksidazın oksidasyonunu göstermektedir. Bununla birlikte, sıvı ve katı faz fermentasyonlarından elde edilen enzim kaynaklarında turp peroksidazına benzer peroksidaz aktivitesi belirlenmiştir. Lakkaz aktivitesi yok veya yok denecek düzeydedir. Sonuçlarımız bu suşun peroksidaz aktivitesine sahip bir enzim üretebildiğini göstermiştir. Bu durum, test edilen fungusun enzim üretiminde önemli olabileceğini göstermektedir. Ham enzim kaynağının aktivitesi asidik koşullarda ve 4-50 °C sıcaklık aralığında yüksektir. Enzimin düşük ve yüksek sıcaklıkta aktivite göstermesi geniş bir uygulama aralığında çalışabilmesi açısından önemlidir.

Çalışmada kullanılan suş, hem steril hem de steril olmayan koşullarda boyar madde renk giderimi yapabilmıştır. Fungal biyokütlenin boyar madde renk giderim aktivitesini tekrarlı kesikli uygulamada da göstermesi ve tekrarlı kullanımda bu aktivitesini koruması üretilcek pelletlerin tekstil ve boyar madde içeren atık suların renginin gideriminde kullanılabileceğini düşündürmektedir. Ham enzim kaynağının da boyar madde renk giderim yeteneğinin olması enzim kaynağının renk giderim potansiyeli açısından da önemli olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak, çalışmamızda kullanılan suşun, enzim üretimi ve boyar madde renk giderimi yetenekleri açısından hem enzim biyoteknolojisi hem de çevre biyoteknolojisi uygulamalarında kullanılabilmek potansiyeli bulunmaktadır.

6. KAYNAKLAR

- [1] M. Stajic, J. Vukojevic & S. Duletic- Lausevic, *Biology of Pleurotus eryngii and role in biotechnological processes: a review*, **Crit. Rev. Biotechnol.**, 29 (2009) 55-66.
- [2] K. Biswas, D. Paul, S. N. Sinha, *Biological agents of bioremediation: A concise review*, **Front. Environ. Microbiol.**, 1 (2015) 39-43.
- [3] A. Tripathi, R. C. Upadhyay, S. Singh, *Extracellular ligninolytic enzymes in Bjerkandera adusta and Lentinus squarrosulus*, **Indian J. Microbiol.**, 52 (2012) 381-387.
- [4] M. Dinis, R. M. F. Bezerra, F. Nunes, A. A. Dias, C. V. Guese, L. M. M. Ferreira, J.W. Cone, G. S. M. Marques, A. R. N. Barros, M. A. M. Rodrigues, *Modification of wheat straw lignin by solid state fermentation with white rot fungi*, **Bioresource Technol.**, 100 (2009) 4829-4835.
- [5] Y. Nakamura, M. G. Sungusia, T. Sawada and M. Kuwahara, *Lignin-degrading enzyme production by Bjerkandera adusta immobilized on polyurethane foam*, **J. Biosci. Bioeng.**, 88 (1999) 41-47.
- [6] A. Knezevic, I. Milovanovic, M. Stajic, N. Loncar, I. Brceski, J. Vukojevic, J. Cilerdzic, *Lignin degradation by selected fungal species*, **Bioresource Technol.**, 138 (2013) 117-123.
- [7] S.B. Pointing, *Feasibility of bioremediation by white-rot fungi*, **Appl. Microbiol. Biot.**, 57 (2001) 20-33.
- [8] M. Tisma, B. Zelic, D. Vasic- Racki, *White rot fungi in phenols, dyes and other xenobiotics treatment- a brief review*, **Croat. J. Food Sci. Technol.**, 2 (2010) 34-47.
- [9] R. Reina, H. Kellner, N. Jehmlich, R. Ullrich, I. Garcia-romera, E. Aranda, C. Liers, *Differences in the secretion pattern of oxidoreductases from Bjerkandera adusta induced by a phenolic olive mill extract*, **Fungal Genet. Biol.**, 72 (2014) 99-105.
- [10] N. N. Pozdnyakova, S.V. Nikiforova, O. V. Turkovskaya, *Influence of PAHs on ligninolytic enzymes of the fungus Pleurotus ostreatus D1*, **Cent. Eur. J. Biol.**, 5 (2010) 83-94.
- [11] G. Koutrotsios and G. I. Zervakis, *Comparative examination of the olive mill wastewater biodegradation process by various wood- rot macrofungi*, **Hindawi Pub. Cor. Biomed Res. Int.**, 2014, Article ID 482937 (2014) 1-14.
- [12] G. Santi, V. G. Muzzini, E. Galli, S. Proietti, S. Moscatello, A. Battistelli, *Mycelial growth and enzymatic activities of white rot fungi on anaerobic digestates from industrial biogas plants*, **Environ. Eng. Manag. J.**, 14 (2015) 1713-1719.
- [13] A. Knezevic, M. Stajic, V. M. Jovanovic, V. Kovacevic, J. Cilerdzic, I. Milovanovic, J. Vukojevic, *Induction of wheat straw delignification by Trametes species*, **Sci. Rep-Uk.**, 6 (2016) 1-12.
- [14] D. Wesenber, I. Kyriakides, S. N. Agathos, *White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents*, **Biotechnol. Adv.**, 22 (2013) 161-187.

- [15] T. K. Kowalska and K. Rybczynska, *Decolorization of remazol brilliant blue (RBBR) and poly R-478 by Bjerkandera adusta CCBAS 930*, **Cent. Eur. J. Biol.**, 7 (2012) 948-956.
- [16] Isroi, R. Millati, S. Syamsiah, C. Niklasson, M. N. Cahyanto, K. Lundquist and M. J. Taherzadeh, *Biological pretreatment of lignocelluloses with white-rot fungi and its applications: a review*, **Bioresources**, 6 (2011) 5224-5259.
- [17] P. Singh, O. Sulaiman, R. Hashim, P.F. Rupani, and L.C. Peng, *Biopulping of lignocellulosic material using different fungal species: a review*. **Rev. Environ. Sci. Bio.**, 9 (2010) 141-151.
- [18] G.M. Scott, M. Akhtar and T.K. Kirk (2000), *An update on biopulping commercialization*. In: **Proceedings of the 2000 Pulping Conference**, Tappi Press, Atlanta.
- [19] A. Knezevic, I. Milovanovic, M. Stajic, J. Vukojevic, *Trametes suaveolens as ligninolytic enzyme producer*, **J. Nat. Sci.**, 124 (2013) 437-444.
- [20] Z. C. Pedri, L. M. S. Lozano, K.L. Hermann, C. V. Helm, R. M. Peralta and L. B. B. Tavares, *Influence of nitrogen sources on the enzymatic activity and growth by Lentinula edodes in biomass Eucalyptus benthamii*, **Braz. J. Biol.**, 75 (2015) 940-947.
- [21] T. Robinson and P. S. Nigam, *Remediation of textile dye waste water using a white-rot fungus Bjerkandera adusta through solid state fermentation*, **Appl. Biochem. Biotech.**, 151 (2008) 618-628.
- [22] S. Kahraman, D. Asma, S. Erdemoğlu ve Ö. Yeşilada, *Biosorption of copper(II) by live and dried biomass of the white rot fungi Phanerochaete chrysosporium and Funalia trogii*, **Eng. Life Sci.**, 5 (2005) 72-77.
- [23] S. Kahraman ve Ö. Yeşilada, *Effect of spent cotton stalks on color removal and chemical oxygen demand lowering in olive oil mill wastewater by white rot fungi*, **Folia Microbiol.**, 44 (1999) 673-676.
- [24] Ö. Yeşilada, K. Fışkın ve E. Yeşilada, *Decolorization of alcoholic waste water by white rot fungi Coriolus versicolor, Funalia trogii and Phanerochaete chrysosporium ME446*, **Turk J Biol**, 19 (1995) 191-200.
- [25] Ö. Yeşilada, S. Şık ve M. Sam, *Biodegradation of olive oil mill wastewater by Coriolus versicolor and Funalia trogii: effects of agitation, initial COD concentration, inoculum size and immobilization*, **World J. Microb. Biot.**, 14 (1998) 37-42.
- [26] C. Wan ve Y. Li, *Microbial pretreatment of corn stover with Ceriporiopsis subvermispora for enzymatic hydrolysis and ethanol production*, **Bioresource Technol.**, 101 (2010) 6398-6403.
- [27] S. R. Couto ve J.L.T. Herrera, *Industrial and biotechnological applications of laccases: a review*. **Biotechnol. Adv.**, 24 (2006) 500-513.
- [28] M. Ardhaoui, S. Bhatt, M. Zheng, D. Dowling, C. Jolivald and F. A. Khonsari, *Biosensor based on laccase immobilized on plasma polymerized allylamine/carbon electrode*, **Mat Sci Eng**, 33 (2013) 3197-3205.
- [29] K. Fackler, C. Gradingner, M. Scmutzer, C. Tavzes, I. Burgert, M. Schwanninger, B. Hinterstoisser, T. Watanabe and K. Messner, *Biotechnological wood modification with selective white-rot fungi and its molecular mechanisms: a review*, **Food Technol. Biotech.**, 45 (2007) 269-276.
- [30] M. C. Westphalen, M. Tomsovsky, J. Kout and A. M. Gugliotta, *Bjerkandera in the Neotropics: phylogenetic and morphological relations of Tyromyces atroalbus and description of a new species*, **Mycol. Prog.**, 14: (2015) 1-8.

- [31] A. Heinfling, M. J. Martinez, A. T. Martinez, M. Bergbauer and U. Szewzyk, *Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from Bjerkandera adusta and Pleurotus eryngii in a manganese-independent reaction*, **Appl. Environ. Microb.**, 64 (1998) 2788-2793.
- [32] B. Tiberius and T. Catalin, *Optimization of nutritional conditions for the mycoremediation of the synthetic dyes*, **Rom. Biotech. Lett.**, 18 (2013) 8804-8811.
- [33] E. E. J. Kaal, J. A. Field and T. W. Joyce, *Increasing ligninolytic enzyme activities in several white-rot basidiomycetes by nitrogen- sufficient media*, **Bioresource Technol.**, 53 (1995) 133-139.
- [34] G. Mtui and Y. Nakamura, *Continuous production of lignin-degrading enzymes by Bjerkandera adusta immobilized on polyurethane foam*, **Biotechnol. Lett.**, 24 (2002) 1743-1747.
- [35] A. Piscitelli, C. D. Vecchio, V. Faraco, P. Giardina, G. Macellum, A. Miele, C. Pezzela, G. Sannia, *Fungal laccases: Versatile tools for lignocellulose transformation*, **C. R. Biol.**, 334 (2011) 789-794.
- [36] V. Madhavi and S.S. Lele, *Laccase: Properties and Applications*, **Bioresources** 4 (2009) 1694-1717.
- [37] C.F. Thurston, *The structure and function of fungal laccases*, **Microbiology**, 140 (1994) 19-26.
- [38] P. Baldrian, *Fungal laccases occurrence and properties*, **Fems Microbiol. Rev.**, 96 (2006) 215-242.
- [39] E. Birhanlı, *Mikroorganizmaların lakkaz üretimine çeşitli faktörlerin etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, **İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Malatya, 2003.
- [40] E. Apohan ve Ö. Yeşilada, *Enhancement of laccase production of pre-grown fungal pellets in wastewater of olive oil mills*, **Fresen. Environ. Bull.**, 20 (2011) 1216-1224.
- [41] T. Senthivelan, J. Kanagaraj and R. C. Panda, *Recent trends in fungal laccase for various industrial applications: an eco-friendly approach- a review*, **Biotechnol. Bioproc. E.**, 21 (2016) 19-38.
- [42] R.C. Minussi, G.M. Pastore, N. Durán, *Potential applications of laccase in the food industry*, **Trends Food Sci. Tech.**, 13 (2002) 205-16.
- [43] C. Crestini, D.S. Argyropoulos, *The early oxidative biodegradation steps of residual kraft lignin models with laccase*, **Bioorg. Med. Chem.**, 6 (1998) 2161-2169.
- [44] S. Camarero, O. Garcia, T. Vidal, J. Colom, J.C. del Rio, A. Gutierrez, *Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system*, **Enzyme Microb. Tech.**, 35 (2004) 113-120.
- [45] J.J. Roy, T.E. Abraham, K.S. Abhijith, K.P.V. Sujith, M.S. Thakur, *Biosensor for the determination of phenols based on Cross-Linked Enzyme Crystals (CLEC) of laccase*, **Biosens. Bioelectron.**, 21 (2005) 206-211.
- [46] R. Deshmukh, A. A. Khardnavis, H. J. Purohit, *Diverse Metabolic capacities of fungi for bioremediation*, **Indian J. Microbiol.**, 56 (2016) 247-264.
- [47] E. Rodriguez, M. A. Pickard, R. Vazquez-Duhalt, *Industrial dye decolorization by laccase from ligninolytic fungi*, **Curr. Microbiol.**, 38 (1999) 27-32.
- [48] M. Schubert, A. Mufflar and S. Mourad, *The use of a radial basis neural network and genetic algorithm for improving the efficiency of laccase-mediated dye decolourization*, **J. Biotechnol.**, 161 (2012) 429-436.

- [49] K. Golz-Berner, B. Walzel, L. Zastrow, O. Doucet, *Cosmetic and dermatological preparation containing copper binding proteins for skin lightening*, **Int. Pat. Appl.**, (2004) WO200401793.
- [50] E. A. Erkurt, A. Ünyayar, H. Kumbur, *Decolorization of synthetic dyes by white rot fungi, involving laccase enzyme in the process*, **Process Biochem.**, 42 (2007) 1429-1435.
- [51] N. K. Pazarlıoğlu, M. Sarıışık ve A. Telefoncu. *Laccase: production by Trametes versicolor and application to denim washing*. **Process Biochem.**, 40 (2005) 1673-1678.
- [52] T. K. Kirk, R.L. Farrell, *Enzymatic combustion- The microbial degradation of lignin*, **Annu. Rev. Microbiol.**, 41 (1987) 465-505.
- [53] K. E. Hammel and D. Cullen, *Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis*, **Curr. Opin. Plant. Biol.**, 11 (2008) 349-355.
- [54] A. M. Cancel, A.B. Orth and M. Tien, *Lignin and veratryl alcohol are not inducers of the ligninolytic system of Phanerochaete chrysosporium*, **Appl. Environ. Microb.**, 59 (1993) 2909-2913.
- [55] T. Mester, E. De Jong and J.A. Field, *Manganese regulation of veratryl alcohol in white-rot fungi and its indirect on lignin peroxidase*, **Appl. Environ. Microb.**, 61 (1995) 1881-1887.
- [56] M. D. Aitken and R. L. Irvine, *Stability testing of ligninase and Mn-peroxidase from Phanerochaete chrysosporium*, **Biotechnol. Bioeng.**, 34 (1989) 1251-1260.
- [57] T. Robinson, B. Chandran and P. Nigam, *Studies on the production of enzymes by white-rot fungi for decolorisation of textile dyes*, **Enzyme Microb. Tech.**, 29 (2001) 575-579.
- [58] R. Vazquez-Duhalt, D. W. S. Westlake and P. M. Fedorak, *Kinetics of chemically modified lignin peroxidase and enzymatic oxidation of aromatic nitrogen-containing compounds*, **Appl. Microb. Biotechnol.**, 42 (1995) 675-681.
- [59] J. A. Bumpus, *Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by Phanerochaete chrysosporium*, **Appl. Environ. Microb.**, 55 (1989) 154-158.
- [60] M. Kuwahara, J.K. Glenn, M. A. Morgan and M. H. Gold, *Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from ligninolytic cultures of Phanerochaete chrysosporium*, **Febs Lett.**, 50 (1984) 169-247.
- [61] M. Hofrichter, *Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP)*, **Enzyme Microb. Tech.**, 30 (2002) 454-466.
- [62] A. Heinfling, M. J. Martinez, A. T. Martinez, M. Bergbauer and U. Szewzyk, *Purification and characterization of peroxidases from the dye-decolorizing fungus Bjerkandera adusta*, **Fems Microbiol. Lett.**, 165 (1998) 43-50.
- [63] D. Li, M. Alic, J.A. Brown and M.H. Gold, *Regulation of manganese peroxidase gene transcription by hydrogen peroxide, chemical stress and molecular oxygen*, **Appl. Environ. Microb.**, 53 (1995) 341-345.
- [64] J. Cilerdzic, M. Stajic ve J. Vukojevic, *Activity of Mn-oxidizing peroxidases of Ganoderma lucidum depending on cultivation conditions*, **Bioresources**, 11 (2016) 95-104.
- [65] J. Jarvinen, S. Taskila, R. Isomaki and H. Ojamo, *Screening of white- rot fungi manganese peroxidases: a comparison between the specific activities of the enzyme from different native producers*, **Amb Express**, 2 (2012) 1-9.

- [66] H. Qayyum, H. Maroof & K. Yasha, *Remediation and treatment of organopollutants mediated by peroxidases: a review*, **Crit. Rev. Biotechnol.**, 29 (2009) 94-119.
- [67] A. Schützendübel, A. Majcherczyk, C. Johannes, A. Hüttermann, *Degradation of fluorene, anthracene, phenanthrene, fluoranthene and pyrene lacks connection to the production of extracellular enzymes by *Pleurotus ostreatus* and *Bjerkandera adusta**, **Int. Biodeter. Biodegr.**, 43 (1999) 93-100.
- [68] J.M. Barrasa, A.T. Martinez, M. J. Martinez, *Isolation and selection of novel basidiomycetes for decolorization of recalcitrant dyes*, **Folia Microbio.**, 54 (2009) 59-66.
- [69] A. Belcarz, G. Ginalska, T. Kornilowicz-Kowalska, *Extracellular enzyme activities of *Bjerkandera adusta* R59 soil strain, capable of daunomycin and humic acids degradation*, **Appl. Microb. Biotechnol.**, 68 (2005) 686-694.
- [70] T. Kornilowicz-Kowalska, M. Wrzosek, G. Ginalska, H. Iglík, R. Bancierz, *Identification and application of a new fungal strain *Bjerkandera adusta* R59 in decolorization of daunomycin wastes*, **Enzyme Microb. Tech.**, 38 (2006) 583-590.
- [71] T. Kornilowicz-Kowalska, G. Ginalska, A. Belcarz, H. Iglík, *Decolorization of humic acids and alkaline lignin derivative by an anamorphic *Bjerkandera adusta* R59 strain isolated from soil*, **Pol. J. Environ. Stud.**, 17 (2008) 903-909.
- [72] T. Kornilowicz-Kowalska, K. Rybczyńska, *Decolorization of Removal Brilliant Blue (RBBR) and Poly R-478 dyes by *Bjerkandera adusta* CCBAS 930*, **Cent. Eur. J. Biol.**, 7(5) (2012) 948-956.
- [73] T. Kornilowicz-Kowalska, K. Rybczyńska, *Anthraquinone dyes decolorization capacity of anamorphic *Bjerkandera adusta* CCBAS 930 strain and its HRP-like negative mutants*, **World J. Microb. Biot.**, 30 (2014) 1725-1736.
- [74] K. Rybczyńska, T. Kornilowicz-Kowalska, *Evaluation of dye compounds' decolorization capacity of selected *H. haematococca* and *T. harzianum* strains by principal component analysis (PCA)*, **Water Air Soil Poll.**, 226-228 (2015) 1-15.
- [75] İ. Başer, Y. İnancı, "Boyar Madde Kimyası", Yayın No:2, **Marmara Üniversitesi Teknik Eğitim Fakültesi Yayınları**, İstanbul, (1990), s. 47-52, 35-37, 90-187.
- [76] E. Forgacs, T. Cserhati, G. Oros, *Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review*, **Environ. Int.**, 30 (2004) 953-971.
- [77] N. A. Rahmat, A.A. Ali, Salmiati, N. Hussain, M.S. Muhamad, R.A. Kristanti and T. Hadibarata, *Removal of Remazol Brilliant Blue R from aqueous solution by adsorption using pineapple leaf powder and lime peel powder*, **Water Air Soil Poll.**, 227:105 (2016) 1-15.
- [78] Anonymous (2017). *Boya Sanayicileri Derneği "Dünya'da ve Türkiye'de Boya ve Hammadde Sektörünün Son Trendleri"*, 2015, <http://www.bosad.org.tr/images/pdf/2015-Bosad-sunum-TR.pdf> (on-line access on 01 March, 2017).
- [79] G. R. Jebapriya and J. J. Gnanadoss, *Bioremediation of textile dye using white rot fungi: a review*, **Int. J. Cur. Res. Rev.**, 5 (2013) 1-13.

- [80] N. N. Sing, A. Husaini, A. Zulkharnain ve H. A. Roslan, *Decolourisation capabilities of ligninolytic enzymes produced by Marasmius cladophyllus UMAS MS8 on Remazol Brilliant Blue R and other azo dyes*, **Hindawi Pub. Cor. Biomed Res. Int.**, 2017, Article ID 1325754, 1-8.
- [81] S. K. Sen, S. Raut, P. Bandyopadhyay, S. Raut, *Fungal decolouration and degradation of azo dyes: A review*, **Fungal Biol-Uk**, 30 (2016) 112-133.
- [82] U. Meyer, *Biodegradation of synthetic organic colorant*, **Fems Symp.**, 12 (1981) 371-378.
- [83] F.O. Kocaer ve U. Alkan, *Boyar Madde İçeren Tekstil Atık sularının Arıtım Alternatifleri*, **Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi**, 7 (2002) 47-55.
- [84] T. Robinson, , G. McMullan, R. Marchant, P. Nigam, *Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment Technologies with a proposed alternative*, **Bioresource Technol.**, 77 (2001) 247-255.
- [85] K. Rybczyńska-Tkaczyk and T. Kornilłowicz-Kowalska, *Biosorption optimization and equilibrium isotherm of industrial dye compounds in novel strains of microscopic fungi*, **Int. J. Environ. Sci. Technol.**, 13 (2016) 2837-2846.
- [86] M. M. Mustafa, P. Jamal, M. F. Alkhabit, S. S. Mahmood, D. N. Jimat and N N. Ilyas, *Panus tigrinus as a potential biomass source for reactive blue decolorization: Isotherm and kinetic study*, **Electron. J. Biotechnol.**, 26 (2017) 7-11.
- [87] Y. Wang, R. Vazquez-Duhalt, M. A. Pickard, *Purification, characterization, and chemical modification of manganese peroxidase from Bjerkandera adusta UAMH 8258*, **Curr. Microbiol.**, 45 (2002) 77-87.
- [88] M. J. Dinis, R. M. F. Bezerra, F. Nunes, A. A. Dias, C. V. Guedes, L. M. M. Ferreira, J. W. Cone, G. S. M. Marques, A. R. N. Barros, M. A. M. Rodrigues, *Modification of wheat straw lignin by solid state fermentation with white-rot fungi*, **Bioresource Technol.**, 100 (2009) 4829-4835.
- [89] A. Heinfling, F. J. Ruiz-Duenas, M. J. Martinez, M. Bergbauer, U. Szewzyk, A. T. Martinez, *A study on reducing substrates of manganese-oxidizing peroxidases from Pleurotus eryngii and Bjerkandera adusta*, **Febs Lett.**, 428 (1998) 141-146.
- [90] J. Swamy and J. A. Ramsay, *The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes*, **Enzyme Microb. Tech.**, 24 (1999) 130-137.
- [91] P. R. Moreira, E. Almeida-Vara, G. Sena-Martins, I. Polonia, F. X. Malcata, J. C. Duarte, *Decolourisation of Remazol Brilliant Blue R via a novel Bjerkandera sp. strain*, **J. Biotechnol.**, 89 (2001) 107-111.
- [92] P. R. Moreira, F. Bouillenne, E. Almeida-Vara, F. X. Malcata, J. M. Frère, J. C. Duarte, *Purification, kinetics and spectral characterisation of a new versatile peroxidase from a Bjerkandera sp. isolate*, **Enzyme Microb. Tech.**, 38 (2006) 28-33.
- [93] J. Axelsson, U. Nilsson, E. Terrazas, T. Alvarez Aliaga, U. Welander, *Decolorization of he textile dyes Reactive Red 2 and Reactive Blue 4 using Bjerkandera sp. Strain BOL 13 in a continuous rotating biological contactor reactor*, **Enzyme Microb. Tech.**, 39 (2006) 32-37.
- [94] M. Mohorcic, S. Teodorovic, V. Golob, J. Friedrich, *Fungal and enzymatic decolourisation of artificial textile dye baths*, **Chemosphere**, 63 (2006) 1709-1717.

- [95] I. Eichlerova, L. Homolka, F. Nerud, *Decolorization of high concentrations of synthetic dyes by the white rot fungus Bjerkandera adusta strain CCBAS 232*, **Dyes Pigments**, 75 (2007) 38-44.
- [96] R. Tinoco, J. Verdin, R. Vazquez-Duhal, *Role of oxidizing mediators and tryptophan 172 in the decoloration of industrial dyes by the versatile peroxidase from Bjerkandera adusta*, **J. Mol. Catal B-Enzym.**, 46 (2007) 1-7.
- [97] F. Nordström, E. Terrazas and U. Welander, *Decolorization of a mixture of textile dyes using Bjerkandera sp. BOL-13*, **Environ. Technol.**, 29 (2008) 921-929.
- [98] A. Anastasi, V. Prigione, G. C. Varese, *Industrial dye degradation and detoxification by basidiomycetes belonging to different eco-physiological groups*, **J. Hazard. Mater.**, 177 (2010) 260-267.
- [99] A. Anastasi, B. Parato, F. Spina, V. Tigrini, V. Prigione and G. C. Varese, *Decolourisation and detoxification in the fungal treatment of textile wastewaters from dyeing processes*, **New Biotechnol.**, 29 (2011) 38-45.
- [100] C. Qi-he, S. Krügener, T. Hirth, S. Rupp, S. Zibek, *Co-cultured production of lignin-modifying enzymes with white-rot fungi*, **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 165 (2011) 700-718.
- [101] N. Gomi, S. Yoshida, K. Matsumoto, M. Okudomi, H. Konno, T. Hisabori, Y. Sugano, *Degradation of the synthetic dye amaranth by the fungus Bjerkandera adusta Dec 1: inference of the degradation pathway from an analysis of decolorized products*, **Biodegradation**, 22 (2011) 1239-1245.
- [102] M. Jonstrup, N. Kumar, B. Guieysse, M. Murto and B. Mattiasson, *Decolorization of textile dyes by Bjerkandera sp. BOL 13 using waste biomass as carbon source*, **J. Chem. Technol. Biot.**, 88 (2013) 388-394.
- [103] Yong-Seok Choi, Ja-Yeon Seo, H. Lee, J. Yoo, J. Jung, Jae-Jin Kim, Gyu-Hyeok Kim, *Decolorization and detoxification of wastewater containing industrial dyes by Bjerkandera adusta KUC9065*, **Water Air Soil Poll.**, 225:1801 (2014) 1-10.
- [104] K. Murugesan, I. H. Nam, Y. M. Kim and Y. S Chang, *Decolorization of reactive dyes by a thermostable laccase produced by Ganoderma lucidum in solid state culture*, **Enzyme Microb. Tech.**, 40 (2007) 1662-1672.
- [105] E. Birhanlı ve Ö. Yeşilada, *Enhanced production of laccase in repeated-batch cultures of Funalia trogii and Trametes versicolor*, **Biochem. Eng. J.**, 52 (2010) 33-37.
- [106] F. Boran ve Ö. Yeşilada, *Enhanced production of laccase by fungi under solid substrate fermentation condition*, **Bioresources**, 6 (2011) 4404-4416.
- [107] Ö. Yeşilada, E. Birhanlı, N. Özmen ve S. Ercan, *Highly stable laccase from repeated-batch culture of Funalia trogii ATCC 200800*, **Appl. Biochem. Micro+**, 50 (2014) 55-61.
- [108] I. M. Banat, P. Nigam, D. Singh, and R. Marchant, *Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: A review*, **Bioresource Technol.**, 58 (1996) 217-227.
- [109] Ö. Yeşilada, *Decolourization of Crystal-Violet by fungi*, **World J. Microb. Biot.**, 11 (1995) 601-602.
- [110] Ö. Yeşilada, D. Asma ve S. Cing, *Decolorization of textile dyes by fungal pellets*, **Process Biochem.**, 38 (2003) 933-938.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Arife ATİK

Doğum Yeri ve Tarihi: Bursa – 30.05.1987

E- posta: destiny_guzel@hotmail.com

Lisans: 2004-2008 Ankara Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü,
ANKARA

