

**T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ**

***Trametes versicolor* BEYAZ ÇÜRÜKÇÜL
FUNGUSUNDAN LAKKAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI ve KİSMİ
NİTELENDİRİLMESİ**

**Meltem GÖKSEL DİZGE
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

**G.Y.T.E.
2007**

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ

***Trametes versicolor* BEYAZ ÇÜRÜKÇÜL**
FUNGUSUNDAN LAKKAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI ve KİSMİ
NİTELENDİRİLMESİ

Meltem GÖKSEL DİZGE
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Ali TÜRKAN

G.Y.T.E.

2007



**GEBZE YÜKSEK
TEKNOLOJİ
ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

Meltem GÖKSEL DİZGE'nin tez çalışması GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu' nun 18/ 06/ 2007 tarih ve 2007/21 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(Tez Danışmanı) : Yrd. Doç. Dr. Ali TÜRKAN

ÜYE

: Doç.Dr. Aziz TANRISEVEN

ÜYE

: Yrd. Doç. Dr. Melek ÖZKAN

ONAY

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
tarih ve / sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Beyaz çürükçül fungus *Trametes versicolor*, ağaç gövdesinde yaşamakta olup karbon kaynağı ihtiyacını karşılamak için ağaç kabuğunu degrade edebilmektedir. Bunun için lignin peroksidaz, mangan peroksidaz ve lakkaz enzimlerini salgılamaktadır. Bu enzimlerin fonksiyonları lignin, hemi-selüloz ve selülozdan oluşan ağaç kabuğunu parçalamaktır. Bu özelliklerinden dolayı bu enzimler, endüstriyel alanda da yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, lignin, fenol ve türevleri gibi yıkımı güç (recalcitrant) maddelerin yıkımında etkili olan lignin peroksidaz, mangan peroksidaz ve lakkaz enzimlerini sekonder metabolit olarak üreten beyaz çürükçül fungus *Trametes versicolor*'dan lakkaz enzimi optimum şartlarda üretilerek kısmi saflaştırılmış ve nitelendirilmiştir.

Trametes versicolor lakkaz'ın optimum üretim şartlarının belirlenmesi için ortamın pH değeri, glikoz miktarı ile iz elementler ve farklı indükleyicilerin (fenol, bakır sülfat, guaikol ve veratril alkol) etkisi incelenmiştir. Sonuç olarak en yüksek lakkaz enzimi üretimi pH değerinin 5 ve glikoz konsantrasyonunun 10 gL^{-1} olduğu değerlerde elde edilmiştir. İndükleyici madde kullanılmadığı durumda optimizasyonu yapılan besiyerinde aktivite 200 ila 250 UL^{-1} arasında iken indükleyici olarak fenol kullanıldığı zaman (5 gL^{-1}) aktivitenin 400 UL^{-1} değerine ulaştığı görülmüştür.

Lakkaz enzimi, optimizasyonu yapılmış ve indüklenmiş ortamda maksimum üretimin gerçekleştiği zamanda inkübasyon durdurularak saflaştırma işlemlerine tabi tutulmuştur. Saflaştırma işlemlerinde enzimin yük dengesi kullanılarak anyon değişim kromatografi kullanılmış ve elde edilen örnekler SDS-PAGE ile belirlenmiştir. Saflaştırılmış lakkaz enziminin molekül ağırlığı SDS-PAGE ile 80 kDa ve kinetik çalışması sonucu ABTS için K_m ile V_{max} değerleri sırasıyla $0.366 \mu\text{M}$ ve 1652 UL^{-1} olarak bulunmuştur.

SUMMARY

White rot fungus *Trametes versicolor*, which lives on boles, can degrade barks as a source for carbon necessity. Therefore it secretes lignin peroxidase, mangan peroxidase and laccase. The functions of these enzymes degrade the bark which consists of lignin, hemi-cellulose and cellulose. Hence, due to these properties, these enzymes are widely used in industrial areas. In this study, the laccase enzyme was produced in optimum conditions from white rot fungus *Trametes versicolor*, which produces lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase that are effective in the destruction of recalcitrant materials e.g. lignin, phenol and derivative, and it was partially purified and characterized.

The effects of pH value, the amount of glucose, trace elements and different inducers (phenol, copper sulphate, guaiacol and veratril alcohol) were studied in order to determine the optimum produce conditions of *Trametes versicolor* laccase. As a result, the highest laccase enzyme was produced at pH and glucose concentration 5 and 10 gL⁻¹, respectively. In optimized medium, the enzyme activity was between 200-250 UL⁻¹ when inducer was absent. It was seen that the activity reached 400 UL⁻¹ when phenol used as an inducer. When the maximum enzyme production was occurred at optimized and induced medium, the incubation was stopped and the laccase was subjected to purification procedure. Anion exchange chromatography was used in the purification steps using charge balance and maintained sample was determined by SDS-PAGE. The molecular weight of the purified laccase was found 80 kDa with SDS-PAGE and kinetic constant K_m and V_{max} values for ABTS were determined 3.66×10^{-4} μ M and 1652 UL⁻¹, respectively.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca destek ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Ali TÜRKAN ve Doç. Dr. Aziz TANRISEVEN'e

Deneylerim boyunca bilgi birikimleri ve imkanlarından çokça istifade ettiğim Mersin Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümü'nden değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Ali ÜNYAYAR ve Arş. Grv. A. Emrah ERKURT'a

Çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Arş. Grv. Zehra ÖLÇER, Pınar AKKUŞ, Çevre Mühendisliği Mikrobiyoloji bölümünden değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Melek ÖZKAN, çalışma arkadaşlarım ve Özlem TERZİ'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Hayatımın her aşamasında sevgi ve desteğini esirgemediğim yanımda olan sevgili ailem ve eşim Nadir DİZGE'ye teşekkürlerimi ve minnet duygularımı sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
TABLolar DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
1.1. Fungusların Genel Özellikleri	1
1.1.1. Fungusların Hücresel Yapıları	3
1.1.1.1. Hifa (Hyphae)	4
1.1.1.2. Septum	6
1.1.1.3. Hücre duvarı	7
1.1.1.4. Vesikül	8
1.1.1.5. Çekirdek ve Çekirdekçik	8
1.1.2. Funguslarda Büyüme ve Üreme	8
1.1.3. Funguslarda Beslenme	9
1.1.4. Fungusların Sınıflandırılması	9
1.1.4.1. Ascomycota	9
1.1.4.2. Zygomycota	10
1.1.4.3. Chytridiomycota	12
1.1.4.4. Deuteromycota	13
1.1.4.5. Basidiomycota	13

1.2. Beyaz Çürükçül Funguslar	16
1.3. Beyaz Çürükçül Fungusların Salgıladığı Ligninolitik Enzimler	17
1.3.1. Fenoloksidaz	18
1.3.1.1 Lakkaz (EC 1. 10. 3. 2)	19
1.3.1.2. Lakkaz Enziminin Yapısal Özellikleri	21
1.3.1.3 Lakkaz Enziminin Kristal Yapısı	25
1.3.1.4. Lakkaz Katalizli Reaksiyonlar	28
1.3.1.5. Lakkaz Aracı (Mediatör) Sistem ve Aracılar (Mediatörler)	29
1.3.1.5.1. ABTS Aracılı Sistem	32
1.3.1.5.2. HBT Aracılı Sistem	33
1.3.2 Peroksidaz	33
1.3.2.1 Mangan Peroksidaz (EC 1.11.1.13)	35
1.3.2.1.1. Mangan Peroksidazın Katalitik Döngüsü	36
1.3.2.1.2. Mangan Peroksidazın Kristal Yapısı	37
1.3.3.2 Lignin Peroksidaz	39
1.3.3.2.1. Lignin Peroksidazın Katalitik Döngüsü	41
1.3.3.2.2. Lignin Peroksidazın Kristal Yapısı	42
1.4. Ligninolitik Enzimlerin Kullanım Alanları	44
1.4.1. Boya Giderimi	45
1.4.2. Biyoremediasyon	46
1.4.3. Kağıt Hamurundan Lignin Giderimi ve Kağıt Hamurunun Beyazlatılması	47
1.4.5. Organik Sentez	47
1.4.6. Şarap ve Bira Stabilizasyonu	48

1.4.7. Gıda İyileştirmesi	49
1.4.8. Biyosensör	49
1.4.9. Medikal Uygulamalar	49
1.5. Enzim Saflaştırma (Pürifikasyon) Teknikleri	50
2. KONU İLE İLGİLİ ÇALIşMALAR	52
3. MATERYAL VE METOT	54
3.1. Kimyasallar	54
3.2. Mikroorganizma ve Kùltürün Devamlılığı	55
3.3. <i>Trametes versicolor</i> İçin Besiyeri Hazırlanması	56
3.3.1. Besiyeri içeriği	56
3.3.2. Besiyeri Sterilizasyonu	57
3.3.3. Besiyerine Fungus Ekimi	57
3.3.4. İnkübasyon Süresi	57
3.3.5. pH'ın <i>Trametes versicolor</i> Lakkaz Üretimine Etkisi	57
3.3.6. Besiyerindeki İz Elementlerin (Metallerin) ve Glikozun Lakkaz Üretimine Etkisi	58
3.3.7. İndükleyici Türü ve Konsantrasyonunun Enzim Üretimine Etkisi	59
3.4. Lakkaz Enziminin Aktivite Tayini	59
3.5. Protein Miktarı Tayini	61

3.6. Kùltür Sıvısından Lakkaz Enziminin Pürifikasyonu	61
3.6.1. Çöktürme Yöntemi ile Pürifikasyon	61
3.6.1.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi	61
3.6.1.2. Etanol Çöktürmesi	63
3.6.2. İyon Değişim Kromatografisi ile Pürifikasyon	64
3.6.3. Elektroforez Yöntemi (SDS-PAGE)	65
3.6.3.1. SDS-PAGE'in Uygulanması	65
3.6.3.2. SDS-PAGE ile Molekül Ağırlığı Tayini	65
3.7. Safılaştırılmış Lakkaz Enziminin Karakterizasyonu	66
3.7.1. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi	66
3.7.2. Optimum pH Değerinin Belirlenmesi	66
3.7.3. Progres Eğrisi	66
3.7.4. ABTS İçin Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi	66
4. SONUÇLAR	67
4.1. Lakkaz Üretimi için Kùltür Koşullarının Optimizasyonu	67
4.1.1. <i>Trametes versicolor</i> 'un Zamana Karşı Büyümesi ve Enzim Üretimi	67
4.1.2. pH'ın <i>Trametes versicolor</i> Lakkaz Üretimine Etkisi	68
4.1.3. Besiyerindeki İz Elementlerin (Metallerin) ve Glikozun Lakkaz Üretimine Etkisi	70

4.1.4. Enzim Üretimine İndükleyicilerin Etkisi	71
4.1.4.1. Enzim Üretimine İndükleyici Türünün Etkisi	72
4.1.4.2. Enzim Üretimine Fenol Konsantrasyonu Etkisi	72
4.2. Kültür Sıvısından Lakkaz Enziminin Pürifikasyonu	74
4.2.1. Çöktürme Yöntemi	74
4.2.1.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi	74
4.2.1.2. Etanol Çöktürmesi	75
4.2.2. İyon Değişim Kromatografisi Yöntemi	75
4.2.2.1. Amonyum Sülfat Çökeleğinin Kolona	
Yüklenmesi	76
4.2.2.2. Etanol Çökeleğinin Kolona Yüklenmesi	76
4.2.2.3. Süpernatantın Çöktürülmeden Kolona	
Yüklenmesi	77
4.2.3. DEAE-sefaroze Kolonundan Elde Edilen Fraksiyonların	
SDS-PAGE İle Analizi	79
4.2.3.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesinden Elde	
Edilen Fraksiyonlara SDS-PAGE İle Analizi	79
4.2.3.2. Etanol Çöktürmesinden Elde Edilen Fraksiyonların	
SDS-PAGE İle Analizi	81
4.2.3.3. Süpernatantın Çöktürülme İşlemi Uygulanmadan	
Elde Edilen Fraksiyonlara SDS-PAGE Uygulanması	83
4.3. Pürifiye Lakkaz Enzimin Karakterizasyonu	85

4.3.1. pH'ın Aktiviteye Etkisi	85
4.3.2. Sıcaklığın Aktiviteye Etkisi	86
4.3.3. Progres Eğrisi	87
4.3.4. Kinetik Değerlerin Belirlenmesi	88
5. KAYNAKLAR	89
ÖZGEÇMİŞ	103

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Lac

LiP

Lignin Peroksidaz (Ligninaz)

MnP

Mangan Peroksidaz

SDS-PAGE

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel
elektroforez

HBT

1-hidroksibenzotriazol

ABTS
asit)

2,2'-azino-bis(3-etilbenziltiazolin-6-sülfonik

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. <i>Phanerochaete cryosporium</i> hifalarının sem görüntüsü	5
1.2. Hifanın hücresel yapıları	5
1.3. <i>Neurospora crassa</i> suşunda septum oluşumu	6
1.4. Fungusların hifalardaki büyümesi	8
1.5. Ascomycota (sac fungi) mikroskopik görüntüsü	10
1.6. Ergin Zygospor oluşumu	11
1.7.A. Eşeyli çoğalma	
1.7.B. Eşeysiz çoğalma	11
1.8. Chytridiomycota' da eşeysiz ve eşeyli çoğalma	12
1.9. Basidiomycota' da clamp cell oluşumu	13
1.10. Basidiomycota' da eşeyli çoğalması	15
1.11. Lakkazın bakır merkezleri	22
1.12. Lakkazın aktif bölgesindeki bakır atomlarının düzenlenişi	24
1.13. Lakkaz enziminin yapısında domainlerin düzenlenişi	25
1.14. <i>Coprinus cinereus</i> ' dan elde edilen Cu-2 bağımlı lakkazın kristal yapısı	26
1.15. <i>Coprinus cinereus</i> ' dan elde edilen lakkazın domainlerin düzenlenişi	26
1.16. <i>Coprinus cinereus</i> kaynaklı lakkazın top ve çubuk modeli	27
1.17. Ligninin fenolik gruplarının lakkaz katalizli yükseltgenme reaksiyonu	29
1.18. Lakkaz mediatör oksidasyon sisteminin katalitik döngüsü	30

1.19. Bazı doğal ve sentetik (yapay) mediatörler ve kimyasal yapıları	31
1.20. Lakkazın kağıt hamuruna etkisinin simülasyonu	32
1.21. Peroksidazların katalitik döngüsü	34
1.22. Mangan peroksidazın katalitik döngüsü	36
1.23. Mangan peroksidazın kristal yapısı	38
1.24. Mangan bağlanma bölgesi	38
1.25. LiP415'in MOLSCRIPT programıyla çizilmiş Ribbon grafiği	40
1.26. Lignin peroksidazın katalitik döngüsü	41
1.27. Lignin peroksidazın aktif bölgesindeki bağlantılar ve etkileşimler	43
1.28. Lignin peroksidazın kristal yapısı	44
3.1. Lakkaz tarafından ABTS'nin katyon radikali (ABTS ⁺) oksitlenmesi	60
3.2.(a). Bakır atomu bazik ortamda proteinler ile indirgenir	62
3.3.(b). İndirgenmiş bakır atomunun iki molekül BCA ile oluşturduğu kompleks	62
3.4. BSA protein standartı için hazırlanan kalibrasyon eğrisi	63
4.1. <i>Trametes versicolor</i> lakkazın zamana karşı üretim grafiği	67
4.1. pH'ın lakkaz üretimine etkisi	68
4.3. Optimum pH grafiği	69
4.4. Besiyerindeki iz elementlerin ve glikozun enzim üretimine etkisi	71
4.5. Lakkaz üretimine indükleyici etkisi	72
4.6. Lakkaz üretimine fenol konsantrasyonunun etkisi	73
4.7. Optimum indükleyici fenol konsantrasyonu	73
4.8. Amonyum sülfat ilavesinden sonra süpernatantta çökmeden kalan enzimin aktivitesi	74

4.9. Amonyum sülfat çöktürmesi ile <i>Trametes versicolor</i> 'dan lakkaz pürifikasyonu	76
4.10. Etanol çöktürmesi ile <i>Trametes versicolor</i> 'dan lakkaz pürifikasyonu	77
4.11. Anyon değişim kromatografi ile <i>Trametes versicolor</i> 'dan lakkaz pürifikasyonu (1.adım)	78
4.12. Anyon değişim kromatografi ile <i>Trametes versicolor</i> 'dan lakkaz pürifikasyonu (2.adım)	79
4.13. Amonyum sülfat ile çöktürülen lakkazın aktiviteye sahip fraksiyonlarının SDS-PAGE ile analiz sonuçları	80
4.14. Saflaştırılan lakkazın molekül ağırlığının belirlenmesi için kullanılan SDS-PAGE ile protein standartları kullanılarak elde edilen kalibrasyon eğrisi	80
4.15. Etanol ile çöktürülen lakkazın aktiviteye sahip fraksiyonlarının SDS-PAGE ile analiz sonuçları	82
4.16. Saflaştırılan lakkazın molekül ağırlığının belirlenmesi için kullanılan SDS-PAGE ile protein standartları kullanılarak elde edilen kalibrasyon eğrisi	82
4.17. Süpernatantın çöktürülme işlemi uygulanmadan elde edilen lakkazın aktiviteye sahip fraksiyonlarının SDS-PAGE ile analiz sonuçları	84
4.18. Saflaştırılan lakkazın molekül ağırlığının belirlenmesi için kullanılan SDS-PAGE ile protein standartları kullanılarak elde edilen kalibrasyon eğrisi	84
4.19. pH'ın aktivite üzerine etkisi	86

4.20. Sıcaklığın aktivite üzerine etkisi	87
4.21. Enzimin aktivitesinin zamanla değişimi	88
4.22. <i>Trametes versicolor</i> lakkaz için Michaelis-Menten grafiği	89
4.23. <i>Trametes versicolor</i> lakkaz için Lineweaver-Burk grafiği	89

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Fungusların her bir türünün hücre duvarını içeriği	7
1.2. Genel ve <i>Trametes</i> kaynaklı lakkaz enziminin fiziksel özellikleri	20
1.3. Protein özelliklerine göre saflaştırma teknikleri	50
3.1. Kullanılan kimyasal maddeler	54
3.2. Besiyeri bileşenleri	56
3.3. Enzim aktivitesine glikoz ve iz element çözeltilerinin farklı konsantrasyonlarının etkisinin araştırılmasında hazırlanmış sekiz farklı besiyeri	58
3.4. Standart protein karışımı ve içerdiği proteinlerin molekül ağırlıkları	65
4.1. Lakkazın amonyum sülfat çöktürmesiyle saflaştırılması	81
4.2. Lakkazın etanol çöktürmesiyle saflaştırılması	83
4.3. Lakkazın çöktürme işlemi uygulanmadan saflaştırılması	85

1. GİRİŞ

Biyoteknoloji; insan, hayvan ve bitki hücrelerinin fonksiyonlarını anlamak ve değiştirmek amacıyla uygulanan çeşitli teknikleri ve işlemleri tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Biyoteknolojik prosesler, endüstriyel kullanımına yönelik ürünlerin geliştirilmesini ve modern teknolojinin doğa bilimlerine uygulanmasını kapsar.

Biyoteknoloji; hücre biyolojisi ve doku kültürü, moleküler biyoloji, mikrobiyoloji, genetik, fizyoloji ve biyokimya gibi doğa bilimleri yanında mühendislik ve bilgisayar mühendisliğinden yararlanarak, rekombinant DNA teknolojisiyle bitki, hayvan ve mikroorganizmaları geliştirmek, doğal olarak var olmayan veya ihtiyacımız kadar üretilemeyen yeni ve az bulunan maddeleri (ürünleri) elde etmek için kullanılan teknolojilerin tümüdür. Biyoteknolojik uygulamalar; mikrobiyoloji, biyokimya, moleküler biyoloji, hücre biyolojisi, immünoloji, protein mühendisliği, çevre mühendisliği, enzimoloji ve biyoproses teknolojileri gibi farklı alanları bünyesinde topladığından bir çok bilimsel disiplinle karşılıklı ilişki içinde gelişir [1].

Biyoteknoloji sayesinde yeni tür enzimlerin büyük ölçeklerde ekonomik olarak üretilmesi mümkün olmuştur. Enzimler hücre içinde oluşmakla birlikte biyolojik etkinliklerini yitirmeden yani katalizör faaliyetlerini koruyarak hücre dışına çıkarılabilir. Birbirlerine peptid bağları ile bağlı amino asitlerin uzun zincir yapılarından oluşmuş ve canlı hücrelerdeki kimyasal reaksiyonların çoğunun katalizinden sorumlu olan enzimlerin hepsi protein yapısındadırlar ve her bir enzim spesifik katalitik etkiye sahiptir. Enzimler, neredeyse insanlığın ilk zamanlarından beri dolaylı veya direkt olarak gıda üretimlerinde bakteri ve mayalar vasıtasıyla kullanılmaktadır.

Bazı enzimlerin halen hayvan ve bitki dokularından ekstrakte edilmeleriyle birlikte enzimlerin çoğu fermentör denilen büyük reaktörlerde mikroorganizmalardan üretilirler. Mikroorganizmalar endüstriyel proseslerde kullanım için uygun canlılardır. Mikrobiyal çeşitliliğin belirlenmesi ve korunması biyoendüstrinin gelişimine çok önemli katkılarda bulunmakla birlikte çok yönlü yapıları ve yüksek

büyüme hızları ile mikroorganizmalar yeni endüstrilerin oluşturulması için yüksek bir kullanım potansiyeli taşımaktadır.

Enzimleri biyolojik sistemlerde olduğu kadar endüstriyel uygulamalar için de gitgide cazip kılan özellikler vardır. Ticari olarak üretilen ve kullanılan enzimlerin çok büyük bir kısmı mikrobiyal organizmalar tarafından üretilmekte ve mikrobiyal enzimlerin biyoteknolojik süreçlerle üretilmeleri ve çeşitli matrikslere bağlanarak daha kararlı kılınmaları, enzimlerin endüstriyel kullanımındaki artışın temel nedenleri arasındadır. Enzimler, canlı hücresinde tüm metabolik olayları yöneten ve yüksek derecede özgül protein katalizörlerdir. Organik kimyanın klasik yöntemleri ile gerçekleştirilmesi zor olan bir çok reaksiyonun doğru enzimin varlığında büyük bir özgüllikle ve kolayca başarılabilmesi, enzimlerin canlı hücrelerden izolasyonu ve canlı dışında çeşitli amaçlar için kullanılabilmesi enzim kullanımını öne çıkarmıştır. Enzimatik süreçlerin daha az çevre kirliliğine yol açması, kimyasal süreçlerden daha ılımlı koşullarda ve ekonomik olarak gerçekleştirilebilmesi nedenleri ile enzimlerin tekstil, deri ve deterjan endüstrileri ve atık giderme süreçlerindeki kullanımları büyük oranda artmıştır [1].

Verimlilikleri, seçicilikleri, ılımlı şartlar altında çalışabilmeleri ve biyolojik olarak parçalanabiliyor olmaları nedeniyle enzimler endüstride organik sentezler, klinik analizler, ilaç üretimi, deterjanlar gıda üretimi ve fermantasyon gibi birçok alanda kullanılmaktadırlar. Özellikle tekstil endüstrisinde beyaz çürükçül funguslar tarafından salgılanan selüloz enzimi mikrofibril uzaklaştırmada, lakkaz enzimi ise renk ağartmada kullanılmaktadır.

Beyaz çürükçül funguslar, hücre dışı ligninolitik enzim sistemleri ile çevre kirliliğine neden olan birçok yıkıcı güç (recalcitrant) organik bileşiklerini (zenobiyotikler, lignin, boyarmaddeler vb.) indirgeyebilmektedir. Özellikle lignin ve renk giderimi amacı ile en yaygın kullanılan beyaz çürükçül fungus türleri; *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes (Coriolus) versicolor* ve *Funalia troglia*'dir. Son zamanlarda endüstriyel uygulamalarda, özellikle tekstil endüstrisinde, boyar maddelerin renk gideriminde yer alan üç fonksiyonel enzimin Lignin peroksidaz (LiP), Mangan peroksidaz (MnP) ve H₂O₂ bağlı peroksidazlar olduğu belirtilmiştir. Lakkaz ise sadece belirli türler tarafından üretilen diğer bir fonksiyonel hücre dışı enzimdir [2].

Protein saflaştırma son derece pahalı ve zor bir işlemdir. Protein saflaştırmada amaç bir proteini protein karışımından ayırmaktır. Bu işlem pH, sıcaklık ve iyonik kuvvet (tuz konsantrasyonu) kontrol edilerek gerçekleştirilir. Ayrıca büyüklük, kütle, şekil, çözünürlük, polarite ve afinite gibi fiziksel özellikler saflaştırmada kullanılan önemli parametrelerdir. Protein saflaştırmada çeşitli yöntemler kullanılabilir. En çok kullanılan yöntemler; santrifüj, diyaliz, ultrafiltrasyon, jel filtrasyon, iyon değişim kromatografisi, elektroforez (SDS-PAGE) ve afinite kromatografisidir [3].

Bu çalışmada, beyaz çürükçül bir fungus olan *Trametes versicolor* mikroorganizmasından endüstriyel bir enzim olan lakkaz enzimi optimum üretim şartları belirlenmiş ve saflaştırılmış ve kısmi karakterizasyonu yapılmıştır.

1.1. Fungusların Genel Özellikleri

Funguslar fotosentetik olmayan bitkiler olarak tanımlanır. Fotosentetik pigmentlerinin olmayışı, fungusları karbon ve enerji kaynağı olarak organik maddeyi kullanmaya zorunlu kılmıştır [4]. Funguslar doğada oldukça yaygın olarak bulunurlar. Yaklaşık 400,000 çeşitten oluşan oldukça gelişmiş hücresel yapıya sahip ökaryotik canlılardır [5]. Bütün çok hücreli hayvanlar ve bitkilere ek olarak algler, protozoalar ve funguslar da ökaryotik hücrelerden oluşmaktadır. Ökaryotik hücreler de tüm hücreler gibi bir plazma membranla çevrili olmalarının yanında ekstra bir membranla çevrili farklı hücresel görevler için özelleşmiş organellere sahiptir. Her bir organel fotosentezin kloroplastlarda, hücresel solunumun da mitokondride gerçekleşmesi gibi kendi spesifik görevini yerine getirir [6]. Fungusların hücre duvarlarında kitin ve selüloz karakterinde maddelerin bulunmasından dolayı devamlı değişen çevre koşullarına uyum sağlamada oldukça dirençli olurlar. Funguslar genellikle düşük pH değerlerinde bile kolayca üreyebilir ve böyle ortamlara adapte olabilirler. Bu sebeple fungusların minimum ve maksimum pH limitleri 2-11 arasında değişebilir fungusların üreme ısı limitleri oldukça geniştir ve türler arasında farklar gösterir. Bu sınırlar 0-60°C arasında değişmektedir. Hifalar maksimum ısı limitinin dışında kolayca ölmelerine karşın, sporları yüksek ısıya ve değişik çevre koşullarına çok fazla dayanıklılık gösterir [7].

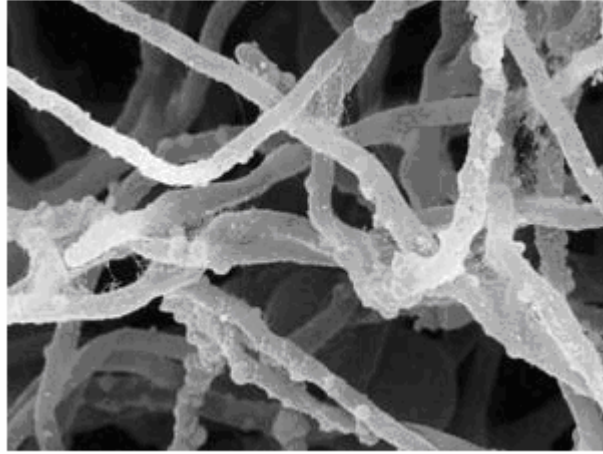
Fungusların metabolik aktiviteleri alg ve yüksek bitkilerden biraz farklılık gösterir. Fotosentez yetenekleri olmadığından enerji yönünden zengin karbon kaynaklarına ihtiyaç duyarlar. Hetetrof bir beslenme özelliği gösteren mantarların metabolizmaları oldukça yüksektir. Bunu gerçekleştirmek için fazla enerjiye ve dolayısıyla da enerji üretimine ihtiyaçları vardır. Mantarlarda da diğer ökaryotik ve prokaryotik canlılarda olduğu gibi, ATP (Adenozin Tri Fosfat) merkezi bir role sahiptir [7].

Funguslar morfolojik olarak 3 sınıfta toplanırlar; yeast (maya), mould (küf) ve dimorfik (dimorphic). Maya, 3-15 µm çapında oval ve tomurcuklanma şeklinde çoğalan tek hücreli canlılardır. Küf, 2-10 µm çapında çok hücreli hypea sporlardır ve yüzeyi pamuksudur. Dimorfik, maya ve küf formunda olup farklı çevresel koşullarda (sıcaklık, CO₂, besin, vb.) çoğalabilen canlılardır [8, 9, 10].

1.1.1. Fungusların Hücresel Yapıları

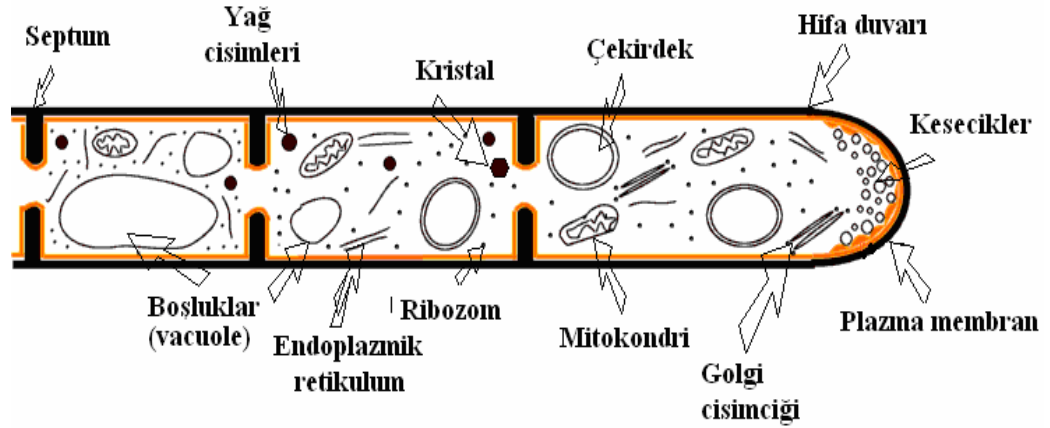
1.1.1.1. Hifa (Hyphae)

Fungus kolonileri, hifa adı verilen, genellikle ince uzun ve saydam mikroskopik filamentlerden (liflerden) oluşmuşlardır (Şekil 1.1). Uzunlukları türden türe değişmekle birlikte genellikle 1-3 cm ve çapları da 5-10 µm arasında olmaktadır. Bazıları dallanmamış ve ince bir tel şeklinde görünüme sahip olmasına karşın, bir kısım hifa genetik karakteri gereği dallanma gösterir. Hifalardan meydana gelen ağ benzeri oluşumlara miselyum adı verilir. Miselyumlar fungusun vejetatif gövdesini oluşturur [7]. Bu filamentler (lif), septum adı verilen bir duvarla bölümlere ayrılır. Septumlar hifaların oluşumunun ilk aşamalarında tamamlanmış halde bulunmazlar. Bu bölgeler iskelet olarak eski duvarların enzimatik olarak bozunması ve yeni duvarın oluşumu için materyal taşıyan iskelet olarak yayılırlar [11] .



Şekil 1.1. Flamentli bir beyaz çürükçül fungus olan *Phanerochaete chrysosporium* hifalarının SEM görüntüsü [12].

Küfler genellikle hifa olarak adlandırılan flamentli çok hücreli yapılar üzerinden büyür. Hifa hücrelerinde bağımsız sitoplazmik elementler vakuol, düz endoplazmik retikulum, çekirdek, mitokondri ve kesecikler (vesicles) Şekil 1.2’de gösterilmektedir [12].

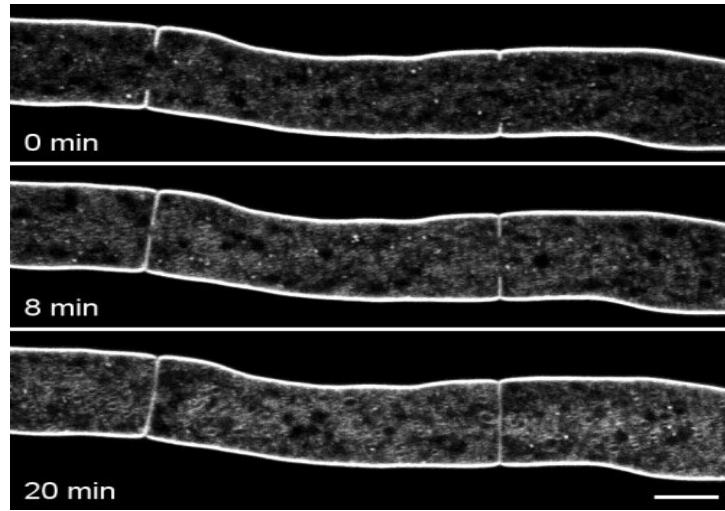


Şekil 1.2. Hifanın hücresel yapıları [13].

Aynı koloni içinde bulunan hifalardan bazıları beslenmeyi sağlamak için, üzerlerinde yaşadıkları substratların içine doğru uzanırlar. Dışarıda kalan diğer hifalar arasında da bazıları çoğalmada görev alır ve buna uygun olarak yapılarında kendilerine özel organizasyonlar oluşur [7].

1.1.1.2. Septum

Septum oluşumu genetik bir karakter olup hücre duvarının iç kısmından orijin alır ve içeri doğru uzayarak karşı duvara kadar devam eder. Yapısı hücre duvarının yapısı ile aynı kimyasal özelliktedir. Septum oluşumuna oomycetes ve zygomycetes sınıfı funguslar hariç diğer filamentli fungusların tümünde rastlanmaktadır [7]. Septumlar bölümler arasındaki turgor basıncına yapısal destek olarak hifaların rijitliğini artırır (Şekil 1.3) [11].



Şekil 1.3. *Neurospora crassa* suşunda FM4-64 ile boyanarak gözlemlenmiş septum oluşumu. Septum dışında boyanan yerler yalnızca plazma membrandır. Bar = 10 μ m [14].

Yapılan elektron mikroskop incelemelerinde iki tür septumun varlığı belirlenmiştir; Birincil septum, Bu tür septum genellikle ascomycetes ve deutromycetes sınıfına ait fungus türlerinde bulunmaktadır. Bu septumun ortasına yakın yerde 0,005-0,5 μ m çapında tek bir por bulunmaktadır ve bu por gerektiğinde kapanabilmektedir. İkincil septum, Bu tür septuma basidiomycetes sınıfına ait funguslarda ve gelişmenin bazı aşamalarında rastlanmaktadır. Bu türde septumun ortasında çok dar bir delik (100–200 nm) vardır. Etrafı amorf ve kabarık bir zarla çevrilidir [7].

Septumun fonksiyonlarını sıralayacak olursak

- yapısal destek,
- hifalar zarar gördüğünde ilk savunma alanı olması,
- funguslar arasında farklılaşmaya yardımcı olmasıdır [13].

1.1.1.3. Hücre duvarı

Genel olarak hücre duvarı; karbohidrat, protein, yağlar ve çok çeşitli polisakkaritlerle birlikte bağlanmış fibril (lifsi) materyallerden oluşur. Fibriler materyal, oldukça inert olmasına karşın içerdiği materyaller zamanla değişebilir. Bu fonksiyonel bileşenler besin taşınması, iletişim, substratlara karşı geçirgen olmaması (non-permeable) ve hücre duvarı modifikasyonları için oldukça önemlidir [11]. Hücre duvarının fibril özelliğini, kitin ve selüloz verir. Bunlar, N-asetilglukozamin ve glikoz polimerlerinin β -1,4 tarzında birleşmesinden meydana gelmiş düz zincirlerdir (Tablo 1.1) [7].

Tablo 1.1. Fungusların her bir türünün hücre duvarı içeriği [11]

<i>TÜR</i>	<i>FİBRİL</i>	<i>JEL TİPİ POLİMER</i>
Basidiomycota	Kitin β -(1-3)	Ksilomannoproteinler
	β -(1-6) Glukan	α (1-3) Glukan
Ascomycota	Kitin β -(1-3)	Galaktomannoproteinler
	β -(1-6) Glukan	α (1-3) Glukan
Zygomycota	Kitin, Kitosan	Poliglukuronik acid
		Glukuronomannoproteinler
		Polifosfat
Chytridiomycota	Kitin, Glukan	Glukan

1.1.1.4. Vesikül

Büyümekte olan hifalar vesikül açısından oldukça zengindir. Vesiküllerin içinde, hücre duvarının sentezinde ve aynı zamanda, lizisinde görevli olan enzimler, inorganik elementler, polisakkaritler, lipidler bulunur ve bunları büyümekte olan hücre duvarı bölgesine taşırlar [7].

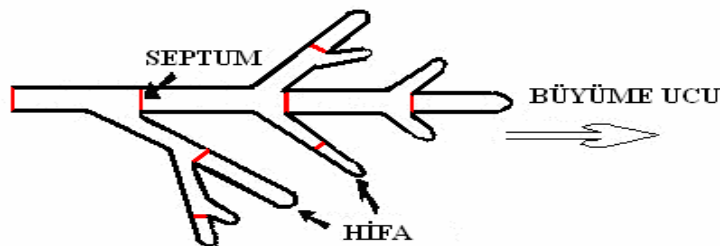
1.1.1.5. Çekirdek ve Çekirdekçik

Fungus hücrelerinde, çekirdekler genellikle küçüktürler. Her hücrede bir tane çekirdek olmasına karşın çok genç ve çabuk üreyen hifalarda bazen birden çok çekirdeğe rastlanabilmektedir [7].

1.1.2. Funguslarda Büyüme ve Üreme

Filamentli funguslarda hücre üremesi ile büyüme birbiri ile yakından ilişkilidir. Funguslar, hifaların genellikle uç kısmından büyüme ve dolayısıyla de üreme gösterir (Şekil 1.4). Hifalardaki bu büyüme ışık mikroskopunda gözlenebilmektedir.

Funguslar sporulasyon, eşeyli ve eşeysiz olarak üreme yeteneğine sahiptir. Miselyumlar olgunlaşır ve yeterince gıda depo ederse veya çevresel koşullar sporlanmaya uygun ise, hifalarda sporlar gelişir. Sporlar olgunlaştıktan sonra hifadan ayrılarak serbest hale gelir ve böylece uygun koşullarda çimlenerek kendi türüne özgü fungusu oluştururlar. Sporların sitoplazmasında çekirdek, vakuol, yağ ve bir fungusun oluşumuna yetecek miktarda inorganik ve organik maddeler vardır [7].



Şekil 1.4. Fungusların hifalardaki büyümesi [13].

1.1.3. Funguslarda Beslenme

Fungusların kendine özgü beslenme tarzları bulunmaktadır. Enerji kaynağı için organik bileşiklere ve biyosentez için de karbonlu kaynaklara gereksinim duyarlar. Funguslar karbon ve enerji kaynağını birçok substrattan temin edebilirler. Doğada serbest olarak yaşayan fungusların birçoğu enerji için bitkisel kökenli kaynaklardan yararlanırlar [7].

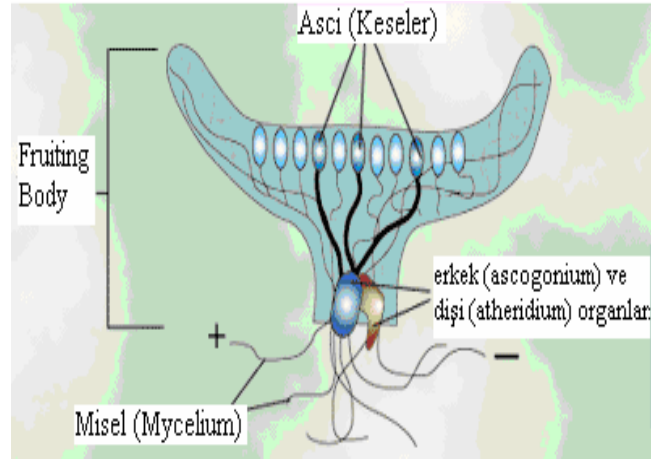
Funguslar gıdalarının bir kısmını kendileri sentezleyebilirler. Ancak, büyük bir bölümünü de dışardan sağlar. Dışarıda bulunan makromolekül veya polimerlerin membrandan girebilmesi ekstraselüler enzimlerin aktiviteleri ile mümkündür. Bu enzimler hücre içinde sentezlendikten sonra, bir kısmı hücre içinde kalır ve diğer kısmı ise dışarıya salınır. Enzimler hücre dışındaki polimerleri monomer haline getirdikten sonra aktif / pasif taşıma ile monomerler hücre içine alınır [7].

1.1.4. Fungusların Sınıflandırılması

1.1.4.1. Ascomycota (*sac fungi*)

Bu funguslar kese (*sac-like*) benzeri yapılar içinde *ascospore* olarak adlandırılan sporlarını üretmelerinden dolayı önceleri kese fungusları (*sac fungi*) olarak adlandırılırdı.

Bu kese benzeri yapılar *asci* (tekil *ascus*) olarak adlandırılır. Şekil 1.5'te bir çeşit sac fungus olan fungusun mikroskopik görüntüsünde sporların nasıl keselerin içerisinde nasıl toplandığı gösterilmiştir. Çekirdek bölünmesi ve mayoz bu yapılarda gerçekleşir. Keselerde bir tur mitozdan sonra tipik olarak mayoz görülür ve sonuçta sekiz çekirdek diğer bir deyişle 8 adet *ascospore* açığa çıkar [17].



Şekil 1.5. Ascomycota (sac fungi) mikroskopik görüntüsü [16].

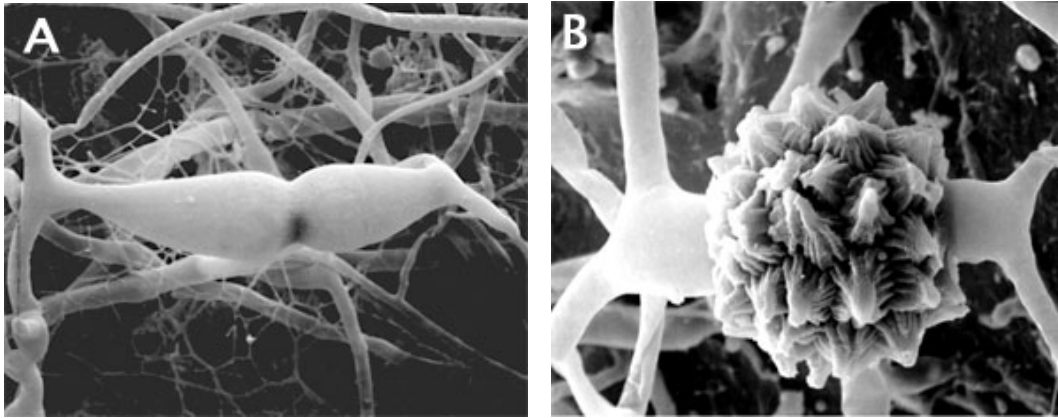
1.1.4.2. Zygomycota (*Conjugation Fungi*)

Çilek ve diğer yüksek oranda şeker içeren meyveler üzerinde etkili olan en ünlü kültür. Bu isimdeki funguslar arasında eşeyli spor oluşumunun fungus veya Ascomycota'lar gibi spor üreten yapılar yerine fungal hifaların bir araya gelerek birleşmesi veya iki hifanın karşılaşmasıyla oluşan çok küçük yapılarda gerçekleşmesine dikkat çeker. Yaklaşık 600 çeşit zygomycota türü tanımlanmıştır. "zygomycota" terimi bölünmenin karakteristik temelini anlatır ki bu da zygospor olarak adlandırılan eşeyli sporların üretimidir [19, 15]. Diğer tüm funguslar gibi, zygomycota da hem eşeyli hem de eşeysiz olarak çoğalabilir. Eşeysiz çoğalma diğer funguslara benzerken eşeyli çoğalma ascomycota'nın çoğalmasına benzerlikler gösterir [20].

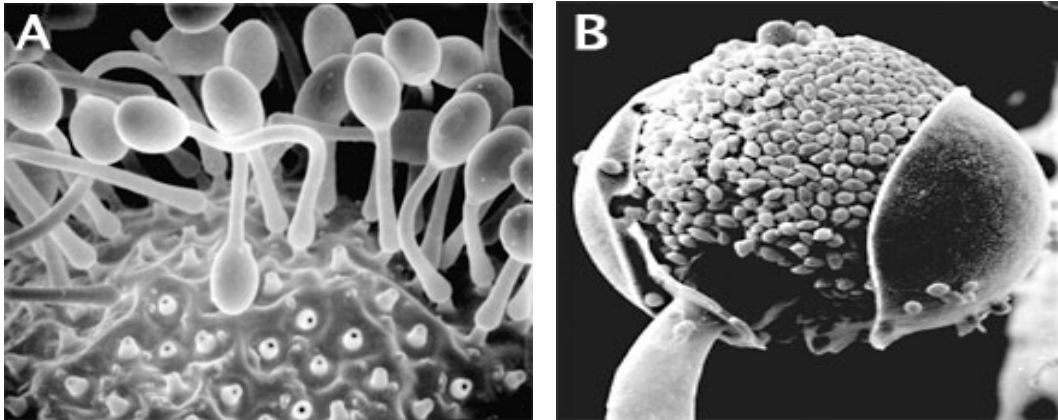
Farklı suşların hifalarının çifleşmesiyle, her iki tarafta da bir çıkıntı (progametangia) oluşur ve bunu ergin zygospor oluşumu takip eder (Şekil 1.6). Bu zygospor'lar dinlenme evresi olarak düşünülebilir. Çünkü çevre koşulları uygun olmadığında sık sık hifadaki büyümeyi devam ettirmek için bu form oluşturulur. Hifalar bozulabilir ve ölebilirler fakat zygospor'lar koşullar düzelineye kadar beklemede kalırlar. Zygospor'lar gelişmeye başladıktan sonra (mayoz bölünmenin gerçekleşmesi) yeni hifalar oluşur. Bu yeni hifalar uzun bir zaman içinde eşeysiz olarak çoğalabilirler. Yeni hifalar üretmek için gelişmeye başlayan sporlar spor kesesi yırtıldığında dışarı salınırlar (Şekil 1.7 a-b) [15].



Şekil 1.6. Ergin Zigospore oluşumu [15].



Şekil 1.7.a. Eşeyli çoğalma. (A) *Mucor mucedo*'da gametangia yapılarının birleşmesinin elektron mikroskobu ile çekilmiş görüntüleri. (B) *Mycotypha africana*'da oldukça donanımlı zigospor yapıları [22].



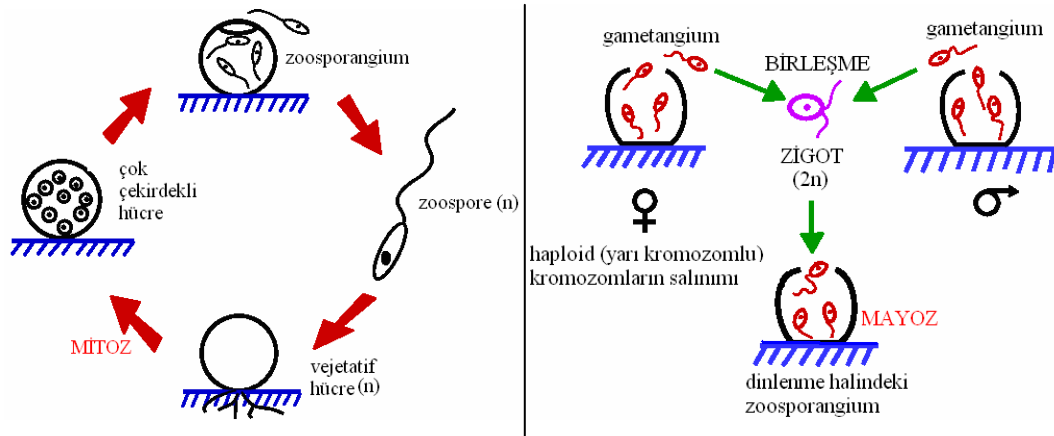
Şekil 1.7.b. Eşeysiz çoğalma (A) *Benjaminiella poitrasii*'nin ergin sporlarının ve (B) *Gilbertella persicaria*'nın spor kesesinin açılarak sporlarının salınımının elektron mikroskop görüntüsü [22].

1.1.4.3. Chytridiomycota (chytrids)

Chytridiomycota en küçük ve en basit fungustur. Prekambriyen çağından kısa bir süre sonra Kuzey Rusya Vendian’ da ortaya çıkmıştır. Şu ana kadar bilinen “chytrid” benzeri en eski fosil fungustur [23].

“Chytridiomycota” tek hücreli veya miselyum thalli’dir. Hücre büyümesi tek hücreli olarak veya çok hücreli hifaların miselyumunda meydana gelebilir (Şekil 1.8). Thallus (bir fungusun somatik fazı) genelde tek hücrelidir ve bu faz hifa büyümesini sınırlayabilir. Hifa hücreleri üreme yapıları burada bulunmamasına rağmen coenocytic’tir. Zoosporların çok gelişmiş yapıları “Chytridiomycota” karakteristiğini belirler. Bu yapıda ribozomlar çekirdeğin etrafında kümelenerek çekirdeği bir kapsül gibi sarar. Chytridiomycota bir veya iki adet kamçıya sahiptir. Ayrıca hetetrof bir canlı olarak yaşadığından çürümüş organizmalar ile beslenir.

Chytridiomycota eşeysiz olarak zoosporları kullanarak çoğalırken eşeyli formda zoosporlar istedikleri bir substrata yerleşene kadar yüzebilirler. Zoospor tutunduğunda substrattan beslenir ve mayoz bölünmeyle burada çoğalır [21].



Şekil 1.8. Chytridiomycota’ da eşeysiz ve eşeyli çoğalma [13].

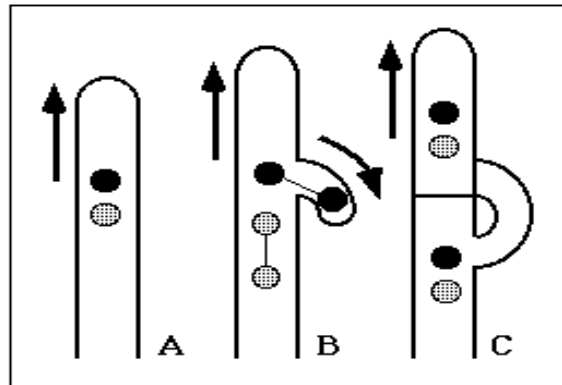
1.1.4.4. Deuteromycota (The Fungi Imperfecti)

Bu bölümdeki türlerin hepsinin eşeysiz olarak çoğaldıkları bilinmektedir. Funguslar çoğunlukla hifaların ucunda bulunan blastosporları oluşturur. Bu bölümdeki grupların ayrılması birincil olarak blastosporların gelişimiyle alakalıdır.

Bu altbölüm üyelerinin eşeyli üreme evreleri yoktur. Bu nedenle “Fungi Imperfecti” olarak ta anılırlar. Eşeysiz üremeleri conidiumlar ile olur. Bu gruba giren mayalar ise tomurcuklanarak çoğalırlar. Bunların yanında sklerotium ve klamidosporeler ile çoğalanlar da vardır. Kontrollü çevre şartları altında kültür edildiklerinde eşeyli üreme yapmaya yönelen pekçok üyesi vardır. Eşeyli üreme sonucu oluşan sporların çoğu ascospore, fakat birkaç türde basidiosporelerdir. Eşeyli üreme safhası görülmemiş üyeler conidiogenöz hücrelerin oluşum tarzı, renk ve konidiumların yapısı ve bunların yerleşim tarzı gibi karakterlerle yapay olarak sınıflandırılırlar.

1.1.4.5. Basidiomycota (club fungi)

Basidiomycota yaklaşık 30,000 tanımlanmış tür içerir [24]. Bu grup öncelikle basidium hücrelerinde üretilen eşeyli sporlar olan Basidiospore’lerle karakterize edilir. Basidiomycota üyeleri resmi olmayan bir şekilde “Basidiomycetes” olarak adlandırılır. Bir çoğu “Clamp Connections” olarak adlandırılan ve diğer funguslarda olmayan septal yapılara sahiptir (Şekil 1.9) ve tümünde görülmese de Basidiomycota’ya özgü bir tür hifa büyümesidir [22].



Şekil 1.9. Clamp cell oluşumu: A. Dikaryotik hifa, oklar hifa yönünden büyüme yönünü göstermektedir. B. Clamp cell çekirdek bölünmesiyle senkronize bir şekilde geriye doğru büyür. C. Ergin clamp [22].

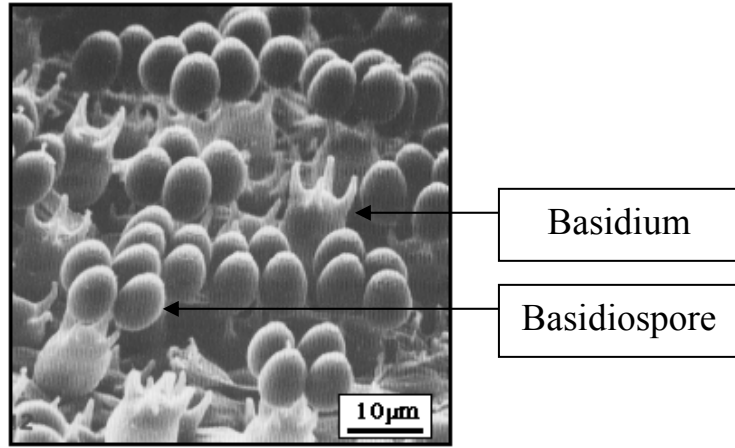
Basidiomycota sınıfı yaygın olarak bilinen fungusları içerir. Bu sınıf ismini basidia safhası olarak adlandırılan hayat döngüsünde diploid geçiş aşamasından alır. Basidia birçok basidiomycete eşeyli sporlardan oluşur. Bu şeklinden dolayı da “club fungi” olarak adlandırılır. Club fungusların birçoğu çürükçüdür. Geri kalanı da mycorrhizae (kök mantar)’dır ve oldukça kuvvetli parazitlerdir. Bu parazit fungusların bir çoğu ağaçlarda bulunur ve ölü ağaçların bozunmasını sağlar. Basidiomycetes diğer türlerden daha az eşeysiz ve daha çok eşeyli çoğalmaya eğilimlidir [25].

Basidia (tekil; basidium) fungusun çoğalma yapılarını kaplar. Basidiospore’lar basidiodan koparak sürüklenirler ve herhangi bir fruiting body’ye sahip fungusta meydana gelebilirler.

Basidiomycota üyeleri eşeysiz olarakta çoğalabilirler. Bu çoğalma Basidiomycota hifalarının basit şekilde büyümesiyle gerçekleşir ki bu hifaların ucunda Conidia adı verilen küçük, tek delikli küresel yapılardır. Conidia, yeni hifanın ilk hücresi olarak davranır. Yeni hifa oldukça basit bir şekilde büyüyerek birçok conidia üretir [15].

Basidia üretiminin en belirgin özelliği hücreler üzerinde eşeyli sporlar olarak üretilmesidir. Her bir hücre thallus içinde iki haploid (yarı kromozomlu) çekirdek içerdiğinden uzun ömürlü (dikaryon) olmaları bir diğer önemli özelliğidir [22]. Birçok Basidiomycota, Basidiumları çok hücreli spor üretilen yapılar (fruiting body) üzerinde üretmesinin yanında basidialar maya veya diğer tek hücrelilerde de oluşabilmektedir [22].

Basidia genel olarak, sterigmata olarak adlandırılan çok küçük bir sapın ucunda her bir basidiumda dört spor olacak şekilde üretilir (Şekil 1.10). Çoğunlukla her bir spor bir veya iki haploid mayozla oluşan ürünler içerir [22].



Şekil 1.10. Basidiomycota eşeyli çoğalması; *Coprinus cinereus* mantarının alt tarafındaki yüzeyinin SEM’inden her birinde dört basidiospore bulunan basidialar görülmektedir [22].

Flamentli funguslar renkleri, sertlik dereceleri (yumuşaklık) ve çürütme (çürüme) çeşitlerine göre beyaz, kahverengi ve yumuşak olarak üç sınıfa ayrılırlar. Yumuşak çürükçül funguslar Ascomycete ve fungi imperfecti (deutromycete) gruplarını içerir ve selülozu ayrıştırırken lignini kısmi olarak parçalayabilir. Kahverengi çürükçül funguslar basidiomycetelerin bir kısmını içerir ve hemiselüloz ile selülozun ayrıştırılması için tercih edilir. Lignini metil giderimi yaparak parçalar ve bunun sonucunda da ürün olarak amorf, kahve renkli ve kolayca ufalanan rezüdüler oluşur. Lignini kinonlara yıkar ve dolayısıyla kahve renk oluşur. Üçüncü olarak beyaz çürükçül funguslar da bazı basidiomyceteleri içerir. Lignin, beyaz çürükçül funguslar tarafından oldukça etkili ve hızlı bir şekilde parçalanır. Diğer birçok fungus ve bakterinin yanında beyaz çürükçül funguslar lignini karbondioksit ve suya tamamen parçalayabilmektedir [26].

1.2. Beyaz Çürükçül Funguslar

Beyaz çürükçül funguslar global karbon döngüsünün düzenlenmesinde anahtar olmaktadır [27]. Lignini parçalayan funguslar ekstraselüler enzimlerini kullanarak lignini depolimerize ve mineralize edebilme yeteneklerine göre karakterize edilir. Ekstraselüler enzimler olan lignin peroksidaz, mangan peroksidaz, H_2O_2 üreten enzimler ve lakkaz ligninin parçalanması ile ilişkilidir. Beyaz çürükçül funguslarla yapılan çeşitli çalışmalar peroksidaz ve lakkaz enzimlerinin türden türe farklılık göstermesine rağmen tüm ligninolitik funguslar tarafından salgılandığını göstermiştir [28, 29, 30].

Ligninolitik funguslar ağaçların köklerinde beyazlığa sebep olarak rekalsitran bileşiklerin geniş bir çeşidini nonspesifik enzimlerle mineralize ve degrade edebilmektedir. Bu yıkımı güç (recalcitrant) bileşiklerden böcek zehirleri (pestisit), polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), poliklorlubifeniller (PCB), organoklorlar, sentetik boyalar, cephane atıkları, sentetik polimerler gibi birçoğu büyük çevre kirliliklerine sebep olurlar [31].

Beyaz çürükçül funguslar lignin, aromatik bileşikler ve tekstil boyaları gibi mikrobiyal ataklara karşı dayanıklı bileşikleri salgıladıkları spesifik olmayan ekstraselüler enzimlerle oksitleyebilirler [32]. Beyaz çürükçül fungusların bir çoğunun organik kirlilikleri geniş bir spektrumda okside edebildiği gibi azo, trifenil metan, polimerik ftalosiyenin ve heterosiklik boyalar gibi rekalsitran maddelerinde çeşitli türlerini okside edebildiği bulunmuştur [33, 34, 35]. Bu kültürler lignini modifiye eden enzimleri yani lignin peroksidaz (LiP), mangan peroksidaz (MnP), mangan bağımsız peroksidaz (MnIP) ve sellobiyoz dehidrogenaz (CDH), azot, karbon veya kükürtün sınırlı olduğu ortamlarda sekonder metabolitler olarak salgırlar [36].

Lignini parçalayan funguslardan *Phanerochaete crysosporium* ve *Trametes versicolor* en çok çalışılmış olan funguslardır. Ligninolitik basidiomycete *Phanerochaete crysosporium*' un lignini oldukça iyi degrade ettiği bulunmuştur ve ligninin biyolojik olarak parçalanmasının fizyolojik gereksinimlerinin çalışılması için model organizma olarak kullanılmaktadır.

Phanerochaete cryosporium' un ligninolitik enzimleri sadece karbon, azot veya kükürt sınırlamasıyla tetiklenen sıvı kültürlerde sekonder metabolizma sırasında ürettiği bulunmuştur [38]. *Trametes versicolor* oldukça fazla çalışılmış ve önemli miktarda lakkaz salgılayan bir diğer beyaz çürükçül fungustur. *Coriolus versicolor* ve *Polyporus versicolor* olarakta bilinmektedir. *Phanerochaete cryosporium*'a benzer şekilde *Trametes versicolor*'da lignin peroksidaz ve mangan peroksidaz enzimlerini salgılar. Birçok lakkaz mantarın ağaç üzerindeki büyümesi sırasında konstitutif (indükleyici bir maddeye ihtiyaç duymadan enzim salgılayan) olarak düşük konsantrasyondaki üretimi xylidine ve ferulik asit gibi aromatik bileşiklerin ilave edilmesiyle yüksek konsantrasyonlara indüklenir. *Trametes versicolor* en çok çalışılmış lakkaz üreten fungustur ve lakkaz hakkındaki birçok bilgi bu çalışmalardan elde edilmiştir [38].

1.3. Beyaz Çürükçül Fungusların Salgıladığı Ligninolitik Enzimler

Ekstraselüler veya intraselüler olarak salgılanan bu biyokatalizörlerin fiziksel fonksiyonları mikroorganizmadan mikroorganizmaya farklılık göstermesine rağmen sonuçta hepsi polimerizasyon veya depolimerizasyon proseslerini katalizler [39].

Lignin molekülleri hücre içine taşınabilmesi için oldukça büyüktür. Lignin, bitki hücre duvarının yapısal komponentini sağlar. Lignin heterojendir ve çeşitli hidroliz edilmeyen -C-C- ve -C-O- bağları tarafından birbirine bağlanan fenil propanoid birimleri içeren kompleks bir biyopolimerdir [40]. Heterojen yapısından dolayı lignin biyolojik olarak parçalanması için ekstraselüler enzimler olması gereklidir [41]. Lignin degradasyonundan sorumlu iki tip ekstraselüler enzim vardır. Bunlar fenoloksidazlar ve peroksidazlardır.

Lakkazlar (EC 1.10.3.2) çoklu bakır fenoloksidazdır. Bu enzimler fenol ve aromatik aminleri oksitler. Yapısında bulunan 4 e⁻ unu suya indirgemek için oksidant (yükseltgen) olarak hidrojen peroksit (H₂O₂) yerine oksijen (O₂) kullanır.

Peroksidazlar ise farklı substrat spektrasına göre ikiye ayrılır. Biri Mn (II)'yi en verimli indirgen substrat olarak kullanan mangan peroksidaz (EC 1.11.1.13) diğeri de nonfenolik ve fenolik aromatik bileşikler oksitleyen Lignin peroksidaz (EC 1.11.1.14)'dır [38]. Tek elektron oksidasyonunu serbest radikal üretmek için katalizler. Degredasyon sırasında lignindeki kimyasal değişimle açıklanan bağ yarılmaları reaksiyonları ve çeşitli nonenzimatik bağlanmalarla yer değiştirmelere uğrayan serbest radikal üretimi fungal kültürler tarafından katalizlenir. Bu enzimlerin lignin degradasyonunu oluşturmak için düşük molekül ağırlıklı mediating substratlardan yararlandığı gösterilmiştir [41].

Lignin Peroksidazlar hem fenolik hem de fenolik olmayan maddelerin oksidasyonunu katalizler, lakkaz ve mangan peroksidaz ise fenolik bileşikler fenoksi radikaller ve kinonlara oksitler, gilkoz oksidaz ve glioksal oksidaz da H_2O_2 üretimi ve sellobioz-kinon oksidoredüktaz ise kinonu indirgeyen bu enzimlerin lignin parçalanmasıyla ilgisi vardır [36, 42]. Ligninin parçalanma derecesi odunun diğer bileşenlerin çevre koşullarına ve içerdiği fungus çeşitlerine bağlıdır ve bunun gerçekleşmesi için tek bir mekanizma olmadığı ve de bu mekanizmanın mikroorganizmalar arasında farklılık gösterdiği kanıtlanmıştır. Örneğin *Pleurotus ostreatus*, lignini degrade eden mikroorganizmaların alt sınıfına aittir ve lakkaz, mangan peroksidaz ve veratril alkol oksidaz üretirken lignin peroksidaz üretmez [43]. *Pycnoporus cinnabarinus* ligninolitik enzim olarak sadece lakkaz üretir [44].

1.3.1. Fenoloksidaz

Mavi bakır enzimler içerdikleri önemli kofaktörlerden dolayı primer amino asit zincirleri ve biyolojik fonksiyonlarında farklılık göstermesine rağmen üç boyutlu yapıları ve üç değişik tipteki bakır (Cu) bağlanma bölgeleri oldukça benzerdir [38, 45].

Substrat olarak moleküler oksijen (O_2) kullandığı bilinen 200 den fazla oksijenaz ve oksidaz vardır. Ancak bunlardan sadece 6 tanesi oksijeni su molekülüne indirger.

- Blue oxidase (laccase) (EC 1. 10. 3. 2)
- Cytochrome-C oxidase (EC 1. 9. 3. 1)
- L-ascorbate oxidase (EC 1. 10. 3. 3)
- Ceruloplasmin (EC 1. 16. 3. 1)
- Bilirubin oxidase (EC 1. 3. 3. 5)
- Phenoxazinone synthase (EC 1. -. -. -)

1.3.1.1 Lakkaz (EC 1. 10. 3. 2)

Çoklu mavi bakır proteinlerinin en yaygın olarak bulunanı lakkazdır [46]. Doğada her yerde bulunan glikoproteinlerdir. Lakkaz enzimi (EC 1.1.3.2, p-difenol; dioksijen oksidoredüktaz) oksidazların mavi-bakır proteinler olarak adlandırılan ailesine aittir [47].

Lakkazlar mavi bakır proteinleridir fakat çoğunlukla polifenol oksidazlar olarak tanımlanırlar. Polifenol oksidazlar, son elektron alıcısı olarak moleküler oksijen içeren aromatik bileşikler oksitleyebilme özelliğine sahiptir [48]. Lakkaz enzimi XIX. yy'dan bu yana çalışılmış enzimlerden biridir [49]. İlk olarak 1883 yılında Yoshida tarafından japon *Lacquer* (verniki) ağacı olan *Rhus vernicifera*'nın reçine kanal sıvılarından ekstrakte edilmiştir [47, 49]. İzolasyonu ve pürifikasyonundan yaklaşık 10 yıl sonra 'lakkaz' olarak adlandırılmıştır [50]. Sonrasında 1896 yılında Bertrand ve Labord, lakkazın funguslar tarafından da salgılanan bir enzim olduğunu bulmuştur. *Coriolus versicolor*, *Dichomitus squalens*, *Junghuhnia separabilma*, *Phanerochaete cryosporium*, *Phlebia ochraceofulva*, *Phlebia radiata*, *Rigidoporus lignosus* çok çalışılmış ve önemli beyaz çürükçül funguslardan bazılarıdır [38]. Lakkaz aktivitesi gösteren tek bakteri de *Azospirillum lipoferum*'dur. Lakkaz ayrıca ağaç, lahana, şalgam, şekerpancarı, elma, şeftali, kuşkonmaz gibi birçok sebzede de teşhis edilmiştir [47].

Tablo 1.2. Genel ve Trametes kaynaklı lakkaz enziminin fiziksel özellikleri [38].

<i>Özellik</i>	<i>Lakkaz (genel)</i>	<i>Lakkaz (Trametes)</i>
Optimum pH	3.0 - 7.5	3.6 - 5.3
Optimum Sıcaklık (°C)	40 - 80	60
Molekül Ağırlığı (kDa)	60 - 390	60 - 65
Molekül başına Bakır içeriği	2 - 16	4
Redoks potansiyeli (mV)	180 – 800	T1 (pH 5.5) 785 T3 (pH 5.5) 782
İzozimlerinin sayısı	> 5	Farklı genlerde 2-3 Kromatografik formda bulunabilir
İzoelektrik nokta (pI)	2.6-7,8	3.1; 3.3; 4.6-6.8
Karbonhidrat içeriği	10 - 45	14
İnhibitörleri	CN ⁻ ; N ₃ ⁻ ; F ⁻ ; halojen ve anyonlar; pH; dietilkarbamik asit; tiyoglikolik asit; feniltiyoüre EDTA; coniferyl alkol	
Katalizlediği reaksiyonlar	Metil, metoksi ve karboksil giderimi; fenoksi radikallerinin oluşumu; C _α -C _β yarılmaları; aril-alkil yarılmaları; C _α -oksidasyonu	
Substratları	o- ve p- difenol; polifenol; aminofenol; klorofenol; askorbik asit; ferrosiyanit	

Lakkaz (EC 1.1.3.2, p-difenol; dioksijen okidoreductase) 70 kDa molekül ağırlığında bir polifenol oksidazdır [52, 53]. Moleküler oksijenin $4e^-$ unun suya indirgenmesini katalizleyebilen bir grup mavi çoklu bakır oksidaz (bmCuO) ailesinin bir üyesidir. Moleküler oksijenin indirgenmesi indirgen substratın $1e^-$ oksidasyonu ile birlikte yürütülür [51]. Fenol için organik solventlerdeki gibi analitik biyosensör araçları, biyofuel hücrelerde oksijen katotlarının geliştirilmesi, tekstil boyalarının degradasyonu, organik sentezler, immunoassay labelling, lignin giderimi, metil giderimi ve kağıt hamuru beyazlatılması gibi çeşitli biyoteknolojik ve çevresel kullanımları bulunmaktadır [38, 39, 52, 54-57].

Lakkazlar sadece metoksi süstitüe monofenol, orto-/para-/difenollerin hidroksil grubundan H atomunun uzaklaştırılmasını değil aynı zamanda aromatik aminler, syringaldazine ve nonfenolik bileşikler de radikaller haline oksitleyebilme yeteneğine de sahiptir [56, 58]. Buna ek olarak sadece fenolik ve metoksifenolik asitleri değil dikarboksilik asitleri de metoksi gruplarına saldırarak (dimetilasyon) oksitler [59].

1.3.1.2. Lakkaz Enziminin Yapısal Özellikleri

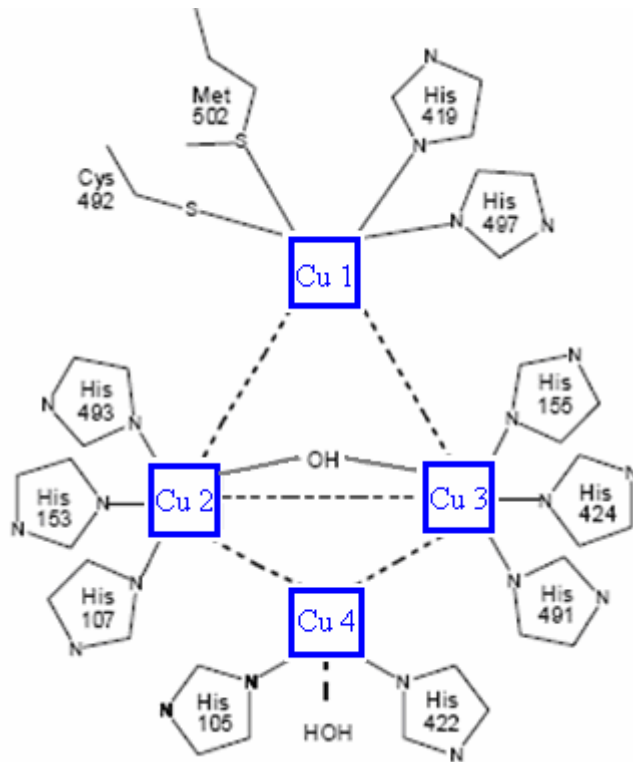
Aktif haloenzim formu olarak lakkaz molekülü dimer veya tetradimer bir glikoproteindir. Çoğunlukla monomer başına üç redoks bölgesine bağlı dört bakır atomu içerir. Monomer sınıflarının molekül ağırlığı 50-100 kDa arasındadır. Önemli bir özelliği de yapısında bulunan % 10-45 oranındaki karbonhidrat kısmının enzime yüksek stabilite sağlamasıdır [61].

Lakkazlar monomerik veya multimerik bakır içeren enzimlerdir ve bu enzimlerde bakır atomu önemli bir prostetik gruptur [38]. Monomerik lakkaz moleküllerinin çoğu yapılarında 4 tane bakır atomu içerir ve yapıları UV/visible ile elektron paramanyetik rezonans (EPR) spektroskopisi teknikleri kullanılarak üç gruba ayrılmıştır:

Tip I bakır (T1); enzimin 600 nm’ de gözlenebilen yoğun mavi renginden sorumludur ve EPR ile belirlenebilir. T1 bakırı çoğunlukla iki histidin aminoasitinin iki azotu ve sistein amino asitinin de kükürt grubu ile bağ yapmış durumdadır (Şekil 1.11) [47]. Lakkaz enziminin karakteristik mavi renginden TipI bakırın, sistein (Cys) aminoasidinin kükürt (S) grubu ile yaptığı bağ sorumludur [62].

Tip II bakır (T2); renksizdir. Görünür bölgede çok zayıf absorbans vermesine karşın EPR ile belirlenebilir,

Tip III bakır (T3); iki çekirdekli konformasyonda bir çift bakır atomu içerir. T3 bölgesinin iki bakırı yakın (near) UV’de 330 nm de verdiği zayıf absorbans bandıyla karakterize edilirken EPR’ta sinyal vermeyen bir çift bakır atomu içerir [47, 51, 62].



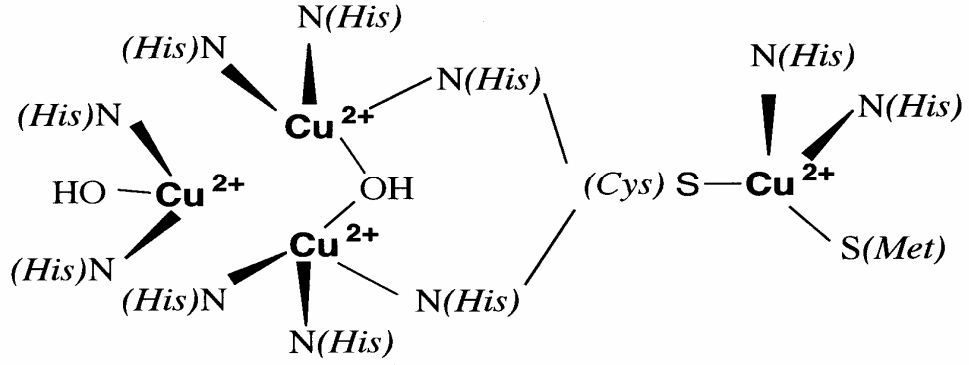
Şekil 1.11. Lakkazın bakır merkezleri [63].

T₂ ve T₃ bakır bölgeleri kapalıdır ve üç çekirdekli merkez formunda kümelenir. Burada iki adet T₃ bakır hidroksil köprüsüyle bağlanmış durumdadır ve bu kümelenme yeri O₂ indirgenme bölgesidir [43, 47, 64]. Bu tip enzimlerdeki T₁ bakır bölgesinin fonksiyonu; indirgen substrattan elektron alarak T₂/T₃ bakır kümesine sonradan ortaya çıkan bu elektronun transferidir (Şekil 1.11) [65]. Lakkazdaki T₁ bakır indirgen substratla reaksiyona girer. Lakkazın substrat aralığı kısmi olarak redoks potansiyeline (E°) göre belirlenmiştir. Genelde fungus kaynaklı lakkaz ile ağaç kaynaklı lakkaz karşılaştırıldığında fungus kaynaklı olan yüksek redoks potansiyeline sahip olduğu görülmüştür. Fungus kaynaklı: 0.5-0.8 V, ağaç kaynaklı: 0.3-0.4 V değerindedir [45]. Bu yüksek değer Tip I bakırının sahip olduğu üç ligandın (2 histidin(his) ve 1 sistein (cys)) trigonal piramidal geometrideki koordinasyonu sonucudur [66].

Örneğin, *Trametes villosa* kaynaklı lakkazın aminoasit zincirinin 463 sırasındaki fenil (phe) yerine mutasyonla metionin (met) getirilmiş ve redoks potansiyeline bakıldığında yüksek değerin düştüğü görülmüştür [66].

Bazı indirgen substratlar için lakkazın katalitik etkinliğinin öncelikli olarak T₁ bakır bölgesinin redoks potansiyeline bağımlı olduğu bulunmuştur. Dolayısıyla T₁ bakır bölgesinin redoks potansiyeli ne kadar yüksekse katalitik etkinlikte o kadar yüksektir [52, 69]. Oldukça benzer veya özdeş görünümlü bakır koordinasyon geometrisine rağmen farklı mavi çoklu bakır oksidazların redoks potansiyelinin (E_o) nasıl ayarlandığı halen tam olarak açıklanamamıştır [67, 68].

İki T₃ bakır atomu arasındaki kuvvetli antiferromanyetik bağlanma hidroksil köprüsü ile oluşur (Şekil 1.12) [64]. Bu tip enzimde T₁ bölgesinin fonksiyonu T₂/T₃ kümelenmiş bakıra elektron transferinin ardından, indirgen substrattan (elektron donörü) elektron alımını sağlamaktır [66].



Şekil 1.12. Lakkazın aktif bölgesindeki bakır atomlarının düzenlenişi [67].

Bu geometri bozulmuş trigonal bipiramidal kooordinasyon olarak tanımlanmaktadır. Cu(I) ve Cu(II) türleri için tercih edilen koordinasyon bölgesi arasındaki ara ürün ender görülür. Lösün rezüdüsü mevcuttur ancak direkt olarak koordine olmak için çok uzaktır. Bu nedenle Cu sadece üç atomla koordine edilir [62].

Lakkazlar kaynağından bağımsız olarak, birçok anyon tarafından inhibe edilebilir. Florür, siyanür, tiyosiyanat ve azid benzeri anyonların bakır bölgeleri ile etkileşime girmesiyle kuvvetli şekilde inhibe olabilir [51, 69, 70].

Farklı kaynaklardan elde edilen lakkazların kinetik verilerine bakıldığında yardımcı substrat olan oksijen için K_m değerleri ($\sim 10^{-5}$) benzer ancak V_{max} ($50-300 \text{ Ms}^{-1}$) değerlerinin farklı olduğu belirtilmiştir. Kinetik, sabit pH değerine bağlı olarak farklılık gösterir. K_m ise hem substrat hem de yardımcı substrat için pH değerinden bağımsızdır [51, 69, 70].

Trametes versicolor kaynaklı lakkazın elektrostatik yüzey dağılım potansiyeli, negatif yükün baskınlığını ortaya çıkarır ki bu da asidik bir pI değeri ile uyum gösterir (pI: 3.5). T1 bakır bölgesinin yakınındaki çukurun küçük negatif yüküne substratın bağlandığı enzim-substrat kompleksinin kristal yapısından bilinmektedir. Bu bölgedeki negatif yükün fonksiyonel önemi katalitik döngü boyunca oluşan radikalın stabilizasyonunu sağlayabilir. Bundan dolayı önemlidir [51].

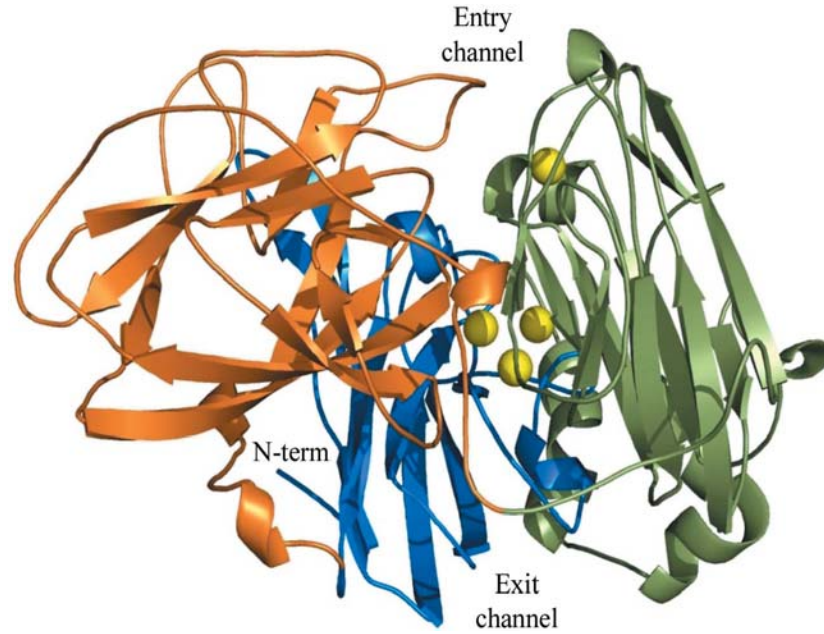
1.3.1.3 Lakkaz Enziminin Kristal Yapısı

Lakkazın mükemmel şekildeki elektron yoğunluğu dört bakır atomunun hepsi ve toplamda da 7 N-asetil glikozamin kısmı ve 5 ayrı N-glikozilasyon bölgesiyle polipeptidin tamamının modellenmesine izin verir [37]. *Trametes versicolor* kaynaklı lakkazın yapısı monomerdir. Sahip olduğu üç domainin boyutları yaklaşık olarak 65 x 55 x 45 Å³ dur. Her domain benzer β -barel yapısına sahiptir [51].

Domain 1: iki adet dört stranddan oluşan β -sheet ve 4 tane 3_{10} -helix içerir.

Domain 2: bir adet altı iplikli ve bir tane de 5 iplikli β -sheet içermesinin yanında 1. domaindeki gibi üç tane 3_{10} -helix içerir.

Domain 3: β -barrel formunda 2 tane beş iplikli ve bir tane iki iplikli β -sheet içerir. α -helix ve β -sheet ile birlikte T1 bakırın yerleştiği bir boşluk oluşturur (Şekil 1.13) [51].



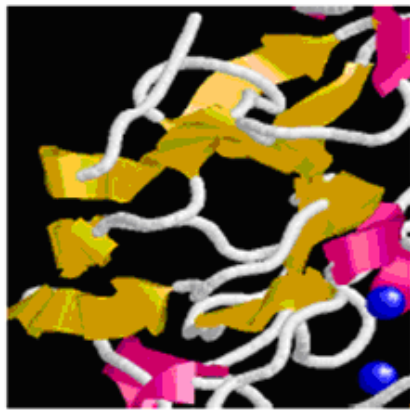
Şekil 1.13. Lakkaz enziminin yapısında domainlerin düzenlenişi (D1-D3) [52].

Lakkazın kristal yapısı içerdği üç cupredoxin benzeri domain içeren monomerik bir molekül olduğunu gösterir. 1998 yılında *Coprinus cinereus*' tan elde edilen lakkazın kristal yapısının Cu-2 bağımlı olduğu rapor edilmiştir (Şekil 1.14) [62].

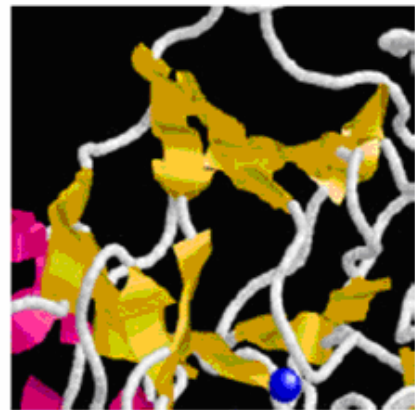


Şekil 1.14. *Coprinus cinereus*' dan elde edilen Cu-2 bağımlı lakkazın kristal [63].

Tüm mavi bakır oksidazlar, moleküler yapısında β -barrel formunda domainler içerir ayrıca üçüncü domain dört adet kısa helikal bölgelerden oluşan β -sandwich konformasyonundadır (Şekil 1.15) [62].



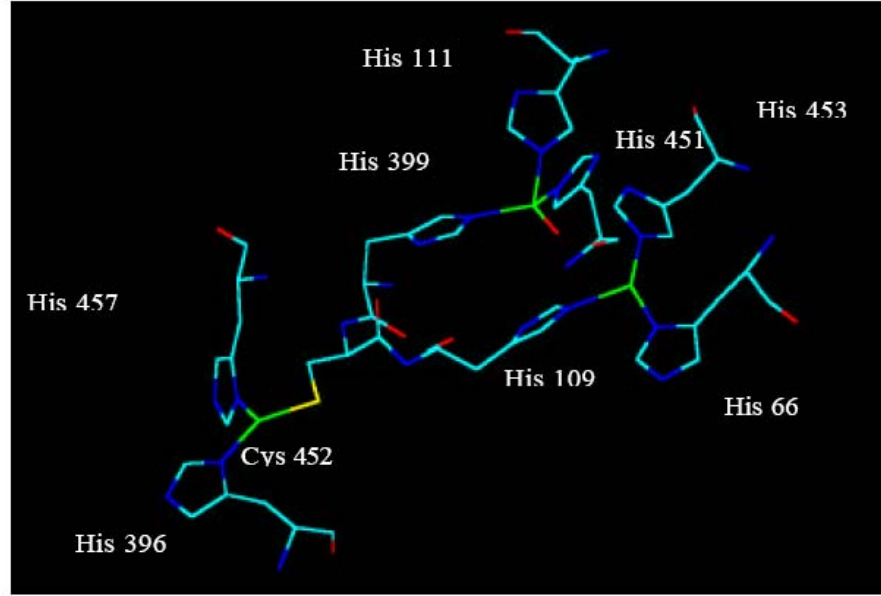
(a)



(b)

Şekil 1.15. *Coprinus cinereus*' dan elde edilen Cu-2 bağımlı lakkazın cupredoxin benzeri domainlerden (a) β -barrel ve (b) β -sandwich konformasyonları Ducros ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır [63].

Kristal yapı üç çekirdekli merkezde T2 bakırı ve T3 bakırlarının beraber ve birbirine yakın olduğunu gösterir [46]. Çalışmalar T2/T3 bakır bölgesinin Cu atomlarının sekiz Histidin (His) ile düzenlenmiş olduğunu göstermiştir. Bu sekiz histidin 4His-X-His motifiyle korunmaktadır. T3 bakırları altı histidinle koordine iken T2 bakırı kalan iki histidin ile koordine (Şekil 1.16) [62].



Şekil 1.16. Coprinus cinereus kaynaklı Cu-2 bağımlı lakkazın aktif bölgesinde ligand ve bakır atomlarının koordinasyonunun top ve çubuk modeli. Bakır yeşil, kükürt sarı ve oksijen atomları kırmızıdır [62].

1.3.1.4. Lakkaz Katalizli Reaksiyonlar

Lakkazlar hem mono hem de multi bakır içeren oksidazlardır. Bu oksidazlar fenolik bileşik ve aromatik amin substratların çok büyük bir miktarının $1e^-$ oksidasyonunu katalizler. Moleküler oksijen terminal elektron akseptörü olarak davranır ve böylece iki molekül su indirgenir [62]. ABTS gibi belirli substratlar potansiyel olarak iki elektronunu verebilmesine rağmen lakkazlar sadece $1e^-$ oksidasyonunu tamamlayabilmektedirler. Bu nedenle sonradan (subsequent) oluşan non enzimatik reaksiyonlarla radikaller oluşturulur [65].

Lakkazın katalitik mekanizmasında bakır atomları önemli rol oynarlar. Lakkaz katalizli reaksiyonlar üç ana basamaktan oluşurlar.

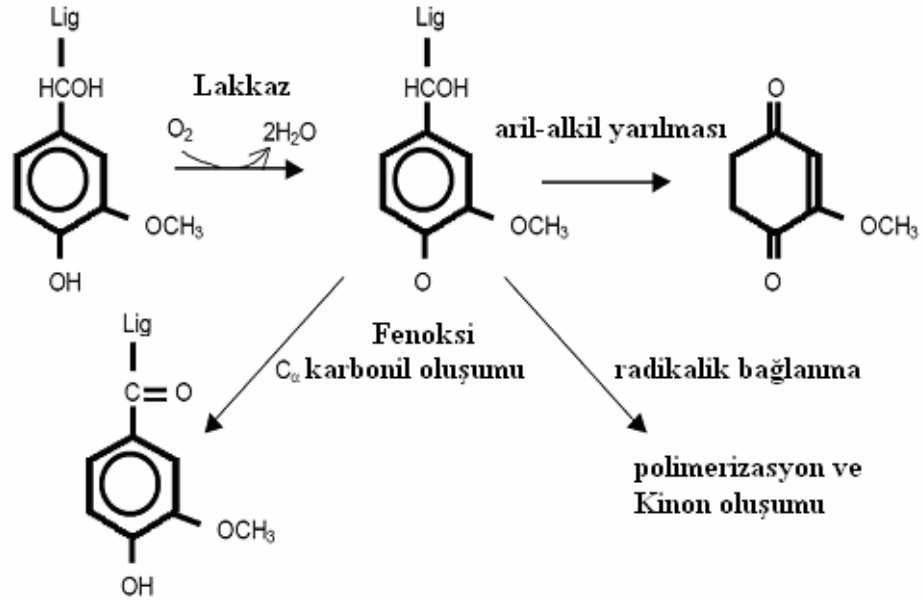
1. İndirgen substratın kendisi yükseltgenirken T1 bakırını indirger.
2. Açığa çıkan elektron T1 bakır bölgesinden üç çekirdekli olarak kümelenmiş T2 ve T3 bakır bölgelerine taşınır.
3. Üç çekirdekli olarak kümelenmiş T2 ve T3 bakır bölgesinde moleküler oksijen suya indirgenir.

Kinetik, spektroskopik ve EPR verileri T1 ve T2 bakır atomlarının elektron alımını ve T2 ile T3 bakır atomlarında oksijen bağlanmasını içerdiğini göstermiştir [59].

Yapılan çalışmalardan indirgen substrattan öncelikle T1 bakır bölgesinin elektron aldığı ve bu reaksiyonunda tek fazlı (monophasic), bimoleküler ve ikinci dereceden olarak yürüdüğü görülmüştür. İkinci dereceden hız sabiti T1 bakırının indirgenme hızı olarak tanımlanmaktadır. T1 bakır bölgesinden üç çekirdekli bakır bölgesinin (T2/T3) moleküller arası elektron transferi daha yavaştır [65].



Lakkaz katalizli reaksiyonlarda substrat moleküllerinin çok büyük bir kısmının lakkaz tarafından $1e^-$ oksidasyonu ile bir serbest radikal oluşması gözlenir [62, 71]. Substratın $1e^-$ oksidasyonu oksijenin $4e^-$ indirgenmesi ile tamamlanır ancak bu mekanizma tam olarak açıklanamamaktadır [47]. Tipik olarak ilk ürün stabil değildir ve ikinci ürün de enzim katalizli oksidasyon, nonenzimatik hidrasyon, veya polimerizasyon gibi reaksiyonlar altında oluşabilir. Lakkazın doğal substratı olan ligninin bağları lakkaz tarafından yarılır. Bu yarıma C_α oksidasyonu ile ($C_\alpha - C_\beta$ bağının yarılması ve aril-alkil yarılması) ligninin fenolik alt birimlerine saldırımayla olur (Şekil 1.17) [27]. Moleküler oksijen son elektron alıcısı olarak davranır ve böylece iki molekül su (H_2O) indirgenir [62].



Şekil 1.17. Ligninin fenolik gruplarının lakkaz katalizli oksidasyon (yükseltgenme) reaksiyonu [63].

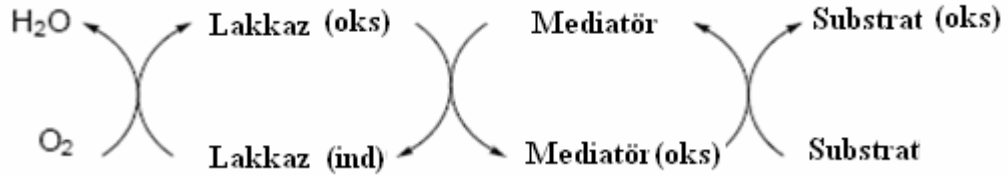
1.3.1.5. Lakkaz Aracı Sistem ve Aracılar (Mediatör-ler)

Ligninin sıralı (random) polimer olması ve lakkazında düşük redoks potansiyelinesahip olmasından dolayı lakkaz sadece ligninin fenolik parçalarını oksitleyebilir. Lakkaz aracı sistem (LMS)'in lignine olan aktivitesi iki ana faktöre bağlıdır. İlk olarak enzimin redoks potansiyeli ikinci olarak da mediatörün oksidasyonundan oluşan radikallerin stabilite ve tekrar kullanılabilirliğidir.

Farklı substratlar ve mediatörler ile değişik kaynaklardan elde edilen lakkazın çok çeşitli şekillerde reaksiyon verdiği gösterilmiştir [58]. Ligninin biyodegradasyonunda lakkazın görevi vardır ancak düşük oksidasyon potansiyelinden dolayı fenolik bileşikler için mediatör bileşikler varlığında bu enzimler kullanılır. Çünkü lignin ve benzeri bileşiklerin oksidasyonu yüksek oksidasyon yeteneği gerektirir [71, 72].

Yüksek redoks potansiyeline sahip (>900 mV) küçük molekül ağırlıklı doğal bileşikler mediatör olarak adlandırılır ve oksijen delignifikasyonundan gelen fenol içermeyen rezüdülerin oksidasyonu için kullanılabilir [44].

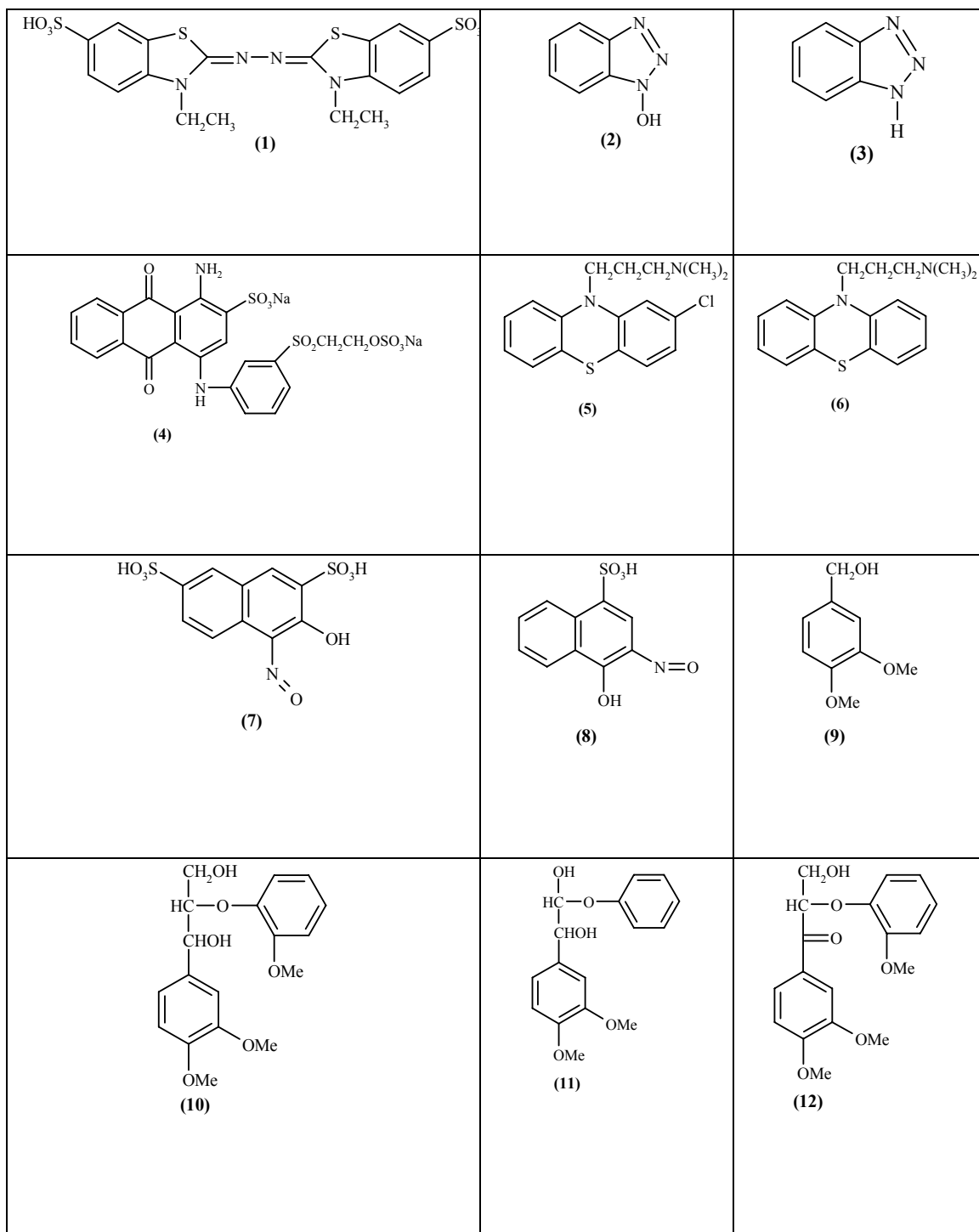
Substratlar büyüklüklerinden dolayı enzimatik pakete direkt giremediklerinden küçük birer molekül olan mediatörler devreye girer. Mediatör, bir çeşit elektron mekiği (electron shuttle) olarak davranan bir moleküldür. Enzim tarafından yükseltgendiğinde oldukça kuvvetli yükseltgen (oksidan) bir ara bileşik (co-mediatör-Med_{oks}) oluşur. Enzimatik paketten difüz edildiğinde herhangi bir substratı kolaylıkla oksitleyebilmektedir (Şekil 1.18) [73].



Şekil 1.18. Lakkaz mediatör oksidasyon sisteminin katalitik döngüsü [73].

Lakkaz mediatör sistemi (LMS), kağıt hamurundan lignin giderimi, tekstil boyalarının ağartılması, PAH degradasyonu, böcek ilacı ve böcek zehiri degradasyonu ve organik sentez gibi geniş bir uygulama alanında kullanılmaktadır [38, 56, 60, 72].

LMS için yaklaşık olarak yüzün üzerinde olası mediatör bileşik tanımlanmıştır fakat ABTS (azin; 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzotiazoline-6-sulfonic acid)) ve HBT (triazol; 1-Hidroxybenzotriazole) en yaygın olarak kullanılan bileşiklerdir (Şekil 1.19) [72, 74].

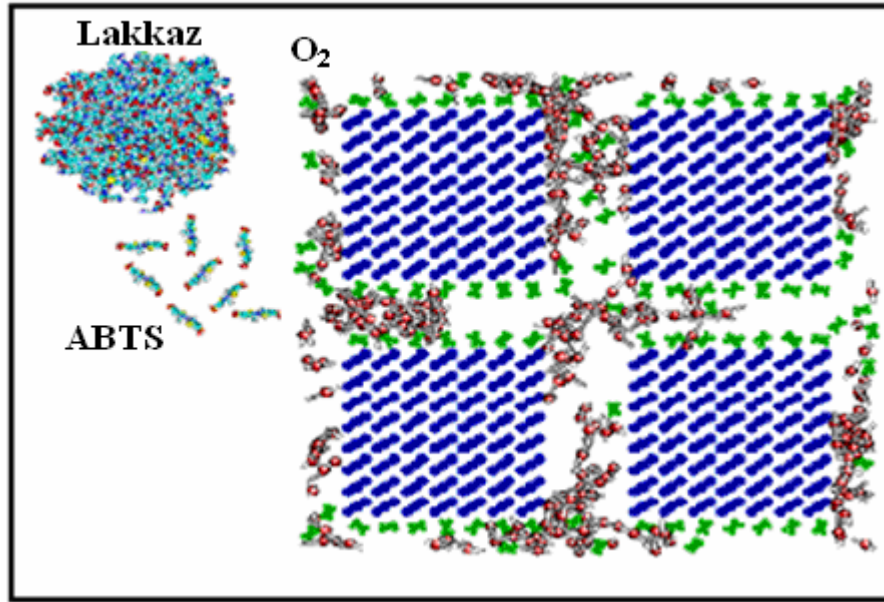


Şekil 1.19. Bazı doğal ve sentetik (yapay) mediatörler ve kimyasal yapıları. 1) 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit), ABTS; 2) 1-hidroksibenzotriazol, HBT; 3) Benzotriazol, BT; 4) Remazol brilliant Blue, RBB; 5) Klorpromazine, CPZ; 6) Promazin, PZ; 7) 1-nitrozo-2-naftol-3,6-disülfonik asit, NNDS; 8) 2-nitrozo-1-naftol-4-sülfonik asit, HNNS; 9) Veratril alkol, VA; 10) Dimer I; 11) Dimer II; 12) Dimer III.

1.3.1.5.1. 2,2'-azino-bis(3-etilbenziltiazolin-6-sülfonik asit) Aracılı Sistem

Lakkaz enzimi 2,2'-azino-bis(3-etilbenziltiazolin-6-sülfonik asit)'i (ABTS) serbest radikaller aracılığıyla stabil bir katyon radikaline oksitler. Oluşan katyon radikalın yoğun rengi de enzim aktivitesiyle ilişkilidir.

ABTS'nin kağıt hamurundan lignin giderimindeki rolü henüz tam olarak anlaşılamamıştır. ABTS'nin oluşan katyon radikali kraft pulp'un fiber duvarlarındaki lignin rezüdüleri ve fiber duvarlardan içeri giremeyen büyük lakkaz molekülü arasında elektron taşıyıcı olarak davranır (Şekil 1.20) [71, 72].



Şekil 1.20. Lakkaz ile beyazlatma işlemi görmemiş kağıt hamurunun çapraz bağlı fiberleri arasındaki etkileşime bir örnek [72].

Azinlerin redoks döngüsündeki ara oksidasyon basamağının ara ürünü katyon radikaller olarak tanımlanır. İkinci elektronun ayrılması ve oksidasyonun devamı sırasında uygun dikatyonlar gözlenebilir. Öyleki $ABTS^{+•}$ ve $ABTS^{2+}$ katyonlarının redoks potansiyelleri sırasıyla 0.680 V ve 1.09 V olarak hesaplanmıştır [75].

1.3.1.5.2. 1-hidroksibenzotriazol (HBT) Aracılı Sistem

HBT, N-heterosiklik (heterohalkalı) bileşiklerin N-OH grubu taşıyan mediatörlere aittir [76]. Oksijen harcayan HBT enzim tarafından aktif ara ürüne çevrilir. Bu ara ürün bir reaktif radikale (R-NO) oksitlenir [58].

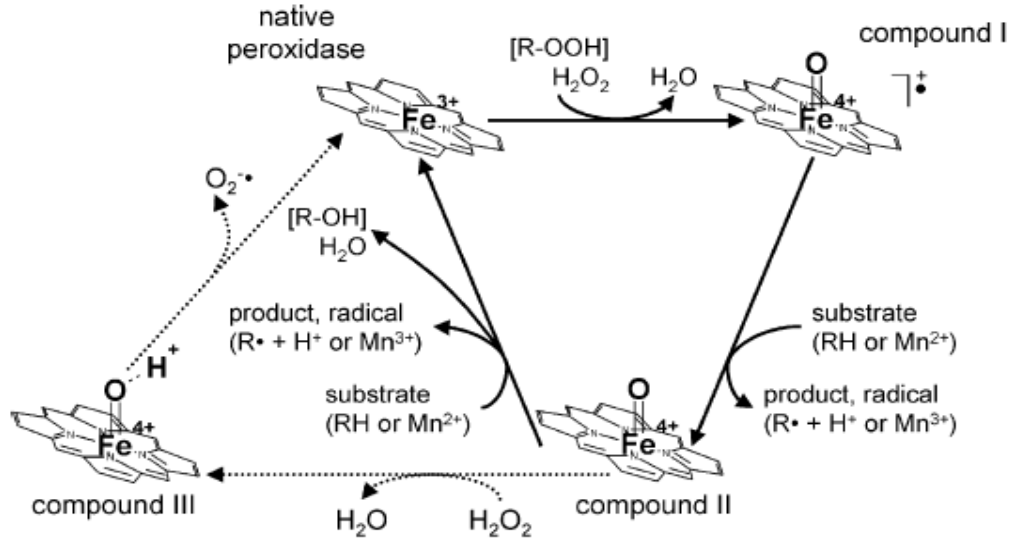
Lakkaz / HBT sistem kağıt hamuru beyazlatılması için yapılan denemelerde iyi sonuçlar vermiş ve aynı zamanda β -1 bağlı dimerler gibi ligninde β -O-4 bağlı fenolik içermeyen alt birimlerin oksidasyonu için de yeterli olduğu görülmüştür [77, 78].

1.3.2 Peroksidaz

Peroksidazlar hem (heme) grubu içeren enzimlerdir. Hem peroksidazlar *Phanerochaete cryosporium* gibi lignini parçalayan basidiomycete'ler tarafından üretilir [105]. Peroksidazlar daha önce de belirtildiği gibi substrat spektrasına dayalı olarak ikiye ayrılır. Birinci tür mangan peroksidaz (MnP) dır ve Mn(II) onun için en iyi indirgen substrattır. Lignin peroksidaz (LiP) ise nonfenolik ve fenolik aromatik bileşikleri oksitler. Lignin ve benzeri bileşikleri oksitleyebilmeleri için hidrojen peroksit (H_2O_2) ihtiyaç duyarlar [79].

Native enzim de bulunan porfirin halkasındaki Fe öncelikle H_2O_2 ile oksitlenir ve böylece enzimin oksidasyon bölgesinde $2e^-$ oluşur (Bileşik I oluşumu). Porphirin kofaktörün H_2O_2 tarafından oksidasyonu sırasında Fe^{3+} ve porfirin halkasından $1e^-$ ayrılır ve Fe^{4+} ile porfirin katyon radikal oluşur. Bileşik I uygun indirgen substrat varlığında Fe^{4+} ara ürünü (Bileşik II) aracılığıyla iki basamakta tekrar native enzime indirgenir (Şekil 1.21) [65]. İlk iki reaksiyon hızlıyken bileşik II'nin reaksiyonu 10 kat daha yavaştır [80, 81]. Bu nedenle k_3 enzimin katalitik etkinlik (turnover) değerinde (k_{cat}) çok kuvvetli bir şekilde etkilidir [82].

Peroksidazların her bir katalitik etkinliğinde (turnover) iki molekül serbest radikal oluşur [83].



Şekil 1.21. Peroksidazların katalitik döngüsü [60].

Mangan peroksidaz ve lignin peroksidazın amino asit dizilimi ~%50-60 oranında oldukça fazla benzerlik gösterir. Helikal yapıların sayısı ve yerleşimi ile birçok β -yapıları da benzerlik gösterir. Buna ek olarak içerdikleri disülfid (S-S) bağlarının sayısı da birbirine yakındır [84].

Mangan peroksidaz, lignin peroksidaz ve diğer peroksidazların yapıları üç bölgeye ayrılabilir: bunlar birbirinden uzak rezüdüler, yakın bölge ve substrat bağlanma bölgesidir.

Uzak bölge, içerisinde H₂O₂ ile ferric enzimin reaksiyonunda gerekli olan Histidin (His), Arjinin (Arg), Aspartat (Asp) ve Lösin (Leu) rezüdülerini bulunduran bir distal paket şeklindedir. En önemli rezüdü bileşik I'in oluşumunu sağlayan asit-baz katalizinden sorumlu olan distal Histidin (His)'dir. Bu histidin, MnP H4 ve LiP H8'de Glisin (Gly) aminoasitiyle değiştirildiğinde Bileşik I oluşumu gerçekleşmemektedir.

Substrat bağlanma bölgesi ise bu iki enzim arasında en büyük farklılığı oluşturan bölgedir. Çünkü LiP substrat olarak çeşitli aromatik bileşikler direkt oksitlerken, MnP substrat olarak sadece Mn²⁺ iyonunu oksitler [65].

1.3.2.1 Mangan Peroksidaz (MnP) (EC 1.11.1.13)

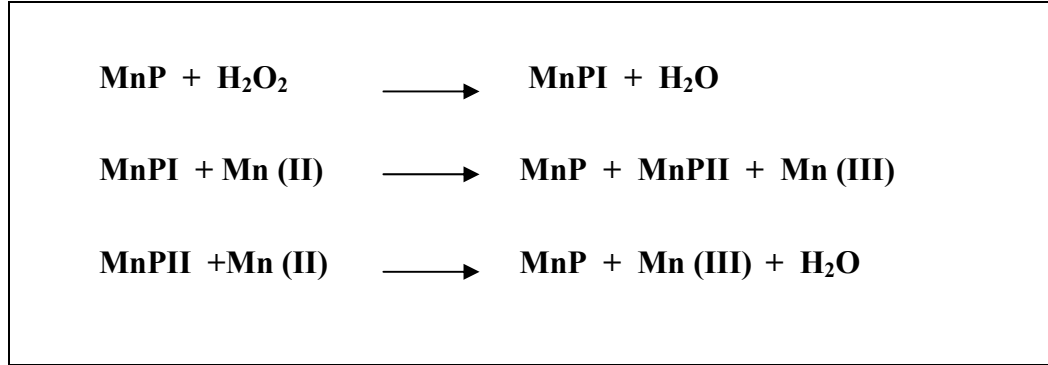
Hemen hemen tüm beyaz çürükçül ve çeşitli atıkların yıkımını sağlayan funguslar ve ayrıca egzotik ortamlardaki funguslar tarafından en yaygın üretilen ligninolitik peroksidaz, mangan peroksidazdır [27, 85-89]. Bunlar Fe içeren hem (protoporphyrin IX) prostetik grubu taşıyan şeker grupları içeren glikoproteinlerdir [91]. Bu hem grubu içeren glikoproteinler yaklaşık 20 yıl önce *Phanerochaete cryosporium* da keşfedilmiştir [90-93]. Mangan peroksidazın üretimi belirli basidiomycete sınıfı funguslarda sınırlıyken hiç bir bakteri, maya ve küfte şimdiye kadar üretildiği tespit edilmemiştir [93].

Mangan peroksidaz Mn^{2+} iyonunun Mn^{3+} iyonuna oksidasyonunu hidrojen peroksit bağımlı şekilde katalizleyerek fenolik lignin ve benzeri yapıları $1e^-$ kopararak nonspesifik olarak oksitler [95]. Molekül ağırlığı 32 - 62.5 kDa arasındadır fakat birçok MnP saflaştırıldığında molekül ağırlığı çoğunlukla 45 kDa civarındadır. MnP çoğunlukla birçok izoform şeklinde üretilir ve bu izoformlar farklı izoelektrik noktalara (pI 3-4) sahiptir [27, 85]. Okzalik asit gibi şelatörler tarafından stabilize edilen mangan peroksidaz tercihen Mn^{2+} 'yi Mn^{3+} formuna oksitler [96, 97]. Mangan peroksidaz, peroksidazlar arasında indirgen substratı ile kompleks oluşturması için Mn^{2+} tercih eden tek enzimdir [98, 99]. Şelat oluşturmuş Mn^{3+} , düşük molekül ağırlıklı oldukça reaktif, difüze olabilen redoks mediatör olarak davranır. Böylece, mangan peroksidaz (MnP), tekstil boyaları, nitroaminotoluen gibi yıkımı güç ksenobiyotikler ile doğal substratı olan lignini depolimerize ve okside edebilir [96, 97].

1.3.2.1.1. Mangan Peroksidazın Katalitik Döngüsü

Katalitik döngü native (ferric) enzime hidrojen peroksit veya organik peroksit bağlanmasıyla oksitlenmesi ve Fe-peroksit kompleksinin oluşumuyla başlar (Şekil 1.22). Bundan sonra peroksit oksijen-oksijen bağ yarılması Fe^{4+} -oxo-porphyrin-radikal kompleksinin (MnP-bileşik I) oluşumu için hem grubundan $2e^-$ transfer edilmesini gerektirir. Daha sonrasında dioksijen bağı heterolitik şekilde yarılır ve bir su molekülü açığa çıkar. Sonraki indirgeme Fe^{4+} -oxo-porphyrin kompleks (MnP-bileşik II) sayesinde ilerler [100]. MnP-bileşik II'nin indirgenmesi için, substrat olarak Mn^{2+} iyonu gerekir. Bir enzimin katalitik etkinliği sırasında iki Mn^{2+} iyonu

Mn^{3+} ’e yükseltgenir. Mn^{3+} , beyaz çürükçül funguslar tarafından üretilen bir metabolit olan okzalik asit gibi organik asitlerle şelat oluşturur [98, 99]. Monoşelat Mn^{2+} iyonu porfirin arabileşiği için $1e^-$ donörü olarak davranır ve Mn^{3+} iyonuna oksitlenir. MnP-bileşik II’nin indirgenmesi de benzer şekilde ilerler ve bir diğer Mn^{2+} iyonundan Mn^{3+} iyonunun oluşturulması da native enzimin oluşturulması ve iki su molekülünün açığa çıkmasıyla yürütülür [100].



Şekil 1.22. Mangan peroksidazın katalitik döngüsü. Mn: mangan, MnPI: 1 e⁻ yükseltgenmiş enzim, MnPII: 2e⁻ yükseltgenmiş enzim [102].

MnP-Bileşik I, lignin peroksidaz (LiP) ve horseradish peroksidaz (HRP)’a benzer ve Mn yanında ferrosiyanür, fenoller gibi elektron donörleri tarafından indirgenebilirken MnP-Bileşik II diğer substratlar tarafından sadece çok yavaş bir şekilde indirgenir ve katalitik döngünün tamamlanması için Mn (II) iyonu gerektirir [101].

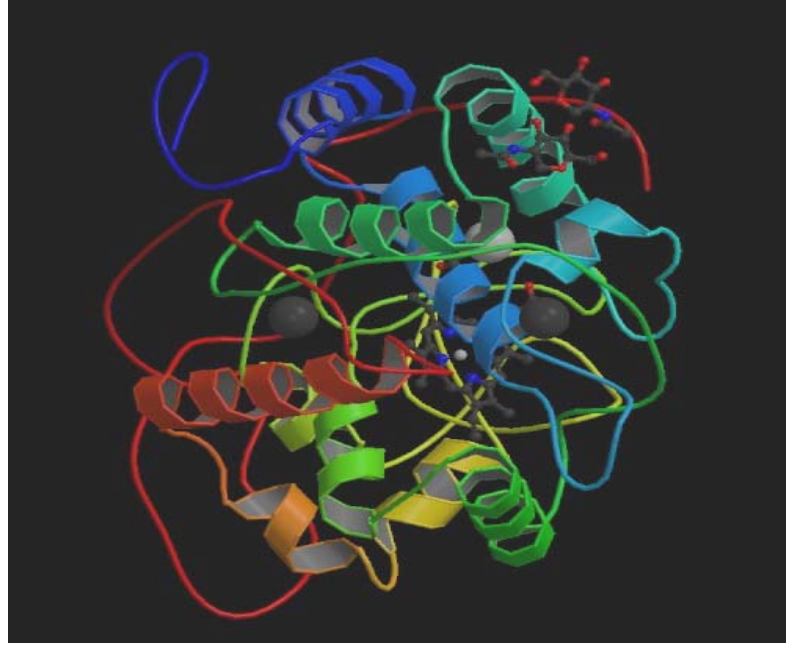
1.3.2.1.2. Mangan Peroksidazın Kristal Yapısı

Mangan peroksidaz aktif bölgesinde beş disülfid bağı ve iki Ca^{2+} iyonu içerir. Bu aktif bölge yani aspartat rezüdüsüne H bağı ile bağlı histidin ve peroksidaz bağlanma bölgesi olan distal bölge, katalitik histidin ve arjinin rezüdülerinden oluşmuştur. [103, 104].

MnP’da bulunan 10 adet Sistein (Cys) rezüdüsü 5 disülfid bağı oluşumuna katılır. Bunlar Cys³-Cys¹⁵, Cys³³-Cys¹¹⁷, Cys¹⁴-Cys²⁸⁹, Cys²⁵³-Cys³¹⁹ ve Cys³⁴¹-Cys³⁴⁸ dir. İlk dört disülfid bağı Lignin peroksidazda da aynıdır ancak 5. disülfid bağı

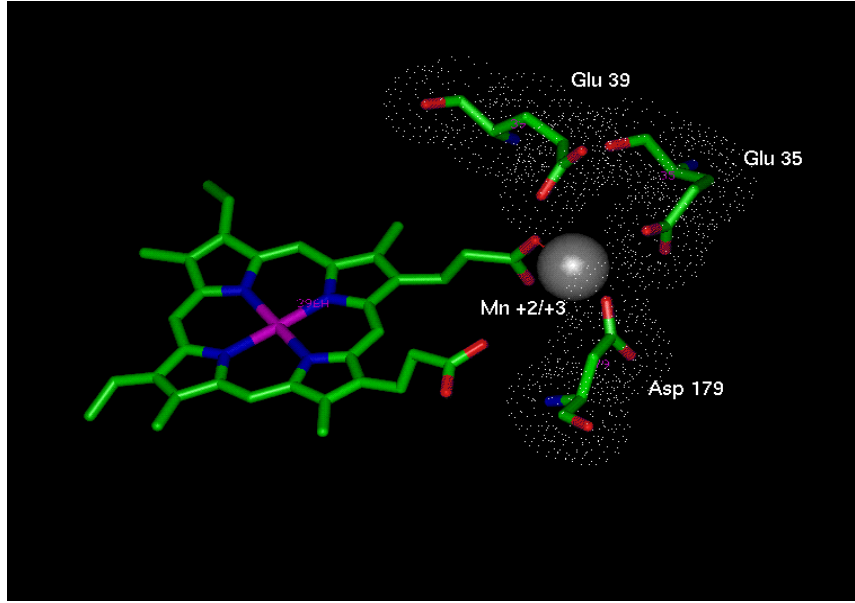
mangan peroksidaza özgüdür. Bu 5. bağ C-ucu kuyruğunun bir kısmıdır ve kısmen proteinin ana gövdesinden C-ucunu uzak tutmak için uygulanan kuvvetten sorumludur [105].

Mangan peroksidaz iki domainden oluşur ve hem grubu bu iki domain arasında sıkışıp kalmıştır. Domainlerin her biri 10 büyük ve 1 adet küçük heliks içerir (Şekil 1.23) [106].



Şekil 1.23. Mangan peroksidazın kristal yapısı [107].

Mangan peroksidazın substrat (mangan) bağlanma bölgesi, Mn(II) iyonu bu bölgede Glutamin (Glu³⁵) ve (Glu³⁹) ile Aspartat (Asp¹⁷⁹) rezidülerinin karboksilik asit gruplarındaki oksijen ve Hem propiyonat grubunun oksijeni ve mevcut iki su molekülünün oksijeni ile altılı koordinasyon (hexacoordinate) yapmıştır (Şekil 1.24) [108].



Şekil 1.24. Mangan bağlanma bölgesi [109].

1.3.2.2 Lignin Peroksidaz

Lignin peroksidaz, *Phanerochaete cryosporium*, *Bjerkandera adusta*, *Panus tigrinus*, *Pleurotus ostreatus* ve *Phlebia radiata* gibi beyaz çürükçül funguslar tarafından üretilmektedir [36].

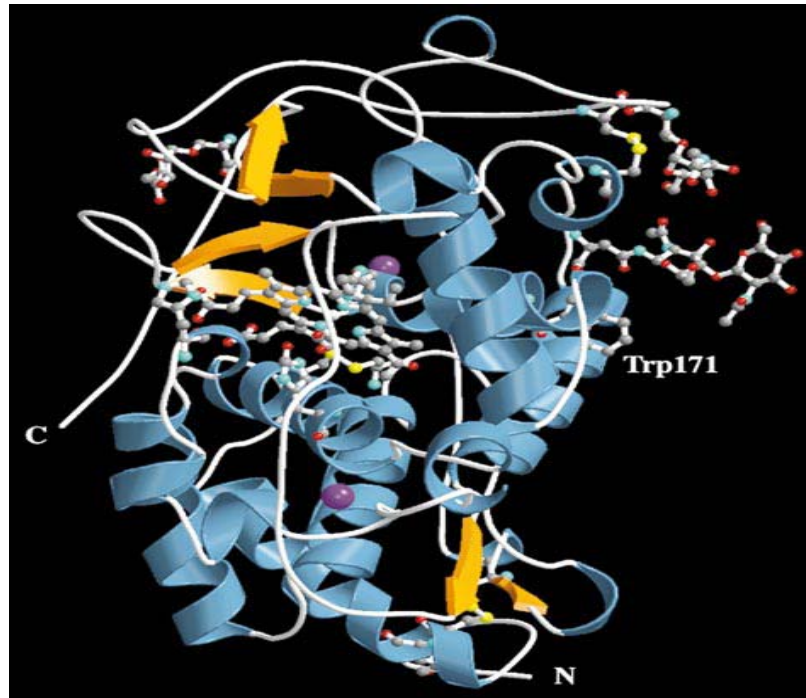
Genelde LiP 38 - 47 (~ 40) kDa molekül ağırlığında, asidik izoelektrik nokta ve optimum pH değerine sahip N-glycosilated ekstraselüler bir enzimdir. Aktif bölgesinde tekli ferric protoporfirin IX Hem grubu bulunan ve klasik peroksidaz mekanizması sergileyen bir peroksidazdır [41, 110]. Lignin ve onunla ilişkili bileşiklerin yan zincirlerinde birçok oksidasyonu katalizler [83].

Lignin peroxidase (LiP), beyaz çürükçül fungus *Phanerochaete cryosporium*'un ligninolitik kültüründen izole edilmiş hem grubu içeren bir glikoprotein ve oksidatif lignin depolimerizasyonunu elektron transferiyle gerçekleştirebilen hidrojen peroksit bağımlı oldukça önemli bir enzimdir. LiP ayrıca fenol içermeyen, elektron yönünden zengin aromatik lignin modelli bileşiklerinde oksidasyonunu katalizleyebilmektedir [111, 112].

Phanerochaete cryosporium'dan elde edilen lignin peroksidazın kristal yapısından 343 rezüdüye ve de dört disülfid bağına sahip olduğu bulunmuştur (Şekil 1.25). Basit bir helikal katlanma ve bütünlük, uzak ve yakın heliksler arasında

sıkıştırılmış hem grubuna sahip 11 helikal parça tarafından belirlenir. Gömülü olarak tarif edilen aspartik asit (Asp)'e hidrojen bağlı uzak Hem ligandı olarak histidin (His) bulunmaktadır [113].

Lignin peroksidaz enzim başına 1 mol protoporfirin IX içeren molekül ağırlığı yaklaşık 41 kDa olan ve 3.2 – 4.0 arasında pI değerleri olan bir seri izoenzimi olan bir glikoproteindir [113]. LiP keşfedildiğinde Veratril alkol (VA) lignin biyodegradasyonu çalışmalarında önemli bir rol oynamaktaydı. Veratril alkol'den oluşan ürün olan Veratraldehitin 310 nm'de verdiği absorbanstan dolayı enzimin aktivite tayininde kullanılmaktadır. Enzimin optimum pH'ı (~2,5) oldukça düşük olmasından dolayı fenol içermeyen substratları okside edebilme yeteneğine sahip olması dikkat çekici bir durumdur [115, 116].



Şekil 1.25. LiP415'in MOLSCRIPT programıyla çizilmiş Ribbon grafiği. Sekonder yapılardan helix (α-; 310-helices) mavi, beta sheet (β-strands) ise turuncu oklarla gösterilmiştir. proximal ve distal histidinli Hem ve iki distal su molekülü, iki kalsiyum iyonu (mor küreler), aktif bölgenin giriş kanalındaki His 82 (sol taraf), dört karbohidrat molekülü, Trp 171 ve disülfid köprüsü (sarı küreler) top ve çubuk modeliyle gösterilmiştir [128].

Lignin peroksidaz için veratril alkolün fiziksel bir substrat olduğu düşünülmektedir, çünkü VA (3,4- dimetoksibenzil alkol) beyaz çürükçül fungusların lignin biyodegradasyonunda lignin peroksidaz salgılandığı sırada üretilen diğer ürünlere benzer [117, 118].

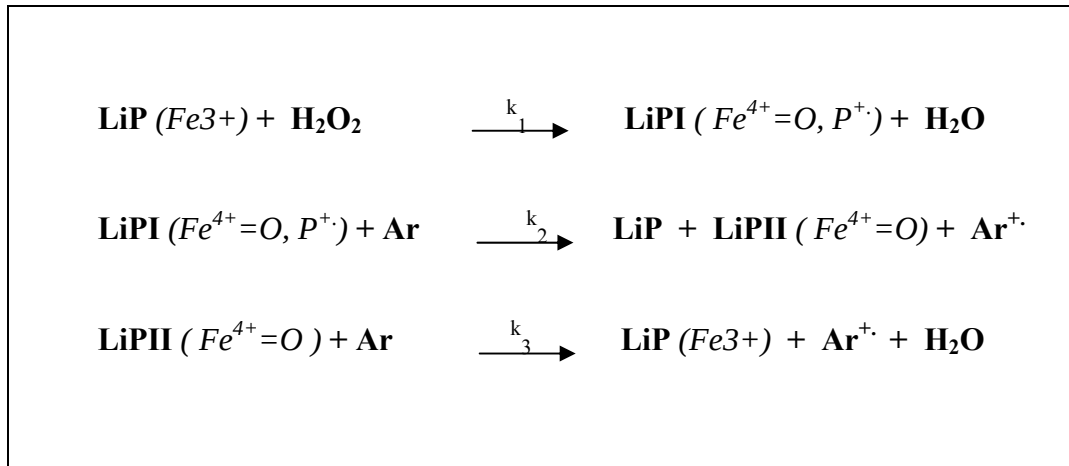
Lignin peroksidaz tarafından kullanılan indirgen substrat türleri mangan peroksidazın substratından biraz farklılık gösterir. Lignin peroksidaz için bir bileşiğin substrat olup olmadığını belirlemede iki faktör etkilidir; birincisi molekülün büyüklüğü ikincisi de redoks potansiyelidir. Lignin peroksidazın diğer peroksidazlardan daha yüksek redoks potansiyeline sahip olması bu enzimi poliaromatik hidrokarbonlar (PAH) için iyi bir yükseltgen yapar. Lignin peroksidaz da indirgen substratın bağlanma bölgesi tam olarak doğrulanamamış olması lignin gibi büyük moleküllerle lignin peroksidazın kinetik parametrelerini belirlemenin oldukça zor olmasına sebep olur [119].

1.3.2.2.1 Lignin Peroksidazın Katalitik Döngüsü

Ligninolitik peroksidazlar diğer peroksidazların karakteristik özelliği olan tipik bir enzimatik döngüye sahiptir [120,121].

Lignin peroksidazın H_2O_2 ile Fe içeren prostetik hem grubunun $2e^-$ yükseltgenmesiyle oksferril demir ($Fe^{4+} = O$) ve a porfirin π katyon radikal ($P^{\cdot+}$) içeren bileşik I ara ürünü oluşumu katalizin ilk basamağıdır. Bu reaksiyonun ikinci dereceden hız sabiti $5.8 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$ 'dir. Sonraki aşamada bileşik I ürünü oluşturmak için aromatik substratla reaksiyona girer. Bileşik I'in $2e^-$ indirgenmesiyle LiP native hale dönerken $1e^-$ yükseltgenerek Bileşik II ara ürünü substrattan $1e^-$ alarak oluşturur (Şekil 1.26) [80- 84, 122- 125].

Bileşik II de native enzime geri dönmek için diğer bir aromatik substrat molekülüyle reaksiyon vererek indirgenir [124].



Şekil 1.26. Lignin peroksidazın (LiP) katalitik döngüsü. Ar: aromatik grup, LiPI: 1 e – yükseltgenmiş enzim, LiPII: 2 e – yükseltgenmiş enzim [103, 124].

Katalitik döngünün ilk iki reaksiyonu hızlı gerçekleşirken (ferric enzimin H_2O_2 ile ve bileşik I'in indirgen substrat ile reaksiyonu) Bileşik II'nin reaksiyonu 10 kat daha yavaştır. Bundan dolayı k_3 enzimin turnover sayısını (kcat) oldukça kuvvetli şekilde etkiler [81, 99, 125].

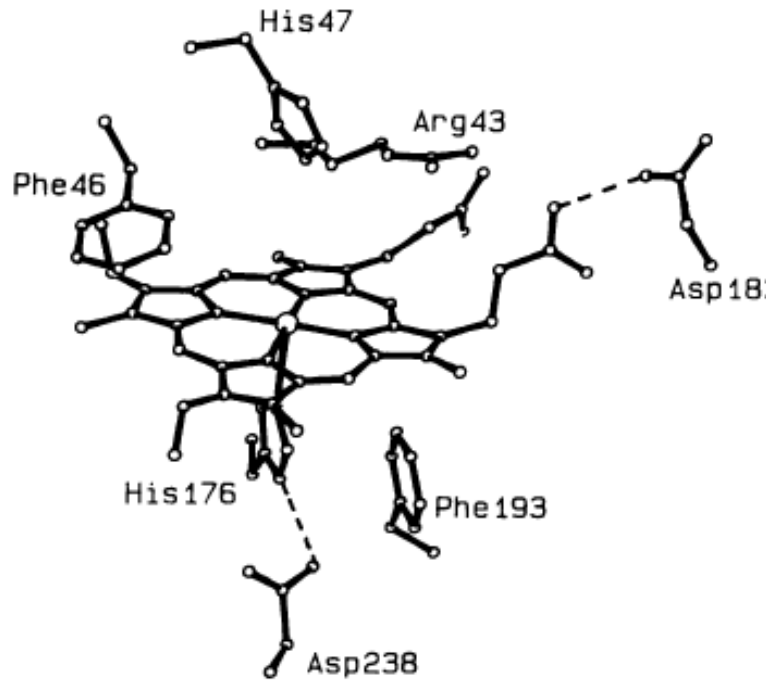
1.3.2.2.2 Lignin Peroksidazın Kristal Yapısı

LiP yapısındaki Hem grubu proteine kovalent olarak bağlı değildir fakat yoğun bir şekilde hidrojen bağlarından oluşmuş bir ağ ile bu bölgele tutulur. Özellikle Asp¹⁸³'ün karboksil grubu ile pirol A halkasındaki propiyonatın dışındaki karboksil grubu hidrojen bağı yapar. Buna ek olarak lignin peroksidaz yapısındaki hidrojen bağları sadece yapısal yönden değil enzimin katalitik özelliklerinde de önemli rollere sahiptir [126].

Hidrojen bağlarının öneminin diğer bir kanıtı da katalitik döngüde bileşik I (Fe(IV)-oxo porfirin radikal katyon) oluşumunun hızı pH'a hassas değildir. Ancak bu araürünün indirgenmesi için bir sonraki basamakta pH değerinin 3 civarında olması gerektiğinden pH'a karşı oldukça hassastır [125, 127].

Proksimal Histidin (His¹⁷⁶) hem grubunun beşinci ligandıdır ancak Hem grubu His⁴⁷'nin azotunun su ile yaptığı hidrojen bağıyla altılı bir koordinasyon bölgesi

olarak doldurulmuştur. Dış kısımdaki heliks üzerinde üç adet anahtar pozisyonda aminoasit rezüdüğü vardır. Bunlar Arg⁴³, Phe⁴⁶ ve His⁴⁷'dir. Bileşik I oluşumu için gerekli olan hidrojen peroksitin hem grubunun Fe iyonu ile etkileşimi için peroksit bağlanma bölgesini oluştururlar. Arg⁴³ ve His⁴⁷ peroksidazlarda korunmuş rezüdülerdir; ancak Phe⁴⁶ korunmuş değildir ve çoğunlukla hem grubunun pirol halkasıyla aynı düzlemde bulunur. Bu iki değişmeyen (sabit) rezüdü, Bileşik I oluşumunda önemli rol oynar (Şekil 1.27) [130].

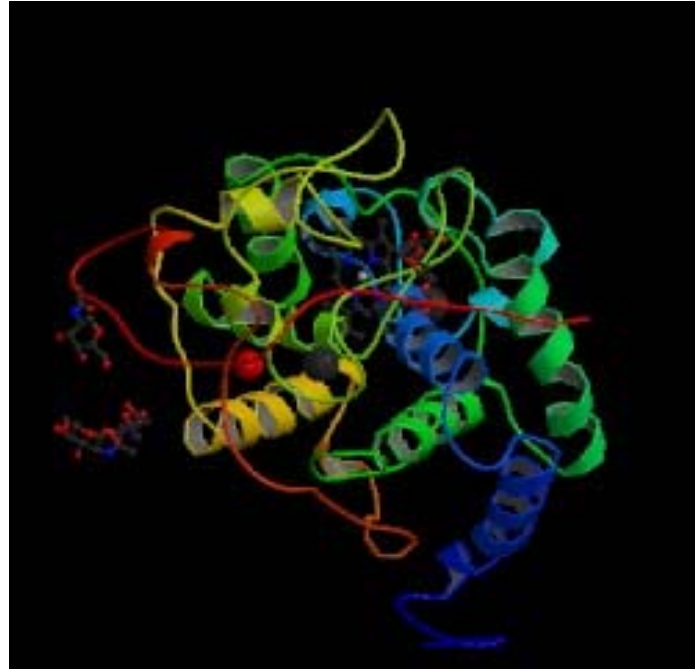


Şekil 1.27. LiP aktif bölgesindeki bağlantılar ve etkileşimler [113].

Arg⁴³ rezüdüğünün iki önemli görevi olduğu öne sürülmektedir. Birincisi peroksidaz OH (peroxide OH_ leaving group) üzerindeki negatif yükün artışını stabilize etmek, ikincisi peroksit grubunun O=O çift bağının yarılmalarıyla ferryl oksijen atomuyla hidrojen bağı yaparak Bileşik I ara ürününü stabilize etmektir. Diğer taraftan peroksit grubunun bağlanması için proton alıcısıdır [113].

II ve III. sınıf peroksidazlar tarafından paylaşılan en önemli yapısal elementlerden biri hem grubuna yakın ve uzak bulunan Kalsiyum (Ca) bağlanma bölgeleridir. Kalsiyum iyonları aktif bölgenin bütünlüğünü koruyarak enzimatik aktivite de önemli rol oynar [131]. Isısal ve alkali etkilerle LiP inaktivasyonu kalsiyum iyonlarıyla bağlantının kaybedilmesi ve düşük spinli inaktif bis-histidil hegzakoordineli Hem durumunun oluşmasıyla ilgilidir [132, 133, 134].

Lignin peroksidazın substrat bağlanma bölgesi ve de substrattan hem grubuna elektron transferinin yolu (pathway) hakkında oldukça az bilgi vardır. Lignin peroksidazın kristal yapısı incelendiğinde hem aktif bölgesi hem de substrat giriş kanalının neredeyse ulaşamaz olduğu gözlenmiştir. Diğer peroksidazlar kıyaslandığında tam tersi olarak substrat giriş kanalı ve aktif bölgenin arasındaki direkt etkileşimin daha kolay olduğu görülür (Şekil 1.28) [113, 122, 126, 130].



Şekil 1.28. Lignin peroksidazın kristal yapısı [107].

1.4. Ligninolitik Enzimlerin Kullanım Alanları

Tipik bir beyaz çürükçül fungus, lignin ve diğer aromatik bileşikleri nonspesifik ekstraselüler enzimlerle parçalayabilmektedir.

Lakkaz çeşitli fonksiyonları ve substrat spesifitesi sebebiyle tekstil boyalarının giderilmesi, fenollerin uzaklaştırılması, atıkların detoksifikasyonu gibi birçok endüstriyel proseste kullanılır [135].

1.4.1. Boya Giderimi

Beyaz çürükçül funguslar boya gideren mikroorganizmalar içinde en yoğun çalışılmış olanlarıdır. Önceleri fungusların nonspesifik ligninolitik enzimlerinin geniş bir aralıkta organik bileşiklerin yapısını değiştirebildiği düşünülmekteydi. Ligninolitik aktivitenin ve beyaz çürükçül fungusların biyodegradasyon kapasitesinin tayini için sülfonlu polimerik boyaların dekolorizasyonu kullanılmıştır. Sonrasında birçok beyaz çürükçül fungus suşu farklı sentetik boyaların ve boya karışımları gibi sentetik atıkların dekolorizasyonu için kullanılmıştır [60, 136].

Endüstride sentetik boyalar, boyama ve baskı işlemlerinde oldukça yaygın olarak kullanılırlar. Yıllık 10,000 çeşitin üzerinde boya ticari olarak 7×10^5 tondan fazla üretilir ve bu miktarın yaklaşık % 5-10'u endüstriyel atıklarda kaybolur. Renk atıksularda çoğunlukla ilk fark edilen kontaminasyondur. Sudaki çok küçük miktardaki ($10-50 \text{ mgL}^{-1}$) boya oldukça fazla göze çarpar ve su yüzeyinin gaz çözünürlüğü ile su geçirgenliğini etkiler. En büyük boya grubunu oluşturan birçok azo bileşikler çevrede anaerobik koşullarda olası kanserojen aminlere ayrışabilir. Sentetik boyalar farklı ve kararlı yapılarından dolayı oluşan renklerine göre sınıflandırılır. Azo, antrakinon ve indigo belli başlı ticari boyalardır [137].

Sentetik boyaların birçoğu, mikrobiyal degradasyona karşı dirençlidir. Bu bileşikler; tekstil, gıda, biyomedikal ve plastik endüstrilerinde renklendirici olarak kullanılırlar [138].

Gerçekte tekstil atık suları sadece boya değil bazen oldukça yüksek iyonik şiddette ve aşırı pH değerinde tuz, şelat oluşturuvcu ajanlar, öncüler ve enzim aktivitesini inhibe edebilen yüzey aktif maddeler içerebilmektedir [66].

In vitro koşullardaki beyaz çürükçül fungusların süpernatantından elde edilen ligninolitik enzimlerin dekolozizasyonu sağladığı kanıtlanmıştır. Ligninolitik enzimlerin üretimi çeşitlilik arzeder. Örneğin; *Phlebia tremellosa* ve *Pleurotus sajorçaju* kültürlerinde lakkaz en çok üretilen enzimdir; ancak mangan peroksidaz ve lignin peroksidaz bulunmamaktadır. Buna ek olarak *Pleurotus ostreatus*, *Schizophyllum commune*, *Sclerotium rolfsii* ve *Neurospora crassa* suşlarından elde edilen lakkazın bulunduğu ortama mangan peroksidaz ve/veya lignin peroksidaz ilave edildiğinde de ticari triarilmetan, antrakınon ve indigo tekstil boyaalarının renk gideriminin % 25 oranında arttığı gözlenmiştir. Bu çeşitliliğe bir diğer örnek *Phanerochaete chrysosporium*'un dekolozizasyondan sorumlu ana enzimi mangan peroksidaz iken *Bjerkandera adusta* suşunda lignin peroksidaz olması gösterilebilir [66]. Sonuç olarak beyaz çürükçül funguslar tarafından üretilen ligninolitik enzimlerin boya gideriminde önemli bir rol oynadığı oldukça açıktır [66].

1.4.2. Biyoremediasyon

Lakkaz kirliliklerde bulunan toksik fenolik bileşikleri enzimatik oksidasyon yoluyla çözünmeyen kompleks yapılara çevirmede kullanılır. Fenol gibi çok çeşitli dayanıklı çevresel kirliliklerin degradasyonu gözlenmektedir. Kömür, petrol rafinerisi, organik kimyasalların üretimi, ve zeytinyağı üretimi gibi birçok endüstriyel prosesin atık suyunda fenolik bileşikler bulunmaktadır. İmmobilize lakkaz, fenol ve klorofenollü kirliliklerin gideriminde oldukça yararlı olduğu bulunmuştur [66]. Polimerik polifenol bileşikler lakkaz katalizli oksidatif bağlanmayla genellikle suda çözünmez. Böylece filtrasyon veya sedimantasyonla kolaylıkla ayrılabilirler.

Endüstriyel atıksulardan fenoliklerin giderimi önemli bir problemdir, çünkü bu bileşiklerin çoğu toksiktir ve içme sularındaki varlıkları sağlık açısından tehlike arz eder. Fenolik kirleticiler, fenoksi herbisitler gibi tarımsal aktivitelerden, kağıt veya

kağıt hamuru işleyen endüstriyel aktivitelerden, petrokimyasallardan, boya sanayiden, diğer organik kimyasallardan veya tekstil endüstrilerinden kaynaklanabilir. Atıksuların detoksifikasyonunda serbest enzimlerin kullanımını kısıtlayan ana neden, pH, sıcaklık ve proteoliziz tarafından denatüre olmalarına karşı olan hassasiyetleridir. Lakkaz, fenolik maddelerin gideriminde diğer ligninolitik enzimlerin üzerinde bir avantaja sahiptir. Çünkü fonksiyon göstermesi için lignin peroksidaz gibi hidrojen peroksitin varlığına gerek duymaz ve tirozinazdan daha geniş substrat özgüllüğüne sahiptir. Bu nedenle serbest lakkaz, enzimin stabilitesini arttırmak için değişik materyallere immobilize edilmektedir [63].

Lakkazın, 2,4,6-triklorofenol'ün 2,6-dikloro-1,4-hidokinol ve 2,6-dikloro-1,4-benzokinona dönüşmesinden de sorumlu olduğu bulunmuştur [46].

1.4.3. Kağıt Hamurundan Lignin Giderimi ve Kağıt Hamurunun Beyazlatılması

Ağaç yapısında selüloz, hemiselüloz, hidroksifenil-propan alt birimlerinden oluşan kompleks bir polimer olan ligninden oluşan uzun ve ince fiberlerin yığılması olarak tanımlanabilir. Lignin orta tabakada bulunur ve burada doğal bir yapışkan görevi görür. Ağaç fiberleri ikinci hücre duvarında, selüloz ve hemiselüloz arasında bağ oluşturucu olarak davranır. Dolayısıyla kağıt hamuru oluşturmak için, ligninin mekanik veya kimyasal yolla uzaklaştırılması gereklidir. Kimyasal kağıt hamuru proseslerinde, ağartma prosesi olarak adlandırılan lignin fraksiyonlarının eliminasyonu için güçlü kimyasal maddeler kullanılır. Genellikle ağartma prosesinde klor (Cl_2), kloroksit (Cl_2O) ve ozon (O_3) eklenir. Ancak günümüzde klor kullanımı yasaklanmış, kloroksit kullanımına da çok sıkı sınırlamalar getirilmiştir. Bu nedenle yeni uygulamalar geliştirilmeye çalışılmaktadır.

Bilindiği gibi beyaz çürükçül fungusların oksidatif enzimlerinin karışımı kullanılarak ligninin degradasyonu gerçekleştirilebilir. Ancak bölüm 1.3.1.5'te de söz edildiği üzere ligninin büyük yapısından dolayı enzimle etkileşime girebilmesi için aracı (mediatör) bileşikler kullanılmalıdır [139].

Ksilinaz ön beyazlatma işlemi dünya çapında birçok imalathanede kullanılmakta; fakat bu işlemde sadece % 20 oranında ağartıcı kimyasal kullanımına izin verilmektedir. Lakkaz, *Trametes versicolor* tarafından ağartma sırasında üretilir. Üretilen lakkaz, kağıt hamurundan kısmi olarak lignini uzaklaştırma ve reaksiyon süresini kısaltmakta oldukça etkilidir. Ancak bu oksidatif döngü için düşük molekül ağırlıklı elektron taşıyıcı moleküller ve düşük oksijen basıncı gereklidir [55].

1.4.5. Organik Sentez

Organik sentezde lakkazın biyokatalizör olarak kullanımı son zamanlarda artan bir ilgiyle çalışılmaktadır. Açık ortamda (in air) hidrojen peroksit kullanmadan ılıman (benign) çevresel koşullarda polimer üretimini sağlar. ‘Urushi’ (Japon geleneksel giysisi) polimerik filmlerin hazırlanması için yeni urushiol analoglarının (benzeri) lakkaz katalizli çapraz bağlanma reaksiyonu gösterilmiştir.

Ayrıca mediatör varlığında veya yokluğunda, radikal akrilamid polimerizasyonunu indüklediği rapor edilmiştir. Lakkaz ek olarak lignin graft kopolimerlerinin kemoenzimatik sentezi için de kullanılmaktadır. Daha yakın bir tarihte de odunsu (lignaceous) bileşiklerin fonksiyonelliği ve çapraz bağlanması için bu enzimin potansiyeli olduğu keşfedilmiştir [66].

1.4.6. Şarap ve Bira Stabilizasyonu

Şarap stabilizasyonunda alternatif bir fiziksel-kimyasal adsorbent olarak gıda endüstrisi lakkazın en büyük kullanım alanlarından biridir. Musts ve şarap, etanol ve organik asitler (koku verir), tuz ve fenolik bileşikler (renk ve tat verir) gibi farklı kimyasal bileşiklerin karışımını içerir. Polifenolün gideriminde, şarabın organoleptik karakterinde istenmeyen değişikliklerden kaçınmak gereklidir. Polifenol gideriminde lakkaz kullanımı bazı önemli şartlar gerektirir. Bunlar asidik ortamda stabilite ve sülfite tersinir inhibisyonudur [66].

Fenol bileşiklerinin seçici giderimi aynı zamanda meyve suyu, şarap ve bira gibi içeceklerin stabilizasyonu için gereklidir. Ancak burada enzimler immobilize edilerek kullanılmalıdır. Çünkü bu enzimlerin katkı maddesi olarak kullanılması onaylanmamıştır [139].

Lakkaz, biranın raf ömrünün artırılmasında da kullanılır. Burada; duman ve sis (haze) oluşumu mayalama (brewing) endüstrisinde sürekli karşılaşılan bir problemdir. Fenol halkalarının nükleofilik substitüsyonuyla proteinin sülfidril grupları duman oluşumunu önleyebilir. Burada fenolün fazlası geleneksel işlemler yerine arpa mayasına lakkaz ilave edilerek yapılabilir [139].

1.4.7. Gıda İyileştirmesi

Bitkisel yağların lezzet kalitesi ortamdan çözünmemiş oksijeni lakkaz ile uzaklaştırarak artırılabilir. Lakkaz ayrıca bitki materyallerinin ekstraktından kısmi veya tamamen türetilen gıda maddelerinden oksijenin uzaklaştırılmasını da sağlayabilmektedir. Kakao ve kakao ürünleri, tadı ve lezzetini (çeşni) artırmak için lakkaz içeren solüsyonlarda ıslatılır, kurutulur ve kavrulur [66]. Çay temelli ürünler, verdiği rengi artırmak için fungal lakkazla muamele edilebilir. Lakkaz fırında pişirilen ürünlerin yapımında hamuruna katılarak hamur bileşenlerine oksitleme etkisinden yararlanmak ve hamur veya pişirilmiş ürünlerde gluten yapılarının dayanıklılığını artırmak için kullanılır [66].

1.4.8. Biyosensör

Biyosensör elektronik dönüştürücü içeren biyolojik bileşenle bütünleşmiş bir probdur. Bu şekilde hazırlana prob, biyokimyasal veya fiziksel değişiklikler göz önüne alınarak biyokimyasal sinyalleri elektriksel değer olarak belirler, kaydeder ve gönderir. Lakkaz içeren birçok biyosensör, immunoassay, glikoz tayini, aromatik aminler ve fenolik bileşiklerin belirlenmesinde kullanılmaktadır [66].

1.4.9. Medikal Uygulamalar

Anestetik, anti-imflammatuar ve sadetif gibi kompleks medikal bileşiklerin sentezinde kullanılabılırler. Son zamanlarda lakkaza dayalı yeni bir enzimatik metod geliştirilmektedir [66].

1.5. Enzim Saflaştırma (Pürifikasyon) Teknikleri

Enzim (Protein) pürifikasyonunun amacı, kompleks protein karışımlarından ilgilenilen proteinin biyolojik aktivitesini kaybetmeden ayrılmasıdır. Biyolojik fonksiyonun korunması da; pH, sıcaklık ve iyonik kuvvetin kontrol edilmesiyle sağlanır. Pürifikasyon, proteinlerin üç boyutlu yapısına bağlıdır ki bu da saflaştırılacak proteinin yüzey gerilimi, molekül büyüklüğü ve biyolojik aktivitesini belirler. Bu özelliklere dayalı olarak protein saflaştırma teknikleri uygulanır. Bir protein veya enzimi homojen halde elde etmek için birçok metot birlikte uygulanmalıdır [140]. Tablo 1.3. proteinin özelliğine göre kullanılabilecek muhtemel metotları göstermektedir.

İlgilenilen proteinin pürifikasyonu için aşağıdaki adımlar takip edilmelidir.

1. ilgili protein için özel bir aktivite tayini olup olmadığı araştırılmalı
2. toplam protein miktarı belirlenmeli
3. ilgili proteine uyarlanmış bir seri ayırma işlemi yapılmalı
4. saflık analizi yapılmalıdır.

Tablo 1.3. Protein özelliklerine göre saflaştırma teknikleri.

<i>Proteinin Karakteristik Özelliği</i>	<i>Ayırma Tekniği</i>
Protein Yüzeyindeki Yüke Göre Ayırma	İyon Değişim Kromatografisi [140, 141]
	Elektroforez [141-146]
	İzoelektrik focussing [10, 142]
Protein Polaritesine Göre Ayırma	Adsorpsiyon Kromatografisi [10,141]
	Kağıt Kromatografisi [10,141]
	Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi [144]
Protein Moleküler Büyükliğüne Göre Ayırma	Diyaliz ve ultrafiltrasyon [10, 141, 145]
	Jel elektroforez [141-145]
	Jel filtrasyon kromatografisi [141]
	Ulsantrifüj [141, 148]
Protein İlgisine Göre Ayırma	Afinite (ilgi) Kromatografisi [141]

2. KONU İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

Nurdan Kaşıkara Pazarlıoğlu ve arkadaşları [149], lakkaz aktivitesini çeşitli fenolik maddelerin ilavesiyle hazırlanan besiyerinde gözlemlenmiştir. Fenol en etkili indükleyici olarak bulunmuştur. Beyaz çürükçül fungus olan *Trametes versicolor*'da, lakkaz, lignin peroksidaz, mangan peroksidaz, arilalkol oksidaz ve polifenol oksidaz üretimini test etmek için indükleyici madde içeren ve içermeyen ortamlarda yetiştirilmiştir. Kültür sıvısında mangan peroksidaz, arilalkol oksidaz ve polifenol oksidaz gözlenmemiş olmasına rağmen 4. ve 5. günlerde lakkaz ve mangan peroksidaz aktivitesi saptanmıştır. Fenol ile indüklenmiş kültürlerde kontrol kültüre karşı maksimum aktivite (yaklaşık 20 kat fazla) bulunmuştur. Optimum fenol konsantrasyonunda lakkaz üretimi, enzim aktivitesi, protein içeriği, glikoz tüketimi ve biyokütle oluşumu gözlenerek incelenmiş ve lakkaz üretiminin büyümeyle ilgili olmadığı bulunmuştur. Enzimin optimum pH değeri 4.5, Km değeri 0.61 mM ve Vmax değeri de 8264 U.L⁻¹ bulunmuştur. *Trametes versicolor*'dan izole edilen lakkaz, aracı (mediatör) olmadan kot kumaşı yıkamasında kullanılabilmiş ve ticari lakkazdan daha etkili olduğu gösterilmiştir.

Nurdan Kaşıkara Pazarlıoğlu ve arkadaşları [150], *Phanerochaete cryosporium* beyaz çürükçül fungusunun katı hal kültürünü inert bir matriks olan polistiren köpük kullanarak oluşturmuştur. Mangan peroksidaz üretimi için uygun ortam ve kültür koşulları seçilerek, immobilize *Phanerochaete cryosporium*'dan izole edilmiş ve pürifiye edilerek kısmi olarak karakterize edilmiştir. saflaştırılmış enzim için protein çöktürme metodu olarak amonyum sülfat, polietilen glikol (PEG), metanol ve etanol kullanılmıştır. DEAE-sefaroze iyon değişim kromatografisi ve ardından ultra jel AcA 54 jel filtrasyon kromatografisinden mangan peroksidaz fraksiyonları elde edilmiştir. Bu pürifikasyonda aktivite verimi % 23.08 pürifikasyon katsayısı da 5.8 olarak bulunmuştur. Jel filtrasyon kromatografisi ve SDS-PAGE analizine göre enzimin moleküler ağırlığı 45,000 +/- 10,000 Da'dur. Pürifiye MnP'nin optimum pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla 4.5 ve 30°C'dir. Bu enzimin bir saatlik inkübasyonda 25°C'de pH 4.5 ila 6 aralığında ve 35°C'de pH 4.5'ta stabil olduğu bulunmuştur. MnP aktivitesi 2 mM NaN₃, askorbik asit, 2-merkaptetanol ve ditreitrol tarafından inhibe edilmiştir. H₂O₂ ve 2,6-dimetoksi fenol için mangan

peroksidazın K_m değerleri sırasıyla 71.4 ve 28.57 μM 'dır. Ayrıca olası inhibitör ve aktivatörlerin enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır.

Hong-Gyu Song ve arkadaşları [151], beyaz bir çürükçül fungus olan *Trametes versicolor*'un ligninolitik enzimlerinden biri olan lakkazı etanol çöktürmesi, DEAE-sefaroze, fenil-sefaroze ve G-100 kromatografisi kullanılarak % 6.2 verimle kültür sıvısından 209 kat pürifiye etmiştir. *Trametes versicolor* 951022, substrat olarak ABTS için oldukça yüksek aktivite (91.443 U mg^{-1}) gösteren monomerik lakkazı salgıladığı rapor edilmiştir. Enzimin yaklaşık moleköl ağırlığı SDS-PAGE ile 97 kDa olarak belirlenmiştir ki bu değer diğer lakkaz moleköl ağırlıklarına göre büyük bir değerdir. Enzim pH 3 ve 50°C sıcaklıkta optimum aktivite göstermiştir. K_m değeri ABTS substratı için 12.8 μM ve V_{max} değeri de 8152.4 U mg^{-1} 'dir. Spesifik aktivitesi ve substrat afinitesi diğer beyaz çürükçül funguslardan daha yüksek olduğu bulunmuş böylece endüstriyel uygulamalarda potansiyele sahip olabileceği öne sürülmüştür.

Juliana Akit Ramsay [152], modifiye Tien-Kirk ortamındaki *Trametes versicolor*'un (ATCC 20869) boya giderimi sırasında MnP ve lakkaz üretilirken, LiP, sellobiyoz dehidrojenaz üretilmez. Çalışmada öncelikle lakkaz ve mangan peroksidaz üretimi için farklı indükleyiciler içeren besiyerlerinde üretim yapılmış ve sonrasında pürifikasyon yapılmıştır. Saflaştırılan mangan peroksidaz ve lakkaz için sırasıyla 50 U ve 1200 U aktivite ile % 10 ve % 57 verim elde edilmiştir. Moleköl ağırlıkları da 44 - 45 ve 55 kDa olarak belirlenmiştir. Saflaştırılan enzimler boya gideriminde kullanılarak dekolorizasyon yetileri araştırılmış ve pürifiye mangan peroksidaz azo boya ların (amaranth, reaktif black 5 ve cibacron brilliant yellow) mangan bağımlı reaksiyonlarla rengini giderirken antrakinon boya ların (remazol brilliant blue) boya ların rengini gideremediği, bunun yanında pürifiye lakkazın 5 ila 10 kat renk giderimi gerçekleştirdiği öne sürülmüştür. Tipik bir fungal kültürle yapılan renk giderim çalışmasında Lac:MnP oranı enzim aktivitesine bağlı olarak başlangıçta 10:1 ila 20:1 oranında iken, renk giderimi tamamlandığında bu oran 30:1 olduğu bulunmuş buradan da MnP'ın boya giderimindeki enzim aktivitesinin Lakkazdan yaklaşık 30 kat daha hızlı olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Lele ve arkadaşları [153], etkili bir şekilde lakkaz üreten *Trametes versicolor* MTCC 138 suşu endüstriyel olarak önemlidir. Basal besiyerinde lakkaz aktivitesi 155 U mL^{-1} 'dir. Farklı besiyeri bileşenlerinin lakkaz üretimine etkisi ortogonal düzenleme metoduyla optimize etmiştir. Azot kaynağı olarak maya ekstraktı, karbon kaynağı olarakta nişasta ve glikoz kullanıldığında aktivitenin (305 U mL^{-1}) iki kat arttığı bulunmuştur. Optimize edilmiş besiyerine 1 mM bakır ilavesi yapıldığında da aktivite 406 U mL^{-1} değerine ulaşmıştır. Aynı konsantrasyonda farklı aromatik bileşikler kullanıldığında da aktivitede oldukça büyük artışlar kaydedilmiştir.

Lorenzo ve arkadaşları [154], *Trametes versicolor* kültürlerindeki aktivite aktivatör olarak ağır metaller kullanılmasıyla indüklenmesine çalışmıştır. Cd^{2+} , Ag^{+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} ve Cu^{2+} metallerinin ilavesi karşılaştırıldığında sadece Cu^{2+} metalinin lakkaz aktivitesini arttırdığı bulunmuştur. Bakır metalinin aktiviteyi 12 kat kadar büyük bir oranda artırdığı rapor edilmiştir. Bu aktivite artışı da tekstil boyası olan İndigo Karmen boyasının lakkaz tarafından yıkımında önemli rol oynayan bir faktör olarak bulunmuştur.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kimyasallar

Besiyeri, tampon çözelti ve reaksiyon ortamının hazırlanmasında analitik saflıkta kimyasal maddeler kullanılmıştır. Kullanılan kimyasallar Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Kullanılan kimyasal maddeler

MALZEME ADI	MARKASI	KATALOG NO
Veratril alkol	Fluka	38700
2,6-dimetoksi fenol	Fluka	38772
ABTS	Fluka	11557
ABTS	Sigma	1888
Malt ekstrakt agar	Merck	1,10130
Malt ekstrakt brot	Merck	1,05397
DEAE sefaroze	Sigma-Aldrich	DCL6B100
DEAE sefadeks	Aldrich	27,1195
Standart Protein Karışımı	Merck	15791
KH ₂ PO ₄	Merck	1,04873,1000
NaOH	Merck	13,8701
NaCl	Merck	1,06404
Na-Tartarat	Merck	1,06664
MnSO ₄	Merck	1,05941,0250
MgSO ₄	Sigma	63141
CuSO ₄	Sigma	12853
H ₃ BO ₃	Sigma	B6768
FeSO ₄	Sigma	F8048
HCl	Merck	100,317,2500
Tris	Merck	1,08387,0500
(NH ₄) ₂ SO ₄	Merck	1,01211
Akrilamid	Merck	1,10784

Etanol	Merck	1,00983
Gliserol	Merck	1,4092
Amonyum tartarat	Sigma-Aldrich	A4767
Sodyum dodesil sülfat	Sigma	L-4509
2-merkaptotanol	Merck	8,05740

3.2. Mikroorganizma ve Kültürün Devamlılığı

Çalışmada kullanılan beyaz çürükçül fungus *Trametes versicolor*, Mersin Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarlarından temin edilmiştir. Stok kültürün devamlılığı mikroorganizmanın ayda bir % 2 oranındaki malt ekstrakt agar besiyerine transfer edilmesiyle sağlanmıştır. Transfer edilen kültürler 32°C’de on gün süreyle inkübe edilerek büyütülmüş ve sonrasında kullanılmak üzere +4°C’ de saklanmıştır.

Lakkaz üretimi ve misel oluşumu için optimum sıcaklık ışıklı bir ortamda 25°C olarak bulunmuşken karanlık bir ortamda bu değer 30°C olarak bulunmuştur [11]. Genelde funguslar optimum lakkaz üretimi için 25°C ile 30°C arasındaki sıcaklıklarda yetiştirilirler [13]. Monteiro ve De Darvalho *Trametes versicolor* suşunun ürettiği lakkazın 55°C ve 65°C’de stabil olduğunu ileri sürmüşlerdir [19]. Bu da lakkazın ticari uygulamalarda yüksek sıcaklık gerektiren proseslerde kullanılabilmesinin en önemli özelliğidir.

3.3. *Trametes versicolor* İçin Besiyeri Hazırlanması

3.3.1. Besiyeri içeriği

Trametes versicolor beyaz çürükçül fungus için optimum koşulları belirlenen sıvı besiyeri içeriği Tablo 3.2’de verilmiştir. Karbon kaynağı olarak malt ekstrakt, ortam pH değerinin ayarlanması için fosfat tuzu ve iz elementlerin ihtiyacını karşılamak için de iz element çözeltisi kullanılmıştır. İz element çözeltisi Tien&Kirk tarafından yayımlanmış prosedürde bazı değişiklikler yapılarak hazırlanmıştır [125].

Tablo 3.2. Besiyeri bileşenleri

KULLANILAN MADDE		MİKTAR
Malt Extract Broth		2 gL ⁻¹
Glikoz		1 gL ⁻¹
KH₂PO₄		6.8 gL ⁻¹
İz Element Çözeltisi	H ₃ BO ₃	0.5x10 ⁻³ gL ⁻¹
	CaCl ₂ . H ₂ O	5x10 ⁻³ gL ⁻¹
	CuSO ₄	5x10 ⁻³ gL ⁻¹
	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	5x10 ⁻³ gL ⁻¹
	FeSO ₄ . 7H ₂ O	5x10 ⁻³ gL ⁻¹
	NaCl	8.75x10 ⁻³ gL ⁻¹
	MnSO ₄	25x10 ⁻³ gL ⁻¹
	MgSO ₄	150x10 ⁻³ gL ⁻¹

3.3.2. Besiyeri Sterilizasyonu

Hazırlanan besiyeri, 120°C ve 1.2 atm basınç altında 15 dakika süre ile otoklavda steril edilmiştir.

3.3.3. Besiyerine Fungus Ekimi

Çalışmada kullanılan *Trametes versicolor*'un inkübatörde 7 gün süreyle yetiştirilen yatık agar kültürlerinden, otoklavda steril edilen optimum şartları belirlenmiş olan sıvı besiyerine misel süspansiyonu 0.5 cm x 0.5 cm olacak şekilde 2 adet/100 mL ekilmiştir. 250 mL'lik erlenlerde bulunan 100 mL sıvı besiyerine ekilen *Trametes versicolor* aktivite ölçümüne kadar 32°C sabit sıcaklıktaki çalkalamalı inkübatörde 135 rpm'de inkübe edilmiştir.

3.3.4. İnkübasyon Süresi

pH değeri 5'e ayarlanan *Trametes versicolor* kültürü 32°C'de 14 gün süreyle inkübe edilmiştir. Her iki günde bir örnek alınarak aktivite, Bölüm 3.4'te belirtildiği şekilde takip edilmiştir.

3.3.5. pH'ın *Trametes versicolor* Lakkaz Üretimine Etkisi

Ekstraselüler enzim üretimi üzerine pH'ın etkisi, % 0.2 malt ekstrat brot içeren besiyerleri 50 mM KH₂PO₄ konsantrasyonunda farklı pH değerlerinde (3.5; 4; 4.5; 5; 5.5; 6; 6.5; 7) hazırlanarak otoklavlandıktan sonra *Trametes versicolor*'un aşılansıyla incelenmiştir. Ekimden önce pH değerleri ayarlanmış, fakat yetiştirme süresince pH kontrol edilmemiştir. Aktivite tayini, Bölüm 3.4'te belirtildiği şekilde, inkübasyon süresince aşılamanın yapıldığı günden (0. gün) itibaren 2 gün aralıklarla yapılmıştır.

3.3.6. Besiyerindeki İz Elementlerin (Metallerin) ve Glikozun Lakkaz Üretimine Etkisi

Glikoz ve iz elementlerin enzim üretimi üzerine etkisi Tablo 3.2’de belirtilen şartlarda hazırlanan besiyeri kullanılarak belirlenmiştir.

Tablo 3.3’te görüldüğü gibi sekiz farklı besiyerinde çalışılmıştır. % 0.2 malt ekstrakt brot ve 50 mM’lık KH_2PO_4 konsantrasyonu sabit tutularak glikoz ve iz elementlerin farklı konsantrasyonlarında çalışılmıştır. Glikoz ve iz elementlerin enzim üretimine etkisi, Bölüm 3.4’te belirtildiği şekilde iki günde bir alınan örneklerde aktivite tayini yapılarak belirlenmiştir.

Tablo 3.3. Enzim aktivitesine glikoz ve iz element çözeltilerinin farklı konsantrasyonlarının etkisinin araştırılmasında hazırlanmış sekiz farklı besiyeri.

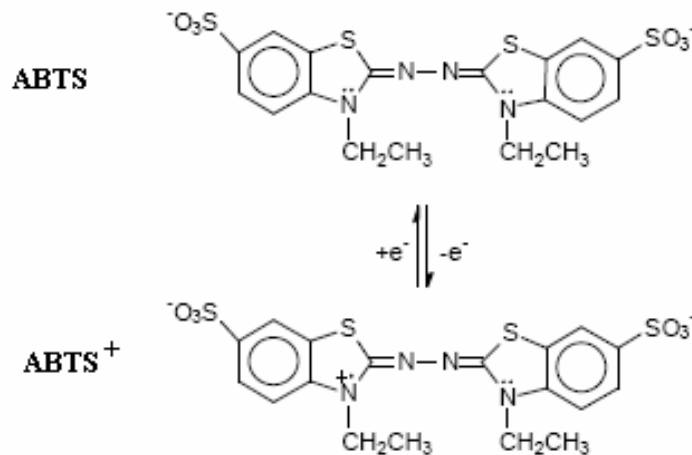
	Malt Ekstrat	Glikoz	KH_2PO_4	İz Element Çözeltisi
<i>Besiyeri 1</i>	2 gL ⁻¹	5 gL ⁻¹	6.8 gL ⁻¹	50 mL ⁻¹
<i>Besiyeri 2</i>	2 gL ⁻¹	5 gL ⁻¹	6.8 gL ⁻¹	-
<i>Besiyeri 3</i>	2 gL ⁻¹	1 gL ⁻¹	6.8 gL ⁻¹	-
<i>Besiyeri 4</i>	2 gL ⁻¹	1 gL ⁻¹	6.8 gL ⁻¹	50 mL ⁻¹
<i>Besiyeri 5</i>	2 gL ⁻¹	-	6.8 gL ⁻¹	100 mL ⁻¹
<i>Besiyeri 6</i>	2 gL ⁻¹	-	6.8 gL ⁻¹	-
<i>Besiyeri 7</i>	2 gL ⁻¹	5 gL ⁻¹	6.8 gL ⁻¹	100 mL ⁻¹
<i>Besiyeri 8</i>	2 gL ⁻¹	1 gL ⁻¹	6.8 gL ⁻¹	100 mL ⁻¹

3.3.7. İndükleyici Türü ve Konsantrasyonunun Enzim Üretimine Etkisi

İndükleyici kullanıldığında enzim üretiminin oldukça etkili bir şekilde arttığı birçok çalışmada belirtilmektedir. Bu nedenle aromatik birer bileşik olan fenol, guaiakol, veratril alkol ve CuSO_4 (enzim aktif merkezinde bakır bulunmasından dolayı) olmak üzere 4 farklı indükleyici kullanılmıştır. İnkübasyonun 4. gününde, konsantrasyonları 100 mgL^{-1} olacak şekilde besiyerine steril olarak ilave edilmiş ve her iki günde bir alınan örneklerle aktivite tayini, Bölüm 3.4'te belirtildiği şekilde yapılmıştır. En etkili indükleyici türü belirlendikten sonra da indükleyicinin hangi konsantrasyonda maksimum etki gösterdiği bulunmuştur.

3.4. Lakkaz Enziminin Aktivite Tayini

Lakkaz enziminin aktivite tayini daha önce yayımlanmış Bourbonnais ve Paice tarafından belirtilen prosedüre göre yapılmıştır [122]. Nonfenolik bir boya olan 2,2'-azinobis-bis-(3-ethylbenzthiazolinesulphonate); (ABTS), lakkaz tarafından oldukça stabil ve tercih edilen bir hal olan katyon radikale oksitlenir (Şekil 3.1). Katyon radikalın oksitlenmesiyle oluşan mavi-yeşil renk enzim aktivitesiyle orantılıdır. Görünür bölgedeki bu renk yoğunluğu 415 ila 420 nm arasında spektrofotometrede okunur [123].



Şekil 3.1. Lakkaz tarafından ABTS'nin katyon radikale (ABTS⁺) oksitlenme mekanizması.

Lakkaz aktivitesinin belirlenmesinde ABTS substrat olarak kullanılmış ve bunun oksidasyonu sonucu oluşan renk UV spektrofotometrede (Shimadzu UV-3600; UV-Vis-NIR spektrofotometre) ölçülmüştür.

Lakkaz aktivitesi ölçümünde son konsantrasyonları 0.167 mM ABTS, 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 4) ve 5 µL süpernatant içerecek şekilde hazırlanan 750 µL reaksiyon karışımı 45°C’de 30 dakika inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda oluşan rengin 420 nm’deki absorbansı ölçülerek aktivite tayin edilmiştir.

Lakkaz aktivitesi dakikada 1µmol ürün oluşturan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Bu denemelerde substrat çözeltisi 745 µL, enzim çözeltisi de 5 µL olarak kullanılmıştır.

Aktivite hesaplanırken aşağıdaki formül kullanılmıştır:

$$UL^{-1} = \left(\frac{V}{v \cdot \epsilon \cdot b} \right) \cdot \left(\frac{\Delta A}{t} \right) \quad [1]$$

V: toplam reaksiyon hacmi (mL)

v: enzim hacmi (mL)

ε: ekstinksiyon katsayısı (ABTS için 420 nm’de 36 mM⁻¹cm⁻¹)

b: ışın yolu (cm)

ΔA: absorbans değişimi

t: süre (dakika)

3.5. Protein Miktarı Tayini

Saflaştırma işleminde elde edilen örneklerdeki protein miktarı BCA (Bicinchoninic Acid) metodu kullanılarak belirlenmiştir [152]. Kullanılan metotta reaksiyon iki basamakta gerçekleşir. Birinci basamakta, ortamdaki bakır proteinlerle indirgenir ve ikinci basamakta, indirgenen bakır BCA ile kompleks oluşturur. Kompleks oluşumu sırasında meydana gelen renk değişiminden protein konsantrasyonu (mg/mL) tayin edilir [154].

3.6. Kültür Sıvısından Lakkaz Enziminin Pürifikasyonu

Optimizasyonu yapılan besiyerinde yetiştirilen fungusun ürettiği lakkaz enziminin aktivitesi takip edilerek maksimum aktivite gösterdiği günde (4 ila 8. gün) inkübasyon durdurularak pürifikasyon adımlarına geçilmiştir. Öncelikle süpernatant süzülerek fungusun miselyumlarından ayrılmıştır. Süzme işleminden sonra elde edilen süpernatant dört eşit hacime ayrılarak yöntemlerin karşılaştırılması amacıyla farklı saflaştırma işlemlerine tabii tutulmuştur. Pürifikasyon deneyleri +4°C’de gerçekleştirilmiştir.

3.6.1. Çöktürme Yöntemi ile Pürifikasyon

Çöktürme yöntemi ile purifikasyonda amonyum sülfat çöktürmesi ve etanol çöktürmesi olmak üzere iki farklı yöntem kullanılmıştır.

3.6.1.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Amonyum sülfat $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ ile doyurarak çöktürme metodunda kullanılacak amonyum sülfat miktarı aşağıda verilen denklemden hesaplanmaktadır. Bu çalışmada, 4°C’de % 85 doygunluk için kullanılan amonyum sülfat miktarı aşağıdaki denklem kullanılarak 44.12 g olacak şekilde hesaplanmıştır.

$$G = \frac{\text{Sat } (M_2 - M_1)}{\text{Sat } M - \left(\frac{\text{Spec Vol}}{1000 \times 132.14 \times \text{Sat } M \times M_2} \right)} \quad [2]$$

G: litre başına eklenecek olan gram cinsinden amonyum sülfat miktarı,

Sat: çözeltideki amonyum sülfat doygunluğu (g L^{-1}),

M_2 : istenilen (son) amonyum sülfat doygunluğu,

M_1 : başlangıçtaki amonyum sülfat doygunluğu,

SatM: doymuş çözeltideki amonyum sülfat solüsyonunun molaritesi,

SpecVol: Amonyum sülfatın hacmi (1 gram ilave edildiğinde çözeltide 0.54 mL'lik bir artışa sebep olur),

132.14: Amonyum sülfat'ın molekül ağırlığıdır.

Amonyum sülfat çöktürme metodunda öncelikle enzimin hangi doygunlukta tamamen çöktüğü (salting out) bulunmalıdır. Bunun için % 35-85 aralığında yüzde değer onar onar artırılarak çökme sağlanır ve süzüntüdeki aktivite miktarına bakılır. Süzüntüde aktivitenin kalmadığı doygunluk değeri kullanılır.

Kültür süpernatantından (100 mL) aktivite ve protein miktarının belirlenmesi için örnek alındıktan sonra % 85 oranında amonyum sülfat $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ ile doyurularak çöktürme ile ortamdaki proteinlerin ayrılması sağlanmıştır. Kültür süpernatantı amonyum sülfat ilavesinden sonra 1 saat süreyle karıştırılmış ve ardından bir gece süreyle $+4^\circ\text{C}$ 'de buzdolabında bekletilmiştir. Bu süre sonunda 30 dakika $15,000 \times g$ ' de santrifüj yapılmış ve böylece proteinlerin çökerek kültür süpernatantından ayrılması sağlanmıştır. Santrifüj sonrasında elde edilen süpernatantın enzim aktivitesine bakılarak enzimin tamamen çöktürülüp çöktürülmediği anlaşılmıştır.

Çöktürme sonucunda elde edilen çökelek az miktarda tampon çözelti (20 mM Na-Asetat, pH 5) ile çözülerek protein yönünden oldukça yoğun bir karışım elde edilmiştir. Bu karışım, içerisinde amonyum sülfat bulundurma olasılığına karşılık 1 gece süreyle +4°C’de buzdolabında kendi hacminin 10 katı kadar saf suya karşı diyalize tabii tutulmuştur. Diyaliz işleminde 10 kDa cut off selüloz membran diyaliz torbası kullanılmıştır.

Diyaliz işleminin ardından protein çözeltisi DEAE-sefaroze anyon değiştirici kolona yüklenmiştir. DEAE-sefaroze örnekle muamele edilmeden önce ortamla denge haline gelmesi için kendi hacminin 3-5 katı kadar tampon çözelti ile yıkanmıştır. Protein çözeltisi kolona yüklenerek saflaştırılması istenen enzimin matrikse iyon-iyon etkileşimi sayesinde tutundurulması sağlanmıştır. Dolayısıyla kolondan alınan protein çözeltisinde lakkaz aktivitesi ya hiç görülmemiş ya da çok az görülmüştür. Matrikse iyonik etkileşimlerle tutunan protein yine iyonik etkileşimlerle matriksten koparılmıştır. Bunun için kolon, NaCl konsantrasyonu 0.5-2.0 M arasında değişen tampon çözelti ile yıkanmıştır. Yıkama işlemiyle kolondan alınan enzim çözeltisi 2 mL’lik fraksiyonlar halinde toplanarak; lakkaz aktivitesine (420 nm), protein varlığına (280 nm) ve BCA metodu (562 nm) ile protein miktarına bakılmıştır.

3.6.1.2. Etanol Çöktürmesi

Kültür süpernatantı (100 mL) -20°C’de iki saat süreyle soğutulmuş etanol ile eşit hacimde karıştırılarak çöktürme sağlanmıştır. Çöktürmenin tamamlanması için -20°C’de 2 saat süreyle bekletilmiştir. Karışıma 30 dakika süreyle +4°C ve 15,000 x g’de santrifüj yapılmıştır. Santrifüjden sonra süpernatant ayrılarak çökelek, vakum altında oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurutulan çökelek az miktarda tampon çözelti ile çözüldükten sonra Bölüm 3.6.1.1’de anlatıldığı gibi DEAE-sefaroze iyon değiştirici kolona yüklenerek enzim saflaştırılmıştır. Uygulanan DEAE-sefaroze kolonundan sonra yapılan SDS-PAGE sonucunda safsızlıklar görülüyorsa, DEAE-sefaredex jel filtrasyon kolonuna yüklenmiştir. Alınan fraksiyonlarda aktivite ve SDS-PAGE bakılarak saflaştırma sonuçları elde edilmiştir.

3.6.2. İyon Değişim Kromatografisi ile Pürifikasyon

Kültür süpernatantı DEAE-sefaroze iyon değiştirici ile muamele edilerek saflaştırma yapılmıştır.

Kültür süpernatantı (100 mL) DEAE-sefaroze kolonuna yüklenmiştir. Bölüm 3.6.1’de anlatıldığı üzere, matriks, örnekle muamele edilmeden önce ortamla denge haline gelmesi için kendi hacminin 3-5 katı kadar tampon çözelti ile yıkanmıştır. Daha sonra örnek kolona yüklenmiş ve yoğun tuz konsantrasyonuna sahip tampon çözelti ile yıkanarak fraksiyonlar toplanmıştır. Fraksiyonlarda aktivite ve protein miktarına bakıldıktan sonra fraksiyonlar birleştirilerek tekrar DEAE-sefaroze kolonuna yüklenmiştir. Konsantre enzim çözeltisine yapılan SDS-PAGE analizinden sonra enzim saf olarak elde edilememiş ise molekül ağırlığından yararlanılarak sefadeks G-100 ile jel filtrasyon kolonuna yüklenerek tam ayırma sağlamıştır. Jel filtrasyon matriksi örnekle muamele edilmeden önce bir gece süreyle tampon çözelti içinde taneciklerinin iyice şişmesi için +4°C’de buzdolabında bekletilmiştir. Enzim çözeltisi tek seferde kolona yüklenmiştir ve fraksiyonlar küçük hacimde (400 µL) olacak şekilde kolondan alınmıştır.

Protein içeren ve lakkaz aktivitesi olan fraksiyonlar birleştirilerek tekrar DEAE-sefaroze kolonuna yüklenerek bir kat daha konsantre edilmiştir. Enzim bağlanması ve yıkanması yukarıda belirtildiği gibi tekrarlanmıştır. Bu işlemde önemli olan nokta, enzim çözeltisinin daha konsantre elde edilebilmesi için kullanılan DEAE-sefaroze matriks miktarının ilk kullanılanıdan daha az olmasıdır.

Yapılan işlemlerde saflaştırma verimliliğini görmek için SDS-PAGE, aktivite ve protein miktarından saflaştırma tablosu hazırlanarak purifikasyon basamaklarındaki değişim gözlenmiştir.

3.6.3. Elektroforez Yöntemi (SDS-PAGE)

3.6.3.1. SDS-PAGE'in Uygulanması

Sodyum dodesil sülfat poli akrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE), purifikasyon işleminin aşamalarını takip etmede, saflaştırılmaya çalışılan enzimin homojenliğinin ve molekül ağırlığının belirlenmesinde kullanılmaktadır. SDS-PAGE Laemmli, 1970 tarafından öne sürülen metoda göre yapılmıştır [153].

3.6.3.2. SDS-PAGE ile Molekül Ağırlığı Tayini

Saflaştırılan enzimin rölatif molekül ağırlığı, standart protein karışımı kullanılarak SDS-PAGE ile belirlenmiştir. Standart protein olarak, özellikleri Tablo 3.4'de verilen standart protein karışımı kullanılmıştır.

Tablo 3.4. Standart protein karışımı ve içerdiği proteinlerin molekül ağırlıkları.

PROTEİN	MOLEKÜL AĞIRLIĞI (Da)
Mayosin	200,000
B-galaktosidaz	116,000
Fosforilaz b	97,400
Albumin (bovine)	66,000
Ovalbumin	45,000
Karbonik anhidraz	29,000

Yapılan SDS-PAGE analizi sonucunda elde edilen bantların hangi ağırlığa denk geldiği, molekül ağırlıklarının logaritmasına karşı jelde aldığı yol (cm) grafiğe geçirilerek bulunmuştur.

3.7. Saflaştırılmış Lakkaz Enziminin Karakterizasyonu

3.7.1. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

Lakkaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi, ABTS'nin lakkaz katalizli oksidasyonu 420 nm'de spektrofotometrik olarak takip edilerek belirlenmiştir. 30-70°C arasındaki sıcaklıklarda 5'er derecelik artışlarla reaksiyon karışımı 30 dakika inkübe edilmiş ve aktivite tayini, Bölüm 3.4'te belirtilen şekilde yapılmıştır.

3.7.2. Optimum pH Değerinin Belirlenmesi

Enzimin aktivite tayininin yapıldığı Bölüm 3.4'te belirtilen reaksiyon karışımının pH değeri 3.0 ila 7.0 aralığında hazırlanmış ve enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır.

3.7.3. Progres Eğrisi

Lakkaz aktivitesinin zamana göre değişimi, reaksiyon karışımından her on dakikaya bir alınan örneklere, Bölüm 3.4'te belirtilen şekilde aktivite tayini yapılarak belirlenmiştir.

3.7.4. ABTS İçin Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi

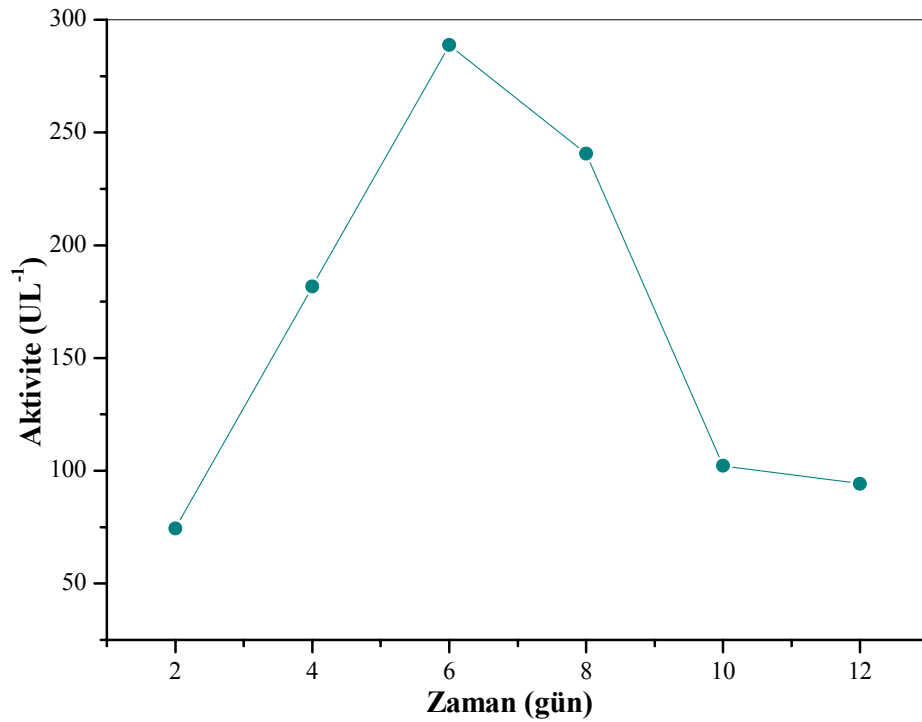
Kinetik veriler, farklı ABTS konsantrasyonlarında (0.04-0.8 mM) başlangıç hızları belirlenerek Michaelis-Menten grafiğinin çizilmesiyle elde edilmiştir. Ayrıca Lineweaver-Burk grafiği çizilerek ABTS için K_m ve V_{max} değerleri belirlenmiştir.

4. SONUÇLAR

4.1. Lakkaz Üretimi için Kültür Koşullarının Optimizasyonu

4.1.1. *Trametes versicolor*'un Zamana Karşı Büyümesi ve Enzim Üretimi

Beyaz çürükçül fungus *Trametes versicolor*, içeriği Tablo 3.1'de verilen sıvı besiyerinde, 12 gün süreyle 125 rpm ve 32°C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Besiyerinde lakkaz aktivitesi takip edilmiş ve maksimum lakkaz aktivitesinin 5 ila 8. günler arasında olduğu bulunmuştur.



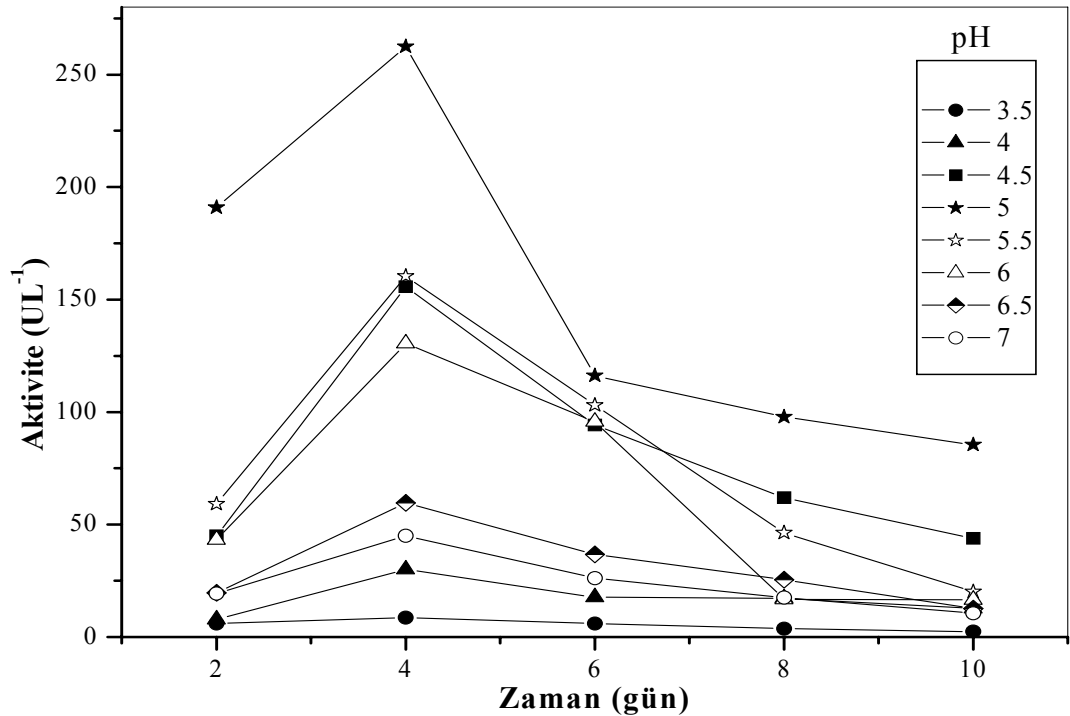
Şekil 4.1. *Trametes versicolor* lakkazın zamana karşı üretim grafiği. (Enzim üretiminin değişimi Bölüm 3.4.'te belirtildiği şekilde aktivite tayini yapılarak belirlenmiştir).

Fungus öncelikle besiyerinde karbon kaynağı olarak bulunan glikozu primer metabolizma için harcayacaktır. Daha sonra karbon kaynağının azalmasıyla birlikte sekonder metabolizmaya geçerek enzim ve diğer metabolitleri üretmeye başlayacaktır. Sekizinci günden itibaren ortamda artık karbon kaynağı olmadığı için fungus endojen faza geçerek enzim üretimini azaltmaktadır.

4.1.2. pH'ın *Trametes versicolor* Lakkaz Üretimine Etkisi

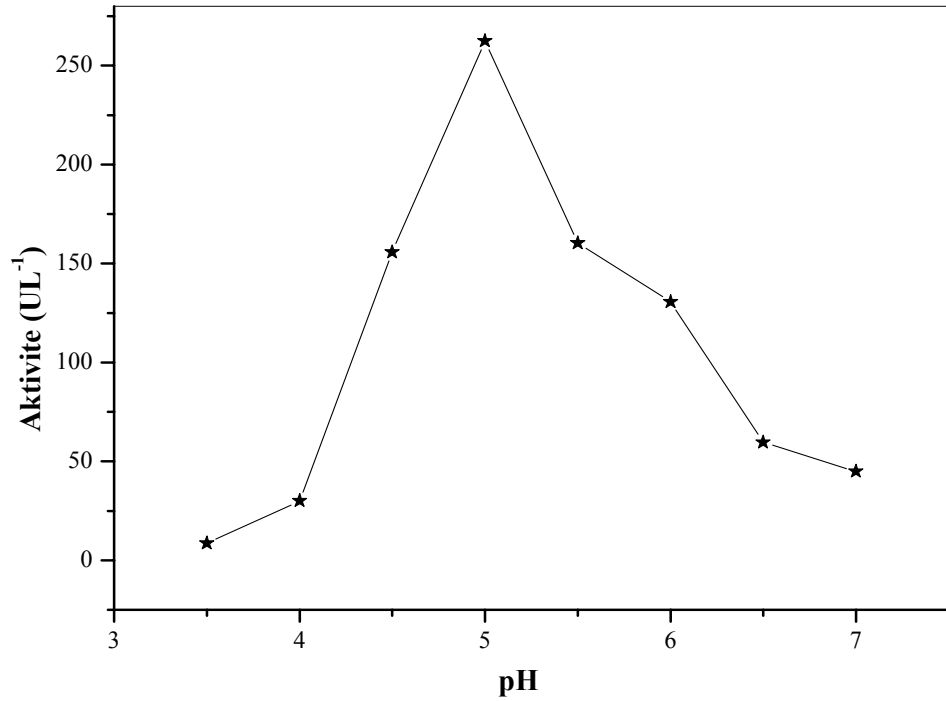
Lakkaz üretiminde pH'ın etkisi üzerine çok fazla bilgi olmamasına rağmen, fungus pH değeri 5 olan ortamda büyütüldüğünde lakkaz üretiminin oldukça fazla olduğu belirtilmiştir [11].

Çalışmada *Trametes versicolor* lakkazın üretimine pH'ın etkisi 3.5-7.0 gibi geniş bir aralıkta incelenmiştir. Şekil 4.2'de 10 gün boyunca farklı pH değerlerinde yetiştirilen *Trametes versicolor* ortamından alınan örneklerdeki lakkaz aktiviteleri görülmektedir. Maksimum aktivite 4. günde pH 5'te görülürken pH 3.5, 6.5 ve 7.0'de lakkaz aktivitesi oldukça düşüktür.



Şekil 4.2. pH'ın lakkaz üretimine etkisi. (Tablo 3.2'de verilen besiyeri sekiz farklı pH değerinde hazırlanarak 32°C ve 125 rpm'de inkübe edilmiş ve her iki günde bir alınan örneklerdeki aktivitenin değişimi Bölüm 3.4.'te belirtildiği şekilde aktivite tayini yapılarak belirlenmiştir).

Şekil 4.3'te *Trametes versicolor* lakkazın optimum pH değerinin 5 olarak bulunduğu ancak bu pH'tan sonra aktivitenin hızlı bir şekilde azaldığı görülmüştür. Arısoy tarafından yapılmış bir çalışmada, dört farklı beyaz çürükçül fungus (*Phanerochete chrysosporium*, *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus florida*, *Pleurotus eryngi*) kullanılarak klorlu organik bileşiklerin parçalanması çalışılmış ve maksimum verimin pH değeri 5 olan kültür ortamında gerçekleştiği belirtilmiştir [157]. Archibald ve ark. tarafından yapılmış bir başka çalışmada ise *Trametes versicolor* pH değeri 5 olan kültür ortamında büyütülerek maksimum lakkaz aktivitesinin bu pH değerinde elde edildiği belirtilmiş ve karbon metabolizması üzerine kağıt hamuru ve ligninin etkisi araştırılmıştır [158].



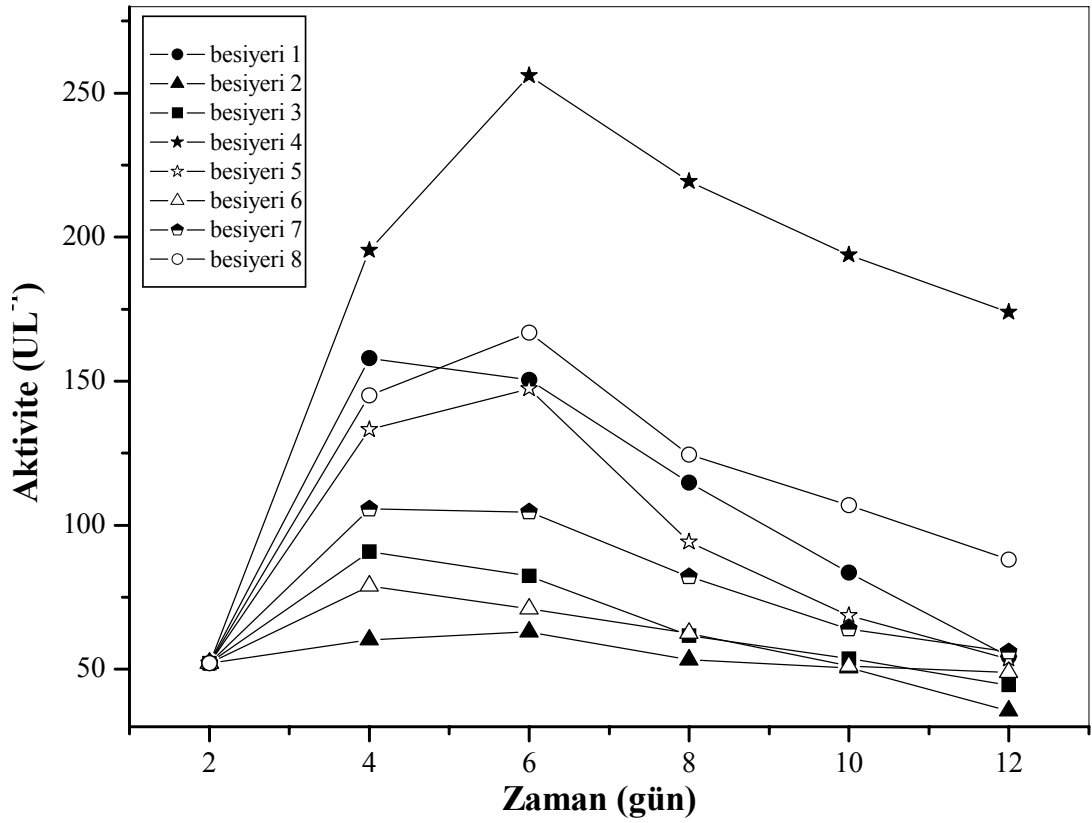
Şekil 4.3. Optimum pH grafiği. (Tablo 3.2'de verilen besiyeri sekiz farklı pH değerinde hazırlanarak 32°C ve 125 rpm'de inkübe edilmiş ve dördüncü günde alınan örneklerdeki aktivitenin değişimi Bölüm 3.4.'te belirtildiği şekilde aktivite tayini yapılarak belirlenmiştir).

4.1.3. Besiyerindeki İz Elementlerin (Metallerin) ve Glikozun Lakkaz Üretimine Etkisi

İz elementler, mikroorganizmaların gelişme ve üreme evrelerinde oldukça önemli bir etkiye sahip olduğundan besiyerinde bulunmaları fungusun büyümesi ve enzim üretmesi için gereklidir. Literatürde, iz element ihtiyacını karşılamak için bu konuda oldukça yoğun çalışmalar yapmış olan Tien&Kirk grubunun 1984 tarihli yayınında belirtmiş oldukları iz element çözeltisi birkaç değişiklik yapılarak kullanılmıştır [120].

Lakkaz üretimi üzerine glikozun etkisi incelendiğinde, ortamda fazla bulunmasının enzim üretimi üzerinde yavaşlatıcı bir etkiye sahip olduğu literatürde belirtilmiştir [137]. Bu durumun geçerliliği ve iz elementlerle herhangi bir etkileşimin olup olmadığını anlayabilmek için fungus, içeriği Tablo 3.3'te verilen sekiz farklı besiyerinde değişik glikoz ve iz element konsantrasyonlarında yetiştirilerek denenmiştir.

Sonuçta Şekil 4.4'ten de görüldüğü gibi en yüksek enzim üretimi düşük glikoz (1 gL^{-1}) ve iz elementleri (50 mL^{-1}) içeren Besiyeri 4'te gözlenirken, en düşük enzim üretimi glikozun maksimum (5 gL^{-1}) olduğu ve iz elementlerin olmadığı Besiyeri 2'de gözlenmiştir. Yu ve Wong tarafından yapılmış olan çalışmada, bulduğumuz sonuçlara paralel olarak *Trametes versicolor* fungusunun düşük glikoz konsantrasyonunda yavaş bir büyüme gösterirken lakkaz enziminin maksimum düzeyde salgılandığı belirtilmektedir [137]. Çalışma sonucunda, iz elementlerin varlığının enzim üretimi üzerinde glikozdan daha önemli bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur. İz element konsantrasyonunun artmasıyla birlikte enzim üretiminin azalması, iz elementler içerisinde bulunan bazı metallerin enzim üretimini inhibe etmiş olabileceğinden kaynaklanmış olabilir. İz elementlerin yokluğu, fungusun yaşamsal faaliyetleri ve enzim üretimini olumsuz yönde etkilemektedir.



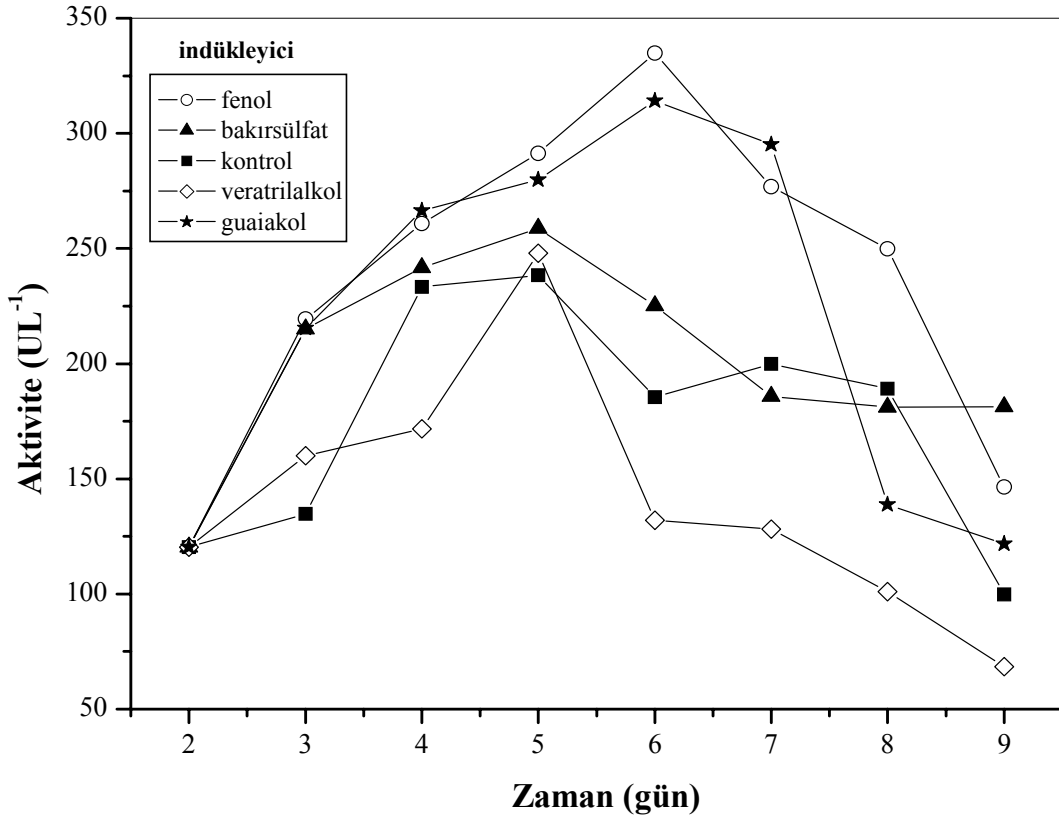
Şekil 4.4. Besiyerindeki iz elementlerin ve glikozun enzim üretimine etkisi. (pH 5, 32°C ve 125 rpm’de inkübe edilmiş ve her iki günde bir alınan örneklerdeki aktivitenin değişimi Bölüm 3.4.’te belirtildiği şekilde aktivite tayini yapılarak belirlenmiştir).

4.1.4. Enzim Üretimine İndükleyicilerin Etkisi

Lakkaz enzimi, salgılandığı funguslar tarafından genellikle düşük konsantrasyonlarda üretilir, fakat ortama çeşitli maddelerin ilavesiyle yüksek konsantrasyonda üretilmesi sağlanabilir [28]. Palmieri ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, 150 μ M bakır sülfat (CuSO_4) büyüme ortamına ilave edildiğinde lakkaz aktivitesinin kontrol ortamına göre 50 kat arttığı bulunmuştur [43]. Pazarlıoğlu ve ark. tarafından yapılan bir diğer çalışmada, farklı konsantrasyonlarda (0-100 mg/L) fenolün lakkaz üretimine etkisi çalışılmış ve 4. günde enzim aktivitesinin 10 mg fenol/L içeren kültürün fenol içermeyen kültürden 1227.5 kat daha fazla olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte, fenol konsantrasyonunun 50 mg/L ve daha fazla olduğu durumda hücre büyümesinin şiddetli bir biçimde inhibe edildiği ve lakkaz üretiminin önemli bir şekilde azaldığı bulunmuştur [149].

4.1.4.1. Enzim Üretimine İndükleyici Türünün Etkisi

Bu çalışmada, dört farklı indükleyicinin (fenol, bakır sülfat, veratril alkol ve guaiakol) lakkaz üretimine etkisi incelenmiştir. Şekil 4.5'te görüldüğü gibi kullanılan indükleyiciler arasında aromatik yapıya sahip olan fenolün, enzim üretimi üzerinde maksimum etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Elde edilen bu sonuç, Pazarlıoğlu ve ark. tarafından yapılan çalışma ile benzer olduğu bulunmuştur [149].

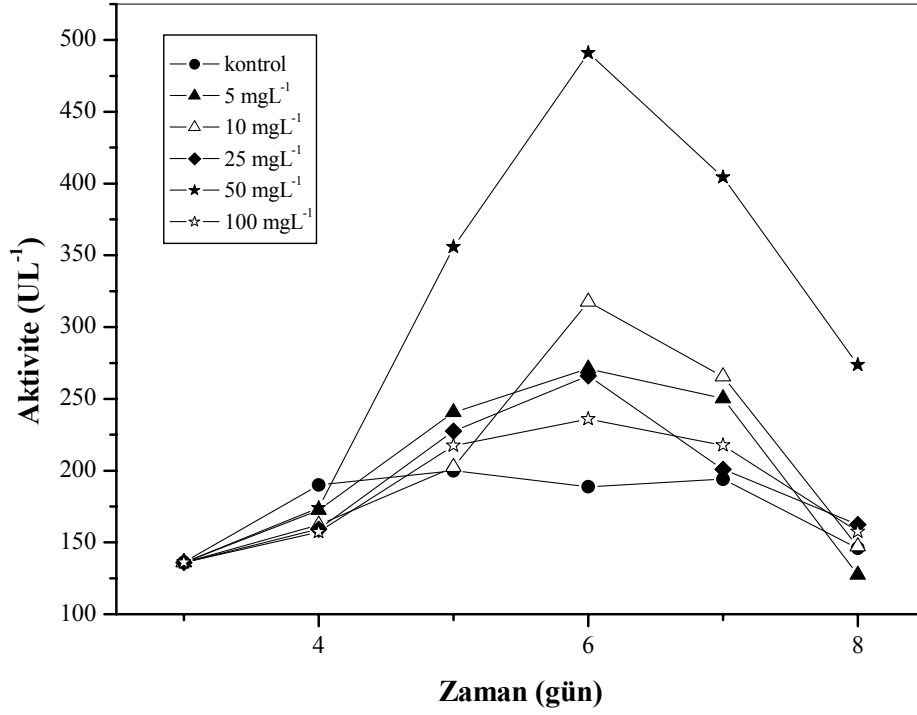


Şekil 4.5. Lakkaz üretimine indükleyici etkisi. (Bölüm 4.1.3'te optimum lakkaz üretim koşulları belirlenen besiyerinde her bir indükleyicinin konsantrasyonu 10 mgL⁻¹ olacak şekilde ilave edilmiş ve indükleyicilerin enzim aktivitesi üzerine etkisi her iki günde bir alınan örneklerdeki Bölüm 3.4.'te belirtildiği şekilde aktivite tayini yapılarak belirlenmiştir).

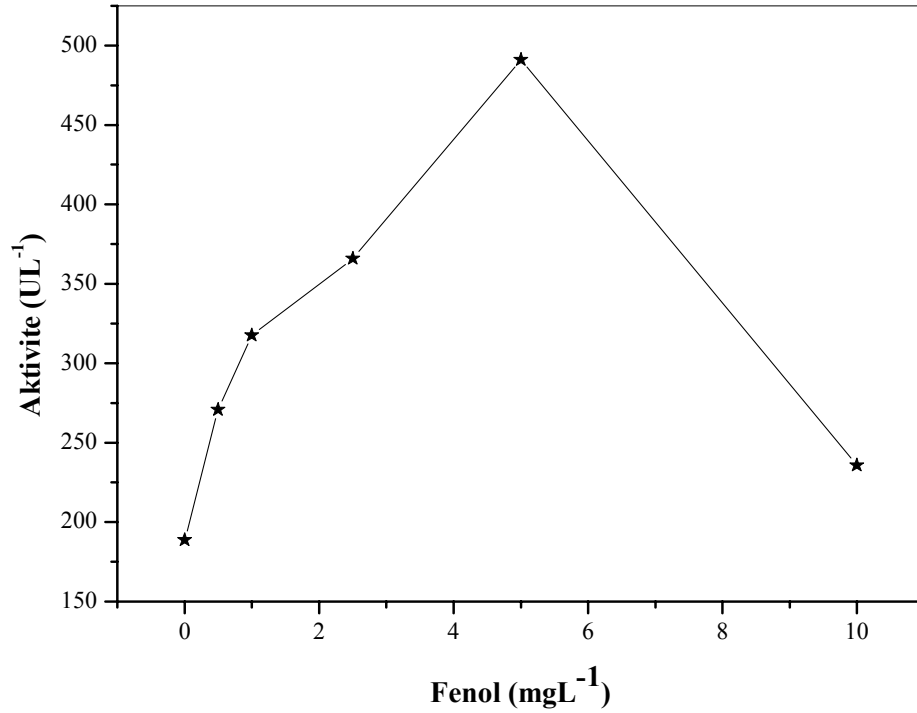
4.1.4.2. Enzim Üretimine Fenol Konsantrasyonu Etkisi

Enzim üretimini oldukça indükleyen fenolün farklı konsantrasyonlardaki (0-10 mgL⁻¹) etkisi incelendiğinde 50 mgL⁻¹ konsantrasyondaki fenolün enzim üretimini maksimum düzeyde indüklediği bulunmuştur (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7). Bununla birlikte, fenol konsantrasyonunun 5 mg/L'den daha fazla olduğu durumda

hücre büyümesinin şiddetli bir biçimde inhibe edildiği ve lakkaz üretiminin önemli bir şekilde azaldığı bulunmuştur.



Şekil 4.6. Lakkaz üretimine fenol konsantrasyonunun etkisi. (Aktivite her iki günde bir alınan örneklerde Bölüm 3.4.'te belirtildiği şekilde hesaplanarak belirlenmiştir).



Şekil 4.7. Optimum indükleyici fenol konsantrasyonu. (Aktivite 6. günde alınan örneklerde Bölüm 3.4.'te belirtildiği şekilde hesaplanarak belirlenmiştir).

4.2. Kültür Sıvısından Lakkaz Enziminin Pürifikasyonu

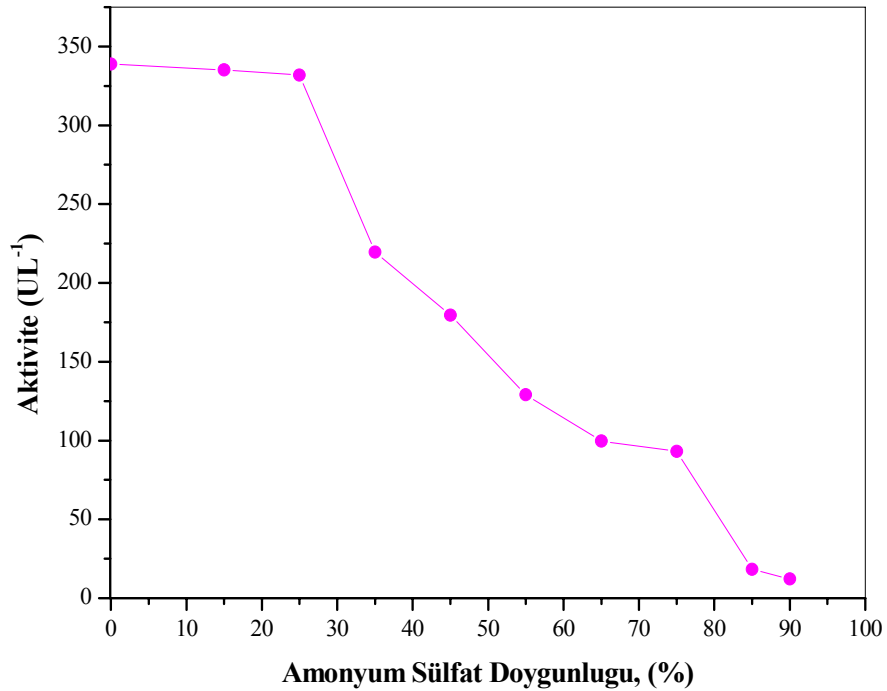
Lakkaz enziminin üst sıvıdan pürifikasyonu için, rutin çöktürme ve iyon değişim kromatografi yöntemleri uygulanmıştır. Bu çalışmada, iki farklı çöktürme yöntemi denenmiştir. Bunlar; amonyum sülfat ve etanol çöktürmeleridir.

4.2.1. Çöktürme Yöntemi

Çöktürme yöntemi proteinlerin geri kazanımında ilk adım olarak oldukça yaygın kullanılan bir yöntemdir. Çoğunlukla tuz ve organik çözücülerle veya protein çözeltisinin doğal pH değerinin değiştirilmesiyle gerçekleştirilir.

4.2.1.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Şekil 4.8’den görüldüğü gibi, lakkaz çöktürülmesi için gerekli amonyum sülfat yüzdesi ≥ 70 ’tir. Bu değeri Bölüm 3.6.2.1’de verilen formülde yerine koyduğumuzda 100 mL kültür süpernatantı için ne kadar amonyum sülfat kullanmamız gerektiğini buluruz. Yapılan hesaplama sonucunda %85 doygunlukta amonyum sülfat kullanılmıştır.



Şekil 4.8. Amonyum sülfat ilavesinden sonra süpernatantta çökmeden kalan enzimin aktivitesi.

Amonyum sülfat ilavesinden sonra yapılan santrifüj sonunda elde edilen çökelek çözülerek DEAE-sefaroze kolonuna yüklenmiştir.

4.2.1.2. Etanol Çöktürmesi

Kültür süpernatantına eşit hacimde soğuk etanol ilavesiyle elde edilen karışım +4°C'de 30 dakika santrifüj edildikten sonra oluşan çökelek az miktarda tampon çözelti ile çözülmüştür. Çöktürme sonucunda elde edilen konsantre çözeltide denatüre protein miktarının oldukça az olduğu ve enzimde aktivite kaybı görülmediği tespit edilmiştir.

4.2.2. İyon Değişim Kromatografisi Yöntemi

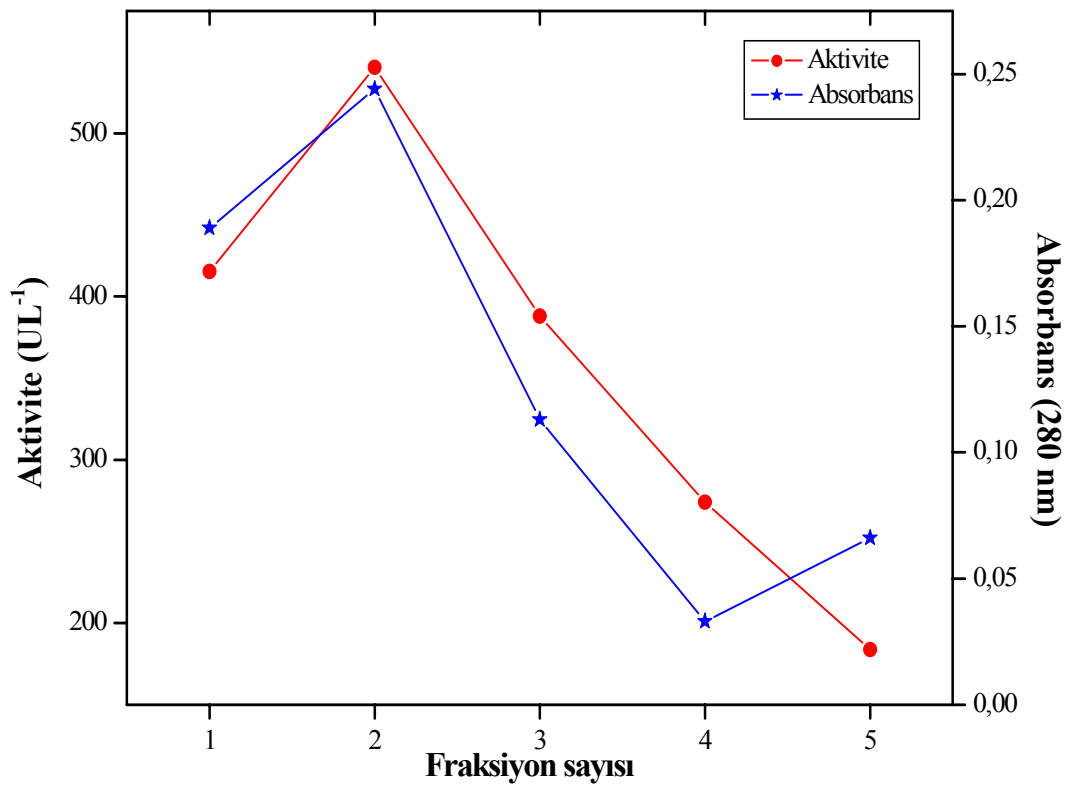
Bu yöntemde esas olan iyon değişimi olduğundan enzimin anyon değiştirici DEAE-sefaroze matriksine tutunabilmesi için enzimin pozitif yüklü olması gerekir. Bu da enzimin pI değeri ile ilgilidir. Ortamın pH değeri enzimin pI değerinin üzerindeyken enzimin pozitif yüklü olmasından yola çıkılarak pH 5 olarak ayarlanmıştır.

Kolona yüklenen matriks (DEAE-sefaroze) çalışılacak olan pH değerine ayarlanmak için, 20 mM sodyum asetat tampon (pH 5.0) çözelti ile birkaç sefer yıkanmıştır. Kültür süpernatantı veya çöktürme sonrası çözülmüş protein çözeltisi kolona yüklenerek enzimin matrikse bağlanmıştır. Bu bağlanma sonunda süzuntüden örnek alınarak enzimin bağlandığını doğrulamak için aktivitesine ve protein miktarına bakılmıştır. Eğer matrikse protein bağlanmışsa, bağlanan proteinin iyon dengesi tampon çözeltinin pH değeri değiştirilerek veya NaCl ile tampon çözeltinin tuz konsantrasyonu artırılarak bozulabilir.

Bu çalışmada matriksten enzimi almak için ~1M konsantrasyonda tuz (NaCl) içeren tampon çözelti ile elüsyon yapılmıştır. Toplanan fraksiyonlarda aktivite tayini ve BCA protein miktar analizi yapılmıştır.

4.2.2.1. Amonyum Sülfat Çökeleğinin Kolona Yüklenmesi

Amonyum sülfat kullanılarak çöktürülen protein az miktarda tamponda çözülerek DEAE-sefaroze kolonuna yüklenmiş ve 1.5 mL'lik fraksiyonlar halinde toplanmıştır. Toplanan fraksiyonlarda yapılan aktivite tayini ve protein varlığı Şekil 4.9'da görülmektedir. Buna göre, 2 nolu fraksiyonda maksimum olmak üzere 1 ve 3 nolu fraksiyonlarda da lakkaz aktivitesi ve protein görülmüştür. Böylece kolonda matrikse bağlanmış olan protein ilk 3 fraksiyonda konsantre bir şekilde elde edilmiştir.

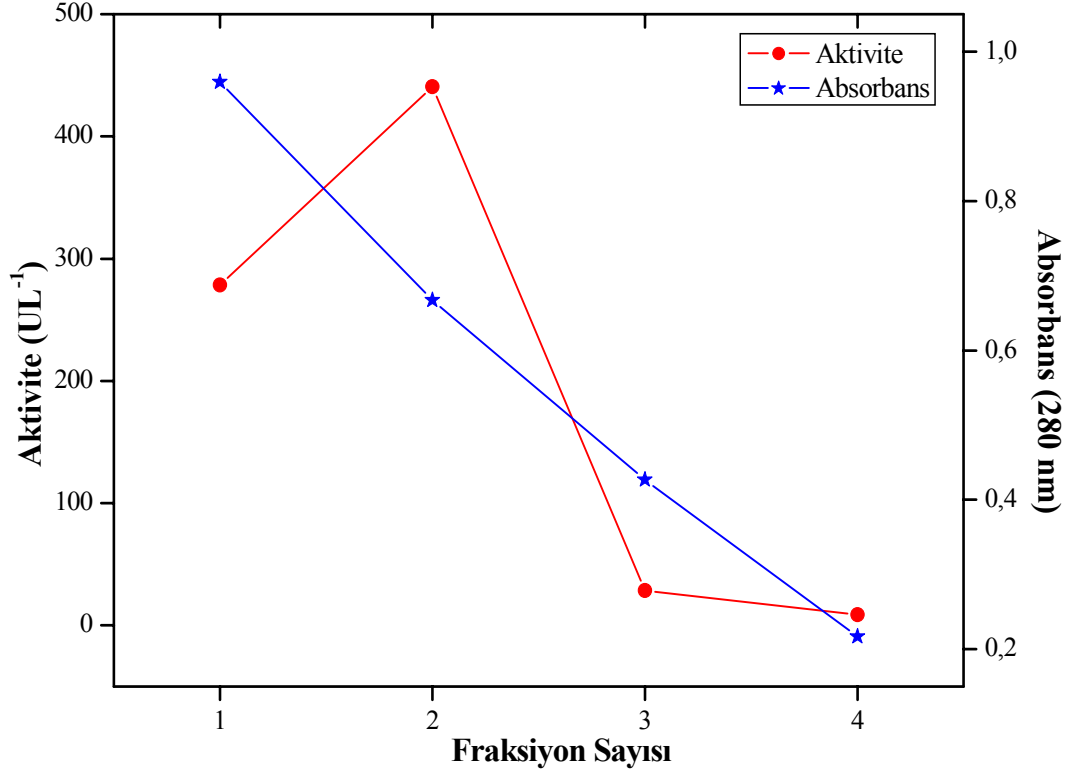


Şekil 4.9. Amonyum sülfat çöktürmesi ile *Trametes versicolor*'dan lakkaz purifikasyonu. (1 cm çap, 30 cm yüksekliğe sahip olan kolona 5 mL DEAE-sefaroze yüklenmiş ve proteinler 1 mL/dak. akış hızında 1.5 mL'lik fraksiyonlar halinde toplanmıştır).

4.2.2.2. Etanol Çökeleğinin Kolona Yüklenmesi

Etanol kullanılarak çöktürülen protein 6 mL tampon ile çözülerek DEAE-sefaroze kolonuna yüklenmiş ve 1.5 mL'lik fraksiyonlar halinde toplanmıştır. Toplanan fraksiyonlarda yapılan aktivite tayini ve protein varlığı Şekil 4.10'da

görülmektedir. Buna göre, 1 ve 2 nolu fraksiyonda lakkaz aktivitesi ve protein görülmüştür. Böylece kolonda matrikse bağlanmış olan protein ilk 2 fraksiyonda konsantre bir şekilde elde edilmiştir.



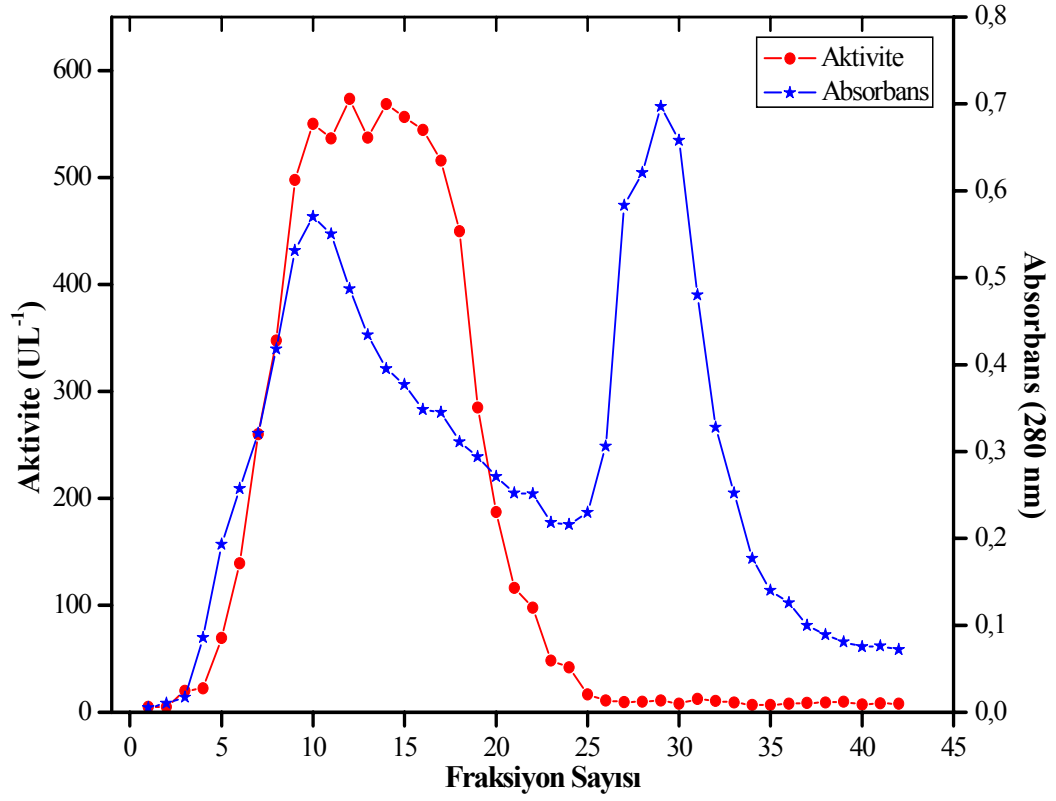
Şekil 4.10. Etanol çöktürmesi ile *Trametes versicolor*'dan lakkaz pürifikasyonu. (1 cm çap, 30 cm yüksekliğe sahip olan kolona 5 mL DEAE-sefaroze yüklenmiş ve proteinler 1 mL/dak. akış hızında 1.5 mL'lik fraksiyonlar halinde toplanmıştır).

4.2.2.3. Süpernatantın Çöktürülmeden Kolona Yüklenmesi

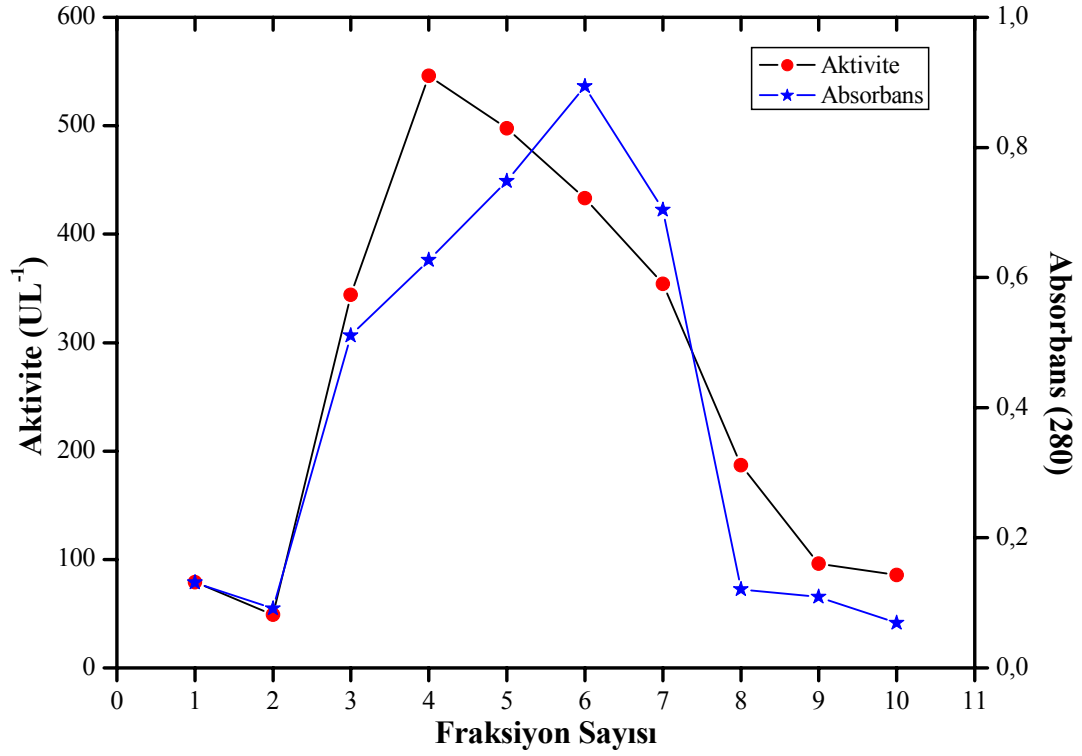
Miselyumlardan ayrılmış süpernatantta bulunan protein, herhangi bir çöktürme işlemine tabi tutulmaksızın DEAE-sefaroze kolonuna yüklenmiş ve 1.5 mL'lik fraksiyonlar halinde toplanmıştır. Toplanan fraksiyonlarda yapılan aktivite tayini ve protein varlığı Şekil 4.11'de görülmektedir. Bu yöntemde, kolona yüklenen örnek konsantre olmadığı için fraksiyon sayısı oldukça fazladır. Dolayısıyla enzim aktivitesinin görüldüğü fraksiyon sayısı daha fazla ve protein içeriği daha azdır.

Şekil 4.11'den görüldüğü gibi, anyon değiştirici kolondan alınan fraksiyonlardan 5-22 arasında aktivite ve protein vardır. Bu fraksiyonlar tekrar

birleştirilerek iki kat konsantre enzim çözeltisi elde etmek amacıyla ikinci kez anyon değiştirici kolona yüklenmiştir. Şekil 4.12’de ise, ikinci anyon değiştirici kolondan alınan fraksiyonlarda protein çözeltisinin daha konsantre olduğu görülüyor. Aktivite ve protein içeren fraksiyonların sayısı 17’den 6’ya düşmüştür.



Şekil 4.11. Anyon değişim kromatografisi ile *Trametes versicolor*'dan lakkaz purifikasyonu (1.adım). (Bölüm 3.6.1’da belirtildiği şekilde uygulanan kolon sistemi sonucunda elde edilen fraksiyonlar).



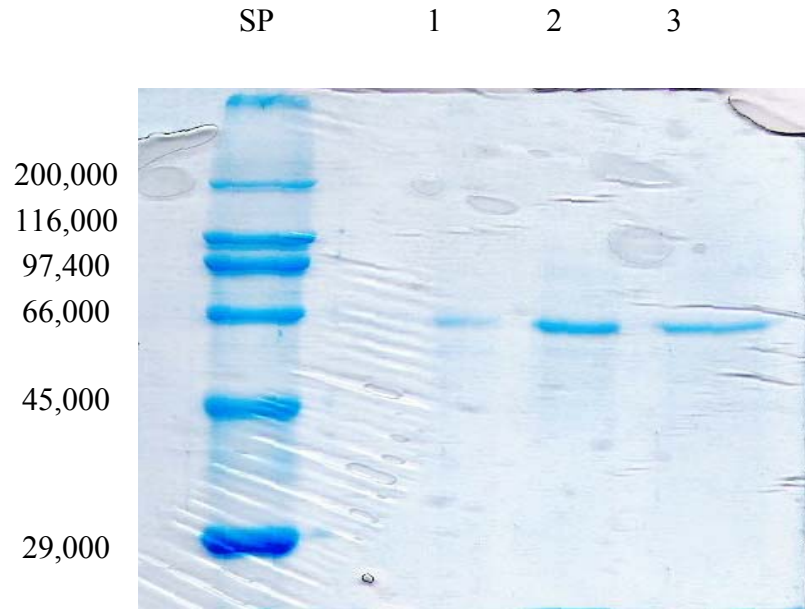
Şekil 4.12. Anyon değişim kromatografisi ile *Trametes versicolor*'dan lakkaz purifikasyonu (2.adım). (Bölüm 3.6.1'da belirtildiği şekilde uygulanan kolon sistemi sonucunda elde edilen fraksiyonlar).

4.2.3. DEAE-sefaroz Kolonundan Elde Edilen Fraksiyonların

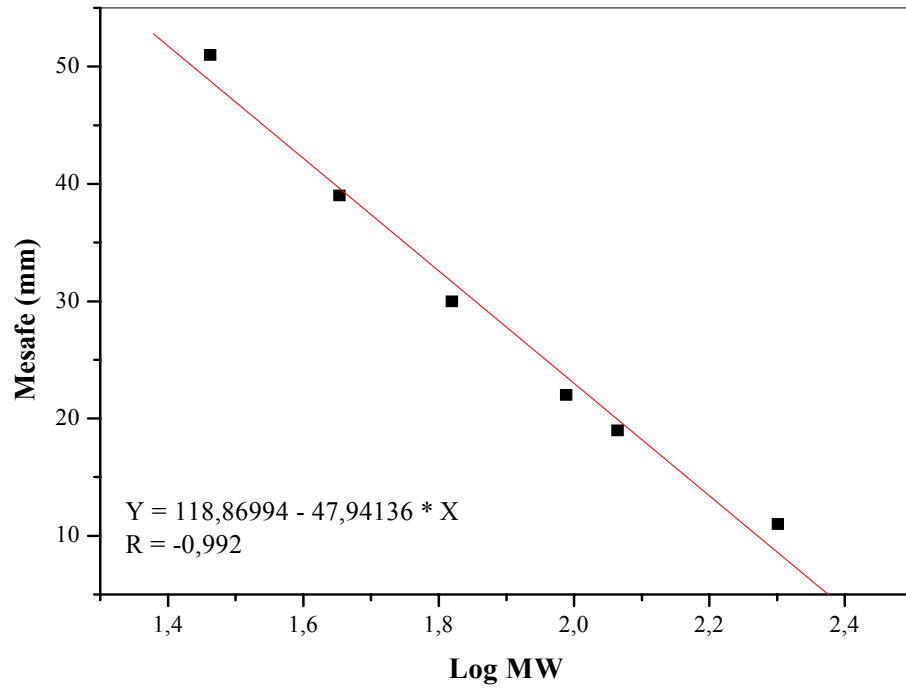
SDS-PAGE İle Analizi

4.2.3.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesinden Elde Edilen Fraksiyonlara SDS-PAGE İle Analizi

Amonyum sülfat çöktürmesiyle elde edilen konsantre protein çözeltisi anyon değişim kolonuna yüklendikten sonra alınan fraksiyonların SDS-PAGE analizi Şekil 4.13'te görülmektedir. Aktivite ve protein miktarının yüksek olan fraksiyonların SDS-PAGE analizine göre lakkaz enzimi %80-90 oranında saflaştırılmıştır.



Şekil 4.13. Amonyum sülfat ile çöktürülen lakkazın aktiviteye sahip fraksiyonlarının SDS-PAGE ile analiz sonuçları. (Her bir fraksiyondan 30 µL yüklenmiştir. SP, standart proteinler; 1: 3. fraksiyon; 2: 4. fraksiyon; 3: 5. fraksiyon)



Şekil 4.14. Saflaştırılan lakkazın molekül ağırlığının belirlenmesi için kullanılan SDS-PAGE ile protein standartları kullanılarak elde edilen kalibrasyon eğrisi.

Şekil 4.14'ten elde edilen grafikte 28 mm bulunan mesafe değeri yerine konduğunda saflaştırılmış lakkaz enziminin molekül ağırlığı 78.6 kDa olarak belirlenir.

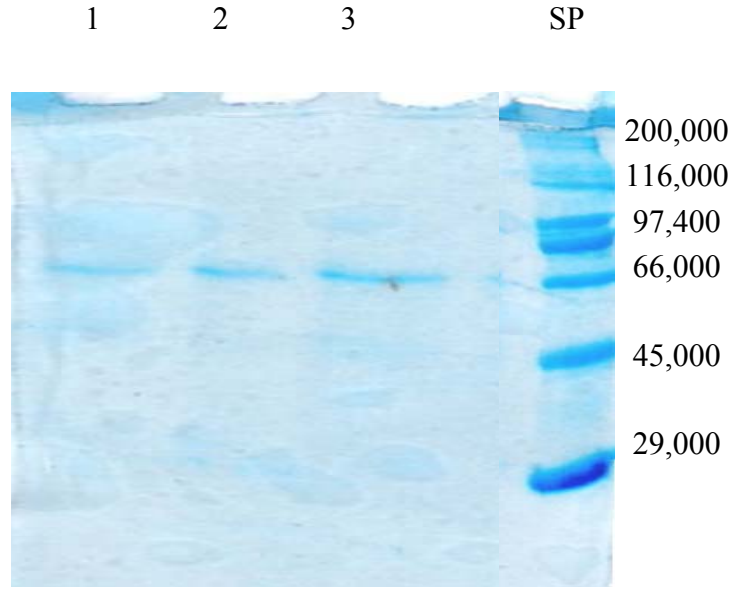
Lakkazın amonyum sülfat çöktürmesiyle saflaştırılma basamakları Tablo 4.1’de özetlenmiştir. Buna göre, lakkaz enzimi %19.2 verimle yaklaşık 3 kat pürifiye edilmiştir.

Tablo 4.1. Lakkazın amonyum sülfat çöktürmesiyle saflaştırılması

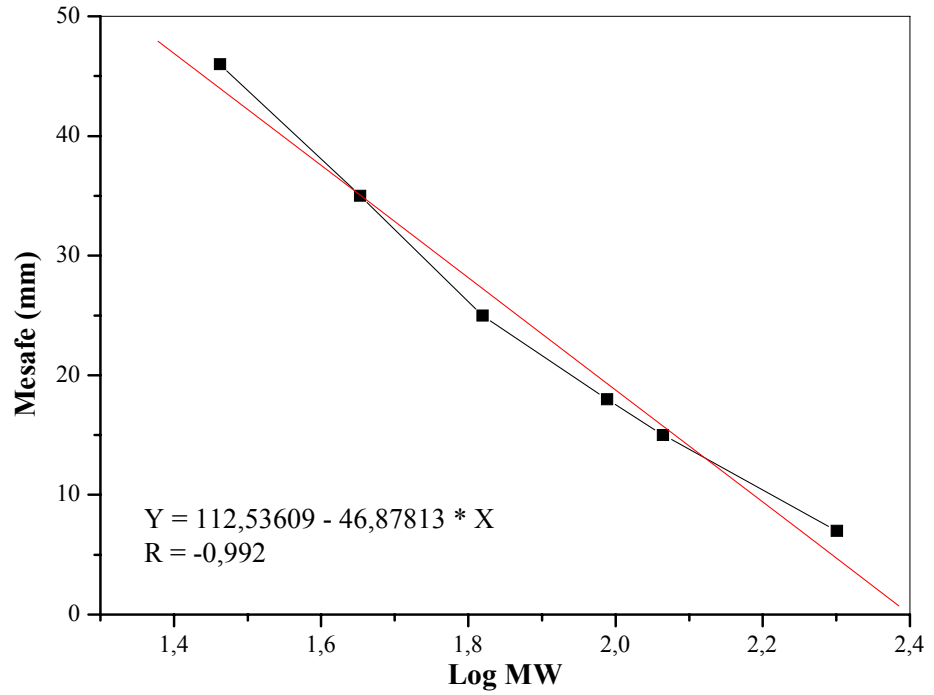
Pürifikasyon Adımı	Hacim (mL)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (Umg⁻¹)	Verim (%)	Pürifikasyon Katsayısı
Kültür süpernatant	100	1.981	25674	12960	100	1
Amonyum sülfat	4	0.545	8941	16405	34.8	1.3
Diyaliz	6	0.256	5018	19600	19.5	1.5
DEAE-sefaroze	2.7	0.128	4733	36974	19.2	2.9

4.2.3.2. Etanol Çöktürmesinden Elde Edilen Fraksiyonların SDS-PAGE İle Analizi

Etanol çöktürmesiyle elde edilen konsantre protein çözeltisi anyon değişim kolonuna yüklendikten sonra alınan fraksiyonların SDS-PAGE analizi Şekil 4.15’te görülmektedir. Aktivite ve protein miktarının yüksek olan fraksiyonların SDS-PAGE analizine göre lakkaz enzimi %80 oranında saflaştırılmıştır.



Şekil 4.15. Etanol ile çöktürülen lakkazın aktiviteye sahip fraksiyonlarının SDS-PAGE ile analiz sonuçları. (Her bir fraksiyondan 30 µL yüklenmiştir. SP, standart proteinler; 1: 1. fraksiyon; 2: 2. fraksiyon; 3: 3. fraksiyon)



Şekil 4.16. Saflaştırılan lakkazın molekül ağırlığının belirlenmesi için kullanılan SDS-PAGE ile protein standartları kullanılarak elde edilen kalibrasyon eğrisi.

Şekil 4.16'dan elde edilen grafikte 23 mm bulunan mesafe değeri yerine konduğunda saflaştırılmış lakkaz enziminin molekül ağırlığı 81.3 kDa olarak belirlenir.

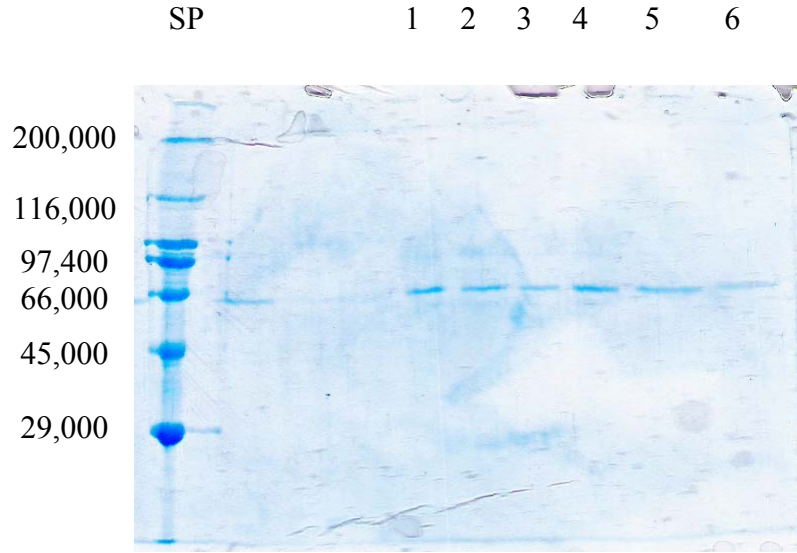
Lakkazın etanol çöktürmesiyle saflaştırılma basamakları Tablo 4.2'de özetlenmiştir. Buna göre, lakkaz enzimi %18.7 verimle yaklaşık 2 kat pürifiye edilmiştir.

Tablo 4.2. Lakkazın etanol çöktürmesiyle saflaştırılması

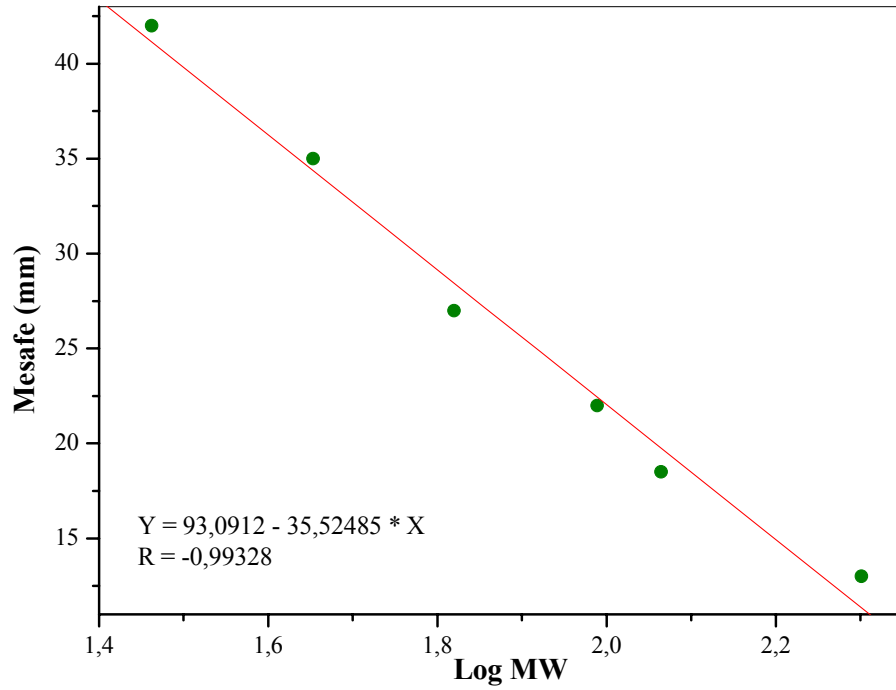
Pürifikasyon Adımı	Hacim (mL)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (UL ⁻¹)	Verim (%)	Pürifikasyon Katsayısı
Kültür süpernatant	0.1	1.981	25674	12960	100	1
Etanol	7.5	0.554	10676	19271	41.6	1.5
DEAE-Sefaroz	2	0.217	4794	22092	18.7	1.7

4.2.3.3. Süpernatantın Çöktürülme İşlemi Uygulanmadan Elde Edilen Fraksiyonlara SDS-PAGE Uygulanması

Miselyumlarından ayrılmış süpernatanttan elde edilen konsantre protein çözeltisi anyon değişim kolonuna yüklendikten sonra alınan fraksiyonların SDS-PAGE analizi Şekil 4.17'de görülmektedir. Aktivite ve protein miktarının yüksek olan fraksiyonların SDS-PAGE analizine göre lakkaz enzimi %80 oranında saflaştırılmıştır.



Şekil 4.17. Süpernatantın çöktürülme işlemi uygulanmadan elde edilen lakkazın aktiviteye sahip fraksiyonlarının SDS-PAGE ile analiz sonuçları. (Her bir fraksiyondan 30 µL yüklenmiştir. SP, standart proteinler; 1: 3. fraksiyon; 2: 4. fraksiyon; 3: 5. fraksiyon; 4: 6. fraksiyon; 5: 7. fraksiyon; 6: 8. fraksiyon)



Şekil 4.18. Saflaştırılan lakkazın molekül ağırlığının belirlenmesi için kullanılan SDS-PAGE ile protein standartları kullanılarak elde edilen kalibrasyon eğrisi.

Proteinlerin hareket mesafesine karşı protein standartlarının molekül ağırlığının logaritması grafiğe geçirildiğinde molekül ağırlığını tayin etmek istediğimiz örneğin ağırlığını denklemden hesaplayabiliriz. Şekil 4.18'deki denklemde 25 mm hareket eden lakkazın molekül ağırlığı 82.55 kDa bulunmuştur.

Lakkazın süpernatanta çöktürme işlemi uygulanmadan yapılan saflaştırılma basamakları Tablo 4.3'te özetlenmiştir. Buna göre, lakkaz enzimi %27 verimle yaklaşık 6 kat pürifiye edilmiştir.

Tablo 4.3. Lakkazın çöktürme işlemi uygulanmadan saflaştırılması.

Pürifikasyon Adımı	Toplam Hacim (mL)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (Umg ⁻¹)	Verim (%)	Pürifikasyon Katsayısı
Kültür süpernatant	100	1.981	25674	12960	100	1
DEAE-Sefaroz I	30	0.265	14347	54140	55.9	4.2
DEAE-Sefaroz II	10	0.092	6942	75456	27.0	5.8

Sonuç olarak, yapılan karşılaştırmalı saflaştırma işlemleri sonucunda Tablo 4.4'ten de görüldüğü gibi, en yüksek pürifikasyon katsayısına çöktürme işleminin uygulanmadığı saflaştırma yönteminde ulaşılmıştır.

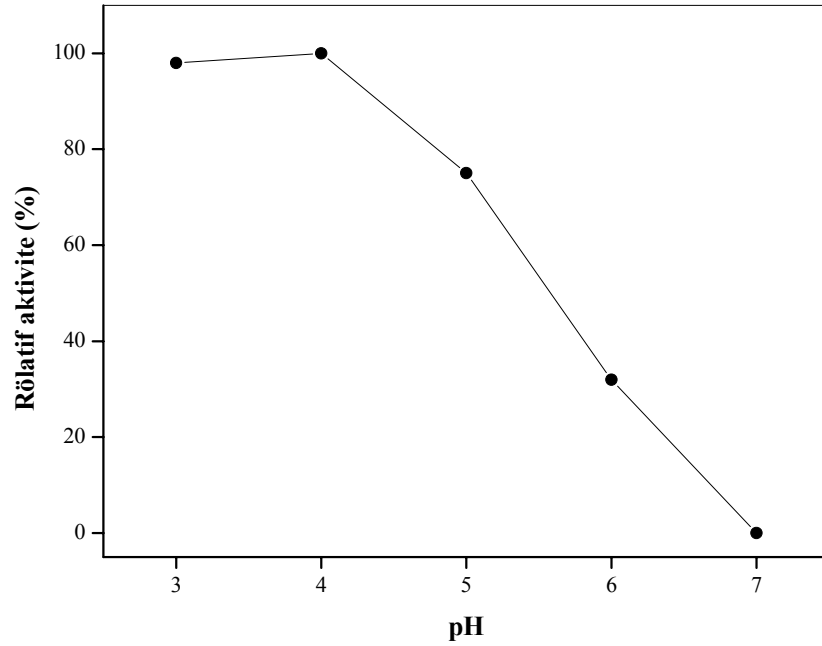
4.3. Pürifiye Lakkaz Enzimin Karakterizasyonu

DEAE-sefaroze ile pürifiye edilmiş lakkazın kısmi nitelendirilmesi aşağıda belirtildiği şekilde yapılmıştır.

4.3.1. pH'ın Aktiviteye Etkisi

pH enzimin aktif bölgesinde etkili olduğu için enzim karakterizasyonunda incelenmesi gereken parametrelerin başında gelmektedir. Deneysel çalışmalar sırasında, aktivite tayini yapılırken substrat olarak ABTS kullanılmış ve en yüksek

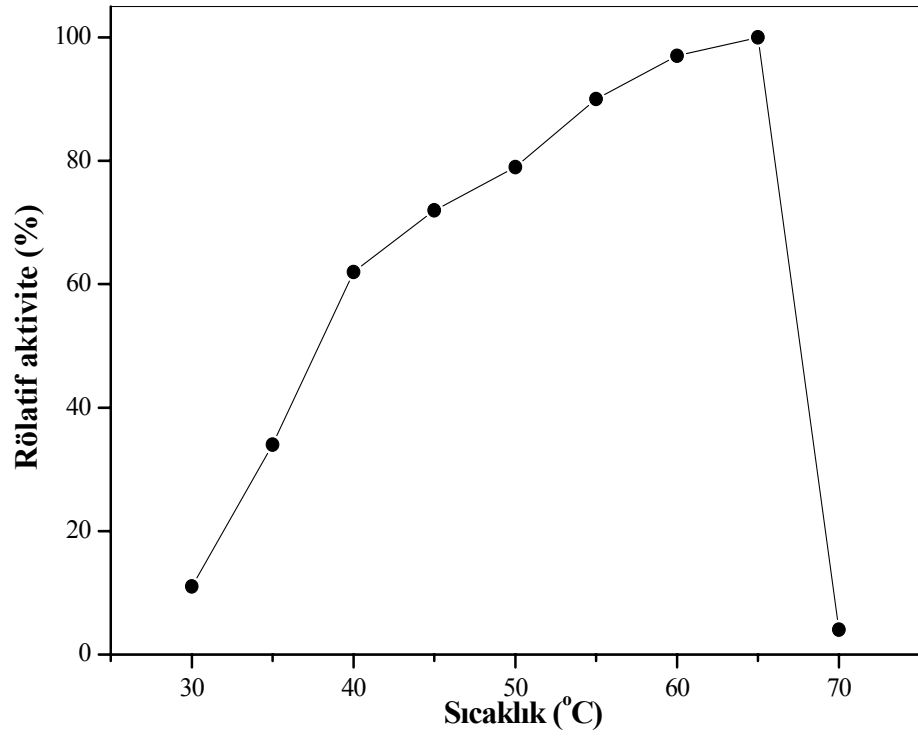
aktivite lakkazın optimum pH değeri 3-4 olan fosfat tampon çözeltisinde elde edilmiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. pH'ın aktivite üzerine etkisi. (Lakkaz aktivitesi ölçümünde son konsantrasyonları 0.167 mM ABTS, 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 3-7) ve 5µL enzim içerecek şekilde hazırlanan 750 µL reaksiyon karışımı 45°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda oluşan rengin 420 nm'deki absorbansı ölçülerek aktivite tayin edilmiştir).

4.3.2. Sıcaklığın Aktiviteye Etkisi

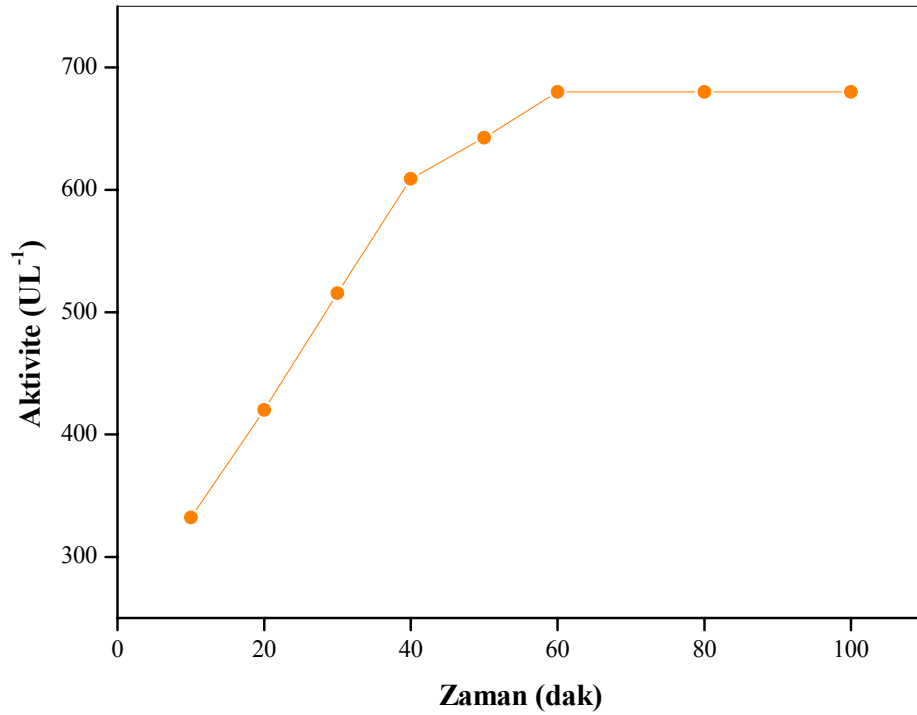
Enzimin aktivitesi sıcaklık arttıkça artış göstermektedir (Şekil 4.20). Enzim aktivitesi 60°C'ye kadar orantılı bir şekilde artış gösterirken 65°C'de maksimum aktivite elde edilmiştir. Sıcaklık 65°C'den sonra enzim aktivitesinin çok keskin bir şekilde düştüğü ve 70°C'de enzimin denatüre olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.20. Sıcaklığın aktivite üzerine etkisi. (Lakkaz aktivitesi ölçümünde son konsantrasyonları 0.167 mM ABTS, 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 4) ve 5µL enzim içerecek şekilde hazırlanan 750 µL reaksiyon karışımı 30-70°C’de 30 dakika inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda oluşan rengin 420 nm’deki absorbansı ölçülerek aktivite tayin edilmiştir).

4.3.3. Progres Eğrisi

Reaksiyon ortamında lakkaz enziminin substratı (ABTS) ürüne dönüştürme hızının zamanla değişimi incelendiğinde aktivitenin 60. dakikada maksimum olduğu bulunmuştur (Şekil 4.21).

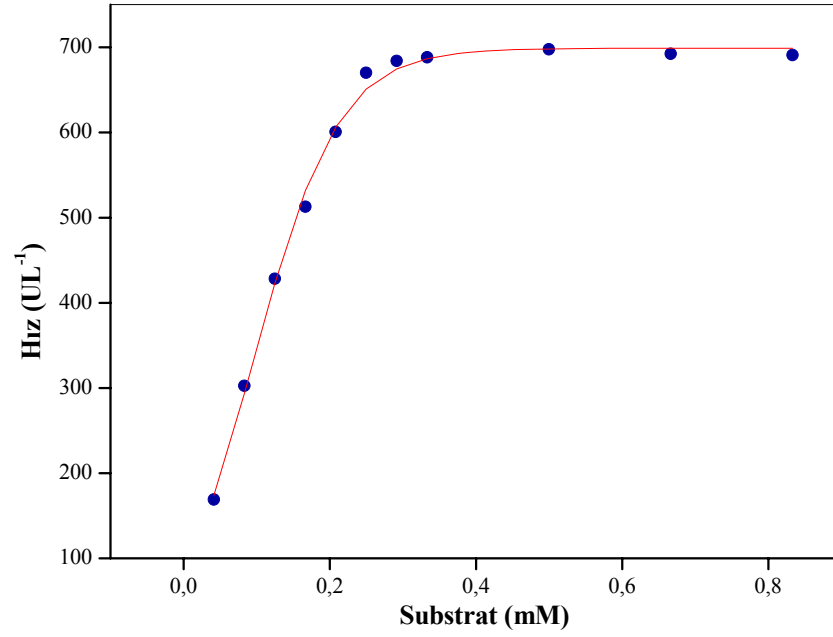


Şekil 4.21. Enzimin aktivitesinin zamanla değişimi. (Lakkaz aktivitesi ölçümünde son konsantrasyonları 0.167 mM ABTS, 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 4) ve 5µL enzim içerecek şekilde hazırlanan 750 µL reaksiyon karışımı 45°C’de 10 ila 100 dakika inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda oluşan rengin 420 nm’deki absorbansı ölçülerek aktivite tayin edilmiştir).

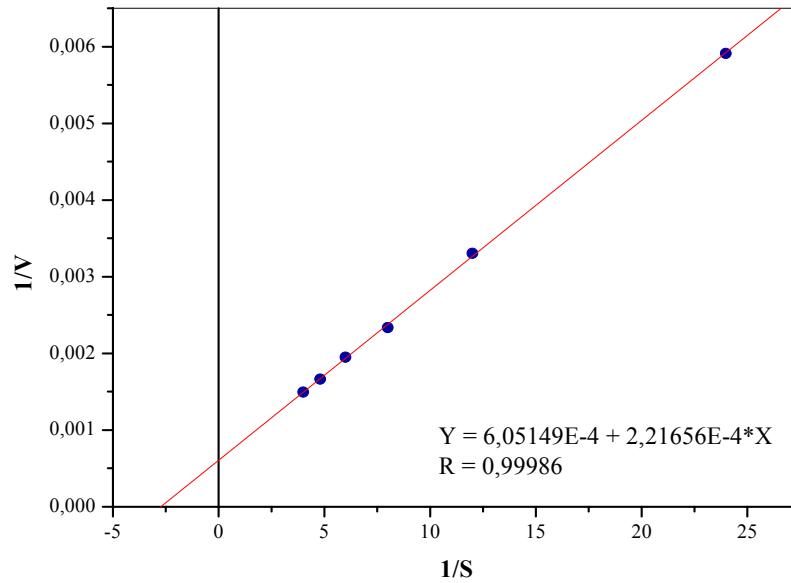
4.3.4. Kinetik Değerlerin Belirlenmesi

ABTS lakkaz aktivite tayininde sıkça kullanılan bir substrattır. Yaptığımız bu çalışmada saflaştırdığımız lakkaz enzimini ABTS için kinetik parametrelerini bularak literatürdeki değerlerle karşılaştırmayı hedefledik.

Yapılan kinetik deneylerinde ABTS konsantrasyonu 0.04 ile 0.83 mM arasında değiştirilmiştir. Şekil 4.22’de kinetik çalışmalar sonucunda elde edilen Michaelis-Menten grafiği, Şekil 4.24’te ise Lineweaver-Burk grafiği görülmektedir. Yapılan hesaplamalar sonucunda $V_{\max} = 1652 \text{ UL}^{-1}$ ve $K_m = 3.66 \times 10^{-4} \text{ M}$ olarak bulunmuştur (Şekil 4.22 ve 4.23).



Şekil 4.22. *Trametes versicolor* lakkaz için Michaelis-Menten grafiği. (Lakkaz aktivitesi ölçümünde son konsantrasyonları (0.04-0.83 mM) ABTS, 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 4) ve 5µL enzim içerecek şekilde hazırlanan 750 µL reaksiyon karışımı 45°C’de 30 dakika inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda oluşan rengin 420 nm’deki absorbanası ölçülerek aktivite tayin edilmiştir).



Şekil 4.23. *Trametes versicolor* lakkaz için Lineweaver-Burk grafiği. (Lakkaz aktivitesi ölçümünde son konsantrasyonları (0.04-0.83 mM) ABTS, 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 4) ve 5µL enzim içerecek şekilde hazırlanan 750 µL reaksiyon karışımı 45°C’de 30 dakika inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda oluşan rengin 420 nm’deki absorbanası ölçülerek aktivite tayin edilmiştir).

5. KAYNAKLAR

1. Kirk, O., Borchert, T.V. and Fuglsang, C.C., (2002) "Industrial Enzyme Applications" *Current Opinion In Biotechnology*, 13: 345-351.
2. Beilen, J. and Li, Z., (2002) "Enzyme Technology: an Overview" *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 338–344.
3. Köse, K., (1991) "Ratlarda Sentetik Seks Steroidlerinin Lipid Metabolizması Üzerine Etkileri" Erciyes Üniversitesi, Doktora Tezi.
4. Demir, G., Özcan, H. K., Elmaslar, E., Borat, M. (2004) "Decolorization of Azo Dyes by the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*", *Fresenius Environmental Bulletin*, 13: (No. 10) 979-984.
5. Murray, et al., (1990) "Medical Microbiology".
6. Purves, et al., (1998) "Life: The Science of Biology" Sinauer Associates, Inc.
7. Arda, M., (2000) "Temel Mikrobiyoloji" Medisan Yayın Serisi no 46.
8. Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., Blackwell, M., (1996) "Introductory Mycology" John Wiley and Sons, New York.
9. Demain, A.L., (1991) "Production of Beta-Lactam Antibiotics and its Regulation" *Proc Natl Sci Counc Repub China B.*, 15: 251-265.
10. Kitamoto, N., Yoshino, S., Ohmiya, K., Tsukagoshi N., (1999) "Sequence Analysis, Overexpression, and Antisense Inhibition of a Beta-Xylosidase Gene, Xyla, from *Aspergillus oryzae* KBN616" *Appl. Env. Microbiol.*, 65: 20-24.
11. Carlile, M.J. & Watkinson, S.C., (2000) "The Fungi" Academic Press, London.
12. University of Winconsin-Madison, (2006) Department of Bacteriology lectures.
13. The Mycological Society of America publishes Mycologia. Stanford University Libraries.
14. Hickey, P.C., Swift, S.R., Roca, M.G. & Read, N.D., (2005) "Live-cell Imaging of Filamentous Fungi Using Vital Fluorescent Dyes" In *Methods in Microbiology*. 34: 63-87. Elsevier: Amsterdam.
15. Backyard Nature (2006) "Fungi".

16. Duncan, C.G. and Deverall, F.J., (1964) "Degradation of Wood Preservatives by Fungi" *Appl Environ Microbiol.* 12 (1): 57-62.
17. Tree of Life design, images, and icons copyright © 1995-2005 Tree of Life Web Project.
18. Martin S. Cohen and Peter D. Gabriele, (1982) "Degradation of Coal by the Fungi *Polyporus versicolor* and *Poria monticola*" *Appl Environ Microbiol.*, 44(1): 23-27.
19. The University of Winnipeg, Evolution, Ecology And Biodiversity Biology 05-1116-3.
20. Spark Notes, (2005) "Today's Most Popular Study Guides from Barnes & Noble".
21. Diven, S.C., Angel, C.A., Hawkins HK, Rowen JL, Shattuck KE, (2004) "Intestinal zygomycosis due to *Absidia corymbifera* Mimicking Necrotizing Enterocolitis in a Preterm Neonate" *J. Perinatol.*, 24 (12): 794-796.
22. O'Donnell, K., (1979) "Zygomycetes in Culture" Department of Botany, University of Georgia, Athens.
23. Hass, H., Taylor, T.N. & Remy, W., (1994) "Fungi from the Lower Devonian Rhynie chert: Mycoparasitism" *American Journal of Botany* 81(1): 29-37.
24. Kirk, P., Cannon, P., David, J., Stalpers, J., (2001) "Dictionary Of The Fungi" 9th Edition.
25. Read, N.D., (1994) "Cellular Nature and Multicellular Morphogenesis of Higher Fungi In: Shape and Form in Plants and Fungi" pp. 254-271. Academic Press: London.
26. Scklarz, G., Antibus, R., Sinsabaugh, R. and Linkins, A., (1989) "Production of Phenol Oxidases and Peroxidases By Wood-Rotting Fungi" *Mycologia*, 81 : 234-240.
27. Hatakka, A., (1994) "Lignin-Modifying Enzymes from Selected White-Rot Fungi: Production and Role in Lignin Degradation" *Fems Microbiol Rev.*, 13: 125– 35.
28. De Jong, E., De Vries, F., Field, J., Van Der Zwan, R., And De Bont, J. (1992) "Isolation and Screening of Basidiomycetes with High Peroxidative Activity" *Mycol. Res.*, 96: 1098-1104.

29. Palaez, F., Martinez, M. and Martinez, A., (1995) "Screening of 68 Species of Basidiomycetes for Enzymes Involved in Lignin Degradation" *Mycol. Res.*, 99: 37-42.
30. Waldner, R., Leisola, M. and Fiechter, A., (1988) "Comparison of Ligninolytic Activities of Selected White-Rot Fungi" *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 29: 400- 407.
31. Pointing, S.B., (2001) "Feasibility of Bioremediation by White-Rot Fungi" *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57: 20–33.
32. Cripps, C., Bumpus, J., Aust S., (1990) "Biodegradation of Azo and Heterocyclic Dyes by *Phanerochaete chrysosporium*" *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 1114–1118
33. Ollikka, P., Alhonma, K.K., Leppä Nen, V.M., Glumoff, T., Rajjola, T., Suominen, I., (1993) "Decolorization of Azo, Triphenyl Methane, Heterocyclic, and Polymeric Dyes by Lignin Peroxidase Isoenzymes From *Phanerochaete chrysosporium*" *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 4010–4016.
34. Heinfling, A., Bergbauer, M., Szewzyk, U., (1997) "Biodegradation of Azo and Phthalocyanine Dyes by *Trametes versicolor* and *Bjerkandera adusta*" *Appl Microbiol Biotechnol.*, 48: 261–266.
35. Paszczynski, A., Pasti-Grigsby, M.B., Goszczynski, S., Crawford, R.L., Crawford, D.L., (1992) "Mineralization of Sulfonated Azo Dyes and Sulfanilic Acid by *Phanerochaete chrysosporium* And *Streptomyces chromofuscus*" *Appl Environ Microbiol.*, 58: 3598–3604.
36. Kirk, T., Farrell, R., (1987) "Enzymatic "Combustion": The Microbial Degradation of Lignin" *Annu Rev Microbiol.*, 41: 465–505.
37. Erwin, E., De Jong, E., And Field, J. (1993) Stimulation of Ligninolytic Peroxidase Activity by Nitrogen Nutrients in The White Rot Fungus *Bjerkandera* Sp. Strain Bos55" *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 4031-4036.
38. Call, H., Mucke, L., (1997) "History, Overview and Applications of Mediated Lignolytic Systems, Especially Laccase-Mediator-Systems (Lignozym process)" *J. Biotechnol.*, 53: 163-202.
39. Mayer A.M. and Staples R.C., (2002) "Laccases: New Functions for an Old Enzyme" *Phytochemistry*, 60: 551–565.

40. Gellerstedt, G., And Northy, R.A., (1989) "Analysis of birch wood lignin by oxidative degradation" *Wood Sci. Technol.*, 23: 75-83.
41. Kirk, K. And Cullen, K., (1998). "Enzymology And Molecular Genetics Of Wood Degradation by White-Rot Fungi" *Environmentally Friendly Technologies fFor The Pulp And Paper Industry*. John Wiley And Sons, Inc. New York. pp 273-307.
42. Thakker, G.D., Evans, C.S. and Rao, K.K., (1992) "Purification and Characterisation Of Laccase From *Monocillium indicum* Saxena" *Applied Microbiol Biotechnology*, 37: 321- 323.
43. Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Scaloni, A., Capasso, A. and Sannia, G. (1997) "A Novel White Laccase From *Pleurotus ostreatus*" *The Journal Of Biological Chemistry*, 272 (50): 31301-31307.
44. Eggert, C., Temp, U. and Eriksson, K.L., (1996) "The Ligninolytic System of The White Rot Fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and Characterisation of the Laccase" *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (4): 1151-1158.
45. Messerschmidt, A., (1997) "Spatial Structures of Ascorbate Oxidase, Laccase and Related Proteins: Implication for Catalytic Mechanism Multicopper Oxidases" *World Scienti®C, Singapore*, Pp. 23-80.
46. Leontievsky, A.A., Vares, T., Lankinen, P., Shergill, J.K., Pozdnyakova, N.N., Myasoedova, N.M., Kalkkinen, N., Golovleva, L.A., Cammack, R., Thurston, C.F. & Hatakka, A., (1997) "Blue and Yellow Laccases Of Ligninolytic Fungi" *Fems Microbiol. Lett.*, 156: 9-14.
47. Thurston, C.F. (1994) "The Structure and Function Of Fungal Laccases" *Microbiol.*, 140: 19–26.
48. Mayer, A.M. (1987) "Polyphenoloxidases In Plants: Recent Progress" *Phytochemistry*, 26: 11-20.
49. Levine, W.G. (1965) "Laccase, A Review. In: *The Biochemistry Of Copper*" Academic Press Inc., New York: 371-385.
50. Bertrand, G (1894) *Sur Le Latex De L'arbre À Laque*. C.R. Hebd. Acad. Sci. (Paris), 118: 1215-1218.
51. Piontek, K., Antorinis, M., Choinowski, T. (2002) "Crystal Structure of A Laccase from the Fungus *Trametes versicolor* At 1.90-Å Resolution

Containing A Full Complement Of Coppers” Biological Chemistry J., 277: 37663-37669.

52. Feng, Xu (1996) “Oxidation of Phenols, Anilines, and Benzenethiols by Fungal Laccases: Correlation between Activity and Redox Potentials as well as Halide Inhibition” Biochemistry, 35: 7608-7614.
53. Sakurai, T. (1992) “Anaerobic reactions of *Rhus vernicifera* laccase and its type-2 copper-depleted derivatives with hexacyanoferrate(II)” Biochem. J., 284: 681–685.
54. Bourbonnais, R., Paice, M.G., (1992) “Demethylation and Delignification of Kraft Pulp by *Trametes versicolor* Laccase in the Presence Of 2,2'-Azinobis-(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulphonate)” Appl. Microbiol. Biotechnol, 36: 823-827.
55. Bourbonnais, R., Paice, M.G., Reid, I.D., Lanthier, P. and Yaguchi, M. (1995) “Lignin Oxidation by Laccase Isozymes from *Trametes versicolor* and Role of The Mediator 2',2'-Azinobis(3-thylbenzthiazoline-6-Sulphonate) in Kraft Pulp Depolymerisation” Applied and Environmental Microbiology, 61 (5): 1876-1880.
56. Li, K., Xu, F., Eriksson, K.E., (1999) “Comparison of Fungal Laccases and Redox Mediators in Oxidation of a Nonphenolic Lignin Model Compound” Appl. Environ. Microbiol., 65(6): 2654-2660.
57. Novotny, C, Svobodova, K, Kasinath, A, Erbanova, P., (2004) “Biodegradation of Synthetic Dyes By *Irpex Lacteus* Under Various Growth Conditions” Int. Biodeterior. Biodegrad., 54: 215-223.
58. Bourbonnais, R., Paice, M.G., Freiermuth, B., Bodie, E. and Borneman, S., (1997) “Reactivities Of Various Mediators and Laccases with Kraft Pulp and Lignin Model Compounds” Applied and Environmental Microbiology, 63: 4627-4632.
59. Gianfreda, L., Xu, F., Bollag J.M., (1999) “Laccases: A Useful Group Of Oxidoreductive Enzymes” Bioremed. J., 3:1-25.
60. Wesenberg at. Al., (2003) “White Rot Fungi and Their Enzymes for The Treatment Of Industrial Dye Effluents” Biotechnology Advances, 22: 161-187.
61. Durán, N., Rosa, M.A., D'annibale, A., Gianfreda, L., (2002) “Applications Of Laccases And Tyrosinases (Phenoloxidases)

- Immobilized On Different Supports: A Review” *Enz. Microbial Technol.*, 31: 907-931.
62. Ducros, V., Brzozowski, A.M., Wilson, K.S., Brown, S.H., Ostergaard, P., Schneider, P., Yaver, D.S., Pedersen, A.H. and Davies, G.J. (1998) “Crystal Structure Of The Type-2 Copper Depleted Laccase from *Coprinus cinereus* At 2.2 Å Resolution” *Nature Structural Biology*, 5: 310-316.
 63. Bar, M. (2001) “Kinetics and Physico-Chemical Properties Of White-Rot Fungal Laccases” *Magister Scientiae*, In the Faculty of the Requirements for the degree.
 64. Claus, H (2004) “Laccases: Structure, Reactions, Distribution” *Micron*. 35: 93-96.
 65. Mester, T., Tien, M., (2000) “Oxidation Mechanism of Ligninolytic Enzymes Involved in The Degradation of Environmental Pollutants” *International Biodeterioration & Biodegradation* 46: 51-59.
 66. Zille, A. (2005) “Laccase Reactions for Textile Application”
 67. Heather, A. Vandertol-Vanier (2000) “The Role of Laccase from *Corioloopsis gallica* in Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolism”
 68. Hough, M. A., Hall, J. F., Kanbi, L. D. & Hasnain, S. S. (2001) *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, 57: 355–360
 69. Xu, F., Kulys, J. J., Duke, K., Li, K., Krikstopaitis, K., Deussen, H.-J. W., Abbate, E., Galintye, V. and Schneider, P. (2000) *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 2052–2056
 70. Palmer, A.E., Szilagyi, R.K., Cherry, J.R., Jones, A., Xu, F., Solomon, E.I., (2003) “Spectroscopic Characterization of The Leu513his Variant Of Fungal Laccase: Effect of Increased Axial Ligand Interaction on The Geometric and Electronic Structure of The Type 1 Cu Site” *Inorg. Chem.*, 42: 4006-4017.
 71. Archibald, F.S., Bourbonnais, R., Jurasek, L., Paice, M.G. & Reid, I.D., (1997) “Kraft Pulp Bleaching and Delignification by *Trametes versicolor*” *J. Biotechnol.*, 53: 215-236.
 72. Paice, M.G., Bourbonnais, R., Reid, I.D., Archibald, F.S. and Jurasek, L., (1995) “Oxidative Bleaching Enzymes: A Review” *Journal of Pulp and Paper Science*, 21 (8): 280-284.

73. Banci, L., Ciofi-Baffoni, S., Tien, M., (1999) "Lignin and Mn Peroxidase-Catalyzed Oxidation Of Phenolic Lignin Oligomers" *Biochemistry*, 38: 3205-3210.
74. Johannes, C. and Majcherczyk, A., (2000) "Natural Mediators in The Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Laccase Mediator Systems" *Applied And Environmental Microbiology*, 66: 524-528.
75. Scott, S.L., Chen, W.J., Bakac, A., Espenson, J.H., (1993) "Spectroscopic Parameters Electrode Potentials, Acid Ionization Constants, and Electron Exchange Rates of The 2,2-Azinobis(3-Ethylbenzothi- Azolone-6-Sulfonate) Radicals and Ions. *J. Phys. Chem.*, 1993:6710-6714.
76. Call, H.P. and Mucke, I. (1994) "State of the Art Enzyme Bleaching and Disclosure of a Breakthrough Process" *Lignozym GmbH*.
77. Bourbonnais, R., Paice, M.G., Leech, D. and Freiermuth, B., (1997) "Reactivity and Mechanism of Laccase Mediators for Pulp Delignification" *Tappi Proceedings*: 335-338.
78. Xu, F. (1997) "Effects Of Redox Potential And Hydroxide Inhibition on the pH Activity Profile of Fungal Laccases" *The Journal of Biological Chemistry*, 272 (10): 924-928.
79. Mester, T., Pena, M., And Field, J., (1996) "Nutrient Regulation Of Extracellular Peroxidases in the White Rot Fungus, *Bjerkandera* sp. Strain bos55" *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 44: 778-784.
80. Kuan, I.-C., Tien, M., (1993) "A Possible Role Of Oxalate in Lignin Degradation" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 90, 1242-1246.
81. Koduri, R.S., Tien, M., (1994) "Kinetic Analysis of Lignin Peroxidase. Explanation for Mediation Phenomenon by Veratryl Alcohol" *Biochemistry*, 33: 4225-4230.
82. Cai, D., Tien, M., (1992) "Kinetic Studies on the Formation and Decomposition Of Compounds II and III Reactions of Lignin Peroxidase with H₂O₂" *J. Biol. Chem.*, 267: 11149-11155.
83. Tien, M., Kirk, T.K., (1983) "Lignin Degrading Enzyme from the Hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds" *Science* 221: 661-663.
84. Banci, L., (1997) "Structural Properties of Peroxidases" *J. Biotechnol.*, 53: 253-263.

85. Hatakka, A., (2001) "Biodegradation of Lignin" Lignin, Humic Substances and Coal. Weinheim, Germany: Wiley-Vch., 1: 129–180.
86. Steffen, K., Hofrichter, M., Hatakka, A., (2000) "Mineralization of ^{14}C -Labelled Lignin and Production of Ligninolytic Enzymes by Selected Litter decomposing Basidiomycetes" Appl. Microbiol. Biotechnol. 54: 819–825.
87. Raghukumar, C., D'souza T., Thorn, R., Reddy, C., (1999) "Lignin-Modifying Enzymes Of *Flavodon flavus*, A Basidiomycete Isolated from A Costal Marine Environment" Appl Environ Microbiol, 65: 2103–2111.
88. Schmidt, O., Schmitt, U., Moreth, U., Potsch, T., (1997) Wood Decay By The White-Rotting Basidiomycete *Physisporinus vitreus* From a Cooling Tower" Holzforschung, 51:193–200.
89. Willmann, G., Fakoussa, Rm., (1997) "Biological Bleaching Of Water-Soluble Coal Macromolecules by a Basidiomycete Strain" Appl Microbiol Biotechnol, 47: 95–101.
90. Kuwahara, M., Glenn, J., Morgan, M., Gold, M., (1984) "Separation and Characterization of Two Extracellular H_2O_2 -Dependent Oxidases from Ligninolytic Cultures of *Phanerochaete chrysosporium*" Febs Lett., 169: 247–250.
91. Glenn, J., Gold M., "Purification and Characterization of an Extracellular Mn(II)-Dependent Peroxidase from the Lignin-Degrading Basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*" Arch Biochem Biophys, 242: 329–341.
92. Paszcynski, A., Huynh, V., Crawford, R., (1985) "Enzymatic Activities of an Extracellular, Manganese-Dependent Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*" Fems Microbiol Lett 29: 37–41.
93. Paszcynski, A., Huynh, V., Crawford, R., "Comparison of Ligninase-1 And Peroxidase-M2 from the White-Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*" Arch Biochem Biophys, 244: 750–65.
94. Cairney, J., Burke R., "Ecto- and Ericoid Mycorrhizal Fungi Produce Peroxidase Activity" Mycorrhiza 8: 61–65.
95. Paszcynski, A., Huynh, V., Crawford, R., (1985) "Enzymatic Activities of an Extracellular Manganese-Dependent Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*" Fems Microbiol Lett, 29: 37–41.

96. Heinfling, A., Martínez, M.J., Martínez, A.T., Bergbauer, M., Szewzyk, U., (1998) "Purification and Characterization of Peroxidases from the Dye decolorizing Fungus *Bjerkandera adusta*" Fems Microbiol. Lett., 165: 43- 50.
97. Van Aken, B., Hofrichter, M., Scheibner, K., Hatakka, A., Naveau, H., Agathos, S., "Transformation and Mineralization of 2,4,6-Trinitrotoluene (Tnt) by Manganese Peroxidase from the White-Rot Basidiomycete *Phlebia radiata*" Biodegradation, 10: 83–91.
98. Kuan, I.C., Johnson, K.A., Tien, M., (1993) "Kinetic Analysis Of Manganese Peroxidase. The Reaction With Manganese Complex" J. Biol. Chem., 268: 20064-20070.
99. Kuan, I.C., Tien, M., (1993) "Stimulation of Mn Peroxidase Activity: a Possible Role of Oxalate in Lignin Degradation" Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 90: 1242-1246.
100. Hofrichter, M., (2002) "Review: Lignin Conversion by Manganese Peroxidase (MnP)" Enzyme and Microbial Technology, 30: 454–466
101. Wariishi, H., Akaleswaran, L., Gold, Mh., (1988) "Manganese Peroxidase from the Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: Spectral Characterization of Oxidized States and the Catalytic Cycle" Biochemistry, 27: 5365–5370.
102. Gold, M., And Alic, M., (1993) "Molecular Biology of the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*" Microbiol. Rev., 57: 605-622.
103. Sutherland, Grj., Schick Zapanta, L., Tien, M., Aust, Sd., (1997) "Role Of Calcium in Maintaining the Heme Environment of Manganese Peroxidase" Biochemistry, 36: 3654–3662.
104. Sundaramoorthy M, Kishi K, Gold Mh, Poulos Tl., (1997) "Crystal Structures of Substrate Binding Sites Mutants of Manganese Peroxidase" J Biol Chem., 272: 17574-17580.
105. Munirathinam, S., Katsuyukki I., Michael H. Gold, and Thomas L. Poulos (1994) "The Crystal Structure of Manganese Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.06-Å Resolution" The Journal of Biological Chemistry, 269: 32759-32767.

106. Welinder, K.G. and Gajhede, M., (1993) "In Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology" Pp. 35-42, University Of Geneva
107. Pdb Data Bank
108. Brown, J.A., Glenn, J.K. and Gold, M.H., (1990) "Manganese Regulates Expression of Manganese Peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*" J. Bacterid., 172: 3125-3130.
109. http://image.fs.uidaho.edu/New_EBI/silicon.html
110. Tien, M, Kirk, T, Bull, C., Fee J., (1986) "Steady-State and Transient-State Kinetic Studies on the Oxidation of 3,4- Dimethoxybenzyl Alcohol Catalyzed by the Ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* Burds" J Biol. Chem., 261: 1687–1693.
111. Schoemaker, H., Leisola, M., (1990) "Degradation of Lignin by *Phanerochaete chrysosporium*" J Biotechnol., 13: 101– 109.
112. Kersten, P., Tien, M., Kalyanaraman, B., Kirk, T., (1985) "The Ligninase from *Phanerochaete chrysosporium* Generates Cation Radicals from Methoxybenzenes" J. Biol. Chem., 260: 2609 –2612.
113. Steven, L., Edwards, T., Reetta, R., Hiroyuki, W., Michael, H. G. and Thomas, L.P., (1993) "Crystal Structure Of Lignin Peroxidase" 90: 750-754.
114. Schoemaker, H.E., Piontek, K., (1996) "On the Interaction of Lignin Peroxidase with Lignin" Pure & Appl. Chem., 68: 2089-2096.
115. Schoemaker, H. E., (1990) "On the chemistry of lignin biodegradation" Recl. Trav. Chim. Pays-Bas, 109: 255-272.
116. Schoemaker, H.E., Lundell, T.K., Hatakka, A.I. and Piontek, K., (1994) Fems Microbiol. Rev., 13: 321-332.
117. Ten Have, R., Teunissen, P.J.M., (2001) "Oxidative Mechanisms Involved in Lignin Degradation by White-Rot Fungi" Chem. Rev., 101: 3397–3431.
118. Rabinovich, M.L., Bolobova, A.V., Vasilchenko, L.G., (2004) "Fungal Decomposition Of Natural Aromatic Substrates And Xenobiotics: A Review" Appl. Biochem. Microbiol., 40: 1–17.
119. Ferapontova, E.E., Castillo, J., Gorton, L., (2006) "Bioelectrocatalytic Properties of Lignin Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* in

Reactions with Phenols, Catechols and Lignin-Model Compounds”
 Biochimica et Biophysica Acta, 1760: 1343–1354.

120. Tien, M., Kirk, T., (1984) “Lignin-Degrading Enzyme From *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, Characterization, And Catalytic Properties Of A Unique H₂O₂-Requiring Oxygenase” Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81: 2280-2284.
121. Wariishi, H., Akilesvaran, L., Gold, M.H., (1988) “Manganese Peroxidase from the Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: Spectral Characterization of Oxidation State and the Catalytic Cycle. Biochemistry, 27: 5365-5370.
122. Banci, L., Ciofi-Baffoni, S., Tien, M., (1999) “Lignin and Mn Peroxidase-Catalysed Oxidation of Phenolic Lignin Oligomers” Biochemistry, 38: 3205-3210.
123. Cancel, A.M., Orth, A.B., Tien, M., (1993) “Lignin and Veratryl Alcohol are not Inducers of the Ligninolytic System of *Phanerochaete chrysosporium*” Appl. Environ. Microbiol. 59: 2909-2913.
124. Ferapontova, E.E., Castillo, J., Gorton, L., (2006) “Bioelectrocatalytic Properties of Lignin Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* in Reactions with Phenols, Catechols and Lignin-Model Compounds” Biochimica et Biophysica Acta, 1760: 1343–1354.
125. Andrawis, A., Johnson, K.A., Tien, M., (1988) “Studies on Compound I Formation of the Lignin Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*” J. Biol. Chem., 263: 1195-1198.
126. Piontek, K., Glumoff, T. and Winterhalter, K., (1993) “Low pH Crystal Structure of Glycosylated Lignin Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.5 Å Resolution” Febs Lett., 315: 119–124.
127. Marquez, L., H. Wariishi, H. B. Dunford, and M. H. Gold. (1988) “Spectroscopic and Kinetic Properties of the Oxidized Intermediates of Lignin Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*” J. Biol. Chem., 263: 10549–10552.
128. Kraulis, P.J., (1991) “Molscript: A Program to Produce Both Detailed and Schematic Plots of Protein Structures” J. Appl. Crystallog, 24: 946-950.
129. Choinowski, T., Blodig, W., Winterhalter, K.H. and Piontek, K., (1999) “The Crystal Structure of Lignin Peroxidase at 1.70 Å Resolution Reveals

A Hydroxy Group on the C of Tryptophan 171” J. Mol. Biol., 286: 809-827.

130. English, A.M., Tsaprailis, G., (1995) “Catalytic Structure–Function Relationships in Heme Peroxidases” Adv. Inorg. Chem., 43: 79–125.
131. Howes, B. D., Feis A., Raimondi L., Indiani C., and Smulevich G., (2001) “The Critical Role of The Proximal Calcium Ion in the Structural Properties of Horseradish Peroxidase” J. Biol. Chem., 276: 40704–40711.
132. Nie, G., and Aust S. D., (1997) “Spectral Changes of Lignin Peroxidase During Reversible Inactivation” Biochemistry, 36: 5113–5119.
133. George, S.J., Kvratskhelia, M., Dilworth, M.J., and Thorneley, R.N.F., (1999) “Reversible Alkaline Inactivation of Lignin Peroxidase Involves the Release of Both the Distal and Proximal Site Calcium Ions and Bis-Histidine Coordination of the Heme” Biochem. J., 344: 237–244.
134. Gerini, M.F., Roccatano, D., Baciocchi, E. and Di Nola, A., (2003) “Molecular Dynamics Simulations of Lignin Peroxidase in Solution” Biophysical Journal, 84: 3883–3893.
135. Moon-Jeong Han, Hyung-Tae Choi and Hong-Gyu Song., (2005) “Purification and Characterization of Laccase from the White Rot Fungus *Trametes versicolor*” The Journal of Microbiology, 555-560.
136. Glenn, J., Gold, M., (1983) “Decolorization of Several Polymeric Dyes by the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*” Appl. Environ. Microbiol., 45: 1741–1747.
137. Wong, Y. and Yu, J., (1999) “Laccase-Catalyzed Decolorization of Synthetic Dyes” Wat. Res., 33: (16) 3512-3520.
138. Champagne, P.P., Ramsay, J.A., (2005) “Contribution of Manganese Peroxidase and Laccase to Dye Decoloration by *Trametes versicolor*” Appl Microbiol Biotechnol., 69: 276–285.
139. Riva, S., (2006) “Laccases: Blue Enzymes For Green Chemistry” Trends In Biotechnology, 24: (5) 219-226.
140. Campbell, Wilbur H., 1996, 1997, 1999, 2001, All Rights Reserved.
141. Voet, D. & Voet, J.G., (2004) Biochemistry.
142. Applied and environmental microbiology journals.
143. Lehninger, (2004) “Principles Of Biochemistry”.
144. Bio-Rad Hydrophobic Interaction & Products.

145. Hofrichter, M., (2002) "Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP)" *Enzyme and Microbial Technology* 30: 454–466.
146. Ruf Rice Education, (2006) lecture notes.
147. Bio Davidson Education/Courses/Genomics/Method
148. Saçak, M., (2004) *Polimer Kimyası*, Gazi Kitabevi.
149. Pazarlıoğlu, N. K., Sarıışık, M., Telefoncu, A., (2005) "Laccase : production by *Trametes versicolor* and application to denim washing" *Process biochemistry*, 40: 1673-1678.
150. Pazarlıoğlu, N.K., Ürek, R.Ö., (2004) "Purification and partial characterization of manganese peroxidase from immobilized *Phanerochaete crysosporium*" *Process Biochemistry*, 39: 2061-2068.
151. Moon-Jeong Han, Hyoungh-Tae Choi and Hong-Gyu Song, (2005) "Purification and Characterization of Laccase from the White Rot Fungus *Trametes versicolor*" *The Journal of Microbiology*, 555-560.
152. Champagne, P.P., Ramsay, J.A., (2005) "Contribution of Manganese Peroxidase and Laccase to Dye Decoloration by *Trametes versicolor*" *Appl Microbiol Biotechnol*, 69: 276-285
153. Revankar, M.S., Lele, S.S., (2006) "Increased Production of Extracellular Laccase by the White Rot Fungus *Coriolus versicolor* MTCC 138" *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 22: 921-926.
154. Lorenzo, M., Moldes, D., Sanroma, M.A., (2005) "Effect of Heavy Metals on the Production of Several Laccase Isoenzymes by *Trametes versicolor* and on Their Ability to Decolourise Dyes.
155. Bradford, M.M., (1976) "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding" *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
156. Laemmli, U.K., (1970) "Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4" *Nature Land.*, 227: 680-685.
157. Arisoy, M., (1998) "Biodegradation of Chlorinated Organic Compounds by White-Rot Fungi" *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 60: 872-876.
158. Archibald, F., Poy, B.P., (1993) "Effects of Kraft Pulp and Lignin on *Trametes versicolor* Carbon Metabolism" *App. And Env. Microbiology*, p. 1855-1863.
- 159.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Meltem GÖKSEL DİZGE
Doğum Tarihi: 28. 03. 1979 - İZMİT
Üniversite: Kocaeli Üniversitesi (2003)
Bölüm: Kimya
Yüksek Lisans: Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü (2007)
Bölüm: Biyokimya