

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YENİ İZOLE EDİLMİŞ *TRAMETES VERSICOLOR*'UN LAKKAZ ÜRETİM
YETENEĞİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tülay TURAL

Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA

OCAK 2022

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YENİ İZOLE EDİLMİŞ *TRAMETES VERSICOLOR*'UN LAKKAZ ÜRETİM
YETENEĞİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TÜLAY TUTAL
(36173611024)

Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA

OCAK 2022

TEŞEKKÜR VE ÖNSÖZ

Bilimsel alanda yapılmış her çalışma büyük bir emek ve özveri ile oluşturulmaktadır. Bu nedenle, bilime sunulan her bir çalışmanın önemi ve değeri çok büyüktür. Bu bağlamda yapılan çalışmalar, bilime uzun yıllar emek harcamış bazı değerli hocaların bilgi, deneyim ve fedakarlıkları sayesinde gerçekleşmektedir. Bu vesile ile;

Gerek Yüksek Lisans eğitimim boyunca gerek tez çalışmaları kapsamında bana her konuda yardımlarını esirgemeyen, kıymetli ve engin bilgi ve tecrübesi ile bu çalışmamın seçimini öneren ve çalışma süresince de bilgi ve desteği ile her türlü imkanı sunan, öğrencisi olmaktan büyük gurur duyduğum, her zaman örnek alacağım, çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA' ya

Yüksek Lisans eğitimim boyunca tüm samimiyeti ve içtenliği ile her konuda hep yanımda olan, günün her saati kıymetli bilgi ve desteğini esirgemeyen, çok değerli hocam, Sayın Dr. Filiz BORAN'a

Laboratuvar çalışmalarım esnasında her zaman yanımda olan ve tüm çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen doktora öğrencisi Eray TATLICI'ya

Yüksek Lisans eğitimim ve deneysel çalışmalarım esnasında, bana maddi ve manevi desteğini esirgemeyen değerli eşim, Dr. Öğretim Üyesi Varol TUTAL ile canım yavrularım Tuana Eminem TUTAL ve Tusem Elzem TUTAL'a

Tüm hayatım boyunca desteklerini hiçbir zaman esirgememiş olan annem ve babam başta olmak üzere; kardeşlerim ve diğer tüm ailem ile arkadaşlarım ve hocalarıma,

Çalışmalarımıza FYL-2019-1756 numaralı proje ile maddi destek sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

ONUR SÖZÜ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum “Yeni İzole Edilmiş *Trametes versicolor*’un Lakkaz Üretim Yeteneğinin Araştırılması” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığına ve yararlandığım bütün kaynakların hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Tülay TUTAL



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR VE ÖNSÖZ	iv
ONUR SÖZÜ	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
SEMBOLLER VE KISALTMALAR	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Biyoteknoloji	1
1.1.1. Kırmızı biyoteknoloji	2
1.1.2. Mavi biyoteknoloji	3
1.1.3. Sarı biyoteknoloji	3
1.1.4. Yeşil biyoteknoloji	3
1.1.5. Kahverengi biyoteknoloji	3
1.1.6. Beyaz biyoteknoloji.....	3
1.1.7. Gri biyoteknoloji	3
1.1.8. Altın biyoteknoloji.....	4
1.1.9. Siyah biyoteknoloji.....	4
1.2. Beyaz Çürükçül Funguslar	4
1.2.1. <i>Trametes versicolor</i>	6
1.3. Lakkaz Enzimi	7
1.3.1. Lakkaz enziminin tanımı ve yapısı.....	7
1.3.2. Lakkaz enziminin bazı uygulama alanları	10
1.4. Lakkaz Enziminin Üretim Yöntemleri	12
1.4.1. Katı faz fermentasyonu.....	12
1.4.2. Sıvı faz fermentasyonu	14
1.4.2.1. Kesikli fermentasyon	14
1.4.2.2. Yarı sürekli fermentasyon	14
1.4.2.3. Sürekli fermentasyon.....	14
1.4.2.4. Tekrarlı kesikli fermentasyon	14
2. KAYNAK ÖZETLERİ	16
3. MATERYAL VE YÖNTEM	21
3.1. Çalışmada Kullanılan Fungus	21
3.2. <i>Trametes versicolor</i> 'un Lakkaz Enzimini Üretebildiğinin Makroskobik Olarak Belirlenmesi.....	21
3.3. <i>Trametes versicolor</i> 'un Sabouraud Dekstrozu Agar (SDA) Besiyerinde Üretilmesi ve Saf Kültür olarak Devamlılığının Sağlanması	22
3.4. Ekim İçin Kullanılacak Stok Ekim Kültürlerinin Hazırlanması	22
3.5. Tekrarlı Kesikli Çalışmalarda Kullanılacak Fungal Peletlerinin Hazırlanması	23
3.6. Lakkaz Enziminin Üretiminde Uygulanan Farklı Fermentasyon Yöntemleri.....	23
3.6.1. Kesikli üretim yöntemi	23
3.6.2. Tekrarlı kesikli üretim yöntemi	23
3.6.3. Katı faz fermentasyonu yöntemi	24
3.7. Katı Faz Kültüründen Lakkaz Enziminin Eldesi	24
3.8. Lakkaz Aktivitesinin Saptanması	24
3.9. Doğal Jel Elektroföresi	25
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	26

4.1. <i>T. versicolor</i> 'un ABTS İçeren ve İçermeyen Sabouraud Dekstroz Agar Besiyerlerinde Lakkaz Varlığının Gösterilmesi	26
4.2. Farklı Fermentasyon Süreçlerinde <i>T. versicolor</i> 'un Lakkaz Üretimi	27
4.2.1. Katı faz fermentasyonu sürecinde lakkaz üretimi	27
4.2.1.1. Katı faz fermentasyonu sürecinde indükleyicilerin lakkaz üretimine etkisi.....	29
4.2.2. Sıvı faz fermentasyonu sürecinde indükleyicilerin lakkaz üretimine etkisi	31
4.2.2.1. Kesikli süreçte lakkaz üretimi	31
4.2.2.2. Tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi	34
4.3. Zimogram Çalışmaları	38
5. SONUÇ VE ÖNERİ	39
KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ	52



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 :	Biyoteknolojinin bazı renkleri.	2
Çizelge 1.2 :	<i>Trametes versicolor</i> 'un bazı uygulama alanları.....	7
Çizelge 1.3 :	Katı faz fermentasyonu (KSF) ve sıvı faz fermentasyonun (SSF) karşılaştırılması	15



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 :	Beyaz çürükçül fungusların odunda bıraktığı beyaz görüntü	4
Şekil 1.2 :	<i>Trametes versicolor</i> 'un odun üzerindeki görüntüsü.	6
Şekil 1.3 :	Mediator varlığı ve yokluğunda substrat oksidasyonu	9
Şekil 1.4 :	Lakkazın bakır merkezleri	10
Şekil 1.5 :	Lakkazların biyoteknolojik uygulamaları	11
Şekil 3.1 :	<i>T. versicolor</i> 'un ağaçtaki görüntüsü.	21
Şekil 3.2 :	SDA içeren plaklarda üretilmiş <i>T. versicolor</i> 'un görüntüsü.	22
Şekil 3.3 :	Zimogram çalışması.	25
Şekil 4.1 :	<i>T. versicolor</i> 'un ABTS oksidasyonuna bağlı olarak SDA ortamındaki renk değişimi. Soldaki: ABTS içermeyen besiyerinde üreme, Sağdaki: ABTS içeren besiyerindeki üreme ve renk değişimi.	27
Şekil 4.2 :	Katı faz sürecinde üretilmiş <i>T. versicolor</i> (a) ve ABTS oksidasyonuna bağlı lakkaz varlığının gösterilmesi (b)	28
Şekil 4.3 :	<i>T. versicolor</i> 'un katı faz fermentasyonu sürecinde zamana bağlı lakkaz aktivite değişimi.	29
Şekil 4.4 :	<i>T. versicolor</i> 'un bakır içeren ortamda katı faz fermentasyonu sürecinde zamana bağlı lakkaz aktivite değişimi	30
Şekil 4.5 :	<i>T. versicolor</i> 'un ABTS ve ABTS + bakır içeren ortamda katı faz fermentasyonu sürecinde zamana bağlı lakkaz aktivite değişimi.	30
Şekil 4.6 :	<i>T. versicolor</i> 'un ksilidin ve ksilidin + bakır içeren ortamda katı faz fermentasyonu sürecinde zamana bağlı lakkaz aktivite değişimi.	31
Şekil 4.7 :	Stok inokulumun görüntüsü. Soldan sağa. Solda: Ekim yapılmamış SDB, Ortada: Çalkalamalı koşullarda üretilmiş kültür, Sağda: Homojenize stok inokulum.	32
Şekil 4.8 :	<i>T. versicolor</i> 'un SDB ortamında kesikli süreçte zamana bağlı lakkaz aktivite değişimi.	33
Şekil 4.9 :	<i>T. versicolor</i> 'un bakır içeren (1 mM) SDB ortamında kesikli süreçte zamana bağlı lakkaz aktivite değişimi.	33
Şekil 4.10 :	<i>T. versicolor</i> 'un ABTS ve ksilidin içeren SDB ortamında kesikli süreçte zamana bağlı lakkaz aktivite değişimi.	34
Şekil 4.11 :	Peletlerin görüntüsü. Solda: Ekim yapılmamış SDB, Sağda: Üretilmiş fungal peletler.	35
Şekil 4.12 :	<i>T. versicolor</i> 'un bakır içeren (1 mM) ve bakır içermeyen SDB ortamında tekrarlı kesikli süreçte zamana bağlı lakkaz aktivite değişimi.	36
Şekil 4.13 :	<i>T. versicolor</i> 'un ksilidin içeren (1 mM) SDB ortamında tekrarlı kesikli süreçte zamana bağlı lakkaz aktivite değişimi.	37
Şekil 4.14 :	<i>T. versicolor</i> 'un 0.05 mM ABTS + 1 mM bakır içeren SDB ortamında tekrarlı kesikli süreçte zamana bağlı lakkaz aktivite değişimi.	37
Şekil 4.15 :	<i>T. versicolor</i> 'un 1 mM ksilidin + 1 mM bakır içeren SDB ortamında tekrarlı kesikli süreçte zamana bağlı lakkaz aktivite değişimi.	38
Şekil 4.16 :	<i>T. versicolor</i> ham kültür filtratlarının zimogram çalışmaları (a) Katı faz fermentasyonu sürecinde bakır içermeyen ortamda 20. gün enzim kaynağı (b) Katı faz fermentasyonu sürecinde 10 mM bakır içeren ortamda 20. gün enzim kaynağı (c) Kesikli süreçte 1 mM bakır içeren ortamda 9. gün enzim kaynağı (d) Tekrarlı kesikli süreçte 1 mM bakır içeren ortamda 6. kullanım enzim kaynağı	38

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

ABTS	: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
Cu	: Bakır
CuSO₄	: Bakır Sülfat
E.C	: Enzim Komisyonu
g	: Gram
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HBT	: 1- hidroksibenzotriazol
Kda	: Kilo Dalton
KSF	: Katı Substrat Fermantasyonu
L	: Litre
LiP	: Ligninperoksidaz
mg	: Miligram
mM	: Milimolar
MnP	: Manganperoksidaz
PAH	: Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar
r.p.m	: Dakikadaki Devir Sayısı (Revolution Per Minute)
SDA	: Sabouraud Dekstroz Agar
SDB	: Sabouraud Dekstroz Broth
SSF	: Sıvı Faz Fermentasyonu
°C	: Santigrad Derece
U/L	: Ünite/Litre
U/mL	: Ünite/mililitre
μmol	: Mikromol

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

YENİ İZOLE EDİLMİŞ *TRAMETES VERSICOLOR*'UN LAKKAZ ÜRETİM YETENEĞİNİN ARAŞTIRILMASI

TÜLAY TUTAL

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

52+XII sayfa

2022

Danışman: Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA

Bu çalışmada yeni izole edilmiş *Trametes versicolor* suşunun lakkaz üretim yeteneği üç farklı fermentasyon sürecinde araştırılmıştır. Üç fermentasyon sürecinde de fungus lakkaz enzimini üretebilmiştir. Tüm fermentasyon süreçlerinde, bakırın lakkaz üretimi için önemli bir indükleyici olduğu gözlenmiştir.

Katı faz fermentasyonu sürecinde bakır içermeyen ortamda 20. günde 10.70 U/mL lakkaz aktivitesi saptanırken, bakır içeren ortamda aynı günde bu değer 13.21 U/mL olarak saptanmıştır. 0.5 mM ABTS içeren ortamda 20. günde 5.60 U/mL lakkaz aktivitesi elde edilirken, 0.5 mM ABTS + 10 mM bakır ortamında 27.30 U/mL lakkaz aktivitesine ulaşılmıştır. 10 mM ksilidin içeren ortamda ise 20. günde 5.53 U/mL lakkaz aktivitesi saptanırken, 10 mM ksilidin + 10 mM bakır içeren ortamda ise 22.59 U/mL enzim aktivitesi belirlenmiştir. Sıvı kesikli fermentasyon sürecinde 1 mM bakır içeren ortamda lakkaz aktivitesi önemli oranda indüklenmiş ve lakkaz aktiviteleri 3, 6 ve 9. günlerde sırasıyla 2.25, 19.83 ve 24.57 U/mL'ye ulaşmıştır. ABTS ve ksilidin bu suşun lakkaz üretimini bakıra göre çok daha düşük düzeyde indüklemiştir. 0.05 mM ABTS + 1 mM bakır içeren ortamda 6. günde 10.50 U/mL lakkaz aktivitesi saptanırken, 1 mM ksilidin + 1 mM bakır içeren ortamda ise 10.69 U/mL enzim aktivitesi belirlenmiştir. Tekrarlı kesikli süreç de lakkaz üretimini önemli oranda indüklemiştir. Bakır içermeyen ortamda düşük düzeyde enzim aktiviteleri saptanırken; bakır içeren ortamda lakkaz aktiviteleri indüklenmiş ve peletlerin 6. kullanımında aktivite 0.66 U/mL' den 9.87 U/mL'ye ulaşmıştır. 1 mM ksilidin + 1 mM bakır içeren ortamda ise lakkaz üretimi güçlü bir şekilde indüklenmiştir. Doğal poliakrilamid jel elektroforezi sonrası yapılan aktivite boyamaları aktif lakkaz bantlarını göstermiştir.

Sonuçlar, bu suşun iyi bir lakkaz üreticisi olduğunu ve fermentasyon sürecine, üretim zamanına ve kullanılan indükleyiciye bağlı olarak lakkaz üretim veriminin değiştiğini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Lakkaz, katı faz fermentasyonu, sıvı kesikli fermentasyon, sıvı tekrarlı kesikli fermentasyon, *Trametes versicolor*, zimogram

ABSTRACT

Master Thesis

INVESTIGATION OF LACCASE PRODUCTION ABILITY OF NEWLY ISOLATED *TRAMETES VERSICOLOR*

TÜLAY TUTAL

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

52+XII sayfa

2022

Supervisor: Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA

In this study, laccase production ability of the newly isolated *Trametes versicolor* strain was investigated during three different fermentation process. In all three fermentation processes, the fungus was able to produce the laccase enzyme. It has been observed that copper is an important inducer for laccase production in all fermentation processes.

During the solid phase fermentation process, 10.70 U/mL laccase activity was detected on the 20th day in the medium without copper, while this value was 13.21 U/mL on the same day in the 10 mM copper-containing medium. In the medium containing 0.5 mM ABTS, 5.60 U/mL laccase activity was obtained on 20th day, while the laccase activity reached to 27.30 U/mL in 0.5 mM ABTS + 10 mM copper medium. On the 20th day, 5.53 U/mL laccase activity was detected in the medium containing 10 mM xylinine, while 22.59 U/mL enzyme activity was determined in the medium containing 10 mM xylinine + 10 mM copper. During the liquid batch fermentation process, in the medium containing 1mM copper, laccase activity was significantly induced and laccase activities reached 2.25, 19.83 and 24.57 U/mL on the 3rd, 6th and 9th days, respectively. ABTS and xylinine induce laccase production of this strain at a much lower level than copper. On the 6th day, 10.50 U/mL laccase activity was detected in the medium containing 0.05 mM ABTS + 1 mM copper, while 10.69 U/mL enzyme activity was determined in the medium containing 1 mM xylinine + 1 mM copper. The repeated batch process also significantly induced laccase production. While low level of enzyme activities in copper-free medium detected, laccase activities were induced in the copper-containing medium and for example, the activity reached from 0.66 U/mL to 9.87 U/mL in the 6th use of pellets. In the medium containing 1 mM xylinine + 1 mM copper, laccase production was strongly induced. Activity staining after natural polyacrylamide gel electrophoresis showed active laccase bands.

The results showed that this strain is a good laccase producer and the laccase production yield varies depending on the fermentation process, production time and inducer used.

Keywords: Laccase, Solid phase fermentation, Liquid batch fermentation, Liquid repeated batch fermentation, *Trametes versicolor*, zymogram

1. GİRİŞ

1.1. Biyoteknoloji

Biyoloji kökenli teknolojinin gelişimi, sürdürülebilir kalkınma için daima önemli bir katkı yapmıştır. Sanayileşmeden çok önce henüz biyoteknoloji ve kimya kavramları olmadan, yiyecek ve içeceklerin hazırlanması ve devamlılığının sağlanması keşfedilmişti (Wohlgemuth, 2009). Biyoteknoloji terimi ilk kez 1919 yılında Karl Ersby tarafından “yeni ürünler oluşturabilmek için hammaddelerin biyolojik sistemler yardımıyla dönüştürülebilmesi” şeklinde tanımlanmış (Gözükırmızı ve Karlık, 2017) ve 1970’li yıllardan sonra ortaya çıkan yeni teknolojiler içinde belki de en çok ilgi çeken teknoloji olarak sağlık, yiyecek üretimi ve işlenmesi, çevrenin korunması ve ürün üretimi gibi birçok alanda etkili olmuştur (Gavrilescu ve Chisti, 2005).

Biyoloji yaşam bilimi, teknoloji ise uygulama bilgisi olarak tanımlandığı için; biyoteknoloji kavramsal olarak “uygulamalı yaşam bilgisi” olarak da ifade edilebilir (Öcal, 2012). Biyoloji sürekli bilgi sınırlarını genişlettiği için biyolojik süreçlerdeki büyüme tıp, tarım ve endüstriyel biyoteknoloji alanlarında yenilikleri öngören seçenekler sunmaktadır (Cornelissen ve diğ, 2021).

Biyoteknoloji; biyolojik sistemlerin mal (ürün) ve hizmet üretiminde kullanılmasıdır. Biyoteknolojide kullanılan biyolojik sistemler de mikroorganizmalar, bitki ve hayvan hücreleri ve onların bileşenleridir (enzimler gibi).

Biyoteknolojinin pek çok alt dalı vardır. Bunlar arasında; fermentasyon biyoteknolojisi, enzim biyoteknolojisi, çevre biyoteknolojisi, gıda biyoteknolojisi, tıbbi (sağlık) biyoteknoloji, endüstriyel biyoteknoloji gibi dallar sayılabilir.

Biyoteknoloji; tıp, tarım, hayvan, bitki ıslahı, doku kültürü gibi alanlarda ve aynı zamanda hastalıkların hızlı bir şekilde teşhis edilip sonrasında da tedavi edilmesinde kullanıldığı gibi; biyoaktif ürünlerin üretiminde de kullanılmaktadır. Bununla birlikte adli tıp, çevre bilimleri, botanik, toksikoloji, fizik, matematik, ekonomi, hukuk, uluslararası ilişkiler, psikoloji, sosyoloji, turizm, gibi daha birçok alanda da biyoteknolojinin kullanımı amaçlanmaktadır. Böylece her alanda yapılan ortak araştırma ve çalışmalar biyoteknolojinin hızlı bir gelişim süreci göstermesini sağlamaktadır (Soetan, 2008).

Atık suların yeniden arıtılması ve kullanılması yönünde biyoteknolojinin yeni yaklaşımları ve çözüm yolları sunabilmesi de oldukça önemlidir (Grommen ve Verstraete, 2002). Biyoteknoloji, gıda ve su açısından yaşanan sorunları azaltarak hem kalkınmaya katkı sağlamakta hem de ülkeler arası barış ortamı oluşturulmasına destek olmaktadır (DaSilva, 1998).

Biyoteknolojinin çok farklı uygulama alanları vardır. Biyoteknolojinin farklı uygulama alanları farklı renklerle ifade edilebilmektedir. Çizelge 1.1’de biyoteknolojinin bazı renkleri verilmiştir.

Çizelge 1.1 : Biyoteknolojinin bazı renkleri.

Renk	Biyoteknolojinin Uygulama Alanları
Kırmızı	Sağlık Biyoteknolojisi
Mavi	Sucul Biyoteknoloji
Sarı	Gıda Biyoteknolojisi
Yeşil	Tarımsal Biyoteknoloji
Kahverengi	Kurak alan ve Çöl Biyoteknolojisi
Beyaz	Endüstriyel Biyoteknoloji
Gri	Geleneksel Fermentasyon ve Biyolojik İşlem Biyoteknolojisi
Altın	Biyoinformatik, Nanobiyoteknoloji
Siyah	Biyoterör, Biosuç

1.1.1. Kırmızı biyoteknoloji

Biyoteknolojinin önemli uygulama alanlarından biridir. Tıp alanındaki uygulamaları kapsayan kırmızı biyoteknoloji; ilaç, aşı ve antikorların üretimi, tedavi ve teşhisinde biyoteknolojik yaklaşımlar ve hastalıkların tedavisinde, genetik mühendislik uygulamalarının kullanılması gibi uygulamaları içermektedir (Akkaya ve Pazarlıoğlu, 2012; Gül, 2014).

1.1.2. Mavi biyoteknoloji

Su ve okyanus biyoteknolojisi olarak da ifade edilen mavi biyoteknolojiye; okyanus içerisinde bulunan çeşitli canlıların hem korunması hem de canlı türlerinin yaşamının devam etmesi için yapılan çalışmalar dahil edilebilir (Akkaya ve Pazarlıoğlu, 2012). Mavi biyoteknoloji; sucul biyolojik çeşitliliğin, çeşitli ürünlerin üretiminde kullanımını da kapsamaktadır. Deniz canlılarının formu, yapısı, fizyolojisi, kimyası gibi denize ait biyokaynakları kullanan alandır (Barcelos ve diğ, 2018).

1.1.3. Sarı biyoteknoloji

Sarı biyoteknoloji; gıda biyoteknolojisindeki her türlü uygulamayı kapsamaktadır. Örneğin; ekmek, peynir, kefir ve şarap gibi ürünlerin üretimi sarı biyoteknolojinin kapsamındadır (İbrahim, 2021).

1.1.4. Yeşil biyoteknoloji

Yeşil biyoteknoloji; bitki yetiştirmede faydalı olan besin kalitesi, verim, ekonomi gibi özellikleri geliştirmek amacıyla tarımdaki biyoteknolojik süreçler ile ilgilidir. Yüksek verimli ve zengin besinsel içerikli, böceklerle karşı dirençli, daha uzun raf ömrüne sahip ürün üretiminde yeşil biyoteknoloji umut vadetmektedir. Transgenik ve genetik olarak modifiye edilmiş organizmaların geliştirilmesi de bu kapsamdadır (Barkha ve diğ, 2016, Barcelos ve diğ, 2018; Yashveer ve diğ, 2014).

1.1.5. Kahverengi biyoteknoloji

Kahverengi biyoteknolojide; çöl bitkilerinin yetiştirilmesi, tuzlu tarım, tuzlu su kültürü ve kurak ortamlarda su ve atık suyun kullanımının geliştirilmesi gibi konular ele alınmaktadır (Rodríguez-Núñez ve diğ, 2020).

1.1.6. Beyaz biyoteknoloji

Beyaz biyoteknoloji, bakteri, maya, fungus, bitkiler ve bu organizmaların enzimleri gibi biyolojik sistemlerle endüstriyel ölçekli ürün üretimini kapsamaktadır (Barcelos ve diğ, 2018).

1.1.7. Gri biyoteknoloji

Geleneksel fermentasyon ve biyolojik işlem biyoteknolojisi uygulamalarını içermektedir.

1.1.8. Altın biyoteknoloji

Biyoteknoloji ve nanoteknolojinin kesişimi olan nanobiyoteknoloji, altın biyoteknoloji kapsamında yer almaktadır. Fiziksel ve kimyasal yaklaşımlara alternatif olarak farmasötik ve tıbbi uygulamalarda güvenilir, temiz ve çevre dostu olan biyolojik tabanlı nanopartikül üretimi de dikkat çekmektedir (Barabadi ve diğ, 2018).

1.1.9. Siyah biyoteknoloji

Siyah biyoteknoloji, mikroorganizma ve toksinleri kullanan biyoterörizm, biyolojik savaş ve biyolojik silahları içermektedir (<https://en.wikipedia.org>).

1.2. Beyaz Çürükçül Funguslar

Beyaz çürükçül funguslar; Basidiomycetes sınıfına dahil olup salgıladıkları enzimler esas olarak lignin ve hemisellozlar olmak üzere odunun tüm bileşenlerini yıkabilen ve doğada oldukça yaygın olan mikroorganizmalardır (Baldrian, 2004; Chenaux ve diğ, 2014; Ozan ve diğ, 2014; Singh ve Singh, 2014; Osma ve diğ, 2011; Martani ve diğ, 2017; An ve diğ, 2021; González ve diğ, 2021). Bazı beyaz çürükçül fungus türleri arasında; *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Trametes trogii*, *Ganoderma lucidum* ve *Irpex lacteus* yer almaktadır (Mir-Tutusa ve diğ, 2018).

Beyaz çürükçül funguslar oldukça dirençli olan lignini parçalayabilen organizmalardır ve lignini yıkarken odunda bıraktığı beyaz renkten dolayı bu ismi almaktadırlar (Rodríguez-Couto, 2017) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1 : Beyaz çürükçül fungusların odunda bıraktığı beyaz görüntü. (<https://www.hemel.com.tr>; <https://en.wikipedia.org>)

Lignin, poliaromatik yapıda olduğundan ve eter bağlı hidrofobik bir polimer olması nedeniyle su geçirmez yapıdadır. Bundan dolayı da biyolojik yıkıma karşı oldukça dirençlidir (Singh ve diğ, 2021). Beyaz çürükçül funguslar, ligninin yıkımında önemli olan ve odunun çürümesini sağlayan enzimleri içermektedir (Akerman-Sanchez ve Rojas-Jimenez, 2021). Beyaz çürükçül fungusların salgılamış olduğu bu lignin modifiye edici enzimler arasında; lakkaz, lignin peroksidaz (LiP), mangan peroksidaz (MnP) ve çok yönlü peroksidazları sayabiliriz. Bu enzimlerden lakkaz elektron alıcısı olarak moleküler oksijeni kullanırken; peroksidazlar hidrojen peroksiti (H_2O_2) kullanmaktadır (Mir-Tutusa ve diğ, 2018).

MnP ve LiP gibi hem içeren oksidatif enzimler, doğada çoğunlukla ligninin uzaklaştırılmasından sorumlu enzimlerdir (Min ve diğ, 2022). MnP katalitik reaksiyonunda, lignin polimeri ve diğer organik kirleticilerin aromatik halkasını kırmak için düşük moleküler ağırlıklı redoks aracı olarak işlev gören Mn^{3+} 'yi oluşturmak üzere ilk olarak Mn^{2+} oksitlenir. Özellikle beyaz çürükçül funguslarda tanımlanan lakkaz ise; katalitik döngüsünde bir elektron oksidasyonunun katalizlenmesiyle hem fenolik hem de fenolik olmayan substratları parçalar (Zhang ve diğ, 2022). Lignin peroksidazlar ise MnP' lere kıyasla daha yüksek redoks potansiyeline sahip olduklarından aromatik bileşikleri oksitleyebilirler (Son ve diğ, 2021). Beyaz çürükçül fungusların salgıladıkları bu lignin modifiye edici enzimler yalnızca ligninin parçalanmasından değil bununla beraber çeşitli ksenobiyotiklerin yıkımından da sorumludur (Wesenberg ve diğ, 2003; Lee ve diğ, 2014).

Beyaz çürükçül funguslar lignin başta olmak üzere, hücre duvarı bileşenlerini parçalamakta ve sonucunda karbondioksit ve su oluşturmaktadır (Glazunova ve diğ, 2018). Beyaz çürükçül fungusların lignini parçalaması, dünyadaki karbon döngüsü açısından büyük önem taşımaktadır (An ve diğ, 2021).

Beyaz çürükçül funguslar diğer mikroorganizmaların aksine spesifik olmayan enzimatik sistemleri sayesinde boyalar, pestisitler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) ve endokrin bozucular gibi çeşitli kirleticileri yıkabilmektedirler (Reddy, 1995; Cerniglia, 1997; Bending ve diğ, 2002; Borràs ve diğ, 2008; Cajthaml ve diğ, 2009; Jebapriya ve Gnanadoss, 2013). Karmaşık yapıdaki polimerleri parçalayabilme özellikleri

sayesinde beyaz çürükçül funguslar; birçok endüstriyel ve çevresel biyoteknolojik uygulamalarda kullanılmaktadır (González ve diğ, 2021).

Bu tez çalışmasında da bir beyaz çürükçül fungus olan *Trametes versicolor* kullanılmıştır.

1.2.1. *Trametes versicolor*

Basidiomycetes sınıfına dahil olan *Trametes versicolor* (syn. *Coriolus versicolor* ve *Polyporus versicolor*) yabani hindiye andıran şekli ve çoklu renklerinden dolayı “hindi kuyruğu” olarak adlandırılır (Tişma ve diğ, 2021). *Trametes versicolor*’un odun üzerindeki görüntüleri Şekil 1.2’de verilmiştir. Meşe kütükleri, ölü ve ölmek üzere olan sert odunların üzerinde gelişen bu fungusun lakkaz üretim yeteneği ilk olarak 1952 yılında Fahraeus tarafından keşfedilmiştir (Lorenzo ve diğ, 2002).



Şekil 1.2 : *Trametes versicolor*’un odun üzerindeki görüntüsü.

(<https://en.wikipedia.org>; <https://ekog.org>; <https://www.first-nature.com>)

Trametes versicolor’dan elde edilen lakkazların çeşitli lakkazlar arasında yüksek redoks potansiyeline sahip lakkazlardan olduğu rapor edilmektedir. Yüksek redoks potansiyelleri yüksek lakkaz aktivitesi ile ilişkili olduğundan; bu durum bu fungusun birçok endüstriyel alanda yaygın olarak kullanılma potansiyelini artırmaktadır (Kurniawati

ve Nicell, 2008). Bu fungusun uygulama alanlarından bazıları Çizelge 1.2’de görülmektedir.

Çizelge 1.2 : *Trametes versicolor*’un bazı uygulama alanları.

Uygulama alanı	Referans
Pestisit biyoremediasyonu	Beltrán-Flores ve diğ, 2021
Lakkaz üretimi	Birhanli ve Yesilada, 2010; Boran ve Yesilada, 2011; Xu ve diğ, 2020
Bisfenol A’nın dönüşümü ve yıkımı	Hongyan ve diğ, 2019
Atık sudan kirleticilerin uzaklaştırılması	Cerrone ve diğ, 2011
Dirençli anti-kanser ilaçlarının uzaklaştırılması	Ferrando-Climent ve diğ, 2015
Zeytinyağı fabrikası atık suyunun biyolojik iyileştirilmesi	Yesilada ve diğ, 1995; Ergül ve diğ, 2009
Tekstil boyalarının yıkımı	Romero ve diğ, 2006
Kot ağartma	Pazarlıoğlu ve diğ, 2005
Boyaların renginin giderimi	Yesilada ve diğ, 2010; Gedikli ve diğ, 2014; Ramírez-Montoya ve diğ, 2015; Diorio ve diğ, 2021

1.3. Lakkaz Enzimi

1.3.1. Lakkaz enziminin tanımı ve yapısı

Lakkaz ilk olarak, 1883 yılında Yoshida tarafından *Rhus vernicifera* adı verilen japon lake ağacının salgılarında keşfedilmiştir ve metal içeren oksidaz olarak tanımlanmıştır (Thurston, 1994; Mayer ve Staples, 2002).

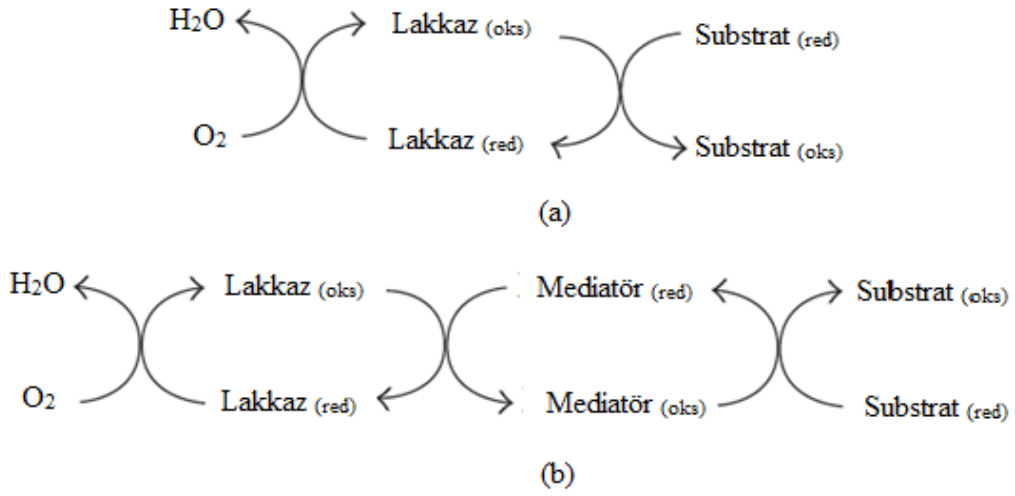
Beyaz çürükçül funguslar, bakteriler, bitkiler ve böcekler lakkaz enzimini üretebilmektedirler. Bununla birlikte; düşük substrat özgülüğüne sahip olan bu enzim, beyaz çürükçül funguslarda yaygın olarak bulunur (Eggert ve diğ, 1996; Upadhyay ve diğ, 2016). Bununla beraber lakkazlar; *Streptomyces lavendulae*, *Streptomyces cyaneus*, *Bacillus subtilis*, *Azospirillum lipoferum* gibi bazı bakteri türleri tarafından da üretilmektedir (Kılıç, 2019). Lakkazlar bakterilerde hücre içi enzimler olarak üretilirken; funguslarda hücre dışı enzimler olarak üretilmektedir (Mate ve Alcalde, 2015). Bununla birlikte bazı böcek türleri tarafından da üretilen lakkaz, böceklerde kutikulanın sertleşmesinde rol oynamaktadır (Kılıç, 2019). Lakkazların bitkiler tarafından üretimi funguslara göre daha az seviyededir (Mayer ve Staples, 2002). Lakkaz varlığı bildirilen

türler arasında; *Rhus vernicifera*, *Rhus succedanea*, Rodríguez-Delgado ve diğ. (2015) *Anacardiaceae* familyasının tamamı, *Acer pseudoplatanus* hücre kültürleri, *Pinus taeda*, *Aesculus parviflora*, *Populus euramericana*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium proliferatum*, *Botrytis cinerea*, *Brassica oleracea*, *Malus pumila*, *Brassica rapa*, *Solanum tuberosum* ve *Pyrus calleryana* Mayer ve Staples (2002); Dhull ve diğ. (2020) sayılabilmektedir.

Lakkazlar (benzenediol: oksijen oksidoredüktaz, EC 1.10.3.2) fenol oksidaz aktivitesine sahip çok bakırlı oksidazlardır. Düşük substrat özgüllüklerinden dolayı çok farklı substratları oksitleyebilmektedirler (Yesilada ve diğ, 2014; Agrawal ve diğ, 2018; Moreno ve diğ, 2020). Bu enzimler monomerik, dimerik veya tetramerik yapıda olabilir (Agrawal ve diğ, 2018; Yesilada ve diğ, 2018). Mavi bakır oksidaz olarak da bilinen lakkaz enzimi glikoprotein yapıda olup moleküler oksijenin suya indirgenmesiyle oksidasyon meydana gelmekte ve aromatik bileşiklerden amin, hidroksil, paradifenol, ortodifenol gibi grupları içine alan bileşimler lakkazlar ile okside olabilmektedir (Ozan ve diğ, 2014).

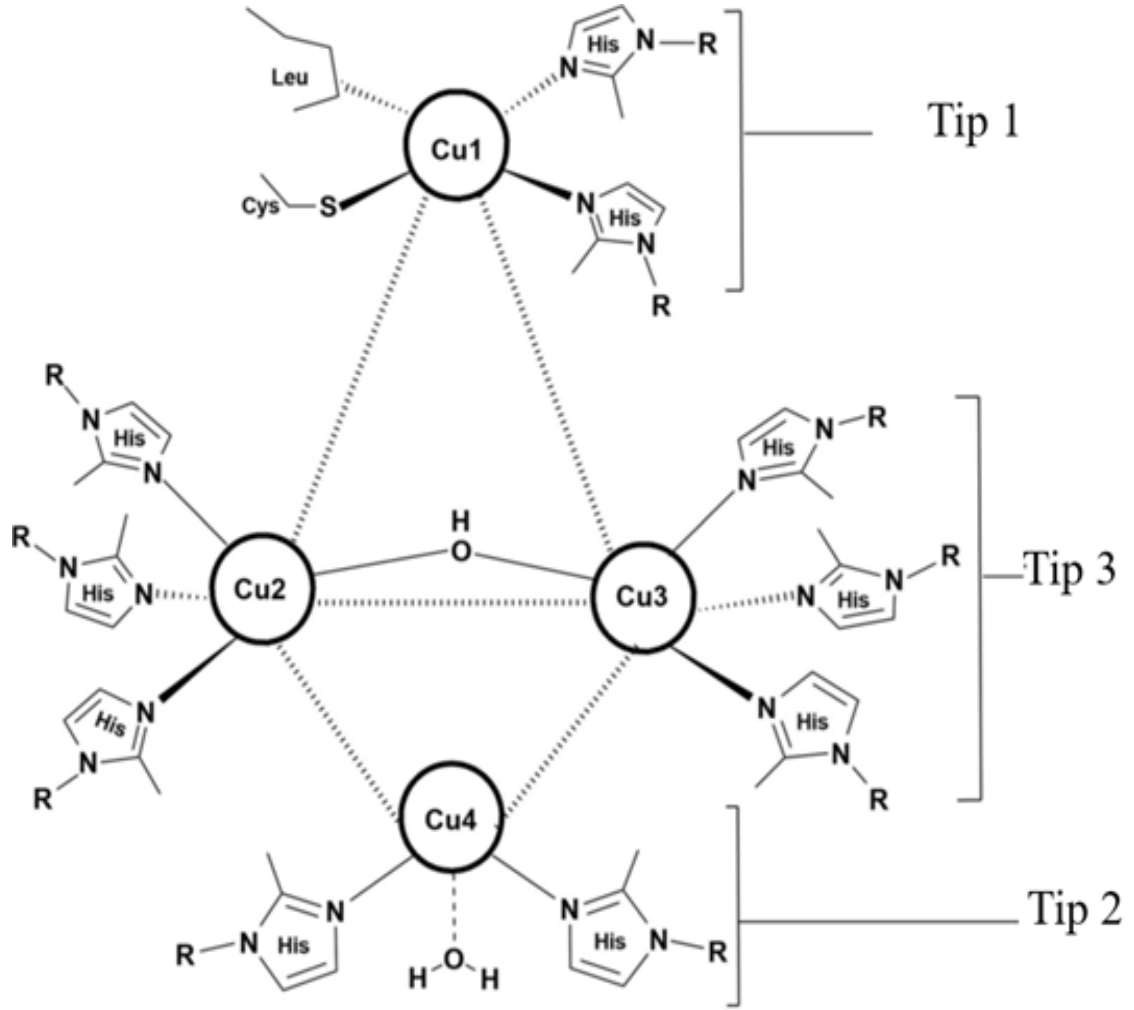
Lakkazların moleküler ağırlıkları genel olarak 60-130 kDA arasında olabilmektedir (Agrawal ve diğ, 2018; Yesilada ve diğ, 2018). Lakkaz enzimleri glikozillenmiş yapıdadır. Bu kısım protein olan kısmın genelde %10 ile %25'i kadar Osma ve diğ. (2010) veya fazla olabilir. Bu kısım protein kısma kovalent bağla bağlanmıştır. Enzim karbonhidrat sayesinde yüksek kararlılık göstermektedir (Demiralp ve diğ, 2015). Farklı organizmalar farklı sayıda lakkaz izozimleri üretebilmektedir ve bu enzimlerin çeşitli özellikleri ve ayrıca substrat özgüllükleri farklı olabilmektedir (Yesilada ve diğ, 2018).

Lakkaz enziminin oksidasyon potansiyelini artıran çeşitli redoks mediatörleri vardır. 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) ve 1-hidroksibenzotriazol (HBT) bu tip mediatörlerdendir. Mediatörler kullanılarak lakkazın oksidasyon yeteneği artırılabilir (Ozan ve diğ, 2014; Mayolo-Deloya ve diğ, 2020). Mediatörler kullanılarak lakkazın fenolik olmayan substratları oksitleyebilme yeteneği sağlanabilmektedir (Gochev ve Krastanov, 2007). Substrat enzimin aktif merkezine giremeyecek kadar büyük olduğunda veya redoks potansiyeli yüksek olduğunda lakkaz tarafından direkt olarak oksitlenemez. Bu durumda, küçük mediatörler aracı olarak kullanılıp substratın oksitlenmesi sağlanabilmektedir (Şekil 1.3) (Gochev ve Krastanov, 2007; Osma ve diğ, 2010).



Şekil 1.3 : Mediatör varlığı ve yokluğunda substrat oksidasyonu (Osma ve diğ, 2010).

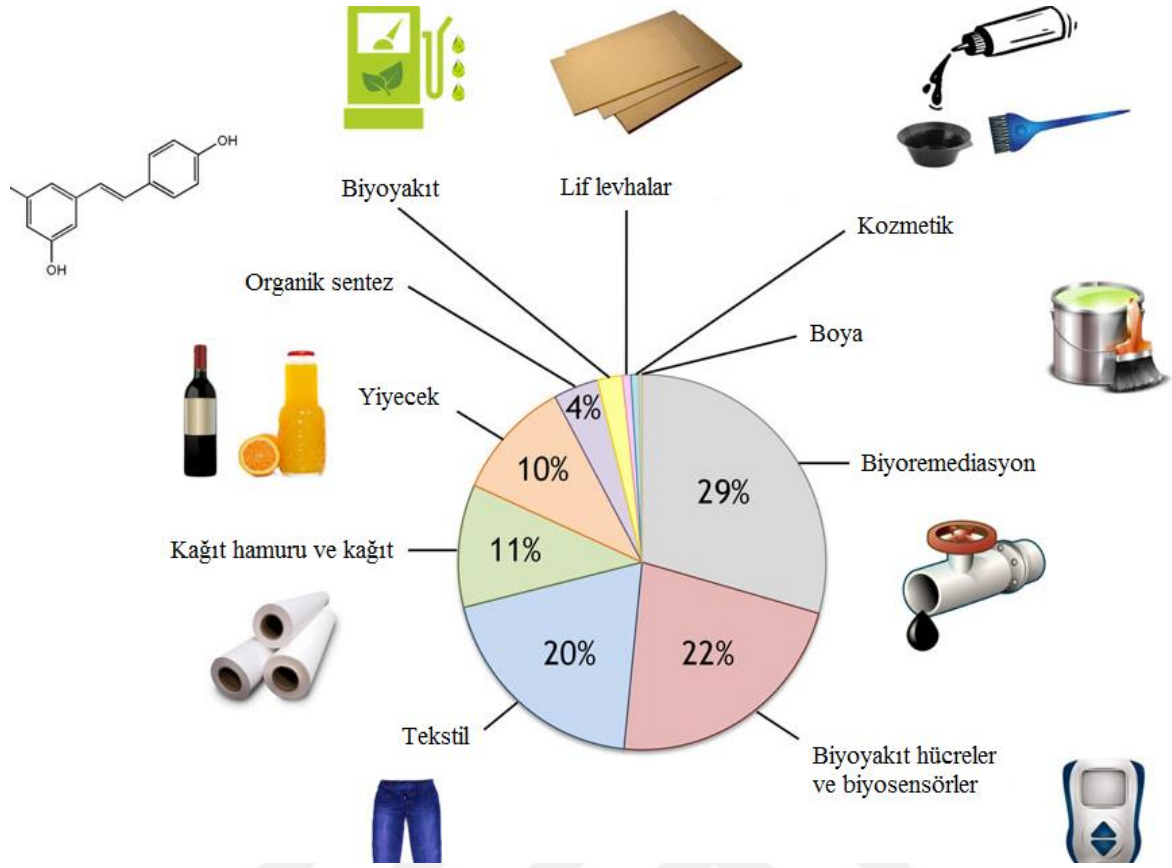
Lakkaz enzimleri Tip 1, Tip 2 ve Tip 3 olmak üzere çoklu bakır bölgelerine sahiptirler. Dört bakır, aktif bölgede bulunur. Çeşitli substratların tek elektron oksidasyonu T1 bakır bölgesinde oluşur. Elektron daha sonra T2/T3 bölgesine transfer edilir ve burada oksijen suya redüklenir (Şekil 1.4) (Osma ve diğ, 2010; Agrawal ve diğ, 2018; Yesilada ve diğ, 2018).



Şekil 1.4 : Lakkazın bakır merkezleri (Agrawal ve diğ, 2018).

1.3.2. Lakkaz enziminin bazı uygulama alanları

Lakkaz enzimi, endüstriyel birçok alanda büyük ilgi görmekte ve birçok işlemde kullanılmaktadır. Lakkazların bazı biyoteknolojik uygulamaları Şekil 1.5'te görülmektedir (Mate ve Alcalde, 2016).



Şekil 1.5 : Lakkazların biyoteknolojik uygulamaları.

Lakkazların; kağıt hamuru ve kağıt sanayi, tekstil endüstrisi, gıda endüstrisi, biyoremediasyon Dhull ve diğ. (2020); Yesilada ve diğ. (2014), ilaç sektörü ve tıbbi uygulamalar Forootanfar ve Famarzi (2015); Kunamneni ve diğ. (2005); Rodríguez-Delgado ve diğ. (2016), nanobiyoteknoloji ve biyokatalizör uygulamaları Kunamneni ve diğ. (2005), biyosensör tasarımı Rodríguez-Delgado ve diğ. (2015), biyoyakıt hücrelerinin geliştirilmesi ve tasarımı Rodríguez-Delgado ve diğ. (2015) ve Dhull ve diğ. (2020), ksenobiyotiklerin yıkımı ve atık su arıtım işlemlerinde Rodríguez-Delgado ve diğ. (2015) uygulamaları araştırılmaktadır. Lakkaz enzimi ile yapılan bazı çalışmalar aşağıda verilmiştir:

- Kağıt hamurunun delignifikasyonu ve ağartılması (Bourbonnais ve Paice, 1996; Camarero ve diğ, 2007; Babot ve diğ, 2011; Aslam ve diğ, 2016; Singh ve Arya, 2019),
- Lignoselülozlu ham maddenin delignifikasyonu (Rico ve diğ, 2014; Loaiza ve diğ, 2019; Navas ve diğ, 2019; Liu ve diğ, 2021),
- Kot beyazlatılması (Rodríguez-Couto, 2017; Panwar ve diğ, 2020),

- Boyar maddelerin biyoremediasyonu (Yesilada ve diğ, 2014; Ulu ve diğ, 2020),
- Pestisitlerin biyolojik yıkımı (Zeng ve diğ, 2017a; Bilal ve diğ, 2019),
- Bisfenol A'nın biyolojik yıkımı (Taghizadeh ve diğ, 2020; Onaizi ve Alshabib, 2021),
- Şarap ve bira kararlılığının sağlanması ve puslu görüntünün giderilmesi (Minussi ve diğ, 2007; Osma ve diğ, 2010; Dhillon ve diğ, 2012),
- Meyve suyunun kararlılığının sağlanması ve puslu görüntünün giderilmesi (Osma ve diğ, 2010; Wang ve diğ, 2020),
- Hamur ve ekmeğin kalitesinin artırılması (Osma ve diğ, 2010; Niño-Medina, 2017),
- Lakkaz biyosensörlerinin hazırlanması (Rodríguez-Delgado ve diğ, 2015),
- Zeytinyağı fabrikası atık suyunun renk ve fenol yükünün azaltılması (D'Annibale ve diğ, 1999),
- Tekstil fabrikası atık sularının renginin giderimi (Khlifi ve diğ, 2010),
- Biyoyakıt hücrelerinde lakkaz kullanımı (Barrière ve diğ, 2004),
- Organik sentezde kullanım (Kunamneni ve diğ, 2008; Su ve diğ, 2018),
- Çeşitli çevre kirleticilerinin biyotransformasyonu (Rodriguez-Delgado ve diğ, 2016),
- Boya sentezinde kullanımı (Polak ve Jarosz-Wilkolazka, 2012),
- Derinin beyazlatılması ve saçın renginin açılmasında kullanımı (Mate ve Alcalde, 2015).

1.4. Lakkaz Enziminin Üretim Yöntemleri

1.4.1. Katı faz fermentasyonu

Katı faz fermentasyonunda (KFF); besiyerinde bulunan katı maddeler, karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılır. Ortamda serbest sıvının bulunmadığı, akışkan sıvı bir ortamın olmadığı bir besiyerinden söz edebiliriz. Yani, mikroorganizmaların üreyip metabolik reaksiyonları gerçekleştirebildiği kısmi nem içeren katı ortamlardır (Pandey ve diğ, 2000; Pandey, 2003; Krishna, 2005).

Funguslar nemli ortamlarda iyi ürerler. KFF'de de serbest suyun bulunmaması, filamentli fungusların üreme ve gelişimine olumlu katkı yaparak kolonize olmalarını kolaylaştırır. Diğer bir açıdan bakacak olursak KFF, heterojen üç fazlı (gaz-sıvı-katı)

yapıda olan, gözenekli ve nemli katı substrat yüzeyinde mikroorganizmaların özellikle fungusların geliştiği ve mikrobiyal üremeyi/metabolizmayı sürdürmek için yeterli nemin mevcut olduğu bir fermentasyon sürecidir (Ruiz ve diğ, 2012).

Lignoselülozlu substratlar, doğada bol miktarda bulunmaktadır ve bunların bir kısmı da atık formundadır. Beyaz çürükçül funguslar lignoselülozlu hammaddeleri substrat olarak kullanabilmektedirler. Bu funguslar sahip oldukları lakkaz, ligninaz, selüloz, pektinaz ve ksilinaz gibi enzimler sayesinde lignoselülozlu substratlardaki selüloz, hemiselüloz ve lignini parçalayabilirler (Pandey ve diğ, 2000; Papunitti ve diğ, 2007; Boran ve Yesilada, 2011).

KFF iki şekilde uygulanmaktadır. Birinci uygulamada substrat olarak doğal katı maddeler kullanılırken; diğer uygulamada ise katı maddeler sadece tutunma matrisi olarak kullanılmaktadır (Krishna, 2005). Daha önce de belirtildiği gibi, KFF doğal substratların kullanıldığı, serbest suyun bulunmadığı ve katı partiküller üzerinde mikrobiyal üreme sonucu ürün oluşumunun gerçekleştiği bir süreçtir. Bu tip fermentasyonda, ticari önemi olmayan veya az olan ve çevre kirliliğine yol açan çeşitli lignoselülozlu atıkların substrat olarak kullanılması sonucunda değerlendirilmesi amaçlanmaktadır (Pandey ve diğ, 2000; Pandey, 2003). KFF, mikroorganizmaların özellikle filamentli fungusların doğal habitatlarına benzediğinden, önemli ürünlerin üretiminde tercih edilen bir uygulamadır. Bakteriler, mayalar ve filamentli funguslar katı substratlar üzerinde üretilirler. Bununla birlikte, KFF işlemleri için en uygun olan mikroorganizmalar, nemli ortamlarda iyi üreyen filamentli funguslardır (Manan ve Webb, 2017). KFF’de çok farklı substratlar kullanılabilmektedir. Bu substratlar arasında buğday kepeği, saman, çeşitli meyve kabukları, bitki yaprakları ve talaş sayılabilir (Rosales ve diğ, 2007; Elisashvili ve diğ, 2008; Levin ve diğ, 2008; Sharma ve Arora, 2010; Boran ve Yesilada, 2011;).

Katı faz fermentasyonunun bilinen en iyi örnekleri, geleneksel fermentasyonlardır. Bunlara çeşitli ülkelerde kullanılan fermentasyon ürünleri olarak; Japonya’da pirince buhar uygulaması ile kullanılan “koji”, Endonezya’da mikrobiyal kaynak olarak küf ve katı substrat olarak buhar uygulanmış bezelye tohumlarının kullanıldığı “tempeh” veya Hindistan’a ait “ragi” verilebilir. Yine, *Penicillium roqueforti* veya küflü peynir üretimi uzun yıllardan beri uygulanan katı faz fermentasyonları örneklerindendir (Ortiz, 1998; Raimbult, 1998; Couto ve Sanroman, 2006; Mienda ve diğ, 2011; Manan ve Webb, 2017).

1.4.2. Sıvı faz fermentasyonu

1.4.2.1. Kesikli fermentasyon

Kesikli süreç, üretim boyunca ortama substratın eklenmediği ve kültürün dışarıya alınmadığı bir üretim sürecidir. Bu süreçte öncelikle biyoreaktöre besiyeri eklenir ve sterilizasyon gerçekleştirilir. Daha sonra biyoreaktöre steril koşullarda mikroorganizma ekilir ve üretime bırakılır. Üretimin sonuna kadar kültüre herhangi bir şekilde taze substrat eklenmez ve kültürden de dışarıya alınmaz.

1.4.2.2. Yarı sürekli fermentasyon

Yarı sürekli fermentasyon, kesikli ve sürekli yöntemin modifiye bir şekli olarak düşünülebilir. Yarı sürekli fermentasyonda besiyeri uygun şekilde hazırlandıktan sonra mikroorganizma ekimi yapılarak üretime başlanır. Ürün üretimi gerçekleştiğinde kültür sıvısının bir kısmı alınır ve alınan kültür sıvısı kadar taze substrat ortama eklenir. Daha sonra üretime devam edilir.

1.4.2.3. Sürekli fermentasyon

Sürekli fermentasyon sürecinde; sıvı besiyeri hazırlanıp steril edildikten sonra mikroorganizma ekimi yapılır. Bu fermentasyon işlemi sırasında ortama sürekli olarak taze besiyeri eklenirken aynı hızda da kültür fermentörden dışarıya alınır. Böylece bu süreçte mikroorganizma üremenin optimum olduğu logaritmik fazda tutulur.

1.4.2.4. Tekrarlı kesikli fermentasyon

Tekrarlı kesikli süreçte; sıvı besiyeri steril edildikten sonra besiyerine ekim yapılır ve üretime bırakılır. Üretim gerçekleştikten sonra, kültür sıvısının bir kısmı yada tamamı ortamdan uzaklaştırılır ve aynı miktarda taze besiyeri eklenir. Mikroorganizmalar ise süreç boyunca sürekli ortamda kalır ve süreç istenildiği kadar tekrarlanır. Burada mikroorganizmalar uzun süre tekrar tekrar kullanılabilir (Birhanlı ve Yesilada, 2010).

Katı faz fermentasyonu (KSF) ve sıvı faz fermentasyonun (SSF) karşılaştırılması Çizelge 1.3’de görülmektedir.

Çizelge 1.3 : Katı faz fermentasyonu (KSF) ve sıvı faz fermentasyonun (SSF) karşılaştırılması (Sindhu ve diğ, 2015).

FAKTÖR	KSF	SFF
Substratlar	Çözölemeyen substratlar (nişasta, selüloz, pektin, lignin)	Çözölebilir substratlar (şekerler)
Aseptik şartlar	Buhar uygulaması, steril olmayan şartlar	Isı sterilizasyonu ve aseptik şartlar
Su	Sınırlı su tüketimi, çıkış suyu yok	Yüksek miktarda su tüketimi ve atık su deşarjı
Metabolik ısı	Düşük ısı transfer kapasitesi	Kolay sıcaklık kontrolü
Havalandırma	Kolay havalandırma, yüksek yüzey hava/substrat değışimi	Sınırlı çözölebilir oksijen, yüksek düzeyde hava gereksinimi
pH kontrolü	Tamponlanmış katı substratlar	Kolay pH kontrolü
Mekanik çalkalama	Statik şartlar tercih edilir	İyi homojenizasyon
Üretim	Mühendislik ve yeni tasarım ekipman ihtiyacı	Endüstriyel ekipman mevcut
İnokülasyon	Spor inokülasyonu, kesikli üretim	Kolay inokülasyon, sürekli üretim
Enerji değıerlendirmesi	Yüksek enerji tüketimi	Düşük enerji tüketimi
Ekipman hacmi	Düşük hacimler, düşük ekipman maliyeti	Yüksek hacimler ve yüksek ekipman maliyeti
Çıkış suyu	Çıkış suyu yok, daha az kirlilik	Yüksek hacimde çıkış suyu

1. KAYNAK ÖZETLERİ

Boran ve Yesilada (2011) katı faz fermentasyonu sürecinde, beyaz çürükçül funguslardan, *Funali trogii* ve *Trametes versicolor*'u buğday kepeği üzerinde üreterek bu fungusların lakkaz üretim yeteneğini araştırmışlardır. Ayrıca çalışmada, farklı atık/hammaddeler kullanıldığı gibi bu atıkların kullanılan nemlendirme sıvılarının, lakkaz üretimine etkisi de test edilmiştir. Bu amaçla farklı konsantrasyonlarda peyniraltı suyu, melas, zeytinyağı fabrikası atık suyu ve alkol fabrikası atık suyu (vinas) nemlendirme sıvıları olarak kullanırken bakır ve ksilidin de indükleyiciler olarak ortama farklı miktarlar da ilave edilmiştir. İndükleyici eklenmemiş ortamda, *T. versicolor* daha etkin lakkaz üreticisi olarak belirlenirken, indükleyici ilave edilmiş ortamlar için en yüksek lakkaz aktivitesi (14.18 U/mL) 5 mM bakır içeren %25 vinas ile nemlendirilmiş buğday kepeği ortamında *F. trogii* ile belirlenmiştir.

Xu ve diğ. (2020) ise yaptıkları çalışmada; çay atıklarını substrat olarak kullanmışlar ve katı faz fermentasyonu sürecinde *T. versicolor*'un lakkaz üretim verimini araştırmışlardır. Çalışmada optimize edilmemiş koşullarda lakkaz üretimi 6.4 U/g iken, bu değer optimize koşullarda 25.7 U/g'ye ulaşmıştır. Çalışmada ayrıca tava tipi fermentörde de lakkaz üretimi değerlendirilmiş ve lakkaz üretimi 31.2 U/g olarak belirlenmiştir.

Bir diğer çalışmada; Aydınoglu ve Sargın (2013) zeytin yapraklarını kullandıkları katı faz fermentasyonu sürecinde, *T. versicolor*'un lakkaz üretimini araştırmışlardır. Çalışmada; başlangıç nem içeriği, substrat parça büyüklüğü, organik ve inorganik kaynakların destek olarak ortama ilavesinin etkileri test edilmiştir. Buna göre en yüksek lakkaz aktivitesi; %80 başlangıç nem içeriği, 1.4-1.6 mm substrat parça büyüklüğü ve %1 maya özütü ilave edilmiş ortamda 276.62 U/g kuru substrat olarak belirlenmiştir.

Risdianto ve diğ. (2012) katı faz fermentasyonu sürecinde; *Marasmius sp.*, *T. hirsuta*, *T. versicolor* ve *Phanerochaete cryosporium* beyaz çürükçül funguslarının çeşitli tarımsal atıklar (boş meyve demetleri, pirinç samanı, mısır koçanı ve pirinç kabuğu) üzerinde lakkaz üretimini test etmişlerdir. Çalışmada, *Marasmius sp.* ve katı pirinç samanı substratı, 10. günde 1116.11 U/L aktivite ile en yüksek lakkaz aktivitesini göstermiştir. *Trametes versicolor* için en iyi lakkaz aktiviteleri inkübasyonun 8. gününde boş meyve demetleri ve mısır koçanı için sırasıyla 134.02 U/L ve 400.56 U/L olarak belirlenmiştir.

T. versicolor CICC 14001'in katı faz fermentasyonu sürecinde lakkaz üretimi Adekunle ve diğ. (2017) tarafından çalışılmıştır. Uygulamada buhar uygulanmış mısır sapının kullanıldığı katı faz fermentasyonu sürecinde, lakkaz üretimini önemli ölçüde artırdığı belirtilmiştir. Buhar uygulanmış mısır sapı (2600.33 U/g) kullanıldığında, ham mısır sapına (1241.07 U/g) nazaran yaklaşık 2.1 kat daha yüksek lakkaz aktivitesi tespit edilmiştir. Bunun nedeninin buhar uygulamasının lignoselülozik yapıyı bozması, yüzey alanını artırması ve *T. versicolor*'un kullanabileceği çözünebilir bileşiklere erişimini artırması olduğu bildirilmiştir.

Iandolo ve diğ. (2011) domates posasını besiyeri olarak kullandıkları katı substrat fermentasyonu sürecinde; *Pleurotus ostreatus* ve *T. versicolor*'un lakkaz, ksilanaz ve proteaz enzim aktivitelerini değerlendirmiştir. Çalışmada nem, su aktivitesi ve substrat partiküllerinin boyutu gibi parametrelerin etkisi de belirlenmiştir. Uygulamada; besin ilavesi ya da O₂ zenginleştirilmesi yapılmayıp kültür koşullarında herhangi bir optimizasyon olmadan önemli lakkaz aktivite (36 U g⁻¹ kuru madde) seviyelerine ulaşılabileceği görülmüştür.

Wang ve diğ. (2014) mısır fiçı suyunu kullandıkları çalışmada, sıvı fermentasyon sürecinde *T. versicolor*'un lakkaz üretimini değerlendirmişlerdir. Çalışmada mısır fiçı suyu olmayan ortama göre 20 g/L mısır fiçı suyu içeren ortamda, 5 günlük inkübasyon sonrasında 1.96 kat bir artışla 633.3 U/L lakkaz aktivitesi elde edilmiştir.

Birhanli ve Yesilada (2006) yaptıkları çalışmada; tekrarlı kesikli süreçte *F. trogii* ve *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimini araştırmışlardır. Bakır ilave edilmiş çalkalamalı ve statik kesikli kültürlerde *T. versicolor* için en yüksek lakkaz aktivite değerlerini sırasıyla; 2.96±0.34 ve 2.34±0.46 U/mL olarak belirlemişlerdir. Bununla birlikte, *T. versicolor* peletlerinin bakır ilave edilmiş tekrarlı kesikli kültürlerinde lakkaz aktivitesi 12.09±0.72 U/mL olarak tespit edilmiştir. *T. versicolor* peletlerinin yedi kez tekrarlı kullanımı sonucunda, 59 U/mL'lik toplam lakkaz aktivitesi belirlenmiştir. Tekrarlı kesikli yöntemin uzun süreli lakkaz aktivitesi için uygun bir yöntem olduğu belirtilmiştir.

Birhanli ve Yesilada (2010)'nın diğer bir çalışmasında; tekrarlı kesikli süreçte *F. trogii* ve *T. versicolor*'un lakkaz üretim kapasitelerinin artırılması amaçlanmıştır. Tekrar süresi, sıcaklık, çalkalama, pH ve pelet miktarının tekrarlı kesikli çalışmalarla lakkaz üretiminde önemli olduğu belirtilmiştir.

Tekrarlı kesikli yöntemin önceki çalışmalarında etkin bir yöntem olduğunu saptayan Birhanlı ve Yeşilada (2017a) diğer bir çalışmalarında bu yöntemi kullanarak *F. trogii* ve *T. versicolor*'un bakır içeren ve bakır içermeyen distile su, Sabouraud dekstroz broth, Malt özütü broth ve Peynir altı suyu ortamlarında lakkaz üretimini araştırmışlardır. Çalışmada en yüksek lakkaz aktivitesi bakır ilave edilen malt özütü broth ortamında 6.27 U/ mL olarak *T. versicolor* için saptanmıştır.

Pirinç kepeğinin substrat olarak kullanıldığı diğer bir çalışmada; *Coriolus versicolor* RC3 suşunun katı ve sıvı ortamlarda lakkaz üretimi test edilmiştir. Çalışmada sıvı ortamda %1 glukoz, buğday kepeği ve pirinç samanına karşın %1 pirinç kepeği en etkili substrat miktarı olarak belirlenmiştir. 37 °C'de 15 gün çalkalamalı inkübasyondan sonra pirinç kepeği ortamında 0.22 U/mL lakkaz aktivitesi tespit edilmiştir. Sıvı ortamda pirinç kepeği ile en yüksek lakkaz üretimi 15 günlük inkübasyon sonrası 22 U/g substrat olmuştur. Bu değer, katı substrat fermentasyonunda 30 günde elde edilen maksimum aktiviteden 11 kat daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Chawachart ve diğ, 2004).

Couto ve diğ. (2002) *T. versicolor*'un yarı katı ortamda lakkaz üretimine poliüretan köpük, buğday samanı, arpa samanı, odun talaşı ve arpa kepeği gibi desteklerin ve indükleyicilerin (veratril alkol, ksilidin ve C/N oranı) etkisini araştırmışlardır. Arpa kepeği ortamında 1200 U/L lakkaz aktivitesi belirlenirken ksilidin lakkaz aktivitesini en iyi arttıran indükleyici olarak belirlenmiştir (1700 U/L). Bununla birlikte ortama taze desteğin eklenmesi ile hem kültür ömrünün uzadığı hem de lakkaz aktivitesinin 2000 U/L'den daha yüksek değerlere ulaştığı saptanmıştır.

T. versicolor'un sıvı fermentasyonu sürecinde, ortama lignin ilavesinin lakkaz üretimine etkisinin araştırıldığı diğer bir çalışmada, *T. versicolor* kültür ortamına 1.2 g/L lignin eklenmesiyle lakkaz aktivitesinin lignin eklenmeyen ortama göre 3.69 kat bir artışla 1213.93 U/L'ye yükseldiği belirtilmiştir (Adekunle ve diğ, 2017).

Birhanlı ve Yesilada (2013) yaptıkları bir çalışmada; lignoselülozlu atıkların yarı katı ortam ve sıvı fermentasyon koşullarında lakkaz üretimine etkisini test etmişlerdir. Çalışmada iki etkin lakkaz üreticisi *T. trogii* ATCC 200800 ve *T. versicolor* ATCC 200801 kullanılmış ve ayçiçeği kabuğu, kayısı çekirdeği kabuğu ve kamış gibi lingoselülozlu substratlar lakkaz üretimi açısından substrat olarak kullanılmıştır. Yarı katı ortamda mısır koçanı kullanılarak yapılan çalışmada *T. versicolor* için maksimum lakkaz aktivitesi 387

U/L olarak belirlenmiştir. Sıvı fermentasyon ortamında ise *T. versicolor* için en yüksek lakkaz aktivitesi toz kamış için 1216 U/L olarak saptanmıştır.

İstatistiksel deneysel tasarım kullanılarak biyoreaktör ortamında *T. versicolor*'un lakkaz üretiminin araştırıldığı bir çalışmada, başlangıç glukoz konsantrasyonu (0-9 g/L), çalkalama hızı (100-180 rpm) ve pH (3.0-5.0)'nın lakkaz üretimine etkisi test edilmiştir. Çalışmaya göre 11 g/L başlangıç glukoz konsantrasyonu ve pH 5.2 optimum koşullar olarak belirlenmiş ve bu ortamda 11.403 U/L lakkaz aktivitesi tespit edilmiştir (Tavares ve diğ, 2006).

Zeng ve diğ. (2017b) Bisfenol A içeren tarımsal atıklar üzerinde katı faz fermentasyonu koşullarında *T. versicolor* ile lakkaz üretimini ve Bisfenol A'nın yıkımını araştırmışlardır. Yapılan çalışmada Bisfenol A'nın yıkımının lakkaz üretimi ile birlikte olduğu ve buğday kepeği ve mısır samanı karışımının lakkaz üretimi için uygun substrat olduğu tespit edilmiştir. Bisfenol A'nın *T. versicolor* ile yıkımı sürecinde, lakkaz aktivitesinin ekimden sonraki 6-10. günlerde hızla arttığı izlenmiştir. Bisfenol A'nın lakkaz üretimini de artırabildiği gözlenmiştir.

Tişma ve diğ. (2012) çeşitli endüstriyel atıkların kullanıldığı sıvı fermentasyon sürecinde *T. versicolor* MZKI G-99'ın lakkaz üretimi için, kağıt üretim tesisinin arıtma tesisinden çıkan katı atığın en etkili olduğunu ortaya koymuşlardır.

Yapılan bir diğer çalışmada; kağıt hamuru ve kağıt endüstrisi yan ürünlerinin *T. versicolor*'un üretimi ve lakkaz indüklenmesine etkisi araştırılmıştır. Çalışmada lakkaz aktivitesini optimize etmek için, indükleyici ilavesinin ve aynı anda glikoz baskılanmasının birlikte etkisi incelenmiştir. Lakkaz indüklenmesi açısından en iyi sonuç (1240 U/L), kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinin yan ürünü olan katı lignin ile elde edilmiştir. Daha yüksek lakkaz aktivitesine (1583 U/L) ise, ortama ksilidin ilavesi ve glikoz baskılanmasının birlikte etkisi ile ulaşılmıştır (Rebelo Barreto Xavier ve diğ, 2007).

Gedikli ve diğ. (2014) sıvı fermentasyon koşullarında *T. versicolor*'un lakkaz üretimini test etmişlerdir. Yapılan çalışmada yüksek miktarda lakkaz üretimi için optimum kültür koşulları; 2 g/L glukoz, 5 g/L maya ekstraktı, 2 mM CuSO₄, % 4 inokulum miktarı ve pH 5.5 olarak tespit etmişlerdir.

Pinheiro ve diğ. (2020) erlen ve reaktör ortamlarında sıvı fermentasyon sürecinde farklı indükleyiciler (pamuk sapı ve pamuk çırçırı eklenmiş vinasın yanısıra arpa kamışı, şeker kamışı atığı ve endüstriyel beyaz çamur gibi) kullanarak *T. versicolor*'un lakkaz

üretimini artırmayı amaçlamışlardır. Aynı zamanda, kültür ortamına azotun eklenmesinin lakkaz üretimine etkisi de test edilmiştir. Çalışmada en yüksek lakkaz üretimi BioFlo 310 reaktörde 12 gün inkübasyon sonrası 55.24 U/mg protein olarak belirlenmiştir.

Lorenzo ve diğ. (2006) arpa kepeği içeren sıvı ortamda çalkalamalı koşullarda *T. versicolor*'un lakkaz üretiminin bakır eklenmesiyle 12 kata kadar arttığını rapor etmişlerdir.

Cordi ve diğ. (2007) sıvı ortamda çalkalamalı koşullarda ürettikleri *T. versicolor*'un bakır içermeyen ortamda çok düşük lakkaz ürettiğini, bununla birlikte bakır eklenmesiyle lakkaz üretiminin arttığını bildirmiştir.

Collins ve Dobson (1997) sıvı besiyerinde statik koşullarda ürettikleri *T. versicolor*'un besiyerine bakır ve ksilidin ayrı ayrı eklenmesinin veya ikisinin birlikte eklenmesinin lakkaz geninin transkripsiyonunu hızla etkilediğini bildirmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Fungus

Bu tez çalışmasında Basidiomycetes sınıfına dahil bir beyaz çürükçül fungus olan *Trametes versicolor* kullanılmıştır. Bu fungus Dr. Özfer Yeşilada tarafından Hatay'dan toplanmış ve saf kültür olarak izole edildikten sonra tanımlanmıştır. Çalışmada kullanılan fungus İnönü Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji laboratuvarında devamlılığı sağlanarak saf kültür olarak muhafaza edilmektedir.



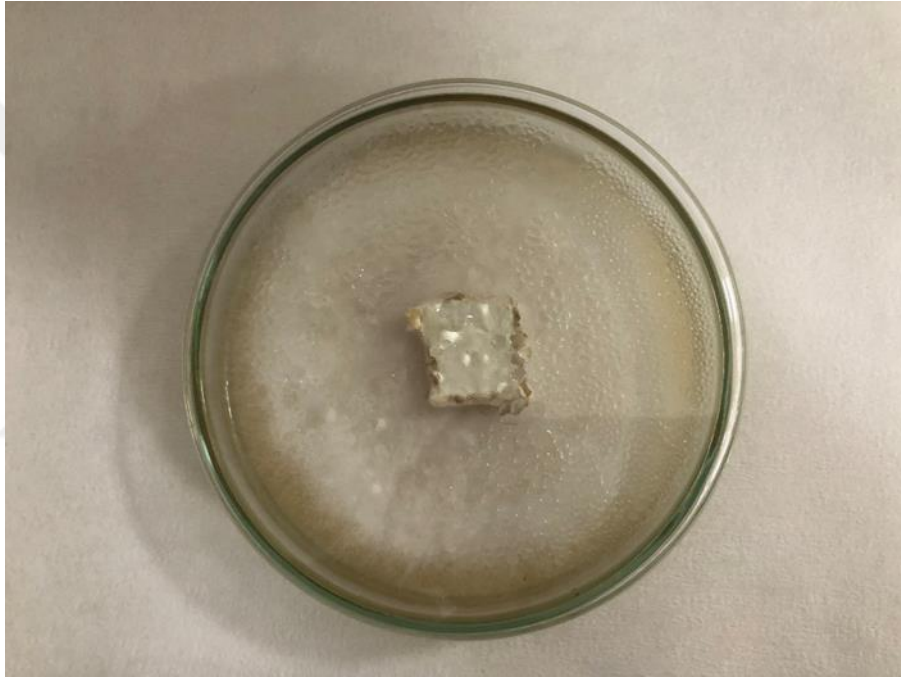
Şekil 3.1: *T. versicolor*'un ağaçtaki görüntüsü.

3.2. *Trametes versicolor*'un Lakkaz Enzimini Üretebildiğinin Makroskobik Olarak Belirlenmesi

Çalışmada öncelikle kullanılacak fungusun lakkaz enzimini üretilip üretilmediği izlenmiştir. Bu amaçla lakkaz substratı olan ABTS içeren SDA plakları hazırlanmış ve plaklara fungus ekimi yapılmıştır. Örnekler 30° C'de statik olarak inkübe edildikten sonra ABTS oksidasyonuna bağlı olarak oluşan renk değişimi lakkaz enziminin varlığının belirlenmesinde kullanılmıştır.

3.3. *Trametes versicolor*'un Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) Besiyerinde Üretilmesi ve Saf Kültür olarak Devamlılığının Sağlanması

Petrilerde hazırlanmış olan Sabouraud dekstroz agar (SDA) besiyeri ortamlarına her ay düzenli olarak pasajlama yapılarak, fungusun devamlılığı sağlanmıştır. Bu amaçla, daha önce saf kültür olarak SDA içeren plaklarda üretilmiş olan ve +4 °C'de buzdolabında muhafaza edilen katı fungus kültüründen steril koşullarda misel kütlesi alınmış ve taze SDA içeren petrilere steril şartlarda ekim yapılmıştır. Ekim işleminin ardından kültürler inkübatörde 30 °C'de statik koşullarda inkübe edilmiş ve inkübasyon sonrası +4 °C'de buzdolabında kullanılana kadar muhafaza edilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 : SDA içeren plaklarda üretilmiş *T. versicolor*'un görüntüsü.

3.4. Ekim İçin Kullanılacak Stok Ekim Kültürlerin Hazırlanması

Çalışmada öncelikle SDA içeren yatık agarlar hazırlanmıştır. Daha sonra, buzdolabında muhafaza edilen petrideki katı kültürden steril şartlar altında yatık SDA ortamına ekim yapılmış ve yatık kültür, inkübatörde 30 °C'de statik olarak inkübasyona bırakılmıştır. Üretim sürecinin ardından yatık kültürün üzerine steril distile su eklenmiş ve miseller steril ekim çubuğu ile kazınıp misel süspansiyonu elde edilmiştir. Hazırlanan misel süspansiyonundan 4 mL olacak şekilde 100 mL Sabouraud dekstroz broth (SDB)/250 mL erlene steril koşullarda ekim yapılmıştır. Hazırlanan kültür 30 °C ve 150

rpm'de 7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, elde edilen sıvı kültür steril şartlarda homojenizatör ile düşük hızda homojenize edilmiş ve homojenize edilen kültürden 4 mL olacak şekilde 100 mL SDB/250 mL erlenlere ekim yapılmıştır. Hazırlanan bu sıvı kültürler 30 °C ve 150 rpm'de 7 gün çalkalamalı etüvde üretilmiştir. Üretim sonrası bu sıvı kültürler düşük devirde homojenize edilmiş ve stok ekim kültürü olarak kullanılmıştır.

3.5. Tekrarlı Kesikli Çalışmalarda Kullanılacak Fungal Peletlerinin Hazırlanması

Tez çalışmasında kullanılacak fungal peletlerin elde edilmesi için öncelikle 600 mL SDB/1000 mL erlenler hazırlanmış ve bu sıvı besiyerleri 121 °C'de 20 dakika otoklavize edilmiştir. Bu sıvı besiyerlerine Kısım 3.4'te belirtildiği şekilde hazırlanmış homojenize stok ekim kültüründen 7'şer mL ekilmiştir. Kültürler fungal peletlerin oluşması için 30 °C ve 150 rpm'de çalkalamalı etüvde 7 gün inkübe edilmiştir. Daha sonra, oluşan peletler steril koşullarda süzölmüş ve steril distile su ile yıkandıktan sonra fungal peletler çalışmalarda kullanılmıştır.

3.6. Lakkaz Enziminin Üretiminde Uygulanan Farklı Fermentasyon Yöntemleri

3.6.1. Kesikli üretim yöntemi

Kesikli üretim çalışmaları 50 mL SDB/250 mL erlenlerde yürütölmüştür. Kesikli üretim çalışmalarında lakkaz üretimine çeşitli indükleyicilerin etkisi de test edilmiştir. Bu amaçla indükleyici içermeyen ve son konsantrasyonda ayrı ayrı olacak şekilde 1 mM bakır, 1 mM ksilidin, 0.05 mM, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), 1 mM ksilidin +1 mM bakır ve 0.05 mM ABTS + 1 mM bakır içeren 50 mL SDB/250 mL erlenlerler hazırlanmıştır. Steril koşullarda hazırlanan bu besiyerlerine Kısım 3.4'te belirtildiği şekilde hazırlanmış homojenize stok ekim kültüründen 1'er mL ekilmiş ve kültürler 30 °C ve 150 rpm'de 3,6 ve 9 gün inkübe edilmiştir.

3.6.2. Tekrarlı kesikli üretim yöntemi

Tekrarlı kesikli üretim yönteminde Kısım 3.5'te belirtildiği şekilde elde edilen fungal peletler kullanılmıştır. İndükleyici içeren ve içermeyen 50 mL SDB/250 mL erlenlere steril koşullarda 30'ar gram peletler aktarılmıştır. Kültürler 30 °C' ve 150 rpm'de 24 saat inkübe edildikten sonra kültür sıvıları süzölmüş ve pelet içeren bu erlenlere tekrar taze steril besiyerleri eklenerek aynı şekilde 24 saat inkübe edilmişlerdir (Birhanlı ve Yeşilada 2010). Bu çalışmalar indükleyici içermeyen besiyerinde ve ayrıca ayrı ayrı olacak

şekilde 1 mM bakır, 1 mM ksilidin, 0.05 mM ABTS, 1 mM ksilidin +1 mM bakır ve 0.05 mM ABTS + 1 mM bakır içeren ortamlarda da tekrarlı kesikli olarak yürütülmüştür (Birhanli ve Yesilada, 2017b).

3.6.3. Katı faz fermentasyonu yöntemi

Katı faz fermentasyonu yönteminde katı faz besiyerleri kullanılmıştır. Katı faz besiyerinin hazırlanması için 3.5 g buğday kepeği+1.5 g soya unu 250 mL'lik erlenlere konulmuş ve üzerlerine 15 mL nemlendirme sıvısı (steril distile su veya çalışmaya bağlı olarak uygun indükleyiciyi içeren steril distile su) eklenmiştir. Hazırlanan katı besiyerleri 121 °C'de 20 dakika otoklavize edilmiştir. Daha sonra steril katı besiyeri ortamlarına Kısım 3.4'te belirtildiği şekilde hazırlanmış homojenize stok ekim kültüründen 4'er mL ekim yapılmış ve statik olarak 30 °C'de inkübe edilmişlerdir. Katı faz fermentasyonu çalışmaları indükleyici içermeyen ve ayrıca ayrı ayrı olmak üzere 10 mM bakır, 10 mM ksilidin, 0.5 mM ABTS, 10 mM ksildin+ 10 mM bakır ve 0.5 mM ABTS + 10 mM bakır ortamlarında yürütülmüştür.

3.7. Katı Faz Kültüründen Lakkaz Enziminin Eldesi

İnkübasyon sonrasında her bir katı faz kültürü üzerine 40 mL olacak şekilde steril distile su ilave edildikten sonra kültürler steril çubuklarla karıştırılmıştır. Bu işlemten sonra kültürler 30 °C ve 150 rpm'de 2 saat çalkalanmıştır. Çalkalama sonrası kültürler süzölmüş ve elde edilen filtratlar 7000 rpm'de 10 dakika 2 kez santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrası elde edilen süpernatantlarda lakkaz enzim aktivitesi belirlenmiştir (Boran ve Yesilada, 2011).

3.8. Lakkaz Aktivitesinin Saptanması

Lakkaz (EC 1.10.3.2) aktivitesinin saptanması için substrat olarak 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) kullanılmış ve lakkaz aktivitesi lakkaz enziminin yaptığı ABTS oksidasyonuna bağlı olarak belirlenmiştir. Lakkaz aktivitesi ölçümü 40 °C'de yürütölmüş ve reaksiyon karışımı sodyum asetat tamponu (100 mM, pH 4.0), ABTS (5 mM) ve uygun miktarda süpernatant içerecek şekilde hazırlanmıştır. ABTS'nin oksidasyonu sonucu 420 nm'de 1 dakikada oluşan absorbans değişimi saptanmış ve 40 °C'de 1 µmol substratı 1 dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarı 1 ünite

olarak ifade edilmiştir (Yeşilada ve diğ, 2014). Tüm lakkaz aktivite değerleri en az 3 çalışmanın ortalaması olarak verilmiştir.

3.9. Doğal Jel Elektroforezi

Lakkaz enziminin varlığının ve olası izozimlerin gösterilmesi için doğal jel elektroforezi uygulaması yapılmıştır (Şekil 3.3). Bu amaç için TGX jeller kullanılmış ve kültür sıvıları kuyucuklara yüklendikten sonra 40 mA’de yaklaşık 1 saat yürütülmüştür. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel, ABTS içeren pH 4.0 asetat tamponunda bekletilip aktivite boyama işlemi yapılmıştır (Birhanli ve Yeşilada, 2010).



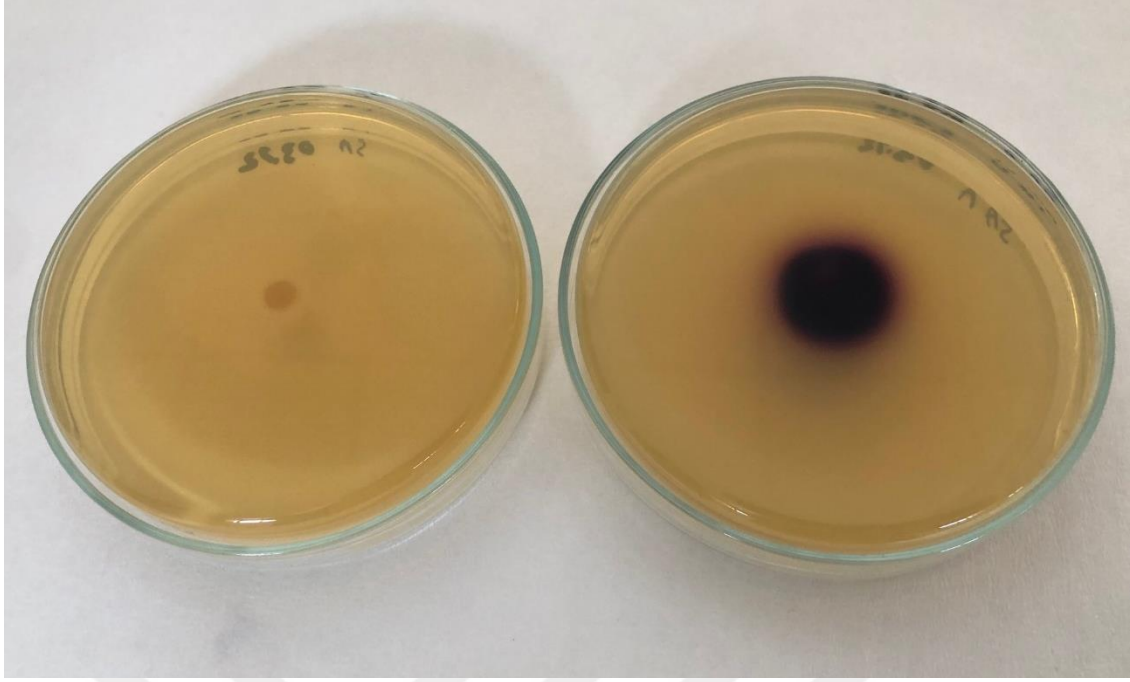
Şekil 3.3 : Zimogram çalışması.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Lakkaz enzimi; odun ve kağıt hamurundan lignin giderimi, ksenobiyotiklerin biyoremediasyonu, tekstil ve boya fabrikalarının atık sularının renginin giderimi, boyar maddelerin renginin giderimi, organik maddelerin sentezi, meyve sularının, biranın ve şarabın berraklaştırılması, kot ağartılması ve biyosensör hazırlanması gibi birçok uygulamada kullanılabilmektedir (Couto ve Toca-Herrera, 2007). Bu nedenle bu enzimin yüksek düzeyde üretimine yönelik pek çok araştırma yapılmaktadır. Bu enzimin en iyi üreticileri doğada yoğun şekilde bulunan beyaz çürükçül funguslardır. Beyaz çürükçül fungusların lakkaz üretim potansiyeli kullanılan türe ve hatta suşa bağlı olarak değişebilmektedir. Bu nedenle bu tez çalışmasında Hatay ilinden izole edilmiş bir beyaz çürükçül fungus olan *Trametes versicolor*'un lakkaz üretim yeteneği araştırılmıştır.

4.1. *T. versicolor*'un ABTS İçeren ve İçermeyen Sabouraud Dekstroz Agar Besiyerlerinde Lakkaz Varlığının Gösterilmesi

Çalışmanın bu kısmında öncelikle ABTS içeren ve içermeyen Sabouraud dekstroz agar (SDA) besiyerleri hazırlanmış ve bu katı besiyerlerinin tam ortasına steril koşullarda *T. versicolor* ekimi yapılmıştır. Fungusun besiyerindeki ABTS'yi oksitleyip oksitlememesine bağlı olarak bir renk değişimi oluşmaktadır. Eğer fungus ABTS'yi oksitleyebiliyorsa besiyerinin rengi yeşil-mora dönüşmektedir. Bu çalışmada da kullanılan fungus üreme sürecinde ABTS'yi oksitleyebilmiş ve mor renk oluşmuştur (Şekil 4.1). Bu da bu fungusun iyi bir lakkaz üreticisi olduğunun bir göstergesidir.



Şekil 4.1 : *T. versicolor*'un ABTS oksidasyonuna bağlı olarak SDA ortamındaki renk değişimi. Soldaki: ABTS içermeyen besiyerinde üreme, Sağdaki: ABTS içeren besiyerindeki üreme ve renk değişimi.

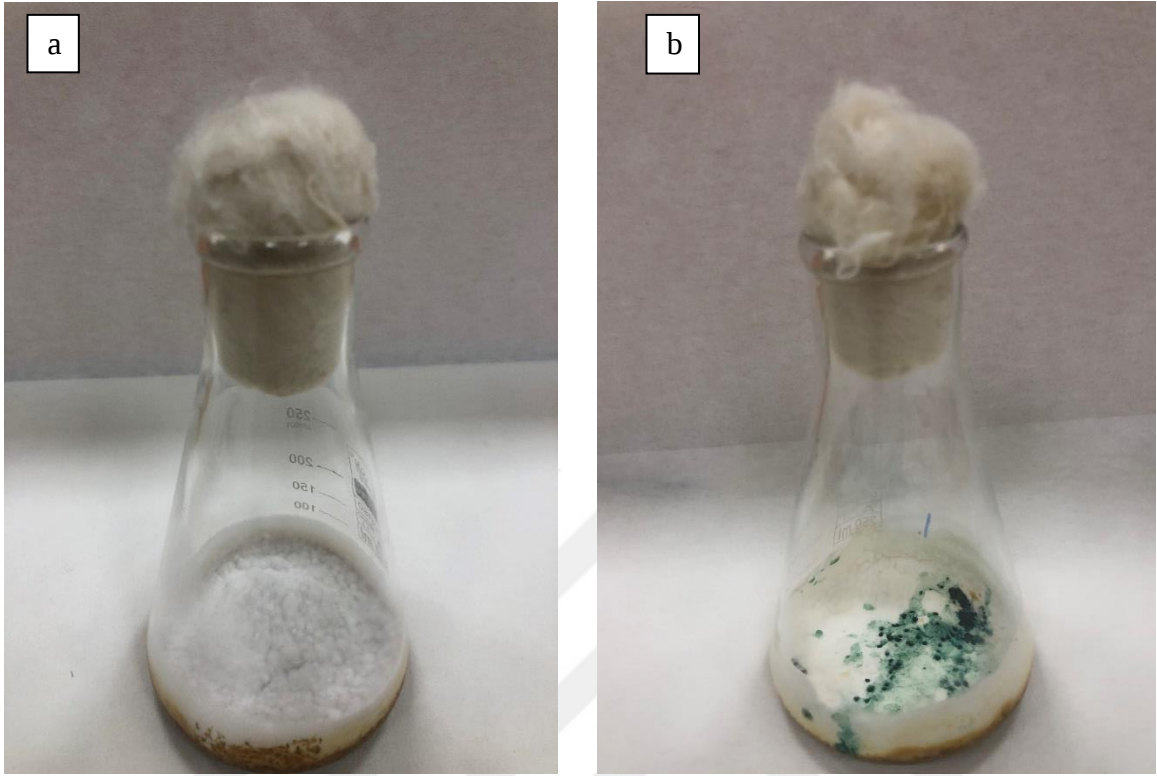
4.2. Farklı Fermentasyon Süreçlerinde *T. versicolor*'un Lakkaz Üretimi

Beyaz çürükçül fungusların lakkaz üretim potansiyeli üretimde kullanılan fermentasyon süreçlerinin (katı faz fermentasyonu, kesikli sıvı faz fermentasyonu ve tekrarlı kesikli sıvı faz fermentasyonu) farklılığına bağlı olarak değişmektedir. Çalışmada ayrıca zamana ve indükleyicilere bağlı olarak fungusun enzim üretimindeki değişimi de incelenmiştir.

4.2.1. Katı faz fermentasyonu sürecinde lakkaz üretimi

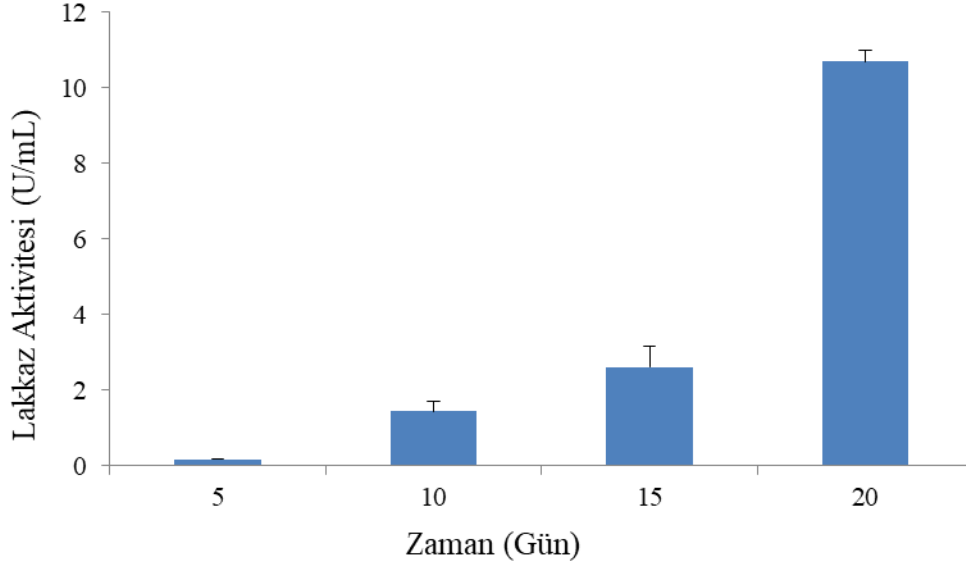
Bu kısımda katı substrat olarak nemlendirilmiş buğday kepeği + soya unu (3.5 g + 1.5 g) kullanılmıştır. Bu katı substrat hazırlandıktan sonra, distile su ile nemlendirilmiş ve otoklavda sterilize edilmiştir (Boran ve Yeşilada, 2011). Sterilizasyon sonrası besiyerlerine steril koşullarda fungusun ekimi yapılmış ve 20 gün 30 °C'de statik olarak üretime bırakılmıştır. Öncelikle bu fungusun katı faz fermentasyonu sürecinde lakkaz üretilmediği pratik bir yöntem olan katı faz ortamına ABTS eklenmesiyle izlenmiştir. Bu

uygulama sonucunda fungusun, ABTS'yi oksitlemesine bağlı olarak oluşan yeşil renk, katı faz fermentasyonu sürecinde lakkaz Üretebildiğinin göstergesi olmuştur (şekil 4.2 a-b).



şekil 4.2 : Katı faz sürecinde üretilmiş *T. versicolor* (a) ve ABTS oksidasyonuna bağlı lakkaz varlığının gösterilmesi (b)

Bu fungusun lakkaz ürettiğinin makroskopik olarak gözlenmesinden sonra fungusun farklı günlerde (5, 10, 15 ve 20. günlerde) lakkaz üretimi izlenmiştir. şekil 4.3'te görüldüğü gibi inkübasyonun 5. gününde 0.17 U/mL olan lakkaz aktivitesi saptanırken, lakkaz aktivitesi zaman bağlı olarak artarak 20. günde 10.70 U/mL'ye ulaşmıştır. Beyaz rkl fungusların katı faz fermentasyonu sürecinde lakkaz enzimini ürettiği daha önce rapor edilmiştir (Boran ve Yeşilada, 2011).

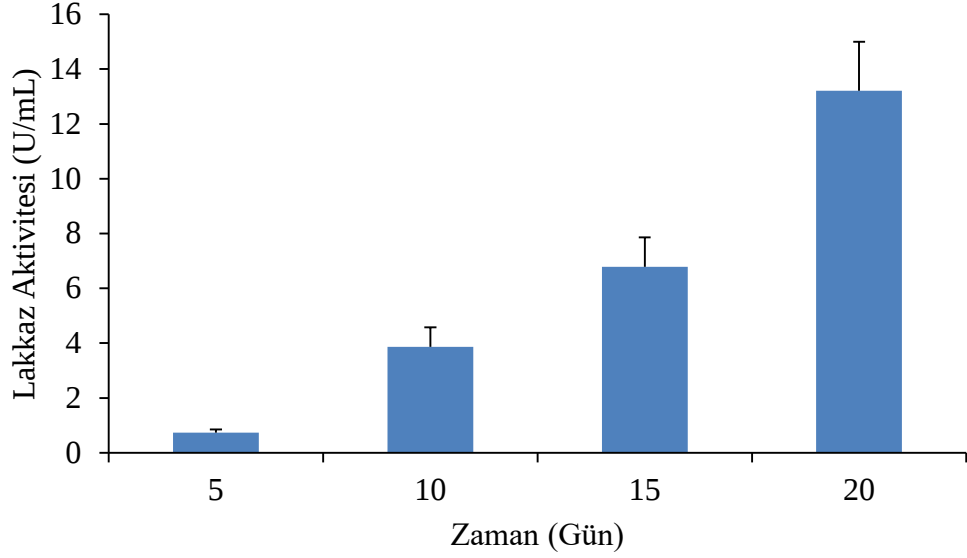


Şekil 4.3 : *T. versicolor*'un katı faz fermentasyonu sürecinde zamana bağlı lakkaz aktivite değişimi.

4.2.1.1. Katı faz fermentasyonu sürecinde indükleyicilerin lakkaz üretimine etkisi

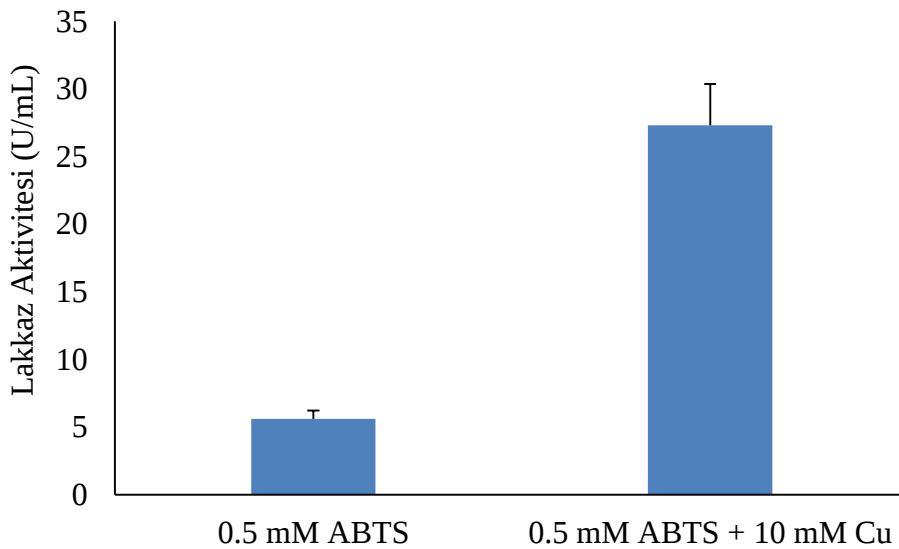
İndükleyicilerin beyaz çürükçül fungusların lakkaz üretimini etkilediği çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir (Collins ve Dobson, 1997; Boran ve Yeşilada, 2011; Birhanlı ve Yeşilada, 2017b). Bu yüzden bu kısımda bakır, ksilidin ve ABTS'nin ve aynı zamanda bakır + ksilidin ve bakır + ABTS'nin katı faz fermentasyonu sürecinde lakkaz üretimine etkisi test edilmiştir.

Bakırın lakkaz üretimi için iyi bir indükleyici olduğu rapor edilmiştir (Birhanlı ve Yeşilada, 2006). Tez çalışmasında 10 mM bakır içeren distile su ile nemlendirilmiş katı substrat besiyeri olarak kullanılmış ve 20 günlük süreçte zamana bağlı olarak lakkaz aktivite değişimi izlenmiştir. Bu üretim sürecinde fungusun lakkaz aktivite değerleri 5, 10, 15 ve 20.günlerde sırasıyla 0.74, 3.87, 6.79 ve 13.21 U/mL olarak saptanmıştır (Şekil 4.4). Bakır içermeyen ortama göre bakır eklenmesi *T. versicolor*'un lakkaz üretimini indüklemiştir. Bakır içermeyen ortamda 20. günde 10.70 U/mL lakkaz aktivitesi saptanırken, bakır içeren ortamda aynı günde bu değer 13.21 U/mL olarak bulunmuştur. Bakırsız ortamda lakkaz enzimi üretim verimi: Katı faz fermentasyonu>Tekrarlı kesikli fermentasyon>Kesikli fermentasyon şeklinde iken bakır içeren ortamda Kesikli fermentasyon>Katı faz fermentasyonu>Tekrarlı kesikli fermentasyon şeklindedir.



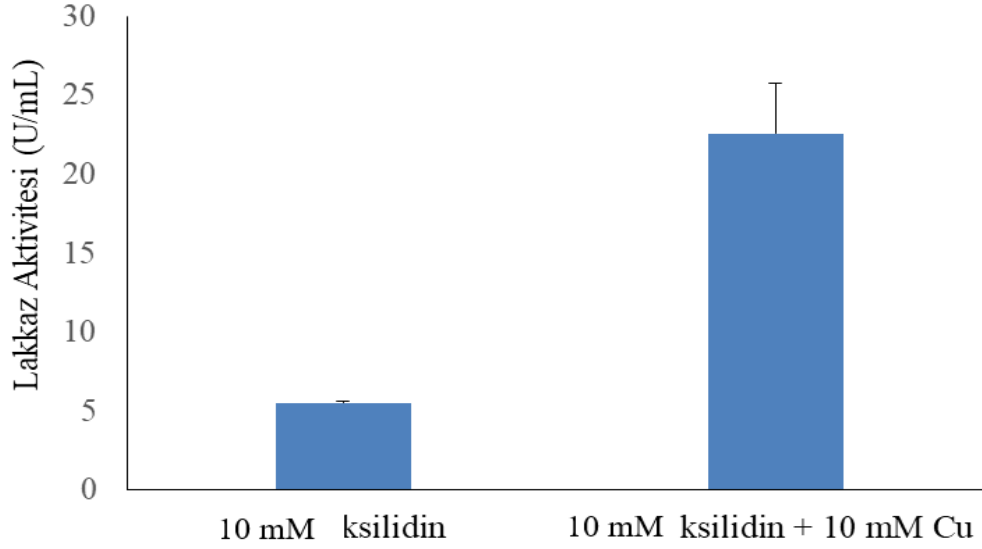
Şekil 4.4 : *T. versicolor*'un bakır içeren ortamda katı faz fermentasyonu sürecinde zamana bağlı lakkaz aktivite değişimi

Çalışmada ayrıca ABTS ve ksilidinin etkisi de test edilmiştir. Ayrıca iyi bir indükleyici olan bakırla birlikte sinerjistik etkisinin olup olmadığının test edilmesi amacıyla ABTS + bakır ve ksilidin + bakır uygulamaları da yapılmıştır. Bu amaçla bu indükleyicileri içeren ortamlarda 20 gün inkübasyon yapılmış ve 20. günde lakkaz aktivitesine bakılmıştır. 0.5 mM ABTS içeren katı faz fermentasyonunda 5.60 U/mL lakkaz aktivitesi elde edilirken 0.5 mM ABTS + 10 mM bakır ortamında 27.30 U/mL lakkaz aktivitesi saptanmıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 : *T. versicolor*'un ABTS ve ABTS + bakır içeren ortamda katı faz fermentasyonu sürecinde zamana bağlı lakkaz aktivite değişimi.

Yine ksilidin ve ksilidin + bakırın etkisini test etmek amacıyla çalışmalar yürütülmüştür. 10 mM ksilidin içeren ortamda 20. günde 5.53 U/mL lakkaz aktivitesi saptanırken 10 mM ksilidin + 10 mM bakır içeren ortamda ise 22.59 U/mL enzim aktivitesi belirlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 : *T. versicolor*'un ksilidin ve ksilidin + bakır içeren ortamda katı faz fermentasyonu sürecinde zamana bağlı lakkaz aktivite değişimi.

4.2.2. Sıvı faz fermentasyonu sürecinde indükleyicilerin lakkaz üretimine etkisi

Çalışmada katı faz fermentasyonu sürecinin yanı sıra sıvı faz fermentasyonu sürecinde de *T. versicolor*'un lakkaz üretim potansiyeli araştırılmıştır. Bu amaçla farklı fermentasyon süreçleri olan hem kesikli hem de tekrarlı kesikli süreçte zamana bağlı olarak lakkaz üretimi izlenmiştir.

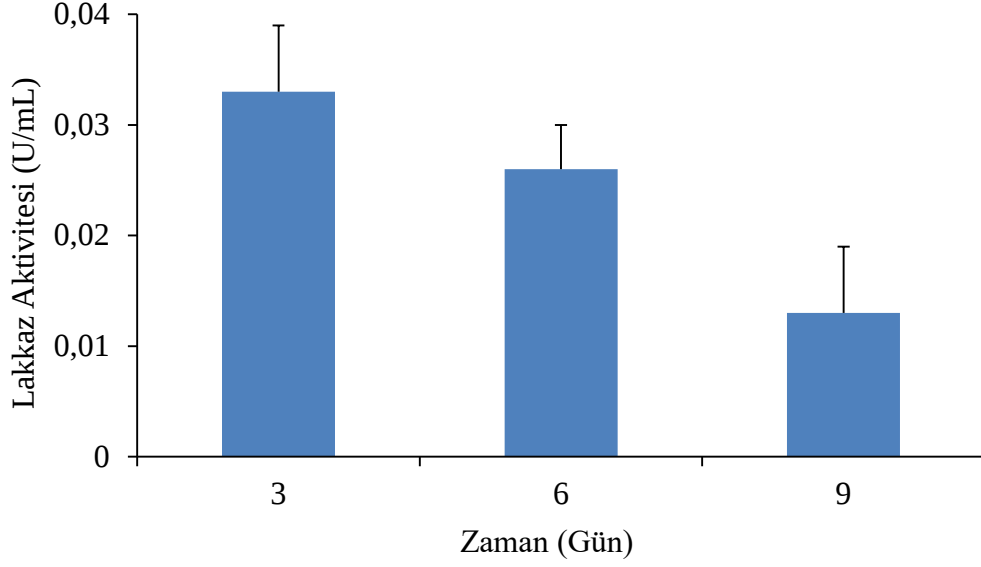
4.2.2.1. Kesikli süreçte lakkaz üretimi

Kesikli süreçte lakkaz üretimi çalışmalarında Sabouraud dekstrozo broth (SDB) besiyeri kullanılmıştır. Çalışmalarda öncelikle yatık agarda üretilen fungus SDB ortamına ekilerek üretilmiştir. İnkübasyon sonrası homojenize edilen kültürden taze SDB ortamına ekilerek tekrar 5 gün inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonrası kültür, homojenize edildikten sonra sıvı besiyerlerine ekim için kullanılacak stok inokulum olarak kullanılmıştır (Şekil 4.7).

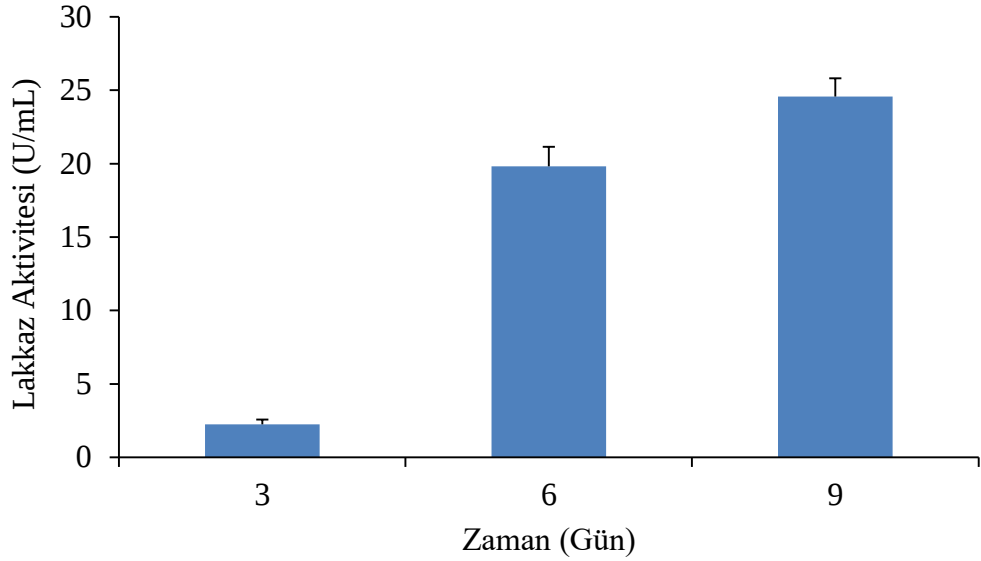


Şekil 4.7 : Stok inokulumun görüntüsü. Solda: Ekim yapılmamış SDB, Ortada: Çalkalamalı koşullarda üretilmiş kültür, Sağda: Homojenize stok inokulum.

Yukarıda belirtildiği gibi hazırlanan stok inokulumdan, 50 mL SDB/250 mL erlen ortamına ekim yapılmış ve 9 gün süresince zamana bağlı lakkaz aktivitesi izlenmiştir. Şekil 4.8’de görüldüğü gibi SDB ortamında lakkaz aktiviteleri belirgin olarak düşük çıkmıştır. Bakır içermeyen ortamda lakkaz aktiviteleri 3, 6 ve 9. günlerde sırasıyla; 0.033, 0.026 ve 0.013 U/mL saptanmıştır. Buna karşın 1mM bakır içeren ortamda lakkaz aktivitesi önemli oranda indüklenmiştir. Bu indükleyiciyi içeren ortamda ise lakkaz aktiviteleri 2.25, 19.83 ve 24.57 U/mL’ye ulaşmıştır (Şekil 4.9). Sonuçlar incelendiğinde bakır eklenmesiyle lakkaz aktivitesi 3. günde 6.82, 6. günde 762 ve 9. günde 1890 kat arttığı görülmektedir. Bu sonuç, bakırın kesikli ortamda da önemli bir lakkaz indükleyicisi olarak rol oynadığını göstermektedir (Lorenzo ve diğ, 2006; Cordi ve diğ, 2007).



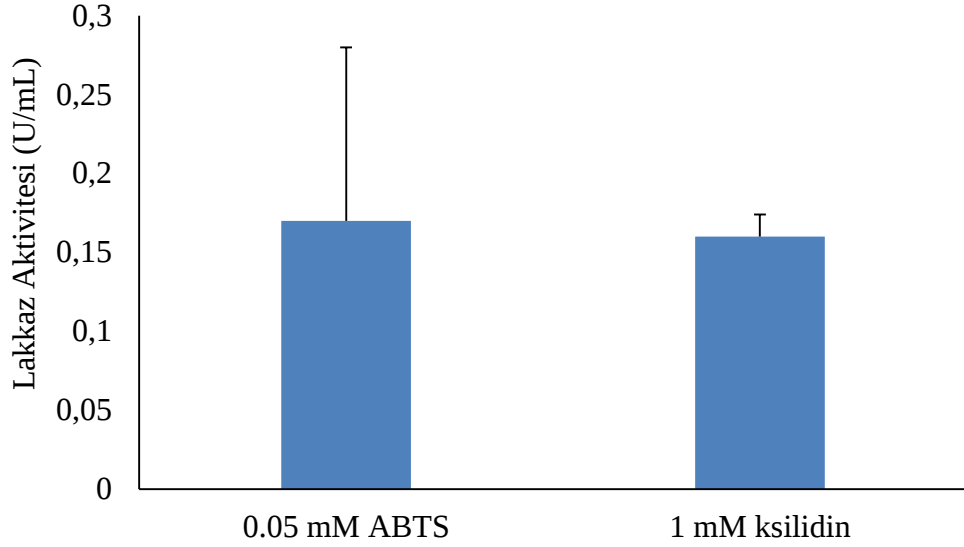
Şekil 4.8 : *T. versicolor*'un SDB ortamında kesikli süreçte zamana bağlı lakkaz aktivite değişimi



Şekil 4.9 : *T. versicolor*'un bakır içeren (1 mM) SDB ortamında kesikli süreçte zamana bağlı lakkaz aktivite değişimi.

Çalışmada ABTS ve ksilidinin etkisi de test edilmiştir. Bu amaçla bu indükleyicileri içeren ortamlarda 6 gün inkübasyon yapılmış ve 6. günde lakkaz aktivitesine bakılmıştır. 0.05 mM ABTS içeren SDB besiyerinde, 0.17 U/mL lakkaz aktivitesi saptanırken; 1 mM ksilidin içeren SDB ortamında 0.16 U/mL lakkaz aktivitesi belirlenmiştir (Şekil 4.10). Bu sonuçlar; indükleyicilerin lakkaz aktivitesini belirli oranda

indüklediğini gösterirken (yaklaşık 6 kat) bakıra göre bu indüklemenin çok daha düşük olduğunu ifade etmektedir (Şekil 4.8-Şekil 4.10).



Şekil 4.10 : *T. versicolor*'un ABTS ve ksilidin içeren SDB ortamında kesikli süreçte zamana bağlı lakkaz aktivite değişimi.

ABTS + bakır ve ayrıca ksilidin + bakırın etkisinin test edildiği çalışmalarda 0.05 mM ABTS + 1 mM bakır ve 1 mM ksilidin + 1 mM bakır ortamlarında da 6. gün lakkaz aktiviteleri ölçülmüştür. 0.05 mM ABTS + 1 mM bakır içeren ortamda 6. günde 10.50 U/mL lakkaz aktivitesi saptanırken 1 mM ksilidin + 1 mM bakır içeren ortamda 10.69 U/mL lakkaz aktivite elde edilmiştir.

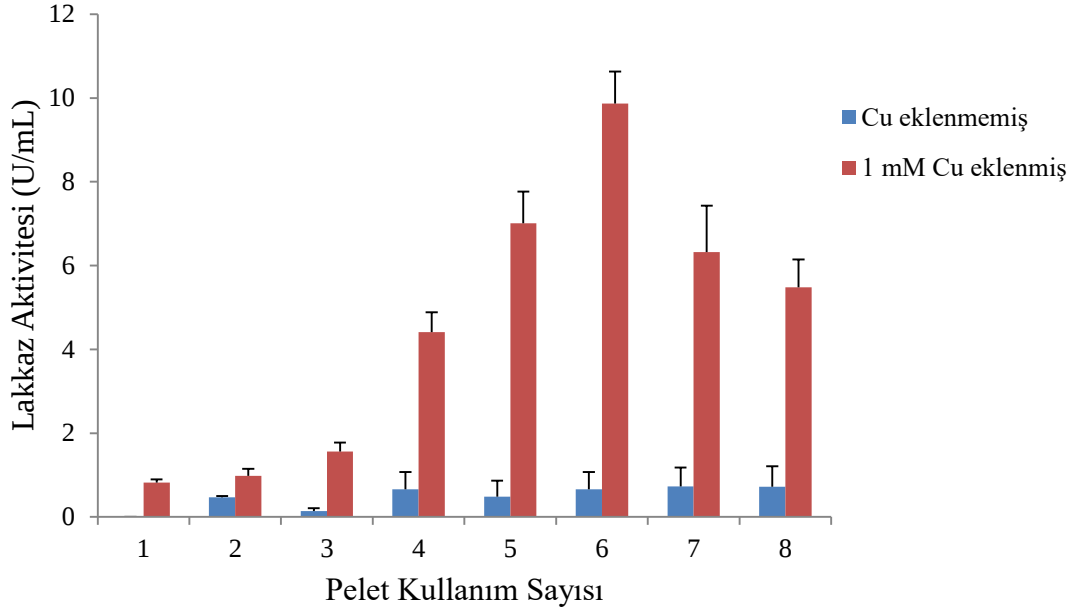
4.2.2.2. Tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi

Tekrarlı kesikli süreçte yürütülen çalışmalarda da Sabouraud Dekstroz broth (SDB) besiyeri kullanılmıştır. Burada da kesikli süreçte belirtildiği gibi hazırlanan homojenize kültür, çalışmalarda kullanılacak peletleri elde etmek için stok inokulum olarak kullanılmıştır. Bu stok inokulumdan 600 mL SDB/1000 mL erlen ortamına ekim yapılmış ve inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası oluşan peletler tekrarlı kesikli süreçte kullanılmıştır (Şekil 4.11).



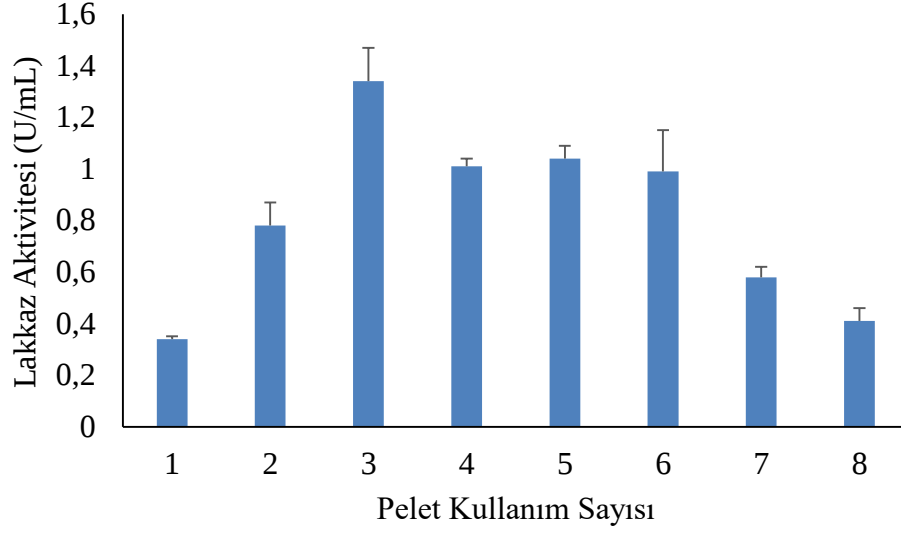
Şekil 4.11 : Peletlerin görüntüsü. Solda: Ekim yapılmamış SDB, Sağda: Üretilmiş fungal peletler.

Tekrarlı kesikli süreçte öncelikle indükleyici olarak, bakırın etkisi test edilmiştir. Bu süreçte bakır *T. versicolor*'un lakkaz aktivitesini önemli oranda indüklemiştir (Şekil 4.12). Bakır içermeyen ortamda, düşük düzeyde enzim aktiviteleri saptanırken; bakır içeren ortamda lakkaz aktiviteleri indüklenmiş ve örneğin peletlerin 6. kullanımında 0.66 U/mL'den 9.87 U/mL'ye ulaşmıştır. Bakır içeren ortamda peletlerin 1. kullanımından itibaren, 7. kullanımına kadar lakkaz üretimi artarken; 7. kullanım ve sonrasında lakkaz üretimi düşmüştür. Bu da, peletlerin kendi kendine tutuklandığı bu süreçte fungusların tekrarlı ve uzun süreli lakkaz üretimi için kullanılabileceğini göstermektedir. Bu sonuç; bakırın tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimine pozitif etkisini bildiren çalışmalarla uyumludur (Birhanlı ve Yeşilada, 2017b).

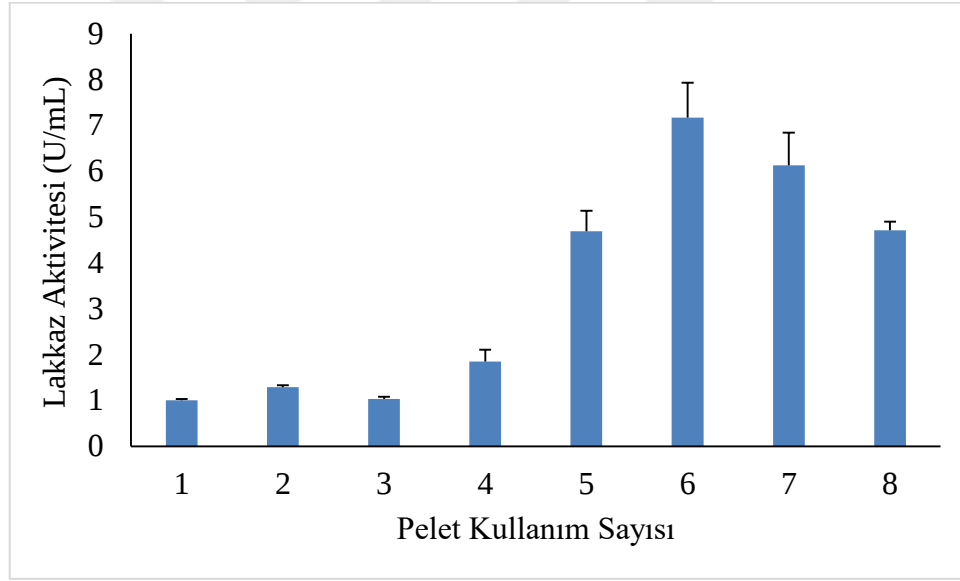


Şekil 4.12 : *T. versicolor*'un bakır içeren (1 mM) ve bakır içermeyen SDB ortamında tekrarlı kesikli süreçte zamana bağlı lakkaz aktivite değişimi.

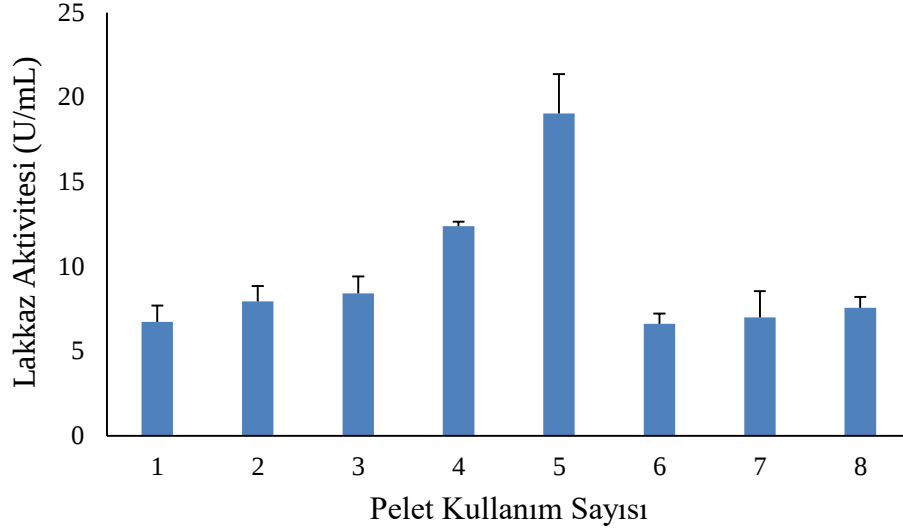
Çalışmanın bu kısmında indükleyici olarak ABTS ve ksilidinin tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimine etkileri de araştırılmıştır. 0.05 mM ABTS'nin lakkaz üretimi üzerine pozitif bir etkisi izlenmemiştir. Ksilidinin ise lakkaz üretimi üzerine pozitif bir etkisi olmasına rağmen bu etki bakıra göre ihmal edilebilecek kadar düşüktür (Şekil 4.13). Çalışmada ayrıca 0.05 mM ABTS + 1 mM bakır ve 1 mM ksilidin + 1 mM bakırın da sinerjistik etkisi test edilmiştir. 0.05 mM ABTS + 1 mM bakır içeren ortamda yalnızca bakır içeren ortama göre önemli bir artış gözlenmemiştir (Şekil 4.14). Şekil 4.15'ten de görüldüğü gibi 1 Mm Ksilidin + 1 Mm bakır içeren ortamda lakkaz aktivitesi ilk 5 kullanımda; kullanıma bağlı olarak artarken, 5. kullanımdan sonra lakkaz aktivitesi azalmaya başlamıştır. Daha önceki çalışmalarda bakırla birlikte eklenen ABTS veya ksilidin gibi indükleyicilerin lakkaz üretimi üzerine sinerjistik etkisi rapor edilmiştir (Birhanlı ve Yeşilada, 2017b).



Şekil 4.13 : *T. versicolor*'un ksilidin içeren (1 mM) SDB ortamında tekrarlı kesikli süreçte zamana bağlı lakkaz aktivite değişimi.



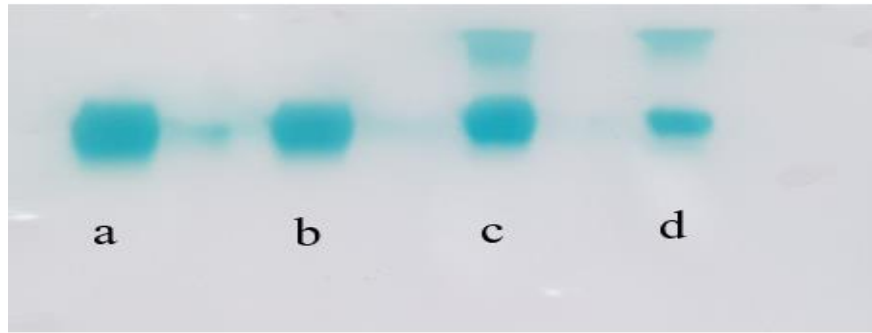
Şekil 4.14 : *T. versicolor*'un 0.05 mM ABTS + 1 mM bakır içeren SDB ortamında tekrarlı kesikli süreçte zamana bağlı lakkaz aktivite değişimi.



Şekil 4.15 : *T. versicolor*'un 1 mM ksilidin + 1 mM bakır içeren SDB ortamında tekrarlı kesikli süreçte zamana bağlı lakkaz aktivite değişimi.

4.3. Zimogram Çalışmaları

Katı faz fermentasyonu, kesikli fermentasyon ve tekrarlı kesikli fermentasyon süreçlerinden elde edilen enzim kaynaklarının zimogram uygulamaları da yapılmıştır. Bu süreçte enzim kaynakları jel üzerinde yürütüldükten sonra ABTS ile aktivite boyaması yapılmış ve jel fotoğraflanmıştır (Şekil 4.15). Jel fotoğrafından da görüldüğü gibi tüm fermentasyon koşullarında aktif lakkaz bandları izlenmiştir.



Şekil 4.16 : *T. versicolor* ham kültür filtratlarının zimogram çalışmaları (a) Katı faz fermentasyonu sürecinde bakır içermeyen ortamda 20. gün enzim kaynağı (b) Katı faz fermentasyonu sürecinde 10 mM bakır içeren ortamda 20. gün enzim kaynağı (c) Kesikli süreçte 1 mM bakır içeren ortamda 9. gün enzim kaynağı (d) Tekrarlı kesikli süreçte 1 mM bakır içeren ortamda 6. kullanım enzim kaynağı

5. SONUÇ VE ÖNERİ

Lakkaz enzimleri, çok bakırlı oksidoredüktazlardır. Düşük substrat özgüllüklerinden dolayı çok farklı substratları oksitleyebilmeleri, pek çok uygulama açısından öne çıkmalarını sağlamıştır. Bu enzimler; çeşitli atık suların biyolojik iyileştirilmesi, boyar madde renk giderimi, kağıt hamurundan ve lignoselülozlu ham maddeden lignin giderimi, ilaç, pestisit ve Bisfenol A gibi zararlı bileşiklerin biyoremediasyonu, şarap, bira ve meyve suyu stabilitesinin sağlanması, hamur ve ekmeğin kalitesinin artırılması, biyosensör hazırlanması ve organik madde sentezinde kullanım gibi uygulamalarda kullanımları araştırılmaktadır.

Çeşitli organizmalar, lakkaz enzimlerini üretebilmektedir. Bu organizmalar arasında, beyaz çürükçül funguslar en iyi lakkaz üreticileridir. Bu fungusların lakkaz üretim potansiyelleri, türden türe hatta suştan suşa değişmektedir. Lakkaz üretimi için uygulanan fermentasyon sürecinin farklılığı da fungusun lakkaz üretim potansiyelini önemli oranda etkilemektedir. Ayrıca, kullanılan indükleyici de fungusun lakkaz üretimini farklı şekilde etkileyebilmektedir.

Yukarıda belirtilen nedenlerden dolayı, bu tez çalışmasında Hatay ilinden toplanıp saf kültür olarak izole edilen *Trametes versicolor* suşu kullanılmıştır. Çalışmada ayrıca katı faz fermentasyonu, sıvı kesikli fermentasyon ve sıvı tekrarlı kesikli fermentasyon gibi farklı fermentasyon süreçlerinde üretilen bu fungusun lakkaz üretim potansiyeli araştırılmıştır. Lakkaz enzim üretimini etkiledikleri bilinen bakır, ABTS ve ksilidinin de farklı fermentasyon süreçlerinde lakkaz üretimi üzerine etkisi test edilmiştir. Bakır; kullanılan indükleyiciler arasında en yaygın kullanılan ve lakkaz üretimini artırma açısından, en etkili indükleyicilerden birisidir. Bu nedenden dolayı da çalışmada bakırla birlikte kullanılan ABTS ve ksilidinin sinerjistik etkisi de izlenmiştir. Herhangi bir indükleyici içermeyen fermentasyon süreçlerinde en yüksek lakkaz aktivitesi katı faz fermentasyonu sürecinde saptanmıştır. Tek başına bakır eklenmesinin enzim üretimi üzerine, tek başına ABTS veya ksilidin eklenmesine göre çok daha yüksek indükleyici etkisi olmuştur. ABTS + bakır veya ksilidin + bakır eklenmiş ortamlarda bazı fermentasyon süreçlerinde lakkaz aktivitesinin yüksekliği sinerjistik etkinin de bir göstergesidir.

Sonuç olarak; fermentasyon süreci, zaman ve indükleyici seçimi bu suşun lakkaz üretim potansiyelini önemli oranda etkilemektedir. Bu tez çalışmasında kullanılan suşla

yüksek düzeyde enzim üretilmesi, bu suşun lakkaz üretimi açısından önemli olduğunu ve değerlendirilebileceğini göstermektedir. Elde edilecek enzimin, çeşitli uygulamalarda kullanılabilecek olması da ayrıca önemlidir.



KAYNAKLAR

- Adekunle, A. E., Guo, C. & Liu, C. Z. (2017). Lignin-enhanced laccase production from *Trametes versicolor* Waste and biomass valorization, 8(4), 1061-1066.
- Agrawal, K., Chaturvedi, V., & Verma, P. (2018). Fungal laccase discovered but yet undiscovered, *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1), 1-12.
- Akerman-Sanchez, G., & Rojas-Jimenez, K. (2021). Fungi for the bioremediation of pharmaceutical-derived pollutants: A bioengineering approach to water treatment, *Environmental Advances*, 4, 1-10.
- Akkaya, A. & Pazarhoğlu, N. (2012). 21. yüzyılın anahtar teknolojisi: Beyaz biyoteknoloji. *Kırıkkale Üniversitesi Bilimde Gelişmeler Dergisi*, 1(1), 22-33.
- An, Q., Li, C. S., Yang, J., Chen, S. Y., Ma, K. Y., Wu, Z. Y., S. Biyan, L. & Han, M. L. (2021). Evaluation of Laccase Production by Two White-rot Fungi Using Solid-state Fermentation with Different Agricultural and Forestry Residues, *BioResources*, 16(3), 5282-5300.
- Aslam, M. S., Hanif, K., Rehman, S. U., Gull, I., Athar, M. A. & Abbas, Z. (2016). Delignification of paper pulp by purified laccase from *Aspergillus flavus*. *Journal of Animal Plant Sciences*, 26, 1399-1404.
- Aydinoğlu, T. & Sargın, S. (2013). Production of laccase from *Trametes versicolor* by solid-state fermentation using olive leaves as a phenolic substrate, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36(2), 215-222.
- Babot, E. D., Rico, A., Rencoret, J., Kalum, L., Lund, H., Romero, J. & Gutiérrez, A. (2011). Towards industrially-feasible delignification and pitch removal by treating paper pulp with *Myceliophthora thermophila* laccase and a phenolic mediator, *Bioresource technology*, 102(12), 6717-6722.
- Baldrian, P. (2004). Increase of laccase activity during interspecific interactions of white-rot fungi, *FEMS Microbiology Ecology*, 50(3), 245-253.
- Barabadi, H., Kobarfard, F. & Vahidi, H. (2018). Biosynthesis and characterization of Biogenic tellurium nanoparticles by using *Penicillium chrysogenum* PTCC 5031: A novel approach in gold biotechnology, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 17(2), 87-97.
- Barcelos, M. C., Lupki, F. B., Campolina, G. A., Nelson, D. L. & Molina, G. (2018). The colors of biotechnology: general overview and developments of white, green and blue areas, *FEMS Microbiology Letters*, 365(21), 1-11.
- Barkha, S., Bharti, S. K. & Anita (2016). Green biotechnology and scope of genetically modified crops: facts and prejudices, *Indian Journal of Agriculture Business*, 2(1), 63-72.
- Barrière, F., Ferry, Y., Rochefort, D. & Leech, D. (2004). Targetting redox polymers as mediators for laccase oxygen reduction in a membrane-less biofuelcell, *Electrochemistry Communications*, 6(3), 237-241.

- Beltrán-Flores, E., Sarrà, M. & Blánquez, P. (2021).** Pesticide bioremediation by *Trametes versicolor*: Application in a fixed-bed reactor, sorption contribution and bioregeneration. *Science of The Total Environment*, 794, 148386.
- Bending, G. D., Friloux, M. & Walker, A. (2002).** Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential, *FEMS Microbiology Letters*, 212(1), 59-63.
- Bilal, M., Iqbal, H. M. & Barceló, D. (2019).** Persistence of pesticides-based contaminants in the environment and their effective degradation using laccase-assisted biocatalytic systems. *Science of The Total Environment*, 695, 133896.
- Birhanli, E., & Yesilada, O. (2006).** Increased production of laccase by pellets of *Funalia trogii* ATCC 200800 and *Trametes versicolor* ATCC 200801 in repeated-batch mode. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(6), 1286-1293.
- Birhanli, E., & Yesilada, O. (2010).** Enhanced production of laccase in repeated-batch cultures of *Funalia trogii* and *Trametes versicolor*. *Biochemical Engineering Journal*, 52(1), 33-37.
- Birhanli, E., & Yeşilada, Ö. (2013).** The utilization of lignocellulosic wastes for laccase production under semisolid-state and submerged fermentation conditions, *Turkish Journal of Biology*, 37(4), 450-456.
- Birhanli, E., & Yeşilada, Ö. (2017a).** Tekrarlı kesikli süreçte *Funalia trogii* ve *Trametes versicolor* ile lakkaz enziminin çeşitli ortamlarda üretimi. *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi*, 43(1), 27-40.
- Birhanli, E., & Yeşilada, Ö. (2017b).** The effect of various inducers and their combinations with copper on laccase production of *Trametes versicolor* pellets in a repeated-batch process, *Turkish Journal of Biology*, 41(4), 587-599.
- Blombach, B., Grünberger, A., Centler, F., Wierckx, N. & Schmid, J. (2021).** Exploiting unconventional prokaryotic hosts for industrial biotechnology. *Trends in Biotechnology*.
- Borràs, E., Blánquez, P., Sarrà, M., Caminal, G. & Vicent, T. (2008).** *Trametes versicolor* Pellets production: low-cost medium and scale-up. *Biochemical Engineering Journal*, 42(1), 61-66.
- Boran, F. & Yesilada, O. (2011).** Enhanced production of laccase by fungi under solid substrate fermentation condition. *BioResources*, 6(4), 4404-4416.
- Bourbonnaus, R. & Paice, M.G. (1996).** Enzymatic delignification of kraft pulp using laccase and a mediator, *The Technical Association of the Pulp and Paper Industry Journal* ., 79, 199-204.
- Cajthaml, T., Křesinová, Z., Svobodová, K. & Möder, M. (2009).** Biodegradation of endocrine-disrupting compounds and suppression of estrogenic activity by ligninolytic fungi, *Chemosphere*, 75(6), 745-750.
- Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, A. T., Romero, J., Gutiérrez, A., & José, C. (2007).** Paper pulp delignification using laccase and natural mediators. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(5), 1264-1271.

- Cerniglia, C. E. (1997).** Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19(5-6), 324-333.
- Cerrone, F., Barghini, P., Pesciaroli, C., & Fenice, M. (2011).** Efficient removal of pollutants from olive washing wastewater in bubble-column bioreactor by *Trametes versicolor*. *Chemosphere*, 84(2), 254-259.
- Chawachart, N., Khanongnuch, C., Watanabe, T., & Lumyong, S. (2004).** Rice bran as an efficient substrate for laccase production from thermotolerant basidiomycete *Coriolus versicolor* strain RC3. *Fungal Divers*, 15, 23-32.
- Chenaux, P. R., Lalji, N., & Lefebvre, D. D. (2014).** *Trametes meyenii* possesses elevated dye degradation abilities under normal nutritional conditions compared to other white rot fungi. *AMB Express*, 4(1), 1-9.
- Collins, P. J., & Dobson, A. (1997).** Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(9), 3444-3450.
- Cordi, L., Minussi, R. C., Freire, R. S., & Durán, N. (2007).** Fungal laccase: copper induction, semi- purification, immobilization, phenolic effluent treatment and electrochemical measurement. *African Journal of Biotechnology*, 6(10), 1255-1259
- Cornelissen, M., Małyska, A., Nanda, A. K., Lankhorst, R. K., Parry, M. A., Saltenis, V. R., Piribil, M., Nacry, P., Inze, D., & Baekelandt, A. (2021).** Biotechnology for tomorrow's world: scenarios to guide directions for future innovation. *Trends in Biotechnology*, 39(5), 438-444.
- Couto, S. R., Gundín, M., Lorenzo, M., & Sanromán, M. Á. (2002).** Screening of supports and inducers for laccase production by *Trametes versicolor* in semi-solid-state conditions. *Process Biochemistry*, 38(2), 249-255.
- Couto, S. R., & Sanromán, M. A. (2006).** Application of solid-state fermentation to food industry—a review. *Journal of Food Engineering*, 76(3), 291-302.
- Couto, S. R., & Toca-Herrera, J. L. (2007).** Laccase production at reactor scale by Filamentous fungi. *Biotechnology Advances*, 25(6), 558-569.
- D'Annibale, A., Stazi, S. R., Vinciguerra, V., Di Mattia, E., & Sermanni, G. G. (1999).** Characterization of immobilized laccase from *Lentinula edodes* and its use in olive-mill wastewater treatment. *Process Biochemistry*, 34(6-7), 697-706.
- DaSilva, E. (1998).** Biotechnology: developing countries and globalization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(4), 463-486.
- Demiralp, B., Büyük, İ., Aras, S., & CANSARAN-DUMAN, D. (2015).** Lakkaz enziminin endüstriyel ve biyoteknoloji alanında kullanımı. *Türk Hijyen ve Deneyisel Biyoloji Dergisi*, 72(4): 351-68
- Dhillon, G. S., Kaur, S., Brar, S. K., & Verma, M. (2012).** Flocculation and haze removal from crude beer using in-house produced laccase from *Trametes versicolor* cultured on brewer's spent grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(32), 7895-7904.
- Dhull N, Michael M, Simran P, Gokak VR and Venkatanagaraju E.(2020).** Production and Purification strategies for laccase. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2020; 11(6): 2617-2625.

- Diorio, L. A., Fréchou, D. S., & Levin, L. N. (2021).** Removal of dyes by immobilization of *Trametes versicolor* in a solid-state micro-fermentation system. *Revista Argentina de Microbiología*, 53(1), 3-10.
- Eggert, C., Temp, U., & Eriksson, K. E. (1996).** The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(4), 1151-1158.
- Elisashvili, V., Penninckx, M., Kachlishvili, E., Tsiklauri, N., Metreveli, E., Kharziani, T. & Kvesitadze, G. (2008).** *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. *Bioresource Technology*, 99(3), 457-462.
- Ergül, F. E., Sargin, S., Öngen, G., & Sukan, F. V. (2009).** Dephenolisation of olive mill wastewater using adapted *Trametes versicolor*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63(1), 1-6.
- Ferrando-Climent, L., Cruz-Morató, C., Marco-Urrea, E., Vicent, T., Sarrà, M., Rodríguez-Mozaz, S., & Barceló, D. (2015).** Non conventional biological treatment based on *Trametes versicolor* for the elimination of recalcitrant anticancer drugs in hospital wastewater. *Chemosphere*, 136, 9-19.
- Forootanfar, H. & Faramarzi, M. A. (2015).** Insights into laccase producing organisms, fermentation states, purification strategies, and biotechnological applications. *Biotechnology Progress*, 31(6), 1443-1463.
- Fungus**, Erişim: 05 Aralık 2021, <https://www.hemel.com.tr/what-is-white-rot-in-trees-what-causes-it>; https://en.wikipedia.org/wiki/Wood-decay_fungus
- Gavrilescu, M. & Chisti, Y. (2005).** Biotechnology—a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnology Advances*, 23(7-8), 471-499.
- Gedikli, S., Aytar, P., Buruk, Y., Apohan, E., Cabuk, A., Yeşilada, Ö. & Burnak, N. (2014).** Laccase production and dye decolorization by *Trametes versicolor*: Application of Taguchi and Box-Behnken Methodologies. *Turkish Journal of Biochemistry/Türk Biyokimya Dergisi*, 39(3), 298-306
- Glazunova, O. A., Shakhova, N. V., Psurtseva, N. V., Moiseenko, K. V., Kleimenov, S. Y. & Fedorova, T. V. (2018).** White-rot basidiomycetes *Junghuhnia nitida* and *Steccherinum bourdotii*: Oxidative potential and laccase properties in comparison with *Trametes hirsuta* and *Coriolopsis caperata*. *PLoS One*, 13(6), e0197667.
- Gochev, V. K. & Krastanov, A. I. (2007).** Fungal laccases. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 13(1), 75.
- Godoy, A., Amorim, H. V., Lopes, M. L. & Oliveira, A. J. (2008).** Continuous and batch fermentation processes: advantages and disadvantages of these processes in the Brazilian ethanol production. *International Sugar Journal*, 110(1311), 175-181.
- González, C., Wu, Y., Zuleta-Correa, A., Jaramillo, G. & Vasco-Correa, J. (2021).** Biomass to value-added products using microbial consortia with white-rot fungi. *Bioresource Technology Reports*, 100831.
- Gözükırmızı, N. & Karlık, E. (2017).** Bitki Teknolojisinde Tarihsel Gelişmeler. *TÜRKTOB Dergisi*, 24, 4-11.

- Grommen, R. & Verstraete, W. (2002).** Environmental biotechnology: the ongoing quest. *Journal of Biotechnology*, 98(1), 113-123.
- Gül, Ü. D. (2014).** Sağlık alanında biyoteknolojik uygulamalar: Kırmızı biyoteknoloji. *Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 1(1), 66-70.
- Hongyan, L., Zexiong, Z., Shiwei, X., He, X., Yinian, Z., Haiyun, L., & Zhongsheng, Y.(2019).** Study on transformation and degradation of bisphenol A by *Trametes versicolor* laccase and simulation of molecular docking. *Chemosphere*, 224, 743-750.
- Iandolo, D., Piscitelli, A., Sannia, G., & Faraco, V. (2011).** Enzyme production by solid substrate fermentation of *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* on tomato pomace. *Applied biochemistry and biotechnology*, 163(1), 40-51
- Ibarra, D., Romero, J., Martínez, M. J., Martínez, A. T., & Camarero, S. (2006).** Exploring the enzymatic parameters for optimal delignification of eucalypt pulp by laccase-mediator. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(6), 1319-1327.
- Ibrahim, M. (2021).** Biotechnology Branches Color Classification and Applications. *Electronic Journal of Biology*, 17(6), 236-237.
- Jebapriya, G. R., & Gnanadoss, J. J. (2013).** Bioremediation of textile dye using white-rot fungi: a review. *International Journal of Current Research and Review*, 5(3), 1-13.
- Khelifi, R., Belbahri, L., Woodward, S., Ellouz, M., Dhouib, A., Sayadi, S., & Mechichi, T.(2010).** Decolourization and detoxification of textile industry wastewater by the laccase-mediator system. *Journal of Hazardous Materials*, 175(1-3), 802-808.
- Kılıç, G. (2019).** Farklı sıcaklık değerlerinin *Penicillium expansum* fungusunun protein içeriği ve proteaz enzimi üzerine etkileri/The effects of different temperatures on the protein content and protease enzyme of the *Penicillium expansum* fungus (Master Thesis).
- Krishna, C. (2005).** Solid-state fermentation systems—an overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25(1-2), 1-30.
- Kurniawati, S. & Nicell, J. A. (2008).** Characterization of *Trametes versicolor* laccase for the transformation of aqueous phenol. *Bioresource Technology*, 99(16), 7825-7834.
- Kunamneni, A., Camarero, S., García-Burgos, C., Plou, F. J., Ballesteros, A., & Alcalde, M. (2008).** Engineering and applications of fungal laccases for organic synthesis. *Microbial Cell Factories*, 7(1), 1-17.
- Kunamneni, A., Permaul, K., & Singh, S. (2005).** Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus *Thermomyces Lanuginosus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(2), 168-171.
- Lee, H., Jang, Y., Choi, Y. S., Kim, M. J., Lee, J., Lee, H., ... & Kim, J. J. (2014).** Biotechnological procedures to select white rot fungi for the degradation of PAHs. *Journal of Microbiological Methods*, 97, 56-62.

- Levin, L., Herrmann, C., & Papinutti, V. L. (2008).** Optimization of lignocellulolytic enzyme production by the white-rot fungus *Trametes trogii* in solid-state fermentation using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 39(1), 207-214.
- Liu, S., Liu, H., Shen, C., Fang, W., Xiao, Y., & Fang, Z. (2021).** Comparison of performances of different fungal laccases in delignification and detoxification of alkali-pretreated corncob for bioethanol production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 48(1-2), 013, 1-9.
- Loaiza, J. M., Alfaro, A., López, F., García, M. T., & García, J. C. (2019).** Optimization of Laccase/Mediator System (LMS) stage applied in fractionation of *Eucalyptus globulus*. *Polymers*, 11(731), 1-13.
- Lorenzo, M., Moldes, D., Couto, S. R., & Sanroman, A. (2002).** Improving laccase production by employing different lignocellulosic wastes in submerged cultures of *Trametes versicolor*. *Bioresource Technology*, 82(2), 109-113.
- Lorenzo, M., Moldes, D., & Sanromán, M. Á. (2006).** Effect of heavy metals on the production of several laccase isoenzymes by *Trametes versicolor* and on their ability to decolourise dyes. *Chemosphere*, 63(6), 912-917.
- Manan, M. A., & Webb, C. (2017).** Design aspects of solid state fermentation as applied to microbial bioprocessing. *Journal of Applied Biotechnology and Bioengineering*, 4(1), 91.
- Martani, F., Beltrametti, F., Porro, D., Branduardi, P., & Lotti, M. (2017).** The importance of fermentative conditions for the biotechnological production of lignin modifying enzymes from white-rot fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 364(13), 1-18.
- Mate, D. M., & Alcalde, M. (2015).** Laccase engineering: from rational design to directed evolution. *Biotechnology Advances*, 33(1), 25-40.
- Mate, D. M., & Alcalde, M. (2016).** Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. *Microbial Biotechnology*, 10(6), 1457-1467.
- Mayer, A. M., & Staples, R. C. (2002).** Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, 60(6), 551-565.
- Mayolo-Deloisa, K., González-González, M., & Rito-Palomares, M. (2020).** Laccases in food industry: Bioprocessing, potential industrial and biotechnological applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 222.
- Mienda, B. S., Idi, A., & Umar, A. (2011).** Microbiological features of solid state fermentation and its applications-An overview. *Research in Biotechnology*, 2(6), 21-26
- Min, K., Kim, Y. H., Kim, J., Kim, Y., Gong, G., & Um, Y. (2022).** Effect of manganese peroxidase on The decomposition of cellulosic components: Direct cellulolytic activity and synergistic effect with cellulase. *Bioresource Technology*, 343, 126-138.
- Minussi, R. C., Rossi, M., Bologna, L., Rotilio, D., Pastore, G. M., & Durán, N. (2007).** Phenols removal in musts: strategy for wine stabilization by laccase. *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*, 45(3-4), 102-107.

- Mir-Tutusaus, J. A., Bacchar, R., Caminal, G., & Sarrà, M. (2018).** Can white-rot fungi be a real wastewater treatment alternative for organic micropollutants removal? A review. *Water Research*, 138, 137-151.
- Moreno, A. D., Ibarra, D., Eugenio, M. E., & Tomás-Pejó, E. (2020).** Laccases as versatile enzymes: from industrial uses to novel applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 95(3), 481-494.
- Navas, L. E., Martínez, F. D., Taverna, M. E., Fetherolf, M. M., Eltis, L. D., Nicolau, V., Estanoz, D., Campos, E., Benintende, G., Berretta, M. F. (2019).** A thermostable laccase from *Thermus* sp. 2.9 and its potential for delignification of Eucalyptus biomass. *AMB Express*, 9(1), 1-10.
- Niño-Medina, G., Gutiérrez-Soto, G., Urías-Orona, V., & Hernández-Luna, C. E. (2017).** Effect of laccase from *Trametes maxima* CU1 on physicochemical quality of bread. *Cogent Food & Agriculture*, 3(1), 1328762.
- Onaizi, S. A., & Alshabib, M. (2021).** The degradation of bisphenol A by laccase: Effect of biosurfactant addition on the reaction kinetics under various conditions. *Separation and Purification Technology*, 257, 117785.
- Ortiz, R. (1998).** Critical role of plant biotechnology for the genetic improvement of food crops: perspectives for the next millennium. *Electronic Journal of Biotechnology*, 1(3), 16-17.
- Osma, J. F., Toca-Herrera, J. L., & Rodríguez-Couto, S. (2010).** Uses of laccases in the food industry. *Enzyme Research*,
- Osma, J. F., Moilanen, U., Toca-Herrera, J. L., & Rodríguez-Couto, S. (2011).** Morphology and laccase production of white-rot fungi grown on wheat bran flakes under semi-solid-state fermentation conditions. *FEMS Microbiology Letters*, 318(1), 27-34.
- Ozan, V. A., Atacı, N., & Arisan, İ. (2014).** Studies on Production of Laccase Enzyme by White Rot Fungi. *Sigma: Journal of Engineering & Natural Sciences/Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*, 32(1), 61-70.
- Öcal, E. (2012).** İlköğretim fen bilgisi öğretmenlerinin biyoteknoloji (genetik mühendisliği) farkındalık düzeyleri. Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü, Malatya.
- Pandey, A., Soccol, C. R., Nigam, P., & Soccol, V. T. (2000).** Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresource technology*, 74(1), 69-80.
- Pandey, A. (2003).** Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3), 81-84.
- Panwar, V., Sheikh, J. N., & Dutta, T. (2020).** Sustainable Denim Bleaching by a Novel Thermostable Bacterial Laccase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 192(4), 1238-1254.
- Papinutti, V. L., & Forchiassin, F. (2007).** Lignocellulolytic enzymes from *Fomes sclerodermeus* growing in solid-state fermentation. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 54-59.

- Pazarlıoğlu, N. K., Sarişik, M., & Telefoncu, A. (2005).** Laccase: production by *Trametes versicolor* and application to denim washing. *Process Biochemistry*, 40(5), 1673-1678.
- Pinheiro, V. E., Michelin, M., Vici, A. C., de Almeida, P. Z., & de Moraes, M. D. L. T. (2020).** *Trametes versicolor* laccase production using agricultural wastes: a comparative study in Erlenmeyer flasks, bioreactor and tray. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 43(3), 507-514.
- Polak, J., & Jarosz-Wilkolazka, A. (2012).** Fungal laccases as green catalysts for dye synthesis. *Process Biochemistry*, 47(9), 1295-1307.
- Raimbault, M. (1998).** General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, 1(3), 26-27.
- Ramírez-Montoya, L. A., Hernández-Montoya, V., Montes-Morán, M. A., Jáuregui-Rincón, J., & Cervantes, F. J. (2015).** Decolorization of dyes with different molecular properties using free and immobilized laccases from *Trametes versicolor*. *Journal of Molecular Liquids*, 212, 30-37.
- Rebello Barreto Xavier, A. M., Mora Tavares, A. P., Ferreira, R., & Amado, F. (2007).** *Trametes versicolor* growth and laccase induction with by-products of pulp and paper industry. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10(3), 444-451.
- Reddy, C. A. (1995).** The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. *Current Opinion in Biotechnology*, 6(3), 320-328.
- Rico, A., Rencoret, J., Del Río, J. C., Martínez, A. T., & Gutiérrez, A. (2014).** Pretreatment with laccase and a phenolic mediator degrades lignin and enhances saccharification of Eucalyptus feedstock. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 1-14.
- Risdianto, H., Sofianti, E., Suhardi, S. H., & Setiadi, T. (2012).** Optimisation of laccase production using white rot fungi and agriculture wastes in solid state fermentation. *ITB Journal of Engineering Science*, 44(2), 93-105.
- Rodríguez-Couto, S. (2017).** Industrial and environmental applications of white-rot fungi. *Mycosphere*, 8(3), 456-466.
- Rodríguez-Delgado, M. M., Alemán-Nava, G. S., Rodríguez-Delgado, J. M., Dieck-Assad, G., Martínez-Chapa, S. O., Barceló, D., & Parra, R. (2015).** Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 74, 21-45.
- Rodríguez-Delgado, M., Orona-Navar, C., García-Morales, R., Hernandez-Luna, C., Parra, R., Mahlknecht, J., & Ornelas-Soto, N. (2016).** Biotransformation kinetics of pharmaceutical and industrial micropollutants in groundwaters by a laccase cocktail from *Pycnoporus sanguineus* CS43 fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 108, 34-41.
- Rodríguez-Núñez, K., Rodríguez-Ramos, F., Leiva-Portilla, D., & Ibáñez, C. (2020).** Brown biotechnology: a powerful toolbox for resolving current and future challenges in the development of arid lands. *SN Applied Sciences*, 2, 1-23.
- Romero, S., Blánquez, P., Caminal, G., Font, X., Sarrà, M., Gabarrell, X., & Vicent, T. (2006).** Different approaches to improving the textile dye degradation capacity of *Trametes versicolor*. *Biochemical Engineering Journal*, 31(1), 42-47.

- Rosales, E., Couto, S. R., & Sanromán, M. A. (2007).** Increased laccase production by *Trametes hirsuta* grown on ground orange peelings. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(5), 1286-1290.
- Ruiz, H. A., Rodríguez-Jasso, R. M., Rodríguez, R., Contreras-Esquivel, J. C., & Aguilar, C. N.(2012).** Pectinase production from lemon peel pomace as support and carbon source in solid-state fermentation column-tray bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 65, 90-95.
- Sharma, R. K. & Arora, D. S. (2010).** Production of lignocellulolytic enzymes and enhancement of in vitro digestibility during solid state fermentation of wheat straw by *Phlebia floridensis*. *Bioresource Technology*, 101(23), 9248-9253.
- Sindhu, R., Pandey, A., & Binod, P. (2015).** Solid-state fermentation for the production of poly (hydroxyalkanoates). *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 29(2), 173-181.
- Singh, A. K., Bilal, M., Iqbal, H. M., Meyer, A. S., & Raj, A. (2021).** Bioremediation of lignin derivatives and phenolics in wastewater with lignin modifying enzymes: Status, opportunities and challenges. *Science of the Total Environment*, 777, 145988.
- Singh, A. P., & Singh, T. (2014).** Biotechnological applications of wood-rotting fungi: A review. *Biomass and Bioenergy*, 62, 198-206.
- Singh, G., & Arya, S. K. (2019).** Utility of laccase in pulp and paper industry: A progressive step towards the green technology. *International Journal of Biological Macromolecules*, 134, 1070-1084.
- Siyah Biyoteknoloji,** Erişim: 05 Aralık 2021
<https://en.wikipedia.org/wiki/Biotechnology>.
- Soetan, K. O. (2008).** Pharmacological and other beneficial effects of antinutritional factors in plants-A review. *African journal of Biotechnology*, 7(25), 4713-4721.
- Son, H., Seo, H., Han, S., Kim, S. M., Khan, M. F., Sung, H. J., Kang, S.H.,Kim,K.J. & Kim, Y. H. (2021).** Extra disulfide and ionic salt bridge improves the thermostability of lignin peroxidase H8 under acidic condition. *Enzyme and Microbial Technology*, 148, 109803.
- Su, J., Fu, J., Wang, Q., Silva, C., & Cavaco-Paulo, A. (2018).** Laccase: a green catalyst for the biosynthesis of poly-phenols. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(2), 294-307.
- Taghizadeh, T., Talebian-Kiakalaieh, A., Jahandar, H., Amin, M., Tarighi, S., & Faramarzi, M. A.(2020).** Biodegradation of bisphenol A by the immobilized laccase on some synthesized and modified forms of zeolite Y. *Journal Of Hazardous Materials*, 386, 121950.
- Tavares, A. P. M., Coelho, M. A. Z., Agapito, M. S. M., Coutinho, J. A. P., & Xavier, A. M.R. B. (2006).** Optimization and modeling of laccase production by *Trametes versicolor* in a bioreactor using statistical experimental design. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 134(3), 233-248.
- Thurston, C. F. (1994).** The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 140(1), 19-26.

- Tišma, M., Žnidaršič-Plazl, P., Vasić-Rački, D., & Zelić, B. (2012).** Optimization of Laccase production by *Trametes versicolor* cultivated on industrial waste. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166(1), 36-46.
- Tišma, M., Žnidaršič-Plazl, P., Šelo, G., Tolj, I., Šperanda, M., Bucić-Kojić, A., & Planinić, M. (2021).** *Trametes versicolor* in lignocellulose-based bioeconomy: State of the art, challenges and opportunities. *Bioresource Technology*, 124997.
- Trametes versicolor,** Erişim: 05 Aralık 2021, [https://en.wikipedia.org/wiki/Trametes_versicolor#/media/File:Trametes_versicolor_G4_\(1\).JPG](https://en.wikipedia.org/wiki/Trametes_versicolor#/media/File:Trametes_versicolor_G4_(1).JPG); <https://ekog.org/2019/11/29/hindi-kuyugu-mantari-trametes-versicolor/>; <https://www.first-nature.com/fungi/trametes-versicolor.php>
- Ulu, A., Birhanli, E., Boran, F., Köytepe, S., Yesilada, O., & Ateş, B. (2020).** Laccase-conjugated thiolated chitosan-Fe₃O₄ hybrid composite for biocatalytic degradation of organic dyes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 150, 871-884.
- Upadhyay, P., Shrivastava, R., & Agrawal, P. K. (2016).** Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase. *3 Biotech*, 6(1), 1-15.
- Wang, F., Hu, J. H., Guo, C., & Liu, C. Z. (2014).** Enhanced laccase production by *Trametes versicolor* using corn steep liquor as both nitrogen source and inducer. *Bioresource Technology*, 166, 602-605.
- Wang, F., Owusu-Fordjour, M., Xu, L., Ding, Z., & Gu, Z. (2020).** Immobilization of laccase on magnetic chelator nanoparticles for apple juice clarification in magnetically stabilized fluidized bed. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 589.
- Wesenberg, D., Kyriakides, I., & Agathos, S. N. (2003).** White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances*, 22(1-2), 161-187.
- Wohlgemuth, R. (2009).** The locks and keys to industrial biotechnology. *New Biotechnology*, 25(4), 204-213.
- Yashveer, S., Singh, V., Kaswan, V., Kaushik, A., & Tokas, J. (2014).** Green biotechnology, nanotechnology and bio-fortification: perspectives on novel environment-friendly crop improvement strategies. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 30(2), 113-126.
- Yesilada, O., Fiskin, K., Yesilada, E. (1995).** The use of white rot fungus *Funalia Trogii* (Malatya) for the decolorization and phenol removal from olive mill wastewater. *Environmental. Technology*. 16,1, 95-100
- Yesilada, O., Yildirim, S. C., Birhanli, E., Apohan, E., Asma, D., & Kuru, F. (2010).** The evaluation of pre-grown mycelial pellets in decolorization of textile dyes during repeated batch process. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(1), 33-39.
- Yeşilada, Ö., Birhanli, E., Ercan, S., & Özmen, N. (2014).** Reactive dye decolorization activity of crude laccase enzyme from repeated-batch culture of *Funalia trogii*. *Turkish Journal of Biology*, 38(1), 103-110.

- Yesilada, O., Birhanli, E., & Geckil, H. (2018).** Bioremediation and decolorization of textile dyes by white rot fungi and laccase enzymes. In *Mycoremediation and environmental sustainability* (pp. 121-153). Springer, Cham.
- Xu, L., Sun, K., Wang, F., Zhao, L., Hu, J., Ma, H., & Ding, Z. (2020).** Laccase production by *Trametes versicolor* in solid-state fermentation using tea residues as substrate and its application in dye decolorization. *Journal of Environmental Management*, 270, 110904.
- Zhang, H., Sun, F., Meng, C., Geng, A., & Gao, Z. (2022).** The synergism of manganese peroxidase and laccase from *Cerrena unicolor* BBP6 in denim dye decolorization and the construction of gene co-expression system in *Pichia pastoris*. *Biochemical Engineering Journal*, 177, 108230.
- Zeng, S., Qin, X., & Xia, L. (2017a).** Degradation of the herbicide isoproturon by laccase-mediator systems. *Biochemical Engineering Journal*, 119, 92-100.
- Zeng, S., Zhao, J., & Xia, L. (2017b).** Simultaneous production of laccase and degradation of bisphenol A with *Trametes versicolor* cultivated on agricultural wastes. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40(8), 1237-1245.

ÖZGEÇMİŞ

Ad- Soyad : Tülay TUTAL

ÖĞRENİM DURUMU:

Lise : 1997, Malatya Hacı Ahmet Akıncı Anadolu Lisesi, Fen Bilimleri Alanı,

Lisans : 2003, Harran Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü,

Tezsiz Yüksek Lisans : 2008, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Öğretmenliği,

SERTİFİKALAR:

1. C Sınıfı İş Güvenliği Uzmanlığı Belgesi, 2013, Çalışma ve Sosyal Güvenlik Bakanlığı
2. B Sınıfı İş Güvenliği Uzmanlığı Belgesi, 2014, Çalışma ve Sosyal Güvenlik Bakanlığı
3. A Sınıfı İş Güvenliği Uzmanlığı Belgesi, 2021, Çalışma ve Sosyal Güvenlik Bakanlığı
4. İlkyardımcı Eğitimci Eğitimi Belgesi, 2019, İnönü Üniversitesi, MALATYA
5. Yüksekte Çalışma Eğitici Eğitimi, 2021, Gedik Üniversitesi, İSTANBUL
6. Yangın Eğitici Eğitimi, 2021, Gedik Üniversitesi, İSTANBUL
7. Patlayıcı Ortamlardan Korunma (ATEX) Mini MBA Eğitimi, 2021, Çalışma ve Sosyal Güvenlik Bakanlığı
8. Kalite yönetim sistemi iç tetkik ve dokümantasyon eğitimi, 2017, Türk Standartları Enstitüsü, MALATYA
9. Gıda güvenliği yönetim sistemi temel eğitimi ve dokümantasyon eğitimi, 2014, Türk Standartları Enstitüsü, MALATYA

STAJLAR:

1. Malatya Kız Lisesi, Biyoloji Öğretmenliği, 2006-2007, Battalgazi/ MALATYA
2. Malatya Anadolu Lisesi, Biyoloji Öğretmenliği, 2006-2007, Battalgazi/MALATYA
3. Malatya Sümer Lisesi, Biyoloji Öğretmenliği, 2007-2008 Yeşilyurt/MALATYA

AKADEMİK DENEYİMLER:

Poster Sunumu:

Tutal, T., & Yeşilada, Ö., (2019).''Yeni İzole Edilmiş *Trametes versicolor*'un Lakkaz Üretim Yeteneğinin Araştırılması'' 20. Uluslararası Katılımlı Biyoteknoloji Kongresi, Başkent Üniversitesi, 10-12 Ekim