

T.C
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YENİ İZOLE EDİLMİŞ BEYAZ ÇÜRÜKÇÜL FUNGUSLARLA KATI
SUBSTRAT FERMENTASYONU KOŞULLARINDA LAKKAZ ÜRETİMİ**

FİLİZ BORAN

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

HAZİRAN, 2013

Tezin Başlığı: Yeni izole edilmiş beyaz çürükçül funguslarla katı substrat fermentasyonu koşullarında lakkaz üretimi

Tezi Hazırlayan: Filiz BORAN

Sınav Tarihi: 27 Haziran 2013

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

Sınav Jüri Üyeleri

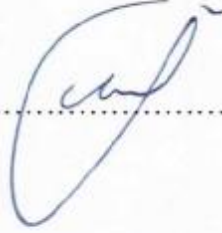
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA
İnönü Üniversitesi



Prof. Dr. Burhan ARIKAN
Çukurova Üniversitesi



Prof. Dr. Murat ÖZMEN
İnönü Üniversitesi



Prof. Dr. Dilek ASMA
İnönü Üniversitesi



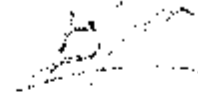
Prof. Dr. Sibel KAHRAMAN
İnönü Üniversitesi



Prof.Dr. Mehmet ALPASLAN
Enstitü Müdürü

ONUR SÖZÜ

Doktora tezi olarak sunduğun “Yeni İzole Edilmiş Beyaz Çürükçül Funguslarla Katı Substrat Fermantasyonu Koşullarında Lakkaz Üretimi” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.



Filiz BORAN

ÖZET

Doktora Tezi

YENİ İZOLE EDİLMİŞ BEYAZ ÇÜRÜKÇÜL FUNGUSLARLA KATI SUBSTRAT FERMENTASYONU KOŞULLARINDA LAKKAZ ÜRETİMİ

Filiz BORAN

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

128 + xiii sayfa

2013

Danışman: Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA

Katı substrat fermentasyonu (KSF), doğal substratların kullanıldığı, serbest suyun olmadığı bir işlemdir. Biyoteknolojik süreçlerde alternatif bir metod olan bu fermentasyon işlemi, yüksek aktivite ve daha düşük maliyetli lakkaz üretimi için lignoselülozlu ham maddeleri kullanmaktadır. Organizmalar bu katı substratları hem bağlanma yeri hem de besin olarak kullanmaktadır. Biyolojik süreçlerde lignoselülozlu ham maddelerin kullanımı, çevresel problemlerin çözümüne yardımcı olabilmektedir.

Bu çalışmada, yeni izole edilmiş olan *Funalia trogii*, *Ganoderma lucidum* ve *Trametes versicolor*'ın lakkaz üretimi KSF sürecinde araştırıldı. Farklı faktörlerin (katı substrat, sıcaklık, pH, nem içeriği ve indükleyiciler) lakkaz üretimine etkisi test edildi. Test edilen lignoselülozlu katı substratlar arasından buğday kepeği, lakkaz üretimi için en iyi katı substrat olarak belirlendi. Fungusların lakkaz üretimi üzerine soya unu, ağaç yaprakları, maya özütü ve bakırın etkisi de araştırıldı. Yüksek lakkaz aktivitesi için en iyi ortam, bakır ilave edilmiş buğday kepeği+soya unu ortamıdır. Optimum KSF koşulları, %75 nem içeriği, 30°C ve pH 5-6'dır.

KSF cam tava tipi fermentör kullanılarak da yürütüldü ve en yüksek lakkaz aktiviteleri *F.trogii*, *G.lucidum* ve *T.versicolor* için sırasıyla 22469±2622, 2008±826 ve 2649±810 U/L olarak elde edildi.

Ayrıca, bakır ilave edilmiş olan buğday kepeği+soya unu ortamlarında üretilen *F.trogii*, *G.lucidum* ve *T.versicolor*'dan elde edilen ham lakkazın aktivite ve kararlılığı üzerine pH ve sıcaklığın etkisi test edildi. Bu ham lakkazlar, özellikle pH 2.5-3.5'da yüksek aktivite gösterdi. Yüksek sıcaklıkta da kararlı oldukları gözlemlendi.

G.lucidum ham lakkazının Remazol Brilliant Blue R (RBBR) renk giderimi aktivitesi, optimum koşullar altında bu tekstil boyasının rengini (400mg/L) 20 dakikada %61 giderebileceğini gösterdi.

Sonuçlar, KSF'nin lakkaz üretimi için uygun olduğunu ve optimum koşullar altında bu funguslarla yüksek miktarda lakkaz elde edilebileceğini göstermektedir. En iyi uygulama şartlarını anlamak için ham lakkazların aktivite ve kararlılık profillerini belirlemek önemlidir.

ANAHTAR KELİMELEER: Katı substrat fermentasyonu, *Funalia trogii*, *Ganoderma lucidum*, *Trametes versicolor*, lignoselülozlu ham maddeler, ham lakkaz, renk giderimi

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

LACCASE PRODUCTION BY NEWLY ISOLATED WHITE ROT FUNGI UNDER SOLID SUBSTRATE FERMENTATION CONDITIONS

Filiz BORAN

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

128 + xiii pages

2013

Supervisor: Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA

Solid substrate fermentation (SSF) is a process occurring in the absence of free water, using natural substrates. This fermentation method which is an alternative method for biotechnologic processes uses lignocellulosic raw materials as solid substrates for laccase production with high activity and lower cost. Organisms utilize these solid substrates both as an attachment place and nutrition. Using lignocellulosic raw materials in bioprocesses may help to solve environmental problems.

In this study, laccase production by newly isolated *Funalia trogii*, *Ganoderma lucidum* and *Trametes versicolor* was investigated during SSF process. The effect of different factors (solid substrate, temperature, pH, moisture content and inducers) on laccase production was tested. Among the tested lignocellulosic solid substrates wheat bran was determined the best solid substrate for laccase production. The effect of soy flour, tree leaves, yeast extract and copper on laccase production of fungi was also investigated. Wheat bran+soy flour medium supplemented with copper was the best medium for high laccase production. Optimum SSF conditions were 75% moisture content, 30°C and pH 5-6.

SSF was also conducted using glass tray fermentor and high laccase activities as 22469±2622, 2008±826 and 2649±810 U/L were obtained for *F.trogii*, *G.lucidum* and *T.versicolor*, respectively.

The effect of pH and temperature on crude laccase activity and stability, obtained from *F.trogii*, *G.lucidum* and *T.versicolor* grown on copper supplemented wheat bran+soy flour media were also tested. These crude laccases showed high activity especially at pH 2.5-3.5. They gave the highest activity in high temperatures. They were also detected as thermostable at high temperatures.

Remazol Brilliant Blue R (RBBR) decolorization activity of crude laccase from *G.lucidum* showed that it could decolorize this textile dye (400 mg/L) as 61% within 20 minutes under optimal conditions.

Results showed that, SSF has a potential for the laccase production and high amount of laccases could be obtained by these fungi under optimum conditions. It is important to determine the activity and stability profiles of these crude laccases for understanding the best application conditions.

KEYWORDS: Solid substrate fermentation, *Funalia trogii*, *Ganoderma lucidum*, *Trametes versicolor*, lignocellulosic raw materials, crude laccase, dye decolorization

TEŞEKKÜR

Akademik hayatım boyunca engin bilgisini, anlayışını, alçak gönüllüğünü hep örnek aldığım ve alacağım, çalışmamın her aşamasında yardım ve öneri ve her zaman sağladığı destek ve güleryüzü için danışman hocam Sayın Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA'ya;

Çalışmam boyunca önerileri ve hep içten destekleriyle bana yardımcı olan Tez izleme komitesi üyeleri değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Dilek ASMA ve Sayın Prof. Dr. Sibel KAHRAMAN'a,

Bu tez çalışmasını 2010/118 no'lu proje olarak destekleyen İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi'ne,

Tezin elektroforez çalışması aşamasında bana yardımcı olan Arş. Grv. Dr. Emre BİRHANLI'ya, desteğinden dolayı sevgili arkadaşım Arş. Grv. Aygöl KILIÇ KARABULUT'a ve deneysel aşamalarda bana yardımcı olan sevgili Sinem ERCAN'a,

Çalışmalarım boyunca hep yanımda hissettiğim, beni hem iyi hem zor günlerimde hiç yalnız bırakmayan sevgili arkadaşlarım Öğr. Grv. İdil AÇARI ve Elif ÖZBEY'e,

Ve...

Tüm hayatım boyunca olduğu gibi tez sürecimde de hep yanımda olan ve desteklerini, bana olan güvenlerini hep üzerimde hissettiğim, varlıklarıyla sevgileriyle bana güç veren canım annem Güner KURU ve canım babam Mustafa KURU'ya,

Varlığıyla beni güçlü kılan, bana olan güveni ve desteğiyle her zaman yanımda olan canım kardeşim Burak KURU'ya,

Ömrünü ömrüme katıp, eşsiz ve sonsuz sevgisi, güveni ve desteğiyle hep yanımda olan canım eşim Mehmet Murat BORAN'a,

en içten dileklerimle teşekkür ederim...

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Katı Substrat Fermentasyonu.....	1
1.1.1. KSF sürecinde nem miktarının önemi.....	3
1.1.2. KSF sürecinde pH'nın önemi.....	3
1.1.3. KSF sürecinde sıcaklığın önemi.....	3
1.1.4. KSF sürecinde substratın önemi.....	4
1.1.5. KSF sürecinde kullanılan mikroorganizmalar.....	5
1.1.6. Katı substrat fermentasyonu uygulamaları.....	8
1.1.7. Katı substrat fermentasyonu ile enzim üretimi.....	11
1.1.8. KSF'nin avantajları ve dezavantajları.....	12
1.2. Lakkaz Enzimi.....	14
1.2.1. Lakkaz enziminin özellikleri.....	15
1.2.2. Lakkaz enziminin endüstriyel ve biyoteknolojik alanlarda kullanımı.....	16
1.3. Beyaz Çürükçül Funguslar.....	17
1.3.1. <i>Funalia troglia</i>	20
1.3.2. <i>Ganoderma lucidum</i>	21
1.3.3. <i>Trametes versicolor</i>	22
1.4. Boyar Maddeler.....	23
1.4.1. Boyaların sınıflandırılması.....	23
1.4.2. Kullanım yada uygulama alanlarına göre bazı boyalar.....	26
1.4.2.1. Reaktif boyalar.....	26
1.4.2.2. Dispers boyalar.....	26
1.4.2.3. Sabit (vat) boyalar.....	26
1.4.2.4. Kükürt boyalar.....	26
1.4.2.5. Katyonik (temel) boyalar.....	26
1.4.2.6. Asit boyalar.....	27
1.4.2.7. Solvent boyalar.....	27
1.4.3. Tekstik atık sularındaki boyar maddelerin önemi.....	27
1.4.4. Renk giderimi yöntemleri.....	28
1.4.5. Biyolojik renk giderim yöntemleri.....	29
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	33
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	43
3.1. Çalışmada Kullanılan Funguslar.....	43
3.2. Çalışmada Kullanılan Fungusların Üretimi ve Devamlılığının Sağlanması.....	43
3.3. Çalışmada Kullanılacak Stok Fungus Kültürlerinin Hazırlanması... ..	43
3.4. Çalışmada Kullanılan Nemlendirme Sıvılarının Hazırlanması.....	43
3.5. Çalışmada Kullanılan Katı Substratlar.....	44
3.6. Katı Substrat Ortamının Hazırlanması, Ekim ve Üretim.....	44

3.6.1.	Erlende katı substrat uygulamaları.....	44
3.6.2.	Tava tipi fermentörde katı substrat uygulamaları.....	45
3.7.	Agar Plaklarında Lakkaz Üretiminin Gösterilmesi.....	45
3.8.	Çeşitli Koşulların KSF' de Lakkaz Üretimine Etkisi.....	45
3.8.1.	Sıcaklığın etkisi.....	45
3.8.2.	pH'nın etkisi.....	45
3.8.3.	Nem miktarının etkisi.....	46
3.9.	İndükleyicilerin Lakkaz Üretimine Etkisinin Belirlenmesi.....	46
3.9.1.	Bakırın etkisi.....	46
3.9.2.	Maya özütünün etkisi.....	46
3.9.3.	Soya ununun etkisi.....	46
3.9.4.	Yaprığın etkisi.....	46
3.9.5.	Melasın etkisi.....	47
3.9.6.	Bakır içeren melasın etkisi.....	47
3.10.	Lakkaz Aktivitesinin Saptanması.....	47
3.11.	Ham Lakkaz Enziminin Aktivitesine Sıcaklık ve pH' nın Etkisinin Saptanması.....	47
3.11.1.	Ham lakkaz aktivitesine sıcaklığın etkisi.....	47
3.11.2.	Ham lakkaz aktivitesine pH'nın etkisi	48
3.12.	Ham Lakkaz Enziminin Kararlılığına Sıcaklık ve pH'nın Etkisinin Saptanması.....	48
3.12.1	Sıcaklığın ham lakkaz enziminin kararlılığına etkisi.....	48
3.12.2.	pH' nın ham lakkaz enziminin kararlılığına etkisi.....	48
3.13.	<i>Ganoderma lucidum</i> Ham Lakkaz Enzimi ile Renk Giderimi Çalışmaları.....	48
3.13.1.	Çalışmada kullanılan boyar madde.....	48
3.13.2.	Çalışmada kullanılan stok boyar maddenin hazırlanması.....	49
3.13.3.	Başlangıç pH'sının renk giderimine etkisi.....	49
3.13.4.	Sıcaklığın renk giderimine etkisinin saptanması.....	49
3.13.5.	Zamana bağlı renk gideriminin saptanması.....	49
3.13.6.	Ham enzim miktarının renk giderimine etkisinin saptanması.....	50
3.13.7.	Boya konsantrasyonunun renk giderimine etkisinin saptanması	50
3.14.	Doğal Jel Elektroforezi Uygulaması.....	50
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI.....	51
4.1.	Çalışmada Kullanılan Fungusların Sabouroud Dekstroz Agar Ortamında Lakkaz Aktiviteleri.....	51
4.2.	Katı Substrat Fermentasyonu Ortamlarında Optimizasyon Çalışmaları.....	52
4.2.1.	Farklı katı substrat içeren ortamlarda fungusların lakkaz üretimi....	52
4.2.2.	İnkübasyon sıcaklığının fungusların lakkaz üretimine etkisi.....	57
4.2.3.	Başlangıç pH'sının fungusların lakkaz üretimine etkisi.....	59
4.2.4.	Nemlendirme oranının KSF sürecinde lakkaz aktivitesi üzerine etkisi.....	60
4.3.	İndükleyicilerin ve Ek Faktörlerin Lakkaz Üretimine Etkisi.....	61
4.3.1.	Soya unu ilavesinin lakkaz üretimine etkisi.....	61
4.3.2.	Yaprak eklenmesinin KSF sürecinde lakkaz aktivitesi üzerine etkisi.....	62
4.3.3.	Maya özütü ilavesinin KSF sürecinde lakkaz aktivitesi üzerine etkisi.....	63
4.3.4.	Bakırın lakkaz üretimine etkisi.....	64

4.3.5.	Melasın KSF sürecinde lakkaz üretimine etkisi	65
4.3.6.	Soya unu ve bakır içeren katı substrat ortamlarında fungusların lakkaz üretimi.....	66
4.3.7.	Nemlendirme sıvısı olarak bakır eklenmiş melasın kullanıldığı çalışmalarda fungusların lakkaz üretimi.....	68
4.4.	Tava Tipi Fermentör Çalışmaları.....	70
4.4.1.	Distile su ile nemlendirilmiş katı substrat ortamlarında tava tipi fermentör uygulamaları.....	70
4.4.2.	Bakır içeren distile su ile nemlendirilmiş katı substrat ortamlarında tava tipi fermentör uygulamaları.....	71
4.4.3.	Melas ile nemlendirilmiş katı substrat kullanılan tava tipi fermentörde uygulamaları.....	72
4.5.	Ham Lakkaz Enziminin Aktivite Çalışmaları.....	73
4.5.1.	Sıcaklığın ham lakkaz aktivitesine etkisi.....	73
4.5.2.	pH'nın lakkaz aktivitesine etkisi.....	75
4.5.3.	Enzim aktivitesine pH ve sıcaklığın birlikte etkisi.....	77
4.6.	Ham Lakkaz Enziminin Kararlılık Çalışmaları.....	79
4.6.1.	Sıcaklığın enzim kararlılığına etkisi.....	79
4.6.2.	pH'nın enzim kararlılığına etkisi.....	84
4.7.	Ham Lakkaz Enzimi ile Renk Giderim Çalışmaları.....	88
4.7.1.	Başlangıç pH'sının renk giderimine etkisi.....	88
4.7.2.	Sıcaklığın renk giderimine etkisi.....	88
4.7.3.	Zamanın renk giderimine etkisi.....	90
4.7.4.	Ham enzim miktarının renk giderimine etkisi.....	90
4.7.5.	Boya konsantrasyonunun renk giderimine etkisi.....	91
4.8.	Poliakrilamid Jel Elektroforezi Çalışmaları.....	92
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ.....	93
6.	KAYNAKLAR.....	107
7.	ÖZGEÇMİŞ.....	128

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Substrat üzerinde filamentli fungusların üremesi ve spordan fungal biyokütleye doğru gelişimi	6
Şekil 1.2.	<i>Trametes versicolor</i> lakkazının üç boyutlu yapısı (D1: Domain 1, D2: Domain 2, D3: Domain 3, Cu: Bakır).....	16
Şekil 1.3.	Odunun hücre duvar bileşenlerinin şematik modeli, selüloz (S), hemiselüloz (H) ve lignin (L).....	18
Şekil 1.4.	<i>Funalia trogii</i> 'nin odundaki görüntüsü.....	21
Şekil 1.5.	<i>Ganoderma lucidum</i> 'un odundaki görüntüsü.....	22
Şekil 1.6.	<i>Trametes versicolor</i> 'ın odundaki görüntüsü.....	23
Şekil 3.1.	RB 19'un kimyasal yapısı.....	49
Şekil 4.1.	ABTS içeren SDA ortamlarında <i>F.trogii</i> (a), <i>G. lucidum</i> (b) ve <i>T. versicolor</i> 'da (c) lakkaz varlığı.....	52
Şekil 4.2.	Buğday kepeği ortamının makroskobik (a) ve SEM görüntüsü (b), buğday kepeği ortamında üretilmiş <i>F.trogii</i> 'nin makroskobik (c) ve SEM görüntüsü (d).....	53
Şekil 4.3.	Buğday kepeği ortamının makroskobik (a) ve SEM görüntüsü (b), buğday kepeği ortamında üretilmiş <i>G.lucidum</i> 'un makroskobik (c) ve SEM görüntüsü (d).....	54
Şekil 4.4.	Buğday kepeği ortamının makroskobik (a) ve SEM görüntüsü (b), buğday kepeği ortamında üretilmiş <i>T.versicolor</i> 'ın makroskobik (c) ve SEM görüntüsü (d).....	55
Şekil 4.5.	Katı substrat fermentasyonu sürecinde <i>F. trogii</i> ile 5. günde elde edilen lakkaz aktivite değerleri.....	56
Şekil 4.6.	Katı substrat fermentasyonu sürecinde <i>G.lucidum</i> ile 5. günde elde edilen lakkaz aktivite değerleri.....	56
Şekil 4.7.	Katı substrat fermentasyonu sürecinde <i>T.versicolor</i> ile 5. günde elde edilen lakkaz aktivite değerleri.....	57
Şekil 4.8.	İnkübasyon sıcaklığının distile su ile nemlendirilmiş buğday kepeği ortamında beş gün üretilen fungusların lakkaz üretimine etkisi.....	58
Şekil 4.9.	İnkübasyon sıcaklığının distile su ile nemlendirilmiş kozalak ortamında beş gün üretilen fungusların lakkaz üretimine etkisi.....	58
Şekil 4.10.	Ortam pH'sının distile su ile nemlendirilmiş buğday kepeği ortamında beş gün üretilen fungusların lakkaz üretimine etkisi.....	59
Şekil 4.11.	Ortam pH'sının distile su ile nemlendirilmiş kozalak ortamında beş gün üretilen fungusların lakkaz üretimine etkisi.....	60
Şekil 4.12.	Nemlendirmenin buğday kepeği ortamında beş gün üretilen fungusların lakkaz üretimine etkisi.....	61
Şekil 4.13.	Distile su ile nemlendirilmiş buğday kepeği ve soya unu içeren ortamlarda fungusların 5 gün inkübasyon sonrası lakkaz aktiviteleri.....	62
Şekil 4.14.	Distile su ile nemlendirilmiş buğday kepeği ve yaprak içeren ortamlarda fungusların 5 gün inkübasyon sonrası lakkaz aktiviteleri.....	63
Şekil 4.15.	Maya özütü içeren distile su ile nemlendirilmiş katı substrat	

	ortamlarında lakkaz aktivitesi.....	64
Şekil 4.16.	Bakır içeren distile su ile nemlendirilmiş katı ortamlarda lakkaz aktivitesi.....	65
Şekil 4.17.	Melas ile nemlendirilmiş buğday kepeği içeren ortamlarda lakkaz aktiviteleri.....	66
Şekil 4.18.	5mM bakır içeren distile su ile nemlendirilmiş buğday kepeği+soya unu katı ortamlarında lakkaz aktivitesi.....	67
Şekil 4.19.	10mM bakır içeren distile su ile nemlendirilmiş buğday kepeği+soya unu katı ortamlarında lakkaz aktivitesi.....	68
Şekil 4.20.	%10 Melas ile nemlendirilmiş buğday kepeği+soya unu katı ortamlarında elde edilen lakkaz aktiviteleri.....	69
Şekil 4.21.	10mM bakır içeren %10'luk Melas ile nemlendirilmiş Buğday kepeği+ soya unu katı ortamlarında elde edilen lakkaz aktiviteleri.....	69
Şekil 4.22.	Tava tipi fermentörde üretilmiş <i>G.lucidum</i> kültürünün görüntüsü.....	70
Şekil 4.23.	Distile su ile nemlendirilmiş buğday kepeği+soya unu içeren katı substrat ortamlarında tava tipi fermentörde üretilen kültürlerinin lakkaz aktiviteleri.....	71
Şekil 4.24.	10mM bakır içeren distile su ile nemlendirilmiş buğday kepeği+soya unu içeren katı substrat ortamlarında tava tipi fermentörde üretilen kültürlerinin lakkaz aktiviteleri	72
Şekil 4.25.	%10'luk melas ile nemlendirilmiş buğday kepeği+soya unu içeren katı substrat ortamlarında tava tipi fermentörde üretilen kültürlerinin lakkaz aktiviteleri.....	73
Şekil 4.26.	10mM bakır içeren distile su ile nemlendirilmiş buğday kepeği+soya unu besiyerinde üretilmiş <i>F.trogii</i> kültürlerinden elde edilmiş ham enzim kaynağının farklı sıcaklıklardaki lakkaz aktivite değerleri.....	74
Şekil 4.27.	10mM bakır içeren distile su ile nemlendirilmiş buğday kepeği+soya unu besiyerinde üretilmiş <i>G.lucidum</i> kültürlerinden elde edilmiş ham enzim kaynağının farklı sıcaklıklardaki lakkaz aktivite değerleri.....	74
Şekil 4.28.	10mM bakır içeren distile su ile nemlendirilmiş buğday kepeği+soya unu besiyerinde üretilmiş <i>T.versicolor</i> kültürlerinden elde edilmiş ham enzim kaynağının farklı sıcaklıklardaki lakkaz aktivite değerleri.....	75
Şekil 4.29.	10mM bakır içeren distile su ile nemlendirilmiş buğday kepeği+soya unu besiyerinde üretilmiş <i>F.trogii</i> kültürlerinden elde edilmiş ham enzim kaynağının farklı pH'lardaki lakkaz aktivite değerleri.....	76
Şekil 4.30.	10mM bakır içeren distile su ile nemlendirilmiş buğday kepeği+soya unu besiyerinde üretilmiş <i>G.lucidum</i> kültürlerinden elde edilmiş ham enzim kaynağının farklı pH'lardaki lakkaz aktivite değerleri.....	76
Şekil 4.31.	10mM bakır içeren distile su ile nemlendirilmiş buğday kepeği+soya unu besiyerinde üretilmiş <i>T.versicolor</i> kültürlerinden elde edilmiş ham enzim kaynağının farklı pH'lardaki lakkaz aktivite değerleri.....	77

Şekil 4.32.	10mM bakır içeren distile su ile nemlendirilmiş buğday kepeği+soya unlu besiyerinde üretilmiş <i>F.trogii</i> kültürlerinden elde edilmiş ham enzim kaynağının farklı pH ve sıcaklıklarda lakkaz aktivite değerleri.....	78
Şekil 4.33.	10mM bakır içeren distile su ile nemlendirilmiş buğday kepeği+soya unu besiyerinde üretilmiş <i>G.lucidum</i> kültürlerinden elde edilmiş ham enzim kaynağının farklı pH ve sıcaklıklarda lakkaz aktivite değerleri.....	78
Şekil 4.34.	10mM bakır içeren distile su ile nemlendirilmiş buğday kepeği+soya unu besiyerinde üretilmiş <i>T.versicolor</i> kültürlerinden elde edilmiş ham enzim kaynağının farklı pH ve sıcaklıklarda lakkaz aktivite değerleri.....	79
Şekil 4.35.	<i>F.trogii</i> 'nin ham lakkaz enziminin 4-20°C (a), 30-40°C (b), 50-60°C (c), 70-80°C (d) aralıklarında zamana bağlı sıcaklık kararlılığı.....	80
Şekil 4.36.	<i>G.lucidum</i> 'un ham lakkaz enziminin 4-20°C (a), 30-40°C (b), 50-60°C (c), 70-80°C (d) aralıklarında zamana bağlı sıcaklık kararlılığı.....	82
Şekil 4.37.	<i>T.versicolor</i> 'ın ham lakkaz enziminin 4-20°C (a), 30-40°C (b), 50-60°C (c), 70-80°C (d) aralıklarında zamana bağlı sıcaklık kararlılığı.....	83
Şekil 4.38.	<i>F.trogii</i> 'nin ham lakkaz enziminin pH 3, 4, 5 (a) pH 5, 6, 7, 8, 9 (b) pH kararlılığı.....	85
Şekil 4.39.	<i>G.lucidum</i> 'un ham lakkaz enziminin pH 3, 4, 5 (a) pH 5, 6, 7, 8, 9 (b) pH kararlılığı.....	86
Şekil 4.40.	<i>T.versicolor</i> 'ın ham lakkaz enziminin pH 3, 4, 5 (a) pH 5, 6, 7, 8, 9 (b) pH kararlılığı.....	87
Şekil 4.41.	Ham lakkaz enziminin farklı pH'larda RB 19 renk giderim aktivitesi.....	88
Şekil 4.42.	Ham lakkaz enziminin farklı sıcaklıklarda 40°C (a), 50°C (b), 60°C (c) RB 19 renk giderim aktivitesi.....	89
Şekil 4.43.	Ham lakkaz enziminin zamana bağlı RB 19 renk giderim aktivitesi.....	90
Şekil 4.44.	Ham lakkaz enzim miktarının RB 19'un renk giderimine etkisi.....	91
Şekil 4.45.	Boyar madde konsantrasyonunun renk giderimine etkisi.....	92
Şekil 4.46.	<i>F. trogii</i> (1), <i>G.lucidum</i> (2) ve <i>T. versicolor</i> (3) kültür filtratlarının ham lakkaz enzim zimogramları.....	92

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.	KSF’de kullanılan katı substratlar.....	5
Çizelge 1.2.	KSF işlemlerinde kullanılan bazı mikroorganizmalar ve uygulama alanları.....	7
Çizelge 1.3.	KSF’nin uygulama alanları.....	10
Çizelge 1.4.	KSF teknikleri ile üretilen bazı enzimler.....	11
Çizelge 1.5.	Katı ve sıvı fermentasyonun karşılaştırılması.....	13
Çizelge 1.6.	Lakkaz enziminin bazı uygulama alanları.....	17
Çizelge 1.7.	Beyaz çürükçül fungusların kullanım alanları.....	20
Çizelge 1.8.	Renk İndeksine (RI) göre boyaların kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması.....	24
Çizelge 1.9.	Renk indeksinde kullanım ve uygulama alanlarına göre boyaların sınıflandırılması.....	25
Çizelge 1.10.	Renk gideriminde kullanılan metodlar.....	28
Çizelge 1.11.	Fiziksel ve kimyasal işlemlerde renk gideriminde uygulama metodları.....	29
Çizelge 1.12.	Mikroorganizmalarla renk giderimi.....	31
Çizelge 5.1.	KSF sürecinde <i>F. trogii</i> , <i>G.lucidum</i> ve <i>T.versicolor</i> ile 5. günde elde edilen lakkaz aktivite değerleri (U/L).....	94
Çizelge 5.2.	Yapılan çeşitli araştırmalarda, çeşitli fungusların KSF sürecinde üretimi sonucu elde edilen lakkaz aktivite değerleri.....	97

SİMGELER VE KISALTMALAR

KSF	Katı Substrat Fermentasyonu
KFF	Katı Faz Fermentasyonu
SF	Sıvı Fermentasyon
RBBR (RB 19)	Remazol Brilliant Blue R
Cu	Bakır
<i>F.trogii</i>	<i>Funalia trogii</i>
<i>G.lucidum</i>	<i>Ganoderma lucidum</i>
<i>T.versicolor</i>	<i>Trametes versicolor</i>
ATCC	American Type Culture Collection
ABTS	2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazolin-6-sülfonik asit
U	Ünite
U/L	Ünite/litre
SDA	Sabouraud dekstrozu agar
SEM	Taramalı elektron mikroskopu
mM	Milimolar
rpm	Dakikada dönme hızı
BOİ	Biyolojik Oksijen İstemi
KOİ	Kimyasal Oksijen İstemi
RI	Renk İndeksi
PHA	Polihidroksi alkanat
PCB	Poliklorlu bifeniller
TNT	2,4,6-tr, n, trotoluen
DDT	1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl) ethane

1. GİRİŞ

Fermentasyon işlemleri, temel olarak sıvı fermentasyon (SF) ve katı substrat fermentasyonu (KSF) olmak üzere 2 gruba ayrılabilir. SF, mikroorganizmaların besin içeren sıvı ortamlarda üretimine dayalı bir işlem iken, KSF; suyun olmadığı yada çok az olduğu katı partiküller üzerinde mikrobiyal üreme ve ürün oluşumunun gerçekleştiği işlemdir (Martins vd., 2011). KSF ve SF’de fungal üreme; farklı yüzey durumu, nem içeriği ve substratın kimyasal bileşimi bakımından farklılık göstermektedir (Winqvist vd., 2008).

Endüstriyel uygulamalarda sıvı kültür tekniklerinin kullanımı fazladır. Fakat sıvı ortam, fungusların adapte olduğu doğal çevresinden farklıdır (Raimbault ve Alazard, 1980). KSF ise mikroorganizmaların doğal habitatlarına benzediğinden önemli ürünlerin üretiminde tercih edilebilir bir uygulamadır (Singhania vd., 2009). Birçok enzim SF teknikleri ile üretilmektedir. Bununla birlikte, son yıllarda pekçok enzimin üretiminde, KSF tekniğinin kullanımına yönelik ilgi artmaktadır (Rodríguez Couto ve Sanromán, 2005a).

Bu doğal yöntem, kompostlama ve ambarda saklama gibi doğal mikrobiyolojik işlemleri yansıttığından endüstriyel uygulamalarda istenilen ürünün üretiminde kullanılabilir (Rodríguez Couto ve Sanromán, 2006a). Aynı zamanda, KSF’de lignosellülozlu hammaddeler/atıklar katı substrat olarak kullanılabildiğinden uygulamanın maliyeti açısından ve bu tip substratların oluşturabileceği çevre kirliliğinin azaltılması açısından da önemlidir. Az miktarda su kullanımı ve sonucunda da daha az atık su çıkışı sayesinde de çevre kirliliği de azaltılmış olmaktadır.

1.1. Katı Substrat Fermentasyonu

Katı substrat fermentasyonu (KSF), katı matriks gerektiren ve serbest suyun olmadığı yada çok az olduğu ortamda gerçekleşen fermentasyon işlemi olarak ifade edilir (Singhania vd., 2009). Başka bir deyişle, KSF lignoselülozik hammaddenin biyolojik dönüşümünü ifade eder (Sharma ve Arora, 2010).

KSF terimi, suda çözünemeyen materyallerin mikrobiyal üremede kullanıldığı uygulamalarda kullanılır ve bu tip fermentatif işlemlerde, su miktarı

mikroorganizmaların ürettiği katı yatağın doyma kapasitesini aşmamalıdır (Aguilar vd., 2008). Bu işlem Asya ülkelerinde eski zamanlardan beri bilinmektedir. Fakat batı ülkelerinde 1940'lerden sonra önem kazanmaya başlamıştır. Bunun sebebi ise penisilinin sıvı fermentasyon tekniği ile bulunması ve birçok bileşiğin de SF tekniği ile üretilmeye başlamasıdır (Rodríguez Couto ve Sanromán, 2005a). KSF, geleneksel fungal fermentasyon teknolojilerinden ve hatta eski yiyecek fermentasyonu metodlarından yararlanır ve doğal ürünlerin üretiminde yeni biyolojik işlemlerin gelişimi için olanak sağlar (Bigelis vd., 2006).

KSF işlemlerinde katı materyal olarak, tarımsal veya endüstriyel atıklardan (buğday kepeği ya da samanı, şeker kamışı atığı, kahve atığı, üzüm atıkları gibi) substratlar veya hareketsiz materyaller (iyon değişimi reçinesi, poliüretan köpük) kullanılabilir (Aguilar vd., 2008). Bu nedenle, KSF aynı zamanda katı faz fermentasyonu olarak da tanımlanmaktadır. Fakat bu işlemlerde yaygın olarak istenilen ürünün oluşumuna ve üretici mikroorganizmanın üremesine uygun olarak tarım veya yiyecek endüstrisinin yan ürünleri veya atık ürünler kullanılır (Mitchell vd., 2006). Doğal kaynakların etkin kullanımına yönelik evrensel bir ilgi bulunmaktadır. Çünkü tarım endüstrisi yan ürünlerinin direkt çevreye boşaltılması çevre kirliliğinin önemli bir nedenidir (Ajila vd., 2011).

Biyoteknolojik uygulamalar açısından da bakıldığında düşük maliyetle yüksek miktarda enzim üretimi için en uygun yaklaşımlardan biri lignoselülozlu hammaddeler/atıkları kullanmaktır. Bu atıklardan bazıları önemli konsantrasyonlarda çözünebilen karbohidrat ve ligninolitik enzimlerin etkin bir şekilde üretimini arttıran enzim sentezi indükleyicilerini içermektedir (Moldes vd., 2004; Elisashvili vd., 2008b).

Sıcaklık, pH, nem miktarı, oksijen seviyesi ve besinlerin konsantrasyonu KSF'de mikrobiyal üreme ve ürün oluşumunu etkilemektedir. Sıvı kültürlerde besin ve ürün çözeltilerinin, ve mikrobiyal hücre süspansiyonlarının homojen olmasından dolayı çevresel kontrol daha basittir. Karıştırma, ısı değişimi, oksijen transferi, nem kontrolü, pH ayarlamaları ve ürün ve besin seviyeleri ise KSF gibi heterojen kültürlerde ciddi problemlere neden olur.

1.1.1. KSF sürecinde nem miktarının önemi

KSF, serbest suyun olmadığı, katı substratlar üzerinde mikroorganizmaların üretildiği bir uygulamadır. Bu uygulamada, katı substratı nemlendirmek için gerekli olan su miktarı oldukça önemlidir. KSF işlemlerinin SF'ye göre bir farkı da substratın nem içeriğinin düşük olmasıdır (Oriol vd., 1988). KSF'de mikrobiyal üreme için gerekli olan nem, substrat tarafından absorbe edilmiş veya katı matriksle kompleks oluşturmuş durumdadır (Krishna, 2005). Eğer su miktarı yetersiz olursa çözünen ve gazın etkin şekilde difüzyonu gerçekleşmez, hücre metabolizması yavaşlar ya da durabilir (Gervais ve Molin, 2003). Suyun hücre içi veya hücre dışı miktarı bazı enzimlerin fonksiyonel özelliklerini sürdürmelerine izin vermeyecek miktarda ise, bu enzimlerin inaktif olmaları hücrenin metabolik zincirinde dengesizliğe neden olur (Gervais ve Molin, 2003). Aynı şekilde, eğer su stresi ile indüklenen su transferi plazmik membranın mekanik yapısının denatürasyonuna neden olursa membran boyunca geçirgenliğin ve taşınımın tüm özellikleri etkilenebilir ve bu durum da hücrelerin etkilenebilmesine neden olur.

Funguslar üremeleri için nemli çevreyi tercih eder. Optimum nem seviyesi önemlidir, çünkü düşük nem; besin difüzyonunu, mikrobiyal üremeyi, enzim kararlılığını ve substrata ulaşılabilirliği azaltır. Yüksek nem seviyeleri ise partiküllerin bir araya yığılmasına, gaz transferinin sınırlanmasına ve bakterilerle rekabete neden olur (Krishna, 2005).

1.1.2. KSF sürecinde pH'nın önemi

KSF'de önemli olan diğer bir faktör pH'dır ve metabolik aktivitelere bağlı olarak değişmektedir. Her mikroorganizma, üremesi ve aktivitesi için optimum pH aralığına sahiptir. Filamentli funguslar optimum olarak pH 3.8-6.0 arasında iyi ürerler. KSF de pH'yı saptamak zordur. Çünkü katı materyallerde uygun alet ve elektrodlar olmadığından dolayı pratik olarak pH'yı belirlemek zordur (Krishna, 2005).

1.1.3. KSF sürecinde sıcaklığın önemi

KSF performansını etkileyen fiziksel değişkenlerden en önemlisi sıcaklıktır. Çünkü, enzim veya metabolit üretimi genellikle sıcaklığa duyarlıdır. Funguslar

optimum 20 ile 55°C sıcaklık değerleri aralığında üreyebilirler. KSF’de sıcaklık kontrolü de oldukça zordur. Çünkü, geleneksel ısı yayılımı veya iletken soğutucu aletler katı substratların zayıf termal iletkenliğinden dolayı metabolik ısının dağılımı için yetersizdir. Üstelik, ısı oluşumu, direkt olarak sistemdeki metabolik aktivitenin seviyesi ile orantılıdır (Krishna, 2005). KSF’de düşük nem içeriği ve organik materyallerin termal özellikleri ısı transferinde zorluklar yaratmaktadır (Saucedo-Castañeda vd., 1990).

1.1.4. KSF sürecinde substratın önemi

KSF sistemleri 2 tiptir. Bunlardan ilki en yaygın kullanılan sistem olup üretim doğal materyal üzerinde gerçekleşir. İkincisi ise daha az kullanılan bir sistemdir ve bu sistemde kullanılan katı yüzey inert bir yüzeydir. İlk sistem hem destek hem de besin kaynağı olan doğal materyalleri kullanır ve bu materyaller nişasta veya lignoselüloza dayalı tarımsal ürünler veya tarım endüstrisi kaynaklarıdır. İkinci tip katı sistemde ise, kullanılan katı destek organizmalar için yalnızca tutunma yüzeyi olarak işlev görür (Krishna, 2005). Yani, KSF’de kullanılan substratlar temelde tarımsal veya tarım endüstrisi yan ürünlerinden oluşan heterojen substratlar veya diğer lignoselülozlu ham maddelerdir. Bu temel makromoleküler yapı (örneğin, selüloz, nişasta, pektin, lignoselüloz, lif gibi) kullanılan katının substrat olma özelliğini verir. Yapısal makromoleküller, karbon ve enerji kaynakları yüzeyine tutunmuş durağan bir matriks sağlar (Krishna, 2005). KSF işlemlerinde tarımsal atıkların doğal formlarında kullanılması bu atıkların birikimi sonucu oluşan negatif çevresel etkileri önlemeye yardımcı olmaktadır. Bu da KSF’de SF’ye göre önemli bir avantaj sağlamaktadır (Milagres vd., 2004).

KSF uygulamalarında kullanılacak substratın seçimi önemlidir. Çünkü işlemin başarısı önemli oranda buna bağlıdır. Substrat seçiminde en önemli faktörler; partikül büyüklüğü, por yapısı ve kimyasal içeriktir. Buna ilaveten erişilebilirlik ve maliyette büyük önem taşımaktadır. Son yıllarda KSF teknikleri ile ürün üretiminde tarım, orman ve besin endüstrisi atıkları gibi organik atıkların kullanımına karşı artan bir ilgi vardır. Üstelik bu atıkların çoğu ligninolitik aktivitede indükleyici olarak rol oynayan lignin, selüloz ve hemiselülozu içerir (Osma vd., 2007). Bu nedenle KSF aynı zamanda substratın karbon ve enerji kaynağı olarak rol oynadığı sistem olarak da tanımlanabilir (Suffian vd., 2010). Ayrıca, şeker içerikleri de bu atıklarla yapılan

işlemlerin ekonomik olmasını sağlar (Osma vd., 2007) Aynı zamanda çevreye verildiğinde önemli ölçüde çevre kirliliğine neden olan bu atıkların kullanımı da çevre kirliliğini önleme açısından da çok önemlidir.

Substrat hazırlama ve ön uygulama, ham materyali kullanımda uygun bir forma dönüştürmek için gerekli aşamalardır. Bunlar; öğütme, rendeleme veya parçalara ayırma, substrat erişilebilirliğini arttırmak için polimerlerin fiziksel, kimyasal veya enzimatik hidrolizi ile boyutta azaltma, besinle destekleme ve pH'nın ve mineral çözeltinin nem içeriğinin ayarlanmasını, makromoleküler yapının ön yıkımı ve büyük kontaminantların eliminasyonu için pişirme veya buhar uygulanmasını içerir (Krishna, 2005). KSF'de kullanılan tarımsal atıkların seçimi ise partikül büyüklüğü, nem seviyesi, partikül arası boşluklar ve substratın besin içeriği gibi bazı fiziksel parametrelere bağlıdır (Mojsov, 2010).

KSF'de kullanılan substratlardan bazıları Çizelge 1.1' de verilmiştir.

Çizelge 1.1. KSF'de kullanılan katı substratlar (Boran ve Yeşilada, 2011; Osma vd., 2007; Rodríguez Couto vd., 2005b; Rodríguez Couto vd., 2006b; Meza vd., 2005; Rosales vd., 2005; Yang vd., 2006; Gómez vd., 2005)

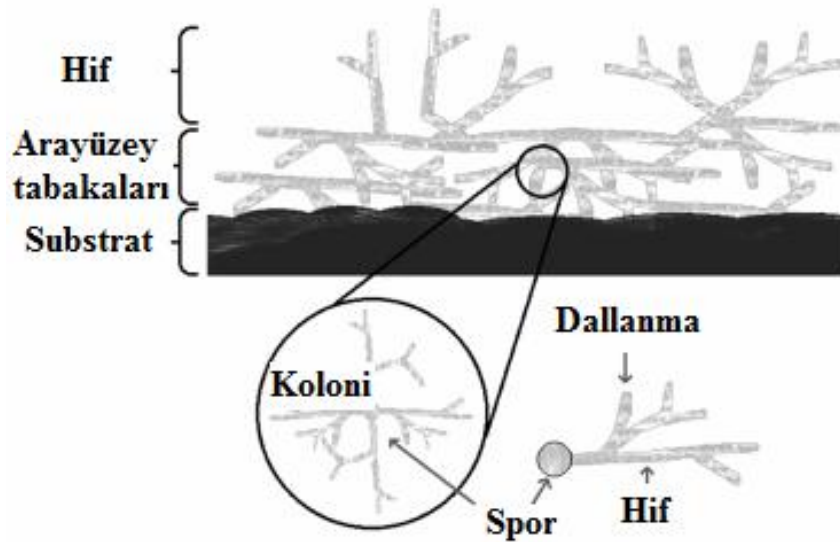
Şeker kamışı posası	Buğday kepeği
Pirinç kepeği	Mısır
Hindistancevizi lifi	Buğday samanı
Muz atığı	Çay ve kahve atıkları
Cassava atığı	Hurma atığı
Şeker pancarı posası	Elma posası
Üzüm tohumu	Soya atığı
Portakal posası	Kahve özü
Üzüm çekirdeği	Kivi atığı

1.1.5. KSF sürecinde kullanılan mikroorganizmalar

Bakteriler, mayalar ve funguslar katı substratlar üzerinde üreyebilirler ve KSF işlemleri ile ürün üretiminde kullanılabilirler (Raimbault, 1998). Fakat, filamentli

funguslar, KSF işlemlerine en iyi adapte olan mikroorganizmalardır (Mienda vd., 2011). KSF işlemlerinde kullanılan mikroorganizmalardan bazıları ve bu mikroorganizmaların uygulama alanları Çizelge 1.2’de görülmektedir.

Filamentli fungusların hif yapısı, düşük su aktivitesi ve yüksek osmotik basıncı iyi tolere etmeleri, katı substratın kolonileşmesinde ve var olan besinlerin kullanımında önemli avantaj sağlamaktadır (Krishna, 2005). Filamentli fungus türlerinin birçoğu için KSF doğal yaşam ortamıdır. Porlara bağlı olarak üreme, substratın yüzeyinde veya içinde meydana gelir (Gervais ve Molin, 2003). Hif yapısı bu fungusların katı substrata penetrasyonunda, kolonileşmesinde ve ayrıca besinlerin kullanımında önemli avantajlar sağlamaktadır (Raimbault, 1998). Filamentli funguslar dallanmış biçimde ürer. Spordan oluşan tübüler hif, uçta uzamaya devam eder ve aynı zamanda hif boyunca yeni dallar oluşur. Dallanma devam eder ve miselyum olarak bilenen porlu üç boyutlu hif ağı oluşur. Filamentli fungusların bu kendine özgü morfolojik karakterleri KSF şartları için çok uygundur. Çünkü morfolojileri sayesinde filamentli funguslar katı substrata kolaylıkla penetre olmakta ve koloni oluşturmaktadır (Rahardjo, 2005). Şekil 1.1’de filamentli fungusların üremesi görülmektedir.



Şekil 1.1. Substrat üzerinde filamentli fungusların üremesi ve spordan fungal biyokütleyle doğru gelişimi (Rahardjo, 2005).

Çizelge 1.2. KSF işlemlerinde kullanılan bazı mikroorganizmalar ve uygulama alanları (Raimbault, 1998)

MİKROORGANİZMA	KSF’ de UYGULAMA ALANI
Bakteriler	
<i>Bacillus sp.</i>	Kompostlama, Natto, amilaz
<i>Pseudomonas sp.</i>	Kompostlama
<i>Serratia sp.</i>	Kompostlama
<i>Streptococcus sp.</i>	Kompostlama
<i>Lactobacillus sp.</i>	Ambarda depolama, yiyecek
<i>Clostridium sp.</i>	Ambarda depolama, yiyecek
Mayalar	
<i>Endomicopsis burtonii</i>	Tape, cassava, pirinç
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Yiyecek, etanol
<i>Schwanniomyces castelli</i>	Etanol, amilaz
Funguslar	
<i>Altemaria sp.</i>	Kompostlama
<i>Aspergillus sp.</i>	Kompostlama, endüstriyel, yiyecek
<i>Fusarium sp.</i>	Kompostlama, giberellin
<i>Monilia sp.</i>	Kompostlama
<i>Mucor sp.</i>	Kompostlama, yiyecek; enzimler
<i>Rhizopus sp.</i>	Kompostlama, yiyecek, enzim ,organik asit
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Kompostlama, lignin yıkımı
<i>Trichoderma sp</i>	Kompostlama, biyolojik kontrol, biyoinsektisit
<i>Beauveria sp., Metharizium sp.</i>	Biyolojik kontrol, biyoinsektisit
<i>Amylomyces rouxii</i>	Tape, cassava, pirinç
<i>Aspergillus oryzae</i>	Koji, yiyecek, sitrik asit
<i>Rhizopus oligosporus</i>	Tempeh, soya, amilaz, lipaz
<i>Aspergillus niger</i>	Yem, protein, amilaz, sitrik asit
<i>Pleurotus oestreatus, sajor-caju</i>	Mantar
<i>Lentinus edodes</i>	Shi-take mantarı
<i>Penicilium notatum, roquefortii</i>	Penisilin, peynir

1.1.6. Katı substrat fermentasyonu uygulamaları

Katı substrat fermentasyonu (KSF) yüzyıllardır bilinen bir teknik olmasına rağmen son yıllarda büyük önem kazanmıştır (Botella vd., 2005). Ekmek yapımı, bilinen en eski KSF örneği olup, MÖ 2600 yıllarında mısırlıların fermentasyon işlemiyle ekmek yaptıkları bilinmektedir. Peynir yapımı, geleneksel fungus işlenmiş yiyecekler, hayvan ve balık ürünlerinin korunması ve sirke/gallik asit üretimi gibi yiyecek fermentasyonları çok uzun yıllardan beri vardır (Krishna, 2005). Koji işlemi ile ilgili bilgiler de MÖ 1000 yıllarına dayanmaktadır (Ooijkaas vd., 2000).

KSF işlemlerinin geleneksel uygulamaları:

- Koji; pişirilmiş soya fasulyelerinin üzerinde *Aspergillus oryzae*'nin üretimidir. KSF işleminin 2-3. gününde fungal misel, fasulyelerin tamamını sarmaz fakat ortama farklı enzimler salar. Ardından fermente olmuş fasulyeler birkaç ay boyunca salamuraya alınır. Enzimler yavaşça soya fasulyelerini parçalar (Mitchell vd., 2006). Bu yöntem doğuya özgü bazı yiyeceklerin fermentasyonunda ve soya sosu endüstrisinde hala başlangıç kültürü olarak kullanılmaktadır. Bu işlem, modern KSF teknolojisi için büyük tarihsel öneme sahiptir ve KSF'nin prototipi olarak düşünülür (Ooijkaas vd., 2000).
- Tempeh, pişirilmiş soya fasulyelerinde *Rhizopus oligosporus* üretimidir. Fungal misel katı bir kalıp halinde soya fasulyelerine bağlanır, ardından kızartılır ve yenir. Endonezya'da oldukça popüler olan fermente bir yiyecektir.
- Ang-kak yada "kırmızı pirinç" pişirilmiş pirinç üzerinde *Monascus purpureus* üretimidir. Fungus koyu kırmızı renkte pigment üretir. Fermentasyon sonunda kırmızı fermente pirinç kurutulur ve tozu yemeklerde renklendirici ajan olarak kullanılır.
- Küflü peynir oluşturmak için *Penicillium roquefortii* gibi küfler ve substrat olarak da peynirin kullanıldığı bir yöntemdir (Raimbault, 1998).

KSF'nin tarihsel gelişimi (Krishna 2005):

- 1896'da Takamine, *A.oryzae*'yı buğday kepeği üzerinde KSF tekniğini kullanarak üretilen Takadiastaz isimli sindirim enzimini üretmiştir. Bu uygulama KSF teknolojisinin diğer yiyecek ve içecek endüstrilerine yönelmesini sağlamıştır (Krishna, 2005).
- 1900-1920 yılları arasında fungal enzimler, mikrobiyal enzimler ve kojik asitin üretiminde gelişmeler başlamıştır.
- 1920-1940 yılları arasında fungal enzimler, glukonik asit ve sitrik asitin üretimi ve dönen silindir fermentörü gelişimi gerçekleşmiştir.
- 1940 ve 1960'larda fermentasyon endüstrisinde penisilin gibi antibiyotiklerin üretimi ve fungal sporlarla steroid transformasyonu gibi oldukça önemli yeni gelişmeler olmuştur. Bu nedenle bu dönem fermentasyon endüstrisinde "Altın Çağ" olarak bilinmektedir. II. Dünya Savaşı esnasında penisilin üretimi KSF tekniğine dayanmaktadır.
- 1960-1980'lerde aflatoksin gibi mikotoksinlerin üretimi ve proteince zenginleştirilmiş tek hücre proteini üretimi önemli gelişmelerdir.
- 1980-1990'da ise KSF ile çeşitli primer ve sekonder metabolitlerin üretimi yapılmıştır. Aynı zamanda kolon tipi fermentör keşfedilmiş ve yeni modellerin teorileri de oluşturulmuştur.

Bu dönemden sonra ise KSF tekniğiyle çok sayıda substrat ve mikroorganizma kullanılarak önemli çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. KSF uygulamalarıyla önemli ürünlerin üretimi yapılabilmektedir (Mienda vd., 2011; Raimbault, 1998).

Gün geçtikçe, birçok farklı ürünün üretimi ve uygulamanın yapılması amacıyla KSF sürecinin kullanımına yönelik ilgi artmaktadır (Çizelge 1.3).

Çizelge 1.3. KSF'nin uygulama alanları

ALAN	UYGULAMA	REFERANS
Endüstriyel Fermentasyon	Enzimler (Amilaz, proteaz, lipaz, pektinaz, tannaz, selüloz, lakkaz vd.)	Boran ve Yeşilada, 2011; Lee vd., 2011; Suganthi vd., 2011; Yang vd., 2006; Kang vd., 2004; Sandhya vd., 2005; Lagemaat ve Pyle, 2001; Ncube vd., 2012; Santis-Navarro vd., 2011
	Pigmentler	Chiu ve Chan, 1991; Velmurugan vd., 2011
	Aromalar ve tatlandırıcı bileşikler	Longo ve Sanromán, 2006
	Vitamin	Keuth ve Bisping, 1994; Keuth ve Bisping, 1998
	Organik asit (Oksalik asit, sitrik asit, laktik asit, fumarik asit, gallik asit vd.)	Kumar vd., 2003; Wu vd., 2011; Leangon vd., 1999
	Antibiyotik (Penisilin, tetrasiklin vd.)	Taşkın vd., 2010; Vastrad ve Neelagund, 2011
	Hayvan besini	Graminha vd., 2008
	Biyoyakıt	Mazaheri vd., 2012
	Polihidroksialkanoat (PHA)	Castilho vd., 2009
	Tek hücre proteini	Akintomide ve Antai, 2012
Tarım Endüstrisi	Tarımsal atıkların proteince zenginleştirilmesi	Shojaosadati vd., 1999
	Besinsel zenginleştirmede tarımsal atıkların biyolojik dönüşümü	Robinson ve Nigam, 2003
Çevresel Kontrol	Biyolojik kontrol ajanları (biyoinektisit, biyoherbisit, biyopestisit, mikopestisit gibi)	Singh vd., 2010; Deshpande, 1999
	Bioremediasyon (Biyolojik iyileştirme)	Pointing, 2001; D'Annibale vd., 2005;
	Boyar maddenin renginin giderimi amacıyla enzim üretimi	Murugesan vd., 2007; Mazmanci ve Unyayar, 2010; Zeng vd., 2011; Ozmen ve Yesilada 2012
	Tarım atıklarının biyolojik detoksifikasyonu	Leifa vd., 2000; Ozmen ve Yesilada 2012
	Tehlikeli bileşiklerin biyolojik yıkımı	Steffen vd., 2003; Tuomela vd., 1999
	Biyolojik olarak kağıt hamurunun ağartılması	Szendefy vd., 2006
	Biyolojik kağıt hamuru üretimi	Blanchette ve Burnes, 1988; Patel vd., 1994; Chen vd., 2002

1.1.7. Katı substrat fermentasyonu ile enzim üretimi

Biyoteknolojik enzim üretimi hızla gelişmektedir (Toca-Herrera, 2007). SF enzim üretimi için tercih edilen bir teknoloji olmasına rağmen birçok endüstriyel enzimin üretiminde KSF tekniklerinin kullanımına yönelik artan bir ilgi vardır (Ooijkaas vd., 2000). KSF'nin avantajları bu ilgiyi desteklemektedir (Smits vd., 1998). Enzim üretimi en önemli uygulamalardandır ve kullanılan mikroorganizma, kültür şartları, substratın doğası ve besinlere erişilebilirlik enzim üretimini etkileyen önemli parametrelerdir. İyi bir enzim üretimi için optimum su içeriği ve su aktivitesinin kontrolünü sağlamak önemlidir (Mojsov, 2010). Çevre kirliliğinin gideriminde mikroorganizmalar ve enzimler gibi biyolojik ajanlar önemlidir (Gianfreda vd., 1999). KSF teknikleri kullanılarak üretilen enzimlerden bazıları Çizelge 1.4'te görülmektedir.

Çizelge 1.4. KSF teknikleri ile üretilen bazı enzimler (Viniegra-González ve Favela-Tornes, 2004)

Enzim	Substrat
Lakkaz	Lignoselülozik atıklar
Kitinaz	Kabuklu deniz hayvanlarının katı atıkları
Selülaz	Selülozik atıklar, şeker kamışı posası
Glukoz oksidaz	Buğday kepeği
Amilaz	Muz atığı, buğday kepeği
İnülinaz	Buğday kepeği ve pirinç kepeği,
Lipaz	Buğday ve pirinç kepeği, Hindistan cevizi atığı,
Pektinaz	Buğday kepeği, elma posası, kahve atığı, şeker kamışı posası
Proteaz	Buğday ve pirinç kepeği
Fitaz	Kanola atığı, buğday atığı, börülce posası ve atığı
Pullulanaz	Buğday kepeği
Tannaz	Şeker kamışı posası
Ksilanaz	Buğday kepeği, kahve atığı, buğday ve pirinç samanı, şeker pancarı posası, şeker kamışı posası, muz atığı, mısır koçanı atığı

1.1.8. KSF' nin avantajları ve dezavantajları

KSF işlemleri SF ile kıyaslandığında bazı avantajlara sahiptir (Suffian vd., 2010; Pandey, 2003; Raghavarao vd., 2003; Mienda vd., 2011; Rodríguez Couto vd., 2003; Aguilar vd., 2008; Manpreet vd., 2005):

- Ø Enerji gereksinimi daha azdır.
- Ø KSF işlemlerinde daha az atık su üretilir. Bu işlemlerde tarım endüstrisi atıkları substrat olarak kullanılmaktadır. Katı atıkların boşaltılması problemi de çevre dostu olan bu işlemle daha kolay çözülebilir.
- Ø SF ile kıyaslandığında, genelde KSF ile daha yüksek ürün üretimi söz konusudur.
- Ø Serbest su olmadığından maya ve bakterilerle kontaminasyon riski düşüktür. Bu da aseptik şartlarda çalışma kolaylığı sağlar.
- Ø KSF uygulamalarında kullanılan ortam, bu uygulamalarda yaygın kullanılan mikroorganizmalardan olan beyaz çürükçül fungusların doğadaki doğal habitatlarına benzer.
- Ø Substrat olarak tarımsal atıklar kullanılabildiğinden maliyet de düşüktür.
- Ø Substrat, genellikle mikroorganizmanın üremesi için gerekli besinleri sağlar. Bundan dolayı da kültür ortamı oldukça basittir.
- Ø Havalandırma işlemi kolaydır. Çünkü atmosferik oksijene substratın erişebilirliği daha kolaydır. Bu durumda, nemli katı substrata oksijenin artan bir difüzyon oranı vardır.

Bununla birlikte KSF işlemlerinin dezavantajları da vardır (Suffian vd., 2010; Pandey, 2003; Raghavarao vd., 2003; Mienda vd., 2011; Aguilar vd., 2008):

- Ø KSF işlemleri SF'ye göre daha yavaştır. Çünkü KSF yığın halde katı bir bariyer oluşturur. Aynı zamanda ısı transferi yetersizdir.
- Ø Çoğu durumda KSF'de kullanılan substrat için parçalama, öğütme, fiziksel ve kimyasal enzimatik hidroliz, buhar uygulaması gibi işlemler gerekebilir.
- Ø Bakteriler üremek için daha yüksek suya ihtiyaç duyduğundan KSF işlemleri için funguslar daha uygundur.
- Ø pH, nem içeriği, oksijen ve biyokütle konsantrasyonunun belirlenmesi substratın katı olmasından dolayı zordur.

- Ø Üretim için çalkalamalı koşullar uygun olmadığından statik üretim tercih edilir.
- Ø Farklı funguslarla kontaminasyon riski vardır.
- Ø Sporların çimlenmesi için uzun bir lag fazına ihtiyacı vardır. Bu da SF'ye göre üretim süresinin daha uzun olmasına neden olur.

Çizelge 1.5' te KSF ve SF sistemleri karşılaştırmalı olarak verilmektedir.

Çizelge 1.5. Katı ve sıvı fermentasyonun karşılaştırılması (Raimbault, 1998)

FAKTÖR	Sıvı Fermentasyon	Katı Substrat Fermentasyonu
Substrat	Çözünebilir substratlar (şeker gibi)	Nişasta, selüloz, lignin gibi çözünemeyen polimer yapıda substratlar
Aseptik şartlar	Isı sterilizasyonu ve aseptik şartlar	Buhar uygulaması ve steril olmayan şartlar
Su	Yüksek hacimde su kullanımı ve atık su çıkışı	Sınırlı su kullanımı ve atıksu çıkışı hemen hemen yok
Metabolik ısı	Kolay ısı kontrolü	Düşük ısı transfer kapasitesi
pH kontrolü	Kolay pH kontrolü	pH kontrolü zor
Mekanik çalkalama	Etkin homojenizasyon	Statik şartlar tercih edilir
Büyük ölçekli çalışma	Endüstriyel ölçekler mevcut	Mühendislik ve yeni cihazlar gerekli
İnokülasyon	Kolay inokülasyon	Spor inokülasyonu
Kontaminasyon	Bakterilerle kontaminasyon riski	Kontaminasyon riski çok düşük
Enerji	Yüksek enerji tüketimi	Düşük enerji tüketimi
Araç gereç	Yüksek hacimli ve yüksek maliyetli teknoloji	Düşük hacimli ve düşük maliyetli araç gereçler
Atık su çıkışı ve çevre kirliliği	Yüksek hacimde kirletici atık su çıkışı	Atık su çıkışı olmadığından daha az çevre kirliliği

1.2. Lakkaz Enzimi

Beyaz çürükçül funguslar, besin sınırlamasına karşın sekonder metabolizma esnasında ekstrasellüler enzimler salgılayarak odunun tüm bileşenlerini yıkabilen tek organizma grubudur (Shraddha vd., 2011). Bu ligninolitik enzimlerin temel bileşenleri lignin peroksidazlar ve mangan-bağımlı peroksidazlar ve lakkazlar olarak adlandırılan çoklu bakır oksidazlar ailesidir (Toca-Herrera vd., 2007).

İlk lakkaz 1883 yılında Japon lake ağacı *Rhus vernicifera*'da tanımlanmıştır (Thurston, 1994). Daha sonra lakkaz ve lakkaz benzeri proteinler bitkilerde, funguslarda, bakterilerde tanımlanmıştır (Rodgers vd., 2009). Lakkazlar (*p*-difenol:dioksijen oksidoredüktazlar; EC 1.10.3.2) yüksek yapılı bitkilerde, bazı böceklerde, bakterilerde ve funguslarda bulunur. Bilinen lakkazların çoğu özellikle beyaz çürükçül funguslardan olmak üzere fungal orjinlidir (Saito vd., 2003). Fungal lakkazlar birçok Basidiomycetes, Ascomycetes ve Deuteromycetes türünde belirlenmiş ve saflaştırılmıştır. En iyi lakkaz üreticileri beyaz çürükçül funguslardır (Pandey, 2004). *Funalia trogii*, *Trametes versicolor*, *Trametes hirsuta*, *Trametes ochracea*, *Trametes villosa*, *Trametes gallica*, *Cerrena maxima*, *Phlebia radiata*, *Coriolopsis polyzona*, *Lentinus tigrinus*, *Pleurotus eryngii* gibi birçok fungus lakkaz üretmektedir (Dwivedi vd., 2011, Yeşilada vd. 1995, Yeşilada vd., 1998). Lakkazlar hem fenolik hem de fenolik olmayan bileşiklerin oksidasyonunu katalizler ve sentetik boyar maddelerin birçoğunun rengini giderir (Toca-Herrera vd., 2007). Lakkaz; kağıt hamuru, kağıt, tekstil, eczacılık gibi birçok alanda geleneksel kimyasal işlemlerin yerini alması açısından umut veren bir enzimdir (Kunamneni vd., 2008)

Etkin ve yeşil oksidasyon teknolojileri geleneksel biyolojik olmayan metodların yerine enzimlerin kullanımına karşı olan ilgiyi arttırmıştır. Birçok oksitleyici enzim arasında lakkaz, son yıllarda yoğun araştırma konusudur (Rodríguez Couto ve Toca-Herrera, 2006c, Birhanlı ve Yeşilada 2010, Apohan ve Yeşilada, 2011, Boran ve Yeşilada 2011, Kahraman ve Yeşilada, 2001). Çünkü, lakkaz enzimleri düşük substrat özgüllükleri olan ve difenoller, polifenoller, farklı sübstitüe fenoller, diaminler, aromatik aminler dahil olmak üzere çok fazla çeşitlilikteki substratları okside etmektedirler (Tuncer, 2010). Aynı zamanda lakkazın kosubstratı olan oksijen, kendi çevrelerinde mevcuttur. Aynı zamanda lakkazlar, ekstrasellüler enzimlerdir ve bu da saflaştırma işlemlerini kolaylaştırır

(Toca-Herrera vd., 2007). Lakkaz enzimi, kararlılığı ve bununla birlikte basit ve ucuz ortamlarda dahi üretilebilmesinden dolayı da oldukça dikkat çekici bir enzimdir (Cabana vd., 2011). Lakkaz üreten organizmanın spektrumunu genişletme ve onların lakkaz üretim yeteneklerini artırma da lakkazın önemini arttırmıştır (Arora ve Gill, 2001) .

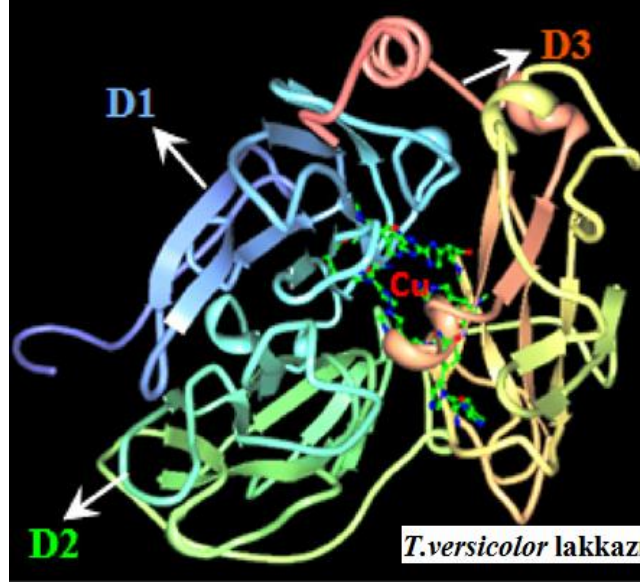
Düşük maliyette ve yüksek miktarda enzim üretimi önemlidir. Bundan dolayı bu alandaki, araştırmacılar etkin üretim sistemlerine yönelmektedir. Bu amaç için iyi bir strateji, KSF uygulamalarında katı substratların destek substrat olarak kullanımıyla lakkaz üretimidir (Suffian vd., 2010). KSF'deki lignoselülozik atıklar fungusların ihtiyaç duyduğu besinleri sağlar (Lorenzo vd., 2002) ve ayrıca tutunma yeri olarak da işlev görür (Pandey vd., 2000).

Yiyecek, tarım ve orman endüstrileri, çevreye boşaltıldığında ciddi çevre problemleri oluşturan yüksek miktarda atık üretmektedir. Biyolojik atıkların yeniden kullanımı da büyük ilgi görmektedir. Bu gibi atıkların, çoğu çözünebilir karbohidratlarca zengindir ve aynı zamanda lakkazı indükleyen maddeleri içermektedir. Bu da, etkin bir şekilde lakkaz üretimini sağlar. Üstelik, aynı fungal soy ve kültür şartlarıyla, hareketsiz destekler kullanmak yerine lignoselülozlu substratlar kullanarak daha yüksek miktarda lakkaz elde edilmektedir (Toca-Herrera vd., 2007).

1.2.1. Lakkaz enziminin özellikleri

Lakkazlar, moleküler oksijeni suya redükleyen bakır içeren enzimlerdir (Cullen, 1997) ve katalitik merkezinde bakır atomu içeren polifenol oksidazlar grubuna dahildirler (Baldrian, 2006).

Funguslardan 100'den fazla lakkaz saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Lakkazlar monomerik veya polimerik yapıda olabilmektedir. Bu enzimlerde bulunan bakır merkezleri substratın oksidasyonu ve oksijenin redüklendiği bölgelerdir. Lakkazların içerdiği metal tipi ve sayısı farklı olabilmektedir. Proteine bağlı olan karbohidrat kısmı enzimin kararlılığı için önemlidir. Asidik izoelektrik noktası pH 4 civarında olan monomerin moleküler ağırlığı, 50 ile 100 kDa arasında değişmektedir. (Kunamneni vd., 2008). Şekil 1.2'de *Trametes versicolor* lakkazının üç boyutlu yapısı görülmektedir.



Şekil 1.2. *Trametes versicolor* lakkazının üç boyutlu yapısı (D1: Domain 1, D2: Domain 2, D3: Domain 3, Cu: Bakır) (Dwivedi vd., 2011)

Katalitik aktivite ABTS, şiringaldazin veya guaikol gibi lakkaz substratları ile ölçülür (Majeau vd., 2010).

1.2.2. Lakkaz enziminin endüstriyel ve biyoteknolojik alanlarda kullanımı

Son yıllarda biyoteknolojik uygulamalarda fungal enzim kullanımına yönelik ilgi daha fazla artmıştır. Bu enzimlerden birisi olan lakkaz enzimi, peroksidazlarla kıyasla daha fazla ilgi çekmektedir (Octavio vd., 2006). Lakkazlar, peroksidazların kullandığı hidrojen peroksidin aksine oksijeni kofaktör olarak kullandıklarından dolayı önemli bir avantaja sahiptir (Gnanamani vd., 2006). Lakkazlar birçok fenolik bileşiği ve aromatik aminlerin oksidasyonunu katalizler ve aynı zamanda uygun redoks araçlarının varlığında fenolik olmayan substratları oksitler. Bu da, lakkazları biyoteknolojik amaçlar için uygun yapar (Bourbonnais vd., 1992) ve birçok biyoteknolojik alanda kullanılmasını sağlar (Octavio vd., 2006).

Bununla birlikte biyoteknolojik işlemlerde lakkazın kullanımı düşük maliyette yüksek miktarda enzim üretimini gerektirir. Bundan dolayı araştırmacılar enzim üretimini geliştirecek ekonomik yolları araştırmaktadır. Bu amaç için uygun olan yaklaşımlardan birisi, indükleyicileri ve çözünebilen karbohidrat içeren lignoselülozik atıkları kullanmaktır (Osma vd., 2011a). Lakkazlar; biyolojik kağıt hamuru üretimi, biyolojik ağartma ve endüstriyel atıksuların biyolojik

iyileştirilmesinde uygun biyolojik katalizörlerdir (Toca-Herrera vd., 2007). Lakkaz enziminin çeşitli endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanım potansiyeli, üzerinde yoğun araştırmalar yapılmasına yol açmaktadır (Çizelge 1.6).

Çizelge 1.6. Lakkaz enziminin bazı uygulama alanları

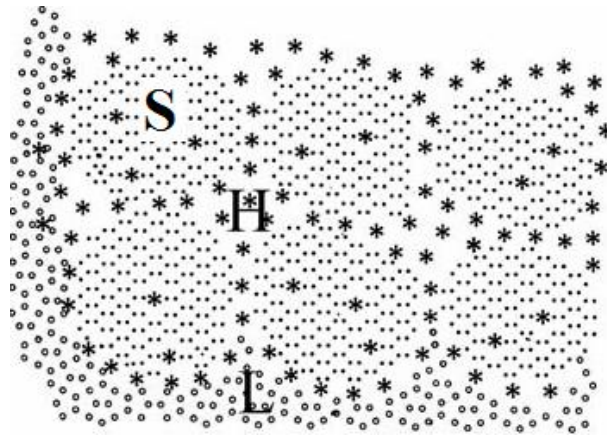
UYGULAMA ALANI	REFERANS
Biyoremediasyon (Biyolojik İyileştirme)	
Endüstriyel atıksulardaki boyaların renginin giderimi	Wong ve Yu, 1999; Sathishkumar vd., 2010; Sun vd., 2009; Rodríguez vd., 1999; Erkurt vd., 2007, Yeşilada vd. 2010
Çeşitli kirleticilerin uzaklaştırılması	Majeau vd., 2010
Ksenobiyotiklerin parçalanması	Itoh vd., 2000; Keum ve Li, 2004; Dodor vd., 2004; Castro vd., 2003
Atıksuların biyolojik iyileştirilmesi	D'Annibale vd., 1999; D'Annibale vd., 2000, Yeşilada vd. 1995, Yeşilada vd. 1998
Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) gibi organik kirleticilerin oksidasyonu	Majcherczyk vd., 1998; Pickard vd., 1999
Yiyecek ve içecek endüstrilerinde	Cantarelli vd., 1999; Giovanelli ve Ravasini, 1993; Micard ve Thibault, 1999; Kuuva vd., 2003
Kozmetikte	Roure vd., 1992; Aaslyng vd., 1996
Kot ağartılması (eskitme)	Pazarlıoğlu vd., 2005
Etanol üretimi	Larsson vd., 2001
Kağıt hamurundan ligninin uzaklaştırılması	Bourbonnais vd., 1995; Breen ve Singleton, 1999
Biyosensör	Peter ve Wollenberger, 1997; Gomes ve Rebelo, 2003; Leite vd., 2003; Roy vd., 2005
Şarabın berraklaştırılması	Servili vd., 2000

1.3. Beyaz Çürükçül Funguslar

Beyaz çürükçül funguslar lignini yıkabilen fungusları kapsayan fizyolojik bir gruptur. Beyaz çürükçül ismi bu fungusların oduna yaptığı atak sonucunda ligninin

uzaklaşmasıyla ağartılmış görüntüden dolayıdır (Boyd-Wilson ve Walter, 2002). Aslında, odunun bütün bileşenlerini yıkabilen tek organizmalardır. Bu funguslar, lignin peroksidaz (LiP), mangan-bağımlı peroksidaz (MnP) ve lakkaz gibi ekstraselüler enzimleri salgırlar (Osma vd., 2011a). LiP, lignin molekülünden bir elektron alarak katyon radikaller oluşturur ve ardından ligninin oksijenasyonu ve depolimerizasyonu ile sonuçlanan oksidatif reaksiyonu başlatır. MnP ise, lignine difüze olabilen ve oksidasyonu başlatan Mn (II)'yi Mn (III)'e oksitler. Daha önce de belirttiğimiz gibi lakkaz diğer peroksidazlardan farklı olarak lignoselülozu parçalamak için hidrojen peroksida gerek duymayan bir fenol oksidazdır (Pandey, 2004).

Beyaz çürükçül funguslar, selüloz ve hemiselülozun yanı sıra lignini de yıkabilme yetenekleri sayesinde lignoselülozun bütün bileşenlerini parçalayarak önemli ürünlerin üretiminde de önemli rol oynar (Pandey, 2004). Lignin, selüloz ve hemiselülozun karbohidrat polimer matriksine gömülü olan ve hücre duvarının bütünleştiren kısmıdır (Aehle, 2007). Şekil 1.3'de odunun hücre duvar bileşenleri görülmektedir.



Şekil 1.3. Odunun hücre duvar bileşenlerinin şematik modeli, selüloz (S), hemiselüloz (H) ve lignin (L) (Schmidt, 2006)

Diğer mikroorganizmalara karşı beyaz çürükçül funguslar lignini tamamen ve daha hızlı şekilde parçalarlar. Bu funguslar, lignini CO₂ ve H₂O'ya tamamen yıkabilme yeteneğine sahiptirler (Cullen ,1997). Doğada en bol bulunan aromatik bileşik olan lignin bitki hücre duvarının selüloz mikrofibrillerinin etrafını matriks gibi sararak bitkinin korunmasını sağlar. Lignin, selüloz ve hemiselülozun aksine hidrolitik atağa karşı dayanıklıdır. Beyaz çürükçül funguslar lignini depolimerize ve

mineralize eden en etkin mikroorganizmalardır. (<http://genome.jgi-psf.org/whiterot1/whiterot1.home.html>). Selüloz ve hemiselüloz, lignine göre daha kolay yıkılır. Çünkü yapısındaki fenilpropan üniteleri ve bu üniteleri arasındaki dirençli bağlar lignini birçok mikroorganizmaya karşı dirençli hale getirir. Aynı zamanda hidrofobik yapıda ve üç boyutlu oldukça büyük bir molekül olan lignin bu özelliğinden dolayı parçalayıcı enzimlerin içeri girmesini engeller (Schmidt, 2006). Bu funguslar, Poliaromatik hidrokarbonları (PAH) içeren birçok ksenobiyotiği, klorlanmış fenol ve pestisitleri, Poliklorlu bifenilleri (PCB), dioksinleri, organofosforlu bileşikler, nitrotoluenler, kloranilinler, boyaları metabolize edebilirler. Toksik bileşikler yıkabilme özellikleri beyaz çürükçül fungusları biyolojik iyileştirmede önemli hale getirmektedir (Reddy, 1995, Davila-Vazquez vd., 2005).

En etkin ligninolitik mikroorganizmalar olan beyaz çürükçül funguslar (Levin ve Forchiassin, 2001), ligninin yanı sıra klorlanmış aromatik bileşikler, heterosiklik aromatik hidrokarbonlar, çeşitli boyalar gibi yıkıma dirençli olan kirleticilerin çoğunu yıkabilir. Beyaz çürükçül fungusların bu yıkım özellikleri onların enzimlerinin güçlü oksidatif aktiviteleri ve düşük substrat özgüllüklerinden dolayıdır. Bu da onları biyolojik iyileştirme için öne çıkarmaktadır (Ohkuma vd., 2001). Biyolojik iyileştirme amacıyla katı ya da sıvı çeşitli çevresel ortamlarda uygulanabilmektedir (Gao vd., 2010). Çizelge 1.7’de beyaz çürükçül fungusların kullanım alanları görülmektedir.

Çizelge 1.7. Beyaz çürükçül fungusların kullanım alanları

UYGULAMA ALANI	REFERANS
Lignin yıkımı	Fıskın vd., 1989, Blanchette, 1984
Biyolojik kağıt hamuru üretimi	Blanchette ve Burnes, 1988; Patel vd., 1994
Biyoremediasyon	Kirk vd., 1992; Walter vd., 2005, Yeşilada vd., 1995
Kağıt hamurunun ağartılması	Reid ve Paice, 1994; Moreira vd., 1997
Kot ağartma	Pazarlıoğlu vd., 2005
Biyoyakıt üretimi	Okamota vd., 2011; Kamei vd., 2012
Ksenobiyotiklerin yıkımı	Magan vd., 2010
Atık suların biyolojik iyileştirilmesi	Faraco vd., 2009; Christov ve van Driessel, 2003, Yeşilada, 1992
Boyaların renginin giderimi	Yesilada vd., 2010; Eichlerová vd., 2006; Mishra vd., 2011; Kariminiaae-Hamedani vd., 2007
Poliklorlu bifeniller, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, pestisitler ve sentetik polimerler gibi kirleticilerin yıkımı	Bogan vd., 1999; Bumpus, 1989; Ryu vd., 2000
Enzim üretimi	Arora ve Gill, 2000; Kahraman ve Yeşilada 2001, Kahraman ve Gurdal, 2002; Levin vd., 2010

Bu tez çalışmasında da yeni izole edilmiş olan beyaz çürükçül funguslardan *Funalia trogii*, *Ganoderma lucidum*, *Trametes versicolor* kullanılmıştır. Kullandığımız fungusların özellikleri ise şöyledir;

1.3.1. *Funalia trogii*

Funalia trogii, odun üzerinde üreyen bir beyaz çürükçül fungustur. Üreme esnasında peroksidazları ve polifenol oksidazları (lakkazlar) içeren yıkıcı enzimleri kullanarak lignini parçalayıp odunu çürütme (yumuşatma) yeteneğine sahiptir. *F. trogii*, farklı kirleticilerin yıkımı, zeytinyağı fabrikası ve alkol fabrikası atık suyu gibi dirençli çıkış sularının renginin giderimini (Yesilada vd., 1998; Yesilada ve Fıskın, 1995; Yesilada vd., 1995; Mazmanci ve Unyayar, 2005) ve endüstriyel atık sulardan ağır metal uzaklaştırılması (Kahraman vd., 2005) gibi uygulamalarda test

edilmektedir. Bu fungusun yüksek düzeyde enzim üretim kapasitesi rapor edilmiştir (Birhanlı ve Yeşilada 2010).



Şekil 1.6. *Funalia trogii*'nin odundaki görüntüsü

(http://www2.ac-lille.fr/myconord/Photos_SMNF/Photos_SMNF_F/Funalia_trogii.htm)

1.3.2. *Ganoderma lucidum*

Basidiomycetes sınıfına dahil olan *Ganoderma lucidum*, 2000 yıldan fazladır geleneksel bir ilaç olarak kullanılmaktadır. Yenilebilen bu fungusun insan sağlığını koruduğu ve ömür uzunluğunu arttırdığı düşünülmektedir (Sliva, 2003). Aynı zamanda *G. lucidum*' un anti-androjenik aktivitesi de gösterilmiştir (Fujita vd., 2005).

G. lucidum da odunun birçok kısmını parçalayabilir. *G.lucidum* ile ilgili birçok çalışma tıbbi ve farmokolojik özellikleri ile ilgilidir. Bununla beraber, *G.lucidum* ve enzimlerinin boyaları da kapsayan ksenobiyotiklerin ve organik bileşiklerin yıkımında kullanımını üzerine araştırmalar mevcuttur. Yine toksik kimyasalların uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır (Liao vd., 2012). Lignin yıkımından sorumlu temel ekstraselüler enzimlerden olan lakkaz, *G. lucidum*'un ürettiği temel enzimdir (Songulashvili vd., 2007; Zilly vd., 2011, D'Souza vd., 1999; Murugesan vd., 2009).



Şekil 1.5. *Ganoderma lucidum*'un odundaki görüntüsü
(<http://www.mushroomthejournal.com/greatlakesdata/Taxa/Ganodlucid143.html>)

1.3.1. *Trametes versicolor*

Kesilmiş meşe tomruğu ve diğer ölü sert ağaçlarda yetişen ve Polyporaceae familyasına ait bir beyaz çürükçül fungustur (Lorenzo vd., 2002). Bu fungusun lakkaz üretim yeteneği ilk olarak Farhreaus tarafından 1952 yılında keşfedilmiştir (Lorenzo vd., 2002). Beyaz çürükçül funguslardan *Trametes* genusu, lakkaz enziminin temel üreticilerinden birisidir (Osma vd., 2007). Bu cinsin bir türü olan *Trametes versicolor*, iyi bir lakkaz üreticisidir. Bu tür, mangan bağımlı peroksidaz ve yüksek miktarda lakkaz ve lignin peroksidaz (LiP) enzimlerini üretir (Silvério vd., 2013, Casas vd., 2013; Tişma vd., 2012; Tanaka vd., 1999; Paice vd., 1993). Kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde ligninin uzaklaştırılması (Archibald vd., 1997) ve kağıt hamurunun ağartılması, tekstil fabrikası atıksularında bulunabilen boyar maddelerin renginin giderimi (Sari vd., 2012a; Dhillon vd., 2012; Swamy ve Ramsay, 1999; Wong ve Yu, 1999; Amaral vd., 2011), atık su arıtımı (Modi vd., 1998; Yesilada vd., 1998), PAH, DDT gibi toksik kirleticilerin yıkımı (Rodríguez-Escales vd., 2013, Sari vd., 2012a, Sari vd., 2012b) gibi uygulamalarda bu tür veya enzimleri önemli bir potansiyele sahiptir.



Şekil 1.4. *Trametes versicolor*'ın odundaki görüntüsü
(http://www.mykoweb.com/CAF/species/Trametes_versicolor.html)

1.4. Boyar Maddeler

Boyar maddeler, ipliğe uygulandığında ışığa ve suya karşı dirençli olan kalıcı renkler veren renkli maddeler olarak tanımlanmaktadır (Rai vd., 2005). Sentetik ve aromatik yapıli bileşikler olan boyalar; yiyecek, kozmetik, kağıt, plastik ve tekstil endüstrisi gibi birçok alanda kullanılmaktadır. (Sathiya vd., 2007).

Boya molekülleri, boyanın renginin ortaya çıkmasını sağlayan kromofor ve kromoforun rengini ortaya çıkaran ve boyanın bağlanmasını kuvvetlendiren oksokromdan oluşur (Prasad ve Rao, 2010; Gupta ve Susas, 2009). En önemli kromoforlar azo ($-N=N-$), karbonil ($-C=O$), metan ($-CH=$), nitro ($-NO_2$) ve kinon gruplarıdır. En önemli oksokromlar ise amin ($-NH_3$), karboksil ($-COOH$), sülfonat ($-SO_3H$) ve hidroksil ($-OH$) dir. Oksokromlar; reaktif, asit, direkt, temel, mordant, dispers, pigment, vat, anyonik ve diazo, sülfür, solvent ve dispers boyalar sınıfına aittir (Prasad ve Rao, 2010).

1.4.1. Boyar maddelerin sınıflandırılması

“Society of Dyers and Colorists” de (1971-1996’da) yayınlanmış olan Renk İndeksi (RI), boyalar ve diğer renklendiriciler için bir referanstır. Geleneksel isimlerinin yanı sıra RI ya bağlı sınıflandırma her bir boya için tek olan bir numara ve rengi ve uygulamadaki endüstriyel metoduna dayalı bir isim sağlamaktadır. (Kiernan, 2001). Sınıflandırmadaki ilk kelime boya sınıflandırmasını gösterirken

ikinci kelime boyanın renk tonunu ifade eder. Örneğin, RI Asit Sarı 36 (RI 13065) asit tip boya olup sarı renklidir (Hao vd., 2000).

Boyalar uygulama ve kimyasal yapılarına göre sınıflandırılırlar (Prasad ve Rao, 2010). Çizelge 1.8’de boyaların Renk İndeksine göre Çizelge 1.9’da ise Renk İndeksinde kullanım ve uygulama alanlarına göre sınıflandırılması görülmektedir.

Çizelge 1.8. Renk indeksinde (RI) boyar maddelerin kimyasal yapılarına bağlı olarak sınıflandırılması (Kiernan, 2001)

Nitroz boyalar	Indofenol boyalar
Nitro boyalar	Azin boyalar
Azo boyalar	Oksazin boyalar
Azoik boyalar	Tiazin boyalar
Stilben boyalar	Kükürt boyalar
Karotenoid boyalar	Lakton boyalar
Difenilmetan boyalar	Aminoketon boyalar
Triarilmetan boyalar	Hidroksiketon boyalar
Ksantan boyalar	Antrakinin boyalar
Akridin boyalar	Indigo boyalar
Kinolin boyalar	Fitalosiyanin boyalar
Methine boyalar	Doğal organik renklendiriciler
Thiazol boyalar	Oksidasyon bazları
İndamin boyalar	İnorganik renklendirici maddeler

Çizelge1.9. Renk indeksinde kullanım ve uygulama alanlarına göre boyaların sınıflandırılması (Kiernan, 2001)

Asit boyalar	Yün, ipek ve naylona düşük pH’da uygulanan renkli anyonlar
Azoik boyalar	Naftol ile diazonyum tuzunun reaksiyonunun substratı ile oluşan çözünmez azo boyalar
Bazik boyalar	Asit yan zincirine sahip poliakrilonitril (akrilik) tekstilde kullanılan renkli katyonlar
Direkt boyalar	Selüloz ipliklerini bağlayan büyük moleküllü asit boyalar
Dispers boyalar	Plastikleştiriciye uygulandığında hidrofobik materyallere giren ince süspansiyonki çözünmeyen renkli bileşikler
Floresan beyazlatıcılar	Ultraviyoleyi absorblar ve mavi ışık yayar. Beyaz dokuma kumaşlardaki sararmaların uzaklaştırılmasında kullanılır.
Yiyecek boyaları	Yiyecekleri renklendirmek için kullanılan maddeler.
Ingrain (diazo) boyalar	Boyanan substrata uygulandıktan sonra çözünmez olan ve kimyasal olarak değişen çözgen renklendirici.
Mordant boyalar	Metallerle birlikte uygulanan boyalardır. Metal boyadan önce, sonra ya da boyayla birlikte uygulanabilir.
Doğal boyalar	Bitki ya da hayvanlardan elde edilen boyalardır.
Oksidasyon bazları	Oksitlendiğinde kahverengi ya da siyah maddeleri polimerleştiren renksiz aminler veya aminofenollerdir.
Pigmentler	Suda ve organik çözücülerde, çözünmeden beyaz, siyah ve ya renkli materyallere ayrılırlar. Boyalarda ve plastiklerin boyanmasında kullanılır.
Reaktif boyalar	Substratla kovalent bağların şekillenmesinde reaksiyon gösteren yan zincir içeren renkli bileşiklerdir. Selülozun oldukça hızlı boyanmasını sağlamak için kullanılır.
Solvent boyalar	Yalnızca hidrofobik çözücülerde çözünebilir renkli bileşiklerdir. Sıvıların ve plastiklerin boyanmasında kullanılır.
Kükürt boyalar	Kükürt yada sodyum polisülfid ile aromatik aminlerin ve fenollerin ısıtılmasıyla yapılan ucuz polimerik boyalardır. Çözünebilir form tekstilde uygulanabilirken çözünemeyen polimer oksidasyonla yeniden üretilir.
Vat boyalar	Kumaşlara çözünebilir bileşik olarak uygulanır ve boyanın çözünemeyen, tamamen renkli formuna oksitlenir. Esas olarak pamukta kullanılır.

1.4.2. Kullanım yada uygulama alanlarına göre bazı boyalar

1.4.2.1. Reaktif boyalar: Daha az bir oranda yün ve naylonda kullanılmasına rağmen bu boyalar çoğunlukta pamuktaki ipliğe kovalent bağ ile bağlanırlar. Reaktif boyaların direkt boyalara karşı önemli bir avantajı, kimyasal yapılarının daha basit olması ve boyalarının daha parlak olmasıdır. Parlak renkleri, düşük enerji tüketimi ile kolay uygulama teknikleri ve suya dayanıklı olmalarından dolayı tekstil endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Aksu, 2005; Hu, 1992; Sumathi ve Manju, 2000). Temel reaktif boya sınıfları; azo, trifendioaksin, ftalosiyanın, formazan, ve antrakinondur. Reaktif boyalar tipik olarak azo-dayalı kromoforların vinil sülfan, klorotriazin, trikloroprimidin, diflorokloroprimidin gibi reaktif grupların kombinasyonlarıdır (Aksu, 2005).

1.4.2.2. Dispers boyalar: Bu boyalar sulu dispersiyondan hidrofobik ipliklerle olan uygulamalar için suda çözünmeyen iyonik olmayan boyalardır. Bunlar öncelikle polyester ve daha az olarak da naylon, selüloz, selüloz asetat ve akrilik iplerde kullanılmaktadır. Bu sınıftaki boyaların çoğu stilben, ftalosiyanın ve oksazinlerle birlikte poliazo bileşiklerdir (Hunger, 2003). Dispers boyalar sucul ortamda iyonlaşmaz ve bazı dispers boyalar biyolojik birikim eğilimindedir. Kimyasal kararlılığı ve düşük biyolojik yıkım nedeniyle bu boyaların içeren atıksuyun geleneksel biyolojik atıksu arıtım sistemleri ile arıtılması etkin değildir (Banat vd., 1996; Aksu, 2005).

1.4.2.3. Sabit (vat) boyalar: Bu suda çözünebilen boyalar temelde selülozik ipliklere uygulanmaktadır. Bu boyaların temel kimyasal sınıfları ise antrokinonlar ve indigolardır (Hunger, 2003).

1.4.2.4. Kükürt boyalar: Sayı olarak daha küçük bir boya grubudur (Hunger, 2003).

1.4.2.5. Katyonik (temel) boyalar: Suda çözünebilen bu katyonik boyalar, kağıt, poliakrilonitril, modifiye naylon ve polyestere uygulanmaktadır. Temel sınıfları; diazahemisiyanin, triarilmetan, siyanin, hemisiyanin, tiazin, oksazin ve akridindir (Hunger, 2003).

1.4.2.6. Asit boyalar: Suda çözünebilen anyonik boyalar naylon, yün, ipek ve modifiye akriliklere uygulanmaktadır. Kağıt, deri, mürekkep püskürtmeli baskılama, besin ve kozmetikte kullanılmaktadır (Hunger, 2003).

1.4.2.7. Solvent boyalar: Bu boyalar suda çözünemeyen fakat çözücüde çözünebilen boyalardır. Boyalar temelde azo ve antrakinondur fakat ftalosiyanın ve triarilmetan boyalar da kullanılmaktadır (Hunger, 2003).

1.4.3. Tekstil atıksularındaki boyar maddelerin önemi

Tekstil endüstrisi başta olmak üzere birçok sektörde her yıl büyük miktarlarda boya üretilmekte ve uygulanmaktadır. Sentetik boyalar, organik kirleticilerin bir grubudur (Aksu, 2005). Yıllık üretimi 700000 tonun üzerinde olan 100000 den fazla ticari boya vardır ve bunun yaklaşık %15'i boyama işlemi esnasında kalmaktadır. Çıkış suyundaki iz konsantrasyondaki boya bile estetik açıdan istenmeyen bir durumdur. Bu durum sucul yaşamda ve insan sağlığının bozulmasında ciddi problemlere neden olmaktadır (Khataee ve Kasiri, 2010). Tekstil endüstrisi atık suları boyalar ve boyama işlemleriyle ilişkili olan organoklorlu pestisitlerden ağır metaller kadar birçok kirletici maddeden oluşan kompleks bir karışımdır (McMullan vd., 2001; Correia vd., 1994). Tekstil ve boyar madde endüstrilerinin boyar madde içeren atıksuları en zor işlenen atıksulardan biridir (Srinivasan ve Viraraghavan, 2010). Tekstil boyama ve boya üretim endüstrileri arttıkça bu endüstrilerin çevreye boşalttıkları atıksular da artmaktadır. Uygulama sırasında boyama işlemindeki yetersizlik yüksek miktarda boyar maddenin direkt çevreye boşaltılması ile sonuçlanmaktadır (Rai vd., 2005, McMullan vd., 2001).

Renk önemli bir kirlilik etmenidir (Banat vd., 1996). Çünkü tekstil fabrikası atıksuyu içerisindeki renk içerdiği boyar maddeden gelmektedir. Boyar maddelerin toksik ve genotoksik etkileri rapor edilmiştir (Birhanlı ve Ozmen, 2005; Dogan vd., 2005). Bununla birlikte, yüzey sularında renklenmeye neden olabilmeleri önemli bir problemdir. Renkli atık sular çevreye boşaltılmadan önce renk giderimi şarttır. Suda çok küçük miktarlarda dahi bulunan boyar madde (bazı boyalar için 1ppm den daha az) gözle görünebilir niteliktedir ve göllerde, derelerde ve diğer su kaynaklarında estetik görünümü, su berraklığını ve gaz çözünürlüğünü etkilemektedir. Ayrıca renk,

güneş ışığının suya girişine engel olup fotosentezi, sucul canlıların gelişimini engellemektedir (Banat vd., 1996). Atıksulardan rengin uzaklaştırılması çoğu zaman BOİ (Biyolojik Oksijen İstemi)'nin temel bölümü olan renksiz organik maddelerin uzaklaştırılmasından daha da önemlidir (Banat vd., 1996; Robinson vd., 2001).

1.4.4. Renk giderim yöntemleri

Endüstriyel tekstil atıksularının renginin giderimi biyolojik arıtım sonrası uygulanan ozonlama (%50-60 renk giderimi), flokülasyon-filtrasyon (%80'in üzerinde renk giderimi) ve kalsiyum hidrosülfite ile alkalileştirme ile yapılmaktadır. Boyalı atıksuların muamelesi ve renginin giderimi geniş pH aralıkları, tuz konsantrasyonları ve kimyasal yapılarından dolayı ciddi problemler taşımaktadır (Balan ve Monteiro, 2001). Renk gideriminde kullanılan bazı metodlar Çizelge 1.10'da verilmiştir.

Çizelge 1.10. Renk gideriminde kullanılan metodlar (Hao vd., 2000)

Tip	İşlem	Örnek
Fiziksel	Membran filtrasyon Flotasyon	Nanofiltrasyon Elektroflotasyon
Elektrokimyasal	Oksidasyon/redüksiyon	Elektro-koagülasyon, elektro-oksidasyon, elektro-flotasyon
Kimyasal	Koagülasyon/çökelme Klorlama/ozonlama Adsorpsiyon Nemli hava oksidasyonu Fenton aracılı oksidasyon Redüksiyon İyon değişim İyon çifti ekstraksiyonu	Demir/alüminyum, polimerli yada polimersiz kalsiyum oksit Cl ₂ , NaOCl, ozon Karbon veya diğer düşük maliyetli materyaller Yüksek sıcaklık ve basınç H ₂ O ₂ /Fe(II) Na ₂ S ₂ O ₄ Anyon değişim reçinesi Sülfonik gruplarla reaksiyona girip hidrofobik iyon çiftleri oluşturan ve organik ortamda biriken aminler
Fotokatalitik	UV;H ₂ O ₂	UV/H ₂ O ₂ , UV/O ₃ , UV/TiO ₂
Biyolojik	Anaerobik, aerobik, anoksik	Aktif çamur, funguslar

Fiziksel ve kimyasal metodlarla renk giderimi, atık su hacmi az olduğunda etkilidir. Bu nedenle de küçük ölçekli çalışmalarda kullanılmaktadır. Bu metodlardaki diğer bir sınırlayıcı faktör ise yüksek maliyetli olmasıdır. Bu nedenlerden dolayı da fiziko-kimyasal metodların kullanımı sınırlıdır (Robinson vd., 2001). Çizelge 1.11’de fiziksel ve kimyasal metodlardan bazıları ve bu metodların avantaj ve dezavantajları görülmektedir.

Çizelge 1.11. Fiziksel ve kimyasal işlemlerde renk gideriminde uygulama metodları (Pearce vd., 2003)

Fiziksel ve kimyasal metodlar	Avantajları	Dezavantajları
Oksidasyon	Hızlı işlem	Yüksek enerji tüketimi ve yan ürün oluşumu
Adsorpsiyon	Boyanın büyük miktarının iyi bir şekilde uzaklaştırılması	Adsorban gereksinimi
Membran teknolojileri	Tüm boya tiplerinin uzaklaştırılması	Yoğun atık üretimi
Koagülasyon/flokülasyon	Ekonomik olarak uygunluk	Yüksek miktarda atık üretimi

Atıksuların muamelesi ve renginin giderimi için düşük maliyetinden dolayı en etkili olanı biyolojik sistemlerdir. Biyolojik sistemler, biyolojik ve kimyasal oksijen istemini geleneksel aerobik biyolojik yıkım ile düşürmektedir. Beyaz çürükçül funguslar, kompleks enzimatik sistemleri ile farklı kirleticileri parçalayabilme yeteneğine sahiptir. Aromatik hidrokarbonlar, pestisitler, organoklorlular, boyalar etkin bir şekilde karbondioksit kadar yıkılabilmektedir (Barr ve Aust, 1997; Balan ve Monteiro, 2001).

1.4.5. Biyolojik renk giderimi yöntemleri

Boyar maddeler biyolojik yıkıma dirençli olduğundan, geleneksel biyolojik yöntemler renk gideriminde yetersiz kalmaktadır. Bazı funguslar, bakteriler ve algler gibi birçok mikroorganizma renk giderim yeteneğine sahiptir (Fu ve Viraraghavan, 2001). Boyar maddeleri yıkabilen beyaz çürükçül fungus türlerinin kullanımı ile

biyolojik yöntemlerle renk giderimi işlemi önem kazanmıştır (Banat vd., 1996, Yesilada vd. 2002, Yesilada vd. 2003). Beyaz çürükçül funguslarla boyaların renginin giderimi ilk çalışmaları arasında Glenn ve Gold çalışması sayılabilir (Gleen ve Gold, 1983). Boyar madde renk gideriminden sorumlu olan bazı mikroorganizmalar Çizelge 1.12’de verilmiştir.

Özellikle beyaz çürükçül fungusların ürettiği lignolitik enzimlerin (ör: lakkaz) boyar madde renk giderim kapasitesi alternatif biyolojik katalizörleri sağlamıştır (Mazmancı ve Ünyayar, 2010, Yesilada, 1995c; Yesilada ve Özcan, 1998; Yesilada vd. 2010). Tekstil fabrikası atıksularının biyolojik iyileştirmesinde pek çok uygulama yetersiz olduğundan (Rodríguez Couto ve Toca-Herrera, 2006), farklı kimyasal yapılardaki boyar maddeleri yıkabilme potansiyelinden dolayı lakkaza dayalı uygulamalar ilgi çekmektedir (Hou vd., 2004; Salony vd., 2006; Abadulla vd., 2000).

Çizelge 1.12. Mikroorganizmalarla renk giderimi

Mikroorganizma	Boya	Referans
Fungus		
<i>Ganoderma lucidum</i>	Remazol brilliant mavi R	Zilly vd., 2011
<i>Thelephora</i> sp.	Turuncu G , Kongo kırmızı, Amido Siyah 10B	Selvam vd., 2003
<i>Trametes versicolor</i>	Reaktif Siyah 5, Reaktif Kırmızı 198	Borchert ve Libra, 2001
<i>Trametes trogii</i>	Remazol brilliant mavi R	Mechichi vd., 2006
<i>Coriolus versicolor</i>	Turuncu II	Yeşilada ve Özcan, 1998
<i>Funalia trogii</i>	Astrazon Kırmızı FBL	Yesilada vd., 2002
<i>Phanerochaete sordida</i>	Reaktif Kırmızı 120	Harazono vd., 2003
<i>Pleurotus Florida</i>	Reaktif Mavi 198	Sathishkumar vd., 2010
Bakteri		
<i>Enterobacter</i> sp. EC3	Reaktif Siyah 5	Wang vd., 2009a
<i>Citrobacter</i> sp. CK3	Reaktif Kırmızı 180	Wang vd., 2009b
<i>Bacillus</i> sp. YZU1	Reaktif Siyah 5	Wang vd., 2012
<i>Pseudomonas</i> sp. SUK1	Reaktif Kırmızı BLI	Kalyani vd., 2008
Alg		
<i>Chlorella vulgaris</i>	Tectilon Sarı 2G	Acuner ve Dilek, 2004

Yukarıda belirtilenlere bağlı olarak bu çalışmada amaç, yeni izole edilmiş beyaz çürükçül fungusların (*Funalia trogii*, *Ganoderma lucidum* ve *Trametes versicolor*) katı substrat fermentasyonu sürecinde lakkaz üretim yeteneklerinin test edilmesi ve farklı destek/katı substratlar, nemlendirme ajanları, nemlendirme oranı, kültür koşulları ve indükleyicilerin lakkaz üretimine etkisinin saptanmasıdır. Aynı

zamanda, çalışmada tava tipi fermentör ortamında fungusların lakkaz üretimleri optimum koşullarda test edilerek laboratuvar ölçekli fermentör ortamında da lakkaz üretimi ortaya konulacaktır. Bununla birlikte elde edilen ham lakkaz enzimi kaynaklarının biyoteknolojik uygulamalarda oldukça önemli olan aktivite ve kararlılıklarının saptanması ve ayrıca tekstil boyar maddelerinden biri olan Remazol Brilliant Blue R (RB19)'nin renginin giderilebilirliğinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Rosales vd., (2002), *Trametes hirsuta*'yı elma, portakal, patates kabuğu gibi farklı yiyecek atıkları üzerinde üreterek bu ortamlarda elde edilen lakkaz aktivitelerini karşılaştırmıştır. Naylon sünger üzerinde fungus üretiltiğinde 5.günde 779 U/L lakkaz aktivitesi bulunmuştur. Arpa kepeğini katı substrat olarak kullandıklarında 8. günde 2247 U/L, elma kabuğunda 5.günde 3148 U/L, portakal kabuğunda ise üretimin 6. gününde 3437 U/L lakkaz aktivitesi tespit edilmiştir. En yüksek lakkaz aktivitesi ise patates kabuklarının katı substrat olarak kullanılan ortamda 8 gün inkübasyonda sonrasında 5372 U/L olarak belirlenmiştir. Katı substrat olarak yiyecek atıklarını kullandıkları tüm ortamlarda naylon süngerin kullanıldığı ortama göre oldukça yüksek enzim aktiviteleri tespit edilmiştir.

İki farklı *Panus tigrinus* soyunun (M609RQY ve M109RQY) 3 farklı tarım endüstrisi atığında (pirinç samanı, pirinç kabuğu ve kassava atığı) üretiltiği çalışmada ligninolitik enzim aktivitesi test edilmiştir. Yapılan çalışmada, lakkaz üretimi en iyi pirinç kabuğu ortamında saptanmıştır. Bu ortamda elde edilen en yüksek lakkaz aktivitesi *Panus tigrinus* M109RQY soyu ile 10. günde 2556 U/L olarak rapor edilmiştir (Ruqayyah vd., 2013).

Giorgio vd. (2012) odun parçaları ve talaş üzerinde ürettikleri beyaz çürükçül fungusların lakkaz üretimlerini araştırmışlar ve en yüksek lakkaz aktivitesini talaş üzerinde üretilen *T. villosa* BAFC 2755 ile 1.417 ± 0.153 U/gsubstrat olarak belirlemişlerdir.

Verma ve Madamwar (2002)'ın yaptıkları çalışmada, maun ağacı kabuğu, buğday kepeği ve şeker kamışı posası atıkları ile *P. ostreatus* and *P. chrysosporium*'un üretiltiği KSF koşullarında ligninolitik enzim üretimi araştırılmıştır. Bu atıklar, bol miktarda bulunmaları, ucuz olmaları ve ligninolitik enzim üretiminde etkin olmaları açısından tercih edilmiştir. Yapılan çalışmada en yüksek lakkaz aktivitesi (772 U/g) inkübasyonun 25. gününde ve 28°C'de, maun ağacı kabuğu ve buğday kepeğinin 1:1 oranında karıştırıldığı ve *P. ostreatus*+*P. chrysosporium*'un üretiltiği ortamdan elde edilmiştir.

Risdianto vd. (2012) katı substrat olarak meyve atıkları, pirinç samanı, mısır koçanı ve pirinç kabuğunu, beyaz çürükçül fungus olarak da *Marasmius* sp, *Trametes hirsuta*, *Trametes versicolor* and *Phanerochaete chrysosporium*'u kullandıkları çalışmada en yüksek lakkaz aktivitesine sahip olan fungusun *Marasmius* sp.

olduğunu ve en yüksek lakkaz aktivitesinin de (1116.11 U/L), pirinç samanının ortamında elde edildiğini tespit etmişlerdir.

Mazumder vd. (2009) *Pleurotus ostreatus*'un lakkaz üretimini katı faz ve sıvı fermentasyon koşullarında karşılaştırmışlardır. Bunun için destek materyal olarak poliüretan köpüğü kullanılmış ve patates özütü, dekstrozu ve maya özütü ortamında çalışma yürütülmüştür. En yüksek lakkaz aktivitesi KSF ortamında 3×10^5 U/L olarak belirlenirken sıvı fermentasyon ortamında $1,5 \times 10^5$ U/L olarak belirlenmiştir. Aynı zamanda indükleyicilerin etkisi de test edilmiş ve test edilen indükleyicilerin (bakır ve ferulik asit gibi) lakkaz aktivitesini arttırdığı gözlenmiştir. KSF ortamına bakır ilavesinin lakkaz aktivitesini yaklaşık %30 oranında arttırdığı görülmüştür.

Phanerochaete chrysosporium NCIM 1197'nin buğday kepeği üzerinde üretildiği çalışmada en yüksek lakkaz aktivitesi inkübasyonun 5. gününde 48.89 U/L olarak belirlenmiştir. Aynı çalışmada statik sıvı kültürler ve laboratuvar ölçekli biyoreaktör kullanılarak lakkaz aktivitesi ölçülmüş ve elde edilen lakkaz aktivite değerlerinin KSF ortamındaki lakkaz aktivite değerinden düşük olduğu belirlenmiştir (Gnanamani vd., 2006).

Diğer bir çalışmada ise, Stajić vd. (2006) farklı *Pleurotus* soyları ile lakkaz üretimini katı ve sıvı fermentasyon ortamlarında test etmişlerdir. *P.ostreatus* 493 asma talaşında üretildiğinde inkübasyonunun 10. gününde 2144.6 U/L lakkaz aktivitesi belirlenmiştir. *P.ostreatus* 494 ile üretimde ise en yüksek lakkaz aktivitesi inkübasyonun 7. gününde 378 U/L olarak yine asma talaşı üzerinde belirlenmiştir. *P.pulmonarius* 572 üretici mikroorganizma olarak kullanıldığında ise en yüksek aktivite 10. günde 391 U/L olarak belirtilmiştir.

Yapılan bir diğer çalışmada ise *Pleurotus ostreatus* HP-1'in lakkaz üretimine farklı kültür şartlarının ve indükleyicilerin etkisi araştırılmıştır. Substratın tipi ve konsantrasyonu, inokulum miktarı, nem içeriği, pH, sürfektan varlığı, sıcaklık ve azot kaynağı gibi kültür parametreleri optimize edilmiştir. Substrat olarak; buğday samanı, buğday kepeği, pirinç kepeği ve şeker kamışı posası denenmiştir. Nem miktarı olarak ise %40-80 arası nem miktarları uygulanmıştır. pH 3.0-9.0 ve sıcaklık değeri olarak da 20-50°C aralığı test edilmiştir. Sürfektan olarak ise Tween 20 ve Tween 80, 0.005-0.02 g l⁻¹ aralığında denenmiştir. En yüksek lakkaz aktivitesi 3952 U g⁻¹ olarak buğday samanı, %60 nem, pH 5.0, 0.015 g l⁻¹ sürfektan, azot kaynağı (her biri için 10 mM konsantrasyonda L-asparaginaz ve NH₄NO₃ kombinasyonu) ve 28°C

inkübasyon sıcaklığı ile elde edilmiştir. Lakkaz aktivitesi ise optimum koşullarda 0.28 mM bakır sülfat ilavesi ile 14189 U g⁻¹'ye ulaşmıştır (Patel vd., 2009).

Hasmin (2012) yapmış olduğu çalışmada KSF sürecinde lakkaz üretiminde en etkin olan koşulları belirlemiştir. Öncelikle üretici mikroorganizmayı belirlemek için talaş üzerinde üretilen farklı fungusları (*Trichoderma* sp., *Fusarium* sp., *Rhizoctonia solani*, *Pleutorus ostreatus*) lakkaz üretim yetenekleri açısından karşılaştırdığında en yüksek lakkaz aktivitesini *P.ostreatus* ortamında 0.15 U/mL olarak elde etmiştir. Ardından nem oranı (1:1, 1:2, 1:3, 1:4) test edildiğinde 1:3 nem oranında 0.27 U/mL lakkaz aktivitesi belirlenmiştir. İnkübasyon zamanının (0-30 gün) etkisine bakıldığında ise lakkaz aktivitesi değeri inkübasyonun 15.gününde 0,395 U/mL'ye ulaşmıştır. Son olarak ise sıcaklık optimizasyonunda 20-37°C aralığında en etkin lakkaz aktivitesi 25°C'de 0,69 U/mL olarak rapor edilmiştir.

Aydinoğlu ve Sargın (2013) ise çalışmalarında zeytin yapraklarını katı kullanmış ve bu katı substrat üzerinde *Trametes versicolor* FPRL 28A INI suşunu çeşitli koşullarda üreterek etkin lakkaz üretimi koşullarını belirlemişlerdir. Çalışmada farklı substrat büyüklüğü (0.3–0.4, 1.4–1.6, 3.4–4.4 mm), %1 oranında çeşitli inorganik azot (amonyum nitrat, sodyum nitrat, amonyum klorür, diamonyum hidrojen fosfat, amonyum sülfat) ve farklı organik azot kaynakları (üre, maya özütü, malt çili, soya unu) ve farklı nem içeriklerinin (%75, %80) lakkaz aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışmada en yüksek lakkaz aktivitesi ise (276.62 U/g kuru substrat) %80 nem içeriği, 1.4-1.6 substratın partikül büyüklüğü, %1 maya özütü ilave edilen ortamda elde edilmiştir.

Iqbal vd. (2011) *Trametes versicolor* IBL-04 ile yaptıkları çalışmada, öncelikle farklı katı substratların lakkaz aktivitesi üzerine etkisini araştırmışlardır. Buğday samanı, pirinç samanı, muz atığı, mısır koçanı, mısır atığı ve şeker kamışı posası gibi lignoselülozlu substratları içeren KSF ortamlarında lakkaz aktivitesini test ettiklerinde en yüksek lakkaz aktivitesini üretimin 5.gününde pirinç samanı ortamında 49.7 U/mL olarak belirlemişlerdir. En uygun nem oranı olarak %66.6 nem oranıyla pirinç samanı ortamı saptanmıştır. Bu ortamda 5 gün inkübasyon sonucunda en yüksek lakkaz aktivitesi 51.5 U/mL olarak elde edilmiştir. Optimum pH ve sıcaklık da sırasıyla pH 4 ve 30°C olarak belirlenmiştir.

Neifar vd. (2009)'in yaptıkları çalışmada buğday kepeği üzerinde ürettikleri *Fomes fomentarius* MUCL 35117 ortamlarına bakır ilavesinin etkisini araştırılmıştır.

Bakır içermeyen ortamlarda en yüksek lakkaz aktivitesi üretimin 13. gününde 6400 U/L iken 2mmol bakır ilavesi ile aktivite 27864 U/L' ye ulaşmıştır.

Karp vd. (2012) yaptıkları çalışmada, *Pleurotus ostreatus*'u şeker kamışı posası içeren ortamlarda üretmişler ve bu ortamlarda indükleyicilerin etkisini ve azot miktarının etkisini araştırmışlardır. Sonuçta 5 g/L maya özütü, 150 µM bakır sülfat ve 2mM ferulik asit ilavesiyle en yüksek lakkaz aktivitesi 167 U/g olarak belirlenmiştir. Aynı zamanda yapılan zimogram çalışması sonucunda altı lakkaz izoformu gösterilmiştir.

Papinutti ve Forchiassin (2007) *Fomes sclerodermeus*'un katı substrat fermentasyonu sürecinde enzim üretimini araştırmışlardır. Kullanılan substrata bağlı olarak enzim aktivitelerinin de değiştiği gösterilmiştir. Soya kepeği ortamında lakkaz aktivitesi üretimin son gününde en yüksek değerine ulaşmıştır (520 U g⁻¹). Soya ve buğday kepeği 1:1 oranında karıştırıldığında ise lakkaz aktivitesi 18. günde 69 U g⁻¹ olarak bulunmuştur.

Rosales vd. (2007) ise çalışmalarında erlen ve biyoreaktör ortamlarında lakkaz aktivitelerini karşılaştırmışlardır. *Trametes hirsuta* 2.5 g portakal kabuğu/15mLkültür ortamında üretildiğinde şiringaldazin ve bakır sülfat gibi indükleyicilerin lakkaz üretimine etkisi belirlenmiştir. Erlen kültürlerinde yürütülen çalışmada en yüksek lakkaz aktivitesi 2.5 g portakal kabuğu ortamına 5mM bakır sülfat ilave edildiğinde 31786 U/L olarak rapor edilmiştir. Uygulama 250mL'lik sabit yataklı reaktör ve 1.8L hacimli tava tipi reaktör ortamlarında denenmiştir. Sabit yataklı reaktörde 3000U/L, tava tipi reaktör ortamında ise 12000 U/L lakkaz aktivite değerleri belirlenmiştir.

Osma vd. (2011b)'nin çalışmalarında *Trametes pubescens* erlen ortamında farklı substratlar (muz kabuğu, buğday kepeği, ayçiçeği kabuğu) üzerinde üretilerek lakkaz aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Yapılan çalışmada ayçiçeği kabuğu ve buğday kepeği ortamlarında 10 gün inkübasyon sonucu 7750 U/L ve 2500 U/L lakkaz aktivite değerlerine elde edilmiştir. Muz kabuğu ortamında ise lakkaz aktivitesi inkübasyonun 20. gününde 1600 U/L olarak belirlenmiştir. Ayçiçeği kabuğunu ortamında farklı indükleyicilerin ilavesi ile lakkaz aktivitesi indüklenmeye çalışılmıştır. İnkübasyonun 3. gününde ortama 0.5 mM Cu⁺² ilavesi sonucu 25773 U/L lakkaz aktivitesi değerine ulaşılmıştır. Bununla birlikte farklı günlerde ilave edilen hindistancevizi yağı, soya yağı, tannik asit, ksilidin gibi indükleyicileri içeren tüm ortamlarda indükleyici madde içermeyen ayçiçeği kabuğu ortamlarında daha

yüksek lakkaz aktivite değerleri elde edilmiştir. Aynı ortamlar tava tipi fermentör ortamında denendiğinde ise yalnızca ayçekirdeği kabuğu ortamında 7130 U/L lakkaz aktivitesi elde edilmiştir. Bu ortama Cu^{+2} ve tannik asit ilave edildiğinde ise lakkaz aktivitesi 31610 U/L değerindedir. Aynı indükleyiciler inkübasyonun 3.gününde eklendiğinde ise 41135 U/L lakkaz aktivitesi belirlenmiştir. Yapılan çalışmada KSF ve SF ortamları maliyet açısından da karşılaştırılmış ve erlen kültürlerinde tüm KSF ortamlarında maliyetin daha düşük olduğu belirtilmiştir.

Tava tipi fermentör ve daldırma tip fermentörün lakkaz üretimi açısından karşılaştırıldığı çalışmada iki farklı laboratuvar ölçekli fermentör ortamında Rodríguez Couto vd. (2006) *Trametes hirsuta*'yı üzüm tohumları üzerinde üretmişlerdir. En yüksek lakkaz aktivitesi tava tipi fermentör ortamında 3×10^5 nkat/L olarak belirtilmiştir. Çalışmada tava tipi fermentör ortamından elde edilen ham enzim ile İndigo Karmin, Metil Turuncu, Metil Yeşil, Malaşit Yeşili ve Brom Fenol Mavi boyalarının renginin giderimi test edilmiştir. Çalışmada boyaların yapılarının renk giderimindeki önemi belirtilirken en etkin renk giderimi Brom Fenol Mavi boyasında 20.saatte yaklaşık %100 olarak belirtilmiştir.

Özşölen vd., (2010) yaptıkları çalışmada 13 farklı substratı (buğday kepeği, arpa kepeği, *Pinus nigra* kozalağı, talaş, mısır kepeği, yulaf, pirinç kepeği, kanola, kurtulmuş çay, yonca samanı, ayçiçeği sapı, soya fasulyesi posası, kurtulmuş tahıl) KSF ortamında lakkaz aktivitesi açısından test etmişlerdir. Üretici mikroorganizmalar olarak ise *Trametes versicolor* (ATCC 200801), *Phanerochaete chrysosporium* (ME 446) ve *Pleurotus sajor-caju* seçilmiştir. En yüksek lakkaz aktivitesi ise *T.versicolor*'ın yonca samanında üretildiği ortamda 22.36 U/mL ve buğday kepeği ve arpa kepeği ortamlarında ise 19.77 U/L ve 18.66 U/L lakkaz aktiviteleri belirlenmiştir. Aynı çalışmada elde edilen ham enzim kaynağı ile 4°C'de pH aktivite ve kararlılık çalışmaları da araştırılmıştır. pH kararlılığına bakıldığında ham lakkazın 24. saatte pH 2-5 aralığında %45-60 lakkaz aktivite kaybı varken bu değer pH 6-8 aralığında %65-70 kalan aktivite belirlenmiştir. Sıcaklığın 30 dakika inkübasyondan sonra ham lakkazın aktivitesi üzerine etkisine bakıldığında pH 4.5 ile 20-50°C aralığında 30 dakikada enzimin kararlı olduğu rapor edilmiş, 60°C'de %40, 90°C' de ise %17.1 kalan aktivite gösterilmiştir.

Irshad vd., (2011)'ın çalışmalarında *Shyzyphyllum commune* IBL-06 muz saplarında farklı koşullarda üretilerek optimum koşullar belirlenmiştir. Çalışmada optimum KSF koşulları; pH 4.5, 35°C, %60 nem içeriği, 3mL inokulum miktarı,

15:1 C:N kaynağı, 1mL ABTS (1mM), 1mL CuSO₄(1mM) ile sağlanmıştır. Çalışmada elde edilen ham lakkazın aktivite ve kararlılık çalışmaları da yapılmıştır. Buna göre ham lakkaz için en yüksek lakkaz aktivitesi pH 6'da belirlirken enzimin pH 6-7 aralığında kararlı kaldığı belirtilmiştir. Ham enzim 40°C'de en yüksek lakkaz aktivitesini sağlarken, 30-35°C arasında da 24 saat boyunca kararlı kalabildiği raporlanmıştır.

Stoilova vd. (2010) yaptıkları çalışmada *Trametes versicolor*'ın ham lakkaz enziminin özelliklerini belirlemişlerdir. pH'nın enzim aktivitesi üzerine etkisine bakıldığında ham enzim pH 1-7 arasında çalışılmış ve maksimum lakkaz aktivitesi pH 4.5'da bulunmuştur. Ham lakkaz enzimi 48 saat sonunda yalnızca %3.4 aktivite kaybıyla en kararlı pH 4.5'da kalırken, kararlılığını en hızlı pH 7'de kaybetmiştir. En yüksek lakkaz aktivitesi 45°C'de belirlenmiş ve enzim, 40°C'de 48 saat boyunca kararlı kalırken, 50°C' de 6 saat sonunda aktivite kaybı %53.4 iken 48 saat sonunda %90'a ulaşmıştır. 60°C' de ise 6. saatte aktivite kaybı %58 iken, 48. saatin sonunda aktivite kalmamıştır. 70°C'de ise 5 dakikada sonunda aktivitenin %53.5'i kaybedilirken, 20 dakika sonra aktivite saptanamamıştır.

De Souza vd., (2002)'nin *Pleurotus pulmonarius*'u buğday kepeğinde ürettikleri çalışmada optimum ne seviyesi %75 olarak belirlenmiştir. Ham lakkaz enzimi ile yapılan çalışmada 50°C ve pH 6.5 lakkaz aktivitesinin en yüksek olduğu değerler olarak bulunmuştur. Ayrıca ham lakkazın kararlılığını test ettiklerinde ise ham lakkazın 50°C'de 6 saatten fazla süre kararlı kalabildiği belirtilmiştir. 55 ve 60°C'de ise 1 saat inkübasyon sonucu kalan aktiviteler sırasıyla %73 ve %18 olarak rapor edilmiştir. Ham lakkaz enziminin alkali pH'larda kararlı kalırken asidik pH'larda kararlılığını hızla kaybettiği bildirilmiştir.

Sathishkumar vd. (2010), çalışmalarında *Pleurotus ostreatus*'un lakkaz üretimini test etmişler ve bu amaçla, muz kabuğu, mandalina kabuğu ve kavun kabuğunu substrat olarak kullanmışlardır. Çalışmada muz kabuğu, lakkaz üretimi için en etkin katı substrat olarak belirlenmiştir (5.4 U/g). Muz kabuğu, mandalina kabuğu ve kavun kabuğu farklı oranlarda test edilmiş ve 5:2:3 oranında kullanıldığında lakkaz aktivitesinin 6.8 U/g'ye yükseldiği görülmüştür. Bu ortam üzerinde üretilen *P.florida* lakkazı Reaktif mavi 198'in renginin giderimi çalışmalarında kullanılmış ve en uygun pH, sıcaklık, enzim konsantrasyonu ve boyar madde konsantrasyonu araştırılmıştır. Reaktif mavi 198'in renginin gideriminde düşük boyar madde konsantrasyonlarında etkin renk giderimi belirlenirken, 150

ppm'in üzerinde renk giderimi azalmıştır. En etkin renk giderimi pH 4.5, 60°C ve 1.2 U/mL enzim konsantrasyonunda elde edilmiştir.

Rodriguez-Couto vd. (2004) iki *Trametes* türünün arpa kepeği ortamında lakkaz üretimini test etmişler ve başlangıç amonyum konsantrasyonu 0.2g/L olduğunda arpa kepeği kültürlerindeki lakkaz aktivitesi hareketsiz bir destek olan poliüretan köpük kullanılan kültürlerden 13 kat daha yüksek bulunmuştur. Bunun da arpa samanında lakkaz aktivitesini indükleyen selüloz içeriğinden dolayı olduğu ileri sürülmüştür. Arpa kepeği üzerinde üretilen *T.versicolor* ve *T.hirsuta* kültürlerine 2,5-ksilidin ve bakır ilave edilerek lakkaz üretimi arttırılmaya çalışılmıştır. 1mM bakır sülfat ve 2mM ksilidin eklenmiş *T.hirsuta* kültürlerinde 5 kat daha yüksek lakkaz aktivite değerleri elde edilmiştir. Son olarak da, *T.hirsuta* kültürlerinden elde edilen ekstraselüler sıvı ile bazı sentetik boyaların in vitro renginin giderimi araştırılmıştır. Renk gideriminde pH'nın etkisine bakıldığında pH 4 te pH 5'e göre daha etkin renk giderimi tespit edilmiştir. Bromfenol mavisi, İndigo karmin ve Metil turuncu'ya göre Poly R-478'in yıkıma karşı daha dirençli olduğu gösterilmiştir.

Gómez vd., (2005)'de hindistancevizi kabuğu ve arpa kepeğini substrat olarak kullanmış ve *Coriolopsis rigida*'nın bu ortamda lakkaz üretimine bakmışlardır. Arpa kepeği kullanıldığında, hindistancevizi kabuğu kullanılarak elde edilen lakkaz aktivitesi değerinden 25 kat daha yüksek bir aktivite elde edildiği belirtilmiştir (3.10^5 nkat/L). Buna ilaveten 1mM bakır eklenmiş arpa kepeği ortamından elde edilen ekstraselüler sıvının; Indigo karmin, Metil turuncu ve Metil yeşil gibi farklı yapıdaki boyaların rengini giderim aktivitesi belirlenmiştir. Metil turuncu'nun renk giderimine daha dirençli olduğu tespit edilmiştir. Indigo karminin ise 4 saat sonunda renginin neredeyse tamamı giderilebilmiştir.

Boran ve Yeşilada (2011)'nin çalışmalarında farklı nemlendirme ajanları ile buğday kepeği nemlendirilmiş ve *Funalia trogii* ve *Trametes versicolor* üretilerek lakkaz aktivitesi belirlenmiştir. Zengin içeriğe sahip olmaları ve ucuz olmaları açısından nemlendirme sıvısı olarak farklı konsantrasyonlarda zeytinyağı fabrikası atıksuyu (ZYFA), vinas (alkol fabrikası atık suyu), peyniraltı suyu ve melas test edilmiştir. Çalışmaya göre ZYFA ve vinas, en uygun ve etkin nemlendirme ajanları olarak seçilmiştir. Aynı zamanda indükleyicilerin de (bakır ve ksilidin) lakkaz üretimine etkisi test edilmiştir. Çalışmada en yüksek lakkaz aktivitesi 5mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ilave edilen %25 vinas ile nemlendirilmiş buğday kepeğinde üretilen *F.trogii* ortamında 14.18 U/mL olarak saptanmıştır. Çalışmada aynı zamanda katı

substrat kültürlerinden elde edilen süpernatantlar (ham lakkaz enzimleri) ile azo boya olan Reaktif mavi 171'in renginin giderimi araştırılmıştır. *F.trogii* ham lakkazı ile bir dakikada %66 renk giderimi elde edilirken, bu oran *T.versicolor* için %14 olarak belirlenmiştir.

Rodríguez-Couto vd. (2005) ile lakkaz üretimini test etmişlerdir. *Trametes hirsuta*'yı katı substrat olarak hindistan cevizi kabuğunun bulunduğu ortamda maksimum lakkaz aktivitesi 333.280 nkat/L olarak belirlenirken, 2mM bakır ilavesiyle lakkaz aktivitesinin yaklaşık 3 kat bir artışla 920.895 nkat/L -gözülmüştür. Elde edilen kültür filtratıyla Lissamine yeşil B'nin 12 saat muamelesi sonrasında %42-66 renk giderimi saptanmıştır.

Hou vd. (2004), *Pleurotus ostreatus*'un lakkaz üretiminin artırılmasını ve bu enzimin antrokinon boyasının renginin gideriminde kullanılmasını araştırmışlardır. Çalışmada *P. ostreatus* 32 çalkalamalı ve statik koşullarda farklı karbon ve azot kaynağı içeren sıvı ortamlarda üretildiğinde süpernatanda yalnızca lakkaz aktivitesi belirlenmiştir. Çalkalamalı ve azotça zengin ortamda lakkaz aktivitesi gözlenmezken statik ve azotça zengin ortamda lakkaz aktivitesi yaklaşık 40 U/ml olarak tespit edilmiştir. Statik ve azot sınırlı ortamda ise lakkaz aktivitesi çalkalamalı ve azot sınırlı ortamdakinden yaklaşık 2 kat daha yüksek gözlenmiştir. Karbon ve azot kaynağı olarak sellobiyoz ve pepton kullanıldığında daha yüksek aktivite gözlenmiştir. Bu durumda üreme ve lakkaz üretimine bakıldığında statik kültürün çalkalamalı kültürden daha etkin olduğu ve azot sınırlı kültürün lakkaz üretiminin daha iyi olduğu belirtilmiştir. İndükleyicilerin lakkaz üretimi üzerine etkisi de incelenmiştir. Yapılan çalışmada ABTS (1 mM) en iyi lakkaz indükleyicisi olarak belirlenmiştir. Ortama 1mM Cu⁺² ilavesinin de lakkaz üretimini pozitif yönde etkilediği gösterilmiş ve lakkaz aktivitesi 360 U/ml olarak saptanmıştır. Ayrıca antrokinon boyası SN4R'nin renginin, ham lakkaz (30 U/ml) ile etkin bir şekilde giderilebildiği de (%66) gösterilmiştir. Mediator olarak ABTS (%0.16) kullanımıyla renk gideriminin % 90'a ulaştığı rapor edilmiştir.

Osma vd. (2007) muz kabuğunu kullandıkları çalışmada *Trametes pubescens* CBS696.94 lakkaz aktivitesini üretimin üçüncü gününde 63 U/L olarak, sonunda ise 1570 U/L olarak belirlemişlerdir. Buna ilaveten elde edilen ekstraselüler sıvının yıkım yeteneği de test edilmiştir. Bu amaçla antrakınon bir boya olan Remazol Brilliant Mavi R (RBBR) ve trifenilmetan bir boya olan Metil Yeşil (MG)'in renginin invitro giderimini test etmişlerdir. Dört saat sonunda yukarıda söz

edilen ilk boyanın %57 ikinci boyanın ise %41'nin giderildiğini bildirmişlerdir. Renk giderim uygulaması ticari lakkazla yapıldığında ise, *T.pubescens*'in muz kabuğu kullanılarak elde edilen lakkaz ile renk giderim aktivitesine kıyasla RBBR'de düşük olduğu ancak MG'de renk giderimlerinin birbirine yakın olduğu gözlenmiştir.

Rodriguez vd. (1999) lakkaz ile endüstriyel boyaların renginin giderimi amaçlı yaptıkları çalışmada 23 boyar madde kullandılar. Yulaf taneleri üzerinde üretilen 16 farklı fungal soyun katı ortam kültürlerinden elde edilen ham özütlerinde lakkaz, mangan peroksidaz, lignin peroksidaz ve aril alkol oksidaz belirlenmiştir. Karışık sıvı kültürlerle karşılaştırıldığında yulaf taneleri katı ortam kültürlerinde daha yüksek lakkaz ve mangan peroksidaz belirlenmiştir. Ham özütünün renk giderim aktivitesinin, yalnızca lakkaz ile ilişkili olduğu gözlenmiştir.

Selvam vd., (2003) beyaz çürükçül fungus azo boyaların ve boya endüstrisi çıkış suyunun renginin *Thelophora* sp. ile giderimi çalışmasında, Turuncu G, Kongo kırmızısı ve Amido siyah 10B azo boyaları kullanılmıştır. Enzimatik renk giderimi çalışmasında 15 U/L de lakkaz ile turuncu G'nin renginin %19'unun uzaklaştırıldığı belirlenmiştir. Kongo kırmızısı ve Amido black 10B'nin renginin lakkaz ile giderimi çalışmalarında ise en yüksek renk giderimleri %12 ve %15 olarak belirtilmiştir.

Murugesan vd. (2007) yaptıkları çalışmada *Ganoderma lucidum* KMK2'nin ham lakkaz enziminin tekstil boyalarının renginin giderim potansiyelini araştırmışlardır. *G.lucidum* ham enzimi, antrakinon bir boya olan Remazol Brilliant Mavi R'nin rengini mediatör eklenmeden etkin şekilde giderirken diazo bir boya olan Remazol Siyah 5 için mediatör gerekmektedir. Ham lakkaz enzimi ile, 50 mg/L RBBR için 1 saat sonunda %40.5 renk giderimi elde edilirken olurken RB-5 için renk gideriminin %43.6 olduğu görülmüştür. Boya konsantrasyonu 100 mg/L olduğu durumda ise 1 saat sonunda RBBR ve RB-5 için renk gideriminin sırasıyla %39.6 ve %18.3 olarak saptanmıştır.

Sun vd. (2009) kolza bitkisi sapı, buğday kepeği, fıstık kabuğu ve pirinç kabuğu gibi farklı katı substrat ortamlarında üretilen *Trametes* sp. AH28-2'den elde edilen ham enzim ile renk giderimi çalışmaları yapmışlardır. En yüksek lakkaz aktivitesi %60 kolza bitkisi sapı, %20 fıstık kabuğu ve %20 buğday kepeği ortamında 2.10×10^6 U/kg olarak elde edilmiştir. Ham lakkaz enzimi ile Levafix Mavi CA ve Cibacron Mavi FN-R (1.0 g/l)'nin rengi 15 saatte tümüyle giderilmiştir.

Zeng vd. (2011) yaptıkları çalışmada farklı tarım endüstrisi atıkları üzerinde üretilen yeni izole edilmiş *Trametes troglia* ortamlarından elde edilen ham enzim

kaynağının sentetik boyarların renginin giderim yeteneğini test etmişlerdir. Çalışmada ham lakkazın renk giderimindeki etkinliği ortaya konmuştur. Renk giderim yüzdeleri ise herhangi bir redoks mediatör eklenmeden Remazol Brilliant Mavi R (50mg/L), Reaktif Mavi 4 (35mg/L), Asit Mavi 129 (83.3mg/L) için sırasıyla %85.2, %69.6 ve %45.6 olarak rapor edilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Funguslar

Çalışmada Basidiomycetes sınıfına dahil olan beyaz çürükçül funguslardan yeni izole edilmiş *Funalia trogii*, *Ganoderma lucidum* ve *Trametes versicolor* kullanıldı. *F.trogii*, Dr. Özfer Yeşilada tarafından toplanıp, saf kültür olarak izole edilmiştir. *G.lucidum* ve *T.versicolor* ise Dr. Hakan Allı tarafından toplanmış ve Dr. Özfer Yeşilada tarafından saf kültür olarak izole edilmişlerdir. Bu funguslar halen İnönü Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji/Biyoteknoloji laboratuvarında saf kültür olarak muhafaza edilmektedir.

3.2. Çalışmada Kullanılan Fungusların Üretimi ve Devamlılığının Sağlanması

Çalışmada kullanılan fungusların devamlılığını sağlamak için, funguslar Sabouraud dextrose agar (SDA) plaklarında 30°C’de 4-6 gün inkübe edildi ve üç haftada bir taze besiyerine pasajlama yapıldı. Fungus kültürleri kullanılıncaya kadar 4°C’ de buzdolabında muhafaza edildi.

3.3. Çalışmada Kullanılacak Stok Fungus Kültürlerinin Hazırlanması

SDA plaklarında üremiş olan fungus kültürlerinden yatık agara pasajlama yapıldıktan sonra, kültürler 30°C’de 4-6 gün inkübe edildi. Yatık agarda üretilen fungus kültürlerine 10 ml steril distile su eklenerek misel süspansiyonu hazırlandı. Misel süspansiyonun 5 ml alınarak 100 ml Sabouraud dextrose broth (SDB)/250 ml olacak şekilde ekim yapıldı ve 30°C’de 150 rpm’de çalkalamalı etüvde 7 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kültür, düşük devirde homojenize edilerek çalışma amacına uygun olarak ekim yapıldı.

3.4. Çalışmada Kullanılan Nemlendirme Sıvılarının Hazırlanması

Çalışmada esas nemlendirme sıvısı olarak steril distile su kullanıldı. Bunun dışında, katı substrat fermentasyonunda (KSF) indükleyicilerin etkisi araştırılırken %1, %5 ve %10’luk melas çözeltileri, 1g/L, 5g/L ve 20g/L malt özütü içeren distile su, 1 mM, 5mM ve 10mM Cu içeren distile su da nemlendirme sıvısı olarak kullanıldı. Nemlendirme ortamları 121°C’de 1,5 atm. basınç altında 20 dakika süresince otoklavda steril edildi.

3.5. Çalışmada Kullanılan Katı Substratlar

Lakkaz üretim çalışmasının ilk aşamasında farklı substratlar kullanılmıştır. Bu aşamada kullanılan katı substratlar; buğday kepeği, atık yaprak, atık kavak talaşı, atık ceviz kabuğu, atık kozalak, atık buğday samanı ve atık mısır koçanıdır. Bu substratlardan yaprak, ceviz kabuğu, kavak talaşı, kozalak ve mısır koçanı öğütüldükten sonra kullanılmıştır.

Çalışmada ileri aşamalarında ise katı substrat olarak buğday kepeği kullanıldı. Buğday kepeği besin içeriği, kolay erişilebilirliği, maliyetinin düşük olması ve iyi bir lakkaz üretim besiyeri olduğu saptandığı için tercih edildi. Lakkaz üretiminin indüklenmesi, buğday kepeğine yaprak veya soya unu eklenerek de test edilmiştir. Çalışma sürecinde kullanılan katı substratlar 50°C’de 24 saat kurutulduktan sonra kullanılmıştır.

3.6. Katı Substrat Ortamının Hazırlanması, Ekim ve Üretim

3.6.1. Erlenlerde katı substrat uygulamaları

Öncelikle 5g buğday kepeği/15mL distile su, 5g yaprak/15mL distile su, 4g kavak talaşı/15mL distile su, 5g kozalak/10mL distile su, 10g ceviz kabuğu/7mL distile su, 3g mısır koçanı/15mL distile su, 3g buğday samanı/15mL distile su olacak şekilde 250 mL’ lik erlenlerde hazırlandı. Diğer çalışmalar içinse 1:1, 2:1, 4:1 ve 9:1 oranlarında buğday kepeği:yaprak ve yine aynı oranlarda buğday kepeği:soya unu karıştırılarak 5 g katı substrat/15 ml distile su olacak şekilde hazırlandı. Daha sonra örnekler 121°C’de 1,5 atm. basınç altında 45 dakika süresince otoklavda steril edildi. Hazırlanan ortamlara *F.trogii*, *G.lucidum* ve *T.versicolor* stok kültürlerinden 2’şer ml ekildi ve 30°C’de statik olarak 5 gün süresince inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyonun 5. gününde her bir erlene 40 ml steril distile su eklendi ve kültür bir öze ile karıştırılarak parçalandı. Erlenler 30°C ve 200 rpm’de 1 saat süre ile çalkalamalı etüvde çalkalandıktan sonra süzüldü. Süzüntü, 6000 rpm’de 3 dakika santrifüj edildi ve elde edilen süpernatant, lakkaz aktivitesi ölçümünde kullanıldı.

3.6.2. Tava tipi fermentörde katı substrat uygulamaları

Tava tipi fermentör olarak 15 cm x 27 cm ölçülerinde cam kaplar kullanıldı. Bu fermentörlerde katı substrat olarak en yüksek enzim aktivitesinin tespit edildiği 1:1 buğday kepeği:soya unu karışımı kullanıldı. Nemlendirme sıvısı olarak yalnızca distile su, 10mM bakır içeren distile su ve %10'luk melas kullanıldı. Daha sonra, tava tipi fermentördeki ortamlar 121°C'de 1.5 atmosfer basınç altında 45 dakika otoklavda steril edildi. Ardından her bir ortama, 20'şer mL *F.trogii*, *G.lucidum* ve *T.versicolor* ekildi ve kültürler 30°C'de statik olarak 5 gün süresince inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyonun 5. gününde her bir reaktör içindeki kültür, 2 eşit parçaya bölünüp erlenlere transfer edildi ve her bir kültüre 200'şer ml steril distile su eklendi. Kültür, öze ile karıştırılarak parçalandı ve bu kültürleri içeren erlenler 30°C ve 200 rpm'de 1 saat süre ile çalkalamalı etüvde çalkalandıktan sonra süzüldü. Süzüntü, 6000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi ve süpernatant, lakkaz aktivitesi ölçümünde kullanıldı.

3.7. Agar Plaklarında Lakkaz Üretiminin Gösterilmesi

SDA plakları, 0.5 mM 2,2'-azinodi-[3-ethyl-benzo-thiazolin-sulphonate] (ABTS) içerecek şekilde hazırlandı ve plakların ortasına 1cm çapında fungus ekildi. Kültürler, 30°C'de statik olarak inkübasyona bırakıldı. Enzim-substrat ilişkisi makroskobik olarak renk değişimi izlenerek saptandı.

3.8. Çeşitli Koşulların KSF'de Lakkaz Üretimine Etkisi

3.8.1. Sıcaklığın etkisi

Sıcaklığın lakkaz üretimine etkisi test etmek amacıyla *F.trogii*, *G.lucidum* ve *T.versicolor*' un buğday kepeği ve kozalak ortamlarındaki lakkaz aktiviteleri 20, 25, 30, 35 ve 40°C'de belirlendi. Kültürler ilgili sıcaklıklarda 5 gün statik olarak inkübasyona bırakıldıktan sonra lakkaz aktivitesi ölçüldü.

3.8.2. pH'nın etkisi

Nemlendirme sıvısı olarak pH'ları pH 3-7 arasında hazırlanan ortamlar kullanıldı. pH'nın lakkaz üretimine etkisini test etmek amacıyla farklı pH'lardaki

nemlendirme sıvısıyla nemlendirilmiş buğday kepeği ve kozalak ortamlarında üretilen 3 fungusun lakkaz aktiviteleri belirlendi. Kùltürler 30°C’de 5 gün boyunca statik olarak inkübe edildikten sonra lakkaz aktivitesi ölçüldü.

3.8.3. Nem miktarının etkisi

Buğday kepeği %50, %75 ve %85 olacak şekilde pH 6 tamponu ile nemlendirildi ve fungus ekimi yapıldıktan sonra kùltürler 30°C’de 5 gün boyunca statik olarak inkübe edildi. Daha sonra, lakkaz aktivitesi ölçüldü.

3.9. İndükleyicilerin Lakkaz Üretimine Etkisinin Belirlenmesi

3.9.1. Bakırın etkisi

Farklı konsantrasyonlarda (1, 5 ve 10 mM CuSO₄.5H₂O) bakır içeren distile su ortamları ile nemlendirilmiş 5 g buğday kepeği ortamları 121°C’de 1,5 atm. basınç altında 45 dakika otoklavize edildi ve bu ortamlara ekim yapıp 5 gün inkübasyona bırakıldı.

3.9.2. Maya özütünün etkisi

Farklı miktarlarda maya özütü (1 g/L, 5 g/L ve 20 g/L) içeren distile su ile nemlendirilmiş 5g buğday kepeği ortamları 121°C’de 1,5 atm. basınç altında 45 dakika otoklavize edildi ve fungus ekimi yapıldıktan sonra 5 gün inkübasyona bırakıldı.

3.9.3. Soya ununun etkisi

Farklı oranlarda soya unu içeren buğday kepeği ortamlarında (1:1, 2:1, 4:1 ve 9:1) soya ununun lakkaz üretimine etkisi test edildi. Bu amaçla hazırlanan ortamlar distile su ile nemlendirilip 121°C’de 1.5 atm. basınç altında 45 dakika otoklavize edildi ve fungus ekimi yapıp 5 gün inkübasyona bırakıldı.

3.9.4. Yaprığın etkisi

Yaprak ilavesinin lakkaz üretimine etkisini test etmek amacıyla buğday kepeği ortamlarına farklı oranlarda olacak şekilde (1:1, 2:1, 4:1 ve 9:1) atık yaprak eklendi. Hazırlanan ortamlar distile su ile nemlendirilip 121°C’de 1,5 atm. basınç

altında 45 dakika otoklavize edildi ve fungus ekimi yapıldıktan sonra 5 gün inkübe edildi.

3.9.5. Melasın etkisi

Farklı konsantrasyonlarda melas (%1, %5 ve %10) içeren nemlendirme sıvısı ile nemlendirilen 5 g buğday kepeği, 121°C’de 1,5 atm. basınç altında 45 dakika otoklavize edildi. Daha sonra, ekim yapıp 30°C’de statik olarak inkübasyona bırakıldı.

3.9.6. Bakır içeren melasın etkisi

Bakır içeren melasın lakkaz üretimine etkisini test etmek için 10mM bakır içerecek şekilde hazırlanmış %10’luk melas nemlendirme sıvısı olarak hazırlandı. Yüksek enzim aktivitelerinin saptandığı buğday kepeği:soya unu (1:1) ve buğday kepeği:soya unu (2:1) ortamları, hazırlanan nemlendirme sıvısı ile nemlendirilerek 121°C ve 1,5 atm. basınç altında 45 dakika otoklavize edildi. Fungus ekimi yapıldıktan sonra kültürler 5 gün inkübe edildi.

3.10. Lakkaz Aktivitesinin Saptanması

Lakkaz aktivitesi 2,2’-azino-bis (3- etilbenz-tiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS)’ in oksidasyonuna bağlı olarak izlendi. Enzim aktivitesi ölçümünde reaksiyon karışımı sodyum asetat tamponu (100mM, pH 5.0), ABTS (5mM) ve uygun miktarda süpernatant içerecek şekilde hazırlandı ve 420 nm’de 1 dakikada oluşan absorbanst değişimi saptandı. 1 µmol substratı 1 dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarı 1 ünite olarak ifade edildi (Birhanli ve Yesilada, 2006; Boran ve Yesilada, 2011).

3.11. Ham Lakkaz Enziminin Aktivitesine Sıcaklık ve pH’nın Etkisinin Saptanması

3.11.1. Ham lakkaz aktivitesine sıcaklığın etkisi

Ham enzim aktivitesine sıcaklığın etkisinin test edilmesi amacıyla enzim aktivite ölçümleri farklı sıcaklıklarda (20-85°C) ve pH 5’te olacak şekilde yapıldı. Bunun için enzim aktiviteleri Kısım 3.10’da belirtildiği şekilde ölçülerek hesaplandı.

3.11.2. Ham lakkaz aktivitesine pH'nın etkisi

Ham enziminin aktivitesine pH'nın etkisinin test edilmesi için lakkaz aktivite ölçümleri farklı pH' larda (pH 2-7) hazırlanan tampon ortamlarında ve 30°C' de yürütüldü. Substrat olarak kullanılan ABTS de ilgili pH değeri ile aynı tampon ortamında hazırlanarak kullanıldı. Enzim aktivitesi Kısım 3.10' da belirtildiği şekilde ölçülerek hesaplandı.

3.12. Ham Lakkaz Enziminin Kararlılığına Sıcaklık ve pH'nın Etkisinin Saptanması

3.12.1. Sıcaklığın ham lakkaz enziminin kararlılığına etkisi

Sıcaklık kararlılık çalışmaları, farklı sıcaklık değerinde (4-80°C) ve farklı zaman aralıklarında (0-24 saat) bekletilen ham enzim kaynaklarının lakkaz aktivitelerinin pH 3'te ölçülmesiyle saptandı. Sonuçlar, % lakkaz aktivite değişimi olarak ifade edildi.

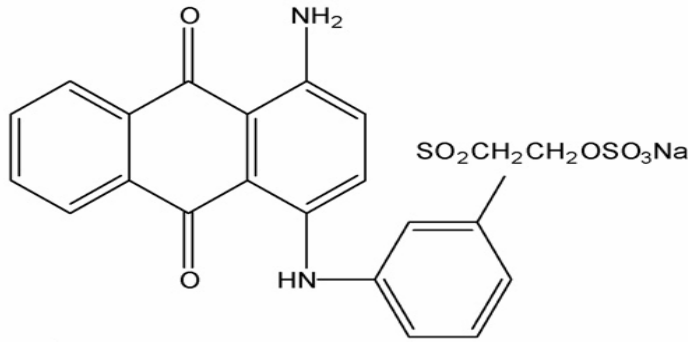
3.12.2. pH'nın ham lakkaz enziminin kararlılığına etkisi

Ham lakkaz enziminin kararlılığına pH'nın etkisinin test edilmesi amacıyla, çalışmalar pH 3-9 arasında hazırlanmış tampon ortamlarında yürütüldü ve farklı sürelerde (0-24 saat) ölçümler alınarak pH'nın kararlılık üzerine etkisi saptandı. Sonuçlar, % lakkaz aktivite değişimi olarak ifade edildi.

3.13. *Ganoderma lucidum* Ham Lakkaz Enzimi ile Renk Giderimi Çalışmaları

3.13.1. Çalışmada kullanılan boyar madde

Çalışmada boyar madde olarak kimyasal yapısına bağlı olarak antrakinon grubu bir boya olan Remazol Brilliant Blue R (RBBR) (RB 19) kullanıldı. RBBR'nin maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyu 592 nm olarak spektrofotometrede belirlendi. Kullanılan boyar maddenin yapısı Şekil 3.1'de görülmektedir.



Şekil 3.1. RB 19'un kimyasal yapısı (Murugesan vd., 2007)

3.13.2. Çalışmada kullanılan stok boyar maddenin hazırlanması

Çalışmada kullanılan RBBR boyası 5000 mg/L stok boya/distile su olacak şekilde hazırlandı ve çalışma amacına bağlı olarak aksi belirtilmediği müddetçe 100 ppm (son konsantrasyon) olacak şekilde kullanıldı.

3.13.3. Başlangıç pH'sının renk giderimine etkisi

Renk giderimi çalışmaları farklı pH' larda (2.5-6.0) yürütüldü. Bu amaçla, 100 ppm olacak şekilde stok boyar madde ve 100µL *G.lucidum*'un ham enzim kaynağı eklenerek 30°C'de zamana bağlı (0-300 saniye) renk giderimi spektrofotometrik olarak saptandı. Renk giderimi kontrole karşı % renk giderimi olarak ifade edildi.

3.13.4. Sıcaklığın renk giderimine etkisinin saptanması

Sıcaklığın renk giderimine etkisini saptamak için 100 ppm boyar madde içeren pH 2.5, 3.0 ve 3.5 tamponlarına 100µL enzim kaynağı eklendi ve farklı sıcaklıklarda (40, 50 ve 60°C) ve farklı zaman aralıklarında (0-300 saniye) 592 nm' deki absorbans değişimi saptandı. Renk giderimi kontrole karşı % renk giderimi olarak ifade edildi.

3.13.5. Zamana bağlı renk gideriminin saptanması

Renk gideriminin zamana bağlı değişimini belirlemek için en iyi renk gideriminin sağlandığı pH 3 ve 40°C'de farklı sürelerde (0, 5, 10, 20 ve 30 dakika) olmak üzere ölçümler yapıldı. Bu amaçla çalışmalar, 100µL ham enzim kaynağı ve

100 ppm boyar madde içeren reaksiyon ortamlarında yürütüldü. Renk giderimi kontrole karşı % renk giderimi olarak ifade edildi.

3.13.6. Ham enzim miktarının renk giderimine etkisinin saptanması

Enzim miktarının renk giderimine etkisini saptamak için 100 ppm boyar madde (pH 3) ve farklı miktarlarda ham enzim içerecek (50-400µL) şekilde hazırlanan reaksiyon karışımlarının 592 nm'deki renk değişimi, 40°C zamana bağlı olarak (0-20 dakika) belirlendi. Renk giderimi kontrole karşı % renk giderimi olarak ifade edildi.

3.13.7. Boya konsantrasyonunun renk giderimine etkisinin saptanması

Renk giderimine boya konsantrasyonunun etkisini belirlemek için farklı konsantrasyonlarda (50-400 ppm) RB 19 içeren ortamlara (pH 3) 100µL enzim eklendi ve 592 nm'de renk değişimi 40°C'de saptandı. Renk giderimi kontrole karşı % renk giderimi olarak ifade edildi.

Tüm çalışmalar en az üç tekrarlı olarak yürütülmüştür.

3.14. Doğal Jel Elektrofözezi Uygulaması

Biyolojik olarak aktif proteinlerin ayrılması için doğal poliakrilamid jel elektrofözezi çalışmaları yapılmıştır. Fungus kültür sıvıları doğal poliakrilamid jel kuyucuklarına yüklendikten sonra 40 mA'de yaklaşık 1 saat yürütülmüştür. Yürütme işlemi sonrası, jel 40 °C'de, ABTS içeren asetat tamponunda (pH 4.8) bekletilerek aktivite boyama işlemi yapılmış ve lakkaz aktivitesi incelenmiştir (Birhanli and Yesilada, 2010).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Lakkaz enzimi; geniş substrat özgüllüğü, ekstraselüler bir enzim olması, fenolik ve fenolik olmayan bileşikleri oksitleyebilmesi açısından enzim üretimi, biyolojik ağartma, biyolojik kağıt hamuru üretimi, endüstriyel atıksuların muamelesi, boyaların renginin giderimi gibi birçok alanda oldukça dikkat çeken ve kullanılan bir enzimdir (Toca-Herrera vd., 2001). Fakat bu işlemler için düşük maliyette ve yüksek miktarda enzim üretimi gerektiğinden uzun bir zamandan beri araştırmacıların ilgisi biyoteknolojik uygulamalarla yüksek miktarda enzim üretimine yönelmiştir (Yesilada, 1992). Katı substrat fermentasyonu (KSF) olarak da ifade edilen katı faz fermentasyonu (KFF) ile yüksek miktarda enzim üretimi yapılabilmektedir (Boran ve Yesilada, 2011). KSF işlemlerinde ağırlıklı olarak, lignosellülozlu ham maddeler olan tarımsal atıklar/ham maddeler katı substrat olarak kullanılmaktadır. Bu lignosellülozlu substratlar fungus için besin kaynağı sağlamalarının yanı sıra fungusun doğada yaşadığı sürece benzer bir tutunma yüzeyini de oluşturmaktadırlar. Bu tip atıkların kullanılması doğaya çıkan atık lignosellüloz kaynaklı kirlilik yükünü azaltmakta ve ayrıca düşük maliyetli ham madde sunmaktadır.

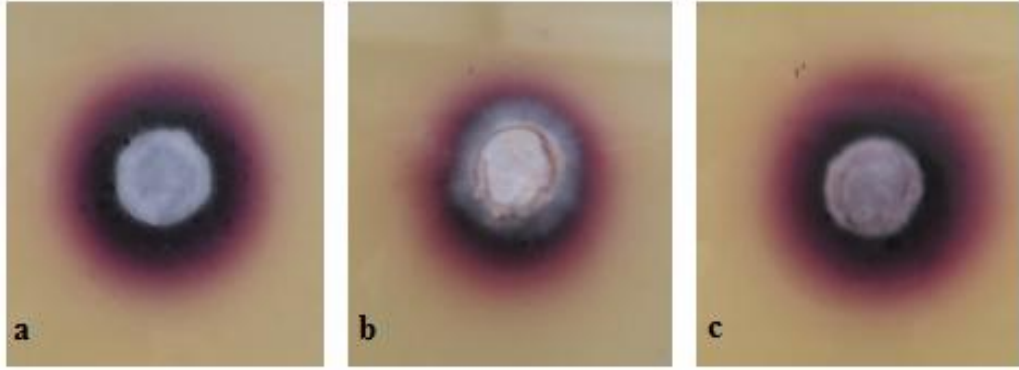
Tez çalışmasında çeşitli lignosellülozlu ham maddeler; fungus ve buna bağlı olarak lakkaz üretim amacıyla kullanılmış ve lakkaz üretiminin optimizasyonu çalışılmıştır. Bu amaçla farklı nemlendirme sıvıları ve farklı indükleyicilerin lakkaz üretimine etkisi test edilmiştir. Çalışmada ayrıca tava tipi fermentör modelinde de üretim araştırılmıştır. Tez kapsamında elde edilen ham lakkaz enzimlerinin aktivitesi ve kararlılığına, sıcaklık ve pH'nın etkisi de test edilmiştir. Elde edilen ham lakkaz örneğinin boyar madde renk giderim yeteneği de çalışılmıştır.

4.1. Çalışmada Kullanılan Fungusların Sabouroud Dekstroz Agar Ortamında Lakkaz Aktiviteleri

Tez çalışmasında öncelikle yeni izole edilmiş *Funalia trogii*, *Ganoderma lucidum* ve *Trametes versicolor*'ın 0.5mM 2,2'-azinodi-[3-ethyl-benzo-thiazolin-sulphonate] (ABTS) içeren Sabouroud Dekstroz Agar (SDA) ortamlarında lakkaz aktiviteleri izlenmiştir. Bu amaçla, 0.5mM ABTS içeren SDA ortamlarına 1cm çapında olacak şekilde funguslar ekilmiş ve örnekler 30°C'de statik olarak 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda lakkaz varlığı araştırılmıştır.

Fungusun lakkaz üretimine bağlı olarak ABTS oksidasyonu sonucu oluşacak mor renk lakkaz varlığının göstergesidir.

Kullanılan üç fungus da lakkaz enziminin ABTS oksidasyon aktivitesine bağlı olarak üredikleri alanda mor renk oluşturdular. Bu ön çalışma, çalışmada kullanılması planlanan fungusların lakkaz üreticisi olduklarını ortaya koydu (Şekil 4.1.a, b, c).



Şekil 4.1. ABTS içeren SDA ortamlarında *F.trogii* (a), *G.lucidum* (b) ve *T.versicolor*'da (c) lakkaz varlığı.

4.2. Katı Substrat Fermentasyonu Ortamlarında Optimizasyon Çalışmaları

KSF çalışmalarında üretim koşulları oldukça önemli olup fungusun enzim üretimini de önemli ölçüde etkilemektedir (Boran ve Yesilada, 2001). Bu amaçla, çalışmanın ilk aşamasında lignoselüloz kaynağı olan katı substrat, katı substratın nem seviyesi, ve ayrıca inkübasyon sıcaklığı ve ortamın başlangıç pH'sının fungusların lakkaz üretimine etkisi araştırılmıştır.

4.2.1. Farklı katı substrat içeren ortamlarda fungusların lakkaz üretimi

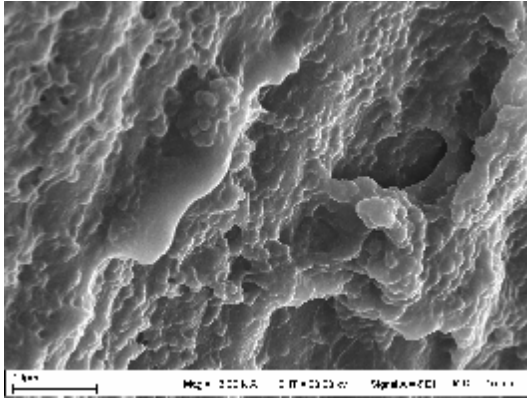
KSF işlemlerinde besinsel kaynak olarak ta rol oynadıklarından kullanılacak lignoselülozlu kaynak oldukça önemlidir. Bu nedenle, ilk olarak farklı lignoselüloz kaynağı olan katı substratlar belirlendi. Bu amaçla; çeşitli lignoselülozlu hammaddeler katı substrat olarak test edildi; buğday kepeği, atık yaprak, atık kavak talaşı, atık ceviz kabuğu, atık kozalak, atık buğday samanı ve atık mısır koçanı. *F.trogii*, *G.lucidum* ve *T.versicolor* lignoselülozlu atıklar üzerinde üretilerek fungusların KSF sürecinde lakkaz aktiviteleri araştırıldı. Şekil 4.2-4.4'te fungus

ekilmiş ve ekilmemiş buğday kepeği ortamlarının makroskobik olarak ve Taramalı Elektron Mikroskopundaki (SEM) fotoğrafları görülmektedir.

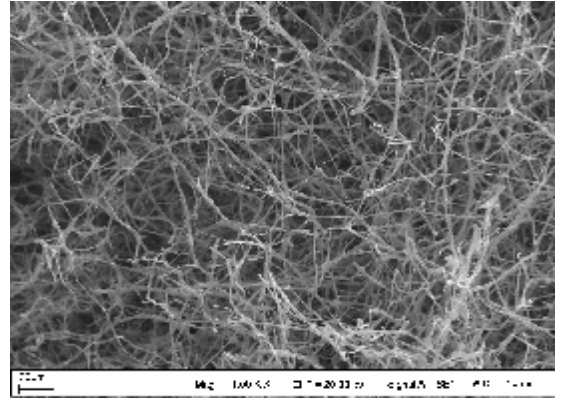


(a)

(c)



(b)



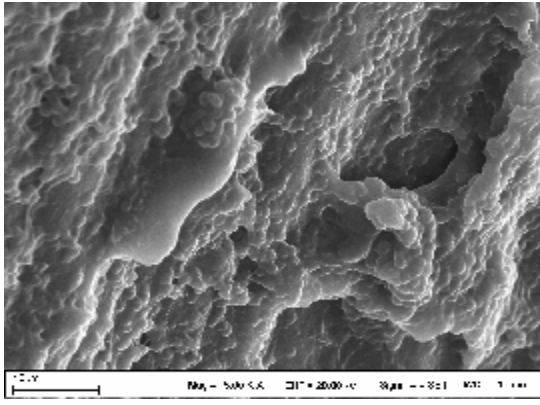
(d)

Şekil 4.2. Buğday kepeği ortamının makroskobik (a) ve SEM görüntüsü (b), buğday kepeği ortamında üretilmiş *F.trogii*'nin makroskobik (c) ve SEM görüntüsü (d)

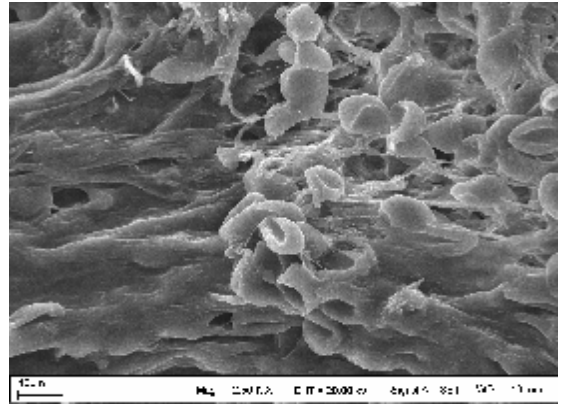


(a)

(c)



(b)



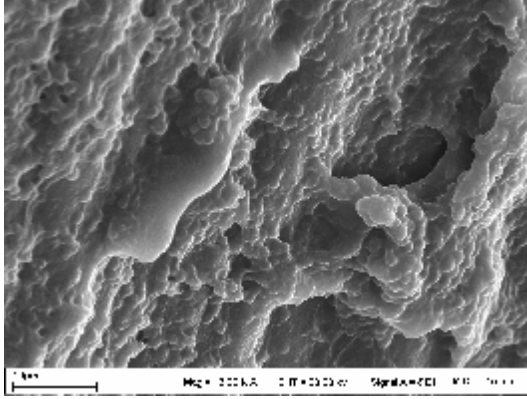
(d)

Şekil 4.3. Buğday kepeği ortamının makroskobik (a) ve SEM görüntüsü (b), buğday kepeği ortamında üretilmiş *G.lucidum*'un makroskobik (c) ve SEM görüntüsü (d)

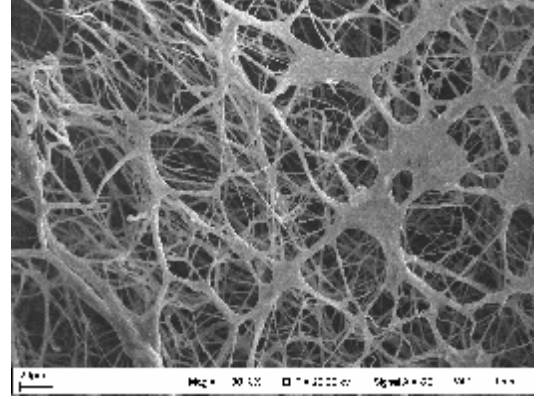


(a)

(c)



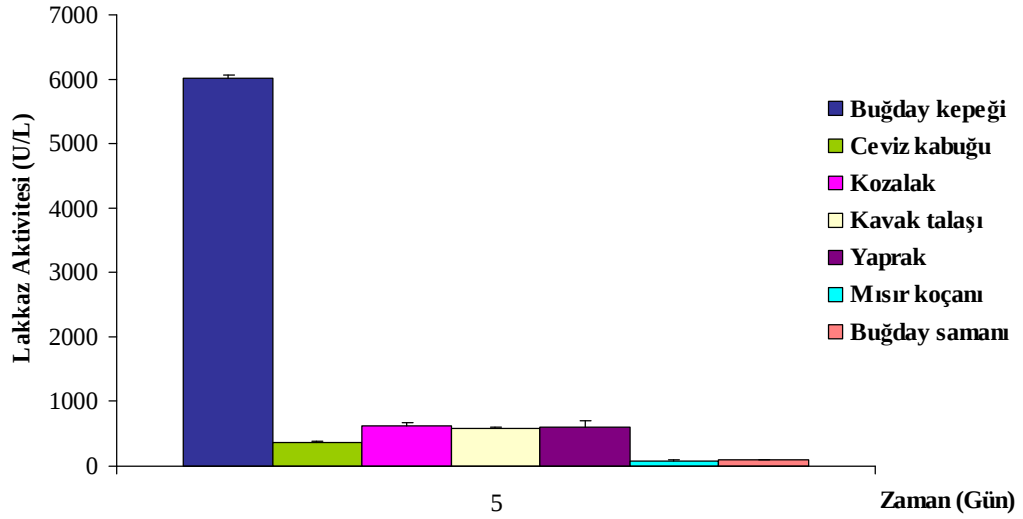
(b)



(d)

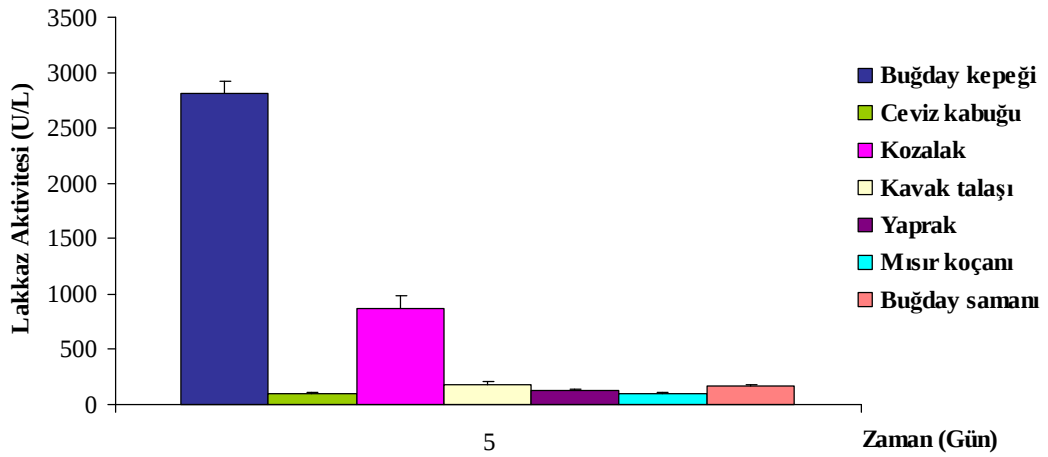
Şekil 4.4. Buğday kepeği ortamının makroskopik (a) ve SEM görüntüsü (b), buğday kepeği ortamında üretilmiş *T.versicolor*'ın makroskopik (c) ve SEM görüntüsü (d)

F.trogii'nin 30°C ve statik koşullarda üretildiği buğday kepeği ortamında en yüksek lakkaz aktivitesi 6008 ± 53 U/L olarak tespit edildi. Diğer lignoselülozlu atıkların kullanıldığı ortamlarda ise daha düşük lakkaz aktiviteleri saptandı. Kozalak ortamında 636 ± 450 U/L aktivite belirlendi (Şekil 4.5).



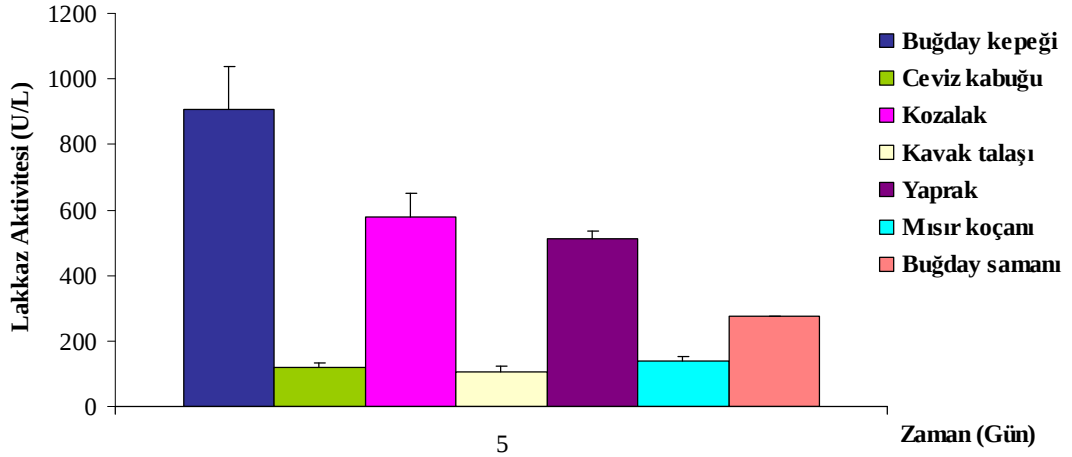
Şekil 4.5. Katı substrat fermentasyonu sürecinde *F. trogii* ile 5. günde elde edilen lakkaz aktivite değerleri

G.lucidum ile yapılan çalışmada da *F.trogii* ile yapılan çalışmayla benzer olarak en yüksek lakkaz aktiviteleri buğday kepeği ve kozalak ortamlarında belirlendi. Şekil 4.6'dan da görülebileceği gibi buğday kepeği ortamında 2814 ± 105 U/L, kozalağın kullanıldığı ortamda ise 873 ± 114 U/L lakkaz aktivitesi saptandı.



Şekil 4.6. Katı substrat fermentasyonu sürecinde *G.lucidum* ile 5. günde elde edilen lakkaz aktivite değerleri

T.versicolor ile yürütülen çalışmada en yüksek lakkaz aktiviteleri sırasıyla buğday kepeği, kozalak, yaprak ve buğday samanı ortamlarında saptandı. Bu değerler buğday kepeği ve kozalak için sırasıyla 906 ± 135 U/L ve 577 ± 730 U/L olarak tespit edildi (Şekil 4.7).



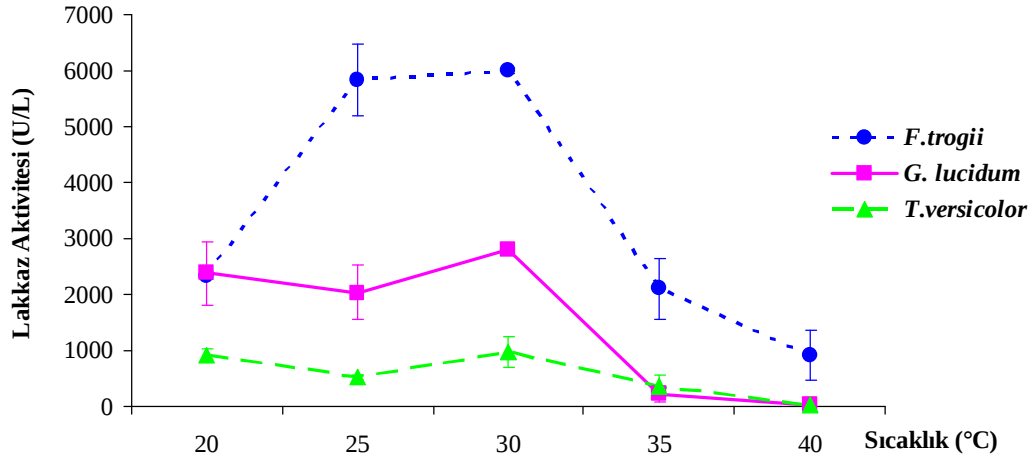
Şekil 4.7. Katı substrat fermentasyonu sürecinde *T.versicolor* ile 5. günde elde edilen lakkaz aktivite değerleri

Yapılan çalışmalardan görüldüğü gibi *F.trogii*, *G.lucidum* ve *T.versicolor*'la en yüksek lakkaz aktivitesi katı substrat olarak buğday kepeği içeren ortamlarda elde edildi. Aynı funguslarla inkübe edilen ortamlarda ikinci en yüksek lakkaz aktivitesi kozalak içeren ortamlarda belirlendi. Bu nedenle çalışmaların bundan sonraki aşamalarında katı substrat olarak buğday kepeği ve kozalak kullanılmıştır.

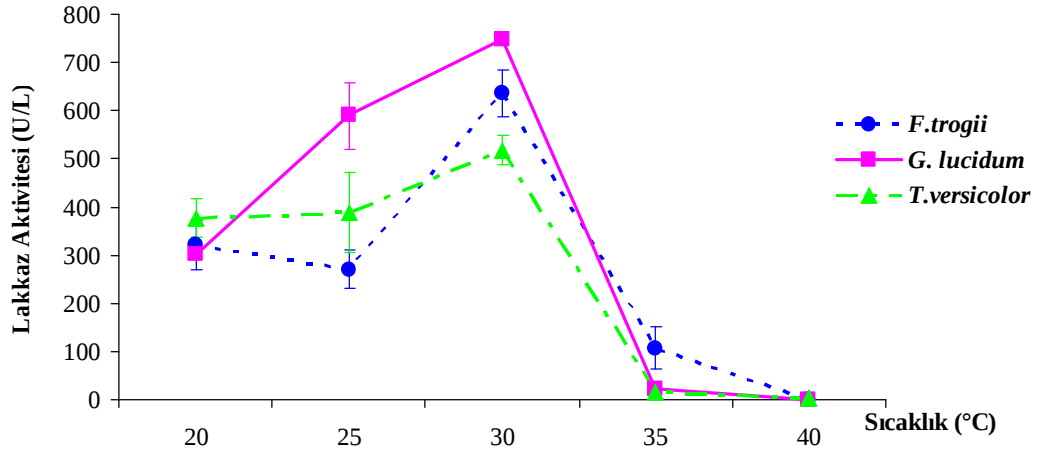
4.2.2. İnkübasyon sıcaklığının fungusların lakkaz üretimine etkisi

Sıcaklık, mikroorganizmaların üremesi ve gelişimini buna bağlı olarak da enzim aktivitesini etkileyen en önemli faktörlerden birisidir. Sıcaklık fungusların lakkaz üretimini de etkiler (Krishna, 2005). Bu nedenle farklı KSF ortamlarında en yüksek lakkaz üretimi için gerekli sıcaklık aralığı belirlenmiştir. Bu amaçla, 5 gün boyunca farklı sıcaklıklarda (20-40°C) üretim yapılmıştır. Buğday kepeği kullanılan ve *F.trogii*, *G.lucidum* ve *T.versicolor*'ın kültüre edildiği ortamlarda en yüksek lakkaz aktivitesi 30°C'de sırasıyla 6008 ± 53 U/L, 2814 ± 105 U/L, 906 ± 135 U/L

olarak saptandı (Şekil 4.8). Benzer olarak kozalağın kullanıldığı çalışmalarda da funguslar için en uygun sıcaklığın 30°C olduğu gözlemlendi (Şekil 4.9).



Şekil 4.8. İnkübasyon sıcaklığının distile su ile nemlendirilmiş buğday kepeği ortamında beş gün üretilen fungusların lakkaz üretimine etkisi

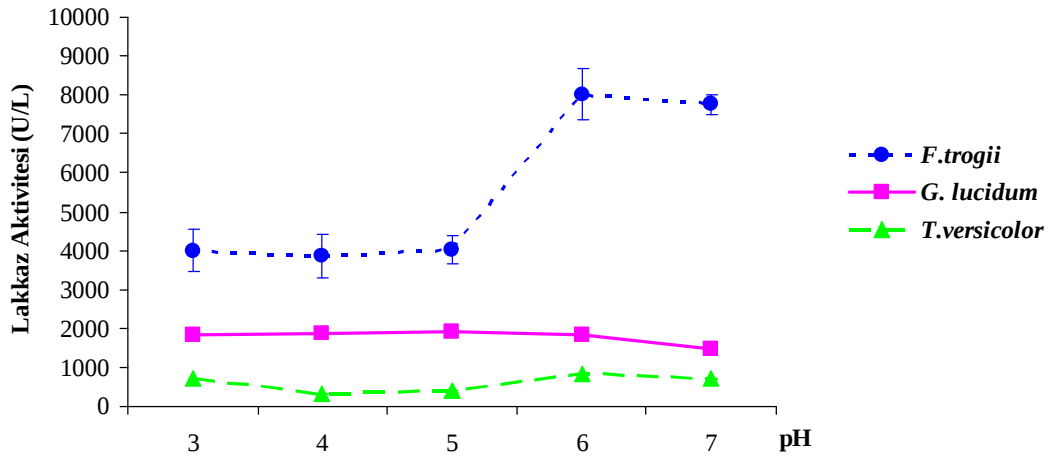


Şekil 4.9. İnkübasyon sıcaklığının distile su ile nemlendirilmiş kozalak ortamında beş gün üretilen fungusların lakkaz üretimine etkisi

Çalışma sonucu; *F.trogii*, *G.lucidum* ve *T.versicolor*'da lakkaz üretimi için optimum sıcaklığın 30°C olduğu saptandı.

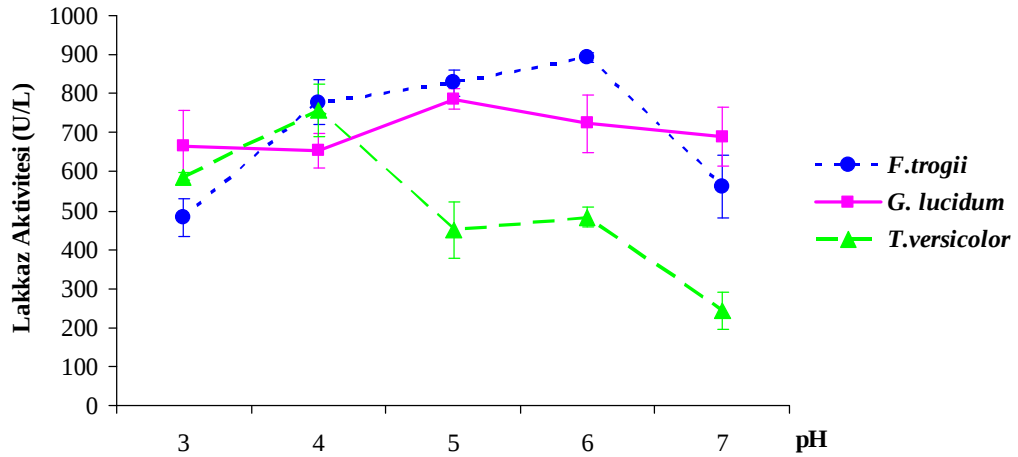
4.2.3. Başlangıç pH'sının fungusların lakkaz üretimine etkisi

Ortam pH'sı enzim üretimini etkileyen önemli bir faktördür (Krishna, 2005). Bu pH değeri, kullanılan fungus ve üretim şartlarına bağlı olarak değişebilmektedir. Bu nedenle, başlangıç pH'sının lakkaz üretimine etkisinin belirlenmesi amacıyla buğday kepeği ortamlarında çalışmalar yürütüldü. Yapılan çalışmada en yüksek lakkaz aktiviteleri *F.trogii* ve *T.versicolor* fungusları için pH 6'da sırasıyla 8017 ± 653 U/L ve 819 ± 14 U/L olarak tespit edilirken *G.lucidum*'da pH 5 ortamında 1925 ± 24 U/L olarak belirlendi (Şekil 4.10). Bununla birlikte pH 6 ortamıyla önemli bir farklılık gözlenmedi.



Şekil 4.10. Ortam pH'sının distile su ile nemlendirilmiş buğday kepeği ortamında beş gün üretilen fungusların lakkaz üretimine etkisi

Katı substrat olarak buğday kepeği yerine kozalak kullanılan çalışmalarda lakkaz aktiviteleri buğday kepeği ortamlarına göre daha düşük saptandı. *F.trogii* için buğday kepeği ortamı ile benzer şekilde en yüksek lakkaz aktivitesi pH 6 ortamında tespit edildi (893 ± 56 U/L). *G.lucidum*'da da buğday kepeği ortamında olduğu gibi pH 5'de 787 ± 28 U/L lakkaz aktivitesi belirlendi. *T.versicolor*'da kozalak ortamında en yüksek lakkaz aktivitesi pH 4'te (756 ± 67 U/L) saptandı (Şekil 4.11).



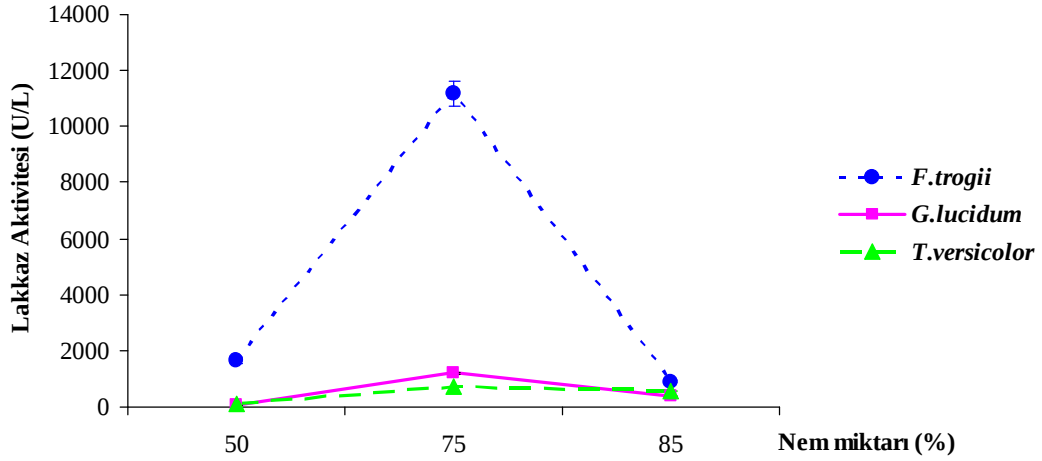
Şekil 4.11. Ortam pH'sının distile su ile nemlendirilmiş kozalak ortamında beş gün üretilen fungusların lakkaz üretimine etkisi

4.2.4. Nemlendirme oranının KSF sürecinde lakkaz aktivitesi üzerine etkisi

KSF, serbest suyun olmadığı ve katı substratlar üzerinde mikroorganizmaların üretildiği bir uygulama olması dolayısıyla kullanılacak olan katı substratı nemlendirmek için gerekli olan su miktarı oldukça önemlidir. Nemlendirme sıvısının gerekenden az ya da fazla olması enzim aktivitesini de etkiler. Çünkü düşük nem; besin difüzyonunu, mikrobiyal üremeyi, enzim kararlılığını ve substrata ulaşılabilirliği azaltmaktadır. Diğer yandan nem miktarı yüksek olduğunda ise partiküller bir araya yığılabilmekte, gaz transferi sınırlanabilmekte ve aynı zamanda bakterilerle rekabet artmaktadır (Krishna, 2005). Bu nedenle, optimum nem seviyesi önemlidir.

Optimum nem seviyesinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada buğday kepeğinin nemlendirilmesi için farklı nemlendirme sıvısı oranları (%50, %75 ve %85) denenmiştir. pH 6 tamponu ile nemlendirilen kültürler 30°C'de statik olarak üretildi. *F.trogii*, *G.lucidum* ve *T.versicolor*'ın 5 gün inkübe edildiği kültürlerde her üç fungus içinde lakkaz üretiminde en etkin olan nem miktarı %75 olarak sırasıyla 11190±435 U/L, 1206±18 ve 737±9 U/L olarak saptandı. Bu değerden düşük (%50) ve yüksek (%85) nemlendirme oranlarında lakkaz üretimi önemli oranda baskılandı

(Şekil 4.12). Yapılan çalışmalar sonucunda KSF sürecinde nem miktarının da bu funguslar için lakkaz üretimi açısından önemli olduğu görüldü.



Şekil 4.12. Nemlendirmenin buğday kepeği ortamında beş gün üretilen fungusların lakkaz üretimine etkisi

4.3. İndükleyicilerin ve Ek Faktörlerin Lakkaz Üretimine Etkisi

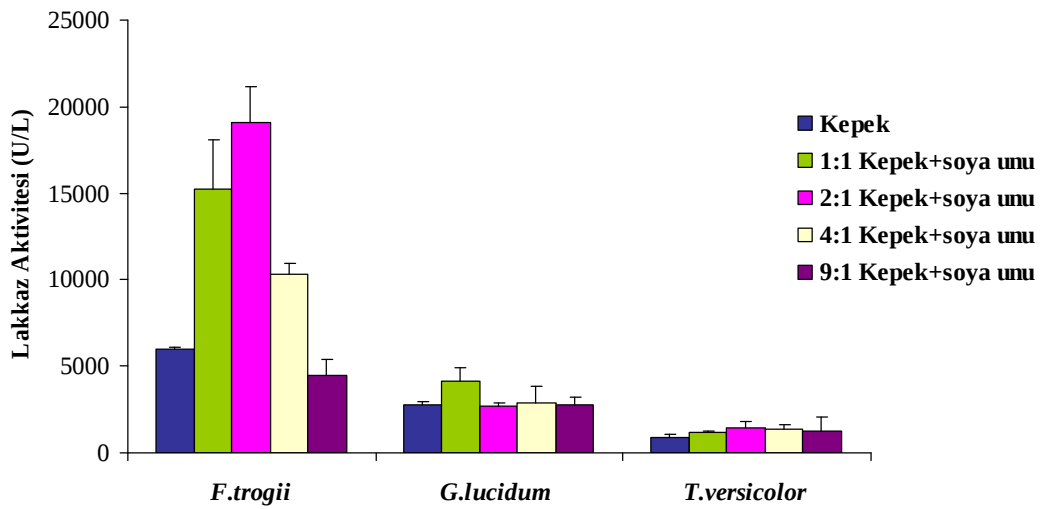
4.3.1. Soya unu ilavesinin lakkaz üretimine etkisi

Soya fasulyesinin kavrulup öğütülmesiyle elde edilen soya unu, %53 protein içeriğine sahip olmakla birlikte mükemmel bir demir, kalsiyum ve B vitaminleri kaynağıdır ([http://www.soyaunu.com/?module=modul_tek&modul=142&cat=206](http://www.soyaunu.com/?module=modul_tek&modul=142&cat=206;); http://www.hammaddeler.com/index.php?option=com_content&view=article&id=4625&Itemid=408).

Zengin içeriğinden dolayı lakkaz aktivitesini indüklemek amacıyla buğday kepeği ortamına çeşitli oranlarda soya unu eklenmiştir. Yürütülen çalışmada 1:1, 2:1, 4:1 ve 9:1 oranlarında buğday kepeği:soya unu karışımları katı substrat olarak kullanıldı ve distile su ile nemlendirilip ekim yapıldıktan sonra 5 gün inkübe edildi. *F.trogii* ile yürütülen çalışmada yalnızca buğday kepeği içeren ortamda 6008 ± 53 U/L lakkaz aktivitesi belirlenirken buğday kepeğine 1:1 oranında soya unu eklendiğinde

lakkaz aktivitesi 15238 ± 2847 U/L'ye yükseldi. Bu oran 2:1 olduğunda ise 19050 ± 2059 U/L lakkaz aktivitesine ulaşıldı.

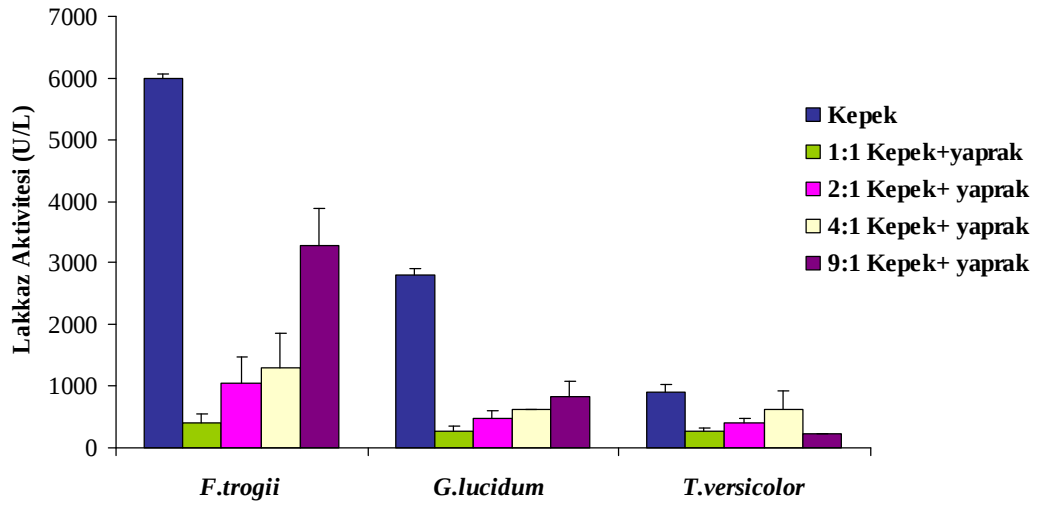
G.lucidum'da yalnızca kepek içeren ortamda lakkaz aktivitesi 2814 ± 105 U/L iken 1:1 oranında buğday kepeğine soya unu ilave edilen ortamdaki üretimde lakkaz aktivitesinin indüklendiği görüldü (4080 ± 826 U/L). *T.versicolor*'da buğday kepeğine soya unu ilave edildiğinde lakkaz aktivitesinde az bir oranda artış izlenmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Distile su ile nemlendirilmiş buğday kepeği ve soya unu içeren ortamlarda fungusların 5 gün inkübasyon sonrası lakkaz aktiviteleri

4.3.2. Yaprak eklenmesinin KSF sürecinde lakkaz aktivitesi üzerine etkisi

Çalışmada atık bir hammadde olduğu için lignoselülozlu ortama atık yaprak eklenmesinin lakkaz aktivitesi üzerine etkisini saptayabilmek amacıyla buğday kepeği ortamına farklı oranlarda (1:1, 2:1, 4:1, 9:1) öğütülmüş *Platanus orientalis* (Çınar) yaprağı eklendi. Bu lignoselülozik katı substratlar nemlendirildikten sonra ayrı ayrı olmak üzere *F.trogii*, *G.lucidum* ve *T.versicolor* ekilerek 5 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. Yapılan çalışma sonucunda katı substrat ortamına yaprak ilavesinin olumlu bir etkisinin olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.14).

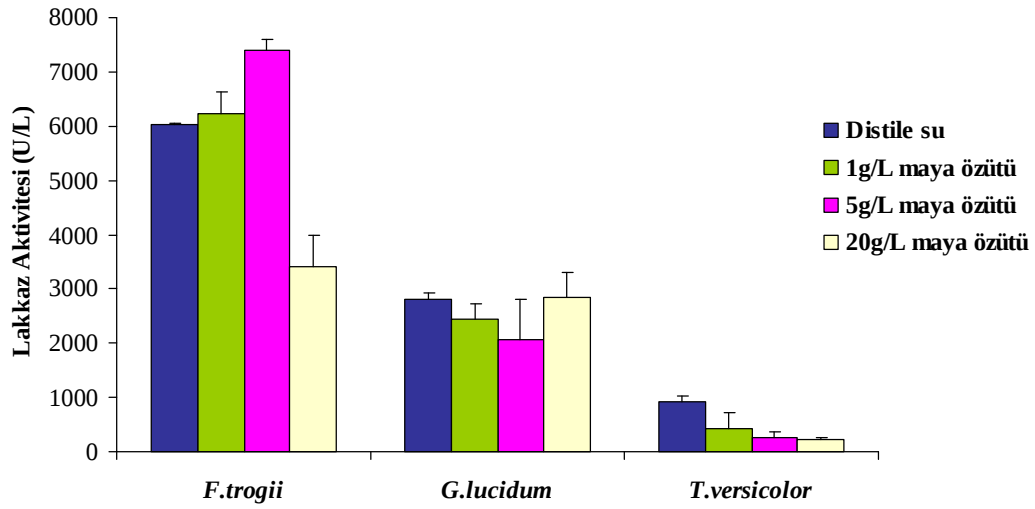


Şekil 4.14. Distile su ile nemlendirilmiş buğday kepeği ve yaprak içeren ortamlarda fungusların 5 gün inkübasyon sonrası lakkaz aktiviteleri

4.3.3. Maya özütü ilavesinin KSF sürecinde lakkaz aktivitesi üzerine etkisi

Maya özütü mikroorganizmalar için iyi bir besinsel kaynaktır (<http://www.condalab.com/pdf/1038.pdf>). Bu nedenle buğday kepeği içeren katı substrat ortamlarını nemlendirmek için kullanılan distile suya farklı konsantrasyonlarda olacak şekilde maya özütü eklenmiş ve 5 günlük üretim sonucunda fungusların lakkaz aktivite değişimleri değerlendirilmiştir.

Maya özütünün *F.trogii*'nin lakkaz üretimine olumlu etkisi gözlenirken, *G.lucidum*'da önemli bir indüklenme görülmedi. *T.versicolor*'da ise lakkaz üretimi üzerine negatif etkisi saptanmıştır (Şekil 4.15). Sonuçlar, yüksek düzeyde maya özütü eklenmesinin *G.lucidum*'un lakkaz üretimi üzerine önemli bir etkisinin olmadığını, bununla birlikte diğer iki fungusta inhibe edici bir etkisinin olduğunu göstermektedir. Yüksek miktarda maya özütünün bazı fungusların lakkaz aktivitesi üzerine negatif etkisi yüksek düzeylerin enzim üretimini etkileyebileceğini göstermektedir (Risdiyanto vd., 2012).



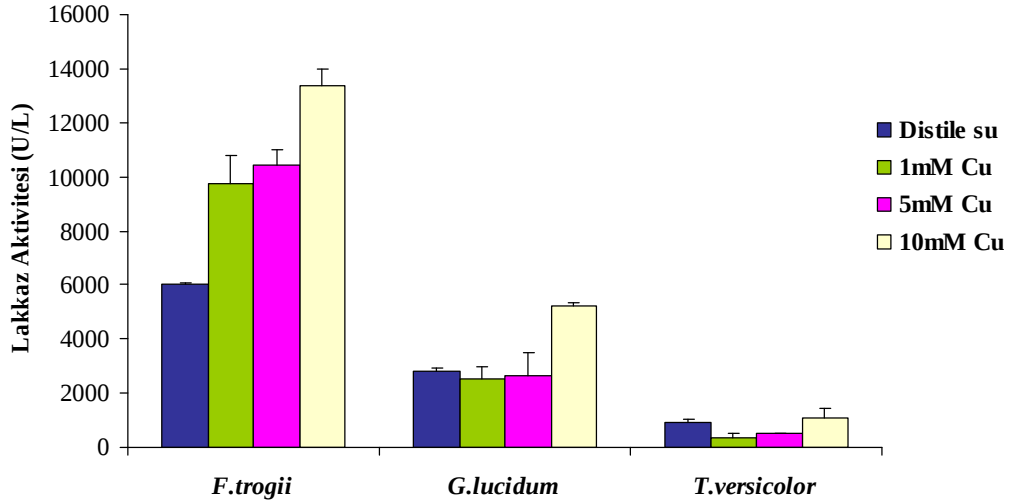
Şekil 4.15. Maya özütü içeren distile su ile nemlendirilmiş katı substrat ortamlarında lakkaz aktivitesi

4.3.4. Bakırın lakkaz üretimine etkisi

Lakkaz enzimleri, çoklu bakır içeren oksidazlardır. Yani bakır lakkazın önemli bir bileşenidir (Gianfreda vd., 1999). Lakkaz enziminin kofaktörü olan bakır, lakkaz aktivitesini indüklemek için kullanılan bir metaldir. Birçok mikroorganizma için gerekli bir mikro element olmakla beraber aynı zamanda da belirli konsantrasyonlar üzerinde toksik etkisi olduğu rapor edilmiştir (Cervantes ve Gutierrez-Corona, 1994; Labbé ve Thiele, 1999; Birhanli ve Yesilada, 2006). Bu nedenle bakırın uygun konsantrasyonda kullanılması şarttır.

Yürütülen çalışmada farklı bakır konsantrasyonlarının (1, 5 ve 10 mM) lakkaz üretimine etkisini saptamak için çeşitli oranlarda bakır içeren distile su ile nemlendirilmiş buğday kepeği ortamlarında lakkaz aktivitesi ölçüldü. *F.trogii*, *G.lucidum* ve *T.versicolor* için özellikle 10 mM bakır içeren ortamlarda lakkaz aktivitesinin önemli ölçüde arttığı gözlemlendi. *F.trogii* fungusunda lakkaz aktivitesi distile su ortamında 6008±53 U/L iken 10mM bakır içeren ortamda 13344±634 U/L'ye ulaştığı görüldü. *G.lucidum*'da ise distile su ortamında 2814±105 U/L olan lakkaz aktivitesi 10 mM bakır ortamında aktivite 1,8 kat fazla bulundu (5199±133 U/L). *T.versicolor*'da ise bakır içermeyen ortamda lakkaz aktivitesi 906±135 U/L iken 10mM Cu içeren ortamda 1107±349 U/L'ye yükseldi. Şekil 4.16' dan da

görüldüğü gibi bakır kullanılan her konsantrasyonda *F.trogii*'nin lakkaz üretimi üzerine pozitif etki yaparken, *G.lucidum*'da 10 mM bakır uygulaması olumlu bir etki göstermiştir. *T.versicolor*'da ise pozitif anlamda önemli bir değişim gözlenmemiştir.



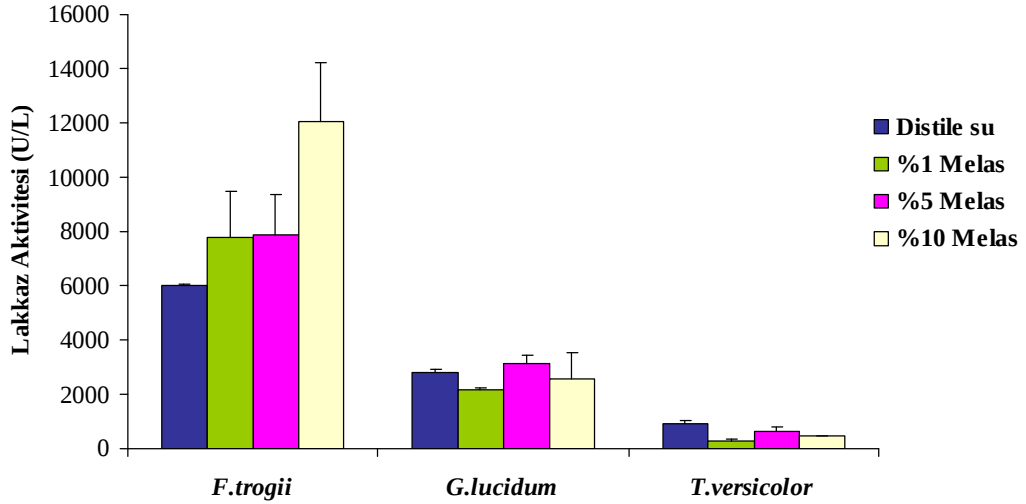
Şekil 4.16. Bakır içeren distile su ile nemlendirilmiş katı ortamlarda lakkaz aktivitesi

4.3.5. Melasın KSF sürecinde lakkaz üretimine etkisi

Melas, şeker elde etmek için şeker pancarının işlenmesi sırasında ortaya çıkan koyu kahve renkli koloidal atık bir maddedir. İçeriğinde kompleks polisakkaritler, invert şekerler, karbonhidrat olmayan bileşikler, koyu kahve renkli azot içeren polimerik bileşikler, inorganik iyonlar, malik asit, laktik asit, formik asit, asetik asit ve propiyonik asit gibi organik asitler bulunmaktadır (Kahyaoğlu ve Konar, 2006).

Melas, zengin içeriğinden dolayı katı ortamda lakkaz üretimini indüklemek amacıyla nemlendirici olarak test edildi. Zengin bir içeriğe sahip olan melasın katı substrat ortamında lakkaz üretimine etkisini saptayabilmek için buğday kepeği %1, 5, 10 oranlarında melas ile nemlendirildi. Yapılan çalışmada nemlendirme sıvısı olarak melas kullanımının *F.trogii*'de lakkaz üretimini indüklediği saptandı. Distile su ortamında *F.trogii*'nin lakkaz aktivitesi 6008 ± 53 U/L olarak saptanırken %10

melas ortamında bu değer 12038 ± 2207 U/L olarak saptandı. Melas *G.lucidum* ve *T.versicolor*'un lakkaz üretimini indüklememiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Melas ile nemlendirilmiş buğday kepeği içeren ortamlarda lakkaz aktiviteleri

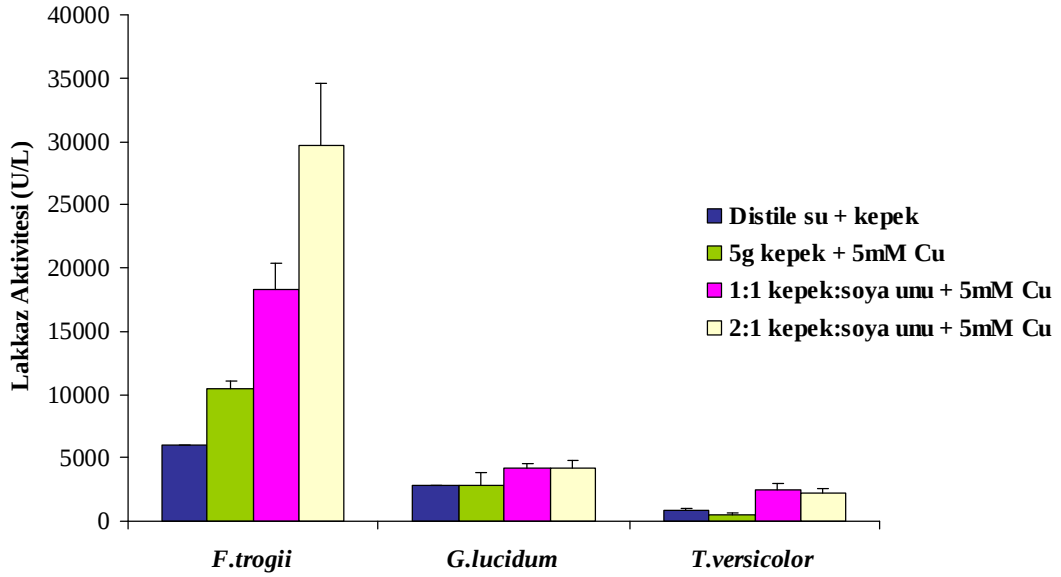
4.3.6. Soya unu ve bakır içeren katı substrat ortamlarında fungusların lakkaz üretimi

Soya unu ve bakır ayrı ayrı içeren distile su ile nemlendirilmiş buğday kepeği ortamlarında *F.trogii*, *G.lucidum* ve *T.versicolor*'ın lakkaz üretimlerinin indüklendiği daha önce saptanmıştı (Şekil 4.13, Şekil 4.16). Buna bağlı olarak bu kısımda, yüksek aktivite değerlerine ulaşılan 1:1 ve 2:1 oranlarında buğday kepeği:soya unu karışımları katı substrat olarak kullanılmış ve bu ortamlar 5 ve 10 mM bakır içeren distile su ile nemlendirilerek lakkaz üretimine her iki koşulun etkisi araştırılmıştır.

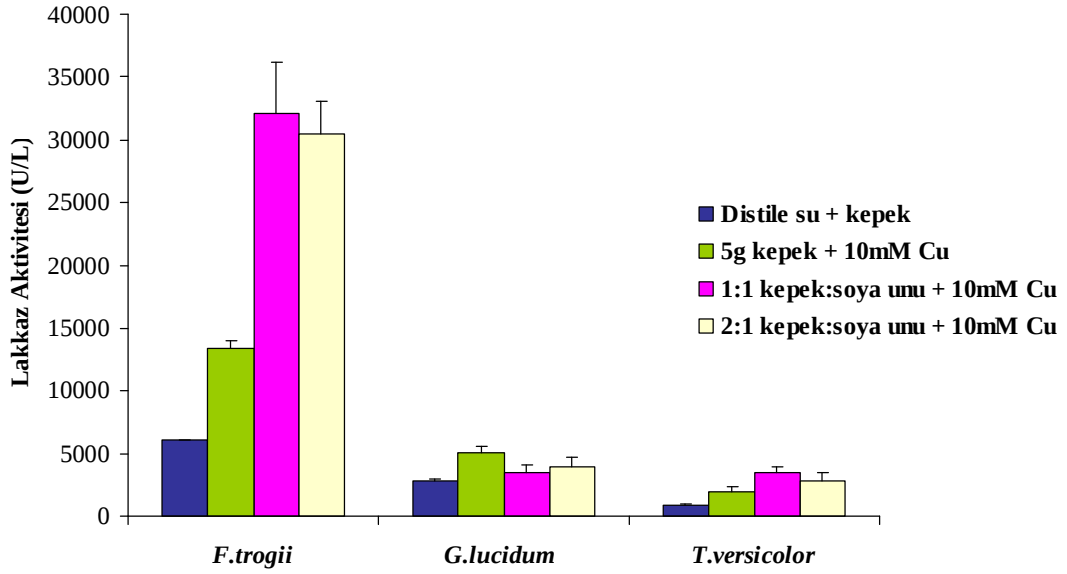
F.trogii'nin üretildiği yalnızca kepek içeren ortamda 6008 ± 53 U/L olan lakkaz aktivitesinin, 5 mM bakır ilavesiyle 10430 ± 598 U/L'ye ulaştığı izlendi. Kepek ortamına 2:1 oranında soya unu ilave edildiğinde ise 4.94 katlık bir artışla aktivite 29699 ± 4961 U/L olarak tespit edildi.

G.lucidum'da bakır içermeyen buğday kepeği ortamında lakkaz aktivitesi 2814 ± 105 iken 5mM bakır eklenmiş 1:1 buğday kepeği:soya unu ortamında 4172 ± 423 U/L, 2:1 buğday kepeği:soya unu ortamında ise 4134 ± 652 U/L olarak belirlendi. *T.versicolor*'da ise lakkaz aktivitesinin bakır içermeyen gruba göre soya unu içeren ortamlarda (1:1 ve 2:1) arttığı izlendi (Şekil 4.18).

F.trogii, *G.lucidum* ve *T.versicolor*'ın lakkaz aktivitesinin bakır eklenmemiş olan buğday kepeği ortamlarına kıyasla 10 mM bakır içeren tüm ortamlarda indüklendiği izlendi (Şekil 4.19). Özellikle *F.trogii*'de bakır eklenmeyen kepek ortamında 6008 ± 53 U/L olan lakkaz aktivitesi 10mM bakır eklenmiş 1:1 buğday kepeği:soya unu ortamında önemli ölçüde artarak 32085 ± 4044 U/L değerine ulaştı.



Şekil 4.18. 5mM bakır içeren distile su ile nemlendirilmiş buğday kepeği+soya unu katı ortamlarında lakkaz aktivitesi

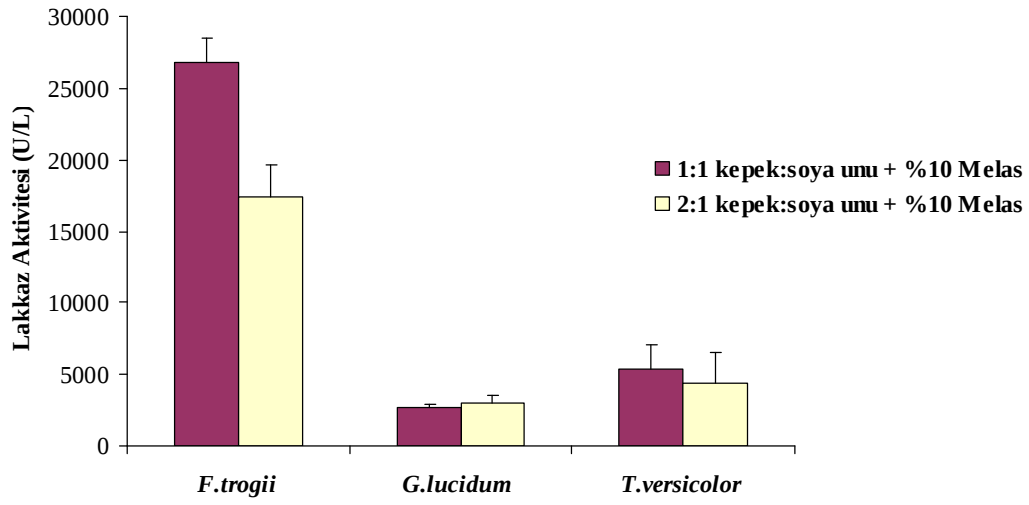


Şekil 4.19. 10mM bakır içeren distile su ile nemlendirilmiş buğday kepeği+soya unu katı ortamlarında lakkaz aktivitesi

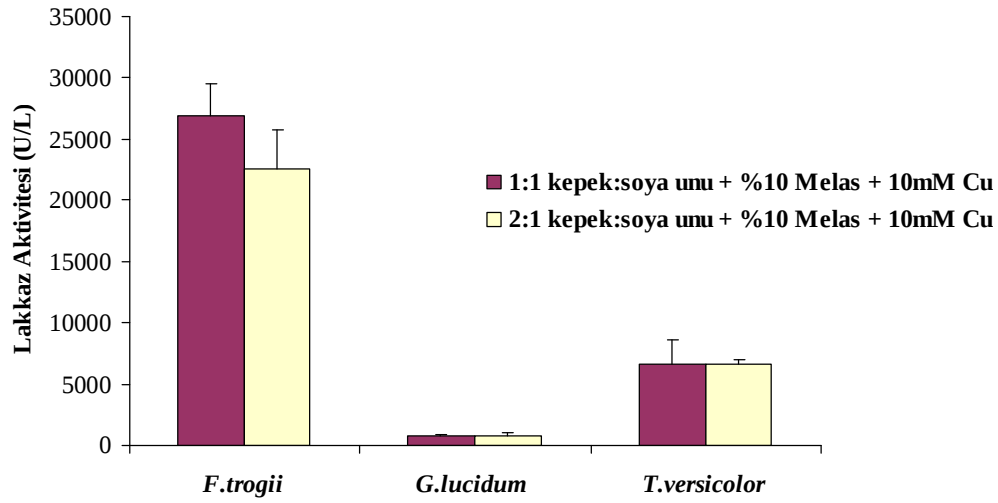
4.3.7. Nemlendirme sıvısı olarak bakır eklenmiş melasın kullanıldığı çalışmalarda fungusların lakkaz üretimi

Daha önce yapılan çalışmalarda melas ile nemlendirilmiş buğday kepeği ortamının özellikle *F.trogii*'nin lakkaz üretimini indüklediği saptanmıştı (Şekil 4.17). Buna bağlı olarak, 1:1 ve 2:1 oranında buğday kepeği: soya unu içeren ortam, bakır içeren ve bakır içermeyen %10 melas ile nemlendirilerek fungus ekilmiş ve lakkaz aktiviteleri saptanmıştır. Optimum sıcaklık çalışmasında (Şekil 4.8) en yüksek lakkaz aktiviteleri 30°C' de elde edildiğinden yapılan çalışma 30°C'de yürütülmüştür.

Melas ile nemlendirilen 1:1 oranında buğday kepeği:soya unu ortamında üretilen *F.trogii*'nin lakkaz aktivitesi 26778±1773 U/L olarak belirlendi. Nemlendirme ortamına 10mM bakır eklendiğinde ise lakkaz aktivitesi 26847±2649 U/L değerindeydi. 2:1 buğday kepeği:soya unu ortamında ise bakır içermeyen ortamda lakkaz aktivitesi 17443±2249 U/L iken bakır ilave edildiğinde 22525±3241 U/L değerine ulaştı. *G.lucidum*'da bakır ilavesi lakkaz aktivitesini indüklemeyenken *T.versicolor*'da soya ununun ilave edildiği iki ortamda da (1:1 ve 2:1) bakır içermeyen ortama karşın lakkaz aktivitesinde artış izlendi (Şekil 4.20 ve 4.21).



Şekil 4.20. %10 Melas ile nemlendirilmiş buğday kepeği+soya unu katı ortamlarında elde edilen lakkaz aktiviteleri



Şekil 4.21. 10mM bakır içeren %10'luk Melas ile nemlendirilmiş Buğday kepeği+soya unu katı ortamlarında elde edilen lakkaz aktiviteleri

Yürütülen çalışmalara göre ise katı substrat olarak 1:1 buğday kepeği:soya unu ve nemlendirme sıvısı olarak da 10 mM bakır içeren distile suyun kullanıldığı uygulamalarda lakkaz üretiminin önemli oranda indüklenebileceğini göstermiştir.

4.4. Tava Tipi Fermentör Çalışmaları

Tava tipi fermentörler, KSF işlemlerinde en yaygın olarak kullanılan fermentör tipidir. Bu tip fermentörler çok eski yıllardan beri bilinmektedir. Günümüzde tempeh gibi geleneksel ürünlerin üretiminin yanı sıra diğer çeşitli ürünlerin üretiminde de kullanılmaktadır (Pandey, 2004). Katı substrat bu tip fermentörlerde, fermentöre ince bir tabaka halinde yayılır ve ardından da fungus ekilip, havalandırma olacak şekilde inkübe edilir (Rodríguez Couto ve Ángeles Sanromán, 2006a, b).

Fermentör olarak küçük ölçekli erlen kullanılan çalışmalar tamamlandıktan sonra daha büyük bir ölçek olarak tava tipi fermentör çalışmalarına geçilmiştir. Bu amaçla, boyutları 15cm x 27cm olan cam tava tipi fermentörler kullanılmıştır (Şekil 4.22). Çalışmalar iki farklı nemlendirici (distile su ve melas) ve bakır içeren/içermeyen ortamlarda yürütülmüştür.

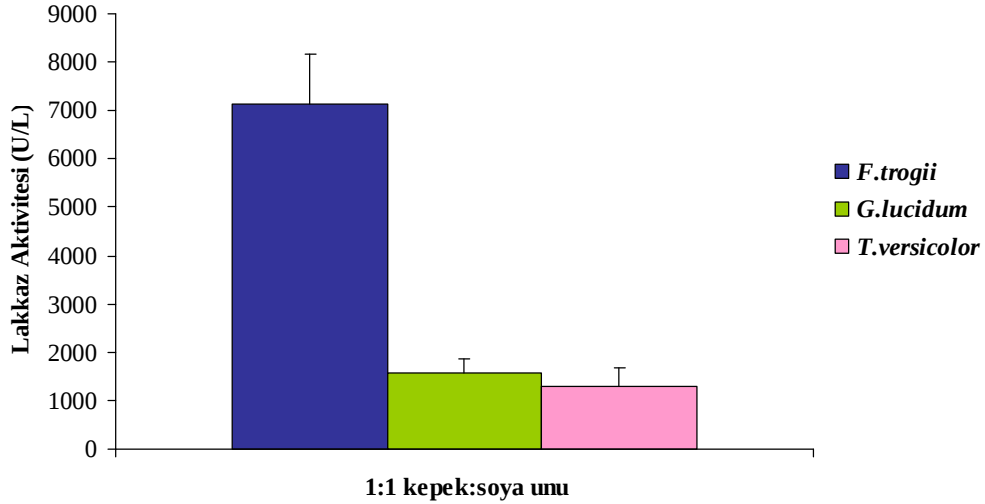


Şekil 4.22. Tava tipi fermentörde üretilmiş *G.lucidum* kültürünün görüntüsü

4.4.1. Distile su ile nemlendirilmiş katı substrat ortamlarında tava tipi fermentör uygulamaları

Tava tipi fermentör ortamında daha önce erlen çalışmalarında yüksek lakkaz aktivitelerinin belirlendiği ortamlar kullanılmıştır. Bu amaçla, *F.trogii*, *G.lucidum* ve

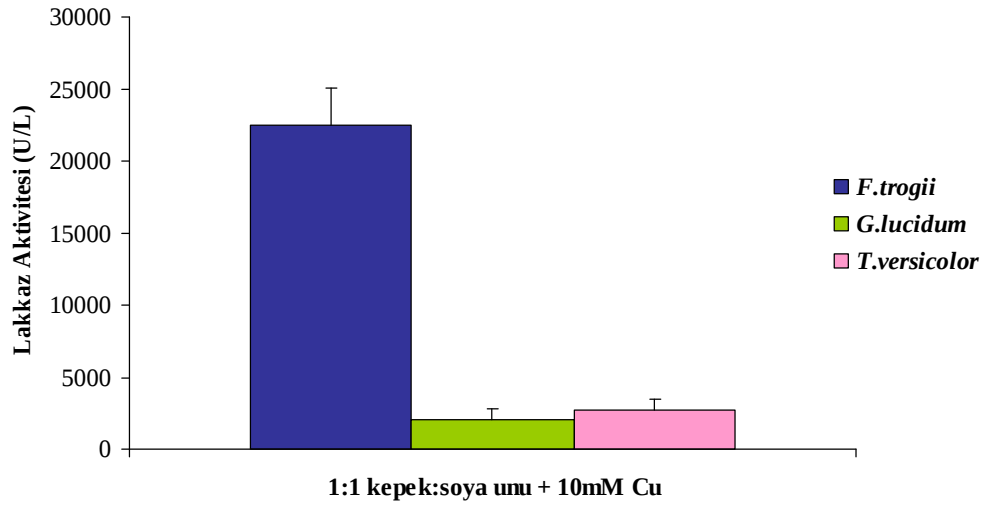
T.versicolor distile su ile nemlendirilmiş 1:1 buğday kepeği:soya unu ortamında üretildi ve 30°C’de 5 gün inkübasyon sonrasında lakkaz aktiviteleri ölçüldü. Şekil 4.23’den de görülebileceği gibi *F.trogii* için 7149±1019 U/L, *G.lucidum* için 1582±276 U/L ve *T.versicolor* için de 1279±402 U/L lakkaz aktivite değerleri saptandı.



Şekil 4.23. Distile su ile nemlendirilmiş buğday kepeği+soya unu içeren katı substrat ortamlarında tava tipi fermentörde üretilen kültürlerinin lakkaz aktiviteleri

4.4.2. Bakır içeren distile su ile nemlendirilmiş katı substrat ortamlarında tava tipi fermentör uygulamaları

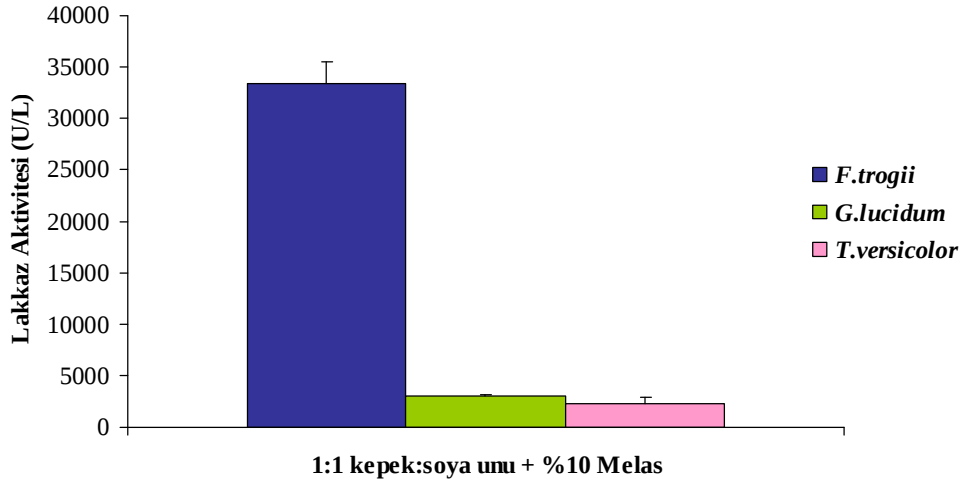
Erlen çalışmalarında en yüksek lakkaz aktivitesinin belirlendiği 10mM bakır içeren distile su ile nemlendirilmiş 1:1 oranında buğday kepeği:soya unu ortamı tava tipi fermentör ortamında da denendi. *F.trogii* fungusu için erlen kültürlerinin lakkaz aktivitesi 32085±4044 U/L iken tava tipi fermentörde 22469±2622 U/L enzim aktivitesine ulaşıldı. *G.lucidum*’da erlen ortamında 3507±628 U/L, fermentör ortamında ise 2008±826 U/L lakkaz aktivitesi saptandı. *T.versicolor*’un erlen kültüründeki ve fermentördeki lakkaz aktiviteleri ise sırasıyla 3516±390 U/L ve 2649±810 U/L değerlerinde belirlendi (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. 10mM bakır içeren distile su ile nemlendirilmiş buğday kepeği+soya unu içeren katı substrat ortamlarında tava tipi fermentörde üretilen kültürlerinin lakkaz aktiviteleri

4.4.3. Melas ile nemlendirilmiş katı substrat kullanılan tava tipi fermentörde uygulamaları

F.trogii, *G.lucidum* ve *T.versicolor* fungusları %10'luk melas ile nemlendirilen 1:1 buğday kepeği:soya unu ortamında tava tipi fermentörde 30°C'de 5 gün inkübe edildi. *F.trogii* kültürü için 33295±2249 U/L, *G.lucidum* kültürü için 2973±220 U/L ve *T.versicolor* kültürü içinse 2249±619 U/L lakkaz aktivite değerleri tespit edildi (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. %10'luk melas ile nemlendirilmiş buğday kepeği+soya unu içeren katı substrat ortamlarında tava tipi fermentörde üretilen kültürlerinin lakkaz aktiviteleri

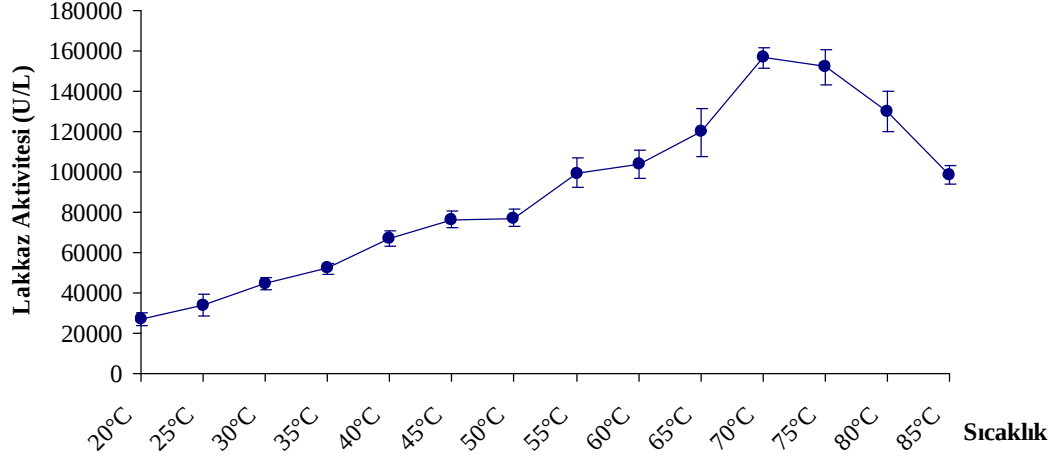
4.5. Ham Lakkaz Enziminin Aktivite Çalışmaları

4.5.1. Sıcaklığın ham lakkaz aktivitesine etkisi

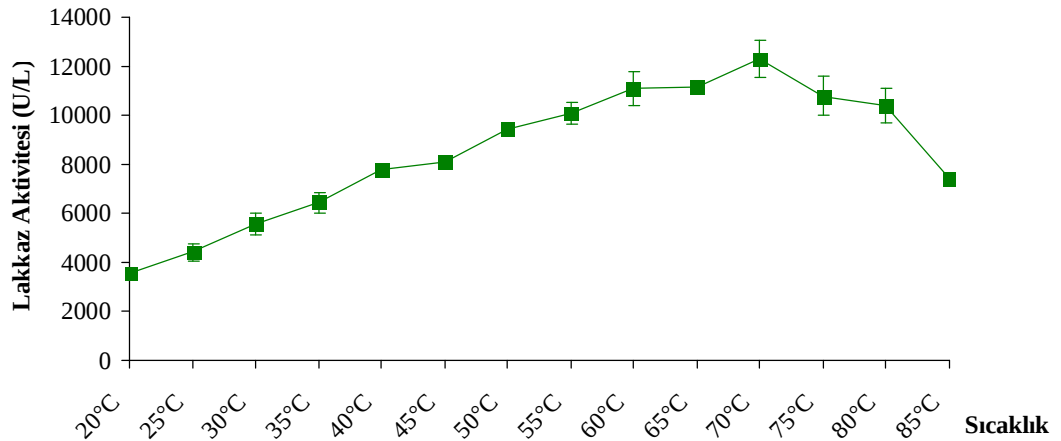
Birçok enzim yüksek sıcaklıkta denatüre olmaktadır. Enzim katalizleyen reaksiyonlar sıcaklık artışıyla artar çünkü enzim denatüre olana kadar ve katalitik aktivite düşene kadar moleküller arası çarpışmalar sıklaşır. Sıcaklığa bağlı denatürasyona enzimlerin aktif bölgesinin bozulması ve tersiyer yapının denatürasyonu neden olmaktadır (Palmer, 1991). Bu nedenle, öncelikle sıcaklığın ham lakkaz aktivitesine etkisinin araştırıldığı çalışmalar yürütülmüştür. Bu amaçla, enzim aktivitesi 20-85°C sıcaklık aralıklarında ve pH 5'de belirlenmiştir.

F.trogii ham lakkaz enziminin aktivitesi 70°C'ye kadar artmıştır. *F.trogii* ham lakkaz enziminin aktivitesi 20°C'de 27132±3004 U/L iken 70°C'de 156570±5131 U/L'ye yükseldi. 70°C' den sonra ise sıcaklık artışı ile lakkaz aktivitesinin düşmeye başladığı gözlemlendi (Şekil 4.26). Bununla birlikte, 70-75°C'lerin üzerinde de yüksek aktivite değerlerine ulaşılmıştır. *G.lucidum*'da enzim aktivitesinde 20°C'den 70°C'ye kadar sürekli bir artış izlenmiş ve en yüksek aktivite 70°C'de saptanmıştır (Şekil 4.27). 70°C'de elde edilen lakkaz aktivite değeri 12280±753 U/L'dir. 70°C'den sonra ise lakkaz aktivitesi düşmeye başladı. *G.lucidum* ham lakkaz enziminin aktivitesi 50-

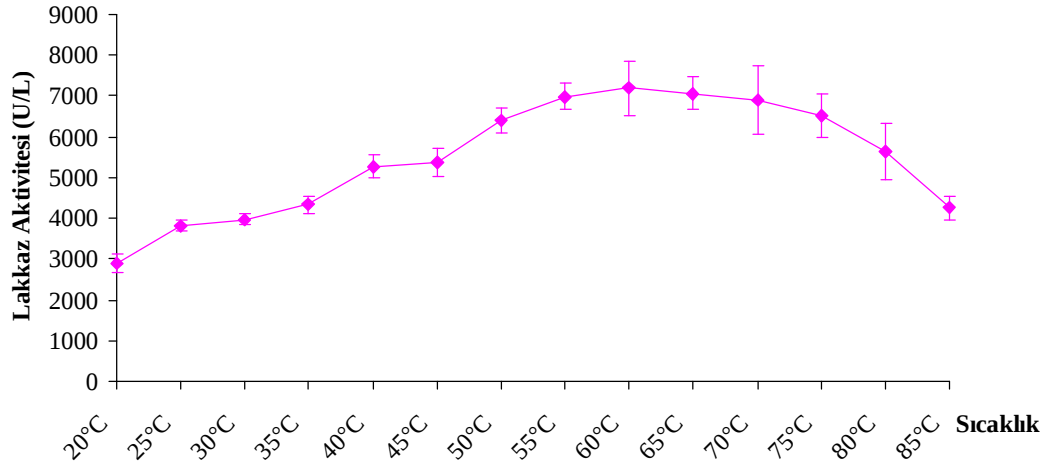
80°C'ler arasında yüksek değerlerdedir. *T.versicolor*'da ise lakkaz aktivitesi 50°C'ye kadar yükselmiş ve bu sıcaklıktan sonra 75°C'ye kadar benzer aktivite değerlerinde devam etmiştir. Özellikle 75°C'den sonra aktivite düşmeye başlamıştır (Şekil 4.28).



Şekil 4.26. 10mM bakır içeren distile su ile nemlendirilmiş buğday kepeği+soya unu besiyerinde üretilmiş *F.trogii* kültürlerinden elde edilmiş ham enzim kaynağının farklı sıcaklıklardaki lakkaz aktivite değerleri



Şekil 4.27. 10mM bakır içeren distile su ile nemlendirilmiş buğday kepeği+soya unu besiyerinde üretilmiş *G.lucidum* kültürlerinden elde edilmiş ham enzim kaynağının farklı sıcaklıklardaki lakkaz aktivite değerleri

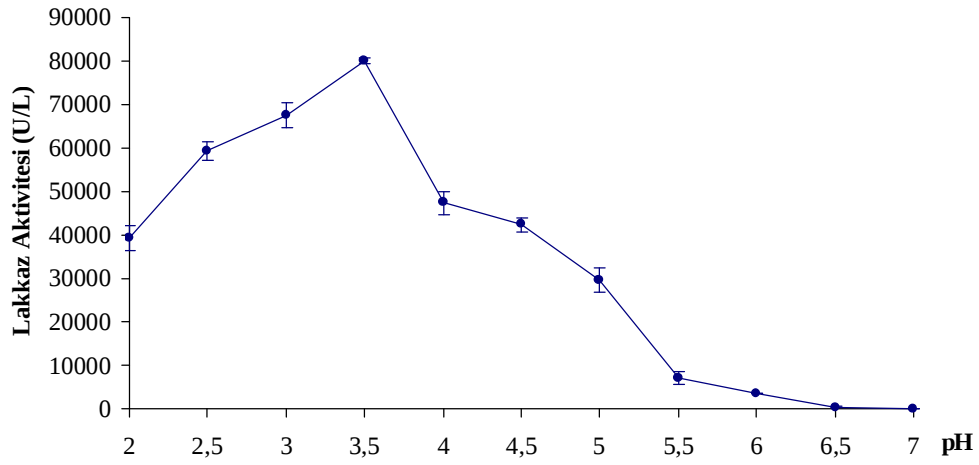


Şekil 4.28. 10mM bakır içeren distile su ile nemlendirilmiş buğday kepeği+soya unu besiyerinde üretilmiş *T.versicolor* kültürlerinden elde edilmiş ham enzim kaynağının farklı sıcaklıklardaki lakkaz aktivite değerleri

4.5.2. pH'nın lakkaz aktivitesine etkisi

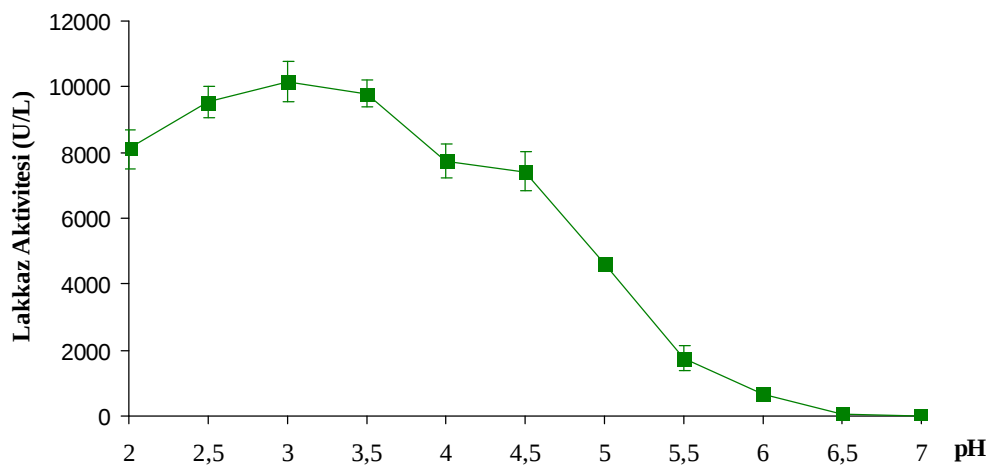
Enzim aktivitesi ortam pH'sından etkilendiğinden pH'nın ham lakkaz enziminin aktivitesine etkisi de araştırılmıştır. Bu amaçla, *F.trogii*, *G.lucidum* ve *T.versicolor*'

ın ham lakkaz enzimlerinin aktivitesi farklı pH değerlerinde (pH 2-7) 30°C'de belirlenmiştir. *F.trogii* ham lakkazı için en yüksek aktivite pH 3.5'ta 79970 ± 686 U/L belirlenirken en düşük aktivite pH 7'de 108 ± 7 U/L olarak tespit edildi (Şekil 4.29). Yüksek asidik pH değerlerinde yüksek lakkaz aktiviteleri saptanırken pH 4.5'tan sonra aktivitenin düştüğü gözlemlendi.



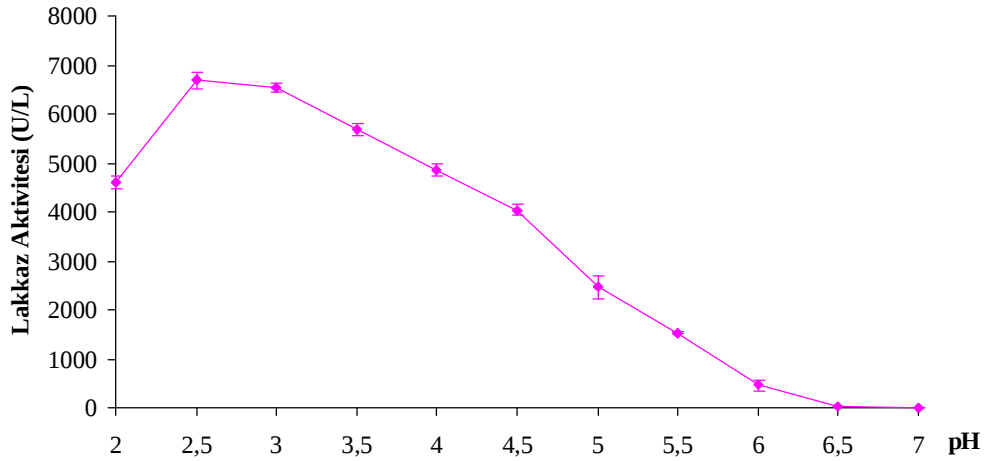
Şekil 4.29. 10mM bakır içeren distile su ile nemlendirilmiş buğday kepeği+soya unu besiyerinde üretilmiş *F.trogii* kültürlerinden elde edilmiş ham enzim kaynağının farklı pH'lardaki lakkaz aktivite değerleri

G.lucidum ham lakkaz enzimi için de *F.trogii*'de olduğu gibi yüksek asidik pH değerlerinde yüksek lakkaz aktiviteleri elde edilirken özellikle pH 4.5 üzerindeki değerlerde aktivitenin belirgin bir şekilde düştüğü gözlemlendi (Şekil 4.30).



Şekil 4.30. 10mM bakır içeren distile su ile nemlendirilmiş buğday kepeği+soya unu besiyerinde üretilmiş *G.lucidum* kültürlerinden elde edilmiş ham enzim kaynağının farklı pH'lardaki lakkaz aktivite değerleri

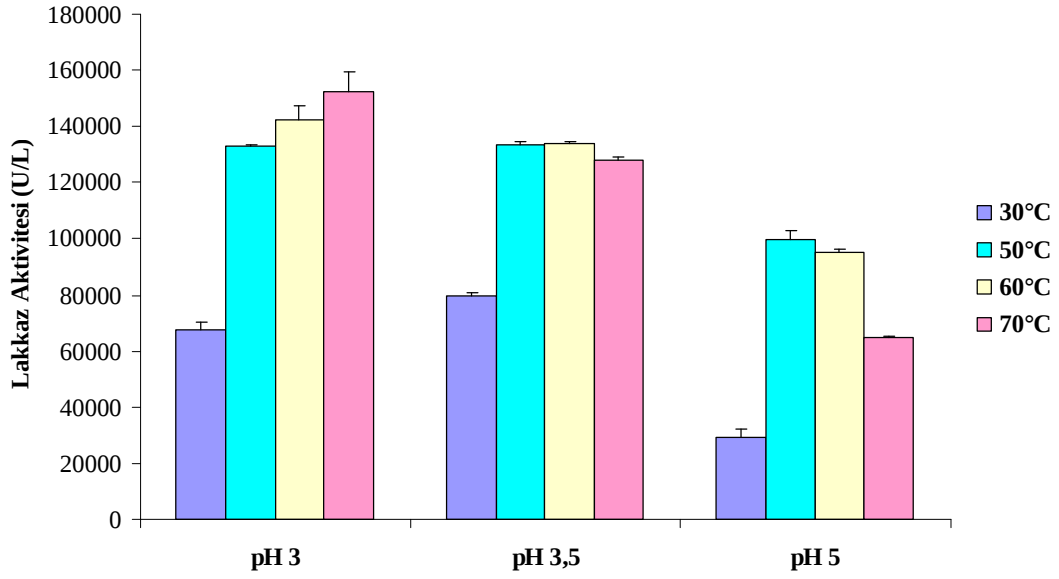
Şekil 4.31 incelendiği zaman *T.versicolor*'ın ham lakkaz enzimi aktivitesi özellikle yüksek asidik pH'larda lakkaz aktivitesinin yüksek olduğu ve pH 2.5-3 değerlerinin en yüksek lakkaz aktivitesinin elde edildiği değerler olduğu görülmektedir.



Şekil 4.31. 10mM bakır içeren distile su ile nemlendirilmiş buğday kepeği+soya unu besiyerinde üretilmiş *T.versicolor* kültürlerinden elde edilmiş ham enzim kaynağının farklı pH'lardaki lakkaz aktivite değerleri

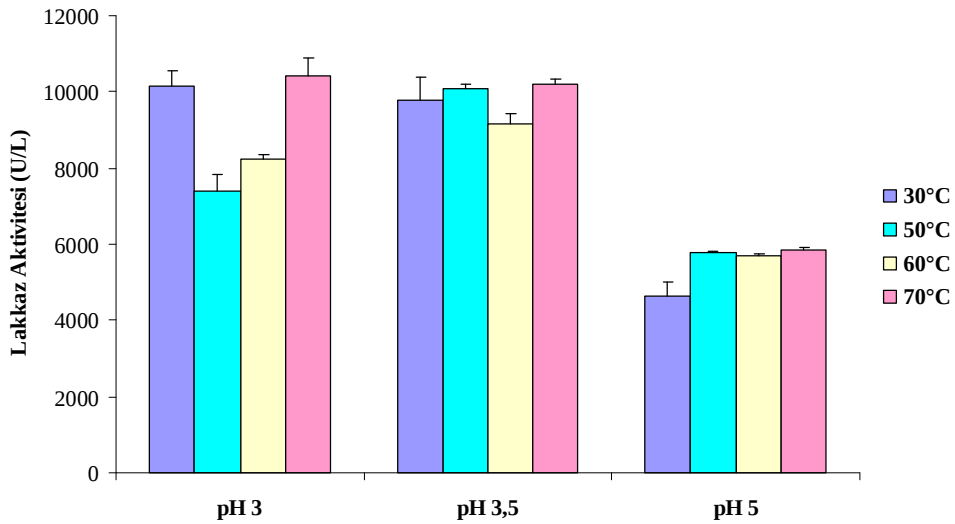
4.5.3. Enzim aktivitesine pH ve sıcaklığın birlikte etkisi

Lakkaz enziminin birçok endüstriyel uygulamadaki etkinliği reaksiyon ortamındaki zamana bağlı aktivasyonuna bağlıdır. Bu nedenle aktif kalabildiği sıcaklık ve pH değerleri çok önemlidir. Yukarıda yapılan çalışmalarda sıcaklık ve pH aralığının ham lakkaz enziminin aktivitesini önemli oranda etkilediği ayrı ayrı çalışmalarla saptanmıştır. Bu nedenle, bu kısımda farklı pH ve sıcaklık değerlerinin ham enziminin aktivitesini nasıl etkilediğinin gözlemlemek için farklı pH ve sıcaklık değerlerinde enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Yapılan çalışmada, pH ve sıcaklığın birlikte etkisine bakıldığında *F.trogii*'nin ham lakkaz enziminin en yüksek aktiviteleri pH 3 ortamında 70°C'de 152250±7229 U/L, pH 3.5 ortamında 60°C'de 134277±259 U/L pH 5 ortamında ise lakkaz aktivitesi diğer pH değerlerine göre daha düşük olmakla birlikte 50°C'de 99715±3063 U/L olarak belirlendi (Şekil 4.32).



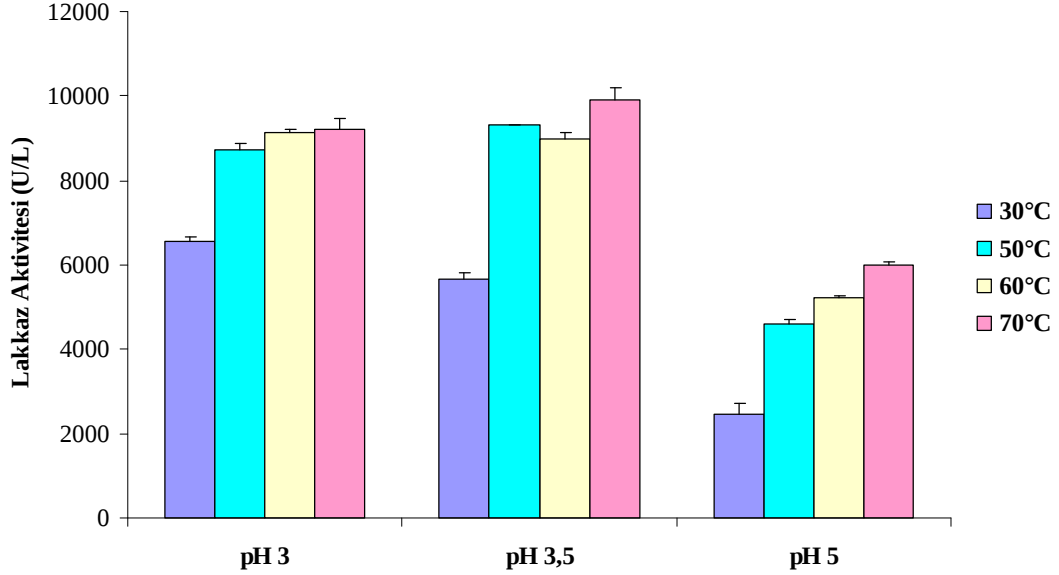
Şekil 4.32. 10mM bakır içeren distile su ile nemlendirilmiş buğday kepeği+soya unlu besiyerinde üretilmiş *F.troglia* kültürlerinden elde edilmiş ham enzim kaynağının farklı pH ve sıcaklıklarda lakkaz aktivite değerleri

G.lucidum'un ham lakkaz enziminin aktivitesine bakıldığında 30°C pH 3'de 10162±389 U/L, 50°C pH 3.5'da 10075±117 U/L, 60°C pH 3.5'da 9176±249 U/L ve 70°C'de ise 10421±461 U/L olarak belirlendi (Şekil 4.33).



Şekil 4.33. 10mM bakır içeren distile su ile nemlendirilmiş buğday kepeği+soya unu besiyerinde üretilmiş *G.lucidum* kültürlerinden elde edilmiş ham enzim kaynağının farklı pH ve sıcaklıklarda lakkaz aktivite değerleri

T.versicolor'da ise pH 5'e kıyasla pH 3 ve pH 3.5 ortamlarında daha yüksek lakkaz aktiviteleri tespit edilmekle birlikte her üç pH değerinde de en yüksek lakkaz aktivitelerinin 70°C'de olduğu görüldü (Şekil 4.34).

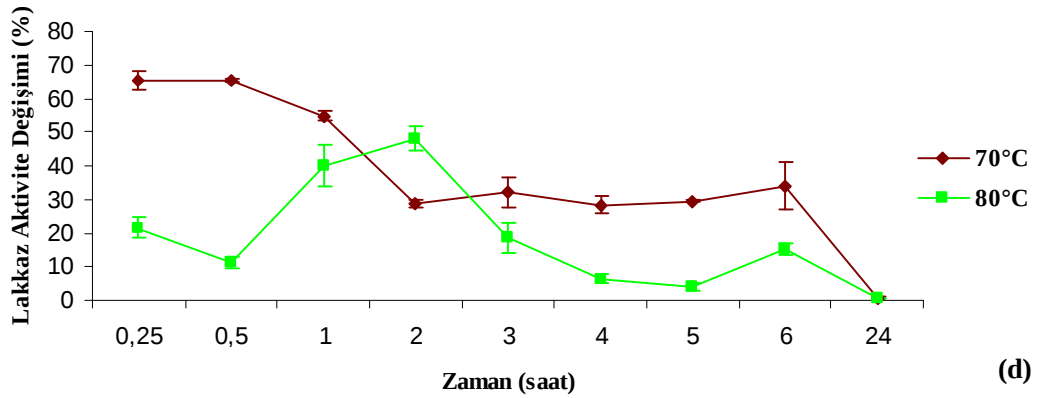
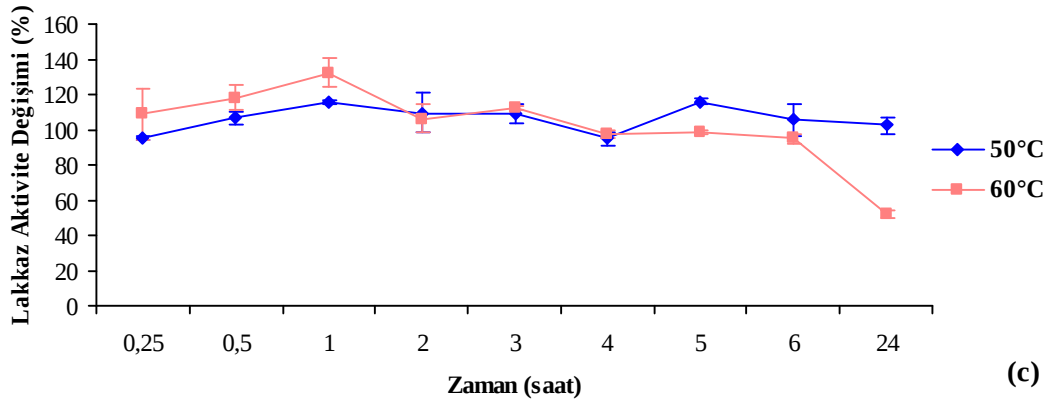
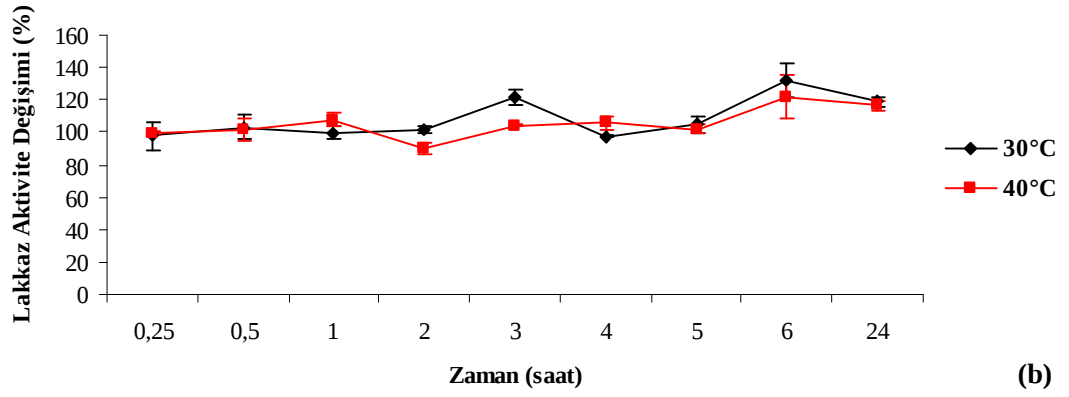
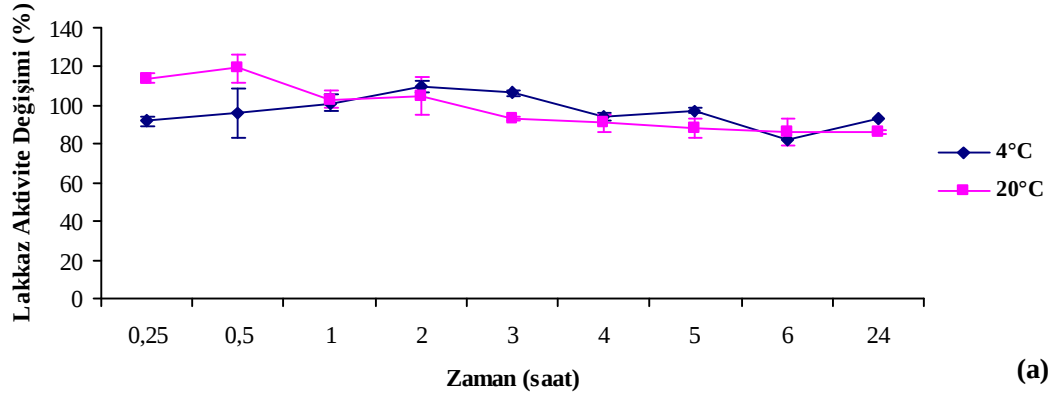


Şekil 4.34. 10mM bakır içeren distile su ile nemlendirilmiş buğday kepeği+soya unu besiyerinde üretilmiş *T.versicolor* kültürlerinden elde edilmiş ham enzim kaynağının farklı pH ve sıcaklıklarda lakkaz aktivite değerleri

4.6. Ham Lakkaz Enziminin Kararlılık Çalışmaları

4.6.1. Sıcaklığın enzim kararlılığına etkisi

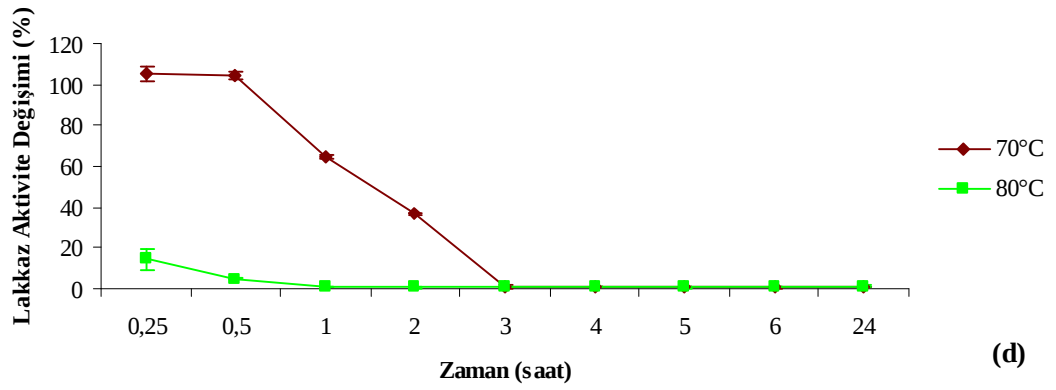
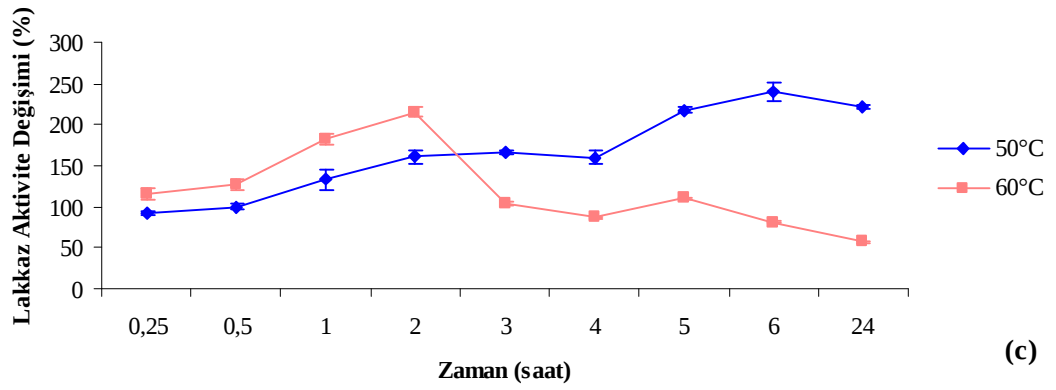
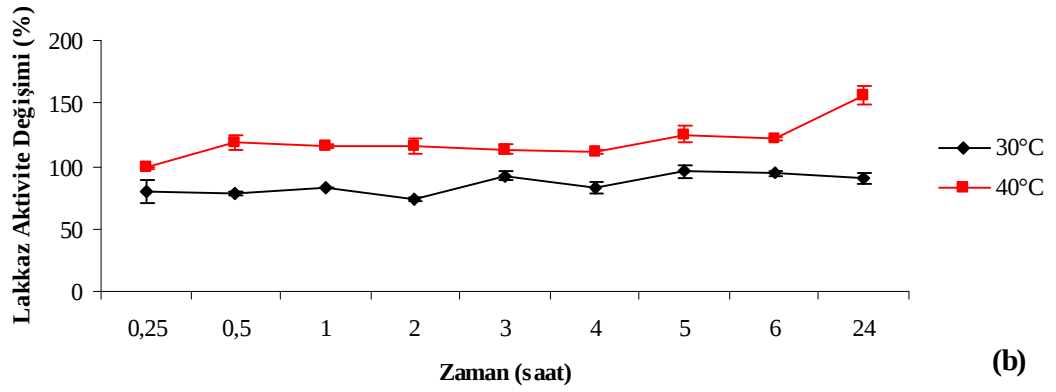
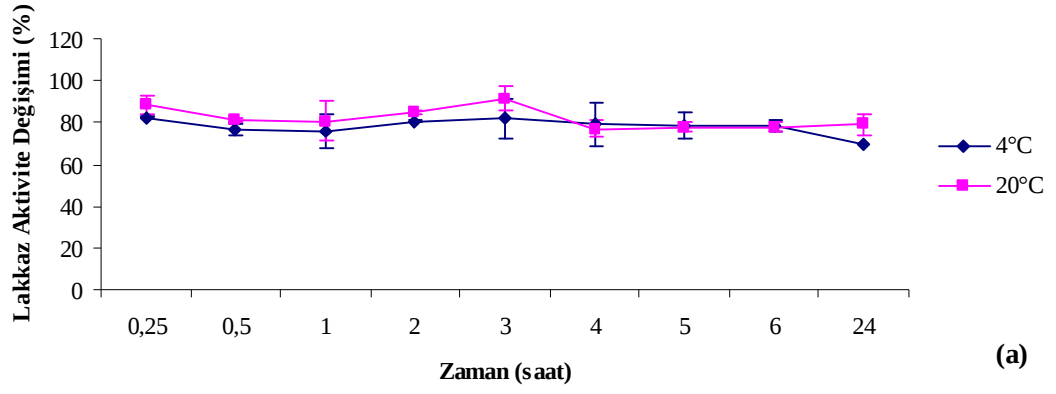
Enzimlerin kararlılığı sıcaklıktan etkilenmektedir. Birçok enzim yüksek sıcaklıkta denatüre olur ve kararlılığını kaybeder. Enzimin sıcaklık kararlılığı, uygulama süreci için de önemlidir. Bu nedenle, *F.trogii*, *G.lucidum* ve *T.versicolor*'ın ham lakkaz enzimlerinin aktiviteleri farklı sıcaklıklarda (4-80°C) 0.25-24 saatler arasında inkübasyon sürecinde ölçülerek sıcaklık kararlılığı saptandı. *F.trogii* ham lakkaz enzimi 4, 20, 30, 40 ve 50°C'de 24 saat süresince kararlı kaldı (Şekil 4.35a, b). Kararlılık 60°C'de 6 saat boyunca devam ederken 24. saatte lakkaz aktivitesinin %52'si korundu. Ham lakkaz enziminin 70°C'de 6 saat inkübasyon sonucu lakkaz aktivitesinin %34'ü korunurken, 80°C'de 2 saat inkübasyon sonucunda aktivitenin %48'i kaldı (Şekil 4.35 c, d).



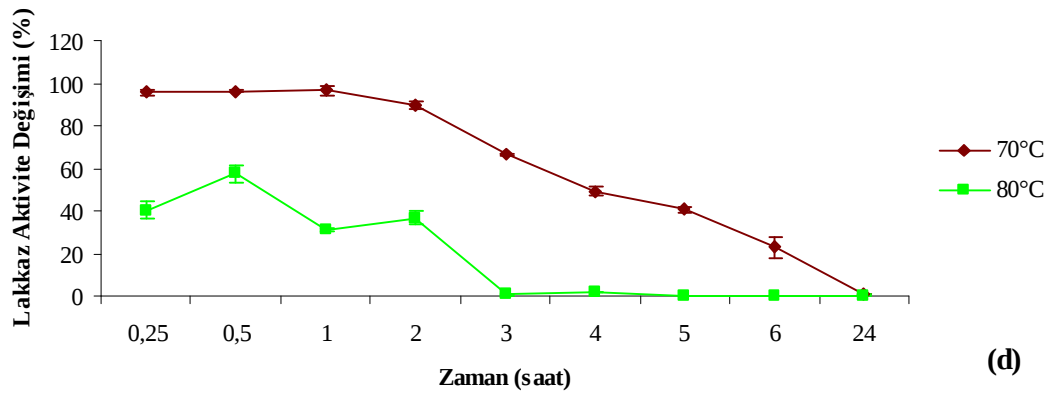
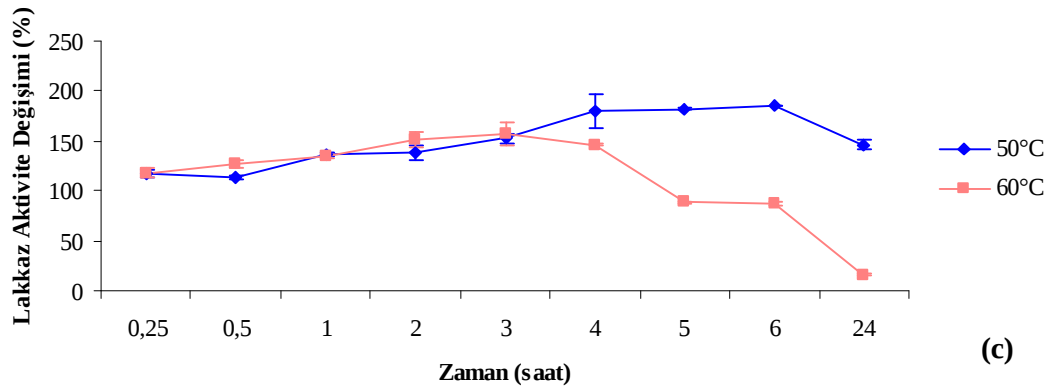
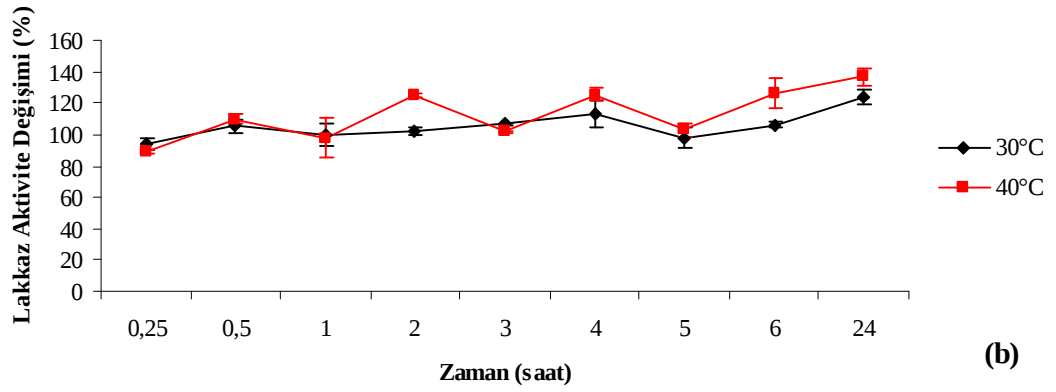
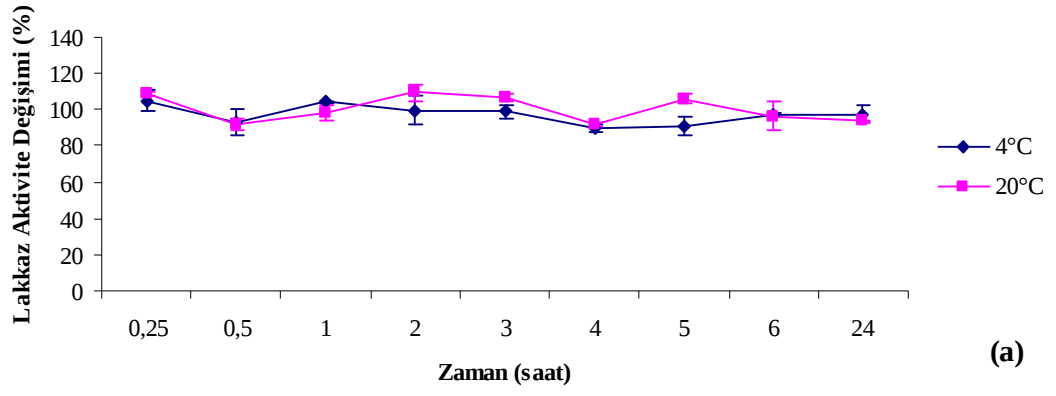
Şekil 4.35. *F.trogii* 'nin ham lakkaz enziminin 4-20°C (a), 30-40°C (b), 50-60°C (c), 70-80°C (d) aralıklarında zamana bağlı sıcaklık kararlılığı

G.lucidum ham lakkaz enzim aktivitesi 50°C'ye kadar kararlı kaldı. 60°C'de ise kararlılık 6 saat boyunca devam ederken 24.saatte azaldı. 70°C'de enzim kararlılığı 2 saat inkübasyonda %37 korurken, 80°C'de kararlılığın 0.5 saatte ancak %5' i korunabildi (Şekil 4.36 a, b, c, d).

T.versicolor'un ham lakkaz enzimi diğer funguslara benzer şekilde 4, 20, 30, 40 ve 50°C'de 24 saat boyunca kararlı kalırken, 60°C'de 6 saat süresince aktivite kararlılığı devam ettirip 24.saatte hızla düştüğü izlendi. 70°C'de, 3 saat inkübasyonda lakkaz aktivitesinin %50' sinden fazlası korunurken, 80°C'de çok yüksek olmamakla birlikte 2.saate kadar lakkaz enzimi kararlılığını %37 devam ettirirken 2.saatten sonra hızla kararlılığını kaybetti (Şekil 4.37 a, b, c, d).



Şekil 4.36. *G.lucidum*'un ham lakkaz enziminin 4-20°C (a), 30-40°C (b), 50-60°C (c), 70-80°C (d) aralıklarında zamana bağlı sıcaklık kararlılığı

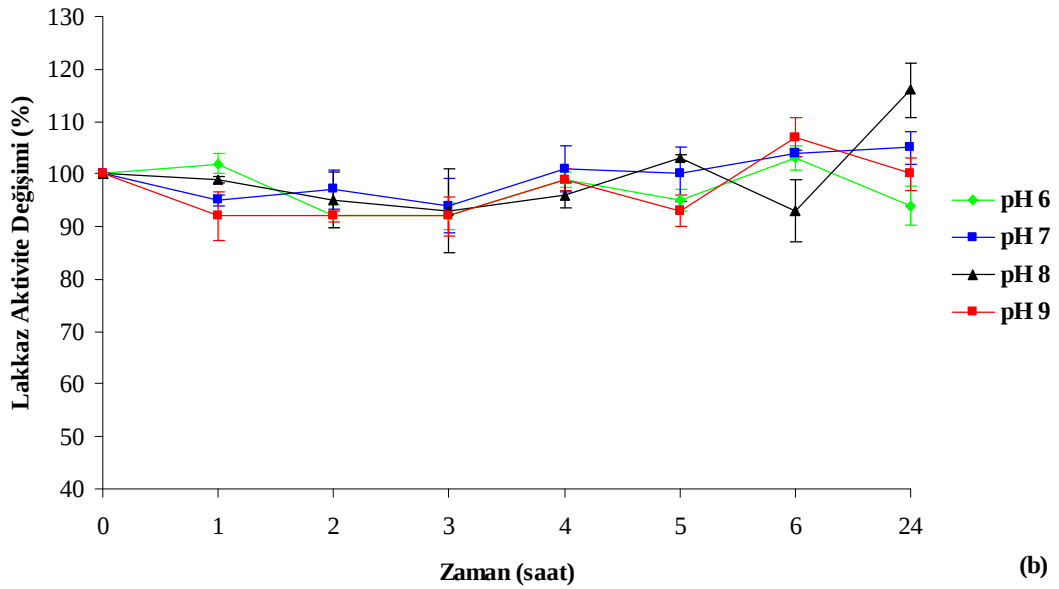
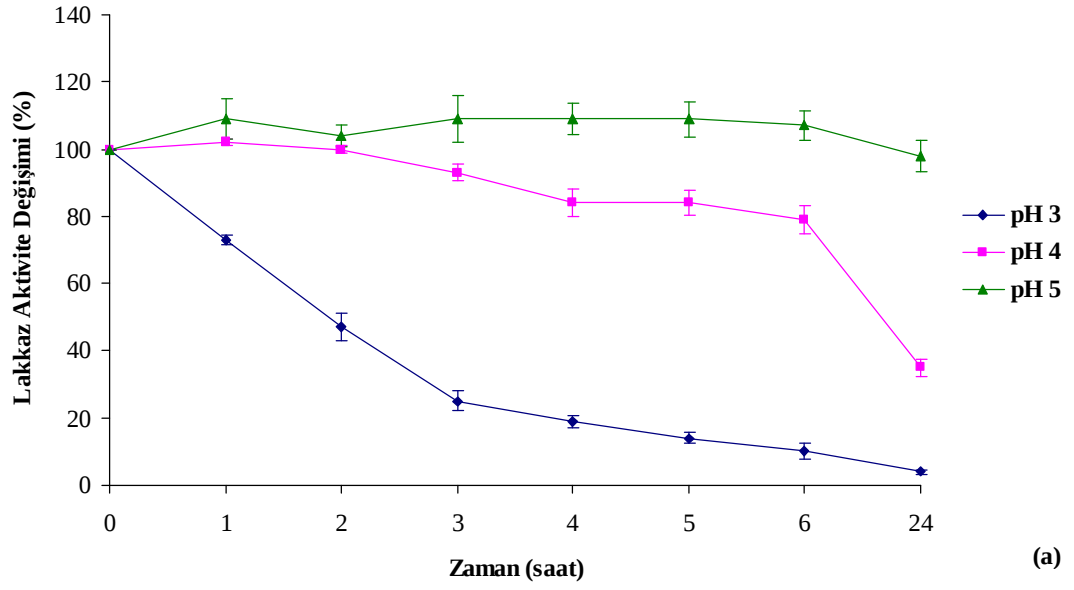


Şekil 4.37. *T.versicolor*'ın ham lakkaz enziminin 4-20°C (a), 30-40°C (b), 50-60°C (c), 70-80°C (d) aralıklarında zamana bağlı sıcaklık kararlılığı

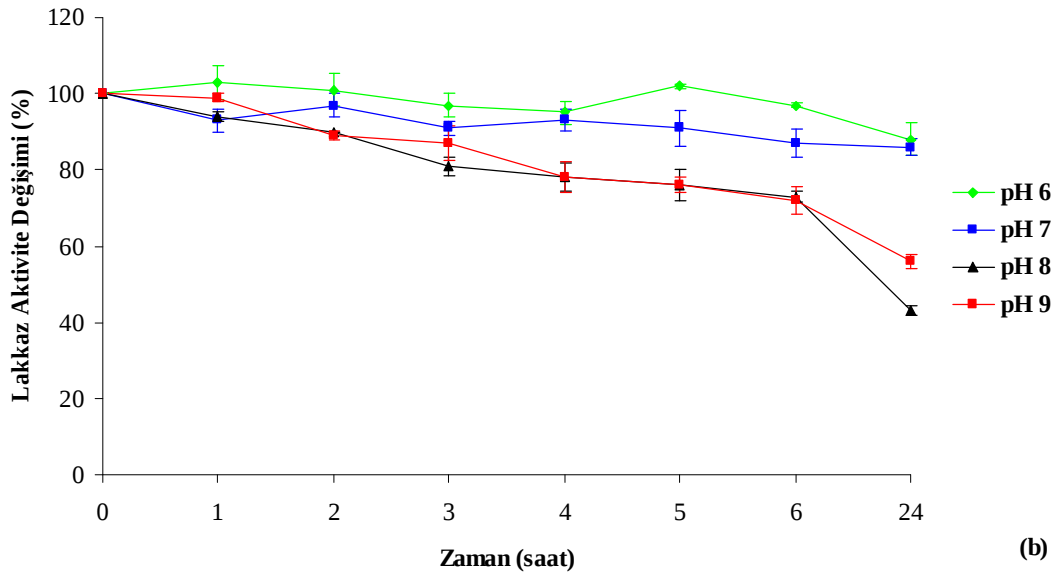
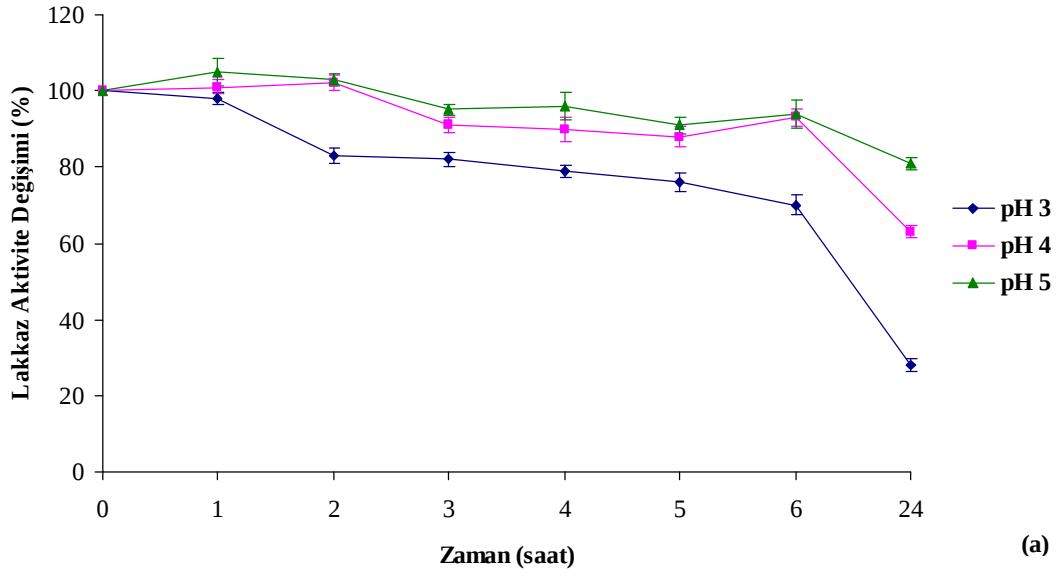
4.6.2. pH'nın enzim kararlılığına etkisi

Ham lakkaz enziminin pH 3-9 aralığındaki pH kararlılığı 24 saat boyunca belirlendi. *F.trogii* ham lakkaz enzimini en fazla pH 3'te aktivite kaybına uğradı ve 24.saatte aktivitenin yalnızca %4'ü korundu. pH 4'te ise 24 saatte sonrasında aktivitenin %35'i korunmuştur. pH 5 ve daha yüksek pH değerlerinde ise aktivitenin 24 saat boyunca oldukça kararlı kaldığı saptandı (Şekil 4.38).

G.lucidum'un ham lakkaz enziminde ise tüm pH değerlerinde 6 saat boyunca enzim aktivitesinde oldukça az bir aktivite değişimi oluştu. 24.saatte en fazla aktivite kaybı pH 3'te izlenirken kalan aktivite %28 olarak belirlendi. pH 4' te %63, pH8'de %43 ve pH9' da %56 kalan aktivite değerleri saptandı (Şekil 4.39).

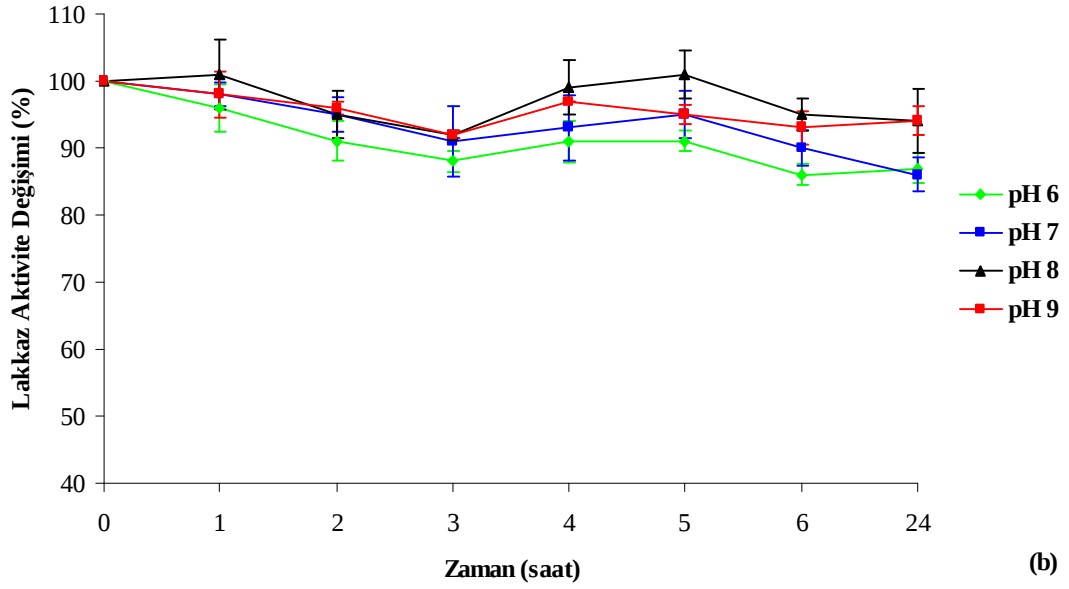
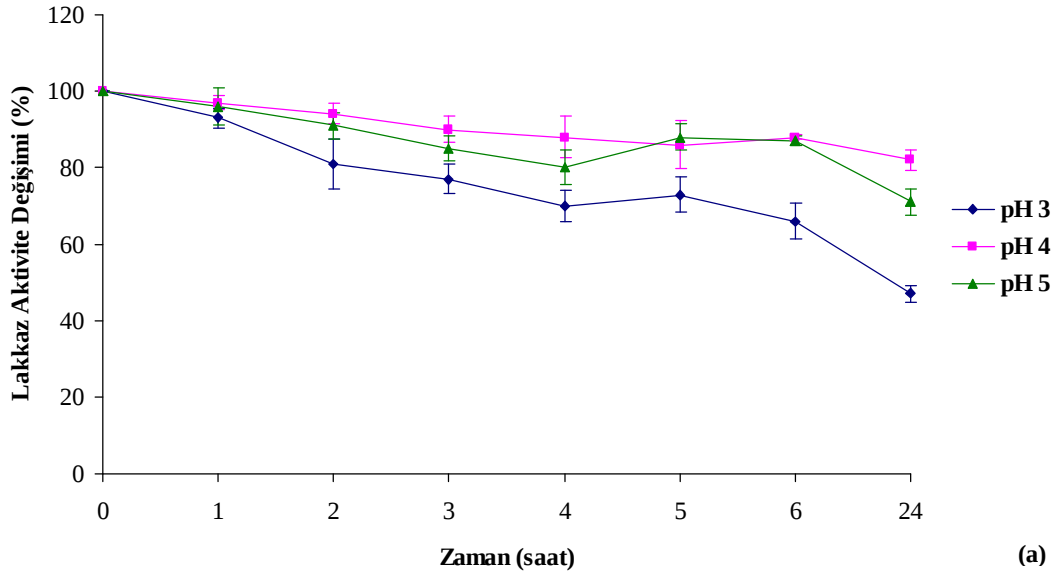


Şekil 4.38. *F.troglis*'nin ham lakkaz enziminin pH 3, 4, 5 (a) pH 5, 6, 7, 8, 9 (b) pH kararlılığı



Şekil 4.39. *G.lucidum*'un ham lakkaz enziminin pH 3, 4, 5 (a) pH 5, 6, 7, 8, 9 (b) pH kararlılığı

T.versicolor'da ise pH 3'te enzim kararlılığı ilk saatten itibaren azaldı ve 24 saatte kalan aktivite %47 olarak belirlendi. Diğer pH değerlerinde ise ham enzimin aktivitesinde 24 saat boyunca değişim gözlenmedi (Şekil 4.40). Özellikle pH 6 ve daha yüksek pH' larda lakkaz enziminin 24 saat boyunca kararlı kalabildiği izlendi.



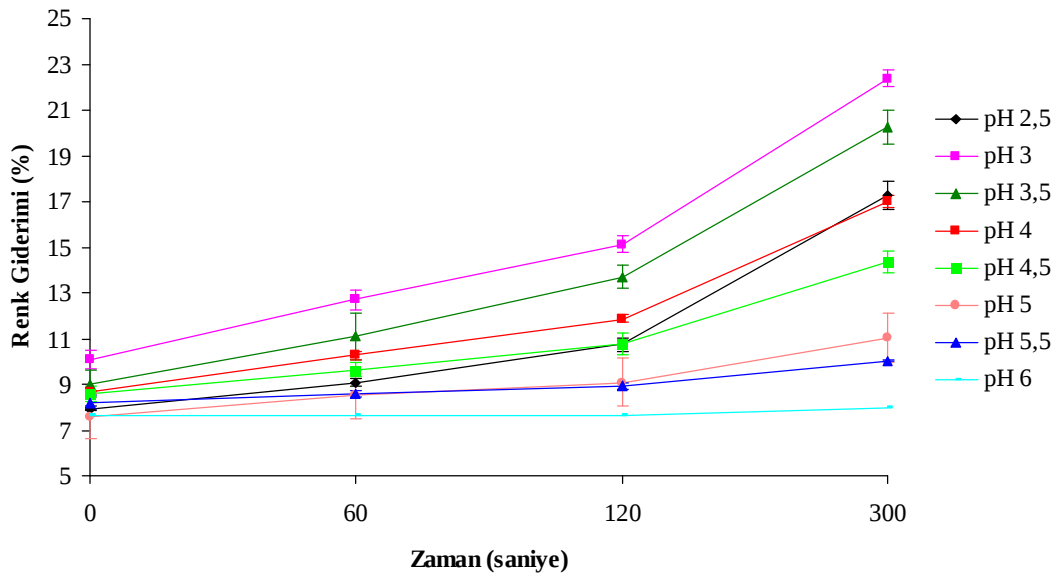
Şekil 4.40. *T.versicolor*'ın ham lakkaz enziminin pH 3, 4, 5 (a) pH 5, 6, 7, 8, 9 (b) pH kararlılığı

4.7. Ham Lakkaz Enzimi ile Renk Giderim Çalışmaları

Boyar maddelerin renginin giderimi boyanın yapısına, uygulama koşullarına ve boyar madde miktarına göre değişmektedir. Bundan dolayı *G.lucidum*'un ham enzim kaynağı ve Remazol Brilliant Blue R (RB 19) sırasıyla renk giderim çalışmalarında kullanılacak enzim kaynağı ve boyar madde olarak seçilmiştir. Bu kısımda, boyar maddenin renginin gideriminde başlangıç pH'sı, sıcaklık, zaman, enzim miktarı ve boyar madde konsantrasyonunun etkisi araştırılmıştır.

4.7.1. Başlangıç pH'sının renk giderimine etkisi

RB 19'un renginin giderimi için öncelikle başlangıç pH'sının etkisi araştırıldı. Ham lakkaz enziminin (100µL) ve 100 mg/L boyar madde içeren ortamlarda 30°C renk giderim aktivitesi incelendiği zaman, en iyi renk giderimi 300 saniyede pH 2.5, 3 ve 3.5'ta sırasıyla %17.24, %22.38 ve %20.25 olarak belirlendi (Şekil 4.41).

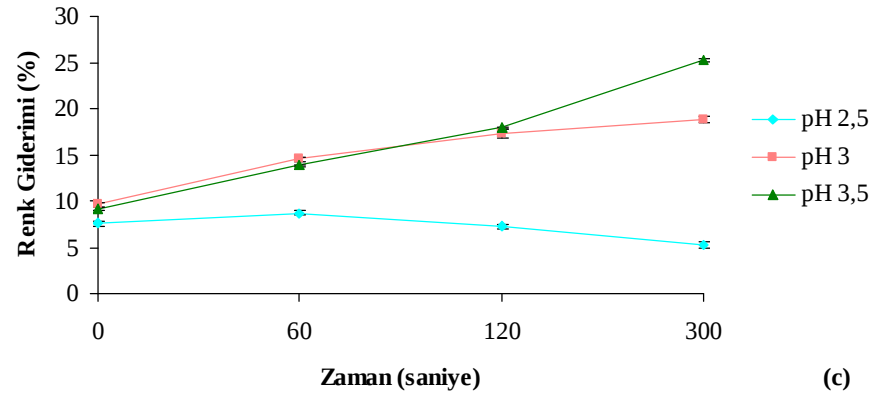
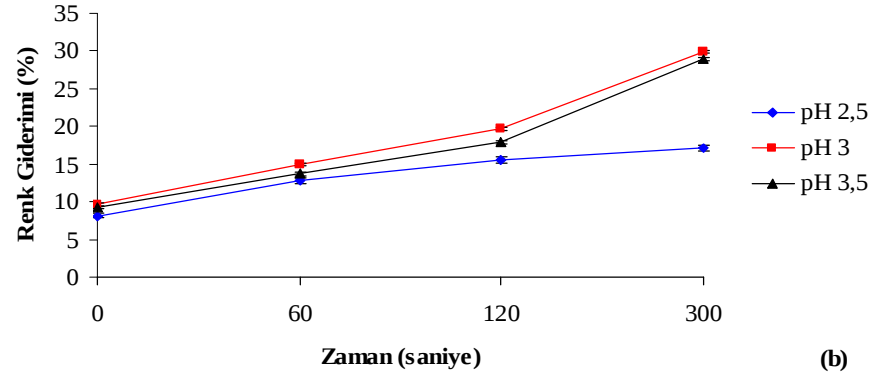
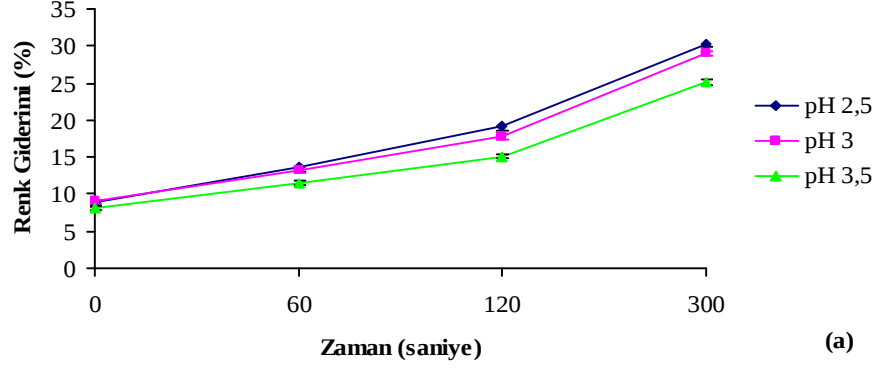


Şekil 4.41. Ham lakkaz enziminin farklı pH'larda RB 19 renk giderim aktivitesi

4.7.2. Sıcaklığın renk giderimine etkisi

Sıcaklığın renk giderimine etkisini incelendiği çalışmalarda 100mg/L boyar madde içeren pH 2.5, 3 ve 3.5 tamponlarına 100µL enzim kaynağı eklendi ve farklı sıcaklıklarda (40, 50 ve 60°C) zamana bağlı renk giderimi saptandı. 300. saniyedeki

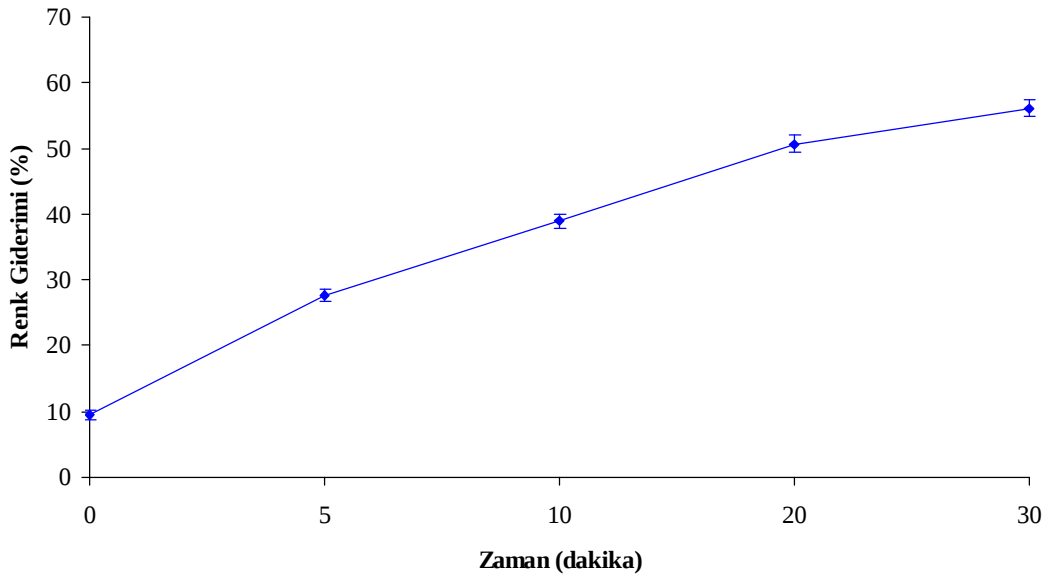
renk giderimi 40°C pH 2.5'ta %30.26, pH 3'te ise %28.98 olarak belirlendi. 50°C'de ise en etkin renk gideriminin pH 3'te %29.95 olduğu görüldü. 60°C'de ise renk gideriminin 40 ve 50°C' ye göre daha düşük olduğu izlendi (Şekil 4.42 a,b,c).



Şekil 4.42. Ham lakkaz enziminin farklı sıcaklıklarda 40°C (a), 50°C (b), 60°C (c) RB 19 renk giderim aktivitesi

4.7.3. Zamanın renk giderimine etkisi

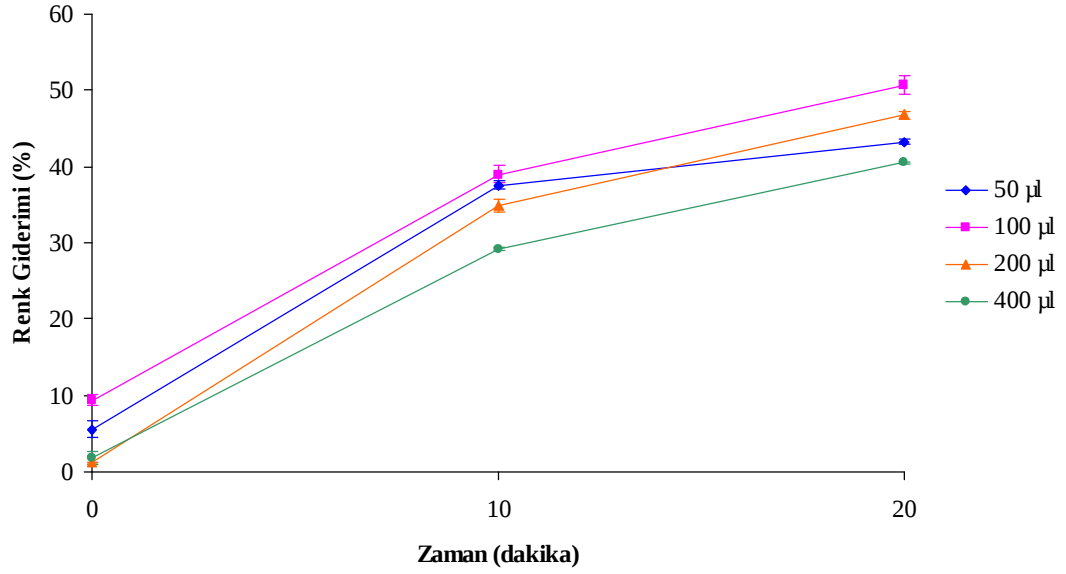
Renk gideriminin zamana bağlı değişiminin belirlenmesi amacıyla çalışmalar, en iyi renk gideriminin belirlendiği pH 3 ve 40°C’de 300 saniyeden daha uzun sürelerde yürütülmüştür. Ham enzim kaynağı (100µL) ve 100mg/L boyar madde içeren ortamlarda 0-30 dakika arasında renk değişimi incelenmiştir (Şekil 4.43). En etkin renk giderimi 20. dakikada %50.71 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.43. Ham lakkaz enziminin zamana bağlı RB 19 renk giderim aktivitesi

4.7.4. Ham enzim miktarının renk giderimine etkisi

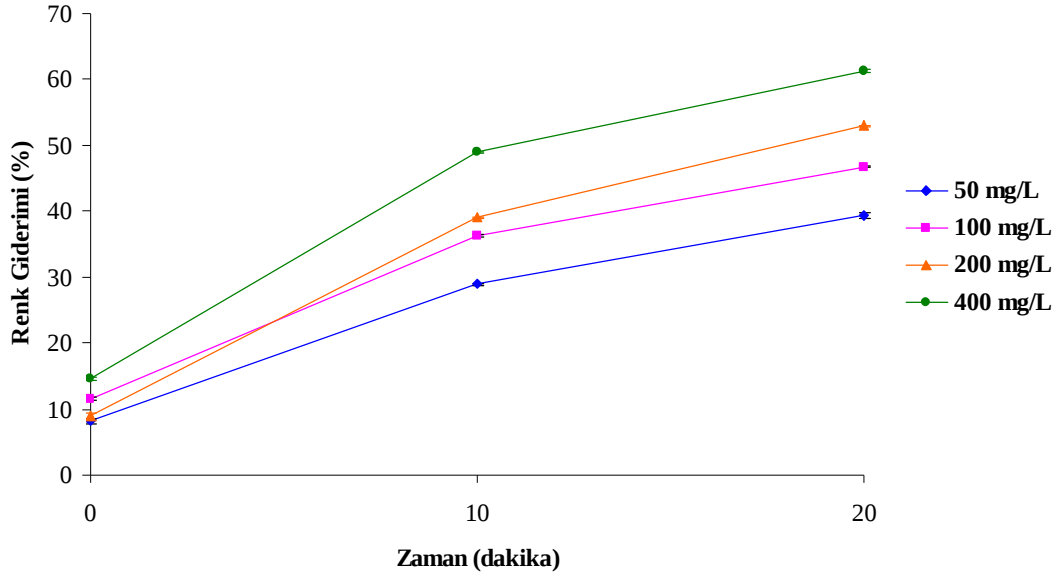
Enzim miktarının renk giderimine etkisini saptamak için farklı miktarlarda ham enzim (50-400µL), 100mg/L boyar madde içeren reaksiyon ortamlarında boyar madde renk değişimi 40°C ve pH 3’te zamana bağlı (0-20 dakika) olarak saptanmıştır. Enzim miktarının değişim renk giderimi üzerine önemli bir etkisi gözlenmemiştir (Şekil 4.44). En iyi renk giderimi 100 µL enzim kaynağı kullanılan çalışmada % 50.71 olarak saptanmıştır.



Şekil 4.44. Ham lakkaz enzim miktarının RB 19'un renk giderimine etkisi

4.7.5. Boya konsantrasyonunun renk giderimine etkisi

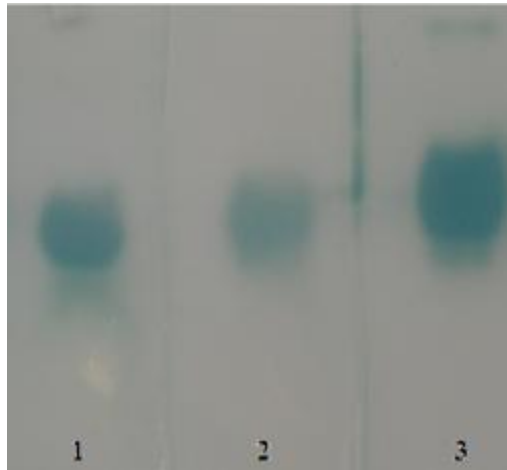
Boya konsantrasyonunun renk giderimine etkisini saptamak için çalışmalar 100µL enzim ve farklı konsantrasyonlarda (50-400mg/L) boyar madde içeren ortamlara 40°C ve pH 3 yürütülmüştür. Boya konsantrasyonu arttıkça renk giderim etkinliğinin de arttığı izlendi. En etkin renk giderimi ise 400 mg/L boya konsantrasyonunda %61.28 olarak belirlendi (Şekil 4.45).



Şekil 4.45. Boyar madde konsantrasyonunun renk giderimine etkisi

4.8. Poliakrilamid Jel Elektorforezi Çalışmaları

KSF çalışmalarından elde edilen ham lakkaz enzim kaynağının zimogram çalışmaları da yapılmış ve çalışma sonucu aktivite boyaması yapılarak jel üzerinde lakkaz varlığı araştırılmıştır. *F.trogii* ve *G.lucidum* için birer lakkaz aktivite bandı gözlenirken, *T. versicolor* için 2 band gözlenmiştir. Bu da, bu suşta en az iki lakkaz izozimi olduğunu göstermektedir (Şekil 4.46).



Şekil 4.46. *F. trogii* (1), *G.lucidum* (2) ve *T. versicolor* (3) kültür filtratlarının ham lakkaz enzim zimogramları

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Lakkaz, hem fenolik hem de fenolik olmayan bileşikleri oksitleyebilme özelliğinden dolayı birçok endüstriyel alanda oldukça dikkat çeken bir enzimdir. Bu enzim, kağıt hamurunun ağartılması, tekstil boyalarının renginin giderimi, atık suların muamelesi, kot ağartılması, çeşitli kirleticilerin yıkımı, biyosensör hazırlanması gibi birçok biyoteknolojik uygulamada kullanılmaktadır (Mienda vd., 2011; Birhanli ve Yesilada, 2010; Boran ve Yesilada, 2011). Bu çalışmada, bu enzimin katı substrat fermentasyonu (KSF) sürecinde yüksek miktarda üretimi ve aynı zamanda tarımsal atık/ham maddelerin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. KSF işlemleri ile etkin lakkaz üretiminde; üretici mikroorganizma, kullanılan katı substrat, katı substratı nemlendirme oranı, indükleyiciler, ortam pH'sı ve sıcaklığı önemli oranda etkilidir. Bu nedenle de doğadan yeni izole edilen fungusların üretim kapasitesinin araştırılması ve elde edilecek enzimin kararlılık ve optimizasyon çalışmalarının yapılması çok önemlidir.

Son zamanlarda lakkaz üreten yeni fungal soyların bulunması, bu mikroorganizmalar ile lakkaz üretiminin optimizasyonu ve biyoteknolojik olarak çevre dostu olan bu enzimin düşük maliyette ve fazla miktarda üretimi oldukça önem kazanmıştır. Bu nedenle yüksek etkinlikte, çevre dostu ve düşük maliyetli lakkaz üretimi birçok araştırmacının ilgisini çekmektedir. Çalışmada doğadan izole edilip tanımlanan *F.trogii*, *G.lucidum* ve *Trametes versicolor* suşları kullanılmıştır. Bu suşlar KSF sürecinde ilk kez bu amaçla test edilmektedir. Bu nedenle, öncelikle doğadan toplanıp saf kültür olarak elde edilen bu suşların olası üretim yetenekleri lakkaz substratı olarak ABTS içeren Sabouraud dekstrozu katı ortamında araştırılmış ve bu fungusların lakkaz ürettikleri saptanmıştır.

KSF'de hem destek hem de besinsel açıdan fayda sağlayan lignoselülozlu atıklar/hammaddeler ve yiyecek endüstrisi atıkları kullanılabilir (Krishna, 2005; Boran ve Yesilada 2011, Ozmen and Yesilada, 2012). Lignin, selüloz ve hemiselüloz içerdiklerinden dolayı, lignoselülozlu hammaddeler lakkaz enzimi gibi önemli ürünlerin üretiminde alternatif besiyeri olarak kullanılabilir. Çalışmamızda *F.trogii*, *G.lucidum* ve *Trametes versicolor*'ın lakkaz üretim yetenekleri farklı katı substrat içeren ortamlarda araştırılmıştır (Çizelge 5.1).

Çizelge 5.1. KSF sürecinde *F. trogii*, *G.lucidum* ve *T.versicolor* ile 5. günde elde edilen lakkaz aktivite değerleri (U/L)

Kullanılan fungus	Katı substrat	Lakkaz Aktivitesi (U/L)
<i>Funalia trogii</i>	Buğday kepeği	6008±53
	Kozalak	636±45
	Kavak talaşı	574±23
	Ceviz kabuğu	355±34
	Yaprak	598±96
	Mısır koçanı	81±3
	Buğday samanı	106±1
<i>Ganoderma lucidum</i>	Buğday kepeği	2814±105
	Kozalak	873±114
	Kavak talaşı	182±27
	Ceviz kabuğu	104±8
	Yaprak	132±10
	Mısır koçanı	101±13
	Buğday samanı	172±10
<i>Trametes versicolor</i>	Buğday kepeği	906±135
	Kozalak	577±73
	Kavak talaşı	103±19
	Ceviz kabuğu	119±15
	Yaprak	514±21
	Mısır koçanı	138±13
	Buğday samanı	275±2

Buğday kepeği, atık yaprak, atık kavak talaşı, atık ceviz kabuğu, atık kozalak, atık buğday samanı ve atık mısır koçanının ayrı ayrı katı substrat olarak denendiği çalışmalarda, lakkaz üretimi için en etkin katı substratın buğday kepeği olduğu belirlenmiştir. Buğday kepeğinin enzim üretimi için etkili bir katı subtrat olduğu rapor edilmektedir ve bu nedenle, birçok çalışmada lakkaz üretiminde etkili bir

substrat olarak test edilmiştir. Buğday kepeği buğday öğütme fabrikasında yüksek miktarda üretilen bir yan üründür ve önemli bir karbon kaynağıdır (Beaugrand vd., 2004). Funguslar için doğal habitatlarına benzer bir çevre sağlayan ve hemiselüloz, nişasta, selüloz, protein, lignin içeren bir substrat olması ek bir avantajdır (Maes ve Delcour, 2001; Murugesan vd., 2007). *Pleurotus pulmonarius*'un buğday kepeği ortamında lakkaz üretebildiği rapor edilmiştir (De Souza vd., 2002). Buğday kepeğinde ferulik, kumarik, siringik, gentisik ve kafeik asit gibi fenolik bileşikler bulunmaktadır (Onyeneho ve Hettiarachchy, 1992, Hegde vd., 2006). Fenolik bileşiklerin lakkaz aktivitesini indükleyen önemli bileşikler olduğu birçok çalışmada rapor edilmiştir (Berka vd., 1997; Farnet vd., 2004, Revankar ve Lele, 2006). Belirtilen nedenlerle, buğday kepeği ortamında funguslar etkili lakkaz üretimi sağlayabilir ve bu çalışmada da yüksek lakkaz aktivite değerlerine ulaşılmıştır. *Ganoderma* sp. üretilen ortamda en yüksek lakkaz aktivitesi 974 U/gds olarak rapor edilmiştir (Revankar vd., 2007). Özşölen vd. (2010) tarafından yapılmış olan diğer bir çalışmada ise farklı katı substratlar üzerinde *T. versicolor* ATCC200801'in 30°C'de 12 gün boyunca üretimi sonucunda yonca samanı ortamında 22.36 U/mL ve buğday kepeği ortamında da 19.77 U/mL lakkaz aktivitesi rapor edilmiştir. Çalışmamızda ise *T.versicolor* için daha düşük aktivite değeri elde edilmiştir. Bunun nedeni ortam şartlarının ve özellikle kullanılan fungal soyun farklı olması olabilir.

Birçok çalışmada da farklı katı substratların lakkaz üretimine etkisi araştırılmıştır (Çizelge 5.2). Bu çalışmalar, katı substrat ve kullanılan suşun lakkaz üretimi açısından önemli olduğunu göstermektedir. Osma vd. (2011b) yaptığı çalışmada katı ve sıvı fermentasyon ortamlarını maliyet açısından karşılaştırıp aynı zamanda lakkaz aktiviteleri için de test etmiştir. Bu amaçla, kültür ortamları değiştirilerek lakkaz aktiviteleri ölçülmüş ve maliyet hesapları da yapılmıştır. Buğday kepeği kullandıkları KSF çalışmalarında *T.pubescens* için 10. günde 2500 U/L lakkaz aktivitesi belirlemiş ve üretim şartları değişse de KSF ortamının SF ortamına göre oldukça düşük maliyetli olduğunu rapor etmiştir. Balaraju vd. (2010) *Oudemansiella radicata* ile buğday kepeği ortamında inkübasyonun 14. gününde 11.473 U/mL ve pirinç kepeği ortamında 25.784 U/mL lakkaz aktivitesi değerlerine ulaşmışlardır. Elisashvili vd. (2008a) yaprak atığını katı substrat olarak kullandıkları çalışmada, *T.versicolor* için 662±71 U/L ve *F.trogii* için 458±54 U/L lakkaz aktivitesi belirlemiştir. Aynı çalışmada buğday samanı kullanıldığında ise

T.versicolor'da 137 ± 14 U/L, *F.trogii*'de ise 760 ± 70 U/L lakkaz aktivitesi rapor edilmiştir. Yaprak atığını katı substrat olarak kullanıldığı çalışmamızda ise *T.versicolor* ile 5. günde 514 ± 21 U/L ve *F.trogii* ile 598 ± 96 U/L lakkaz aktivitesi tespit edildi. Buğday samanının katı substrat olarak kullandığı durumda aktivite değerleri *T.versicolor* için 275 ± 2 U/L ve *F.trogii* için 106 ± 1 U/L olarak belirlendi. Üretim sürecinde funguslar ve substratlar aynı olsa dahi sıcaklık, nemlendirme sıvısı, nemlendirme oranı gibi üretim şartlarından dolayı farklı aktivite sonuçları elde edilebilmektedir. Elisashvili vd., (2008b), yaprak ve buğday samanını katı substrat olarak kullandıkları çalışmada, yaprak kullanılan ortamda en yüksek lakkaz aktivitesini *Lentinus edodes* IBB 123 ve *L.edodes* IBB 363 için sırasıyla 57 U/erlen ve 52 U/erlen olarak rapor etmişlerdir. *Pleurotus ostreatus* 2175, *P. dryinus* IBB 903 ve *P. tuberregium* IBB 624 için ise sırasıyla 15 U/erlen, 16 U/erlen ve 20 U/erlen lakkaz aktiviteleri belirlenmiştir. Talaşın katı substrat olarak denendiği bir çalışmada *Pleurotus ostreatus* ile 0.15 U/mL lakkaz aktivitesi elde edilmiştir (Hasmin, 2012). Çalışmamızda, *F.trogii* ile talaş ortamında daha yüksek lakkaz aktivitesine ulaşılmıştır. Bu, üretimde kullanılan fungusun ve hatta suşun önemini göstermektedir. Risdianto vd., (2012) tarafından yapılan çalışma da mısır koçanı ortamında *T.versicolor* 7. günde 220.14 U/L lakkaz ürettiği rapor edilmiştir. Çalışmamızda ise 138.12 U/L aktivite belirlenmiştir. Üretimde kullanılan fungus ve kullanılan katı substrat aynı olmasına rağmen suşun, nemlendirme ortamının, üretim şartları ve inkübasyon süresinin farklı olmasından dolayı lakkaz aktiviteleri değişmektedir. *Trametes versicolor* FPRL 28A INI'nın distile su ile nemlendirilen zeytin yaprağı üzerinde üretildiği çalışmada lakkaz aktivitesi üretimin 26. gününde 30.98 U/g ds olarak belirlenmiştir (Aydınoglu ve Sargın, 2013).

Yapılan çalışmalar, substrat ortamları ve funguslar (hatta suşlar) değiştikçe üretim şartlarının da etkisi ile farklı lakkaz aktivitelerine ulaşılabileceğini göstermektedir (Çizelge 5.2).

Çizelge 5.2. Yapılan çeşitli araştırmalarda, çeşitli fungusların KSF sürecinde üretimi sonucu elde edilen lakkaz aktivite değerleri

Fungus	Suş No	Katı substrat	Lakkaz aktivitesi	Referans
<i>T.pubescens</i>	CBS 696.94	Buğday kepeği	2500 U/L	Osma vd., 2011b
<i>T.versicolor</i>	IBB 897	Yaprak atığı	662 U/L	Elisashvili vd., 2008a
	IBB 897	Buğday samanı	137 U/L	Elisashvili vd., 2008a
		Mısır koçanı	220 U/L	Risdianto vd., 2012
	FPRL 28A INI	Zeytin yaprağı	31 U/gds	Aydinoğlu ve Sargın, 2013
	ATCC200801	Yonca samanı	22.36 U/mL	Özşölen vd.,2010
	ATCC200801	Buğday kepeği	19.77 U/mL	Özşölen vd.,2010
	NBRC4937	Domates posası	35 U/g d.m.	Iandolo vd., 2004
<i>F.trogii</i>	IBB 146	Yaprak atığı	458 U/L	Elisashvili vd., 2008a
	IBB 146	Buğday samanı	760 U/L	Elisashvili vd., 2008a
<i>Ganoderma</i> sp.	WR-1	Buğday kepeği	974 U/gds	Revankar vd., 2007
<i>Oudemansiella radicata</i>		Buğday kepeği	11 U/mL	Balaraju vd.,2010
<i>Pleurotus ostreatus</i>		Talaş	0.15 U/mL	Hasmin, 2012
	2175	Yaprak	15 U/flask	Elisashvili vd., 2008b
	2191	Buğday samanı	17 U/flask	Elisashvili vd., 2008b
	ATCC MYA-2306	Domates posası	15 U/g d.m.	Iandolo vd., 2004
	HK-35	Patates kabuğu	6708.3 U/L	Ozcırak ve Urek, 2012
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	CCB-19	Mısır koçanı	270 U/L	Tychanowicz vd., 2006
	CCB-19	Buğday kepeği	8600U/gsubstrat	De Souza vd., 2002
<i>Pleurotus</i> sp.	HP1	Buğday samanı	3992 U/g	Patel vd., 2009
<i>Fomes fomentarius</i>	MUCL 35117	Buğday kepeği	8124 U/L	Neifar vd., 2009
<i>Lentinus edodes</i>	IBB 123	Yaprak	57 U/erlen	Elisashvili vd., 2008b
	IBB 363	Buğday samanı	55 U/erlen	Elisashvili vd., 2008b
<i>P. dryinus</i>	IBB 903	Yaprak	16 U/erlen	Elisashvili vd., 2008b
	IBB 903	Buğday samanı	13 U/erlen	Elisashvili vd., 2008b
<i>P. tuberregium</i>	IBB 624	Yaprak	20 U/erlen	Elisashvili vd., 2008b
		Buğday samanı	10 U/erlen	Elisashvili vd., 2008b

Fungusun lakkaz üretimi için gerekli optimum sıcaklık çalışmalarında her üç fungus için buğday kepeği ortamında de en uygun sıcaklık aralığı 30°C olarak belirlenmiştir. Yine, *F.trogii* ve *T.versicolor* için en iyi lakkaz aktivitesinin saptandığı pH değeri pH 6 iken *G.lucidum* için geniş bir pH aralığında (pH 3-7) yüksek enzim aktivitesi elde edilmiştir. Iqbal vd. (2011) *T.versicolor* IBL-04 için optimum koşulları sırasıyla 30°C ve pH 4 olarak rapor etmiştir. *P.ostreatus* lakkaz üretimi için en uygun sıcaklık aralığı 25°C olarak rapor edilmiştir (Hasmin, 2012). Risdianto vd. (2010) ise pirinç kepeğini katı substrat olarak kullandıkları çalışmada *Marasmius* sp.'nin optimum sıcaklığını 31°C olarak belirlemiştir (1564.17 U/L lakkaz aktivitesi).

KSF, serbest suyun olmadığı katı substratlar üzerinde mikrobiyal üreme sürecini içerir. KSF'de başlangıç nem seviyesinin optimizasyonu, substratın kullanımı ve lakkaz üretimi açısından önemlidir (Patel vd., 2009). Bu nedenle çalışmada nem miktarının etkisi de test edilmiştir. Nem miktarının düşük olması besin transferini güçleştirmekte ve mikroorganizmanın üremek için ihtiyaç duyduğu su aktivitesini etkilemektedir, aksine yüksek nem seviyesinde ise gaz transferi sınırlanmaktadır. Mikrobiyal üreme için oldukça önemli olan nemlendirme oranı da kullanılan katı substrata göre değişir. Örneğin, *Aspergillus niger* pirinç üzerinde üretildiğinde optimum nem seviyesi %40 iken kahve atığında %80 olarak rapor edilmiştir (Raimbault, 1998; Gervais ve Molin, 2003). Çalışmamızda %50, %75 ve %85 nem içeren ortamlarda üretilen *F.trogii*, *G.lucidum* ve *T.versicolor*'un lakkaz aktiviteleri saptanmıştır. En yüksek lakkaz aktiviteleri %75 nem oranına sahip olan ortamlarda tespit edilmiştir. Daha düşük (%50) ve yüksek (%85) nem seviyelerinde ise lakkaz aktivitesinin önemli oranda azaldığı tespit edilmiştir. Revankar vd. (2007) tarafından yapılan çalışmada farklı nem içerikleri (%40-%80) test edilmiş ve *G.lucidum* için buğday kepeği ortamının uygun nem miktarının %70 olduğu belirlenmiştir. Hasmin, (2012)'de *Pleurotus ostreatus* lakkaz üretimi (0.27 U/L) için talaş ortamında 1:3'lük nem oranının en uygun nemlendirme oranı olduğunu rapor etmişlerdir. Kahve atığının kullanıldığı çalışmada ise optimum nem seviyesi %55-60 olarak belirlenmiştir (Leifa vd., 2000). De Souza vd. (2002) yaptığı çalışmada ise çalışmamıza benzer şekilde temel substrat olarak buğday kepeği kullanmış, optimum nem içeriğini %75 olarak belirlemiştir. Aydınoglu ve Sargın (2013) en uygun nem seviyesini %80 olarak tespit etmiştir. *T.versicolor* için optimum %75 nem içeriğini

tespit ettiğimiz çalışmamıza benzer şekilde daha düşük ve daha yüksek nem seviyelerinin de lakkaz aktivitesinde düşüşe neden olduğunu rapor edilmiştir. Çalışmalar, nem tutma kapasitesinin substrata göre değiştiğini de göstermektedir.

Çalışmamızda, ayrıca enzim üretimini arttırmak amacıyla ortama soya unu, yaprak, malt özütü, bakır gibi lakkaz üretimini indükleyebilecekleri düşünülen ek substratlar ve indükleyiciler farklı konsantrasyonlarda eklenmiş ve bu ortamlardaki lakkaz aktiviteleri belirlenmiştir. Aynı zamanda, nemlendirme sıvısı olarak direkt distile su yerine melas içeren distile su ile nemlendirilen ortamlardaki lakkaz aktiviteleri saptanmıştır.

Soya unu önemli bir protein kaynağıdır (<http://www.grain-free-gluten-free.com/soy-flour.html>). Yüksek lakkaz aktivite değerlerine ulaşılan buğday kepeği ortamına soya ununun eklediğimiz çalışmalarda lakkaz üretiminde önemli oranda artış sağlanmıştır. Papinutti ve Forchiassin, (2007) ve Aydınoglu ve Sargin (2013) buğday kepeği ortamına soya ununun eklenmesinin enzim üretimini etkilediğini bildirmiştir.

Maya özütü, organik azot kaynağı olup üreme ve enzim sentezinde etkili olan aminoasit, protein ve vitamin içermektedir. İyi bir azot kaynağı olan maya özütünün lakkaz aktivitesine etkisinin araştırıldığı çalışmada maya özütü ilavesi belirli bir konsantrasyona kadar lakkaz üretimini indüklerken, belirli bir konsantrasyon üzerinde enzim üretimi üzerine negatif etki yapmıştır. Yüksek maya özütü konsantrasyonlarının enzim üretimi üzerine negatif etkisi rapor edilmiştir (Mehta vd., 2006). Bunun bir nedeni, beyaz çürükçül fungusların esas hedefi olan ligninin yıkımının sekonder metabolizma esnasında azot sınırlı ortamda olması olabilir (Keyser vd., 1978, Mester ve Field, 1998). Lakkaz gibi ligninolitik enzimlerin azot sınırlı ortamda etkin olduğu rapor edilmektedir (Mäkelä vd., 2013). De Souza vd. (2011), maya özütü ilavesinin lakkaz üretimini inhibe ettiğini belirtilmiştir. Buna karşın Kaal vd. (1995) ise, yüksek azot miktarının ligninin depolimerizasyonunu indüklediğini rapor etmişlerdir. Galhaup vd. (2002)'de çalışmalarında da etkin lakkaz üretimi için azot kaynağının gerekli olduğunu rapor etmiştir. Çalışmamızda da, düşük maya özütü ilavesi lakkaz üretimini indüklerken yüksek miktarlara çıkıldığında lakkaz üretiminin azaldığı görülmektedir. Risdianto vd., (2012) 0.2 g/L maya özütü ilavesinin *T.versicolor* lakkaz üretimini indüklediğini, yüksek miktarda eklenen maya özütünün ise lakkaz üretiminde azalmaya neden olduğunu rapor

etmiştir. Çalışmamızda da, maya özütü ilavesi *T.versicolor*'ın lakkaz üretimi üzerine negatif etki yapmıştır. *G.lucidum*'un üretildiği ortamda ise maya özütü ilavesi lakkaz üretimi üzerine önemli bir indüklemeye yapmamıştır. *F.trogii* ortamlarına 1 ve 5mg/L konsantrasyonlarda maya özütü ilavesi lakkaz üretimini indüklerken yine yüksek miktarda (20mg/L) maya özütü ilavesi lakkaz üretimini negatif etkilemiştir. Yine bir başka çalışmada (De Souza vd., 2011), nemlendirilmiş buğday kepeği üzerinde *T.versicolor* üretilmiş ve maya özütü ilavesinin lakkaz üretimini inhibe ettiği rapor edilmiştir. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlarda *T.versicolor* için belirtilen çalışmaları desteklemektedir. Aydınoglu ve Sargın (2013), %0.5 ve %1 oranında maya özütü ilavesinin *Trametes versicolor*'ın lakkaz üretimini indüklediğini yüksek konsantrasyonda ise (%2) lakkaz üretimi üzerine negatif etki yaptığını rapor etmiştir. Deveci vd. (2004) de azot kaynağının etkisini rapor etmiştir.

Ek kaynak olarak yaprak ilavesinin lakkaz üretimine etkisini saptayabilmek amacıyla yapılan çalışmada çeşitli oranlarda yaprak (1:1, 2:1, 3:1, 4:1) olmak üzere buğday kepeği ortamına eklenmiştir. *F.trogii*, *G.lucidum* ve *T.versicolor*'un üretildiği ortamlarda yaprağın lakkaz üretimine olumlu bir etkisi saptanmamıştır. Çalışmada kolay erişilebilirliği ve atık olması nedeniyle tercih edilen yaprağın lakkaz aktivitesini indükleyememesinin nedeninin içeriğinin lakkaz aktivitesini indükleyecek kadar zengin olmamasıyla açıklanabilir.

Bakırın bazı funguslarda lakkaz üretimi üzerine pozitif etki yaptığı bilinmektedir (Galhaup vd., 2002; Rodríguez Couto ve Sanromán, 2005b; Birhanli ve Yesilada, 2006; Boran ve Yesilada, 2011; Mäkelä vd., 2013; Dittmer vd., 1997). Collins ve Dobson (1997), bakırın *Trametes versicolor* lakkaz gen ifade seviyesini arttırdığını rapor etmiştir. Palmieri vd. (2000)'de bakırın benzer etkisini *P.ostreatus* için bildirmiştir. Birhanli and Yesilada (2006), bakırın ortamda mevcut bulunan lakkaz enziminin aktivitesi üzerine değil sentezi üzerine etki yaptığını rapor etmiştir. Yani, bakırın etkisi sentezlenmiş bulunan enzimin aktivitesi indüklemek yoluyla değil gen ifadesini artırma süreciyle gerçekleşmektedir. Bakırın lakkaz üretiminde ilavesinin pozitif etkisi *Marasmius quercophilus* (Farnet vd., 1999), *Trametes pubescens* (Galhaup ve Haltrich, 2001), *Pleurotus sajor-caju* (Soden ve Dobson, 2001), *Trametes trogii* (Levin vd., 2002) kültürlerinde de rapor edilmiştir.

Yukarıda belirttiğimiz nedenlerle, KSF ortamına eklenen bakırın lakkaz üretimi üzerine negatif veya pozitif etkisi de araştırılmıştır. Özellikle 10 mM bakırın

lakkaz aktivitesini önemli ölçüde indüklediği gözlenmiştir. Tychanowicz vd. (2006), *Pleurotus pulmonarius* ürettikleri mısır koçanını ortamına 25mM bakır eklenmesiyle 270 U/L olan lakkaz aktivitesinin 1420 U/L'ye yükseldiğini bildirmiştir. Boran ve Yeşilada (2011)'de zeytinyağı fabrikası atık suyu ve vinas ile nemlendirilen buğday kepeği ortamlarına bakır eklenmesinin lakkaz üretimini indüklediğini bildirmiştir. Patel vd. (2009) buğday samanı üzerinde ürettikleri *Pleurotus* sp. HP1'nin lakkaz aktivitesini bakır içermeyen ortamda 3992 U/g olarak, 0.28 mM bakır içeren ortamda da 14189 U/g olarak rapor etmiştir. *Fomes fomentarius*' un üretildiği buğday kepeği ortamında da çalışmamıza benzer şekilde bakır ilavesinin lakkaz aktivitesini indüklediği rapor edilmiştir (Neifar vd., 2009). Çalışmamızda da bakır lakkaz üretimini pozitif etkilemiştir (Şekil 4.17).

Buğday kepeği+soya unu ortamında bakır ilavesiyle en yüksek lakkaz aktivite değerine ulaşılmıştır. Özellikle *F.trogii*'de 10mM bakır eklenmiş 1:1 buğday kepeği:soya unu ortamında oldukça yüksek lakkaz aktivite değerine ulaşılmıştır (32084.74 U/L). Lakkaz üretiminde etkili olan fenolik bileşikler içeren buğday kepeği ve yüksek protein kaynağı olan soya unu katı ortamı fungusların doğada adapte olduğu ortamlara benzer bir destek/çevre oluşturmanın yanı sıra lakkaz üretimi üzerine de pozitif etki yapmıştır.

Çalışmamızın bir kısmında da doğal ve zengin bir kaynak olan melasın nemlendirme sıvısı olarak lakkaz üretimine etkisi test edilmiştir. *F.trogii* lakkaz üretimi uygulanan tüm melas konsantrasyonlarında (%1, 5 ve 10) artmıştır. *G.lucidum* için %5 melas ortamında indüklenme izlenirken, *T.versicolor* için melasın herhangi bir pozitif etkisi gözlenmemiştir. Mehta vd. (2006) melasın düşük konsantrasyonlarda enzim üretimini indüklerken yüksek konsantrasyonlarda üretimi baskıladığını rapor etmiş ve bunu azot kaynaklarının baskılama etkisine bağlamıştır.

Tava tipi fermentör, KSF işlemlerinde yaygın kullanılan bir fermentör tipidir (Pandey, 2004). Tava tipi fermentörün filamentli funguslarla lakkaz üretimi için daha uygun bir fermentör olduğu Rosales vd. (2007) tarafından rapor edilmiştir. Bu tip bir fermentörde fungus mekanik strese maruz kalmayacağı için fungusun parçalanma riski ortadan kalkmakta ve katı substrat ince bir tabaka şeklinde yerleştirildiğinden substratın yığılması engellenmektedir (Rosales vd., 2007). 10mM bakır içeren distile su ile nemlendirilmiş buğday kepeği:soya unu (1:1) ortamında *F.trogii* erlen

kültürlerinin lakkaz aktivitesi 32085 ± 4044 U/L iken tava tipi fermentörde 22469 ± 2622 U/L enzim aktivitesine ulaşılmıştır. *G.lucidum* erlen kültürleri ile 3507 ± 628 U/L ve fermentör kültürleri ile 2008 ± 826 U/L lakkaz aktivitesi saptanmıştır. *T.versicolor* erlen kültürleri için de bu değerler sırasıyla 3516 ± 390 U/L ve 2649 ± 810 U/L olarak belirlenmiştir. Rosales vd. (2007) erlen ve tava tipi fermentör kültürleri ile yaptıkları çalışmada katı substrat olarak portakal kabuğunu kullanmışlar ve *Trametes hirsuta* erlen kültürleri için en yüksek lakkaz aktivitesini 2,5 g portakal kabuğu ortamına 5mM bakır ilave edildiğinde 31786 U/L olarak belirlenirken, tava tipi fermentör ortamında en yüksek lakkaz aktivitesi 12000 U/L olarak belirlenmiştir. Rodríguez Couto vd. (2006b) daldırma tipi ve tava tipi fermentör uygulamalarında, katı substrat olarak üzüm tohumlarını kullandıkları durumda *Trametes hirsuta* ile daldırma tipi fermentöre karşın tava tipi fermentörde daha yüksek lakkaz aktivitesine ulaşılmıştır.

Bilindiği gibi enzimler belirli sıcaklık aralıklarında optimum çalışırlar. Bu değerlerin üzerinde veya altındaki sıcaklık aralıklarında ise proteinler olumsuz etkilendiklerinden inhibisyon gerçekleşir. Enzimlerin katalizlediği reaksiyonların hızı sıcaklığın artması ile moleküller arası çarpışmaların sıklaşması sonucu enzim denatüre olana kadar artar. Sıcaklığa bağlı denatürasyon, enzimlerin aktif bölgesinin bozulması ve tersiyer yapının denatürasyonu sonucu olmaktadır (Palmer, 1991). Enzimler düşük sıcaklıklarda inhibe olur. Ortam pH'sı da enzimin çalışma hızını etkileyen önemli bir faktördür. Yani, enzimlerin optimum çalıştıkları pH ve sıcaklık aralığının belirlenmesi önemlidir. Bu nedenle, elde edilen ham enzim kaynaklarının uygulama açısından önemli olan sıcaklık ve pH ihtiyaçları karşılaştırılmıştır. Her üç fungusun ham lakkaz enzimleri de yüksek sıcaklıklarda yüksek lakkaz aktivite değerleri vermiştir. Bu da, enzimin yüksek sıcaklıklarda belirli sürelerde çalışabilmesi açısından önemlidir. De Souza vd. (2002), *Pleurotus pulmonarius*'un ham lakkaz enziminin 50-55°C'de aktif olduğunu rapor etmiştir. Stoilova vd. (2010) *Trametes versicolor* ham lakkaz enzimi için en yüksek aktiviteyi 45°C'de elde etmiş ve 50°C'den sonra ise lakkaz aktivesinin hızla düştüğünü rapor etmiştir. Diğer yandan, yaptığımız çalışmada daha asidik olan pH değerlerinde daha yüksek ham lakkaz enzim aktivitesi saptanırken, pH artışına bağlı olarak aktivite azalmıştır. Bu da, ham enzim kaynağının düşük pH aralıklarında daha yüksek aktivite verdiğini

göstermektedir. Stoilova vd. (2010) *Trametes versicolor*'ın ham lakkaz enzimi için en yüksek aktiviteyi pH 4,5'da bulmuştur.

Yüksek sıcaklık ve pH'da proteinin kararlı olması da, enzimlerin endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanımı açısından oldukça önemlidir (Renate vd., 1999). Farklı endüstriyel uygulamalarda yüksek sıcaklıkta kararlılık, enzimin istenilen özelliğidir (Asgher vd., 2012). Bu nedenle enzimin aktif kalabildiği sıcaklık ve pH değerleri oldukça önemlidir. Beyaz çürükçül lakkazlarının çoğunun 30-50°C aralığında tamamen aktif kalabildiği, 60°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda ise aktivitelerini hızla kaybettikleri belirtilmektedir (Nagai vd., 2002). Bu nedenle, ilk kez tarafımızdan kullanılan bu suşlardan elde edilen ham enzim kaynaklarının sıcaklık ve pH kararlılıkları da araştırılmıştır. *F.trogii* ham lakkaz enzimi 80°C'de 2 saat inkübasyon sonucu aktivitesinin %48'ini korurken, *G.lucidum*'un ham lakkaz enzimi 70°C'de 0.5 saat te aktivitesinin yaklaşık %100'ünü, 2 saat inkübasyon sonucu da %37'sini korumuştur. *T.versicolor*'da ise 70°C'de, 3 saat inkübasyon sonrasında lakkaz aktivitesinin %50'sinden fazlası korunmuştur. Özşölen vd. (2010)'nin çalışması 50°C'nin üzerindeki sıcaklık değerlerinde enzimin kararlılığını kaybettiğini göstermektedir. *Pleurotus pulmonarius* ham lakkaz enziminin kararlılığının araştırıldığı çalışmada, ham enzimin 50°C'de 6 saatten fazla kararlı kalabildiği, 55°C ve 60°C'de ise 1 saatte aktivitenin %73 ve %18'nin kaldığı rapor edilmiştir (De Souza vd., 2002). Bu da, ham enzim kaynağının yüksek sıcaklıklarda en azından belirli bir zaman için kararlı kalabileceğini göstermektedir. Bu, yüksek sıcaklığa ihtiyaç duyulan uygulamalar için önemlidir.

pH' nın enzim kararlılığına etkisini test ettiğimiz çalışmalarda, tüm fungal ham lakkaz enzimlerinin en hızlı aktivite kaybı pH 3'de gerçekleşmiştir. *F.trogii* ham lakkaz enzimi, pH 5 ve üzerindeki pH değerlerinde 24 saat boyunca oldukça kararlı kalırken, *G.lucidum* ham enzimi pH 3 hariç tüm pH değerlerinde 6 saat boyunca oldukça kararlı kalmış (az bir değişim gerçekleşmiştir) ve en fazla aktivite kaybı da pH 3'te 24 saatlik uygulama sonucu tespit edilmiştir. *T.versicolor*'da ise özellikle pH 4 ve daha yüksek pH'larda ham lakkaz enzimi 24 saat boyunca kararlı kalmıştır. De Souza vd., (2002), asidik pH'larda enzim aktivitesinin hızlı düştüğünü rapor etmiştir. Stoilova vd. (2010) *Trametes versicolor* ham lakkaz enziminin pH 4,5'ta bazik bölgeye daha yakın olan pH değerlerine göre 48 saat boyunca daha kararlı kalabildiğini bildirmiştir. Çalışmalarından kararlılığını en hızlı pH 7'de azaldığı

gözlenmektedir. Çalışmamızda kullandığımız 3 fungusun ham lakkaz enzimleri de asidik pH'larda kararlılıklarını daha hızlı kaybetmişlerdir.

Enzim üretimi, aktivite ve kararlılık çalışmalarının yanı sıra enzim kaynaklarının katalitik potansiyelinin ortaya konması da önemlidir. Beyaz çürükçül fungus enzimleri sentetik boyar maddelerin renginin gideriminde kullanılmasına yönelik çeşitli çalışmalar vardır (Verma ve Madamwar, 2002, Asgher vd., 2008; Rodríguez vd., 1999; Selvam vd., 2003; Nilsson vd., 2006). Özellikle lakkaz enzimi, birçok renk giderimi çalışmasında etkin olarak kullanılmaktadır (Zeng, vd., 2011; Sathishkumar vd., 2010; Sun vd., 2009; Murugesan vd., 2007). Bu nedenle, antrakinon bir boya olan Remazol Brilliant Blue R (RBBR) (RB19), enzim katalitik özelliğini test etmek için çalışmamızda model boya olarak seçilmiştir. Bu boyar madde, lignolitik enzimlerin substratı olan polisiklik aromatik hidrokarbonlara benzemektedir (Vyas ve Molitoris, 1995). Bu amaçla, enzim kaynağı olarak da *G.lucidum* ham lakkaz enzimi kullanılmış ve renk gideriminde başlangıç pH'sı, sıcaklık, zaman, enzim miktarı ve boyar madde konsantrasyonunun etkisi belirlenmiştir. pH'nın renk giderimine etkisinin test edildiği çalışmalar 30°C'de ve farklı pH değerlerinde yürütülmüş ve en yüksek renk giderimi pH 3'de %22.38 olarak belirlenmiştir. *G.lucidum* lakkazının asidik pH değerlerinde daha etkin olduğu bildirilmektedir (Murugesan vd., 2007). Çalışmamızda da benzer olarak düşük pH değerlerinde (pH 2.5-4) renk giderimi daha etkin iken yüksek pH'larda (pH 4.5-6) azaldığı izlenmiştir. Sıcaklığın etkisi ise en yüksek renk giderim değerlerine ulaşılan pH değeri aralıklarında yapılmış (pH 2.5, 3 ve 3.5) ve pH 3'de 40°C, 50°C ve 60°C'de sırasıyla %28.98, %29.95 ve %18.82 renk giderimine ulaşılmıştır. Çalışma, 50°C sıcaklık aralığına kadar renk giderim aktivitesinin arttığını ve 40-50°C'de benzer giderim değerlerine ulaşılabilceğini göstermiştir. Bu nedenle, zamanın renk giderimine etkisi çalışmaları 40°C ve pH 3'de yürütülmüş ve renk giderimi 20. dakikada %50.71 olarak belirlenirken 30. dakikada %56.15'e ulaşmıştır. Boya konsantrasyonunun renk giderim etkisine bakıldığında ise en yüksek renk giderimi 400 mg/L boya konsantrasyonunda %61.28 olarak belirlenmiştir. Enzim miktarının ise renk gideriminde çok önemli bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte en yüksek renk giderim değeri 100 µL ham enzim kaynağı ile elde edilmiştir. Bu, az miktarda kullanılacak ham enzim kaynağıyla uygulama yapılabilmesi açısından da önemlidir. Çalışmamızda renk giderim çalışmalarında ortama herhangi

bir mediatör eklenmemiştir. Mediatörlerin belirli bir konsantrasyonun üzerinde enzim aktivitesi üzerine olabilecek negatif etkisi ve toksik etkileri düşünüldüğünde bunun önemi ortaya çıkacaktır. Burada, ham enzim kaynağındaki buğday kepeği kaynaklı fenolik bileşikler mediatör görevi yapmış olabilir (Murugesan vd., 2009). Murugesan vd. (2007), ham enzim kaynağının 50 mg/L, 100 mg/L, 200mg/L ve 300mg/L konsantrasyonlardaki RB 19'un rengini 60 dakikada sırasıyla %40.5, %39.6, %17.6 ve %1.1 giderdiğini belirtilmiştir. Bununla birlikte en iyi renk giderimi %90 olarak pH 4'de elde edilmiştir. Deveci vd. (2004)'de 100mg/L'nin üstündeki konsantrasyonların inhibitör etki gösterdiğini rapor edilmiştir. Bizim çalışmamızda ise, boyar madde konsantrasyonu arttıkça renk giderimi değerinin arttığı saptanmış ve yüksek boya konsantrasyonlarının inhibitör etkisi izlenmemiştir. Zeng vd. (2011) *Trametes trogii* ham enzimi ile 50 mg/L RB19'un rengini 30 dakikada %85.2 oranında gidermiştir. Çalışmamızda ise 50mg/L RBBR konsantrasyonunda daha düşük renk giderimi değeri elde edilmiştir. Bunun nedeni kullanılan enzim kaynağının farklı olması olabilir.

Lakkaz aktivitesinin direkt jelde gözlenmesi amacıyla yaptığımız doğal jel uygulaması sonucunda *F.trogii* ve *G.lucidum* için tek bir aktivite bandı gözlenirken *T.versicolor* için 2 farklı aktivite bandı gözlenmiştir. Beyaz çürükçül fungusların farklı lakkaz izozimlerini ürettikleri bilinmektedir. Birhanli ve Yesilada (2010) farklı *F.trogii* ve *T.versicolor* suşları ile tekrarlı kesikli süreçte yaptıkları çalışmada tek bir band gözlediklerini rapor etmişlerdir. Yaptığımız katı substrat çalışmada da *F.trogii* suşu için de tek bir band gözlenirken, *T.versicolor* için 2 band gözlenmiştir.

Sonuç olarak; yapılan çalışmalarda KSF ortamında kullanılacak olan katı substratın seçiminin, kullanılacak fungusunun, ortam nem seviyesinin, inkübasyon sıcaklığının ve başlangıç pH'sının lakkaz üretimini önemli ölçüde etkilediği belirlenmiştir. Yeni izole edilen funguslardan *F.trogii*, *G.lucidum* ve *T.versicolor*'ın buğday kepeği ortamında iyi birer lakkaz üreticisi oldukları saptanmıştır. Bununla birlikte ortama ilave edilecek indükleyicileri ve bu indükleyicilerin en etkin konsantrasyonlarını belirleyerek yüksek oranda lakkaz aktivitesine ulaşılabileceği gösterilmiştir. Diğer kaynakların katı substrat olarak kullanıldığı durumlarda daha düşük miktarlarda enzim üretiliyor olsa da, bu kaynakların atık durumdan çıkarılması ve aynı zamanda çevre kirliliği potansiyellerinin indirgenmesi atık lignosellülozların

endüstriyel anlamda en azından enzim üretiminde ham madde olarak kazandırılması açısından önemlidir.

Test edilen ham enzim kaynaklarının 70°C gibi yüksek sıcaklık değerlerinde belirli bir zaman dilimi için kararlı kalabilmesi ve yüksek sıcaklıklarda yüksek aktivite göstermesi sıcaklık ihtiyacı olan uygulamalar için çok önemlidir. Çalışmamızda kullandığımız ham lakkaz enzimlerinin yüksek sıcaklık değerlerinde daha kararlı olması biyoteknolojik uygulamalar açısından daha avantajlı olmasını da sağlayacaktır. Ham enzim kaynağı kullanımı saflaştırma gibi ek maliyet yükleyen uygulamaları azaltacağından ekonomiklik sağlamaktadır. Ham enzim kaynağının katalitik özelliği boyar madde renk giderim yeteneğine bağlı olarak gösterilmiştir. Bu ham enzim kaynakların çeşitli uygulamalar açısından uygulanabilirliğine bir ışık yakmaktadır. Tekstil ve boyama fabrikası atık suları önemli çevre kirleticileridir ve geleneksel yöntemler kirlilik giderimi açısından yetersizdir. Bu nedenle, alternatif biyoteknolojik uygulamalara ve kaynaklara ihtiyaç vardır. Elde edilen enzim kaynaklarının bu açıdan da kullanım potansiyeli yüksektir.

6. KAYNAKLAR

- Aaslyng, D., Rorbaek, K., Sorensen, N.H. (1996). An enzyme for dyeing keratinous fibres. *Int. Pat. Apl.* WO9719998.
- Abadulla, E., Tzanov, T., Costa, S., Robra, K.H., Cavaco-Paulo, A., Gübitz, G.M. (2000). Decolorization and Detoxification of Textile Dyes with a Laccase from *Trametes hirsuta*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 8, 3357-3362.
- Acuner, E., Dilek, F.B. (2004). Treatment of tectilon yellow 2G by *Chlorella vulgaris*. *Process Biochem.* 39, 623–631.
- Aehle, W. (2007). *Enzymes in Industry*. Verlag GmbH&co KGaA Weinheim. 235 p.
- Aguilar, C.N., Gutiérrez-Sánchez, G., rado-Barragán, P.A., Rodríguez-Herrera, R., Martínez-Hernandez, J.L., Contreras-Esquivel, J.C. (2008). Perspectives of Solid State Fermentation for Production of Food Enzymes. *Am. J. Biochem. & Biotech.* 4, 4, 354-366.
- Ajila, C.M., Brar, S.K., Verma, M., Tyagi, R.D., Valéro, J.R. (2011). Solid-state fermentation of apple pomace using *Phanerocheate chrysosporium* – Liberation and extraction of phenolic antioxidants. *Food Chem.* 126, 1071–1080.
- Akintomide, M.J., Antai, S.P. (2012). Inorganic nitrogen supplementation and micro-fungal fermentation of white yam peels (flour) into single cell protein. *Journal of Microbiology, Biotechnology Food Sciences.* 2, 3, 820-832.
- Aksu, Z. (2005). Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. *Process Biochem.* 40, 997–1026.
- Amaral, P.F.F., Fernandes, D.L.A., Tavares, A.P.M., Xavier, A.B.M.R., Cammarota, M.C., Coutinho, J.A.P., Coelho, M.A.Z. (2011). Decolorization of Dyes from textile wastewater by *Trametes versicolor*. *Environ. Technol.* 25, 1313-1320.
- Apohan, E., Yesilada, O. (2011). Enhancement of laccase production of pre-grown fungal pellets in wastewater of olive oil mills. *Fresen. Environ. Bull.* 20,5, 1216-1224.
- Archibald, F.S., Borbonnais, R., Jurasek, L., Paice, M.G., Reid, I.D. (1997). Kraft pulp bleaching and delignification by *Trametes versicolor*. *J. Biotechnol.* 53, 215–236.
- Arora, D.S., Gill, P.K. (2000). Laccase production by some white rot fungi under different nutritional conditions. *Bioresource Technol.* 73, 283-285.
- Arora, D.S., Gill, P.K. (2001). Effects of various media and supplements on laccase production by some white rot fungi. *Bioresource Technol.* 77, 89-91.
- Asgher, M., Batool, S., Bhatti, H.N., Noreen, R. (2008). Laccase mediated decolorization of vat dyes by *Coriolus versicolor* IBL-04. *Int. Biodeter. Biodegr.* 62, 465–470.

- Asgher, M., Iqbal, H.M.N., Asad, M.J. (2012). Kinetic characterization of purified laccase produced from *Trametes versicolor* IBL-04 in solid-state bio-processing of corncobs. *BioResources*. 7,1, 1171-1188.
- Aydinoğlu, T., Sargın, S. (2013). Production of laccase from *Trametes versicolor* by solid-state fermentation using olive leaves as a phenolic substrate. *Bioprocess Biosyst. Eng.* (2013) 36:215–222.
- Balan, D.S.L., Monteiro, R.T.R. (2001). Decolorization of textile indigo dye by ligninolytic fungi. *J. Biotechnol.* 89, 141–145.
- Balaraju, K., Park, K., Jahagirdar, S., Kaviyarasan, V. (2010). Production of cellulase and laccase enzymes by *Oudemansiella radicata* using agro wastes under solid-state and submerged conditions. *Research in Biotechnology*. 1, 21-28.
- Baldrian, P. (2006). Fungal laccases-occurrence and properties. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 215–242.
- Banat, I.M., Nigam, P., Singh, D., Marchant, R. (1996). Microbial decolorization of textile-dye containing effluents: a review. *Bioresource Technol.* 58 , 217-227.
- Barr, D.P., Aust, S.D. (1997). Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 28,2, 78–87.
- Beaugrand, J., Reis, D., Guillon, F., Debeire, P., Chabbert, B. (2004). Xylanase - Mediated Hydrolysis of Wheat Bran: Evidence for Subcellular Heterogeneity of Cell Walls. *Int. J. Plant Sci.* 165, 4, 553-563.
- Berka, R.M., Schneider, P., Golightly, E.J., Brown, S.H., Madden, M., Brown, K.M., Halkier, T., Mondorf, K., Xu, F. (1997). Characterization of the Gene Encoding an Extracellular Laccase of *Myceliophthora thermophila* and Analysis of the Recombinant Enzyme Expressed in *Aspergillus oryzae*. *Appl. Environ. Microb.* 63, 8, 3151-3157.
- Bigelis, R., He, H., Yang, H.Y., Chang, L-P., Greenstein, M. (2006). Production of fungal antibiotics using polymeric solid supports in solid-state and liquid fermentation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33, 815–826.
- Birhanlı, A., Ozmen, M. (2005). Evaluation of the Toxicity and Teratogenicity of Six Commercial Textile Dyes Using the Frog Embryo Teratogenesis Assay–Xenopus. *Drug Chem. Toxicol.* 1, 51–65.
- 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 Microb. Tech.* 39, 1286–1293.
- Birhanli, E., Yesilada, O. (2010). Enhanced production of laccase in repeated-batch cultures of *Funalia trogii* and *Trametes versicolor*. *Biochem. Eng. J.* 52, 33–37.
- Blanchette, R.A. (1984). Screening Wood Decayed by White Rot Fungi for Preferential Lignin Degradation. *Appl. Environ. Microb.* 48, 3, 647-653.
- Blanchette, R.A., Burnes, T.A. (1988). Selection of White-rot Fungi for Biopulping. *Biomass*. 15, 93-101.

- Bogan, B.W., Lamar, R.T., Burgos, W.D., Tien, M. (1999). Extend of humification of anthracene, fluoranthene, and benzo[α]pyrene by *Pleurotus ostreatus* during growth in PAH-contaminated soils. *Lett. Appl. Microbiol.* 28, 250-254.
- Boran, F., Yeşilada, O. (2011). Enhanced production of laccase by fungi under solid substrate fermentation condition. *BioResources.* 6, 4, 4404-4416.
- Borchert, M., Libra, J.A. (2001). Decolorization of Reactive Dyes by the White Rot Fungus *Trametes versicolor* in Sequencing Batch Reactors. *Biotechnol. Bioeng.* 75,3, 313-321.
- Botella, C., de Ory, I., Webb, C., Cantero, D., Blandino, A. (2005). Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. *Biochem. Eng. J.* 26, 100-106.
- Bourbonnais, R., Paice, M.G. (1992). Demethylation and delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor* laccase in the presence of 2,20-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline- 6-sulphonate). *Appl. Microbiol. Biot.* 36, 823–827.
- Bourbonnais, R., Paice, M.G., Reid, D., Lanthier, P., Yaguchi, M. (1995). Lignin Oxidation by Laccase Isozymes from *Trametes versicolor* and Role of the Mediator 2,29-Azinobis(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonate) in Kraft Lignin Depolymerization. *Appl. Environ. Microb.* 61, 5, 1876-1880.
- Boyd-Wilson, K., Walter, M. (2002). *Development of a biotechnology tool using New Zealand white-rot fungi to degrade pentachlorophenol*, Waste Management Institute New Zealand 14th Annual Conference November, New Zealand.
- Breen, A., Singleton, F.L. (1999). Fungi in lignocellulose breakdown and biopulping. *Curr. Opin. Biotech.* 10, 252-258.
- Bumpus, J.A. (1989). Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microb.* 55, 1, 154-158.
- Cabana, H., Ahamed, A., Leduc, R. (2011). Conjugation of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor* to chitosan and its utilization for the elimination of triclosan. *Bioresource Technol.* 102, 1656–1662.
- Cantarelli, C., Brenna, O., Giovanelli, G., Rossi, M. (1989). Beverage stabilization through enzymatic removal of phenolics. *Food Biotech.* 3, 203-213.
- Casas, N., Blázquez, P., Vicent, T., Sarrá, M. (2013). Laccase production by *Trametes versicolor* under limited-growth conditions using dyes as inducers. *Environ. Technol.* 34,1, 113-119.
- Castilho, L.R., Mitchell, D.A., Freire, D.M. (2009). Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation. *Bioresource Technol.* 100, 5996–6009.
- Castro, A.I.R.P., Evtuguin, D.V., Xavier, A.M.B (2003). Degradation of biphenyl lignin model compounds by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of 1-hydroxybenzotriazole and heteropolyanion [SiW11VO40]⁵⁻. *J. Mol. Catal. B- Enzym.* 22, 13–20.

- Cervantes, C., Gutierrez-Corona, F. 1994. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* 14, 2, 121-137.
- Chen, H., Xu, F., Li, Z. (2002). Solid-state production of biopulp by *Phanerochaete chrysosporium* using steam-exploded wheat straw as substrate. *Bioresource Technol.* 81,3, 261-263.
- Chiu, S.W., Chan, S.M. (1991). Production of pigments by *Monascus purpureus* using sugar-cane bagasse in roller bottle cultures. *World J. Microb. Biot.* 8, 1, 68-70.
- Christov, L., van Driessel, B. (2003). Waste water bioremediation in the pulp and the paper industry. *Indian J. Biotechnol.* 2, 444-450.
- Collins, P.J., Dobson, A.D.V. (1997). Regulation of Laccase Gene Transcription in *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microb.* 63, 9, 3444-3450.
- Correia, V.M., Stephenson, T., Judd, S.J. (1994). Characterisation of textile wastewaters – a review. *Environ Technol.* 15, 917–929.
- Cullen, D. (1997). Recent advances on the molecular genetics of ligninolytic fungi. *J. Biotechnol.* 53 (1997) 273–289.
- D'Annibale, A., Stazi, S.R., Vinciguerra, V., Mattia, E.D., Sermanni, G.G. (1999). Characterization of immobilized laccase from *Lentinula edodes* and its use in olive-mill wastewater treatment. *Process Biochem.* 34, 697–706.
- D'Annibale, A., Stazi, S.R., Vinciguerra, V., Mattia, E.D., Sermanni, G.G. (2000). Oxirane-immobilized *Lentinula edodes* laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater. *J. Biotechnol.* 77, 265–273.
- D'Annibale, A., Ricci, M., Leonardi, V., Quarantino, D., Mincione, E., Petruccioli, M. (2005). Degradation of Aromatic Hydrocarbons by White-Rot Fungi in a Historically Contaminated Soil. *Biotechnol Bioeng.* 90, 6, 723-731.
- D'Souza, T.M., Merritt, C.S., Reddy, C.A. (1999). Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*, *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5307–5313.
- Davila-Vazquez, G., Tinoco, R., Pickard, M.A., Vazquez-Duhalt, R. (2005). Transformation of halogenated pesticides by versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta*. *Enzyme Microb. Tech.* 36, 223–231.
- De Souza, C.G.M., Zilly, A., Peralta, R.M. (2002). Production of laccase as the sole phenoloxidase by a Brazilian strain of *Pleurotus pulmonarius* in solid state fermentation. *J. Basic Microbiol.* 42, 2, 83–90.
- De Souza, E.S., Sampaio, I.L., Freiere, A.K.L., da Silva, B.K.S., Sobrinho, A.S., Lima, A.M., Souza, J.V.B. (2011). Production of *Trametes versicolor* laccase by solid state fermentation using a fixed-bed Bioreactor. *J. Food Agric. Environ.* 9, 2, 55-58 .
- Deveci, T., Unyayar, A., Mazmanci, M.A. (2004). Production of Remazol Brilliant Blue R decolourising oxygenase from the culture filtrate of *Funalia trogii* ATCC 200800. *J. Mol. Catal. B- Enzym.* 30, 25–32.

Deshpande, M.V. (1999). Mycopesticide Production by Fermentation: Potential and Challenges. *Crit. Rev. Microbiol.* 25,3, 229-243.

Dhillon, G.S., Kaur, S., Brar, S.K. (2012). In-vitro decolorization of recalcitrant dyes through an ecofriendly approach using laccase from *Trametes versicolor* grown on brewer's spent grain. *Int. Biodeter. Biodegr.* 72, 67-75.

Dittmer, J.K., Patel, N.J., Dhawale, S.W., Dhawale, S.S. (1997). Production of multiple laccase isoforms by *Phanerochaete chrysosporium* grown under nutrient sufficiency. *FEMS Microbiol Lett.* 149, 65-70.

Dodor, D.E., Hwang, H.M., Ekunwe, S.I.N. (2004). Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by immobilized laccase from *Trametes versicolor*. *Enzyme Microb. Technol.* 35, 210-217.

Dogan, E.E., Yesilada, E., Ozata, L., Yologlu, S. (2005). Genotoxicity Testing of Four Textile Dyes in Two Crosses of *Drosophila* Using Wing Somatic Mutation and Recombination Test. *Drug Chem. Toxicol.* 28, 289-301.

Dwivedi, U.N., Singh, P., Pandey, V.P., Kumar, A. (2011). Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 68, 117-128.

Eichlerová, I., Homolka, L., Nerud, F. (2006). Synthetic dye decolorization capacity of white rot fungus *Dichomitus squalens*. *Bioresource Technol.* 97, 2153-2159.

Elisashvili, V., Kachlishvili, E., Penninckx, M. (2008a). Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 1531-1538.

Elisashvili, V., Penninckx, M., Kachlishvili, E., Tsiklauri, N., Metreveli, E., Kharziani, T., Kvesitadze, G. (2008b). *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. *Bioresource Technol.* 99, 457-462.

Erkurt, E.A., Ünyayar, A., Kumbur, H. (2007). Decolorization of synthetic dyes by white rot fungi, involving laccase enzyme in the process. *Process Biochem.* 42, 1429-1435.

Faraco, V., Pezzella, C., Miele, A., Giardina, P., Sannia, G. (2009). Bio-remediation of colored industrial wastewaters by the white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus ostreatus* and their enzymes. *Biodegradation.* 20, 209-220.

Farnet, A-M., Tagger, S., Petit, J.L. (1999). Effects of copper and aromatic inducers on the laccases of the white-rot fungus *Marasmius quercophilus*. *C. R. Acad. Sci.* 322, 499-503.

Farnet, A-M., Criquet, S., Cigna, M., Gil, G., Ferré, E. (2004). Purification of a laccase from *Marasmius quercophilus* induced with ferulic acid: reactivity towards natural and xenobiotic aromatic compounds. *Enzyme Microb Tech.* 34, 549-554.

- Fu, Y., Viraraghavan, T. (2001). Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. *Bioresource Technol.* 79, 251-262.
- Fujita, R, Liu, J., Shimizu, K., Konishi, F., Noda, K., Kumamota, S., Ueda, C., Tajiri, H., Kaneko, S., Suimi, Y., Kondo, R. (2005). Anti-androgenic activities of *Ganoderma lucidum*. *J. Ethnopharmacol.* 102, 107–112.
- Galhaup, C., Haltrich, D. (2001). Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 225–32.
- Galhaup, C., Wagner, H., Hinterstoisser, B., Haltrich, D. (2002). Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme Microb. Tech.* 30, 529–536.
- Gao, D., Du, L., Yang, J., Wu, W-M., Liang, H. (2010). A critical review of the application of white rot fungus to environmental pollution control. *Crit. Rev. Biotechnol.* 30,1, 70–77.
- Gervais, P., Molin, P. (2003). The role of water in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 13, 85–101.
- Gianfreda, L., Xu, F., Bollag, J-M. 1999. Laccases: A Useful Group of Oxidoreductive Enzymes. *Biorem. J.* 3,1, 1-26.
- Giorgio, E.M., Fonseca, M.I., Tejerina, M.R., Ramos-Hryb, A.B., Sanabria, N., Zapata, P.D., Villalba, L.L. (2012). Chips and sawdust substrates application for lignocellulolytic enzymes production by solid state fermentation. *International Research Journal of Biotechnology.* 3, 7,120-127.
- Giovanelli, G., Ravasini, G. (1993). Apple Juice stabilization by combined enzyme in membrane filtration process. *Lobensm-Wissu-Tech.* 26, 1-7.
- Gleen, J.K., Gold, M.H. (1983). Decolorization of Several Polymeric Dyes by the Lignin- Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microb.* 45,6, 1741-1747.
- Gnanamani, A., Jayaprakashvel, M., Arulmani, M., Sadulla, S. (2006). Effect of inducers and culturing processes on laccase synthesis in *Phanerochaete chrysosporium* NCIM 1197 and the constitutive expression of laccase isozymes. *Enzyme Microb. Technol.* 38, 1017–1021.
- Gomes, S.A.S.S., Rebelo, M.J.F. (2003). A new laccase biosensor for polyphenols determination. *Sensors.* 3, 166-175.
- Goméz, J., Pazos, M., Rodríguez Couto, S., Sanromán, M^a.A. (2005). Chestnut shell and barley bran as potential substrates for laccase production by *Coriolopsis rigida* under solid-state conditions. *J. Food Eng.* 68, 315–319.
- Graminha, E.B.N., Gonçalves, A.Z.L., Pirola, R.D.P.B, Balsalobre, M.A.A, Da Silva, R., Gomes, E. (2008). Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. *Anim. Feed Sci. Tech.* 144, 1-22.

Gupta, V.K., Susas. Application of low-cost adsorbents for dye removal – A review. (2005). *J. Environ. Manage.* 90, 2313–2342.

Hao, O.J., Kim, H., Chiang, P-C. (2000). Decolorization of Wastewater. *Crit. Rev. Env. Sci. Tech.* 30,4, 449–505.

Harazono, K., Watanabe, Y., Nakamura, K. (2003). Decolorization of Azo Dye by the White-Rot Basidiomycete *Phanerochaete sordida* and by Its Manganese Peroxidase. *J. Biosci. and Bioeng.* 95,5, 455-459.

Hasmin, A.J. (2012). Determination of optimal conditions for laccase production by *Pleurotus ostreatus* using sawdust as solid medium and its use in phenol degradation. *J. Baghdad for Sci.* 9, 3, 491-499.

Hegde, S., Kavitha, S., Varadaraj, M.C., Muralikrishna, G. (2006). Degradation of cereal bran polysaccharide-phenolic acid complexes by *Aspergillus niger* CFR 1105. *Food Chem.* 96, 14–19.

Hou, H., Zhou, J., Wang, J., Du, C., Yan, B. (2004). Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Process Biochem.* 39 , 1415–1419.

http://www2.aclille.fr/myconord/Photos_SMNF/Photos_SMNF_F/Funalia_trogii.hm

<http://www.condalab.com/pdf/1038.pdf>

http://www.hammaddeler.com/index.php?option=com_content&view=article&id=4625&Itemid=408

<http://genome.jgipsf.org/whiterot1/whiterot1.home.html>

<http://www.grain-free-gluten-free.com/soy-flour.html>

<http://www.mushroomthejournal.com/greatlakesdata/Taxa/Ganodlucid143.html>

http://www.mykoweb.com/CAF/species/Trametes_versicolor.html

http://www.soyaunu.com/?module=modul_tek&modul=142&cat=206

Hu, T.L. (1992). Sorption of reactive dyes by *Aeromonas* biomass. *Wat. Sci. Tech.* 26,1-2,357-366.

Hunger, K. (2003). *Industrial Dyes*. Druckhaus Darmstadt GmbH, Darmstadt, Germany, 3 p.

Iandolo, D., Piscitelli, A., Sannia, G., Faraco, V. (2011). Enzyme Production by Solid Substrate Fermentation of *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* on Tomato Pomace. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 163, 40–51.

Iqbal, H.M.N., Asgher, M., Bhatti, H.N. (2011). Optimizaton of physical and nutritional factors for synthesis of lignin degrading enzymes by a novel strain of *Trametes versicolor*. *BioResources.* 6, 2, 123-1287.

- Irshad, M., Asgher, M., Sheikh, M.A., Nawaz, H. (2011). Purification and characterization of laccase produced by *Schizophyllum commune* IBL-06 in solid state culture of banana stalks. *BioResources*. 6,3, 2861-2973.
- Itoh, K., Fujita, M., Kumano, K., Suyama, K., Yamamoto, H. (2000). Phenolic acids affect transformations of chlorophenols by a *Coriolus versicolor* laccase. *Soil Biol. Biochem.* 32, 85-91.
- Kaal, E.E.J., Field, J.A., Joyce, T.W. (1995). Increasing ligninolytic enzyme activities in several white-rot Basidiomycetes by nitrogen-sufficient media. *Bioresource Technol.* 53, 2, 133-139.
- Kahraman, S., Yesilada, O. (2001). Industrial and agricultural wastes as substrates for laccase production by white-rot fungi. *Folia Microbiol.* 46,2, 133-136.
- Kahraman, S., Gurdal, I.H. (2002). Effect of synthetic and natural culture media on laccase production by white rot fungi. *Bioresource Technol.* 82 , 215–217.
- Kahraman, S., Asma, D., Erdemoglu ,S., Yesilada. O. (2005). Biosorption of copper (II) by live and dried biomass of the white rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Funalia trogii*. *Eng. Life. Sci.* 5, 1, 72-77.
- Kahyaoğlu, M., Konar, V. (2006). Şeker Fabrikası Atık Maddeleri Kullanılarak *Pseudomonas aeruginosa*'dan Ramnolipit Biyosüpfektanı Elde Edilmesi *Fırat Üniv. Fen ve Müh. Bil. Dergisi.* 4, 493-498.
- Kalyani, D.C., Patil, P.S., Jadhav, J.P., Govindwar, S.P. (2008). Biodegradation of reactive textile dye Red BLI by an isolated bacterium *Pseudomonas* sp. SUK1. *Bioresource Technol.* 99, 4635–4641.
- Kamei, I., Hirota, Y., Mori, T., Hirai, H., Meguro, S., Kondo, R. (2012). Direct ethanol production from cellulosic materials by the hypersaline-tolerant white-rot fungus *Phlebia* sp. MG-60. *Bioresource Technol.* 112, 137–142.
- Kang, S.W., Park, Y.S., Lee, J.S., Hong, S.I., Kim, S.W. (2004). Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technol.* 91, 153–156.
- Kariminiaae-Hamedani, H-R., Sakurai, A., Sakakibara, M. (2007). Decolorization of synthetic dyes by a new manganese peroxidase-producing white rot fungus. *Dyes Pigments*.72, 157-162.
- Karp, S.G., Faraco, V., Amore, A., Birollo, L., Giangrande, C., Soccol, V.T., Pandey, A., Soccol, C.R. (2012). Characterization of laccase isoforms produced by *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation of sugarcane bagasse. *Bioresource Technol.* 114, 735–739.
- Keum, Y.S., Li, Q.X. (2004). Fungal laccase-catalyzed degradation of hydroxy polychlorinated biphenyls. *Chemosphere*. 56, 23–30.
- Keuth, S., Bisping, B. (1994). Vitamin B12 Production by *Citrobacter freundii* or *Klebsiella pneumoniae* during Tempeh Fermentation and Proof of Enterotoxin Absence by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 5, 1495-1499.

- Keuth, S., Bisping, B. (1998). Formation of vitamins by pure cultures of tempe moulds and bacteria during the tempe solid substrate fermentation. 75, 5, 427-434.
- Keyser, P., Kirk, T.K., Zeikus, J.G. (1978). Ligninolytic Enzyme System of *Phanerochaete chrysosporium*: Synthesized in the Absence of Lignin in Response to Nitrogen Starvation. *J. Bacteriol.* 135, 3, 790-797.
- Khataee, A.R., Kasiri, M.B. (2010). Photocatalytic degradation of organic dyes in the presence of nanostructured titanium dioxide: Influence of the chemical structure of dyes. *J. Mol. Catal. A-Chem.* 328, 8–26
- Kiernan, J.A. (2001). Classification and naming of dyes, stains and fluorochromes. *Biotech. Histochem.* 76, 5&6, 261-277.
- Kirk, T.K., Lamar, R.T., Glaser, J.A. (1992). The potential of white rot fungi in bioremediation. *Biotechnology and Environmental Science: Molecular Approaches* Edited by S. Mongkolsuk et al., Plenum Press, New York, 131-138.
- Krishna, C. (2005). Solid-State Fermentation Systems—An Overview. *Crit. Rev. Biotechnol.* 25, 1–30.
- Kumar, D., Jain, V.K., Shanker, G., Srivastava, A. (2003). Citric acid production by solid state fermentation using sugarcane bagasse. *Process Biochem.* 38, 1731-1738.
- Kunamneni, A., Plou, F.J., Ballesteros, A., Alcalde, M. (2008). Laccases and their applications: A patent review. *Recent Pat. Biotechnol.* 2, 1, 10-24.
- Kuuva, T., Lantto, R., Reinikainen, T., Buchert, J., Autio, K. (2003). Rheological properties of laccase-induced sugar beet pectin gels. *Food Hydrocolloid.* 17, 679–684.
- Labbé, S., Thiele, D.J. (1999). Pipes and wiring: the regulation of copper uptake and distribution in yeast *Trends in Microbiology.* 12, 500-505.
- Lagemaat J., Pyle, D.L. (2001). Solid-state fermentation and bioremediation: development of a continuous process for the production of fungal tannase. *Chem. Eng. J.* 84, 115–123.
- Larsson, S., Cassland, P., Jönsson, L.J. (2001). Development of a *Saccharomyces cerevisiae* Strain with Enhanced Resistance to Phenolic Fermentation Inhibitors in Lignocellulose Hydrolysates by Heterologous Expression of Laccase. *Appl. Environ. Microb.* 67, 3, 1163-1170.
- Leangon, S., Maddox, I.S., Brooks, J.D. (1999). Influence of the glycolytic rate on production of citric acid and oxalic acid by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *World J. Microb. Biot.* 15: 49-495.
- Lee, C.K., Darah, I., Ibrahim, C.O. (2011). Production and Optimization of Cellulase Enzyme Using *Aspergillus niger* USM AI 1 and Comparison with *Trichoderma reesei* via Solid State Fermentation System. *Biotechnology Research International.* 2011
- Leifa, F., Pandey, A., Soccol, C.R. (2000). Solid state cultivation – an efficient method to use toxic agro-industrial residues. *J. Basic Microbiol.* 40, 3, 187–197.

- Leite, O.D., Lupetti, K.O., Fatibello-Filho, O., Vieira, I.C., Barbosa, A.M. (2003). Synergic effect studies of the bi-enzymatic system laccase-peroxidase in a voltammetric biosensor for catecholamines. *Talanta*. 59, 889-896.
- Levin, L., Forchiassin, F. (2001). Ligninolytic Enzymes of the White Rot Basidiomycete *Trametes trogii*. *Acta Biotechnol.* 21, 2, 179–186.
- Levin, L., Forchiassin, F., Ramos, A.M. (2002). Copper induction of lignin-modifying enzymes in the white-rot fungus *Trametes trogii*. *Mycologia*. 94,3, 377–383.
- Levin, L., Melignani, E., Ramos, A.M. (2010). Effect of nitrogen sources and vitamins on ligninolytic enzyme production by some white-rot fungi. Dye decolorization by selected culture filtrates. *Bioresource Technol.* 101, 4554–4563.
- Liao, C-S., Yuan, S-W., Hung, B-H., Chang, B-W. (2012). Removal of organic toxic chemicals using the spent mushroom compost of *Ganoderma lucidum*. *J. Environ. Monit.* 14, 1983–1988.
- Longo, M.A., Sanromán, M.A. (2006). Production of Food Aroma Compounds: Microbial and Enzymatic Methodologies. *Food Technol. Biotechnol.* 44,3, 335–353.
- Lorenzo, M., Moldes, D., Rodríguez Couto, S., Sanromán, A. (2002). Improving laccase production by employing different lignocellulosic wastes in submerged cultures of *Trametes versicolor*. *Bioresource Technol.* 82, 109-113.
- Maes, C., Delcour, J.A., 2001. Alkaline hydrogen peroxide extraction of wheat bran non-starch polysaccharides. *J. Cereal Sci.* 34, 29–35.
- Magan, N., Fragoeiro, S., Bastos, C. (2010). Environmental Factors and Bioremediation of Xenobiotics Using White Rot Fungi. *Mycobiology*. 38, 4, 238-248.
- Majcherczyk, A., Johannes, C., Hüttermann, A. (1998). Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*. *Enzyme Microb. Technol.* 22, 335-341.
- Majeau, J.A., Brar, S.K., Tyagi, R.D. (2010). Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresource Technol.* 101, 2331–2350.
- Mäkelä, M.R., Lundell, T., Hatakka, A., Hildén, K. (2013). Effect of copper, nutrient nitrogen, and wood-supplement on the production of lignin-modifying enzymes by the white-rot fungus *Phlebia radiata*. *Fungal Biology*. 117, 62-70.
- Manpreet, S., Sawraj, S., Sachin, D., Pankaj, S., Banerjee, U.C. (2005). Influence of Process Parameters on the Production of Metabolites in Solid-State Fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology*, Vol 1(2) 2005, pp. 1-9.
- Martins, S., Mussatto, S.I., Martínez-Avila, G., Montañez-Saenz, J., Aguilar, C.N., Teixeira, J.A. (2011). Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnol. Adv.* 29, 365–373.

- Mazahari, D., Shojaosadati, S.A., Mousavi, S.M., Hejazi, P., Saharkhiz, S. (2012). Bioethanol production from carob pods by solid-state fermentation with *Zymomonas mobilis*. *Appl. Energ.* 99, 372-378.
- Mazmanci, M.A., Unyayar, A. (2005). Decolourisation of Reactive Black 5 by *Funalia trogii* immobilised on *Luffa cylindrica* sponge. *Process Biochem.* 40, 337–342.
- Mazmanci, M.A., Unyayar, A. (2010). Decolorization efficiency of *Funalia trogii* under static condition: Effect of C: N ratios. *Afr. J. Biotechnol.* 9, 39, 6539-6544,
- Mazumder, S., Basu, S.K., Muherjee, M. (2009). Laccase production in solid-state and submerged fermentation by *Pleurotus ostreatus*. *Eng. Life Sci.* 9, 1, 45–52.
- McMullan, G., Meehan, C., Conneely, A., Kirby, N., Robinson, T., Nigam, P., Banat, I.M., Marchant, R., Smyth, W.H. (2001). Microbial decolourisation and degradation of textile dyes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 81–87.
- Mechichhi, T., Mhiri, N., Sayadi, M. (2006). Remazol Brilliant Blue R decolourization by the laccase from *Trametes trogii*. *Chemosphere.* 64, 998–1005.
- Mehta vd., V.J., Thumar, J.T., Singh, S.P. (2006). Production of alkaline protease from an alkaliphilic actinomycete. *Bioresource Technol.* 97, 1650–1654.
- Mester, T., Field, J.A. (1998). Characterization of a Novel Manganese Peroxidase Lignin Peroxidase Hybrid Isozyme Produced by *Bjerkandera* Species Strain BOS55 in the Absence of Manganese. *J. Biol. Chem.* 273, 15412-15417.
- Meza, J.C., Lomascolo, A., Casalot, E., Sigoillot, J.C., Auria, R. (2005). Laccase production by *Pycnoporus cinnabarinus* grown on sugar-cane bagasse: Influence of ethanol vapours as inducer. *Process Biochem.* 40, 3365–3371.
- Micard, V., Thibault, J-F. (1999). Oxidative gelation of sugar-beet pectins: use of laccases and hydration properties of the cross-linked pectins. *Carbohydr. Polym.* 39, 265–273.
- 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.
- Milagres, A.M.F., Santos, E., Piovan, T., Roberto, I.C. (2004). Production of xylanase by *Thermoascus aurantiacus* from sugar cane bagasse in an aerated growth fermentor. *Process Biochem.* 39 (2004) 1387–1391.
- Mishra, A., Kumar, S., Pandey, A.K. (2011). Laccase production and simultaneous decolorization of synthetic dyes in unique inexpensive medium by new isolates of white rot fungus. *Int. Biodeter. Biodegr.* 65, 487-493.
- Mitchell, D:A., Krieger, N., Berovic, C. (2006). *Solid-State Fermentation Bioreactors*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 5 p.
- Modi, D.R., Chandra, H., Garg, S.K. (1998). Decolourization of Bagasse-based Paper Mill Effluent by the White-rot Fungus *Trametes versicolor*. *Bioresource Technol.* 66, 79-81.

- Mojsov, K. (2010). Application of solid-state fermentation for cellulase enzyme production using *Trichoderma viride*. *Perspectives of Innovations, Economics & Business*. 5,2, 108-110.
- Moldes, D., Lorenzo, M., Sanromán, M^a.A. (2004). Different proportions of laccase isoenzymes produced by submerged cultures of *Trametes versicolor* grown on lignocellulosic wastes. *Biotechnol. Lett.* 26, 327–330.
- Moreira, M.T., Feijoo, G., Sierra-Alvarez, R., Lema, J., Field, J.E. (1997). Biobleaching of oxygen delignified kraft pulp by several white rot fungal strains. *J. Biotechnol.* 53, 237–251.
- Murugesan, K., Nam, I.H., Kim, Y.M., Chang, Y.S. (2007). Decolorization of reactive dyes by a thermostable laccase produced by *Ganoderma lucidum* in solid state culture. *Enzyme Microb. Tech.* 40, 1662–1672.
- Murugesan, K., Yang, I.H., Kim, Y.M., Jeon, J.R., Chang, Y.S. (2009). Enhanced transformation of malachite green by laccase of *Ganoderma lucidum* in the presence of natural phenolic compounds. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 82, 341-350.
- Nagai, M., Sato, T., Watanabe, H., Saitoi K., Kawata, M., Enei, H. (2002). Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes*, and decolorization of chemically different dyes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 327–335.
- Ncube, T., Howard, R.L., Abotsi, E.K., van Rensburg, L.J., Ncube, I. (2012). *Jatropha curcas* seed cake as substrate for production of xylanase and cellulase by *Aspergillus niger* FGSCA733 in solid-state fermentation. *Ind. Crop Prod.* 37, 118–123.
- Neifar, M., Jaouani, A., Ellouze-Ghorbel, R., Ellouze-Chaabouni, S., Penninckx, M.J. (2009). Effect of culturing processes and copper addition on laccase production by the white-rot fungus *Fomes fomentarius* MUCL 35117. *Lett. Appl. Microbiol.* 49, 73–78.
- Nilsson, I., Möller, A., Mattiasson, B., Rubindamayugi, M.S.T., Welander, U. (2006). Decolorization of synthetic and real textile wastewater by the use of white-rot fungi. *Enzyme Microb. Technol.* 38, 94–100.
- Octavio, L.C., Irma, P.P.M.C., Ricardo, B.R.J., Francisco, V.O. (2006). Laccases. *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*. 323-340.
- Ohkuma, M., Maeda, Y., Johjima, T., Kudo, T. (2001). Lignin degradation and roles of white rot fungi: Study on an efficient symbiotic system in fungus-growing termites and its application to bioremediation. *Focused on Ecomolecular Science Research*. 42, 39-42.
- Okamoto, K., Nitta, Y., Maekava, N., Yanase, H. (2011). Direct ethanol production from starch, wheat bran and rice straw by the white rot fungus *Trametes hirsuta*. *Enzyme Microb. Technol.* 48, 273–277.
- Onyeneho, S.N., Hettiarachchy, N.S. (1992). Antioxidant Activity of Durum Wheat Bran. *J. Agric. Food Chem.* 40, 1496-1500.

Ooijkaas, L.P., Weber, F.J., Buitelaar, R.M., Tramper, J., Rinzema, A. (2000). Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. *TIBTECH* AUGUST 2000, 18.

Oriol, E., Raimbault, M., Roussos, S., Viniegra-Gonzales, G. (1988). Water and water activity in the solid state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27.498-503.

Osma, J.F., Toca Herrera J.L., Rodríguez Couto, S. (2007). Banana skin: A novel waste for laccase production by *Trametes pubescens* under solid-state conditions. Application to synthetic dye decolouration. *Dyes Pigments.* 75, 32-37.

Osma, J.F., Moilanen, U., Toca-Herrera, J.L., Rodríguez Couto, S. (2011a). Morphology and laccase production of white-rot fungi grown on wheat bran flakes under semi-solid-state fermentation conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* 318, 27–34.

Osma, J.F., Toca-Herrera, J.L., Rodríguez Couto, S. (2011b). Cost analysis in laccase production. *J. Environ. Manage.* 92, 2907-2912.

Ozcırak, S., Urek, R.O. (2012). Utilization of potato peelings for the production of ligninolytic enzymes by solid state fermentation using *Pleurotus ostreatus*. 15th European Congress on Biotechnology, 29, 23–26 September 2012, 107p.

Ozmen, N., Yesilada, O. (2012). Valorization and biodecolorization of dye adsorbed on lignocellulosics using white rot fungi. *BioResources.* 6, 2, 1656-1665.

Özşölen, F., Aytar, P., Gedikli, S., Çelikdemir, M., Ardıç, M., Çabuk, A. (2010). Enhanced Production and Stability of Laccase Using Some Fungi on Different Lignocellulosic Materials. *JABS.* 4, 3, 69-78.

Paice, M.G., Reid, I.D., Bourbonnais, R., Archibald, F.S., Jurasek, L. (1993). Manganese Peroxidase, Produced by *Trametes versicolor* during Pulp Bleaching, Demethylates and Delignifies Kraft Pulp. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1, 260-265.

Palmer, T. (1991). *Understanding Enzymes*. Ellis Horwood Limited, Great Britain by Hartnolls, Bodmin, Cornwall, 75 p.

Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B., Sannia, G. (2000). Copper Induction of Laccase Isoenzymes in the Ligninolytic Fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3, 920-924.

Pandey, A., Soccol, C.R., Mitchell, D. (2000). New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and Products. *Process Biochem.* 35, 1153–1169.

Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 13, 81–84.

Pandey A. (2004). *Concise encyclopedia of bioresource technology*. Food Products Press, New York, London, Oxford, 533, 681, 668 p.

Papinutti, V.L., Forchiassin, F. (2007). Lignocellulolytic enzymes from *Fomes sclerodermeus* growing in solid-state fermentation. *J. Food Eng.* 81, 54-59.

Patel, R.N., Thakker, G.D., Rao, K.K. (1994). Potential use of white-rot fungus *Antrodia* sp. RK1 for biopulping. *J. Biotechnol.* 36, 19-23.

- Patel, H., Gupte, A., Gupte, S. (2009). Effect of different cultures conditions and inducers on production of laccase by a basidiomycete fungal isolate *Pleurotus ostreatus* HP-1 under solid state fermentation. *BioResources*. 4, 1, 268-284.
- Pazarlıoğlu, N.K., Sarioğlu, M., Telefoncu, A. (2005). Laccase: production by *Trametes versicolor* and application to denim washing. *Process Biochem*. 40, 1673–8.
- Pearce, C.I., Lloyd, J.R., Guthrie, J.T. (2003). The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. *Dyes Pigment*. 58. 179–196.
- Peter, M.G., Wollenberger, U. (1997). Phenol oxidizing enzymes: mechanisms and applications in biosensors. *EXS*. 80: 63–82.
- Pickard, M.A., Roman, R., Tinoco, R., Vazquez-Duhalt, R. (1999). Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolism by White Rot Fungi and Oxidation by *Coriopsis gallica* UAMH 8260 Laccase. *Appl. Environ. Microb*. 65, 9, 3805-3809.
- Pointing, S.B. (2001). Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 57, 20–33.
- Prasad, A.S.A., Rao, K.V.B. (2010). Physico chemical characterization of textile effluent and screening for dye decolorizing bacteria. *Global J. Biotech. Biochem*. 5,2, 80-86.
- Raghavarao, K.S.M.S., Ranganatham, T.V., Karanth, N.G. (2003). Some engineering aspects of solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J*. 13, 127–135.
- Rai, H.S., Bhattacharyya, M.S., Singh, J., Bansal, T.K., Vats, P., Banerjee, U.C. (2005). Removal of Dyes from the Effluent of Textile and Dyestuff Manufacturing Industry: A Review of Emerging Techniques With Reference to Biological Treatment. *Crit. Rev. Env. Sci. Tec*. 35, 219–238.
- Raimbault, Alazard, D. (1980). Culture Method to Study Fungal Growth in Solid Fermentation. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol*. 9, 199-209.
- Raimbault, M. (1998). General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *EJB Electron. J. Biotechn*. 1, 3.
- Rahardjo, Y.S.P. (2005). *Fungal Mats in Solid-State Fermentation*. PhD Thesis. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
- Reddy, C.A. (1995). The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. *Curr. Opin. Biotechnol*. 6, 320–328.
- Reid, I.D., Paice, M.G. (1994). Biological bleaching of kraft pulps by white-rot fungi and their enzymes. *FEMS Microbiol. Rev*. 13, 369-376.
- Renate, U.H., Ulrich, A., Mansfeld, J. (1999). The concept of the unfolding region for approaching the mechanisms of enzyme stabilization. *J. Mol. Cat. B-Enz*. 7, 125–31.
- Revankar, M.S., Lele, S.S. (2006). Enhanced production of laccase using a new isolate of white rot fungus WR-1. *Process Biochem*. 41, 581–588.

- Revankar, M.S., Desai, K.M., Lele, S.S. (2007). Solid-state Fermentation for Enhanced Production of Laccase using Indigenously Isolated *Ganoderma* sp. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 143, 16–26.
- Risdianto, H., Suhardi, S.H., Setiadi, T., Kokugan, T. (2010). The Influence of Temperature on Laccase Production in Solid State Fermentation by using White Rot Fungus *Marasmius* sp. *The 1st International Seminar on Fundamental & Application Of Chemical Engineering*. November 3-4, 2010, Bali.
- 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 J. Eng. Sci.* 44, 2, 93-105.
- Robinson, T., McMullan, G., Machant, R., Nigam, P. (2001). Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technol.* 77, 247-255.
- Robinson, T., Nigam, P. (2003). *Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation*, *Biochem. Eng. J.* 13, 197–203.
- Rodgers, C.J., Blanford, C.F., Giddens, S.R., Skamnioti, P., Armstrong, F.A., Gurr, S.J. (2009). Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes?. *Trends Biotechnol.* 28, 2, 63-72.
- Rodríguez, E., Pickard, M.A., Vazquez-Duhalt, R. (1999). Industrial Dye Decolorization by Laccases from Ligninolytic Fungi. *Curr. Microbiol.* 38, 27-32.
- Rodríguez Couto, S., Moldes, D., Liébanas, A., Sanromán, A. (2003). Investigation of several bioreactor configurations for laccase production by *Trametes versicolor* operating in solid-state conditions. *Biochem. Eng. J.* 15, 21–26.
- Rodríguez Couto, S., Rosales, E., Gundín, E., Sanromán, M^a.A. (2004). Exploitation of a waste from the brewing industry for laccase production by two *Trametes* species. *J. Food Eng.* 64, 423–428.
- Rodríguez Couto, S., Sanromán, A. (2005a). Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochem. Eng. J.* 22, 211–219.
- Rodríguez Couto, S., Sanromán, M^a.A. (2005b). Coconut flesh: a novel raw material for laccase production by *Trametes hirsuta* under solid-state conditions. Application to Lissamine Green B decolourization. *J. Food Eng.* 71, 208–213.
- Rodríguez Couto ve Ángeles Sanromán. (2006a). Rodríguez Couto, S., Ángeles Sanromán, M. (2006a). Application of solid-state fermentation to food industry—A review. *J. Food Eng.* 76, 291–302.
- Rodríguez Couto, S., López, E., Sanromán, M. A. (2006b). Utilisation of grape seeds for laccase production in solid-state fermentors. *J. Food Eng.* 74, 263–267.
- Rodríguez Couto, S., Toca-Herrera J.L. (2006c). Laccases in the textile industry. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* 1,4, 115-120.

- Rodríguez-Escales, P., Borrás, E., Sarra, M., Folch, A. (2013). Granulometry and Surfactants, Key Factors in Desorption and Biodegradation (*T. versicolor*) of PAHs in Soil and Groundwater. *Water Air Soil Pollut.* 224,1422, 1-6.
- Rosales, E., Rodríguez Couto, S., Sanromán, A. (2002). New uses of food waste: application to laccase production by *Trametes hirsuta*. *Biotechnol. Lett.* 24, 701–704.
- Rosales, E., Rodríguez Couto, S., Sanromán, M^a. A. (2005). Reutilisation of food processing wastes for production of relevant metabolites: application to laccase production by *Trametes hirsuta*. *J. Food Eng.* 66, 419–423.
- Rosales, E., Rodríguez Couto, S., Sanromán, M^a. A. (2007). Increased laccase production by *Trametes hirsuta* grown on ground orange peelings. *Enzyme Microb. Tech.* 40, 1286–1290.
- Roure, M., Delattre, P., Froger, H. (1992). Composition for an enzymic coloration of keratin fibres, especially for hair and its use in a dyeing process. Eur Pat Appl EP0504005.
- Roy, J.J., Abraham, T.E., Abhijith, K.S., Kumar, P.V.S., Thakur, M.S. (2005). Biosensor for the determination of phenols based on Cross-Linked Enzyme Crystals (CLEC) of laccase. *Biosens. Bioelectron.* 21, 206–211.
- Ruqayyah, T.I.J., Jamal, P., Alam, Md.Z., Mirghani, Md.E.S. (2013). Biodegradation potential and ligninolytic enzyme activity of two locally isolated *Panus tigrinus* strains on selected agro-industrial wastes. *J. Environ. Manage.* 118, 115-121.
- Ryu, W.R., Shim, S.H., Jang, M.Y., Jeon, Y.J., Oh, K.K., Cho, M.H. (2000). Biodegradation of Pentachlorophenol by White Rot Fungi under Ligninolytic and Nonligninolytic Conditions. *Biotechnol. Bioprocess. Eng.* 2000, 5: 211-214.
- Saito, T., Hong, P., Kato, K., Okazaki, M., Inagaki, H., Maeda, S., Yokogawa, Y. (2003). Purification and characterization of an extracellular laccase of a fungus (family Chaetomiaceae) isolated from soil. *Enzyme Microb. Technol.* 33, 520–526.
- Salony., Mishra, S., Bisaria, V.S. (2006). Production and characterization of laccase from *Cyathus bulleri* and its use in decolourization of recalcitrant textile dyes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 71, 646–653.
- Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G., Pandey, A. (2005). Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochem.* 40, 2689–2694.
- Santis-Navarro, A., Gea, T., Barrena, R., Sánchez, A. (2011). Production of lipases by solid state fermentation using vegetable oil-refining wastes. *Bioresource Technol.* 102, 10080–10084.
- Sari, A.A., Tachibana, S., Muryanto. (2012a). Correlation of Ligninolytic Enzymes from the Newly-Found Species *Trametes versicolor* U97 with RBBR Decolorization and DDT Degradation. *Water Air Soil Pollut.* 223, 5781–5792.

- Sari, A.A., Tachibana, S., Itoh, K. (2012b). Determination of co-metabolism for 1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl) ethane (DDT) degradation with enzymes from *Trametes versicolor* U97. *J. Biosci. Bioeng.* 114,2, 176-181.
- Sathishkumar, P., Murugesan, K., Palvannan, T. (2010). Production of laccase from *Pleurotus florida* using agro-wastes and efficient decolorization of Reactive blue 198. *J. Basic Microb.* 50, 360–367.
- Sathiya moorthi, P., Periyar selvam, S., Sasikalaveni, A., Murugesan, K., Kalaichelvan, P. T. (2007). Decolorization of textile dyes and their effluents using white rot fungi. *Afr. J. Biotechnol.* Vol. 6 4,424-429.
- Saucedo-Castañeda, G., Gutiérrez-Rojas, M., Bacquet, G., raimbault, M. (1990). Het transfer simulation in solid substrate fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 35, 802-808.
- Schliephake, K. (1993). Decolourisation of a pigment plant effluent by *Pycnoporus cinnabarinus* in a packed-bed bioreactor. *Biotechnol. Lett.* 15,11, 1185-1188.
- Schmidt, O. (2006). *Wood and Tree Fungi*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, Germany, 91,92 p.
- Selvam, K., Swaminathan, K., Chae, K.S. (2003). Decolourization of azo dyes and a dye industry effluent by a white rot fungus *Thelephora* sp. *Bioresource Technol.* 88, 115–119.
- Servili, M., De Stafano, G., Piacquaido, P., Sciancalepore, V. (2000). A Novel Method for Removing Phenols from Grape Must. *Am. J. Enol. Vitic.* 51, 4, 357-361.
- 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 Technol.* 101, 9248–9253.
- Shraddha., Shekher, R., Sehgal, S., Kamthania, M., Kumar, A. (2011). Laccase:Microbial Sources, Production, Purification, and Potential Biotechnological Applications. *Enzyme Research*.
- Shojaosadati, S.A., Faraidouni, R., Madadi-Nouei , A., Mohamadpour, I. (1999). Protein enrichment of lignocellulosic substrates by solid state fermentation using *Neurospora sitophila*. *Resources, Conservation and Recycling.* 27, 73–87.
- Silvério, S.C., Moreira, S., Milagres, A.M.F., Macedo, E.A., Teixeira, J.A., Mussatto, S.I. (2013). Laccase production by free and immobilized mycelia of *Peniophora cinerea* and *Trametes versicolor*: a comparative study. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 36, 365–373.
- Singh, J., Majumdar, D., Pandey, A., Pandey, A.K. (2010). Solid substrate fermentation of mycoherbical agent *Alternaria alternata* FGCC#25. *Rec. Res. Sci. Tech.* 2, 9, 22-27.
- Singhania, R.R., Patel, A.K., Soccol, C.R., Pandey, A. (2009). Recent advances in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 44, 13–18.
- Sliva, D. (2003). *Ganoderma lucidum* (Reishi) in Cancer Treatment. *Integr. Cancer Ther.* 2, 4, 358-364.

- Smits, J.P., Rinzema, A., Tramper, J., van Sonsbeek, H.M., Hage, J.C., Kaynak, A., Knol, W. (1998). The influence of temperature on kinetics in solid-state fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* 22,50-57.
- Soden, D.M., Dobson, A.D.W. (2001). Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. *Microbiology*.147, 1755–1763.
- Songulashvili, G., Elisashvili, V., Wasser, S.P., Nevo, E., Hadar, Y. (2007). Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes. *Enzyme Microb. Technol.* 41, 57-61.
- Srinivasan, A., Viraraghavan, T. (2010). Decolorization of dye wastewaters by biosorbents: A review. *J. Environ .Manage.* 91,1915-1929.
- Steffen, K.T., Hatakka, A., Hofrichter, M. (2003). Degradation of Benzo[a]pyrene by the Litter-Decomposing Basidiomycete *Stropharia coronilla*: Role of Manganese Peroxidase. *Appl. Environ. Microb.* 69,7, 3957–3964.
- Stoilova, I., Krastanov, A., Stanchev, V. (2010). Properties of crude laccase from *Trametes versicolor* produced by solid-substrate fermentation. *Advances in Bioscience and Biotechnology.* 1, 208-215.
- Suffian, M., Annuar, M., Murthy, S.S., Sabanatham, V. (2010). Laccase production from oil palm industry solid waste: Statistical optimization of selected process parameters. *Eng. Life Sci.* 10, 1, 40–48.
- Suganthi, R., Benazir, J.F., Santhi, R., Kumar, R.V., Hari, V.A., Meenakshi, N., Nidhiya, K.A., Kavitha, G., Lakshmi, R. (2011). *Int. J. Eng. Sci. Technol.* 3, 1756-1763.
- Sumathi, S., Manju, B.S. (2000). Uptake of reactive textile dyes by *Aspergillus foetidus*. *Enzyme Microb. Tech.* 27, 347–355.
- Sun, Q.Y., Hong, Y.Z., Xiao, Y.Z., Fang, W., Fang, J. (2009). Decolorization of textile reactive dyes by the crude laccase produced from solid-state fermentation of agro-byproducts. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 1153–1160.
- Swamy, J., Ramsay, J.A. (1999). The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes. *Enzyme Microb. Tech.* 24, 130–137.
- Szendefy, J., Szakacs, G., Christopher, L. (2006). Potential of solid-state fermentation enzymes of *Aspergillus oryzae* in biobleaching of paper pulp. *Enzyme Microb. Tech.* 39, 1354–1360.
- Tanaka, H., Itakura, S., Enoki, A. (1999). Hydroxyl radical generation by an extracellular low-molecular-weight substance and phenol oxidase activity during wood degradation by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*. *J. Biotechnol.* 75, 57-70.
- Taşkın, E., Eltem, R., Soyak, E. (2010). Enhancment of solid state fermentation for production of penicilin G on sugar beet pulp. *BioResources.* 5,1, 268,275.
- Thurston, C.F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology.* 140, 19-26.

Tišma, M., Žnidaršič-Plazl, P., Vasić-Rački, Đ., Zelić, B. (2012). Optimization of Laccase Production by *Trametes versicolor* Cultivated on Industrial Waste. *Appl Biochem Biotechnol.* 166, 36-46.

Toca-Herrera, J.L., Osma, J.F., Rodríguez Couto, S. (2001). Potential of solid-state fermentation for laccase production. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. A. Méndez-Vilas (Ed.)

Toca-Herrera, J.L., Osma, J.F., Rodríguez Couto, S. (2007). Potential of solid-state fermentation for laccase production. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*.

Tuncer, M. (2010). Lakkaz, Ksım 1: Yapısı, katalitik özellikleri, ve dağılımları. *Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 22,19-63.

Tuomela, M., Lyytikäinen, M., Oivanen, P., Hatakka, A. (1999). Mineralization and conversion of pentachlorophenol (PCP) in soil , inoculated with the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Soil Biol. Biochem.* 31, 65-74.

Tychanowicz, G.K., de Souza, D.F., Souza, C.G.M., Kadowaki, M.K., Peralta, R.M. (2006). Copper Improves the Production of Laccase by the White- Rot Fungus *Pleurotus pulmonarius* in Solid State Fermentation. *Braz. Arch. Biol. Techn.* 49, 5, 699-704.

Vastrad, B.M., Neelagund, S.E. (2011). Production and optimisation of tetracycline by various strains of *Streptomyces* under solid state fermentation using pineapple peel as a novel substrate. *Recent Research in Science and Technology*. 3, 01-08.

Velmurugan, P., Hur, H., Balachandar, V., Kamal-Kannan, S., Lee, K.J., Lee, S.M., Chae, J.C., Oh, B.T. (2011). *Monascus* pigment production by solid-state fermentation with corn cob substrate. *J. Biosci. Bioeng.* 112, 6, 590–594.

Verma, P., Madamwar, D. (2002). Production of Ligninolytic Enzymes for Dye Decolorization by Cocultivation of White-Rot Fungi *Pleurotus ostreatus* and *Phanerochaete chrysosporium* Under Solid-State Fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 102-103, 109-118.

Viniegra-González, G., Favela-Tornes, E. (2004). *Handbook of Fungal Biotechnology*. Madison Avenue, New York, 478 p.

Vyas, B.R., Molitoris, H.P. (1995). Involvement of an Extracellular H₂O₂-Dependent Ligninolytic Activity of the White Rot Fungus *Pleurotus ostreatus* in the Decolorization of Remazol Brilliant Blue R. *Appl. Environ. Microb.* 61, 11, 3919-3927.

Walter, M., Boyd-Wilson, K., Boul, L., Ford, C., McFadden, D., Chong, B., Pinfold, J. (2005). Field-scale bioremediation of pentachlorophenol by *Trametes versicolor*. *Int. Biodeter. Biodegr.* 56, 51–57.

Wang, H., Zheng, X-W., Su, J-Q., Tian, Y., Xiong, X-J., Zheng, T.L. (2009a). Biological decolorization of the reactive dyes Reactive Black 5 by a novel isolated bacterial strain *Enterobacter* sp. EC3. *J. Hazard. Mater.* 171, 654–659.

- Wang, H., Su, J.Q., Zheng, X.W., Tian, Y., Xiong, X.J., Zheng, T.L. (2009b). Bacterial decolorization and degradation of the reactive dye Reactive Red 180 by *Citrobacter* sp. CK3. *Int. Biodeter. Biodegr.* 63, 395–399.
- Wang, Z.W., Liang, J.S., Liang, Y. (2012). Decolorization of Reactive Black 5 by a newly isolated bacterium *Bacillus* sp. YZU1. *Int. Biodeter. Biodegr.* 1-8.
- Winqvist, E., Moilanen, U., Mettälä, A., Liesola, M., Hatakka, A. (2008). Production of lignin modifying enzymes on industrial waste material by solid-state cultivation of fungi. *Biochem. Eng. J.* 42, 128-132.
- Wong, Y., Yu, J. (1999). Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes. *Wat. Res.* 33,16, 3512-3520.
- Wu, X., Jiang, S., Liu, M., Pan, L., Zheng, Z., Luo, S. (2011). Production of L-lactic acid by *Rhizopus oryzae* using semicontinuous fermentation in bioreactor. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 38, 4, 565-571.
- Yang, S.Q., Yan, Q.J., Jiang, Z.Q., Li, L.T., Tian, H.M., Wang, Y.Z. (2006). High-level of xylanase production by the thermophilic *Paecilomyces thermophila* J18 on wheat straw in solid-state fermentation. *Bioresource Technol.* 97, 1794–1800.
- Fışkın, K., Ünyayar, A., Yeşilada, Ö. (1989). Beyaz Çürükçül Fungusların Lakkaz ve Peroksidaz Aktivitelerine Bağlı Lignin Degradasyonu. *Doğa Türk Biyoloji Dergisi.* 13,3, 141-148.
- Yesilada, O. (1992). *Alkol Fabrika Atığı Vinas (Şlempe)’in Beyaz Çürükçül Funguslar Tarafından Biyodegradasyonunda Renk Giderimi-Enzim İlişkisinin Araştırılması*. Doktora tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya.
- Yesilada, O., Fiskin, K. (1995a). Decolorization of Alcoholic Waste Water by White Rot Fungi *Coriolus versicolor*, *Funalia trogii* ve *Phanerochaete chrysosporium* ME446. *Turk. J. Biol.* 19: 191-200
- Yesilada, O., Fiskin, K., Yesilada, E. (1995b). The use of white rot fungus *Funalia trogii* (Malatya) for the decolorization and phenol removal from olive mill wastewater. *Environ. Technol.* 16,1, 95-100.
- Yesilada, O. (1995c). Decolorization of Crystal Violet by Fungi. *World J. Microb. Biot.* 11,5, 601-602.
- Yesilada, O., Sik, S., Sam, M (1998). Biodegradation of olive oil mill wastewater by *Coriolus versicolor* and *Funalia trogii*: effects of agitation, initial COD concentration, inoculum size and immobilization. *World J. Microb. Biot.* 14, 37-42.
- Yesilada, O., Cing, S., Asma, D. (2002). Decolourisation of the textile dye Astrazon Red FBL by *Funalia trogii* pellets. *Bioresource Technol.* 81, 155-157.
- Yesilada, O., Asma, D., Cing, S. (2003). Decolorization of textile dyes by fungal pellets. *Process Biochem.* 38, 933-938.
- Yeşilada, O., Özcan, B. (1998). Decolorization of Orange II Dye With the Crude Culture Filtrate of White rot Fungus, *Coriolus versicolor*. *Tr. J. of Biology.* 22, 463-476.

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 J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 33–39.

Zeng, W., Cai, Y., Liao, X., Zeng, X., Li, W., Zhang, D. (2011). Decolorization of synthetic dyes by crude laccase from a newly isolated *Trametes trogii* strain cultivated on solid agro-industrial residue. *J. Hazard. Mater.* 187, 517–525.

Zilly, A., Coelho-Moreira, J.S., Bracht, A., de Souza, G.M., Carvajal, A.E., Koehnlein, E.A., Peralta, R.M. (2011). Influence of NaCl and Na₂SO₄ on the kinetics and dye decolorization ability of crude laccase from *Ganoderma lucidum*. *Int. Biodeter. Biodegr.* 65, 340-344.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Filiz BORAN

Doğum Yeri ve Tarihi: Malatya-10.03.1981

E-posta: filiz.kuru@inonu.edu.tr

Lisans: 2000-2004 İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, MALATYA

Yüksek Lisans: 2004-2007 İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, MALATYA

Yayın Listesi:

- 1- Yesilada O, Yildirim SC, Birhanli E, Apohan E, Asma D, **Kuru F.** The evaluation of pre-grown mycelial pellets in decolorization of textile dyes during repeated batch process, World J Microbiol Biotechnol 26:33–39, 2010
- 2- **F. Boran**, O. Yesilada, Enhanced production of laccase by fungi under solid substrate fermentation condition and its application in dye decolorization. Bioresources. 6(4), 2011
- 3- Kahraman, S., **Kuru, F.**, Dogan, D., Yesilada, O., "Removal of Indigo Carmine from an Aqueous Solution by Fungus *Pleurotus ostreatus*". Archives of Environmental Protection. 38 (3), 2012

TEZDEN TÜRETİLEN YAYINLAR/SUNUMLAR

- 1- **Boran, F.**, Yeşilada, O. Laccase production by newly isolated *Funalia trogii* under solid state fermentation conditions. *The International Conference on Environmental Science and Technology – 2013 (ICOEST'2013)*. June 18 - 21, 2013 Cappadocia Urgup, Nevsehir, Turkey.