

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

134659

**İMMOBİLİZE *Phanerochaete chrysosporium*'dan
MANGAN PEROKSİDAZ ENZİMİNİN
ÜRETİMİ, İZOLASYONU VE KISMİ SAFLAŞTIRILMASI**

Raziye ÖZTÜRK ÜREK

**Biyokimya Anabilim Dalı
Bilim Dalı Kodu : 405.05.01**

Sunuş Tarihi : 29.09.2003

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Nurdan PAZARLIOĞLU

Bornova-İZMİR

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

III

Raziye ÖZTÜRK ÜREK tarafından DOKTORA tezi olarak sunulan “İmmobilize *Phanerochaete chrysosporium*’dan Mangan Peroksidaz Enziminin Üretimi, İzolasyonu ve Kısmi Saflaştırılması” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 29.09.2003 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı : Yrd. Doç. Dr. Nurdan PAZARLIOĞLU

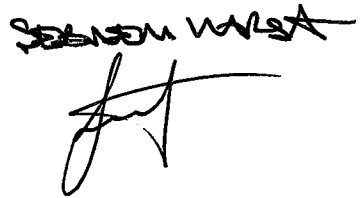
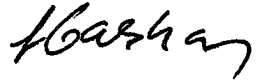
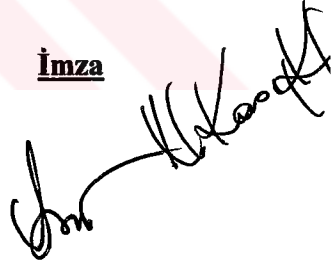
Raportör Üye : Prof.Dr. Azmi TELEFONCU

Üye : Prof.Dr. Leman TARHAN

Üye : Prof.Dr. Şebnem HARSA

Üye : Yrd. Doç.Dr. İhsan YAŞA

İmza



ÖZET

**İMMOBİLİZE *Phanerochaete chrysosporium*'dan
MANGAN PEROKSİDAZ ENZİMİNİN
ÜRETİMİ, İZOLASYONU VE KISMİ SAFLAŞTIRILMASI**

ÖZTÜRK ÜREK, Raziye

Doktora Tezi, Biyokimya Bölümü

Tez Yöneticisi: Yrd. Doç. Dr. Nurdan PAZARLIOĞLU

Eylül 2003, 198 sayfa

Phanerochaete chrysosporium BKMf-1767 (ATCC 24725) farklı taşıyıcılarda immobilize edildi. En iyi taşıyıcı polistiren köpük ve optimum immobilizasyon koşulları 50 rpm, 37°C ve 2 saat olarak belirlendi. Adsorpsiyon kinetik sabitleri saptandı. Sonuçlar; polistiren köpük üzerinde *P. chrysosporium* adsorpsiyonunun Langmuir adsorpsiyon izotermini izlediğini gösterdi. *P. chrysosporium* katı-hal kültürlerinde mangan peroksidaz (MnP) enziminin üretimine etki eden bazı faktörler incelendi. Kültürlere 37°C ve pH 4,5 da 174 µM Mn⁺², % 0,05 Tween 80 (v/v), 22 mM azot ve 10 g/L glukozun ilavesiyle maksimum MnP aktivitesi (421 U/L) elde edildi.

Modifiye katı-hal daldırma biyoreaktörde kesikli tip kültürde *P. chrysosporium* tarafından MnP üretimi gerçekleştirildi ve maksimum MnP aktivitesi 770,82 U/L olarak saptandı. Enzim üretim verimliliği 110,12 U/gün.L olarak belirlendi. MnP, immobilize *P. chrysosporium*'dan izole edildi ve (NH₄)₂SO₄ ile protein çöktürmesinin ardından DEAE-Sefaroz iyon değişim ve Ultrajel AcA 54 jel filtrasyon kromatografileriyle saflaştırıldı. Bu saflaştırma prosesiyle 5,8-saflaştırma katıyla % 23,08 verim elde edildi. Jel filtrasyon ve sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezine (SDS-PAGE) göre; enzimin molekül ağırlığı 45000 ±1000 Da dur. Saflaştırılan MnP nin optimum pH sı 4,5, sıcaklığı da 30°C olarak saptandı. Bazı inhibitör ve aktivatörlerin enzim aktivitesine etkisi incelendi.

Anahtar Kelimeler: *Phanerochaete chrysosporium*, katı-hal kültürleri, polistiren köpük, Mangan peroksidaz, saflaştırma, karakterizasyon, modifiye daldırma biyoreaktör, kesikli tip kültür

VII

ABSTRACT

THE PRODUCTION, ISOLATION and PARTIAL PURIFICATION of MANGANASE PEROXIDASE from IMMOBILIZED *Phanerochaete chrysosporium*

OZTURK UREK, Raziye

PhD in Biochemistry Department

Supervisor: Ass.Prof. Nurdan PAZARLIOGLU

September 2003, 198 pages

Phanerochaete chrysosporium BKMf-1767 (ATCC 24725) was immobilized on various supports. The best support and optimum immobilization conditions were determined as polystyrene foam and 50 rpm, 37 °C and 2 h respectively. Kinetic constants of adsorption were estimated. The results show that the adsorption of *P. chrysosporium* on polystyrene foam follows the Langmuir adsorption isotherm. The effects of some parameters on manganese peroxidase (MnP) production in solid-state cultures of *P. chrysosporium* was studied. Supplementing the cultures with 174 µM Mn²⁺, 0.05 % Tween 80 (v/v), 22 mM nitrogen and 10 g/L glucose at 37°C and pH 4.5, a maximum MnP activity of 421 U/L was achieved.

The production of MnP by *P. chrysosporium* in a modified solid-state immersion bioreactor (batch made) was also performed and maximum MnP activity was determined as 770.8 U/L. Enzyme productivity was obtained as 110.12 U/day L. MnP was isolated from immobilized *P. chrysosporium* and purified with partial protein precipitation by using (NH₄)₂SO₄ followed DEAE-Sepharose ion exchange and Ultragel AcA 54 gel filtration chromatographies. This purification process attained 23.08 % activity yield with a purification factor of 5.8. According to data on gel filtration chromatography and sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), the molecular weight of the enzyme was 45000 ±1000 Da. The optimum pH and temperature of purified MnP were 4.5 and 30°C respectively. Effects of possible inhibitors and activators of enzyme activity were investigated.

Keywords : *Phanerochaete chrysosporium*, solid-state cultures, polystyrene foam, manganese peroxidase, purification, characterization, modified immersion bioreactor, batch made cultivation.

IX

TEŞEKKÜR



Tez çalışmamın biçimlenmesinde ve her aşamasında değerli katkıları ve görüşlerinden yararlandığım danışmanım Yrd.Doç.Dr. Nurdan PAZARLIOĞLU'na, 6 aylık tez izleme süreçlerinde çalışmamın yönlendirilmesinde bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen Prof.Dr.Leman TARHAN ve Prof.Dr. Azmi TELEFONCU'ya, Biyokimya Bölümü elemanlarına ve Kimya Eğitimi ABD ye ve çalışma arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca; çalışmalarım süresince her an yanımda olan, tüm sıkıntılarımı paylaşan, olağanüstü özverisiyle bana güç veren sevgili eşime, aileme ve desteklerini esirgemeyen N. SÖKMEN'e teşekkür ederim.

XI

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	III
ABSTRACT.....	IV
TEŞEKKÜR.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	IX
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	X
1.GİRİŞ.....	1
1.1 Ligninin Yapısı ve Özellikleri.....	5
1.2 Lignin Biyo-yıkımı.....	5
1.2.1 Doğada lignin yıkımı.....	5
1.2.2 Ligninolitik enzimlerin moleküler biyolojisi.....	13
1.2.3 Ligninolitik enzimler.....	17
1.2.4 Mangan Peroksidaz (E.C 1.11.1.13).....	27
1.3 <i>In vitro</i> Fungal Enzim Üretimi.....	37
1.3.1 Serbest hücreler.....	37
1.3.2 İmmobilize hücreler.....	38
1.3.3 Katı hal fermentasyonu (SSF).....	51
1.3.4 İmmobilize hücrelerle ligninolitik enzimlerin üretimi.....	55

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.MATERYAL ve METODLAR.....	59
2.1 Materyaller.....	59
2.1.1 Kimyasallar.....	59
2.1.2 Mikroorganizma.....	59
2.1.3 Cihazlar.....	59
2.2 Metodlar.....	60
2.2.1 <i>P.chrysosporium</i> BKMf-1767 (ATCC 24725) ve kültivasyon koşulları.....	60
2.2.2 Hücre miktar tayinleri.....	61
2.2.3 Aktivite tayinleri.....	63
2.2.4 Polistiren köpük üzerinde hücre adsorpsiyonu.....	70
2.2.5 Polistiren köpük üzerinde immobilize <i>P. chrysosporium</i> 'dan MnP üretimi.....	75
2.2.6 İmmobilize <i>P.chrysosporium</i> dan MnP enziminin izolasyonu kısmi saflaştırılması ve molekül ağırlığının tayini.....	75
2.2.7 İmmobilize <i>P.chrysosporium</i> tarafından üretilen MnP enziminin karakterizasyonu.....	81
3.SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	83
3.1 MnP Aktivite Tayin Yönteminin Belirlenmesi.....	83
3.2 <i>P.chrysosporium</i> İmmobilizasyonu.....	83
3.2.1 Spor immobilizasyonu.....	83
3.2.2 Misel immobilizasyonu.....	90
3.3 Stasyoner Kültürlerde MnP Üretimi.....	93

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.4	MnP Enzim Üretimine Etki Eden Faktörler.....	93
3.4.1	Mn ⁺² konsantrasyonunun etkisi.....	94
3.4.2	Oksijen etkisi.....	95
3.4.3	PMSF nin etkisi.....	95
3.4.4	Tween 80 in etkisi.....	98
3.4.5	Azot konsantrasyonunun etkisi.....	99
3.4.6	Gliserin konsantrasyonunun etkisi.....	100
3.4.7	Sıcaklığın etkisi.....	101
3.4.8	pH nin etkisi.....	102
3.5	Biyoreaktörde MnP Üretimi.....	104
3.5.1	Biyoreaktör tasarımı.....	105
3.5.2	Reaktör kinetik değerleri.....	110
3.6	İmmobilize <i>P.chrysosporium</i> dan MnP Enziminin İzolasyonu ve Kısmi Saflaştırılması.....	113
3.6.1	Proteinlerin (NH ₄) ₂ SO ₄ ile çöktürülmesi.....	114
3.6.2	Proteinlerin metanol ve etanol ile çöktürülmesi.....	115
3.6.3	Proteinlerin polietilen glikol ile çöktürülmesi.....	116
3.6.4	DEAE-Sefaroz anyon değiştirici kolon kromatografisi.....	117
3.6.5	Jel Filtrasyon kolon kromatografisi.....	119
3.6.6	SDS-PAGE elektroforezi.....	121
3.7	MnP in Kinetik Karakterizasyonu.....	123
3.7.1	Enzimin substrat spesifikliği.....	123
3.7.2	pH ile aktivite değişimi.....	125
3.7.3	Sıcaklığa bağımlı aktivite değişimi.....	126

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.7.4	Enzimin V_{max} ve K_m 'inin bulunması.....	126
3.7.5	Termal stabilite değişimi.....	128
3.7.6	pH stabilite değişimi.....	129
3.7.7	Karboksilik asitlerin etkisi.....	130
3.7.8	Bazı fenolik bileşiklerin etkisi.....	131
3.7.9	Bazı metal iyonlarının etkisi.....	131
3.7.10	İyon şiddetinin etkisi.....	132
3.7.11	Bazı kimyasal maddelerin etkisi.....	133
3.7.12	Depolama kararlılığı.....	135
3.7.13	Enzimatik dekolorizasyon.....	135
3.8	Yapısal Karakterizasyonu.....	136
3.8.1	Aktif merkez tayini.....	136
3.8.2	Karbohidrat tayini.....	137
4.	SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	139
	KAYNAKLAR.....	141
	ÖZGEÇMİŞ.....	171

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Ligninin şematik yapısal formülü.....	4
1.2 LiP in kristal yapısı.....	19
1.3 MnP nin kristal yapısı.....	28
1.4 MnP nin katalitik döngüsü.....	29
1.5 Fenolik olmayan lignin'in yıkımı (d.YA; doymamış yağ asidi).....	32
1.6 MnP sistemi tarafından substratlara bağımlı radikal oluşumu.....	34
2.1 Thoma lamında <i>P. chrysosporium</i> başlangıç hücre sayımı.....	62
2.2 Bradford yöntemine göre protein kalibrasyon grafiği.....	64
2.3 Glukoz tayini kalibrasyon grafiği.....	66
2.4 Azot tayini kalibrasyon grafiği.....	68
2.5 Karbohidrat tayini kalibrasyon grafiği.....	69
2.6 Stirenden polistiren eldesi ve polistiren yapısı.....	72
2.7 İmmobilizasyonda kullanılan polistiren köpük.....	73
2.8 37°C de durağan olarak 5 gün inkübe edilen serbest ve immobilize hücreler.....	74
2.9 Ultragel AcA 54 jel filtrasyon kolon kromatografisinin molekül ağırlık kalibrasyon grafiği. (---) saflaştırılan MnP.....	77
3.1 <i>P.chrysosporium</i> 'un başlangıç hücre miktarına bağımlı gram taşıyıcıdaki adsorplanan hücre miktarı.....	85
3.2 <i>P.chrysosporium</i> 'un gram taşıyıcıda adsorplanan hücre miktarına inkübasyon süresinin etkisi.....	86
3.3 <i>P.chrysosporium</i> adsorpsiyon kinetik değerleri.....	89
3.4 <i>P.chrysosporium</i> adsorpsiyonunun Langmuir izotermi.....	90

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

- 3.5 *P. chrysosporium*'un başlangıç hücre miktarına bağımlı gram taşıyıcıda adsorplanan hücre miktarı.....92
- 3.6 *P. chrysosporium*'un gram taşıyıcıda adsorplanan hücre miktarına inkübasyon süresinin etkisi.....92
- 3.7 *P. chrysosporium* 'un 100 μ M (-□-); 174 μ M (büyüme ortamı) (-♦-); 354 μ M (-■-); 424 μ M (-▲-) aralığında zamana bağımlı MnP aktivite değişimi.....94
- 3.8 *P. chrysosporium* büyüme ortamında %Tween 80 (v/v) miktarına bağımlı MnP aktivite değişimi.....96
- 3.9 *P. chrysosporium* Büyüme ortamında Tween 80 varlığında MnP (-■-) ve kuru kütle (-▲-) miktarının zamana bağımlı değişimi..... 97
- 3.10 Serbest (-●-) ve immobilize (-■-) hücreler tarafından ortam azot konsantrasyonuna bağımlı MnP üretimi.....100
- 3.11 Serbest (-●-) ve immobilize (-■-) hücreler tarafından ortam gliserin konsantrasyonuna bağımlı MnP üretimi.....101
- 3.12 Serbest (-●-) ve immobilize (-■-) hücrelerde sıcaklığa bağımlı MnP üretimi.....102
- 3.13 Serbest (-●-) ve immobilize (-■-) hücreler tarafından ortam pH'sına bağımlı MnP üretimi.....103
- 3.14 Serbest hücre büyüme eğrisi. (-■-), MnP aktivitesi; (-●-) kuru kütle.....104
- 3.15 Modifiye daldırmalı biyoreaktör.....105

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.16 İmmobilize <i>P.chrysosporium</i> tarafından modifiye daldırmalı biyoreaktörde zamana bağımlı glukoz (-■-) ve azot (-▲-) tüketimi ve pH (-●-) değişimi.....	106
3.17 İmmobilize <i>P.chrysosporium</i> tarafından modifiye daldırmalı biyoreaktörde zamana bağımlı MnP aktivitesi (-■-) ve biyokütle (-●-) değişimi.....	107
3.18 Modifiye daldırmalı biyoreaktörde glukoz konsantrasyonuna bağımlı biyokütle üretimi.....	110
3.19 Modifiye daldırmalı biyoreaktörde substrat tüketimine bağımlı enzim üretimi.....	111
3.20 Modifiye daldırmalı biyoreaktörde glukoz konsantrasyonuna bağımlı spesifik büyüme hızı.....	111
3.21 İmmobilize <i>P.chrysosporium</i> tarafından daldırmalı tip biyoreaktörde zamana bağımlı MnP üretimi.....	112
3.22 İmmobilize <i>P.chrysosporium</i> tarafından daldırmalı tip biyoreaktörde zamana bağımlı Glukoz (-■-) ve Azot (-●-) miktarları değişimleri.....	113
3.23 % (NH ₄) ₂ SO ₄ konsantrasyonuna bağımlı MnP aktivite değişimi..	115
3.24 Değişen metanol ve etanol oranlarına bağımlı MnP aktivite değişimi.....	116
3.25 Değişen % PEG-2000 (-■-) ve -5000 (-▲-) değerlerine bağımlı MnP aktivite değişimi.....	117
3.26 DEAE-Sefaroz anyon değiştirici kolon kromatografisi. Protein absorpsiyonu (-o-) ve MnP aktivite (-●-) değişimleri.....	118
3.27 MnP enziminin Ultragel AcA 54 jel filtrasyon kolon kromatografisi. Protein absorpsiyonu (-o-) ve MnP aktivite (-●-) değişimleri	119

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.28 <i>P.chrysosporium</i> dan izole edilen MnP enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi. (I). Protein standartları, (II) Reaktörden alınan ham ekstrasellüler sıvı, (III) Anyon değiştirici kolon kromatografisi sonrası enzim,(IV) Jel filtrasyon kolon kromatografisi sonrası enzim.....	122
3.29 pH'a bağımlı MnP aktivite değişimleri.....	125
3.30 Sıcaklığa bağımlı MnP aktivite değişimleri.....	126
3.31 Sabit 2,6-dimetoksifenol konsantrasyonunda değişen H ₂ O ₂ konsantrasyonuna bağımlı Lineweaver-Burk diyagramı.....	127
3.32 Sabit H ₂ O ₂ konsantrasyonu varlığında değişen 2,6-DMP konsantrasyonuna bağımlı Lineweaver-Burk diyagramı.....	127
3.33 pH 4,5'da 1 saatlik inkübasyon sıcaklığına bağlı olarak enzimin koruduğu aktivite değerleri.....	128
3.34 25°C de 1 saatlik inkübasyon pH'sına bağımlı koruduğu MnP aktivite değerleri.....	129
3.35 MnP enzim aktivitesi üzerine iyon şiddetin etkisi: tartarat, pH 4,5 (-●-) ; fosfat pH 6,0 (-▲-) ve klorür, pH 4,5 (-■-).....	133
3.36 25°C ve pH 4,5'da inkübasyon süresine bağımlı olarak MnP aktivitesine bazı maddelerin etkisi.....	134
3.37 MnP ile bazı azo boyaların enzimatik dekolorizasyonu.....	136

ÇİZELGELER DİZİNİ

Cizelge

Sayfa

1.1	Hücre immobilizasyonunda kullanılan organik taşıyıcılar.....	42
1.2	Kesikli sisteme göre farklı reaktör tiplerinde ligninolitik enzimlerin üretimi.....	56
1.3	Sürekli sisteme göre farklı reaktör tiplerinde ligninolitik enzimlerin üretimi.....	57
2.1	<i>P. chrysosporium</i> 'un sporilasyon ortamı.....	60
2.2	<i>P. chrysosporium</i> 'un büyüme ortamı.....	61
2.3	MnP enzim aktivitesi tayin yöntemi.....	63
2.4	Bradford yöntemi.....	64
2.5	Proteaz aktivite tayini.....	65
2.6	Glukoz tayini.....	66
2.7	Azot tayini.....	67
2.8	Karbohidrat tayini.....	69
2.9	SDS-PAGE örnek tampon birimleri.....	79
2.10	SDS-PAGE jel bileşenleri ve miktarı.....	80
3.1	<i>P. chrysosporium</i> immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılar ve % adsorplanan hücre miktarı.....	84
3.2	<i>P. chrysosporium</i> 'un adsorplanan hücre miktarına (%) çalkalama hızının etkisi.....	87
3.3	Deneyisel sonuçlardan elde edilen adsorpsiyon kinetik değerleri.....	88
3.3	<i>P. chrysosporium</i> 'un gr taşıyıcıda % adsorplanan hücre miktarı (1 dk homojenize edilen misel kullanılarak).....	91
3.4	Modifiye daldırmalı biyoreaktörde başlangıç glukoz konsantrasyonuna bağımlı inkübasyon süresince maksimum MnP üretimi, enzim üretim ve glukoz tüketim hızı.....	109

ÇİZELGELER DİZİNİ

Cizelge

Sayfa

3.6	İmmobilize <i>P. chrysosporium</i> 'dan MnP'ın Saflaştırma Basamakları.....	120
3.7	Modifiye daldırmalı biyoreaktörde immobilize <i>P.chrysosporium</i> 'danMnP'ınSaflaştırma Basamakları.....	120
3.8	2,2 mM konsantrasyonundaki farklı substratların Mn^{+2} varlığında ve yokluğundaki % Bağlı MnP aktiviteleri a) tartarat tamponunda, pH 4,5 b) asetat tamponunda, pH 4,5.....	123
3.9	Ticari MnP üzerine bazı karboksilik asitlerin etkisi.....	124
3.10	Ticari MnP üzerine bazı metallerin etkisi.....	124
3.10	1 mM konsantrasyonundaki karboksilik asitlerin <i>P.chrysosporium</i> MnP aktivitesi üzerine etkisi.....	130
3.11	1 mM konsantrasyonundaki metallerin <i>P.chrysosporium</i> MnP aktivitesi üzerine etkisi.....	132

KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
MnP	Mangan Peroksidaz
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
HRP	Turp peroksidazı
A	Absorbans
mg	Miligram
μ g	Mikrogram
ml	Mililitre
μ l	Mikrolitre
dk	Dakika
nm	Nanometre
BSA	sığır serum albumini
TEMED	N,N,N',N'- tetrametilendiamin
APS	Amonyum persülfat
DTT	Ditiyotreitol
PMSF	Fenilmetil sülfanilflorür
V_{max}	Maksimum hız
K_m	Michaelis Menten sabiti
rG	Glukoz tüketim hızı
$rMnP$	MnP üretim hızı
rN	Azot tüketim hızı
Cys	Sistein
Ser	Serin

1. GİRİŞ

Fungusların, geleneksel fungal biyoteknolojiyi kullanan fermentasyon endüstrisi dışında sanayide kullanımları giderek artmaktadır. Fermentasyon sanayi, kuşkusuz biyoteknolojide, fungusların en büyük ve ekonomik açıdan en önemli kullanım alanlarını oluşturmaktadır. Bununla birlikte, son yıllarda fungal aktivite ve metabolizmanın yeni endüstriyel uygulamalarına yönelik gelişmeler her geçen gün artmaktadır. Bu gelişmelerin pek çoğu laboratuvar veya pilot tesislerde gerçekleştirilmektedir. Bunların bazıları hiç kuşkusuz başlangıçta ekonomik açıdan bir değer teşkil etmemekle beraber oldukça umut vericidir. Beyaz çürükçül funguslar ise ürettikleri çok geniş substrat spesifikliğine sahip ligninolitik enzimleri nedeni ile endüstriyel ve ticari uygulamalar açısından en çok ilgi çeken funguslardandır.

Ligninolitik enzimlerin üretimi kültivasyon koşullarından oldukça etkilenir. Özellikle karıştırma ve çalkalama hareketleri, organizma tarafından bu enzimlerin üretimini olumsuz yönde etkilemektedir. Bu nedenle, ligninolitik enzim üretimi durağan kültürlerde gerçekleştirilir. Lignini yıkabilen bu enzimler, çeşitli aromatik, fenolik ve fenolik olmayan bileşikleri parçalama de özelliğindedir.

Bu tez çalışmasında; hücre dışı ligninolitik bir enzim olan mangan peroksidaz (MnP)'ın, immobilize *Phanerochaete chrysosporium*'dan yüksek aktivite ile ekonomik bir şekilde üretimi, izolasyonu, saflaştırılması ve karakterizasyonu amaçlanmıştır.

1.1 Ligninin Yapısı ve Özellikleri

Bitki hücreleri, yapısal olarak selüloz içeren hücre duvarlarına sahiptir. Bitki büyürken hücre duvarları selüloz, hemiselüloz ve lignoselülozun birikmesiyle kalınlaşmaya başlar. Lignoselüloz, karbon içeriği açısından zengin olup karbon: azot oranı 500:1 dir (Eriksson et al.,

1993). Monomerik birimi glukozun β -(1-4) bağıyla bağlanması ile meydana gelen selüloz, olgun bitki hücre duvarının yaklaşık % 40-50'sini oluşturan en önemli bitki polimeridir. Selüloz molekülü, rastgele (amorf selüloz) veya sıkı yapıdaki mikrofibrillerin yaklaşık 3000 glukoz birimli düz zincirinden meydana gelir. Selüloz yıkımı, fungusların endo β -glukanaz ve β -glukozidaz enzimleri ile gerçekleştirilir. Endoglukanazlar, selüloz zincirlerini dimer sellobioz ve trimer sellotrioz gibi daha küçük birimlere hidrolizler. Ardından sellobioz, β -glukozidaz tarafından parçalanır ve glukoz, karbon kaynağı olarak hücre alım için hazır hale gelir. Selülozun yıkımı ise, ekzo- β -glukanaz tarafından iki şeker biriminin (sellobioz) parçalanmasıyla gerçekleştirilir. Selülozun yıkımı, yeryüzündeki karbon döngüsü bakımından önemlidir. *Chaetomium*, *Fusarium* ve *Myrothecium* türleri, en etkili sellüolitik funguslardır (Carlile and Watkinson, 1994).

Lignin, yeryüzünde doğal polimer olarak selülozdan sonra ikinci sırada yer alır. Ancak selüloza göre, yıkıma daha dirençlidir ve parçalanması daha zordur. Lignin'in; oldukça stabil karbon-karbon moleküller arası bağları ve inert eter bağlarının bulunması nedeniyle, selüloz ve hemiselüloz ile birlikte, odunsu bitkilerde hücre duvarlarına sağlamlık verir, hücreleri mekanik hasar ve mikrobiyal etkilerden korurlar. Bitkilerin kuru ağırlıklarının %10-35'i ligninden meydana gelir. Her bitki, formülü her zaman bilinmeyen kendine özgü bir lignin yapısına sahiptir. Lignin; kompleks, üç boyutlu, çeşitli karbon-karbon ve eter bağlarıyla bağlı optikçe inaktif fenil propanoid birimlerinden meydana gelmiş stereo-düzenliliği olmayan yaklaşık molekül ağırlığı 20000 Da olan aromatik yapıda bir biyopolimerdir. Lignin metabolizması, biyosferdeki karbon çevriminde hız sınırlayıcı bir adımdır ve doğada önemli yer tutar (Elisashvili,1993).

Lignin genelde bitki sekonder hücre duvarlarında bulunurken bitki hücreleriyle birlikte lignin segmentlerinin bulunduğu orta lamellerde (hücreler arası bölgelerde) yüksek konsantrasyonlarda yer alır. Böylece lignin, bitkiye sertlik ve sağlamlık kazandırır. Lignin polimeri, bitkilerin

selülozik mikrofibrillerinin üstünde mikrobiyal yıkıma dirençlilik sağlayan polisakkaritleri oluşturarak hemiselülozlara kimyasal olarak bağlanma eğilimindedir (Sarkanen and Ludwig, 1971; Higuchi, 1990).

Lignin sentezi, bitkinin ve dokunun tipine bağlı olarak nispeten farklı oranlardaki p-kumaril alkol, koniferil alkol ve sinapil alkol gibi fenil propanoik öncülerin rastgele oksidatif polimerizasyonundan meydana gelir. Bu lignin alt yapıları; sırasıyla p-kumaril, guaykil (guaiacyl) ve şiringil çekirdekler olarak adlandırılırlar. Bu çekirdeklerin ve çeşitli moleküller arası bağların bulunma oranları, bitkiler arasında da farklılık gösterir ve ligninlerin kaynaklarına göre farklılaşmasına neden olur. Üç tip odunsu yapı lignini bilinmektedir:

Yumuşak odunsu yapı (gymnosperm) lignini; başlıca koniferil alkol, biraz p-kumaril alkol den meydana gelirken sinapil alkol içermez.

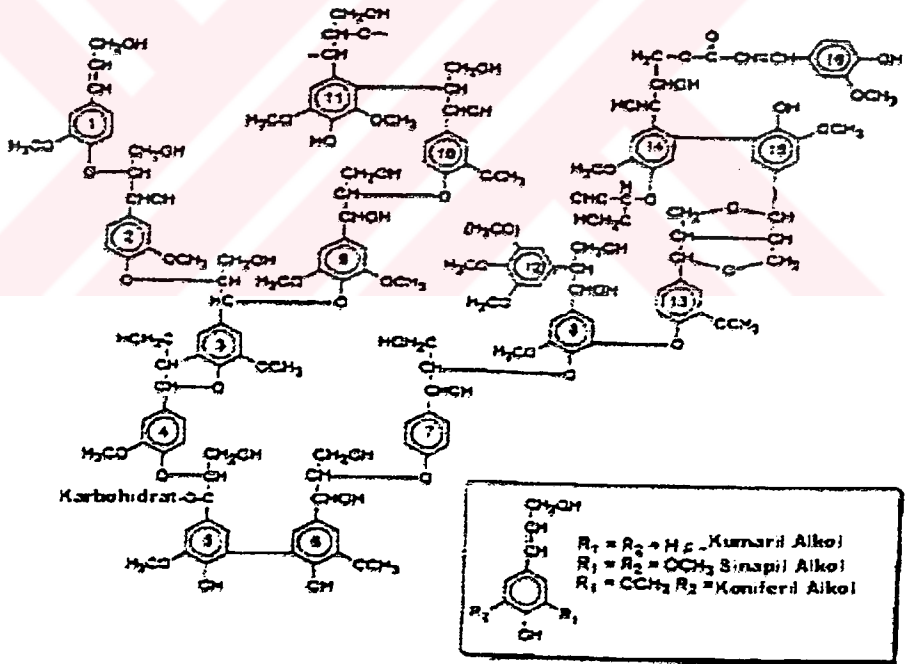
Sert odunsu yapı (angiosperm) lignini; yaklaşık eşit miktarlarda koniferil ve sinapil alkollerden oluşan guaykil-şiringil lignin içermektedir. Bu tür ligninler, her fenil propan birimi başına 1,2-1,5 metoksi grubu içerirler.

Çim ve bambu ligninleri; p-kumaril alkol, koniferil alkol ve sinapil alkolden meydana gelmektedir (Eriksson et al., 1993).

Bitki hücre duvarı peroksidazları veya lakkazlar tarafından başlatılan bu alkollerin serbest radikal kondensasyonu (Harkin and Obst, 1973); birçok farklı bağın bulunduğu heterojen, amorf, optik olarak inaktif, rastgele, oldukça dallanmış üç-boyutlu polimerin oluşumuyla sonuçlanır. Şekil 1 de angiosperm ligninin şematik yapısal formülü gösterilmektedir (Kirk and

Farrel, 1987). Lignindeki önemli fonksiyonel gruplar; fenolik, hidroksil, benzilik hidroksil ve karbonil gruplarıdır.

Şematik gösterimler sadece büyük bağlantıları (<%50) vermektedir. Bu bağlar β -O-4 tipi olup, şekilde 1 ve 2, 2 ve 3, 4 ve 5, 6 ve 7, 3 ve 9, 9 ve 10 numaralı birimler arasında görülmektedir. Polimerizasyon prosesinde sekonder reaksiyonlar lignin ve hemiselülozlar arasında çapraz bağlanmalara yol açar. Ayrıca çimler ve bazı odunsu yapıli ligninlerin yan zincirlerindeki hidroksil gruplarından aromatik veya sinnamik asitler ile esterleşmişlerdir.



Şekil 1.1 Ligninin şematik yapısal formülü

1.2 Lignin Biyo-yıkımı

1.2.1 Doğada lignin yıkımı

Selülozlar ve ligninler, mikroorganizmalar tarafından yıkıma uğratılan ölü bitki artıklarının büyük bir kısmını oluştururlar. Bu yıkım olayı, ekolojide büyük önem taşır. Kısmen degradasyona uğrayan lignin ve selüloz, toprakta humus olarak birikir ve uygun koşullar altında yer tezeği miktarının artışına neden olur. Bu oluşum, uzun yıllar sonra linyit ve maden kömürüne dönüşür.

Aromatik bir biyopolimer olan lignin, uzaydaki üç boyutlu düzensiz yapılarından ve rastgele düzenlenen bağlarından dolayı, pek çok organizma tarafından yıkıma dirençlidir. Ligninin yapısal özellikleri başlangıç saldırıdan sorumlu biyodegradatif sistemler üzerine alışıl gelmişin dışında sınırlamalar getirir.

Ligninin yapısal özelliklerinden dolayı biyo-yıkımı gerçekleştiren sistemler; hücre-dışı olmalı, spesifik ve hidrolitik olmamalıdır. Ligninin hidrolize olamaması, heterojen olması ve moleküler yapısının kompleksliği, başlangıç tepkimenin oksidatif olduğunu ve spesifik olmadığını ve ayrıca hücre dışı sistem tarafından gerçekleştiğinin göstergesidir.

Lignin yıkımı, iki mekanizmayla gerçekleşir :

1-Molekülün daha basit alt birimlerine parçalanması,

2-Çift bağlar ve yan zincirlerin, *in situ* olarak parçalanması,

Lignin yıkımının ilk aşamasında; vanilik asit ve koniferaldehit gibi bileşiklerin oluşması, yıkımın ilk mekanizmaya göre gerçekleştiğini gösterir. *In situ* halka parçalanmasında ise lignin yıkımı, demetilasyon ile iki komşu hidroksil grubuna sahip Difenolik asitleri oluşturarak başlar. Ardından

dioksigenaz enzimleri tarafından halkalar açılır ve lignine bağlı alifatik zincir oluşturulur. Bu alifatik zincirler daha sonra, lakkaz gibi oksigenaz enzimleri tarafından yıkıma uğrattılır. Lignin yıkım hızı, ortamdaki kullanılabilir azotun niteliğine ve niceliğine de bağlıdır. Lignin yıkımının asıl özelliği, oldukça oksidatif bir proses olmasıdır. Bundan dolayı “enzimatik yanma” olarak adlandırılır (Kirk and Farrell, 1987).

Çürükçül Funguslar

Çürükçül funguslar; odunsu yapıdaki selüloz ve lignini yıkıma uğratabilirler. Ancak hemiselüloz, selüloz ve lignin için farklı yıkım hızlarına sahiptirler. Bu funguslar odunsu yapıdaki selüloz, hemiselüloz ve lignine etki tarzlarına yani substrat kullanımlarındaki makroskopik farklılıklarına göre sınıflandırılırlar:

Kahverengi Çürükçül Funguslar: Bu grubu, genellikle Basidiomycetes’ler (*Armillariella mellea*, *Laccaria laccate*, *Merulius lacrymans*, *Lentinus*, *Poria* vb.) oluşturur. Lümene girerek, polioksidazları salgılar ve hücre çeperlerini parçalarlar. Selüloz, hemiselülozu etkin olarak yıkıma uğrattırlarken, lignini kısmen parçalayarak kahverengi bir atık oluştururlar. Özellikle konifer substratları (gymnosperm) tercih ederler. Fungus hifinden salıverilen sellülaz enzimleri, hif üzerinden selülozu yıkıma uğrattır ve odunsu yapı içine serbestçe difüzlenirler. Kahverengi çürükçüllerin etkisi, odunsu yapının dayanıklılığını zayıflatmaktır. Bu tip çürükçüllerle muamele edilen ligninin metoksi içeriği azalır (Kirk and Adler, 1970; Kirk, 1975) ve önemli miktarda fenolik hidroksil grupları yapı içine sokulur (Kirk, 1975; Crawford, 1981; Jin et al., 1990). Koyu

kahverenk, modifiye ligninde karbonil gruplarının konjuge olması ve buna ilaveten kinonların oluşmasıyla meydana gelir (Kirk, 1975).

Yumuşak Çürükçül Funguslar : Toprak ile temas halindeki yüzey tabakalarındaki selülozu yıkıma uğratarak nemli odunsu yapıya atak yaparlar ve bu saldırı, odunsu yapı yüzeyinin yumuşamasıyla sonuçlanır (Blanchette, 1991). Fakat ligninin parçalanması, sadece hiflerin çevresiyle sınırlı kalır. Lignin yapısıyla ilişkili fenolik bileşikler mineralize etme yeteneğine sahip yumuşak çürükçül fungusların pek çoğu Ascomycetes ve Deuteromycetes grubuna aittir (Ander et al., 1984; Ander et al., 1988). Yumuşak çürükçül funguslardan *Chaetomium* ve *Fusarium* türleri, genelde toprakta bulunurlar (Carlile and Watkinson, 1994).

Beyaz Çürükçül Funguslar: Basidiomycetes grubuna ait *Stereum*, *Coriolus*, *Fomes*, *Collybia*, *Clitocybe*, *Marasmius* vb. türleri; selüloz, hemiselüloz ve lignini aynı anda parçalamaktadırlar. Odunsu yapı; lifli, beyaz, dayanıksız bir hale dönüşür. Bazı suşlar; lignini selülozdan seçimli bir şekilde ayırabilme özelliğindedir. Şimdiye kadar 500 den fazla beyaz-çürükçül suşu belirlenmiştir. Beyaz çürükçül funguslar, en etkili ligninolitik mikroorganizmalardır ve genelde angiospermilerin sert odunu üzerinde etkindirler.

Lignini yıkabilen funguslardan özellikle beyaz çürükçüller, çeşitli biyoteknolojik uygulama alanlarında kullanılmaktadırlar. Lignin gibi organik moleküllere etki eden, spesifikliği düşük olan çeşitli ligninolitik enzimleri üretirler. Bu enzimler, ligninleri yıkıma uğratmada doğal ekosistemlerde kullanılmalarına rağmen pestisidler, trinitrotoluen atıklarını içeren atık-sular, kağıt hamuru endüstrisinin klorlanmış lignin atıkları gibi kompleks-fenol

bileşiklerini parçalamak üzere de biyoteknolojide yaygın kullanım alanı bulmaktadırlar (Marton et al. 1969).

Beyaz Çürükçül Fungusların Başlıca Uygulamaları

Mikrobiyal Delignifikasyon

Kimyasal kağıt hamuru proseslerinden Kraft prosesinde; lignin çözülür ve (Kirkpatrick et al.,1990) lignin, selüloz ve hemiselüloz gibi üç ana bileşenden meydana gelen odunsu yapı, bileşenlerine kadar ayrılır. Bu prosesde odunsu yapı, sodyum sülfid ve sodyum hidroksit ile pişirilir; böylece ligninin çoğu çözünür, karakteristik siyah renk giderilir. Alkali ekstraksiyonu takiben klorlama, renkli kraft hamurunda kalan ligninin büyük çoğunluğunu da etkin olarak uzaklaştırmaktadır. Ancak, bu süreç de klorürlerin bazıları nehirlerle boşaltıldığında lignine bağlı yeni klorlanmış organik bileşikler oluşturarak büyük çevre problemine neden olurlar. Kraft proses ile oluşan ksenobiyotikler, biyoteknologları alternatif kimyasal ağartma yöntemlerine yönlendirmektedir (Rossi and Erlich, 1990).

Çürükçül fungus *Trametes (Coriolus) versicolor*'un yardımıyla klorlama yapılmaksızın kağıt hamuru parlaklığı, % 2 oranında artırılabilir (Reid et al., 1990). Yumuşak odun hamurlarının ağartılması, sert odun hamurlarına göre daha zordur ancak bu hamurlar da fungusları içeren biyolojik proseslerle ağartılabilir.

Mikrobiyal delignifikasyon, özellikle kağıt yapımı için odun hamuru üretiminde uygulanmaktadır ve sellüloolitik aktiviteleri yok edilmiş mutant lignin-degrade edici funguslar kullanılarak mekanik hamurlaşma için enerji gereksinimini de azaltmak mümkündür.

Mikrobiyal Biyoremediasyon

Odunsu yapının çürümesine neden olan funguslar, kağıt hamuru likörlerinin köpürmemesi ve renksizleştirilmesinde de kullanılmaktadırlar. Bu likörlerde lignin ve türevleri, yaygın olarak bulunur ve siyaha yakın kahverengi bir renk oluşmasına ve göze hoş görünmeyen kirlilik problemine yol açarlar. Kraft siyah likörün renksizleştirilmesi, *Trametes versicolor* gibi bir çok fungus ve *Aspergillus* sp. gibi çürükçül olmayan funguslar tarafından gerçekleştirilir. Renksizleştirme, genellikle miselyum yüzeyinde oluşan renkliliğin adsorbsiyonuyla gerçekleşir. Örneğin; *Tinctoporia borbonica*, atık pigmenti % 70 oranında renksizleştirmektedir. Ortama şekerler ilave edildiğinde bu oran % 99 a ulaşmaktadır. Bu renksizleştirme olayı, sadece yüzey adsorbsiyonuyla değil oksiligninin delignifikasyonu ve kısmi indirgenmesiyle gerçekleşmektedir (Bergbauer et al., 1991).

Bitki atıklarındaki klorlanmış lignin türevleri de beyaz çürükçül fungus *Trametes versicolor* tarafından yıkıma uğratılır. Ko-substrat olarak glukoz ilavesinde 3 günlük inkübasyon sonunda yaklaşık % 90 renk açılması gerçekleştirilebilir. Benzer şekilde; ortamdaki kloro-organik bileşiklerin konsantrasyonu, yaklaşık % 45 oranında azaltılabilir. Bu tip atık sıvılardan etkili renk giderilmesi, kalsiyum aljinat boncuklarında bu fungusun immobilize edilmesiyle gerçekleştirilmiştir (Bergbauer et al., 1991).

Zararlı atıkların biyoremediasyonunda beyaz çürükçül fungusların kullanım avantajları aşağıda sunulmuştur;

- Ağaç ve tarımsal atıklar gibi ucuz substratlar üzerinde büyüebilmeleri,

- Uygun sistemlerle, sıvı atıkların ve toprağın arıtılmasında kullanılabilmesi,
- Uygun bir taşıyıcıda immobilize edildikten sonra da kullanılabilir olmalarıdır.

Kağıt Hamurunun Mikrobiyal Ağartılması

Funguslar, biyo-mekanik kağıt hamuru yapımı olarak adlandırılan kağıt-yapımı endüstrisinde de kullanılabilir (Jurasek and Paice, 1988; Setliff et al., 1990). Beyaz çürükçül funguslarla odunsu yapıların biyolojik ön muamelesi; enerji kullanımını azaltmasının yanı sıra liflerin birbirine bağlanmasını da sağlar. Ayrıca, günümüzde kullanılan fiziko-kimyasal yöntemlere kıyasla çevre daha az zarar verme eğilimindedirler. Biyolojik ön-muamele, kağıt dayanıklılığını ve parlaklığını da arttırmaktadır. Kağıt endüstrisinde bir fungusun kullanılabilmesi için aranan en önemli özellik, lignini yıkıma uğratma yeteneğidir (Reid, 1985).

Beyaz çürükçül funguslar, kağıt hamurunun selüloz içeriğini etkilemeksizin odunsu yapıdaki lignin miktarının azaltılmasında kullanılmaktadırlar. Delignifikasyonun tamamen gerçekleşmesi zorunlu değildir. Hatta, küçük miktardaki delignifikasyon, mekanik kağıt hamuru hazırlamak için odunsu yapıyı daha yumuşak hale getirir. Böylece, prosede daha az enerji kullanılır ve kağıt hamurunun kağıt-yapım kalitesi de artırılır.

Phanerochaete chrysosporium

Daha önceleri *Chrysosporium lignorum* ve *Sporotrichum pulverulentum* olarak bilinen *Phanerochaete chrysosporium*, Basidiomisetlerin bir üyesidir (Burdsall and Eslyn, 1974). *P.chrysosporium*, beyaz çürükçül fungus olarak hem sıvı atıklar hem de topraktaki ksenobiyotikleri yıkıma uğratabilen düşük spesifiklikteki ligninolitik enzimleri üretme yeteneğindedir.

P.chrysosporium, lignin yıkımına katılan çeşitli peroksidazları/ligninazları üretir. Bu enzimler, ligninin aril katyon radikaline bir-elektronlu oksidasyonunu katalizler. Ardından lignin, parçalanır ve benzilik alkol ve aldehidlere oksitlenir. Bu fungusdan izole edilen peroksidazlar da polisiklik aromatik bileşikler, kinonlara oksitler. Örneğin; antrasen, antrokinonlara dönüştürülürken pyren, pyren-1,6-kinon ve pyren-1,8-kinon karışımına çevrilir. *P.chrysosporium*'un lignin biyodegradasyonu için model organizma olarak seçilmesinin nedenleri;

- hem lignini hem de selülozu etkili bir şekilde degrade edebilmesi,
- sıcaklığa toleranslı olması,
- laboratuvarla kolaylıkla büyüyebilmesi,
- genetik manipulasyonlar için zorunlu olan seksüel basidiosporlar ve aseksüel konidiosporları üretebilmesidir (Burdall and Eslyn, 1974; Gold and Cheng, 1978).

P.chrysosporium'un ligninolitik aktivitesi, besin karbonu, kükürtü veya azotu tüketildiğinde sekonder metabolik büyüme fazının başlamasıyla tetiklenmektedir ve bu esnada, organizmanın primer büyümesi tamamlanmaktadır. Azot bileşikler tarafından kontrole hassas olan lignin gibi karbon substratlarını degrade eden bir mekanizma vardır. Peroksidazlar, enzim sentezinin baskılanmasından ziyade besin sınırlamasına tepki olarak üretilirler. Böylece; beyaz çürükçül funguslar, kimyasal ksenobiyotikleri yıkıma uğratmadan önce bir adaptasyon periyoduna ihtiyaç duymazlar. Fungus, toprağa atılan lignoselüloz atıklar üzerinde de büyüyebilir. Düşük miktarlarda azot içermelerine rağmen diğer tüm besinlere sahip odun parçaları (çerçöp) gibi atıklar, ideal besin kaynaklarıdır (Aust, 1990; Bumpus et al, 1985). *P.chrysosporium*'un ligninolitik sistemi, ligninin yıkımı sonucu oluşan düşük molekül ağırlıklı, çözünebilir bileşikler tarafından indüklenmektedir.

P.chrysosporium'un ligninolitik sisteminin özelliği; ligninin CO₂ e yoğun dönüşümünün, sadece durağan faz kültürasyon koşullarında meydana gelmesidir; kültürün karıştırılması, fungusun iyi büyümesini ve selüloz degradasyonunu sağlar, ancak lignin yıkımını baskılar. Baskılama olayı, pellet oluşumunun bir sonucu olabilir. Çünkü pelletler içindeki sınırlı oksijen miktarı, oksidatif bir işlem olan lignin metabolizmasını inhibe etmektedir. Lignin yıkım hızı ve derecesi, ortamdaki oksijen konsantrasyonuna da bağlıdır. *P.chrysosporium*'un % 100 O₂ atmosferinde büyüme sürecinde ligninin CO₂ e metabolize olan miktarı, hava oksijenindeki büyümesine göre 2-3 kat daha yüksektir. % 5 O₂ varlığında ise lignin yıkımı gerçekleşmemektedir.

P.chrysosporium ligninolitik kültürleri; DDT (1,1,1-trikloro-2,2-bis-(4-klorofenil)etan), lindan (1,2,3,4,5,6-hekzaklorosikloheksan, 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin) ve benzo(a)piren gibi yıkıma dirençli organik ksenobiyotikler mineralize etme kapasitesindedir (Bumpus et al.,1985). Bu fungus tarafından, PCB (poliklorlanmış bifeniller) gibi kompleks karışımlar, TNT (2,4,6-trinitrotoluen) gibi savaş gereçleri (Fernando et al., 1990) ve CCl₄ gibi alifatik hidrokarbonların yıkımı gerçekleştirilmektedir (Khindaria et al., 1995) ve TNT imalatında oluşan pembe renkli sıvı atığın arıtılmasında da kullanılmaktadır. Bu prosesinde; TNT konsantrasyonu, 24 saat içinde 90 µg/ml den sıfıra indirgenmektedir. Yüksek molekül ağırlıklı ksenobiyotiklerin yıkımı, geleneksel yöntemlerle gerçekleştirilemez ve bu bileşiklerin ekosistemdeki son konsantrasyonları da genellikle bilinmemektedir. Bununla birlikte; *P.chrysosporium* kağıt hamuru atık sularında bulunan organik klorürlerin yaklaşık % 70 ini, 48 saatten daha kısa sürede uzaklaştırabilmektedir (Bumpus, 1989).

Zararlı atıklar ve ksenobiyotiklerin yıkım işleminde; *P.chrysosporium* içeren reaktör sistemleri kullanıldığında biyo-yıkım hızının, immobilize fungus ile reaktör ortamında 40-kat arttığı gösterilmektedir (Lewandowski et al., 1990).

1.2.2 Ligninolitik enzimlerin moleküler biyolojisi

P.chrysosporium ligninolitik sisteminin moleküler genetik yapısıyla ilgili standart prosedürler; okzotrof (auxotroph) üretimi, rekombinasyon analizi (Alic and Gold, 1985) ve hızlı DNA ve RNA saflaştırmasıdır (Haylock et al. 1985). *P.chrysosporium*'un moleküler yapısı da araştırılmaktadır (Alic and Gold, 1991; Pease and Tien, 1991; Cullen and Kersten, 1992; Gold and Alic, 1993).

P.chrysosporium transformasyon sistemleri geliştirilmekte ve amino glikozid antibiyotiği olan G415 e dirençli transformasyon rapor edilmektedir (Randall et al.,1989). Direnç sistemi, *P.chrysosporium* ME446 endojen plazmidyle Kan vektörünün rekombinasyonundan meydana gelir. Rekombinant plazmidler, düşük sayıdaki kopyada ekstra-kromozomal olarak muhafaza edilmektedirler (Randall and Reddy, 1991, 1992; Randal et al., 1991).

Tien ve Tu (1987) tarafından ilk olarak LiP H8'i kodlayan cDNA klonlanmasıyla, *P.chrysosporium* peroksidaz genlerinin sayısı, yapısı ve organizasyonu ile ilgili daha çok bilgiye ulaşılmıştır. LiP'ler; 10 gen ailesi (*lipA-lipJ*) ve allelik genleri tarafından kodlanmaktadır. Ancak, allelik akrabalık, tüm klonlar arasında saptanmamıştır (Gaskell et al., 1994).

Bazı klonlarda uç dizininin aynen korunması ve birbirinden çok farklı olmayan izoenzimleri kodlayan allelik formların bulunması (Gaskell et

al., 1991), gen-izoenzim ilişkilerinin tam olarak belirlenmesinde yeterli değildir. Deneysel olarak saptanan izoelektrik noktalar, N-uç dizinim verileri ve transkriptlerin çokluğuna göre *lip A*, *lip D* ve *lip C* genlerinin sırasıyla H8, H2 ve H10 izoenzimlerini kodlaması olasıdır. *lip A* nın kodlaması, heterolog enzim ekspresyonu ile de doğrulanmaktadır (Johnson and Li, 1991). Karbon sınırlı kültürlerden 5 LiP izoenzimi saflaştırıldı ve N-uç amino asit dizinimleri saptandı (Glumoff et al., 1990). Buna göre; pI ları 4,65, 3,85 ve 3,70 olan üç izoenzimin, sırasıyla *lip D*, *lip A* ve *lip B* nin ürünleri olduğu deneysel olarak da belirlendi.

Diğer fungal türlerin peroksidaz genleriyle ilgili nispeten az bilgi vardır. *Phlebia radiata* (Saloheimo et al., 1989), *Trametes versicolor* (Black and Reddy, 1991; Jönsson and Nyman, 1992) ve *Coprinus cinereus* den elde edilen klonların dizinim tayini yapılmıştır. *P.chrysosporium* genlerinin Southern blot hibridizasyonuna göre LiPe benzeyen dizinimler, *Bjerkandera adusta*, *Coriolus versicolor*, *Fomes lignosus* (Huopinen et al., 1990), *Ceriporiopsis subvermispora* ve *Phlebia brevispora* (Ruttiman et al., 1992) genlerinde de saptanmıştır.

LiP genleri arasında nükleotid ve amino asit dizinim homolojisi yüksektir. Örneğin; *P. chrysosporium* BKM-1767 nin *lip A* ve *lip I* genleri, % 97 özdeş olan proteinleri kodlar (Schalch et al., 1989). Peroksidaz aktivitesi için zorunlu aminoasitler ise aynen mevcuttur. Ayrıca *lip A* geni, bir propeptid özelliği gösterir (Schalch et al., 1989). Benzer dizinim, suş OGC101 geninde de saptanmakta ve pro-enzim, *in vitro* transkripsiyon ürünü olarak gösterilmektedir (Ritch et al., 1991). *P.chrysosporium*'un birçok geninde, proline zengin karboksil-uçları bulunmaktadır (Schalch et al., 1989).

LiP'lere göre MnP genlerinin sayısı ve yapısı hakkında daha az bilgi mevcuttur. MnP'ı kodlayan cDNA (Pribnow et al., 1989) ve ilgili genomik klonu (Godfrey et al., 1990), *P.chrysosporium* OGC101 suşundan izole edilmiştir. BKM-1767 den türevlendirilen (MP-1) MnP-cDNAda, karakterize edilmiştir (Pease et al., 1989). Amino asit dizinimi, *lip A* ile %50-60 oranında özdeştir. Allellik varyant MP-1 e ilaveten OGC101 (Mayfield et al., 1994) ve BKM-1767 (Orth et al., 1994) suşlarından yeni, klonlarda izole edilmiştir. MnP genlerinin toplam sayısı ve izoenzimlerin N- uç amino asit dizinimi (Datta et al., 1991; Pease and Tien, 1992), *P.chrysosporium* BKM-1767 de eksprese edilen MnP geninin olduğunu göstermektedir. LiP'lerdeki gibi MnPy benzeyen dizinimler, heterolog probolar kullanılarak *C. subvermispora* ve *P. brevispora* genomlarında da saptanmıştır (Ruttiman et al., 1992).

cAMP'nin, *P.chrysosporium* ligninolitik enzim sisteminin düzenlenmesine katıldığı ve bu süreçte ligninolitik kültürlerde hücre içi cAMP düzeyinin arttığı gösterilmektedir (MacDonald et al., 1984,1985). Bununla birlikte; cAMP inhibitörleriyle muamele edilen kültürlerde peroksidaz izoenzimlerinin ve transkriptlerinin azaldığı da rapor edilmektedir (Boominathan and Reddy, 1992).

MnP üretimi, Mn konsantrasyonuna bağımlı olup (Bonnarme and Jeffries, 1990; Brown et al., 1990) Mn tarafından regülasyon, transkripsiyonal düzeydedir (Brown et al., 1990, 1991). Potansiyel transkripsiyonal kontrolü, suş OGC101 den MnP geninin 5'-translate yapılmamış bölgesinde belirlenmiştir (Godfrey et al., 1990; Alic and Gold, 1991). Mn (II) ye ilaveten transkripsiyon, ısı şoku (Brown et al., 1993), hidrojen peroksit, kimyasal stres ve moleküler oksijen (Li et al., 1995)

tarafından indüklenmektedir. C- ve N- sınırlaması yapılan kültürlerde MnP izoenzimlerinin regülasyonlarının farklı olduğu da gösterilmektedir (Pease and Tien, 1992). Ayrıca her izoenzim, Mn konsantrasyonuna karşı farklı tepki göstermektedir (Pease and Tien, 1992). Agarlı ortamda *P.chrysosporium* kolonilerinde MnP transkriptleri lokalize halde saptanmıştır (Moukha et al., 1993).

LiP ve MnP genlerinin farklı regülasyonu, izoenzimlerin farklı fonksiyonlara sahip olmasını da sağlamaktadır. Lignin yıkımında her bir izoenzimin etkileşimi ve rolünün aydınlatılması, kompleks substratlarda spesifik izoenzimlerin belirlenmesini ve saf izoenzimlerin daha ileri düzeyde biyokimyasal karakterizasyonuna gereksinim duymaktadır. İmmünogold işaretli denemeler ile, koloni oluşturulan odunsu yapıda LiP ve MnP belirlenmesine rağmen enzim verimliliği, tamamiyle izoenzim ayrımı için yeterli değildir (Blanchette et al., 1989; Daniel et al., 1990).

Peroksidazların heterolog ekspresyonları da problemlidir. *E. coli*'de nispeten düşük düzeylerde agregatlaşan approtein üretilmektedir. *S. cerevisiae* ekspresyon sistemleri ile hücre içi apoprotein üretmez ya da verim çok düşüktür (Pease and Tien, 1991). *T.reesei*'de *P.radiata* LiP'lerin ekspresyonu, transkripsiyon için yeterli düzeyde değildir (Saloheimo et al., 1989). Peroksidazların heterolog ekspresyonunda; Baculovirüs sistemleri, aktif rekombinant MnP izoenzimi H4 (Pease et al., 1991) ve LiP izoenzimi H8 (Johnson and Li, 1991) üretmede kullanılmaktadır. Verim, nispeten düşük olmasına rağmen, baculovirüs üretimi, sınırlı miktarlarda rekombinant proteine (örn; nokta-spesifik mutajenezis) ihtiyaç duyan denemeler için kullanışlı olabilir. *Aspergillus oryzae*'de aktif *C. cinereus* peroksidazı etkili düzeyde üretildi (Andersen et al., 1992). Baculovirüs sistemi içeren kültürlerle Hem'in ilavesi, ekspresyon verimliliğini arttırmaktadır.

Lakkaz üreten bazidiomisetlerin moleküler genetik yapılarıyla ilgili daha az bilgi vardır. *Coriolus hirsutus* (Kojima et al., 1990) ve *P.radiata* (Saloheimo et al., 1991) nın hem genomik hem de cDNA klonları, dizinimleri gerçekleştirilmektedir. Ortaya çıkan amino asit dizinimleri, benzerdir (% 63) ancak *A.nidulans* ve *Neurospora crassa* bazidiomiset fungusları lakkazlarının ise farklıdır. *C.hirsutus* ve *P.radiata* cDNA ları, sırasıyla *S.cerevisiae* (Kojima et al., 1990) ve *T.reesei* (Saloheimo and Niku-Paavola, 1991) de eksprese edildiğinde aktif, ekstrasellüler enzim elde edilmiştir.

P.chrysosporium peroksidazlarının tersine, gliokzal oksidaz, tek bir gen tarafından kodlanmaktadır (Kersten and Cullen, 1993). Peroksidazlarla koordineli bir şekilde transkripsiyona uğramasına rağmen (Stewart et al., 1992; Kersten and Cullen, 1993) gliokzal oksidaz geni, bilinen tüm *P.chrysosporium* genleriyle ilişkili değildir (Gaskell et al., 1994). Bu enzimi kodlayan cDNA, *A.nidulans*'da tamamiyle aktif hücre dışı proteini de etkili bir şekilde eksprese etmektedir.

1.2.3 Ligninolitik enzimler

Lignin Peroksidaz (LiP) (EC 1.11.1.14 diarilpropan oksijen, hidrojen peroksit oksidoredüktaz); Lignin peroksidaz (LiP) ve mangan peroksidaz (MnP), kompleks aromatik polimer ligninin başlangıç yıkımında çok önemli rol oynarlar. LiP, lignin model bileşiklerin H_2O_2 e bağımlı α -C β bağının parçalanmasını gerçekleştiren ilk enzim olarak keşfedilmiştir ve ardından *in vitro* da metillenmiş ligninin kısmi depolimerizasyonunu katalizlediği gösterilmiştir (Glenn et al.,1983; Tien and Kirk, 1983; Gold et al., 1984; Tien and Kirk, 1984).

P.chrysosporium ve diğer pek çok beyaz- çürükçül funguslarda LiP'in çeşitli izoenzim formları; izoelektrik noktaları (pI) ve Mono-Q anyon değişim kolonundan elüsyon sıralarına göre saptanmıştır (Renganathan et al., 1985; Kirk et al., 1986a; Leisola et al., 1987). Mono-Q anyon değişim kromatografisinde saptanan 10 peroksidaz H1-H10 olarak tanımlanmakta ve bunlardan 6 tanesi H1 (pI 4,7), H2 (pI 4,4), H6(pI 3,7), H7 (pI 3,6), H8 (pI 3,5) ve H10 (pI 3,3); LiP'in karakteristik veratril alkol oksidasyon aktivitesine sahiptir (Farrell et al., 1989). Analitik izoelektrik fokuslamada, LiP aktivitesine sahip 15 protein saptanmıştır (Leisola et al., 1987). Büyüme koşulları (örn; N ve C sınırlı ligninolitik koşullar), enzimin saflaştırma yöntemleri ve depolanması, izoenzimlerini etkilemektedir.

LiP'in izoenzimleri, molekül ağırlıkları 38-46 kDa olan glikoproteinlerdir. Bu enzimler, glikozillenmiş Hem-proteinleridir. H1 izoenzimi hariç tüm LiP izoenzimleri, mannoz 6-fosfat şeklinde N-bağlı karbohidrat kısımlarından fosforillenmektedirler (Kuan and Tien, 1989). N- uç ve genetik analizler, LiP'lerin farklı gen ürünleri olduğunu göstermektedir ve bu farklanma, sadece post-translasyonel modifikasyonlar nedeniyle değildir. Spektroskopik ve fiziksel karakterizasyonlar; LiP'in doğal, yüksek spinli bir demir içerdiğini ve Histidin ile beş- koordinasyonlu bir yapı oluşturduğunu göstermektedir (Kuila et al., 1985; Andersson et al., 1987; Banci et al., 1991). DNA klonlarından elde edilen primer dizinim, turp peroksidazı (HRP) ve sitokrom c peroksidazı (CcP) ile benzerlik göstermektedir.

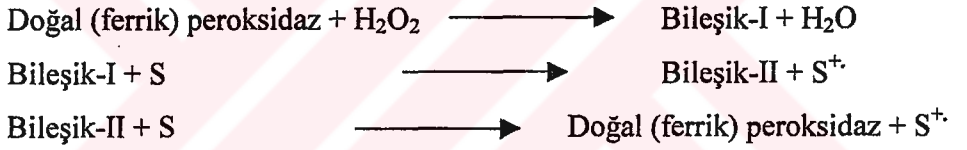


Şekil 1.2 LiP in kristal yapısı

LiP'in kristal yapısı Şekil 1.2 de gösterilmektedir (Edwards et al., 1993; Pointek et al., 1993). En göze çarpan özelliği, sitokrom c peroksidaz (CcP)ın dizinimiyle yaklaşık % 20 lik bir özdeşlik göstermesine rağmen üç-boyutlu yapılarının tamamen benzer olmasıdır. Proksimal (yakın) Hem ligandı olan Histidin, gömülü aspartik asite (Asp) hidrojen bağıyla bağlıdır: peroksit cebi, distal (uzak) histidin (His) ve arginin (Arg) ile de benzerdir. LiP de fenilalanin (Phe) proksimal Hem yüzeyleriyle temas halindedir. Ayrıca LiP Hem propiyanatın Asp 183 e hidrojen bağıyla bağlanması LiP'in düşük pH optimumuna sahip olmasını da açıklayabilmektedir (Edwards et al., 1993). 4 disülfid bağına sahip LiP'de C-ucu, düzenli yayılım göstermeyen sekonder yapılı (276-343 aminoasit kalıntıları) dır.

Lignin peroksidazın katalitik döngüsünde enzim ara-ürünleri, diğer peroksidazlarla analogdur (Andrawis et al., 1988; Harvey et al., 1989; Marquez et al., 1988; Renganathan and Gold, 1986; Tien et al., 1986; Wariishi et al., 1990). H_2O_2 , LiP'in katalizlediği tepkimelerde tercih edilen kosubstrat ve oksidantdır. LiP ile substratlarının etkileşimi, ping-pong

mekanizmasına benzer; H_2O_2 , iki elektron ile ferrik enzimi oksitleyen Bileşik-I ara ürününü oluşturur. Bileşik-II, Bileşik -I in bir elektron ile aromatik substratı oksitlemesiyle oluşur (bir elektron ile oksitlenmiş enzim ara ürünü) ve aromatik substratın tekrar oksitlenmesiyle enzim, temel haline geri döner. LiP'ler, aromatik substratlara karşı benzer özellikler göstermelerine rağmen (Farrel et al., 1989; Glumoff et al., 1990) kinetik özellikleri, H_2O_2 tert-butil hidroperoksit ile yer değiştirdiğinde belirgin bir şekilde değişmektedir (Glumoff et al.,1990). Bileşik-I oluşumu pH'a bağımlı olmamasına rağmen düşük bir pH optimumuna ($pH < 3,0$) sahiptir. Katalitik ara ürünlerin dönüşümünde fenolik olmayan aromatik substrat S ile gösterilirse;



Diğer peroksidaz enzim ara ürünü olan Bileşik-III; ferröz peroksidaz ile oksijen (doğal peroksidaz, bir elektron ile indirgenir), ferrik peroksidaz ile süperoksit ve H_2O_2 ile Bileşik-II nin kompleks oluşturmasıyla meydana gelir. LiP kataliz mekanizmasında; Bileşik-III (LiP Bileşik-III ile H_2O_2 kompleksi), gerçek ara ürün ise de LiP Bileşik-III ün stabilitesi çok düşüktür (Cai and Tien, 1989,1990,1992; Wariishi and Gold, 1990; Wariishi et al., 1990; Wariishi et al., 1992).

LiP, tümü H_2O_2 e bağımlı çeşitli oksidasyon tepkimelerini katalizler. Bu oksidasyon tepkimeleri; lignin ve lignin modellerinin propil yan zincirlerindeki $C\alpha$ - $C\beta$ bağının parçalanması, benzilik metilen gruplarının hidroksilasyonu, benzil alkollerin aldehit ve ketonlarına oksidasyonu, fenol

oksidasyonu ve hatta fenolik olmayan lignin model bileşiklerinin aromatik halka parçalanmasıdır (Tien and Kirk, 1984; Leisola et al., 1985; Renganathan et al., 1985; Umezawa et al., 1986; Umezawa and Higuchi, 1987). LiP, bir elektron ile aromatik substratları oksitlemesiyle oluşan aril katyon radikalleri, substrat yapısına ve tepkime ortamına bağlı olarak bir çok tepkime ile kendiliğinden yıkıma uğratılır. LiP tarafından katalizlenen tepkimelerde metoksibenzen substratlarından katyon radikal ara ürünlerinin üretimi, Elektron Spin Rezonans (ESR) ile saptanmaktadır (Kersten et al., 1985). Lignin yapıları bileşiklerle karbon-merkezli ve peroksil radikal ara ürünlerinin yanı sıra radikal-dimer ürünlerinin belirlenmesine, radikal ara ürünleri de katılmaktadır (Hammel et al., 1986). Lignin model bileşiklerinde yaygın görülen C α -C β bağının parçalanması, C β karbonunun süstitüsyon derecesine bağlı olarak anlaşılabilir (Snook and Hamilton, 1974). Katyon radikallerinin C-C bağının parçalanmasıyla oluşan karbon-merkezli radikal ara ürünlerle O₂ nin tepkimeye girmesi LiP'in oksigenaz etkisinin göstergesidir (Hammel et al., 1985; Renganathan et al., 1986). LiP aktivitesinin, C α lignin-karbohidrat bağını parçalaması da beklenmektedir (Kirk et al., 1986).

LiP, yaklaşık 7,5 eV veya daha düşük iyonlaşma potansiyeline sahip polisiklik aromatik bileşikler oksitlerken turp peroksidazı (HRP), 7,35 eV nin altındaki iyonlaşma potansiyeline sahip polisiklik aromatik bileşikler oksitlemektedir (Cavalieri and Rogan, 1985). Ligninolitik enzimlerin en büyük özellikleri, elektron yoğunlukları azaltılmış daha reaktif Hem aktif merkezlerine sahip olmaları ve yüksek redoks potansiyelli substratları oksitlemeleridir. LiP için Fe⁺³/Fe⁺² çiftinin redoks potansiyeli, yaklaşık -130

mV iken MnP için -90 mV olarak saptanması (Millis et al., 1989) katalitik ara ürünlerin redoks potansiyellerinin, büyük olduğunu göstergesidir.

LiP için etkinliği az olan substratların (örn: anisil alkol) oksidasyonunun artırılmasında; etkinliği yüksek substratların (örn: veratril alkol) katalitik miktarlarının ilavesi etkili olmaktadır (Harvey et al., 1986). Böylece etkinliği yüksek substratlardan oluşan katyon radikal ara ürünleri, etkinliği az olan substratların oksidasyonuna aracılık etmektedir. Ayrıca *P.chrysosporium*'un sekonder bir metaboliti olan veratril alkol, enzimin katalitik döngüsünde peroksidazın korunmasında önemli rol oynar (Shoemaker, 1990). Katyon radikal ara ürünleri ile bu düzenleme, okzalik asit ve H₂O₂ oksidasyonuna da benzer (Akamutsu et al., 1990; Popp et al., 1991). Okzalit, veratril alkol ve Mn⁺² ile LiP katalizi, oksijen tüketimi ve karbon dioksit anyon radikal ve perhidroksil radikallerinin oluşumuyla birlikte gerçekleşir (Popp et al., 1991). Okzalit, LiP Bileşik-III oluşumunu önlemektedir (Goodwin et al., 1994).

LiP ayrıca, fenolik lignin bileşiklerin oksidasyonunu da katalizlemektedir ve lignin depolimerizasyonu ile oluşan fenolik bileşikler, hem ligninin depolimerizasyonu (Tien and Kirk, 1983) hem de *in vitro* da lignin alt birimlerinin yeniden polimerizasyonu nedeniyle ilgi çekmektedir (Haemmerli et al., 1986; Odier et al., 1988). *In vitro* da ham LiP ve H₂O₂ ile sentetik ligninin kısmi depolimerizasyonu da gösterilmiştir (Hammel and Moen, 1991). *In vivo* lignin depolimerizasyonunda, LiP önemli bir etkiye sahiptir (Leisola et al., 1988) ve ekstrasellüler LiP'in misel pelletlere ilavesi, ¹⁴C-ligninin ¹⁴CO₂ e dönüşümünü artırmaktadır.

Lakkaz (Lac) (EC1.10.3.2 Benzendiol:O₂ oksidoredüktaz); Geniş bir substrat spesifikliğine sahip bir fenol oksidazdır. Bir çok beyaz çürükçül

fungusun tersine *P. chrysosporium*, saptanabilir düzeylerde düşük lakkaz aktivitesine sahiptir. Ancak lakkazında ligninolitik enzimler gibi, funguslar tarafından gerçekleştirilen lignin degradasyonunda önemli bir rol oynadığı gösterilmektedir (Kawai et al., 1988, 1989). *Trametes* (*Coriolus* veya *Polyporus*) *versicolor* lakkazı, mavi-bakır oksidazıdır ve fenolik bileşikler, aromatik aminler, askorbat ve metal siyanürlerin oksidasyonu esnasında O_2 nin H_2O ya 4 elektron ile indirgenmesini katalizler (Malmsröm et al., 1975). Bu enzim ile fenolik bileşikler ve fenolik lignin alt birimleri; ya radikallerden tek elektron çekilerek yükseltgenir veya polimerizasyona ya da depolimerizasyona uğratılır. LiP ve MnP gibi, lakkaz tarafından fenolik bileşiklerin oksidasyonu, daha ileri düzeyde enzimatik olmayan tepkimelere girer. Lakkazın molekül ağırlığı; genelde 55-68 kDa aralığında saptanmasına rağmen *Agaricus bisporus*'da 100 kDa molekül ağırlığında bulunmuştur. Lakkaz aktivitesinin optimum pH'sı, 3,5-6,0 aralığında değişir. Lakkaz, diğer mavi-bakır proteinlerine kıyasla özellikle yüksek redoks potansiyelli tip-1 ve tip-3 bakır merkezli 4 bakır atomuna sahiptir (Reinhammer, 1984). *Phlebia radiata* lakkazının aktif merkezinde pirrolokinolin kinon (PQQ) ile birleşmesinde sadece iki bakıra sahip olduğu ileri sürülmektedir (Karhunen et al., 1990b). Bununla birlikte PQQ, *Trametes versicolor* lakkazında saptanmamıştır (Maccarrone et al., 1991). *Rigidopporus lignosus* lakkaz ve MnP ı arasında bir sinerjizm olduğu da ileri sürülmektedir (Galliano et al., 1991).

İlgili Diğer Enzimler

Diğer enzim sistemleri, lignin yıkımında yardımcı ve sekonder rol oynarlar. Bu yıkım prosesi için H_2O_2 i üretirler, depolimerizasyon

ürünlerinin hücre içine taşınmasını, metabolize edilmelerini ve zehirsizleştirilmelerini sağlarlar.

Gliokzal Oksidaz (GLOX); *P.chrysosporium* ligninolitik sistemlerinin önemli bir bileşeni, peroksidatif tepkimelerde oksidant olarak ihtiyaç duyulan H_2O_2 dir. Bu H_2O_2 , standart ligninolitik koşullar altında salgılanan, gliokzal oksidaz tarafından üretilmektedir (Kirk and Farrell, 1987).

Kültürlerdeki gliokzal oksidaz, peroksidaz ve oksidaz substratın birbiriyle geçici korelasyonu, bu bileşenler arasında yakın fizyolojik bir ilişkinin olduğunu göstermektedir (Kersten and Kirk, 1987; Kersten, 1990). GLOX, iki izoenzimi bulunan (pI 4,7 ve 4,9) ve 68 kDa molekül ağırlığında bir glikoproteindir. Enzimin aktif merkezi, tam olarak karakterize edilmemiştir ancak saflaştırılan enzimin aktivitesinde Cu^{+2} nin, önemli rol oynadığı görülmektedir. Gliokzal oksidaz; glukoz veya ksiloz gibi lignoselülozik bileşiklerin ana şeker bileşenlerini içeren *P.chrysosporium* un kültürlerinde üretilir. Bununla birlikte; enzimin fizyolojik substratları, büyümede kullandığı bu karbon bileşikleri değildir. Substratları olarak pek çok basit aldehid-, α -hidroksikarbonil- ve α -dikarbonil bileşikleri, elektron donörü olarak da çeşitli 1-3 karbonlu aldehidleri kullanmaktadır. Gliokzal ve metilgliokzal gibi bazı GLOX substratları, *P.chrysosporium*'un doğal ekstrasellüler metabolitleridir (Kersten, 1990). Lignin ise olası GLOX substratları kaynağıdır. LiP tarafından β -O-4 model bileşiğin (ligninin büyük alt yapısı) oksidasyonu, gliokzal oksidaz için iyi bir substrat olan glikolaldehid açığa çıkarır (Hammel et al., 1994).

GLOX'un dönüşümlü inaktivasyonu, fizyolojik öneme sahiptir (Kersten, 1990; Kurek and Kersten, 1995). Gliokzal oksidaz, eşleşmiş

peroksidaz sistemin yokluğunda katalitik döngü esnasında inaktif hale gelir. Ancak oksidaz, LiP ve fenolik olmayan peroksidaz substratları tarafından yeniden aktive edilebilir. Ancak fenolik substratlar, LiP tarafından gerçekleştirilecek aktivasyonu önlerler. Bu olay oksidazın; peroksidaz, peroksidaz substratları ve peroksidaz ürünlerinden (örn; ligninolizis sonucu oluşan fenolikler) sorumlu düzenleyici bir mekanizmaya sahip olduğunu göstermektedir.

Sellobiyoz oksidaz, sellobiyoz:kinon oksidoredüktaz (CBQaz) (EC 1.1.3.25 sellobiyoz: oksijen 1-oksidoredüktaz) (Ayers et al., 1978; Westermarck and Eriksson, 1974), hem lignin hem de selüloz degradasyonuna katılmaktadır. Sellobiyoz oksidazın sınırlı proteolizisi; CBQ az'ın olası bir parçalanma ürünü olduğunu göstermektedir (Henriksson et al., 1991; Wood and Wood, 1992). Sellobiyoz oksidaz, biri flavin diğeri Hem içeren iki domaine sahiptir. Flavin içeren domain, selülozu bağlar ve CBQaz ile benzer fonksiyona sahiptir. Bu oksidoredüktazların fonksiyonları, lignin oksidasyonunda peroksidazlar ve lakkazlar tarafından üretilen fenoksi-radikallerinin yeniden-polimerleşmesini önlemektir (Eriksson et al., 1993). Bu enzimlerin, sitokromlar ile elektron-transfer tepkimeleri (Rogers et al., 1994), kinon indirgenmesi, mangan oksit çözünürleştirilmesi ve Mn^{+3} şelatlanmasında önemli rollere sahip olduğu ileri sürülmektedir (Roy et al., 1994).

Sellobiyoz dehidrogenaz (CDH) (EC 1.1.5.1 Sellobiyoz: kinon 1-oksidoredüktaz); C kaynağı olarak selüloz kullanıldığında bir çok fungus, ksenobiyotiklerin yıkımında önemli olan CDH salgılar (Cameron et al., 2000; Stahl et al., 2000a). (Cameron and Aust, 1999).

CDH, farklı domainlerde FAD ve Hem içeren 2-domainli bir enzimdir (Wood and Wood, 1992). Sellobiyoz, çok sayıdaki elektron akseptörlerinin indirgenmesi için iki elektron tarafından oksitlenir. Bu akseptörlerden ikisi, Ferrik iyon ve O_2 dir ve sırasıyla ferröz iyon ve H_2O_2 oluştururlar (Hyde and Wood, 1997). CDH ile oluşan $OH^\cdot$ radikali, poliakrilat polimerlerinin parçalanmasında kullanılmaktadır (Cameron and Aust, 1999). Genelde besince-yeterli koşullarda CDH konsantrasyonu yüksektir. *P. chrysosporium* besince-sınırlı koşullarda üretildiğinde, büyük miktarda CDH, proteolitik olarak parçalanmaktadır (Cameron and Aust, 2000). Bu olayın, CDH ve peroksidazlar arasındaki redoks döngüsünü yavaşlattığı ileri sürülmektedir. Bağımsız flavin domaini, birçok CDH aktivitesine sahiptir (Cameron and Aust, 2000).

Piranoz oksidaz (glukoz-2-oksidaz) (EC 1.1.3.10 piranoz:oksijen 2-oksidoredüktaz); Peroksid-oluşturan piranoz oksidaz (glukoz-2-oksidaz), *P. chrysosporium*'un sıvı kültürlerinde hücre içinde baskın düzeyde bulunmasına rağmen oksidazın odun çürütmesinde önemli bir rol oynadığına yönelik bulgular vardır (Daniel et al. 1994). Oksidaz, tercihen hifsel periplazmik boşlukta ve membransı materyallerle birleşik durumda bulunur. Benzer ultra-yapısal dağılım, kooperatif bir etki gösteren MnP'da da gözlenmektedir.

Aril alkol oksidaz (AAO) (EC 1.1.3.7 aril-alkol: oksijen oksidoredüktaz); AAO lar beyaz çürükçül funguslarda H_2O_2 üretimi için önemlidir. Peroksid oluşum mekanizması, hücre dışı aril alkol oksidaz üreten *Bjerkandera* sp. suş BOS55'de gösterilmektedir (de Jong et al., 1994). Enzimin substratları; fungusun glukozdan *de novo* yöntemiyle sentezlediği klorlanmış anisil alkollerdir. Oksidasyon ürünleri, fungal

miselyum ve aril alkol dehidrogenaz tarafından indirgenir, böylece katalitik-döngü tamamlanır. Aril alkol dehidrogenaz, *P.chrysosporium*'dan saflaştırılıp karakterize edilmiştir (Muheim et al., 1991).

1.2.4 Mangan Peroksidaz (MnP) (EC 1.11.1.13 Mn(II): Hidrojen peroksit oksidoredüktaz)

Mangan peroksidaz *P.chrysosporium* ligninolitik kültürlerinin ekstrasellüler sıvısında bulunan bir diğer Hem peroksidazdır (Kuwahara et al., 1984; Paszczynski et al., 1985). Enzimin asıl fonksiyonu, oksidant olarak H_2O_2 i kullanarak Mn^{+2} yi Mn^{+3} e oksitlemektir.

Yapısal Özellikleri

MnP (EC 1.11.1.13), oksidoredüktaz sınıfı ekstrasellüler bir enzim olup, bir Hem molekülü, % 17 nötral karbohidrat ve yüksek oranda asidik amino asit içermektedir.

MnP nin prostetik grubu, demir protoporfirin IX dir (Paszczynski et al., 1986; Leisola et al., 1987; Mino et al., 1988; Wariishi et al., 1988). LiP izoenzimleri için kullanılan adlandırmayla uyumlu olarak (Farrell et al., 1989), kültürlerde belirlenen spesifik MnP'lar; H3 (pI: 4,9), H4 (pI: 4,5) ve H5 (pI: 4,2) olarak tanımlanmaktadır (Pease and Tien, 1992). MnP izoenzimleri, glikozillenmektedir ve molekül ağırlıkları, 45-47 kDa arasında değişmektedir (Leisola et al., 1987; Pribnow et al., 1989).

MnP'nin kristal yapısı, LiP ile benzerlikler gösterir (Şekil 1.3); aktif merkez, Asp'a Hidrojen bağıyla bağlı proksimal His ligandı ve katalitik His ve Arg'den oluşan distal kısımda peroksid-bağlayıcı bir cebe sahiptir

(Sundaramoorthy et al., 1994). Bununla birlikte; Asp-179, Glu-35, Glu-39 ve bir Hem propiyonat içeren mangan-bağlayıcı bir merkez de bulunmaktadır. LiP'in tersine MnP, 5 disülfid bağına sahiptir.



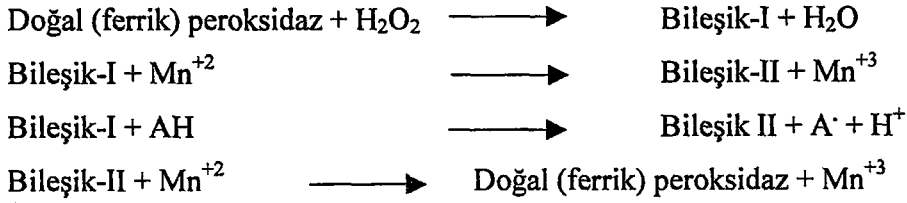
Şekil 1.3 MnP nin kristal yapısı

Katalitik ve Kinetik Özellikleri

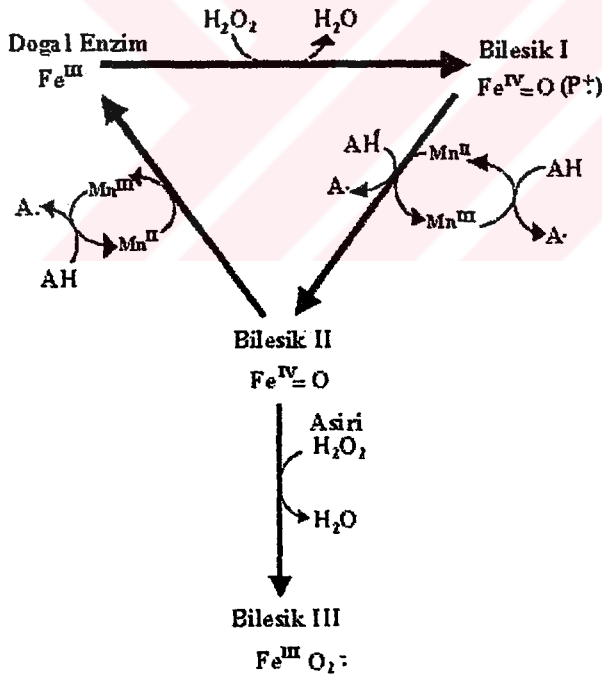
MnP; fenolik aromatik substratların demetoksilasyon ve dekarboksilasyon tepkimelerini, tiollerin varlığında ise fenolik olmayan lignin bileşiklerinin oksidasyonunu katalizler ve fenolik bileşikleri, fenoksilik radikallerin ve kinonların oluşumu ile okside eder.

MnP enzim ara ürünleri, diğer peroksidazlarla analogdur (Wariishi et al., 1988, 1989). Doğal MnP, H_2O_2 varlığında Bileşik-I e oksitlenir. Ardından Bileşik-I, Mn^{+2} ve fenoller tarafından Bileşik II'ye indirgenir. Bileşik-II ise Mn^{+2} tarafından enzimin temel haline dönmek üzere indirgenir ancak fenoller tarafından indirgenme gerçekleşmez (Wariishi et al. 1989). Bundan dolayı; katalitik döngüyü tamamlamada Mn^{+2} ye gereksinim duyulur (Wariishi et al. 1988; Pease and Tien 1992). Mn^{+2} şelatlarıyla

yapılan kinetik çalışmalar, Mn^{+2} tarafından MnP Bileşik-II sinin indirgenmesinde okzalatin bir rolü olduğunu desteklemektedir (Kuan et al. 1993; Kishi et al. 1994). AH, substrat olarak gösterilirse MnP kataliz mekanizması aşağıdaki şekildedir;



MnP nin katalitik döngüsü, aşağıdaki şekilde şematik olarak gösterilebilir;

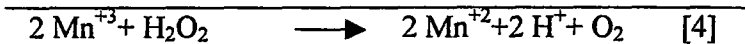


Şekil 1.4 MnP nin katalitik döngüsü

MnP, kompleks Mn^{+2} yi indirgeyici substrat olarak kullanan tek peroksidazdır (Kuan et al., 1993). MnP Bileşik-I i; çeşitli fenoller (örn; guaykol, 2,6-dimetoksifenol), ancak Mn^{+2} ye göre daha düşük etkinlikte oksitleme kapasitesindedir (Whitwam et al., 1997). Bileşik-II nin indirgenmesi, substrat olarak Mn^{+2} ye bağlıdır. Bir enzim kataliz tepkimesinde; iki Mn^{+2} , Mn^{+3} e oksitlenir. Enzimin aktivitesi, Mn^{+3} ü stabilize eden, böylece difüzlenebilir oksitleyici şelatlar oluşturan basit organik asitler tarafından uyarılmaktadır (Glenn and Gold 1985). Mn^{+3} , beyaz çürükçül funguslar tarafından üretilen bir metabolit olan okzalit gibi organik asitler tarafından şelatlanır (Kuan and Tien, 1993). Mn^{+3} -okzalit kompleksi, oldukça stabildir ve Mn^{+3} -okzalit kompleksine göre daha düşük redoks potansiyeline sahip çeşitli fenolik bileşikler oksitleme kapasitesindedir (Banci et al., 1999).

MnP tepkimelerinde mangana olan gereksinim enzimin, pirofosfat, tartarat ve laktat gibi bazı ligandların varlığında Mn^{+2} nin Mn^{+3} e oksidasyonunu katalizlemesinden kaynaklanır. Enzimatik olarak oluşan Mn^{+3} -kompleksleri, MnP nin çeşitli aromatik substratlarını da oksitlemektedir (Banci et al., 1999). Mn^{+3} -laktat ve Mn^{+3} -malonat kompleksleri, enzimden bağımsız olarak, MnP nin organik substratlarını oksitlediği gösterilmektedir. Böylece, MnP tarafından organik bileşik oksidasyonlarında manganın rolü, 1 elektron transferini sağlayan bir mediatör olarak görülmektedir (Glenn et al. 1986).

Mn^{+3} ve H_2O_2 arasındaki tepkime mekanizması aşağıdaki şekildedir:

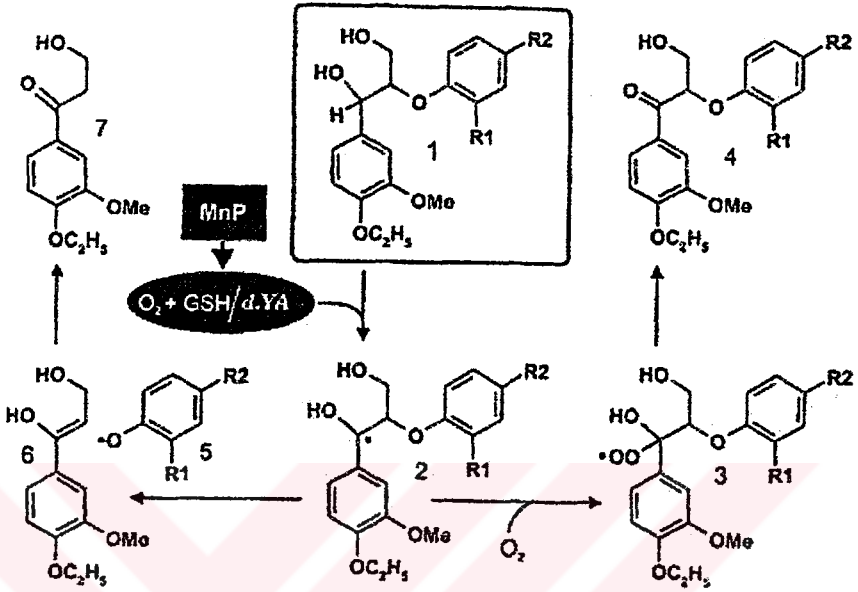


Ara ürün MnO_2^+ , süperoksit anyonuyla iki yüklü mangan kompleksini göstermektedir (protonlanmış formu, MnOOH^{+2}). Tepkime [1], ters yöndeki tepkime Mn^{+3} ü stabilize eden ligandların varlığında meydana gelmediği için denge tepkimesidir. Eğer tepkime [1] nin ileri yöndeki hızı, yukarıdaki mekanizmanın sınırlandırıcı adımı ise tüm tepkime, Mn^{+2} konsantrasyonuna birinci dereceden bağımlılık gösterecektir. Gözlenen tepkime derecelerinin, pH 4,75 de 1 ve 2 arasında olması, bu pH nın tepkime [2] veya [3] un kısmi olarak hız sınırlandırıcısı olduğunu gösterir.

Mn^{+3} -şelatör kompleksi, mediatör olarak etki etmektedir ve polimerik substratları oksitlemek üzere geçirgen bir membrandan difüzlenmeye karşı oldukça stabildir (Glenn et al., 1986). MnP molekülü, odunsu yapı matriksinden içeri difüzlenmek için büyük olduğundan odunsu yapıdaki lignine doğrudan bağlanmadığını ancak difüzlenebilir Mn^{+3} -şelatör kompleksi aracılığıyla substratı oksitlediği gösterilmektedir (Daniel et al., 1990; Blanchette et al., 1997).

Substratları

Enzim, Mn^{+3} -okzalat kompleksinden daha yüksek redoks potansiyeline sahip fenolik olmayan lignin bileşikleri ve polisiklik aromatik hidrokarbonları (PAH) oksitlemektedir. Özellikle reaktif radikalleri oluşturan ko-oksidantlar (mediatörler), fenolik olmayan yapıların oksidasyonunu gerçekleştirmede kullanılırlar. Glutatyon (GSH) gibi organik kükürt bileşikleri, dimerlerin oksidasyonunu arttırmaktadır (Şekil 1.5) (Forrester et al., 1988; D'Annibale et al., 1996; Wariishi et al., 1989).



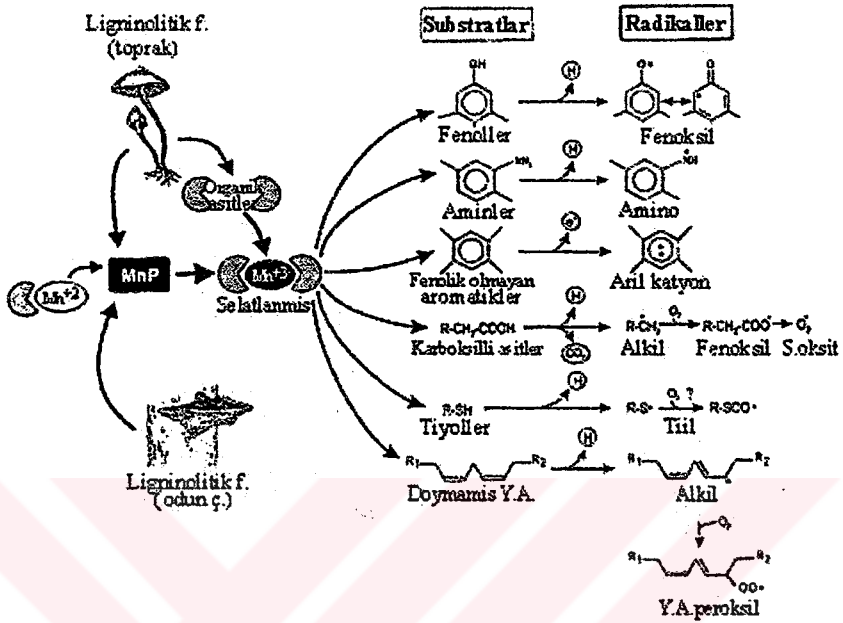
Şekil 1.5 Fenolik olmayan lignin'in yıkımı (d.YA; doymamış yağ asidi)

Bununla birlikte; fungusların indirgenmiş tiyollerini mikro-çevrelerine salgılamamalarına rağmen, peptidlerdeki SH grupları, kısmi hücre lizisi esnasında serbest kalırlar ve tiyol mediatörlerinin kaynağını oluştururlar. *Nematoloma frowardii* MnP'ı, tepkime ortamına GSH ilave edildiğinde antrasen, pyren, benzo(a)pyren, benzo(a)antrasen ve fenantren'i oksitlemektedir (Sack et al., 1997). GSH, reaktif oksijen türleri ve serbest radikallere karşı hücrelerin korunmasında kullanılan önemli bir peptid-bileşimidir. HRP ile GSH den tiyil-radikalinin oluşumu, HRP nin tek başına oksitleyemediği veratril alkolün oksidasyonunu başlatmaktadır (McEldoon and Dordick, 1991). Tiyil (thiyl) -radikallerinin oluşumu, MnP-Mn⁺²-GSH sistemi tarafından PAH oksidasyonunda da görülmektedir (Sack et al.,

1997). Diğer “tiyo” bileşiklerinin; aromatik substratların MnP a bağımlı oksidasyon da benzer role sahip oldukları ileri sürülmektedir.

Fenolik olmayan lignin model bileşikleri ve PAH (antrasen, benzo(a)pyren), doymamış yağ asitleri (Tween 80 formunda), MnP ve Mn(II) varlığında yıkıma uğratılmaktadır (Kapich et al., 1999). Doymamış yağ asitleri (d.YA) ve türevlerini içeren diğer mediatör sistem, MnP tarafından fenolik olmayan lignin yapılarının yıkımında (Bao et al., 1994; Kapich et al., 1999a; Kawai et al., 1995; Kapich et al., 1999b) tiyol mediatör sistemle benzer şekilde etkir. Doymamış yağ asit yapılarından reaktif ara ürünlerin (peroksil radikalleri) oluşum prosesi, Lipid Peroksidasyon olarak bilinir (Halliwell and Gutteridge 1989). Sonuç olarak; MnP-lipid sistem, fenolik olmayan lignin model dimerlerindeki C α -C β ve β -aril eter bağlarını etkin olarak parçalamaktadır (Şekil 1.5) (Bao et al., 1994; Kapich et al., 1999a; Kawai et al., 1995; Kapich et al., 1999b). Ligninolitik fungusların mikro-çevresinde GSH bulunmamasına rağmen uygun doymamış yağ asitleri ve bulunmaktadır (Enoki et al., 1999) ve odunsu yapının doğasında da mevcuttur (Hofrichter et al., 2001). Kapich ve arkadaşlarına (1999) göre; Tween 80 gibi sürfaktantların kullanımı, hidrofobik substratların daha iyi çözünmesini sağlamaktadır. Ayrıca, lignin ve lignin model bileşiklerini oksitlemede lipoksigenaz tarafından oluşturulan lipid peroksil radikallerinin, yeterli olmadığı (Kapich et al., 1999) ve bu bileşiklerin oksidasyonuna lipid peroksidasyonun katıldığı ileri sürülmektedir.

MnP sistemi, yıkıma dirençli lignin polimerinin yıkımında bir “radikal pompası” olarak etki eden potansiyel biyokimyasal bir araçtır.



Şekil 1.6 MnP sistemi tarafından substratlara bağımlı radikal oluşumu

Karboksilik asitlerle (örn; Okzalot, Malonat, Malat, Tartarat, Laktat) Mn^{+3} şelatları, çeşitli substratların 1 elektronla oksidasyonuna neden olmaktadır (Şekil 1.6) (Hatakka et al., 2001).

- Fenolik ve Amino-Aromatik bileşikler, sırasıyla fenoksil ve amino radikallerinden hidrojenin uzaklaştırılmasıyla oksitlenir (Paszczyński et al., 1985; Paszczyński et al., 1986; Wariishi et al., 1988, 1992; Kishi et al., 1994).
- Antrasen veya Tetrametoksibenzen gibi düşük redoks potansiyelli bazı fenolik olmayan aromatik bileşikler, aromatik halkadan 1 elektronun uzaklaştırılmasıyla aril-katyon radikallerini oluştururlar (Popp et al., 1991, Sack et al., 1997).
- Mn^{+3} ve karboksilik asitlerin (örn; okzalot veya malonat) şelatları, birbirleriyle tepkimeye girerek ve Alkil radikallerine dönüştürülür.

Bu radikallerin O_2 ile spontan tepkimesi, diğer radikallerin (örn:Süperoksit) oluşumuyla sonuçlanır (Hatakka et al., 2001; Perez and Jeffrie, 1996, Kuan and Tien, 1993; Urzua et al., 1998; Hofrichter,1998a). Otokatalitik tepkimelerle oluşan peroksidlerin kaynağı bu radikallerdir ve eksternal H_2O_2 in yokluğunda MnP tarafından kullanılabilirler (Kuan and Tien, 1993; Urzua et al., 1998; Hofrichter, 1998a).

MnP enzim sistemi; organik kükürt bileşiklerinin (örn; GSH, L-sistein, vb.) yanı sıra doymamış yağ asitleri ve türevleri (örn; Linoleik asit, Tween 80) gibi bazı ko-oksidadantlarını oksitleyerek, sırasıyla thiyl ve peroksil radikallerini oluşturur (Forrester et al., 1988; Popp et al., 1991; Sack et al., 1997; Perez and Jeffrie, 1996; Kuan and Tien, 1993). O_2 varlığında bu radikaller, “basit” MnP sisteminin ilk yıkım atağına (Kawai et al., 1995) dirençli olan lignin yapılarına saldırabilirler ve sistem için gerekli H_2O_2 kaynağını oluştururlar (Bao et al., 1994; Kapich et al., 1999). Şekil 1.6 daki tüm radikaller, koşullara bağlı olarak daha ileri düzeydeki spontan tepkimelerin başlangıç noktalarını oluşturabilirler (Hatakka, 2001).

LiP ve MnP deki substrat-bağlama merkezleri, bu homolog enzimlerin fonksiyonlardaki farklanmadan sorumludur. İki glutamatın (E35, E39) karboksilat oksijen atomları, aspartat (D179), Hem propiyanat oksijen ve iki su oksijen atomu ile oluşan Mn^{+2} -bağlama merkezi, MnP a özgüdür ve LiP de bulunmadığı X-ışını kristalografisi ve Enerji optimizasyon Analizleriyle saptanmıştır (Sundaramoorthy et al., 1994; Johnson et al., 1994).

MnP aktivitesinin izlendiği ölçümlerde; kolaylıkla Mn^{+3} tarafından oksitlenen ve tayin için gerekli renk değişimlerini veren fenolik bileşikleri kullanılmaktadır. Bununla birlikte; Mn^{+3} tarafından ligninin hem fenolik hem de fenolik olmayan bileşiklerinin oksitlenmesinde etkili olduğu gösterilmektedir (Hammel et al. 1989). MnP tarafından sentetik ligninin *in vitro* kısmi depolimerizasyonu da gerçekleştirilmiştir (Wariishi et al. 1991).

MnP -LiP hibrid formları, fenolik ve fenolik olmayan aromatik bileşikleri (örn; fenol kırmızısı, veratril alkol) oksitlemektedir. Hibrid enzimler, *Pleurotus eryngii* (Martinez et al., 1996; Heinfling et al., 1998), *Bjerkandera sp. BOS55* (Mester and Field, 1998) ve *Bjerkandera adusta*'da (Heinfling et al., 1998) üretilmektedir. Bu çok yönlü (versatile) peroksidazların nasıl yayılım gösterdikleri henüz belli değildir. Ancak bu peroksidazın bulunması, MnP ve LiP'in birbirleriyle çok yakın ilişkili enzimler olduklarını da göstermektedir. Bu varsayım daha sonraları; sadece bir aminoasit pozisyonu değiştirilmiş *P.chrysosporium* dan MnP 5568 W mutantının, hem Mn^{+2} hem de tipik LiP substratı Veratril alkolü oksitlemesiyle desteklenmiştir (Timofeevski et al., 2000).

MnP'in Üretimi

Her mikroorganizmanın büyüebilmesi ve maksimum enzim üretimini gerçekleştirebilmesi için optimum pH ve sıcaklık değerleri vardır. *Pleurotus* spp. kültüründe maksimum lakkaz aktivitesi için pH 5,5-6,0 aralığı optimum iken *P. chrysosporium* tarafından ligninolitik enzimlerin üretimi için optimum pH değeri 4,5 ve sıcaklık 37 °C dir.

P. chrysosporium kültürasyonunda karıştırma hızı da ligninolitik enzimlerin üretimini etkilemektedir. 100 rpm çalkalamada, az sayıda

ortalama çapı 6,6 mm olan büyük pelletler oluşurken ligninolitik aktivite saptanmamıştır (Elisashvili, 1993).

Besin ortamı bileşenlerinden eser elementler de ligninolitik enzim üretimini etkilemektedir. LiP ve MnP lerin biyosentezinde Mn^{+2} iyonu, düzenleyici bir role sahiptir. Mn^{+2} içermeyen *P. chrysosporium* kültürlerinde LiP aktivitesi baskın iken Mn^{+2} varlığında sadece MnP üretimi gözlenmiştir.

P. chrysosporium, *Trametes versicolor*, *Phlebia radiata*, *Panus tigrinus*, *Phlebia (Merulius) tremellosa*, *Lentinula edodes* ve *Pleurotus ostreatus*'un kültürlerinde MnP enzimi bulunmaktadır (Kuwahara et al., 1984; Karhunen et al., 1990a; Bekker et al., 1992; Glenn and Gold, 1985; Maltseva et al., 1991). *P. radiata* MnP 1, H_2O_2 ilavesi olmaksızın yüksek aktiviteli NADH oksidasyonu göstermiştir. *P. ostreatus* sıvı kültürlerinden üç MnP izole edilmiştir. *P. tigrinus* da LiP aktivitesi bulunmamakla birlikte yüksek molekül ağırlıklı lignini düşük molekül ağırlıklı fraksiyonlara dönüştürme kapasitesinde olan MnP saptanmıştır.

1.3 In vitro Fungal Enzim Üretimi

1.3.1 Serbest hücreler

Hücreler immobilize edilmeden serbest halde enzim üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bazı dezavantajlarının bulunması nedeniyle son zamanlarda immobilize hücrelerden enzim üretimi özellikle biyoteknolojik uygulamalarda daha çok ilgi çekmektedir.

1.3.2 İmmobilize hücreler

Hücre İmmobilizasyonu

Hücre immobilizasyonu, enzim fermentasyonunun doğal bir sonucudur. İmmobilize enzimlerin ılımlı fizyolojik koşullar altında spesifik katalitik aktiviteleri ve yüksek performansları nedeniyle fermentasyondaki önemleri gün geçtikçe artmaktadır. Enzimler, serbest halde veya sulu sistemlerde çözünmez formda kullanılabilirler. Bu iki formda enzimler, katı bir taşıyıcıya da bağlanabilirler ve bu durum da; işlemsel stabilitenin, aktivitenin artması ve substratlar ile ürün akışının daha iyi kontrol edildiği sürekli proseslerin uygulanabilirliği ile sonuçlanır. Yine de enzim proseslerinin; saf enzimlerin maliyeti, ekstraksiyon ile geri kazanımlarının zor olması ve bazı immobilize enzimlerde sızıntı nedeniyle ürün kontaminasyonu . problemleri gibi bazı dezavantajları vardır. Bu dezavantajların üstesinden gelmek için mikrobiyal enzimler hücreleriyle birlikte çeşitli yöntemlerle taşıyıcılara bağlanır ve bu durum, genellikle enzim aktivitesi ve yarılanma-ömründe önemli artışlara neden olur.

Hücre immobilizasyonunda çeşitli reaktifler ve kurutma, dondurma, çapraz-bağlama gibi prosedürler hücreleri öldürebilmesine rağmen, enzim aktivitesi bu durumdan etkilenmez. Tekli hücre içi enzimlere gereksinim duyan fermentasyonlarda; immobilizasyon prosesleri genellikle hücre duvarlarının geçirgenliğini artırır, besinler, substratlar ve ürünlerin hücre membranları aracılığıyla kolaylıkla difüzenmesini sağlar ve böylece fermentasyon işlemini kolaylaştırır. Bu durumda ölü hücreler de, taşıyıcı olarak fonksiyon gösterirler. Daha kompleks immobilizasyonlar, fermentasyon tepkimesinde özel fonksiyonlara sahip hücresel bileşenleri ve çoklu enzimleri içeren canlı hücreleri kapsamaktadır (Phillips and Poon, 1988).

Mikrobiyal hücrelerin enzimlere göre nispeten daha kompleks olmaları nedeniyle mikroorganizmaların bağlanma davranışının incelenmesi, enzimlere göre her zaman geri planda kalmaktadır. Farklı kimyasal bileşimleri nedeniyle enzimleri, saflaştırmak ve karakterize etmek daha kolaydır.

Biyo-katalizlenmiş prosesler arasından tüm hücreler (veya organeller) ile enzimlerin (veya koenzimlerin) serbest ve immobilize formlarının karşılaştırılması doğru değildir. Karşılaştırmalar; ancak immobilize hücreler ve serbest hücreleri içeren prosesler ile immobilize hücreler ve immobilize enzimleri kapsayan prosesler arasında yapılmalıdır.

Genelde immobilize hücrelerin verimliliği oldukça yüksektir. Bu verimlilik, taşıyıcı tarafından sağlanan mikro-çevrenin (yani; hücre-hücre etkileşimi, besin-ürün gradientleri, pH gradientleri) organizma veya enzimleri daha stabil hale getirmesiyle açıklanabilir. Bu sistemler, genellikle çok sınırlı fiziksel koşullar altında ancak optimal aktivite gösterirler. Hücre immobilizasyonu enzim aktivitesi ve yarılanma-süresi artırılır. Canlı hücreler için büyüme hızı da immobilizasyon ile artırılmaktadır. Sonuç olarak; immobilize organizmaların hem operasyonel stabilitesi hem de verimliliği artırılmaktadır. Böylece canlı veya ölü olsun immobilize hücrelerde enzimler, serbest hücrelerdeki göre aktivitelerini daha iyi korurlar. Immobilize hücre sistemlerinin diğer bir avantajı; özellikle sistem, tek tip küresel partikül formundaki katı taşıyıcıları kullanıyorsa heterojen kataliz sistemlerin teorik ve hidrodinamik uygulamalarının kolaylıkla geliştirilmesini sağlamasıdır. Ayrıca bazı durumlarda hücre immobilizasyonu, genetik stabilizeyi de arttırmaktadır.

Serbest hücrelerle iyi çalışmayan sürekli fermentasyonları immobilize hücrelerle, gerçekleştirmek de olasıdır. Daha yüksek hücre yüklemesini sağlaması nedeniyle tepkime hızları daha yüksek olabilir. Hücre immobilizasyonu ayrıca kültür yıkama etkisi olmaksızın daha yüksek seyrelmeyi mümkün kılar ve mikroorganizmanın geri döngüsünü ve tekrar kullanımını da oldukça kolaylaştırır. Daha yüksek düzeyde kontrol aşağıdaki durumlarda mümkündür;

- Maksimum verimlilikte hücre aktivitesinin sürdürülmesi gibi seçimli alanlarda,
- Enzim aktivitesinin re-aktivasyonunda veya rejenerasyonu,
- İnhibitör özellikteki tepkime ara ürünlerin veya ürünlerin seçimli izolasyonu,
- Hücreler arasında maddelerin geniş bir alana transferini sağlayan metabolik olarak eşlenik mikroorganizmaların ko-immobilizasyonu ile verimliliği artırılması,
- Tepkime ortamından ürünlerin uzaklaştırılması,
- Tepkime sonunda oluşan atığın uzaklaştırılması.

Hücre immobilizasyon sistemleri; bir çok problemi de beraberinde getirmektedir. Bu tip sistemler için başlangıç maliyeti genellikle yüksektir ve proses, genellikle bir reaktöre gereksinim duyar. Immobilize hücre sistemlerin mekanik özellikleri, serbest hücrelerinkine göre daha komplekstir ve bu özellikleri, sürekli geri-döngülü prosesde etkili karıştırma ve filtrasyonun sağlanması amacıyla dikkate alınmalıdır.

İmmobilize hücre kullanımının bazı dezavantajları da vardır. Bu tip bir katalizörün heterojen yapısı, difüzyon sınırlamalarını etkiler. Katalizörün sadece yüzeysel tabakası, optimum bir hızda çalışmaktadır. Bu gibi

sınırlamaları azaltmak amacıyla; yüzeye bağlı hücreler kullanılabilir, partikül boyutu azaltılabilir, büyük hacimli çalışmalarda substrat konsantrasyonu ve taşıyıcının gözenek çapı arttırılabilir ve hücre yüklemesi azaltılabilir (Flint, 1987).

İmmobilize hücreler; saflaştırılmış enzimlere kıyasla bir çok substrat için ilave bir difüzyon bariyeri (örn: hücre membranı) ne sahiptir. Eğer canlı olmayan hücre örnekleri kullanılıyorsa bu problem, hücrelerin geçirgenliği sayesinde yok edilebilir. Diğer tarafta canlı hücre örnekleri de bu ek difüzyon bariyerini oluşturmaları nedeniyle substratın kullanımını sınırlandırabilirler.

Sentetik organik taşıyıcıların polimerizasyonunda kullanılan monomerler, çapraz bağlayıcı ajanlar ve radikal başlatıcılar gibi reaktifler, genellikle sitotoksiktir ve bu tepkimelerde kullanılan organik çözümler, mikroorganizmaları parçalayabilir ve böylece mikroorganizmalarda bulunan enzimler denatüre olabilir. Kovalent bağlanma veya çapraz bağlanma gibi bazı immobilizasyon yöntemleri, hücreleri dönüşümsüz olarak öldürür ve böylece çoklu-enzim fermentasyonlarındaki kullanımlarını da sınırlandırır (Chibata et al., 1974).

Taşıyıcılar ve Özellikleri

Hücre immobilizasyonunda; çeşitli organik ve anorganik taşıyıcılar yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu taşıyıcılarda hücre yüzeyi ile etkileşime giren reaktif grupların niteliği ve miktarı birbirinden farklıdır (Prenosil et al., 1989; Brodelius and Vandamme, 1987).

Taşıyıcı seçimi, çoğunlukla empirik olarak yapılmaktadır ve çok az taşıyıcı, yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte; taşıyıcı

özellikleriyle birlikte mikroorganizma-taşıyıcı etkileşim mekanizmalarını ve hücre metabolizması üzerine etkilerinin anlaşılması nedeniyle, spesifik uygulamalar için özel taşıyıcılar, organik ve anorganik olmak üzere ikiye ayrılır. Her iki grup taşıyıcıların kendilerine has özellikleri olmasına rağmen organik taşıyıcılar, uygulamalarda daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Çünkü organik taşıyıcılar, yüzeylerinde aminokarboksil veya hidroksil gruplar gibi çeşitli reaktif gruplara sahiptir. Organik taşıyıcılar, polisakkaridler, proteinler ve sentetik polimerler olmak üzere üç ana grupta toplanmaktadır (Çizelge 1.1).

Çizelge1.1 Hücre immobilizasyonunda kullanılan organik taşıyıcılar

Polisakkaridler	Proteinler	Sentetik Polimerler
Selüloz	Kollojen	Poliakrilamid
Agar/Agaroz	Jelatin	Metakrilamid
Kitosan	Albumin	Poliüretan
Dekstran	Fibrin	Polistiren
Karragenan		Poliester
Aljinat		Polipropilen
		Polivinil Alkol
		Polivinil Klorür

Anorganik taşıyıcılar, çeşitli oksidlerden meydana gelmektedir ve yüksek termo-stabiliteye sahiptirler. Çözeltide yüzeyleri, hidrolizlenir ve hidroksil grupları, hücre yüzeyindeki karboksil veya amino gruplarıyla doğrudan tepkimeye girebilir. Ayrıca, yüzeye spesifik organik gruplara sahip anorganik taşıyıcılar, amino veya aldehid gruplarına bağlanmaktadır. Hücrelerin anorganik taşıyıcılara bağlanmasında kullanılan teknikler özellikle adsorpsiyon ve kovalent bağlamadır. Hücre immobilizasyonunda

kullanılan anorganik taşıyıcıların başlıcaları; Alümina, Zirkonyum, Titanyum, Silika, Cam, Seramiklerdir.

Hücre İmmobilizasyonunda Kullanılan Taşıyıcı Kriterleri

Herhangi bir taşıyıcıya mikrobiyal hücrenin immobilizasyonundan sorumlu olan birbirinden farklı çeşitli mekanizmalar vardır:

- Yüklü hücreler ve taşıyıcı arasındaki elektrostatik etkileşimler,
- Taşıyıcı yüzeyindeki reaktif grup ve hücre yüzeyindeki amino ve karboksil grupları arasında iyonik bağ oluşumu,
- Hidroksil gruplar ve hücre yüzeyindeki karboksil veya amino grupları arasında kısmi kovalent bağ oluşumu,
- İmmobilize liganda biyo-spesifik adsorpsiyon. Hücre yüzeyindeki spesifik reseptör merkezleri, katı taşıyıcıya bağlanma amacıyla kullanılmaktadır.
- İzosiyanat, aminosilan, glutaraldehid, karbodiimid ve imidoester gibi ajanlar aracılığıyla modifiye edilen taşıyıcılar üzerindeki aktif gruplar ve hücre yüzeyindeki reaktif gruplar arasında kovalent bağ oluşumu.
- Hücrelerin polimerler içinde fiziksel tutuklanması.

İlk dört mekanizma, adsorpsiyon olarak adlandırılabilir. Mikrobiyal hücreler, negatif yüklü oldukları için pozitif yüklü taşıyıcıları (örn; DEAE-Sefadeks ve Amberlit) tercih etmektedirler (Brodelius and Vandamme, 1987).

Büyük ölçekli kullanım için uygun taşıyıcı seçiminde bir çok faktör dikkate alınmalıdır (Prensil et al., 1989);

- Materyal, uygun miktarlarda ve düşük fiyatta mevcut olmalıdır.
- Materyal, hücre ve reaktantların girebileceği büyük bir yüzey alanına sahip olmalıdır.
- Materyal, proses ve depolama koşullarında mekanik, kimyasal ve termal olarak stabil olmalıdır.
- Matriks, hücrelerin bağlanması için yeterli sayıda fonksiyonel grup içermelidir.
- Materyal, hücre aktivitesini düşürmemeli veya hücre lizisini başlatmamalıdır.
- Materyal, immobilizasyon prosedüründe kolaylıkla kullanılmalıdır.
- Materyal, geri-döngülü kapasitede veya güvenli atık oluşturmamalıdır.
- Hücrelerin tutundukları matriksde oluşacak yeni hücreler dikkate alınarak yeterli boş alan bulunmalı veya yapı bunu sağlayacak esnekliğe sahip olmalıdır.

Hücre İmmobilizasyon Yöntemleri

Hücre immobilizasyon yöntemleri, genel olarak enzim immobilizasyon yöntemleriyle paralellik gösterir ve mekanik, kimyasal veya iyonik bağlanma tipinin yapısına göre sınıflandırılabilir. Mekanik immobilizasyonda; hücreler, fiziksel bariyerler aracılığıyla lokalize olurlar. Kimyasal immobilizasyonda; kovalent bağlar, hücreler arasında veya hücrelerle katı faz arasında meydana gelir. İyonik immobilizasyonda; elektrostatik, van der Waal's veya London çekim kuvvetleri mevcuttur.

Mekanik İmmobilizasyon

Misel - Pellet ve -Kütle: Fungus miselyumu, sporlarının en üstünde bulunan tübüler filamentler (hifler) den meydana gelir. Tipik olarak fungus hifleri, yaklaşık 50 mikron uzunluğundadır ve aktif büyüme koşullarında dışa doğru dallanma meydana gelerek, birbirleriyle karışarak ve ağ formunu oluşturmak üzere biri diğeriyle kaynaşıp yapışmaktadır. Bazen bu tip misel kütleleri, fermentasyonlarda problemlere neden olabilir. Çünkü miselyal büyümenin aşırı artması, filamentöz hücreleri kullanan fermentasyonda; ortam ve fungus arasındaki temas alanının azalması, böylece besinlerle oksijen girişinin azalması nedeniyle inaktivasyona yol açabilir (Bucke and Wiseman, 1981).

Spesifik teknikler yardımıyla fungusun filamentöz büyümesi, miselyal kütleleri üretmede teşvik edilebilir. Böylece fungus miselyumu aşılansarak ve büyümei kontrol etmek üzere Carbopol-934 polimeri kullanılarak aynı büyüklükte fungal miselyal pelletler elde edilebilir. Fermentasyonda miselyal agregatların en önemli uygulaması, asetik asit üretimidir.

Enkapsülasyon: Enzimlerin enkapsülasyonunda; ara yüzey polimerizasyonu, sıvı kurutma, faz ayırımı ve sıvı membran yöntemleri kullanılmaktadır. Mikrobiyal sistemlerde ise yalnızca sıvı kurutma ve sıvı membran yöntemleri başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. Bu yöntemlerde; mikrobiyal hücrelerin, kollodion, silikon, kollajen, selüloz asetat, poliester, naylon veya etilselüloz gibi yarı-geçirgen materyal ile çevreleri tamamen kapatılır. Mikrokapsüllerin moleküler boyutları, fermentasyonda hem besinler hem de ürünlerin moleköl büyüklükleri üzerine sınırlayıcı bir etkidir. Ayrıca tepkime hızı, kapsüller içindeki substratın transfer hızına da

bağlıdır. Kapsül boyutları da başlangıçta yüksek hücre yoğunluğu bulunmasına rağmen hücrelerin büyümesini sınırlandırabilir (Mohan and Li, 1975).

Diyaliz Kültürü: Diyaliz kültürü, immobilizasyon alanında çok çeşitli örnekleri içerir. Fermentasyondaki diyaliz kültüründe bazı hücreler, seçilen molekül büyüklüğüne ulaşıncaya kadar besinlerle fermentasyon ürünlerinin kolaylıkla geçebileceği difüzyon bariyerleri vasıtasıyla fiziksel olarak hapsedilir veya lokalize edilirler (Bucke and Wiseman, 1981). Diyaliz fermentasyonunun avantajlarına rağmen endüstriyel üretimde kullanılmamasının nedenleri;

- Büyük ölçekli endüstriyel üretim için düşük ekonomik potansiyel oluşturmaları,
- Bazı fermentasyon ürünlerinin diyalizlenememesi,
- Diyalizde bazı mikroorganizma veya hücre fragmantlarının sızıntı yapma olasılıkları,
- Membran kirlenmesi problemidir.

Tutuklama: Hücre immobilizasyonunda en sık kullanılan tekniklerden tutuklamada; karbohidrat, protein, sentetik organik veya anorganik olan polimerik materyal örgüsü içinde hücrelerin inkorporasyonu gerçekleştirilir. Membran formundaki katı taşıyıcının bulunduğu genel enzim immobilizasyon tekniği, hücrelerin immobilizasyonunda da kullanılmaktadır.

Agar, aljinat ve karragenan gibi polisakkaritlerin mikrobiyal hücrede bulunan fiziksel ortama benzer özelliklere sahip olmaları, tutuklanmış hücreler ve enzimlerin stabilitesini artırır. Ancak mekanik özellikleri uygun değildir. Çünkü agar, yüksek sıcaklıklara çıkıldıkça; kalsiyum aljinat ise fosfat tuzları gibi şelatlayıcı ajanların varlığında kararlı değildir. Selüloz ve

türevleri, suda çözünmez ancak dimetil formamid, dimetil sülfoksit ve aseton gibi polar aprotik organik çözüenlerde çözünür. Mikrobiyal hücre, tamamiyle bu çözüenlere ilave edilir. Çözüen, su içinden geçtiği zaman immobilize mikroorganizmaları içeren membranlar ve boncuklar içinde oluşabilir veya fiberler şeklinde ortamdan çekilebilir.

Poliakrilamid, mikrobiyal hücrelerin immobilizasyonunda sıklıkla kullanılan sentetik bir polimerdir. Vinil karboksilik asit amidin lineer polimerizasyonu ile oluşan poliakrilamid, suda kolaylıkla çözünen bir katıdır. Polimer; hücre immobilizasyonuna daha uygun örgü yapısına benzer bir polimer oluşturmak üzere kopolimer N,N'-metilenbisakrilamid ile çapraz bağlanır. Mikrobiyal hücrelerin tutuklanmasında taşıyıcı olarak poliakrilamid kullanımının asıl avantajları, ilgili hücrenin enzimleri üzerindeki stabilizasyon etkileridir (Yamamoto et al., 1977).

Poliüretanda hücrenin ve organellerin tutuklanması, farklı etilen oksit varlığında (% 91 ve % 100) polietilendiol birimlerini (ortalama molekül ağırlığı 2600 Da) içeren ön-polimerleri kullanılarak gerçekleştirilmektedir (Tanaka et al., 1979). Prepolimerlerin uç grupları, toluen di-izosiyanat'tan meydana gelmektedir. Poliüretan; steroid bileşiklerin hidrofoblukları nedeniyle çözüen ve taşıyıcı polaritesine çok hassas olan steroid fermentasyonlarında kullanılmak üzere seçilen bir taşıyıcıdır (Fukui and Tanaka, 1982). Ön-polimerlerin özellikle glikol bileşenlerinin polaritesi ve zincir uzunluğunun seçimine göre, özellikle fermentasyon için bir taşıyıcı dizayn etmek olasıdır. Silika hidrojel, alkoksi-silan ve borosilikat cam fiberleri gibi anorganik polimerler de hücre tutuklanmasında kullanılmaktadır.

Kovalent Bağlama

Bu immobilizasyon yönteminin en ayırt edici özelliği, hücreler ve polimer örgü arasında veya hücrelerin kendiliğinden bir yığın oluşturmaları için aralarında kovalent bağların meydana gelmesidir (Kennedy et al., 1980). Enzimler, kimyasal yapıları nedeniyle reaktifler aracılığıyla kovalent bağlanmaya yatkındırlar. Bu tip reaktiflerin hücreler üzerinde kullanılması, enzimatik aktivitenin korunmasına rağmen genellikle hücreleri öldürmektedir.

Glutaraldehid, mikrobiyal hücrelerin immobilizasyonunda çapraz bağlayıcı reaktif olarak kullanılmaktadır. Glutaraldehid ile kovalent çapraz bağlanma, özellikle kollajen, jelatin, albumin gibi protein taşıyıcıları için uygundur. Kovalent çapraz bağlanma; genellikle glutaraldehid ile silika, titanyum, cam, tuğla ve zirkonyum gibi anorganik katı taşıyıcılar üzerinde de gerçekleştirilmektedir (Kennedy, 1978). Genelde kovalent bağlı hücrelerde, mekanik degradasyon veya hücre sızıntısı problemleri yaşanmaz. Ancak immobilize hücrelerin canlılık kaybı gibi problemler meydana gelmektedir.

İyonik Bağlama

Flokülasyon: İmmobilizasyonun iyonik bağlanma şekli, hidrojen bağı, koordinat bağı, Van der Waals ve dispersiyon (dağılım) kuvvetleri gibi elektrostatik kuvvetler aracılığıyla gerçekleştirilir (Fletcher, 1979). Mikrobiyal flokülasyon mekanizması; türlerin morfolojisi ve fizyolojisinin yanı sıra pH, iyonik ve besinsel özellikler vb çevre koşulları gibi birçok faktöre bağlıdır.

Adsorpsiyon: Adsorpsiyon tarafından mikrobiyal hücre immobilizasyonu, çok yaygın kullanılan bir yöntemdir (Gerson and Zajic, 1979). İnert taşıyıcı

yüzeylerinde hücrelerin adsorpsiyonu, hücre immobilizasyonu için yaygın olarak kullanılmaktadır. Çok değişken yapılı taşıyıcı, hücre süspansiyonu ile karıştırılır ve hücreler, az veya çok yüzeye yapışır. Taşıyıcı, inert ve proses de, ilave kimyasallara gereksinim olmadığı için immobilizasyon, süspansiyon halinde hücrelerin bulunduğu aynı fizyolojik koşullar altında gerçekleştirilir. Adsorpsiyon ile immobilizasyonun en büyük avantajı, besin ve taşıyıcı materyaller arasında doğrudan temasın meydana gelmesidir. Yüksek hücre yükleme, mikro-gözenekli taşıyıcı materyaller kullanılarak elde edilebilir. Ancak gözenekli taşıyıcı materyaller, yüksek hücre yoğunluklarında partikül içi gözenek difüzyon sınırlamalarına neden olabilir. Yüksek hücre yükleme kapasitesini sağlamada gözenekli, partikül halindeki materyalin iç yüzeyinin yanı sıra dış yüzeyi de adsorpsiyon için girişe uygun olmalıdır. Bundan dolayı; gözenek çapı, büyük yüzey alanı oluşturmak üzere yeterince küçük, ancak diğer taraftan hücre penetrasyonunu sağlamak için yeterince büyük olmalıdır. Gözenek ile hücre çapı oranının 4-5 olması, gözenekli taşıyıcı partiküllerin iç yüzeyindeki hücre immobilizasyonu için önerilmektedir. Küçük gözenek boyutları; porların iç yüzeylerine besin girişini sınırlandırıcı faktör olabilir. Bundan dolayı, maksimum biyodönüşüm hızını sağlayan optimum gözenek büyüklüğü vardır (Messing et al., 1979).

Adsorpsiyon kapasitesi ve bağlanma şiddeti, uygun taşıyıcı materyal seçimini etkileyen iki önemli faktördür. Adsorpsiyon kapasitesi, 2 mg/g (gözenekli silika) ve 250 mg/g (odun parçacıkları) arasında değişir (Durand and Navarro, 1978). Gözenekli cam taşıyıcılar, 10^8 - 10^9 hücre/g adsorplama kapasitesine sahiptirler. Hücre ve taşıyıcı yüzeyler arasındaki bağlanma kuvvetleri, taşıyıcı materyalin yüzey özelliklerine ve hücrelerin tipine bağımlı olarak değişebilir (Messing et al., 1979).

Mineraller Üzerinde Adsorpsiyon: Mineral olarak toprak, mikroorganizmaların en önemli taşıyıcısıdır. Toprakta mikroorganizmaların immobilizasyon mekanizmaları komplekstir (Burns, 1979). Fermentasyon çalışmasında; silikon oksitler (cam, jel, seramik, kil), alüminyum oksitler (killer, jeller) ve kalsiyum fosfatlar (apatit) gibi çeşitli mineraller kullanılmaktadır. Titanyum, zirkonyum, alüminyum, vanadyum ve demir oksitleri, polimerik bileşikler oluşturmak üzere hidroksil köprüleriyle bağlı metalik elementlerin bulunduğu hidratlı yapılardır. Bu hidroksil köprülerinin bazıları, mikroorganizma hücre duvarına benzer bileşenler ile yer değiştirdiği zaman immobilizasyon meydana gelir (Kennedy, 1979). Bu immobilizasyon yönteminin; kolay hazırlanması ve pH aralığının esnekliği gibi bir çok avantajı da vardır (Kennedy et al., 1980).

Taşıyıcı olarak sulu titanyum oksitler, fizyolojik koşullar altında kolay hazırlanma ve iyi bağlanma avantajlarına sahiptir. Canlı hücreler, bu teknikle immobilize edilebilir. Oksit ve hücreler arasındaki etkileşim, hücreleri yüksek yüklemeye ve yüksek akış hızlarındaki yıkama etkisine karşı dirençli yapar. Silika (cam), seramikler, alümina ve mineral kordierit gibi diğer anorganik oksitler de adsorpsiyon taşıyıcıları olarak kullanılabilirler.

Polisakkaridler Üzerinde Adsorpsiyon: Çeşitli doğal formlardaki selüloz ve bir çok türevi, toksisitesinin bulunmaması, gerekli mekanik özellikleri, kolay bulunabilirlikleri ve yapısal-fonksiyonel grup modifikasyonlarının esnekliği nedeniyle mikroorganizmaların immobilizasyonu için uygundur. Selüloz türevleri, iyon değiştiriciler olarak etki ederler. Pek çok mikroorganizmanın negatif yüklü olması nedeniyle anyon değiştiriciler, adsorpsiyon ile immobilizasyonda tercih edilmektedir. Kayın ağacı

parçaları, şeker kamışı posası ve mısır, hücre adsorpsiyonunda taşıyıcı olarak tercih edilmektedir. Bu taşıyıcılarla immobilize hücrelerin aktivitesi veya fermentasyon ürün verimliliği artmaktadır. İlimli koşullar nedeniyle hücreler, genellikle metabolik olarak canlıdır ve yenilenebilmektedir. Ayrıca belirli pH ve sıcaklık aralığında iyi operasyonel stabiliteye sahiptir. Steroid transformasyonları, azot fiksasyonu ve etanol üretimi gibi genel uygulama alanları vardır (Atrat and Groh, 1981).

İyon Değiştirici Reçineler Üzerinde Adsorpsiyon: İmmobilizasyonda kullanılan polar olmayan adsorbantlar, hidrokarbon ve polistiren içermektedir. Adsorpsiyon yönteminin avantajları; işlemin basitliği, ılımlı koşulların kullanılması, yüksek hücre konsantrasyonu olasılığı, uzun süreli stabilite ve hücre yapısının ve ölü hücrelerin azaltılmasıdır. Ancak adsorpsiyon, genellikle spesifik değildir ve çözgenin iyonik yapısı ve pH a oldukça bağlıdır. Ayrıca yüklerin konfigürasyonu da adsorpsiyonda önemli rol oynayabilir (Seyan and Kirwan, 1979) .

1.3.3 Katı hal fermentasyonu (SSF)

Katı taşıyıcı olarak kullanılan inert veya inert olmayan substrat gibi doğal substratlardan yararlanılan serbest halde suyun hiç veya hemen hemen bulunmadığında meydana gelen bir fermentasyon prosesidir (Pandey et al., 2000). Tipik bir derin fermentasyonun su içeriği, %95 den daha fazladır. SSF de katı materyalin su içeriği, genellikle % 40 ile % 80 arasında değişmektedir. SSF ler, genellikle pirinç, buğday, arpa, mısır ve soya fasülyesi gibi besinler veya tarım ürünlerini kullanmaktadırlar. SSF lerin kendilerine has tek özellikleri, miselli organizmaların büyümesi için seçimli ortamı sağlayan düşük nem düzeylerinde çalışabilmeleridir. Pek çok katı-hal

fermentasyonu ile hücre dışı enzimler üretilmektedir. Bakteriler ve mayalar, düşük nem düzeylerini (su aktivitelerini) tolere edemedikleri için SSF de bakteri ve mayalar tarafından fermentasyon ortamının kontaminasyon riski, önemli ölçüde azaltılmaktadır. Derin fermentasyon sistemlerine karşı SSF lerin en büyük avantajları;

- Küçük hacimdeki fermentasyon materyali veya reaktör hacmiyle daha düşük sermaye ve çalışma maliyetine gereksinim duyulur.
- Düşük nem düzeyleri nedeniyle daha az kontaminasyon riski ortaya çıkar.
- Kolay ürün ayrımı sağlanır.
- Enerji etkinliğine ve bazı durumlarda ürün oluşumu için kritik önemi olan tamamiyle farklılaşmış yapıların gelişmesini sağlar.

SSF proseslerini etkileyen çeşitli faktörler vardır. Bunların arasından uygun suş ve substratın ve proses parametrelerinin (fiziksel, kimyasal ve biyokimyasal) seçimi önemlidir.

SSF prosesinde; katı substrat sadece mikrobiyal kültürün büyümesi için besinleri sağlamaz aynı zamanda hücrelerin bağlanma yeri olarak da etkili olur. Mikroorganizmaların büyümesi için ihtiyaç duyulan tüm besinleri sağlayan substrat, İdeal Substrat olarak tanımlanmaktadır.

SSF proseslerinde kullanmadan önce bazı substratların (örn; ligno-selülozikler) ön-muameleden geçirilmesi (kimyasal veya mekanik olarak) işlemde kolaylık sağlar. Böylece bu substratlar, mikrobiyal büyüme için çok kolaylıkla kullanılabilirler. Mikrobiyal büyüme ve aktivite için özellikle substrat, partikül boyutu ve nem düzeyi/su aktivitesi önemli faktörlerdir (Roussos et al., 1993; Auria et al., 1992; Smail et al., 1995; Pandey, 1991;

Selvakumar et al., 1996). Genel olarak küçük substrat partikülleri, mikrobiyal atak için daha büyük alan sağladığından avantajlı olabilirler. Ancak çok küçük substrat partikülleri; mikrobiyal solunum/havalandırma ile etkileşim durumunda substratın kümeleşmesine neden olabilir ve böylece daha az büyüme gerçekleşebilir. Aynı zamanda daha büyük partiküller, daha iyi solunum/havalandırma etkinliğini gerçekleştirir (iç partikül yüzeyinin artması nedeniyle) ancak mikrobiyal atak için sınırlı bir yüzey alanını sağlarlar.

SSF lerin en büyük dezavantajı, fermentasyon ortamında kontrol problemlerine (pH, sıcaklık, çözülmüş oksijen) yol açan zayıf karıştırma nedeniyle ortamın heterojen yapıda olmasıdır. Büyük hacimli fermentasyonlar için konsantrasyon gradientleri, düşük çalkalama hızlarında yok edilemez ve miselli hücreler, yüksek çalkalama hızlarında hasar görebilir.

Yarı-Katı Hal Koşulları; Az miktarda serbest halde sıvı varlığında katı materyaller üzerinde mikroorganizmaların büyümesi olarak tanımlanır. Bu tip kültürün çekiciliği; bir çok mikroorganizma yaşamının doğal şekline yakın olmasından ve basitliğinden ileri gelir (Pandey et al., 2000). SSF de kullanılan katı materyaller, iki sınıfa ayrılır:

1. İnert materyaller (mineral veya sentetik materyaller); sadece mikroorganizma için tutunma yeri olarak etki ederler. En önemlileri, Amberlit ve poliüretandır.
2. İnert olmayan doğal materyaller: Mikroorganizmalara tutunma yerinin yanı sıra bazı besinleri de sağlarlar. Bu ikili rolleri nedeniyle “destek substratlar” olarak adlandırılırlar. Bu durum, tüm organik materyaller (lignoselülozik veya nişastalı ürünler) için geçerlidir. Bu

materyaller, tüm işlemi daha ekonomik hale getirirken fungusa doğal habitatına (odun) yakın bir ortamı da sunarlar. Pek çok ülkede bol bulunan zirai atık olan mısır koçanı ve şeker kamışı posası bu tip materyallere en iyi örneklerdir.

Doğal substratlar, fermentasyon kinetik çalışmalarında problemler yarattığı için (heterojen yapısı nedeniyle) bu tip çalışmalar, sentetik inert katı substratlar kullanılarak gerçekleştirilmesi avantajlıdır.

Endüstriyel önemi olan proteazlar, sellüloz, ligninazlar, ksilanaz, pektinaz, amilaz, glukoamilaz gibi birçok enzim üretimi SSF de gerçekleştirilmektedir. SSF sistemleri kullanılarak inülinazlar, fitazlar, tannaz, fenolik asit esteraz, mikrobiyal rennet, aril-alkol oksidaz, oligo-sakkarid oksidaz, tannin açıl hidrolaz, α -L arabinofuranosidaz gibi ürünlerin üretimine yönelik çalışmalar yapılmaktadır (Pandey et al., 1999a; Balakrishnan and Pandey, 1996; Pandey et al., 1999b; Pandey and Radhakrishnan, 1993).

1.3.4 İmmobilize hücreler ile ligninolitik enzimlerin üretimi

Kesikli Sistemler

Mikroorganizmaların büyümesi belirli kurallara uyar. Bu nedenle bazı koşullar altındaki inkübasyonları esnasında; inkübasyon, uyum ve hızlanma fazı, logaritmik, geçiş, durağan ve ölüm fazlarına sahiptirler. Biyosentezler ve özellikle ikincil metabolit üretimi, durağan fazda meydana gelir.

Kesikli sistemlerde enzim üretimi amacıyla kullanılan daldırmalı biyoreaktörde, organizma tarafından işgal edilen yüzey düzenli olarak besi ortamına daldırılıp çıkarılmaktadır. Sistemin ayrıca havalandırılmasına da gerek yoktur. Tepsili reaktörde ise organizma daha geniş yüzey alanına sahip olmaktadır. Akışkan yataklı biyoreaktörde; immobilize hücrenin yoğunluğu substratın yoğunluğundan daha fazla olmalıdır. İmmobilize hücrede meydana gelebilecek deformasyon riski nispeten düşüktür.

İnert taşıyıcılarda immobilize edilen hücreler kesikli sistemde, SSF ye göre daha yüksek düzeyde ligninolitik aktivitenin üretilmesini sağlamaktadırlar (Çizelge 1.2) (Laugero et al., 1996, Herpoël et al., 1999, Rodríguez et al., 1999, Rodríguez Coutó et al., 2000, Domínguez et al., 2001, Rodríguez Coutó et al., 2001a, Rodríguez Coutó et al., 2001b, Rodríguez Coutó et al., 2002).

Çizelge 1.2 Kesikli sisteme göre farklı reaktör tiplerinde ligninolitik enzimlerin üretimi (—, incelenmemiş)

Taşıyıcı	Reaktör Tipi	Reaktör hacmi (L)	LiP (U/L)	MnP (U/L)	Lak (U/L)	Yılı
Naylon	Hava (bubble) kabarcıklı	2,5	600	3600	—	1996
Paslanmaz çelik	Hava	2,5	500	3400	—	1994
Paslanmaz çelik	kaldırmalı	100	2100	6600	—	
Naylon sünger	Statik	1	—	600	114	1999
Poliüretan köpük	Yatak	1	—	500	62	
Poliüretan köpük	Dolgu yatak	0,3	197	1371	95	2000
Naylon sünger		0,3	229	1593	48	
Mısır koçanı		0,3	232	346	63	
Naylon sünger	Dönen tambur	2	364	1350	56	2001
Polipropilen sünger	Statik yatak	1,5	194	154	0	2001
Polipropilen sünger	Daldırmalı	2,2	277	1477	0	
Mısır koçanı	Statik yatak	1	464	0	20	2001
Mısır koçanı	Statik yatak	0,5	774	0	62	
Mısır koçanı	Tepsili (koji)	1	400	292	0	
Naylon sünger	Daldırmalı	2,5	116	574	—	2002

Sürekli Sistemler

Sürekli sistemeler, ara verilmeksizin uzun süre devam edebilir ve genelde bu sistemlerde otomasyon daha kolaydır. Sürekli sistemlerde; substratın reaktörde alıkonma süresi sabit tutulursa reaktör içindeki substrat konsantrasyonu ve ürün konsantrasyonu da sabit olur. Bu tip sistemler “kemostat” olarak adlandırılırlar.

Bu prosesde; zamana karşı korunan yüksek aktivite değerleriyle birlikte stabil enzim üretimine gereksinim duyulur. *P. chrysosporium*'un katı hal kültivasyonu ile ligninolitik enzimlerin üretiminde karşılaşılan asıl problemlerden biri, kültür süresince meydana gelen aktivite kaybıdır. Sürekli sistemlerde, kesikli sistemlere göre daha düşük aktivite değerlerine sahip ligninolitik enzimler üretilir (Rodríguez Coutó et al., 2000, Domínguez et al., 2001, Rodríguez Coutó et al., 2002) (Çizelge 1.3). SSF biyoreaktörlerinde sürekli ligninolitik enzimlerin üretiminde; C/N oranı, oksijenlenme düzeyi, pH ve kullanılan taşıyıcının yapısı çok önemlidir.

Sürekli sistemlerde dolgu yatak reaktörü, özellikle küresel partikül formundaki hücreler için kullanılır. Reaktör yüksekliğine bağımlı basınç değişiminin gözlenmesi, kullanılan hücre boyutlarının küresellikten sapmasıyla orantılıdır.

Çizelge 1.3 Sürekli sisteme göre farklı reaktör tiplerinde ligninolitik enzimlerin üretimi (—, incelenmemiş)

Taşıyıcı	Reaktör Tipi	Reaktör Hacmi (L)	LiP (U/L)	MnP (U/L)	Lak (U/L)	Yılı
Poliüretan köpük	Dolgu yatak	0,3	255	782	30	2000
Naylon sünger	Dolgu yatak	0,3	100	400	40	
Mısır koçanı	Dolgu yatak	0,3	407	417	30	
Naylon sünger	Dönen Tambur	2	300	100	0	2001
Naylon sünger	Daldırmalı	2,5	132	60	—	2002

Yapılan çalışmalardan; inert olmayan bir taşıyıcı kullanıldığında kesikli sisteme göre sürekli sistemde daha fazla ligninolitik enzim üretildiği görülmektedir. Özellikle katı-hal koşullarında ligninolitik enzimlerin sürekli

üretimiyle ilgili az çalışma yapılmasının nedenleri (Lonsane et al., 1985; Durand et al., 1993; Marsh et al., 2000);

- ligninolitik enzimlerin üretiminde; misellerin aşırı büyümesi, misellerin etrafında polisakkaridlerin oluşması ve üretilen enzimleri deaktive eden bazı bileşiklerin (örneğin; proteazlar) salgılanması,
- mikroorganizma fizyolojisi ve gen mühendisliği bilgilerinin yetersiz olmasıdır.



2. MATERYAL ve METODLAR

2.1 Materyaller

2.1.1 Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallardan; nitrilotriasetat, DEAE-Sefaroz, Woodward's Reagent K (WRK), guaykol, Sigma Chemical Co (St. Louis, ABD); Agar/agar, pepton, Difco Laboratories; 2,6-dimetoksifenol, Aldrich Chem. Co. Gillingham-Dorset; ve diğer kullanılan tüm kimyasallar MERCK (F.Almanya) firmalarından temin edildi.

2.2.2 Mikroorganizma

Bu çalışmada lignin biyodegradasyonunda önemli role sahip ligninolitik enzimleri üretebilen *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 (ATCC 24725) suşu, stasyonere kültürlerde üretilerek kullanıldı.

2.1.3 Cihazlar

Çalışmada kullanılan tüm materyallerin sterilizasyonu için otoklavdan (Hiclave-HVE-50, Hirayama); kültür inkübasyonu için çalkalamalı inkübatörden (Stuart- Scientific) yararlanıldı. Enzimatik aktivite tayini için gerekli ölçümler, JASCO V-500 UV-VIS spektrofotometresi ile yapıldı. Ayrıca enzim ekstraktını deriştirmek amacıyla 10 kDa luk ultrafiltrasyon sistemi ve santrifüj (Hettich) kullanıldı.

2.2 Metodlar

2.2.1 *P. chrysosporium* BKMF-1767 (ATCC 24725) ortam ve kültivasyon koşulları

Bu çalışmada; ligninolitik enzimleri üretebilen *P. chrysosporium* BKMF-1767 (ATCC 24725) suşu kullanıldı. *P. chrysosporium*, azot sınırlı ortamda değişik indüktörler varlığında durağan (stasyoner) olarak kltive edildi (Tien and Kirk, 1984).

Çizelge 2.1 *P. chrysosporium*'un sporilasyon ortamı

Bileşen	Miktarı (g/L)
Glukoz	10
Malt ekstrakt	10
Pepton	2
Maya ekstrakt	2
Asparajin	1
KH ₂ PO ₄	2
MgSO ₄ .7 H ₂ O	1
Tiamin-HCl	0,001
Agar	20

Yatık kültürlerde spor retimi 37 °C de gerçekleştirilip steril su ile aseptik koşullarda süspanse edildi. Spor süspansiyonu, OD₆₅₀ de 0,500 absorbans verecek şekilde (5x10⁶ spor/ml) Thoma lamındaki sayıma göre ayarlandı.

Çizelge 2.2 *P. chrysosporium*'un büyüme ortamı

Bileşen	Miktar (ml/L)
Bazal III ortam ¹	100
%10 Glukoz	100
20 mM Asetat tamponu pH 4,5	100
Tiamin-HCl (100mg/l)	10
0,086 M Na-tartarat	12,5
0,086 M (NH ₄) ₂ SO ₄	12,5
Spor süspansiyonu	100
İz element çözeltisi ²	60
İndüktör ³	100
Steril su	405

Bazal III ortam¹: KH₂PO₄, 20 g/L; CaCl₂, 1 g/L; MgSO₄, 5 g/L; İz element çözeltisi², 100ml.

İz element çözeltisi²: MgSO₄, 3 g/L; MnSO₄, 0,5 g/L; NaCl, 1,0 g/L; FeSO₄.7H₂O, 0,1 g/L; CoCl₂, 0,1 g/L; ZnSO₄.7 H₂O, 0,1g/L; CuSO₄, 0.1 g/L; AlK(SO₄).12H₂O, 0,01 g/L; H₃BO₃, 0,01 g/L; Na₂MoO₄.2H₂O, 0,01 g/L; Nitrilotriasetat, 1,5 g/L.

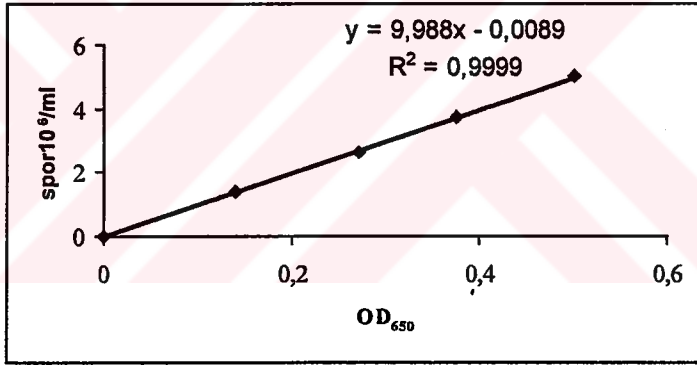
İndüktör³: Mn⁺², Tween 80, Mn⁺²+ Tween 80, PMSF.

2.2.2 Hücre miktar tayinleri

Hücre Sayımı

Elde edilen spor süspansiyonundaki başlangıç hücre sayısını bulmak için Thoma Lamı kullanıldı (Gürgün ve Halkman, 1988). Bu amaçla; OD₆₅₀ si 0,500; 0,375; 0,270; 0,140 absorbans olacak şekilde spor süspansiyonu seyreltildi. Thoma lamında sayım yapabilmek için OD₆₅₀ si 0,140 olan

örnekten 1/10 000 oranında tekrar seyreltme yapıldı. Seyreltmede %10 luk Asetik Asit çözeltisi kullanıldı. Bu konsantrasyondaki Asetik Asit, hücreleri birbirinden ayırarak kümeleşmeyi önlediği için kolay bir sayım yapılmasına yardımcı olur. Thoma lamının esası, $0,1 \text{ mm}^3$ hacimde sayım yapılmasıdır. Lamda 16 büyük kare, her büyük karede 25 küçük kare olmak üzere toplam 400 küçük kare vardır. Sayım bu karelerde yapılır. Thoma lamında sayım sonucu; $A \times SF \times 10\ 000$ formülü ile hesaplanır. Burada A, 16 büyük karede sayılan hücre sayısı; SF, seyreltme faktörü; 10 000 ise sabit sayıdır. Thoma lamında sayım sonucu; OD_{650} 'si 0,500 absorbansı olan spor süspansiyonunda, 5×10^6 spor/ml bulundu (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Thoma lamında *P. chrysosporium* başlangıç hücre sayımı

Kuru Kütle Tayini

Beyaz çürükçül fungus olan *P. chrysosporium* durağan faz kültürlerinde hücre miktarları, kuru kütle tayinine göre saptandı. Hücre süspansiyonu uzaklaştırıldıktan sonra oluşan misel, darası alınmış tartım kaplarına alınarak 105°C de sabit tartıma gelinceye kadar etüvde bekletilip son tartım alındı.

2.2.3 Aktivite tayinleri

Mangan Peroksidaz (MnP) Aktivitesi

Elde edilen kültürlerdeki MnP aktivitesi; Mn(II) iyonları varlığında 2,6-dimetoksifenolün oksidasyon hızının saptanmasıyla ölçülmesine dayanır. Ortama H_2O_2 eklenmesiyle başlayan reaksiyonun 469 nm'deki absorbansının lineer artışı 3 dakika boyunca izlenir ($\epsilon = 27\ 500\ sM^{-1}cm^{-1}$). Bir ünite (U) enzim aktivitesi, 1 dakika boyunca 1 μ mol 2,6-dimetoksifenolü dönüşüme uğratan MnP miktarı olarak tanımlanır (Kuwahara et al., 1984).

Çizelge 2.3 MnP enzim aktivitesi tayin yöntemi

Bileşen	Kör (ml)	Örnek (ml)
Enzim	—	0,20
0,25 M Na-tartarat tampon pH 4,5	0,80	0,60
20 mM 2,6-dimetoksifenol	0,05	0,05
20 mM $MnSO_4 \cdot H_2O$	0,05	0,05
4 mM H_2O_2	0,10	0,10

Protein Tayini

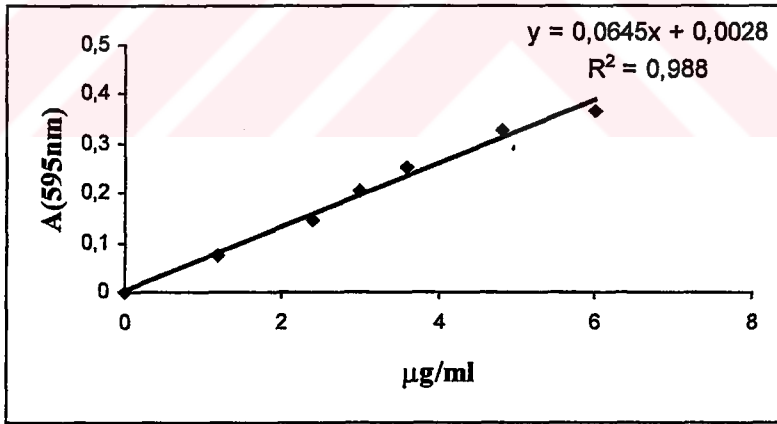
Protein miktarları, standart olarak sığır serum albumini (BSA) kullanılarak Bradford yöntemine göre saptandı. Yöntem; organik boyaların asidik ve bazik gruplarıyla renk oluşturmasını esas alır. Boya bağlamaya dayalı yöntemlerin en yaygını, Bradford tarafından geliştirilen ve Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının kullanıldığı yöntemdir. Coomassie Brilliant Blue G-250 (100 mg), 50 ml %95 lik etanolde çözöldü. Bu çözeltiye, 100 ml % 85

(w/v) fosforik asit ilave edildi. Son hacim, 1 litreye tamamlandı (Bradford, 1976).

Çizelge 2.4 Bradford yöntemi

Bileşen	Standart (ml)	Kör (ml)	Örnek (ml)
Destile su	—	0,1	—
Standart çözelti	0,1	—	—
Enzim örneği	—	—	0,1
Bradford	1,0	1,0	1,0
Reaktifi			

Tüpler karıştırılıp, 2 dk oda sıcaklığında bekletilir ve 595 nm de absorbans okunur.



Şekil 2.2 Bradford yöntemine göre protein kalibrasyon grafiği

Proteaz Aktivite Tayini

Proteaz aktivitesi, substrat olarak Azocoll kullanılarak ölçüldü. 1 ünite, 520 nm deki absorbansda 0,001/dk değişime neden olan azo boyanın salıverilmesini katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlanır (Dosoretz et al., 1990).

Çizelge 2.5 Proteaz aktivite tayini

Bileşen	Miktar (ml)
20 mM Asetat tamponu pH 4,5	1,5
Enzim örneği	0,5
Tüpler karıştırılıp 39 °C de 5 dk inkübasyon	
12,5 mg/ml Azocoll çözeltisi	1,0
40°C de 60 dk inkübasyon	
%10 Trikloroasetik asit (w/v)	2,0
5 000 rpm de 10 dk santrifüj sonrası 2 ml süpernatant,	
0,5 N NaOH	2,0
Tüpler karıştırılıp 520 nm de absorbans okunur.	

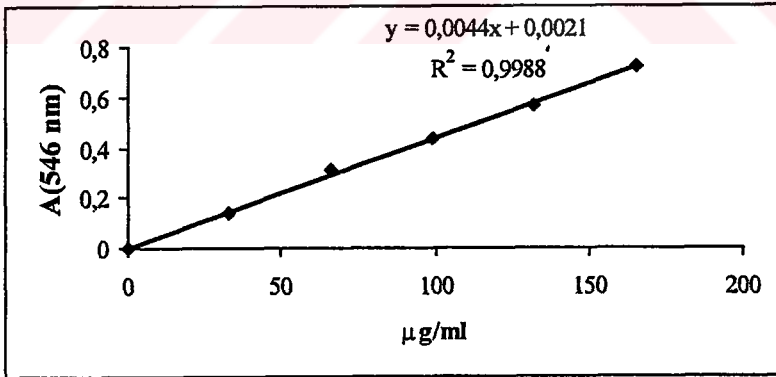
Glukoz Tayini

Büyüme ortamında karbon kaynağı olarak kullanılan glukoz, standart olarak glukoz monohidrat kullanılarak Dinitrosalisilik asit yöntemiyle ölçüldü (Ghose, 1987). Bu yöntem, indirgenmiş şeker olarak adlandırılan serbest karbonil grubu (C=O) nun varlığını test etmektedir ve glukozda aldehid fonksiyonel grubunun oksidasyonunu içermektedir. Glukozun oksidasyonu esnasında; 3,5-dinitrosalisilik asit (DNS), bazik koşullarda 3-amino-5-nitro-salisilik aside indirgenmektedir.

Renk Reaktifi: 1 g 3,5- dinitrosalisilik asit, 20 ml 2N NaOH de çözüldü. Bu çözeltiye, 30 g Na-K tartaratın 50 ml saf suda çözülerek hazırlandığı çözelti ilave edildi ve son hacim 100 ml'ye tamamladı.

Çizelge 2.6 Glukoz tayini

Bileşen	Standart (ml)	Kör (ml)	Örnek (ml)
Destile su	—	0,5	—
Standart çözelti	0,5	—	—
Enzim örneği	—	—	0,5
Renk Reaktifi	0,5	0,5	0,5
Karıştırma, 100°C lik su banyosunda 10 dk inkübasyon, oda sıcaklığına soğutma			
Destile su	5,0	5,0	5,0
Karıştırma sonrası köre karşı 546 nm'de absorbands okunur.			



Şekil 2.3 Glukoz tayini kalibrasyon grafiği

Azot Tayini

Azot içeriği, standart olarak $(\text{NH}_2)_4\text{SO}_4$ kullanılarak Fenol-Hipoklorid yöntemiyle saptandı (Weatherburn, 1967). Yöntemde; bazik ortamda amonyak ve oksitleyici reaktifler fenol ve hipoklorid arasında meydana gelir. Oluşan mavi renk, indofenol boyalarının rengine benzer ve yoğunluğu da amonyak konsantrasyonuyla orantılıdır.

Fenol Reaktifi; A ve B çözeltilerinden eşit hacimde karıştırılarak hazırlandı

A= 1 g fenol, 10 ml saf suda çözüldü

B= 25mg Na-nitroprussid, 50 ml saf suda çözüldü.

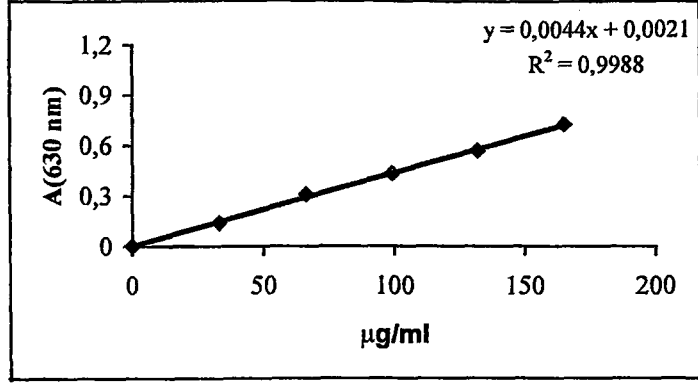
Alkali Hipoklorid Reaktifi; A ve B çözeltilerinden eşit hacimde karıştırılarak hazırlandı.

A= 5 g NaOH, 100 ml saf suda çözüldü.

B= 26 g/L NaOCl içeren ticari Hipoklorid çözeltisi

Çizelge 2.7 Azot tayini

Bileşen	Standart (ml)	Kör (ml)	Örnek (ml)
Destile su	—	2,0	—
Standart çözelti	2,0	—	—
Enzim örneği	—	—	2,0
15 dk 25°C de inkübasyon			
Fenol Reaktifi	0,5	0,5	0,5
Alkali-hipoklorid Reaktifi	0,5	0,5	0,5
Karıştırma, 60°C'lik su banyosunda 5dk inkübasyon sonrası köre karşı 630 nm'de absorbans okunur.			



Şekil 2.4 Azot tayini kalibrasyon grafiği

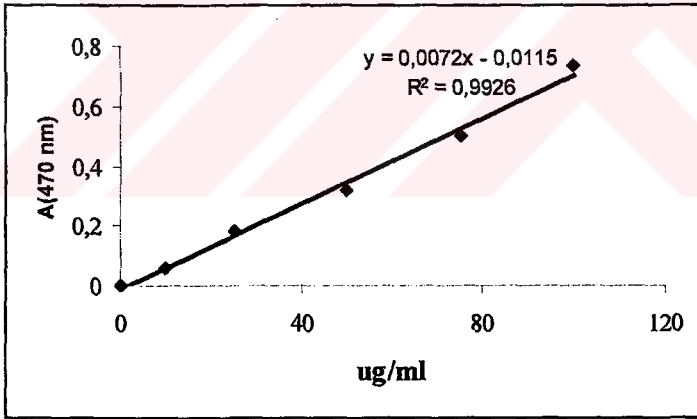
Karbohidrat Tayini

Yarı asetal veya yarı ketal formundaki monosakkaridler ve maltoz tipi disakkaritler indirgen özellik gösterirler. Bu karbohidratlar birçok yükseltgen tarafından oksitlenirken sakkaroz gibi trehaloz tipi disakkaritler etkilenmezler. Karbohidrat tayininde yaygın olarak kullanılan Fenol-Sülfürik asit yöntemidir. Bu yöntemde; derişik mineral asitler karbohidratlardan su çekerek furan aldehydleri açığa çıkarırlar. Furan aldehydleri de fenoller ile karakteristik boyar maddeler oluştururlar(Saha and Brewer, 1994).

Çizelge 2.8 Karbohidrat tayini

Bileşen	Standart (ml)	Kör (ml)	Örnek (ml)
Destile su	—	1,0	—
Standart çözelti	1,0	—	—
Enzim örneği	—	—	1,0
% 5 Fenol çöz.	1,0	1,0	1,0
der.H ₂ SO ₄	5,0	5,0	5,0

Karıştırma, 20 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 470 nm’de absorbands okunur.



Şekil 2.5 Karbohidrat tayini kalibrasyon grafiği

2.2.4 Polistiren köpük üzerinde hücre adsorpsiyonu

Spor Süspansiyonunun Hazırlanması

P. chrysosporium'un yatık kültürlerde 6 gün 37 °C de spor üretimi gerçekleştirildikten sonra steril su ile aseptik koşullarda süspanse edildi. Spor süspansiyonu OD₆₅₀ de 0,5 absorbans verecek şekilde ayarlandı.

P. chrysosporium Spor Formu ile İmmobilizasyon

Hücre immobilizasyonunda taşıyıcı olarak;

Amberlit IR 45,	Purolit CI 275,
Polistiren Köpük,	Purolit MN 500,
Eupergite C,	Polipropilen,
Eupergite C 250 L,	Perlit (70 mesh altı),
Kaba kepek	Coco-peat (35 mesh altı ve üstü),

kullanıldı.

Bu taşıyıcılardan; Amberlit IR 45, gözenekli, bazik bir anyon değiştiricidir. Anyonik reçine, polistiren-divinilbenzen matriksinden oluşmuştur ve kimyasal ataklara dayanıklıdır.

Eupergite C ve Eupergite C 250L taşıyıcılar N,N^l-metilen-bis metakrilamid, metakrilamid ve oksiran içeren monomerlerin kopolimerizatıdır ve immobilizasyon, oldukça ılımlı koşullarda kolaylıkla gerçekleştirilebilir. Taşıyıcıların sahip oldukları oksiran grupları üzerinden hücrenin adsorpsiyonu gerçekleşmektedir.

Perlit, silika taşıdır ve % 2-6 oranında su içerir. Doğal cam formunda olduğundan kimyasal olarak inert şeklinde adlandırılır.

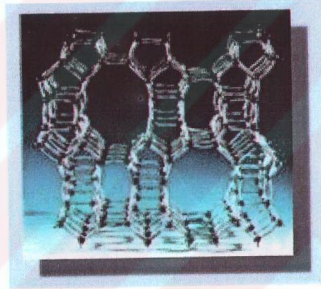
Purolit, makroporöz stiren-divinilbenzen yapısında iyon değişim reçinesidir.

Polistiren Köpük; köpük oluşumu, polistiren granüllerin genişlemesiyle başlar. % 6-7 oranında n-pentan'ın difüzlendiği 500-800µm çapına ulaşır. Polimer, cam geçiş sıcaklığının üzerinde ısıtıldığında granüller istenen ölçekte genişlemeye başlar. Genişleyen boncuklarının genişlemeyen boncuklarının hacmine oranı 5-10 arasındadır. Cam geçiş sıcaklığının üzerinde ısıtıldığında (200-260 °C) genişleyen boncuklar kalıba enjekte edilirler. Boncukların genişlemesi; pentan içeriği ve kalıp sıcaklığı gibi faktörlere bağımlıdır. Polistiren köpüklerin mikroskobik düzeyde köpük yapısı kapalı boncuklardan oluşur. Hücresel yapı, her bir boncuğun içinde mevcuttur. Köpük oluşum mekanik özellikleri, boncuklar arasındaki füzyon genişliğine bağılıdır. Genişletilmiş polistiren % 90 havadan oluşur. Elde edilen materyal, inert ve hidrofobik yapıdır (Rossacci and Shivkumar, 2003). Taşıyıcı olarak kullanılan inert materyaller, kültivasyon süresince homojen aerobik koşulun sağlanmasına yardımcı olurlar (Aidoo et al;1982).

İnert taşıyıcı polistiren (poli(1-feniletilen)) köpük boncukları (3-4 mm çapında), 121 °C, 20 dakika otoklavlanarak hazırlandı.

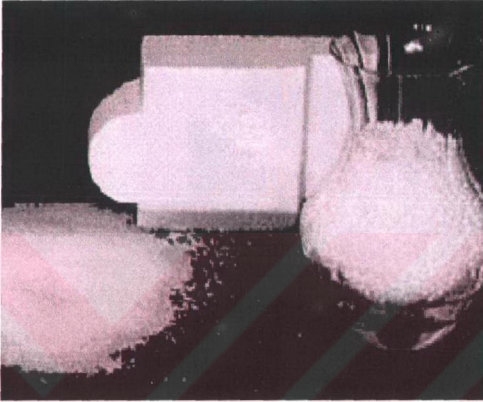


(a)



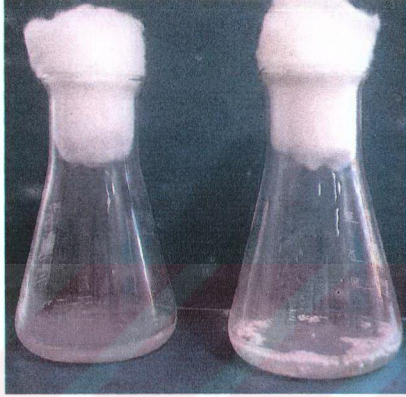
(b)

Şekil 2.6 Stirenden polistiren eldesi (a) ve polistiren yapısı (b)



Şekil 2.7 İmmobilizasyonda kullanılan polistiren köpük

İmmobilizasyon (taşıyıcı materyal üzerine hücrelerin adsorpsiyonu), steril edilmiş (121 C, 20 dk) 1 gram taşıyıcıyı içeren 100 ml' lik erlenlerde 5 ml spor süspansiyonu (5×10^6 spor/ml) varlığında 37 C ve 50 rpm de gerçekleştirildi. Şekil 2.8 de; 37 C de durağan olarak 5 gün inkübe edilen serbest ve immobilize hücreler görülmektedir.



Şekil 2.8 37°C de durağan olarak 5 gün inkübe edilen serbest ve immobilize hücreler

Misel Süspansiyonunun Hazırlanması

Bu amaçla; sporilasyon ortamından elde edilen sporlar ($OD_{650}=0,500$) normal büyüme ortamına aşılandı. 37°C ve karanlıkta 48 saat durağan fazda inkübe edilerek misel oluşumu sağlandı. Oluşan miseller, ayrıldıktan sonra geride kalan büyüme ortamı hacmi kadar % 09 NaCl çözeltisi ilave edildi ve değişen sürelerde (0,5; 1; 2 dk) blender'da (Waring) homojenize edilerek birbirlerinden ayrılmalari sağlandı.

***P. chrysosporium* Misel Formu ile İmmobilizasyon**

İmmobilizasyon; steril edilmiş 1 gram taşıyıcıya elde edilen misel homojenatından 5 ml ilave edilerek 37°C ve 50 rpm de gerçekleştirildi.

2.2.5 Polistiren köpük üzerinde immobilize *P.chrysosporium*'dan MnP üretimi

Erlenlerde Üretim

P. chrysosporium'dan MnP enzimi, 100 ml'lik erlenlerde indüktör içeren 10 ml büyüme ortamı bileşiminde 37°C de durağan olarak üretildi. Bu amaçla; Mn^{+2} , Tween 80, azot, gliserin konsantrasyonlarının, PMSF, oksijen, pH ve sıcaklığın etkileri incelendi.

Biyoreaktörde Üretim

Standart koşullarda polistiren köpükte spor immobilizasyonuna takiben 10 ml büyüme ortamı içeren 100 ml lik erlenlerde durağan olarak 3 gün 37°C de inkübe edilen immobilize hücreler, kafes içine yerleştirildi. 0,5 L büyüme ortamı içeren 1 L lik modifiye daldırmalı biyoreaktör içine daldırıldı ve büyüme ortamı sürekli karıştırıldı. Erlenlerde üretimde optimize edilen büyüme ortamı bileşenleri varlığında başlangıç glukoz konsantrasyonunun; MnP ve biyokütle üretimine etkileri incelendi.

2.2.6 İmmobilize *P.chrysosporium*'dan MnP enziminin izolasyonu,

kısmi saflaştırılması ve molekül ağırlığının tayini

P. chrysosporium, optimize edilen koşullarda, taşıyıcı polistiren köpük üzerinde 37 °C ve 50 rpm de 2 saat inkübe edilerek immobilize edildi. İmmobilize *P. chrysosporium* kültürlerinin 10 ml hacimde 100'er ml'lik erlenlerde 37°C de indüktör olarak Tween 80 varlığında inkübasyonun altıncı günündeyken, ekstrasellüler sıvı toplandı ve ortamdaki miselleri uzaklaştırmak için +4°C ve 5000 rpm'de 5dk süre ile santrifüjlendi. MnP aktivitesi, 420 U/L olarak ölçüldü. Ekstrasellüler enzimi deriştirme amacıyla

10 kDa'luk membran kullanılarak ultrafiltrasyon işlemi yapıldı ve enzim aktivitesi, 672,5 U/L olarak bulundu. Deriştirme işlemi sonrası ilk saflaştırma basamağında; ekstrasellüler sıvıdaki proteinler, % 45 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile $+4^\circ\text{C}$ de çöktürüldü. Proteinler, $+4^\circ\text{C}$ ve 15 000 rpm de 15 dk santrifüjlenerek ayrıldı ve enzim aktivitesi 600,8 U/L olarak saptandı. Elde edilen enzim örneği, 50 mM Na-tartarat tamponu pH 4,5 ile $+4^\circ\text{C}$ de dengelenmiş anyon değıştirici DEAE-Sepharose ($1,6 \times 25$ cm) kolonuna uygulandı. Enzim, 0,5 ml / dk akış hızında 2,5 ml hacimlerde 50-250 mM Na-tartarat tamponu pH 4,5 ve ardından 0,2-1,0 M NaCl gradientlerinde fraksiyonlandı. MnP fraksiyonları 10 kDa'luk ultrafiltre ile deriştirilerek Ultragel AcA 54 ($1,6 \times 90$ cm) jel filtrasyon kolonuna uygulandı.

Jel Filtrasyon Kolon Kromatografisi

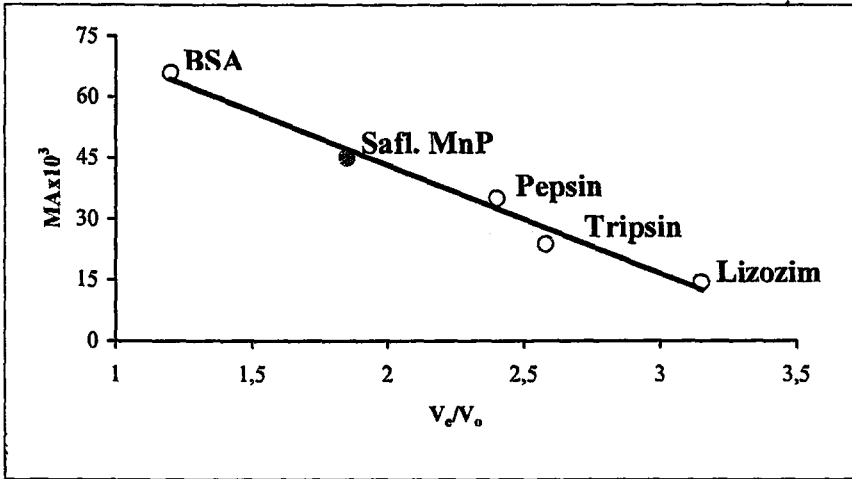
Jel filtrasyon kromatografisi, molekül büyüklüğüne bağımlı bir ayırımı gerçekleştirmektedir. Yöntemin temel prensibini, proteinlerin, poröz yapılı durağan faz ile hareketli faz arasında dağılımı oluşturmaktadır. Fraksiyonlanma olayı, kolonda paketlenmiş porlu jel matriks ve çözgen aracılığıyla gerçekleşir. Kolona uygulanan proteinler, porların boyutundan çok büyük ise kolonu ilk olarak terk eder. Küçük moleküller ise jel matriks porlarına girmekte ve burada alıkonmaktadır. Bunu izleyen basamakta, porlar tarafında tutulan küçük moleküller difüzyon ile ayrılmakta ve hareketli fazın akışı aracılığıyla ortamdan uzaklaştırılmaktadır. Böylece, proteinler azalan molekül ağırlıklarına bağımlı olarak kolondan elüe olmaktadır (Harris and Angal, 1993).

MnP'in molekül ağırlığı, 50 mM Na-tartarat pH 4,5 tamponuyla dengelenmiş Ultragel AcA 54 jel filtrasyonu kolonu ($1,6 \times 90$ cm)

kullanılarak saptandı. Kolonda moleköl ağırlık standartları olarak sığır serum albumini (66 000 Da), pepsin (35 000 Da), tripsin (23 800 Da) ve lizozim (14 388 Da) kullanıldı.

Ultrigel AcA 54, yaklaşık % 40 jel hacmine karşılık gelen 50 mM Na-tartarat tampon pH 4,5 hacminde süspansiyeye edildi ve ardından yavaşça karıştırılarak çözünmüş hava uzaklaştırıldı. Tek bir adımda jel, kolona boşaltıldı ve aynı tampon ile +4°C'de dengelendi. Ultrigel AcA 54 jel filtrasyonu kolonunun boş hacmini bulmak amacıyla blue dekstran (1mg/ml) kullanıldı. 5 mg/ml BSA, 2,5 mg/ml pepsin, 2 mg/ml tripsin ve 2 mg/ml lizozim içeren her bir örnekten 2ml, kolona uygulandı. Proteinlerin ayrımı için kolonda optimum akış hızı 2,5 ml / 12 dk olarak belirlendi.

P.chrysosporium MnP örneği de aynı koşullarda kolona uygulandı. Kolondan toplanan fraksiyonlardaki protein miktar değişimleri, 280 nm'de incelendi. Saflaştırılan MnP'nin moleköl ağırlığı, kalibrasyon grafiğinden $45000 \pm 1\,000$ Da olarak bulundu (Şekil 2.9).



Şekil 2.9 Ultragel AcA 54 jel filtrasyon kolon kromatografisinin molekül ağırlık kalibrasyon grafiği (---) saflaştırılan MnP

Elektroforetik Yöntem

SDS-poliakrilamid jel elektroforezi, düşey (vertikal) slab jel aparatı kullanılarak Laemmli yöntemine göre gerçekleştirildi (Laemmli, 1970).

Akrilamid/Bis Akrilamid (% 30; %2,67, stok)

146g Akrilamid, 4g N,N'-Metilen-bis Akrilamid, 500 ml destile suda çözüldü, ardından süzüldü ve karanlıkta +4°C de depolandı.

1,5M Tris-HCl, pH 8,8

54,45 g Tris-baz, 150 ml destile suda çözüldü, pH 8,8 e ayarlandı ve ardından hacim, 300 ml ye tamamlandı. +4°C de depolandı.

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8

6 g Tris-baz, 60 ml destile suda çözüldü, pH 6,8 e ayarlandı ve ardından yavaşça karıştırılarak son hacim, 100 ml ye tamamlandı. +4°C de depolandı.

%10 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) (w/v)

10g SDS, 60ml destile suda yavaşça karıştırılarak çözüldü ve son hacim 100 ml ye tamamlandı.

%10 Amonyum persülfat (w/v)

100mg amonyum persülfat, 1ml destile suda çözüldü ve her denemede taze olarak hazırlandı.

Örnek Tamponu (SDS indirgeyici tampon: 62,5mM Tris-HCl, pH 6,8 , %20 Gliserin, %2 SDS, %5 β -merkaptoetanol)

Çizelge 2.9 SDS-PAGE Örnek Tampon Bileşenleri

Bileşen	Miktar(ml)
Destile su	3,0
0,5M Tris-HCl, pH 6,8	1,0
Gliserin	1,6
%10 SDS	1,6
β -Merkaptoetanol	0,4
%0,5 Bromfenol blue (w/v) (suda)	0,4

Örnekler, 1:2 oranında örnek tamponuyla seyreltildi ve 95°Cde 5dk bekletildi.

5× Elektrod Tamponu (1×=25 mM Tris, 192 mM Glisin, %0,1 SDS, pH 8,3)

45g Tris-baz, 216g Glisin ve 15g SDS, 3L destile suda çözüldü ve +4°Cde karanlıkta depolandı. Bu 5 × Elektrod tamponunun 300 ml si, 1,2 L destile su ile seyreltildi ve bir elektroforez denemesinde kullanıldı.

Jel Hazırlanması:

% 4 ve % 12 lik süreksiz elektroforez jeli hazırlandı.

Çizelge 2.10 SDS-PAGE Jel Bileşenleri ve Miktarları

Bileşen	%12 için miktar (ml)	%4 için miktar (ml)
Akrilamid/bis akrilamid (stok)	40,0	1,3
Destile su	33,5	6,1
1,5M Tris-HCl, pH 8,8	25,0	—
0,5M Tris-HCl, pH 6,8	—	2,5
%10 SDS (w/v)	1,0	0,1
%10 Amonyum persülfat	0,5	0,05
TEMED	0,05	0,01
Toplam Monomer	100 ml	10 ml

SDS-elektroforez molekül ağırlık standartları olarak; sığır serum albumini (66 000 Da), ovalbumin (45 000 Da), pepsin (34 700 Da), Tripsinojen (24 000 Da), β -laktoglobulin (18 400 Da) ve lizozim (14 300 Da) kullanıldı. Molekül ağırlık protein standartları, modifiye daldırmalı biyoreaktör ham ekstrasellüler sıvısı, anyon değiştirici kolon kromatografisi sonrası ve jel filtrasyon kolon kromatografisi sonrası enzim örnekleri, örnek tamponunda çözüldü ve 95°C'de 5 dk inkübe edilerek denatüre edildi.

Elektroforez; % 12 ayırıcı ve % 4 istifleyici jeller ile süreksiz yöntemle göre oda sıcaklığında, 125 voltajda gerçekleştirildi. Jel, bir gece Coomassie Brilliant Blue R-250 ile boyandı ve ardından boya uzaklaştırıldı.

2.2.7 İmmobilize *P.chrysosporium* tarafından üretilen MnP enziminin karakterizasyonu

İmmobilize hücreden üretilen MnP nin substrat spesifikliğı, enzimatik ve kinetik özellikleri incelendi. Bu amaçla; enzimin; pH ve sıcaklığa bağımlı aktivite ve stabilite değışimi araştırıldı. Tartarat, okzalal, maleat, sitrat ve asetat gibi bazı karboksilik asitlerin, Mn^{+2} Mg^{+2} Ca^{+2} Cu^{+2} Fe^{+2} Ni^{+2} gibi metal iyonlarının ve bazı kimyasal maddelerin (NaN_3 , nitrilotriasetat, askorbik asit, β -merkaptotanol, KCN, PMSF ve DTT iyodoasetamid, NBS ve WRK), iyon şiddetinin enzim aktivitesine etkisinin yanı sıra MnP nin depolama kararlılığı incelendi ve V_{max} ve K_m değerleri saptandı.



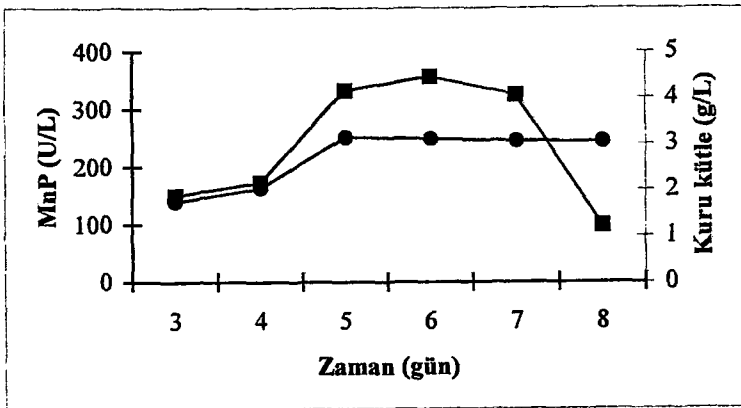
3. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

3.1 MnP Aktivite Tayin Yönteminin Belirlenmesi

Enzimin aktivite tayinine, pH 4,5 u sağlayacak farklı tampon türünün etkisi incelendi. Bu amaçla; 250 mM dimetil-süksinat, Na-asetat ve Na-tartarat tamponları (pH 4,5) hazırlandı. Hazırlanan bu tampon sistemleriyle bir seri MnP enzim aktivite tayini gerçekleştirildi ve en yüksek enzim aktivite değerine, 250 mM Na-tartarat tamponu (pH 4,5) ile ulaşıldı. Elde edilen sonuçlara göre; çalışmada MnP enzim aktivite tayininde bu tampon sistemi kullanıldı.

3.2. *Phanerochaete chrysosporium*'un İmmobilizasyonu

P.chrysosporium immobilize edilmeden önce serbest hücrenin büyüme eğrisi belirlendi. Şekil 3.1 de, serbest hücre ile maksimum MnP üretimine 6 günde ulaşıldığı gösterilmektedir.



Şekil 3.1 Serbest hücre büyüme eğrisi. (-■-), MnP aktivitesi; (-●-) kuru kütle

3.2.1 Spor immobilizasyonu

Spor süspansiyonu OD₆₅₀ de 0,500 (5×10^6 spor/ml) absorbans verecek şekilde seyreltilti. İmmobilizasyon sterilize edilmiş (121 °C, 20 dk.) taşıyıcıları içeren 100 ml lik erlenlerde kontrollü çalkalamalı olarak gerçekleştirildi. 1 gram taşıyıcı üzerine 5 ml spor süspansiyonu (5×10^6 spor/ml) ilave edilerek 2 saat, 37 °C ve 50 rpm de inkübe edildi ve adsorplanan hücre miktarları saptandı.

Çizelge 3.1 *P. chrysosporium* immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılar ve adsorplanan hücre miktarı

Taşıyıcı	Adsorpsiyon (%)
Amberlit IR 45	72,5
Eupergite C	34,1
Eupergite C 250 L	9,1
Perlit (70 mesh altı)	46,4
Purolit CT 275	8,0
Purolit MN 500	21,9
Polipropilen	10,4
Polistiren köpük	86,4
Coco-peat (35 mesh altı)	36,3
Coco-peat (35 mesh üstü)	59,8
Kaba kepek	23,7

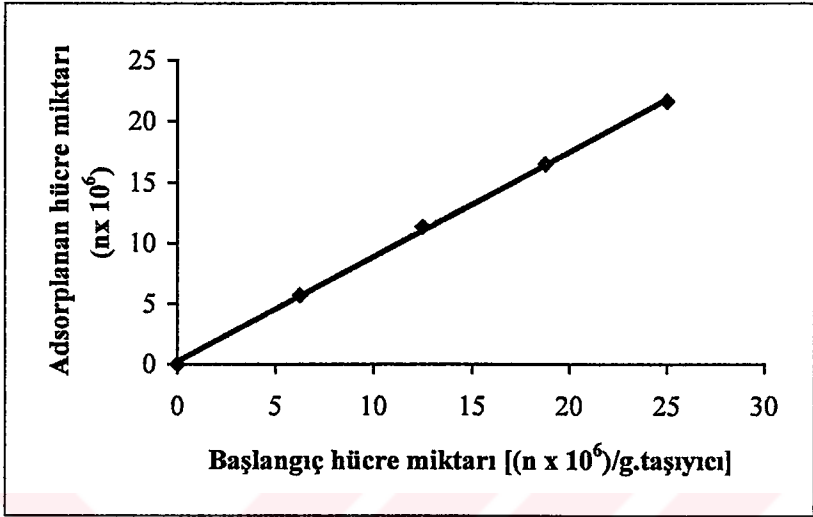
Çizelge 3.1'den elde edilen sonuçlara göre *P. chrysosporium* hücrelerinin immobilizasyonu için bağlanma yüzdesi en yüksek olan polistiren köpük daha sonraki çalışmalar amacıyla uygun taşıyıcı olarak seçildi. *P.chrysosporium* immobilizasyonunda taşıyıcı olarak polistiren granüllerin

genişletilmesiyle oluşan polistiren köpük kullanımı şimdiye kadar rapor edilmemiştir.

Guimaraes ve arkadaşları (2002); poli (vinilklorr), paslanmaz elik, poliüretan köpük ve sünger (Scotch-Brite) gibi katı taşıyıcıların yüzey hidrofobisitesi veya hidrofilitesi ile immobilize *P. chrysosporium* miktarı arasında bir ilişki olmadığını ve ayrıca taşıyıcı morfolojisinin önemli olduğunu gösterdiler (Guimaraes et al., 2002). Çizelge 3.1'den; *P. chrysosporium* adezyonu için makro-gözenekli iyon değişim reçine taşıyıcılarında hidrofobitenin daha etkili olduğu görülmektedir.

Başlangıç Hücre Miktarının Etkisi

Spor immobilizasyonuna, başlangıç spor miktarının etkisi araştırıldı. Bu amaçla; OD₆₅₀ de 0,100-0,500 arasında değişen konsantrasyonlardaki 5 ml spor süspansiyonu, 1 gram steril edilmiş polistiren köpük ile 37 C ve 50 rpm de 2 saat inkübe edildi. Bu inkübasyon süresi sonunda da taşıyıcıya bağlanmamış olan spor konsantrasyonu OD₆₅₀ okunarak saptandı (şekil 3.2).

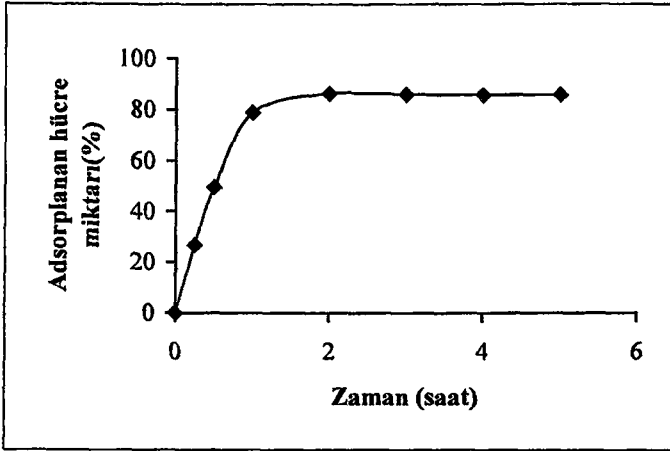


Şekil 3.2 *P. chrysosporium*'un başlangıç hücre miktarına bağımlı birim taşıyıcı başına adsorplanan hücre miktarı.

Şekil 3.2'de de görüldüğü gibi; çözeltideki başlangıç hücre miktarının artmasıyla adsorplanan hücre miktarı da artmaktadır. Birim taşıyıcı ağırlığı başına adsorplanan hücre sayısı, çalışılan $0-25 \times 10^6$ hücre aralığında adsorplanmadan geride kalan hücre konsantrasyonuna birinci dereceden bağımlılık göstermektedir. İstenen hücre yüklenmesi, aşı süspansiyonundaki başlangıç hücre miktarı değiştirilerek elde edilebilir.

İnkübasyon Süresinin Etkisi

Spor ile hücre immobilizasyonuna, inkübasyon süresinin etkisi de incelendi. Zamana bağımlı hücre immobilizasyonunda, OD_{650} de 0,500 absorbansı olan 5 ml spor süspansiyonu standart 1 gram steril edilmiş polistiren köpük 0-5 saat arasında değişen sürelerde 37°C ve 50 rpm de inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda taşıyıcıya bağlanmamış olan spor konsantrasyonu OD_{650} okunarak saptandı (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 *P. chrysosporium*'un birim taşıyıcı miktarı başına adsorplanan hücre miktarına inkübasyon süresinin etkisi

Şekil 3.3 den; polistiren köpük yüzeyine adsorplanan hücre miktarı (%), immobilizasyon süresine bağımlı olduğu görülmektedir. Elde edilen verilerden; serbest ve immobilize hücreler arasında bir dengeye yaklaşık 2 saat sonra ulaşıldığı ve bağlanma oranının ise yaklaşık % 86,4 olduğu saptandı.

Çalkalama Hızının Etkisi

Polistiren köpük üzerinde *P. chrysosporium* immobilizasyon koşullarında işlem, 37°C ve 2 saatlik farklı çalkalama hızlarında gerçekleştirildiğinde; çalkalama hızı arttıkça adsorplanan hücre miktarının (%) da azaldığı görüldü (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2 *P. chrysosporium*'un adsorplanan hücre miktarına (%) çalkalama hızının etkisi

Çalkalama hızı (rpm)	Adsorplanan hücre miktarı (%)
50	86,38
75	19,12
100	7,3

Polistiren köpük üzerinde *P. chrysosporium* immobilizasyon koşullarında işlem; 39 °C, 75 rpm de tekrarlandığında, adsorplanan hücre yüzdesinin çok fazla düştüğü gözlemlendi. Organizmanın optimum büyüme sıcaklığının dışına çıkmamak için immobilizasyonda, 37 °C kullanıldı. Spor formunda hücre immobilizasyonunda, 37°C, 50 rpm ve 2 saatlik inkübasyon süresi optimum immobilizasyon koşulları olarak belirlendi.

Mekanik olarak çalkalama; kültürlerde miseller üzerine kayma etkisi oluşturduğundan ligninolitik enzim üretimine inhibitör etkili olarak bilinmektedir (Kirk et al., 1978). Bundan dolayı, polistiren köpük kullanarak durağan immobilize hücre kültürü, MnP üretimi için tercih edildi. Ayrıca fungal hücrelerin immobilizasyonu; hem mitokondriyal solunumu hem de salgılama sistemini (endoplazmik retikulum ve golgi aparatı) uyarmaktadır (Bonnarme et al., 1991).

Adsorpsiyon Kinetiği

Şekil 3.2 deki deneysel sonuçlarla, difüzyon kinetiklerinden elde edilen bir model kullanılarak adsorpsiyon kinetikleri tanımlanabilir. Oluşan adsorpsiyon ara yüzeyindeki hücre konsantrasyonu,

$$C = C_0 + K \sqrt{t}$$

denklemini izler. Bu denklemden;

C_0 , başlangıç hücre konsantrasyonu,

C , t süre sonraki hücre konsantrasyonu,

K , bir sabittir.

Buradan elde edilen matematiksel model ise;

$$X_a/X_1 = k_0 \sqrt{t} + k_1 t$$

X_a , t sürede adsorplanmış hücre miktarı,

X_1 , adsorplanmış maksimum hücre miktarı,

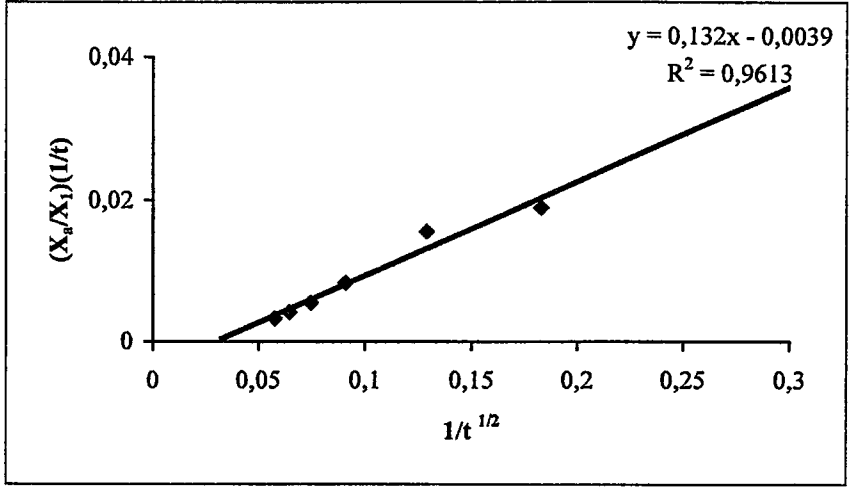
k_0 , sabit (başlangıç adsorpsiyon hız sabiti)

k_1 , sabit (zamana bağlı adsorpsiyon değişim sabiti).

Bu modelin geçerliliği, (X_a/X_1) $(1/t)$ ile $1/t^{1/2}$ arasında çizilen grafikten saptandı ve k_a ve k_1 sabit değerleri bulundu.

Çizelge 3.3 Deneysel sonuçlardan elde edilen adsorpsiyon kinetik değerleri

Süre (dk)	$1/\sqrt{t}$	X_a	X_a/X_1	$(X_a/X_1)(1/t)$
30	0,18	$12,40 \cdot 10^6$	0,574	$18,94 \cdot 10^{-3}$
60	0,13	$19,71 \cdot 10^6$	0,913	$15,52 \cdot 10^{-3}$
120	0,09	$21,60 \cdot 10^6$	1,000	$8,33 \cdot 10^{-3}$
180	0,08	$21,51 \cdot 10^6$	0,996	$5,54 \cdot 10^{-3}$
240	0,06	$21,45 \cdot 10^6$	0,993	$4,14 \cdot 10^{-3}$
300	0,06	$21,40 \cdot 10^6$	0,991	$3,30 \cdot 10^{-3}$



Şekil 3.4 *P.chrysosporium* adsorpsiyon kinetik değerleri

$$\text{Eğim} = k_0 = 0,132 \text{ dk}^{-1/2}$$

$$k_1 = -0,0039 \text{ dk}^{-1}$$

$$(X_a / X_1) (1/t) = k_0 (\sqrt{t} / t) + k_1$$

$$(X_a / X_1) (1/t) = 0,132 (\sqrt{t} / t) - 0,0039$$

k_1 sabit değerinin negatif olması, zamanla adsorpsiyon hızının azaldığını gösterir.

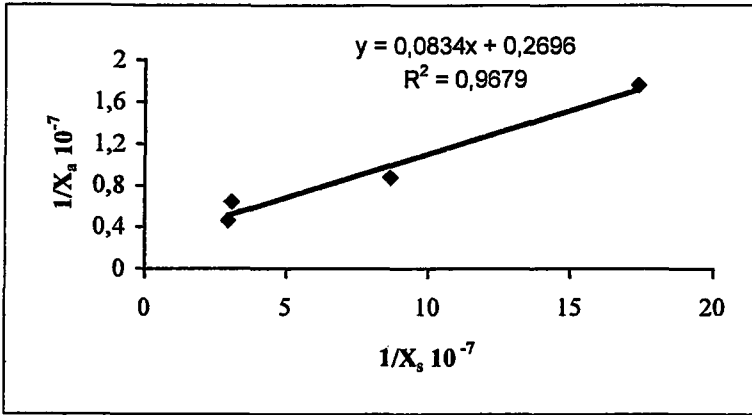
Langmuir adsorpsiyon izotermiyle analog olarak, dengedeki mikrobiyal hücre adsorpsiyonu aşağıdaki model ile tanımlanabilir:

$$X_a = X_l / [1 + (1/k_a X_s)]$$

X_s , süspansiyondaki serbest hücre miktarı,

k_a , mikroorganizma/taşıyıcı afinite sabiti.

Oluşturulan bu modelin geçerliliği için, Şekil 3.3 deki deneysel veriler kullanılarak $1/X_s$ ve $1/X_a$ arasında oluşturulan grafikten;



Şekil 3.5 *P.chrysosporium* adsorpsiyonunun Langmuir izotermi

$$X_1 = 3,71 \cdot 10^7$$

$k_a = 3,23 \text{ dk}^{-1}$ olarak bulundu.

Bu çalışmadan elde edilen deneysel sonuçlar, *P.chrysosporium* adsorpsiyonunun Langmuir izotermi izlediğini göstermektedir.

3.2.2. Misel İmmobilizasyonu

Hücre immobilizasyonu, *P.chrysosporium*'un misel formu için de tekrarlanarak koşullar optimize edildi. Bu amaçla; steril edilmiş 1 gr taşıyıcıya 5 ml misel homojenatı ilave edildi ve 2 saat, 37°C ve 50 rpm de inkübe edilerek adsorplanan hücre miktarı (%) saptandı.

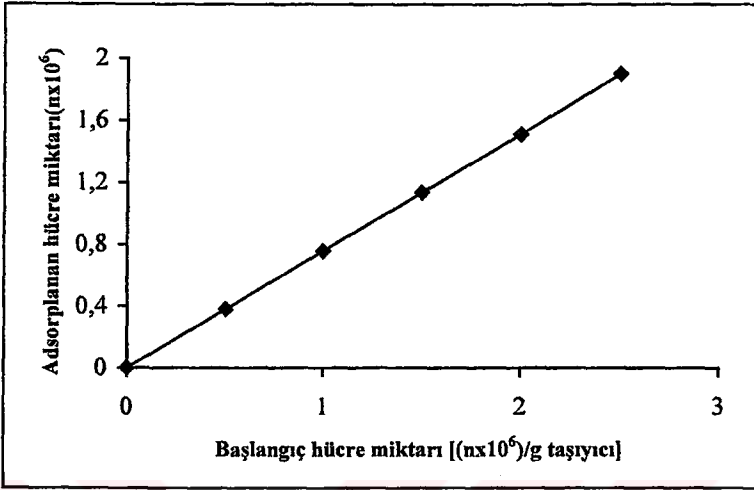
Çizelge 3.4 *P. chrysosporium*'un birim taşıyıcı miktarı başına adsorplanan hücre miktarı (%) (1 dk homojenize edilen misel kullanılarak)

Taşıyıcı	% Adsorplanan hücre miktarı
Polistiren köpük	76,0
Purolit CT 275	5,3
Purolit MN 500	2,1
Amberlit IR 45	14,4
Polipropilen	11,6
Coco-peat (35 mesh altı)	20,4
Coco-peat (35 mesh üstü)	27,8
Perlit (70 mesh altı)	18,1

0,5 ve 2 dk süreyle homojenize edilen misellerle immobilizasyonlar, sadece taşıyıcı olarak polistiren köpük kullanılarak aynı koşullarda gerçekleştirildi ve sırasıyla % 59,3 ve % 49,2 adsorplanan hücre miktarı saptandı. Misel formu ile immobilizasyon sonuçlarına göre; homojenizasyon süresi, 1 dk ve taşıyıcı olarak polistiren köpük kullanılmasına karar verildi.

Başlangıç Hücre Miktarının Etkisi

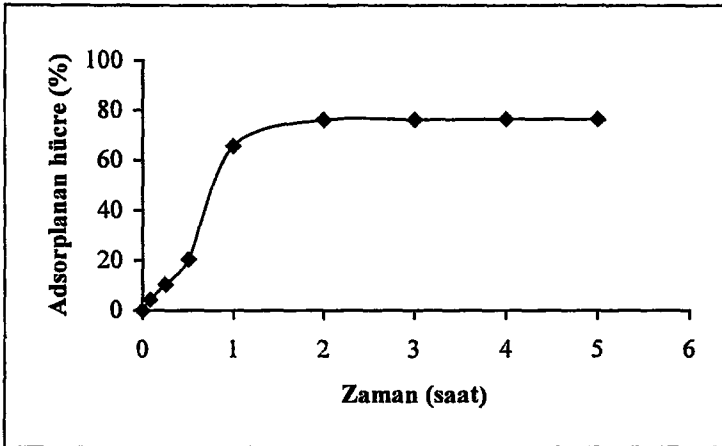
Misel formu ile immobilizasyonda; immobilizasyon süresinin ve başlangıç hücre miktarının etkisi incelendi. Farklı misel konsantrasyonlarını elde etmek amacıyla; 1/5, 2/5, 3/5, 4/5 ve 5/5 oranlarında 5 ml homojenize misel çözeltisi hazırlandı. 1 gram steril polistiren köpük üzerine ilave edilip 37 °C ve 50 rpm de 2 saat inkübe edildi (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 *P. chrysosporium*'un başlangıç hücre miktarına bağlı gram taşıyıcıda adsorplanan hücre miktarı.

İnkübasyon Süresinin Etkisi

Zamana bağlı immobilizasyonda ise; 1 g steril polistiren köpük ve 5 ml homojenize misel, 0-5 saat gibi değişen sürelerde 37°C ve 50 rpm de inkübe edildi (Şekil 3.7).



Şekil 3.7 *P. chrysosporium*'un gram taşıyıcıda adsorplanan hücre miktarına inkübasyon süresinin etkisi.

Misel formu ile immobilizasyonda; çalkalama hızı 75 rpm'e çıkarıldığında, % adsorplanan hücre miktarında bir azalma gözlemlendi.

% 0,09 luk NaCl çözeltisinde gerçekleştirilen misel homojenizasyon ortamına, verimliliği arttırmak amacıyla % 0,05 (v/v) olacak şekilde Tween 80 ilave edilerek işlem tekrarlandı. Oluşan homojenize misel formu ile yine aynı koşullarda gerçekleştirilen immobilizasyon sonrasında taşıyıcı adsorpsiyon verimliliğinin değişmediği gözlemlendi.

P.chrysosporium'un spor ve misel immobilizasyon sonuçlarından optimum immobilizasyon koşulu; taşıyıcı olarak polistiren köpüğün kullanıldığı OD₆₅₀ de 0,500 absorbansa sahip 5 ml spor süspansiyonu ortamında 37°C sıcaklık ve 50 rpm de 2 saatlik inkübasyon süresi olarak belirlendi.

3.3 Stasyonere Kültürlerde MnP Üretimi

İmmobilize *P.chrysosporium*'dan MnP enzimi, 100 ml lik erlenlerde indüktör olarak Tween 80 içeren 10 ml büyüme ortamı bileşiminde 37°C de durağan fazda üretildi. Stasyonere kültürlerde maksimum enzim üretimine 6. günde ulaşıldı (bakınız Şekil 3.10).

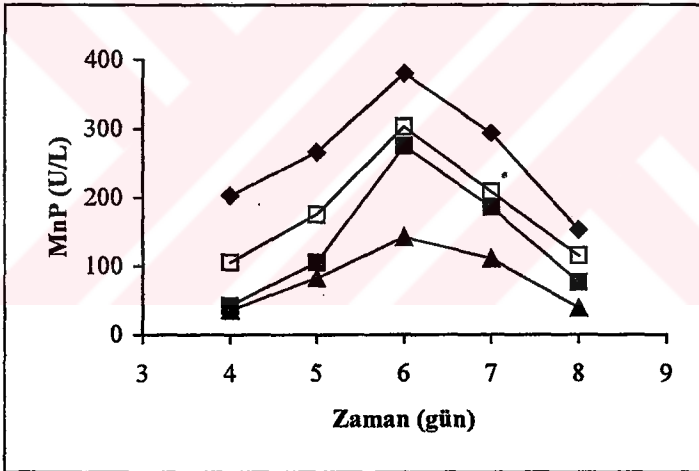
3.4 MnP Enzim Üretimine Etki Eden Faktörler

Mikrobiyal büyüme ve enzim üretimi için mikroorganizmanın pH, sıcaklık gibi fiziksel ve karbon, azot, kükürt, fosfor kaynakları, eser elementler, oksijen gibi kimyasal gereksinimleri vardır.

İmmobilize *P.chrysosporium* tarafından maksimum MnP enziminin üretilmesinde değişen Mn^{+2} konsantrasyonun, Oksijenin, Tween 80 ve proteaz inhibitörlerinin etkileri incelendi.

3.4.1 Mn^{+2} konsantrasyonunun etkisi

P.chrysosporium büyüme ortamında 100, 354 ve 424 μM Mn^{+2} konsantrasyonunun MnP enzim aktivitesine etkisi incelendi ve sonuçlar, 174 μM Mn^{+2} konsantrasyonunun bulunduğu normal büyüme ortamındaki değerleri ile karşılaştırıldı (Şekil 3.8).



Şekil 3.8 *P. chrysosporium*'un 100 μM (-□-); 174 μM (Normal büyüme ort.) (-◆-); 354 μM (-■-); 424 μM (-▲-) varlığında zamana bağımlı MnP aktivite değişimi

Elde edilen sonuçlara göre; *P. chrysosporium*'un normal büyüme ortamında bulunan 174 μM Mn^{+2} konsantrasyonunun, MnP üretimi için yeterli olduğu görülmektedir. Ayrıca 380 U/L lik maksimum MnP üretimine kültürün 6. gününde ulaşılmaktadır. Ortama Mn^{+2} nin ilavesi, MnP

aktivitesini arttırdı. Mn^{+2} , MnP nin substratı olduğundan etkisi, substrat düzeyinde indüksiyondur (Lestan et al., 1990).

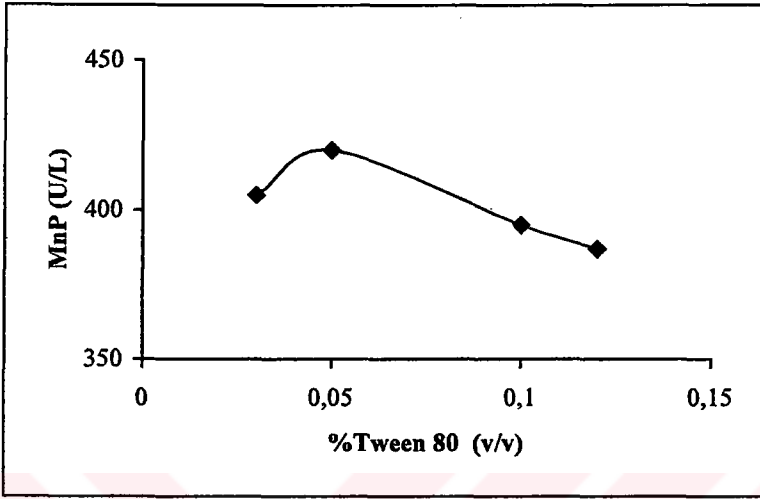
3.4.2 Oksijen etkisi

Aerobik solunum yapan organizmaların metabolik sistemleri için oksijen gereklidir. Özellikle moleküler oksijen (O_2) besinlerden daha fazla enerji eldesinde önemlidir.

Ligninolitik enzim MnP üretimine oksijenin etkisini incelemek amacıyla; immobilize *P. chrysosporium* büyüme ortamından aşılardan hemen sonra ve büyümenin 3. gününde 1dk süre ile 1,2 Mpa konsantrasyonunda oksijen geçirildi. Zamana bağımlı MnP enzim aktivitesi ve kuru kütle değerleri izlendiğinde, oksijenin olumlu bir katkı sağlamadığı gözlemlendi. Oksijen konsantrasyonunun artmasıyla, ligninolitik kültürlerde polisakkarid üretiminin artabileceği ileri sürülmektedir (Bonnarme and Asther,1993; Dosoretz et al., 1990).

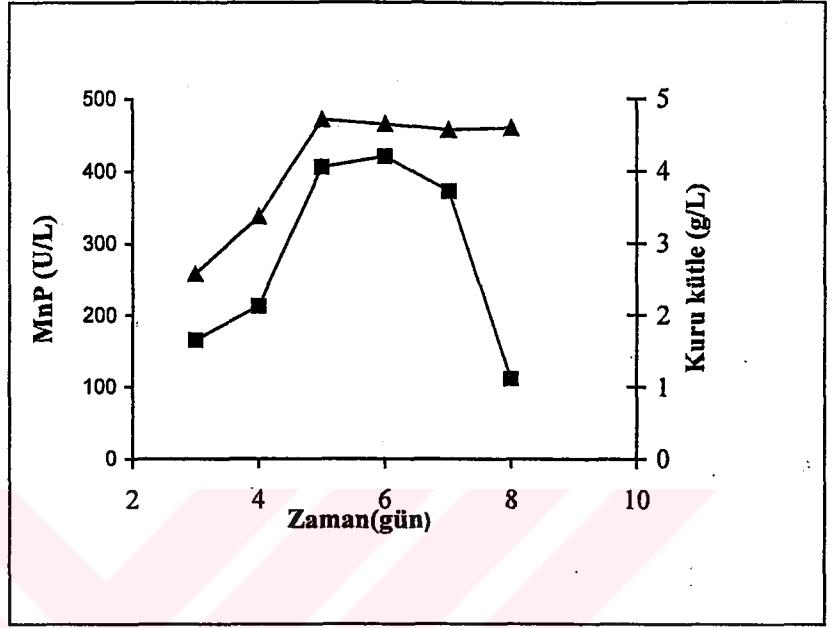
3.4.3 Tween 80'in etkisi

İmmobilize *P. chrysosporium* büyüme ortamına % 0,03-0,12 (v/v) konsantrasyonunda Tween 80 ilave edildi (Şekil 3.9).



Şekil 3.9 *P.chrysosporium* büyüme ortamında %Tween 80 (v/v) miktarına bağımlı MnP aktivite değişimi

Beyaz çürükçül fungus kültürlerine çeşitli deterjanların, özellikle Tween 80 ilavesinin, ligninolitik aktiviteyi uyardığı bilinmektedir. Bu amaçla, 174 μm Mn^{+2} içeren immobilize *P. chrysosporium* büyüme ortamına % 0,05 oranında Tween 80'in ilavesi, MnP enzim aktivitesini uyardı. Zamana bağımlı olarak immobilize *P. chrysosporium* kültürlerinde MnP enzim aktivitesi ve biyokütle miktarı izlendi (Şekil 3.10).



Şekil 3.10 *P. chrysosporium* Büyüme ortamında Tween 80 varlığında MnP (-■-) ve kuru kütle (-▲-) miktarının zamanâ bağımlı değişimi

Şekil 3.10'dan görüldüğü gibi; 421 U/L'lik maksimum MnP aktivitesine % 0,05 Tween 80 varlığında inkübasyonun 6. gününde ulaşıldı. Ortama Tween 80 konmamış örnek de ise MnP aktivitesi 218,03 U/L olarak saptandı.

Büyüme ortamında Tween 80'in bulunması, MnP enzim aktivitesinin yanı sıra stabilitesini ve fungusun kuru kütlelerini de artırdı (4,71 g/L). Ancak, deterjanların ligninolitik aktiviteyi uyarmasına yönelik mekanizma, tam olarak saptanamamıştır. Olası mekanizmanın, fungusun lipid metabolizmasındaki değişim veya stoplazmik membranının modifikasyonundan meydana gelebileceği ileri sürülmektedir (Dosoretz et al., 1990; Asther et al., 1987; Asther et al., 1988). Böylece Tween 80, hücre

membran yapısını dönüşüme uğratmakta ve ortama MnP geçişini arttırmaktadır.

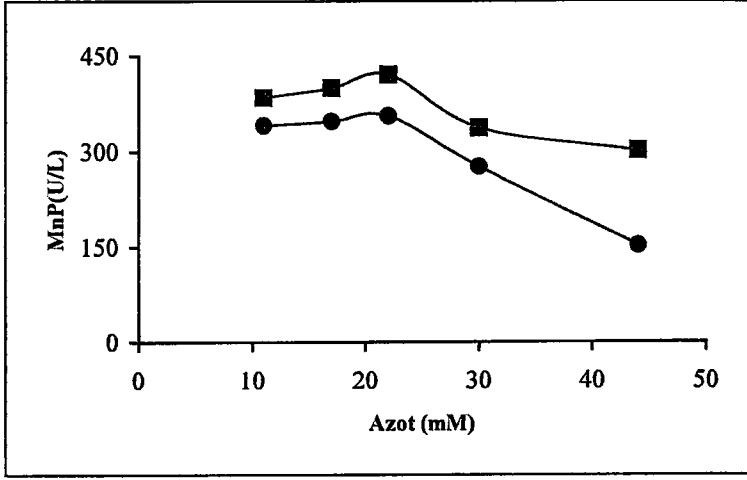
İmmobilize *P. chrysosporium* tarafından MnP enzim üretimi Tween 80 varlığında arttığı için % 0,05 oranında Tween 80 ve 354 μM lık Mn^{+2} konsantrasyonu birlikte büyüme ortamına kondu. MnP aktivitesinin ve kuru kütle miktarının zamana bağımlı değişiminde önemli bir farklanma gözlenmedi.

3.4.4 Fenil Metil Sülfonil Florür (PMSF)'ün etkisi

Büyüme ortamında ligninolitik enzim aktivitesinin zamana bağımlı artış veya azalışın, ortamdaki proteaz aktivitesinden ve dolayısıyla glukoz tüketimindeki artış ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (Dosoretz et al., 1990). Proteazlar genelde azot sınırlı ortamlarda indüklenebilmektedir. Bu nedenle, MnP immobilize *P. chrysosporium* büyüme ortamına proteaz inhibitörleri ilavesinin MnP enzim üretimine etkisi incelendi. Bu amaçla, *P. chrysosporium* büyüme ortamındaki son konsantrasyonu 0,1 mM olacak şekilde serin proteaz inhibitörü Fenil Metil Sülfonil Florür (PMSF), kültürasyonun 3. ve 5. günleri ilave edildi. PMSF nin, ham hücre dışı sıvıda ligninaz aktivitesine karşı inhibitör etkili olmadığı rapor edilmektedir (Bonnarme and Asther, 1993). Büyümenin 6. gününde incelenen MnP aktivite ve kuru kütle değerlerinden, PMFS'nin olumlu bir etkisinin olmadığı saptandı. Herhangi bir proteaz inhibitörünün konmadığı *P. chrysosporium* büyüme ortamında proteaz aktivitesi 0,6 U/L gibi çok düşük değerlerde bulundu.

3.4.5 Azot konsantrasyonunun etkisi

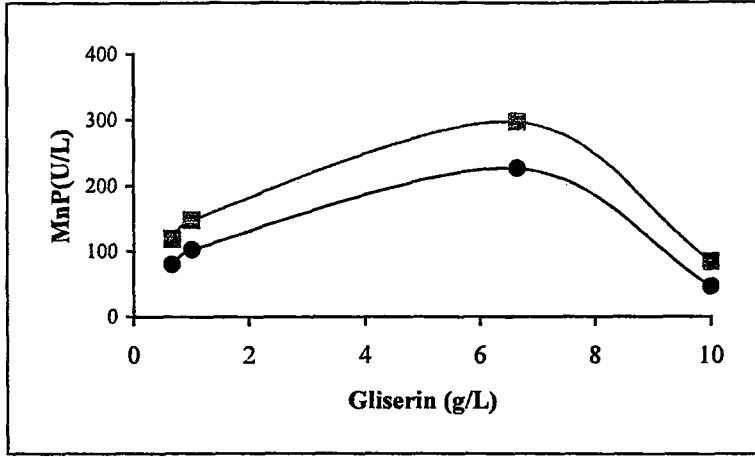
Beyaz çürükçül fungus *P.chrysosporium*, azot sınırlı büyüme ortamı koşullarında ligninolitik enzimleri üretmektedir (Tien and Kirk, 1984). Bu nedenle *P.chrysosporium* büyüme ortamı bileşenlerinden azotun konsantrasyonu, MnP enzim üretimini etkilemektedir. Azot konsantrasyonunun (11-44 mM) etkisi, serbest ve immobilize hücrelerin varlığında 10 ml büyüme ortamı içeren 100 ml lik erlenlerde durağan koşullarda 37 °C de incelendi. Şekil 3.11 den görüldüğü gibi; inkübasyonun 6. günündeki serbest ve immobilize hücrelerin standart aktivite ölçüm koşullarında ölçülen MnP aktivitesi, 22 mM Azot konsantrasyonunda maksimuma ulaşmaktadır. Ayrıca, 44 mM lık yüksek azot konsantrasyonundan serbest hücreler, immobilize hücrelere göre daha çok etkilenmekte ve bunun sonucunda enzim aktivitesi önemli ölçüde azalmaktadır. Bu çalışmadan da görüldüğü gibi; azot gibi elementler, mikroorganizmaların hücresel materyallerinin sentezi için gereklidir. Örneğin protein sentezinde önemli miktarlarda azota ihtiyaç duyulur. Ayrıca DNA ve RNA sentezinde de azot ve fosfor kullanılmaktadır. Organizmalar; proteinleri oluşturan amino asitlerin amino grubunu oluşturmak üzere temel olarak azot kullanırlar (Tortora et al., 2002). Genelde hücre kuru ağırlığının yaklaşık %10'u azottan meydana gelmektedir. Bu nedenle; büyüme ortamı bileşiminde azot konsantrasyonu arttıkça organizma enzim üretimi yerine biyokütle üretimini artıracaktır.



Şekil 3.11 Serbest (-●-) ve immobilize (-■-) hücreler tarafından ortam azot konsantrasyonuna bağımlı MnP üretimi

3.4.6 Gliserin konsantrasyonunun etkisi

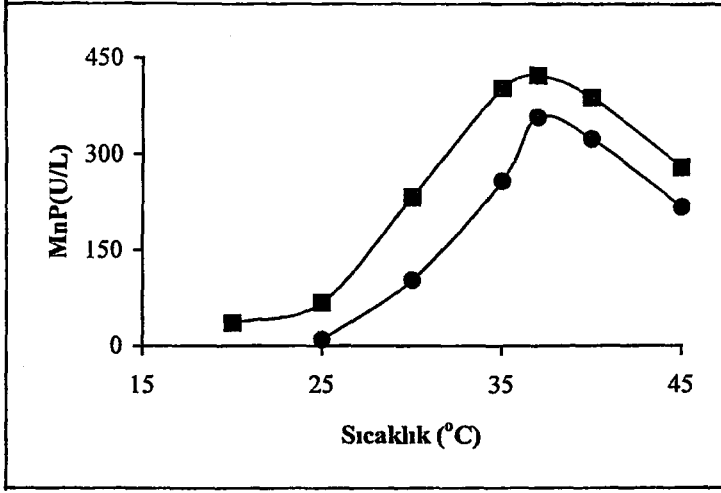
Gliserin konsantrasyonunun (0,665-10 g/L) etkisi, serbest ve immobilize hücrelerin varlığında 10 ml büyüme ortamı içeren 100 ml lik erlenlerde durağan kültürlerde 37 °C de incelendi. Şekil 3.12 den görüldüğü gibi; inkübasyonun 6. günündeki serbest ve immobilize hücrelerin standart aktivite ölçüm koşullarında ölçülen MnP aktivitesi, 6,65 g/L Gliserin konsantrasyonunda maksimuma ulaşmaktadır. Bu nedenle; normal büyüme ortamında bulunan glukoz (10 g/L), karbon kaynağı olarak seçildi (Tien and Kirk, 1984).



Şekil 3.11 Serbest (●) ve immobilize (■) hücreler tarafından ortam gliserin konsantrasyonuna bağımlı MnP üretimi

3.4.7 Sıcaklığın etkisi

Sıcaklık, mikroorganizmanın büyümesini ve enzim üretimini etkileyen önemli faktörlerden biridir. Mikroorganizmaların en iyi büyüme gösterdikleri sıcaklık, optimum büyüme sıcaklığıdır. Daha yüksek sıcaklık değerlerinde, büyüme hızı azalır. Bu durum, yüksek sıcaklıkta hücre enzimatik sistemlerinin inaktive olmasından kaynaklanmaktadır (Tortora et al., 2002). Sıcaklığın etkisi, serbest ve immobilize hücrelerin varlığında 10 ml büyüme ortamı içeren 100 ml lik erlenlerde durağan kültürlerde incelendi. Şekil 3.13'den görüldüğü gibi; inkübasyonun 6. günündeki serbest ve immobilize hücrelerin standart ölçüm koşullarında ölçülen MnP aktivitesi, 37°C ye kadar artmakta ve ardından azalma eğilimi göstermektedir. Yapılan her iki örnekte de maksimum MnP aktivitesine 37°C de ulaşılmaktadır.



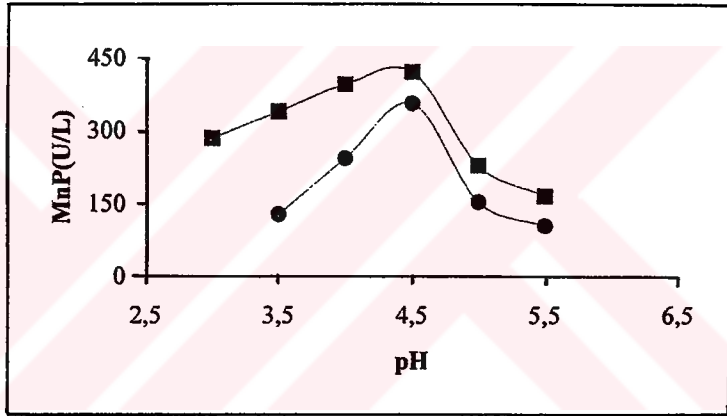
Şekil 3.13 Serbest (-●-) ve immobilize (-■-) hücrelerde sıcaklığa bağımlı MnP üretimi

3.4.8 pH'nın etkisi

Mikroorganizmanın fizyolojisini ve enzim üretimini etkileyen bir diğer faktörde pH'dır. pH, sadece enzim aktivitesini etkilemez aynı zamanda dönüşümlü ve dönüşümsüz inaktivasyona neden olarak katalitik protein konformasyonunda değişimlere de sebep olabilir. pH'nın etkisi, serbest ve immobilize hücrelerin varlığında 10 ml büyüme ortamı içeren 100 ml lik erlenlerde durağan kültürlerde incelendi. Şekil 3.13 den görüldüğü gibi; inkübasyonun 6. günündeki serbest ve immobilize hücrelerin standart aktivite ölçüm koşullarında ölçülen MnP aktivitesi, pH 4,5'a kadar artmakta ve ardından azalma eğilimi göstermektedir. Ancak pH 3,0 ile 4,5 arasında, immobilize hücrelerin MnP aktivitesi, serbest hücrelerinkine göre daha yüksek değerdedir. Bu durum immobilize hücrelerin düşük pH'lara ve bazı difüzyonel sorunlara karşı daha stabil olduğunu göstermektedir. Ayrıca

immobilizasyon ile ortamdaki hücre sayısı, serbest hücrelere göre başlangıç aşamasında daha fazladır.

Mikroorganizmaların büyümesinin yanı sıra enzim üretimleri için optimum pH değerleri vardır. Optimal büyüme pH sı, sadece hücre dışı ortam pH sının göstergesidir. Hücre içi pH ise hücredeki asidik- veya bazik-kararsız makromoleküllerin yıkımını önlemek amacıyla genelde nötral pH civarındadır (Madigan et al., 2003).



Şekil 3.14 Serbest (●) ve immobilize (■) hücreler tarafından ortam pH sına bağımlı MnP üretimi

Elde edilen sonuçlara göre: polistiren köpük üzerinde immobilize edilen *P. chrysosporium* dan maksimum MnP üretimi (421 U/L) için optimum koşullar; 174 μM Mn^{+2} , % 0,05 Tween 80, 22 mM azot, 10 g/L glukoz, 37°C ve pH 4,5 olarak belirlendi.

3.5 Biyoreaktörde MnP Üretimi

Ligninolitik enzimlerin endüstriyel proseslere uygulamalarının gerçekleştirilmesi, düşük maliyette büyük miktarlarda biyokatalizörlerin üretilmesine gereksinim duyar. Buna rağmen, özellikle katı hal koşullarında enzimlerin sürekli üretimiyle ilgili çok fazla çalışma bulunmamaktadır (Rodríguez et al., 1999, 2002; Durand et al., 1993). SSF koşullarında kullanılan katı taşıyıcılar, inert ve inert olmayan doğal substratlardır. Ancak immobilize sistemlerde taşıyıcı olarak suni, sentetik bir çok madde kullanılabilir ve işlem, kimyasal yöntemlerle de gerçekleştirilebilmektedir.

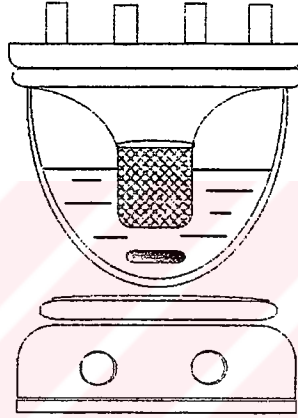
Avantajlarıyla birlikte katı-hal proseslerini gerçekleştirmede uygun biyoreaktör dizaynının az oluşu, yeni biyoreaktör konfigürasyonlarının gerçekleştirilmesini ve dizaynlarının modifiye edilmesini zorunlu hale getirmiştir. Bu amaçla; 2000 yılında Rivela ve arkadaşları tarafından daldırmalı (immersiyon) biyoreaktör gerçekleştirildi ve naylon süngerde immobilize *P.chrysosporium* tarafından yaklaşık 170U/L lik MnP aktivitesi elde edilmiştir (Rivela et al., 2000).

3.5.1 Biyoreaktör tasarımı

İmmobilize Spor Kullanımı

İmmobilize *P.chrysosporium*'dan MnP üretimine yönelik akışkan yataklı, hava-kaldırmalı ve modifiye daldırmalı biyoreaktörler denendi. Akışkan yataklı ve hava-kaldırmalı biyoreaktörlerde enzim üretimi gerçekleşmezken 1 L lik modifiye daldırmalı biyoreaktörde (çalışma hacmi 0,5 L) MnP üretimi sağlandı. Bu amaçla; standart koşullarda polistiren köpükte spor immobilizasyonu işlemlerini takiben 10 ml büyüme ortamı (10

g/L glukoz varlığında) içeren 100 ml lik erlenlerde durağan olarak 3 gün 37°C de inkübe edildi. Ardından 25 erlende immobilize hücrelerin oluşturduğu miseller dikkatli bir şekilde steril koşullarda kafes içine yerleştirildi ve 37°C de 0,5 L lik büyüme ortamı içine daldırıldı. Büyüme ortamı bir magnet yardımıyla yavaşça sürekli karıştırıldı (Şekil 3.15).



Şekil 3.15 Modifiye daldırmalı biyoreaktör

Biyoreaktörde kinetik parametreler ve verimliliğin hesaplanması

SSF koşullarında reaktördeki MnP üretim hızı r_{MnP} ;

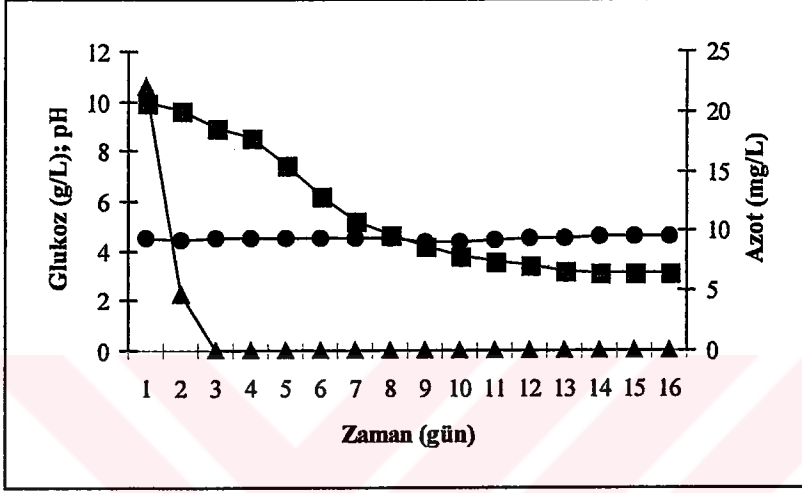
$$r_{MnP} = [MnP]_s - [MnP]_b / \Delta t$$

şeklinde hesaplandı. $[MnP]_s$ ve $[MnP]_b$, sırasıyla kültürün sonunda ve başındaki MnP aktiviteleridir. Δt , zaman değişimidir. r_G ve r_N , benzer şekilde hesaplandı (G, glukoz ve N, azot)

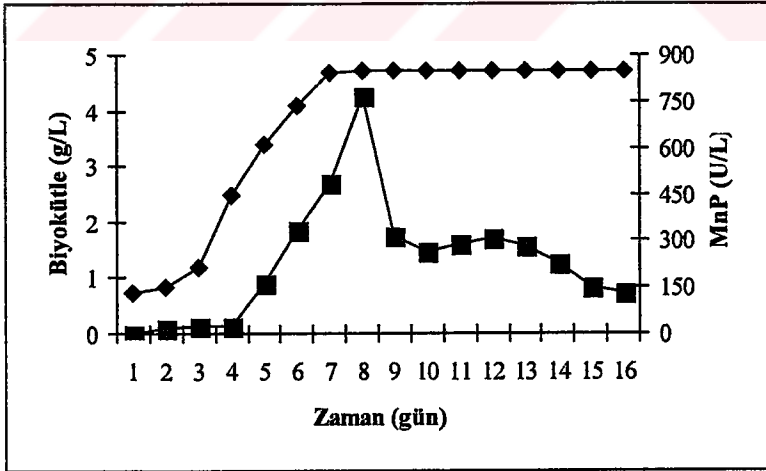
Glukoz Miktarının Etkisi

Modifiye daldırmalı biyoreaktörde *P. chrysosporium* un kesikli kültürü gerçekleştirildi. Zamana bağımlı olarak biyoreaktördeki MnP

aktivitesi, glukoz ve azot miktarı, ortam pH sı ve biyokütle değişimi izlendi (Şekil 3.16 ve 3.17).



Şekil 3.16 İmmobilize *P.chrysosporium* tarafından modifiye daldırmalı biyoreaktörde zamana bağlı glukoz (■) ve azot (▲) tüketimi ve pH (●) değişimi.



Şekil 3.17 İmmobilize *P.chrysosporium* tarafından modifiye daldırmalı biyoreaktörde zamana bağlı MnP aktivitesi (■) ve biyokütle (●) değişimi.

Şekil 3.17 dan görüldüğü gibi; maksimum MnP üretimi inkübasyonun 7. günü 770,8 U/L olarak saptandı. Ardından enzim aktivitesinde önemli bir azalma gözlemlendi ve 12. güne kadar 300 U/L düzeyinde saptandı. Benzer şekilde pH daki 0,2 birimlik azalma da inkübasyonun 7. günü gözlemlendi.

Reaktörde gözlenen MnP aktivite kaybı, fungus tarafından bazı metabolitlerin sürekli üretimi veya ortamdaki yüksek H_2O_2 konsantrasyonları nedeniyle olabilir. Bu fazda; büyüme hızı yavaşlar. Mikrobiyal ölü hücre sayısı ile canlı hücre sayısı dengelenir ve popülasyon stabil hale geçer. Besinlerin azalması ve atık ürünlerin birikmesi büyümeyi de etkiler (Tortora et al., 2002). Durağan fazda genellikle büyüme artışı gerçekleşmemesine rağmen hücrenin enerji metabolizması ve bazı biyosentetik prosesleri içeren bir çok hücresel fonksiyonu devam etmektedir. H_2O_2 , fungus *P.chrysosporium* un periplazmik boşluğunda bulunan oksidazlar tarafından üretilmektedir. Bu nedenle, H_2O_2 doğrudan enzimi inaktive edebilir. Bununla birlikte; yarı katı-hal kültürlerinde yapılan çalışmalarda yüksek düzeyde bulunduğu gösterilen (örn; $100 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) H_2O_2 , enzim inaktivasyonunu gerçekleştirebilir. Ekstrasellüler sıvıda H_2O_2 düzeyi düşük olmasına rağmen özellikle fungusun mikro-çevresinde yüksek konsantrasyonları bulunmaktadır (Tonon and Odier, 1988; Bonnarne and Asther, 1993; Cabaleiro et al., 2001).

Reaktörde yapılan bir çok çalışmada; ligninolitik enzimlerin üretimindeki ani düşümlere, ortamdaki proteazların neden olabileceği ileri sürülmektedir. Ancak proteaz üretimi, ortamdaki glukoz konsantrasyonu ile kontrol edilebilir. Eğer inkübasyon sonunda ortamda 1-5 g/L konsantrasyonunda glukoz bulunursa, proteazların salgılanması

önlenmektedir (Dosoretz et al., 1990). Dolayısıyla modifiye daldırmalı biyoreaktörde proteaz salgılanmasını önleyecek miktarda glukoz mevcuttur. Ayrıca ekstrasellüler sıvıda proteaz tayini yapıldığında 0,6 U/L gibi çok düşük düzeyde aktivite saptanmıştır. Böylece biyoreaktördeki koşullarda proteazların MnP aktivite kaybına neden olamayacağı görülmektedir.

Şekil 3.16 dan görüldüğü gibi; reaktör ortamındaki azot miktarı 2. günde tamamen tüketilmektedir. Glukoz miktarı ise inkübasyonun ilk 6 günü süratle ve ardından daha yavaş hızlarda tüketilmektedir. Bundan dolayı; azot, bu kültivasyonda, sınırlayıcı bir faktördür ve tüketim hızı r_N 11,05 mg/L.gün dür. Bu tüketim prosesi, diğer araştırmacıların çalışmalarıyla da uyumludur (Boominathan and Reddy, 1991; Barr and Aust, 1994). Düşük glukoz tüketim hızı, karbon sınırlamasının ortaya çıkmasını ve enzim sentezi için kültürün sekonder metabolizmaya geçişini sağlamaktadır. Inkübasyonun ilk günlerindeki süratli glukoz tüketimi ile biyokütle artışı ilişkilidir. Bundan dolayı; biyokütle oluşumu da 6. güne kadar süratle artmakta, 4,7 g/L maksimum değerine ulaşmakta ve ardından reaktör süresinin sonuna kadar herhangi bir değişim gözlenmemektedir. Nispeten yüksek biyokütle üretimi, yüksek azot tüketimiyle desteklenmektedir.

Kültür ortamının, tüm kültivasyon süresince berrak kaldığı gözlemlendi. Bu durum, fungusun taşıyıcıya iyi bağlandığının göstergesi olabilir. Böylece reaktörde üretim süresince büyüme ortamında serbest halde hücre bulunmamaktadır.

Polistiren köpük üzerinde immobilize *P. chrysosporium* sporları modifiye daldırmalı biyoreaktöre yerleştirildi. Ardından başlangıç glukoz konsantrasyonunun MnP üretimine etkisi incelendi (Çizelge 3.5).

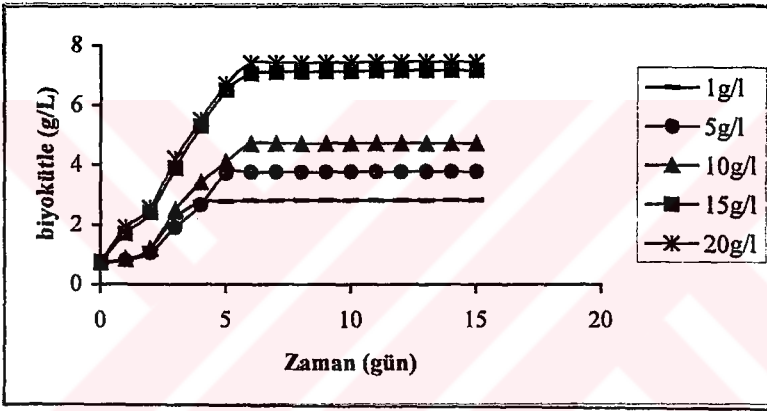
Çizelge 3.5 Modifiye daldırmalı biyoreaktörde başlangıç glukoz konsantrasyonuna bağımlı inkübasyon süresince maksimum MnP üretimi, enzim üretim ve glukoz tüketim hızı

Glukoz (g/L)	İnk. Süresi (gün)	Maks. MnP akt (U/L)	<i>rMnP</i> (U/L.gün)	<i>rG</i> (g/L.gün)
1	4	17,5	4,4	0,07
5	6	276,5	46,1	0,24
10	7	770,8	110,1	0,46
15	8	171,4	21,4	0,58
20	8	43,6	5,4	0,90

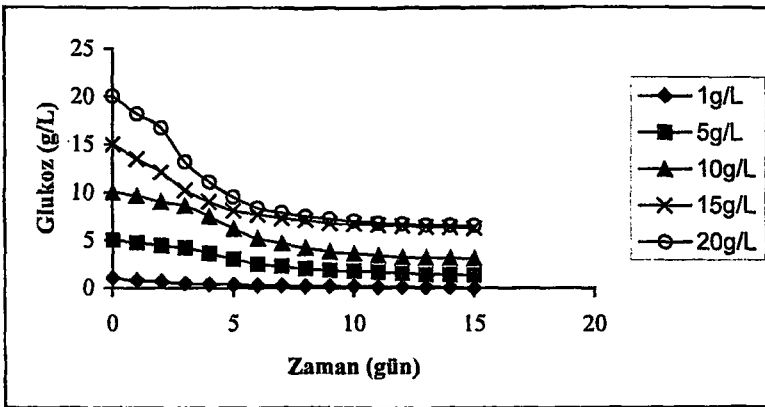
Reaktör ortamında karbon kaynağı olarak kullanılan glukoz konsantrasyonu arttıkça maksimum MnP aktivitesine ulaşıldığı süre de farklılaşmaktadır. Ayrıca 10 g/L değerinin üstündeki glukoz konsantrasyonlarının, MnP enzim aktivitesi üzerine inhibitör etkili olduğu görülmektedir. Glukoz, başlangıçtaki düşük konsantrasyonlarda yüksek aktiviteli enzim üretimi olmaksızın sadece hücre büyümesinde kullanılmıştır ve enzim üretim metabolik yolunun bir kısmı, yüksek glukoz konsantrasyonlarında da inhibe edilmiştir. Çizelgeden MnP üretim hızının (*rMnP*) başlangıçta artan glukoz konsantrasyonlarında (10 g/L ye kadar) arttığı görülmektedir. 20 g/L glukoz konsantrasyonunda glukoz tüketim hızı, 0,9 g/L.gün e ulaşmaktadır. Bu reaktörden elde edilen MnP aktivitesi oldukça yüksektir.

3.5.2 Reaktör Kinetik Değerleri

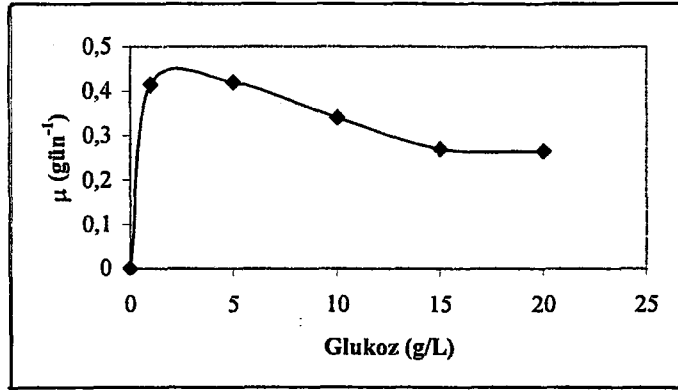
Modifiye daldırmalı biyoreaktörde, glukoz konsantrasyonlarına bağımlı üretilen biyokütle değerleri birbirinden farklılıkta ve en yüksek biyokütle üretimine 20 g/L glukoz varlığında ulaşılmaktadır (Şekil 3.18). Şekil 3. 19 da ise modifiye daldırmalı biyoreaktörde inkübasyon süresine bağımlı olarak substrat tüketimi gösterilmektedir.



Şekil 3.18 Modifiye daldırmalı biyoreaktörde glukoz konsantrasyonuna bağımlı biyokütle üretimi



Şekil 3.19 Modifiye daldırmalı biyoreaktörde glukoz tüketim hızı

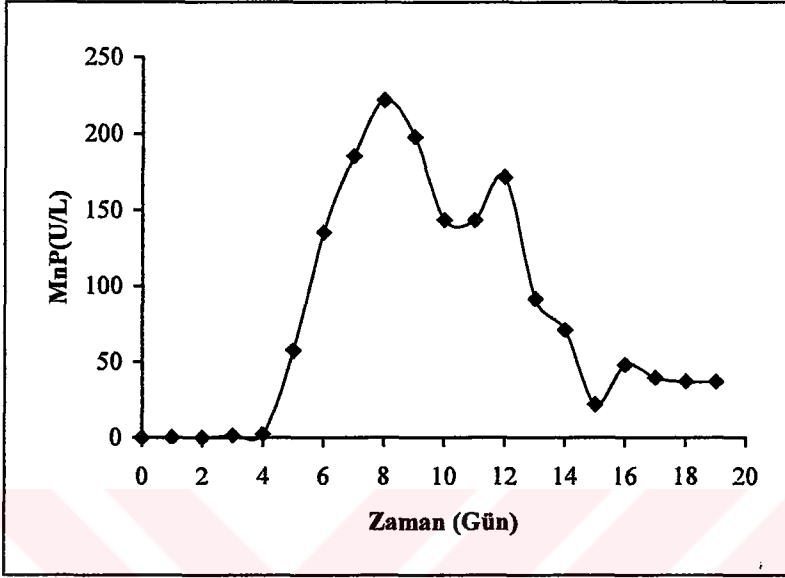


Şekil 3.20 Modifiye daldırılmalı biyoreaktörde glukoz konsantrasyonuna bağımlı spesifik büyüme hızı

Yüksek glukoz konsantrasyonlarında mikroorganizma, glukozu enzim üretimi yerine biyokütle üretiminde kullanmıştır. μ_{max} ; 1 g/L glukoz konsantrasyonunda 0,42 gün⁻¹ olarak saptanmasına rağmen maksimum MnP aktivitesine, 10 g/L glukoz varlığında ulaşılmıştır. Bundan dolayı; denemelerde glukoz konsantrasyonu 10 g/L ye ayarlandı.

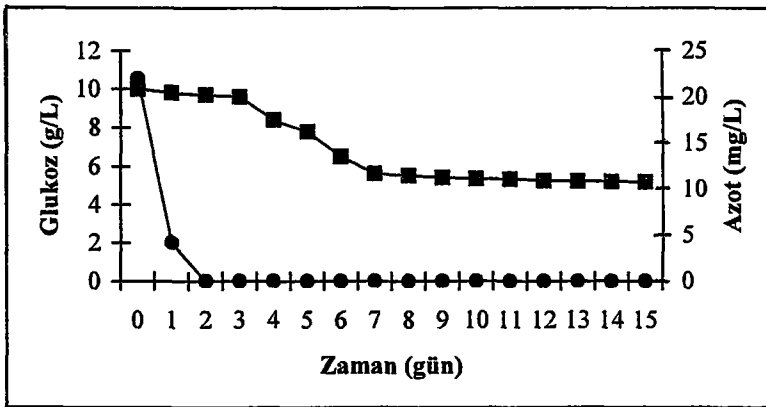
İmmobilize misel kullanımı

Standart koşullardaki miselle immobilizasyon sonrası hücreler, 10 ml büyüme ortamı (10 g/L glukoz varlığında) içeren 100 ml lik erlenlerde durağan fazda 3 gün 37°C de inkübe edildi. Ardından 25 erlende immobilize hücrelerin oluşturduğu miseller dikkatli bir şekilde steril koşullarda kafes içine yerleştirildi ve 37°C de 0,5 L lik büyüme ortamı içine daldırıldı. Büyüme ortamı bir magnet yardımıyla yavaşça sürekli karıştırıldı. Zamana bağımlı olarak biyoreaktördeki MnP aktivitesi, glukoz ve azot tüketimi izlendi (Şekil 3.21 ve 3.22).



Şekil 3.21 İmmobilize *P.chrysosporium* tarafından modifiye daldırılmalı biyoreaktörde zamana bağımlı MnP üretimi

Şekil 3.21 den görüldüğü gibi biyoreaktörde enzim üretimi açısından, 8. gün 222,1U/L ve 12. gün 172,02 U/L olmak üzere iki aktivite piki saptandı.



Şekil 3.22 İmmobilize *P.chrysosporium* tarafından modifiye daldırılmalı biyoreaktörde zamana bağımlı Glukoz (-■-) ve Azot (-●-) miktarları değişimleri.

Şekil 3.22'e göre; biyoreaktördeki azot miktarı ikinci günde tamamen tüketilirken glukoz miktarı inkübasyonun 7-13. günleri arasında yaklaşık olarak 5 g/L olarak saptandı.

3.6 İmmobilize *P. chrysosporium*'dan MnP Enziminin İzolasyonu ve Kısmi Saflaştırılması

İmmobilize *P. chrysosporium* kültürlerinin 10 ml hacimde 100'er ml'lik erlenlerde 37°C de inkübasyonun altıncı günündeyken, ekstrasellüler sıvı toplandı ve ortamdaki miselleri uzaklaştırmak için + 4°C ve 5000 rpm'de 5dk'lık süre ile santrifüjlendi. Enzim aktivite ve protein tayinleri yapıldı. Ekstrasellüler enzimi deriştirme amacıyla 10 kDa'luk membran kullanılarak ultrafiltrasyon işlemi yapıldı. Bu aşamada da enzim aktivite ve protein değerleri saptandı.

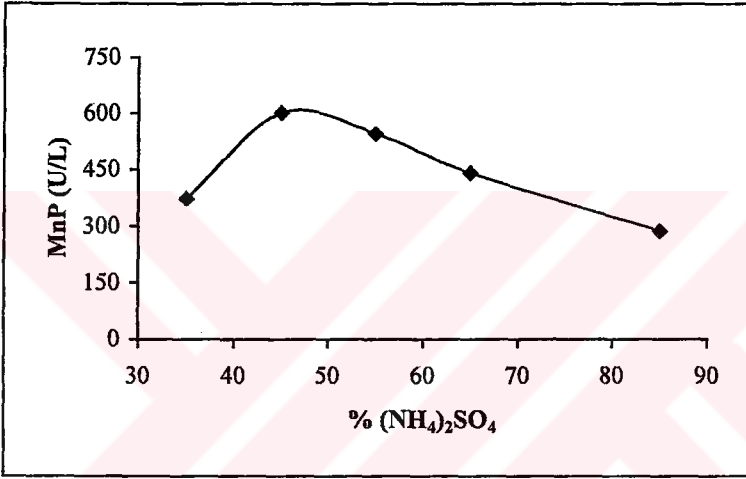
Deriştirme işlemi sonrası ilk saflaştırma basamağında; ekstrasellüler sıvıdaki proteinler, $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, metanol, etanol ve polietilen glikol-2000, -5000 gibi çeşitli yöntemler kullanılarak çöktürüldü.

3.6.1 Proteinlerin $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile çöktürülmesi

Nötral tuzların ilavesiyle proteinlerin çöktürülerek fraksiyonlanması yaygın kullanılan bir yöntemdir. Çöktürülen proteinler genellikle denatüre değildir ve aktivite, pelletin tekrar çözünmesiyle geri kazanılır. Aynı zamanda proteinler, nötral tuzların ilavesiyle denatürasyon, proteoliz veya bakteriyel kontaminasyona karşı stabilize edilir.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile protein çöktürme işlemi, % 35, % 45, % 55, % 65 ve % 85 (w/v) konsantrasyonunda gerçekleştirildi. Katı $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, deriştirilen

ekstrasellüler örneğe yavaşça ilave edildi ve +4°C de 1 saat süreyle yavaşça karıştırıldı. Çökelek, 15000 rpm ve 4°C de 15dk santrifüjlenerek uzaklaştırıldı ve başlangıç miktarına eşit hacimde 50 mM Na-tartarat tamponu, pH 4,5 ile tekrar süspansiyon edildi. Her iki fazda da MnP aktivite ve protein değerleri saptandı.



Şekil 3.23 % (NH₄)₂ SO₄ konsantrasyonuna bağımlı MnP aktivite değişimi

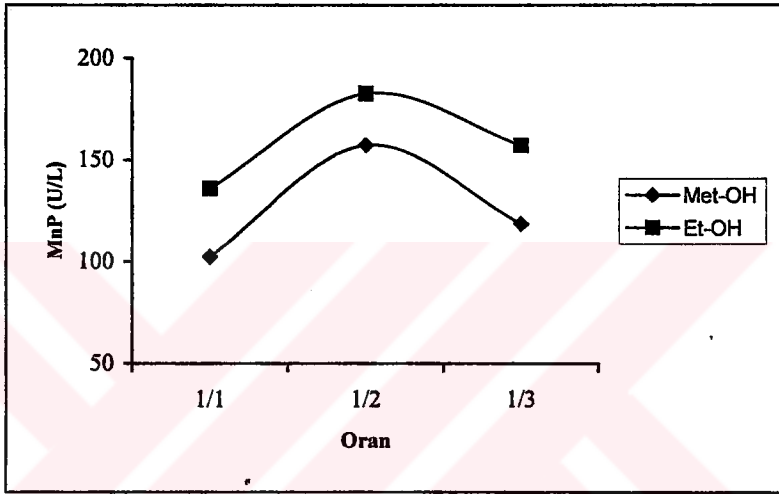
Şekil 3.23'den görüldüğü gibi, alt fazda en yüksek MnP aktivite değeri, %45 (NH₄)₂SO₄ için 600,8 U/L olarak elde edildi.

3.6.2 Proteinlerin metanol ve etanol ile çöktürülmesi

Pek çok protein, aseton ve etanol gibi suda karışan organik çözügenlerin varlığında çöktürülebilir. Çözeltiye organik çözügenlerin ilavesi, çözeltinin dielektrik sabitini ve dolayısıyla çözme yeteneğini azaltacaktır. Dielektrik sabitindeki düşme, zıt yüklü yüzey alanlarının birbirini daha güçlü çekmesine neden olur. Böylece proteinin çözünürlüğü azalır ve

elektrostatik etkileşim aracılığıyla agregatlaşma meydana gelir (Haris and Angal, 1993).

İmmobilize *P. chrysosporium* ekstrasellüler sıvısındaki proteinlerin çöktürülmesi, 1/1 – 1/3 (v/v) metanol ve etanol oranlarında gerçekleştirildi.



Şekil 3.24 Değişen Metanol ve Etanol oranlarına bağımlı MnP aktivite değişimi.

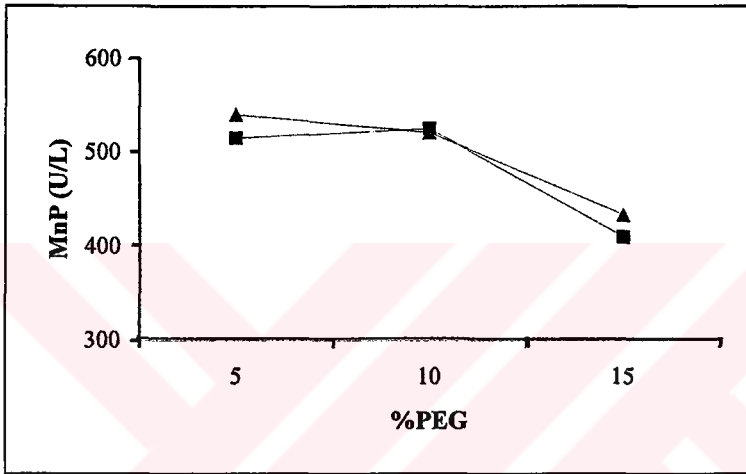
Şekilden görüldüğü gibi; en yüksek MnP aktivitesi, ½ metanol (v/v) varlığında 157,3 U/L ½ etanol (v/v) oranında ise 182,68 U/L olarak bulunmuştur.

Her iki organik çözügen ile protein çöktürmesinde, MnP enziminin organik çözügenlerden etkilendiği görülmektedir.

3.6.3 Proteinlerin polietilen glikol ile çöktürülmesi

Organik polimerlerle proteinlerin çöktürülmesinde iyonik olmayan hidrofilik polimer polietilen glikol (PEG) yaygın olarak kullanılmaktadır. PEG'in etanol ve diğer organik çözügenlere kıyasla proteini denatüre edici

eğilimi, yüksek sıcaklık ve derişimde bile çok azdır (Haris and Angal, 1993). Protein çöktürölmesi, ortalama molekül ağırlığı 2000 ve 5000 olan değişen % PEG miktarlarında 25°C ve 10000 rpm de 15 dk santrifüjlenerek gerçekteşirildi.



Şekil 3.25 Değişen % PEG-2000 (-■-) ve -5000 (-▲-) değerlerine bağımlı MnP aktivite değişimi

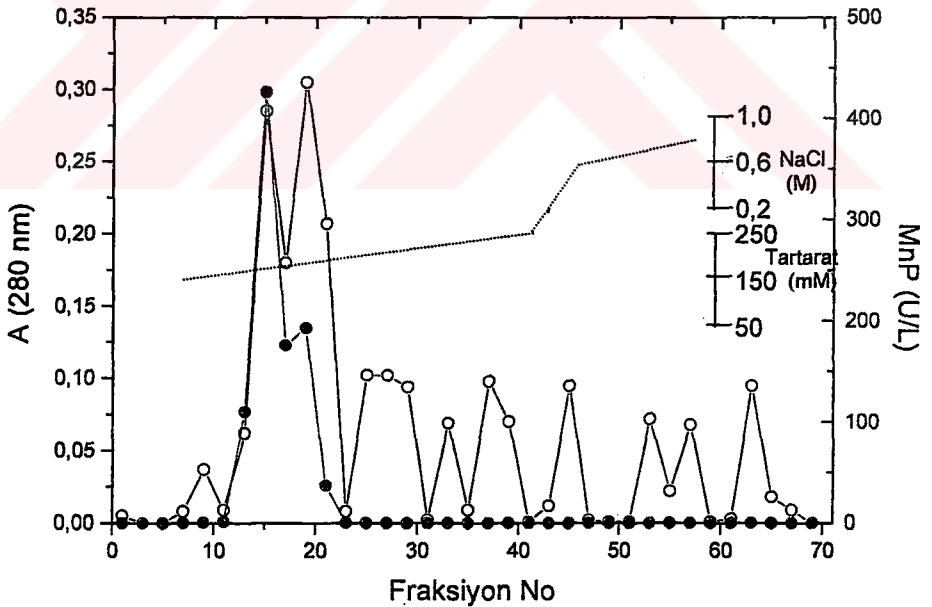
Kullanılan protein çöktürme yöntemleri sonuçlarına göre; en yüksek MnP aktivite verimliliği % 45 (NH₄)₂SO₄ ile 600,8 U/L olarak elde edildi.

3.6.4 DEAE- Sefarose anyon değiştirici kolon kromatografisi

Elektrostatik çekime dayanan iyon değişim kromatografisinde, örnekte bulunan bileşikler yüklü durağan faza olan afinitelerine göre ayrılırlar. İyon değiştirici dolgu maddesi eğer pozitif gruplarla kimyasal olarak bağlanmışsa, karşı iyonlar negatif olup bu tür iyon değiştiriciler negatif iyonları değiştirdiklerinden anyon değiştiriciler adını alırlar. Benzer şekilde eğer dolgu maddesi negatif gruplarla kimyasal olarak bağlanmışsa,

karşı iyonlar pozitif olup bu tür iyon değıştirciler pozitif iyonları değıştirdiklerinden katyon değıştirciler adını alırlar.

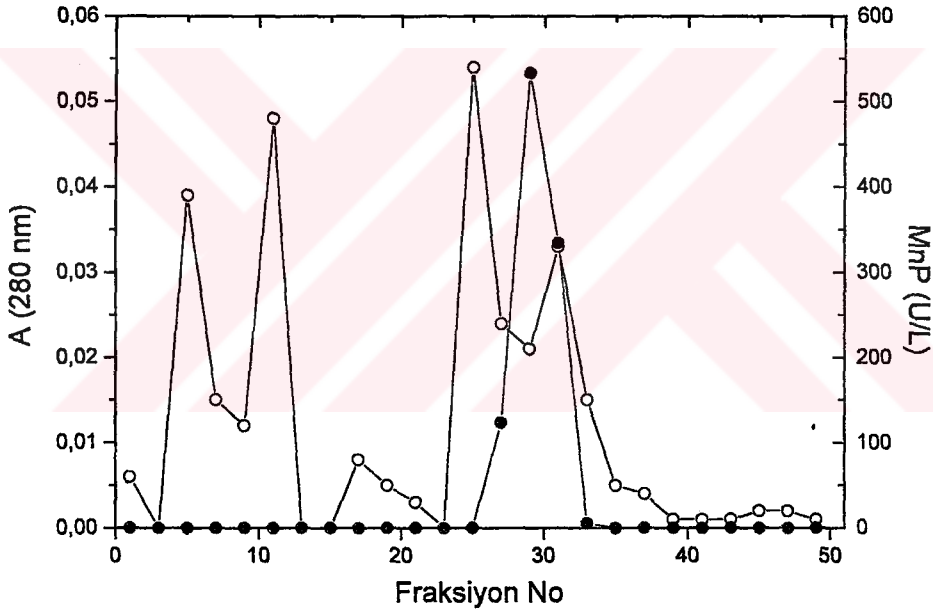
Etanol, metanol, PEG, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gibi kullanılan protein çöktürme yöntemleri sonuçlarına göre; en yüksek MnP aktivite verimliliği % 45 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile 600,8 U/L olarak elde edildi. Kısmi olarak saflaştırılan enzim örneği, 50 mM Na-tartarat tamponu pH 4,5 ile $+4^\circ\text{C}$ de dengelenmiş anyon değıştirici DEAE-Sepharose (16 × 25 cm) kolonuna uygulandı. Proteinler, Na-tartarat tamponu (50-250 mM; pH 4,5) ve ardından NaCl çözeltisinin (0,2- 1,0 M) doğrusal gradientleriyle 0,5 ml / dk akış hızında elüe edildi (Şekil 3.26)



Şekil 3.26 DEAE-Sefaroz anyon değıştirici kolon kromatografisi. Protein absorpsiyonu (o-o-) ve MnP aktivite (●-●-) değışimleri.

3.6.5 Jel Filtrasyon kolon kromatografisi

DEAE-Sepharose anyon değiştirici kolonundan elde edilen 14-20. fraksiyonlar 10 kDa'lık ultrafiltre ile deriştirildi ve ardından 50 mM Na-tartarat tamponu pH 4,5 ile +4°C de dengelenmiş Ultragel AcA 54 (1,6 x 90 cm) jel filtrasyonu kolonuna uygulandı. Proteinler, aynı tamponda elüe edildi ve MnP aktivitesini içeren fraksiyonlar saptandı (şekil 3.27).



şekil 3.27 MnP enziminin Ultragel AcA 54 jel filtrasyon kolon kromatografisi. Protein absorpsiyonu (-o-) ve MnP aktivite (-•-) değişimleri.

Safılaştırılan enzimin molekül ağırlığı, Ultragel AcA 54 jel filtrasyon kromatografisine gore, molekül ağırlıkları bilinen standart proteinlerle karşılaştırılarak $45\ 000 \pm 1\ 000$ Da olarak bulundu. Yapılan alışmalarda *P.chrysosporium* MnP'nin molekül ağırlığı 45 000 - 47 000 Da olarak

saptanırken yine beyaz çürükçül funguslardan *Trametes versicolor* MnP'sinin ise 49 000 Da olarak belirlenmiştir (Schneegaß et al., 1997; Tien and Kirk, 1984). *P.chrysosporium* MnP'sinin saflaştırma işlemleri aşağıdaki tabloda gösterilmektedir (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6 İmmobilize *P. chrysosporium*'dan MnP'ın Saflaştırma Basamakları

Saflaştırma Basamakları		Toplam Aktivite (U)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Verim	Saflaştırma Katı
Ham Sıvı	Ekstrasellüler	21 000	0,25	84	100	1,0
10 kDa Ultrafiltrasyon	-	16812,5	0,1175	142,8	80,06	1,6
% 45 (NH ₄) ₂ SO ₄ ile çöktürme		7510	0,036	210	35,76	2,5
DEAE-Sepharose		5053,6	0,0134	376,3	24,06	4,5
Ultragel AcA 54		4847,5	0,010	484,75	23,08	5,8

Yapılan saflaştırma işlemine göre immobilize *P.chrysosporium*'dan MnP, 5,8-kat saflaştırıldı. Yapılan çalışmalarda; beyaz çürükçül funguslardan ligninolitik enzimlerin saflaştırılmasında benzer saflaştırma katına ulaşılmıştır (Schneegaß et al., 1997; Heinfling et al., 1998b). *Bjerkandera adusta* MnP, yaklaşık olarak 4,5; *Nematoloma frowardii* b19 MnP ise 5,9'luk bir saflaştırma katıyla saflaştırılmıştır.

Modifiye daldırmalı biyoreaktör koşullarında 10 g/L glukoz konsantrasyonunda 7. gün de 770,8 U/L olarak üretilen MnP saflaştırma işlemleri aşağıdaki tabloda gösterilmektedir (Çizelge 3.7).

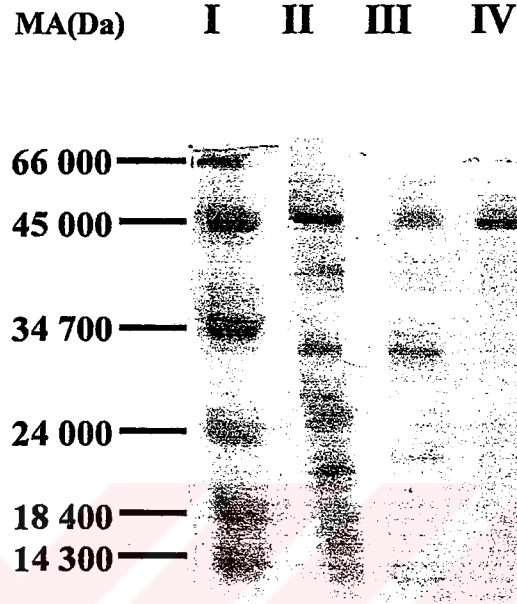
Çizelge 3.7 Modifiye daldırmalı biyoreaktörde immobilize *P. chrysosporium*'dan MnP'in Saflaştırma Basamakları

Saflaştırma Basamakları	Toplam Aktivite (U)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Verim	Saflaştırma Katı
Ham Ekstrasellüler Sıvı	385 400	4,85	79,5	100	1
10 kDa -Ultrafiltrasyon	189 320	2,98	120,25	92,97	1,5
% 45 (NH ₄) ₂ SO ₄ ile çöktürme	189 528	0,745	254,4	52,89	3,2
DEAE-Sepharose	118 455	0,25	473,82	30,74	5,96
Ultragel AcA 54	93 929	0,15	632,82	24,37	7,96

Tablodan görüldüğü gibi; modifiye daldırmalı reaktör koşullarında MnP enzimi % 24,37 verimle 7,96-kat saflaştırılmıştır.

3.6.6 SDS-PAGE Elektroforezi

Kısmi olarak saflaştırılan MnP nin Sodyum Dodesil . Sülfat- Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS- PAGE) sonucuna göre enzimin molekül ağırlığı $45\,000 \pm 500$ Da olarak saptandı (Şekil 3.28).



Şekil 3.28 *P.chrysosporium*dan izole edilen MnP enziminin SDS poliakrilamid jel elektroforezi. (I). Protein standartları, (II) Reaktörden alınan ham ekstrasellüler sıvı, (III) Anyon değıştirici kolon kromatografisi sonrası enzim, (IV) Jel filtrasyon kolon kromatografisi sonrası enzim

3.7 MnP'nin Kinetik Karakterizasyonu

3.7.1 Enzimin substrat spesifikliği

2,2 mM substrat (2,6-Dimetoksifenol, Mn^{+2} , Guaykol, Fenol Red, 3-Metil 2-benzotiazolinon hidrazon, Veratril Alkol) konsantrasyonunda Mn^{+2} varlığında ve yokluğunda MnP aktivitesi ölçüldü ve 2,6-Dimetoksifenol substratına karşı % bağıl aktivite değerleri saptandı (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.8 2,2 mM konsantrasyonundaki farklı substratların Mn^{+2} varlığında ve yokluğundaki % Bağıl MnP aktiviteleri
a) tartarat tamponunda, pH 4,5

Substrat	%Bağıl Aktivite (Mn^{+2} varlığında)	%Bağıl Aktivite (Mn^{+2} yokluğunda)
2,6-Dimetoksifenol	100,0	1,1
Guaykol	65,6	1,6
3-Metil 2-benzotiazolinon hidrazon	1,3	0,3
Veratril Alkol	0	0
Mn^{+2}	0	0
Fenol Red	0	0

b) asetat tamponunda, pH 4,5

Substrat	%Bağıl Aktivite (Mn^{+2} varlığında)	%Bağıl Aktivite (Mn^{+2} yokluğunda)
2,6-Dimetoksifenol	100,0	0,8
Mn^{+2}	91,5	0
Fenol Red	58,8	7,2

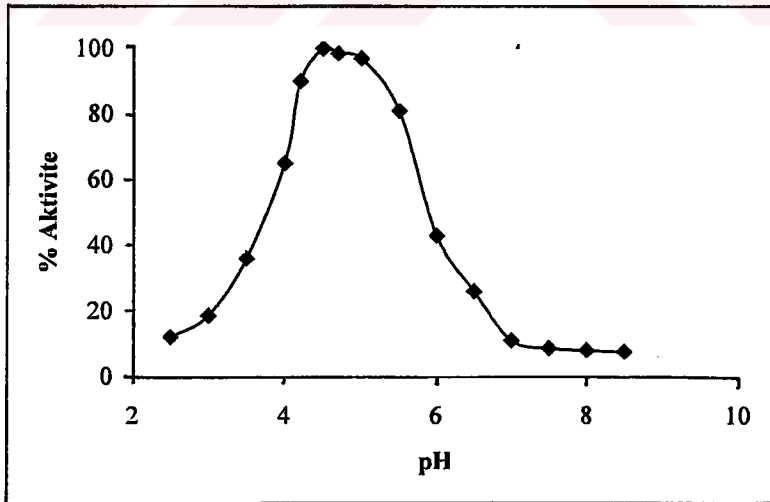
LiP, fenolik ve fenolik olmayan lignin birimlerini yükseltgenirken lakkaz ve MnP, sadece ligninin fenolik yapılarını yükseltgeme

yeteneğindedir. Ancak mediatörler varlığında Lakkaz ve MnP lerin substrat aralığı fenolik olmayan yapılara kadar genişletilebilir.

MnP enziminin Mn(II), H_2O_2 ve glutatyon gibi bir tiyol indirgen varlığında veratril alkol ve diğer fenolik olmayan bileşikleri oksitleyebilir (Sack et al., 1997). Reaksiyon, Mn(III) şelatı tarafından thiyl (tiil) radikalının oluşumuyla gerçekleşmektedir ve thiyl radikali, fenolik olmayan bileşenler için bir oksidant olarak etki etmektedir(Sack et al., 1997). Reaksiyon ortamına indirgen tiyol ilave edilmediği için bu çalışmada, MnP tarafından veratril alkolün dolaylı oksidasyonu gerçekleşmemiştir.

3.7.2 pH ile aktivite değişimi

pH'a bağımlı MnP aktivite değişimleri, 250 mM konsantrasyonundaki Na-tartarat (pH 2,5-5,5) ve fosfat (pH 6,0-8,5) tamponları kullanılarak incelendi (Şekil 3.29).

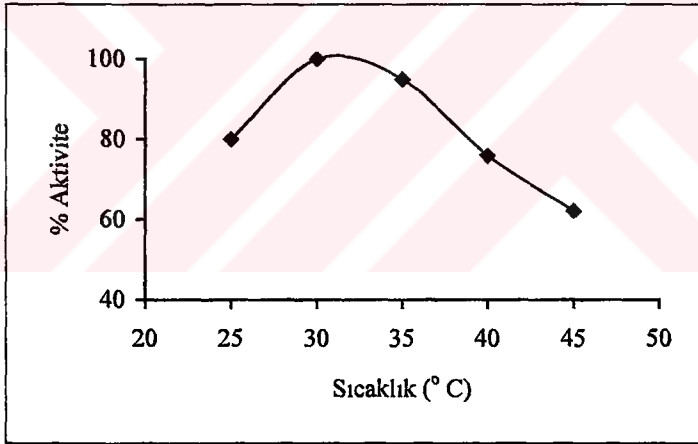


Şekil 3.29.pH'a bağımlı MnP aktivite değişimleri.

Şekil 3.29'dan görüldüğü gibi; MnP aktivitesi, pH 4,5'a kadar artmakta ve pH 5,0 den sonra süratle azalmaktadır. *P.chrysosporium* gibi bir beyaz çürükçül olan *Pleurotus ostreatus* MnP'nin optimum pH'sı da 4,5 olarak saptanmıştır (Sarkar, et al., 1997). Optimum pH'nın 4,5 olarak belirlenmesi, enzimin aktif merkezinde asidik aminoasitlerin etkili olabildiğini de göstermektedir.

3.7.3 Sıcaklığa bağımlı aktivite değişimi

Sıcaklığa bağımlı MnP aktivite değişimleri; 250 mM Na-tartarat tamponunda pH 4,5, 25-45°C sıcaklık aralığında incelendi (Şekil 3.30).



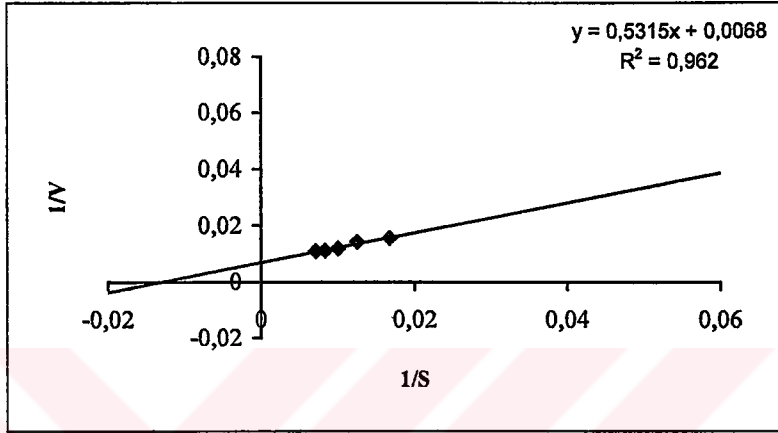
Şekil 3.30. Sıcaklığa bağımlı MnP aktivite değişimleri.

Şekil 3.30' dan görüldüğü gibi en yüksek aktiviteye 30°C de ulaşılmaktadır.

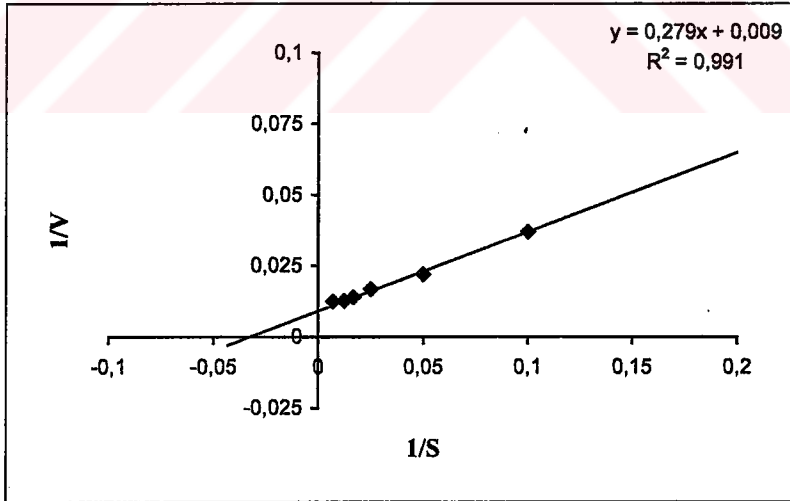
3.7.4 Enzimin V_{max} ve K_m 'inin bulunması

Reaksiyon ortamında sabit 2,6-dimetoksifenol konsantrasyonu (1 mM) varlığında değişen H_2O_2 konsantrasyonunda ve ayrıca sabit H_2O_2

konsantrasyonunda (0,4 mM) değişen 2,6- dimetoksifenol konsantrasyonunda MnP enziminin V_{max} ve K_m değerleri saptandı.



Şekil 3.31 Sabit 2,6-dimetoksifenol konsantrasyonunda değişen H_2O_2 konsantrasyonuna bağımlı Lineweaver-Burk Diyagramı

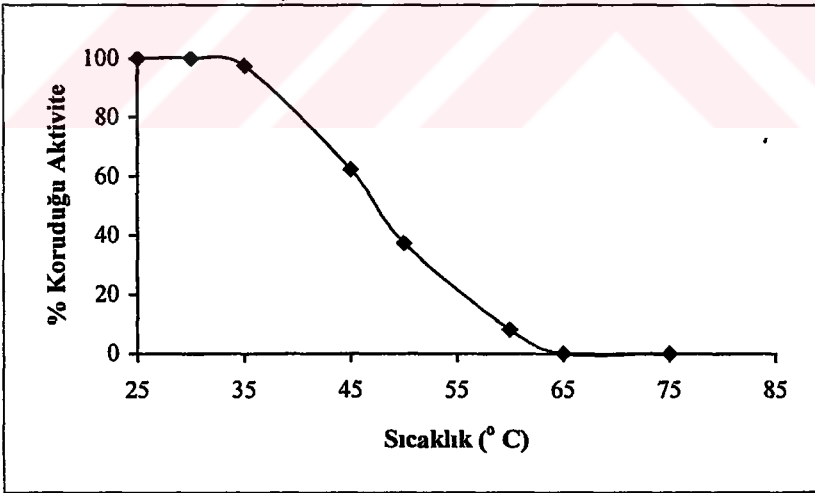


Şekil 3.32 Sabit H_2O_2 konsantrasyonu varlığında değişen 2,6-DMP konsantrasyonuna bağımlı Lineweaver-Burk diyagramı.

Şekil 3.31 dan görüldüğü gibi, H_2O_2 konsantrasyonuna bağımlı MnP enziminin K_m değeri, $71,4 \mu M$ ve V_{max} değeri $134,34 U/mg$ olarak bulundu. Şekil 3.32'e göre ise, 2,6-DMP konsantrasyonuna bağımlı enzimin K_m değeri $28,57 \mu M$ ve V_{max} değeri $111,1 U/mg$ olarak saptandı. Ayrıca H_2O_2 , $0,4 mM$ konsantrasyonun üzerinde enzim üzerine inhibitör etkisi gösterirken 2,6-DMP'de bu etki $1mM$ konsantrasyonunun üzerindeki değerlerde gözlemlendi.

3.7.5 Termal stabilite değişimi

Saflaştırılan *P.chrysosporium* MnP, 30, 35, 45, 50, 60, 65, $75^\circ C$ sıcaklıklarda $50 mM$ Na-tartarat tamponunda pH 4,5, 1 saat inkübe edildi. Koruduğu aktivite değerleri, standart aktivite ölçüm koşullarında saptandı (Şekil 3.33).

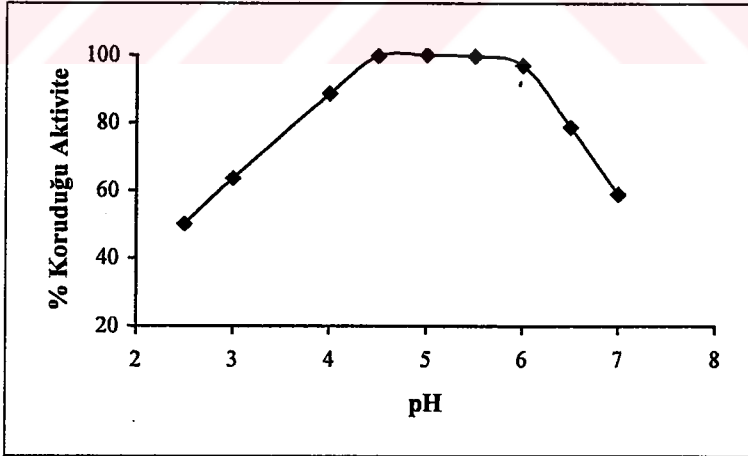


Şekil 3.33 pH 4,5'da 1 saatlik inkübasyon sıcaklığına bağlı olarak enzimin koruduğu aktivite değerleri.

Şekilden görüldüğü gibi; 65°C ve daha yüksek sıcaklıklarda enzim inaktif olmaktadır. 50°C de ancak yaklaşık % 37,4 lük aktiviteyi koruduğu görülmektedir. Sutherland and Aust (1996); MnP'in 45°C ve üzerindeki sıcaklıklarda enzimin daha çok etkilendiğini gösterdiler. Ayrıca ligninolitik enzimlerden LiP'e göre MnP'in termal denatürasyona daha hassas olduğu da belirlenmiştir. Yüksek sıcaklıklarda, enzimin konformasyonel yapısı değişmekte, böylece enzim aktif merkezinin substrat ile tepkimeye girme olasılığı azalmakta ve korunan enzim aktivite değerleri de düşmektedir.

3.7.6 pH- stabilite değişimi

MnP enzimi, 50 mM Na-tartarat (pH 2,5-5,5) ve fosfat (pH 6,0-7,0) tamponlarında 25°C de 1 saat inkübe edildi. Enzim stabilitesinin pH'a bağımlılığı, standart ölçüm koşullarında aktivite ölçülerek saptandı (Şekil 3.34).



Şekil 3.34 25 °C de 1 saatlik inkübasyon pH'sına bağımlı koruduğu MnP aktivite değerleri.

Gerçekleştirilen çalışmalarda MnP'nin, pH 6,5 ve üzerindeki pH ortamına maruz bırakıldığında inaktive olduğu belirlenmiştir (Sutherland and Aust, 1996). Zayıf asidik pH bölgesinin dışına çıkıldığında enzimin aktif merkezinde aktivitesi için zorunlu aminoasitler etkilenmekte ve korunan aktivite değerleri düşmektedir.

3.7.7 Karboksilik asitlerin etkisi

Dikarboksilik asitler, şelatlayıcı olarak etki ederek MnP aktivitesinin artmasına neden olurlar. MnP aktivitesi; standart enzim aktivitesi ölçüm koşullarında 1 mM konsantrasyonundaki Okzalat, Maleat, Sitrat ve Asetat varlığında ölçüldü ve sonuçlar tartarat ile elde edilen değerle kıyaslandı (Çizelge 3.9).

Çizelge 3.9 1 mM konsantrasyonundaki karboksilik asitlerin *P.chrysosporium* MnP aktivitesi üzerine etkisi

Karboksilik asitler	% Bağıl Aktivite
Tartarat	100
Okzalat	108,8
Maleat	102,5
Sitrat	71,75
Asetat	42,5

Çizelge den görüldüğü gibi; en yüksek % bağıl aktiviteye okzalat varlığında ulaşılmaktadır.

0, 1 ve 2 mM okzalat ve maleat varlığında % bağıl aktivite sırasıyla 100; 108,8; 111,6 ve 100; 102,5; 105,2 olarak saptandı. Buna göre; okzalat ve maleat konsantrasyonu arttıkça % bağıl MnP aktivite de artmakta ve en yüksek artış, okzalat ile elde edilmektedir. Okzalat ve Maleat gibi

dikarboksilli asitler, şelatlayıcı olarak etki ederek MnP aktivitesinin artmasına neden olmaktadır. *Dichumitus squalens* MnP ı için en yüksek artış 1 mM okzalit varlığında saptanmıştır (Perie et al., 1996). Tek karboksilli asit içeren asetat varlığında düşük MnP aktivitesi saptanmıştır. Genellikle bir karboksil grubuna ve karbonil, aldehid veya hidroksil grubuna sahip bileşikler MnP aktivitesini inhibe etmektedir. Karboksilat gibi Mn^{+3} – şelatlayıcı ajanlar, genelde MnP aktivitesinde artışa neden olmaktadır (Kuan and Tien, 1993).

Fungus tarafından milimolar konsantrasyonlarda üretilen okzalitin fungal mikro çevrede Mn(II) nin fizyolojik şelatlayıcısı olduğu ileri sürülmektedir (Timofeevski and Aust, 1997). MnP mekanizmasında Mn(II)-şelatlayıcıların rolleri, MnP tarafından Mn(II) oksidasyonunu kolaylaştırmak ve enzimden Mn(III) ün salıverilmesini sağlamaktır. Okzalit gibi enzim şelatlayıcılar, doğrudan Hem grubundaki demire bağlanmazlar ancak Hem grubuna yakın bir bağlanma merkezi vardır. Bununla birlikte; okzalit, Mn(II) bağlama merkezinin yakınında bulunan iki su molekülüyle yer değiştirerek enzim ile etkileşime girebilir. Şelatlayıcı bileşikler, çözelti içinde Mn(III)'ü stabilize edebilirler ve H_2O_2 in oksidatif olarak dekompozisyonunu azaltabilirler (Timofeevski and Aust, 1997).

3.7.8 Bazı fenolik bileşiklerin etkisi

1 mM konsantrasyonundaki veratril alkol, fenol ve guaykol varlığında % bağıl MnP aktivitesi, sırasıyla %100; 85,88; 61,5 olarak bulundu. Buna göre; veratril alkol varlığında % bağıl aktivite değişmez iken fenol ve guaykol tarafından farklı düzeylerde inhibe edilmiştir .

3.7.9 Bazı metal iyonlarının etkisi

Standart enzim aktivitesi ölçüm koşullarında 1 mM Mg^{+2} , Ca^{+2} , Cu^{+2} , Fe^{+2} ve Ni^{+2} varlığında MnP aktivitesi ölçüldü ve sonuçlar Mn^{+2} ile elde edilen değer ile karşılaştırıldı (Çizelge 3.10).

Çizelge 3.10 1 mM konsantrasyonundaki metallerin *P.chrysosporium* MnP aktivitesi üzerine etkisi

Metaller	% Bağlı Aktivite
Mn^{+2}	100
Mg^{+2}	98,2
Ca^{+2}	94,2
Cu^{+2}	91,8
Fe^{+2}	90,1
Ni^{+2}	83,8

1 mM Mg^{+2} , MnP aktivitesi önemli bir etki göstermezken % en düşük aktivite Ni^{+2} ile elde edildi.

Yapılan denemelerden bazısı, ticari MnP enzim (*N. frowardii*) kullanılarak gerçekleştirildi. Substrat olarak 1 mM 2,6-DMP kullanıldığında, Mn(II) yokluğunda %1,73 bağlı aktivite değeri saptandı. Bununla birlikte; 1 mM konsantrasyonundaki okzalit ve sitrat varlığında elde edilen sonuçlar, tartarat ile bulunan değer ile kıyaslandı (Çizelge 3.11). Benzer şekilde; 1 mM Cu^{+2} , Pb^{+2} metalleri varlığında saptanan sonuçlar Mn(II) deki değerle karşılaştırıldı (Çizelge 3.12).

Çizelge 3.11 Ticari MnP üzerine bazı karboksilik asitlerin etkisi

1mM	% Bağıl Aktivite
Tartarat	100,0
Okzalal	102,3
Sitrat	72,4

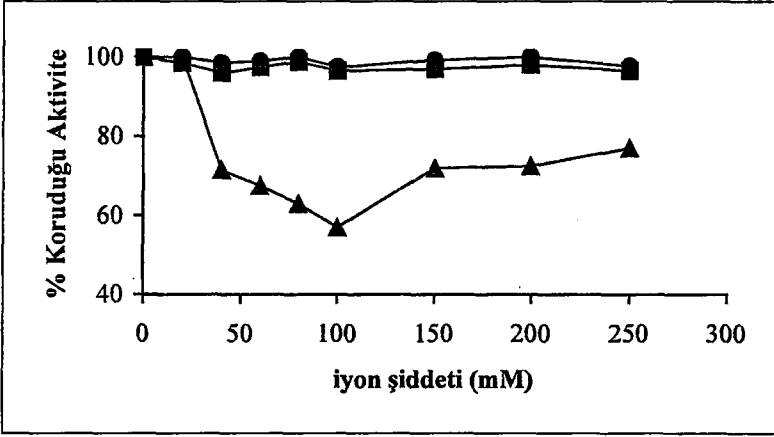
Çizelge 3.12 Ticari MnP üzerine bazı metallerin etkisi

1 mM	% Bağıl Aktivite
Mn ⁺²	100,0
Cu ⁺²	88,3
Pb ⁺²	77,8

Ticari MnP enzimiyle elde edilen sonuçlar, *P.chrysosporium* MnP enziminin karakterizasyonuna yönelik elde edilen değerlerle karşılaştırıldığında önemli bir farklanma olmadığı görülmektedir.

3.7.10 İyon şiddetin etkisi

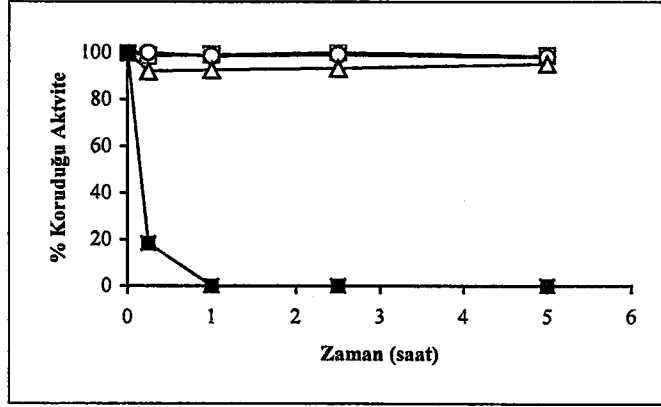
20-250 mM konsantrasyon aralığında tartarat, klorür (pH 4,5) ve fosfatın (pH 6,0) iyon şiddetine bağımlı MnP aktivite değişimleri, standart aktivite ölçüm koşulları kullanılarak incelendi. Tartarat ve 50 mM Na-tartarat tamponuna konan klorürün 20-250 mM iyon şiddetlerinde enzim aktivitesinde herhangi bir etki gözlenmedi. Ancak fosfat varlığında 100 mM iyon şiddetine kadar artan değerlerde enzim inhibisyonu gözlendi (Şekil 3.35). Bu değerlerden sonra, koruduğu aktivite değerinde % 20 lik gözlenen artış, bu bölgede tepkimenin elektrostatik olarak kolaylaştırıldığının göstergesi olabilir.



Şekil 3.35. MnP enzim aktivitesi üzerine iyon şiddetinin etkisi: tartarat, pH 4,5 (-●-); fosfat, pH 6,0 (-▲-) ve klorür, pH 4,5 (-■-).

3.7.11 Bazı kimyasal maddelerin etkisi

Saflaştırılan MnP; NaN_3 , Nitritotriasetat, Askorbik asit, β -merkapto-etanol, KCN, PMSF ve DTT (2' mM) ve İyodoasetamid (0,5 mM) içeren 50 mM Na-tartarat tamponunda pH 4,5 inkübe edildi. Aktivite değerleri, zamana bağımlı olarak standart ölçüm koşullarında ölçüldü (Şekil 3.36).



Şekil 3.36 25 °C ve pH 4,5’da inkübasyon süresine bağımlı olarak MnP aktivitesine bazı maddelerin etkisi.(-□-), 2 mM nitrilotriasetat; (-○-), 0,5 mM iyodoasetamid; (-Δ-), 2 mM PMSF; (-■-), 2 mM KCN

2 mM NaN_3 , Askorbik asit, β -merkaptotanol ve dithiothreitol varlığında, MnP aktivitesi tamamen inhibe edildi. Yapılan çalışmalarda MnP’in, Askorbik asit ve NaN_3 varlığında tamamen inaktive olduğu gösterilmektedir (Paszczynski, et al., 1986; Harris et al., 1991). Askorbik asit, özellikle peroksil radikallerinin sönmüleyicisidir. Bu nedenle hidroperoksitlerin oluşumunu dolayısıyla MnP aktivitesini inhibe etmektedir (Popp et al., 1990).

İyodoasetamid (0,5 mM) and PMSF (2 mM) nin, enzim stabilitesi üzerine herhangi bir etki göstermemesi, Serin aminoasidinin MnP aktivitesinde önemli rolü olmadığını göstergesidir. Ancak, β -merkaptotanol ve DTT, MnP aktivitesini inhibe etmesi Sistein’in enzim aktivitesi ve yapısında önemli etkisi olduğuna bir işarettir.

Enzim ayrıca 5 mM *N*-Bromosüksinimide (NBS; 0,1 M fosfat tamponu, pH 6.0) ve *N*-etil-5-fenilisoksazolin-3’-sülfonat (Woodward’s

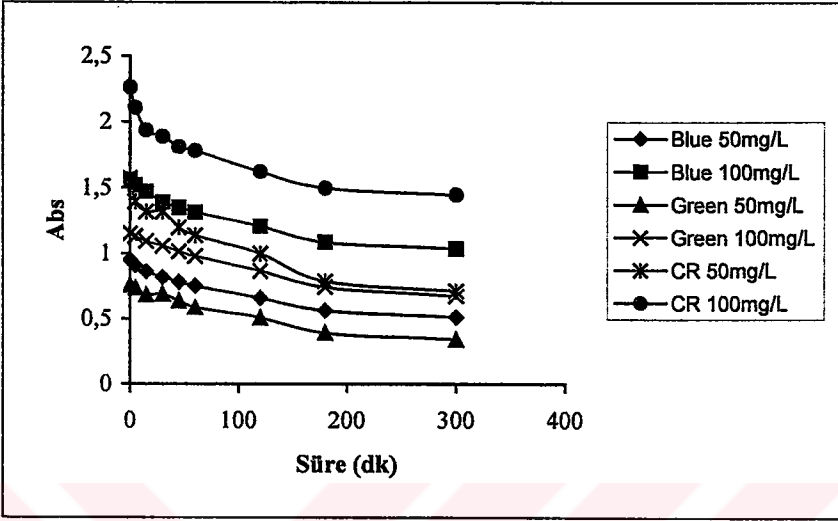
reagent K, WRK; 0,1 mM HCl de) 37°C de 30 dk inkübe edildi (Roig and Kennedy, 1992). Protein-oksiteleyici bir ajan olan NBS, pH 6,0 da enzimi tamamen inhibe etti. Bu oksitleyici tepkime genellikle SH grupları için spesifiktir. Bundan dolayı; Sistein (Cys), enzim aktif merkezi için zorunludur. Enzimin WRK ile modifikasyonu, tamamiyle aktivite kaybı gözlemlendi. Böylece, karboksil gruplarının MnP katalitik aktivitesinde önemli bir rolü olduğu söylenebilir.

3.7.12 Depolama Kararlılığı

Saflaştırılan MnP, 50 mM Na-tartarat tamponu pH 4,5 içinde +4°C de bekletildi. 1 haftalık depolama periyodu sonunda yaklaşık % 30 aktivite kaybı saptandı. Ancak, enzim 3 ay -20°C de depolandığında sadece %10 luk bir aktivite kaybının meydana geldiği gözlemlendi.

3.7.13 Enzimatik Dekolorizasyon

Beyaz çürükçül funguslar ve ligninolitik enzimleri, birçok ksenobiyotik maddenin yıkımında ve atık sularda bulunan boyar maddelerin dekolozasyonunda yaygın olarak denenmekte ve olumlu sonuçlara da ulaşmaktadır. İzole MnP nin ligninolitik enzimlerin gösterdiği tipik tepkime olan azo boyaların dekolozasyonu test edildi. Bu amaca yönelik hazırlanan tepkime karışımı; toplam 1 ml lik hacimde enzim ve boya (50 ve 100 mg/L) dan meydana gelmektedir. Dekolorizasyon, her bir boyanın maksimum absorbands verdiği dalga boyunda, 30°C ve pH 4,5 da izlendi.



Şekil 3.37 MnP ile bazı azo boyaların enzimatik dekolorizasyon

Direct Blue 15 ($\lambda=610$ nm), Direct Green ($\lambda= 620$ nm) ve Congo Red ($\lambda= 497$ nm) gibi sentetik boyalar, üretilen MnP ile muamele edildi (Şekil 3. 37). En yüksek dekolorizasyon, Congo Red (100 mg/L) ile 15 dk lık muamele sonrası %15 olarak belirlendi. İzole enzimin; denenen azo boyalar üzerinde farklı miktarlarda dekolorizasyonu gerçekleştirme kapasitesinde olduğu belirlendi.

3.8 MnP nin Yapısal Karakterizasyonu

MnP nin yapısal karakterizasyonu amacıyla Bölüm 3.7.11 de enzim aktif merkezine yönelik elde edilen sonuçlara ilaveten karbohidrat tayini de gerçekleştirildi.

3.8.1 Aktif merkez tayini

Bölüm 3.7.11 de saptandığı gibi; enzimin aktif merkezi ve yapısı için Cys amino asidi ve –SH gruplarının önemli rol oynadığı görülürken Ser aminoasidinin herhangi bir etkisinin olmadığı saptandı.

3.8.2 Karbohidrat tayini

Fenol-sülfürik asit yöntemine göre immobilize *P.chrysosporium* MnP enzimi 65,78 µg/ml toplam karbohidrat içeren bir glikoprotein olduğu saptandı (Tien and Kirk, 1983).



4. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

1980 li yılların başlarında, beyaz çürükçül funguslardan *P. chrysosporium*'un lignin yıkım tepkimelerini gerçekleştiren iki hücre dışı enzim LiP ve MnP ürettiği keşfedildi. Bu keşiften kısa bir süre sonra organizmanın biyolojik yıkıma dirençli aromatik kirliliklerin pek çoğunu (örneğin, DDT, poliklorobifeniller, pentaklorafenol ve 2,3,7,8-TCDD) yıkıma uğratabildiği saptandı. Bu enzimlerden MnP, temel substrat olarak Mn^{+2} yi kullanan bir Hem-peroksidazdır. H_2O_2 ve bir karboksilik asit şelatörü varlığında Mn^{+2} yi Mn^3 e oksitleme kapasitesindeki enzim, fenolik lignin model bileşiklerini ve GSH gibi tiyol bileşikleriyle fenolik olmayan bileşikleri de yıkıma uğratmaktadır. Bu yıkım mekanizması, çeşitli radikal ara ürünler üzerinden gerçekleşmektedir.

P. chrysosporium spor ve miselleri, Amberlit IR 45, Eupergite C, Eupergite C 250L, Perlit (70 mesh altı), Purolit CT 275, Purolit MN 500, Polipropilen, polistiren köpük, coco-peat, kaba kepek gibi farklı taşıyıcılarda immobilize edildi ve polistiren köpük yeni bir taşıyıcı olarak saptandı. Böylece bu taşıyıcının kullanımı; üretim maliyetini düşürerek izolasyon ve paketlenme atık materyalinin tekrar kullanım olasılığını sağlamaktadır.

Beyaz çürükçül fungus *P.chrysosporium* un serbest, immobilize durağan kültürleri ve modifiye daldırmalı reaktör koşullarında MnP üretimi incelendi ve enzim üretiminin Mn^{2+} , Tween 80, varlığında arttığı belirlendi.

Enzim, immobilize *P. chrysosporium* dan izole edilerek saflaştırıldı ve kısmi olarak karakterize edildi. Ham enzimde $(NH_4)_2SO_4$ ile kısmi protein çöktürmesine takiben DEAE-Sefaroz iyon değişim ve Ultragel AcA

54 jel filtrasyon kromatografisiyle saflaştırıldı. Bu klasik saflaştırma prosesiyle yüksek verimlilikte nispeten saf bir enzim elde edildi. Saflaştırılan MnP nin bazı enzimatik, kinetik ve yapısal tayini gerçekleştirildi. Enzim aktivitesine, karboksilik asitlerin etkisi incelendiğinde özellikle; okzalit, maleat gibi dikarboksilli asitlerin olumlu etkisi gözlemlendi. Bu durum, dikarboksilli asitlerin enzim mekanizmasında şelatlayıcı ajanlar olarak etki etmelerinden kaynaklanmaktadır.

Enzimin 65,78 µg/ml karbohidrat içeren bir glikoprotein olduğu, aktif merkezi ve yapısında Sistein amino asidinin ve -SH gruplarının önemli, Serin aminoasidinin etkili olmadığı görüldü.

Üretilen MnPnin bazı sentetik azo boyaların dekolizasyonunda etkili olduğu saptandı. En yüksek dekolizasyon, enzimin 100 mg/L Congo Red ile 15dk'lık muamelesi sonrası %15 olarak belirlendi. Bu durum; üretilen MnPnin endüstriyel açıdan da etkin kullanılabileceğinin göstergesi olabilir.

Her fermentasyon prosesi için ideal bir biyoreaktör yoktur. Bundan dolayı; organizmanın niteliği, ortam koşulları, üretilen metabolitin özelliği ve teknolojik açıdan biyoreaktör tasarımı zorunlu görülmektedir. Bu amaçla; katı-hal daldırmalı biyoreaktör modifiye edildi. *P. chrysosporium* tarafından MnP üretimi incelendi. İnert taşıyıcı polistiren köpükte sporların immobilizasyonu ile oluşan hücre kültürü, kesikli tip kültürde geleneksel stasyonel sıvı kültürlerle göre daha yüksek MnP üretti. Bu çalışmada üretilen, izole edilip saflaştırılarak kısmi olarak karakterize edilen MnP endüstriyel ve ticari bir çok biyoteknolojik çalışmalarda kullanılabilecek kapasitesinde olduğu gösterildi.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aidoo, K.E., Hendry, R., and Wood, B.J.B., 1982, Solid State fermentations, *Advances in Appl. Microbiol.*, 28, 201-237.
- Akamatsu, Y., Ma, D.B., Higuchi, T. and Shimada, M., 1990, A novel enzymatic decarboxylation of oxalic acid by the lignin peroxidase system of white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *FEBS Lett.*, 269: 261-263 pp.
- Alic, M. and Gold, M.H., 1985, Genetic recombination in the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 50: 27-30 pp.
- Alic, M. and Gold, M., 1991, Genetics and molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *More Gene Manipulations in Fungi*, Bennett, J. and Lasure, L. (Eds) Academic Press, New York. 319-341 pp.
- Ander, P., Eriksson, K.E. and Yu, H.S., 1984, Metabolism of lignin-derived aromatic acids by wood-rotting fungi, *J. Gen. Microbiol.*, 130: 63-68 pp.
- Ander, P., Stoytschev, I., and Eriksson, K.E., 1988, Cleavage and metabolism of methoxyl groups from vanillic and ferulic acids by brown-rot and soft-rot fungi, *Cellulose Chem. Technol.*, 22: 255-266 pp.
- Andersen, L.A., Renganathan, V., Loelt, T.M. and Gold, M.H., 1987, Lignin peroxidase: resonance raman spectral evidence for compound II and for a temperature-dependent coordination-state equilibrium in the ferric enzyme, *Biochemistry*, 26: 2258-2263 pp.
- Andrawis, A., Johnson, K.A. and Tien, M., 1988, Studies on compound formation of lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*, *J. Biol. Chem.*, 263: 1195-1198 pp.

- Asther, M., Corrieu, G., Drapron, R. and Odier, E., 1987**, Effect of Tween 80 and oleic acid on ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium* INA-12, *Enzyme and Microbial Technol.*, 9: 245–249 pp.
- Asther, M., Lesage, L., Drapron, R., Corrieu, G., and Odier, E., 1988**, Phospholipid and fatty acid enrichment of *Phanerochaete chrysosporium* INA-12 in relation to ligninase production, *Appl. Environ. Microbiol.*, 27: 393–398 pp.
- Atrat, P. and Groh, H., 1981**, Steroid transformation with immobilized microorganisms(Part VI), *Z. Allg. Mikrobiol.*, 21: 3-6 pp.
- Auria, R., Palacios, J. and Revah, S., 1992**, Determination of the interparticular effective diffusion coefficient for CO₂ and O₂ in solid state fermentation, *Biotechnol. Bioeng.*, 39: 898-902 pp.
- Aust, S.D., 1990**, Degradation of environmental pollutants by *Phanerochaete chrysosporium*, *Microb. Ecol.*, 20: 197-209 pp.
- Ayers, A.R., Ayers, S.B. and Eriksson, K., 1978**, cellobiose oxidase, purification and partial characterization of a hemoprotein from *Sporotrichum pulverulentum*, *Eur. J. Biochem.*, 90: 171-181 pp.
- Balakrishnan, K. And Pandey, A., 1996**, Production of biologically active secondary metabolites in solid state fermentation, *J. Sci. Ind. Res.*, 55: 365-372 pp.
- Banci, L., Bertini, I., Turano, P., Tien, M. and Kirk, T.K., 1991**, proton nmr investigation into the basis for the relatively high redox potential of lignin peroxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 6956-6960 pp.

- Banci, L., Ciofi-Baffoni, S. and Tien, M., 1999,** Lignin and Mn-peroxidase-catalysed oxidation of phenolic lignin oligomers, *Biochemistry*, 38: 3205-3210 pp.
- Bao, W., Fukushima, Y., Jensen, K.A., Moen, M.A. and Hammel, K.E., 1994,** Oxidative degradation of non-phenolic lignin during lipid peroxidation by fungal manganese peroxidase, *FEBS Lett.*, 354: 297-300 pp.
- Barr, D.P. and Aust, S.D., 1994,** Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants, *Environ. Sci. Technol.*, 28 : 79-87 pp.
- Birnbaum, S., Pendleton, R., Larsson, P.O. and Mosbach, K., 1981,** Covalent stabilization of alginate gel for the entrapment of living whole cells, *Biotechnol. Lett.*, 3: 393-400 pp.
- Black, A.K. and Reddy, C.A., 1991,** Cloning and characterization of a lignin peroxidase gene from the white-rot fungus *Trametes versicolor*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 179: 428-435 pp.
- Blanchette, R.A., Abad, A.R., Farrell, R.L. and Leathers, T.D., 1989,** Detection of lignin peroxidase and xylanase by immunocytochemical labeling in wood decayed by basidiomycetes, *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 1457-1465 pp.
- Blanchette, R.A., 1991,** Delignification by wood-decay fungi, *Annu. Rev. Phytopathol.*, 29: 381p.
- Blanchette, R.A. and Ander, P., 1990,** Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components, Springer-Verlag, Berlin.
- Blanchette, R.A., Kruger, J.E., Haight, J.E., Akhtar, M., and Akin, D.E. 1997,** Cell wall alteration in loblolly pine wood decayed by the white-rot fungus, *Coliporiopsis subvermispora*, *J. Biotechnol.*, 53: 203-213 pp.

- Bergbauer, M., Eggert, C. and Kraeplin, G., 1991,** Degradation of chlorinated lignin compounds in a bleach plant effluent by the white rot fungus *Trametes versicolor*, *Appl. Microb. Biotech.*, 35: 105-109 pp.
- Bonnarme, P. and Jeffries, T., 1990,** Mn (II) regulation of lignin peroxidases and manganese-dependent peroxidase from lignin-degrading white-rot fungi, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 210-217 pp.
- Bonnarme, P., Delattre, M., Corrieu, G. and Asther, M., 1991,** Peroxidase secretion by pellets or immobilized cells of *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 and INA-12 in relation to organelle content, *Enzyme Microbiol. Technol.*, 13: 727-733 pp.
- Bonnarme, P. and Asther, M., 1993,** Influence of primary and secondary proteases produced by free or immobilized cells of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* on lignin peroxidase activity. *J. Biotechnol.*, 30: 271-282 pp.
- Boominathan, K. and Reddy, C.A.,** Fungal Degradation of Lignin, in Biotechnological Applications. In *Handbook of Applied Mycology*, ed. D.K. Arora, H.G. Mukerji and R.P. Elander. Marcel Dekker Inc, New York, 1991, pp 763-822.
- Boominathan, K., Reddy, C.A., 1992,** cAMP-mediated differential regulation of lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase production in the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89: 5586-5590 pp.
- Bradford, M.M., 1976,** Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 72: 248-254 pp.

- Brodelius, P. and Vandamme, E.J., 1987, Immobilized Cell Systems, Biotechnology, Rehm, H.J. and Reed, G., (Eds), VCH Verlagsgesellschaft bH, Weinheim 7a (8), 405-464 pp.
- Brown, J.A., Glenn, J.K. and Gold, M.H., 1990, Manganese regulates expression of manganese peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*, *J. Bacteriol.*, 172: 3125-3130 pp.
- Brown, J.A., Alic, M. and Gold, M., 1991, Manganese peroxidase gene transcription in *Phanerochaete chrysosporium* activation by manganese, *J. Bacteriol.*, 173: 4101-4106 pp.
- Brown, J.A., Li, D. and Gold, M.H., 1993, Heat shock induction of manganese peroxidase gene transcription in *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 4295-4299 pp.
- Bucke, C. and Wiseman, A., 1981, Immobilized enzymes and cells, *Chem. Ind.*, 4: 234-240 pp.
- Bumpus, J.A., 1989, Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 154-158 pp.
- Bumpus, J.A., Tien, M., Wright, D. and Aust, S.D., 1985, Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus, *Science*, 288: 1432-1436 pp.
- Burdsall, H.H. and Eslyn, W.E., 1974, A new *Phanerochaete chrysosporium* with a imperfect state, *Mycotaxon*, 1: 123-133 pp.
- Burns, R.G., 1979, Adhesion of Microorganisms to Surfaces, Ellwood, D.C., Melling, J. and Rutter, P., (Eds.), Academic Press, New York, 109 p.
- Cabaleiro, D.R., Rodríguez, S., Sanroman, A. and Longo, M.A., 2001, Characterisation of deactivating agents and their influence on the stability of manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 76: 867-872 pp.

- Cai, D. and Tien, M.,** 1989, On the reactions of lignin peroxidase compound III (isozyme H8), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 162: 464-469 pp.
- Cai, D. and Tien, M.,** 1990, Characterization of the oxycomplex of lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*: equilibrium and kinetics studies, *Biochemistry*, 29: 2085-2091 pp.
- Cai, D. and Tien, M.,** 1992, Kinetic studies on the formation and decomposition of compounds II and III, *J. Biol. Chem.*, 257: 11149-11155 pp.
- Cameron, M. D. and Aust S.D.,** 1999, Degradation of chemicals by reactive radicals produced by cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 367: 115-121 pp.
- Cameron, M.D. and Aust, S.D.,** 2000, Proteolysis of cellobiosedehydrogenase alleviates inhibition of peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*: a proposed rational for the formation of cellobiose: quinone oxidoreductase, *Arch. Biochem. Biophys.*, 370: 226 p.
- Cameron, M.D., Post, Z.D., Stahl, J.D., Haselbach, J. and Aust, S.D.,** 2000, Cellobiose dehydrogenase-dependent biodegradation of polyacrylate polymers by *Phanerochaete chrysosporium*, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 7:130-134 pp.
- Cavalleri, E. and Rogan, E.,** 1985, role of radical cations in aromatic hydrocarbon carcinogenesis, *Environ. Health Perspect.*, 64: 69-84 pp.
- Carlile, M.J. and Watkinson, S.C.,** 1994, *The Fungi*, Academic Press, San Diego.

- Carvalho, M.E.A., Monteiro, M.C., Bon, E.P.S. and Sant'Anna, G.L., 1998,** Production and characterization of *Phanerochaete chrysosporium* lignin peroxidases for pulp bleaching, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 70-72: 955-966 pp.
- Chibata, I., Tosa, T. And Sato, T., 1974,** Immobilized aspartase-containing microbial cells: preparation and enzymatic properties, *Appl. Microbiol.*, 27: 878-885 pp.
- Crawford, R.L., 1981,** Lignin Biodegradation and Transformation, Wiley-Interscience, New York.
- Cullen, D. and Kersten, P., 1992,** fungal enzymes for lignocellulose degradation, *Applied Molecular Genetics of Filamentous Fungi*, Kinghorn, J.K. and Turner, G. (Eds), Blackie Academic, London, 100-130 pp.
- Daniel, G., Pettersson, B., Nilsson, T. and Volc, J., 1990,** Use of immunogold cytochemistry to detect Mn (II)-dependent and lignin peroxidases in wood degraded by the white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Lentinus edodes*, *Can. J. Bot.*, 68: 920-933 pp.
- Daniel, G., Volc, J. and Kubatova, E., 1994,** Pyranose oxidase a major source of H_2O_2 during wood degradation by *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* and *Oudemansiella mucida*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 2524-2532 pp.
- D'Annibale, A., Crestini, C., Di Mattia, E. and Sermanni, G.G., 1996,** Veratryl alcohol oxidation by manganese-dependent peroxidase from *Lentinus edodes*, *J. Biotechnol.*, 48: 231-239 pp.
- Datt, A., Betterman, A. and Kirk, T.K., 1991,** Identification of a specific manganese peroxidase among ligninolytic enzymes secreted by *Phanerochaete chrysosporium* during wood decay, *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 1453-1460 pp.

- De Jong, E., Cazemier, A.E., Field, J.A. and de Bont, J.A.M., 1994, Physiological role of chlorinated aryl alcohols biosynthesized de novo by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 271-277 pp.
- Dosoretz, C.G., Chen, H.C. and Grethlein, H.E., 1990, Effect of environmental conditions on extracellular protease activity in ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 395-400 pp.
- Durand, G. and Navarro, I.M., 1978, Immobilized microbial cells, *Process Biochem.*, September, 14923 pp.
- Durand, A., Renaud, R., Almanza, S., Maratray, J., Diez, M. and Desgranges, C., 1993, Solid-state fermentation reactors: from lab scale to pilot plant. *Biotechnol. Adv.*, 11: 591-597 pp.
- Edwards, S.L., Raag, R., Wariishi, H., Gold, M.H. and Poulos, T. L., 1993, Crystal structure of lignin peroxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 750-754 pp.
- Elisashvili, V.I., 1993, Physiological regulation of ligninolytic activity in higher basidium fungi, *Microbiology*, 62(5): 480-487 pp.
- Eriksson, K. E. L., Habu, N. and Samejima, M., 1993, Recent advances in fungal cellobiose oxidoreductases, *Enz. Microb. Tech.*, 15: 1002-1008 pp.
- Eriksson, K.E., Enoki, M., Watanabe, T., Nakagame, S., Koller, K., Messner, K., Honda, Y. and Kuwahara, M., 1999, Extracellular lipid peroxidation of selective white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 180: 205-211 pp.
- Farrell, R.L., Murtagh, K.E., Tien, M., Mozuch, M.D. and Kirk, T.K., 1989, Physical and enzymatic properties of lignin peroxidase isozymes from *Phanerochaete chrysosporium*, *Enz. Microb. Technol.*, 11: 322-328 pp.

- Fernando, T., Bumpus, J.A. and Aust, S.D., 1990,** Biodegradation of TNT (2,4,6-trinitrotoluene) by *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 1666-1671 pp.
- Fletcher, M., 1979,** Adhesion of Microorganisms to Surfaces, Ellwood, D.C., Melling, J., and Rutter, P., (Eds), Academic Press, Newyork, 87 p.
- Flint, K.P., 1987,** Immobilized Whole-Cell Biocatalysts, Biotechnology of Waste Treatment and Exploitation, Gidwick, J.M. and Holdom, R.S., (Eds.), Halsted Press, New York, 332-379 pp.
- Forrester, I.T., Grabski, A.C., Burgess, R.R. and Leatham, G.F., 1988,** Manganese, Mn-dependent peroxidases, and the biodegradation of lignin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 157: 992-999 pp.
- Fukui, S. and Tanaka, A., 1982,** Immobilized microbial cells, *Annu. Rev. Microbiol.*, 36: 145-172 pp.
- Galliano, H., Gas, G., Seris, J.L. and Boudet, A.M., 1991,** Lignin degradation by rigidoporus lignosus involves synergistic action of two oxidizing enzymes: Mn Peroxidase and Laccase, *Enzy. Microb. Technol.*, 13: 478-482 pp.
- Gaskell, J., Dieperink, E. and Cullen, D., 1991,** Genomic organization of lignin peroxidase genes from *Phanerochaete chrysosporium*, *Nucl. Acids Res.*, 19: 599-603 pp.
- Gaskell, J., Stewart, P., Kersten, P.J., Covert, S.F., Reiser, J. and Cullen, D., 1994,** Establishment of genetic linkage by allele-specific pcr: application to the lignin peroxidase gene family of *Phanerochaete chrysosporium*, *Bio/Technology*, 12: 1372-1375 pp.
- Gerson, D.F. and Zajic, J.E., 1979,** Immobilized Microbial Cells, ACS Symp. Ser., 106, 29p.

- Ghose, T.K., 1987, Measurement of cellulase activities, *Pure Appl. Chem.*, 59:257-268 pp.
- Glenn, J.K., Morgan, M.A., Mayfield, M.B., Kuwahara, M. and Gold, M.H., 1983, An extracellular H_2O_2 -requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 114: 1077-1083 pp.
- Glenn, J.K. and Gold, M.H., 1985, Purification and characterization of an extracellular Mn (II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 242: 329-341 pp.
- Glenn, J.K., Akileswaran, L. and Gold, M.H., 1986, Mn(II) oxidation is the principal function of the extracellular Mn-peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 251: 688-696 pp.
- Glumoff, T., Harvey, P.J., Molinari, S., Goble, M., Frank, G., Palmer, M., Smit, J.D.G. and Leisola, M.S.A., 1990, Lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*, molecular and kinetic characterization of isozymes, *Eur. J. Biochem.*, 187: 515-520 pp.
- Godfrey, B.J., Mayfield, M.B., Brown, J.A. and Gold, M., 1990, Characterization of a gene encoding a manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*, *Gene*, 93: 119-124 pp.
- Gold, M.H. and Cheng, T.M., 1978, Induction of colonial growth and replica plating of the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 35: 1223-1225 pp.
- Gold, M.H., Kuwahara, M., Chiu, A.A., and Glenn, J.K. 1984, Purification and Characterization of an Extracellular H_2O_2 -requiring diarylpropane oxygenase from the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 234: 353-362 pp.

- Gold, M. and Alic, M., 1993, Molecular biology of lignin degradation by the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *Microbiol. Rev.*, 57: 605-622 pp.
- Gold, M.H., Cheng, T.M. and Mayneal, M.B., 1982, Isolation and complementation studies of auxotrophic mutants of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *App. Environ. Microbiol.*, 42: 278-282 pp.
- Goodwin, D.C., Barr, D.P., Aust, S.D. and Grover, T.A., 1994, The role of oxalate in lignin peroxidase-catalyzed reduction: protection from compound III accumulation, *Arch. Biochem. Biophys.*, 315: 267-272 pp.
- Guimaraes, C., Matos, C., Azeredo, J., Mota, M. and Oliviera, R., 2002, The importance of the morphology and hydrophobicity of different carriers on the immobilization and sugar refinery effluent degradation activity of *Phanerochaete chrysosporium*, *Biotechnol. Lett.*, 24: 795-800 pp.
- Gürkün, V. ve Halkman, A.K., 1988, Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri, Gıda Teknolojileri Derneği Yayın no:7, Son Matbaası, Ankara, 146s.
- Haemmerli, S.D., Leisola, M.S.A. and Fiechter, A., 1986, Polymerisation of lignins by ligninases from *Phanerochaete chrysosporium*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 35: 33-36 pp.
- Halliwel, B. and Gutteridge, J.M.C., 1989, Free Radicals in Biology and Medicine, Calderon Press, Oxford, UK.
- Hammel, K.E. and Moen, M.A., 1991, Depolymerization of a synthetic lignin in vitro by lignin peroxidase, *Enzy. Microb. Technol.*, 13: 15-18 pp.
- Hammel, K.E., Mozuch, M.D., Jensen, Jr, K.A. and Kersten, P.J., 1994, H₂O₂ recycling during oxidation of the arylglycerol β -aryl ether lignin structure by lignin peroxidase and glyoxal oxidase, *Biochemistry*, 33: 13349-13354 pp.

- Hammel, K.E., Tien, M., Kalyanaraman, B. and Kirk, T.K., 1985, Mechanism of oxidative C α -C β cleavage of a lignin model dimer by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase: stoichiometry and involvement of free radicals, *J.Biol. Chem.*, 260: 8348-8353 pp.
- Hammel, K.E., Kalyanaraman, B. and Kirk, T.K., 1986, Substrate free radicals are intermediates in ligninase catalysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 3708-3712 pp.
- Hammel, K.E., Tardone, P.J., Moen, M.A. and Price, L.A., 1989, Biomimetic oxidation of nonphenolic lignin models by Mn(III): new observations on the oxidizability of guaiacyl and syringyl substructures, *Arch. Biochem. Biophys.*, 270: 404-409 pp.
- Haris, E.L.V. and Angal, S., 1993, Protein Purification Methods (a practical approach), Oxford University Press, New York, 313 pp.
- Harkin, J.M. and Obst, J.R., 1973, Demethylation of 2,4,6-trimethoxyphenol by phenol oxidase, *Science*, 180: 296-298 pp.
- Harris, R.Z., Wariishi, H., Gold, M.H. and Ortiz de Montellano, P.R., 1991, The catalytic site of manganese peroxidase. Regiospecific addition of sodium azide and alkylhydrazines to the heme group, *J. Biol. Chem.*, 266: 8751-8758.
- Harvey, P.J., Schoemaker, H.E. and Palmer, J.M., 1986, Veratryl alcohol as a mediator and the role of radical cations in lignin biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*, *FEBS Lett.*, 195: 242-246 pp.
- Harvey, P.J., Palmer, J.M., Schoemaker, H.E., Dekker, H.L. and Wever, R., 1989, Pre-steady-state kinetic study on the formation of compound I and II of ligninase, *Biochem. Biophys. Acta*, 994: 59-63 pp.

- Hatakka, A.**, 2001, Biodegradation Of Lignin. Biopolymers, Vol 1-Lignin, Humic Substances and Coal, Hofrichter, M. and Steinbüchel, A, (Eds.), Wiley-VHC, Weinheim, Germany, 129-180 pp.
- Haylock, R., Liwicki, R. and Broda, P.**, 1985, The isolation of mRNA from the basidiomycete fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Coprinus cinereus* and its in vitro transiation, *Appl. Environ. Microbiol.*, 46: 260-263 pp.
- Heinfling, A., Ruiz-Dueñas Guillén, F., Matinez, M.J., Bergbauer, M., Szewzyk, U. and Martinez, A.T.**, 1998, A study on reducing substrates of manganese-oxidizing peroxidases from *Pleurotus eryngii*, and *Bjerkandera adusta*, *FEBS Lett.*, 428: 141-146 pp.
- Heinfling, A., Martinez, M.J., Martinez, A.T., Bergbauer, M. and Szewzyk, U.**, 1998b, Purification and characterization of peroxidases from the dye-decolorizing fungus *Bjerkandera adusta*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 165: 43-50 pp.
- Higuchi, T.**, 1990, Lignin Biochemistry: Biosynthesis and Biodegradation, *Wood Sci Technol.*, 24: 23-63 pp.
- Hofrichter, M., Ziegenhagen, D., Vares, T., Friedrich, M., Jäger, M.G., Fritsche, W. and Hatakka, A.**, 1998a, Oxidative decomposition of malonic acid as basis for the action of manganese peroxidase in the absence of hydrogen peroxide, *FEBS Lett.*, 434: 362-366 pp.
- Hofrichter, M., Scheibner, K., Schneegaß, I. and Fritsche, W. K.**, 1998b, Enzymatic combustion of aromatic and aliphatic compounds by manganese peroxidase from *Nematolama frowardii*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 399-404 pp.
- Hofrichter, M., Lundell, T. and Hatakka, A.**, 2001, Conversion of milled pine wood by Manganese Peroxidase from *Phlebia radiata*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 4588-4593 pp.

- Hofrichter, M.**, 2002, Review: lignin conversion by the manganese peroxidase (MnP), *Enzy. Microbiol. Technol.*, 30: 454-466 pp.
- Huoponen K., Ollikka, P., Kalin, M., Waither, I., Mantsaia, P. and Reiser, J.**, 1990, Characterization of lignin peroxidase-encoding genes from lignin-degrading basidiomycetes, *Gene*, 89: 145-150 pp.
- Hyde, S.M. and Wood, P.M.**, 1997, A mechanism for production of hydroxyl radicals by the brown-rot fungus *Coniophora puteana*: Fe(III) reduction by cellobiose dehydrogenase and Fe(II) oxidation at a distance from the hyphae, *Microbiology*, 143: 259-266 pp.
- Jin, L., Schultz, T.P. and Nicholas, D.D.**, 1990, Structural characterization of brown rotted lignin, *Holzforschung*, 44: 133-138 pp.
- Johnson, T.M. and Li, J.K.**, 1991, Heterologous expression and characterization of an active lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* using recombinant baculovirus, *Arch Biochem Biophys*, 291: 371-378 pp.
- Johnson, F., Loew, G.H. and Du, P.**, 1994, Homology models of two isozymes of manganese peroxidase: prediction of a Mn(II) binding site, *Proteins*, 20: 312-319 pp.
- Jönsson, L. and Nyman, P.O.**, 1992, Characterization of a lignin peroxidase gene from the white-rot fungus *Trametes versicolor*, *Biochimie*, 74:177-182 pp.
- Jurasek, L. and Paice, M.G.**, 1988, Biological treatment of pulps, *Biomass*, 15: 103-108 pp.
- Kapich, A., Hofrichter, M., Vares, T. and Hatakka, A.**, 1999, Coupling of manganese peroxidase-mediated lipid peroxidation with destruction of nonphenolic lignin model compounds and ¹⁴C-labeled lignins, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 259: 212-219 pp.

- Kapich, A., Jensen, K.A. and Hammel, K.E., 1999, Peroxyl radicals are potential agents of lignin biodegradation, *FEBS Lett*, 461: 115-119 pp.
- Karhunen, E., Kantelinen, A. and Niku-Paavola, M.L., 1990a, Mn-dependent peroxidase from the lignin-degrading white rot fungus *Plebia radiata*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 279: 25-31 pp.
- Karhunen, E., Niku-Paavola, M-L., Vukari, L., Haltia, T., van der Meer, R.A. and Duine, J.A., 1990b, A novel combination of prosthetic groups in a fungal laccase: PQQ and two copper atoms, *FEBS Lett.*, 267: 6-8 pp.
- Kawai, S., Umezawa, T. and Higuchi, T., 1988, Degradation mechanisms of p-phenolic β -1 lignin substructure model compounds by laccase of *Coriolus versicolor*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 262: 99-110 pp.
- Kawai, S., Umezawa, T. and Higuchi, T., 1989, Oxidation of methoxylated benzyl alcohols by laccase of *Coriolus versicolor* in the presence of syringaldehyde, *Wood Res.*, 76: 10-16 pp.
- Kawai, S., Jensen, K.A., Bao, W. and Hammel, K.E., 1995, New polymeric model substrates for the study of microbial ligninolysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 3407-3414 pp.
- Kennedy, J.F., 1978, Microbial cells immobilized and living on solid supports and their application to fermentation processes, *Enzyme Eng.*, 4: 323-328 pp.
- Kennedy, J.F., 1979, Immobilized Microbial Cells, ACS Symp Ser 106, 19 p.
- Kennedy, J.F., Humphreys, J.D., Barker, A. and Greenshields, R.N., 1980, Application of living immobilized cells to the acceleration of the continuous conversions of ethanol (wort) to acetic acid (vinegar)-hydrous titanium (IV) oxide-immobilized acetobacter species, *Enzy. Microbiol. Technol.*, 2: 209-216 pp.

- Kersten, P.J., Tien, M., Kalyanaraman, B. and Kirk, T.K., 1985, The ligninase of *Phanerochaete chrysosporium*, generates cation radicals from methoxybenzenes, *J. Biol. Chem.*, 260: 2609-2612 pp.
- Kersten, P.J. and Kirk, T.K., 1987, Involvement of a new enzyme glyoxal oxidase in extracellular H₂O₂ production by *Phanerochaete chrysosporium*, *J. Bacteriol.*, 169: 21956-22201 pp.
- Kersten, P.J., 1990, Glyoxal oxidase of *Phanerochaete chrysosporium* : Its characterization and activation by lignin peroxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 2936-2940 pp.
- Kersten, P.J. and Cullen, D., 1993, Cloning and characterization of a cDNA encoding glyoxal oxidase a H₂O₂-producing enzyme from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7411-7913 pp.
- Khindaria, A., Grover, T.A. and Aust, S.D., 1995, Reductive dehalogenation of aliphatic halocarbons by lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*, *Environ. Sci.Tech.*, 29: 719-725 pp.
- Kirk, T.K. and Adler, E., 1970, Methoxyl-deficient structural elements in lignin of sweetgum decayed by a brown-rot fungus, *Acta Chem. Scand.*, 24: 3379-3390 pp.
- Kirk, T.K., 1975, Lignin-degrading enzyme system, *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 5: 139-150 pp.
- Kirk, T.K., Schultz, E., Connors, W.J., Lorenz, L.F. and Zeikus, F.G., 1978, Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*., *Arch. Microbial.*, 117: 277-285 pp.
- Kirk, T.K., Croan, S., Tien, M., Murtagh, K.E. and Farrell, R.L., 1986a, Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: effect

of selected growth conditions and use of a mutant strain, *Enzy. Microb. Technol.*, 8: 27-32 pp.

Kirk, T.K., Tien, M., Murtagh, K.E. and Farrell, R.L., 1986b, Ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* mechanism of its degradation of the non-phenolic arylglycerol β -aryl ether substructure of lignin, *Biochem. J.*, 236: 279-287 pp.

Kirk, T.K. and Farrell, R.L., 1987, Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin, *Annu. Rev. Microbiol.*, 41: 465-505 pp.

Kirkpatrick, N., Reid, I.D., Ziomek, E. and Paice, M.G., 1990, Biological bleaching of hardwood kraft pulp using *trametes (coriolus) versicolor* immobilized in polyurethane foam, *Appl. Env. Microbiol.*, 33: 105-108 pp.

Kishi, K., Wariishi, H., Marquez, L., Dunford, H.B. and Gold, M.H., 1994, Mechanism of manganese peroxidase compound II reduction: effect of organic acid chelators and pH, *Biochemistry*, 33:8694-8701 pp.

Kojima, Y., Tsukuda, Y., Kawai, Y., Tsukamoto, A., Sugiura, J., Sakaino, M. and Kita, Y., 1990, Cloning, sequence analysis and expression of ligninolytic phenoloxidase genes of the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*, *J. Biol. Chem.*, 265: 15224-15230 pp.

Kuan, I.C. and Tien, M., 1989, Phosphorylation of lignin peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. Identification of mannose 6-phosphate, *J. Biol. Chem.*, 264: 20350-20355 pp.

Kuan, I.C. and Tien, M., 1993, Stimulation of Mn peroxidase activity: a possible role for oxalate in lignin biodegradation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 1242-1246 pp.

Kuan, I.C., Johnson, K.A. and Tien, M., 1993, Kinetic analysis of Manganese peroxidase. The reaction with manganese complexes, *J. Biol. Chem.*, 268: 20064-20070 pp.

- Kulla, D., Tien, M., Fee, J.A. and Ondrias, M.R., 1985, Resonance raman spectra of extracellular ligninase: evidence for a heme active site similar to those of peroxidases, *Biochemistry*, 24: 3394-3397 pp.
- Kurek, B. and Kersten, P.J., 1995, Physiological regulation of glyoxal oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* by peroxidase systems, *Enz. Microb. Tech.*, 17: 751-756 pp.
- Kurek, B. and Odier, E., 1990, Influence of lignin peroxidase concentration and localisation in lignin biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 34: 264-269 pp.
- Kuwahara, M., Glenn, J.K., Morgan, M.A. and Gold, M.H., 1984, Separation and characterization of two extracellular H_2O_2 -dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*, *FEBS Lett.*, 169: 247-250 pp.
- Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature (London)*, 227: 680-682 pp.
- Leisola, M.S.A., Schmidt, B., Thanei-Wyss, U. and Fiechter, A., 1985, Aromatic ring cleavage of veratryl alcohol by *Phanerochaete chrysosporium*, *FEBS*, 189: 267-270 pp.
- Leisola, M.S.A., Kozulic, B., Meusdoerffer, F. and Fiechter, A., 1987, Homology among multiple extracellular peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*, *J. Biol. Chem.*, 262: 419-424 pp.
- Leisola, M.S.A., Haemmerli, S.D., Waldner, R., Schoemaker, H.E., Schmidt, H.W.H. and Fiechter, A., 1988, Metabolism of a lignin model compound 3,4-dimethoxybenzyl alcohol by *Phanerochaete chrysosporium*, *Cellulose Chem. Technol.*, 22: 267-277 pp.

- Lestan, D., Strancar, A. and Perdih, A., 1990,** Influence of some oils and surfactants on ligninolytic activity, growth and lipid fatty acids of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 34:426-428 pp.
- Lewandowski, G.A., Armenante, P.M., and Pak, D., 1990,** Reactor design for hazardous waste treatment using a white-rot fungus, *Water Res.*, 24: 75-82 pp.
- Li, D., Alic, M., Brown, J.A. and Gold, M.H., 1995,** Regulation of manganese peroxidase gene transcription by hydrogen peroxide chemical stress and molecular oxygen, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 341-345 pp.
- Maccarrone, M., Veidink, G.A. and Vliengenthart, J.F.G., 1991,** An investigation on the quinoprotein nature of some fungal and plant oxidoreductases, *J. Biol. Chem.*, 266: 21014-21017 pp.
- MacDonaid, M.J., Paterson, A. and Broda, P., 1984,** Possible relationship between cyclic amp and idiophasic metabolism in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *J. Bacteriol.*, 160: 470-472 pp.
- MacDonald, M.J., Ambler, R. and Broda, P., 1985,** Regulation of intracellular cyclic AMP levels in the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* during the onset of idiophasic metabolism, *Arch. Microbiol.*, 142: 152-156 pp.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Paeker, J., 2003,** Brock Biology of Microorganisms, Prentice Hall, Inc., Upper Saddle River, New Jersey, 105-150 pp.
- Malmström, B.G., Andreasson, L.E. and Reinhammer, B., 1975,** The Enzymes, Vol 12. Boyer, P.D., (Ed.) Academic Press, New York, 507-579 pp.
- Marquez, L., Wariishi, H., Dunford, H.B. and Gold, M.H., 1988,** Spectroscopic and kinetic properties of oxidized intermediates of lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*, *J. Biol. Chem.*, 263:10549-10552 pp.

- Matinez, M.J., Ruiz-Dueñas Guillén, F. and Martinez, A.T.,** 1996, Purification and catalytic properties of two manganese isoenzymes from *Pleurotus eryngii*, *Eur. J. Biochem.*, 237: 424-432 pp.
- Marton, J., Stern, A.M. and Marton, T.,** 1969, Decolorization of kraft black liquor with *Polyporus versicolor*, A White Rot Fungus, *Tappi J.*, 52: 1975-1981 pp.
- Mayfield, M.B., Godfrey, B.J. and Gold, M.H.,** 1994, Characterization of the *mnp2* gene encoding manganese peroxidase isozyme 2 from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *Gene*, 142: 231-235 pp.
- McEldoon, J.P. and Dardick, J.S.,** 1991, Thiol and Mn^{2+} - mediated oxidation of veratryl alcohol by horseradish peroxidase, *J. Biol. Chem.*, 266: 14288-14293 pp.
- Messing, R.A., Oppermann, R.A. and Kolot, F.B.,** 1979, Pore dimensions for accumulating biomass, *ACS Symp. Ser.*, 106: 13-28 pp.
- Mester, T. And Field, J.A.,** 1998, Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera* sp. BOS55, *J. Biol. Chem.*, 273: 15412-15417 pp.
- Millis, C.D., Cai, D., Stankovich, M.T. and Tien, M.,** 1989, Oxidation-reduction potentials and ionization states of extracellular peroxidases from the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *Biochemistry*, 28: 8484-8489 pp.
- Mino, Y., Wariishi, H., Blackburns, N.J., Loehr, T.M. and Gold, M.H.,** 1988, Spectral characterization of manganese peroxidase an extracellular heme enzyme from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *J. Biol. Chem.*, 263: 7029-7036 pp.
- Mohan, R.R. and Li, N.N.,** 1975, Nitrate and nitrite reduction by liquid membrane-encapsulated whole cells, *Biotechnol. Bioeng.*, 17: 1137-1156 pp.

- Moukha, S.M., Wösten, H.A.B., Mylius, E., Asther, M. and Wessels, J.G., 1993, Spatial and temporal accumulation of mRNAs encoding two common lignin peroxidases in *Phanerochaete chrysosporium*, *J. Bacteriol.*, 175: 3672-3678 pp.
- Muheim, A., Waldner, R., Sanglard, D., Reiser, J. and Schoemaker, H.E., 1991, Purification and properties of an aryl-alcohol dehydrogenase from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *Eur. J. Biochem.*, 195: 369-375 pp.
- Odier, E., Mozuch, M.D., Kalvanaraman, B. and Kirk, T.K., 1988, Ligninase-mediated phenoxy radical formation and polymerization unaffected by cellobiose: quinone oxidoreductase, *Biochimie*, 70: 847-852 pp.
- Orth, A.B., Rzhets Kaya, M., Cullen, D. and Tien, M., 1994, Characterization of a cDNA encoding a maganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*: genomic organization of lignin and manganese peroxidase-encoding genes, *Gene*, 148: 161-165 pp.
- Pandey, A., 1991, Effect of particle size of substrate on enzyme production in solid state fermentation, *Biores. Technol.*, 37: 169-172 pp.
- Pandey, A. and Radhakrishnan S., 1993, The production of glucoamylase by *Aspergillus niger* NCIM 1245, *Process Biochem.*, 28(3): 305-309 pp.
- Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C.R. and Nigam, P., 1999a, Solid state fermentation for the production of industrial enzymes, *Curr. Sci.*, 11(1): 149-162 pp.
- Pandey, A., Binjamin, S., Soccol, C.R., Nigam, P., Kriger, N. and Soccol, V.T., 1999b, The realm of microbial lipases in biotechnology, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 29 (2): 119-131 pp.

- Pandey, A., Soccol, C.R. and Mitchell, D., 2000, New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products, *Process Biochem.*, 35: 1153-1169 pp.
- Paszczynski, A., Huynh V.B. and Crawford, R.L., 1985, Enzymatic activities of an extracellular manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 29: 37-41 pp.
- Paszczynski, A., Huynh V.B. and Crawford, R.L., 1986, Comparison of ligninase-I and peroxidase-M2 from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 244: 750-765 pp.
- Pease, E.A., Andrawis, A. and Tien, M., 1989, Manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* primary structure deduced from complementary DNA sequence, *J. Biol. Chem.*, 264: 13531-13535 pp.
- Pease, E.A. and Tien, M., 1991, Lignin-degrading enzymes from the filamentous fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *Biocatalysts For Industry*, Dordick (Eds.), Plenum Press. New York, 115-135 pp.
- Pease, E.A. and Tien, M., 1992, Heterogeneity and regulation of manganese peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*, *J. Bacteriol.*, 174: 3532-3540 pp.
- Perez, J. and Jeffries, T.W., 1996, Roles of manganese and organic acids chelators in regulating lignin degradation and biosynthesis of peroxidases by *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 4263-4267 pp.
- Perie, F.H., Sheng, D. and Gold, M.H., 1996, Purification and characterization of two manganese peroxidase isoenzymes from the white-rot basidiomycete *Dichomitus squalens*. *Biochem. Biophys. Acta*, 1297: 139-148 pp.
- Phillips, C.R. and Poon, Y.C., 1988, Immobilization of Cells, Springer-Verlag, Berlin, Germany, 1-73 pp.

- Pointek, K., Glumorf, T. and Winterhalter, K., 1993, Low pH crystal structure of glycosylated lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.5 °Å resolution, *FEBS Lett.*, 315:119-124 pp.
- Popp, J.L., Kalyanaraman, B. and Kirk, T.K., 1990, Lignin peroxidase oxidation of Mn^{2+} in the presence of veratryl alcohol, malonic or oxalic acid, and oxygen, *Biochemistry*, 29: 10475-10480 pp.
- Popp, J.L. and Kirk, T.K., 1991, Oxidation of methoxybenzenes by manganese peroxidase and by Mn^{+3} , *Arch. Biochem. Biophys.*, 288: 145-148 pp.
- Popp, J.L., Kalyanaraman, B. and Kirk, T.K., 1991, Lignin peroxidase oxidation of Mn^{+2} in the presence of veratryl alcohol malonic or oxalic acid and oxygen, *Biochemistry*, 29:10475-10480 pp.
- Poulos, T.L., Edwards, S. L., Wariishi, H. and Gold, M.H., 1993, Crystallographic refinement of lignin peroxidase at 2Å°, *J. Biol. Chem.*, 268: 4429-4440 pp.
- Pribnow, D., Mayfield, M.B., Nipper, V.J., Brown, J.A. and Gold, M.H., 1989, Characterization of a cDNA encoding a manganese peroxidase from the Lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *J. Biol. Chem.*, 264: 5036-5040 pp.
- Pronosil, J.E., et al., 1989, Immobilized Biocatalysts, Ullmann's Encyclop. Ind. Chem., VHC Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, A14, 1-42pp.
- Randall, T., Rao, T.R. and Reddy, C.A., 1989, Use of a shuttle vector for the transformation of the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 161: 720-725 pp.
- Randall, T. and Reddy, C.A., 1991, An improved transformation vector for the lignin-degrading white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *Gene*, 103: 125-130 pp.

- Randall, T., Reddy, C.A. and Boominathan, K., 1991, A novel extrachromosomally maintained transformation vector for the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *J. Bacteriol.*, 173: 776-782 pp.
- Randall, T. and Reddy, C.A., 1992, The nature of extrachromosomal maintenance of transforming plasmids in the filamentous basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *Curr. Genet.*, 21: 255-260 pp.
- Reid, I.D., 1985, Biological delignification of aspen wood by solid-state fermentation with white rot fungus *Merilius tremellosus*, *Appl. Env. Microbiol.*, 52: 607-611 pp.
- Reid, I.D., Paice, M.G. and Jurasek, L., 1990, Biological bleaching of softwood kraft pulp with the fungus *Trametes (Coriolus) versicolor*, *Tappi J.*, 73: 14-153 pp.
- Reinhammer, B., 1984, Laccase, Copper Proteins and Copper Enzymes, Lontie, R., (Ed) CRC Press Boca Raton Fl., 1-35 pp.
- Renganathan, V., Miki, K. and Gold, M.H., 1985, Multiple molecular forms of diarylpropane oxygenase an H_2O_2 -requiring lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 241: 304-314 pp.
- Renganathan, V., Miki, K. and Gold, M.H., 1986, Role of molecular oxygen in lignin peroxidase reactions, *Arch. Biochem. Biophys.*, 246: 155-161 pp.
- Ritch, T.G., Nipper, N.V., Akileswaran, L., Smith, A.J., Pribnow, D.G. and Gold, M.H., 1991, Lignin peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* is synthesized as a proenzyme, *Gene*, 107: 119-126 pp.
- Rivela, I., Rodríguez Couto, S. and Sanromán, A., 2000, Extracellular ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* in a new solid-state bioreactor. *Biotechnol. Lett.*, 22: 1443-1447 pp.

- Rodríguez, S., Longo, M.A., Cameselle, C. and Sanromán, A., 1999, Production of manganese peroxidase and laccase in laboratory-scale bioreactors by *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioprocess Eng.*, 20: 531-535 pp.
- Rodríguez Couto, S., Rivela, I., Muñoz, M.R. and Sanromán, A., 2000, Ligninolytic enzyme production and the ability of decolourisation of Poly R-478 in packed-bed bioreactors by *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioprocess Eng.* 23:287-293 pp.
- Rodríguez Coutó, S., Barreiro, M., Rivela, I., Longo, M.A. and Sanromán, A., 2002, Performance of a solid-state immersion bioreactor for ligninolytic enzyme production: evaluation of different operational variables. *Process Biochem.*, 38: 219-227 pp.
- Rogers, M.S., Jones, G.D., Antonini, G., Wiison, M.T. and Brunori, M., 1994, Electron transfer from *Phanerochaete chrysosporium* cellobiose oxidase to equine cytochrome c and *Pseudomonas aeruginosa* cytochrome c-551, *J. Biochem.*, 298: 329-334 pp.
- Roig, M.N. and Kennedy, J.F., 1992, Perspectives of chemical modifications of enzymes, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 12: 391-412 pp.
- Rossacci, J., Shivkumar, S., 2003, Bead fusion in polystyrene foams, *J. Materials Science*, 38, 201-206.
- Rossi, G. and Erlich, H.L., 1990, Other Bioleaching Processes, in Microbial Mineral Recovery, Eds Henry, H.L. and Bierley, C.L., McGraw-Hill, New York, 149-170 pp.
- Roussos, S., Raimbault, M., Prebois, J.B. and Lonsane, B.K., 1993, Zymotis, a large scale solid state fermenter-design and evaluation, *Appl. Biochem. Botechnol.*, 42: 37-52 pp.
- Roy, B.P., Paice, M.G., Arenibald, F.S., Misra, S.K. and Misiak, L.E., 1994, Creation of metal-coplexing agents reduction of maganese dioxide and

- promotion of manganese peroxidase-mediated Mn(III) production by cellobiose: quinone oxidoreductase from *Trametes versicolor*, *J. Biol. Chem.*, 269: 19745-19750 pp.
- Ruttiman, C., Senwember, E., Salas, L., Curlen, D. and Vicuna, R., 1992,** Ligninolytic enzymes of the white rot basidiomycetes *Phlebia brevispora* and *Ceriporiopsis subvermispora*, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 16: 64-76 pp.
- Sack, U., Hofrichter, M. and Fritsche, W., 1997,** Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by manganese peroxidase of *Nematoloma frowardii*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 152: 227-234 pp.
- Saha, S.K. and Brewer, C.F., 1994,** Determination of the concentrations of oligosaccharides, complex type carbohydrates, and glycoproteins using the phenol-sulfuric acid method, *Carbohydrate Research*, 254: 157-167 pp.
- Saloheimo, M., Barajas, V., Niku-Paavola, M. and Knowles, J., 1989,** A lignin peroxidase gene from the white rot fungus *Phlebia radiata*: characterization and expression in *Trichoderma reesei*, *Gene*, 85: 343-351 pp.
- Saloheimo, M., Niku-Paavola, M. and Knowles, J., 1991,** Isolation and structural analysis of the laccase gene from the lignin-degrading fungus *Phlebia radiata*, *J. Gen. Microbiol.*, 137: 1537-1544 pp.
- Sarkanen, K.V. and Ludwig, C.H., 1971,** Lignins. Occurrence, Formation Structure and Reactions, Wiley, New York.
- Sarkar, S., Martinez, A.T. and Martinez, M.J., 1997,** Biochemical and molecular characterization of a manganese peroxidase isoenzyme from *Pleurotus ostreatus*, *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 1339: 23-30 pp.
- Schalch, H., Gaskell, J., Smith, T.L. and Cullen, D., 1989,** Molecular cloning and sequences of lignin peroxidase genes *Phanerochaete chrysosporium*, *Mol. Cell. Biol.*, 9: 2743-2747 pp.

- Schneegaß, I., Hofrichter, M., Scheibner, K. and Fritsche, W., 1997, Purification of the main manganese peroxidase isoenzyme MnP2 from the white-rot fungus *Nematoloma frowardii* b19, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 48: 602-605.
- Selvakumar, P., Ashakumary, L. and Pandey, A., 1996, Microbial synthesis of starch saccharifying enzyme in solid state fermentation, *J. Sci. Ind. Res.*, 55 (5-6): 443-449 pp.
- Setliff, E.C., Marton, R., Granzow, S.G. and Eriksson, K.L., 1990, Biochemical pulping with white rot fungi, *Tappi J*, 73: 141-147 pp.
- Seyan, E. and Kirwan, D., 1979, Nitrogenase activity of immobilized *Azotobacter vinelandii*, *Biotechnol. Bioeng.*, 21: 271-280 pp.
- Smail, T., Salhi, O. Knapp J.S., 1995, Solid state fermentation of carob pods by *Aspergillus niger* for protein production- effect of particle size, *World J. Microbiol. Technol.*, 11: 171-173 pp.
- Snook, M.E. and Hamilton, G.A., 1974, Oxidation and fragmentation of some phenyl-substituted alcohols and ethers by peroxydisulfate and fenton's reagent, *J. Am. Chem. Soc.*, 96: 860-869 pp.
- Stahl, J.D., Cameron, M.D., Haselbach, J. and Aust, S.D., 2000, Biodegradation of superabsorbent polymers in soil, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 7 (2): 83-88 pp.
- Stewart, P., Kersten, P., Vanden, Wymelenberg, A., Gaskell, J. and Cullen, D., 1992, The lignin peroxidase gene family of *Phanerochaete chrysosporium*: complex regulation by carbon and nitrogen limitation and the identification of a second dimorphic chromosome, *J. Bacteriol.*, 174: 5036-5042 pp.
- Sutherland, G.R.J. and Aust, S.D., 1996, The Effects of Calcium on the Thermal Stability and Activity of Manganese Peroxidase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 332: 128-134 pp.

- Sundaramoorthy, M., Kishi, K., Gold, M.H. and Poulos, T. L., 1994, The crystal structure of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.06-Å resolution, *J.Biol. Chem.*, 269: 32759-32767 pp.
- Tanaka, A., Jin, I.N., Kawamoto, S. and Fukui, S., 1979, Entrapment of microbial cells and organelles with hydrophilic urethane prepolymers, *Eur. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 7: 351-354 pp.
- Tien, M. and Kirk, T.K., 1983, Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* burds, *Science*, 221: 661-663 pp.
- Tien, M. and Kirk, T.K., 1984, Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 2280-2284 pp.
- Tien, M., Kirk, T.K., Bull, C. and Fee, J.A., 1986, Steady-state and transient-state kinetic studies on the oxidation of 3,4-dimethoxybenzyl alcohol catalyzed by the ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* burds, *J. Biol. Chem.*, 261: 1687-1693 pp.
- Tien, M., and Tu, C.P.D., 1987, Cloning and sequencing of a cDNA for a ligninase from *Phanerochaete chrysosporium*, *Nature*, 326: 520-523 pp.
- Timofeevski, S.L. and Aust, S.D., 1997, Effects of Mn²⁺ and oxalate on the catalytic activity of Manganese peroxidase, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 239: 645-649 pp.
- Tonon, F. and Odier, E., 1988, Influence of veratryl alcohol and hydrogen peroxide on ligninase activity and ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54:466-472 pp.
- Tortora, G.J., Funke, B.R. and Case, C.L., 2002, Microbiology, an Introduction, Person Education, Inc., San Francisco, 156-162 pp.

- Umezawa, T. and Higuchi, T., 1987, Mechanism of aromatic ring cleavage of β -O-4 Lignin substructure models by lignin peroxidase, *FEBS Lett.*, 218: 255-260 pp.
- Umezawa, T., Shimada, M., Higuchi, T. and Kusai, K., 1986, Aromatic ring cleavage of β -O-4 lignin substructure model dimers by lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*, *FEBS Lett.*, 205: 287-292 pp.
- Urzua, U., Kersten, P.J. and Vicuna, R., 1998, Manganese peroxidase-dependent oxidation of glyoxylic and oxalic acids synthesized by *Ceriporiopsis subvermispora* produces extracellular hydrogen peroxide, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 68-73 pp.
- Wariishi, H. and Gold, M.H., 1990, Lignin peroxidase compound III mechanism of formation and decomposition, *J. Biol. Chem.*, 265: 2070-2077 pp.
- Wariishi, H., Akaleswaran, L. and Gold, M.H., 1988, Manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* : spectral characterization of the oxidized states and the catalytic cycle, *Biochemistry*, 27: 5365-5370 pp.
- Wariishi, H., Valli, K., Rengamathan, V. and Gold, M.H., 1989a, Thiol mediated oxidation of non-phenolic lignin model compounds by manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*, *J. Biol. Chem.*, 264:14185-14191 pp.
- Wariishi, H., Dunford, H.B., MacDonald, I.D. and Gold, M.H., 1989b, Manganese peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: transient-state kinetics and reaction mechanism, *J. Biol. Chem.*, 264: 3335-3340 pp.
- Wariishi, H., Marquez, L., Dunford, H.B. and Gold, M.H., 1990, Lignin peroxidase compound II and compound III: spectral and kinetic

- characterization of reactions with peroxides, *J. Biol. Chem.*, 265: 11137-11142 pp.
- Wariishi, H., Valli, K. and Gold, M.H.**, 1991, In vitro depolymerization of lignin by manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 176: 269-275 pp.
- Wariishi, H., Valli, K. and Gold, M.H.**, 1992, Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *J. Biol. Chem.*, 267: 23688-23695 pp.
- Weatherburn, M.W.**, 1967, Phenol-Hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.*, 28: 971-974 pp.
- Westermarck, U. and Eriksson, K.E.**, 1974, Cellobiose: Quinone oxidoreductase a new wood-degrading enzyme from white-rot fungi, *Acta Chem. Scand.*, 28: 209-214 pp.
- Whitwam, R.E., Brown, K.R., Musick, M., Natan, M.J. and Tien, M.**, 1997, Mutagenesis of the Mn^{2+} -binding site of manganese peroxidase affects oxidation of Mn^{2+} by compound I and compound II, *Biochemistry*, 36: 9766-9773 pp.
- Wood, J.D. and Wood, P.M.**, 1992, Evidence that cellobiose: quinone oxidoreductase from *Phanerochaete chrysosporium* is a breakdown product of cellobiose oxidase, *Biochim. Biophys. Acta.*, 119: 90-96 pp.
- Yamamoto, K., Tosa, T., Yamashita, K. and Chibata, I.**, 1977, Kinetics and decay of fumarase activity of immobilized *Brevibacterium ammoniagenes* cells for continuous production of L-malic acid, *Biotechnol. Bioeng.*, 19: 1101-1114 pp.

ÖZGEÇMİŞ

Adı,Soyadı Raziye ÖZTÜRK ÜREK

Doğum Tarihi 17.03.1972

Doğum Yeri Denizli

Medeni Hali Evli

Uyruğu T.C.

İş Adresi Dokuz Eylül Üniversitesi
Buca Eğitim Fakültesi, Kimya Eğitimi ABD
35150 Buca/İZMİR
E-Mail :raziye.urek@deu.edu.tr
Tel :0 232 4204882/1256
Fax :0 232 4204895

Ev Adresi Dumlupınar Mah. 75 Sok. No: 34 D:6
35160 Buca-İZMİR
Tel: 0 232 4421367

Eğitim Durumu

Okul	Derece	Yıl
Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir	B.Sc. (Kimya Öğr.)	1990-1994
Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir	Y.Dil Eğitimi	1994-1995
Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir	M.Sc. (Kimya Eğit)	1995-1998
Ege Üniversitesi, İzmir	Ph.D. (Biyokimya)	2000-(-)

AKADEMİK SÜRECİ

a) Bilimsel Yayın Listesi

Yurt Dışı Yayınlar

1. Öztürk R., Bozkaya L.A., Atav E., Sağlam N., Tarhan L., "Purification and Characterization of Superoxide Dismutase from *Phanerochaete chrysosporium*" Enzyme Microbial Technol,25, 392-399,1999.
2. Aydemir T., Öztürk R., Bozkaya L.A., Tarhan L., "The Effects of Some Antioxidants on the Chicken Erythrocyte SOD, CAT, GPx" Cell Biochem. and Func. 18,109-115, 2000.
3. Öztürk-Ürek R., Bozkaya L.A., Tarhan L., "The Effects of Some Antioxidant Vitamins and Trace Elements Supplemented Diets on Activities of SOD, CAT, GSH-Px and LPO Levels in Chicken Tissues" Cell Biochem. and Func. ,19, 125-132, 2001.
4. Bozkaya L.A., Öztürk R., Aydemir T., Tarhan L., "Effects of Se, Cu and Se+Vitamin E Deficiency on the Activities of CuZnSOD, GSH-Px, CAT and LPO Levels in Chicken Erythrocyte" Cell Biochem. and Func. Vol.19, 153-157, 2001.
5. Öztürk-Ürek R., Tarhan L., "The Purification and Characterization of Superoxide Dismutase from Chicken Liver" Comp. Biochem. and Phys. vol. 128/2, 205-212, 2001.
6. Öztürk Ürek R., Pazarlıoğlu N., "Purification and Partial Characterization of Manganese Peroxidase from Immobilized *Phanerochaete chrysosporium*" Process Biochem'de incelemede (PBB. 2477).

7. Öztürk-Ürek R., Pazarlıoğlu N., "Production and Stimulation of Manganese peroxidase by Immobilized *Phanerochaete chrysosporium*" Process Biochem'de incelemede (PBB 2479).
8. Öztürk-Ürek R., Pazarlıoğlu N., "Manganese Peroxidase Production by Immobilized *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 in a Modified Immersion Bioreactor" Process Biochem'de incelemede.
9. Öztürk-Ürek R., Pazarlıoğlu N., "A Novel Carrier for *Phanerochaete chrysosporium* Immobilization" Biotechnology Letters'de incelemede.

Yurt İçi Yayınlar

1. Sağlam, N., Atav, E., Öztürk, R., Bozkaya, L.A., Tarhan L., "Small-Scale Distruption of *Phanerochaete chrysosporium* for Isolation of Superoxide Dismutase" Chimica Acta Turc. 26 (2), 113-116, 1998.
2. Öztürk Ürek R., Ayar Kayalı H., Çavaş B., Tarhan L., "İlköğretimde Enerji Kavramı ve Enerji Tasarrufuna Yönelik Bir Çalışma" Hacettepe Eğit. Fak. Dergisi, MEB Basımevi, 211-216, 2000.
3. Ayar Kayalı H., Öztürk Ürek R., Çavaş B., Tarhan L., "Ortaöğretimde Kimya Derslerinde Enerji Kavram Haritasının ve Konu Diziliminin Geliştirilmesine Yönelik Bir Çalışma" Hacettepe Eğit. Fak. Dergisi, MEB Basımevi, 408-415, 2000
4. Ayar Kayalı H., Öztürk Ürek R., Tarhan L., "Kimya Ders Programı Maddenin Yapısı Ünitesindeki *Bağlar* Konusunda Yeni Bir Rehber Materyal Geliştirilmesi ve Uygulanması" 16-18 Eylül 2002, V. Ulusal Fen Bilimleri ve Matematik Eğitimi Kongresi (ODTÜ- Ankara) baskıda.

5. Öztürk Ürek R., Ayar Kayalı H., Tarhan L., “Lise-1 Biyoloji Programındaki Canlıların Temel Bileşenleri Ünitesindeki *Proteinler ve Enzimler* Konularına Yönelik Rehber Materyal Geliştirilmesi ve Uygulanması” 16-18 Eylül 2002, V. Ulusal Fen Bilimleri ve Matematik Eğitimi Kongresi (ODTÜ- Ankara) baskıda.
6. Öztürk Ürek R., Pazarlıoğlu N., “*Phanerochaete chrysosporium* BKMF-1767 nin Polistiren Köpük Üzerinde Adsorpsiyon Kinetiğinin İncelenmesi” 13. Biyoteknoloji Kongresi Kitapçığı, 181-184, 2003.

b) Tebliğler

- 12-15 Ekim 2003 13 th Balkan Biochemical Biophysical Days (Kuşadası-Aydın) a;
 “Purification and Partial Characterization of Manganese Peroxidase From Immobilized *Phanerochaete chrysosporium*” konulu tebliğle katılım kabulü,
- 25-29 Ağustos 2003 13. Ulusal Biyoteknoloji Kongresine (Çanakkale);
 1. “*Phanerochaete chrysosporium* BKMF-1767’un Polistiren Köpük Üzerinde Adsorpsiyon Kinetiğinin İncelenmesi”
 2. “İmmobilize *Phanerochaete chrysosporium* BKMF-1767 ile Stasyoner Kültürlerde Mangan Peroksidaz Enziminin Üretimi” ve
 3. “İmmobilize *Phanerochaete chrysosporium* ile Bazı Azo Boyar Maddelerin Dekolorizasyonu “
 konulu tebliğlerle katılım,
- 16-18 Eylül 2002 V. Ulusal Fen Bilimleri ve Matematik Eğitimi Kongresine (ODTÜ- Ankara);
 1. “Kimya Ders Programı Maddenin Yapısı Ünitesindeki *Bağlar* Konusunda Yeni Bir Rehber Materyal Geliştirilmesi ve Uygulanması”
 2. “Lise-1 Biyoloji Programındaki Canlıların Temel

Bileşenleri Ünitesindeki *Proteinler ve Enzimler* Konularına Yönelik Rehber Materyal Geliştirilmesi ve Uygulanması" konulu tebliğlerle katılım,

5-8 Ekim 2001

IV. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresine (Bodrum-Muğla);

"Tekstil Sanayinde Kullanılan Çeşitli Azo Boyar Maddelerin Biyolojik Yıkımı" konulu tebliğle katılım,

17-21 Eylül 2001

12.Ulusal Biyoteknoloji Kongresine (Ayvalık-Balıkesir);

"*Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767'ün Pomza Üzerinde İmmobilizasyon Kinetiğinin İncelenmesi" konulu tebliğle katılım,

6-8 Eylül 2000

Fen Bilimleri Eğitimi Kongresi (Hacettepe Üniv. Ankara) ;

1."Ortaöğretim Enerji Kavramının Geliştirilmesine Yönelik Bir Çalışma" ,

2.İlköğretimde Enerji Kavramı ve enerji Tasarrufuna Yönelik Bir Çalışma" konulu tebliğlerle katılım,

18-23 Mayıs 1999

Serbest Radikaller ve Antioksidanlar Derneği II.Ulusal Kongresine (Eskişehir);

"Tavuk Karaciğerinden Süperoksit Dismutaz'ın Saflaştırılması ve Kısmi Karakterizasyonu" konulu tebliğle katılım,

6-7 Kasım 1998

Yaşlanmaya Biyokimyasal Yaklaşım Uluslararası Sempozyuma (GATA-Ankara),

1."Tavuk Organlarındaki SOD, CAT, GPx ve Lipid Peroksite, Bazı Antioksidan Vitamin ve Eser Elementlerin Etkileri ",

2."Süperoksit Dismutaz'ın *Phanerochaete chrysosporium* dan Saflaştırılması ve Kısmi karakterizasyonu" konulu tebliğlerle katılım,

28 Ekim-2 Kasım 1997

Serbest Radikaller ve Antioksidanlar Derneği I.Ulusal Kongresine (Side-Antalya),

I. Ulusal Kongresine (Side-Antalya),

1. "Tavuk Eritrositlerindeki SOD, CAT ve GPx Aktiviteleri Üzerine Bazı Antioksidanların Etkisi",
2. "The Isolation and Purification of Superoxide Dismutase From *Phanerochaete chrysosporium*" konulu tebliğlerle katılım,

21-27 Eylül 1997

Enzimoloji Yazokuluna (Ege Üniv. Fen Fak.-Berlin Teknik Üniv. Kuşadası-Aydın);

"Koyun Kanı Eritrositlerinden Süperoksit Dismutazın 6-Hidroksidopamin Yöntemiyle Karakterizasyonu" konulu tebliğle katılım,

14-20 Eylül 1997

Biyokimya Lisansüstü Yaz Okuluna (Protein Saflaştırması ve Karakterizasyonu, Kuşadası-Aydın);

"Tavuk Kalbinden Süperoksit Dismutaz'ın İzolasyonu ve Saflaştırılması" konulu tebliğle katılım,

18-20 Eylül 1996

II. Ulusal Eğitim Sempozyumuna (Marmara Üniv. Atatürk Eğit. Fak. İstanbul);

"Biyokimya'da Bazı Deney Örnekleri" konulu tebliğle katılım,

c) Katıldığı Bilimsel Toplantılar

1. 14-20 Eylül 1997 "Proteinlerin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu" konulu lisans üstü Biyokimya Yaz Okulu (E.Ü.Fen Fak.- Berlin Teknik Üniv.-Kuşadası/Aydın) na posterle katılım,
2. 21-27 Eylül 1997 "Enzimoloji" Lisansüstü Yazokulu (E.Ü.Fen Fak.- Berlin Teknik Üniv.-Kuşadası/Aydın) na posterle katılım,
3. 30 Ekim-2 Kasım 1997 Serbest Radikaller ve Antioksidanlar Araştırma Derneği I. Ulusal Kongresi'ne tebliğ ile katılım,
4. 28-31 Ekim 1997 XIV. Ulusal Biyokimya Kongresi (Uluslararası Katılımlı) ne katılım,

5. 20-22 Şubat 1998 Türk Biyokimya Laboratuvarlarında Kalite Kontrol ve Standardizasyonu Kursu'na katılım,
6. 31 Mart 1998, DIONEX İyon Kromatografi-Hızlandırılmış Solvent Ekstraksiyon Sistemi Semineri (İzmir) ne katılım,
7. 16-17 Haziran 1998, VP-Serisi HPLC Sisteminin Tanıtım ve Uygulama Semineri (İzmir)ne katılım,
8. 20-22 Haziran 1998 Bitkilerde Stres Fizyolojisinin Moleküler Temelleri Sempozyumu (Ege Bilimsel ve Araştırma Merkezi -EBİLTEM ve E.Ü. Ziraat Fak.-İzmir) na katılım,
9. 6-7 Kasım 1998, "Yaşlanmaya Biyokimyasal Yaklaşım" Sempozyumu'na (Uluslararası Katılımlı)(GATA-Ankara) iki adet tebliğle katılım,
- 10.07 Nisan 1999, Chris Mullins'in "Atomic Absorbtion Software" Varian/Terra, AAS/ICP Semineri ne katılım (İzmir),
- 11.6-8 Ekim 1999, 6.Uluslararası Katılımlı "Biyomedikal Bilim ve Teknoloji" Sempozyumuna katılım (İzmir),
- 12.06-09 Mart 2000 "Biyoteknoloji ve Sanayi" konulu sempozyuma katılım, (EBİLTEM, İzmir)
- 12.3-14 Temmuz 2000, "Prokaryotik Sistemlerde Gen Klonlaması ve Ekspresyonu" (Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü (GMBAE), Marmara Araştırma Merkezi, Gebze) lisansüstü eğitim kursuna katılım,
- 13.13-15 Aralık 2000, "HPLC Uygulamaları" konulu kursa katılım (EBİLTEM- İncekara Ltd.-İzmir)
- 14.2-3.05.2001, "Kimya Seminerleri 2001" Dr.İ. Yanço Metrohm, Efes Oteli, İzmir,
- 15.17-21.09.2001, 12. Ulusal Biyoteknoloji Kongresine katılım (Biyoteknoloji Derneği-Balıkesir Üniv., Balıkesir),
- 16.26.09.2001 " Properties and Production of Biologically Surface Active Reagent" konulu uluslararası sempozyuma katılım (EBİLTEM, İzmir),
- 17.5-7. 02. 2002 "Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri Teori ve Uygulamaları" konulu kursa katılım (EBİLTEM-EÜ Fen Fak. Biyoloji Böl.-İzmir),

18. 27. 02-1. 03. 2002 "Biyoteknolojide Termofilik ve Halofilik Bakteriler" konulu kursa katılım (British Council, EBİLTEM-EÜ Fen Fak. Biyomühendislik Böl.-İzmir),
19. 02-04.04.2003 "International Workshop and Training Course on Photobioreactors" katılım (TUBİTAK, EBİLTEM-Algal Teknoloji R&D Ünitesi, EÜ Biyomühendislik Böl.-İzmir),
20. 25-29.08.2003 "13. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi" katılım (Biyoteknoloji Derneği-Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi-Çanakkale).

d) Proje Çalışmaları

1. Tarhan L. "Kimya Eğitiminde Avagadro Sabiti, Molar Kütle ve Hacim Kavramlarına Yönelik Deneysel Uygulamalar" D.E.Ü. Rektörlüğü 0926.97.01.02.
2. Tarhan L. "Koyun Kanı Eritrositlerinde Süperoksit Dismutazın İzolasyonu ve Karakterizasyonu" D.E.Ü. Rektörlüğü, 0922.97.01.34.
3. Tarhan L. "Tavuk Kanı Eritrositlerinden Süperoksit Dismutazın Saflaştırılması, İmmobilizasyonu ve İmmunolojik Etkisinin İncelenmesi" DPT projesi, 901.98.00.01.
4. Tarhan L. "Antioksidan Vitamin ve Eser Elementlerin Tavuk Eritrositlerindeki SOD,CAT, GP_x ve Lipid Perokside Etkileri" D.E.Ü. Rektörlüğü, 0901.99.01.03.
5. Tarhan L. "İlköğretim Fen Bilgisi Enerji Konusunun Öğretiminde Teknoloji Kullanımının Öğrenci Başarılarına Etkileri" D.E.Ü. Rektörlüğü, 0901.20.01.02.
6. Pazarlıoğlu, N. "Tekstil Sanayi Atık Sularındaki Azo Boyar Maddelerin Biyokimyasal Giderimi" TUBİTAK Projesi (TBAG-1884), 2000.
7. Tarhan L., "Fenilalanin Dehidrogenazın immobilizasyonu ve Fenilketonüri Teshisinde Klinik Uygulanabilirliğinin Araştırılması" DPT Projesi, 2001K120420.
8. Tarhan L. "Tavuk Karaciğerinden Katalaz Enziminin Saflaştırılması ve Kısmi Karakterizasyonu" D.E.Ü. Rektörlüğü 0903.01.01.04
9. Pazarlıoğlu, N., "İmmobilize *Phanerochaeta chrysosporium*'dan Mangan Peroksidaz Enziminin Üretimi, İzolasyonu ve Kısmi Saflaştırılması" E.Ü. Rektörlüğü, FEN 068-2001.