

Farklı Kùltür ve Atık Tipleri ile İndüklenen Makrofungus Ligninolitik Enzimleri ile
Boyar Madde Renk Giderimi ve Reaktör Uygulaması

Cansu Bayburt

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Şubat 2013

Using of Macrofungal Ligninolytic Enzymes For Dye Decolorization and Reactor
Application

Cansu Bayburt

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

February 2013

Farklı Kültür ve Atık Tipleri ile İndüklenen Makrofungus Ligninolitik Enzimleri ile
Boyar Madde Renk Giderimi ve Reaktör Uygulaması

Cansu Bayburt

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Doç. Dr. Mustafa Yamaç

şubat 2013

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Cansu Bayburt'un YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Farklı Kültür ve Atık Tipleri ile İndüklenen Makrofungus Ligninolitik Enzimleri İle Boyar Madde Renk Giderimi ve Reaktör Uygulaması" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Mustafa YAMAÇ

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye : Doç. Dr. Mustafa YAMAÇ

Üye : Prof. Dr. Semra İLHAN

Üye : Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA

Üye : Prof. Dr. Aysun ERGENE

Üye : Doç. Dr. Halil BIYIK

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Nimetullah BURNAK

Enstitü Müdürü

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, yeni ve yerel ligninolitik enzim kaynağı makrofungus izolatlarının bulunması ve çevresel bir kirlilik etmeni olan tekstil endüstrisi atık sularının gideriminde kullanım potansiyellerinin belirlenmesidir.

Bu amaçla ülkemizden izole edilen 40 adet Basidiomycetes izolatı, ligninolitik enzim üretimi ve boyar madde giderim kapasiteleri açısından taranmış, başarılı bulunan OBCC 1047 ve OBCC 3501 kodlu izolatlar bir sonraki aşamalarda kullanılmak üzere seçilmiştir. Seçilen izolatların, 3 farklı kültür (statik, derin ve katı faz) sisteminde, farklı lignoselülozik atıklar (portakal kabuğu atığı, çay atığı, buğday kepeği) varlığında büyüme sırasında lakkaz, MnP ve LiP enzimlerinin varlığı incelenmiştir. OBCC 1047 izolatında ölçümü yapılan enzimlerin varlığına rastlanamazken, OBCC 3501 kodlu makrofungusun her üç enzimi değişik oranlarda ürettiği ve en iyi enzim üretiminin inkübasyonun 11. gününde katı faz kültür yöntemiyle çay atığında 114.5 U/L lakkaz, 438.1 U/L MnP, 15.9 U/L LiP olduğu belirlenmiştir. Moleküler bazlı tekniklere dayanılarak OBCC 3501 izolatı NCBI veritabanından % 98 benzerlik oranı ile *Polyporus arcularius* olarak tanımlanmıştır.

Polyporus arcularius ham kültür filtratıyla, RBBR, remazol black, cibacron blue 3R, amaranth, kristal viyole, malaşit yeşili boyar maddelerinde *in vitro* giderim çalışması gerçekleştirilmiş, renk giderimi sırasıyla % 62, 8, 80, 20, 57, 37 olarak ölçülürken, ortama HBT mediatörünün ilavesiyle bu oranlar % 92, 82, 100, 100, 87, 100'e yükseltilmiştir. Boyar madde gideriminde sorumlu olduğu belirlenen MnP enziminin, DMP oksidasyonu sırasında optimum pH ve sıcaklık değerleri 4.8 ve 40 °C olarak belirlenirken, bu koşullarda enzimin K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 1.37 mM ve 0.135 mM/sn olarak belirlenmiştir.

Amonyum sülfat çöktürmesi ile konsantre edilen ham enzim çözeltisi sodyum alginat boncuklarına immobilize edilmiştir. İmmobilize enzim boncuklarının immersiyon tip reaktörde (3.5 L hacim) yapay atık boyar madde giderim kapasitesi araştırılmış ve 24 saat sonunda % 88 renk giderimi ölçülürken, yapay boyar madde karışımının toksisitesinde % 80 azalma meydana gelmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Polyporus arcularius*, ligninolitik enzimler, boyar madde renk giderimi, immersiyon reaktör

SUMMARY

The aim of the present study was to discover new and local macrofungi producing ligninolytic enzymes and to determine decolorization capacity of crude culture filtrates of these isolates.

Ligninolytic enzyme producing ability of fourty Basidiomycetes isolates was investigated. Isolates OBCC 1047 and OBCC 3501 were selected further studies. Laccase, manganase peroxidase (MnP) and lignin peroxidase (LiP) production capacity of these isolates were investigated under different culture conditions such as static, submerged and solid state and lignocellulosic agro-wastes (orange peel, tea waste, wheat bran). While OBCC 3501 produced all the enzymes, no enzyme activity was detected for OBCC 1047. Maximum enzyme activities were obtained on tea wastes as 114 U/L laccase, 438.1 U/L MnP, 15.9 U/L LiP under solid state fermentation on the day 11th. The isolate OBCC 3501 was identified *Polyporus arcularius* with 98 % similarity ratio.

In vitro Remazol Brilliant Blue R (RBBR), remazol black, cibacron blue 3R, amaranth, crystal violet, malachite gren dyes decolorization capacity of crude enzymes from *Polyporus arcularius* was determined as 62, 8, 80, 20, 57 and 37 % respectively. The decolorization values were 92, 82, 100, 100, 87 and 100 % in HBT containing reaction media, respectively. Mnp was the ezyme responsible for dye decolorization. Kinetic properties of MnP against DMP (Dimethoxy phenol) were found optimum pH 4.8, optimum temperature 40 °C, 1.37 mM K_m and 0.135 mM/sn V_{max} .

The concantrated crude enzyme extract was immobilised into Ca-alginat beads and dye decolorization capacity of these beads invastigated in the immersion reactor (3.5 L). The decolorization ratio obtained after 24 h was 88 %. Also, the toxicity of the dye mixture decrease at the rate of 80 %.

Keywords: *Polyporus arcularius*, ligninolytic enzymes, dye degradation, immersion reactor

TEŞEKKÜR

Tez konumun seçiminden başlayarak tüm çalışma boyunca bilgisini, sabrını ve tecrübesini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli danışman hocam sayın Doç. Dr. Mustafa YAMAÇ' a;

Çalışmaların çeşitli aşamalarında zamanlarını ayırarak değerli bilgi ve tecrübeleriyle çalışmayı boyutlandıran değerli hocalarım Prof. Dr. Muzaffer TUNCEL, Prof. Dr. Hülya SİVASLI ve Arş. Gör. Dr. Emre CEYHAN' a;

Tez süresince yaptığım çalışmalarda yardımlarını esirgemeyen ve laboratuvarda geçen geniş zamanları eğlenceli kılan Cem ÖZKAN'a, Ayşenur BAHADIR'a, aynı zamanda izolatin moleküler tanımlaması aşamasını da gerçekleştirilen Ayşe Betül KARADUMAN' a, Bilal DOĞAN' a ve tüm Fungikültür Laboratuvar' ı çalışanlarına;

Sevgi ve desteğiyle her zaman yanımda olan, bana olan inancını asla yitirmeyen Özay CANDARLI' ya;

Akademik hayatım ve bundan sonraki hayatım boyunca ilham aldığım ve alacağım, kalbimde sevgisi hiçbir zaman kaybolmayacak olan Efnan SAKARYA' ya;

Tüm hayatım boyunca olduğu gibi yüksek lisans eğitimim sırasında da beni destekleyen, hayatta kazandığım ve kazanacağım tüm başarıların mimarı olan annem Sevgi BAYBURT, babam Veysel BAYBURT ve ablam Duygu BAYBURT' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenen 201019039 no' lu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

Cansu BAYBURT

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET.....	V
SUMMARY.....	VI
TEŞEKKÜR.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XIV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	XVIII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	XXI
 1. GİRİŞ.....	 1
1.1. Boyar Maddeler.....	3
1.1.1. Boyar Maddelerin Yapısal Özellikleri.....	3
1.1.2. Boyar Maddelerin Sınıflandırılması.....	4
1.1.2.1. Asidik Boyar Maddeler.....	6
1.1.2.2. Reaktif Boyar Maddeler.....	6
1.1.2.3. Metal Kompleks Boyar Maddeler.....	7
1.1.2.4. Direkt Boyar Maddeler.....	7
1.1.2.5. Bazik Boyar Maddeler.....	7
1.1.2.6. Mordant Boyar Maddeler.....	8
1.1.2.7. Dispers Boyar Maddeler.....	8
1.1.2.8. Pigmentler.....	8
1.1.2.9. Vat Boyar Maddeler.....	9
1.1.2.10. Ingrain Boyar Maddeler.....	9
1.1.2.11. Sülfür Boyar Maddeler.....	9
1.1.3. Boyar Maddelerin Kullanım Alanları.....	10
1.1.4. Boyar Madde Giderimi.....	11
1.1.4.1. Fiziksel Yöntemlerle Boyar Madde Giderimi.....	12

İÇİNDEKİLER (Devam)

Sayfa No

1.1.4.2. Kimyasal Yöntemlerle Boyar Madde Giderimi.....	13
1.1.4.3. Biyolojik Yöntemlerle Boyar Madde Giderimi.....	14
1.2. Ligninolitik Enzimler.....	15
1.2.1. Ligninolitik Enzim Kaynakları.....	17
1.2.2. Ligninolitik Enzimlerin Kullanım Alanları.....	18
1.3. Literatür Araştırmaları.....	20
2. MATERYAL ve METODLAR.....	26
2.1. Materyal.....	26
2.1.1. Makrofungus İzolatları.....	26
2.1.2. Besiyerleri.....	27
2.1.3. Çözeltiler ve Diğer Kimyasal Maddeler.....	31
2.2. Metodlar.....	33
2.2.1. Makrofungus İzolatlarının Ligninolitik Enzim Üretim ve Boyar Madde Renk Giderim Kapasitelerinin Belirlenmesi.....	33
2.2.2. Farklı Kültür Teknikleri ve Substratların Ligninolitik Enzim Üretimine Etkisi.....	36
2.2.2.1. Atıklar ve İndükleyicinin Hazırlanması.....	36
2.2.2.2. Makrofungus İzolatlarının Kültür Ortamlarına İnokülasyonu.....	37
2.2.2.3. Farklı Kültür Tiplerinde Büyüme Sırasında Ligninolitik Enzim Üretimi.....	37
2.2.2.3.1. Derin Kültür Yöntemi.....	37
2.2.2.3.2. Statik Kültür Yöntemi.....	37
2.2.2.3.3. Katı Faz Kültür Yöntemi.....	38
2.2.2.4. Analitik Yöntemler.....	38
2.2.2.4.1. Ligninolitik Enzim Ölçümü.....	38
2.2.2.4.2. Protein Miktar Tayini.....	39

İÇİNDEKİLER (Devam)

Sayfa No

2.2.2.4.3. Toplam Karbonhidrat Tayini.....	40
2.2.2.4.4. pH Tayini.....	40
2.2.3. Makrofungus İzolatlarının Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması.....	40
2.2.4. Enzimlerin Girişim / Maskeleye Oranlarının Belirlenmesi.....	41
2.2.4.1. Mangan Peroksidaz – ABTS Girişim Testi.....	41
2.2.4.2. Lakkaz – DMP Girişim Testi.....	42
2.2.5. <i>Polyporus arcularius</i> İzolatının Boyar Madde Renk Giderim Kapasitesini Belirlenmesi.....	42
2.2.5.1. Boyar Maddelerin Dalga Boylarının Belirlenmesi.....	42
2.2.5.2. Enzimin Boyar Madde Renk Giderim Kapasitesinin Belirlenmesi.....	44
2.2.5.3. Boyar Madde Renk Giderim Kapasitesinin Mediatör Aracılığıyla Arttırılması.....	45
2.2.5.4. Boyar Madde Renk Gideriminden Sorumlu Enzimlerin Belirlenmesi.....	45
2.2.6. Mangan Peroksidaz Enziminin Aktivitesi Üzerine Kinetik Çalışmalar.....	47
2.2.6.1. Enzimin Optimum pH' sının Belirlenmesi.....	47
2.2.6.2. Enzimin pH Stabilitesinin Belirlenmesi.....	47
2.2.6.3. Enzimin Optimum Sıcaklığının Belirlenmesi.....	48
2.2.6.4. Enzimin Sıcaklık Stabilitesinin Belirlenmesi.....	48
2.2.6.5. Enzimin K_m ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi.....	48
2.2.7. Ham Enzimin Amonyum Sülfat Çöktürmesi ile Konsantre Edilmesi.....	49
2.2.7.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi.....	49
2.2.7.2. Diyaliz.....	49

İÇİNDEKİLER (Devam)

Sayfa No

2.2.8. Sodyum Alginat ile İmmobilize Edilen Konsantre Enzimin Konsantre Enzimin Boyar Madde Renk Giderim Kapasitesinin Belirlenmesi.....	50
2.2.8.1. Yapay Atık Boyar Madde Çözeltisinin Hazırlanması.....	50
2.2.8.2. Konsantre Enzimin Sodyum Alginata İmmobilizasyonu.....	51
2.2.8.3. İmmobilize Edilen Enzimlerin Boyar Madde Renk Giderim Kapasitesinin Belirlenmesi.....	52
2.2.9. İmmersiyon Tip Reaktörde Boyar Madde Renk Giderimi.....	52
2.2.10. Renk Gideriminin Toksisite Üzerine Etkisi.....	53
3. BULGULAR.....	55
3.1. Makrofungus İzolatlarının Ligninolitik Enzim Üretim ve Boyar Madde Renk Giderim Kapasitelerinin Belirlenmesi.....	55
3.2. Farklı Kültür Teknikleri ve Substratların Ligninolitik Enzim Üretimine Etkisi.....	67
3.2.1. OBCC 1047 Kodlu Makrofungus İzolatının Ligninolitik Enzim Üretimi.....	67
3.2.2. OBCC 3501 Kodlu Makrofungus İzolatının Ligninolitik Enzim Üretimi.....	68
3.3. Makrofungus İzolatlarının Moleküler Yöntemlerle Tanılanması.....	77
3.3.1. OBCC 1047 Kodlu Makrofungus İzolatının Moleküler Yöntemlerle Tanılanması.....	77
3.3.2. OBCC 3501 Kodlu Makrofungus İzolatının Moleküler Yöntemlerle Tanılanması.....	78
3.4. Enzimlerin Girişim / Maskeleye Oranlarının Belirlenmesi.....	80
3.4.1. Mangan Peroksidaz – ABTS Girişim Testi.....	80

İÇİNDEKİLER (Devam)

Sayfa No

3.4.2. Lakkaz – DMP Girişim Testi.....	81
3.5. <i>Polyporus arcularius</i> İzolatının Boyar Madde Renk Giderim Kapasitesinin Belirlenmesi.....	82
3.5.1. Enzimin Boyar Madde Renk Giderim Kapasitelerinin Belirlenmesi ve Arttırılması.....	82
3.5.1.1. RBBR.....	83
3.5.1.2. Remazol Black.....	84
3.5.1.3. Cibacron Blue 3R.....	86
3.5.1.4. Amaranth.....	87
3.5.1.5. Kristal Viyole.....	89
3.5.1.6. Malaşit Yeşili.....	90
3.5.2. Boyar Madde Renk Gideriminden Sorumlu Enzim(ler)in Belirlenmesi...	92
3.6. Mangane Peroksidaz Enziminin Aktivitesi Üzerine Kinetik Çalışmalar.....	98
3.6.1. Enzimin Optimum pH' sının Belirlenmesi.....	98
3.6.2. Enzimin pH Stabilitesinin Belirlenmesi.....	99
3.6.3. Enzimin Optimum Sıcaklığının Belirlenmesi.....	99
3.6.4. Enzimin Sıcaklık Stabilitesinin Belirlenmesi.....	100
3.6.5. Enzimin K_m ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi.....	101
3.7. Ham Enzimin Amonyum Sülfat Çöktürmesi ile Konsantre Edilmesi.....	102
3.8. Sodyum Alginat ile İmmobilize Edilen Enzimin Boyar Madde Renk Giderim Kapasitesinin Belirlenmesi.....	105
3.9. İmmersiyon Tip Reaktörde Boyar Madde Renk Giderimi.....	108
3.10. Renk Gideriminin Toksikite Üzerine Etkisi	110
4. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	113
4.1. Makrofungus İzolatlarının Ligninolitik Enzim Üretim ve Boyar Madde Renk Giderim Kapasitelerinin Belirlenmesi.....	113
4.2. Farklı Kültür Teknikleri ve Substratların Ligninolitik Enzim Üretimine Etkisi.....	115

İÇİNDEKİLER (Devam)

Sayfa No

4.3. Makrofungus İzolatlarının Moleküler Yöntemlerle Tanılanması.....	119
4.4. Enzimlerin Girişim / Maskeleye Oranlarının Belirlenmesi.....	120
4.5. <i>Polyporus arcularius</i> İzolatının Boyar Madde Renk Giderim Kapasitesini Belirlenmesi.....	121
4.6. Mangan Peroksidaz Enziminin Aktivitesi Üzerine Kinetik Çalışmalar.....	124
4.7. Ham Enzimin Amonyum Sülfat Çöktürmesi ile Konsantre Edilmesi.....	125
4.8. Sodyum Alginat ile İmmobilize Edilen Enzimin Boyar Madde Renk Giderim Kapasitesinin Belirlenmesi.....	126
4.9. İmmersiyon Tip Reaktörde Boyar Madde Renk Giderimi.....	127
4.10. Renk Gideriminin Toksisite Üzerine Etkisi	128
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	130
KAYNAKLAR.....	132

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Pozitif sonuç olarak değerlendirilen substrata özgü renk reaksiyonları.....	34
Şekil 2.2. Boyar maddeler üzerinde meydana gelen dekolorizasyon örnekleri.....	35
Şekil 2.3. Protein miktar tayininde kullanılan standart eğri grafiği.....	39
Şekil 2.4. Toplam karbonhidrat tayininde kullanılan standart eğri grafiği.....	40
Şekil 2.5. Çalışmada kullanılan boyar maddelerin standart eğri grafikleri.....	43
Şekil 2.6. Konsantre enzim çözeltisinin alginat ile tutuklanması ile elde edilen boncuklar.....	51
Şekil 2.7. İmmersiyon tip reaktör.....	53
Şekil 3.1. OBCC 1047 izolatının derin, statik ve katı faz kültür sistemlerinde büyümesi.....	68
Şekil 3.2. OBCC 3501 izolatının derin, statik ve katı faz kültür sistemlerinde büyümesi.....	69
Şekil 3.3. OBCC 3501 izolatının katı faz kültür yönteminde ligninolitik enzim aktivitesi.....	70
Şekil 3.4. OBCC 3501 izolatının derin (a) ve statik (b) kültür yöntemlerinde ligninolitik enzim aktivitesi.....	71
Şekil 3.5. OBCC 3501 izolatının kültür tipine bağlı olarak seçilmiş ligninolitik enzim aktiviteleri.....	75
Şekil 3.6. OBCC 3501 izolatının katı faz sisteminde çay atığı indükleyicisi varlığında büyüme özellikleri.....	76
Şekil 3.7. OBCC 1047 kodlu makrofungus izolatının yakın ilişkili türler ile ilişkisini ifade eden filogenetik ağaç.....	78

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 3.8. OBCC 3501 kodlu makrofungus izolatının yakın ilişkili türler ile ilişkisini ifade eden filogenetik ağaç.....	79
Şekil 3.9. <i>Polyporus arcularius</i> makrofungusunun karpofor görüntüsü.....	79
Şekil 3.10. ABTS oksidasyonuna MnP ve lakkaz enzimlerinin katkısı.....	81
Şekil 3.11. DMP oksidasyonu MnP ve lakkaz enzimlerinin katkısı.....	82
Şekil 3.12. <i>Polyporus arcularius</i> izolatının RBBR boyar maddesinde renk giderim kapasitesi.....	83
Şekil 3.13. <i>Polyporus arcularius</i> izolatının HBT ilaveli ve ilavesiz RBBR boyar maddesinde renk giderim kapasitesi.....	84
Şekil 3.14. <i>Polyporus arcularius</i> izolatının remazol black boyar maddesinde renk giderim kapasitesi.....	85
Şekil 3.15. <i>Polyporus arcularius</i> izolatının HBT ilaveli ve ilavesiz remazol black boyar maddesinde renk giderim kapasitesi.....	85
Şekil 3.16. <i>Polyporus arcularius</i> izolatının cibacron blue 3R boyar maddesinde renk giderim kapasitesi.....	86
Şekil 3.17. <i>Polyporus arcularius</i> izolatının HBT ilaveli ve ilavesiz cibacron blue 3R boyar maddesinde renk giderim kapasitesi.....	87
Şekil 3.18. <i>Polyporus arcularius</i> izolatının amaranth boyar maddesinde renk giderim kapasitesi.....	88
Şekil 3.19. <i>Polyporus arcularius</i> izolatının HBT ilaveli ve ilavesiz amaranth boyar maddesinde renk giderim kapasitesi.....	88
Şekil 3.20. <i>Polyporus arcularius</i> izolatının kristal viyole boyar maddesinde renk giderim kapasitesi.....	89

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 3.21. <i>Polyporus arcularius</i> izolatının HBT ilaveli ve ilavesiz kristal viyole boyar maddesinde renk giderim kapasitesi.....	90
Şekil 3.22. <i>Polyporus arcularius</i> izolatının malaşit yeşili boyar maddesinde renk giderim kapasitesi.....	91
Şekil 3.23. <i>Polyporus arcularius</i> izolatının HBT ilaveli ve ilavesiz malaşit yeşili boyar maddesinde renk giderim kapasitesi.....	91
Şekil 3.24. <i>Polyporus arcularius</i> izolatı tarafından üretilen lakkaz enziminin sodyum azid ile inhibisyonu.....	93
Şekil 3.25. <i>Polyporus arcularius</i> izolatı tarafından üretilen MnP enziminin sodyum azid ile inhibisyonu.....	94
Şekil 3.26. <i>Polyporus arcularius</i> izolatı tarafından üretilen lakkaz enziminin n-propil gallat ile inhibisyonu.....	96
Şekil 3.27. <i>Polyporus arcularius</i> izolatı tarafından üretilen MnP enziminin n-propil gallat ile inhibisyonu.....	96
Şekil 3.28. <i>Polyporus arcularius</i> izolatının MnP enziminin reaksiyon hız sabiti (k) değerlerinin pH' ya bağlı değişimi.....	98
Şekil 3.29. <i>Polyporus arcularius</i> izolatının MnP enziminin pH: 4.8'de zamana bağlı enzim aktivitesi değişimi.....	99
Şekil 3.30. <i>Polyporus arcularius</i> izolatının MnP enziminin reaksiyon hız sabiti (k) değerlerinin sıcaklığa bağlı değişimi.....	100
Şekil 3.31. <i>Polyporus arcularius</i> izolatının MnP enziminin 40 °C' de zamana bağlı enzim aktivitesi değişimi.....	101

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 3.32. MnP enzimi ile gerçekleştirilen DMP oksidasyon çalışmaları sonucunda oluşturulan Lineweaver-Burk grafiği.....	102
Şekil 3.33. Amonyum sülfat çöktürmesi ile saflaştırma aşamalarındaki ABTS oksidasyonuna bağlı lakkaz ölçümü.....	103
Şekil 3.34. Amonyum sülfat çöktürmesi ile saflaştırma aşamalarındaki DMP oksidasyonuna bağlı MnP ölçümü.....	104
Şekil 3.35. Amonyum sülfat çöktürmesi ile saflaştırma aşamalarındaki Bradford ölçümüne bağlı belirlenen protein miktarları.....	104
Şekil 3.36. Alginata immobilize edilmiş konsantre enzim çözeltisinin yapay atık boya çözeltisini renk giderim kapasitesi.....	107
Şekil 3.37. Yapay atık boyar madde çözeltisi ile işlem öncesinde ve sonrasında alginat boncukları.....	107
Şekil 3.38. Alginat boncukları ile işlem öncesinde ve 24 saat sonrasında yapay atık boyar madde çözeltileri.....	108
Şekil 3.39. İmmobilize konsantre enzim çözeltisinin reaktör ölçeğinde yapay atık boyar madde renk giderim kapasitesi.....	109
Şekil 3.40. İmmobilize enzim preperatı kullanılarak immersiyon tip biyoreaktörde yapay atık boyar madde çözeltisinin renk giderimi.....	110
Şekil 3.41. İmmersiyon tip biyoreaktör sisteminde farklı boyar madde konsantrasyonlarının <i>Artemia salina</i> larvaları üzerindeki toksisite grafikleri.....	112

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa No</u>
Çizelge 1.1. Kromofor ve oksokrom grupları.....	4
Çizelge 1.2. Boyar maddelerin farklı şekillerde sınıflandırılması.....	5
Çizelge 1.3. Farklı boyamalarda boyaların ipliğe tutunma yüzdeleri ve atık suda kalan boya miktarları.....	11
Çizelge 1.4. Ligninolitik enzimlerin kullanım alanları ve amaçları.....	18
Çizelge 2.1. Tarama çalışmasında kullanılan Basidiomycetes türleri.....	26
Çizelge 2.2. Ligninolitik enzim aktivitesini belirlemek için kullanılan substratlar ve derişimleri.....	28
Çizelge 2.3. Boyar madde giderim kapasitesinin belirlenmesi için kullanılan boyar maddeler ve derişimleri.....	29
Çizelge 2.4. Çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve kullanım alanları.....	32
Çizelge 2.5. Boyar madde renk giderimi çalışmalarında kullanılan dalga boyları ve derişimler.....	44
Çizelge 3.1. İzolatların neden olduğu ABTS substratının oksidasyonuna bağlı spesifik renk değişim parametreleri.....	56
Çizelge 3.2. İzolatların neden olduğu Guaicol substratının oksidasyonuna bağlı spesifik renk değişim parametreleri.....	57
Çizelge 3.3. İzolatların neden olduğu Gallik asit substratının oksidasyonuna bağlı spesifik renk değişim parametreleri.....	58
Çizelge 3.4. İzolatların RBBR boyar maddesinde neden olduğu renk giderimine bağlı inceleme parametreleri.....	59
Çizelge 3.5. İzolatların Remazol Black boyar maddesinde neden olduğu renk giderimine bağlı inceleme parametreleri.....	60

ÇİZELGELER DİZİNİ (Devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa No</u>
Çizelge 3.6. İzolatların Cibacron Blue 3R boyar maddesinde neden olduğu renk giderimine bağlı inceleme parametreleri.....	61
Çizelge 3.7. İzolatların Amaranth boyar maddesinde neden olduğu renk giderimine bağlı inceleme parametreleri.....	62
Çizelge 3.8. İzolatların Kristal Viyole boyar maddesinde neden olduğu renk giderimine bağlı inceleme parametreleri.....	63
Çizelge 3.9. İzolatların Malaşit Yeşili boyar maddesinde neden olduğu renk giderimine bağlı inceleme parametreleri.....	64
Çizelge 3.10. Tarama çalışması sonucu seçilen izolatlar ve standart suşun substrat ve boyar maddeler ile verdiği reaksiyon sonuçları.....	66
Çizelge 3.11. OBCC 3501 izolatının derin kültür tipinde farklı indükleyicilerin varlığında zamana bağlı ligninolitik enzim aktivitesi.....	72
Çizelge 3.12. OBCC 3501 izolatının statik kültür tipinde farklı indükleyicilerin varlığında zamana bağlı ligninolitik enzim aktivitesi.....	73
Çizelge 3.13. OBCC 3501 izolatının katı faz kültür tipinde farklı indükleyicilerin varlığında zamana bağlı ligninolitik enzim aktivitesi.....	74
Çizelge 3.14. Farklı sodyum azid konsantrasyonlarının <i>Polyporus arcularius</i> izolatı tarafında üretilen ligninolitik enzimleri inhibisyon oranları.....	92
Çizelge 3.15. Farklı n-propil gallat konsantrasyonlarının <i>Polyporus arcularius</i> izolatı tarafında üretilen ligninolitik enzimleri inhibisyon oranları.....	95

ÇİZELGELER DİZİNİ (Devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa No</u>
Çizelge 3.16. İnhibitörler ile muamele edilen ham enzimin 4. saat sonunda boyar madde renk giderimleri.....	97
Çizelge 3.17. Ham kültür sıvısına uygulanan amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz sonucunda elde edilen enzim ve protein miktarları ile bunlara bağlı olarak hesaplanan spesifik aktivite ve saflaştırma faktörü değerleri.....	103
Çizelge 3.18. Konsantre edilen ham enzim çözeltisi ve immobilizasyon işlemi sonrası CaCl_2 çözeltisinde bulunan lakkaz ve MnP enzim aktiviteleri.....	105
Çizelge 3.19. Alginata immobilize edilmiş konsantre enzim çözeltisinin yapay atık boyar madde renk giderim kapasitesi ve tekrar kullanılabilirliği.....	106
Çizelge 3.20. Reaktör ölçeğinde boyar madde giderim aşamalarında kullanılan çözeltilerde bulunan lakkaz ve MnP enzim aktiviteleri.....	109
Çizelge 3.21. İmmersiyon tip biyoreaktör sisteminde farklı boyar madde konsantrasyonlarının <i>Artemia salina</i> larvaları üzerindeki toksisite oranları.....	111
Çizelge 4.1. Bazı basidiomiset izolatların katı faz kültür yöntemi ile ligninolitik enzim üretimleri.....	118

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simge</u>	<u>Açıklama</u>
LiP	Lignin Peroksidaz
MnP	Mangan Peroksidaz
ABTS	2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat
RBBR	Remazol Brilliant Blue R
DMP	2,6 dimethoxyphenol
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HBT	1-Hidroxy-1H-benzotriazol
FSA	Fenol Sülfrik Asit Yöntemi
NaN ₃	Sodyum Azid
n-PG	Propil Gallat
μM	Mikromolar
mM	Milimolar

1. GİRİŞ

Dünyadaki hızlı nüfus artışı ile beraber kentleşme ve sanayileşme süreçleri, endüstriyel boyutta elde edilen ürünlerin miktar ve çeşitliliğinde de artışa neden olmuştur. Bu duruma paralel olarak söz konusu endüstri ürünlerinin, üretim süreçlerinde açığa çıkan atıkların miktar ve çeşitliliği de artmaktadır. Atıkların üretim hızı ile giderim hızı arasındaki fark yıllar boyunca giderek artmış ve sonuç olarak doğada birikim halinde olan atık miktarı da tolerans sınırlarını aşarak, doğal dengenin aleyhinde olacak biçimde sürekli bir artış eğilimine girmiştir. Bu bağlamda, çeşitli çevre sorunlarına yönelik uluslararası alanda sözleşmeler imzalanmakta ve birlikler bazında tüm devletleri bağlayıcı politikalar oluşturulmaktadır. Türkiye de hem Avrupa Birliği uyum süreci hem de taraf olduğu çok sayıda uluslararası çevre sözleşmeleri gereği üzerine düşen çevresel düzenlemelerini yapmakla yükümlü hale gelmiştir (Sağlam, 2008)

Endüstriyel atıkların en önemlilerinden birisi de tekstil sektöründen kaynaklanan atık sularıdır. Son yıllarda Türkiye’de sanayinin hızla gelişmesine paralel olarak tekstil endüstrisinde önemli gelişmeler yaşanmaktadır. Bu gelişmelerle birlikte hayatımızın her alanında kullandığımız ürünler tekstil endüstrisi tarafından kullanımımıza sunulmakla birlikte, artan ihtiyaçlar doğrultusunda çevre şartlarına dayanıklı ve uzun ömürlü ürünleri sunulmaya çalışılmaktadır. Tekstil ürünlerine çeşitli özellikler kazandırmak amacıyla yapılan işlemler neticesinde bazı organik ve inorganik kirlilik sebebi maddeler atık sulara karışmaktadır. Gerek iplik gerekse kumaş gibi ürünlere renk kazandırmak için yapılan çalışmalar sonucunda meydana gelen kirlilik, tekstil atık suları içinde en büyük paya sahiptir (Arslan, 2004).

Başta tekstil terbiye işlemleri olmak üzere tekstil endüstrisinde uygulanan proseslerde büyük ölçüde su kullanılmaktadır. Tekstil ürünlerinin elde edildiği banyolara boyar maddelerin yanı sıra yardımcı kimyasallar da eklenmektedir. Tekstil endüstrisine ilişkin en önde gelen çevresel kaygı deşarj edilen atık su hacmi ve bu atık suyun taşıdığı kirletici yük miktarıdır (Sağlam, 2008). Tekstil atık suları yüksek

konsantrasyonda boyar madde, biyokimyasal oksijen ihtiyacı (BOİ), kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) ve askıda katı madde içermesinin yanı sıra yüksek alkanite ve sıcaklığa sahiptir (Kestioğlu ve Yalılı, 2006). Bu atık sulardaki boyar maddeler dışındaki önemli kirleticiler; biyolojik olarak zor ayrıştırılan organik maddeler ve inhibitör bileşikler, adsorplanabilir klorlu bileşikler, pH ve tuzlardır (Mercimek, 2007). Tekstil sanayinde kullanılan tek kimyasal madde boyar maddeler değildir. Boyar maddelerin dışında; poliakrilatlar, fosfonatlar, deflokulasyon ajanları (lignin gibi), boyar maddeyi liflere fikse eden ajanlar da bulunabilmektedir (Vandevivere et al, 1998). Krom, kobalt ve bakır gibi ağır metallerin de tekstil atık sularında bulunması çevresel zararları açısından dikkat çekicidir (Kaushik and Malik, 2009).

Sahip oldukları kimyasal özelliklerinden ve taşıdığı kirletici yüklerinin fazla olmasından dolayı tekstil atık suları hem insan sağlığı hem de ekosistem açısından çevresel bir tehlike oluşturmaktadır. Bu nedenle tekstil endüstrisi atık suları, alıcı kaynaklara deşarj edilmeden önce mutlaka arıtma işlemlerinden geçirilmelidir.

Atık suların arıtımında, fiziksel, kimyasal ve biyolojik olmak üzere farklı arıtım yöntemleri kullanılmaktadır. Atık suyun içeriğine göre bir ya da birden fazla yöntem bir arada kullanılabilmektedir. Arıtım için tercih edilecek yöntem atık suyun içerdiği kimyasal maddelerin çeşidine, miktarına ve uygulama alanlarına bağlı olarak değişebilmektedir. Tekstil atık sularının arıtılması için genellikle birden fazla temel sürecin uygulanmasına ihtiyaç vardır. Farklı karakterdeki tekstil atık sularının renk gideriminde çok sayıda kimyasal ve fiziksel arıtım yöntemleri kullanılmaktadır. Ancak bu teknolojiler rengin tamamen giderilmesi için yeterli olmamaktadır. Ayrıca arıtım sistemlerinin pahalı olmalarının yanında, değişik moleküler yapılar sahip boyar maddeler için uygulanabilir sistemler değildir (Yuri et al., 2006). Biyolojik yöntemler fiziksel ve kimyasal arıtım yöntemlerine oranla daha az çamur üretmesi, maliyetinin düşük olması, alıcı ortamlara daha az zararlı yan ürünlerin verilmesi ve çevreyle dost sistemler olması gibi özelliklerinden dolayı tekstil endüstrisi atık sularının arıtımı için ideal çözüm olarak kabul edilmektedir (Kocaer ve Alkan, 2002).

Sunulan çalışmada ise;

- Yeni ve yerel ligninolitik enzim kaynağı izolatlar bulunması,
- Farklı kültür ve lignoselülozik atık tipleri kullanılarak maksimum enzim üretiminin elde edilmesi,
- Elde edilen ligninolitik enzimlerin tekstil endüstrisinde kullanılan boyar madde giderim kapasitelerinin belirlenmesi,
- Enzimlerin tekstil atık sularında kullanılabilirliğinin belirlenmesini ve,
- Reaktör ölçeğinde boyar madde giderimi hedeflenmiştir.

1.1. BOYAR MADDELER

Cisimleri renkli hale getirebilmek için kullanılan genellikle organik yapıli moleküllere “boyar madde” denir. Renk verici maddeler, elektromanyetik spektrumun 400-700 nm dalga boyu aralığında ışığı absorbe edebilen moleküllerdir. Renklendiriciler temelde pigmentler ve boyar maddeler olmak üzere ikiye ayrılırlar. Pigmentler de boyar maddelerle hemen hemen aynı özellikleri göstermelerinden dolayı zaman zaman boyar maddeler içerisinde yer alırlar. Pigmentler uygulandıkları ortamda hiç çözünmeyen bileşiklerdir. Pigment partikülleri, substrata polimer, plastik gibi katkı maddeleriyle birlikte bağlanır. Boyar maddeler ise uygulandıkları substrata tutunma eğilimi göstermeleri ile karakterize olurlar. Bu nedenle boyar maddeler kısmen çözüldükleri bir sıvı yardımıyla uygulanmaktadır ve uygulandıkları substrata özel bir ilgilerinin olması gerekmektedir (Sağlam, 2008; Özmen, 2008). Bunun yanı sıra boyar madde ve boya tanımları da sıklıkla birbirlerine karıştırılmaktadır. Ancak boyar maddeler uygulandıkları substrata tutunurken, boyalar yalnızca yüzeyi örtme görevi görürler. Boyaların ortamdan uzaklaştırılması için kazıma gibi mekanik işlemler yeterli olurken, boyar maddeler daha kompleks işlemlerle ortamdan uzaklaştırılabilmektedir.

1.1.1. Boyar Maddelerin Yapısal Özellikleri

Boyar maddelerin çoğunluğu iyonlaşabilen aromatik organik bileşikler grubundadır ve temelde benzen halkası yapısındadır. Normalde hidrokarbonlar renksizdirler ancak bunlara kromofor adı verilen doymamış grupların bağlanmasıyla boyar maddeleri oluştururlar. Kromofor bağlanmış hidrokarbonlara “kromojen” denir (Zollinger, 1991). Kromoforlar genelde elektron verici gruplardır. Kromojenlerin tam olarak boyar madde özelliği kazanabilmesi için oksokrom adı verilen ikinci seri grup bileşiğin moleküle bağlanması gerekmektedir. Kromojenler normal durumda silik saman rengidir. Oksokrom eklerinin kromojene bağlanmasıyla elektronlar aktif hale geçerek daha uzun dalga boyundaki ışınları soğurabilme yetisi kazanırlarlar, bu sayede hem renk şiddetini hem de renk derinliğini arttırırlar (Zollinger, 1991; Sağlam, 2008). Ayrıca oksokromlar elektron vererek rengin çözünürlüğü ve boyar maddenin substrata bağlanması gibi özellikleri etkilemektedirler. En önemli kromofor ve oksokrom grupları Çizelge 1.1’ de gösterilmektedir.

Çizelge 1.1. Kromofor ve oksokrom grupları (Zollinger, 1991)

Kromofor Gruplar		Oksokrom Gruplar	
$\text{-}\ddot{\text{N}}=\ddot{\text{N}}\text{-}$	Azo	-HN_2	Amino
>C=O	Karbonil	-NHR -NR_2 }	Substitue amino
$\text{-N}\begin{matrix} \diagup \text{O}^- \\ \diagdown \text{O}^- \end{matrix}$	Nitro	-OH	Hidroksil
>C=C<	Etilen	-SH	Tiyoalkol
>C=NH	Karbamino	-OCH_3	Metoksi
>C=S	Tiyokarbonil	$\text{-SO}_3\text{H}$	Sulfonik asid
-N=O	Nitrozo	$\text{-O-C}_6\text{H}_5$	Fenolik

1.1.2. Boyar Maddelerin Sınıflandırılması

Boyar maddeler farklı şekillerde sınıflandırılrsa da temel olarak kimyasal yapılarına, uygulama alanları, çözünürlüklerine ve boyama özelliklerine göre farklı şekillerde sınıflandırılmaktadırlar. Farklı sınıflandırmalar Çizelge 1.2’ e görülmektedir (Erdoğan, 2008; Vursavuş, 1999; Srinivasan and Virarghavan, 2010).

Çizelge 1.2 Boyar maddelerin farklı şekillerde sınıflandırılması

Çözünürlüklerine göre boyar maddeler	Boyama özelliklerine göre boyar maddeler	Kimyasal özelliklerine göre boyar maddeler
Suda çözünenler	Reaktif	Azo
Suda çözünmeyenler	Direkt	Nitro – Nitroza
Substratta çözünenler	Asidik	Polimetil
	Bazik	Arilmetin
	Sülfür	Azo [18] Annulen
	Küp	Karbonil
	Mordant	Antrakinon
	Metal Kompleks	
	Dispers	
	Pigmentler	

Her türlü boya/boyar madde/pigment “Society of Dyers and Colourist (SDC)” ve “American Association of Textile Chemist and Colourist (AATCC)” tarafından oluşturulan Colour Index (Renk İndeksi) sistemi ile uluslar arası standartta kaydedilmektedir. Bu sınıflandırmada boyalar öncelikle uygulama özelliklerine göre tanımlanan jenerik isimleri altında toplanır ve kimyasal yapısı biliniyorsa ona göre bir C.I numarası belirlenir (Sağlam, 2008). Renk indeksinin 2005 yılında yayınlanan 4. baskısında 17500 renk indeks jenerik ismi altında 34500 boya ve pigment listelendiği bildirilmiştir (www.sdc.org.uk). Boyaların uygulamasına göre Renk İndeksinde 15

farklı sınıf vardır (Cing, 2007). Bunlardan en yaygın olarak kullanılanları aşağıdakilerdir.

- Asidik boyar maddeler
- Reaktif boyar maddeler
- Metal kompleks boyar maddeler
- Direkt boyar maddeler
- Bazik boyar maddeler
- Mordant boyar maddeler
- Dispers boyar maddeler
- Pigmentler
- Vat boyar maddeler
- İngrain boyar maddeler
- Sülfür boyar maddeler

1.1.2.1. Asidik Boyar Maddeler

Genel formülleri $Bm-SO_3Na^+$ (Bm: boyar madde renkli kısmı) şeklinde yazılabilen asit boyar maddeleri, molekülde bir veya birde fazla sülfonik asit ($-SO_3H$), karboksil ($-COOH$) ve hidroksil ($-OH$) gibi oksokrom grupları içerirler. . Bu sınıftaki boyalara asidik denmesinin sebebi moleküler yapılarındaki asit gruplarının (sülfonat, karboksil) varlığından ziyade, asit boya banyolarında kullanılmalarından olmaktadır. Bu nedenle uygulamalar sonucunda organik asit tuzları oluşur. Asidik boyalar anyonik bileşikler olup, azot içeren yün, poliamid, ipek, katyonik modifiye akrilonitril elyafı ile kağıt, deri ve besin maddelerinin boyanmasında kullanılır (Seventekin, 1988; Cing, 2007). Renk indeksi listesinde yer alan verilere göre asidik boyalar en fazla renk indeksi ismine sahip gruptur (www.sdc.org.uk). Bir çok asidik boya azo, antraknon ve triarilmetan bileşikler içermektedir (Srinivasan and Virarghavan, 2010).

1.1.2.2. Reaktif Boyar Maddeler

Reaktif boyar maddeler, üretimine 1950’li yıllarda başlanmış ve sağladığı avantajlar nedeniyle halen günümüz modern tekstil endüstrisinin yaygın kullanılan boyalardandır. Reaktif boyar maddeler, sahip oldukları fonksiyonel gruplar sayesinde pamuk, yün, ipek gibi selülozik materyale kovalent bağ kurarak bağlanırlar. Kovalent bağ kurularak oluşturulan boyama işlemi ile daha yüksek haslık sağlanması ve çok yönlü kullanımları nedeniyle tekstil endüstrisinde en sık kullanılan boyar maddelerden birisi reaktif boyalardır (Sağlam, 2008). Reaktif boyar maddeler tekstil sektöründe en avantajlı boyar maddeler olarak kabul edilseler de; boyama işlemi sırasında, reaktif grupların hidrolize olması nedeniyle, boyanın % 10 – 50’ lik kısmı kumaşla reaksiyona giremez ve boyama tanklarında kalır. Bu nedenle renkli atık su oluşumuna neden olurlar. Bu boyalar, kimyasal yapıları, molekül boyutu ve yapısı nedeniyle biyolojik indirgenmeye dayanıklıdır (Al-Degs et al., 2000). Ayrıca reaktif boyar maddeler, renk indeks listesinde yayınlanan ikinci en geniş gruptur (www.sdc.org.uk).

1.1.2.3. Metal Kompleks Boyar Maddeler

Belirli gruplara sahip bazı azo boyar maddeler ile metal iyonlarının kompleks oluşturmaları sonucu meydana gelen boyalardır. Metal katyonu olarak Co, Cr, Cu ve Ni iyonları kullanılır. Krom kompleksleri daha çok yün ve poliamid; bakır kompleksleri ise pamuk ve deri boyacılığında kullanılmaktadır. Işık ve yaş haslıkları yüksektir (Seventekin, 1988). Metal kompleks boyalar genellikle azı bileşiklerdir. Renk indeksi listesinde yer alan azo boyarların 1/6’ sı metal kompleksleridir (Cing, 2007).

1.1.2.4. Direkt Boyar Maddeler

Genellikle sülfonik, bazen de karboksilik asitlerin sodyum tuzları şeklinde bulunan direkt boyar maddeler, selüloz liflerine yüksek affinite gösterir. Van der Waals bağı ile liflere bağlanmaktadır. Suda çözünebilen bileşikler olan direkt boyar maddeler önceden bir işlem yapılmaksızın boyar madde çözeltisinden selüloz ve yüne doğru

çekilirler (Başer ve İnancı, 1990). Bu nedenle selülozik elyaflarda kullanılmakla birlikte ucuz ve uygulanması kolaydır. Renk indeksinde direkt boyalar ikinci en geniş boya sınıfını oluşturmalarına rağmen yalnızca yaklaşık % 30' u üretilmektedir (Cing, 2007; McCharty, 1987).

1.1.2.5. Bazik Boyar Maddeler

Bazik boyar maddeler katyonik yapıda olup, bazik olarak etki ettiklerinden anyonik grup içeren liflere bağlanırlar. Ayrıca renkli bir katyona ve renksiz bir anyona sahiptirler. Pozitif yük taşıyıcısı olarak N ve S atomu içerirler. Bazik boyar maddeler, poliakrilnitritlerin, yün ve pamuk elyafın boyanmasında kullanılır (Erdoğan, 2008). Bazik boyalar genellikle modifiye poliakrile benzeyen asit grubu içeren sentetik liflerin boyanmasında kullanılır. Liflerin asit gruplarına bağlanırlar. Bazik boyar maddeler Renk İndeksi' ndeki boyaların % 5' ini oluştururlar (Cing, 2007). Bazik boyar maddelerin ışığa ve suya karşı haslıkları düşüktür.

1.1.2.6. Mordant Boyar Maddeler

Mordant boyar maddeler, boyanın liflere bağlanmasını sağlayan bir kimyasal olan mordantın ortama ilave edilmesiyle kumaşa bağlanırlar. Mordan olarak, suda çözünmeyen hidroksitler oluşturan Al, Sn, Fe, Cr tuzları kullanılır. Kumaştan renk solmasını düzenletici sabitleyici ajan olarak etkilidirler. Yün, der, ipek ve modifiye selüloz liflerini boyamak için kullanılırlar. En fazla bulunanlar azo, okzazin ya da triarilmetandır (Erdoğan, 2008).

1.1.2.7. Dispers Boyar Maddeler

Dispers boyar maddeler, sentetik liflere (selüloz asetat, poliester, poliamid, akril v.b) penetre olabilen ve suda zor çözünebilen moleküllerdir. Bu boyar maddeler, boyama işlemi sırasında dispersiyon ortamından hidrofob elyaf üzerine difüzyon yolu

ile çekilmektedir. Boyanın yayılabilmesi için liflerin, yüksek sıcaklıkta ($>120\text{ C}^0$) veya kimyasal yumuşatıcıların kullanılması yardımıyla şişmesi gerekmektedir. Özellikle poliestere boyanmasında kullanılırlar ve haslıkları oldukça yüksektir. Dipsers boyalar, Renk İndeksindeki üçüncü en büyük boya grubunu oluşturmaktadır (Erkurt, 2006).

1.1.2.8. Pigmentler

Pigment boyar maddeler, bağlayıcı madde denilen sentetik reçineler ile elyaf yüzeyine bağlanan boyar maddelerdir. Bunlar suda çözünmeyen noniyonik bileşikler ya da tuzlardır. Renk İndeksi'ndeki bütün ticari boyaların % 25'ini oluştururlar. Uygulama sırasında kristal ya da partiküllü yapılarını korurlar. Çoğu azo ya da metal kompleks fitalosiyeninlerdir (Başer ve İnanıcı, 1990).

1.1.2.9. Vat Boyar Maddeler

Vat boyar maddeler, suda çözünmeyen ve yaygın olarak içerikli ipliklerin boyanmasında kullanılan boyar maddelerdir. Bu boyar maddeler, suda çözünmezler ancak alkali indirgenmeyle (sodyum hidroksit varlığında) çözünür hale gelebilir. Selüloz liflere Van der Waals bağlarına bağlanır ve hidrojen peroksitle oksitlenerek çözünmeyen forma dönüşür. Hemen hemen bütün vat boyar maddeleri, antrakonin ve indigoiddir. İndigo boya, 5000 yıllık tarihi ile vat boyar maddelere iyi bir örnektir (Kulkarni, 2003).

1.1.2.10.İngrain Boyar Maddeler

İngrain terimi *in situ* olarak oluşan bütün boyalar için kullanılabilir. Naftol, fenol gibi bileşenler ile diazo aromatik aminlerin reaksiyonları sonucunda açığa çıkan çözünmeyen bir üründür. Bu reaksiyon kumaş üzerinde meydana gelmektedir. Bütün naftol boyalar azo bileşiklerdir (Erdoğan, 2008).

1.1.2.11.Sülfür Boyar Maddeler

Heterosiklik kükürt içeren halkalardan oluşan kompleks polimerik aromatiklerdir. Kükürtlü boya, vat boyama gibi redüksiyon ve oksidasyon işlemleri gerektirir. Tüm dünyada üretilen boyaların % 15' ini oluşturlar ve genel olarak pamuk boyamasında kullanılırlar (Vursavuş, 1999).

1.1.3. Boyar Maddelerin Kullanım Alanları

İnsanoğlu ilk çağlardan bu yana malzemeleri renklendirmek için boyar maddeleri kullanmaktadır. Bitkisel ve hayvansal kaynaklı doğal boyar maddeler kullanılarak geliştirilen ilk boyama tekniğinin Mezopotamya' da uygulanmasının ardından, geçen zamanda uygulama ve ham madde üzerinde pek çok gelişmeler olmuştur. Gelişen boyama teknolojisi ve boyar madde çeşitliliğinin bir sonucu olarak, boyar maddeler pek çok alanda kullanım imkanı bulmaktadır.

Dünyada ve ülkemizde boyar madde gereksinimi ve kullanım alanları gün geçtikçe artmaktadır. 2005 yılı verilerine göre boyar madde ve ara ürünlerinin dünyadaki market hacmi 25 milyon dolar olarak belirtilirken bu rakamın yıllık 6 milyon dolarının yalnızca tekstil boyar maddeleri satışına ait olduğu bildirilmektedir. Dünya çapında boyar madde üretim miktarının 34 milyon ton civarında olduğu belirtilmektedir. Boyar madde üretim ve pazarlama merkezleri İsviçre, Almanya ve İngiltere olarak bilinse de son yıllarda ucuz üretim maliyeti ve büyüyen ekonomisi ile Asya ülkeleri öne çıkmaktadır (<http://www.dyepigments.net/industries-we-serve.html#global>).

Boyar maddeler, tekstil, plastik, deri, sentetik lif üretimi, lastik, kereste, selüloz ve kağıt, kozmetik, ilaç, gıda, inşaat, cam ve porselen, otomotiv, makine, matbaacılık, güzel sanatlar olmak üzere pek çok sanayi alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak kullanım alanları çok geniş olan boyar maddelerin % 80 ' i tekstil sanayinde kullanılmaktadır (Koçak, 2011; Kurbanova et al., 1998)

Tekstil endüstrisi, tüm Dünya' da olduğu gibi ülkemiz ekonomisinin de başta gelen sektörlerinden biridir. Ülkemizin toplam ihracat gelirlerinin % 36 – 39' u tekstil

ürünlerinin ihracatından sağlanmasının yanı sıra, bu sektörün ülkemizdeki sanayi payı % 20' dir (Cing, 2007; Şeker, 2007). Ticari olarak üretilen ve tekstil sektöründe kullanılan boyaların sayısının 10.000'den fazla olduğu ve Dünya çapında üretilen yaklaşık yıllık 10^9 ton boyar maddenin % 20 – 25 kadarının atık olarak alıcı su kaynaklarına iletildiği bildirilmektedir (Başer ve İnanıcı, 1990). Tekstil endüstrisinde haşıl sökme, ağartma, boyama ve yıkama gibi üretim aşamalarında fazla miktarda su kullanımıyla beraber, atık su oluşumu miktarı da oldukça artmaktadır. Kullanılan boyar maddelerin iplik üzerine adsorpsiyonu kullanılan iplik, boyanın tipi, uygulama koşulları (zaman, pH, sıcaklık, kullanılan mordant) gibi faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Sonuç olarak boyar maddelerin ipliğe tutunma yüzdeleri değişmekte ve önemli sayılabilecek bir yüzdesi atık suda kalarak alıcı su kaynaklarına iletilmektedir (Çizelge 1.3).

Çizelge 1.3. Farklı boyamalarda boyaların ipliğe tutunma yüzdeleri ve atık suda kalan boya miktarları (Cing, 2007)

Boyar Madde	İplik	Tutunma derecesi (%)	Atık suda kalan boya miktarı (%)
Asidik	Poliamid	89 - 95	5 - 20
Bazik	Akrilik	95 - 100	0 - 5
Direkt	Selüloz	70 - 95	5 - 30
Dispers	Polyester	90 - 100	0 - 10
Metal kompleks	Yün	90 - 98	2 - 10
Reaktif	Selüloz	50 - 90	10 - 50
Kükürt	Selüloz	60 - 90	10 - 40
Vat	Selüloz	80 - 95	5 - 20

1.1.4. Boyar Madde Giderimi

Tekstil işletmelerinden alıcı su kaynaklarına deşarj edilen boyar maddeler, ortamın renklenmesi sonucunda ışık geçirgenliğini azaltmakta ve buna bağılı olarak fotosentetik aktivite olumsuz yönde etkilenmektedir. Fotosentezin engellenmesine bağılı olarak su içerisindeki çözünmüş oksijen miktarı azalmakta ve giderek ortamda anaerobik koşulların hakim olmasına neden olmaktadır. Bunun yanında boyar maddelerin memelilerde ve sucul organizmalarda toksik etkileri belirtilmektedir (O'Neill, 1999). Bu boyaların % 2' lik kısmının balıklarda LC50 değerinin 1 mg/dm³ , % 96' sınır ise LC50 değerinin 10 mg/dm³ ün üstünde olduğu tesbit edilmiştir (Şeker, 2007). Yine pek çok sentetik boyar maddenin kanserojen ve mutajen etkisi bilinmektedir (Gupta and Suhas, 2009). Tekstil atık sularında boyar maddelerin yanı sıra, boyama işleminde yardımcı olarak kullanılan organik ve inorganik diğer kimyasallar da bulunmakta ve işlem prosesi sonucunda sıcaklık ve pH gibi fiziksel ortam koşulları da değişmektedir. Boyar maddelerin kimyasal yapılarındaki farklılıklar ve sahip olduğu karakteristik özellikleri nedeniyle tekstil atık suları degradasyonu oldukça zor, kirlilik oranı yüksek atıklar sınıfına girmekte ve çevresel zararlar vermektedir (Srinivasan and Virarghavan, 2010). Bu nedenle, bu atık tip suların alıcı kaynaklara bırakılmadan önce bir ön arıtım işlemi uygulanması gerekmektedir. Tekstil atık sularında boyar maddelerin rengini giderebilmek için fiziksel, kimyasal ve biyolojik arıtma sistemleri kullanılabilir. Bu yöntemlerle elde edilen renk giderim veriminin, atık sudaki boyar madde türüne bağılı olarak değişiklik göstermesi, atık sulardan renk giderim için en uygun yöntemin seçimini daha da zorlaştırmaktadır (Doğan ve ark., 2005).

1.1.4.1. Fiziksel Yöntemlerle Boyar Madde Giderimi

Fiziksel arıtım yöntemleri, atık suyun içerdiği askıdaki katı maddeleri ve diğer iri katı maddeleri sudan ayırarak, çöken maddeleri atık sudan uzaklaştırmak için kullanılan yöntemlerdir. Genellikle ileri aşamalarda yapılacak olan arıtma yöntemleri için ön işlemler olarak değerlendirilebilir ancak tam bir arıtım sağlamazlar

Adsorpsiyon, membran filtrasyonu, iyon değiştiriciler, ızgara ve elekten geçirme, kum taneciklerini tutma, yüzen maddeleri tutma, radyasyon, dengeleme gibi yöntemlerle fiziksel arıtım gerçekleştirilmektedir (Gupta and Suhas, 2009).

Adsorbsiyon metodu oldukça etkili bir metod olmasının yanında maliyeti de uygundur. Adsorpsiyonla renk gideriminde en fazla kullanılan yöntem aktif karbon yöntemi olup, katyonik, mordant ve asidik boyalar için oldukça etkili olurken; dispers, direkt, pigment, vat ve reaktif boyalar için etkisi azdır. Metodun performansı karbonun tipine ve atık suyun karakterisiğine bağlıdır. Bunun dışında bataklık kömürü, ağaç kırıntıları, uçucu kül-kömür karışımı, silika jeller, doğal killer, mısır koçanı gibi malzemeler de absorban olarak kullanılabilir (Robinson et al., 2001).

Membran filtrasyonu ile boyar maddenin sürekli olarak arıtılması, konsantre edilmesi ve en önemlisi atık sudan ayrılması mümkün olmaktadır. Diğer yöntemlere göre en önemli üstünlüğü sistemin sıcaklığa, beklenmedik bir kimyasal çevreye ve mikrobiyal aktiviteye karşı dirençli olmasıdır. Ancak ayırmadan sonra kalan konsantre atığın bertaraf edilmesi, sermaye giderlerinin yüksek olması, membranın tıkanma olasılığı ve yenilenme gerekliliği gibi dezavantajlara sahiptir (Kocaer ve Alkan, 2002).

İyon değiştiriciler ile atık su içerisinde mevcut değişim bölgeleri doğunluğa erişene kadar iyon değiştirici reçineler üzerinden geçirilerek arıtım sağlanır. Böylelikle atık sudaki hem anyonik hem de katyonik boyalar uzaklaştırılabilir. Dispers boyalar için uygun olmayan bu yöntemin maliyetinin oldukça yüksek olmasının yanında, boyar maddelerin çok farklı kimyasal yapıya sahip olması bu metodun kullanımını sınırlar (Robinson et al., 2001).

1.1.4.2. Kimyasal Yöntemlerle Boyar Madde Giderimi

Tekstil atık sularında bulunan boyar maddelerde renk giderimi sağlanması için oksidatif prosesler, fenton ayıracı, ozonlama, sodyum hipoklorit, fotokimyasal ve elektrokimyasal işlemler, kimyasal koagülasyon, flokülasyon gibi kimyasal ayırma yöntemleri kullanılarak sağlanmaktadır (Robinson et al., 2001; Erdoğan, 2007).

Kimyasal arıtım yöntemlerinden en yaygın kullanılanı oksidatif proseslerdir. Bu işlemden temel oksitleyici ajan olarak hidrojen peroksit (H_2O_2) kullanılmaktadır.

Oksidatif proseslerde boyar madde molekülündeki aromatik halka kırılarak atık sudan boya arıtılmış olur (Kocaer ve Alkan, 2002).

Ozonlama, aromatik hidrokarbonlar, pestisitler, fenoller ve klorlu hidrokarbonların yıkımında, boyar madde ve KOİ gideriminde kullanılan etkili bir yöntemdir (Xu and Lebrun, 1999). Boyar madde molekülünde bulunan çift bağlı organik bileşiklerin ozonlama ile kırılmaları sonucunda renksiz moleküller oluşur. Ozonlama işlemi sonucunda çamur oluşumu gözlemlenmemektedir ancak sistemin gaz halinde uygulanması ve uygulama sonucu su hacmin arttırılması sistemin dezavantajlarıdır (Erdoğan, 2007).

Endüstriyel tekstil atık sularının renk gideriminde ozonlama (% 50-60 renk giderimi), flokülasyon/filtrasyon (% 80' e varan renk giderimi) ve kalsiyum hidrosülfid ile alkalinizasyon gibi kimyasal arıtım işlemleri kullanılmaktadır. Bu işlemler ön iyileştirme olarak ya da biyolojik iyileştirmenin ardından uygulanabilmektedir (Balan and Monteiro, 2001).

1.1.4.3. Biyolojik Yöntemlerle Boyar Madde Giderimi

Tekstil atık sularındaki boyar madde gideriminde kullanılan fiziksel ve kimyasal arıtım yöntemlerinin uygulaması ve sürdürülebilirliğinin pahalı olmalarının yanında, birden fazla kompleks yapıli boyar maddelerin bulunduğu atık sularında tek bir arıtım yöntemi yeterli olmamaktadır (Banat et al., 1996). Son zamanlarda yapılan çalışmalar sonucunda birçok boya türünü atık sulardan giderebilme yeteneğine sahip mikroorganizma türlerinin varlığı tespit edilmesi biyoteknolojik uygulamaları ön plana çıkarmaktadır. Biyolojik prosesler kullanılarak yapılan atık su arıtımı, arıtım sonucunda az çamur üretilmesi, maliyetin düşük olması, zararlı yan ürünlerin oluşmaması gibi nedenlerden ötürü dikkat çekicidir (Kocaer ve Alkan, 2002). Cing (2007), biyolojik işlemlerin yatırım maliyetinin ozonlama ve hidrojen peroksit gibi kimyasal yöntemlere göre 5-20 kat, işletme maliyetinin de 3-10 kat daha az olduğunu vurgulamaktadır.

Tekstil atık sularının arıtımında en yaygın kullanılan biyolojik arıtım yöntemi aktif çamur sistemidir. Aktif çamur sistemi, çözünen bazik ve direkt boyar maddelerin

önemli bir kısmının rengini gidermektedir. Fakat geniş oranda kullanılan reaktif ve asit boyar maddeleri çok az uzaklaştırabilmektedir. Ayrıca tekstil atık sularının sürekli değişken bileşiminden dolayı bakteriyi canlı tutmak zorlaşmaktadır (Başbüyük ve ark., 1998). Son zamanlarda tekstil atık sularının renk gideriminde aerobik ve anaerobik sistemlerin beraber kullanılması üzerine çalışmalar yoğunlaşmaktadır.

Boyar maddelerin renk giderimi ile ilgili çalışmalarında bitkiler, algler, bakteriler ve funguslar olmak üzere pek çok organizma ve sahip oldukları enzimatik sistemler kullanılmaktadır. Bitkiler ve alglerle yapılan giderim çalışmaları genellikle boyar madde içeren atık suların, biyosorbent görevi gören organizmalar tarafından tutularak ortamdan uzaklaştırılması üzerine yoğunlaşmaktadır (Ergene ve ark., 2009; Hubbe et al., 2002; Deneshvar et al., 2006). Fungus ve bakteriler sahip oldukları değişen ortamlara hızlı adapte olabilme özellikleri nedeni ile diğer canlılar arasında önemli bir üstünlüğe sahip olmakta ve ksenobiyotikler de hızlı bir şekilde metabolize edebilecek enzim ya da sistemler geliştirebilmektedirler. Tüm bunların yanında bazı mikrobiyal türlerde bulunan ve çok çeşitli organik bileşiklere karşı etkili olan enzimatik reaksiyon potansiyeli önemli bir avantaj olarak karşımıza çıkmaktadır. Tekstil atık sularında renk giderimin çalışmalarında canlı ve ölü hücrelerle biyosorpsiyon işlemleri, aerobik ve anaerobik arıtım, enzimatik sistemleri kullanılarak renk giderim gibi biyolojik proseslerle ilgili çalışmalar bulunmaktadır.

1.2. LİGNİNOLİTİK ENZİMLER

Ligninolitik enzimler, kompleks ve yıkıma dirençli bir polimer olan ligninin yıkımında rol oynayan enzimlerdir. Lignin, selülozdan sonra doğada en fazla bulunan, bitkisel kaynaklı yenilenebilir bir biyopolimer olması nedeniyle karbon döngüsünde önemli bir role sahiptir. Bu nedenle ligninolitik enzimler doğada oldukça önemli bir yere sahiptir (Lankinen, 2004).

Ligninolitik enzimler, peroksidazlar, lakkazlar ve ekstraselüler hidrojen peroksit üretiminden sorumlu oksidazlar olmak üzere geniş bir ekstraselüler enzim sisteminden oluşmaktadır. Farklı tür ve kültür koşullarına özgü olarak enzim üretim sistemleri

değişebilmektedir. Lignin yıkımından asıl sorumlu ligninolitik enzimler lakkaz, lignin peroksidaz ve mangan peroksidaz olarak bildirilmektedir. Versatil peroksidazlar, lignin peroksidazlar ve mangan peroksidazların yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin bir kombinasyonu olan demir içeren peroksidazlar grubundan yeni bir ligninolitik enzim grubu olarak tanımlanmaktadır. Bunların yanı sıra hidrojen peroksit üretimi ile karakterize olan glikol oksidaz (GLOX) ve aril alkol oksidaz (AAO, EC 1.1.3.7) enzimleri de ligninolitik enzimler sınıfına giren enzim gruplarındandır (Maciel et al., 2010).

Lakkazlar (EC 1.10.3.2, benzenediol: oksijen oksidoredüktaz); fenolik içerikli bileşikler fenoksi radikallere okside eden, çoklu bakır atomu içeren fenoloksidaz grubu enzimlerin bir grubudur. Lakkaz enzimleri düşük substrat özgüllükleri ile karakterize edilmekte olup, difenoller, polifenoller, farklı sübstitüye feoller, daiminler, aromatik aminler ve hatta iyodin gibi inorganik bileşikler de dahil olmak üzere çok fazla çeşitlilikteki substratları okside etmektedirler (Tuncer, 2010a). Lakkazlar genelde fenolik bileşiklerin yıkımında rol oynayan enzimler olarak bilinse de 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) (ABTS) ya da 1-Hidroksibenzo triazole (HBT) gibi mediatörlerin varlığında fenolik olmayan bileşikler de okside etme yetenekleri bildirilmiştir (Eggert et al., 1996). Lakkaz enzimleri oldukça fazla substratlarının olması ve dolayısıyla pek çok reaksiyonu katalizleyebilmesi sebebiyle pek çok alanda ticari olarak kullanılmaktadır (Tuncer, 2010b).

Lignin peroksidaz (LiP, EC 1.11.1.14); oksidoredüktazlar ailesine ait demir içeren bir ligninolitik enzimdir. İlk kez 1983 yılında *Phanerochaete chrysosporium* 'da tanımlanmıştır (Glenn et al., 1983). Lignin peroksidaz enzimi, oksidant olarak hidrojen peroksit varlığında lignine benzer yapıdaki bileşiklerin propil yan zincirlerinin C-C bağlarını oksidatif olarak parçalar ve tek elektron oksidasyonu ile substratını okside eder. Diğer peroksidazlara göre daha düşük bir pH olan pH 2.5 noktasında optimum çalışmaktadır. Pek çok polimerik substratı okside edebilme yeteneğine sahip olan LiP enzimi, aynı zamanda fenolik olmayan moleküllerin yıkımında görev almasıyla önem kazanmaktadır (Maciel et al., 2010).

Mangan peroksidaz (MnP, EC 1.11.1.13) enzimi; kofaktör olarak mangana ihtiyaç duymasıyla Mangan-bağımlı peroksidaz olarak da bilinmektedir. İlk kez *Phanerochaete chrysosporium* da keşfedilen bu enzim (Kuwahara et al., 1984), demir içeren oksidoredüktazlar grubuna girmektedir. Bu enzim ortamda bulunan Mn^{+2} yi Mn^{+3} e oksitler ve bu sayede fenolik halkaları fenoksi radikallerine dönüştürerek molekülün yıkılmasına öncülük eder (Hattaka, 1994). MnP enzim oksidant olarak hidrojen peroksit varlığına ihtiyaç duymaktadır. Mangan bağımlı peroksidaz, lignin peroksidaz ve lakkaz ile birlikte ligninin biyolojik parçalanmasından sorumludur. Ligninden poliaromatik hidrokarbonlara olmak üzere pek çok rekalsitrant bileşiği yıkımında görev almaktadır (Lankinen, 2004).

1.2.1. Ligninolitik Enzim Kaynakları

Ligninolitik enzimler doğada pek çok farklı organizma grubu tarafından sentezlenebilmektedirler.

Funguslar ligninolitik enzim üretiminde en iyi bilinen organizma grubu olmakla birlikte, funguslar içerisinde ligninolitik enzim üretim kapasitesi en yüksek grup beyaz çürükçül funguslardır. Sistematik olarak bir grup basidiyomisetleri içerisine alan beyaz çürükçül funguslar, ligninin karbondioksit ve suya kadar mineralizasyonunu sağlayan tek grup olarak bu enzimlerin üretiminde önemli bir yere sahiptir. Doğal ortamlarında çoğunlukla ölü ya da canlı odun parçalarının üzerini yaşam alanı olarak tercih etmeleri ile karakterize olurlar. Bu gruptaki funguslar birden fazla ligninolitik enzimi aynı anda üretebilme kapasitesine sahiptir (Eriksson, 1990; Lankinen, 2004). Beyaz çürükçül funguslardan *Phanerochaete chrysosporium* ve *Trametes versicolor* (*Coriolus versicolor* ya da *Polyporus versicolor*) ligninolitik enzim üretimi en fazla çalışılan makrofunguslardır. Bu grubun dışında yumuşak çürükçül fungusların ve kahverengi çürükçül fungusların ligninin kısmi parçalanmasında görev aldığı bildirilmektedir (Dizge, 2007).

Funguslar kadar yaygın olmasa da bakteriler arasında da ligninolitik enzim üretimi rapor edilmiştir. Aktinomisetlerin ekstraselüler peroksidaz ürettikleri

bildirilmektedir. Filamentli bakterilerin bulunduğu *Streptomyces* genusu lignin degrade özelliği bilinen bir gruptur ve lignin molekülünü % 15' e varan oranlarda mineralize edebilmektedir. Filamente sahip olmayan bakteri gruplarında lignin yıkım oranının daha düşük olduğu görülmektedir. Bununla birlikte ligninin mineralizasyonda yardımcı rol oynayabilmektedirler. *Pseudomonas spp.* bakteriler arasındaki lignin dekaradasyonunda en etkili suşlardan biri olarak göze çarpmaktadır (Hattaka, 1994).

1.2.2. Ligninolitik Enzimlerin Kullanım Alanları

Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması, biyoteknolojinin endüstriyel enzimler ile ilgili alanında yapılan araştırmaların daha da önem kazanmasına neden olmaktadır. Ligninolitik enzimler, çok çeşitli ve rekalsitrant moleküllerin yıkımında ya da ara ürün oluşumunda rol oynadıklarından dolayı kullanım alanları oldukça geniştir.

Ligninolitik enzimler gıda endüstrisi, ambalaj ve kağıt endüstrisi, tekstil endüstrisi, biyoremediasyon çalışmaları, besin endüstrisi, ilaç endüstrisi, medikal, kozmetik, nanoteknoloji ve organik madde sentezi gibi pek çok alanda farklı amaçlar için kullanılmaktadır (Çizelge 1. 4) (Maciel et al., 2010).

Çizelge 1.4. Ligninolitik enzimlerin kullanım alanları ve amaçları (Maciel et al., 2010)

Kullanım Alanı	Ligninolitik Enzimler	Kullanım Amaçları
Yiyecek ve İçecek Endüstrisi	Lakkaz	Yiyecek ve içeceklerin fenolik içeriğinin giderilmesi Askorbik asit belirlenmesi Şeker pancarı pektin jelatinasyonu
	MnP	Doğal aroma üretimi
	LiP	Doğal aroma kaynağı Vanilin üretimi

Çizelge 1.4. Ligninolitik enzimlerin kullanım alanları ve amaçları (Maciel et al., 2010)
(Devamı)

Kullanım Alanı	Ligninolitik Enzimler	Kullanım Amaçları
Ambalaj ve Kağıt Endüstrisi	Lakkaz	Lignin depolimerizasyonu Odun hamurundan lignin uzaklaştırılması Ambalaj kağıdının ağartılması
	MnP	Ambalaj kağıdının ağartılması
	LiP	Ambalaj kağıdının renginin giderilmesi Fabrika atıklarının giderimi
Tekstil Endüstrisi	Lakkaz	Tekstil boyalarının giderimi ve ağartma
	MnP	Tekstil boyalarının giderimi ve ağartma
	LiP	Tekstil boyalarının giderimi ve ağartma
Biyoremediasyon	Lakkaz	Ksenobiyotiklerin biyodegradasyonu Polisiklik aromatik hidrokarbonların (PAH) degradasyonu
	MnP	PAH degradasyonu Sentetik boyar madde degradasyonu Bitkisel kaynaklı kağıtların ağartılması DDT, PCB, TNT degradasyonu
	LiP	Azo, heterosiklik, reaktif ve polimerik boyar maddelerin giderimi Çevresel kirliliğin mineralizasyonu Ksenobiyotik ve pestisit degradasyonu
Organik Sentez, Medikal, Farmasötik, Kozmetik ve Nanoteknoloji Uygulamaları	Lakkaz	Polimerlerin üretimi Fenol ve steroidlerin bağlanması Medikal ajanlar Karbon-azot bağlarının oluşturulması Kompleks doğal ürünlerin sentezi Kişisel hijyen ürünleri Biyosensör ve biyobildirici
	MnP	Akrilamid polimerizasyonu Polimer kauçuk degradasyonu Direkt elektron transferi
	LiP	Fonksiyonel bileşik sentezi Kozmetik ve dermatolojik cilt ürünleri

1.3. LİTERATÜR ARAŞTIRMALARI

Beyaz çürükçül funguslar, doğal ve endüstriyel lignin yıkımının yanı sıra, çeşitli kirleticiler dahil geniş aralıklardaki rekalsitrant aromatik bileşikleri yıkıma uğratabilmektedirler. Bu özelliklerinden dolayı beyaz çürükçül funguslarla yapılan biyodegradasyon çalışmaları giderek ilgi kazanmaktadır. Tekstil atık sularında kirlilik etmeni oluşturan boyar maddelerin giderimi de biyodegradasyon çalışmalarının önemli bir kolunu oluşturma olup, ülkemiz ve dünyada pek çok araştırmacı bu konuya ilgi duymakta ve çok çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Bu nedenle konu ile ilgili sunulacak herhangi bir literatür özetinin eksik olmaması mümkün görülmemektedir. Çalışma sayısının çokluğu nedeni ile burada sadece temsilci örneklerden söz edilebilmiştir.

Beyaz çürükçül funguslar, ortamda bulunan boyar maddelerin rengini biyosorpsiyon ve enzimatik yıkım olmak üzere iki şekilde giderebilmektedir. Buna bağlı olarak bu funguslarla yapılan renk giderim çalışmaları, fungusun boyalı ortamda büyütülmesi (*in vivo*) yoluyla biyosorpsiyon ya da direkt enzimatik yıkım (*in vitro*) olarak karşımıza çıkmaktadır.

Beyaz çürükçül funguslardan *Phanerochaete chrysosporium* ligninolitik enzim üretimi ve boyar madde giderim yeteneği en yaygın olarak çalışılan fungus olup pek çok çalışmaya konu olmuştur (Yeşilada ve Özcan, 1998; Ollikka et al., 1993; Gao et al., 2006).

Balan ve Monteiro (2001) tarafından gerçekleştirilen çalışmada Brezilya' dan izole edilen 4 farklı makrofungusun indigo boyar madde (CI Vat Blue I) içeren sıvı ortamda büyümesi sırasında neden oldukları renk giderimleri araştırılmıştır. *Phellinus gilvus* izolatında renk giderimi 4 günün sonunda % 100' e ulaşırken bu oran, *Pleurotus sajor-caju* için % 94, *Pycnoporus sanguineus* için % 91, *Phanerochaete chrysosporium* için % 75 olarak ölçülmüştür.

Rabinson ve arkadaşları (2001) tarafından yapılan bir diğer çalışmada *Bjerkandera adusta*, *Phlebia tremellosa*, *Pleurotus ostreatus* ve *Coriolus versicolor*, beyaz çürükçül funguslarının kısıtlı azot bulunan mineral tuz ortamında LiP, MnP ve lakkaz üretim yetenekleri araştırılmış, *B.adusta* ve *P.tremellosa* yüksek enzim

aktivitelerinden dolayı yapay tekstil atık suyu giderim çalışmalarında kullanılmak üzere seçilmiştir. Degradasyon deneyleri 100 mg/l derişimde boyar madde içeren azot bakımında zengin ve kısıtlı koşullarda gerçekleştirilmiştir. Azot miktarının *B.adusta* tarafından gerçekleştirilen boyar madde gideriminde bir etkisi olmadığı belirlenirken, *P.tremellosa* için çok küçük bir düşüş olduğu belirlenmiştir. Azot içeriğinin renk giderim zamanına da herhangi bir etkisi olmadığı saptanmıştır.

Ölü ağaç kalıntılarında izole edilen ve *Ganoderma sp.*WR-1 olarak tanımlanan makrofungus izolatu ile gerçekleştirilen bir çalışmada 100 ppm amaranth boyar maddesi ilave edilen % 2 nişasta ve % 0.125 yeast ekstakt bulunan optimize büyüme ortamında % 96 renk giderim oranına ulaşılmıştır. Bu giderim kapasitesinin, boyar madde giderim çalışmalarında yaygın olarak kullanılan *T.versicolor* ve *P.chrysosporium* suşlarına oranla oldukça yüksek olduğu vurgulanmaktadır. *Ganoderma sp.*WR-1 izolatu tekstil endüstrisi atık suyu bulunan ortamda büyütüldüğünde 12 gün içerisinde rengi tamamen giderdiği gözlemlenmiştir (Ravenkar and Lele, 2007).

Bir başka çalışmada Acid Orange 7, Acid Red 18 ve Reactive Black 5 boyar maddelerinin *Schizophyllum commune*' nun gelişimi üzerindeki etkisi ve bu boyar maddelerin giderimi çalışılmıştır. Bu çalışmada farklı başlangıç pH değerlerinin (1-6) ve boyar madde konsantrasyonlarının (10-100 mg/l) renk giderimi ve mantarların gelişimi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Mantarların gelişimi ve bu üç azo boyanın renginin giderimi için optimal pH'nın 2 olduğu saptanmıştır. Boyar madde derişimi arttıkça mantarın gelişiminin de inhibe olduğu belirlenirken en düşük boyar madde konsantrasyonların malsimum renk giderimi gözlemlenmiştir. Diğer 2 boyar maddeye oranla Reactibe Black 5' in daha yüksek oranda giderildiği vurgulanmıştır (Renganathan et al., 2006).

Yeşilada ve arkadaşları (2001), başlangıç pH' sı, boya konsantrasyonu, pellet miktarı, sıcaklık ve karıştırma gibi koşulların *Funalia trogii*'nin renk giderimi aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Başlangıç pH' sı dışındaki tüm faktörlerin izolatu renk giderim aktivitesi üzerinde önemli olduğu belirlenmiştir. Boyar maddenin fungal pelletler tarafından adsorbe edilerek dekolorizasyonunun son aşamsını, mikrobiyal metabolizma yoluyla degradasyon izlemiştir. Sıcaklık uygulaması ile öldürülen fungal

pelletlerin de Astrazon red boyasını giderim kapasitesi araştırılmıştır. Bu pelletleri 24 saatlik sürede boyar maddenin % 55' ini bünyesinde tuttuğu , ikinci tekrarda ise bu oran % 24'e düşmektedir.

Dichomitus squalens makrofungusu tarafından Orange G, Amaranth, Orange I, Remazol Brilliant Blue R (RBBR), Cu-Fitalosiyenin, Poly R-478, Malaşit Yeşili ve Kristal Viyole boyar maddelerinin giderimi Eichlerova ve arkadaşları (2006) tarafından agar plaklarında araştırılmıştır. Beyaz çürükçül izolat, aynı yoğunlukta olmamasına karşın test edilen tüm boyar maddelerde renk giderim kapasitesi göstermiştir. Bazı boyar maddeler 2 g/l gibi yoğun bir derişimde kullanılmasına karşın degradasyon kapasitesinde bir kısıtlama olmadığı belirtilmiştir. Katı ortamdaki boyar maddelerin varlığı fungusun misel büyümesini azaltırken, büyüme oranı ile renk giderimi arasında pozitif ilişki olduğu gözlemlenmiştir. Orange G ve RBBR boyar maddelerinin renk giderimleri ayrıca sıvı kültürde de çalışılmış, her iki boyalı ortamda da ligninolitik enzim üretimi ve hidrojen peroksit üretiminin arttığı ancak biyomas üretiminde azalma meydana geldiği saptanmıştır. RBBR boyar maddesi Orange G' ye göre daha yüksek oranda giderilmiştir.

Perumal ve arkadaşları (2007) tarafından yürütülen bir çalışmada *Trametes hirsuta* ve *Pleurotus florida* funguslarının Blue CA, Black B133 ve Corazol Violet SR boyar maddelerinin giderim verimleri araştırılmıştır. Maksimum renk giderimi 200 mg/l Blue 133 boyar maddesinde *P. florida* için inkübasyonun 4. gününde, *T. hirsuta* için inkübasyonun 6. gününde olarak belirlenmiştir. İzolatların boyar madde giderim yeteneklerinin artırılması için % 1 ve 2' lik glikoz konsantrasyonlara denenmiştir. Lakkaz kaynaklı renk gideriminin belirlenmesi amacıyla *P. florida* ve *T. hirsuta* izolatları, substrat olarak pirinç kepeği bulunan ortamda katı faz yöntemi ile büyütülmüş, sırasıyla 0.175 U/ml ve 0.126 U/ml lakkaz aktivitesi belirlenmiştir. En etkili renk giderimin ise % 2 (w/v) glikoz varlığında *P. florida* suşu kullanılarak elde edildiği belirlenmiştir.

Giderim çalışmalarında kullanılan yöntemlerden biri de fungal biyokütlenin immobilizasyonudur. Mazmancı ve arkadaşları (2005) tarafından gerçekleştirilen

çalışmada *Funalia trogii* ATCC 200800 fungusu bitkisel kökenli bir materyal olan *Luffa cylindrica*’ ya tutuklanmış ve immobilize fungusun Drimaren Blue K2RL boyar maddesini giderim kapasitesi araştırılmıştır. 150 rpm çalkalamalı ortamda, 30 C° de, pH 5’ de gerçekleştirilen inkübasyon sonunda % 80 oranında giderim sağlanmıştır. Karbon ve azot kaynağı eklenmeyen *Luffa cylindrica* içeren ortamlarda fungusun renk giderimindeki etkinliği araştırılmış, bu amaçla ortamlara 5 farklı konsantrasyonda boyar madde eklenmiştir. Çalışma sonucunda kontrol grubunda ve boyar madde içeren ortamlarda lakkaz ve peroksidaz enzim aktivitesine rastlanmıştır. Ortamda şeker ve azot eklenmemiş olmasına karşın renk gideriminin gerçekleştiği saptanmıştır. Yapılan mikroskopik ve makroskopik incelemelerde boyar maddenin fungus yüzeyine adsorbe olmadığı ancak lif üzerine adsorbe olduğu (7-11 mg/L) tespit edilmiştir. Tutuklanmış fungusun maksimum renk giderim kapasitesinin bulunabilmesi için ortamlara farklı konsantrasyonlarda (25-50-100-150-200 mg/L) boyar madde eklenmiştir. Çalışma sonucunda *Luffa cylindrica*’ nın fungusların tutuklanmasında kullanılabilecek bir materyal olduğu, *F.trogii* kültürleri tarafında Drimaren Blue K2RL’nin renginin giderilebildiği, karbon ve azot kaynağı eklenmeyen ortamlarda renk gideriminin etkili şekilde gerçekleştiği bulunmuştur.

Ortamda bulunan karbon ve azot kaynakları ligninolitik enzim üretimi ve boyar madde giderimi üzerinde etkili olmaktadır. *Trametes versicolor* KCTC 16781 izolatu ile yapılan çalışmada, karbon ve azot kaynaklarının MnP, LiP ve lakkaz gibi ligninolitik enzim üretimi üzerindeki etkilerinin yanı sıra boyar madde gideriminde biyosorpsiyon ve biyodegradasyon terimleri araştırılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda glikoz lakkaz ve MnP enzimlerinin üretiminde en yüksek potansiyeli gösteren karbon kaynağı olurken, amonyum tartaratın enzim üretimi için iyi bir azot kaynağı olduğu belirlenmiştir. Lakkaz ve MnP enzimlerinin üretiminde en uygun C/N oranının 25 olduğu tespit edilmiştir. . *Trametes versicolor* KCTC 16781 izolatu optimum koşullarda, 72 saatte 33.7 U/ml lakkaz üretilirken, 96 saatte 475 U/ml MnP üretmektedir ve bu koşullarda % 90’ nın üzerinde boyar madde giderimi gözlemlenmektedir (Yuri et al., 2006).

Verma ve Maddwar (2002) tarafından yapılan çalışmalarda *Pleurotus ostreatus* ve *Phanerochaete chrysosporium* makrofungusları kullanılarak yapılan bir çalışmada farklı aık substratlar kullanılarak ligninolitik enzim üretimi izlenmiş ve elde edilen enzimlerin boyar madde giderim kapasiteleri araştırılmıştır. Her iki izolatin da maksimum lakkaz, MnP ve LiP enzimi üretimini yalancı tespah ağacı otunda gösterdiği belirlenmiştir. *P.ostreatus* ve *P.chrysosporium* izolatlarının en iyi atık tipinde birliktekültüre edilmesi sonucunda 25. günde elde edilen kültür filtratı ile 9 farklı boyar madde kullanılarak renk giderim çalışmaları gerçekleştirilmiş, ortamdaki hidrojen peroksit varlığının renk giderimini arttırdığı belirlenmiştir.

Bir diğer çalışmada *Schizophyllum sp.* F17 makrofungusunun katı faz kültür yöntemi ile çam odunu üzerinde büyütölmesi sırasında izole edilen MnP enzimi, Sephadex G-75 je filtrasyon kramotografisi ve DEAE- selölöz anyon değışim kramotografisi yöntemleri ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzim optimum çalışma sıcaklığı ve pH' sı sırasıyla 35 C° ve 6.8 olarak belirlenirken, enzimin 25 C°' de 1 saatlik inkübasyon periyotlarında pH 4.0-7.0 arasında stabilite gösterdiği belirlenmiştir. Saflaştırılan enzimin Congo Red, Orange G ve Orange IV azo boyar maddelerini giderim yeteneğı araştırılmıştır. En yüksek degradasyon 1 saatin sonunda % 30 oranla Orange IV boyar maddesinde gözlemlenmiştir (Xiaobin et al., 2007).

Sarnthima ve Khammuang (2008), tarafından gerçekleştirilen *in vitro* çalışmada *Pleurotus sajor-caju* tarafından üretilen ligninolitik enzimin karakterizasyonu ve boyar madde giderim kapasitesi çalışılmıştır. Ekstraselölüler kültür sıvısına uygulanan doğal poliakrilamid jel elektroforezi ile kültür sıvısında lakkaz enziminin iki izoenzimi bulunduğı belirlenmiştir. Elde edilen ham enzimin ABTS substratı varlığında optimum 40 °C ve 6.0 pH' da çalışırken, 30 C° ve pH 5.0 noktasında en yüksek stabilite gösterdiği belirlenmiştir. Ham kültür sıvısının direk İndigo carmin ve Metil Red boylarıyla muamele edilmesi sonucunda sırasıyla % 90 ve % 3.5 renk giderim oranları elde edilmiştir.

Son yıllarda beyaz çürükçöl fungusların ligninolitik enzim üretimlerinin indüklenmesi için endüstriyel atık formunda bulunan ligninoselölözik içerikli materyallerin kullanılması çalışmalara yeni bir boyut kazandırmaktadır (Guerra et al.,

2008; Couto, 2007; Irshad et al., 2011; Isikhuemhen et al., 2012). Osmar ve arkadaşları (2006) tarafından yürütülen çalışmada *Trametes pubescens* CBS 696.94 atık formundaki muz kabuğu substratında büyütülmesi ile 1570 U/l ekstraselüler lakkaz üretimi gerçekleştiriliyor. Elde edilen lakkaz enzimi ile gerçekleştirilen *in vitro* boyar madde giderim çalışmalarında oldukça iyi sonuçlar elde edildiği gözlemlenmiştir.

Boran ve Yeşilada (2011) tarafından gerçekleştirilen bir diğer çalışmada *Funalia troglia* ve *Trametes versicolor* izolatlarının, zeytinyağı fabrikası atık suyu ve alkol fabrikası atık suyu (şilempe) ile nemlendirilen buğday kepeği substratında büyütülmeleri sırasında lakkaz enzimi saptanmıştır. Maksimum lakkaz aktivitesi, *F. troglia*'de 5 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve % 25 şilempe ile nemlendirilen buğday kepeği ortamında 14.18 U/ml olarak belirlenmiştir. Fermentasyon sonucu elde edilen kültür sıvısının azo boyar madde giderim yeteneği de araştırılmıştır. 0.063 U/ml *F. troglia* lakkazı bir dakika içerisinde reaksiyon karışımında % 66 renk giderimine neden olurken, *T. versicolor* da bu oran % 14 olarak tespit edilmiştir.

Yapılan literatür araştırmalarından biyodegradasyon ve biyoremediasyon çalışmalarında ligninolitik enzimlerin ekonomik ve ekolojik gerekçelerle oldukça önemli bir yere sahip olduğu gözlemlenmektedir.

2. MATERYAL ve METODLAR

2.1. Materyal

2.1.1. Makrofungus izolatları

Çalışmada ülkemizin farklı illerinden toplanan basidiomata örneklerinden dikaryotik misel formunda izole edilen ve Eskişehir Osmangazi Üniversitesinde korunan Basidiomycetes stok kültürlerinin bir kısmı kullanılmıştır. Stok kültürlerin devamlılığı Potato Dekstroz Agar (PDA) ortamında + 4 °C’ de saklanarak sağlanmıştır. Ligninolitik enzim üretimi ve boyar madde giderim potansiyeli yüksek olan izolatları belirlemek amacıyla listesi Çizelge 2.1’ de sunulan izolatlar kullanılmıştır. Çalışmanın her aşaması öncesinde, stok kültürler PDA ortamında 27 °C’de 7 gün inkübe edilerek aktifleştirilmiştir.

Çizelge 2.1. Tarama çalışmasında kullanılan Basidiomycetes türleri

OBCC Kodu	Tür adı	OBCC Kodu	Tür adı
24	<i>Macrolepiota procera</i>	2519	Tanımlanmamış izolat
26	Saprofit izolat	2520	Tanımlanmamış izolat
36	Beyaz çürükçül izolat	3001	<i>Trametes versicolor</i>
1004	<i>Ganoderma carnosum</i>	3002	<i>Tapinella panuoides</i>
1009	<i>Pleurotus eryngii</i>	3004	<i>Cycstoderma sp.</i>
1015	<i>Pleurotus ostreatus</i>	3006	Tanımlanmamış izolat
1021	<i>Pleurotus ostreatus</i>	3007	<i>Lentinus tigrinus</i>
1022	<i>Pleurotus ostreatus</i>	3501	<i>Polyporus arcularius</i>
1023	<i>Schizophyllum commune</i>	5002	<i>Trametes versicolor</i>
1024	<i>Schizophyllum commune</i>	5008	<i>Ganoderma lucidum</i>
1025	<i>Schizophyllum commune</i>	5017	Beyaz çürükçül izolat
1028	<i>Coprinus comatus</i>	5019	<i>Macrolepiota procera</i>
1033	Saprofit izolat	5024	<i>Hygrocybe pratensis</i>

Çizelge 2.1. Tarama çalışmasında kullanılan Basidiomycetes türleri (Devamı)

OBCC Kodu	Tür adı	OBCC Kodu	Tür adı
1038	Saprofit izolat	5027	<i>Schizophyllum commune</i>
1045	<i>Inonotus hispidus</i>	5040	<i>Tricholoma caligatum</i>
1047	Tanımlanmamış izolat	5041	<i>Trametes velutina</i>
1050	Tanımlanmamış izolat	5042	Tanımlanmamış izolat
1054	Tanımlanmamış izolat	5043	Tanımlanmamış izolat
1058	Tanımlanmamış izolat	5044	Tanımlanmamış izolat
2001	<i>Lenzites betulina</i>	ATCC 200801	<i>Trametes versicolor</i> (kontrol)
2502	<i>Stereum hirsutum</i>		

2.1.2. Besiyerleri

Çalışma süresince kullanılan tüm besiyerleri, aksi belirtilmedikçe besiyeri içeriğinin distile suda çözülüp otoklavda 1.1 atm basınç ve 121 °C sıcaklıkta 15 dakika süre işlem görmesi ile steril edilerek kullanılmıştır.

Besiyeri 1: Patates Dekstroz Agar (PDA)

Ticari hazır besiyerinden (Merck) 39 g/l oranında tartılarak hazırlanmıştır. Makrofungus izolatlarının geliştirilmesinde kullanılmıştır.

Besiyeri 2: Modifiye Kirk Ortamı (MKM)

Glikoz	1.0	g
Üre	0.036	g
KH ₂ PO ₄	2.0	g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5	g
CaCl ₂	0.099	g

Agar	15.0	g
Distile su	1000	ml

İzolatların ligninolitik enzim ve boyar madde giderim kapasitelerinin belirlenmesi aşamasında kullanılmıştır (Kalmış ve ark., 2007).

Besiyeri 3: Ligninolitik Enzim Tarama Ortamları

İzolatların ligninolitik enzim üretim kapasitelerini belirlemek için kullanılan substratlar Çizelge 2.2’ de sunulmuştur. Tüm substratlar 0.22 mikron por çapında filtrelerden geçirilerek steril edildikten sonra, otoklav sonrası son derişimleri sağlanacak şekilde aseptik koşullarda Besiyeri 2 ortamına ilave edilmiş ve 9 cm çapındaki petri kaplarına aktarılmıştır (Kalmış ve ark., 2007).

Çizelge 2.2. Ligninolitik enzim aktivitesini belirlemek için kullanılan substratlar ve derişimleri

Substrat	Marka	Konsantrasyon (%)
ABTS	Sigma	0.04
Gallik Asit	Merck	0.5
Guaicol	Sigma	0.01

Besiyeri 4: Boyar Madde Giderimi Tarama Ortamları

İzolatların boyar madde giderim kapasitelerini belirlemek amacıyla 6 farklı boya kullanılmıştır (Çizelge 2.3). Boyar maddelerin sterilizasyonu 0.22 mikron por çapında filtreler kullanılarak sağlandıktan sonra Besiyeri 2 ortamına son derişimleri sağlanacak şekilde aseptik koşullarda eklenmesi ile elde edilen besiyeri 9 cm çapındaki petri kaplarına aktarılmıştır.

Çizelge 2.3. Boyar madde giderim kapasitesinin belirlenmesi için kullanılan boyar maddeler ve derişimleri

Boyar Maddeler	Markası	Konsantrasyon
Remazol Brilliant Blue R (RBBR)	Sigma	% 0.04
Remazol Black (Reaktif Black 5)	Ticari	% 0.02
Cibacron Blue 3R (Reaktif Blue 49)	Ticari	% 0.02
Amarant	Sigma	% 0.02
Kristal Viyole	Merck	% 0.02
Malaşit Yeşili	Himedia	% 0.02

Besiyeri 5: Patates Malt Pepton Ortamı (PMP)

Malt Ekstrakt	10.0	g
Pepton	1.0	g
Patates Dekstroz Broth	24.0	g

İnokulant hazırlanmasında kültür geliştirme ortamı olarak kullanılmıştır.

Besiyeri 6: Ligninolitik Enzim İndüksiyon Ortamı I

Karbon kaynağı	10.0	g
KH ₂ PO ₄	1.0	g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5	g
NH ₄ NO ₃	0.5	g
Yeast Extract	1.0	g
İz element çözeltisi*	10.0	ml
Distile su	990.0	ml
pH	6.0	

*İz element çözeltisi

CaCl ₂ .2H ₂ O	0.6	g
CuSO ₄ . 7H ₂ O	0.05	g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.05	g
MnSO ₄ . H ₂ O	0.05	g
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0.01	g
Distile su	100.0	ml

İz element çözeltisi içeriği distile suda çözülüp filtre ile steril edildikten sonra, steril besiyeri bileşimine aseptik koşullarda ilave edilmiştir. Besiyeri bileşimine karbon kaynağı olarak portakal kabuğu, çay atığı, buğday kepeği veya glukoz ilave edilerek derin ve statik kültür tiplerinde enzim üretim ortamı olarak kullanılmıştır (Mikiashvili et al., 2006).

Besiyeri 7: Ligninolitik Enzim İndüksiyon Ortamı II

Atık materyaller (portakal kabuğu, çay atığı, buğday kepeği) erlenlere aktararak, Besiyeri 6 (karbon kaynağı dışında) ile 1:3 oranında nemlendirilmiştir. Sterilizasyon işlemi otoklavda 121 °C’de 45 dk. süreyle gerçekleştirilmiştir. Katı faz kültür sisteminde enzim üretim ortamı olarak kullanılmıştır (Mikiashvili et al., 2006).

Besiyeri 8: Patates Dekstroz Broth (PDB)

Ticari hazır besiyerinden (Acumedia) 24 g/l oranında tartılarak hazırlanmıştır. Makrofungus izolatlarının sıvı besi ortamında misel yumakları (pellet) formunda geliştirilmesinde kullanılmıştır.

2.1.3.Çözeltiler ve diğer kimyasal maddeler

Çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve kullanım alanları Çizelge 2.4' te belirtilmiştir.

Çözelti 1: 83.17 mM KOH Çözeltisi

0.47 gr KOH (Merck), yeterli miktarda distile suda çözüldükten sonra 100 ml'ye tamamlanması ile hazırlanmıştır. Portakal kabuğunun nötralizasyonunda kullanılmıştır.

Çözelti 2: Bradford Reaktifi

25 mg Commassie Brilliant Blue G-250 (Applied Chemistry) boyasına, 12.5 ml etanol (%95) ve 25 ml H_3PO_4 (% 85) eklendikten sonra distile su ile 250 ml'ye tamamlanması ile hazırlanmıştır. Kullanmadan önce Whatman No: 1 filtre kağıdından geçirilip, ışık almayan ortamda oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Protein miktar tayininde belirteç olarak kullanılmıştır.

Çözelti 3: Yapay Deniz Suyu

Yeterli miktarda distile suda 35 g NaCl (Merck) çözüldükten sonra çözelti hacmi 1000 ml' ye tamamlanmıştır. Degradasyon ürünlerinin toksisitelerinin belirlenmesi aşamasında kullanılmıştır.

Çizelge 2.4. Çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve kullanım alanları

Kimyasal maddeler	Kullanım Amacı
RBBR Remazol Black Cibacron Blue 3R Amaranth Kristal Viyole Malaşit Yeşili	Boyar madde giderim çalışmaları ve yapay atık su oluşturma
% 1 Agaroze jel	İzolatın moleküler yöntemlerle tanılanması
DMP ABTS Veratril alkol Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) MnSO ₄ Sodyum Tartarat Sodyum Asetat	Ligninolitik enzim aktivitesi tayini
% 5' lik Fenol	FSA yöntemi ile toplam karbonhidrat tayini
1-Hidroksibenzo triazole (HBT)	Mediatör
Sodyum Azid (NaN ₃) n-Propil Gallat (n-PG)	İnhibitör
Katalaz enzimi	Ortamdaki H ₂ O ₂ yıkımı
0.25 M Fosfat tamponu	pH tamponu
Amonyum Sülfat	Proteinlerin çöktürülmesi
% 0,05 EDTA % 2 NaHCO ₃	Diyaliz tüplerinin hazırlanması
Sodyum alginat 0.2 M CaCl ₂	Enzim immobilizasyonu

2.2. Metodlar

2.2.1. Makrofungus İzolatlarının Ligninolitik Enzim Üretim ve Boyar Madde Renk Giderim Kapasitelerinin Belirlenmesi

Daha yüksek ligninolitik enzim üretim ve boyar madde renk giderim kapasitesine sahip makrofungus izolatlarının belirlenmesi amacıyla, enzim substratı ve boyar madde içeren besi ortamlarında bir ön tarama işlemi gerçekleştirilmiştir.

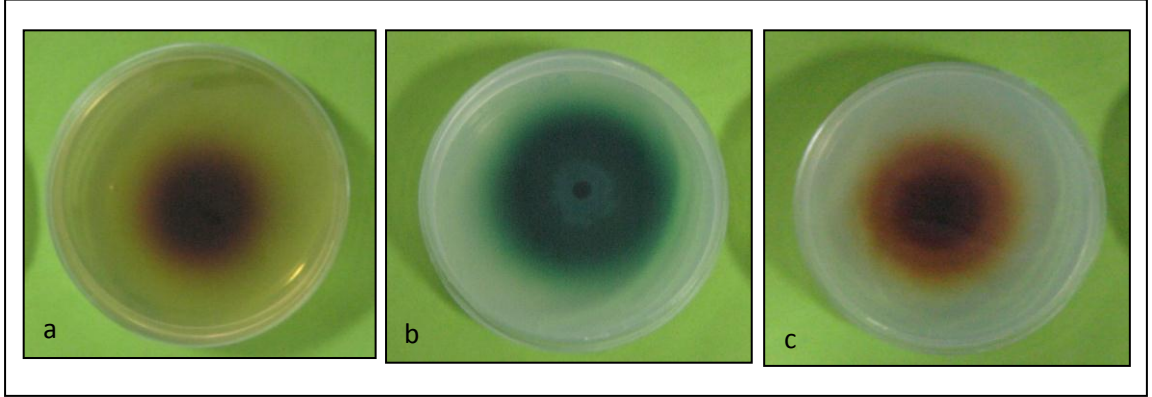
Bu amaçla öncelikle makrofungus izolatları PDA ortamında 30 °C’de 7 gün inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. Fungal koloninin aktif büyüyen dış sınırlarından elde edilen 6 mm çapındaki misel diskleri, ligninolitik enzim ve boyar madde giderimi tarama ortamlarına inoküle edilmiştir. İnokülasyon yapılan petriler 30 °C’de 20 gün boyunca inkübasyona bırakılarak inceleme parametreleri açısından inkübasyonun ilk 9 gününde günlük olarak ve sonraki inkübasyon periyodunda 11, 13, 15, 17 ve 20. günlerde değerlendirilmiştir (Diwaniyan et al., 2009, Kalmış ve ark., 2007, Anastasi et al., 2010)

İnkübasyon süresince fungus koloni çapı ve substratlar için spesifik renk reaksiyonları dijital kumpas yardımıyla ölçülerek elde edilen sonuçlar;

- a: Spesifik renk değişiminin ilk görüldüğü gün (Eichlerova et al., 2006),
- b: Spesifik renk değişiminin petrinin tamamını kapladığı gün (Eichlerova et al., 2006),
- c: Spesifik renk değişiminin zon çapı (mm) (Eichlerova et al., 2006),
- d: Spesifik renk değişiminin zon çapının tüm petrinin çapına (90 mm) oranı (%) (Eichlerova et al., 2006),
- e: Spesifik renk değişiminin zon çapının fungus koloni çapına oranı (Dhouib et al., 2005)

olmak üzere 6 farklı parametreye göre değerlendirilmiştir.

Ligninolitik enzim tarama ortamlarında, substratlara özgü renk reaksiyonu (gallik asit için kahverengi, ABTS için yeşil ve guaicol için kahverengi-kırmızı) görülen zon oluşumu pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir (Şekil 2.1).



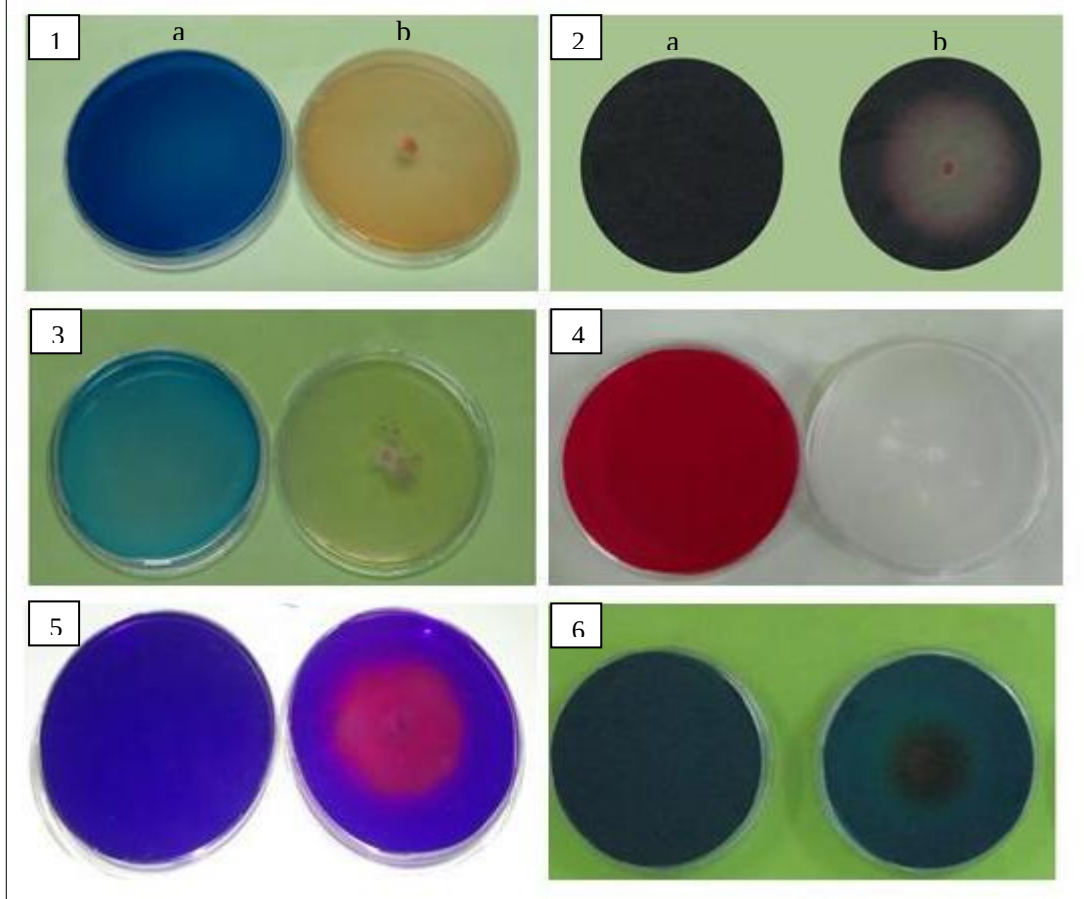
Şekil 2.1. Pozitif sonuç olarak değerlendirilen substrata özgü renk reaksiyonları; a: Gallik Asit, b: ABTS, c: Guaicol.

İzolatların boyar madde giderim kapasitelerinin belirlenmesi amacıyla, fungus kolonisi altı ve/veya etrafındaki renk açılımı (dekolorizasyon) pozitif sonuç olarak izlenmiştir (Şekil 2.2). Renk açılımı ve fungus koloni çapının dijital kumpas yardımıyla ölçülmesi ile elde edilen veriler;

- a: fungusun boya içeren petrideki koloni çapı (mm) (Kalmış ve ark., 2007)
- b: fungusun boya içeren petride büyüme hızı (mm/gün) (Bilay ve ark., 2000),
- c: Renk gideriminin başladığı gün (Eichlerova et al., 2006),
- d: Renk gideriminin tamamen bittiği (rengin tamamen açıldığı) gün (Eichlerova et al., 2006),
- e: Renk gideriminin zon çapı, kontrole (boyasız ortamdaki gelişmeye) göre gelişim (%) (Eichlerova et al., 2007),
- f: Renk gideriminin zon çapının tüm petri çapına (90 mm) oranı (%) (Eichlerova et al., 2006)
- g: Renk gideriminin zon çapının fungus koloni çapına oranı (Dhouib, 2005),
- h: kontrole (boyasız ortam) göre gelişim (%) (Eichlerova et al., 2006),

$$\% \text{ Gelişim} : \frac{\text{Boya içeren ortamdaki koloni çapı}}{\text{Boya içermeyen ortamdaki koloni çapı}} \times 100$$

olmak üzere 7 farklı parametreye göre değerlendirilmiştir.



Şekil 2.2. RBBR (1), Remazol Black (2), Cibacron Blue 3R (3), Amaranth (4), Kristal Viyole(5) ve Malaşit Yeşili (6) boyar maddeler üzerinde meydana gelen renk giderim örnekleri; a: abiyotik kontrol grubu, b: deney grubu

Makrofungus izolatların aktivitelerini değerlendirebilmek amacı ile ligninolitik enzim üretimi açısından Türkiye’ den izole edilmiş standart bir suş olan *Trametes versicolor* ATCC 200801 suşu da diğer izolatlarla aynı koşullarda çalışılmış ve aktivitesi aynı parametrelere göre hesaplanmıştır. Enzim üretimi ve boyaların renk giderimi taraması süresince substrat/boyar madde içermeyen ortamda büyütme (biyotik kontrol) ve inoküle edilmeyen substrat/boyar madde içeren petriler (abiyotik kontrol)

olmak üzere iki kontrol grubu daha çalışmaya dahil edilmiştir. Deneylerin tümü 3 paralel halinde gerçekleştirilmiş olup veriler paralellerin ortalamaları alınarak değerlendirilmiştir.

2.2.2. Farklı Kültür Teknikleri ve Substratların Ligninolitik Enzim Üretimine Etkisi

Çalışmanın bu aşamasında, farklı kültür sistemleri ve indükleyicilerin seçilen makrofungus izolatlarının ligninolitik enzim üretimlerine etkisi araştırılmıştır. Seçilen izolatların 3 farklı kültür (derin, statik ve katı faz) sisteminde ve çeşitli tarımsal atıklar (portakal kabuğu, çay atığı, buğday kepeği) ile ticari bir indükleyici olduğu bilinen 2,5-ksilidin (Sigma) varlığında büyümeleri sırasında ligninolitik enzim üretimi zamana bağlı olarak izlenmiştir.

2.2.2.1. Atıklar ve İndükleyicinin Hazırlanması

Kültür tiplerinde kullanılacak portakal kabuğu, çay atığı ve buğday kepeği gibi atıklar, kaynağından atık formunda alınarak laboratuvar ortamına getirilmiştir. Organik asit içeriği bakımından zengin bir atık olduğu bilinen portakal kabuğu atığı, 1:3 oranında Çözelti 1 ile bir saat muamele edilerek ön nötralizasyon işlemine tabii tutulmuştur. Distile ile su ile yıkanan substratlar, 30 °C’de kurutularak kullanıma hazır hale getirilmiştir (Rosales et al., 2007).

Derin ve statik kültür sistemlerinde, atık tiplerinin indükleyici etkisinin karşılaştırılması amacıyla karbon kaynağı olarak yalnızca glikoz içeren ortam negatif kontrol olarak kullanılırken, ticari bir indükleyici olarak çok fazla kullanılan 2,5-ksilidin pozitif kontrol olarak çalışmaya dahil edilmiştir. Etanolde (%50) çözölen 2,5-ksilidin 0.22 mikronluk filtreden geçirilerek steril edilmiş ve karbon kaynağı olarak glikoz içeren Besiyeri 5 ortamına, inkübasyonun 3. gününde, son konsantrasyonu 1 mM olacak biçimde ilave edilmiştir.

2.2.2.2. Makrofungus İzolatlarının Kültür Ortamlarına İnokülasyonu

Bu amaçla PDA ortamında aktiveleştirilen makrofungus izolatlarının misellerinden elde edilen 6 mm çapında disklerden 5 adet alınarak 100 ml PMP ortamına aktarılması yolu ile inokülasyon sağlanmıştır. İnokülasyonu gerçekleştirilen izolatlar çalkalamalı etüvde (Edmund Buhler) 100 rpm' de 30 °C' de 4 gün büyütüldükten sonra, fazla besiyeri dökülüp, fungus pelletleri 2 kez steril distile su ile yıkanarak ön geliştirme besiyeri kalıntılarından arındırılmıştır. Daha sonra dökülen besiyeri miktarı kadar steril distile su fungus pelletleri üzerine ilave edilerek, homojenizatör (Heidolph) yardımıyla parçalanarak homojen bir inokülant elde edilmiştir. Elde edilen homojenizattan her bir kültür tipi için kullanılan erlenlere % 4 oranında inokülasyon yapılmıştır (Kızılcık ve ark., 2010).

2.2.2.3. Farklı Kültür Tiplerinde Büyüme Sırasında Ligninolitik Enzim Üretimi

2.2.2.3.1. Derin Kültür Yöntemi

Homojenize edilen makrofungus izolatları, indükleyici olarak portakal kabuğu, çay atığı, buğday kepeği ve 2,5-ksilidin içeren ligninolitik enzim indüksiyon ortamı 1 (Besiyeri 6) ' e inoküle edilerek çalkalamalı etüvde 30 °C' de, 100 rpm' de ve 20 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresince 0, 4, 8, 11, 13, 15, 17 ve 20. günlerde erlenlerdeki kültür ortamı Whatman No: 1 filtre kağıdından süzülerek hasat edilmiş, elde edilen filtrat 5000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilmiştir. Elde edilen ham kültür sıvısında ligninolitik enzim üretimi ve büyüme parametreleri araştırılmıştır.

2.2.2.3.2. Statik Kültür Yöntemi

Bu yöntemde, derin kültür yöntemi ile aynı besiyeri ortamları ve inkübasyon koşulları kullanılmış olup, inkübasyon çalkamalı koşullar yerine durgun şekilde gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sırasında erlenlerin yüzeyinde film oluşumunu engellemek ve oksijen geçişinin sağlanması için erlenler günde bir kez hafifçe

çalkalanmıştır. Erlenlerden ekstraksiyon işlemi ve inceleme parametreleri derin kültür yönteminde belirtilen biçimde gerçekleştirilmiştir.

2.2.2.3.3. Katı Faz Kültür Yöntemi

Katı faz kültür sisteminin ligninolitik enzim üretimine etkisinin araştırılması amacıyla, homojenize edilen makrofungus izolatları başlangıç nem oranı nemlendirme sıvısı ile % 70 ' e ayarlanan enzim indüksiyon ortamı 2 (Besiyeri 7)' ye inoküle edilerek, statik koşullarda 30 °C' de 20 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresince uygun zaman aralıklarında (0, 4, 8, 11, 13, 15, 17 ve 20. günler) ekstraksiyon işlemi yapılarak elde edilen kültür sıvısında ligninolitik enzim aktivitesi ve büyüme parametreleri incelenmiştir. Ekstraksiyon işlemi için, 50 ml soğuk distile su erlenlere aktarıldıktan sonra misel ve substrat karışımı parçalanarak, 4 °C' de 1 saat çalkalandıktan sonra Whatman No:1 filtre kağıdından süzölmüş ve 5000 rpm' de 10 dk. santrifüj edilmiştir (Tychanowicz et al., 2003).

2.2.2.4. Analitik Yöntemler

2.2.2.4.1. Ligninolitik Enzim Ölçümü

Makrofungus izolatlarının ligninolitik enzim üretim kapasitesi; lakkaz, mangan peroksidaz (MnP) ve lignin peroksidaz (LiP) enzimlerinin uygun reaksiyon ortamı ve substratların varlığında spektrofotometrik olarak (Shimadzu UV-2450) yapılan ölçümler sonucunda elde edilen absorbans değerlerinin U/L cinsinden hesaplanması ile belirlenmiştir.

Lakkaz enzim aktivitesi; substrat olarak ABTS (0.1 mM) bulunan sodyum asetat (80 mM, pH: 4.5) tamponunda 420 nm dalga boyundaki absorbans değişiminin ölçülmesi ile belirlenmiştir.

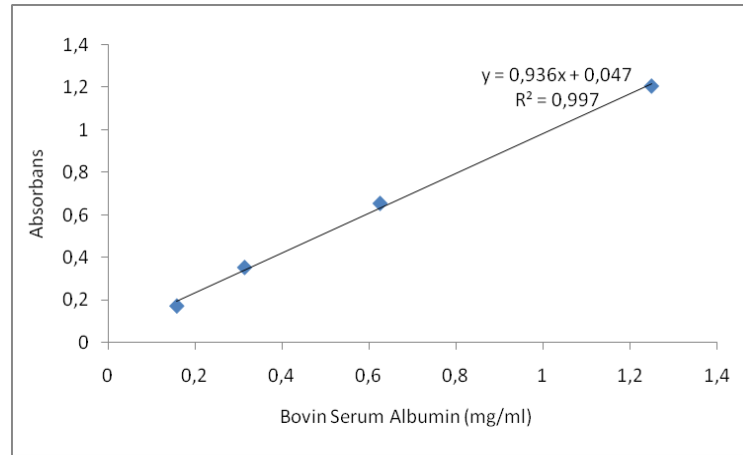
Mangan peroksidaz (MnP) enzim aktivitesinin belirlenmesi amacıyla, 2,6 dimethoxyphenol (DMP) (1 mM) substratının bulunduğu sodyum tartarat (0.15 M, pH:

4.5) tamponuna $MnSO_4$ (1 mM) ve H_2O_2 (0.4 mM) eklendikten sonra 469 nm’de DMP oksidasyonu ölçülmüştür.

Lignin peroksidaz (LiP) enzim aktivitesi ise sodyum tartarat (76.6 mM, pH: 2.5) tamponunda H_2O_2 (0.4 mM) varlığında veratril alkol (20 mM) aracılığı ile 310 nm’de yapılan ölçümler ile gerçekleştirilmiştir. (Öztürk Ürek ve Kaşıkara Pazarlioğlu, 2004; Couto, 2007).

2.2.2.4.2. Protein Miktar Tayini

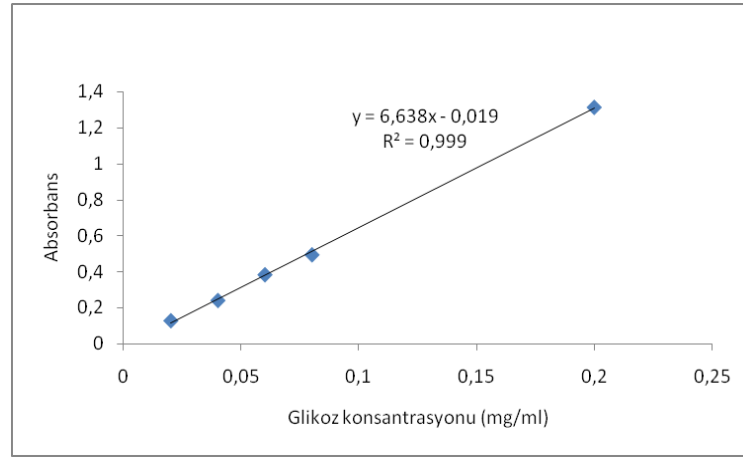
Ortamdaki protein miktarı Bradford yöntemi kullanılarak izlenmiştir. Protein miktarları örnek üzerine Bradford reaktifi (Çözelti 2) ilave edilerek 595 nm’ de okunan absorbans değerlerinin, aynı yöntem ile Bovine Serum Albumin (BSA) kullanılarak hazırlanan standart eğri grafikleri üzerinden hesaplanması ile belirlenmiş ve mg/ml cinsinden ifade edilmiştir (Şekil 2.3) (Temizkan ve ark., 2008).



Şekil 2.3. Protein miktar tayininde kullanılan standart eğri grafiği

2.2.2.4.3. Toplam Karbonhidrat Tayini

Ekstrakte edilen kültür sıvısındaki toplam karbonhidrat miktarını belirlemek için FSA (Fenol Sülfirik Asit) yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla, ham kültür sıvısı, Çözelti 3 ve derişik H_2SO_4 ile muamele edildikten sonra örneklerin 490 nm dalga boyundaki absorbansları ölçülerek, glikoz kullanılarak hazırlanan standart eğri grafikleri üzerinde mg/ml cinsinden hesaplanmıştır (Şekil 2.4) (Dubois et al., 1956).



Şekil 2.4. Toplam karbonhidrat miktar tayininde kullanılan standart eğri grafiği

2.2.2.4.4. pH Tayini

Çalışma sırasında ligninolitik enzim üretim ortam pH' sında meydana gelen değişimler ekstraksiyon günlerinde pH metre ile ölçülerek izlenmiştir.

2.2.3. Makrofungus İzolatlarının Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması

Çalışmanın moleküler yöntemlerle tanımlama kısmındaki tüm deney aşamaları ve elde edilen bulguların değerlendirilmesi aşağıdaki yöntemler kullanılarak Arş. Gör.

Bükay Yenice Gürsu' nun yardımı ile Biyolog Ayşe Betül Karaduman tarafından gerçekleştirilmiştir.

Makrofungus izolatları öncelikle PDB ortamında 30 °C' de 100 rpm'de 7 günlük inkübasyon sonunda elde edilen pelletler besiyerinden ayrılarak distile su ile yıkandıktan sonra liyofilize edilmiştir (Christ Alpha). Liyofilize örneklerden CTAB (Murray and Thompson,1980) yöntemi ile DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Elde edilen DNA pelletleri -20 °C' de saklanmıştır. Dizi analizi yapılacak olan bölge ITS 1 – ITS 4 evrensel primerleri kullanılarak amplifiye edilmiştir (Martin and Rygiewicz, 2005). Reaksiyon ürünleri elektroforezde % 1' lik agaroz jel kullanılarak 90 V' ta 40 dk yürütme ile kontrol edilmiştir. PCR ürünleri jel ekstraksiyon kiti kullanılarak elde edilmiş ve saflaştırma sonrası ürün varlığı agaroz (Biomax) jel elektroforezi ile tekrar kontrol edilmiştir. Elde edilen PCR reaksiyon ürününün tek yönlü DNA dizi analizi hizmet alımı biçiminde gerçekleştirilmiş olup, her izolat için analiz sonucunda elde edilen dizi verileri için BLAST analizi yapılmış, veritabanında kayıtlı olan izolatlar ile benzerlik seviyeleri belirlenmiştir. Her izolata ilişkin veriler Mega 5 software aracılığı ile UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic averages) metodu kullanılarak filogenetik ağaç haline dönüştürülmüştür.

2.2.4. Enzimlerin Girişim / Maskeleye Oranlarının Belirlenmesi

Çalışma kapsamında substrat oksidasyonuna bağlı olarak ölçülen aktivitelerin ifade edilen enzimlere özgü olup olmadığına, diğer bir deyiş ile enzimlerin girişim yapıp yapmadığına ilişkin onaylama testlerine ihtiyaç duyulmuştur. Bu amaçla MnP enziminin ABTS substratına, lakkaz enziminin ise DMP substratına girişim yapıp yapmadığı kurgulanan iki farklı testle araştırılmıştır.

2.2.4.1. Mangan Peroksidaz – ABTS Girişim Testi

Lakkaz enzimi ölçümü sırasında kullanılan ABTS substratının oksidasyonuna MnP enziminin katkısı olup olmadığını belirlemek amacıyla bu test uygulanmıştır.

MnP, mangan ve hidrojen peroksit varlığında çalışan bir enzimdir. Bu bakış açısı ile ham kültür sıvısındaki enzim aktivite tayini sırasında H_2O_2 ilave edilmediği gibi besiyerinde olması olası hidrojen peroksiti (H_2O_2) parçalamak için, öncelikle kültür sıvısı 1000 U/ml katalaz enzimi (Fluka, 153272 U/L) ile 1 saat boyunca muamele edilmiştir. Katalaz ile muamele edilen ve edilmeyen kültür sıvısı, substrat olarak ABTS (0.1mM) bulunan sodyum asetat (80 mM, pH: 4.5) tamponu ortamına eklenerek, 469 nm’ de verdiği absorbans artışı spektrofotometrik olarak ölçülmüştür

2.2.4.2. Lakkaz – DMP Girişim Testi

DMP oksidasyonunun tamamından sorumlu enzimin MnP enzimi olup olmadığını belirlemek amacıyla bu test uygulanmıştır. Bu amaçla ham kültür sıvısının, hidrojen peroksit ve mangan sülfat eklendiği ve eklenmediği durumlardaki DMP oksidasyonu belirlenmiştir. Aktiviteler hesaplanarak, DMP oksidasyon derecelerine göre girişim gözlenip gözlemlenmediği belirlenmiştir.

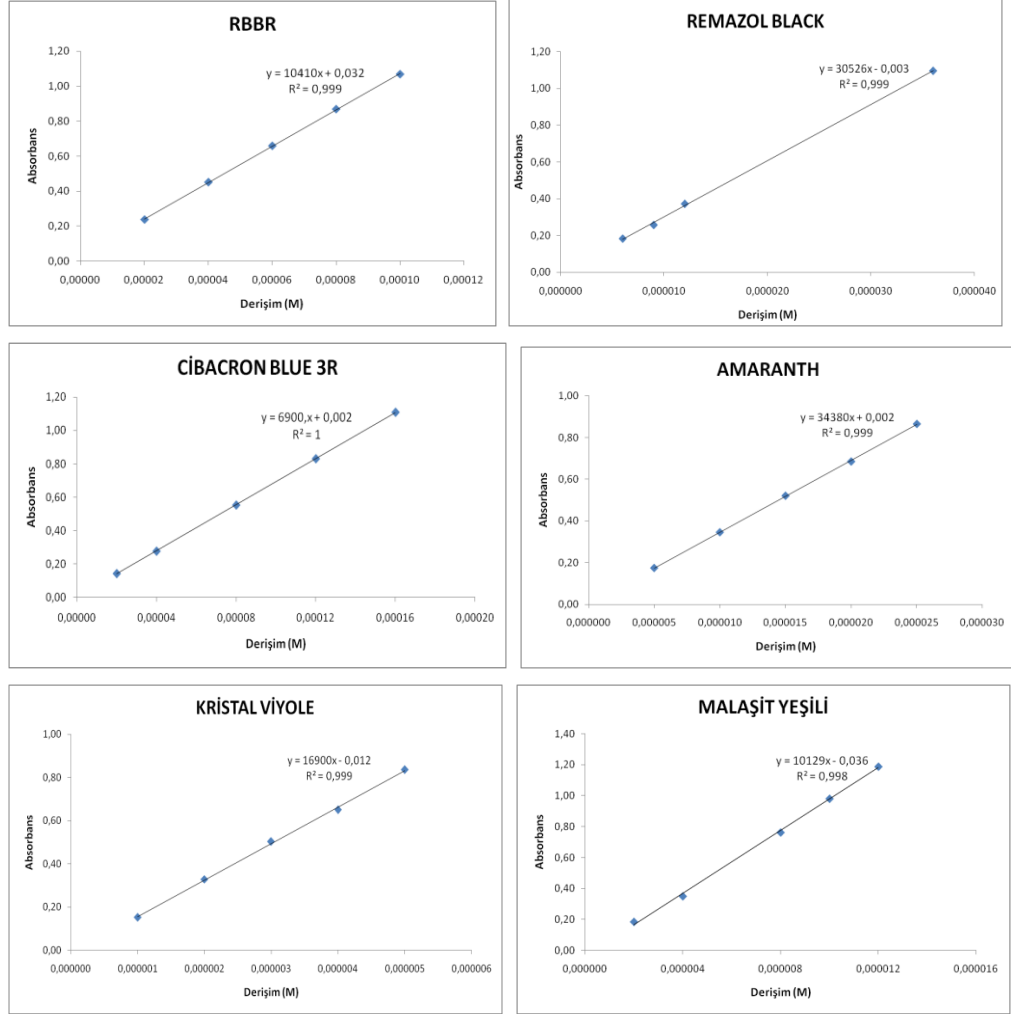
2.2.5. *Polyporus arcularius* İzolatının Boyar Madde Renk Giderim Kapasitesini Belirlenmesi

Makrofungus izolatının boyar madde renk giderim kapasitesinin belirlenmesi amacıyla öncelikle izolattan enzim ekstraksiyonu yapılmıştır. Daha önceki çalışmalarda enzim üretiminin maksimum olduğu belirlenen katı faz kültür yöntemiyle çay atığında izolatın büyümesi sırasında, inkübasyonun 11. gününde, Bölüm 2.2.2.5’ te belirtilen yöntemlerle enzim ekstraksiyonu yapılarak elde edilen kültür sıvısı (ham enzim) boyar madde renk giderim çalışmalarının materyalini oluşturmuştur.

2.2.5.1. Boyar Maddelerin Dalga Boylarının Belirlenmesi

Enzim(ler)in boyar madde renk giderim özellikleri 6 farklı boya ile araştırılmıştır. Bu amaçla ligninolitik enzim üretim kapasitesinin varlığının taranması aşamasında da kullanılan RBBR, remazol black, cibacron blue 3R, amarant, kristal

viyole ve malaşit yeşili boyaları kullanılmıştır. Çalışmalar öncesinde her bir boya için 310 – 750 nm dalga boyları arasında spektrum taraması yapılarak, maksimum absorbands verdikleri dalga boyu belirlendikten sonra, 0.2 – 1.2 absorbands verdikleri aralıklardaki derişimleri belirlenerek, standart eğri grafikleri hazırlanmıştır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Çalışmada kullanılan boyar maddelerin standart eğri grafikleri

Ham enzimin dekolorizasyon yeteneğinin belirlenmesi çalışmaları sırasında boyar maddelerin başlangıç konsantrasyonu olarak 1.3 absorbandsa karşılık gelen derişimleri kullanılmıştır (Osma et al., 2006). Çalışma süresince kullanılacak olan bu derişimler ve her bir boyar maddenin ölçüldüğü dalga boyları Çizelge 2.5'te sunulmuştur.

Çizelge 2.5. Boyar madde renk giderimi çalışmalarında kullanılan dalga boyları ve derişimler

BOYALAR	Maksimum absorbands veren dalga boyu (nm)	1.3 absorbands veren boya derişimleri (mM)
RBBR	593	0,120
Remazol Black	596	0,043
Cibacron Blue 3R	626	0,190
Amarant	520	0,038
Kristal Viyole	590	0,008
Malaşit Yeşili	617	0,013

2.2.5.2. Enzimin Boyar Madde Renk Giderim Kapasitesinin Belirlenmesi

Boyar madde renk giderim çalışmaları çalışmaları, ham enzim çözeltisinin boyar madde çözeltisi ile 1:1 oranında karıştırılması ile elde edilen karışımda gerçekleştirilmiştir. Enzim çözeltisi ile inkübe edilen boyar maddelerin verdiği absorbands değeri boyar maddelere özel dalga boyunda belirli zaman aralıklarında (0 - 240 dk.) spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Elde edilen absorbands değerleri aşağıdaki formül aracılığı ile hesaplanarak, boyar maddelerin zamana bağlı olarak % boya renk giderim değerleri belirlenmiştir.

$$\text{Dekolorizasyon (\%)} : \frac{\text{İlk Absorbans} - \text{Son Absorbans}}{\text{İlk Absorbans}} \times 100$$

Spektrofotometrede kör olarak 1:1 oranında distile su ile karıştırılan ham enzim çözeltisi kullanılırken, negatif kontrol olarak ise kaynatılmış ham enzim - boya çözeltisi (1:1) karışımı kullanılmıştır.

2.2.5.3. Boyar Madde Renk Giderim Kapasitesinin Mediatör Aracılığıyla Arttırılması

Ham enzim çözeltisinin boyar madde renk giderim yeteneğinin arttırılması amacıyla, ligninolitik enzimlerin çalışmasında mediatör görevi gördüğü bilinen ve etkilerinin arttırılmasında kullanılan 1-Hidroxy-1H-benzotriazol (HBT) (Sigma) ayrı bir deney grubu olarak çalışmaya dahil edilmiştir (Call and Mücke, 1996; Khlifi et al., 2009; Michizoe et al., 2003). Mediatör, boyar madde çözeltisine reaksiyondan hemen önce son derişimi 1 mM olacak şekilde 1:1 oranında karıştırılan ham enzim – boyar madde çözeltisine son derişimi 1 mM olacak şekilde ilave edildikten sonra, 1:1 oranda ham enzim çözeltisi eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. Boyar madde renk giderimi, madiatörsüz ortamda olduğu gibi aynı yöntemler ve formül kullanılarak hesaplanmış ve ifade edilmiştir.

2.2.5.4. Boyar Madde Renk Gideriminden Sorumlu Enzim(ler)in Belirlenmesi

Polyporus arcularius izolatıyla daha önce yapılan çalışmalarda izolatin, çay atığı üzerinde katı faz kültür yöntemi ile üretilmesi sırasında inkübasyonun 11. gününde MnP ve lakkaz enzimlerini ürettiği belirlenmiştir. Üretimi gözlenen bu iki enzimden MnP enziminin aktivitesinin daha fazla olduğu bilinmekle birlikte boyar madde gideriminde her iki enzim de görev alabilmektedir. Ham kültür sıvısında bulunan iki enzimden hangisinin boyar madde renk gideriminde rol aldığını belirlemek amacıyla enzimlerin inhibitörleri olduğu bilinen sodyum azid (NaN_3) (Merck) ve n-propil galat (n-PG) (Sigma) enzimlerin spesifik inhibisyon çalışmasında kullanılmıştır. Elde edilen veriler değerlendirilerek, boyar madde giderim çalışması tekrarlanmıştır.

Enzimlerin inhibisyonunu sağlamak için sodyum azid için 10, 25, 50, 75, 100 μ M konsantrasyonları kullanılırken, n-PG inhibitörü için 500, 600, 750, 1000, 5000 μ M konsantrasyonları kullanılmıştır. Sodyum azid çözeltileri distile su ile hazırlanırken, n-PG çözeltileri etanol ile hazırlanmıştır. Ham enzim çözeltisine (2 ml), her bir inhibitör konsantrasyonu son derişimleri sağlanacak şekilde 500 μ l ilave edikten sonra karışım 4 saat boyunca 30 °C’ de inkübe edilmiştir. Her bir konsantrasyondaki inhibitörlerden 0, 2 ve 4. saatlerde örnekleme yapılarak, daha önce belirtilen yöntemlerle lakkaz ve MnP enzim aktiviteleri spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. İnhibisyon oranları, aynı koşullarda hiç muamele edilmeyen ham enzim aktivitesiyle kıyaslanarak aşağıdaki formül kullanılarak % inhibisyon olarak hesaplanmıştır. Çalışma kapsamında n-PG için negatif kontrol olarak çözücü olarak kullanılan etanolün de inhibitör etkisi araştırılmıştır.

$\text{İnhibisyon (\%)} : \frac{\text{Ham enzim aktivitesi} - \text{İnhibe edilen enzim aktivitesi}}{\text{Ham enzim aktivitesi}} \times 100$

Enzimlerin spesifik olarak inhibe olduğu inhibitör, inhibitör konsantrasyonu ve zaman belirlendikten sonra boyar madde renk gideriminden sorumlu enzimi belirleme aşamasına geçilmiştir. Spesifik inhibe etkisi belirlenmiş inhibitör ve inhibitör konsantrasyonu ile muamele edilen enzim çözeltisinin boyar madde giderimi araştırılmıştır. Bu amaçla, ham enzim sodyum azid ve n-PG ile belirlenen son derişim sağlanacak şekilde 4 saat inkübe edildikten sonra, inkübasyon sonrasında her bir boyar madde çözeltisi ile 1:1 oranında muamele edildikten sonra her bir boya için uygun dalga boyunda 0 ve 4. saatlerde spektrofotometrede absorbans ölçümü yapılmıştır. Ölçülen absorbans değerleri kullanılarak daha önce belirtilen formül yardımıyla % dekolizasyon hesaplanmıştır. Çalışmada kontrol grupları olarak, sadece sodyum azid, n-PG ve etanol ile muamele edilen boyar maddeler de kullanılmıştır.

2.2.6. Mangan Peroksidaz Enziminin Aktivitesi Üzerine Kinetik Çalışmalar

Ham enzim çözeltisinde bulunan ligninolitik enzimlerden mangan peroksidaz enziminin boyar madde dekolorizasyonunda görev alan enzim olduğu belirlendikten sonra, bu enzimin çalışmasında etkili faktörlerin belirlenmesi için kinetik çalışmalar yapılmıştır. Substrat olarak DMP varlığında, öncelikle enzimin çalıştığı optimum pH ve sıcaklık noktaları ve bu noktalardaki stabiliteleri belirlendikten sonra K_m ve V_{max} değerleri hesaplanmıştır.

2.2.6.1. Enzimin Optimum pH' sının Belirlenmesi

Enzimin optimum çalıştığı pH noktasını belirlemek amacıyla, 2 ile 8 arasında 15 farklı pH noktasında enzim aktivitesi değerlendirilmiştir. Bu amaçla pH 2 – 5.5 arasında 0.25 M sodyum tartarat tamponu ve pH 6 – 8 arasında 0.25 M fosfat tamponu kullanılmıştır (Ürek ve Pazarlıoğlu, 2003). DMP substratının, farklı pH'lara sahip tamponlarda $MnSO_4$ ve H_2O_2 varlığında oksidasyonuna bağlı olarak aktivite 469 nm'de belirlenmiş ve reaksiyon hız sabiti (k) aşağıda belirtilen formülü kullanılarak hesaplanmıştır.

$$k = \frac{A - A_0}{t - t_0}$$

2.2.6.2. Enzimin pH Stabilesinin Belirlenmesi

Optimum çalışma pH' sı belirlenen ham enzimin, bu pH noktasında ne kadar süre sabit kaldığının belirlenmesi amacıyla; enzim belirlenen pH tamponunda 30 °C' de 72 saat inkübe edilmiştir. İlk 12 saat birer saat arayla, 12. saatin sonunda 24 saatte bir olmak üzere örnekleme yapılarak enzim aktivitesi ölçülmüştür. Enzimin 0. anındaki aktivitesi referans alınarak enzim aktivitesi % üzerinden ifade edilmiştir.

2.2.6.3. Enzimin Optimum Sıcaklığının Belirlenmesi

Enzim aktivitesinin maksimum olduğu sıcaklık noktasının belirlenmesi amacıyla, pH çalışmasında belirlenen optimum koşullarda, 25 – 60 °C arasında 8 farklı sıcaklık noktasında spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır. Enzim aktivitesi değerleri, her bir sıcaklığa özel reaksiyon hız sabiti (k) grafikleri formül ile hesaplanarak çizilmiştir.

2.2.6.4. Enzimin Sıcaklık Stabilitésinin Belirlenmesi

Optimum çalışma sıcaklığı belirlenen boyar madde gideriminden sorumlu olduğu düşünölen MnP enziminin, bu sıcaklık noktasında ne kadar süre stabil kaldığının belirlenmesi amacıyla; ham enzim sıvısı belirlenen sıcaklıkta 72 saat inkübe edilmiştir. İlk 12 saat her saat başı, 12. saatin sonunda 24 saatte bir olmak üzere örnekleme yapılarak bir önceki aşamada belirtilen yöntemlerle enzim aktivitesi değerlendirilmiş, enzim aktivitesi % olarak ifade edilmiştir.

2.2.6.5. Enzimin K_m ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi

Mangan peroksidaz enziminin K_m ve V_{max} değerlerinin hesaplanması amacıyla, DMP substratının 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 ve 5.0 μM derişimleri kullanılarak substrat oksidasyon hızları ölçölmüştür. Substrat derişimleri (S) ve bu derişimlere ait ilk hız değerleri (V) kullanılarak, ve $1/S$ 'e karşı $1/V$ grafigi çizilerek Lineweaver-Burk diyagramı elde edilmistir. Elde edilen diyagram üzerinden Michealis-Menten eşitliği

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}}$$

kullanılarak K_m ve V_{max} değerleri hesaplanmıştır.

2.2.7. Ham Enzimin Amonyum Sülfat Çöktürmesi ile Konsantre Edilmesi

Makrofungus izolatından ekstrakte edilen kültür sıvısına amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemleri uygulanarak, kültür sıvısında bulunan enzimlerin konsantre hale getirilmesi amaçlanmıştır.

2.2.7.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Ligninolitik enzimlerin bulunduğu ham kültür sıvısına iki basamaklı amonyum sülfat çöktürmesi işlemi uygulanmıştır. Ham kültür sıvısı bir beher içerisine alınarak 4 °C' ye soğutulmuş, % 30' luk doyumluk derecesi için gerekli amonyum sülfat (Merck) miktarı toz haline getirilerek soğutulmuş ham kültür sıvısına ilave edilmiş, soğutmalı inkübatörde (Innova 44) 4 °C' de 1 gece boyunca karıştırıldıktan sonra çözelti 3000 xg' de 30 dk. süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant ve çökelti ayrılarak, çökelti 3 ml distile suda çözündürülmüştür. İkinci basamakta % 30'luk çöktürme uygulanan süpernatant için % 70 doyumluk derecesi hesaplanarak, ilk işlemler tekrarlanmıştır. Tekrar santrifüj işleminden sonra, elde edilen çökelti 3 ml distile suda çözündürülmüştür (Temizkan ve ark., 2008; Utkan ve ark., 2011).

2.2.7.2. Diyaliz

Amonyum sülfat çöktürmesi yapıldıktan sonra, süpernatant ve çökelti diyaliz işleminden geçirilmiştir. Bu amaçla 12400 MWCO (Molecular Weight Cut Off) por çapında diyaliz tüpleri (Sigma) kullanılmıştır. Diyaliz tüplerinden uygun parçalar kesilerek, % 2 NaHCO₃ ve % 0,05 EDTA içeren tampon içerisinde 10 dk. kaynatıldıktan sonra oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Bu işlemin ardından birkaç kez distile su ile kaynatılan membranlar kullanım öncesinde distile su ile yıkandıktan sonra süpernatant ve çökelti, ayrı ayrı diyaliz tüplerine aktarılmış ve yaklaşık hacimlerinin 10 katı kadar distile suya karşı 4 °C' de diyaliz işlemine bırakılmıştır. 4 – 5 saat süreyle diyaliz işlemi gerçekleştirildikten sonra sıvılar tüplerden geri alınarak, süpernatant ve çökelti protein ve enzim aktivite tayinleri Bölüm 2.2.2.6' da belirtilen yöntemler

kullanılarak yapılmıştır (Temizkan ve ark., 2008; Utkan ve ark., 2011). Elde edilen bulgular kullanılarak aşağıda belirtilen formüller yardımıyla spesifik aktivite (mg protein başına düşen enzim aktivitesi) ve saflaştırma faktörü hesaplanmıştır (Erkurt, 2006).

$$\text{Spesifik Aktivite (U/mg)} : \frac{\text{Toplam Enzim Aktivitesi (U/ml)}}{\text{Toplam Protein Miktarı (mg/ml)}}$$

$$\text{Saflaştırma Faktörü} : \frac{\text{Fraksiyonun Spesifik Aktivitesi}}{\text{Orjinal Örneğin Spesifik Aktivitesi}}$$

2.2.8. Sodyum Alginat ile İmmobilize Edilen Konsantre Enzimin Boyar Madde Renk Giderim Kapasitesinin Belirlenmesi

Konsantre hale getirilerek aktivite değerleri arttırılan enzimler, kullanım kolaylığı sağlanması ve ardışık kullanılabilir bir preperat haline getirilmesi amacıyla sodyum alginat ile immobilize edilmiştir. Sodyum alginata tutuklanan enzimlerin, boyar maddelerin bir araya getirilmesiyle oluşturulan yapay atık boyar madde çözeltisini giderim kapasitesi araştırılmıştır.

2.2.8.1. Yapay Atık Boyar Madde Çözeltisinin Hazırlanması

Konsantre enzimin tekstil atık sularının gideriminde kullanım potansiyelini araştırmak amacıyla, tekstil atık su örneği oluşturacak bir yapay atık çözeltisi oluşturulmuştur. Yapay atık boyar madde çözeltisi hazırlanması amacıyla RBBR, remazol black, cibacron blue 3R, amarant, kristal viyole ve malaşit yeşili olmak üzere 6 farklı boyar maddenin Çizelge 2.4' te belirtilen 1.3 absorbansa karşılık gelen derişimleri kullanılmıştır. Her bir boyar madde çizelgede yer alan son derişimleri sağlanacak

şekilde tartılarak distile suda çözdükten sonra, tüm çözeltiler karıştırılarak yapay boyar madde çözeltisi hazırlanmıştır. Oluşturulan yapay boyar madde çözeltisine spektrum taraması yapılarak maksimum absorbans verdiği 585 nm dalga boyu çalışmanın diğer aşamalarında dekolorizasyonu belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Dekolorizasyon çalışmalarında yapay atık çözeltisinin başlangıç konsantrasyonu 585 nm dalga boyunda 1.3 absorbans verecek şekilde ayarlanmıştır. (Osma et al., 2006).

2.2.8.2. Konsantre Enzimin Sodyum Alginata İmmobilizasyonu

Konsantre enzim çözeltisinin sodyum alginata immobilizasyonunu sağlamak amacıyla, tartılan sodyum alginat (% 2.5) manyetik karıştırıcı ile karıştırılan enzim çözeltisi içerisine eklenerek tamamen çözülmüştür. Sodyum alginat – enzim karışımı (10 ml) peristaltik pompa (Ismatech) yardımıyla 2 mm çapındaki hortumlar kullanılarak, 50 ml CaCl_2 (0.2 M) çözeltisi içerisine 1.4 ml/dk hızda damlatılarak, konsantre enzim tutuklanmış alginat boncukları elde edilmiştir (Şekil 2.6) Elde edilen boncuklar 2 kez distile su ile yıkanarak CaCl_2 çözeltisi artıklarından arındırılmıştır (Phetsom ve ark., 2009). İmmobilizasyon sırasındaki enzim kaçış oranının belirlenmesi amacıyla immobilizasyon öncesi konsantre enzim çözeltisinde ve immobilizasyon sonrası CaCl_2 çözeltisinde lakkaz ve MnP enzim aktiviteleri ölçülmüştür.



Şekil 2.6. Konsantre enzim çözeltisinin alginat ile tutuklanması ile elde edilen boncuklar

2.2.8.3. İmmobilize Edilen Enzimlerin Boyar Madde Renk Giderim Kapasitesinin Belirlenmesi

İmmobilize enzim boncuklarının, yapay boyar madde çözeltisinde renk giderim kapasitesinin belirlenmesi amacıyla, yapay boyar madde çözeltisine boya gideriminde sorumlu MnP enziminin aktivitesinde rol oynayan MnSO_4 (20 mM) ve H_2O_2 (4 mM) ile mediatör olarak HBT (1 mM) son derişimleri sağlanacak şekilde ilave edilmiştir. Bu şekilde hazırlanmış yapay atık çözeltisi (50 ml) içeren erlenlere, konsantre enzim (10 ml) çözeltisinden hazırlanmış alginat boncukları eklenerek 30 °C sıcaklıkta 100 rpm’de inkübe edilmiştir. Erlenlerden 0, 2, 4 ve 24. saatlerde örnekleme yapılarak 585 nm’ de absorbans ölçümleri gerçekleştirilmiştir. İmmobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirliğinin belirlenmesi amacıyla 24. saatin sonunda yapay boyar madde çözeltisinin tamamı ortamdaki alınarak, ortama taze yapay boyar madde çözeltisi ilave edilmiş ve aynı saatlerde absorbans değerleri ölçülmüştür. Bu işlem 4 kez tekrarlanmıştır. Elde edilen absorbans verileri Bölüm 2.5.2.2’ de belirtilen formül aracılığı ile değerlendirilerek % dekolorizasyon değerleri hesaplanmıştır.

2.2.9. İmmersiyon Tip Reaktörde Boyar Madde Renk Giderimi

Yapay atık boyar madde dekolorizasyon yetenekleri başarılı bulunan immobilize enzim çözeltisinin giderim kapasitesi, ölçek büyütme uygulanarak reaktör boyutunda araştırılmıştır. Bu amaçla immersiyon tip biyoreaktörde (Şekil 2.7) steril olmayan koşullarda çalışılmıştır. Oluşturulan yapay atık çözeltisi (3.5 L) reaktör içerisine aktarıldıktan sonra, immobilize konsantre boncuklar (0.5 L) 100 cm³ hacminde 1.5 mm çapında delikler barındıran 2 adet kafese yerleştirilmiş ve reaktör sıcaklığı 30 °C’ ye ayarlanmıştır. Zamanlayıcı pnömatik sisteme bağlı bir piston yardımıyla, immobilize enzim boncuklarının bulunduğu kafesler 0.25 batış/sn hızla yapay boyar madde çözeltisine daldırılmıştır. Reaktörün örnek portundan 24 saat boyunca belirli aralıklarla örnek alınarak, 585 nm’ de absorbans ölçümleri gerçekleştirilerek % dekolorizasyon (Bkz. bölüm 2.2.5.2) hesaplanmıştır. İmmobilize enzimlerin reaktör sisteminde tekrar kullanılabilirliğinin araştırılması amacıyla, 24. saatin sonunda reaktör içerisindeki yapay atık tamamen boşaltılarak tekrar yapay atık boyar madde çözeltisi

(3.5 L) sisteme eklenerek, aynı koşullarda degradasyon işlemine devam edilmiştir. 24 saat boyunca belirli aralıklarla örnekleme yapılarak % dekolorizasyon değerleri hesaplanmıştır.



Şekil 2.7. İmmersiyon tip reaktör

2.2.10. Renk Gideriminin Toksikite Üzerine Etkisi

İmmersiyon tip biyoreaktör sisteminde çeşitli oranlarda renk giderimi sağlanan örneklerin toksisiteleri *Artemia salina* larvaları kullanılarak araştırılmıştır.

Artemia salina larvalarının elde edilmesi amacıyla, gelişimin sağlanacağı tank ışık almayan koşullarda 2/3 oranında yapay deniz suyu (Çözelti 3) ile doldurulduktan sonra hava motoru ve hava taşı aracılığıyla havalandırılmıştır. Ticari olarak temin edilen *Artemia salina* yumurtaları 4 g kist oranında tank içerisine aktarıldıktan sonra, su yüzeyinin yaklaşık 20 cm üst kısmına 75 W' lık ampuller yerleştirilerek hem ısı hem

yumurtadan çıkan larvaların hareketi sağlanmıştır. Oda sıcaklığında 24 saat boyunca larvaların olgunlaşması beklenmiş ve olgun hale getirilen larvalar toksisite testlerinde kullanılmak üzere ortamdan toplanmıştır (Dvorak et al., 1999).

Degradasyon ürünlerinin toksisitelerini belirlemek amacıyla, petri kuyucuklarına her bir örnekten 0.3 ml aktarılmış ve Çözelti 3 ile son hacimleri 2.5 ml'ye tamamlanmıştır. Abiyotik kontrol olarak sadece yapay deniz suyu, pozitif kontrol olarak ise işlem görmemiş boya çözeltisi çalışmaya dahil edilmiştir. Her kuyucuğa geliştirilen *A. salina* larvalarından 10 adet atıldıktan sonra 0, 6, 12, 18, 24 ve 30. saatlerde ölü bireyler sayılmıştır. Her deneme grubu 3 paralel halinde çalışılmış ve sonuçlar paralellerin ortalamaları alınarak kullanılmıştır. Elde edilen veriler kullanılarak zamana bağlı olarak bireylerin ölüm yüzdeleri hesaplanmıştır (De Souza et al., 2007).

3. BULGULAR

3.1. Makrofungus İzolatlarının Ligninolitik Enzim Üretim ve Boyar Madde Renk Giderim Kapasitelerinin Belirlenmesi

Çalışma kapsamında toplam 40 adet Basidiomycetes izolatı ligninolitik enzim üretim ve boyar madde renk giderim kapasiteleri açısından taranmıştır. Tarama ortamlarına inoküle edilen makrofungus izolatlarının verdiği pozitif reaksiyonlar, belirtilen zaman aralıklarında inkübasyon boyunca incelenmiş ve gerekli hesaplamalar yapılmıştır. Fakat daha etkin aktiviteye sahip izolatların seçilebilmesi için, inkübasyonun erken evresindeki veriler öncelikli olarak dikkate alınmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen veriler her bir substrat ve boya için ayrı çizelgeler halinde sunulmuştur (Çizelge 3.1- 3.9).

Çizelge 3.1. İzolatların neden olduğu ABTS substratının oksidasyonuna bağlı spesifik renk değişim parametreleri

İZOLATLAR (OBCC Kodu)	İnceleme Parametreleri ⁽¹⁾					İZOLATLAR (OBCC Kodu)	İnceleme Parametreleri				
	a	b	c	d	e		a	b	c	d	e
24	1	17	46.5	51.7	5.7	2519	-	-	0.0	0.0	0.0
26	1	17	51.4	57.1	4.2	2520	1	17	44.2	49.1	1.7
36	1	11	43.7	48.5	1.7	3001	1	9	69.6	77.4	1.2
1004	1	11	66.0	73.3	1.4	3002	-	-	0.0	0.0	0.0
1009	-(²)	-(³)	0.0	0.0	0.0	3004	1	20	30.3	33.7	3.6
1015	1	15	45.6	50.6	5.5	3006	1	13	55.9	62.1	2.4
1021	1	-	56.8	63.2	4.4	3007	1	8	73.4	81.6	1.1
1022	1	15	55.1	61.2	9.2	3501	1	11	68.0	75.6	3.8
1023	1	-	26.4	29.3	0.6	5002	1	9	67.8	75.4	1.4
1024	1	-	13.5	15.0	0.2	5008	1	9	64.4	71.5	0.8
1025	1	-	16.8	18.7	0.2	5017	2	13	47.7	53.0	1.3
1028	-	-	0.0	0.0	0.0	5019	1	-	39.0	43.4	4.8
1033	5	-	7.0	7.8	0.1	5024	1	-	5.7	6.3	0.3
1038	1	-	10.9	12.1	0.4	5027	-	-	0.0	0.0	0.0
1045	1	-	40.7	45.2	1.4	5040	5	13	28.4	31.6	2.2
1047	-	-	0.0	0.0	0.0	5041	1	9	60.8	67.5	1.3
1050	1	13	61.1	67.9	1.6	5042	1	-	37.4	41.5	2.1
1054	1	17	37.0	41.1	0.7	5043	1	-	22.1	24.5	0.7
1058	1	15	59.7	66.4	7.6	5044	1	17	33.6	37.3	0.8
2001	1	13	55.6	61.8	1.4	ATCC 200801	1	9	76.08	84.53	3.0
2502	1	17	43.9	48.8	2.1						

1. a: spesifik renk değişiminin ilk görüldüğü gün; b: spesifik renk değişiminin petrinin tamamını kapladığı gün; c: spesifik renk değişiminin zon çapı (mm) (7. gün); d: spesifik renk değişiminin zon çapının tüm petrinin çapına (90 mm) oranı (%) (7. gün); e: spesifik renk değişiminin zon çapının fungus koloni çapına oranı (7. gün)

2. inkübasyon süresi sonuna kadar spesifik renk değişiminin hiç başlamaması durumu,

3: spesifik renk değişimi zon çapının inkübasyon süresi sonunda petrinin tamamını kaplamaması durumu.

Çizelge 3.2. İzolatların neden olduğu Guaicol substratının oksidasyonuna bağlı spesifik renk değişim parametreleri

İZOLATLAR (OBCC Kodu)	İnceleme Parametreleri ⁽¹⁾					İZOLATLAR (OBCC Kodu)	İnceleme Parametreleri				
	a	b	c	d	e		a	b	c	d	e
24	1	-	30.5	33.8	5.1	2519	-	-	0.0	0.0	0.0
26	1	-	42.3	46.9	2.0	2520	1	-	37.3	41.5	1.5
36	1	-	46.2	51.3	0.6	3001	1	-	62.8	69.8	1.0
1004	1	-	55.8	62.1	1.3	3002	2	-	26.3	29.3	4.4
1009	-	-	0.0	0.0	0.0	3004	1	-	32.7	36.3	1.1
1015	1	-	42.1	46.7	1.0	3006	1	-	50.3	55.9	1.2
1021	1	-	49.2	54.7	1.0	3007	1	-	53.4	59.4	1.0
1022	1	-	41.8	46.4	0.9	3501	1	-	31.3	34.8	2.5
1023	1	-	32.3	35.8	1.0	5002	1	-	62.3	69.2	1.0
1024	1	-	35.4	39.4	1.0	5008	1	-	64.8	72.0	1.4
1025	1	-	40.4	44.9	1.1	5017	9	-	0.0	0.0	0.0
1028	-	-	0.0	0.0	0.0	5019	1	-	35.1	39.0	5.9
1033	-	-	0.0	0.0	0.0	5024	1	-	37.2	41.4	4.8
1038	17	-	0.0	0.0	0.0	5027	1	-	31.8	35.3	1.0
1045	1	-	37.3	41.4	1.5	5040	-	-	0.0	0.0	0.0
1047	2	13	21.6	24.0	4.2	5041	1	-	62.2	69.1	0.9
1050	1	-	48.0	53.4	1.1	5042	1	-	19.5	21.7	3.2
1054	1	-	6.2	6.8	1.0	5043	1	-	6.3	7.0	0.5
1058	1	-	41.2	45.8	6.9	5044	1	-	6.5	7.2	0.5
2001	1	-	35.0	38.9	1.9	ATCC 200801	1	-	61.6	68.5	0.7
2502	4	17	28.0	31.1	1.1						

1 : Tüm inceleme parametreleri ve kısaltmalar Çizelge 3.1’ de sunulduğu gibidir.

Çizelge 3.3. İzolatların neden olduğu Gallik asit substratının oksidasyonuna bağlı spesifik renk değişim parametreleri

İZOLATLAR (OBCC Kodu)	İnceleme Parametreleri ⁽¹⁾					İZOLATLAR (OBCC Kodu)	İnceleme Parametreleri				
	a	b	c	d	e		a	b	c	d	e
24	1	-	31.2	34.7	5.2	2519	-	-	0.0	0.0	0.0
26	1	-	32.7	36.4	3.3	2520	1	15	47.9	53.2	0.9
36	1	20	30.6	34.0	5.2	3001	1	13	50.2	55.8	1.8
1004	1	-	33.4	37.1	0.4	3002	-	-	0.0	0.0	0.0
1009	-	-	0.0	0.0	0.0	3004	-	-	0.0	0.0	0.0
1015	1	-	25.0	27.8	2.8	3006	1	20	40.6	45.1	2.2
1021	1	-	31.8	35.4	2.6	3007	1	8	72.4	80.4	1.0
1022	1	-	33.6	37.3	3.4	3501	1	20	58.3	64.7	0.4
1023	1	13	40.8	45.3	0.7	5002	1	-	50.5	56.1	1.4
1024	1	17	2.3	2.6	0.0	5008	1	-	37.8	42.0	0.7
1025	1	13	46.4	51.6	0.7	5017	9	20	0.0	0.0	0.0
1028	-	-	0.0	0.0	0.0	5019	1	-	30.0	33.3	5.0
1033	-	-	0.0	0.0	0.0	5024	1	-	14.8	16.4	0.6
1038	2	-	6.8	7.5	0.8	5027	-	-	0.0	0.0	0.0
1045	1	-	31.8	35.3	1.6	5040	2	-	11.8	13.1	0.5
1047	7	11	34.4	38.2	2.3	5041	1	11	57.1	63.5	1.0
1050	1	17	46.1	51.3	1.8	5042	1	-	7.0	7.8	1.2
1054	2	-	30.4	33.7	0.7	5043	1	-	5.8	6.5	0.1
1058	1	-	29.6	32.8	4.9	5044	2	17	15.8	17.6	0.3
2001	1	20	47.1	52.3	5.5	ATCC 200801	1	-	48.5	53.9	3.3
2502	1	8	80.8	89.8	0.9						

1 : Tüm inceleme parametreleri ve kısaltmalar Çizelge 3.1' de sunulduğu gibidir.

Çizelge 3.4. İzolatların RBBR boyar maddesinde neden olduğu renk giderimine bağlı inceleme parametreleri

İZOLATLAR (OBCC Kodu)	İnceleme Parametreleri ⁽¹⁾								İZOLATLAR (OBCC Kodu)	İnceleme Parametreleri							
	a	b	c	d	e	f	g	h		a	b	c	d	e	f	g	h
24	13.7	2.0	2	-	19.1	50.0	21.2	1.4	2519	34.0	4.9	-	-	0.0	58.6	0.0	0.0
26	21.5	3.1	3	-	18.3	69.1	20.4	0.9	2520	74.6	10.7	5	11	58.3	82.9	64.8	0.8
36	69.4	9.9	1	9	69.4	87.9	77.1	1.0	3001	78.3	11.2	1	8	72.0	87.0	80.0	0.9
1004	72.3	10.3	1	8	76.2	80.3	84.7	1.1	3002	63.3	9.0	-	-	0.0	70.3	0.0	0.0
1009	74.2	10.6	-(2)	-(3)	0.0	91.1	0.0	0.0	3004	42.8	6.1	4	-	31.7	90.9	35.2	0.7
1015	57.8	8.3	2	13	36.8	64.2	40.9	0.6	3006	36.5	5.2	1	15	48.0	81.3	53.3	1.3
1021	78.1	11.2	4	9	57.3	103.0	63.7	0.7	3007	90.0	12.9	2	7	90.0	100.0	100.0	1.0
1022	82.3	11.8	2	11	53.6	91.4	59.6	0.7	3501	63.1	9.0	1	11	56.0	79.4	62.3	1.1
1023	69.4	9.9	-	-	0.0	96.9	0.0	0.0	5002	78.1	11.2	1	8	79.6	86.8	88.5	1.0
1024	78.0	11.1	-	-	0.0	116.0	0.0	0.0	5008	75.8	10.8	1	9	75.8	84.2	84.2	1.2
1025	76.9	11.0	-	-	0.0	97.9	0.0	0.0	5017	67.7	9.7	-	-	0.0	112.0	0.0	0.0
1028	56.6	8.1	-	-	0.0	88.0	0.0	0.0	5019	15.6	2.2	-	-	0.0	60.4	0.0	0.0
1033	38.9	5.6	-	-	0.0	62.1	0.0	0.0	5024	18.4	2.6	-	-	0.0	79.8	0.0	0.0
1038	31.4	4.5	-	-	0.0	118.6	0.0	0.0	5027	79.9	11.4	-	-	0.0	103.3	0.0	0.0
1045	44.4	6.3	-	-	0.0	112.5	0.0	0.0	5040	55.9	8.0	-	-	0.0	73.4	0.0	0.0
1047	90.0	12.9	3	7	90.0	100.0	100.0	1.0	5041	79.6	11.4	2	8	85.0	88.4	94.5	1.1
1050	36.5	5.2	1	15	45.7	45.5	50.8	1.3	5042	17.9	2.6	-	-	0.0	91.0	0.0	0.0
1054	52.4	7.5	-	-	0.0	91.3	0.0	0.0	5043	44.4	6.3	-	-	0.0	163.6	0.0	0.0
1058	30.1	4.3	1	20	26.7	70.4	29.7	0.9	5044	41.4	5.9	-	-	0.0	98.8	0.0	0.0
2001	25.4	3.6	1	-	37.8	28.2	42.0	1.5	ATCC 200801	90.0	12.9	1	7	90.0	100.0	100.0	1.0
2502	52.9	7.6	7	15	36.6	109.8	40.6	0.7									

1 : a: fungusun boya içeren petrideki koloni çapı (mm) (7. gün); b: fungusun boya içeren petride büyüme hızı (mm/gün); c: renk gideriminin başladığı gün; d: renk gideriminin tamamen bittiği (rengin tamamen açıldığı) gün; e: renk gideriminin zon çapı (mm) (7. gün); f: kontrole (boyasız ortamdaki gelişmeye) göre gelişim (%) (7. gün) g: renk gideriminin zon çapının tüm petrinin çapına (90 mm) oranı (%) (7. gün); h: renk gideriminin zon çapının fungus koloni çapına oranı (7. gün).

2: inkübasyon süresi sonuna kadar renk gideriminin hiç başlamaması durumu,

3: renk giderimi zon çapının inkübasyon süresi sonunda petrinin tamamını kaplamaması durumu.

Çizelge 3.5. İzolatların Remazol Black boyar maddesinde neden olduğu renk giderimine bağlı inceleme parametreleri

İZOLATLAR (OBCC Kodu)	İnceleme Parametreleri ⁽¹⁾								İZOLATLAR (OBCC Kodu)	İnceleme Parametreleri							
	a	b	c	d	e	f	g	h		a	b	c	d	e	f	g	h
24	11.4	1.6	-	-	0.0	41.5	0.0	0.0	2519	37.2	5.3	-	-	0.0	64.0	0.0	0.0
26	21.2	3.0	17	-	0.0	68.3	0.0	0.0	2520	29.2	4.2	-	-	0.0	32.5	0.0	0.0
36	79.8	11.4	4	9	56.7	101.0	63.0	1.4	3001	77.4	11.1	2	-	59.7	86.0	66.3	0.8
1004	77.0	11.0	-	-	0.0	85.6	0.0	0.0	3002	90.0	12.9	-	-	0.0	100.0	0.0	0.0
1009	78.1	11.2	-	-	0.0	96.0	0.0	0.0	3004	34.0	4.9	-	-	0.0	72.3	0.0	0.0
1015	61.9	8.8	8	11	0.0	68.7	0.0	0.0	3006	37.6	5.4	-	-	0.0	83.7	0.0	0.0
1021	67.7	9.7	7	9	19.8	89.3	22.0	0.3	3007	81.0	11.6	-	-	0.0	90.0	0.0	0.0
1022	59.6	8.5	8	17	0.0	66.2	0.0	0.0	3501	90.0	12.9	3	7	90.0	113.4	100.0	1.0
1023	68.3	9.8	-	-	0.0	95.4	0.0	0.0	5002	76.0	10.9	2	11	42.5	84.5	47.2	0.6
1024	74.5	10.6	-	-	0.0	110.7	0.0	0.0	5008	90.0	12.9	4	9	45.1	100.0	50.1	2.0
1025	64.0	9.1	-	-	0.0	81.5	0.0	0.0	5017	68.2	9.7	-	-	0.0	112.8	0.0	0.0
1028	14.4	2.1	-	-	0.0	22.3	0.0	0.0	5019	7.2	1.0	-	-	0.0	27.9	0.0	0.0
1033	72.7	10.4	-	-	0.0	116.0	0.0	0.0	5024	8.0	1.1	-	-	0.0	34.8	0.0	0.0
1038	29.8	4.3	-	-	0.0	112.6	0.0	0.0	5027	70.1	10.0	-	-	0.0	90.7	0.0	0.0
1045	53.0	7.6	-	-	0.0	134.1	0.0	0.0	5040	66.2	9.5	-	-	0.0	73.5	0.0	0.0
1047	90.0	12.9	3	7	90.0	100.0	100.0	1.0	5041	74.1	10.6	3	-	63.5	82.4	70.6	0.9
1050	50.2	7.2	-	-	0.0	62.6	0.0	0.0	5042	66.9	9.6	-	-	0.0	340.1	0.0	0.0
1054	68.8	9.8	-	-	0.0	119.8	0.0	0.0	5043	61.4	8.8	-	-	0.0	226.4	0.0	0.0
1058	26.0	3.7	-	-	0.0	60.8	0.0	0.0	5044	61.5	8.8	-	-	0.0	146.7	0.0	0.0
2001	62.8	9.0	-	-	0.0	69.8	0.0	0.0	ATCC 200801	90.0	12.9	1	-	51.3	100.0	57.0	0.6
2502	23.9	3.4	-	-	0.0	49.6	0.0	0.0									

1 : Tüm inceleme parametreleri ve kısaltmalar Çizelge 3.4' te sunulduğu gibidir.

Çizelge 3.6. İzolatların Cibacron Blue 3R boyar maddesinde neden olduğu renk giderimine bağlı inceleme parametreleri

İZOLATLAR (OBCC Kodu)	İnceleme Parametreleri ⁽¹⁾								İZOLATLAR (OBCC Kodu)	İnceleme Parametreleri							
	a	b	c	d	e	f	g	h		a	b	c	d	e	f	g	h
24	19.5	2.8	11	-	0.0	70.9	0.0	0.0	2519	64.0	9.1	-	-	0.0	110.1	0.0	0.0
26	16.4	2.3	20	-	0.0	52.8	0.0	0.0	2520	27.6	4.3	17	-	0.0	30.6	0.0	0.0
36	50.3	7.2	1	11	50.3	63.7	55.9	1.0	3001	78.5	11.2	2	8	76.3	87.2	84.8	1.0
1004	73.0	10.4	2	8	57.6	81.1	64.0	0.8	3002	90.0	12.9	-	-	0.0	100.0	0.0	0.0
1009	75.3	10.8	-	-	0.0	92.4	0.0	0.0	3004	45.0	6.4	-	-	0.0	95.7	0.0	0.0
1015	64.6	9.2	8	13	0.0	71.7	0.0	0.0	3006	52.2	7.5	1	11	54.5	116.2	60.6	1.0
1021	70.4	10.1	7	9	27.7	92.9	30.8	0.4	3007	79.1	11.3	2	8	74.9	87.9	83.2	0.9
1022	77.8	11.1	5	11	45.3	86.4	50.3	0.6	3501	70.2	10.0	3	9	70.2	88.4	78.0	1.0
1023	70.3	10.0	-	-	0.0	98.2	0.0	0.0	5002	75.9	10.8	2	8	73.8	84.3	82.0	1.0
1024	67.2	9.6	-	-	0.0	99.8	0.0	0.0	5008	90.0	12.9	1	7	90.0	100.0	100.0	1.0
1025	50.9	7.3	-	-	0.0	64.8	0.0	0.0	5017	55.7	8.0	-	-	0.0	92.2	0.0	0.0
1028	14.7	2.1	-	-	0.0	22.9	0.0	0.0	5019	13.1	1.9	-	-	0.0	50.7	0.0	0.0
1033	75.4	10.8	-	-	0.0	120.3	0.0	0.0	5024	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0
1038	42.8	6.1	-	-	0.0	161.7	0.0	0.0	5027	70.3	10.0	-	-	0.0	90.9	0.0	0.0
1045	73.9	10.6	-	-	0.0	187.0	0.0	0.0	5040	57.6	8.2	-	-	0.0	64.0	0.0	0.0
1047	79.6	11.4	3	9	79.6	88.5	88.5	1.0	5041	77.7	11.1	3	7	90.0	86.4	100.0	1.2
1050	28.3	4.0	-	-	0.0	35.3	0.0	0.0	5042	77.0	11.0	-	-	0.0	391.1	0.0	0.0
1054	75.1	10.7	-	-	0.0	130.9	0.0	0.0	5043	69.8	10.0	-	-	0.0	257.3	0.0	0.0
1058	18.3	2.6	-	-	0.0	42.6	0.0	0.0	5044	61.5	8.8	-	-	0.0	146.8	0.0	0.0
2001	70.5	10.1	2	8	69.0	78.4	76.6	1.0	ATCC 200801	90.0	12.9	1	6	90.0	100.0	100.0	1.0
2502	14.6	2.1	-	-	0.0	30.3	0.0	0.0									

1 : Tüm inceleme parametreleri ve kısaltmalar Çizelge 3.4' te sunulduğu gibidir.

Çizelge 3.7. İzolatların Amarant boyar maddesinde neden olduğu renk giderimine bağlı inceleme parametreleri

İZOLATLAR (OBCC Kodu)	İnceleme Parametreleri ⁽¹⁾								İZOLATLAR (OBCC Kodu)	İnceleme Parametreleri							
	a	b	c	d	e	f	g	h		a	b	c	d	e	f	g	h
24	19.9	2.8	-	-	0.0	72.3	0.0	0.0	2519	60.0	8.6	-	-	0.0	103.3	0.0	0.0
26	34.9	5.0	3	17	34.6	112.4	38.4	1.0	2520	90.0	12.9	-	-	0.0	100.0	0.0	0.0
36	90.0	12.9	5	9	49.3	113.9	54.8	1.8	3001	90.0	12.9	2	15	58.5	100.0	65.0	0.6
1004	78.8	11.3	-	-	0.0	87.5	0.0	0.0	3002	90.0	12.9	-	-	0.0	100.0	0.0	0.0
1009	90.0	12.9	-	-	0.0	110.6	0.0	0.0	3004	40.4	5.8	-	-	0.0	85.9	0.0	0.0
1015	59.8	8.5	9	9	0.0	66.5	0.0	0.0	3006	53.9	7.7	-	-	0.0	120.1	0.0	0.0
1021	66.0	9.4	5	13	20.2	87.2	22.5	0.3	3007	90.0	12.9	-	-	0.0	100.0	0.0	0.0
1022	53.5	7.6	11	13	0.0	59.5	0.0	0.0	3501	90.0	12.9	3	7	90.0	113.4	100.0	1.0
1023	63.8	9.1	-	-	0.0	89.0	0.0	0.0	5002	90.0	12.9	2	6	90.0	100.0	100.0	1.0
1024	73.4	10.5	-	-	0.0	109.1	0.0	0.0	5008	90.0	12.9	4	11	44.8	100.0	49.7	2.0
1025	71.5	10.2	-	-	0.0	91.0	0.0	0.0	5017	56.3	8.0	-	-	0.0	93.2	0.0	0.0
1028	52.1	7.4	-	-	0.0	81.0	0.0	0.0	5019	20.6	2.9	-	-	0.0	79.8	0.0	0.0
1033	69.2	9.9	-	-	0.0	110.4	0.0	0.0	5024	17.7	2.5	-	-	0.0	76.8	0.0	0.0
1038	26.5	3.8	-	-	0.0	100.3	0.0	0.0	5027	72.2	10.3	-	-	0.0	93.4	0.0	0.0
1045	48.9	7.0	-	-	0.0	123.9	0.0	0.0	5040	62.2	8.9	-	-	0.0	69.1	0.0	0.0
1047	90.0	12.9	3	6	90.0	100.0	100.0	1.0	5041	90.0	12.9	3	6	90.0	100.0	100.0	1.0
1050	76.3	10.9	-	-	0.0	95.2	0.0	0.0	5042	32.9	4.7	-	-	0.0	167.0	0.0	0.0
1054	49.3	7.0	-	-	0.0	85.8	0.0	0.0	5043	38.0	5.4	-	-	0.0	140.1	0.0	0.0
1058	40.9	5.8	-	-	0.0	95.4	0.0	0.0	5044	51.4	7.3	-	-	0.0	122.7	0.0	0.0
2001	75.0	10.7	-	-	0.0	83.4	0.0	0.0	ATCC 200801	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0
2502	73.6	10.5	-	-	0.0	152.7	0.0	0.0									

1 : Tüm inceleme parametreleri ve kısaltmalar Çizelge 3.4' te sunulduğu gibidir.

Çizelge 3.8. İzolatların Kristal Viyole boyar maddesinde neden olduğu renk giderimine bağlı inceleme parametreleri

İZOLATLAR (OBCC Kodu)	İnceleme Parametreleri ⁽¹⁾								İZOLATLAR (OBCC Kodu)	İnceleme Parametreleri							
	a	b	c	d	e	f	g	h		a	b	c	d	e	f	g	h
24	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0	2519	10.2	1.5	-	-	0.0	17.5	0.0	0.0
26	22.2	3.2	-	-	0.0	71.5	0.0	0.0	2520	9.5	1.4	-	-	0.0	10.6	0.0	0.0
36	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0	3001	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0
1004	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0	3002	20.9	3.0	-	-	0.0	23.2	0.0	0.0
1009	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0	3004	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0
1015	18.9	2.7	-	-	0.0	21.0	0.0	0.0	3006	9.4	1.3	-	-	0.0	20.9	0.0	0.0
1021	12.2	1.7	-	-	0.0	16.1	0.0	0.0	3007	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0
1022	8.0	1.1	-	-	0.0	8.9	0.0	0.0	3501	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0
1023	15.9	2.3	-	-	0.0	22.2	0.0	0.0	5002	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0
1024	11.6	1.7	-	-	0.0	17.2	0.0	0.0	5008	17.3	2.5	-	-	0.0	19.2	0.0	0.0
1025	11.1	1.6	-	-	0.0	14.1	0.0	0.0	5017	27.1	3.9	-	-	0.0	44.8	0.0	0.0
1028	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0	5019	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0
1033	10.4	1.5	-	-	0.0	16.6	0.0	0.0	5024	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0
1038	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0	5027	17.1	2.4	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0
1045	8.5	1.2	-	-	0.0	21.6	0.0	0.0	5040	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0
1047	21.3	3.0	5	-	21.3	23.6	23.6	1.0	5041	8.8	1.3	-	-	0.0	9.8	0.0	0.0
1050	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0	5042	14.2	2.0	-	-	0.0	72.2	0.0	0.0
1054	9.1	1.3	-	-	0.0	15.8	0.0	0.0	5043	9.8	1.4	-	-	0.0	36.0	0.0	0.0
1058	9.3	1.3	-	-	0.0	21.7	0.0	0.0	5044	9.6	1.4	-	-	0.0	23.0	0.0	0.0
2001	8.2	1.2	-	-	0.0	9.1	0.0	0.0	ATCC 200801	24.2	3.5	2	-	28.2	26.9	31.4	1.2
2502	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0									

1 : Tüm inceleme parametreleri ve kısaltmalar Çizelge 3.4' te sunulduğu gibidir.

Çizelge 3.9. İzolatların Malaşit Yeşili boyar maddesinde neden olduğu renk giderimine bağlı inceleme parametreleri

İZOLATLAR (OBCC Kodu)	İnceleme Parametreleri ⁽¹⁾								İZOLATLAR (OBCC Kodu)	İnceleme Parametreleri							
	a	b	c	d	e	f	g	h		a	b	c	d	e	f	g	h
24	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0	2519	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0
26	15.0	2.1	15	-	0.0	48.2	0.0	0.0	2520	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0
36	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0	3001	13.3	1.9	1	-	6.0	14.8	6.7	0.5
1004	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0	3002	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0
1009	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0	3004	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0
1015	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0	3006	8.2	1.2	1	-	6.0	18.3	6.7	0.7
1021	10.0	1.4	-	-	0.0	13.2	0.0	0.0	3007	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0
1022	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0	3501	7.8	1.1	2	-	34.0	9.8	37.7	0.2
1023	10.4	1.5	-	-	0.0	14.6	0.0	0.0	5002	0.0	0.0	15	-	0.0	0.0	0.0	0.0
1024	9.1	1.3	-	-	0.0	13.5	0.0	0.0	5008	6.0	0.9	3	-	25.6	6.7	28.4	0.2
1025	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0	5017	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0
1028	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0	5019	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0
1033	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0	5024	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0
1038	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0	5027	13.0	1.9	-	-	0.0	16.8	0.0	0.0
1045	10.6	1.5	-	-	0.0	26.7	0.0	0.0	5040	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0
1047	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0	5041	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0
1050	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0	5042	10.6	1.5	-	-	0.0	53.8	0.0	0.0
1054	8.9	1.3	-	-	0.0	15.5	0.0	0.0	5043	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0
1058	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0	5044	7.7	1.1	-	-	0.0	18.4	0.0	0.0
2001	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0	ATCC 200801	15.8	2.23	1	-	40.0	18.0	44.3	3.0
2502	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0									

1 : Tüm inceleme parametreleri ve kısaltmalar Çizelge 3.4' te sunulduğu gibidir.

Tarama çalışmasında kullanılan makrofungus izolatlarının, substrat ve boyar maddelerle verdiği reaksiyonlar sonucu elde edilen veriler her izolat için bir arada değerlendirilmiştir. Bu yolla ligninolitik enzim üretim ve boyar madde renk giderim kapasitesine sahip izolatlar arasında en yüksek aktivite gösterenler bir sonraki aşamada değerlendirilmek üzere seçilmiştir. Bu seçim sırasında, spesifik renk değişimi/boyar madde renk gideriminin ilk görüldüğü gün, petrinin tamamını kapladığı gün, spesifik renk değişimi/boyar madde renk gideriminin zon çapının tüm petri çapına oranı ve fungus koloni çapına oranı gibi bazı parametreler daha iyi bir seçim yapabilmek amacı ile ön planda tutulmuştur. Yapılan değerlendirmeler sonucunda OBCC 1047 ve OBCC 3501 izolatları bir sonraki aşamada çalışılmaya değer bulunmuştur (Çizelge 3.10).

Çizelge 3.10. Tarama çalışması sonucu seçilen izolatlar ve standart suşun substrat ve boyar maddeler ile verdiği reaksiyon sonuçları

Substrat/Boyar Madde		OBCC 1047	OBCC 3501	ATCC 200801	Substrat/Boyar Madde		OBCC 1047	OBCC 3501	ATCC 200801
ABTS	a	-	1	1	Cibacron Blue 3R	a	3	3	1
	b	-	11	9		b	9	9	6
	c	0.0	75.6	84.53		c	88.5	78.0	100.00
	d	0.0	3.8	1.35		d	1.0	1.0	1.0
Gallik Asit	a	7	1	1	Amaranth	a	3	3	-
	b	11	20	-		b	6	7	-
	c	38.2	64.7	53.87		c	100.0	100.0	0.0
	d	2.3	0.4	3.34		d	1.0	1.0	0.0
Guaicol	a	2	1	1	Kristal Viyole	a	5	-	2
	b	13	-	-		b	-	-	-
	c	24.0	34.8	68.47		c	23.6	0.0	31.37
	d	4.2	2.5	0.68		d	1.0	0.0	1.17
RBRR	a	3	1	1	Malaşit Yeşili	a	-	2	1
	b	7	11	7		b	-	-	-
	c	100.0	62.3	100.0		c	0.0	37.7	44.34
	d	1.0	1.1	1.0		d	0.0	0.2	2.53
Remazol Black	a	3	3	1		a			
	b	7	7	-		b			
	c	100.0	100.0	56.94		c			
	d	1.0	1.0	0.57		d			

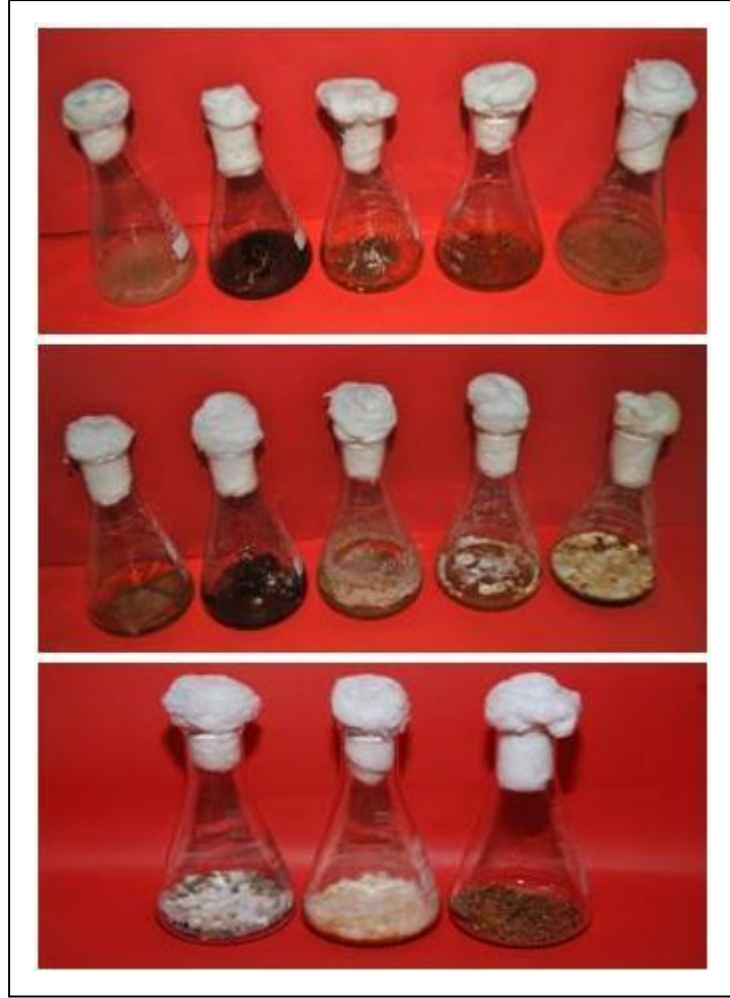
a: Spesifik renk değişimi/dekolorizasyonun ilk görüldüğü gün, b: Spesifik renk değişimi/dekolorizasyonun petrinin tamamını kapladığı gün, c: Spesifik renk değişimi/dekolorizasyonun zon çapının tüm petrinin (90 mm) çapına oranı (%)(7.gün), d: Spesifik renk değişimi/dekolorizasyonun fungus koloni çapına oranı (7.gün)

3.2.Farklı Kùltür Teknikleri ve Substratların Ligninolitik Enzim Üretimine Etkisi

Çalışmanın bu aşamasının temel amacı hangi makrofungus izolatının, hangi kùltür tipinde ve indükleyici varlığında, inkübasyonun kaçınıcı gününde ve hangi enzimi en iyi ürettiğı sorularına cevap bulabilmektir. Bu amaçla elde edilen veriler her bir izolat için ayrı ayrı değerdendirilmiştir.

3.2.1.OBCC 1047 Kodlu Makrofungus İzolatının Ligninolitik Enzim Üretimi

OBCC 1047 kodlu makrofungus izolatı ligninolitik enzim aktivitesinin zamana bağılı olarak izlenebilmesi amacıyla derin, statik ve katı faz kùltür koşullarında ve farklı tarımsal atık ya da ticari indükleyicilerin varlığında üretilmiştir. Makrofungus izolatı tüm kùltür sistemlerinde iyi bir üreme göstermesine karşın (Şekil 3.1), ligninolitik enzim ölçümlerinde lakkaz, MnP ve LiP enzimlerinin varlığına rastlanamamıştır.



Şekil 3.1. OBCC 1047 izolatının derin (a), statik (b) ve katı faz kültür (c) sistemlerinde büyümesi (11.gün)

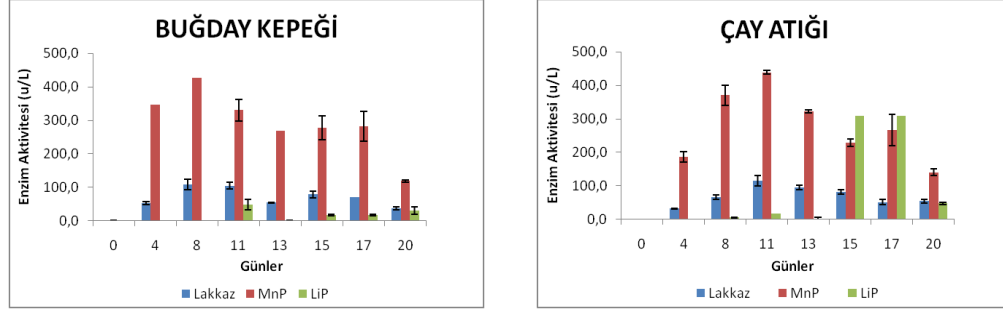
3.2.2. OBCC 3501 Kodlu Makrofungus İzolatının Ligninolitik Enzim Üretimi

OBCC 3501 kodlu izolatı da, derin, statik ve katı faz kültür yöntemleri ve farklı tarımsal atık ya da ticari indükleyicilerin varlığında büyütülerek, ligninolitik enzim üretimi izlenmiştir (Şekil 3.2).

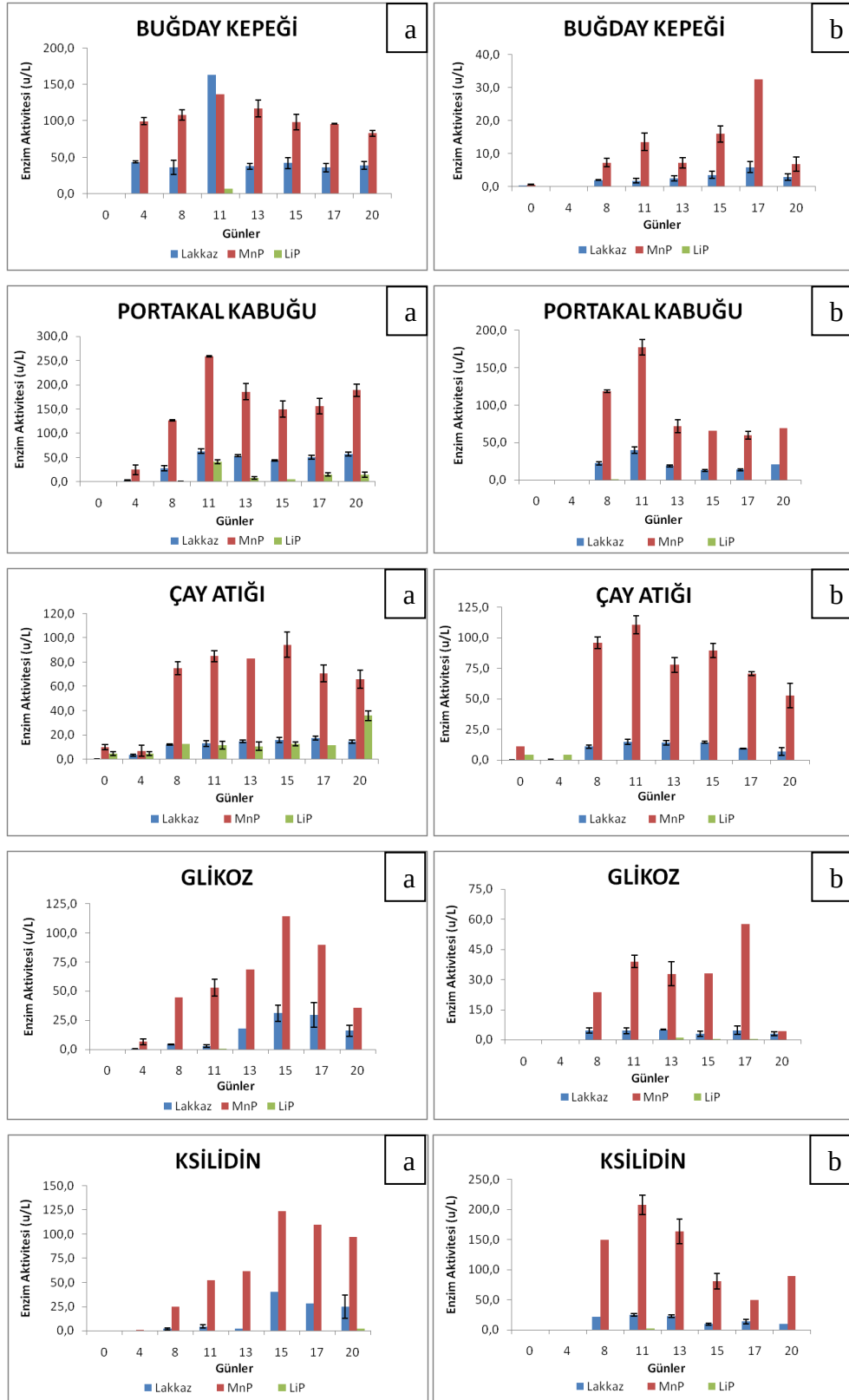


Şekil 3.2. OBCC 3501 izolatının derin (a), statik (b) ve katı faz kültür (c) sistemlerinde büyümesi (13.gün)

İnkübasyon süresince belirli günlerde ekstraksiyon yapılarak her bir kültür tipi ve indükleyici varlığında izolatın ligninolitik enzim üretimi belirlenmiştir (Şekil 3.3 ve 3.4). Katı faz kültür yönteminde, portakal atığı üzerinde herhangi bir gelişim ve enzim üretimine rastlanmadığından grafiklendirilmemiştir. Elde edilen tüm veriler Çizelge 3.11 – 3.13’ da sayısal olarak sunulmuştur. Araştırılan tüm kültür tipleri ve indükleyicilerden elde edilen enzim üretimi verilerinin bir arada değerlendirilebilmesi için, kültür tiplerine göre en iyi indükleyiciler ve enzim miktarları Şekil 3.5’ de sunulmuştur.



Şekil 3.3. OBCC 3501 izolatının katı faz kültür yönteminde ligninolitik enzim aktivitesi



Şekil 3.4. OBCC 3501 izolatının derin (a) ve statik (b) kültür yöntemlerinde ligninolitik enzim aktivitesi

Çizelge 3.11. OBCC 3501 izolatının derin kültür tipinde farklı indükleyicilerin varlığında zamana bağlı ligninolitik enzim aktivitesi (U/L)

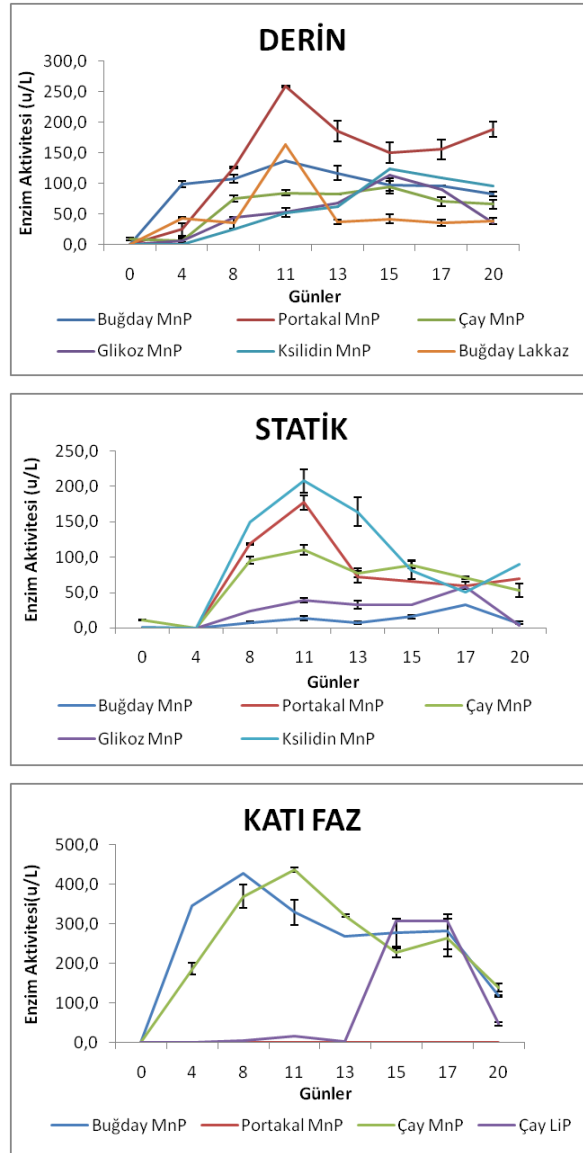
Günler	İNDÜKLEYİCİ														
	BUĞDAY KEPEĞİ			ÇAY ATIĞI			PORTAKAL KABUĞU			GLİKOZ			KSİLİDİN		
	Lakkaz	MnP	LiP	Lakkaz	MnP	LiP	Lakkaz	MnP	LiP	Lakkaz	MnP	LiP	Lakkaz	MnP	LiP
0	0.3±0.1	0.7±0.1	0.0±0.0	0.0±0.1	9.9±2.2	4.6±1.6	0.0±0.0	0.1±0.3	0.0±0.0	0.0±0.0	0.1±0.0	0.0±0.0	0.0±0.1	0.1±0.0	0.0±0.0
4	43.±1.5	99.4±4.8	0.0±0.0	3.3±0.8	6.9±4.8	4.6±1.6	2.5±1.1	24.8±9.9	0.0±0.0	0.5±0.3	6.6±2.7	0.0±0.0	0.0±0.0	0.7±0.1	0.0±0.0
8	36.4±9.6	108.0±7.0	0.0±0.0	12.0±0.7	75.3±5.3	12.5±0.0	28.2±5.2	126.7±1.5	0.6±0.8	4.3±0.3	45.0±0.0	0.0±0.0	1.9±0.8	25.2±0.0	0.0±0.0
11	163.4±0.0	136.8±0.0	7.4±2.4	12.8±2.3	85.0±4.5	11.4±3.2	63.1±4.6	259.1±1.3	41.6±4.0	2.9±1.0	53.0±7.3	0.6±0.0	4.4±1.5	52.2±0.0	0.0±0.0
13	37.4±4.1	117.0±12.0	0.0±0.0	14.8±1.2	82.9±0.0	10.6±3.5	53.2±2.1	185.9±17.0	7.2±2.6	17.6±0.0	68.4±0.0	0.0±0.0	2.1±0.1	61.6±0.0	0.0±0.0
15	42.2±7.7	98.2±10.4	0.0±0.0	15.7±2.1	94.4±10.3	12.5±1.6	43.8±1.2	150.0±16.9	5.7±0.0	31.0±6.8	114.5±0.0	0.0±0.0	40.2±0.0	123.8±0.0	0.0±0.0
17	35.7±5.5	96.1±0.7	0.0±0.0	17.2±1.6	70.7±7.0	11.4±0.0	50.3±4.2	156.3±16.3	14.8±3.2	29.5±10.5	90.0±0.0	0.0±0.0	28.4±0.0	109.5±0.0	0.0±0.0
20	38.9±5.4	83.1±4.1	0.0±0.0	14.4±1.5	66.0±7.5	35.9±4.0	57.5±3.9	189.2±12.6	14.2±5.6	15.9±4.5	35.7±0.0	0.0±0.0	24.9±11.9	96.8±0.0	2.3±0.0

Çizelge 3.12. OBCC 3501 izolatının statik kültür tipinde farklı indükleyicilerin varlığında zamana bağlı ligninolitik enzim aktivitesi (U/L)

Günler	İNDÜKLEYİCİ														
	BUĞDAY KEPEĞİ			ÇAY ATIĞI			PORTAKAL KABUĞU			GLİKOZ			KSİLİDİN		
	Lakkaz	MnP	LiP	Lakkaz	MnP	LiP	Lakkaz	MnP	LiP	Lakkaz	MnP	LiP	Lakkaz	MnP	LiP
0	0.3±0.1	0.7±0.1	0.0±0.0	0.0±0.1	11.2±0.2	4.6±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.1±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.1±0.0	0.0±0.0
4	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.7	0.0±0.0	4.6±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
8	2.0±0.1	7.3±1.2	0.0±0.0	11.0±1.4	95.8±4.7	0.1±0.2	22.2±2.2	118.6±1.7	0.6±0.3	4.7±1.2	23.6±0.0	0.0±0.0	21.6±0.1	149.6±0.0	0.6±0.8
11	1.8±0.6	13.5±2.6	0.0±0.0	15.1±2.2	110.6±7.2	0.0±0.0	40.0±4.6	177.5±10	0.0±0.0	4.6±1.5	39.0±3.1	0.0±0.0	25.2±2.2	208.0±16	2.3±0.0
13	2.5±0.8	7.2±1.6	0.0±0.0	14.2±0.0	77.8±5.8	0.0±0.0	19.0±1.1	71.8±8	0.0±0.0	5.0±0.1	32.9±5.9	1.1±0.0	22.4±2.4	164.0±21	0.0±0.0
15	3.6±1.0	16.0±2.5	0.0±0.0	14.6±2.0	89.6±5.8	0.0±0.0	12.6±1.3	66.0±0.0	0.0±0.0	3.0±1.4	33.2±0.0	0.6±0.8	9.3±1.8	81.2±12.8	0.0±0.0
17	5.9±1.7	32.3±0.0	0.0±0.0	9.4±0.3	70.7±1.7	0.0±0.0	13.4±1.2	60.2±5.2	0.0±0.0	4.7±2.1	57.8±0.0	0.6±0.8	13.7±4.1	50.2±0.0	0.0±0.0
20	2.9±1.0	6.8±2.1	0.0±0.0	7.1±3.3	53.0±10.0	0.0±0.0	20.5±0.0	69.2±0.0	0.0±0.0	3.1±1.0	4.3±0.0	0.0±1.6	9.6±0.2	89.5±0.0	0.0±0.0

Çizelge 3.13. OBCC 3501 izolatının katı faz kültür tipinde farklı indükleyicilerin varlığında zamana bağlı ligninolitik enzim aktivitesi (U/L)

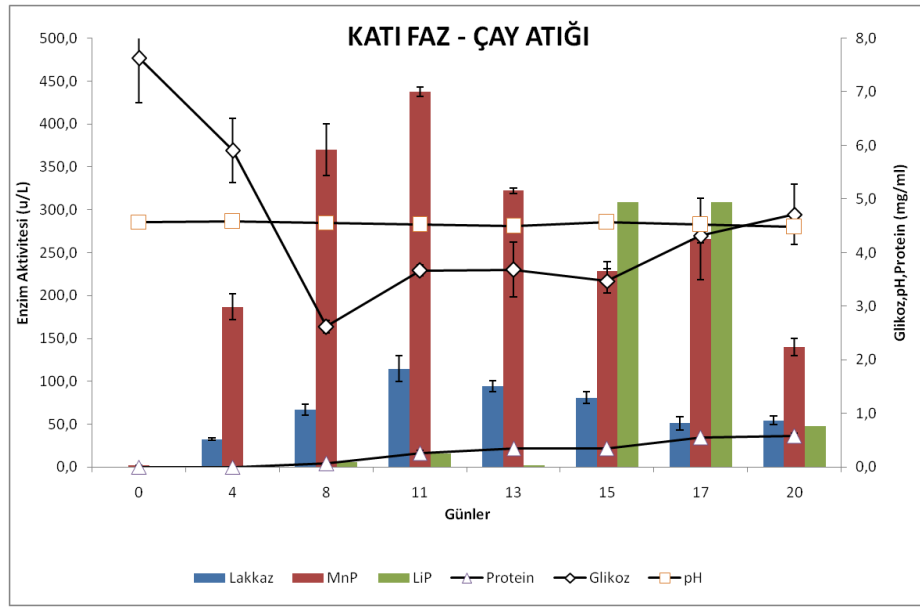
Günler	İNDÜKLEYİCİ								
	BUĞDAY KEPEĞİ			ÇAY ATIĞI			PORTAKAL KABUĞU		
	Lakkaz	MnP	LiP	Lakkaz	MnP	LiP	Lakkaz	MnP	LiP
0	0.0±0.1	0.2±0.1	0.0±0.0	0.0±0.0	1.5±0.3	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
4	52.5±3.7	345.8±0.0	0.0±0.0	32.4±1.1	186.6±15.1	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
8	108.0±15.5	427.4±0.0	0.0±0.0	66.6±6.6	370.5±30.1	5.1±0.8	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
11	104.2±10.3	330.1±31.9	48.4±15.3	114.5±14.9	438.1±5.5	15.9±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
13	53.9±0.3	268.5±0.0	0.8±0.7	94.3±6.2	322.1±3.6	2.3±4.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
15	79.0±10.3	278.1±36.0	16.5±2.4	80.7±6.7	228.1±11.3	308.5±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
17	71.1±0.0	281.3±44.4	16.5±2.4	51.0±7.6	266.1±47.4	308.5±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
20	36.2±4.7	118.3±2.4	29.6±11.3	54.3±5.3	139.6±10.1	47.2±4.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0



Şekil 3.5. OBCC 3501 izolatının kültür tipine bağlı olarak seçilmiş ligninolitik enzim aktiviteleri

OBCC 3501 kodlu makrofungus izolatının farklı kültür tipi ve indükleyiciler varlığında büyütülmesi sonucu elde edilen verilerinin değerlendirilmesi sonucunda, izolatın daha düşük miktarda lakkaz ve LiP enzimlerini üretmesinin yanında yüksek miktarda MnP enzimi ürettiği belirlenmiştir. En yüksek MnP aktivitesi katı faz kültür yöntemi ile çay atığı ortamında, inkübasyonun 11. gününde, $438,1 \pm 5,5$ U/L olarak belirlenmiştir. Katı faz kültür yöntemi ile buğday kepeğinin substrat olarak kullanıldığı

kültür ortamında en yüksek MnP aktivitesi ise inkübasyonun 8. gününde $427,4 \pm 0,0$ U/L olarak belirlenmiştir. Ancak bu kültür yönteminde, LiP aktivitesi de göz önünde bulundurularak çay atığı daha başarılı bir substrat olarak gözlemlenmekte ve bu ortamda diğer deneysel parametreleri de içeren büyüme özellikleri Şekil 3.6' da belirtilmektedir.



Şekil 3.6. OBCC 3501 izolatının katı faz sisteminde çay atığı indükleyicisi varlığında büyüme özellikleri

Çalışılan tüm makrofungus izolatlarının, kültür tipleri ve indükleyiciler ile enzim üretimleri birlikte incelendiğinde, ligninolitik enzim üretimine atıkların katkısını vurgulaması açısından çay atığında en iyi aktivite göstermesi ve en iyi enzim üretimini inkübasyonun erken evrelerinde gerçekleştirmesi nedenlerinden ötürü OBCC 3501 kodlu makrofungus izolatının enzimleri çalışmanın gelecek aşamalarında boya giderimi kapasitesi açısından çalışılmak üzere seçilmiştir.

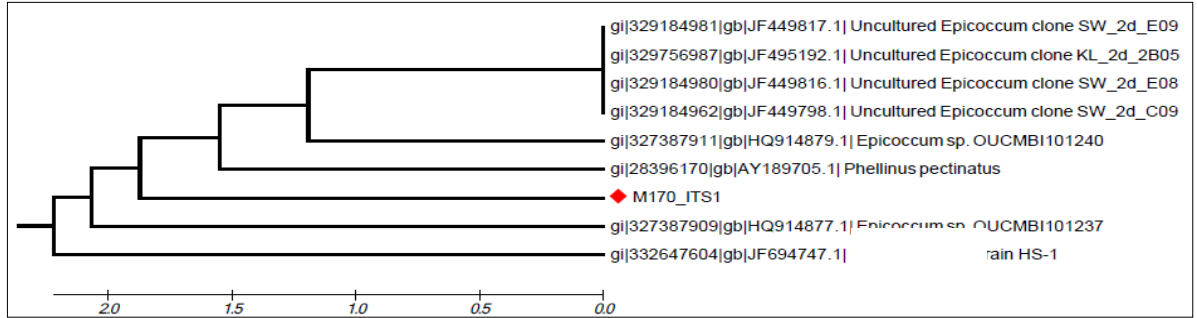
3.3. Makrofungus İzolatlarının Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması

3.3.1. OBCC 1047 Kodlu Makrofungus İzolatının Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması

Dizi analizi çalışmaları ile OBCC 3501 kodlu makrofungus izolatımızın rDNA-ITS dizilimi şu biçimde elde edilmiştir:

```
TTCGGTCTGCTACCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACCTTCGTTTCCTCGGCG
GGTCCGCCCCGCCGATTGGACAACATTCAAACCCTTGTCAGTTGCAATCAGCG
TCTGAAAAAACATAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGG
CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATGTCAGAATT
CAGTGAATCATCGAATTCTTGAACGCACATGTCGCCCCCTTGGTATTCCATGG
GGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCTTCAAGCTCTGCTTGGTGTGTTGGG
TGTTTGTCTCGCCTCTGCGTGTAGACTCGCCTTAAAACAATTGGCAGCCGGC
GTATTGATTTTCGGAGCGCAGTACATCTCGCGCTTTGCACTCATAACGACGAC
GTCCAAAAGTACATTTTTTACACTCTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAACCCG
CTGAACTTAAGCATATCAATAGCCGGAGGAA
```

Belirlenen rDNA-ITS diziliminin GenBank: www.ncbi.nlm.nih.gov veri tabanında BLAST analizi yapılması sonucunda, OBCC 1047 kodlu makrofungus izolatımızın hem *Epicoccum* spp. (Accession# JF694747.1 ve HQ914879.1) hem *Phellinus pectinatus* (AY189705.1) suşlarına % 98 oranında benzediği belirlenmiştir (Şekil 3.7). Bu nedenle geleneksel yöntemler ile isimlendirilemeyen OBCC 1047 kodlu makrofungus izolatı kullanılan moleküler yöntemler ile isimlendirilememiştir. İzolatın bu taksonların ayırt edilmesinde kullanılan diğer primerler ile tekrar çalışılması planlanmaktadır.



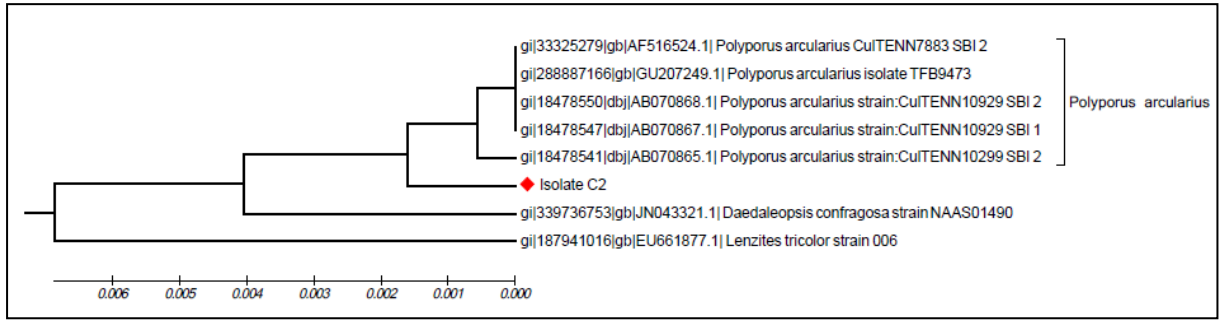
Şekil 3.7. OBCC 1047 kodlu makrofungus izolatının yakın ilişkili türler ile ilişkisini ifade eden filogenetik ağaç

3.3.2. OBCC 3501 Kodlu Makrofungus İzolatının Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması

Dizi analizi çalışmaları ile OBCC 3501 kodlu makrofungus izolatımızın rDNA-ITS dizilimi şu biçimde elde edilmiştir:

```
GGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTAC
ACCTGTGCACTTACTGTGGGTTTCAGGAGCTTCGAAGCGAGGGTTTAATCGC
TCTCGCCGAGTTGTTACTGGGCCTACGTTTATCACAAACTCTTAAAGTATCA
GAATGTAAACGCGTCTAACGCATCTATATACAACCTTTCAGCAACGGATCCTT
TGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAAT
TGCAGATCTAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTAA
TTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATGAAATTCTCAACCTAACAAGTT
CTTAACGGGACTTGCGTAGGCTTGGACTTGGAGGCTTGTCGGCTCTAGCAGT
CGGCTCCTCTCAAATGCATTAGCTTGGTTCCTTGCGGATCGGCTCACGGTGT
GATAATTATCTGCGCCGCGACCGTTGAAGCGTTTAATGGCCAGCTTCTAATC
GTCTCTTGCGAGACAGCTTTCATCGAACTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACT
ACCCGCGTAACTTAAGCATATCAATAGGCCGGAGGAA
```

Belirlenen rDNA-ITS diziliminin GenBank: www.ncbi.nlm.nih.gov veri tabanında BLAST analizi yapılması sonucunda, OBCC 3501 kodlu makrofungus izolatımızın *Polyporus arcularius* türüne (Accession# AF516524.1) % 97 oranında benzediği belirlenmiştir. Bu nedenle geleneksel yöntemler ile isimlendiremediğimiz OBCC 3501 kodlu makrofungus izolatı *Polyporus arcularius* olarak isimlendirilmiştir. Şekil 3.8’ de OBCC 3501 kodlu izolatın GenBank: www.ncbi.nlm.nih.gov veri tabanında yer alan yakın ilişkili türler ile birlikte değerlendirilmesine olanak sağlayan filogenetik ağacı ifade edilmektedir.



Şekil 3.8. OBCC 3501 kodlu makrofungus izolatının yakın ilişkili türler ile ilişkisini ifade eden filogenetik ağaç



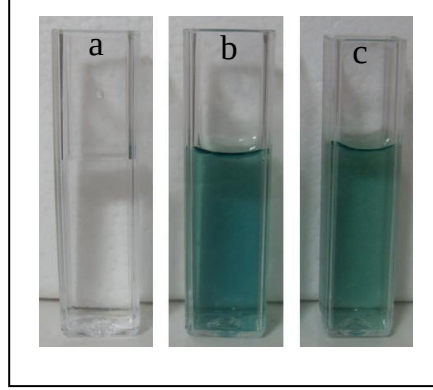
Şekil 3.9. *Polyporus arcularius* makrofungusunun karpofor görüntüsü (Mustafa Yamaç)

Enzimlerin Girişim / Maskeleye Oranlarının Belirlenmesi

Makrofungusun sahip olduğu enzimler önceki çalışmalarda substrat oksidasyonuna bağlı olarak ölçülmüştür. Ancak çalışmanın ilerleyen aşamalarında MnP aktivitesi ölçümünde kullanılan DMP substratının, lakkaz enziminin de substratı olabildiğine dair bulgulara ulaşılmıştır (Nyanhongo et al., 2001; Johannes and Majcherczyk, 2000). Aynı şekilde ABTS substratının hem MnP hem de lakkaz enzimlerinin substratı olabildiği bildirilmektedir (Yuri et al., 2006; Xiaobin et al., 2007). Bu nedenle substrat oksidasyonuna bağlı ölçümlerin, enzimlere özgü olup olmadığına dair onaylama testlerine ihtiyaç duyulmuştur. Bu amaçla MnP enziminin ABTS substratına, lakkaz enziminin ise DMP substratına girişim yapıp yapmadığı araştırılmıştır.

3.3.3. Mangan Peroksidaz – ABTS Girişim Testi

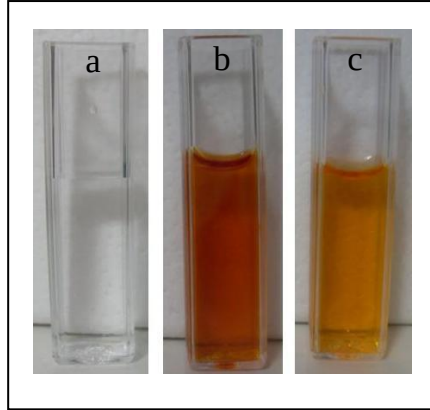
Bu test ile lakkaz enzimi ölçümünde substrat olarak kullanılan ABTS nin okside edilmesinde MnP enziminin katkısı olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Mangan peroksidaz enziminin, ortamda mangan ve hidrojen peroksit bulunduğu durumlarda çalıştığı bilinmekle beraber bu iki madde ortama sonradan eklenmese bile besiyeri bileşenlerinde ve metabolizma sonucu ekstraselüler üretim yoluyla kültür sıvısında bulunabilmektedir. Bu nedenle ham kültür sıvısı katalaz enzimi ile muamele edilerek ortamda bulunması olası hidrojen peroksit parçalanmıştır. Çalışma sonucunda katalaz ile muamele edilmemiş kültür sıvısında 114 U/L' lik bir aktivite belirlenirken, katalaz ile muamele edilmiş olan kültür sıvısında ise 100 U/L aktivite belirlenmiştir (Şekil 3.10). Katalaz ile ortamdaki hidrojen peroksitin giderilmesine rağmen ABTS oksidasyonunda dikkate değer bir fark görülmemesi nedeniyle hidrojen peroksit varlığında çalıştığı bilinen MnP enziminin oksidasyonda görev almadığı düşünülmektedir.



Şekil 3.10. ABTS oksidasyonuna MnP ve lakkaz enzimlerinin katkısı. a: kontrol grubu, b: ham kültür sıvısı, c: katalaz ile muamele edilmiş ham kültür sıvısı

3.3.4. Lakkaz – DMP Girişim Testi

Makrofungus izolatının enzim aktivitesinin belirlenmesi aşamasında kullanılan DMP substratının oksidasyonundan sorumlu enzimin MnP enzimi olup olmadığını belirlemek amacıyla bu test uygulanmıştır. Bu amaçla farklı reaksiyonlar kurulmuş, lakkazın DMP oksidasyonuna etkisi olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla ortama hidrojen peroksit ve mangan sülfat eklenmediği durumlarda meydana gelen DMP oksidasyonunun lakkaz enzimi tarafından gerçekleşmesi beklenmektedir. Bu şekilde kurulan reaksiyonda DMP oksidasyonu 35 U/L olarak belirlenirken, aynı koşullarda hidrojen peroksit ve mangan sülfat varlığında kurulan reaksiyonda 438 U/L olarak belirlenmiştir (Şekil 3.11). Bir başka deyişle elde edilen veriler değerlendirildiğinde, ortamda bulunan DMP oksidasyonunun % 91' inin MnP enzimi tarafından gerçekleştirildiği belirlenmiştir.



Şekil 3.11. DMP oksidasyonu MnP ve lakkaz enzimlerinin katkısı. a: kontrol grubu, b: H_2O_2 ve $MnSO_4$ varlığında ham kültür sıvısı, c: H_2O_2 ve $MnSO_4$ yokluğunda ham kültür sıvısı

3.4. *Polyporus arcularius* İzolatının Boyar Madde Renk Giderim Kapasitesinin Belirlenmesi

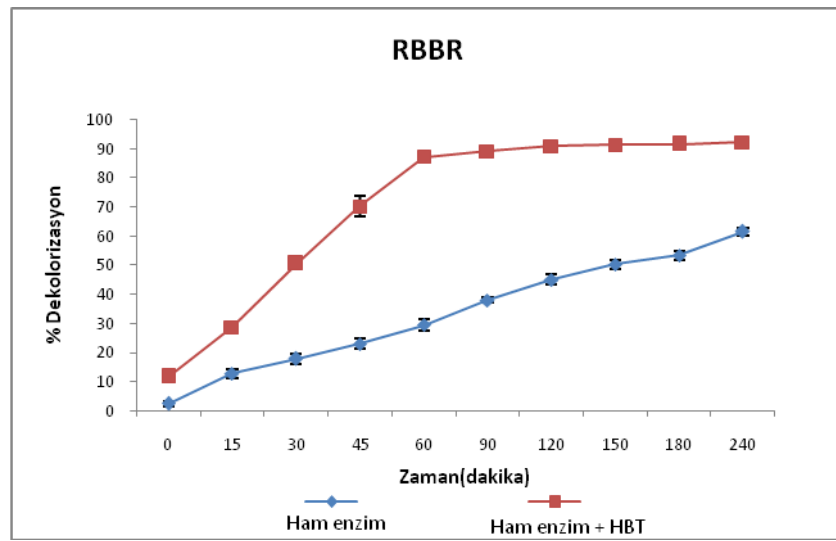
Çalışmanın bu aşamasında *Polyporus arcularius* (OBCC 3501) izolatının katı faz kültür yöntemi ile çay atığı ortamında ürettiği enzimin boyar madde renk giderim kapasitesi araştırılmış, boyar madde renk giderim oranının mediatör yardımıyla artırılması hedeflenmiş ve boya renk gideriminden sorumlu enzim belirlenmiştir.

3.4.1. Enzimin Boyar Madde Renk Giderim Kapasitelerinin Belirlenmesi ve Arttırılması

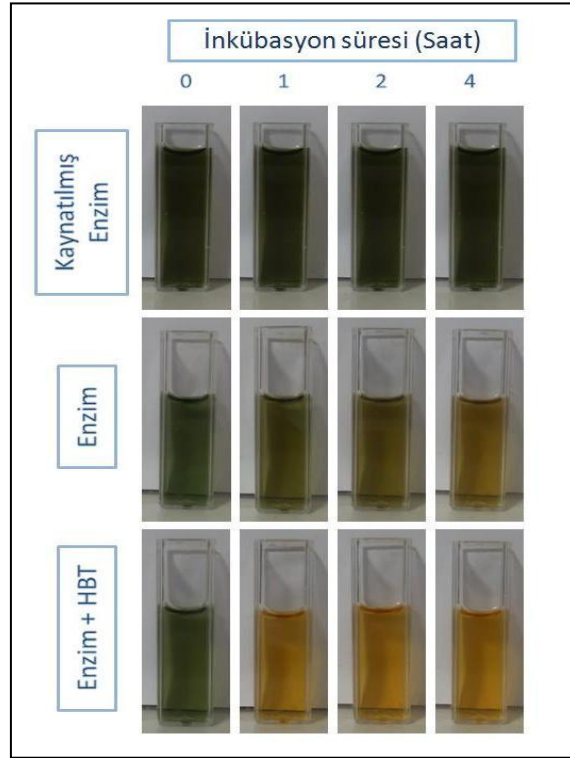
RBRR, remazol black, cibacron blue 3R, amarant, kristal viyole ve malaşit yeşili olmak üzere 6 farklı boyar madde ile enzim(ler)in boyar madde renk giderim yetenekleri ve mediatör yardımıyla arttırılması çalışmaları gerçekleştirilmiş, elde edilen bulgular her bir boyar madde için ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

3.4.1.1. RBBR

Ham enzimle muamele edilen RBBR boyar maddesinin % dekolorizasyonu 4. saat sonunda % 62 olarak belirlenirken, reaksiyon karışımına HBT meditörünün ilave edilmesiyle bu oran 2 saatin sonunda % 92' ye çıkarılmış olup sonraki ölçümlerde sabit olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.12 - 3.13).



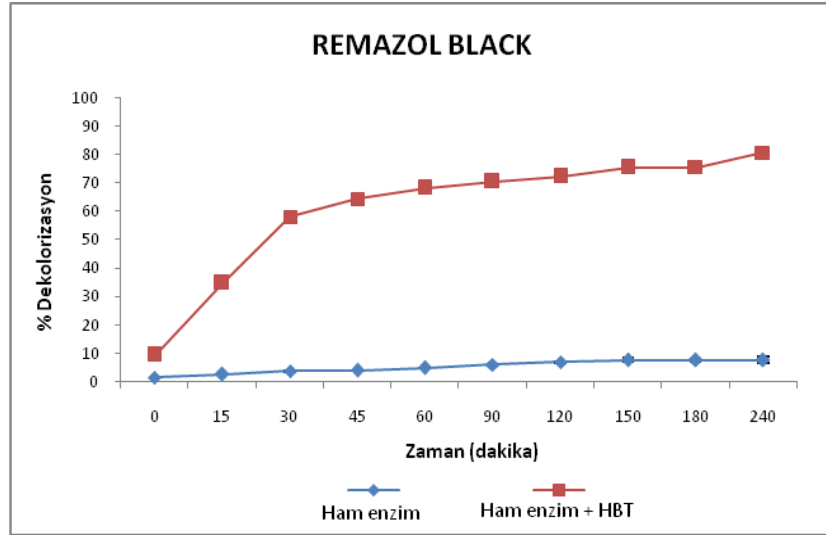
Şekil 3.12. *Polyporus arcularius* izolatının RBBR boyar maddesinde renk giderim kapasitesi



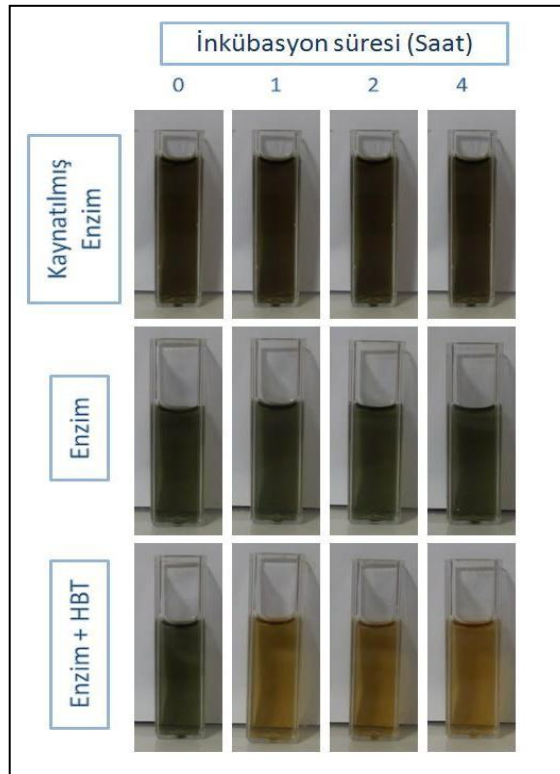
Şekil 3.13. *Polyporus arcularius* izolatının HBT ilaveli ve ilavesiz RBBR boyar maddesinde renk giderim kapasitesi

3.4.1.2. Remazol Black

Remazol Black boyar maddesinin ham enzimle muamele edilmesi durumundaki % dekolorizasyonu 4. saat sonunda % 8 olarak belirlenmiştir. Reaksiyon karışımına HBT meditörünün de ilave edilmesiyle bu oran % 82' ye ulaşmıştır (Şekil 3.14 - 3.15).



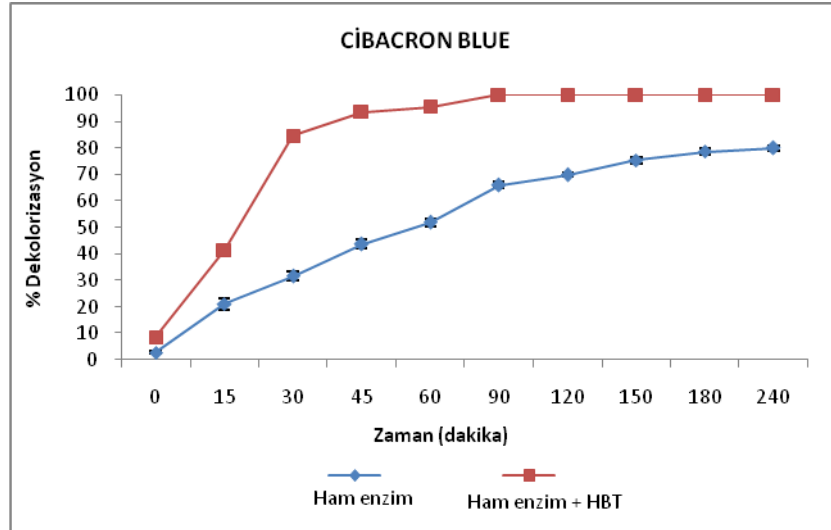
Şekil 3.14. *Polyporus arcularius* izolatının remazol black boyar maddesinde renk giderim kapasitesi



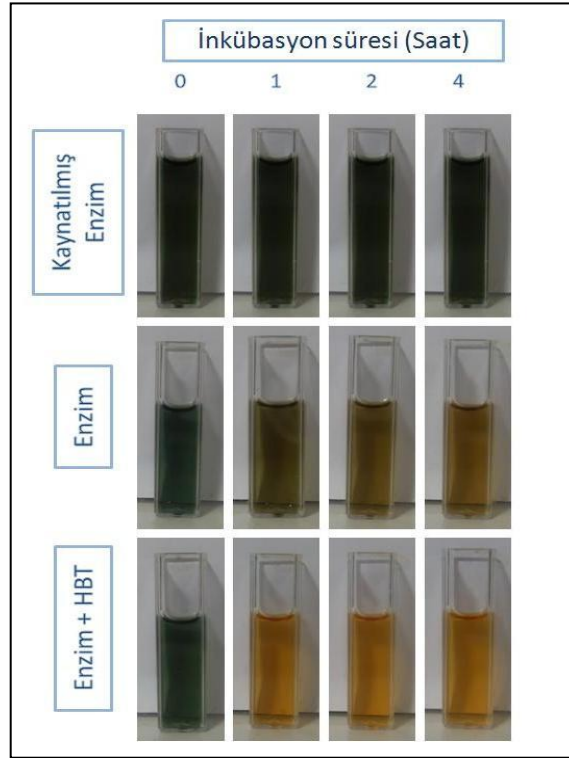
Şekil 3.15. *Polyporus arcularius* izolatının HBT ilaveli ve ilavesiz remazol black boyar maddesinde renk giderim kapasitesi

3.4.1.3. Cibacron Blue 3R

Ham enzimle muamele edilen cibacron blue 3R boyar maddesinin 4. saat sonunda % 80 dekolorize olduğu görülmüştür. Bu oran, reaksiyon karışımına HBT mediatörünün ilave edilmesiyle 1.5 saat sonunda % 100'e çıkarılmıştır (Şekil 3.16 - 3.17).



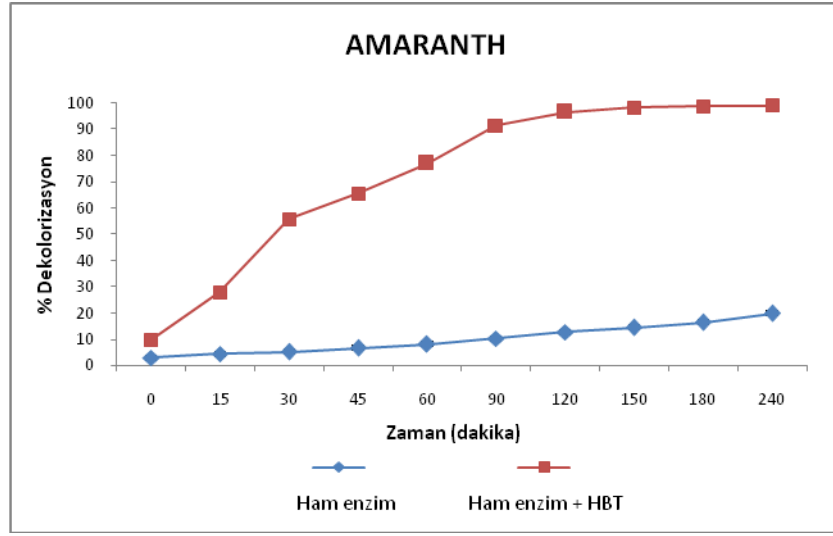
Şekil 3.16. *Polyporus arcularius* izolatının cibacron blue 3R boyar maddesinde renk giderim kapasitesi



Şekil 3.17. *Polyporus arcularius* izolatının HBT ilaveli ve ilavesiz cibacron blue 3R boyar maddesinde renk giderim kapasitesi

3.4.1.4. Amarant

Ham enzimle muamele edilen Amarant boyar maddesinin % dekolorizasyonu 4. saat sonunda % 20 olarak belirlenirken, reaksiyon karışımına HBT meditörünün ilave edilmesiyle bu oran 2. saatin sonunda % 100' e çıkarılabilmektedir (Şekil 3.18 - 3.19).



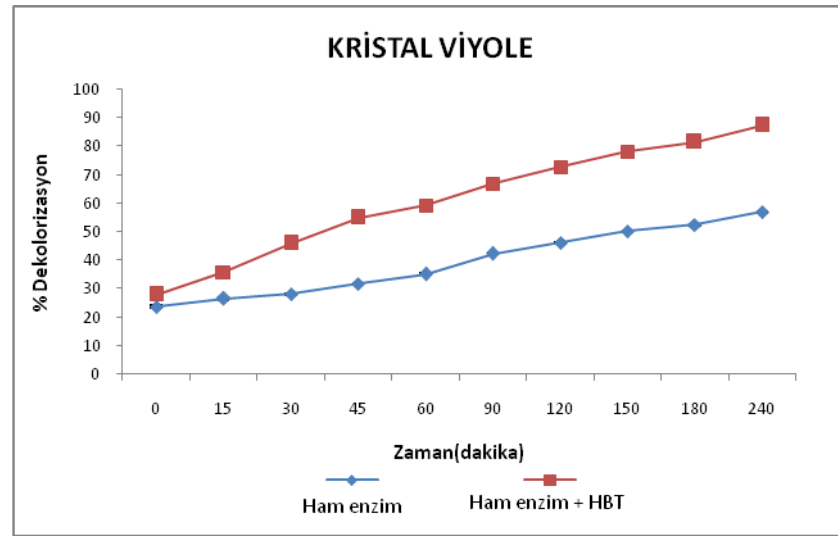
Şekil 3.18. *Polyporus arcularius* izolatının amarant boyar maddesinde renk giderim kapasitesi



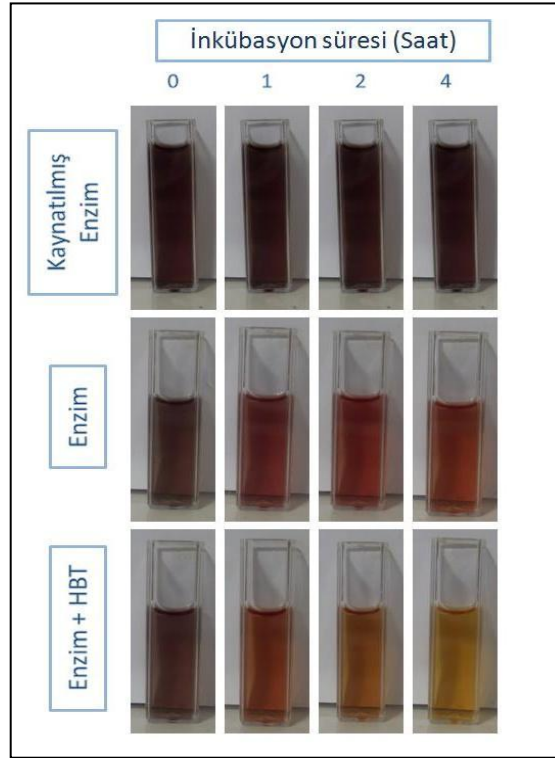
Şekil 3.19. *Polyporus arcularius* izolatının HBT ilaveli ve ilavesiz amarant boyar maddesinde renk giderim kapasitesi

3.4.1.5. Kristal Viyole

Kristal Viyole boyar maddesi ham enzimle muamele edildiğinde 4. saatin sonunda % 57 dekolorize olurken, reaksiyon karışımına HBT meditörünün ilave edilmesiyle bu oran % 87' ye kadar çıkarılabilmektedir (Şekil 3.20 - 3.21).



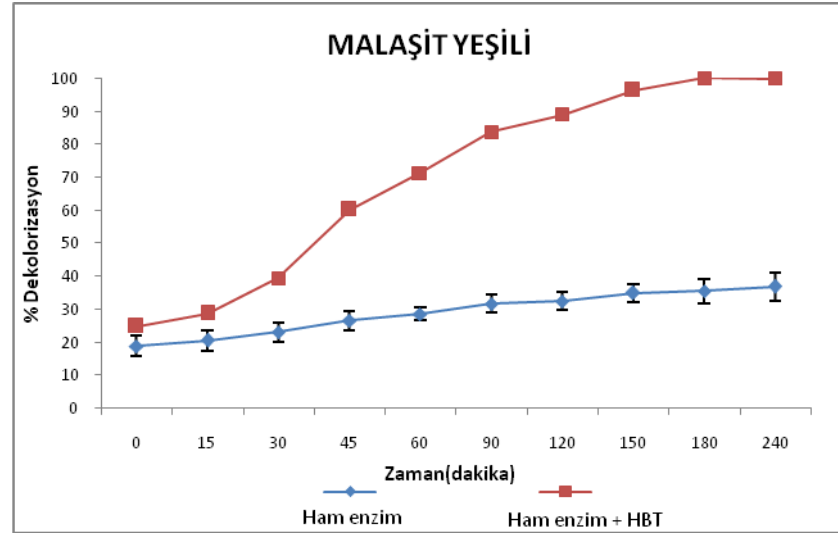
Şekil 3.20. *Polyporus arcularius* izolatının kristal viyole boyar maddesinde renk giderim kapasitesi



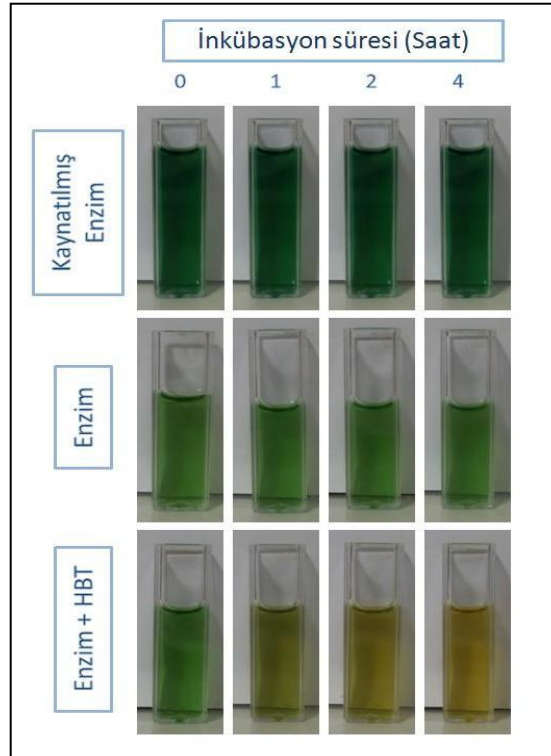
Şekil 3.21. *Polyporus arcularius* izolatının HBT ilaveli ve ilavesiz kristal viyole boyar maddesinde renk giderim kapasitesi

3.4.1.6. Malaşit Yeşili

Ham enzimle muamele edilen Malaşit Yeşili boyar maddesi % dekolorizasyonu 4. saat sonunda % 37 olarak belirlenirken, reaksiyon karışımına HBT meditörünün ilave edilmesiyle bu oran 3. saatin sonunda % 100' e ulaşmıştır (Şekil 3.22 - 3.23).



Şekil 3.22. *Polyporus arcularius* izolatının malaşit yeşili boyar maddesinde renk giderim kapasitesi



Şekil 3.23. *Polyporus arcularius* izolatının HBT ilaveli ve ilavesiz malaşit yeşili boyar maddesinde renk giderim kapasitesi

3.4.2. Boyar Madde Renk Gideriminden Sorumlu Enzim(ler)in Belirlenmesi

Çalışmanın önceki aşamalarında MnP ve lakkaz enzimlerini ürettiği belirlenen *Polyporus arcularius* izolatından ekstrakte edilen ham kültür sıvısı ile boyar madde renk giderim çalışmaları yapılmış ve oldukça başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Ancak ham kültür sıvısında bulunan bu iki enzimden hangisinin boyar madde renk gideriminde rol aldığını belirlemek amacıyla sodyum azid ve n-PG inhibitörlerinin farklı konsantrasyonlarının etkisi araştırılmıştır.

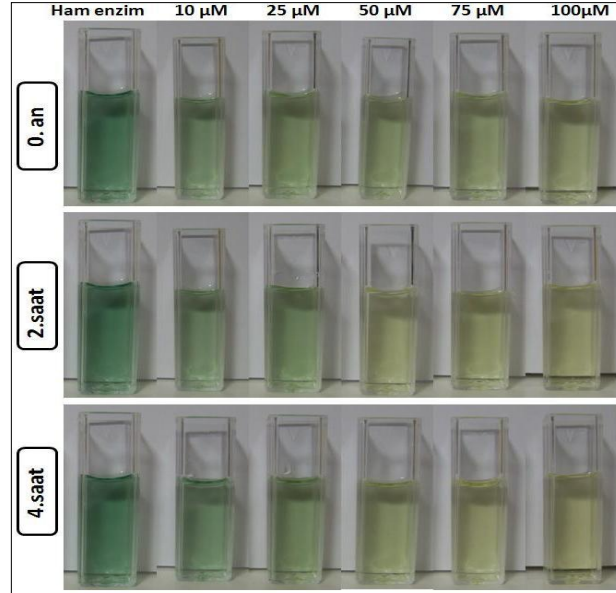
Sodyum azid, hem lakkaz hem de peroksidazları inhibe etme yeteneği olduğu bilinen ligninolitik enzimlerin spesifik inhibisyonunda yaygın olarak kullanılan bir inhibitördür (Johannes and Majcherczyk, 2000; Novotny et al., 2004). Çalışma kapsamında sodyum azidin 5 farklı konsantrasyonu kullanılmış, elde edilen bulgular Çizelge 3.14’ te sunulmuştur. Lakkaz ve MnP enzimlerinin 100 μ M sodyum azid ile 4 saatlik muamele sonucunda % 90 ve 99 oranında inhibe olduğu gözlemlenmiş ve bu derişimin boyar madde renk gideriminin enzim kaynaklı olup olmadığının anlaşılmasında kullanılabileceği belirlenmiştir (Şekil 3.24 – Şekil 3.25).

Çizelge 3.14. Farklı sodyum azid konsantrasyonlarının *Polyporus arcularius* izolatı tarafında üretilen ligninolitik enzimleri inhibisyon oranları

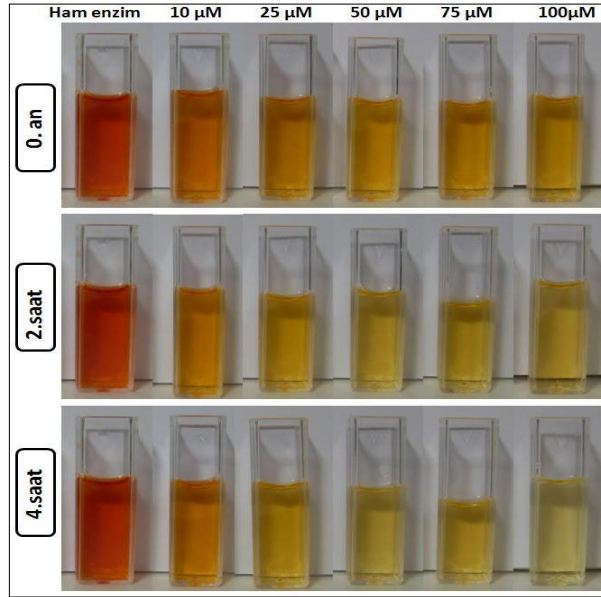
NaN ₃ Konsantrasyon (μ M)	Süre (saat)	Lakkaz	Mangan Peroksidaz
10	0	52	53
	2	27	76
	4	25	72
25	0	66	78
	2	54	88
	4	57	90
50	0	71	84
	2	86	94
	4	80	100

Çizelge 3.14. Farklı sodyum azid konsantrasyonlarının *Polyporus arcularius* izolatu tarafında üretilen ligninolitik enzimleri inhibisyon oranları (Devamı)

NaN ₃ Konsantrasyon (μM)	Süre (saat)	Lakkaz	Mangan Peroksidaz
75	0	74	84
	2	82	95
	4	82	95
100	0	86	92
	2	87	97
	4	90	99
Ham enzim		-	-



Şekil 3.24. *Polyporus arcularius* izolatu tarafından üretilen lakkaz enziminin sodyum azid ile inhibisyonu

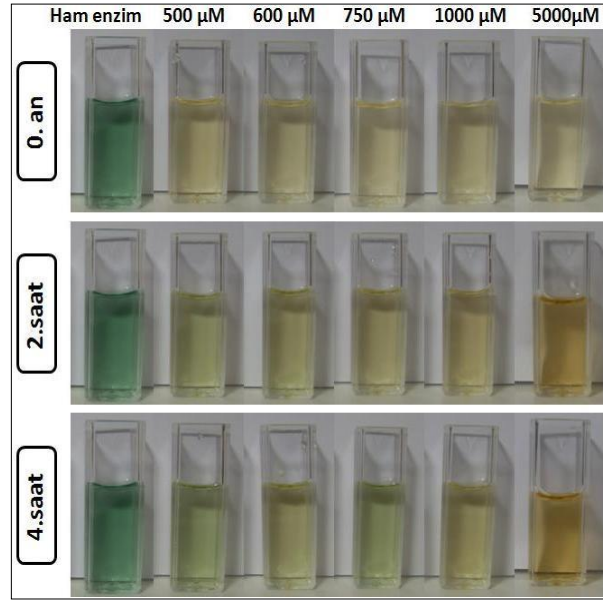


Şekil 3.25. *Polyporus arcularius* izolatu tarafından üretilen MnP enziminin sodyum azid ile inhibisyonu

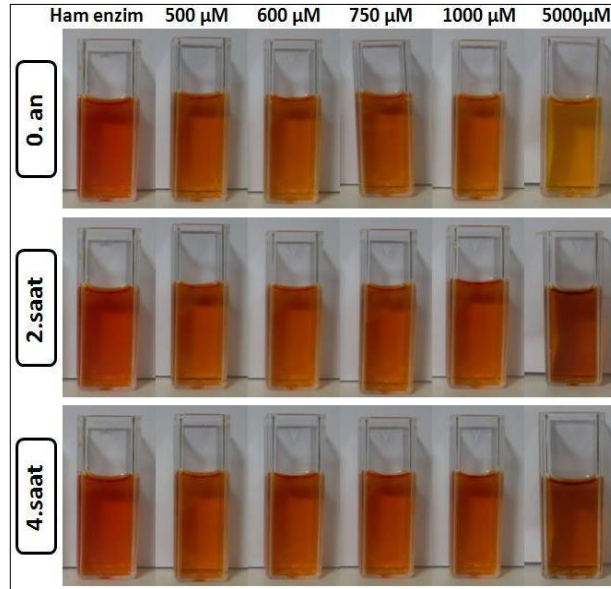
Kullanılan diğer bir inhibitör olan n-Propil gallat, yaygın olarak lakkaz inhibitörü olarak kullanılmasına rağmen MnP inhibe ettiğine dair çalışmalar bulunmaktadır (Kasinath et al., 2002; Novotny et al., 2004). Çizelge 3.15’ de sunulduğu üzere, 5 farklı konsantrasyonda inhibisyon özelliği test edilen n-PG, 5000 µM derişimde lakkazı % 100 inhibe ederken, MnP’ ı % 57 inhibe etmesiyle daha ayırt edici bir inhibisyon oluşturmuştur (Şekil 3.26 – Şekil 3.27).

Çizelge 3.15. Farklı n-propil gallat konsantrasyonlarının *Polyporus arcularius* izolatu tarafında üretilen ligninolitik enzimleri inhibisyon oranları

n-PG Konsantrasyon (μ M)	Süre (saat)	Lakkaz	Mangan Peroksidaz
500	0	100	40
	2	86	34
	4	75	34
600	0	100	58
	2	89	46
	4	87	45
750	0	100	55
	2	93	43
	4	75	42
1000	0	100	57
	2	96	47
	4	91	45
5000	0	100	77
	2	100	56
	4	100	57
Etanol	0	40	31
	2	17	22
	4	18	24
Ham enzim		-	-



Şekil 3.26. *Polyporus arcularius* izolatu tarafından üretilen lakkaz enziminin n-propil gallat ile inhibisyonu



Şekil 3.27. *Polyporus arcularius* izolatu tarafından üretilen MnP enziminin n-propil gallat ile inhibisyonu

Böylece *Polyporus arcularius* izolatu tarafından üretilen ligninolitik enzimlerin ayırt edici biçimde inhibisyonunu sağlayan inhibitör konsantrasyonları ve uygulama

süreleri belirlenmiştir. Bu veriler ışığında her enzim ayrı ayrı inhibe edilerek boyar madde renk giderim çalışması tekrarlanmıştır. Lakkaz ve MnP enzimlerini tamamen inhibe eden sodyum azid konsantrasyonu ile muamele edilen ham enzim çözeltisinin, boyar madde renk giderim kapasitesinin tamamen yok olduğu gözlemlenmiştir (Çizelge 3.16). Bu bilgiye dayanarak, elde edilen boyar madde renk gideriminin *Polyporus arcularius* izolatı tarafından üretilen lakkaz ya da MnP enzimlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Lakkaz enzim aktivitesi tamamen inhibe olurken, MnP enziminin aktivitesinin % 43 oranında korunduğu 5000 μ M derişimindeki n-propil gallat ile 4 saat muamele edilen ham kültür sıvısı ile gerçekleştirilen boyar madde renk giderim çalışmalarında ise, giderimin oransal olarak düşme göstermesine rağmen gerçekleştiği gözlemlenmiştir (Çizelge 3.16). Bu verilere dayanarak boyar madde renk gideriminden sorumlu enzimin MnP enzimi olduğu düşünülmektedir.

Çizelge 3.16. İnhibitörler ile muamele edilen ham enzimin 4. saat sonunda boyar madde renk giderimleri

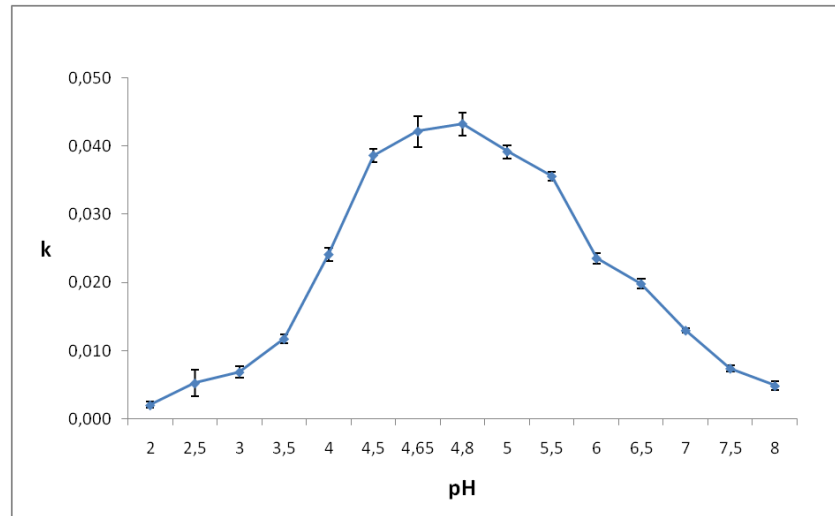
BOYAR MADDELER	BOYAR MADDE DEKOLORİZASYONU (%)					
	Ham enzim	NaN ₃ + Ham enzim	NaN ₃	n-PG + Ham enzim	n-PG	Etanol
RBBR	62	0	0	9	1	0
Remazol Black	8	1	0	3	0	0
Cibacron Blue 3R	80	0	0	15	0	0
Amarant	20	0	0	13	0	0
Kristal Viyole	57	3	3	20	2	0
Malaşit Yeşili	37	0	1	29	0	0

3.5. Mangan Peroksidaz Enziminin Aktivitesi Üzerine Kinetik Çalışmalar

Polyporus arcularius izolatu tarafından optimum koşullarda üretilen mangan peroksidaz enziminin optimum çalışma pH sı, sıcaklığı, K_m ve V_{max} değerleri belirlenmiştir.

3.5.1. Enzimin Optimum pH' sının Belirlenmesi

MnP enziminin optimum aktivite gösterdiği pH noktasını belirlemek amacıyla farklı tamponlar kullanılarak 15 farklı pH değeri araştırılmış, farklı pH derecelerinde elde edilen reaksiyon hız sabiti (k) değerleri Şekil 3.28' de sunulmuştur.

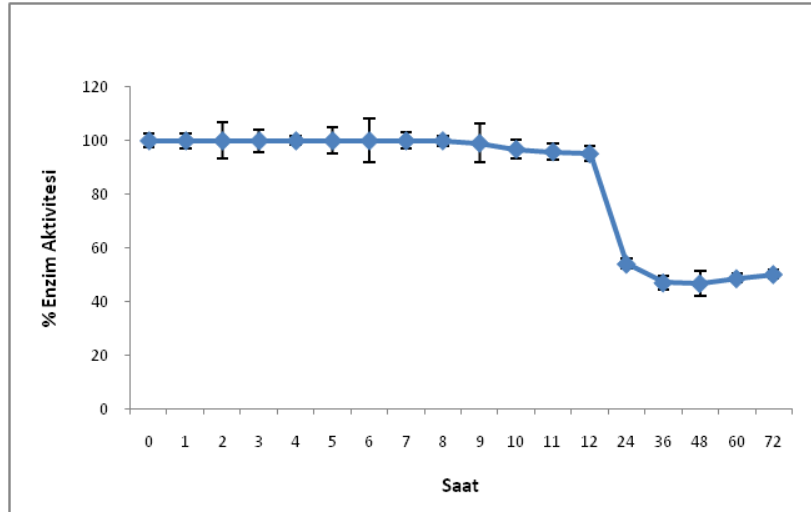


Şekil 3.28. *Polyporus arcularius* izolatının MnP enziminin reaksiyon hız sabiti (k) değerlerinin pH' ya bağlı değişimi

Elde edilen reaksiyon hız sabiti değerleri incelendiğinde, makrofungus tarafından üretilen MnP enziminin optimum aktivite gösterdiği pH' nın 4.5 ile 4.8 civarında olduğu görülmektedir.

3.5.2. Enzimin pH Stabilitesinin Belirlenmesi

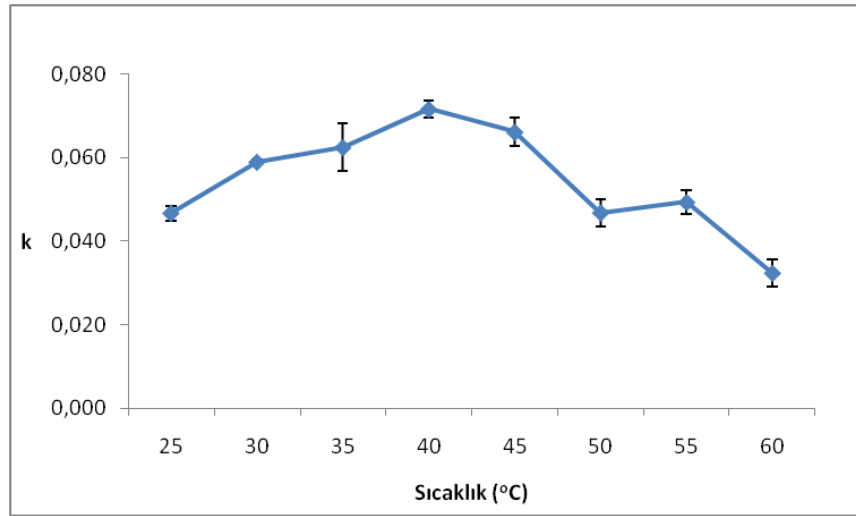
Optimum aktivite gösterdiği pH olarak 4.8 seçilen mangan peroksidaz enziminin pH stabilitesi, optimum pH olarak seçilen 4.8 değerinde 72 saat boyunca incelenmiştir. Makrofungus izolatının enzim aktivitesinin 12. saatten sonra düşmeye başladığı gözlemlenmesine karşın 72. saatin sonunda enzimin aktivitesini % 50 oranında korumaya devam ettiği belirlenmiştir (Şekil 3.29).



Şekil 3.29. *Polyporus arcularius* izolatının MnP enziminin pH: 4.8’ de zamana bağlı enzim aktivitesi değişimi

3.5.3. Enzimin Optimum Sıcaklığının Belirlenmesi

Ham kültür sıvısındaki MnP enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık, 25 – 60 °C aralığında enzim aktivite tayini ile belirlenmiştir. Farklı sıcaklık derecelerinde elde edilen reaksiyon hız sabiti (k) değerleri Şekil 3.30’ da sunulmuştur.

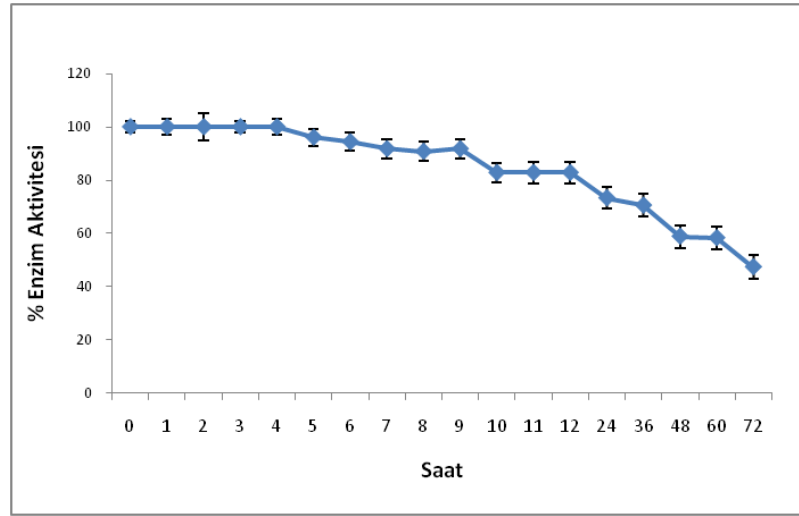


Şekil 3.30. *Polyporus arcularius* izolatının MnP enziminin reaksiyon hız sabiti (k) değerlerinin sıcaklığa bağlı değişimi

Çalışma kapsamında 8 farklı sıcaklık derecesinde ölçülen reaksiyon hız sabitleri incelendiğinde, enzimin en iyi çalışma sıcaklığı 40 °C olarak belirlenmiştir.

3.5.4. Enzimin Sıcaklık Stabilitesinin Belirlenmesi

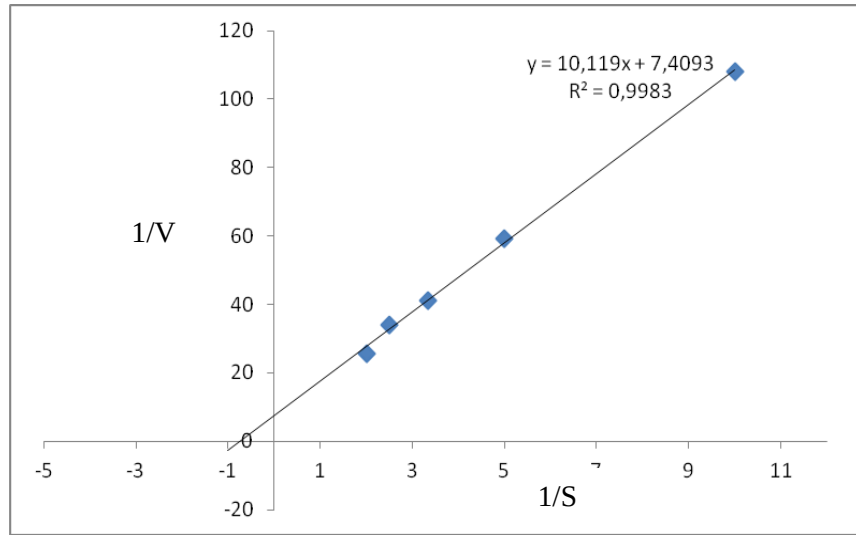
Polyporus arcularius izolatı tarafından üretilen MnP enziminin sıcaklık stabilitesi, optimum sıcaklık olduğu düşünülen 40 °C’ de 72 saat boyunca incelenmiştir. İzolatın enzim aktivitesinin 5. saatten sonra düşmeye başlamasına karşın 72. saat sonunda % 47 oranında korunduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.31).



Şekil 3.31. *Polyporus arcularius* izolatının MnP enziminin 40 °C’ de zamana bağlı enzim aktivitesi değişimi

3.5.5. Enzimin K_m ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi

Mangan peroksidaz enzimi ile gerçekleştirilen DMP oksidasyon çalışması sonucunda elde edilen verilerin Michealis-Menten eşitliğine uygun olarak kullanılmasıyla Lineweaver-Burk grafiği çizildikten sonra, elde edilen formül kullanılarak K_m değeri 1.37 mM ve V_{max} değeri 0.135 mM/sn olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.32).



Şekil 3.32. MnP enzimi ile gerçekleştirilen DMP oksidasyon çalışmaları sonucunda oluşturulan Lineweaver-Burk grafiği

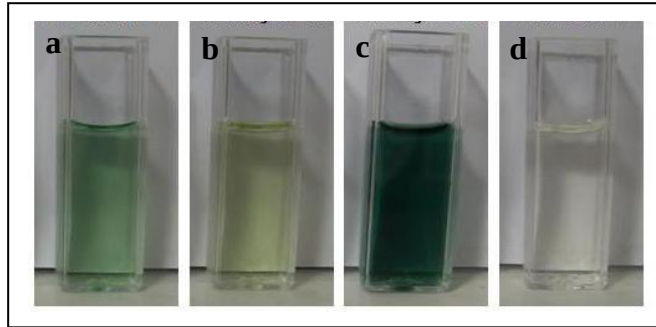
3.6. Ham Enzimin Amonyum Sülfat Çöktürmesi ile Konsantre Edilmesi

Ham kültür sıvısında bulunan ligninolitik enzimlerin kısmi saflaştırmasını sağlamak amacıyla, proteinlerin saflaştırılmasında kullanılan primer ayırma teknikleri olan amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemleri uygulanmıştır. Öncelikle uygulanan amonyum sülfat çöktürmesinde sırasıyla % 30 ve % 70 saturasyon dereceleri kullanılarak, ligninolitik enzimlerin tamamının çöktüğü saturasyon oranı belirlenmiştir. Daha sonra her iki çökelti ve kalan süpernatanta diyaliz işlemleri uygulanarak, çözelti ve çökelti kısımlarında kalan küçük moleküllerle birlikte sıvı içerisinde kalan amonyum sülfat ortamdan uzaklaştırılmıştır.

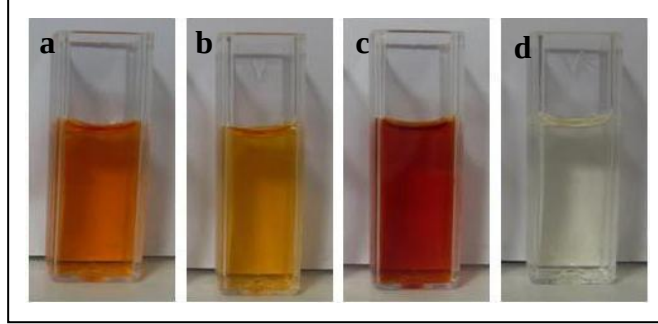
Yapılan çöktürme ve diyaliz işlemleri sonrası, her bir aşamada enzim aktiviteleri ve protein miktarları ölçülerek, spesifik aktivite ve saflaştırma faktörleri hesaplanarak Çizelge 3.17’de sunulmuştur (Şekil 3.34 – 3.35).

Çizelge 3.17. Ham kültür sıvısına uygulanan amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz sonucunda elde edilen enzim ve protein miktarları ile bunlara bağlı olarak hesaplanan spesifik aktivite ve saflaştırma faktörü değerleri

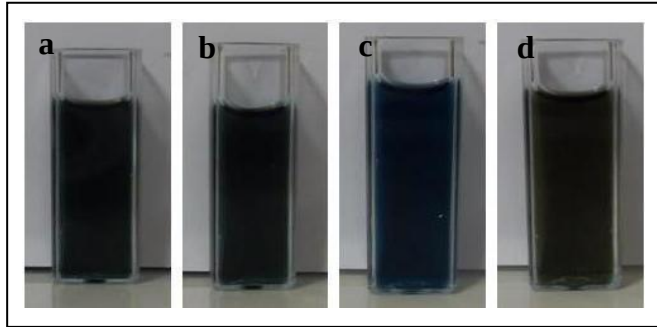
	Enzim Miktarı (U/ml)		Protein (mg/ml)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma Faktörü
	Lakkaz	MnP			
Ham kültür sıvısı	0,12	0,44	0.340	1.647	-
% 30 Çökelti	0.04	0.18	0.433	0.508	0.308
% 70 Çökelti	1,36	4,56	2.602	2.275	1.381
Kalan kültür sıvısı	0.00	0.00	0.000	0.000	0.000



Şekil 3.33. Amonyum sülfat çöktürmesi ile saflaştırma aşamalarındaki ABTS oksidasyonuna bağlı lakkaz ölçümü; a: Ham kültür sıvısı, b: % 30 Çökelti, c: % 70 Çökelti, d: Kalan kültür sıvısı.



Şekil 3.34. Amonyum sülfat çöktürmesi ile saflaştırma aşamalarındaki DMP oksidasyonuna bağlı MnP ölçümü; a: Ham kültür sıvısı, b: % 30 Çökelti, c: % 70 Çökelti, d: Kalan kültür sıvısı.



Şekil 3.35. Amonyum sülfat çöktürmesi ile saflaştırma aşamalarındaki Bradford ölçümüne bağlı belirlenen protein miktarları; a: Ham kültür sıvısı, b: % 30 Çökelti, c: % 70 Çökelti, d: Kalan kültür sıvısı.

Amonyum sülfat çöktürme sonucu Çizelge 3.20 'de elde edilen veriler incelendiğinde en fazla spesifik aktiviteye sahip olmasının yanında çöktürme sonrasında kalan süpernatantta herhangi bir enzim aktivitesi gözlemlenmediğinden, % 70 'lık amonyum sülfat çöktürmesi sonucu kültür sıvısındaki ligninolitik enzimlerin tamamının çökeltiye geçtiği görülmektedir.

3.7. Sodyum Alginat ile İmmobilize Edilen Enzimin Boya Renk Giderim Kapasitesinin Belirlenmesi

Ham kültür sıvısından ekstrakte edilerek konsantre edilen enzim çözeltisi alginat ile tutuklanarak immobilize bir preperat haline getirilmiş ve yapay atık boyar madde çözeltisinde renk giderim yeteneği ölçülmüştür.

Konsantre enzimlerin alginata immobilizasyon işlemi sırasında, immobilizasyon öncesi enzim çözeltisinde ve immobilizasyon sonrası CaCl_2 çözeltisi içerisinde lakkaz ve MnP enzimlerinin aktiviteleri ölçülerek, immobilizasyon işlemi sırasında enzimlerde aktivite kaybı olup oluşmadığı belirlenmiştir (Çizelge 3.18). Elde edilen veriler incelendiğinde konsantre enzim çözeltisi içerisinde bulunan 1360 U/L lakkaz aktivitesinden 60 U/L' lik aktivite gösteren enzim miktarı CaCl_2 çözeltisine geçerken, 4560 U/L MnP enzimi aktivitesinden 140 U/L kadar enzimin CaCl_2 çözeltisine geçtiği belirlenmiştir.

Çizelge 3.18. Konsantre edilen ham enzim çözeltisi ve immobilizasyon işlemi sonrası CaCl_2 çözeltisinde bulunan lakkaz ve MnP enzim aktiviteleri

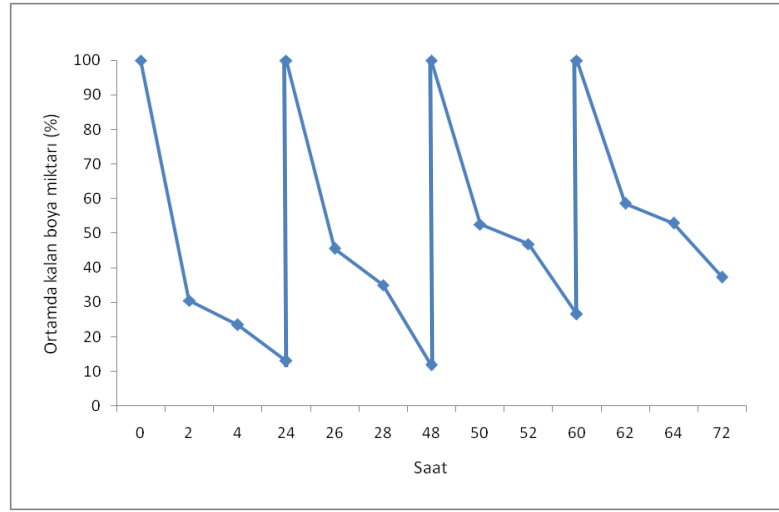
	Konsantre Kültür Sıvısı	CaCl_2 Çözeltisi
Lakkaz	1360 U/L	60 U/L
MnP	4560 U/L	140 U/L

Konsantre enzim çözeltisi içerisinde kalan enzimlerin tamamı alginat boncuklarına tutuklanmış ve 1:5 oranında yapay atık boya çözeltisi bulunan erlenlere aktarılmıştır. Zamana bağlı olarak ölçülen absorbans değerlerine bağlı olarak hesaplanan % dekolorizasyon oranları ve immobilize enzimlerin kullanım tekrar sayıları Çizelge 3.19 ve Şekil 3.36' da ifade edilmiştir. İmmobilize enzimler, ilk 24 saatin sonunda yapay atık çözeltisinde % 87 dekolorizasyona sebep olurken, sonraki

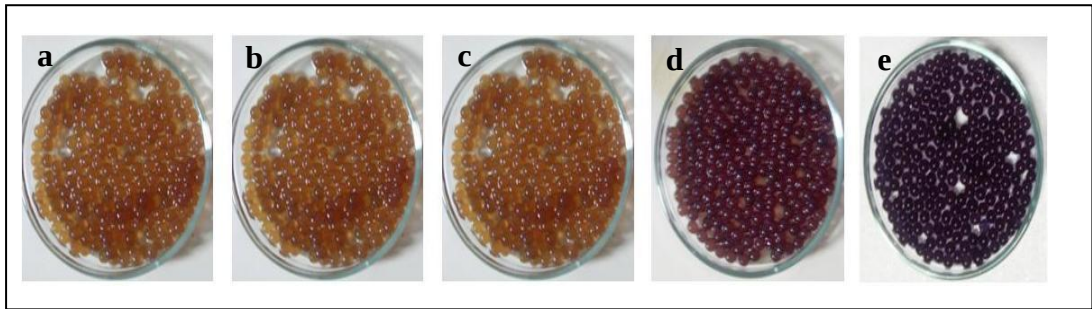
tekrarlarda bu oran sırasıyla % 88, 73 ve 63 olarak hesaplanmıştır. İmmobilize enzim kullanım tekrarı arttıkça renk giderim yeteneği düşmesine karşın, aktivitesini koruduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.40 ve Şekil 3.41).

Çizelge 3.19. Alginata immobilize edilmiş konsantre enzim çözeltisinin yapay atık boyar madde renk giderim kapasitesi ve tekrar kullanılabilirliği

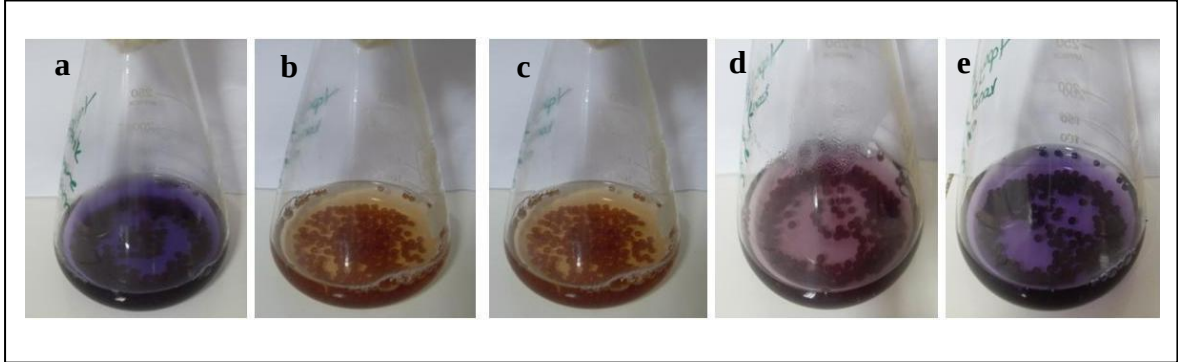
Tekrar Sayısı	Saat	% Dekolorizasyon
1	0	36
	2	69
	4	77
	24	87
2	0	13
	2	55
	4	65
	24	88
3	0	13
	2	47
	4	53
	24	73
4	0	13
	2	41
	4	47
	24	63



Şekil 3.36. Alginata immobilize edilmiş konsantre enzim çözeltisinin yapay atık boya çözeltisini renk giderim kapasitesi



Şekil 3.37. Yapay atık boyar madde çözeltisi ile işlem öncesinde (a) ve sonrasında (b: Birinci tekrar, c: İkinci tekrar, d: Üçüncü tekrar, e: Dördüncü tekrar) alginat boncukları



Şekil 3.38. Alginat boncukları ile işlem öncesinde (a) ve 24 saat sonrasında (b: Birinci tekrar, c: İkinci tekrar, d: Üçüncü tekrar, e: Dördüncü tekrar) yapay atık boyar madde çözeltileri

3.8.İmmersiyon Tip Reaktörde Boyar Madde Renk Giderimi

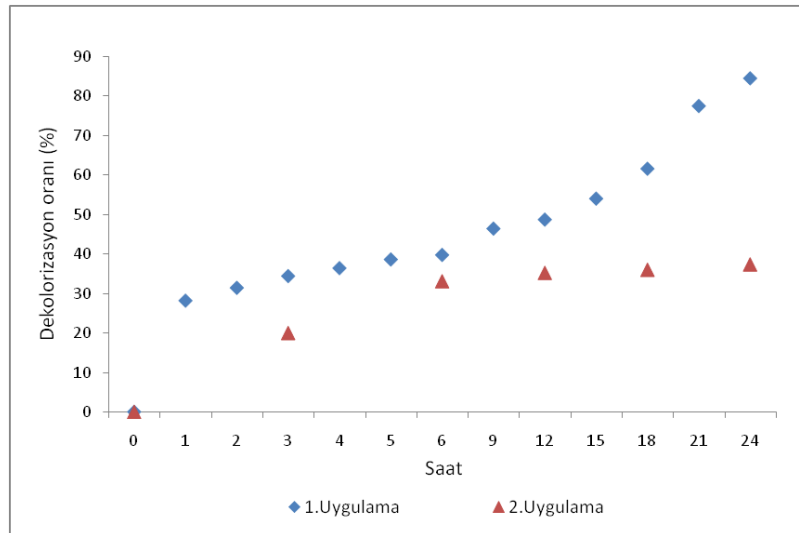
Konsantre edilerek aktivitesi arttırılan ve immobilize preparat haline getirilen enzim boncuklarının, boyar madde renk giderim kapasitelerinin araştırılmasında ölçek büyütme uygulanmış ve reaktör ölçeğinde çalışılmıştır. Bu amaçla immersiyon tip biyoreaktör kullanılmıştır.

Reaktörde yapay atık boyar madde gideriminden sorumlu enzim miktarını belirlemek amacıyla immobilizasyon işlemi öncesi konsantre enzim çözeltisinde, immobilizasyon işlemi sonrası CaCl_2 çözeltisinde, birinci ve ikinci tekrar sonrasında reaktörden alınan yapay atık boyar madde çözeltisinde MnP ve lakkaz enzim aktiviteleri hesaplanmıştır (Çizelge 3.20).

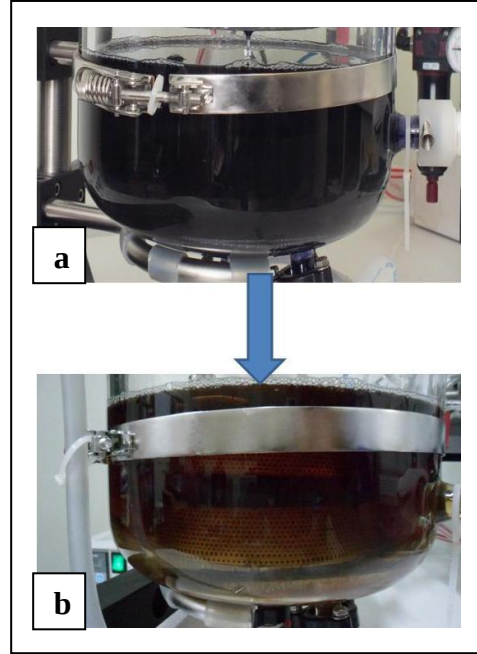
Çizelge 3.20. Reaktör ölçeğinde boyar madde giderim aşamalarında kullanılan çözeltilerde bulunan lakkaz ve MnP enzim aktiviteleri

	Konsantre Kültür Sıvısı	CaCl ₂ Çözeltisi	Yapay Atık Boyar Madde Çözeltisi	
			1.Uygulama	2.Uygulama
Lakkaz	1360 U/L	60 U/L	43 U/L	0.3 U/L
MnP	4560 U/L	140 U/L	87 U/L	0.8 U/L

Reaktör sisteminde immobilize preperatın yapay atık çözeltisi ile 0.25 batış/sn süreyle 24 saatlik inkübasyon sonucunda % dekolorizasyon değerleri hesaplanmış ve Şekil 3.45' te grafik halinde sunulmuştur. Elde edilen veriler incelendiğinde 24. saat sonunda reaktörde bulunan yapay atık çözeltisinin % 88 oranında dekolorize olurken, renk giderim çalışmasının tekrarında bu oran 24. saatin sonunda % 37 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.39).



Şekil 3.39. İmmobilize konsantre enzim çözeltisinin reaktör ölçeğinde yapay atık boyar madde renk giderim kapasitesi



Şekil 3.40. İmmobilize enzim preparatı kullanılarak immersiyon tip biyoreaktörde yapay atık boyar madde çözeltisinin renk giderimi, a: 0. Saat; b: 24. Saat

3.9. Renk Gideriminin Toksisite Üzerine Etkisi

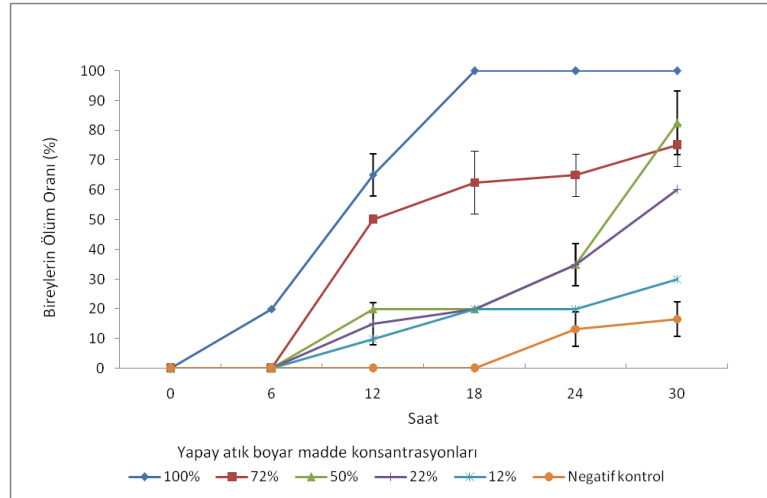
Reaktör ölçeğinde yapay atık boyar madde giderimi esnasında yapılan örneklemeler sonucu % 28, 50, 73 ve 88 oranında renk giderimi sağlanan yapay atık çözeltisinde boyar maddelerin renk giderim oranlarıyla toksisiteleri arasında bağlantı olup olmadığı *Artemia salina* larvaları kullanılarak gerçekleştirilen toksisite testi ile belirlenmiştir. İmmobilize enzimler ile muamele görmeyen boyar madde çözeltisinin 18 saatte ortamda bulunan tüm larvalarda ölüm meydana getirirken, boyar maddelerin rengi giderildikçe ölüm oranının azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.41; Çizelge 3.21).

Çizelge 3.21. İmmersiyon tip biyoreaktör sisteminde farklı boyar madde konsantrasyonlarının *Artemia salina* larvaları üzerindeki toksisite oranları

Yapay Atık Derişimi	Zaman (Saat)	Ölüm Oranı (%)
100%	0	0 ± 0
	6	20 ± 0
	12	65 ± 7
	18	100 ± 0
	24	100 ± 0
	30	100 ± 0
72%	0	0 ± 0
	6	0 ± 0
	12	50 ± 0
	18	63 ± 11
	24	65 ± 7
	30	75 ± 7
50%	0	0 ± 0
	6	0 ± 0
	12	20 ± 0
	18	20 ± 0
	24	35 ± 7
	30	83 ± 11
22%	0	0 ± 0
	6	0 ± 0
	12	15 ± 7
	18	20 ± 0
	24	35 ± 7
	30	60 ± 0

Çizelge 3.21. İmmersiyon tip biyoreaktör sisteminde farklı boyar madde konsantrasyonlarının *Artemia salina* larvaları üzerindeki toksisite oranları (Devamı)

Yapay Atık Derişimi	Zaman (Saat)	Ölüm Oranı (%)
12%	0	0 ± 0
	6	0 ± 0
	12	10 ± 0
	18	20 ± 0
	24	20 ± 0
	30	30 ± 0
Negatif kontrol	0	0 ± 0
	6	0 ± 0
	12	0 ± 0
	18	0 ± 0
	24	13 ± 6
	30	17 ± 6



Şekil 3.41. İmmersiyon tip biyoreaktör sisteminde farklı boyar madde konsantrasyonlarının *Artemia salina* larvaları üzerindeki toksisite grafikleri

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

4.1.Makrofungus İzolatlarının Ligninolitik Enzim Üretim ve Boyar Madde Renk Giderim Kapasitelerinin Belirlenmesi

Çalışmanın bu aşamasında ligninolitik enzim üretim ve boyar madde renk giderim kapasitesine sahip yeni ve etkili suşların belirlenmesi amacıyla, ülkemizin farklı bölgelerinden izole edilen ve ligninolitik enzim yetenekleri daha önce çalışılmamış olan 40 adet Basidiomycetes izolatının enzim üretim ve boyar madde giderim potansiyelleri araştırılmıştır. Kültür koleksiyonunda bulunan izolatlar arasından hızlı ve etkili bir seçim yapılabilmesi amacıyla, pek çok araştırmacı tarafından kullanılan (Levin e al., 2004a; Casieri et al., 2010; Kalmış ve ark., 2007) agarlı besiyeri ortamına enzim spesifik substrat ve renk giderim yeteneği belirlenecek boyar maddelerin eklenmesi yöntemi kullanılmıştır. Seçilen bu yöntem sayesinde besiyeri ortamına salınan ligninolitik enzimler direkt olarak substrat ve boyar maddeler ile reaksiyon vererek, yüksek enzim üretim ve boyar madde renk giderim kapasitesine sahip izolatların seçilmesinde kolaylık sağlanmıştır. Minimal Kirk ortamı düşük karbon içeriğine bağlı olarak izolatların ligninolitik enzim üretimini arttırması sebebiyle tarama besiyeri olarak tercih edilmiştir.

Makrofungus izolatlarının ligninolitik enzim üretim potansiyellerinin belirlenmesi amacıyla ABTS (Eggert et al., 1996), gallik asit ve guaicol (Imran et al., 2012;) substratları kullanılmıştır. Ligninolitik enzim üretim ve boyar madde renk giderimi kapasitesi daha önceden pek çok çalışmaya konu olan *Trametes versicolor* ATCC 200801 suşu da pozitif kontrol olarak çalışmaya dahil edilmiştir (Yeşilada ve ark., 2003; Ratto et al., 2000; Birhanlı ve Yeşilada, 2006).

Substrat içeren besiyerlerinde 20 günlük inkübasyon sonucunda elde edilen fungal büyüme ve substrat spesifik renk reaksiyon zon çapları ölçülerek 6 farklı parametreye göre değerlendirilmiş (Çizelge 3.1 - 3.3), ancak spesifik renk değişiminin ilk görüldüğü gün, petrinin tamamını kapladığı gün, zon çapının tüm petri çapına oranı (7.gün) ve fungus koloni çapına oranı (7.gün) gibi parametreler aktivitenin daha iyi vurgulanması amacıyla dikkate değer bulunarak izolat seçiminde ön planda tutulan

özellikler olmuştur. Tarama kapsamındaki 40 izolatin 38 tanesinin en az bir substrat ile reaksiyon verme kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde yapılan çalışmalardan, Hernandez-Luna ve arkadaşları (2007) Meksika' nın güneybatı bölgesinden izole ettikleri 92 beyaz çürükçül fungusun 15' inin, Levin ve ark. (2004a) Arjantin' den izole ettikleri 26 fungusun 10' unun, Machado ve arkadaşları (2005) Brezilya' dan izole ettikleri 125 fungusun 106' sının ligninolitik enzim üretim yetenekleri olduğunu bildirmişlerdir. Bu anlamda Türkiye' den izole edilen yerel makrofungus kültürlerinin ligninolitik enzim üretim potansiyelleri dikkate değer görülmektedir. İnkübasyonun 11. gününde reaksiyon zon çapının petrinin tamamını kaplamasının yanında aktivite zon çapının fungus koloni çapının 3.8 katı olması nedeniyle OBCC 3501 kodlu izolat ABTS substratında en başarılı izolat olarak göze çarpmaktadır. OBCC 1047 kodlu makrofungus izolatu ise hem guaicol hem de gallik asit substratlarında reaksiyonun tüm petriyi kaplaması ve aktivite zon çapının fungus koloni çapına oranlarının sırasıyla 4.2 ve 2.3 olması nedeniyle ligninolitik enzim üretimi açısından başarılı görülmektedir. Bu nedenle OBCC 3501 ve OBCC 1047 kodlu makrofungus izolatlarının ligninolitik enzim üretme potansiyellerin diğer makrofunguslara oranla daha yüksek olduğu düşünülmektedir. Bu makrofungus izolatlarının verileri çalışma kapsamında pozitif kontrol olarak kullanılan *Trametes versicolor* ATCC 2008001 suşunun substrat reaksiyonları ile kıyaslandığında, OBCC 3501 kodlu makrofungus izolatımızın ABTS ve gallik asit reaksiyonları, OBCC 1047 kodlu izolatımızın ise guaicol ile verdiği reaksiyon dikkat çekici bulunmaktadır.

Tekstil endüstrisinde kullanıldığı bilinen ve tekstil atık sularında bulunma potansiyelleri fazla olan farklı kimyasal gruplara ait 6 farklı boyar madde, çalışmanın ilerleyen aşamalarına öngörü oluşturması amacıyla tarama çalışmasına dahil edilmiştir. Bu amaçla makrofungus izolatları, RBBR, remazol black, cibacron blue 3R, amarant, kristal viyole ve malaşit yeşili boyar maddeleri içeren tarama besiyerlerinde 20 gün boyunca inkübe edilmiş ve 7 farklı parametreye göre değerlendirilmiştir (Çizelge 3.4 – 3.9). Ancak subtrat reaksiyonları için belirtilen 4 özellik izolatların dekolorizasyon yeteneğinin vurgulanması için öncelikli olarak değerlendirilmiştir. OBCC 36, OBCC 1015, OBCC 1021, OBCC 1022, OBCC 1047, OBCC 3501, OBCC 5002 ve OBCC 5008 kodlu makrofungus izolatlarının inkübasyonun değişik zamanlarında RBBR,

remazol black, cibacron blue 3R ve amaranth boyar maddelerinde tamamen dekolorizasyonu neden olduğu gözlemlenirken, kristal viyolede ve malaşit yeşili tam dekolorizasyon gösteren izolat(lar)a rastlanamamıştır. Literatürde daha zor yıkıldığı görülen kristal viyole boyar maddesinde yalnızca OBCC 1047 kodlu izolat inkübasyonun 5. gününden itibaren aktivite gösterse de, aktivitenin % 23.6' da kaldığı gözlemlenmiştir. Yine OBCC 26, OBCC 3001, OBCC 3006, OBCC 3501, OBCC 5002, OBCC 5008 kodlu izolatlar, zor yıkılan malaşit yeşili boya maddesinde aktivite başlangıcı gösteren izolatlar olarak göze çarpmaktadır. Diğer boyar maddelere göre daha toksik bir yapı göstermesi ve daha zor yıkılması nedeniyle kristal viyole ve malaşit yeşili (Jayasinghe ve ark., 2008) boyar maddelerinde pozitif reaksiyon sağlayan izolatlar, tam bir dekolorizasyon gözlemlenmese de dikkate değer bulunmaktadır. OBCC 3501 ve OBCC 1047 kodlu makrofungus izolatlarının, remazol black ve amaranth boyar maddelerinde kontrol suşuna göre daha etkili renk giderimine neden olduğu görülmektedir.

Substrat ve boyar madde reaksiyonları bir arada değerlendirildiğinde OBCC 1047 ve OBCC 3501 kodlu makrofungus izolatlarının ligninolitik enzim üretim yetenekleri ve boyar madde giderim potansiyellerinin diğer izolatlara oranla daha yüksek olduğu ve standart suş ile kıyaslandığında dikkate değer olduğu gözlemlenmektedir (Çizelge 3.10). Bu nedenlerle bahsedilen iki makrofungus izolatı çalışmanın diğer aşamalarında kullanılmak üzere seçilmiştir. Çalışılan diğer makrofungus izolatlarının sonraki araştırmalara konu olması planlanmaktadır.

4.2. Farklı Kültür Teknikleri ve Substratların Ligninolitik Enzim Üretimine Etkisi

Mikroorganizmaların, büyümeleri sırasında içinde bulundukları ortam koşullarının üreme ve metabolit üretimi üzerinde oldukça etkili olduğu bilinmektedir. Ortamda bulunan besinsel bileşenler ve fiziksel koşullar, organizmalar tarafından üretilen enzim, hormon, antimikrobiyal madde gibi metabolitlerin miktar ve karakterini etkileyebilmektedir. Makrofungus kültürlerinin ligninolitik enzim üretim yeteneklerinin fungusun türüne bağlı olduğu kadar, üzerinde büyüdüğü lignoselülozik materyale ve

kullanılan kültür tipine de bağlı olduğu rapor edilmektedir (Elisashvili et al., 2008). Basidiomycetes türlerinin ligninoselülozik içeriği yüksek olan bitkisel kaynaklı atık materyal üzerinde büyümeleri sırasında ligninolitik enzim üretim yeteneklerinin indüklediği pek çok araştırmacı tarafından vurgulanmaktadır (Murugesan et al., 2006; Osma et al., 2006; Irshad et al., 2011). Bu nedenle çalışmanın bu aşamasında, farklı atık tipleri ve kültür koşulları kullanılarak seçilen makrofungus izolatlarının ligninolitik enzim üretim potansiyellerinin artırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla evsel ve endüstriyel üretim prosesleri sonucu atık formuna dönüşen çay posası ve portakal kabuğu ile ligninolitik enzim üretimini arttırdığı vurgulanan buğday kepeği (Aslam and Asgher, 2011; De Souza et al., 2001; Murugesan et al., 2006) kullanılarak makrofungus izolatlarının 3 farklı kültür tipinde (katı faz, derin ve statik kültür) büyümeleri sırasında ligninolitik enzim üretimleri zamana bağlı olarak incelenmiştir. Kullanılan substratların izolatların ligninolitik enzim üretimini indükleme oranlarının kıyaslanması amacıyla, bu enzimlerin üretimini indüklediği belirtilen 2,5-ksilidin de çalışmaya dahil edilmiştir.

Yapılan çalışmalar sonucunda OBCC 1047 kodlu makrofungus izolatının farklı kültür tiplerinde kullanılan substratlarda iyi büyüme göstermesine karşın, yapılan ölçümlerde lakkaz, mangan peroksidaz ve lignin peroksidaz enzimlerinden hiçbirinin varlığına rastlanamamıştır. Bu sonuç, makrofungus izolatının lignoselülozik matreyallerde gelişimi için lignoselüloz yapısında bulunan bileşenlere yönelik farklı enzimler üretme yeteneğine sahip olduğunu düşündürmektedir. Bu nedenle izolatımızın ölçülmeyen farklı peroksidaz, hidrolaz, tirozinaz, selülaz, ksilanaz gibi enzimlerden bir veya bir kaçının üreticisi olabileceği düşünülmektedir.

OBCC 3501 kodlu makrofungus izolatının, katı faz, derin ve statik kültür yöntemleri kullanılarak farklı atık tiplerinde büyütülmesi sonucu, ligninolitik enzim üretimi zamana bağlı olarak incelenmiştir. İzolatın, katı faz kültür yönteminde portakal atığı dışında tüm kültür tipleri ve substratlarda büyüme gösterdiği gözlemlenmiştir.

Derin kültür yöntemi mikroorganizmalardan ticari enzim üretiminde en çok kullanılan fermentasyon yöntemlerinden biridir. Makrofungus izolatının bu yöntem ile

inkübasyonu sonucunda en iyi enzim üretimlerini buğday kepeği ortamında inkübasyonun 11. gününde 163.4 U/L lakkaz, 136.8 U/L MnP ve 7.4 U/L LiP; çay atığı ortamında inkübasyonun 15. gününde 15.7 U/L lakkaz, 94.4 U/L MnP, 12.5 U/L LiP; portakal kabuğu atığında inkübasyonun 11. gününde 63.1 U/L lakkaz, 259.1 U/L MnP, 41.6 U/L LiP; glikoz ortamında inkübasyonun 11. gününde 31 U/L lakkaz, 114.5 U/L MnP ve ksilidin indükleyicisi varlığında inkübasyonun 11. gününde 31 U/L lakkaz, 114.5 U/L MnP olarak gösterdiği belirlenmiştir. Derin kültür yönteminde enzim üretimine en etkili substratın buğday kepeği olduğu gözlemlenirken, ksilidin indükleyicisinin ortamda yalnız glikoz bulunan kontrole göre değerlendirildiğinde önemli derecede bir indüksiyon göstermediği gözlemlenmiştir.

OBCC 3501 izolatının statik kültür yönteminde farklı indükleyiciler varlığından büyütülmesi sonucunda en iyi enzim üretimlerinin buğday kepeği ortamında inkübasyonun 15. gününde 3.6 U/L lakkaz, 16 U/L MnP; çay atığı ortamında inkübasyonun 11. gününde 15.1 U/L lakkaz, 110.6 U/L MnP; portakal kabuğu atığında inkübasyonun 11. gününde 40 U/L lakkaz, 177.5 U/L MnP; glikoz varlığında inkübasyonun 17. gününde 4.7 U/L lakkaz, 57.8 U/L MnP ve ksilidin varlığında inkübasyonun 11. gününde 25.2 lakkaz, 208 U/L MnP olarak ölçülmüştür. Ksilidin indükleyicisi bu kültür yönteminde en iyi indükleyici olarak göze çarpmaktadır ancak enzim miktarları incelendiğinde bu kültür yönteminin ligninolitik enzim üretiminde OBCC 3501 izolatı için çok uygun olmadığı görülmektedir.

Katı faz kültür yöntemi özellikle funguslar için yaygın biçimde kullanılan bir kültür yöntemidir. Son yıllarda bu kültür yöntemi ticari enzim üretimi için oldukça yaygın kullanım alanı bulmaktadır. OBCC 3501 izolatımızın bu kültür yöntemiyle büyütülmesi sırasında en iyi enzim üretimleri buğday kepeği ortamında inkübasyonun 8. gününde 108 U/L lakkaz, 427.4 U/L MnP ve çay atığı ortamında inkübasyonun 11. gününde 114.5 U/L lakkaz, 438.1 U/L MnP, 15.9 U/L LiP olarak belirlenirken, organizma portakal kabuğu atığında büyüme göstermediğinden herhangi bir enzim aktivitesine rastlanmamıştır. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde katı faz kültür yöntemi ile fermentasyon sürecinde en iyi indükleyici tipinin fenolik içeriği fazla olan çay atığı olduğu göze çarpmaktadır.

Çalışma kapsamında değerlendirilen kültür yöntemlerinden OBCC 3501 kodlu makrofungus izolatu için en uygun yöntemin katı faz kültür yöntemi olduğu belirlenirken, makrofungusun bu kültür yönteminde çay atığında inkübasyonun 11. gününde her üç ligninolitik enzimi maksimum ürettiği görülmektedir. Shimokawa ve arkadaşları (2008) özellikle lignin degrade etme yeteneğine sahip beyaz çürükçül fungusların doğal yaşam alanlarını temsil ettiği için katı faz kültür yönteminin funguslar tarafından ligninolitik enzim üretiminde daha başarılı bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir. Elde edilen bu sonuç bu görüşü desteklemektedir.

Çizelge 4.1. Bazı basidiomiset izolatların katı faz kültür yöntemi ile ligninolitik enzim üretimleri

Tür Adı	İndükleyici	Maksimum Aktivite			Gün	Referans
		Lakkaz	MnP	LiP		
<i>Ganoderma lucidum</i>	Buğday kepeği	2540 U/g	211 U/g	-	7	Murugesan et al., 2006
<i>Pleurotus pulmonaris</i>	Buğday kepeği	8600 U/g	-	-	5	De Souza et al., 2001
<i>Trametes pubescens</i>	Muz kabuğu	1600 U/l	-	-	20	Osma et al., 2006
<i>Earliella scabrosa</i>	Şeker kamışı küspesi	4.4 U/g	3.692 U/g	-	11	Guerra et al., 2008
<i>Trametes maxima</i>	Şeker kamışı küspesi	0.313 U/g	2.166 U/g	-	14	Guerra et al., 2008
<i>Ganoderma zonatum</i>	Şeker kamışı küspesi	4.7 U/g	5.4 U/g	-	9	Guerra et al., 2008
<i>Trametes hirsuta</i>	Kağıt atıkları	7695 U/L	-	-	9	Couto, 2007
<i>Lentinus squarrosulus</i>	Mısır sapı	154.5 U/L	13 U/L	-	6	Isikhuemhen et al., 2012
<i>Schizophyllum commune</i>	Muz sapı	367 U/ml	-	-	6	Irshad et al., 2011
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Buğday kepeği	455 U/ml	211 U/ml	55 U/ml	7	Aslam and Asgher, 2011
<i>Schizophyllum sp.</i>	Çam odunu	-	200 U/L	-	10	Xiaobin et al., 2006

Çizelge 4.1. Bazı basidiomiset izolatların katı faz kültür yöntemi ile ligninolitik enzim üretimleri (Devamı)

Tür Adı	İndükleyici	Maksimum Aktivite			Gün	Referans
		Lakkaz	MnP	LiP		
<i>P. chrysosporium</i>	Yalancı tespih ağacı gövdesi	34.2 U/g	54.2 U/g	243 U/g	20	Verme and Maddwar, 2002
<i>P. ostreatus</i>	Yalancı tespih ağacı gövdesi	156.2 U/g	20.2 U/g	254 U/g	20	Verme ve Maddwar, 2002
OBCC 3501	Çay atığı	114.5 U/L 22.9 U/g	438.1 U/L 87.62 U/g	15.9 U/L 3.18 U/g	11	Bu çalışma

Lignin parçalama özelliğine sahip beyaz çürükçül fungusların tarımsal atıklar kullanılarak katı faz fermentasyonu ile enzim üretimleri pek çok araştırmaya konu olmuştur. Bu amaçla yapılan bazı çalışmalar ve elde edilen enzim üretim sonuçları Çizelge 4.1’ de sunulmuştur. OBCC 3501 kodlu makrofungus izolatımızın çay atığı içeren ortamda ürettiği enzim miktarları literatürle kıyaslandığında dikkate değer bulunmaktadır.

Eldeki verilerin değerlendirilmesi sonucu, çalışmanın ilerleyen aşamalarında OBCC 3501 kodlu izolatımızın en yüksek enzim üretimini gerçekleştirdiği koşullar kullanılmıştır.

4.3.Makrofungus İzolatlarının Moleküler Yöntemlerle Tanılanması

Çalışma materyalini oluşturan Basidiomycetes izolatları, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Fungikültür Laboratuvarında çalışmış bulunan önceki araştırmacılar tarafından toplanarak laboratuvar ortamına getirilmiş ve geleneksel yöntemlerle tanımlanmaya çalışılmıştır. Ancak son yıllarda gelişen moleküler yöntemler kullanılarak DNA temelli tanımlama yöntemleri, izolatların tanılanması ve isimlendirilmesi açısından daha değerli bilgiler sunmaktadır. Bu nedenle ligninolitik enzim üretim yetenekleri farklı kültür tipleri ve indükleyiciler

ortamında araştırılan OBCC 1047 ve OBCC 3501 kodlu makrofungus izolatları, geleneksel yöntemlerin yanı sıra moleküler yöntemlerle de tanımlanmaya çalışılmıştır.

Makrofungus izolatları, rDNA-ITS dizilimlerinin Gen Bank: www.ncbi.nlm.nih.gov veri tabanında BLAST taraması yapılarak veri tabanına kayıtlı makrofungus suşları ile benzerlik oranlarının belirlenmesi yolu ile tanımlanmıştır. Elde edilen filogenetik ağaçların incelenmesi sonucunda OBCC 1047 kodlu izolatın *Epicoccum* spp. (Accession# JF694747.1 ve HQ914879.1) ve *Phellinus pectinatus* (AY189705.1) suşlarına % 98 oranında benzediği belirlenirken, OBCC 3501 kodlu izolatın *Polyporus arcularius* türüne (Accession# AF516524.1) % 97 oranında benzediği belirlenmiştir. Böylece OBCC 3501 kodlu makrofungus izolatu hem geleneksel hem de moleküler yöntemlerle *Polyporus arcularius* olarak tanımlanırken, OBCC 1047 kodlu izolat kesin olarak tanımlanamamıştır.

Farklı substrat ve kültür koşullarında MnP, lakkaz ve LiP enzimlerini ürettiği belirlenen *Polyporus arcularius* izolatının, daha önce yapılan çalışmalarda da bu enzimleri ürettiğinin belirlenmesi çalışmalarımızla paralellik göstermektedir (Okino et al., 2001).

4.4. Enzimlerin Girişim / Maskeleye Oranlarının Belirlenmesi

Substrat oksidasyonuna bağlı olarak yapılan spektrofotometrik ölçümler sonucunda *Polyporus arcularius* izolatının lakkaz, MnP ve LiP enzimlerini üretme yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir. Ancak bazı araştırmacılar tarafından DMP substratının lakkaz aktivitesi ölçümünde (Nyanhongo et al., 2001; Johannes and Majcherczyk, 2000), ABTS substratının ise MnP aktivitesi ölçümünde (Yuri et al., 2006; Xiaobin et al., 2007) kullanıldığı bilgilerine rastlanmıştır. Bu nedenle substrat oksidasyonuna bağlı ölçümlerin, enzimlere özgü olup olmadığına dair onaylama testlerine ihtiyaç duyulmuştur. Bu amaçla MnP-ABTS ve lakkaz-DMP girişim testleri uygulanmıştır.

Yapılan MnP-ABTS girişim testi sonucunda, MnP enziminin ABTS oksidasyonuna dikkate değer bir katkı yapmadığı gözlemlenmiştir. Aynı şekilde DMP oksidasyonundan sorumlu enzimatinin tamamının MnP kaynaklı olup olmadığının anlaşılması için yapılan lakkaz-DMP girişim testi sonucunda DMP oksidasyonun % 91' inin MnP kaynaklı olduğu belirlenmiştir. Elde edilen verilere dayanarak çalışma kapsamında yapılan substrat oksidasyonuna bağlı ölçümlerin büyük çoğunluğunda substrat spesifikliğini koruduğu belirlenmiştir.

4.5. *Polyporus arcularius* İzolatının Boyar Madde Renk Giderim Kapasitesini Belirlenmesi

Lignin parçalama özelliğine sahip beyaz çürükçül funguslar tarafından üretilen ligninolitik enzimlerin, klorlu organik bileşikler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, sentetik polimerler ve sentetik azo boyar maddeler gibi pek çok rekalsitrant ksenobiyotiklerin degradasyonunda görev aldığı bildirilmektedir (Svobodova et al., 2006; Rabinovich et al., 2004). Ligninolitik funguslar tarafından gerçekleştirilen boyar madde gideriminin ise lakkaz, MnP ve LiP enzimlerinin üretimleriyle doğru orantılı olduğu görülmektedir (Saparrat and Guillen, 2005; Levin et al., 2004b). Bu bilgilere dayanarak *Polyporus arcularius* izolatı tarafından üretilen ligninolitik enzimlerin, tekstil endüstrisinde kullanılan boyar madde renk giderim potansiyelleri araştırılmıştır.

Polyporus arcularius izolatının çay atığı ortamında katı faz kültürü yöntemiyle büyümesi sonucundan inkübasyonun 11. gününde ekstrakte edilen ham enzim çözeltisi 6 farklı boyar madde ile muamele edilerek kültür sıvısında bulunan ligninolitik enzimlerin *in vitro* koşullarda boyar madde renk giderim kapasitesi belirlenmiştir. Bu amaçla RBBR (antrakinon grubu), remazol black (reaktif), cibacron blue 3R (reaktif), amaranth (azo grubu), kristal viyole (trifenil metan grubu) ve malaşit yeşili (trifenil metan grubu) boyar maddelerinin renk giderimi araştırılmış ve ham enzim ile 4 saat inkübasyon sonucunda boyar maddelerin sırasıyla % 62, 8, 80, 20, 57 ve 37 oranında renginin giderildiği belirlenmiştir. Cibacron blue 3R boyası ham enzim çözeltisi

tarafından en fazla rengi giderilen boyar madde olurken, remazol black renk gideriminin en düşük olduğu gözlemlenmiştir. Makrofungus izolatının ham enzim çözeltisinin yüksek toksisiteye sahip ve zor yıkılan özellikteki kristal viyole ve malaşit yeşili boyar maddelerinde meydana getirdiği renk giderim oranları da dikkate değer görülmektedir (Jones and Falkinham, 2002).

Organik kirleticilerin degradasyonu esnasında ortama ilave edilen moleküler ağırlığı düşük redoks mediatörlerinin ligninolitik enzimlerin çalışmasını düzenleyerek aktiviteleri arttırdığı bilinmektedir (Husain and Husain, 2008; Michizoe, 2003). Bu nedenle hem MnP hem de lakkaz enzimlerinin çalışması esnasında ortamın redoks potansiyelini düşürerek, enzimlerin çalışmasını düzenlediği bilinen HBT maddesi ortama ilave edilerek, ham enzim çözeltisinin boyar madde renk giderim kapasitesi araştırılmıştır (Call and Mücke, 1996; Khelifi et al., 2009; Michizoe et al., 2003). Ortama mediatör ilave edilmesi ile RBBR dekolorizasyonu 2. saatte % 92' ye, remazol black dekolorizasyonu 4. saatin sonunda % 82' ye, cibacron blue 3R dekolorizasyonu 1.5 saatte % 100' e, amaranth dekolorizasyonu 2. saatin sonunda % 100' e, kristal viyole dekolorizasyonu 4 saatte % 87' ye ve malaşit yeşili dekolorizasyonu 3. saatin sonunda % 100 e çıkarılmıştır. Ortama HBT mediatörü ilavesi ile cibacron blue 3R, amaranth ve malaşit yeşili boyar maddelerinin renginin tamamı giderilirken diğer boyar maddelerin renk giderim oranlarının gözle görülür derecede arttığı gözlemlenmiştir.

Beyaz çürükçül fungusların boyar madde ilaveli karbon ve azot kaynaklarında büyütülmesi sırasında (*in vivo*) boyar madde renk giderimi çalışmaları çoğunlukta olsa, fungal kültürlerden elde edilen ham enzimlerle yapılan *in vitro* çalışmaların daha kısıtlı olduğu görülmektedir. Xiaobin ve arkadaşlarının (2007) *Schizophyllum sp.* F17 suşundan izole ettikleri MnP enzimi ile Kongo red, Orange G ve Orange IV boyar maddelerinin giderimini araştırmış, Orange IV boyar maddesinin rengi 1 saat içerisinde % 30 oranında giderilirken H₂O₂ yokluğunda diğer boyar maddelerde renk giderimi gözlemlenmemiştir. Bir diğer çalışmada *Irpex lacteus* makrofungusunun statik ve karıştırmalı kültürlerde büyütülmesi ile elde edilen MnP enzimi ile yapılan *in vitro* boyar madde giderim çalışmasında RBBR, Bromofenol blue ve Cu-fitalosiyanın sentetik boyar madde kullanılmıştır ve sırasıyla % 95, 88 ve 39.5 renk giderimi elde

etmiştir (Svobodova et al., 2006). Ünyayar ve arkadaşları (2004), *Funalia trogii* fungusunun katı faz fermentasyonu ile büyütülmesi ile elde edilen ham kültür filtratıyla, bir metalo azo boyar madde olan Drimaren blue X3LR giderimini araştırmış ve % 81.33 renk giderimi elde etmişlerdir. *Polyporus arcularius* izolatından elde edilen MnP enzimi ile gerçekleştirdiğimiz *in vitro* boyar madde giderimi çalışmamızda, ortama madiatör ilavesi ile elde edilen renk giderim değerlerinin dikkate değer olduğu görülmektedir.

Beyaz çürükçül funguslar tarafından üretilen lakkaz ve MnP gibi ligninolitik enzimlerin her ikisinin de boyar madde gideriminde rol aldığı pek çok araştırmacı tarafından konu edilmiştir (Saparrat and Guillen, 2005; Nagai et al., 2002; Levin et al., 2004b). *Polyporus arcularius*’ tan elde edilen ham kültür sıvısında ağırlıklı MnP ve lakkaz ligninolitik enzimlerinin varlığı belirlenmiştir. Kültür sıvısında bulunan iki enzimden hangisinin boyar madde gideriminde rol aldığını belirlemek amacıyla enzimlerin spesifik inhibisyonu sağlanarak boyar madde dekolorizasyonları araştırılmıştır. Bu amaçla lakkaz ve MnP enzimlerinin belirli oranlarda spesifik olarak inhibe ettikleri rapor edilen sodyum azid ile lakkaz enziminin spesifik inhibisyonu olduğu belirtilen n-propil gallat kullanılmıştır (Kasinath et al., 2002; Novotny et al., 2004; Johannes and Majcherczyk, 2000). Enzimlerin bulunduğu ham kültür çözeltisi değişik konsantrasyonlarda sodyum azid ve n-propil gallat ile zamana bağlı olarak muamele edilerek elde edilen veriler Çizelge 3.14 ve 3.15’ de sunulmuştur. Kültür sıvısında bulunan MnP ve lakkaz enzimlerinin 4 saat boyunca 100 µM sodyum azid ile muamele edilmesiyle % 90 ve 99 oranında inhibe olurken, 5000 µM n-propil gallat ile muamele sonucunda sırasıyla % 57 ve 100 oranında inhibe olduğu belirlenmiştir. Kasinath ve arkadaşları (2002) tarafından gerçekleştirilen benzer bir çalışmada 100 µM derişimdeki n-propil galatın MnP enzimi üzerinde % 68, lakkaz enzimi üzerinde % 100 inhibisyona neden olduğu bildirilmiştir ki bu sonuç bizim sonuçlarımızla örtüşmektedir. Aynı araştırmacıların bir başka çalışmasında sodyum azid inhibitörü kullanılarak elde edilen inhibisyon oranları da çalışmamızın sonuçlarını destekler niteliktedir (Novotny et al., 2004).

Spesifik inhibisyonu gerçekleştirilen lakkaz ve MnP enzimleri ile boyar madde dekolorizasyon çalışmaları tekrarlanmış ve elde edilen veriler Çizelge 3.16’ da

sunulmuştur. Yapılan çalışmalar sonucunda ham enzim çözeltisi yoluyla elde edilen boyar madde renk gideriminin MnP enzimi kaynaklı olduğu belirlenmiştir. Cameroro ve arkadaşları (2005) tarafından yapılan çalışmada, *P. chrysosporium* tarafından gerçekleştirilen azo boyar madde renk gideriminin MnP kaynaklı olduğu rapor edilmiştir. *Trametes trogii* makrofungusu ile gerçekleştirilen bir diğer çalışmada, malaşit yeşili boyar maddesi renk gideriminden sorumlu enzimin MnP olduğu belirtilmiştir (Levin et al., 2004b).

4.6. Mangan Peroksidaz Enziminin Aktivitesi Üzerine Kinetik Çalışmalar

Enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonların en yüksek verimde gerçekleşmesi, pH ve sıcaklık gibi temel fiziksel faktörlerin optimize edilmesine bağlıdır (Erkurt, 2006). Enzimlerin optimum aktivite gösterdiği pH ve sıcaklık noktaları ile bu noktalardaki stabiliteleri, üretici mikroorganizma ve kullanılan substrat karakteri gibi özelliklere göre değişim gösterebilmektedir. Bu nedenle çalışma kapsamında *Polyporus arcularius* izolatu tarafından üretilen ve boyar madde giderim kapasitesi belirlenen mangan peroksidaz enziminin aktivite gösterdiği optimum pH ve sıcaklık noktaları DMP substratı kullanılarak araştırılmıştır. Belirlenen optimum pH ve sıcaklık noktalarında enzim aktivitesinin ne kadar süre ile devam ettiği belirlenmiştir.

Makrofungus tarafından üretilen MnP enziminin pH 4.8’ de optimum aktivite gösterdiği belirlenirken, bu pH noktasında 12 saat boyunca aktivitesini koruduğu gözlemlenmiştir. 72 saat boyunca devam eden stabilite çalışması sonucu 72. saatin sonunda enzim aktivitesinin % 50 oranında korunduğu belirlenmiştir. Makrofungus türlerinden izole edilen mangan peroksidaz enzimlerinin optimum çalıştıkları pH noktaları başka araştırmacılar tarafından da konu edilmiş, *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium* ve *Stereum ostrea* funguslarından izole edilen MnP enziminin bizim çalışmamızla benzer şekilde pH 4.5 maksimum aktivite gösterirken, *Schziophyllum sp.* fungusundan izole edilen MnP’ nin pH 6.8 noktalarında maksimum aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Ürek ve Pazarlıoğlu, 2003; Xinobin et al., 2007; Praveen et al., 2012).

Çalışma kapsamında 8 farklı sıcaklık derecesi araştırılmış, mangan peroksidaz enziminin en iyi çalışma sıcaklığı 40 °C olarak belirlenmiştir. Bu sıcaklık derecesinde enzim aktivitesinin ilk 5 saat süresince sabit devam ettiği, 72. saatin sonunda aktivitenin % 53 oranında kaybedildiği belirlenmiştir. Praveen ve ark. (2012) tarafından yapılan MnP aktivitesi çalışmasında enzimin optimum sıcaklığı 35 °C olarak belirlenirken, bizim de belirlediğimiz gibi enzimin 60 °C' ye kadara aktivitesi koruduğu belirlenmiştir. Yine değişik makrofungus türleri ile gerçekleştirilen sıcaklık çalışmalarında MnP enzimlerinin optimum çalışma aralıkları 30 – 40 °C olarak belirlenmiştir (Ürek ve Pazarlıoğlu, 2003; Xinobin et al., 2007; Yamak ve ark., 2009).

Michealis-Menten eşitliğine bağlı olarak yapılan kinetik hesaplamalarla enzimlerin farklı substratlara olan ilgileri belirlenmektedir. *Polyporus arcularius* izolatımızdan elde edilen mangan peroksidaz enziminin DMP substratı varlığında K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 1.37 mM ve 0.135 mM/sn olarak belirlenmiştir. Yüksek K_m değerine sahip substratların düşük enzim ilgisine sahip olduğu, dolayısıyla K_m değeri yüksek olan bileşiklerin enzimler tarafından daha zor yıkıldığı Enayatzamir ve arkadaşları (2009) tarafından bildirilmiştir. Bu nedenle, elde ettiğimiz enzimin düşük K_m değerine sahip olması dikkat çekici bulunmaktadır. Benzer şekilde Xiaobin ve arkadaşları (2007) *Schizophyllum sp.* F17 mangan peroksidazının substrat spesifik kinetik parametrelerinin araştırdıkları çalışmalarında DMP substratı için 122.9 μ M K_m ve 6.4 V_{max} değerleri hesaplamışlardır.

4.7. Ham Enzimin Amonyum Sülfat Çöktürmesi İle Konsantre Edilmesi

Polyporus arcularius izolatının katı faz kültür yöntemiyle büyütülmesi ile elde edilen ham kültür sıvısındaki lakkaz ve MnP enzimlerin konsantre hale getirmek amacıyla iki kademeli amonyum sülfat çöktürmesi uygulanmıştır. Çöktürmenin birinci aşamasında % 30 ' luk doygunluk derecesi kullanılarak, büyük molekül ağırlığına sahip proteinlerin çöktürülmesi sağlanmıştır (Erarslan, 2000). % 30 ' luk çöktürme sonrasında kültür sıvısında bulunan lakkaz ve MnP enzimlerinin bir kısmı çökeltiye geçmesine karşın, büyük bir kısmının sıvıda kaldığı gözlemlenmiş bu nedenle bir üst çöktürme

derecesine çıkmıştır. Uygulanan % 70 ‘ lik çöktürme sonrasında kültür sıvısında bulunan lakkaz ve MnP enzimlerinin tamamının çökeltiye geçtiği, her iki enzimin de çözelti içerisinde yaklaşık 10 kat daha konsantre hale geldiği belirlenmiştir. Praveen ve arkadaşları (2012), Murugesan ve arkadaşları (2006), Irshad ve arkadaşları (2011) tarafından gerçekleştirilen farklı çalışmalarda, elde ettiğimiz verilere benzer şekilde lakkaz ve MnP enzimlerinin kısmi konsantrasyonunda enzimlerin doygunluk derecesinin % 70 tuz konsantrasyonu olduğu belirlenmiştir.

Ham enzim çözeltisinin kısmi konsantrasyon işlemi aşamasında her bir basamakta çözelti içerisinde protein miktarları belirlenerek spesifik aktivite ve saflaştırma faktörü hesaplanmıştır. % 70’ lik amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda protein başına düşen enzim spesifik aktivitesi 2.275 U/mg olarak belirlenirken, seyreltme faktörü 1.381 olarak belirlenmiştir. Ünyayar ve arkadaşlarının (2005) *Funalia trogii* fungusundan izole ettikleri lakkaz ve peroksidaz enzimlerinin % 80 amonyum sülfat çöktürmesi ile kısmi konsantrasyonunda 1.63 U/mg spesifik aktivite ve 1.02 saflaştırma faktörü hesaplanmıştır. Başka bir çalışmada *Pleurotus ostreatus* izolatının katı faz fermentasyonu ile buğday kepeği ortamında büyütülmesi ile elde edilen mangan peroksidaz enziminin % 85 amonyum sülfat çöktürmesi ile kısmi konsantrasyonunda spesifik aktivite 0.243 U/mg, saflaştırma faktörü 1.16 olarak belirtilmiştir (Aslam and Asgher, 2011). % 70 ‘ lik amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilen spesifik aktivite ve saflaştırma faktörü değerleri ligninolitik enzimlerin kısmi konsantrasyonun işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.

4.8. Sodyum Alginat ile İmmobilize Edilen Enzimin Boya Renk Giderim Kapasitesinin Belirlenmesi

Ülkemiz ve dünyada gelişen tekstil endüstrisinin bir sonucu olarak doğaya deşarj edilen atık sulardaki boyar maddelerin doğal yollarla yıkımı çalışmalarımızın son hedefini oluşturmaktadır. Optimum koşullarda üretilerek izole edilen ligninolitik enzimlerin boyar madde renk gideriminde uygulama kolaylığı sağlanması ve tekrar kullanılabilir olması amacıyla bir matrikse immobilize edilerek preparat haline

getirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla 6 farklı boyar madde üzerinde renk giderim özelliği belirlenen ve konsantre hale getirilen ham enzim çözeltisi sodyum alginata immobilize edilerek, oluşturulan yapay atık boyar madde çözeltisinde renk giderim kapasitesi ve tekrar kullanılabilirliği araştırılmıştır. Endüstriyel boyar madde atıkları genellikle boyar maddelerin karışımı halindedir. Bu nedenle sahada uygulanabilirlik sağlanması amacıyla immobilize enzimlerin giderim kapasiteleri oluşturulan yapay boyar madde karışımında araştırılmıştır (Yeşilada ve ark., 2010).

Konsantre edilen enzimlerin immobilizasyonu sırasında kültür sıvısında bulunan lakkaz aktivitesinin % 95.7 ‘ lik, MnP aktivitesinin % 97.0 ‘ lik kısmı başarı ile korunarak immobilize alginat boncukları içerisinde tutuklanmıştır.

24 saatlik inkübasyon sonunda immobilize enzim preparatı, yapay atık boyar madde çözeltisinde % 87’ lik dekolorizasyona sebep olmasının yanı sıra, sonraki 3 tekrarda preparatın giderim yeteneğini koruduğu gözlemlenmiştir. Elde edilen degradasyon verileri, bir sonraki reaktörde ölçek büyütme aşamasında ön değerlendirme amacı ile kullanılmıştır.

4.9. İmmersiyon Tip Reaktörde Boyar Madde Renk Giderimi

Tekstil atık sularının renginin biyolojik sistemler ile giderilmesi son yıllarda popüler bir çalışma alanı olmasına karşın, büyük ölçekli ve steril olmayan uygulanabilir prosesler geliştirmekle ilgili çalışmaların çok yaygın olmadığı görülmektedir. Boyar madde giderimi ile ilgili yapılan pek çok çalışma erlen ölçekli olarak yapılmaktadır. Bunun yanında çeşitli makrofungus izolatlarının değişik biyoreaktör sistemlerinde ligninolitik enzim üretim ve boyar madde giderim yeteneklerinin belirlenmesi ile ilgili farklı çalışmalar bulunmaktadır (Moreira et al., 2003; Srikanlayanukul et al., 2008; Baccar, 2011, Couto et al., 2001). Bunlardan Couto ve arkadaşları kendi geliştirdikleri immersiyon tip reaktör sisteminde *Phanerochaete chrysosporium* suşunu kullanarak, makrofungus izolatının katı faz fermentasyonu ile ligninolitik enzim üretimini araştırmış ve başarılı sonuçlar elde etmiştir. Reaktör sistemlerinde makrofungusun kendisi kullanılarak yapılan giderim çalışmaları örneklerine rastlansa da steril olmayan

koşullarda direkt enzimlerin kullanıldığı çalışmalara yaygın olarak rastlanılmamaktadır. Bu nedenle tekstil atık sularında uygulanabilir bir preparat haline getirilen *Polyporus arcularius* ligninolitik enzimlerinin yapay atık boyar madde giderim kapasiteleri ölçek büyütme uygulanarak immersiyon tip reaktör sisteminde araştırılmıştır.

İmmersiyon tip reaktörün kafeslerine yerleştirilen immobilize enzim preparatları, 0.25 batış/sn hızla 24 saat boyunca yapay atık boyar madde çözeltisi ile muamele edilmiş, 24. saatin sonunda % 88 oranında renk açılımı gözlemlenmiştir. *Polyporus arcularius* izolatu tarafından sentezlenen ligninolitik enzimlerin, reaktör ölçeğinde 6 farklı boyar maddeden oluşan yapay atık çözeltisinde meydana getirdiği bu giderim dikkate değer görülmektedir.. Daha önce erlen boyutunda gerçekleştirdiğimiz yapay atık boyar madde giderim çalışmalarında, immobilize enzim boncukları 4 tekrarlı kullanılmış ve enzim kapasitesinde % 24' lük bir düşüş gözlemlenmişti ancak reaktör ölçekli çalışmamızda immobilize enzimler iki tekrarlı kullanılabilmiş degradasyon oranında % 51 oranında düşüş gözlemlenmiştir. Kullanılan enzim/substrat oranının ve enzim aktivitesi değerlerinin bunun başlıca nedeni olduğu tahmin edilmektedir. Bu nedenle enzim miktarının artırılması ve ileri saflaştırma teknolojileri ile enzimlerin aktivitesini artırılması gibi çalışmalarla reaktör ölçeğinde daha başarılı sonuçlar alınacağı düşünülmektedir.

4.10. Renk Gideriminin Toksisite Üzerine Etkisi

Çalışmalarımız süresince ligninolitik enzimlerin boyar madde renk giderim kapasiteleri, enzimler ile muamele sonrasında boyar maddelerde meydana gelen spektrofotometrik absorbans düşüşleri ile hesaplanmıştır. Enzimler ile muamele sonucu boyar maddelerin metabolize ya da kometabolize olması sonucu renk giderimi sağlanabilmektedir. Ancak enzimatik reaksiyonlar sonucu boyar maddenin yapısına bağlı olarak toksisite azalabilmekte ya da artabilmektedir (Ramsay and Nguyen, 2002). Bu nedenle immersiyon tip reaktörden alınan ve belirli oranlarda renk giderimi sağlanan örneklerin *Artemia salina* larvaları üzerindeki toksik etkileri araştırılmış,

spektrofotometrik olarak ölçülen renk giderimi ile toksisite arasında korelasyon olup olmadığı bakılmıştır.

A. salina larvaları kullanılarak gerçekleştirilen toksisite testi sonucunda renk giderimi arttıkça, degradasyon ürünlerinin toksisite değerlerinde de düşüş gözlemlenmiştir. İşlem görmemiş yapay atık boyar madde çözeltisinin 24 saat sonunda larvalar üzerinde % 100 ölüm oranına sebebiyet verirken, % 88 oranında renk gideriminin sağlandığı degradasyon ürününün aynı larvalar üzerinde % 20 ölüm oranı gösterdiği belirlenmiştir. Başka bir deyişle enzimatik yolla yapay atık boyar madde çözeltisinin rengi giderilirken toksisitenin de % 80 oranında azaltılabildiği gözlemlenmektedir.

Singh ve arkadaşları (2010) tarafından gerçekleştirilen; *Pleurotus sajor-caju* makrofungusunun katı faz yöntemiyle üretilmesi sonucu elde edilen LiP enzimi ile sentetik tekstil boyar madde giderim çalışmasında % 91.6 renk giderimi elde edilmesine rağmen, toksisitede % 37.5 azalma olduğu gözlenmiştir. Bir diğer çalışmada *Trametes pubescens* ve *Pleurotus ostreatus* makrofunguslarının immobilize miselleri kullanılarak elde edilen boyar madde gideriminde, suşların boyar maddede meydana getirdikleri renk giderimleri ile toksisite değerlerinin paralellik göstermediği, *P. ostreatus* kullanılan 3 boyar madde üzerinde daha iyi renk giderimi göstermesine karşın *T. pubescens* suşu ile elde edilen boyar madde giderimlerinde toksisitenin daha çok azaldığı belirlenmiştir (Casieri et al., 2007). Boyar maddelerin giderimi sonrasında yapılan toksisite çalışmaları ile kıyaslandığında *Polyporus arcularius* izolatımızdan izole ettiğimiz MnP ve lakkaz enzimleri çözeltisinin yüksek oranda renk gideriminin yanı sıra, boyar maddeleri detoksifiye etme kapasitelerinin de oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir (Palacio et al., 2009; Manal et al., 2003; Dellamtrice et al., 2005).

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, yeni ve yerel ligninolitik enzim kaynağı beyaz çürükçül fungusların bulunması ve elde edilen yeni ligninolitik enzim kaynaklarının çevresel bir kirlilik etmeni olan tekstil endüstrisi atık sularının degradasyonunda kullanım potansiyellerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Beyaz çürükçül funguslar ürettikleri ligninolitik enzimlerden dolayı doğada yıkımı zor olan rekalsitrant aromatik bileşiklerin degradasyonunda önemli bir yere sahiptir. Son yıllarda beyaz çürükçül funguslar ve sahip oldukları ligninolitik enzim sistemleri kullanılarak yapılan biyoyıkım çalışmaları giderek ilgi kazanmaktadır. Bu nedenle yeni ve etkili ligninolitik enzim üreticisi mikroorganizmaların bulunması önemli bulunmaktadır. Çalışmamız kapsamında daha önce ligninolitik enzim üretimleri çalışılmamış 40 adet Basidiomycetes izolatu, ligninolitik enzim üretimi ve boyar madde giderimi açısından taranmış, 38 izolatu ligninolitik enzim üreticisi olduğu belirlenirken bunlardan 11 tanesi farklı boyar maddelerde dikkate değer renk giderim özelliği göstermiştir.

Beyaz çürükçül funguslar tarafından gerçekleştirilen ligninolitik enzim üretim miktar ve çeşidinin, fungus türüne bağlı olduğu kadar ortamın besinsel ve fiziksel özelliklerine bağlı olarak değişim gösterdiği rapor edilmektedir (Elisashvili et al., 2008). Tarımsal ve endüstriyel üretim sonucunda atık formuna dönüşen lignoselülozik içeriği yüksek materyaller, beyaz çürükçül funguslar tarafından karbon ve azot kaynağı olarak kullanılmaktadır. Atık formundaki bu materyallerin bu amaçla değerlendirilmesi aynı zamanda organik kirliliğin azaltılmasında rol oynaması açısından önemli bulunmaktadır. Tarımsal atık ve kültür tiplerinin izolatların ligninolitik enzim üretimine etkisi belirlemek için gerçekleştirdiğimiz çalışmalarda, OBCC 3501 kodlu izolatımızın katı faz kültür yöntemiyle çay atığında büyütülmesi sırasında maksimum enzim üretimi gerçekleştiği belirlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuç ülkemizde yaygın olarak bulunan çay atığının değerlendirilmesi açısından umut vaad edici bulunmaktadır. Çay üretimi ülkemizde önemli tarım ürünleri arasında yer almakta, ürünün fabrikalarda işlenmesi

sonrasında yılda yaklaşık 30.000 tonun üzerinde çay atığı olduğu bildirilmektedir (Çavdar ve ark., 2011).

Ligninolitik enzimlerin aromatik hidrokarbonların gideriminde kullanımlarına bir örnek olarak, *Polyporus arcularius* olduğu belirlenen beyaz çürükçül fungustan elde edilen ligninolitik enzimlerin boyar madde giderim kapasiteleri araştırılmış ve ortama HBT mediatörünün ilave edilmesi ile elde edilen boyar madde giderim kapasitelerinin oldukça başarılı olduğu gözlemlenmiştir. Elde edilen bu sonuçtan yola çıkarak boyar maddeler üzerinde başarılı olduğu belirlenen enzim çözeltisinin tekstil atık sularının arıtımında kullanma potansiyelinin belirlenmesi ve reaktör sisteminde ölçek büyütme uygulanarak uygulanabilir bir sistem oluşturulması hedeflenmiştir. Bu nedenle konsantre edilerek spesifik aktivitesi arttırılan enzim çözeltisi Ca-alginat boncuklarına immobilize edilerek tekrar kullanılabilirliği sağlanabilir bir preperat haline getirilmiştir. Immobilize boncukların yapay atık boyar madde giderimi, immersiyon tip reaktörde araştırılarak pilot ölçekli bir çalışma gerçekleştirilmiştir. 24 saatlik uygulama sonucunda % 88 oranında renk giderimi elde edilirken, yapay atık çözeltisinin toksisitesinde % 80 azalma meydana gelmiştir. Kesikli olarak uygulanan sistemin tekrarında boyar madde gideriminde % 51 oranında düşüş görülmüştür.

Ülkemizde ve dünyada, beyaz çürükçül fungus ve diğer mikroorganizmalar kullanılarak tekstil atık sularının renk giderimi üzerine pek çok çalışma yapılsa da, bu çalışmaların çoğu erlen boyutunda sınırlanmaktadır. Reaktör ölçekli yapılan giderim çalışmalarında ise genellikle steril koşullar uygulanmakta, bu da sistemin endüstriyel uygulama olanağını kısıtlamaktadır. İmmersiyon tip biyoreaktörde, steril olmayan koşullarda gerçekleştirdiğimiz çalışmamızın uygulanabilir bir sistem modellemesi olması nedeniyle geliştirilebilir olduğu düşünülmektedir. Mevcut enzimlerin ileri saflaştırma teknolojisi ile etkinliklerinin arttırılması, enzim/substrat oranının optimize edilmesi, çevresel ve fiziksel faktörlerin uygulanabilir hale getirilmesi gibi çalışmalarla sistemin optimize edilmesi hedeflerimiz arasında yer almaktadır.

KAYNAKLAR

- Al-Degs, Y., Khraisheh, M. A. M., Allen, S. J., Ahmad, M. N., 2000, Effect of carbon surface chemistry on the removal of reactive dyes from textile effluent, *Water Research*, 34(3): 927-935.
- Anastasi A., Prigione V., Varese G.C., 2010. Industrial dye degradation and detoxification by basidiomycetes belonging to different eco-physiological groups. *Journal of Hazardous Materials*, 177 (2010) / 260-267.
- Arslan, H. A., 2004, Bazı boyar madde gruplarının aktif çamur biyokütlesi tarafından adsorplanabilme özelliği, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 137 s.
- Aslam, S. ve Asgher, M., 2011, Partial purification and characterization of ligninolytic enzymes produced by *Pleurotus ostreatus* during solid state fermentation, *African Journal of Biotechnology*, Vol. 10(77), 17875-17883.
- Baccar, R., Blaquez, P., Bouzid, J., Feki, M., Attiya, H., Sarra, M., 2011, Decolorization of a tannery dye: from fungal screening to bioreactor application, *Biochemical Engineering Journal*, 56: 184-189.
- Balan, D. S. L. ve Monteiro, R. T. R., 2001, Decolorization of textile indigo dye by ligninolytic fungi, *Journal of Biotechnology*, 89: 141-145.
- Banat, I. M., Nigam, P., Singh, D., Merchant, R., 1996, Microbial decolorization of textile dye containing effluents: a review, *Bioresource Technology*, 58: 217-227.
- Başer, İ. Ve İnancı, Y., 1990, Boyar madde kimyası, Marmara Üniversitesi Teknik Eğitim Fak., Yayın no: 2, 47-52.
- Başbüyük, M., Yüceer, A., Yılmaz, T., 1998, Tekstil atık sularında renk giderilmesinde kullanılan ileri teknolojiler, I. Atık Su Sempozyumu, Kayseri.

KAYNAKLAR (Devam)

- Bilay, V.T., Solomko, E.F., Buchalo, A.S., 2000, Growth of edible and medicinal mushrooms on commercial agar media. In: van Griensven LJLD (ed.), Science and Cultivation of Edible Fungi, pp. 779-780.
- Birhanlı, E. ve Yeşilada, Ö., 2006, Increased Production of Laccase by Pellets of *Funalia trogii* ATCC 200800 and *Trametes versicolor* ATCC 200801 in repeated batch mode. Enzyme and Microbial Technology, 39: 1286-1293.
- Boran, F. ve Yeşilada, Ö., 2011, Enhance production of laccase by fungi under solid substrat fermentation condition, BioResources, 6(4): 4404-4416.
- Call, H. P. ve Mücke, I., 1997, History, overview and applications of mediated ligninolytic systems, especially laccase-maditor-systems, Journal of Biotechnology, 53: 163-202.
- Camerero, S., Ibarra, D., Martinez, M. J., Martinez, A. T., 2005, Lignin derived compunds as efficient laccase mediators for decolorizations of different types of recalcitrant dyes, Appl. Enviromental Microbio., 71: 1775-1784.
- Casieri, L., Anastasi, A., Prigione, V., Varese, G. C., 2010, Survey of ectomycorhizal, litter-degrading, and wood-degrading Basidiomycetes for dye decolorization and ligninolytic enzyme activity, Antonie Van Leeuwenhoek, 98: 483-504.
- Cing, S. Y., 2007, Beyaz çürükçül funguslarla tekstil boyalarının renginin giderimi, Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 224 s.
- Couto, S. R., 2007, Laccase from *Trametes hirsuta* grown on paper cuttings: Application to synthetic dye decolorization at different pH values, Eng. Life Sciences, No.3, 229-234.

KAYNAKLAR (Devam)

- Couto, S. R., Barreiro, M., Rivela, I., Longo, M. A., Sanroman, A., 2001, Performance of a solid state immersion bioreactor for ligninolytic enzyme production: evaluation of different operational variables, *Process Biochemistry*, 38:219-227.
- Çavdar, D. A, Kalaycıoğlu, H., Mengeloğlu, F., 2011, Çay atıklarının odun plastik kompozitlerinde değerlendirilmesi, 00214.STZ.2007-2 kodlu SAN-TEZ Projesi.
- Deneshvar, N., Ayazloo, M., Khataee, A. R., Pourhassan, M., 2006, Biological decolorization of dye solution containing malachite green by microalgae *Cosmarium sp.*, *Biorsource Technology*, Vol.98, 1176-1182.
- Dhouib, A., Hamza, M., Zouari, H., Mechichi, T., H'midi, R., Labat, M., Martínez, M.J., Sayadi, S., 2005, Screening for ligninolytic enzyme production by diverse fungi from Tunisia. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21:1415-1423.
- Diwaniyan S., Kharb D., Raghukumar C., Kuhad R.C., 2010. Devolorization of synthetic dyes and textile effluents by basidiomycetes fungi. *Water Air Soil Pollut.*, 210:409-419.
- Dizge, M. G., 2007, *Trametes versicolor* beyaz çürükçül fungusundan lakkaz enziminin saflaştırılması ve kısmi nitelendirilmesi, Gebze İleri teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, 103 s.
- Doğan, E. E., Yeşilada, E., Özata, L., Yoloğlu, S., 2005, Genotoxicity testing of four textile dyes in two crosses of *Drosophila* using wing somatic mutation and recombination test, *Drug and Chem. Toxicol.*, 28 (3): 281-301.

KAYNAKLAR (Devam)

- Dubois, M., Giles, K.A., Hamilton, G.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956, Colorimetric method for the determination of sugars and related substances, Anal. Chem., 28:350–56.
- Eggert, C., Temp, U., Dean, J. F., Eriksson, K. E., 1996, A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and sytnthetic lignin by laccase, FEBS Letters, 391:144-148.
- Eichlerova, I., Homolka, L., Nerud, F., 2006. Evoaluation of synthetic dye decolorization capacity in *Ischnoderma resinsum*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 33:759-766.
- Elisashvili, V., Kachlishvili, E., Penninckx, M., 2008, Efect of growth substrate, method of fermentation and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes produciton by white-rot basidiomycetes, Journal Industry Microbiol. Biotech., 35:1531-1538.
- Enayatzamir, K., Alikhani, H. A., Yakhchali, B., Tabandeh, F., Couto, S. R., 2010, Decolouration of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* immobilized into alginate beads, Environ. Sci. Pollut. Res., 17: 145-153.
- Erarslan, A., Kazan, D., Öztürk, D., 2000, Enzimlerin Saflaştırılmasında Temel Yöntemler, Tübitak, Marmara Araştırma Merkezi.
- Erdoğan, E. A., 2008, Lignin ve tekstil boyalarının *Streptomyces sp.* suşları kullanılarak parçalanmasının araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 94 s.
- Ergene, A., Ada, K., Tan, S., Katircioğlu, H., 2009, Removal of remazol brilliant blue R dye from aques solutions by adsorption onto immobilized *Scenedesmus quadricauda*: equilibrium and kinetic modelling studies, Desalination, 249: 1308-1314.

KAYNAKLAR (Devam)

- Eriksson, K. E., Blanchette, R. A., Ander, P., 1990, Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components, Springer-Verlag, Berlin, 397 s.
- Erkurt, E. A., 2006, Remazol brilliant blue royal ve drimaren blue Cl-Br' nin beyaz çürükçül funguslar tarafından renk gideriminin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 114 s.
- Gao, D., Wen, X., Zeng, Y., Qian, Y., 2006, Decolourization of a textile- reactive dye with *Phanerochaete chrysosporium* incubated in different ways under non-sterile conditions, Water Practice Technology, 5: 10801-10806.
- Glenn, J. K., Morgan, M. A., Mayfield, M. B., Kuwahara, M., Gold, M. H., 1983, An extracellular H₂O₂-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 114, pgs. 1077-1083.
- Guerra, G., Dominguez, O., Ramos-Leal, M., Manzano, A. M., Sanchez, M. I., Hernandez, I., Palacios, J., Arguelles, J., 2008, Production of laccase and manganase peroxidase by white rot fungi from sugarcane bagasse in solid bed: Use for dyes decolourisation, Sugar Tech, 10(3): 260-264.
- Gupta, V. K. Ve Suhas, 2009, Application of low-cost adsorbent for dye removal: a review, Jour. Environ. Manag., 90: 2313-2342.
- Hattaka, A., 1994, Biodegradation of lignin, 130-167.
- Hernandez-Luna, C. E., Gutierrez-Soto, G., Salcedo-Martinez, S. M., 2007, Screening for decolorizing basidiomycetes in Mexico (Screening and selection of ligninolytic basidiomycetes with decolorizing ability in Northeast Mexico), World J. Microbiol. Biotech., 24: 465-473.

KAYNAKLAR (Devam)

- Huasin, M. ve Husain, M., Application of redox mediators in the treatment of organic pollutants by using oxidoreductive enzymes: A review, 2008, Critical Reviews in Enviromental Science and Technology, 38: 1-42.
- Hubbe, M. A., Beck, K. R., O'Neal, W. G., Sharma, Y. C., 2012, Cellulosic substrat for removal of pollutants from aqueous systems: areview. 2. Dyes, BioResources, 7(2): 2592-2687.
- Irshad, M., Asgher, M., Sheikh, M. A., Nawaz, H., 2011, Purification and characterization of laccase produced by *Schizophyllum communue* IBL-06 in solid state culture of banana stalks, BioResource, 6(3): 2861-2873.
- Isikhuemhen, O. S., Mikiashvili, N. A., Adenipekun, C. O., Ohimain, E. I., Shahbazi, G., 2012, The tropical white rot fungus, *Lentinus squarrosulus* Mont.: ligninocelluolytic enzymes activities and sugar release from cornstalks under solid state fermentation, World J. Microbiol. Biotechnol., 28: 1961-1966.
- Jayasinghe, C., Imtiaj, A., Lee, G. W., Hoan-Im, K., Hur, H., Lee, M. W., 2008, Degradation of three aromatic dyes by white rot fungi and the production of ligninolytic enzymes, The Korean Society of Micology, Microbiology 36(2): 114-120.
- Johannes, C., Majcherczyk, A., 2000, Laccase activity tests and laccase inhibitors, Journal of Biotechnology, 78: 193-199.
- Jones, J. J. ve Falkinham, J. O., 2002, Decolorization of malachite gren and christal violet bu waterbone pathogenic mycobacteria, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol.47, No.7, 2323-2326.

KAYNAKLAR (Devam)

- Kalmış E., Azbari N., and Kalyoncu F., 2007. Agar-plate screening for textile dyde decolorisation by white rot fungi *Pleurotus* species (*Pleurotus cornucopiae* var. *Citrinopileatus*, *P.djamor*, *P.eryngii*, *P.ostreatus* and *P.sajor-caju*. Fresenius Environmental Bulletein, Vol 16, No:10.2007, pages: 1309-1314.
- Kasinath, A., Novotny, C., Svobodova, K., Patel, K. C., Sasek, V., 2002, Decolorization of synthetic dyes by *Irpex lacteus* in liquid cultures and packed-bed bioreactor, Enzyme and Microbial Technology, 32: 167-173.
- Kauchik, P. ve Malik, A., 2009, Fungal dye decolourization: Recent advances and future potential, Enviroment İnternational, 35: 127-141.
- Kestioğlu, K. Ve Yahılı, M., 2006, Yüksek KOİ içerikli tekstil atık sularının kimyasal çökeltim ve adsorpsiyon yöntemleriyle arıtılabilirliği, Ekoloj, 59: 27-31.
- Khelifi, R., Belbahri, L., Woodward, S., Ellouz, M., Dhouib, A., Sayadi, S., Mechichi, T., 2009, Decolourization and detoxification of textile industry wastewater by laccase-mediator system, Journal of Hazardaous Materials, 175:802-808.
- Kızılcık, M. Yamaç, M. Van Griensven, L.J.L.D., 2010, Medium selection for exopolysaccharide and biomass production in submerged cultures of culinary-medicinal mushrooms from Turkey, International Journal of Medicinal Mushroom, 12(1):63-71.
- Kocaer, F. O. Ve Alkan, U., 2002, Boyar madde içeren tekstil atık sularının arıtım alternatifleri, Uludağ Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi, Cilt 7, Sayı 1, 47-55.
- Koçak, G., 2011, *Bacillus subtilis* ile reaktif black 5 boyar maddesini renk giderim kinetiğinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 75 s.

KAYNAKLAR (Devam)

- Kulkarni, S. V., Blackwell, C. D., Blackard, A. L., Stackhouse, C. W., Alexander, M. W., 2003, Textile dyes and dyeing equipment: classification, properties and environmental aspects, EPA/600.
- Kurbanova, R., Mirzaoglu, R., Ahmedova, G., Şeker, R., Özcan, E., 1998, Boya ve tekstil kimyası ve teknolojisi, 1. Baskı, Konya.
- Kuwahara, M., Glenn, J. K., Morgan, M. A., Gold, M. H., 1984, Seperation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*, FEBS Letters, 169: 247-250.
- Lankinen, P., 2004, Ligninolytic enzymes of the basidiomycetous fungi *Agaricus bisporus* and *Phlebia radiata* on lignocellulose-containing media, Yüksek Lisans Tezi, University of Helsinki, Department of Applied Chemistry and Microbiology, 42s.
- Levin, L., Papinutti, L., Forchiassin, F., 2004a, Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzymes and decolorize industrial dyes, Bioresource Technology 94 (2004) 169-167. Katıda tarama
- Levin, L., Forchiassin, F., Viale, A., 2004b, Ligninolytic enzyme production and dye decolorization by *Trametes trogii*: application of the plackett-burman experimental design to evaluate nutritioanl requirements, Process Biochemistry, 40: 1381-1387.
- Machado, K. M. G., Matheus, D. R., Bononi, V. L. R., 2005, Ligninolytiv enzymes production and remazol brilliant blue R decolorization by tropical brazilian basidiomycetes, Brazillian Journal of Microbiology, 36: 246-252.

KAYNAKLAR (Devam)

- Maciel, M. J. M., Silva, A. C., Ribeiro, H. C. T., 2010, Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: a review, *Electronic Journal of Biotechnology*, Vol: 13.
- Martin, K. J. ve Rygiewicz, P. T., 2005, Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of enviromental DNA extracts, *BMC Microbiology*, 5:28.
- Mazmancı, M. A., Ayten, N., Ay, T., Ünyayar, A., Erkurt, E. A., 2006, *Luffa cylindrica*’ ya tutuklanmış beyaz çürükçül fungus *Funali trogii* ATCC 200800 ile drimaren blue k2rl boyar maddesinin renk giderimi, 5. Ulusal Çevre Mühendisliği Kongresi, İstanbul.
- McCarthy, A. J., Lignocellulose degrading actinomyecetes, *FEMS Microbiol. Rev.*, 46: 145-163.
- Mercimek, H. A., 2007, *Trametes versicolor*’ın tekstil boyalarının gideriminde kullanım olanakları, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 64 s.
- Michizoe, J., Uchimura, Y., Ichinose, H., Maruyama, T., Kamiya, N., 2003, Activation of manganase peroxidase in an organic medium using a mediator, *Biochemical Engineering Journal*, 19: 43-46.
- Mikiashvili, N., Wasser, S.P., Nevo, E., Elisashvili, V., 2006, Effects of carbon and nitrogen sources on *Pleurotus ostreatus* ligninolytic enzyme activity, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 22, 999–1002.
- Moreira, M. T., Feijoo, G., Lema, j. M., 2003, Fungal bioreactors: Applications o white rot fungi, *Reviews in Enviromental Science and Biotechnology*, 2: 247-259.
- Murray, H. G. ve Thompson, W. F., 1980, Rapid isolation of high molecular weight DNA, *Nucleic Acids Res.*, 8: 4321-4325.

KAYNAKLAR (Devam)

- Murugesan, K., Nam, I., Kim, Y., Chang, Y., 2006, Decolorization of reactive dyes by thermostable laccase produced by *Ganoderma lucidum* in solid state culture, *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 1662-1672.
- Nagai, M., Sato, T., Watanabe, H., Saito, K., Kawata, M., Enei, H., 2002, Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes* and decolorization of chemically different dyes, *Applied Microbio. Biotechnol.*, 60:327-335.
- Novotny, C., Svobodova, K., Kasinath, A., Erbanova, P., 2004, Biodegradation of synthetic dyes by *Irpex lacteus* under various growth conditions, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 54: 215-223.
- Nyanhongo, G. S., Gomes, J., Gübitz, G. M., Zvaunya, R., Read, J., Steiner, W., 2001, Decolorization of textile dyes by laccases from a newly isolated strain of *Trametes modesta*, *Water research* 36: 1449-1456.
- Okino, L. K., Gomes-Machado, K. M., Fabris, C., Ramos-Bononi, V. L., 2001, Ligninolytic activity of tropical rainforest basidiomycetes, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 16: 889-893.
- Olikka, P., Alhonen, K., Leppanen, V. M., Glumoff, T., Rajjola, T., Souminen, I., 1993, Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*, *Applied Environmental Microbiology*, 12: 4010-4016.
- O'Neill, C., 1999, Anaerobic and aerobic treatment of a simulated textile effluent, Yüksek Lisans Tezi, University of Glamorgan, School of Applied Sciences, 75 s.

KAYNAKLAR (Devam)

- Osma, J. F., Herrera, J. T., Couto, S. R., 2006, Banana skin: A novel waste for laccase production by *Trametes pubescens* under solid-state conditions. Application to synthetic dye decolouration, *Dyes and Pigments*, 75:32-37.
- Özmen, N., 2008, Lakkaz üretimi ve ham kültür filtratının tekstil boyalarının renginin ve toksisitesinin gideriminde kullanımı, Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 93 s.
- Perumal, S. M., Munuswamy, D., Sellamuthu, P. S., Kandasamy, M., Thangavelu, K. P., 2007, Biosorption of textile dyes and effluents by *Pleurotus florida* ve *Trametes hirsuta* with evaluation of their laccase acitivity, *Iranian journal of Biotechnology*, Vol. 5, No. 2, 114-118.
- Phetsom, J., Khammuang, S., Suwannowong, P., Sarnthima, R., 2009, Copper-alginat encapsulation of crude laccase from *Lentinus polychorus* Lev. and their effectiveness in synthetic dye decolorizations, *Journal of Biological Sciences*, 9: 573-583.
- Praveen, K., Usha, K. Y., Viswanath, B., Reddy, B. R., 2012, Kinetic properties of manganase peroxidase from the mushroom *Stereum ostrea* and its ability to decolorize dyes, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22: 1540-1548.
- Rabinovich, M.L., Bolobova, A.V., Vasichenko, L.G., 2004, Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: a review. *Appl.Biochem.Microbiol.*, 40:1–17.
- Ramsay, J.A. ve Nguyen, T., 2002, Decoloration of textile dyes by *Trametes versicolor* and its effect on dye toxicity, *Biotechnol. Letters*, 24:1757–1761.
- Ratto, M., Chatani, M., Ritschkoff, A. C., Viikari, L., 2000, Screening of micro-organisms for decolorization of melanins produced by bluestain fungi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 55: 210-213.

KAYNAKLAR (Devam)

- Renganathan, S., Thilagaraj, W. R., Miranda, L. R., Gautam, P., Velan, M., 2006, Accumulation of acid orange 7, acid red 18 and reactive black 5 by growing *Schizophyllum commune*, Bioresource Technology, 97: 2189-2193.
- Revenkar, M. S. ve Lele, S. S., 2007, Synthetic dye decolorization by white rot fungus, *Ganoderma sp.* WR-1, Bioresource Technology, 98:775-780.
- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R., Nigam, P., 2001, Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment Technologies with a proposed alternative, Bioresource Technology, 77: 247-255.
- Rosales, E., Couto, S.R., Sanroman, M.A., 2007, Increased laccase production by *Trametes hirsuta* grown on ground orange peelings, Enzyme and Microbial Technology, 40, 1286–1290.
- Sağlam, Ç. S., 2008, Boyar madde içeren atık suların arıtımında farklı fotokatalitik oksidasyon parametrelerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, 122 s.
- Saparrat, M.C.N., Guillén F., 2005, Ligninolytic ability and potential biotechnology applications of the South American fungus *Pleurotus laciniatocrenatus*, Folia Microbiol., 50:155–160.
- Sarnthima, R. Ve Khammuang, S., 2008, Evaluation of dye decolourisation by crude enzyme from *Pleurotus sajor-caju* grown on sorghum seed media, Pakistan Journal of Biological Sciences, 11(1): 62-67.
- Seventekin, N., 1988, Boyar madde kimyasına giriş, Bornova, İzmir.

KAYNAKLAR (Devam)

- Shimokawa, T., Hirai, M., Shoda, M., Sugano, Y., 2008, Efficient dye decolorization and production of dye decolorizing enzymes by the basidiomycete *Thanatephorus cucumeris* Dec 1 in a liquid and solid hybrid culture, Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol. 106, No. 5, 481-487.
- Sirinivasan, A. ve Viraraghavan, T., 2010, Decolorization of dye wastewaters by biosorbents: a review, Journal of Enviromental Manag., 91: 1915-1929.
- Svobodova, K., Erbanova, P., Sklena, J., Novotni, C., 2006, The role of Mn-dependent peroxidase in dye decolorization by static and agitated cultures of *Irpex lacteus*, Folia Microbiology; 51: 573-578.
- Şeker, A. F., 2007, Tekstil endüstrisinde kullanılan çeşitli boyar maddelerin aktif karbonil ile gideriminin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Gebze İleri teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, 80 s.
- Tuncer, M., 2010a, Lakkaz kısım 1: yapısı, katalitik özellikleri ve dağılımları, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 22: 19-63.
- Tuncer, M., 2010b, Lakkaz kısım 2: potansiyel endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamaları, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 22: 19-63.
- Tychanowicz, G. K., Zilly, A., De Souza, C. G. M., Peralta, R. M., 2003, Decolorisation of industrial dyes by solid-state cultures of *Pleurotus pulmonarius*, Process Biochemistry 39: 855-859.
- Utkan ve ark., Enzim Saflaştırmada Temel Yöntemler, 2011, XIII. Uygulamalı Eğitim Kursu, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü.

KAYNAKLAR (Devam)

- Ünyayar, A., Mazmancı, M. A., Ataçağ, H., Erkurt, E. A., Coral, G., 2004, A drimaren blur X3LR dye decolorizing enzyme from *Funalia trogii*: one step isolation and identification, *Enzyme and Microbial Technology*, 36: 10-16.
- Ünyayar, A., Mazmancı, M. A., Erkurt, E. A., Ataçağ, H., Gizir, A. M., 2005, Decolorization kinetics of the azo dye drimaren blue X3LR by laccase, *React. Kinet. Catal. Lett.*, Vol. 86, No.1, 99-107.
- Ürek, R. Ö. ve Pazarlıoğlu, N. K., 2003, Purification and partial characterization of manganase peroxidase from immobilized *Phanerochaete chrysosporium*, *Process Biochemistry*, 39: 2061-2068.
- Xiaobin, C., Rong, J., Pingsheng, L., Shiqian, T., Qin Z., Wenshong, T., Xudong, L., 2007, Purification of a new manganase peroxidase of the white rot fungus *Schizophyllum sp.* F17 and decolorization of azo dyes by the ezyme, *Enzyme and Microbial Technology*, 41: 258-264.
- Xu, Y. ve Lebrun, R. E., 1999, Treatment of textile dye plant effluent by nanofiltration membrane, *Separation Science Technolog.*, 34: 2501-2519.
- Vandevivere, P. C., Bianchi, R., Versraete, W., 1998, Treatment and reuse of wastewater from the textile wet-processing industry: Review of emerging Technologies, *Chemical Technology Biotechnology*, 72: 289-302.
- Verma, P. ve Madamwar, D., 2002, Production of ligninolytic enzymes for dye decolorization by cocultivation of white-rot fungi *Pleurotus ostreatus* and *Phanerochaete chrysosporium* under solid-state fermentation, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Vol.102-103.
- Vursavuş, E., 1999, Boyar maddeleri açıklanması ve seçiminde kullanılan test yöntemleri, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Mimar-Mühendislik Fakültesi, 43 s.

KAYNAKLAR (Devam)

- Yamak, Ö., Kalkan, N. A., Aksoy, S., Altınok, H., Hasırcı, N., 2009, Semi-interpenetrating polymer Networks (semi-IPNs) for entrapment of laccase and their use in acid orange 52 decolorization, *Process Biochemistry*.
- Yeşilada, Ö., Cing, S., Asma, D., 2001, Decolourisation of the textile dye astrazon red FBL by *Funalia trogii* pellets, *Bioresources Technology*, 85: 155-157.
- Yeşilada, O., Asma, D., Cing, S., 2003, Decolorization of textile dyes by fungal pellets, *Process Biochemistry*, 38:933–938.
- Yeşilada, Ö, Yildirim, S.C., Birhanli, E., Apohan, E., Asma, D., Kuru, F., 2010, The evaluation of pre-grown mycelial pellets in decolorization of textile dyes during repeated batch process, *World Journal of Microbiol. Biotechnol.*, 26:33–39.
- Yeşilada, Ö. ve Özcan, B., 1998, Decolorization of orange II dye with the crude culture filtrate of white rot fungus, *Coriolus versicolor*, *Turkish Journal of Biology*, TÜBİTAK, 22: 463-476.
- Yuri, L., Park, C., Lee, B., Han, E., Kim, T., Kim, S., 2006, Effect of nutrients on the production of extracellular enzymes for decolorization of reactive blue 19 and reactive black 5, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 16(2): 226-231.
- Zollinger, H., 1991, *Color Chemistry*, VCH, Weinheim, Germany, 496 s.