

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BEYAZ ÇÜRÜKÇÜL MANTARLARDAN LAKKAZ
ÜRETİMİNİN
ARAŞTIRILMASI VE İNDÜKSİYONU

Kimyager Vildan AYKUT ÖZAN

FBE Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programında
Hazırlanan

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İnci ARISAN (YTÜ)

İSTANBUL 2010

İÇİNDEKİLER

KISALTMA LİSTESİ.....	i
ŞEKİL LİSTESİ.....	ii
TABLO LİSTESİ.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. MANTARLAR.....	3
2.1. Mantarların Genel Özellikleri.....	4
2.1.1. Hücresel Yapıları.....	4
2.1.1.1 Hif.....	4
2.1.1.2. Septum.....	4
2.1.1.3. Hücre Duvarı.....	5
2.1.1.4. Vesikül.....	5
2.1.1.5. Çekirdek ve Çekirdekçik.....	6
2.1.2. Beslenme.....	6
2.1.3. Sporlar ve Üreme.....	6
2.1.4. Mantarların Üremesinde Etkili Olan Faktörler	9
2.1.5. Mantarların Büyüme Mevsimleri.....	10
2.1.6. Mantarların Temel Grupları.....	10
2.1.6.1. Chytrids.....	10
2.1.6.2. Zygomycete.....	11
2.1.6.3. Ascomycetes.....	12
2.1.6.4. Basidiomycetes	12
2.1.7. Makromantarların Tanınmasında Rol Alan Özellikler.....	15
2.1.8. Makromantarların Fiziksel Görünüşe Göre Sınıflandırılması.....	16
2.1.9. Mantarların Diğer Türlerle İlişkisi.....	18
2.1.9.1. Likenler	20
2.1.9.2. Mycorrhizea.....	20
2.1.9.3. Endofitler	20
2.1.9.4. Geri Dönüşümcü Mantarlar.....	21

2.1.10.	Mantarların İnsan Hayatına Etkileri.....	21
2.1.10.1.	Hastalıklar.....	22
2.1.10.2.	Toksinler.....	22
2.1.10.3.	Antibiyotikler.....	22
2.1.10.4.	Gastronomi.....	22
2.1.11.	Evrimsel Bağlantılar.....	23
2.1.11.1.	Trüf.....	23
2.1.11.2.	Pilobolus.....	24
2.2.	Beyaz Çürükçül Mantarlar.....	25
2.3.	Beyaz Çürükçül Mantarların Salgıladığı Ligninolitik Enzimler	27
2.3.1.	Lakkaz (EC 1.10.3.2).....	28
2.3.1.1.	Lakkaz Enziminin Yapısı.....	30
2.3.1.2.	Lakkaz Enziminin Kristal Yapısı.....	32
2.3.1.3.	Lakkaz Katalizli Reaksiyonlar.....	35
2.3.1.4.	Lakkaz Aracılı Sistemler (mediatör).....	36
2.3.1.4.1.	ABTS.....	37
2.3.1.4.2.	HBT	38
2.3.2.	Mangan Peroksidaz.....	38
2.3.2.1.	Mangan Peroksitin Kristal Yapısı.....	40
2.3.4.	Lignin Peroksidaz	41
2.3.4.1.	LiP Kristal Yapısı.....	42
2.4.	Ligninolitik Enzimlerin Kullanım Alanları.....	44
2.4.1.	Tekstil.....	45
2.4.1.1.	Ağartma.....	45
2.4.1.2.	Denim yıkama.....	45
2.4.1.3.	Kaynatma.....	46
2.4.2.	Atık Suların Renksizleştirilmesi.....	47
2.4.3.	Boya Giderimi.....	48
2.4.4.	Biyoremediasyon.....	48
2.4.5.	Kağıt Hamurundan Lignin Giderimi.....	49
2.4.6.	Biyosensör.....	49
2.4.7.	Organik Sentez.....	50
2.4.8.	Şarap ve Bira Stabilizasyonu.....	50

3.	MATERYAL VE METOD.....	51
3.1.	Kullanılan Kimyasallar.....	51
3.1.1.	Kullanılan Aletler.....	51
3.1.2.	Kullanılan Mikroorganizmalar ve Kültürün Devamlılığı.....	51
3.1.2.1.	Mikroorganizmalar.....	52
3.1.2.2.	Saf kültürün izole edilmesi.....	52
3.1.2.2.1.	Katı Besiyeri.....	52
3.1.2.2.2.	Mantarlardan alınan örnekler.....	52
3.1.2.2.3.	İnkübasyon ve Saklama Koşulları.....	53
3.1.3.	Sıvı Besiyeri.....	53
3.1.3.1.	Besiyeri İçeriği.....	53
3.1.3.2.	Besiyeri Sterilizasyonu.....	54
3.1.3.3.	pH.....	54
3.1.3.4.	Besiyerine Mantar Ekimi.....	54
3.1.3.5.	İnkübasyon Süresi.....	55
3.1.4.	Lakkaz Enziminin Aktivite Tayini.....	55
4.	SONUÇLAR.....	57
4.1.	Lakkaz Üretimi için Kültür Koşullarının Optimizasyonu.....	57
4.1.1.	Farklı Fungus Örnekleri ve Kültür İzolasyonu.....	57
4.1.1.1.	Örnek bölgeleri.....	60
4.1.1.2.	Saklama koşulları.....	61
4.1.1.3.	Katı besiyerleri.....	62
4.2.	Farklı besiyerlerinin lakkaz üretimine etkisi.....	63
4.2.1.	Besiyeri 1.....	62
4.2.2.	Besiyeri 2.....	63
5.	TARTIŞMA.....	66
	KAYNAKLAR.....	69
	ÖZGEÇMİŞ.....	83

KISALTIMA LİSTESİ

ABTS 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazoline-6-sülfonik asit)

HBT 1-hidroksibenzotriazol

LMS Lakkaz Mediatör Sistem

MnP Mangan peroksidaz

LiP Lignin peroksidaz

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Mantar hiflerinin yeraltındaki görünüşü.....	3
Şekil 2.2 Mantarların hif ve septumlarda büyüme şekli.....	4
Şekil 2.3 Uzun tüpler şeklinde olan hiflerin yapısı.....	6
Şekil 2.4 Mantarların lamellerinden yayılan sporların görüntüsü.....	7
Şekil 2.5 Sporlarını havaya püskürtebilen bir mantar.....	7
Şekil 2.6 Mantarlarda eşeyli ve eşeysiz üreme.....	8
Şekil 2.7 <i>Vaucheria sessilis</i> türü bir Chytrid mantarı.....	11
Şekil 2.7 Zygomycetelerde eşeyli üreme.....	11
Şekil 2.8 Ascomycetler A:3 tür ascii: silindirik, çomak ve küresel B: eşeyli üremenin başlangıç fazı C: keseli bir ascii'nin kesit alınmış görüntüsü.....	12
Şekil 2.9 Basidiomycetelerde hiflerdeki çekirdeklerin yeni filamentler oluşturması.....	13
Şekil 2.10 Basidiomyceteleri özel yapan basidiumlar.....	13
Şekil 2.11. Basidiomycetelerin toprağın üzerindeki farklı görünüşleri.....	14
Şekil 2.12 Peri Halkası.....	14
Şekil 2.13 Mantarlarla alglerin simbiyotik ilişkisinden oluşan Likenler.....	19
Şekil 2.14 En değerli ve mantar olan Trüf mantarı.....	23
Şekil 2.15 Patlayıcı sporlara sahip olan bir Zygomycete: <i>Pilobolus sp.</i>	24
Şekil 2.16 Lakkazın aktif bölgesindeki bakır atomlarının düzenlenişi.....	31
Şekil 2.17 Lakkaz enziminin kristal yapısı.....	33
Şekil 2.18 <i>Coprinus cinereus</i> 'dan elde edilen Cu-2 bağımlı lakkazın cupredoxin benzeri domainlerden (a) β -barrel ve (b) β -sandwich konformasyonları Ducros ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır.....	33
Şekil 2.19 <i>Coprinus cinereus</i> 'dan elde edilen Cu-2 bağımlı lakkazın kristal yapısı.....	34
Şekil 2.20 <i>Coprinus cinereus</i> kaynaklı Cu-2 bağımlı lakkazın aktif bölgesinde ligand ve bakır atomlarının koordinasyonunun top ve çubuk modeli. Bakır yeşil, kükürt sarı ve oksijen atomları kırmızıdır.....	34
Şekil 2.21 Lignindeki fenolik grupların lakkaz katalizli oksidasyonu.....	35
Şekil 2.22 Fenolik olmayan lignin bileşiklerinin bir lakkaz aracılı sistem tarafından oksidasyonu.....	36
Şekil 2.23 Lakkaz mediatör oksidasyon sisteminin katalitik döngüsü.....	37

Şekil 2.24 Mangan Peroksidazın aktif bölgeleri.....	41
Şekil 2.25 Lignin peroksidazın kristal yapısı.....	42
Şekil 4.1 HM mantarı makroskopik ve mikroskopik görüntüsü.....	57
Şekil 4.2 A1 mantarı makroskopik ve mikroskopik görüntüsü.....	58
Şekil 4.3 A2 mantarı makroskopik ve mikroskopik görüntüsü	58
Şekil 4.4 A3 mantarı makroskopik ve mikroskopik görüntüsü.....	58
Şekil 4.5 A4 mantarı makroskopik ve mikroskopik görüntüsü.....	59
Şekil 4.6 A5 mantarı makroskopik ve mikroskopik görüntüsü.....	59
Şekil 4.7 A6 mantarı makroskopik ve mikroskopik görüntüsü.....	59
Şekil 4.8 HM, A1,A2,A3 mantarlarının besiyeri 1'de inkübasyonu sonucu 8 günlük lakkaz aktivitesi.....	63
Şekil 4.9 A4,A5,A6 mantarlarının besiyeri 2'de inkübasyonu sonucu 8 günlük lakkaz aktivitesi.....	64
Şekil 4.10 A1,A4 mantarlarının besiyeri 2'de inkübasyonu sonucu 8 günlük lakkaz aktivitesi.....	65

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1	Kullanılan kimyasallar.....	51
Tablo 3.2	Sıvı besiyeri 1'in içeriği.....	53
Tablo 3.3	Sıvı besiyeri 2'nin içeriği.....	54
Tablo 4.1	Mantarlardan alınan örnek bölgelerinden elde edilen üremeler.....	61
Tablo 4.2	Mantarlardan alınan örneklerin saklama koşullarına göre elde edilen üremeler....	61
Tablo 4.3	Mantarlardan alınan örneklerin farklı katı besiyerlerinde elde edilen üremeler.....	62

TEŞEKKÜR

Bitirme tezimi hazırlarken, başından sonuna kadar bana destek veren, yardımcı olan, sonsuz bilgi ve tecrübesiyle yol gösteren çok değerli hocam **Prof. Dr. İnci ARISAN** ' a sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Daha önce yapılmış çalışmaları ile yardımlarını esirgemeyen Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyokimya Bölümü Yrd.Doç.Dr. Ali TÜRKAN ve Meltem GÖKSEL DİZGE'ye ve ayrıca mantar tanımlamaları sırasında yardımlarını esirgemeyen Mikolog Jilber BARUTÇIYAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Her zaman her konuda beni destekleyen ve yanımda olan sevgili aileme ve eşim Yusuf Ertan ÖZAN'a teşekkürlerimi sunarım.

VİLDAN AYKUT ÖZAN

ÖZET

Beyaz çürükçül mantarlar ağaçlardaki selüloz, hemiselüloz ve lignin gibi büyük molekülleri besin kaynağı olarak kullanarak indirgerler. Beyaz çürükçüller ağacı degrade eden ve ilerde zehirli kimyasalları biyodegrade edebilecek tek organizmadır. Salgıladıkları ligninaz, peroksidaz ve lakkaz gibi enzimlerle çevre kirliliğine yol açan kimyasalları gidermede kullanılırlar.

Lakkaz (E.C.1.10.3.2. p-difenol oksidaz), fenolik substratların büyük miktarlarının oksidasyonunu katalizleyen multimerik ve monomerik bakır içeren oksido-redüktaz sınıfına ait enzimdir. Orto-, para-, difenol, hidroksil ve amin grupları içeren aromatik bileşikler lakkazlar tarafından okside edilirler .

Lakkazlar bir çok uygulama alanına sahip olmakla beraber genellikle dekolorizasyon ve detoksifikasyon özelliklerinden dolayı şarap endüstrisinde fenolik bileşiklerin uzaklaştırılması, çamaşır tozu ve deterjan endüstrisinde boyar maddelerin transferi işlemlerinde kullanılır. Kağıt endüstrisi ve enzimatik dönüşümlerde de, lakkazlar uygulama alanı bulmuştur.

Çalışmada Yıldız Teknik Üniversitesi Davutpaşa kampüsünden toplanan, mangan peroksidaz ve lakkaz enzimlerini sekonder metabolit olarak üreten beyaz çürükçül funguslardan lakkaz enziminin araştırılması ve üretilmesi hedeflenmiştir.

Anahtar kelimeler: Beyaz çürükçül mantarlar, lakkaz, indüksiyon

ABSTRACT

White rot fungus degrading large molecules on wood like lignin, cellulose or hemicellulose using as food source. White rot fungus have an unique ability, that degrading wood and biodegrading poisonous chemicals. They are secreting enzymes such as ligninase, peroxidase and laccase which are used to remove chemicals which cause environmental pollution.

Laccases are catalyzing oxidation of big amounts phenolic substrats. Laccases are belonging to oxido-reductase enzyme groups which have monomeric and multimeric copper structure.

Aromatic compounds which have orto-, para-, diphenol, hidroxil and amine groups are oxidized by laccases.

Laccases have a lot of application area on industry. Laccases are in use on wine industry because of decolorization and detoxification properties and on detergent, pulp, and textile industry treatment of phenolic compounds and dye stuff.

In this study, fungus which are secreting laccase or mangan peroxidase as seconder metabolite, are collected from Yıldız Technical University Davutpaşa Campus. In this experiments we are targeting production laccase enzyme from this fungus in optimal conditions.

Keywords: White Rot Fungus, laccase , induction

1. GİRİŞ

Biyoteknoloji; insan, hayvan ve bitki hücrelerinin fonksiyonlarını anlamak ve değiştirmek amacıyla uygulanan çeşitli teknikleri ve işlemleri tanımlamak için kullanılan bir terimdir. 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 .

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 yapısındadır ve her bir enzim spesifik katalitik etkiye sahiptir. Enzimler, neredeyse insanlığın ilk zamanlarından beri dolaylı veya direkt olarak gıda üretimlerinde bakteri ve mayalar vasıtası ile kullanılmaktadır.

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 özgüllükle 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 endüstri ve atık giderme süreçlerindeki kullanımları büyük oranda artmıştır (Kirk vd., 2002).

Beyaz çürükçül mantarlar, hücre dışı ligninolitik enzim sistemleri ile çevre kirliliğine neden olan birçok yıkımı güç organik bileşikleri indirgeyebilmektedir. Son zamanlarda endüstriyel uygulamalarda, özellikle tekstil endüstrisinde, boyar maddelerin renk gideriminde yer alan üç fonksiyonel enzimin lignin peroksidaz, mangan peroksidaz ve lakkazdır (Beilen vd., 2002).

Lakkazlar bir çok uygulama alanına sahip olmakla beraber genellikle dekolorizasyon ve detoksifikasyon özelliklerinden dolayı şarap endüstrisinde fenolik bileşiklerin uzaklaştırılması, çamaşır tozu ve deterjan endüstrisinde boyarmaddelerin transferi işlemlerinde kullanılır. Kağıt endüstrisi ve enzimatik dönüşümlerde de, lakkazlar uygulama alanı bulmuştur. Lakkazlar, mikroorganizmalar özellikle mantarlar tarafından üretilmektedir.

Boyarmadde içeren tekstil endüstrisi atıksularından renk giderim prosesleri ekolojik açıdan önem kazanmaktadır. Tekstil endüstrileri, yaş dokuma prosesleri için çok miktarda su ve kimyasal tüketmektedirler. Alıcı sulara verilen renkli atıksular su ortamındaki ışık geçirgenliğini azaltır ve fotosentetik aktiviteyi olumsuz yönde etkiler. Boyar maddelerin klor içermeden uzaklaştırılmalarında da beyaz çürükçüller tercih edilmektedir.

Siyanür metal çıkarmada (altın gibi), fotoğraf basımında, sentetik fiber yapımında, organik kimyasalların elde edilmesinde ve çelik yapımında büyük miktarlarda üretilmektedir. Siyanürün çevreye zarar vermeden uzaklaştırılmasında beyaz ve kahverengi çürükçül mantarlar önemli bir rol üstlenmektedirler (Thurston, 1994).

2. MANTARLAR

Dünyanın en büyük organizması insanlar tarafından genellikle büyük beyaz balina olarak bilinse de, dünya rekorunun sahibi 'bal mantarı' olarak bilinen '*Armillaria ostoyae*'dir. Kapladığı alan yaklaşık 800.000 metrekaredir. Bu büyük cüssesine rağmen onu görebilen pek yoktur çünkü toprağın altında bulunur. Devasa yapısını toprağın üzerinde kahverengi mantarlar yaratarak kanıtlar.

Mantar, rizomorf adı veriler uzun ve ipliksi yapısını sadece yüzeye değil, tüm alana yayar. Ve bu rizomorflar, yaşayabilecekleri bir ağaç gövdesi bulana kadar genişlerler ve bu ağaç gövdesinden beslenerek onu zayıflatır veya öldürürler. Çürümüş ve ölmüş ağaç gövdeleri bu mantarın yerüstündeki kanıtıdır.



Şekil 2.1 Mantar hiflerinin yeraltındaki görünüşü (Audesirk vd., 2008)

Araştırmacılar için bu mantarın tek bir oluşum olduğunun en büyük kanıtı genetikdir. Araştırmacılar tarafından *Armillaria*'nın bireysel olarak yayıldığını tahmin ettikleri geniş alanın farklı yerlerinden örnekler alınıp, DNA'larının karşılaştırılması sonucunda hepsinin genetik olarak aynı olduğu görülmüştür (Audesirk vd., 2008).

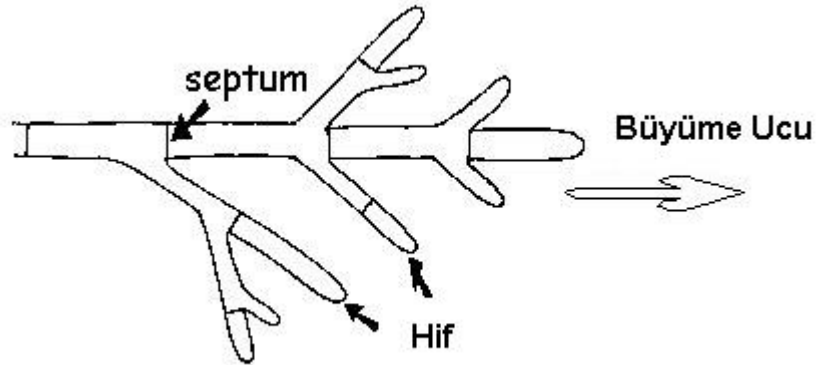
2.1. Mantarların Genel Özellikleri

2.1.1. Hücresel Yapıları

2.1.1.1. Hif

Fungus yapıları ince uzun iplikçiklerden oluşur. Hemen bütün mantarların gövdeleri miselyumlardan oluşmuştur. Miselyumlar ise hif denilen bir hücre kalınlığında ipliksi filamentlerden oluşur.

Funguslar hareket edemez. Fakat bu eksikliklerini hifleri sayesinde hızlıca büyüüp herhangi bir yönde uygun bir ortam bulana kadar hareket ederek kapatırlar. Bu şekilde, mantarların miselyumları bir ekmek, peynir, ağaç gövdesi veya toprağın içine hızlıca kaynaşabilir. Bu yapılar mantar, küf şeklinde dondurulmamış yiyeceklerde, görünür biçimde bulunur ve görebildiğimiz mantarın sadece bir kısmıdır (Audesirk vd., 2008).



Şekil 2.2 Mantarların hif ve septumlarda büyüme şekli (Arda, 2000)

2.1.1.2. Septum

Septum oluşumu genetik bir karakter olup hücre duvarının iç kısmından orjin 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 (Arda, 2000). Septumlar bölümler arasındaki turgor basıncına yapısal destek olarak hiflerin rijitliğini artırır. Septumlar arasındaki delikler sitoplazmanın hücreler arasında besin taşımak için geçişine izin verir (Audesirk vd., 2008)

Yapılan elektron mikroskop incelemelerinde iki tür septumun varlığı belirlenmiştir; Birincil septum, genellikle ascomycetes ve deutromycetes sınıfına ait fungus türlerinde bulunmaktadır. Bu septumun ortasında yakın yerde 0.005-0,5 mikrometre çapında tek bir por bulunmaktadır ve bu por gerektiğinde kapanabilmektedir. İkincil septum, basidiomycetes sınıfına ait funguslarda ve gelişmenin bazı aşamalarında rastlanmaktadır. Bu türde septumun ortasında çok dar bir delik vardır. Etrafı amorf ve kabarık bir zarla çevrilidir.

Septumun fonksiyonları;

-yapısal destek

-hifalar zarar gördüğünde ilk savunma alanı olması

-funguslar arasında farklılaşmaya yardımcı olmasıdır (Arda, 2000).

2.1.1.3. Hücre Duvarı

Genel olarak hücre duvarı, karbonhidrat, protein, yağlar ve çok çeşitli polisakkaritlerle birlikte bağlanmış fibril (lifsi) materyallerden oluşur. Fibrilerin materyali oldukça inert olmasına karşın içerdiği materyaller zamanla değişebilir. Bu fonksiyonel bileşenler besin taşınması, iletişim, substratlara karşı geçirgen olmaması ve hücre duvarı modifikasyonları için oldukça önemlidir (Carlile vd., 2000).

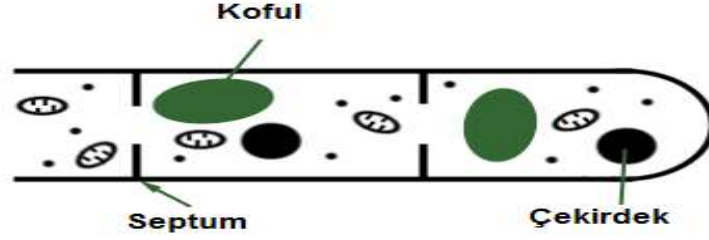
Hücre duvarının fibril özelliğini kitin ve selüloz verir. Bunlar, N-asetilglukozamin ve glikoz polimerlerinin β -1,4 tarzında birleşmesinden meydana gelmiş düz zincirlerdir (Arda, 2000).

2.1.1.4. Vesikül

Büyümekte olan hifler vesikül açısından oldukça zengindir. Vesiküllerin içinde, hücre duvarının sentezinde ve aynı zamanda, lizisinde görevli olan enzimler, inorganik elementler, polisakkaritler, lipitler bulunur ve bunları büyümekte olan hücre duvarı bölgesine taşırlar (Arda, 2000).

2.1.1.5. Çekirdek ve Çekirdekçik

Mantar hücrelerinde, çekirdekler genellikle küçüktürler. Her hücrede bir tane çekirdek olmasına karşın çok genç ve çabuk üreyen hiflerde bazen birden çok çekirdeğe rastlanabilmektedir (Arda, 2000).



Şekil 2.3 Uzun tüpler şeklinde olan hiflerin yapısı (scienceaid.co.uk)

2.1.2. Beslenme

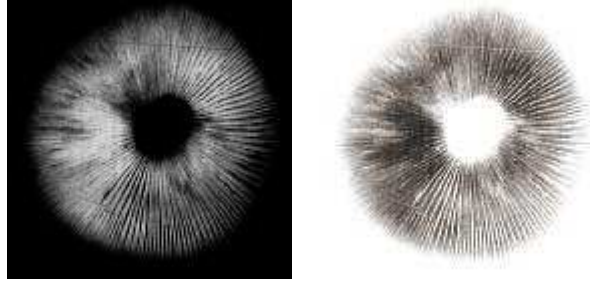
Mantarlar yaşamlarını diğer organizmaların çeşitli şekillerde yıkımını sağlayarak sürdürürler. Bazı mantarlar ölü organizmaların gövdelerini sindirir. Bazıları parazitik olarak yaşarlar ve organizmanın hastalanmasına sebep olurlar. Bazıları ise karşılıklı yararlanma şeklinde diğer organizma ile birlikte yaşarlar.

Hayvanlardan farklı olarak mantarlar yemek yemezler. Mantarlar kompleks molekülleri absorbe edilebilecek şekilde yan ürünlere yıkan enzimler salgırlar ve bu şekilde yiyeceklerini sindirirler. Fungal filamentler, çok ince yapıları sayesinde besinin kaynağına kadar işleyip enzim salgılamak ve besinleri absorbe etmek için uygun ortamı yaratırlar. Hemen hemen her biyolojik materyal bir mantar tarafından parçalanabilir bu yüzden mantarların besin desteği yakın karasal habitatlarında onlara sunulur (Audesirk vd., 2008).

2.1.3. Sporlar ve Üreme

Bitki ve hayvanlardan farklı olarak mantarlar embriyo oluşturmaz. Kendi ürettikleri çok küçük, hafif, yeniden üretilebilir, ve etrafa kolayca yayılabilen sporlar sayesinde ürerler (Şekil 2.4). Sporlar bir otostopçu gibi hareket eden organizmaların gövdelerinde ve sindirim

sistemlerinde hareket edip farklı bölgelerde tekrar üreyebilirler. Hatta bazı mantarlar sporlarını özel bir itici güç sayesinde ileri doğru püskürtebilirler (Şekil 2.5). Mantarların çok büyük miktarlarda spor üretmeleri ve sporlarının heryere taşınabilmesi onlara karasal alanda sık rastlanılmasını sağlar (Audesirk vd., 2008).



Şekil 2.4 Mantarların lamellerinden yayılan sporların görüntüsü (bahcenet.com)

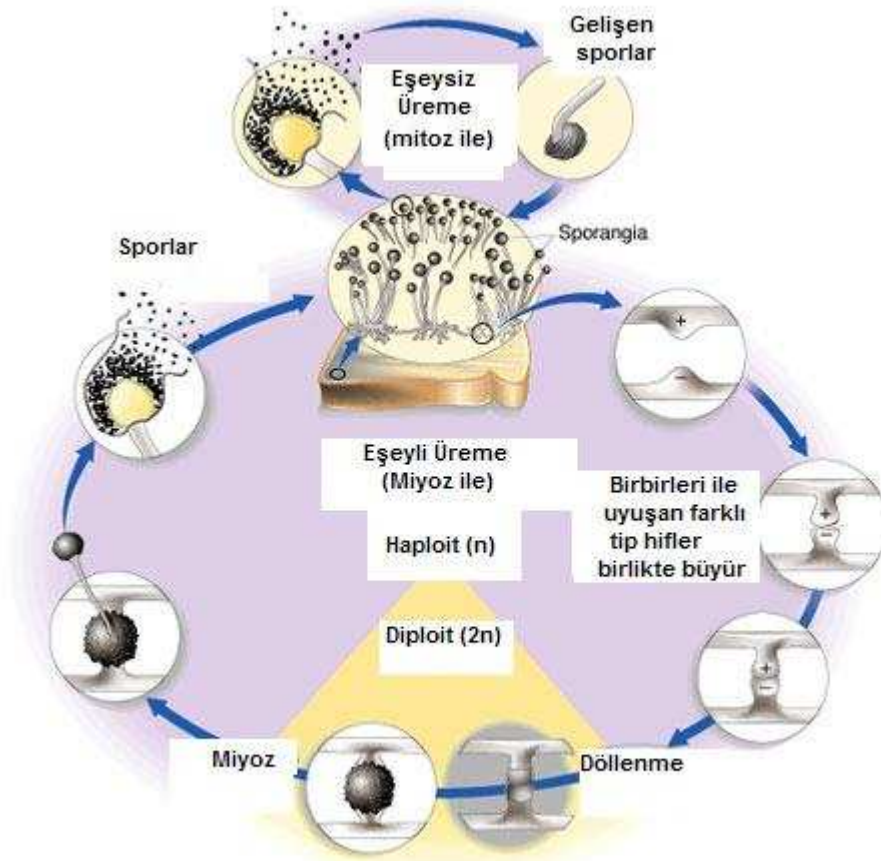


Şekil 2.5 Sporlarını havaya püskürtebilen bir mantar (simonboothphtpgraphy.com)

Birçok mantar eşeyli ve eşeysiz üreyebilir. Stabil koşullar altında mantarlar genelde eşeysiz ürerler fakat çevre koşullarının değişikliğinden dolayı eşeyli üreme de oluşabilir.

Eşeysiz üremede haploit sporlar mitoz ile oluşur. Mantarın gövdesi ve sporları haploittir. Bir haploit miselyum mitoz bölünme ile haploit eşeysiz sporlar oluşturur.

Eğer eşeysiz bir spor uygun bir ortamda bulunuyorsa mitoz bölünme yaşar ve yeni bir miselyuma bölünür. Ve bu kolay ve hızlı dönüşüm orjinal miselyum ile genetik olarak kopya miselyumlar oluşturur (Audesirk vd., 2008).



Şekil 2.6 Mantarlarda eşeyli ve eşeysiz üreme (dwm.ks.edu.tw)

Eşeyli üremede haploit sporlar miyoz ile oluşur. Mantarların üreme çemberinin sadece bir bölümünde diploit yapılar bulunur. Eşeyli üremede bir miselyumun filamentleri uygun başka bir tip miselyumun filamentleriyle etkileşime girer. Ve şartlar elverişli ise iki hif birleşir ve iki hifin

çekirdekleri ortak bir hücreyi paylaşır. Bu iki hifin füzyon ile birleşmesi ile iki farklı haploit hücre bir diploit zigot oluşturur. Ve zigot miyoz bölünme ile haploit eşeyli spora dönüşür. Bu sporlar mitozla bölünüp, filizlenip, yayılıp yeni haploit miselyumlar oluşturur. Yeni oluşan mantarın gövdesi ise kendini oluşturan her iki mantarın da özelliklerini taşır (Audesirk vd., 2008).

2.1.4. Mantarların Üremesinde Etkili Olan Faktörler

Nem mantarların üremelerinde çok önemli faktörlerden birini oluşturmaktadır. Yüksek orandaki nem, genellikle, üreme üzerine olumlu etkide bulunur. Rutubet azaldıkça, mantarların çoğalmaları da sınırlanmaya başlar. Mantarların neme olan gereksinimleri, türler arasında değişiklik gösterir. Bazı mantar türleri relatif nemi %10-15 arasında bulunan ortamlarda veya suyu çok azalmış olan kuru tanelerde üreme yeteneğine sahiptirler. Patojenik mantarların, özellikle, dermatofitlerin insan veya hayvan vücutlarında yerleşebilmesi ve hatta hastalık oluşturabilmesi için nem yine önemli bir faktördür. Eğer deri, su ile ıslanmış ise, mantarların yerleşmesi ve üremesi daha kolay olmaktadır.

Mantarların üreme ısısı limitleri oldukça geniştir ve türler arasında farklar gösterir. Bu sınırlar, 0°C ile 60°C arasında değişebilmektedir. Hifalar maksimal ısı limitinin dışında kolayca ölmelerine karşılık, sporları yüksek ısıya ve değişik çevre koşullarına çok fazla dayanıklılık gösterirler. Buzdolabı ısısında üreyebilen ve gıdaların bozulmasına neden olan mantarlara her zaman rastlamak mümkündür. Çok fazla soğuk, mantarların muhafazasında kullanılmaktadır. Sıfırın altında 195°C'de mantarlar uzun süre canlı kalabilirler (Arda, 2000; Audesirk vd., 2008).

Mantarlar, genellikle, aerobik karakter taşırlar ve oksijenin bulunduğu ortamlarda gelişirler ve ürerler. Bu nedenle, havada bulunduğu miktar (veya oran) kadar oksijen, üreme için gereklidir. Patojenik mantarlardan, Actinomyces bazı türleri hariç olmak üzere, diğerleri aerobik koşullarda ürerler. Oksijenin azlığı veya mikroaerofilik koşullar üremeyi ve gelişmeyi sınırlar.

Mantarların üremeleri için ışık, gereksinme duyulan önemli bir faktör değildir. Işık olmadan da kolayca gelişebilirler. Patojenik mantarlar da direkt ışık olmadan üreyebilme yeteneğine sahiptirler. Direkt güneş ışınları, üremeyi ve gelişmeyi sınırlar (Audesirk vd., 2008) .

2.1.5. Mantarların Büyüme Mevsimleri

Mantarlar büyümek ve üreme organı oluşturmak için, uygun bir yetişme yerine, iklime ve bilhassa rutubet derecesine ihtiyaç gösterirler. Birçok mantar türü bütün bir yıl boyunca görülebilir, fakat ekseriyetle lamelli mantarlar ve Boletuslar sonbaharda ortaya çıkar. Ilık hava halleri, üreme organlarının oluşturulması için en iyi şartlardır.

Kurak yazlardan sonra mantarlar hiç görünmeyebilir veya rutubetin artmasıyla birlikte Eylülde ortaya çıkabilir.

İlkbaharda en erken çıkan mantarlar Morchella'lardır. Yaz boyunca Agaricus'lar, Russula'lar, Boletus'lar ve diğer yenilen mantarlar sıra ile ortaya çıkarlar. Birçok türler yumuşak geçen kışlarda gelişmelerini devam ettirebilirler, böyle kışlarda yemeklik mantar toplanabilir. Ancak yenilebilen bir çok mantar türü kısa bir büyüme mevsimine sahiptir (Audesirk vd., 2008)

2.1.6. Mantarların Temel Grupları

Çok hücreli ökaryotlar arasında hayvanlar ve mantarlar alemleri bitki alemine göre birbirleriyle daha yakın ilişkilidir. Mantarlar çok çeşitlidir. Yaklaşık 100.000 tür mantar tanımlanmıştır fakat her sene yeni mantar türleri keşfedilip tanımlanmaktadır ve mikolojistler tanımlanamayan mantar türlerinin 1 milyonun üzerinde olduğunu söylemektedirler. Mantar türleri dört ana dala ayrılır; Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota (Audesirk vd., 2008).

2.1.6.1. Chytrids

Diğer mantarlardan farklı olarak chytridler suda yaşarlar. Su sayesinde yüzen sporlarını etrafa yayabilirler. Bir chytrid sporu ucundaki tek kamçı sayesinde kendini iterek suya fırlatabilir. Başka hiçbir mantar grubunda kamçı yoktur. Mantar sistemiği araştırıldığında bu grubun diğer mantar gruplarından daha eski olduğu anlaşılmıştır. Bir kayada bulunan en eski mantar fosilinin (600 milyon yaşında) bir chytride ait olması da bu sonucu destekler.

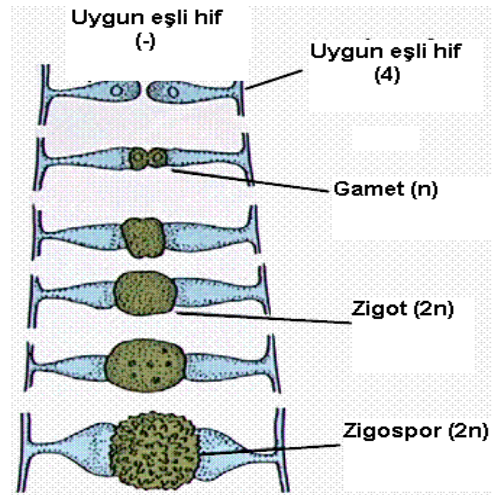


Şekil 2.7 *Vaucheria sessilis* türü bir Chytrid mantarı (cartage.org)

Geçmiş zamanlara ait mantarların, bugünkü habitatlarıyla benzerlik göstermeleri muhtemeldir ve muhtemelen hayvan ve bitkilerdeki gibi karadaki kolonileşmelerinin temeli daha önce suda atılmıştır . Birçok chytrid türü ölü su bitkileriyle veya su atıkları ile beslenir, fakat bazıları hayvanlarda ve bitkilerde parazit olarak yaşarlar. Bir parazit chytrid türünün dünya çapında kurbağaların ölümüne sebep olduğuna inanılmaktadır, ve birçoğunun da bazı türleri tehdit ettiği ve neslinin tükenmesine sebep olduğu bilinmektedir (Audesirk vd., 2008).

2.1.6.2. Zygomycete

Zygomyceteler genellikle toprakta veya çürüyen hayvan veya bitki materyallerinde yaşar. Bu grup meyve çürükçülü ve ekmek küfüne neden olan *Rhizopus* cinsine ait türler içerir. Zigot mantardaki eşeysiz üreme sporangia adı verilen siyah spor keselerinde haploit sporların oluşmasıyla başlar. Bu sporlar havaya yayılır ve uygun bir ortamda bulunduğu yeni haploit hifler filizlenir (Audesirk vd., 2008).



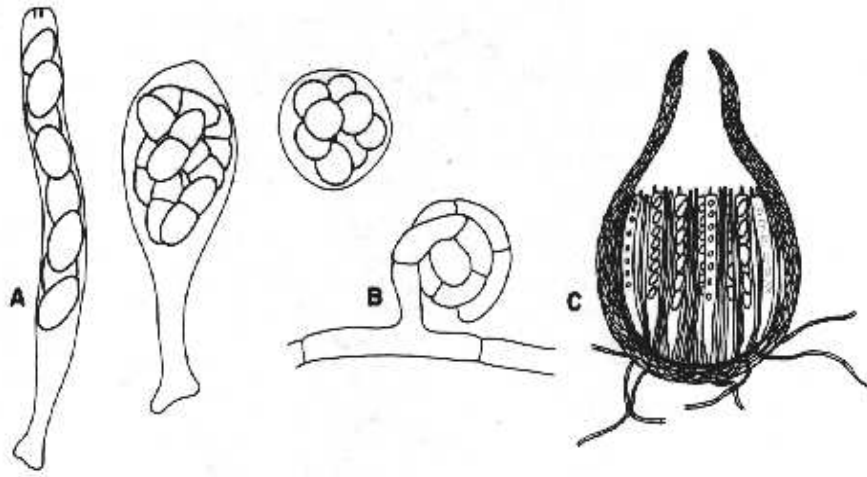
Şekil 2.7 Zygomycetelerde eşeyli üreme (cartage.org)

Eğer iki farklı türe ait iki hif temas kurarsa, eşeyli üreme oluşabilir. İki hif eşeyli olarak çiftleştiğinde çekirdekleri diploit zigosporeler oluşturmak için birleşir. Zigosporeler uzun periyotlar boyunca uygun ortam bulunana kadar beklemeye müsaittirler.

Zigosporeler de eşeysiz üremiş sporeler gibi, yayılır ve filizlenir, fakat direkt yeni hif oluşturmak yerine mitoz bölünme yaşarlar. Sonuç olarak, yeni hiflere gelişen haploit sporeler içeren yapılar oluştururlar (Audesirk vd., 2008).

2.1.6.3. Ascomycetes

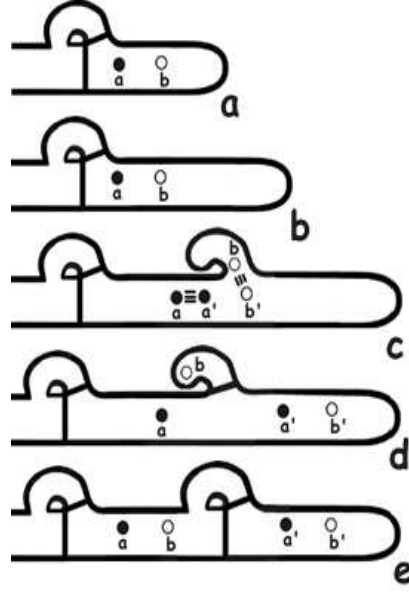
Ascomycetes veya keseli mantarlar eşeyli ve eşeysiz üreyebilirler. Keseli mantarların eşeysiz sporeleri özelleştirilmiş hifler tarafından üretilir. Eşeyli üreme esnasında sporeler iki farklı hifin birleşmesiyle kompleks olaylar zinciriyle üretilir. Bu olaylar 'ascu'nun oluşmasıyla sonlanır. Bu dala adını veren keseli yapılar birçok spor içerirler. Bazı ascomycetler çürümüş orman meyvelerinde yaşarlar. Bu dal depolanmış yiyeceklere saldıran meyvelere ve tohumlara zarar veren, ayrıca ilk antibiyotik olan penisilin de üreten değişik küfler içerir (Audesirk vd., 2008).



Şekil 2.8 Ascomycetler A:3 tür ascu: silindirik, çomak ve küresel B: eşeyli üremenin başlangıç fazı C: keseli bir ascu'nun kesit alınmış görüntüsü (website.nbm-mnb.ca)

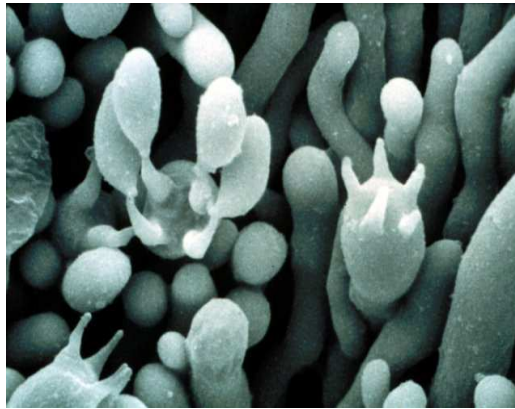
2.1.6.4. Basidiomycetes

Basidiomycetes toplu formlardaki yapılarla (club fungi) ürerler. Bu dala ait türler tipik olarak eşeyli ürerler, iki farklı türe ait hifler her hücresinde iki çekirdek içeren filamentler oluşturmak için birleşirler.



Şekil 2.9 Basidiomycetelerde hiflerdeki çekirdeklerin yeni filamentler oluşturması (Carlile ve Watkinson., 2000)

Özelleştirilmiş oluşuma kadar birleşmeyen çekirdekten, basidia adı verilen diploit hücreler oluşur. Basidialar miyoz bölünme ile, çoğalabilen haploit basidiosporlara sebep olurlar.



Şekil 2.10 Basidiomyceteleri özel yapan basidiumlar (Audesirk vd., 2008)

Basidia ve basidiospor oluşumları mantarlar kadar tanınmış bitki gövdelerinde (puffballs,shelf fungi, stinkhorns) yer alırlar. Üreme için uygun şartlara sahip dev yer altı miselyumlarından yoğun hifli olan kısımlar bu çoğalabilir yapıları oluşturur.



Şekil 2.11. Basidiomycetelerin toprağın üzerindeki farklı görünüüşleri (fig.cox.miami.edu)

Mantarların görünen bölümünün altında basidiaların oluştuğu yapraksı kısım vardır. Toprağa düşen bir basidiospor filizlenip, haploit bir hif oluşturur. Bu hif dışarıya doğru, daha önce orada ölmüş bir hifin etrafında kabaca çembersi bir yapı oluşturur. Toprak altındaki yapı periyodik olarak çeşitli sayılarda çembersi bir desen oluşturacak şekilde mantar üretir. Buna Peri Halkası denir. Bu halkanın çapı mantarın yaşı ile doğru orantılıdır. Bazı peri halkaları 700 yaşındadır ve basidiomycet miselleri bundan daha da yaşlı olabilir (Audesirk vd., 2008).



Şekil 2.12 Peri Halkası (web.utk.edu)

2.1.7. Makromantarların Tanınmasında Rol Alan Özellikler

Şapkanın şekli: Esas olarak dört biçim söz konusudur. Kubbe,düz,çan,huni. Ayrıca kremit biçimi, dalgalı, ortası çökük vb. gibi çok değişik biçimler de bulunur.

Lamellerin konumu: Ayrıca lamellerin sık yada seyrek oluşu, mantar şapkasının uçlarından taşmaları, uçlarının düz yada çatalı oluşu, renkleri, kalınlıkları, kırılğan yada balmumu gibi oluşları vb. de mantarların cins ve türlerini belirlemede yardımcı olmaktadır.

Mantar ayağındaki halka veya çorap: Mantar yumrusunu çevreleyen bir dış zar bulunur. Mantarın boyutlarının büyümesiyle bu zar bir süre sonra parçalanmaktadır. İşte bu zarların parçalanması sonucunda bir kısım zar artıkları yok olmayıp, şapka üzerinde yada kenarlarında saçak şeklinde, ayak uçlarında yada çevresinde kase yada çorap olarak, ayak çevresinde ise yüzük yada kemer biçiminde kalmayı sürdürürler.

Mantar Sapının Gevrekliği: Mantarların dokusal yapısı, uzunlamasına lifcikler şeklindedir. Herhangi bir mantarın sapını -kurumuş durumda değil ise- ortadan kırdığımızda şekilde görüldüğü gibi boylamasına liflerle karşılaşırız. Ancak bu durumun iki istisnası bulunmaktadır. Russula ve Lactarius türü mantarlarda yapı lifli değil gevrek olduğundan, bunlar kırılıp parçalanırlar.

Mantar şapkasının sap ile bağlantısı: 2 gruba ayrılırlar.Şapka ile ayak birbirinden kolayca ayrılabilir, Şapka ile ayak birbirine sıkıca bağlıdır. Lamellerin bitişik yada inişli olduğu mantarlarda, şapka ile ayak üst üste çakışmışlardır, dolayısıyla onları birbirlerinden ayırmak oldukça zor yada imkansızdır.

Mantarın rengi: Renk özelliği genetik bir karakterdir, ancak mantarın yaşlılığı ve nemliliği de renk üzerinde önemli rol oynarlar.Bazı türler neme karşı çok daha hassastır ve nemlilik arttıkça renkleri koyulaşırken, nemliliğin azalmasıyla renkleri de açılır. Bazı mantarların renkleri de, örneğin Russula türleri, suda çözülen renk maddeleri içerdiklerinden, yağışlı havalarda, suyla birlikte akıp gider.

Mantarın kokusu: Mantarın kokusu, en iyi şapkasının altından alınır. Bazı kokular ancak mantarı kırdığımızda hissedilir, bazıları ise çok ucucudurlar. Bu nedenle mantarı kırar kırmaz koklamak en doğru yöntemdir.

Mantarın tadı: Mantarın tadının -mantar pişirilmeden yenmeyeceği için- çig durumda hiçbir anlamı yoktur. Ayrıca zehirli mantarları tadarak tanımak da olanaksızdır. Biliniyor ki pek çok zehirli mantarın tadı oldukça lezizdir.

Mantar sporlarının rengi: Genel olarak mantarın gelişmesinin başlangıç evresinde, mantarın sporları oluşmadığı için, genç mantarları bu yoldan tanımak olanaklı değildir. Mantar gelişip sporlar olgunlaştığı zaman, sporlar şapkanın alt yüzüne renklerinin damgasını vururlar.

Bir mantarın türünü belirlemede, başka özellikler de önemli rol oynarlar.

Sap ile şapkanın görelî bağlantı biçimi: Merkezi, eksantrik veya yandan bağılı.

Büyüme biçimi: Tek tek, deste biçiminde, gruplar halinde, öbek öbek vb .
(wb332306.bahnhofbredband.se).

2.1.8. Makromantarların Fiziksel Görünüşe Göre Sınıflandırılması

Büyük mantarların gövdesi, genel olarak bir sap ve şapkadan oluşmaktadır. Ancak tüm büyük mantarlar böyle şapkalı değildirler. Bazan da sap olarak tanımlanabilecek bir kısım olmayabilir. Mantarların sporları şapka denilen bölümde, humenium içinde oluşurlar. Humeniumun biçimine göre mantarlar gruplandırılabilir.

Aşağıdaki şema genel geçerliliğe göre, humeniumun fiziksel görünüşü göz önüne alınarak yapılmıştır.

Humeniumun Görünüşü:

- Lamelli
 - Şapka sapa sıkıca bağılı.
 - Sporları beyaz-yada açık renkli
 - Sapları kırılğan
 - Mantarın kesilen yüzeylerinden sıvı çıkıyor. *Lactarius* türleri.
 - Kesiklerde süt yok *Russula* türleri
 - Sap etleri lifli.
 - Lamelleri balmumu yapısında. *Hygrocybe* türleri

- Sert etli, lamelleri çentikli. *Tricholoma* türleri
- Sapta yüzükler var, lameller inişli. *Armillaria mellea*
- Lameller inişli. *Clitocybe* türleri
- Sapları kıkırdak yapılı. *Collybia* vb. türleri
- Mantarın tümü kıkırdak yapılı. *Marasmius* türleri
- Sapları eksantrik yada hiç yok. *Plerotus* vb. türleri
- Küçük konik mantarlar, lamelleri inişli. *Omphalina* türleri
- Küçük çan biçiminde, radyal çizgili şapkalar. *Mycena* türleri.
- Sporları kahverengi
 - İç zar örümcek ağı yapısında. Genel olarak şapka kenarında ve ayakların yukarı kısımlarında saçak (püskül) şeklinde kahverengi zar kalıntıları bulunur. *Cortinarius* türleri.
 - Şapkaların üstü iplik iplik *Inocybe* türleri.
 - Değişik türlerde küçük kahverengimsi mantarlar.
- Sporları kırmızı
 - Un kokulu mantarlar, lamelleri inişli. *Clitopilus* türleri.
 - Diğer kırmızı lamelliler. *Entoloma* türleri.
- Sporları siyah
 - Ayakları yüzüklü. Lamelleri bitişik. *Stropharia* türleri.
 - Şapka kenarı ile ayak arasında bir örtü bulunuyor. *Hypholoma* türleri.
- Şapka ile sap birbirinden kolaylıkla ayrılabilir.
 - Ayak uçları kase yada çorap içerisinde.
 - Beyaz sporlu.
 - Ayakları yüzüklü. *Amanita* türleri.
 - Ayakları yüzüksüz. Bunlar yüzüksüz *Amanita* türleridir.
 - Kırmızı sporlu. Yüzüğü yok. *Volvariella* türleri.
 - Ayakları çıplak.
 - Beyaz sporlu.
 - Ayaklarında yüzük var. *Macrolepiota procera* (Turna bacağı)
 - Kırmızı sporlu. Ayakları yüzüksüz. *Pluteus* türleri

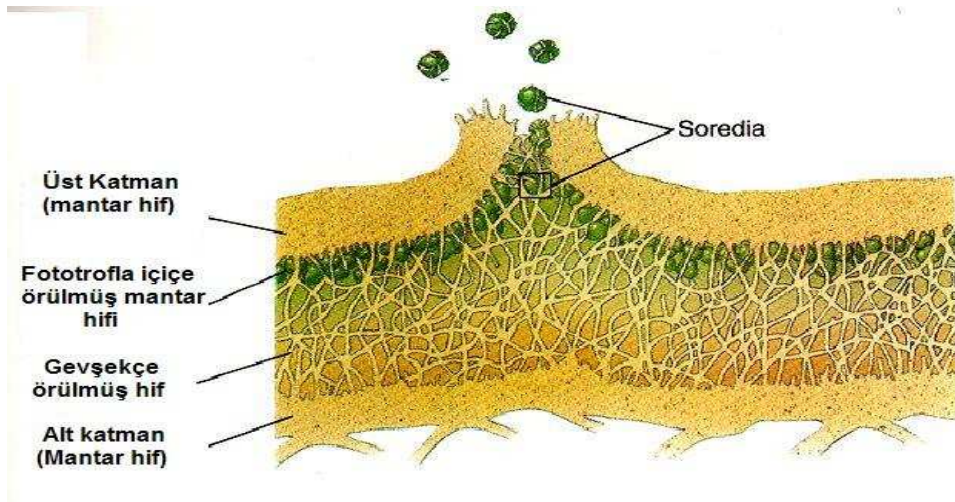
- Ayaklar yüzüklü. *Agaricus* (Champignon) türleri.
- Ayaklarda yüzük yok. *Coprinus* (mürekkep mantarı) türleri,
- Yivli
 - *Cantharellus* türleri. (Horoz mantarı vb)
- Damarlı
 - *Craterellus* (Siyah huni mantarı)
- Dikenli
 - *Hydnum repandum* vb.
- Borulu
 - Borulu (Süngerimsi). Gelişkinlerde borular şapka etinden ayrılabilir.
 - Borucuklar çok kısa, gözenek şeklinde ve şapka etinden ayrılamıyor.
- Parmak biçimi
 - Dallı, budaklı parmak şeklinde. *Ramaria formosa* (saçaklı) vb.
- Diğer biçimler. Bu mantarların ortak özelliği karın mantarları olmalarıdır. Yani bunlarda sporlar, değişik biçimde olmakla birlikte, gövdenin içerisinde oluşurlar. Olgunlaştıktan sonra herhangi bir yolla gövdeden dışarı atılırlar.
 - Basidie tipi olanlar
 - Duman mantarları. *Lycoperdon* türleri vb
 - Yumurta mantarları. *Bovista* türleri.
 - Pis kokulu mantarlar. *Phallus impudicus* vb.
 - Karnıbahar mantarı. *Sparassis crispa*
 - Spor kesesi tipli olanlar
 - Beyin mantarları. *Cıvık mantar*
 - Yer mantarları. *Domalan*
 - Kase mantarları. *Yeryaran*

2.1.9. Mantarların Diğer Türlerle İlişkisi

Birçok mantar diğer türlerle uzun periyotlarda direkt olarak ilişki içinde bulunurlar. Bu ilişkiye simbiyotik denir. Simbiyotik ilişkiye sahip birçok mantar konuğuna zarar verir ama karşılıklı yarar sağlayan ilişkilerde mevcuttur.

2.1.9.1. Likenler

Likenler, mantarlar ve tekhücreli alglerle simbiyotik ilişki içindedir. Bu ilişkideki fotosentetik üye güneş enerjisini kullanarak kendi besinini yani basit şekerleri üretir, ama bazı varolan besinler mantar tarafından tüketilir. Aslında fotosentetik ürünün %90'ını mantar tüketir ve araştırmacılar bu simbiyotik ilişkinin aslında daha çok tek yönlü bir ilişki olduğunu belirtirler. Algli simbiyotlar içeren likenlerde, mantar hifleri bitkileri parazite ettikleri gibi alglerin hücre duvarlarını penetre etmeleri bu görüşü destekler.



Şekil 2.13 Mantarlarla alglerin simbiyotik ilişkisinden oluşan Likenler(Audesirk vd., 2008)

Binden fazla mantar türü, çok az sayıda alg ve bakteri türü ile birleşerek likenleri oluşturur. Bununla beraber, likenler yeni oluşan volkanik adalarda yaşayabilen ilk canlı kolonileridir. Likenler çöl veya Arctic gibi değişik habitatlarda ve hatta boş bir kayada yaşayabilirler. Bunun yanında likenler bazı ortamlarda çok yavaş büyürler (1000 yılda 1 veya 2 inç). Yavaş büyümelerinin yanı sıra uzun zaman periyotları süresinde canlı kalabilirler (4000 yıl) (Audesirk vd., 2008).

2.1.9.2. Mycorrhizea

Mycorrhizea, mantarlar ve bitki kökleri arasındaki önemli bir ortaklıktır. 5000'den fazla mycorrhizea mantar türü çoğunluğunu ağaçların oluşturduğu kökü olan bitki türlerinin %80'i ile yakın ilişki içinde büyür. Mycorrhizal mantar hifleri bitki köklerini çevreler ve kök hücrelerini istila eder.

Mycorrhizea bitkilerin beslenmesine yardımcı olur. Bitkiler ve mycorrhizeler arasındaki ilişki iki taraflı yarar sağlar. Mantar bitkinin fotosentez ürünü olan ve kökleri sayesinde kendine ulaşan enerji zengini şeker moleküllerini kullanır. Ve mantar topraktan aldığı mineralleri ve organik besinleri absorblar, sindirir ve bitki kökünün hücrelerine iletir. Araştırmalar, bitkiye mantar tarafından iletilen fosfor ve azotun bitki gelişimde anahtar elementler olduğunu gösterir. Ayrıca mantar topraktan suyu absorblayıp bitkiye iletir ki bu kuru ortamlarda yaşayan bitkiler için bir avantajdır (Audesirk vd., 2008).

Mycorrhizea ve bitkiler arasındaki ilişki tüm dünyadaki bitkilerin sağlığı için kritik önem taşır. Mycorrhizelerin varlığı dünya bitkilerinin genel üretkenliğini ve hayvanları ve onlara bağlı yaşayan diğer organizmaları destekleme yeteneğini artırır.

Mycorrhizea bitkilerin yeryüzünde yayılmasına yardımcı olur. Bazı bilimadamları mychorrhizal ilişkilerin, bitkilerin 4000 yıldan beri dünya üzerinde yayılmasında önemli rol oynadığına inanır. Fosil kayıtları da bu hipotezi destekler. En yaşlı karasal mantar fosili ile en yaşlı karasal bitki fosillerinin aşşağı yukarı 460 milyon yıllıktır. Bu bulgu mantar ve bitkilerin karaya aynı zamanda hatta belki de birlikte geldiklerini öngörür (Audesirk vd., 2008).

2.1.9.3. Endofitler

Bitki ve mantarlar arasındaki yakın ilişki sadece köklerle sınırlı değildir. Mantarlar ayrıca hemen hertürlü bitki türünün toprağın üzerinde kalan dokularının içlerinde de yaşayabilir. Endofitler bitki gövde veya yapraklarının içinde yaşayan mantarlardır. Bu endofitlerden bazıları bitki hastalıklarına neden olan parazitlerdir, ama büyük çoğunluğu ise bitkiye yarar sağlar. Yararlı mantar endofitleri ile ilgili en iyi örnek bir çok çimen türünün yapraklarının içinde yaşayan ascomycet türleridir. Bu mantar zararlı böceklere ve otlayan memelilere karşı tadı güzel olmayan veya toksik maddeler üretir ve çimeni korur. Tarımla ilgilenen bilim adamları endofit mantarların ürettiği bu korumaya karşılık endofit içermeden büyüeyebilen çimen üretmek için çalışmaktadırlar. At, inek ve tarımsal olarak önemli otlayıcılar endofit içeren çimleri yemeye meyillidirler ve yiyebilecek tek besinin endofit içeren çimen olduğu durumlarda, bunu yiyen hayvanlarda zayıf bağışıklık sistemi ve yavaş büyüme gibi sorunlarla karşılaşmaktadır.

2.1.9.4. Geri Dönüşümcü Mantarlar

Mycorrhizea ve endofitler gibi bazı mantarlar bitki dokularının büyümesinde, korunmasında ve yıkımında önemli rol oynarlar. Sadece mantarlar lignin ve selülozu sindirebilirler. Bir ağaç veya ağaçsı bitki öldüğünde sadece mantarlar artakalanları ayrıştırma yeteneğine sahiptir.

Mantarlar sadece ölü ağaçları değil ölü olan tüm organizmaları ayrıştırabilir. Saprotik mantarlar ölü dokuları hangi komponentlerden oluşmuşlarsa onlara ayrıştırıp ekosisteme geri dönüştürürler. Saprotik mantarların sindirim aktiviteleri besinleri bitkilerin kullanabileceği şekilde açığa çıkarır. Mantar ve bakterilerin dünya üzerinden silinmesi felaketle sonuçlanır. Besinler ölü bitki ve hayvan gövdelerinde kilitli kalır, besinlerin geri dönüşümü durur, toprak verimliliği hızla azalır ve atık ve organik çöküntü birikir, kısa sürede ekosistem çöker (Audesirk vd., 2008).

2.1.10. Mantarların İnsan Hayatına Etkileri

Mantarlar hayatımızda tahmin edilenden daha fazla yer tutarlar. Mantarlar insanlar için önemli olan bitkilere saldırırlar. Mantarlar bitki hastalıklarının temelini oluştururlar ve mantar patojenlerinin dünyanın gıda kaynaklarına tahrip edici etkisi vardır. Özellikle etkili olan basidiomisetler mısır tohumlarında milyon dolarlık yıkıcı etki yaratırlar.

Mantarlar bitkilerin gelişme süreçlerinde bile tahrip etmeye devam ederler. Özellikle kaygı verici olan ağaçları çürüten farklı türdeki mantarlardır. Bazı ascomycetler üremeleri için elverişli sıcak iklimlerde özellikle pamuk ve yün tekstillere zarar veren selülaz ve proteaz enzimlerini salgırlar.

Mantarların tarımsal etkilerinin pozitif yanları da mevcuttur. Böceklere saldıran mantar parazitleri pestisit kontrolünde oldukça etkilidir. Pahalı kimyasal pestisidler kullanan çiftçiler biyolojik bir kontrol olan parazit mantarları karıncalar, tırtıllar, yaprakbitleri gibi pestlerde daha sık kullanmaya başlamışlardır. Bunun yanısıra biyologlar bazı mantar türlerinin sıtma taşıyan sivrisineklere de saldırdıklarını keşfetmişlerdir (Audesirk vd., 2008).

2.1.10.1. Hastalıklar

Mantarlar alemi insanları direkt etkileyen türler içerir. Bunların en çok rastlanana ascomycetlerin neden olduğu deride, özellikle ayaklarda oluşan mantarlardır. Hayati bir tehlike oluşturmazlar ve antifungal ilaçlarla giderilebilirler. Ayrıca hastalık yapıcı mantar sporları solunum yoluyla akciğerlere taşındığı takdirde histoplazmosis ve yüksek ateşe neden olabilir. Diğer mantar hastalıkları gibi antifungal ilaçlarla önlenemez olsa bile eğer tedavi edilmezse ciddi sistemik enfeksiyonlara sebebiyet verebilir (Audesirk vd., 2008).

2.1.10.2. Toksinler

Enfeksiyon hastalıklarına neden olan mantarların yanı sıra insanlar için tehlikeli olan toksinler üreten mantarlar da vardır. Çok nemli ortamlarda saklanan tahıl veya diğer gıda maddeleri üzerinde üreyen mantarlar toksinler salgırlar. Örneğin *Aspergillus* cinsi mantarlar yüksek toksik ve kanserojen bileşenler içeren aflatoksinler salgırlar. Gıda üreticileri aflatoksinlerin 1960'larda keşfedilmesinden beri, depolanmış tohumlarda üremesini sınırlayan metodlar geliştirdiler ve bu aşamada aflatoksinlerin elimine edilmesini sağladılar (Audesirk vd., 2008).

2.1.10.3. Antibiyotikler

Mantarların insan sağlığı üzerinde olumlu etkileri de vardır. Hayat kurtaran antibiyotik ilaçlar, ascomycete küfü tarafından üretilen penisilinden keşfedilmiştir. Penisilin hala, mantarlar tarafından üretilen oleandemisin ve sefalosporin gibi diğer antibiyotiklerle etkileşim içinde hastalıklarla savaşmakta kullanılmaktadır. Mantarlardan türetilmiş bir diğer önemli ilaç olan siklosporin, organ nakillerinde vücudun organı reddetme ihtimalini azaltmak için kullanılır (Audesirk vd., 2008).

2.1.10.4. Gastronomi

Mantarların insan beslenmesine önemli katkıları vardır. Bu katkının en bilinen bileşeni direkt olarak tükettiğimiz yabani ve kültür basidiomycet mantarları ve trüf ve morel gibi ascomiset mantarlarıdır. Ayrıca dünyaca ünlü Rokfor, Gorgonzola, Stilton gibi peynirler aromalarını üzerlerinde büyüyen ascomycet küflerinden edinirler. Ama en önemli ve yiyeceklerde en çok kullanılanlar maya diye adlandırılan tek hücreli ascomycetlerdir (Audesirk vd., 2008).

2.1.11. Evrimsel Bağlantılar

Doğal seleksiyon, milyonlarca yıldan daha uzun süredir mantarların dayanıklı formları üzerinde işler ve sporlarını yayarak ve besin sağlayarak dikkat çekici adaptasyonlar üretmiştir.

2.1.11.1. Trüf

Yemek için satın alınan birçok mantar arasında en çok aranan trüftür. En güzel İtalyan trüflerinin kilosu 2000 liraya satılmaktadır. Trüfler meşe ağaçlarının kökleriyle mychorrizal ortalıkta bulunan ve spor biriktiren yapıda ascomisetlerdir.



Şekil 2.14 En değerli ve mantar olan Trüf mantarı(Audesirk vd., 2008).

Bu mantarlar hayvanları kendine çekmek için etkili bir mekanizma geliştirmiştir. Sporları olgunlaştığında trüf, hayvanların özellikle de domuzların ilgisini çeken bir koku yayar. Kokuyu takip eden domuz, meşe ağacının dibini kazarak mantarı çıkarır ve yer. Bu işlem sırasında milyonlarca spor rüzgarla birlikte saçılır. Eskiden trüf toplayıcıları, yer altındaki mantarların kokusunu 50 metreden bile alabilen ağız bağlı domuzlar kullanırlardı. Bugün en gözde trüf avcıları ise köpeklerdir (Audesirk vd., 2008).

2.1.11.2. Pilobolus

Eğer incelemek için bir yığın at gübresine yeterince yaklaşırsanız, güzel ve hassas yapıda türemiş zygomiset Pilopolusları görürsünüz. Bu narin görüntülerine rağmen onlar fungal silahlardır. Gübrenin içinden çıkan hiplerde, yapışkan siyah sporlarla şapkalanmış şeffaf ampüller şeklinde bulunurlar. Ampüller olgunlaştığında içindeki şeker konsantrasyonu yükselir ve ozmoz ile içindeki su azalır. Şapkasından daha zayıf hale geldiğinde, aniden bir balon gibi patlar ve sporlarını taşıyan şapkayı yaklaşık bir metre uzağa fırlatır.



Şekil 2.15 Patlayıcı spora sahip olan bir Zygomycete: *Pilobolus sp.*(Audesirk vd., 2008).

Uçan sporlar çimlerin yapraklarına konarlar. Piloboluslar ışığı çimenin büyüme yönüne doğru kırarlar. Çimene yerleşen sporlar geniş getiren bir otobur gelene kadar beklerler. Daha sonra çimleri yiyen otobur sindirim sisteminde zarar görmemiş taze Pilobolus sporları içeren dışkısını yapar. Ve bu spordan hipler, ampüller ve şapkaları bu dahice döngüyü tekrarlamak üzere yeniden oluşur (Audesirk vd., 2008).

2.2. Beyaz Çürükçül Mantarlar

Lignini verimli olarak mineralize edebilen tek organizma beyaz çürükçül mantarlar ve buna bağlı olarak atık ayrıştırıcı mantarlardır (Kirk ve Cullen, 1998). Beyaz çürükçül mantarlar Basidiomycetes sınıfına ait heterojen bir gruptur. Farklı beyaz çürükçül mantarlar, odunsu dokulardaki karbonhidrat ve lignini göreceli olarak farklı düzeylerde indirgerler.

Birçok beyaz çürükçül mantar hücre lüminasında kolonize olur ve hücre duvarı erozyonuna sebep olur. Aşınmış zonlar ileri derecede ayrışarak birleşir ve geniş boşluklar miselyumlarla dolarak form alır. Bu tip çürümeye seçici olmayan, simultane çürüme denir (Blanchette, 1995). *Trametes versicolor* tipik bir simultane çürükçül mantarıdır (Cowling, 1961; Eriksson vd., 1990).

Bazı beyaz çürükçül mantarlar lignini öncelikli olarak önemli bir selüloz kaybı olmadan uzaklaştırırlar ve beyaz benek veya beyaz cep çürümesi adı verilen çürümeye neden olurlar, örneğin; *Phellinus nigrolimitatus* (Blanchette, 1984a; Otjen ve Blanchette 1987).

Bazı mantarlar ise her iki çürümeye sebep olabilecek özelliklere sahiptirler (Eriksson vd., 1990). Bu tür mantarlara örnek olarak *Genoderma applanatum* ve *Heterobasidion annosum*'dur. Bu mantarlar lignini seçici olarak indirgediğinden dolayı kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi uygulamalarında çok ilgi görürler. Fakat seçilmiş bir mantarın lignin-hemiselüloz-selüloz ayrıştırma oranları çok büyük farklılıklar içerebilir. Aynı türün farklı üyeleri bile aynı tip ağaçta çok farklı davranabilir. Fakat bir mantar türünde substrata bağlı olmayan varyasyonlar bulunmuştur. Ağaç veya saman biyopulpında uygun mantar seçimi için yapılan birçok çalışmada, bazı mantarların lignini önemli derecede selüloza indirgediği açıklığa kavuşturulmuştur. Bu mantarların verimli olduğu keşfedildiğinden beri lignin indirgeyici sistemlerini incelemek önemli olmuştur. *C. subvermispora* lignin seçici indirgen olarak örnek bir model olabilir. Yıkım devam ederken kalsiyum oksalat ve MnO_2 birikir (Blanchette , 1984b; Eriksson vd., 1990). *C. subvermispora* ve diğer lignin seçici mantarlar tarafından üretilen en önemli ligninolitik enzim MnP 'dir. Beyaz çürükçül mantarlara kapalı tohumlu ağaçlarda, açık tohumlu ağaçlara göre daha sık rastlanır (Blanchette, 1995)). Genellikle ligninin syringyl (S) üniteleri yıkıma daha elverişlidir, guaiacyl (G) üniteleri ise daha dirençlidir.

Samanda gelişmiş ve elektron mikroskobuna aktarılmış *C. subvermispora* ve *P. eryngii* lignini kısmen orta lamelden uzaklaştırırken, *Phlebia radiata* ikincil hücre duvarlarından uzaklaştırmış olur. Liflerde, orta lameller yüksek konsantrasyonlu G lignin içerirken, ikincil duvarlar yüksek oranda S lignin içerir.

Lignin indirgenmesinin mekanizması, fiziksel özellikleri, enzimolojisi gibi temel işleyişleri incelendiğinde, dikkat çeken başlıca mantar kortizoid *P. chrysosporium*'dur (Kirk ve Farrel, 1987; Eriksson vd., 1990; Gold ve Alic, 1993). Taksonomik olarak birçok farklı mantar detaylı olarak, lignin indirgenmesi için sabit fiziksel şartlarda çalışıldığında, mantara özgü ve farklı enzim sistemleri ortaya çıkmaktadır. Farklılıklar mantarın taksonomik pozisyonuyla veya ekolojisiyle bağlantılı olabilir. Güney hibridizasyonu ile LiP-benzerli dizilişler keşfedildikten sonra, mantarın LiP üretme genetik potansiyeline sahip olduğu görülmüştür (D' Souza vd., 1999).

Lignin parçalayan funguslardan *Phanerochaete chrysosporium* ve *Trametes versicolor* en çok çalışılmış funguslardır. Ligninolitik basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*'un lignini oldukça iyi degrade ettiği bulunmuştur ve ligninin biyolojik parçalanmasının fizyolojik gereksinimlerinin çalışılması için model organizma olarak kullanılmıştır. *Phanerochaete chrysosporium*'un ligninolitik enzimleri sadece karbon, azot veya kükürt sınırlamasıyla tetiklenen sıvı kültürlerde sekonder metabolizma sırasında ürettiği bulunmuştur.

Trametes versicolor oldukça fazla çalışılmış ve önemli miktarda lakkaz salgılayan bir diğer beyaz çürükçül fungustur. *Corolius versicolor* ve *Polyporus versicolor* olarakta bilinmektedir. *Phanerochaete chrysosporium*'a benzer şekilde *Trametes versicolor*'da lignin peroksidaz ve mangan peroksidaz enzimlerini salgılar. Birçok lakkaz mantarın ağaç üzerindeki büyümesi sırasında konstitutif (indükleyici maddeye ihtiyaç duymadan enzim salgılayan) olarak düşük konsantrasyondaki üretimi xyloidine 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 (Call ve Mucke, 1997).

Ligninolitik aktiviteler ve atık ayrıştırıcı basidiomycete mantar enzimleri henüz çok az çalışılmıştır. *Agaricus bisporus* ve *Stropharia rugosoannulata* gibi atık ayrıştırıcı mantarların başlıca ligninolitik enzimleri lakkaz ve MnP'dır. Bir çalışmada lakkazın *Marasmius quercophilus* tarafından üretilen tek ligninolitik enzim olduğu belirlenmiştir (Audesirk vd., 2008).

2.3. Beyaz Çürükçül Mantarların Salgıladığı Ligninolitik Enzimler

Lignin, farklı büyüklüklerde parçalar içermesinden dolayı, moleküler ağırlığı kolay tahmin edilemeyen, üç boyutlu amorf bir maddedir (Argyropoulos ve Menachem, 1997). Yakın zamanda keşfedilen yeni kimyasal bağ modellerinden dolayı ligninin kimyasal yapısını da belirlemek güçleşmiştir (Buswell ve Odier, 1987). Lignin mikrobiyolojik çalışmalarda sıkça kullanılan bir bileşiktir. Doğa şartlarını öngörmek pek kolay olmadığı için ,bu tür maddeleri kullanarak sonuç elde etmek oldukça güçtür ve bundan dolayı da beyaz çürükçül mantarlar gibi mikroorganizmaların ağaçtaki lignini indirgerken neler olduğu çok az bilinir.

Ağaçta beyaz çürümeye neden olan, basidiomycete mantarları doğadaki en verimli lignin indirgeyicilerdir ve muhtemelen doğadaki lignin içeren dokuların karbon döngülerini sağlayan birincil ajanlardır (Kirk ve Farrel, 1987; Eriksson vd., 1990). Bu mantarlar taksonomik olarak heterojen yüksek mantarlara dahil bir gruptur, ama en büyük özellikleri, bir takım ekstraselüler ligninolitik enzimler kullanarak lignini mineralize ve depolimerize edebilme yeteneği olan tek mantar türü olmalarıdır (Akthar vd., 1992; Lamar vd., 1992).

Lignin molekülleri hücre içine taşınabilmesi için oldukça büyüktür ve bitki hücre duvarının yapısal komponentidir (Kirk ve Cullen, 1998). Heterojen yapısından dolayı lignin biyolojik olarak parçalanması için ekstraselüler enzimler olması gereklidir (Gellerstedt ve Northy, 1989). Bu enzimler lignin degradasyonundan sorumludur ve ikiye ayrılırlar. Bunlar fenoloksidaz ve peroksidazlardır.

Lakkazlar çoklu bakır fenoloksidazlardır. Bu enzimler fenol ve aromatik aminleri oksitler. Peroksidazlar ise farklı substrat spektrasında göre ikiye ayrılırlar. Biri Mn (II) 'yi en verimli indirgen substrat olarak kullanan mangan peroksidaz diğeri ise nonfenolik ve fenolik aromatik bileşikler oksitleyen lignin peroksidazdır (Call ve Mucke, 1997).

Bu enzimlerin lignin degradasyonunu oluşturmak için düşük molekül ağırlıklı aracı substratlardan yararlandığı gösterilmiştir (Gellerstedt ve Northy, 1989). Lignin peroksidazlar hem fenolik hem de fenolik olmayan maddelerin oksidasyonunu katalizler, lakkaz ve mangan peroksidaz ise fenolik bileşikleri fenoksi radikaller ve kinonlara oksitler, glikoz oksidaz ve glioksal oksidaz da H₂O₂ üretimi ve sellobioz-kinon oksidoredüktaz ise kinonu indirgeyen bu enzimlerin lignin parçalanmasıyla ilgisi vardır (Kirk ve Farrel, 1987; Thakker vd., 1992).

Lignin indirgeyen beyaz çürükçül mantarlar geçtiğimiz 30 yıl boyunca kağıt hamuru iyileştirilmesi, ağartma, biyoremediasyon gibi biyoteknik uygulamalarla ilişki içinde dikkatlice çalışılmıştır (Akthar vd., 1992; Lamar vd., 1992; Messner ve Srebotnik, 1994) Lignin indirgenmesinin enzimoloji ve moleküler biyolojisi çoğunlukla *Phanerochaete chrysosporium*'la çalışılmıştır (Gold ve Alic, 1993; Kirk ve Cullen, 1997). Ama başka bir çok beyaz çürükçül mantar türü de *P. chrysosporium* kadar etkili şekilde lignin indirgeyicidir (Eriksson vd., 1990; Messner ve Srebotnik, 1994).

Lignin indirgenmesinin fiziksel şartları, ve enzimlerin salgılanma modelleri değişik mantar türlerine göre farklılık gösterir. 1980'lerin başına kadar lignin indirgenmesi için gerekli olan enzimlerden sadece lakkaz keşfedilmiş olmasına rağmen lignin peroksidaz ve mangan peroksidaz gibi iki önemli enzimin keşfedilmesiyle, mantardan bu enzimler izole edilmiş ve detaylı karakterizasyonu yapılmıştır (Kirk ve Farrel, 1987).

2.3.1. Lakkaz (EC 1.10.3.2)

Lakkaz, ilk olarak 1880'li yıllarda Lacquer ağacında keşfedildiğinden beri çalışılmaya devam eden az sayıdaki enzimlerden biridir (Yoshida, 1883; Thurston, 1994). Ayrıca lakkaz beyaz çürükçüllerde en çok oluşan oksidoredüktazdır (Kaarik, 1965). İlk olarak yüksek bitki ve diğer mantarlarda bulunmuştur.

Lakkaz, ağaçlarda aşınmalara yol açar ve lignin degradasyonu için lignin sentezini sağlar. Fungal lakkazın pigmentasyon, sporulasyon, patojeniklik ve detoksifikasyon gibi farklı kullanım şekilleri vardır (Bao vd., 1993). Lakkaz, fenolik bileşikler, aromatik aminler ve diğer bileşiklerin dört ardışık tek elektrolu oksidasyonunu katalizleyen mavi bakır oksidazdır.

Bu oksidasyon moleküler oksijenin suya indirgenmesi ile bağlantılıdır (Thurston, 1994; Ducros vd., 1998; Bar, 2001). Lakkaz fenolik β -1 ve β -O-4'de C α -C β bağlarındaki kırılmayı katalizler (Bar, 2001).

Tipik lakkazlar 3.0 ile 5.7 arasında optimum pH'a sahip indüklenebilen enzimlerdir (Bollag ve Leonowicz, 1984). Bazı toprakta yetişen basidiomycetler daha yüksek optimum pH'a sahiptirler (pH 7.0). Yaprak ayrıştırıcı mantar *Marasmius quercophilus* kullanılan optimal sıcaklık en yüksek 75°C olabilmektedir (Dedeyan vd., 2000). Beyaz çürükçülere elde edilen lakkazların ortalama molekül ağırlıkları 60 ila 80 kDa arasındadır, izoelektrik noktaları asidiktir ve glikolizedir (Kaarik, 1965).

Coprinus cinereus basidiomycetinden elde edilen lakkazın kristal yapısı yakın tarihte çözülmüştür (Ducros vd., 1998). Bu lakkaz 63 kDa molekül ağırlığına ve göreceli olarak yüksek pH'a sahiptir. Bu özellik nötral/alkalin pH koşullarının gerekli olduğu endüstriyel kullanımlarda çok önemlidir (Schneider vd., 1999).

Lakkaz *P. chrysosporium*da rastgele bulunduğu ilk zamanlarda, miktarı düşük ve sadece spesifik şartlarda üretilebilen bir enzimdir. Bu nedenle lakkaz, mantarın buğday samanında geliştirilmesine kadar istenilen miktarda bulunamamıştır (Srivansan vd., 1995; Dittmer vd., 1997).

Farklı yardımcı mediatör molekülleri ligninin fenolik olmayan kısımlarında, lakkazın oksidasyon potansiyelini arttırmak için bulunmuştur (Bourbannis ve Paice, 1990; Kawai vd., 1999). Bu olay sadece doğal lignin indirgenmesinde değil, endüstriyel uygulamalarda lakkazın değerinin tekrar anlaşılmasına neden olmuştur. Mediatör denilen birtakım küçük sentetik moleküler ağırlık efektörleri, lakkazın aktivitesini artırır (Bourbannis vd., 1995; Bourbannis vd., 1997; Call ve Mucke 1997). En çok çalışılan mediatörler ABTS ve HBT'dir. İşlenmemiş lakkazın performansı ABTS ile aynı fakat HBT ile farklıdır. *P. ostreatus*, *Merulius tremellosus* ve *Lentina edodes* HBT varlığında veratril alkol oksidasyonunu katalizlemede ve pulp delignifikasyonunda daha az verimlidir. En verimli ham lakkaz *Trametes versicolor*'dan elde edilir (Bourbannis vd., 1997)). Farklı kökenlerdeki lakkazların farklı performansları bize gösterir ki, aminoasit dizilişlerine göre lakkaz sınıflandırılması Tip-1 bakır ile yakından alakalıdır (Li vd., 1999).

Panus tigrinus, *C. versicolor* gibi birçok beyaz çürükçül ve yaprak ayrıştırıcı mantar lakkazları doğal lignoselulozik substratlarda üretilerek bulunmuştur ve likit kültürlerde üretilen lakkazla karşılaştırılmıştır. Likit kültürlerden saflaştırılan lakkaz normal mavi renk ve karakteristik absorpsiyon gösterir fakat tahıl mediumdan saflaştırılan lakkaz tipik olmayan sarı-kahverengi bir renk gösterir. N-terminal aminoasit dizilişlerine bakıldığında enzimlerin birincil yapılarında bir farklılık görülmemektedir. Lignin substratından bazı küçük moleküller doğal oluşumlu mediatörler gibi davranıp sarı lakkazlara bağlandığı ileri sürülmektedir (Leontievsky vd., 1997a). Bu nedenle mantar, mediatörü ligninden sağlar ve onu sentezlemesine gerek kalmaz. *P. tigrinus*'tan üretilen sarı lakkazın performansı normal mavi lakkazdan daha iyidir ve nonfenolik lignin model bileşikler oksidize edebilir (Leontievsky vd., 1997a).

Fungal lakkaz delignifikasyon, ağaç lif modifikasyonu, boya ağartılması, kimyasal ve tıbbi sentezler gibi uygulamalarda potansiyel gösterir (Schneider vd., 1999). Lakkaz organik solventler varlığında aktivitesini kaybetmeden kullanılabilir ve bu da organik sentezleri de içeren birçok uygulamalar için oldukça uygundur (Luterek vd., 1998).

Rekombinant lakkaz, *Trichoderma reesei* küf (Saloheimo ve Niku-Paavola, 1991), *Aspergillus oryzae* ve *Pichia pastoris* (Jönsson vd., 1997) mayası gibi uygun endüstriyel sistemlerde bulunur. Bu yüzden enzimin fiyatının ekonomik olarak daha uygun olması beklenir. Bu güne kadar en az 15 tür mantardan elde edilen lakkaz genlerinden, sekiz basidiomycetin içerdiği 22 gen tanımlanmıştır (Maijala, 2000).

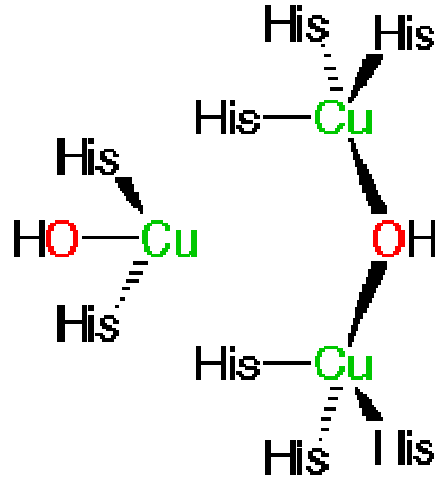
2.3.1.1. Lakkaz Enziminin Yapısı

Tipik olarak lakkaz, spektroskopik ve paramanyetik yapıları ile ayırt edilebilen üç farklı tip içeren dört adet bakır atomu içerir. Tip 1 bakır atomu, birincil elektron alıcısı görevindedir ve elektronları indirgenen fenolik substrattan ayırıp, örneğin Tip2 veya Tip3 bakır atomunun trinükleer noktasına iletir. Trinükleer nokta ikincil substratın bağlandığı taraftır ve dioksijen, indirgenme için Tip-1 tarafındaki elektronları kabul eder .

Tip I bakır (T1); enzimin 600 nm' de gözlenebilen yoğun mavi renginden sorumludur ve EPR ile belirlenebilir. Tip-1 Cu tipik olarak iki histidin nitrojen ve bir sistein sülfür ile bağlantılıdır. Cu-S cys yüksek kovalent bağı enzime ayırt edici mavi rengini verir (Ducros vd., 1998).

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 bakırını yakın UV'de 330 nm de verdiği zayıf absorbans bandıyla karakterize edilirken EPR'ta sinyal vermeyen bir çift bakır atomu içerir (Thurston, 1994; Ducros vd., 1998; Piontek, 2002).



Şekil 2.16 Lakkazın aktif bölgesindeki bakır atomlarının düzenlenişi (Claus., 2004).

T2 ve T3 bakır bölgeleri kapalıdır ve üç çekirdekli merkez formunda kümelenir. Burada iki adet T3 bakırını hidroksil köprüsüyle bağlanmış durumdadır ve bu kümelenme yeri O₂ indirgenme bölgesidir (Thurston, 1994; Palmieri vd., 1997; Claus, 2004).

Bu tip enzimlerdeki T1 bakır bölgesinin fonksiyonu; indirgen substrattan elektron alarak T2/T3 bakır kümesine sonradan ortaya çıkan bu elektronun transferidir (Mester ve Tien, 2000). Lakkazlardaki T1 bakırını indirgen substratla reaksiyona girer.

Lakkazın substrat aralığı kısmi olarak redoks potansiyeline sahip olduğu görülmüştür. Fungus kaynaklı: 0.5-0.8 V, ağaç kaynaklı: 0.3-0.4 V değerindedir (Messerschmidt, 1997). Bu yüksek değer Tip I bakırının sahip olduğu ligandın trigonal piramidal geometrideki koordinasyonu sonucudur (Zille, 2005).

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 (Feng ve Xu, 1996). Oldukça benzer veya özdeş görünümlü bakır koordinasyon geometrisine rağmen farklı mavi çoklu bakır oksidazların redoks potansiyelinin nasıl ayarlandığı halen tam olarak açıklanamamıştır (Heather, Vandertol-Vanier; 2000).

İki T3 bakır atomu arasındaki kuvvetli antiferromanyetik bağlanma hidroksil köprüsü ile oluşur (Claus, 2004). Bu tip enzimde T1 bölgesinin fonksiyonu T2/T3 kümelenmiş bakıra elektron transferinin ardından, indirgen substrattan elektron alımını sağlamaktır (Zille, 2005).

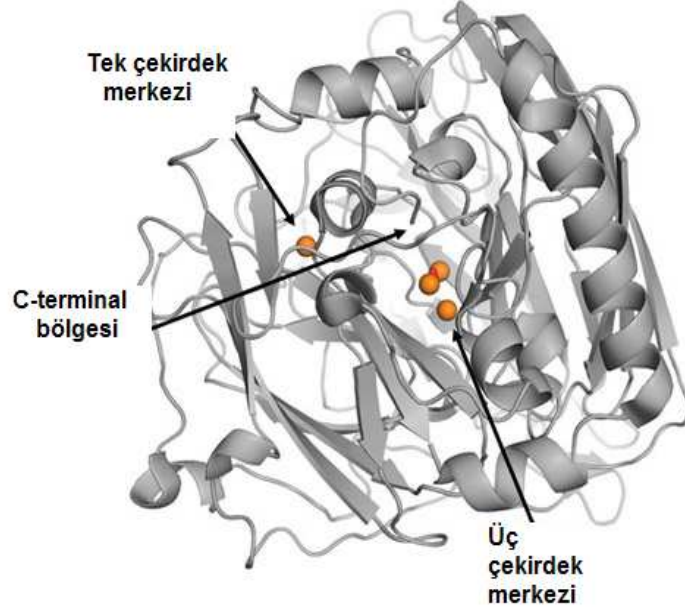
Bu geometri bozulmuş trigonal bipiramidal koordinasyon olarak tanımlanmıştır. Cu(I) ve Cu(II) türleri için tercih edilen koordinasyon bölgesi arasındaki ara ürün ender görülür. Bakır bağlayıcı alanda karboksil terminusuna en yakın noktanın aminoasit dizisinin sıralanışı, farklı lakkazlar için genel bir sınıflandırma olarak kullanılır . Bu rezidü lakkazların içindeki fenilalanin en yüksek redoks potansiyeline sahiptir (Tip 1), lösinli lakkaz ortalama bir redoks potansiyeline sahiptir (Tip 2) ve metiyoninli ise en düşük potansiyele sahiptir (Tip 3) (Eggert vd., 1998) . Birçok beyaz çürükçül mantarın ürettiği lakkaz, Tip 3 lakkazdır. Örneğin; *Phlebia radiata*, *Pleurotus ostreatus*, *Agaricus bisporus*. Sadece *T.villosa* ve *C.cinereus* lakkazları 2.türe aittir (Ducros vd., 1998). 1. tür lakkazları sadece bitki ve küf enzimleri içerirler (Eggert vd., 1998). Fakat, lakkazların mantarlar üzerinde çok farklı fizyolojik etkileri olduğundan dolayı, tek bir tür mantarın farklı lakkazlar ürettiği düşünülebilir.

Lakkaz lignindeki fenolik üniteleri ve lignin model bileşiklerini aril-C \square kırılmalarına ve diğer reaksiyonlara öncülük eden fenoksil radikallerine okside eder. Ligninin sadece 10-15% fenolik yapı içerdiği görüldüğünden beri lakkazın, ligninin indirgenmesinde anahtar bir rol oynadığı düşünülmemiştir (Lai, 1992).

2.3.1.2. Lakkaz Enziminin Kristal Yapısı

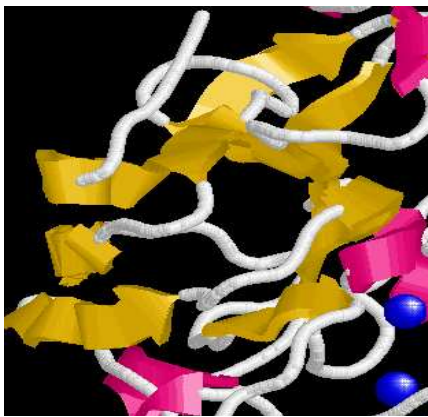
Lakkazın elektron yoğunluğu dört bakır atomunun hepsi ve toplamda da 7 N-asetil gliozamin kısmı ve 5 ayrı N-glikozilasyon bölgesiyle polipeptidin tamamının modellenmesine izin verir (Erwin vd., 1993).

Lakkazın kristal yapısı içerdiği üç cupredoxin benzeri domain içeren monomerik bir molekül olduğunu gösterir (Ducros vd., 1998).

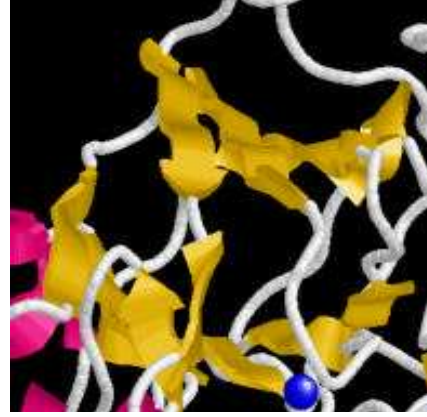


Şekil 2.17 Lakkaz enziminin kristal yapısı (Claus., 2004)

Tüm mavi bakır oksidazlar, moleküler yapısında β -barrel formunda alanlar içerir ayrıca üçüncü alan dört adet kısa helikal bölgelerden oluşan β -sandwich konformasyonundadır .

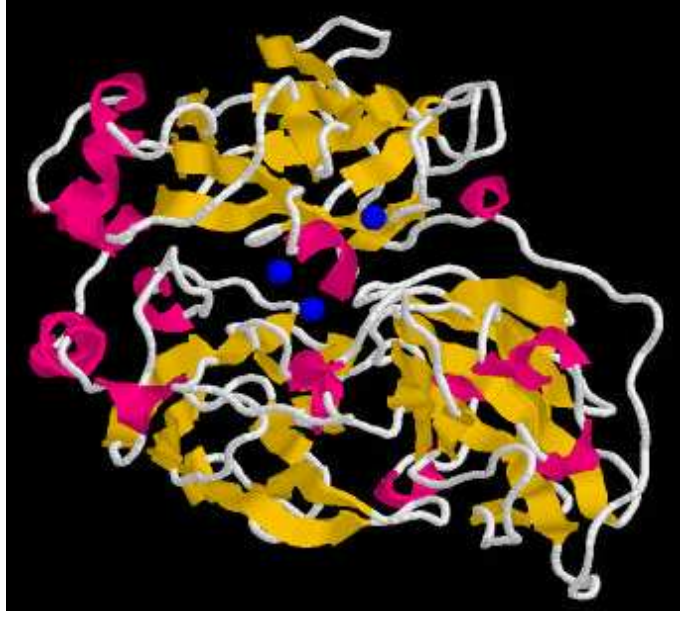


(a)



(b)

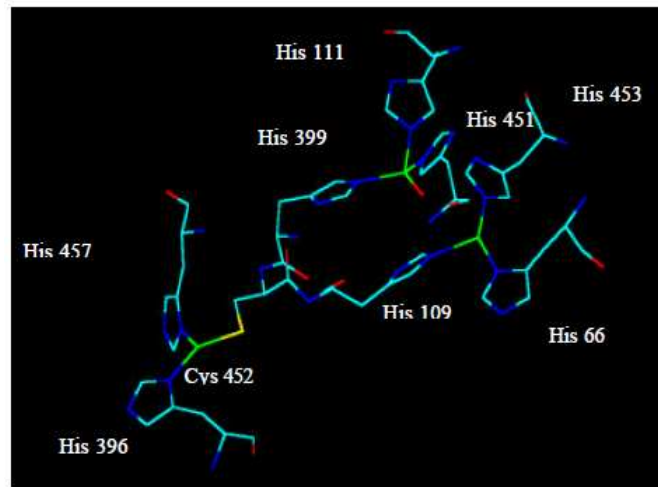
Şekil 2.18 *Coprinus cinereus*'dan elde edilen Cu-2 bağımlı lakkazın cupredoxin benzeri domainlerden (a) β -barrel ve (b) β -sandwich konformasyonları Ducros ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (Bar., 2001)



Şekil 2.19 *Coprinus cinereus*'dan elde edilen Cu-2 bağımlı lakkazın kristal yapısı (Zille., 2005)

Kristal yapı üç çekirdekli merkezde T2 bakırı ve T3 bakırının beraber ve birbirine yakın olduğunu gösterir.

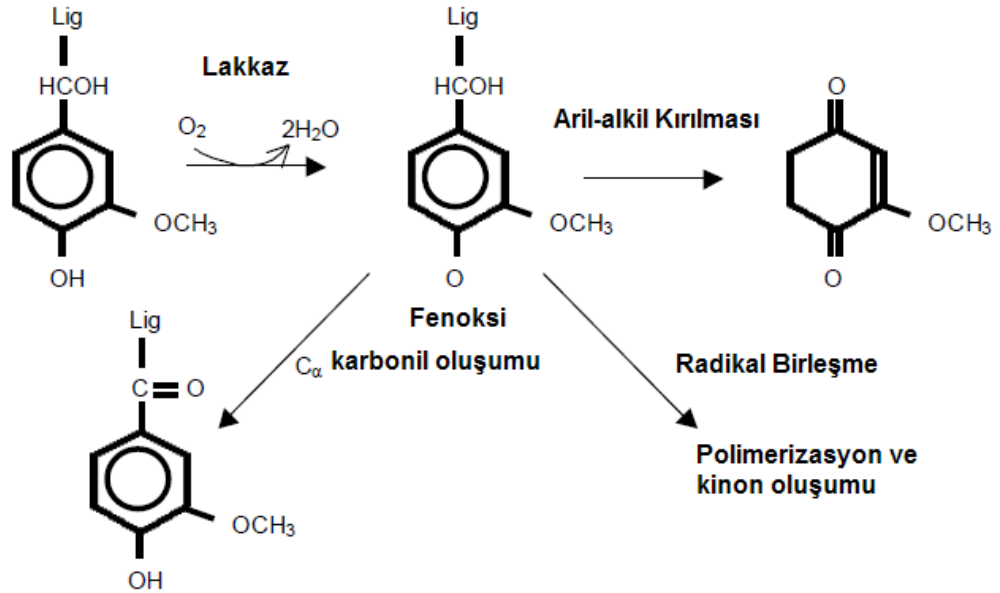
Çalışmalar T2/T3 bakır bölgesinin Cu atomlarının sekiz Histidin (His) ile düzenlenmiş olduğunu göstermiştir. Bu sekiz histidin 4His-X-His motifiyle korunmaktadır. T3 bakırları altı histidine koordine iken T2 bakırı kalan 2 histidin ile koordine edilir (Ducros vd., 1998).



Şekil 2.20. *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 (Bar., 2001).

2.3.1.3. Lakkaz Katalizli Reaksiyonlar

Lakkaz katalizli reaksiyonlarda substrat molekülleri bir elektron oksidasyonu ile bir serbest radikal meydana getirir. Substratın bir elektron oksidasyonu, oksijenin 4 elektron indirgenmesiyle eşleşir. İlk ürün tipik olarak stabil değildir ve ikinci bir enzim katalizli oksidasyon veya hidrasyon, kimyasal tepkime, polimerizasyon gibi enzimatik olmayan bir reaksiyon geçirebilir (Thurston, 1994; Ducros vd., 1998). Lakkazın doğal substratı olan bağları lakkaz tarafından yarıdır. Bu yarıma C α oksidasyonu ile (C α -C β bağının yarılması ve aril-alkil yarılması) ligninin fenolik alt birimlerine saldırmasıyla olur. Moleküler oksijen son elektron alıcısı olarak davranır ve böylece iki molekül su indirgenir (Archibald vd., 1997).

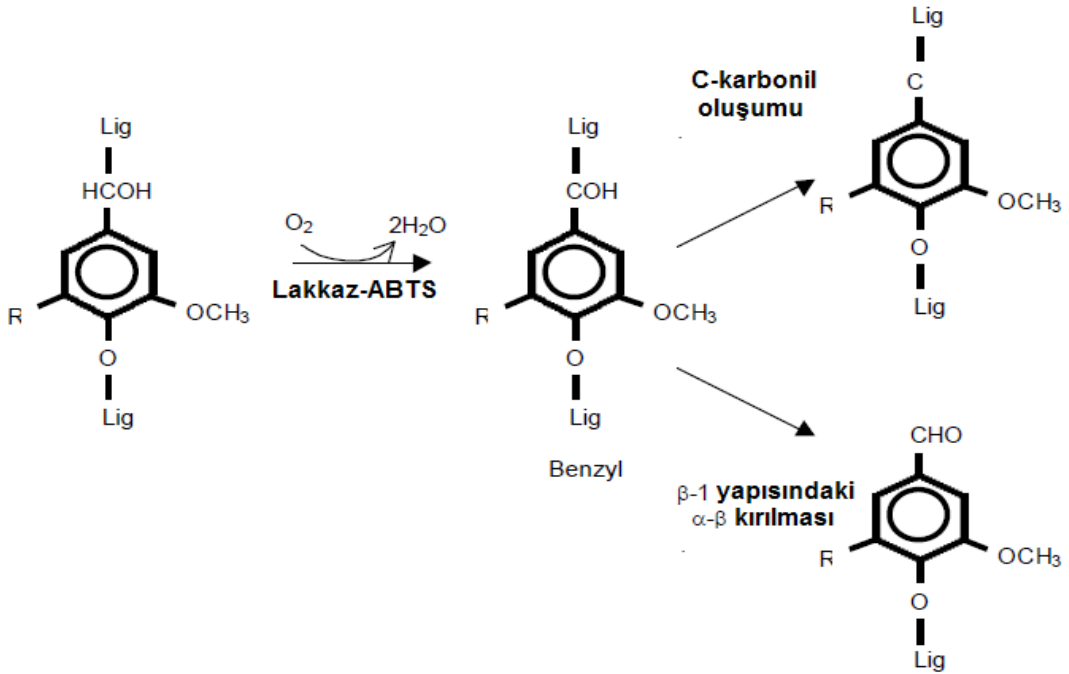


Şekil 2.21 Lignindeki fenolik grupların lakkaz katalizli oksidasyonu (Zille., 2005)

Yapılan çalışmalarda indirgen substrattan öncelikle T1 bakır bölgesinin elektron aldığı ve bu reaksiyonda tek fazlı, bimoleküler ve ikinci dereceden olarak yürüdüğü görülmüştür. İkinci dereceden hız sabiti T1 bakırının indirgenme hızı olarak tanımlanmaktadır. T1 bölgesinden üç çekirdekli bakır bölgesinin (T2/T3) moleküller arası elektron transferi daha yavaştır (Mester ve Tien, 2000).

2.3.1.4. Lakkaz Aracılı Sistemler (Mediatör)

Biyoyağartma teknikleri, klor ile kağıt hamuru ağartılmasına karşıuygun bir alternatif olarak keşfedilmiştir. Lakkaz aracılı sistem (LMS) ilk olarak ağaçtan elde edilen kağıt hamurunun biyoyağartılmasındaki problemler için geliştirilmiştir ve ABTS'nin ilk aracı olarak kullanılması ile tanımlanmıştır (Bourbannis ve Paice, 1990). Lakkazların ligninin ayrıştırılmasında çok büyük rolü olduğu düşünülmüş fakat bu enzimlerin düşük oksidasyon potansiyellerinden dolayı fenolik bileşiklerle sınırlandırılmıştır (Erwin vd., 1993). Aracılı bileşiklerin varlığında bu enzimlerle uygulamalar yapıldığında, nonfenolik lignin model bileşiklerinin oksidasyonu önderliğinde yüksek oksidasyon yetenekleri olduğu görülmüştür.



Şekil 2.22 Fenolik olmayan lignin bileşiklerinin bir lakkaz aracılı sistem tarafından oksidasyonu (Zille., 2005)

Lakkaz aracılı sistemlerin lignine karşı aktivitesi iki ana faktöre bağlıdır. Birincisi enzimin redoks potansiyeli, ikincisi mediatörün oksidasyonundan oluşan radikallerin stabilitesi ve reaksiyona girme kapasitesidir. Farklı organizmalardan elde edilen lakkazlar, farklı araçlara ve farklı substratlara değişik tepkiler gösterirler (Bourbannis vd., 1997a).

Sık olarak çalışılmış fungal lakkazların ve nonfenolik dimerik β -O-4 lignin model bileşiğinin oksidasyonundaki redoks mediatörlerin performanslarını karşılaştırılmıştır.

Oksidasyon verimliliğinin farklı lakkazlarda şu sırayı izlediğini bulmuşlardır:

Trametes villosa > *Pycnoporus cinnabarinus* > *Botrytis cinerea* > *Myceliophthora thermophila* (Li vd., 1999).

Substratlar büyüklüklerinden dolayı enzimatik pakete direkt giremediklerinden küçük birer molekül olan mediatörler devreye girer. Mediatör, bir çeşit elektron mekiği olarak davranan bir moleküldür. Enzim tarafından yükseltgendiğinde oldukça kuvvetli yükseltgen bir ara bileşik oluşur. Enzimatik paketten difüz edildiğinde herhangi bir substratı kolaylıkla oksitleyebilmektedir (Archibald vd., 1997).

LMS için yaklaşık 100 farklı potansiyel mediatör bileşikleri tanımlanmıştır, fakat ABTS ve HBT bunlar arasında en çok kullanılanlardır (Bourbannis vd., 1997a; Johannes ve Majcherczyk, 2000). Son zamanlarda yapılan çalışmalar delignifikasyon için doğal mediatörler üzerinde durmaktadır. Doğal mediatörler fenol, anilin, 4-hidroksibenzoik asit ve 4-hidroksibenzilalkoldür (Johannes ve Majcherczyk, 2000).

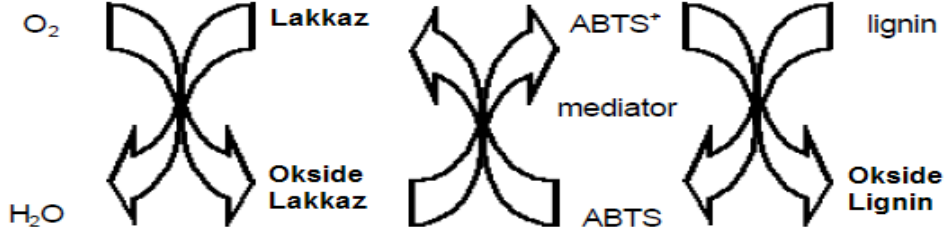
Lakkaz salgılayabilen *P. cinnabarinus* beyaz çürükçül mantarı MnP veya LiP üretemez (Eggert vd., 1997). Ligninolitik peroksidazların eksikliğine rağmen bu mantar lignini verimli bir şekilde ayrıştırır (Hattaka ve Uusi-Rauva, 1983). Mantar 3-hidroksiantiranilat adı verilen bir metabolit salgılar, ve bunun mantarda doğal olarak oluşan bir lakkaz mediatörü olduğu tahmin edilmektedir. Bu madde lakkazdaki nonfenolik lignin bileşiklerin oksidasyonunu sağlar (Eggert vd., 1996). 3-HAA'nin mantar kültürlerinde bulunan en büyük miktarı 20 mikromolardır ve bu miktar lignin degradasyonu için, ABTS ve HBT gibi sentetik mediatör miktarlarıyla karşılaştırıldığında çok küçüktür, sadece katalitik konsantrasyonlarda verimlidir (Eggert vd., 1995).

2.3.1.4.1. ABTS

Lakkaz ABTS'yi stabil bir katyon radikaline oksitler. Oluşan katyon radikalinin rengi enzim aktivitesi ile ilişkilidir (Majcherczyk vd., 1998).

Nonfenolik lignin model bileşikleri lakkaz/ABTS ikilisi tarafından yükseltgendiğinde, ABTS stabil bir katyon radikaline yükseltgenir (ABTS^{•+}). Bu fizyolojik olarak oksalat, glioksalat, malonat gibi organik asitler varlığında ABTS^{•+}'nin, ABTS'ye tekrar indirgenebileceğini gösterir (Collins vd., 1998).

Ayrıca ABTS lakkaz için mediatör olmanın dışında yardımcı oksidant veya aktivatör olarak da görev alır (Bourbannis ve Paice, 1990, Collins vd., 1998). ABTS/lakkaz çifti veratril alkolü okside edebilir fakat ABTS'nin katyon radikali edemez. Lakkaz ayrıca uygun yükseltgenebilir fenolik bileşikler varlığında Mn^{2+} yı Mn^{3+} ya yükseltgeyebilir ve Mn(III) çelatları oluşturur (Archibald ve Roy, 1992).



Şekil 2.23 Lakkaz mediatör oksidasyon sisteminin katalitik döngüsü (Bar., 2001)

Kağıt hamuru delignifikasyonunda ABTS'nin rolü henüz tam olarak çözülememiştir fakat ABTS katyon radikalının, kağıt hamurunun lif duvarında arta kalan lignin ile lif duvarından geçemeyen büyük lakkaz molekülü arasında elektron taşıyıcısı fonksiyonunda olduğu düşünülmektedir (Paice vd., 1995; Mester ve Tien, 2000).

2.3.1.4.2. HBT

HBT, N-heterosiklik bileşiklerin N-OH grubu taşıyan mediatörlere aittir. Oksijen harcayan HBT enzim tarafından aktif ara ürüne çevrilir (Call ve Mucke, 1994).

HBT, lakkaz tarafından bir nitroksit katyon radikali oluşturmak için oksitlenir (Call ve Mucke, 1994; Bourbannis vd., 1997b). Lakkaz / HBT sistem kağıt hamuru ağartılmasında iyi sonuçlar verir ve ligninde β -1 bağlı dimerler gibi baskın olan nonfenolik β -O-4 bağlı altbirimleri okside etme kapasitesine de sahiptir. Fakat bu mediatör geri kullanılabilir bir mediatör değildir (Xu, 1997; Ander ve Messner 1998; Srebnatik ve Hammel, 2000).

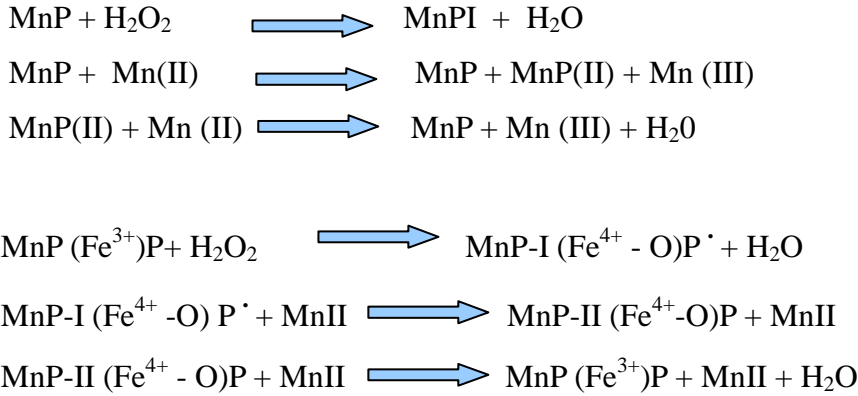
2.3.2. Mangan Peroksidaz

Mangan peroksidaz, hemen hemen tüm beyaz çürükçül, kahverengi çürükçül gibi biyolojik atıkların yıkımını sağlayan mantarların en yaygın ürettiği ligninolitik peroksidazdır (Hattaka, 1994; Willman ve Fakoussa, 1997; Hattaka,2000). *P.chrysosporium*'dan elde edilen manganaz peroksidaz ilk olarak yaklaşık 20 yıl önce tanımlanmıştır (Kuwahara vd., 1984; Paszcynski vd., 1986).

Mangan peroksidazın üretimi belirli basidiomycete sınıfı mantarlarla sınırlıdır ve şimdiye kadar hiçbir bakteri, maya ve küfte üreyebildiği tespit edilmemiştir (Paszcynski vd., 1986).

MnP'lar LiP 'lara göre daha büyük hem proteinleridir. Molekül ağırlıkları 47- 60 kDa'dır, glikolizedir ve genel olarak izoelektrik noktaları asidik, optimum pH'ları da düşüktür (Gold ve Alic, 1993).

MnP'in katalitik döngüsündeki reaksiyonlar şunlardır.



Bu şemada P porfirin, MnP-Bileşik I H₂O₂ nin yükseltgenen eşdeğerleri olan, oksiferil noktası ve porfirin katyon radikali (P[·]) taşır. MnP Bileşik II ise sadece bir yükseltgenen eşdeğer taşır. Çelat Mn³⁺ lignin ve lignin model bileşiklerindeki fenolik halkaları fenoksi radikallerine yükseltger ve bunlar yapıların dekompozisyonuna önderlik ederler (Popp ve Kirk, 1991). Çelat oluşturmuş Mn³⁺, düşük molekül ağırlıklı oldukça reaktif, difüze olabilen redoks mediatör olarak davranır. Böylece MnP, tekstil boyaları, nitroaminotoluen gibi yıkımı güç ksenobiyotikler ile doğal substratı olan lignini depolimerize ve okside edebilir (Van Aken vd., 1994; Heinfling vd., 1998;).

Fenolik yapılar genelde ligninin %10-15'ini oluşturur ve fenoksi radikallerin oluşumundaki MnP aktivitesinin sonuçları, aromatik halkalar ve C α karbon atomları arasındaki bazı bağların kırılmasına sebep olabilir (Gold ve Alic, 1993; Kirk ve Cullen 1998) .

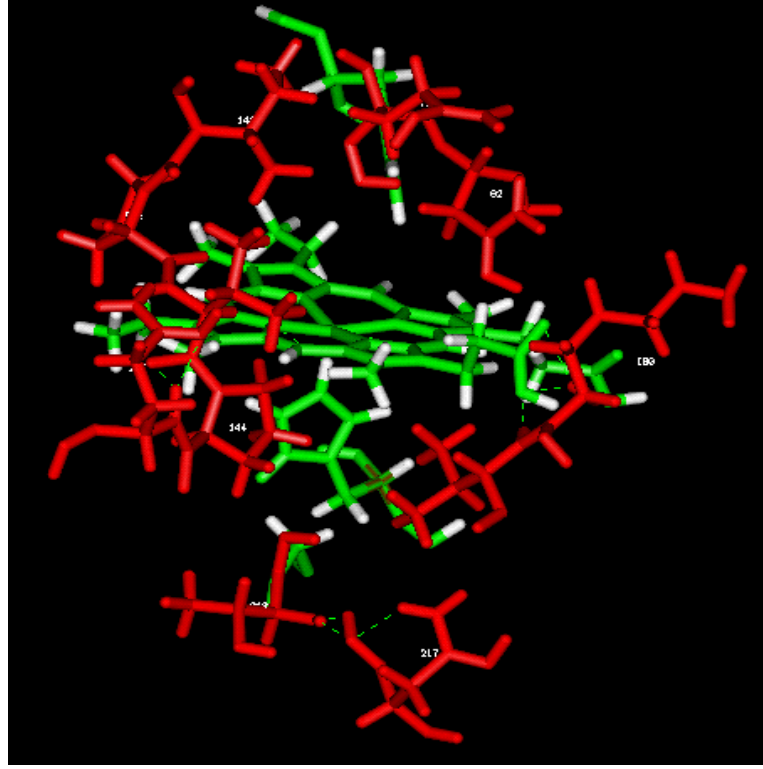
Ceriporiopsis subvermispora aromatik halkada bir elektron yükseltgenmesi veya benzil pozisyonundan hidrojen çıkarılması ile nonfenolik lignin yapılarını degrade edebildiği görülmüştür, ayrıca LiP benzeri genlere sahip olduğu bilinmesine rağmen LiP üretmez (Bao vd., 1994; Srebnatik vd., 1997).

Phlebia radiata'dan elde edilen MnP , linoleik asit ve diğer doymamış lipidlerin peroksidasyonunu katalizler. Reaksiyon sadece nonfenolik dimerik β -O-4 lignin model bileşiğinin kırılmasını sağlamakla kalmaz, C¹⁴ etiketli sentetik ligninin MnP katalizli minerilizasyonunu da geliştirir .

MnP aktivitesi için manganaza organik asit eklemesi gereklidir. Ligniselüozikler yüksek konsantrasyonlarda Mn içerebilir ve birçok sert ve yumuşak ağaçlarda 150 ppm'den fazla Mn bulunmuştur (Kapich vd., 1999).

2.3.2.1. Mangan Peroksitin Kristal Yapısı

MnP'in belirleyici özelliği, yapıdaki aktif bölümde iki adet kalsiyum iyonunun bulunmasıdır. Aktif bölgesi Asp rezidüsüne H- bağlı bir His ligandı ve cep içeren katalitik Arg ve His bağlı peroksit distal tarafı içerir (Banci, 1997). MnP beş adet disülfid bağa sahiptir. Beşinci disülfid bağı MnP'a özgüdür. Bu bağ C-ucu kuyruğunun bir kısmıdır ve kısmen proteinin ana gövdesinden C-ucunu uzak tutmak için uygulanan küvetten sorumludur. MnP, Mn(II)'yi Mn(III)'ye yükseltgeme kabiliyeti konusunda eşsizdir. MnP'in substrat bağlanan bölge mutantlarının kristal yapısı, sadece bir Mn bağlanma bölgeleri olduğunu gösterir. Mn (II) bağlanma bölgesi, bir hem propiyonik asit, üç asidik ligan ve iki su molekülü içerir (Glenn ve Gold, 1985). Mangan peroksidadaz iki domainden oluşur ve hem grubu bu iki domain arasında sıkışıp kalmıştır. Domainlerin herbiri 10 büyük ve 1 adet küçük heliks içerir (Welinder ve Gajhede, 1993).



Şekil 2.24 Mangan Peroksidazın aktif bölgeleri (Welinder ve Gajhede., 1993)

2.3.4. Lignin Peroksidaz

Lignin biyodegradasyon çalışmaları genelde kültür şartlarına göre değişen farklı miktarlarda LiP ve MnP izozimleri üreten *Phanerochaete chrysosporium* üzerinden ilerlemektedir, fakat farklı metodlar farklı varyasyonlara neden olabilir ve bu mantarda 6 LiP tanımlamıştır. Mantarın, oksijen basıncı altında nitrojen limitli veya karbon limitli ortamda veratril alkol ile oluşan ana izozimi H8'dir (Farrel vd., 1989).

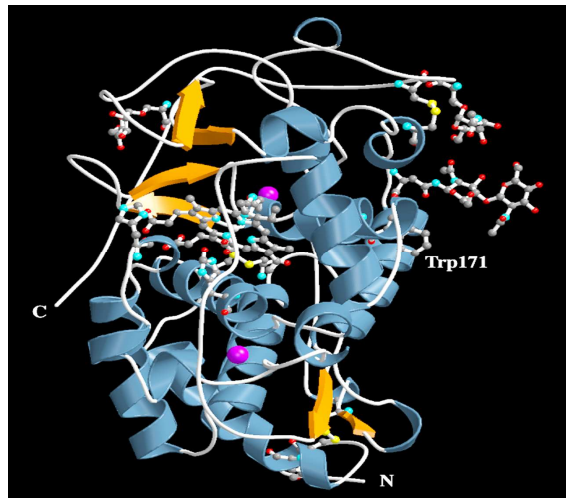
LiP'ın 1983'de keşfinden sonra içerdiği enzim bakımından *Phlebia radiata* diğer mantarların önüne geçmiştir. Halihazırda LiP'ın 1-3 isoformunu MnP ve lakkazın da 1-2 isoformunu üretmektedir (Niku-Paavola vd., 1990; Lundel ve Hattaka, 1994; Vares vd., 1995; Moilanen vd., 1996).

Lignin peroksidazlar 40 kDa moleküler ağırlığa sahiptirler, glikolizedir, asidik izoelektrik noktaları vardır, 2.5-3.0 gibi düşük pH değerleri vardır. Aktif bölgelerinde hem proteinleri ve protoporfirin IX içerirler. LiP tipik bir peroksidaz gibi davranır ve H_2O_2 tarafından iki elektron eksik Bileşik I'e yükseltgenir. Bir elektron eksik olan kısım ise Bileşik II olarak belirlenmiştir. Tipik peroksidazlar sadece fenol ve aromatik aminleri okside etmelerine rağmen LiP'lar farklı olarak fenolik olmayan yapıları da okside eder (Kirk ve Cullen, 1998).

Lignin yapılarındaki LiP katalizli oksidasyon, aromatik halkadan bir elektron çıkararak bir aril kation radikal oluşturur. Moleküler oksijen varlığında farklı ürünler de oluşur (Kirk ve Farrel, 1997). LiP, farklı lignin model bileşiklerinde H_2O_2 bağımlı oksidasyonu aşağıdaki adımlardan oluşan reaksiyon sıralaması ile katalizler.



Bu şemada R, veratril alkol gibi bir aromatik substrattır, P porfirindir. LiP Bileşik I (LiP-I) ise biri oksiferil noktası diğeri de porfirin π kation radikali olan H_2O_2 'ye yükseltgenen eşdeğer, iki yapıyı taşır. LiP bileşik II ise sadece bir yükseltgenen eşdeğer yapı taşıyabilir. R substratı Bileşik I'e yükseltgenir (Paulos vd., 1993, Kirk ve Farel, 1997). Aşırı H_2O_2 varlığında LiP katalitik olarak inaktif orta dereceli Bileşik III'e dönüşür (Cai ve Tien 1989; Renganathan ve Gold, 1994). Doğal LiP Bileşik III'den spontane bir ayrışmayla, bir süperoksit açığa çıkararak yenileştirilebilir (Wariishi ve Gold, 1990).



Şekil 2.25 Lignin peroksidazın kristal yapısı (Renganathan ve Gold., 1994)

Lignin biyodegradasyonu çalışmaları için substrat olarak en çok kullanılan yardımcı yapı dimerik nonfenolik β -O-4 lignin modelidir (Kirk vd., 1986). LiP genellikle model bileşiğin propil zincirindeki C α -C β bağlarının kırılmasını katalizler (Kirk ve Farrel, 1987). Hemen hemen tüm katalitik çalışmalar *P.chrysosporium*dan elde edilen LiP ile yapılmıştır. Fakat *Phlebia radiata* gibi bazı mantarlar dimerik lignin modellerini kalitatif olarak aynı yönde degrade edebilmektedir (Hattaka vd., 1991).

LiP mekanizmasının lignin üzerindeki katalitik aksiyonu henüz tam olarak bilinmemektedir, çünkü enzimin lignini direkt mi katalizlediği yoksa radikal bir aracıya ihtiyacı mı olduğu açıklığa kavuşturulmamıştır.

2.3.4.1. LiP Kristal Yapısı

LiP üç boyutlu yapısı, sitokrom c peroksidazla (CcP) benzerlik göstermektedir, diziliş benzerlikleri %20 civarındadır. LiP, distal ve proksimal helikler arasında hem örtülü 1α helikal segmentler içeren dört disülfid köprüye sahiptir.

LiP'da CcP' de olduğu gibi aspartik asit zinciriyle örtülü hidrojen bağlı proksimal hem ligandı olan histidin içerir. Peroksit bağlı cep merkezden uzak arginin (Arg43) ve histidin (His47) içerir. LiP'ın aktif bölgesi hem ile bağlantılı fenilalanin artıkları içerir ve Ccp triptofana sahipken proksimal histidin ligand içerir (Edwards vd., 1993). LiP yapısındaki hidrojen bağları yapısal yönden ve enzimin katalitik özellikleri yönünden önemli rollere sahiptir (Piontek vd., 1993).

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 rezidüsü vardır. Bunlar Arg43, Phe46 ve His47'dir. Bileşik I oluşumu için gerekli olan hidrojen peroksidin hem grubunun Fe iyonu ile etkileşimi için peroksit bağlanma bölgesini oluştururlar. Arg43 ve His47 peroksidazlarla korunmuş rezidülerdir; ancak Phe46 korunmuş değildir ve çoğunlukla hem grubunun pirol halkasıyla aynı düzlemde bulunur. Bu iki değişmeyen sabit rezidü, Bileşik I oluşumunda önemli rol oynar (English ve Tsaprailis, 1995).

Arg43 rezidüsünün iki önemli görevi olduğu öne sürülmektedir. Birincisi peroksidaz OH üzerindeki negatif yükün artışı stabilize etmek, ikincisi peroksit grubunun O=O çift bağının yarılmasıyla ferryl oksijen atomuyla hidrojen bağı yaparak Bileşik I ara ürününü stabilize etmektir. Diğer taraftan peroksit grubunun bağlanması için proton alıcısıdır (Steven vd., 1993).

II ve III sınıf peroksidazlar tarafından paylaşılan en önemli yapısal elementlerden biri hem grubuna yakın ve uzak bulunan kalsiyum bağlanma bölgeleridir. Kalsiyum iyonları aktif bölgenin bütünlüğünü koruyarak enzimatik aktivite de önemli rol oynar. Isısal ve alkali etkilerle LiP inaktivasyon kalsiyum iyonlarıyla bağlantının kaybedilmesi ve düşük spinli inaktif bis-histidil heksakoordineli hem durumunun oluşmasıyla ilgilidir (Nie ve Aust, 1997; George vd., 1999; Gerini vd., 2003).

LiP'in substrat bağlanma bölgesi ve de substrattan hem grubuna elektron transferinin yolu hakkında oldukça az bilgi vardır. Lignin peroksidazın kristal yapısı incelendiğinde hem aktif bölgesi hem de substrat giriş kanalının neredeyse ulaşamaz olduğu gözlemlenmiştir. Diğer peroksidazlar ile kıyaslandığında tam tersi olarak substrat giriş kanalı ve aktif bölgenin arasındaki diğer etkileşimin daha kolay olduğu görülür (Piontek vd. ,1993; Steven vd., 1993;English ve Tsaprailis, 1995; Banci vd., 1999) .

2.4. Ligninolitik Enzimlerin Kullanım Alanları

Beyaz çürükçül mantarların, lignin, klorlu aromatik ve alifatik hidrokarbonlar, boyarmaddeler gibi parçalanması güç olan birçok maddeyi hücre dışı enzim sistemi ile parçalayabilme yeteneğine sahip oldukları bilinmektedir (Kapdan vd., 2000; Gerini vd., 2003).

Beyaz çürükçül funguslar, hücre dışı ligninolitik enzim sistemleri ile çevre kirliliğine neden olan birçok rekalsitran ve organik bileşikler (ksenobiyotikler, lignin, boyarmaddeler vb.) indirgeyebilmektedir.

Özellikle lignin biyodegradasyonu ve renk giderimi amacı ile en yaygın kullanılan beyaz çürükçül fungus türleri; *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes (Coriolus) versicolor* ve *Funalia trogii*' dir.

Son zamanlarda endüstriyel uygulamalarda özellikle de 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 salgılanan diğer bir fonksiyonel hücre dışı enzimdir (Beilen ve Li, 2002)

2.4.1. Tekstil

2.4.1.1. Ağartma

Lakkazlar, selülozik liflerde bulunan yağlar, mumlar, pektinler, proteinler ve pigmentler gibi doğal renklendirici maddelerin uzaklaştırılması ve bu sayede boyama, baskı ve bitim gibi işlemlere hazırlanması amacıyla kullanılmaktadır. Tekstillerin ağartılması işlemi klasik olarak asidik ve bazik koşullarda, geniş sıcaklık aralığında ve farklı yükseltgen maddelerle yapılmaktadır. Yüksek beyazlık dereceleri istendiğinde ard arda oksidasyon işlemleri uygulanmaktadır. Ağartma maddeleri, liflere aşırı miktarlarda verilmekte, bu da ileriki işlemlerin düzgün yapılabilmesini olumsuz yönde etkileyen zararlı atıklara neden olmaktadır. Bu nedenle tekrarlı yıkamalar gerekmektedir.

2003'te yapılan çalışmada kısa süreli lakkaz ön işleminin pamuklu kumaşların beyazlığını geliştirdiğini ve sonraki ağartma işleminde kullanılan hidrojen peroksitin konsantrasyonunu önemli derecede azalttığını belirtilmiştir (Bumpus ve Aust, 1987; Tzanov vd., 2003).

2.4.1.2. Denim yıkama

Lakkazlar, denim yıkamada taşlama işleminde ponza taşlarının yerine kullanılabilir. Denim yıkamada taşlama işleminin esası, ponza taşı ile istenilen aşındırmanın sağlanması için ürünlerin yıkanmasıdır. Yıkamanın ardından ürünler, sodyum hipoklorit ile kısmen ağartılmakta, nötralize edilmekte ve tekrar yıkanmaktadır. Bu işlemlerin tümü büyük çevresel kirliliğe yol açtığından enzim uygulamaları da yapılmaktadır. Örneğin selülozlar, lif yüzeyini aşındırıcı etkiye sahip olduklarından taş yıkama görüntüsünü elde etmek için ponza taşlarının yerini kısmen alabilmektedir. Bununla birlikte lakkazlar da indigo boyalı denim giysileri daha açık tonlara ağartabilme etkisine sahiptir (Bumpus ve Aust, 1987).

Lakkazlar, denim üzerindeki indigoyu renksizleştirme açısından tek başlarına yeterli olamadıkları için indigodan moleküler oksijene elektron transferi sağlayan medyatörlü sistemler de geliştirilmiştir. Lakkaz ve medyatör sistemi, atkı ipliklerini etkilemeden yalnızca indigoyu parçaladığı için işlem sonucu gri nüanslı denim elde edilmektedir. Denimin klasik hipoklorit ağartması ucuz, hızlı ve etkilidir. Ancak çevreye ve denime zarar vermektedir. Oysaki lakkaz ve medyatör ile ağartma, ılıman koşullar altında yapılabilmekte ve çok daha kolay kontrol edilebilmektedir. Ayrıca bu sistemde ağartma etkisi fenol bileşiklerine özgü olduğundan elastikiyeti etkilememekte ve hipoklorit ağartması gibi elastomer ipliğine de zarar vermemektedir. Lakkaz medyatörlü sistemler, denim yıkama uygulamalarında geri boyamayı azaltmakta, aşınma seviyelerini geliştirmekte ve indigoyu ağartmaktadır (Tzanov vd., 2003; Basto vd., 2007).

Lakkazların denim yıkamada kullanımına ilişkin yapılan çalışmalarda aktifleştirilmemiş ve fenol ile aktifleştirilmiş koşullarda yetiştirilen beyaz çürükçül (white rot) esaslı *Trametes versicolor*'u, lakkaz (TvLac), lignin peroksidaz (LiP), manganez peroksidaz (MnP), arilalkol oksidaz (AAO) ve polifenol oksidaz (PPO) üretimi amacıyla test etmişlerdir. PPO, LiP ve AAO kültür süzüntülerinde gözlenmez iken, TvLac ve MnP aktiviteleri sırasıyla inkubasyonun dördüncü ve beşinci gününde tespit edilmiştir. *T.versicolor*'dan izole edilen lakkaz, medyatör olarak denim yıkama için kullanılmıştır. Çalışmada TvLac'ın, medyatörlü ticari lakkazdan daha verimli olduğu ve denim yıkamada kullanılabileceği belirtilmiştir (Yoon M-Y, 2005).

2.4.1.3. Kaynatma

Kaynatma işlemleri, çeşitli kimyasal maddelerle yapılmakta ve çevresel açıdan kirlilik oluşturmaktadır. Bu nedenle daha ekolojik bir proses olan enzimatik kaynatma tercih edilmektedir. Enzimatik kaynatma işlemlerinde daha çok pektinaz kullanılmakta olup ksilanaz, proteaz, lakkaz, lipaz ve selülaz gibi enzimlerle de denemeler yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda ketene enzimatik kaynatma işleminin etkileri incelenmiştir.

Bu amaçla ham keten liflerine endüstriyel enzimler uygulanmıştır. Kaynatma sonrası, ağartma ve yaş mekanik eğirme yapılmıştır. Eğirmeden sonra tüm ilgili iplik parametreleri ölçülmüş ve direnç, gerilme, neps yüzdesi gibi parametreler değerlendirilmiştir.

Verimlilik; pektinaz > ksilanaz = galaktomannaz = proteaz > lipaz > veya = lakkaz şeklinde sıralanmıştır. Buna göre lakkazların kaynatma amacıyla da kullanılabileceği ancak pektinazlar kadar verimli olmadığı görülmüştür (Pazarlıoğlu vd., 2005).

2.4.2. Atık Suların Renksizleştirilmesi

Azo, trifenil metan ve ftalosiyanın gibi farklı kromofor grupların varlığı, boyarmaddelerin yapısal çeşitliliğini sağlamaktadır. Görsel etki ve kimyasal oksijen ihtiyacı (COD) açısından etkilerinin yanı sıra çoğu sentetik boyarmaddeler, toksik, kanserojen ve genotoksik etkiler de göstermektedir. Mevcut atık su sistemleri ise, bu tip atıklardan inatçı boyarmaddeleri ve diğer organik kalıntıları tamamen uzaklaştırmakta yetersiz kalmaktadırlar (Ossola ve Galente, 2004). Boyama atık sularının arıtılması, adsorpsiyon, koagülasyon, oksidasyon, filtrasyon ve iyonlaştırıcı radyasyon gibi kimyasal ve fiziksel yöntemler gerektirmektedir. Bu yöntemlerin tümü farklı renksizleştirme yeteneğine, sermaye maliyetine ve operasyon hızına sahiptir. Bu yöntemler arasında koagülasyon ve adsorpsiyon yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bunlar büyük miktarlarda atığa yol açmaktadır. Bu nedenle biyolojik prosesler, düşük maliyet ve az çamur oluşturmaları nedeniyle giderek önem kazanmaktadır (Parshetti vd., 2007).

Mantarların katı veya sıvı faz olan iki farklı reaksiyon şekli ile kültürünün elde edilmesi sayesinde boyarmaddelerin renksizleştirilmesini ve iki temel renksizleştirme mekanizmasını (ekstraselular ve biyosorpsiyon) incelemek ve tekrarlı banyo kültürleriyle pratik uygulama olanaklarını doğrulamak amacıyla bir çalışma yapılmıştır.

Çalışmada altı ticari boyarmaddenin on değişik mantar yardımıyla renksizleştirilmesi üzerine çalışılmıştır. Yüksek konsantrasyondaki ticari boyarmaddelerin renksizleştirilebildiği ve bu sayede boyarmadde içeren atık suların arıtılması için bu yöntemlerin avantaj sağlayacağı ifade edilmiştir (Parshetti vd., 2007).

Myceliophthora thermophila'dan elde edilen lakkaz enzimi, epoksi grupları ile aktifleştirilmiş polimetakrilat esaslı polimerler üzerine kovalent olarak immobilize edilmiştir. Çalışmada, bu biyokatalizörlerin yüksek mekanik dayanıklılık ve suda şişmeme gibi özelliklerinin, tekstil sanayinde boyarmaddelerin renginin giderilmesinde uygulama açısından elverişli olduğu belirtilmiştir (Park vd., 2007).

2.4.3. Boya Giderimi

Beyaz çürükçül funguslar boya gideren mikroorganizmalar içinde en yoğun çalışılmış olanlardır. Endüstride sentetik boyalar boyama ve baskı işlemlerinde oldukça yaygın olarak kullanılırlar. Yıllık 10.000 çeşidin üzerinde boya ticari olarak 7x10⁵ tondan fazla üretilir ve yılda yaklaşık 50.000 ton deşarj edilir. Renk atıksularda çoğunlukla ilk fark edilen kontaminasyondur. Sudaki çok küçük miktardaki (10-50 mg/L) boya su yüzeyinin gaz çözünürlüğü ile gaz geçirgenliğini etkiler. En büyük boya grubunu oluşturan birçok azo boya çevrede anaerobik koşullarda kanserojen aminlere ayrışabilir.

Sentetik boyalar farklı ve kararlı yapılarından dolayı oluşan renklerine göre sınıflandırılır. Azo, antrakinin ve indigo belli başlı ticari boyalardır. Sentetik boyaların birçoğu mikrobiyal degradasyona karşı dirençlidir. Bu bileşikler başta tekstil, gıda, biyomedikal ve plastik endüstrileri olmak üzere birçok endüstride renklendirici olarak kullanılırlar. Birbirinden farklı kimyasal yapılarıdaki sentetik boyaların renginin giderilmesinde lakkaz, *Trametes Versicolor* tarafından sentezlenen en önemli ekstraselüler enzimdir. Antrakinin gibi bazı boyalar lakkaz için iyi substrattır ve renk giderimleri enzim aktivitesiyle orantılıdır (Kummanni vd., 2008).

2.4.4. Biyoremediasyon

Lakkaz, toksik fenolik bileşikleri gidermek için enzimatik oksidasyon yoluyla çözünmeyen kompleks yapılara çevirmede kullanılır. Kömür, petrol rafinerisi, organik kimyasalların üretimi, ve zeytinyağı üretimi gibi birçok endüstriyel prosesin atık sularında fenolik bileşikler bulunmaktadır.

Yapılan çalışmalar sonucunda immobilize lakkazın, fenol ve klorofenollü kirliliklerin gideriminde oldukça yararlı olduğu bulunmuştur (Zille, 2005).

Polimerik polifenol bileşikler, lakkaz katalizli oksidatif bağlanmayla genellikle suda çözünmezler. Böylece filtrasyon veya sedimentasyonla kolaylıkla ayrılabilirler. Endüstriyel atıksulardan fenoliklerin giderimi önemli bir problemdir, çünkü bu bileşiklerin çoğu toksiktir ve içme sularındaki varlıkları sağlık açısından tehlike arzeder. Fenolik kirleticiler fenoksi herbisitler gibi tarımsal aktivitelerden, kağıt veya kağıt hamuru işleyen endüstriyel proseslerden, petrokimyasallardan, boya sanayiden, diğer organik kimyasallardan veya tekstil endüstrilerinden kaynaklanabilir.

Atıksuların detoksifikasyonunda serbest enzimlerin kullanımını kısıtlayan temel nedenler: 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 (Bar, 2001). Lakkazın 2,4,6-triklorofenol'ün 2,6-dikloro-1,4-hidokinol ve 2,6-dikloro-1,4-benzokinona dönüşmesinden de sorumlu olduğu bulunmuştur (Leontievsky vd., 1997a).

2.4.5. Kağıt Hamurundan Lignin Giderimi

Ağaç, yapısında selüloz, hemiselüloz, hidrosifenil-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 fiberlerinin 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), klordioksit (ClO_2) ve ozon (O_3) eklenir. Ancak günümüzde klor kullanımı kanserojenik maddelerin oluşumuna neden olduğundan dolayı yasaklanmış, klordioksit kullanımına da çok sıkı sınırlamalar getirilmiştir. Bu nedenle yeni uygulamalar geliştirilmeye çalışılmaktadır. Beyaz çürükçül fungusların oksidatif enzimlerinin karışımı kullanılarak ligninin degradasyonu gerçekleştirilebilir. Ancak ligninin kompleks yapısından dolayı enzimle etkileşime girebilmesi için aracı (mediatör) bileşikler kullanılmalıdır (Riva, 2006).

2.4.6. Biyosensör

Biyosensör elektronik dönüştürücü içeren biyolojik komponentle bütünleşmiş bir probtur. Bu şekilde hazırlanan prob biyokimyasal veya fiziksel değişiklikler göz önüne alınarak biyokimyasal sinyalleri elektriksel değer olarak belirler ve kaydeder. Günümüzde lakkaz içeren birçok biyosensör, atıksuda aromatik aminler ve fenolik bileşiklerin belirlenmesinde kullanımı amacıyla geliştirilmektedir (Zille, 2005).

2.4.7. 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. Ayrıca mediatör varlığında veya yokluğunda , radikal akrilamid polimerizasyonunu indüklediği rapor edilmiştir. Lakkaz ek olarak lignin kraft kopolimerlerinin kemoenzimatik sentezi için de kullanılmaktadır. Daha yakın bir tarihte de odunsu bileşiklerin fonksiyonelliği ve çapraz bağlanması için bu enzimin potansiyeli olduğu keşfedilmiştir (Zille, 2005).

2.4.8. 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 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 (Zille, 2005).

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

Lakkaz biranın raf ömrünün arttırılmasında kullanılır. Birada, duman ve sis oluşumu mayalama endüstrisinde çok 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 (Riva, 2006).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Kullanılan Kimyasallar

Saf kültür elde edilmesi ve kültürün devamlılığının sağlanması için katı besiyerinde, enzim üretimi için sıvı besiyerinde, spektroskopik analiz için reaksiyon ortamında ve çöktürme işlemi kimyasal maddeler kullanılmıştır. Kullanılan kimyasallar Tablo 3.1'de verilmiştir.

Kullanılan Kimyasallar
ABTS
Potato dextrose agar
Malt ekstrakt agar
MgSO ₄ .7H ₂ O
KH ₂ PO ₄
FeSO ₄ .7H ₂ O
CaCl ₂ .H ₂ O
(NH ₄) ₂ SO ₄

Tablo 3.1 Kullanılan kimyasallar

3.1.1. Kullanılan Aletler

İnkübasyon için Sartorius marka çalkalamalı inkübatör kullanılmıştır.

Spektroskopik analiz için Philips PU 8740 UV/VIS. Spektrofotometre kullanılmıştır.

Sterilizasyon için Certoclav kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Mikroorganizmalar ve Kültürün Devamlılığı

Çalışmada kullanılan beyaz çürükçül olduğu düşünülen mantarlar Yıldız Teknik Üniversitesi Davutpaşa kampüsünden sonbahar aylarında çeşitli zaman aralıklarında toplanmıştır. Mantarların farklı yerlerinden alınan örnekler farklı saklama koşullarında bekletilerek saf kültür elde edilebilmesi için optimum şartlar bulunmaya çalışılmıştır.

3.1.2.1. Mikroorganizmalar

Davutpaşa kampüsünden toplanan 7 adet mantar bulunduğu doğal ortamda görüntülenmiştir. Çekilen resimler sayesinde mantarların familyası tespit edilmiştir. Tür tespiti, bir uzman tarafından mantarın koparılmadan doğada incelenmesi ile sağlanabilmektedir. Bu yüzden sadece mantarların familyaları bilinmektedir.

Makro görüntüleri çekilen mantarların, mikroskop görüntüleri de incelenmiştir. Ayrıca verimli bir mantar koleksiyonu hazırlanması için elde edilen saf kültürler de resimlendirilmiştir.

Mantarlar HM, A1, A2, A3, A4, A5, A6 olarak adlandırıldı.

3.1.2.2. Saf kültürün izole edilmesi

3.1.2.2.1. Katı Besiyeri

Doğadan toplanan mantarlardan saf kültürün izole edilmesi için iki farklı katı besiyeri kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda beyaz çürükçül mantarların kültür devamlılığı için çoğunlukla PDA ve MEA katı besiyeri kullanılmaktadır.

% 3,9 patatos dekstroz agar ve % 3 malt ekstrakt ve %2 agar agar kullanılarak PDA ve MEA katı besiyerleri hazırlanmıştır. 120⁰C'de 20 dakika sterilizasyon işleminden geçtikten sonra steril ortamda petrilere dökülmüştür. Bir gün bekletilen ve herhangi bir kontaminasyon olmadığı görülen petrilere ekime hazır hale gelmiştir.

3.1.2.2.2. Mantarlardan alınan örnekler

Doğadan toplanan mantarlar ilk önce üç farklı şekilde depolanmıştır. Her mantardan bir bölüm oda sıcaklığında , bir bölüm +4⁰C'de bir bölümü ise -18⁰C'de bir süre saklanmıştır.

Birkaç gün sonra bu farklı ortamlardan alınan örnekler PDA ve MEA besiyerlerine ekilmiştir. Farklı ortamda bekleyen her mantarın sap, şapka ve iç olmak üzere üç değişik bölgeden örnekler alınmıştır.

PDA ve MEA besiyelerine petrinin ortasına küçük bir parça koyarak ekim yapılmıştır.

3.1.2.2.3. İnkübasyon ve Saklama Koşulları

Genelde funguslar lakkaz üretimi için 25-30°C arasındaki sıcaklıklarda inkübasyonu uygundur. Ekim yapılan tüm petriler 27°C'de etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi beş ile yedi gün arasında değişmektedir. Uygun şekilde üreme sağlanan petriler +4°C'de saklanmıştır. Stok kültürler ayda bir olmak üzere katı besiyerine transfer edilerek devamlılık sağlanmıştır.

3.1.3. Sıvı Besiyeri

3.1.3.1. Besiyeri İçeriği

Beyaz çürükçül mantarların inkübasyonunda optimum koşulları belirlemek üzere iki farklı sıvı besiyeri kullanılmıştır. Farklı çalışmalardaki sıvı besiyerlerinde kullanılan iz elementlerin miktarları karşılaştırılarak optimum değerler belirlenmiştir.

İki besiyerinde de glukoz ve yeast ekstresi ortak kullanılmıştır. İki besiyeri arasındaki fark ise bir besiyerine iz elementler eklenirken diğerine eklenmemiştir.

İki farklı besiyeri iki farklı grup mantarın inkübasyonunda kullanılmıştır. Besiyeri içerikleri Tablo, Tablo 'de verilmiştir.

Besiyeri 1	
Kullanılan Madde	Miktar
Yeast Extract	4 gL ⁻¹
Malt Extract	10 gL ⁻¹
Glukoz	4 gL ⁻¹

Tablo 3.2 Sıvı besiyeri 1'in içeriği

Besiyeri 2	
Kullanılan Madde	Miktar
Yeast Extract	10 gL ⁻¹
Glukoz	10 gL ⁻¹
MgSO₄.7H₂O	1 gL ⁻¹
KH₂PO₄	2gL ⁻¹
FeSO₄.7H₂O	0,01 gL ⁻¹
CaCl₂.H₂O	0,1 gL ⁻¹

Tablo 3.3 Sıvı besiyeri 1'in içeriği

3.1.3.2. Besiyeri Sterilizasyonu

Hazırlanan besiyerleri 120⁰ C'de 20 dakika süre ile certoklavda steril edilmiştir.

3.1.3.3. pH

Hazırlanan 2 farklı sıvı besiyerinden birine pH ayarlaması yapılmamıştır. Fakat ikinci besiyerinin pH'ı 0.1 M sodyum-asetat tamponu ile 5.5 'a ayarlanmıştır.

3.1.3.4. Besiyerine Mantar Ekimi

Çalışmada kullanılan beyaz çürükçül mantarların etüvde 7 gün süre ile bekletilen petrilerdeki kültürlerden, otoklavda steril edilmiş ve oda sıcaklığına getirilmiş sıvı besiyerlerine ekim yapılmıştır.

Aktif olarak büyüyen kültürlerin bulunduğu petri kaplarından 10x10 mm büyüklüğünde parçalar koparılarak 100 ml'ye 2 adet olacak şekilde ekim yapılmıştır. 500 ml'lik erlenlerde bulunan 100 ml'lik sıvı besiyerleri 30⁰C sabit sıcaklıkta 135 rpm'de inkübe edilmiştir.

3.1.3.5. İnkübasyon Süresi

pH değeri 5.5'e ayarlanan ve kültür ekimi yapılan besiyerleri 30°C'de 8 gün boyunca inkübe edilmiştir. Her iki günde bir alınan örneklerin aktivite değerlerine bakılmıştır.

3.1.4. Lakkaz Enziminin Aktivite Tayini

Lakkaz enziminin aktivite tayini Bourbannis ve Paice tarafından belirlenen prosedüre göre yapılmıştır. Nonfenolik bir boya olan 2,2'-azinobis-bis-(3-ethylbenzthiazolinesulphonate); (ABTS), lakkaz tarafından oldukça stabil ve tercih edilen bir hal olan katyon radikale oksitlenir. Katyon radikalın oksitlenmesiyle oluşan mavi yeşil renk enzim aktivitesiyle doğru orantılıdır. Görünür bölgedeki bu renk yoğunluğu 415 ila 420 nm arasında spektrofotometrede okunur (48).

Lakkaz aktivitesinin belirlenmesinde ABTS substrat olarak kullanılmış ve bunun oksidasyonu sonucu oluşan renk UV spektrofotometrede ölçülmüştür.

Lakkaz aktivitesi ölçümünde ABTS konsantrasyonu 0.4 mM olacak şekilde 0.1 M sodyum asetat tamponu ile çözülerek hazırlanmıştır. 580 µl ABTS çözeltisi, 20 µl süpernatant olacak şekilde 600 µl reaksiyon karışımı elde edilmiştir. Reaksiyon karışımı 40°C'de 45 dakika olmak üzere inkübasyonu sağlanmıştır. Ve bu süre sonunda oluşan mavi rengin absorbansı 420 nm 'de ölçülerek aktivite tayin edilmiştir.

Aktivite hesaplanırken kullanılan formül şöyledir:

$$U/ml = 2 \left(\frac{V}{v \times \epsilon \times d \times \Delta A \cdot \text{min}^{-1}} \right)$$

$$U/ml = 2 \left(\frac{0.6}{0.02 \times 36 \times 1 \times \Delta A \cdot \text{min}^{-1}} \right)$$

$$= 1.667 \times \Delta A \cdot \text{min}^{-1},$$

V: toplam reaksiyon hacmi (ml)

v: enzim hacmi (ml)

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

d: ışın yolu (cm)

Δ : absorbans deęiřimi

t: süre (dakika)

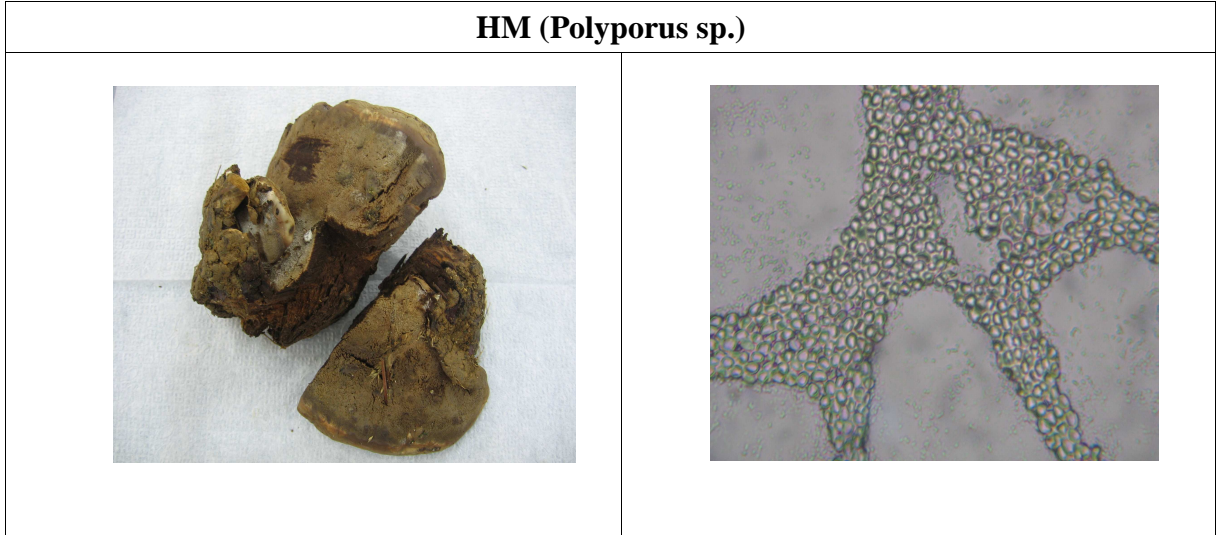
4. SONUÇLAR

4.1. Lakkaz Üretimi için Kültür Koşullarının Optimizasyonu

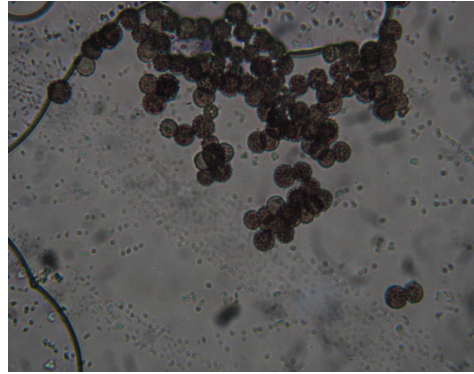
4.1.1. Farklı Fungus Örnekleri ve Kültür İzolasyonu

Doğal ortamdan toplanan beyaz çürükçül mantarların koleksiyonu yapılmıştır. 7 adet mantar makro ve mikro resimlendirilerek familyaları belirlenmiştir.

Aşağıda tüm mantarların makro görüntüleri, mikroskopik görüntüleri ve petri görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.1 HM mantarı makroskopik ve mikroskopik görüntüsü

A1 (Polyporus sp.)

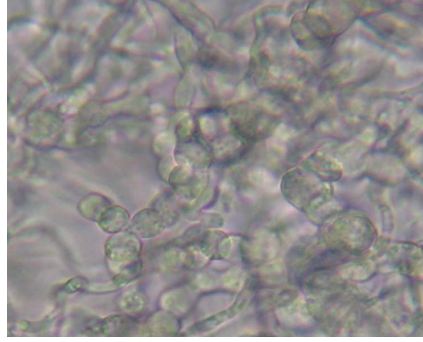
Şekil 4.2 A1 mantarı makroskobik ve mikroskobik görüntüsü

A2 (Bilinmiyor)

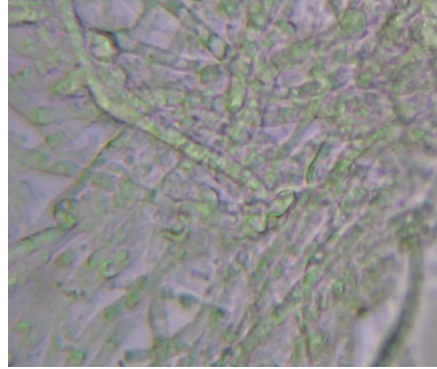
Şekil 4.3 A2 mantarı makroskobik ve mikroskobik görüntüsü

A3 (Bilinmiyor)

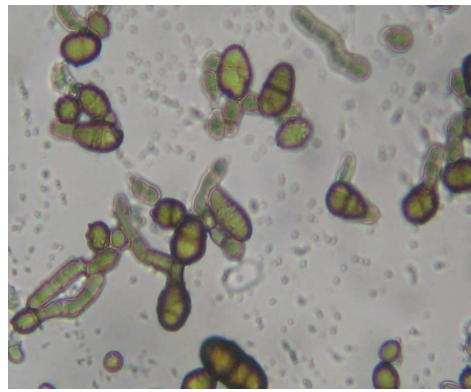
Şekil 4.4 A3 mantarı makroskobik ve mikroskobik görüntüsü

A4 (Polyporus sp.)

Şekil 4.5 A4 mantarı makroskopik ve mikroskopik görüntüsü

A5 (Polyporus sp.)

Şekil 4.6 A5 mantarı makroskopik ve mikroskopik görüntüsü

A6 (Mycena sp.)

Şekil 4.7 A6 mantarı makroskopik ve mikroskopik görüntüsü

4.1.1.1. Örnek bölgeleri

Mantarların farklı bölgelerinden alınan örnekler PDA ve MEA katı besiyerlerine ekilmiştir. Farklı bölgelerden ekim yapılmasının amacı mantarın saf kültürünün hangi bölgeden alınan örneklerle daha az kontaminasyonla ve daha aktif olarak elde edildiğini belirleyebilmektir.

Mantarlar doğadan toplandıktan sonra örnekler, steril eldivenlerle ve alevde steril edilen aletlerle elde edildi. Ve kalan mantarlar da boş petri kutularında uygun saklama koşullarında yine kullanılmak üzere saklandı.

Tablo 4.1'de gösterildiği gibi her bir mantarın iç, dış, şapkaüstü ve şapka altı olmak üzere 4 farklı bölgesinden örnekler alınmıştır. Ve mantarın şekline göre alınan bölgelerden elde edilen üreme değişmektedir.

HM, A1, A4 gibi ağaçtan çanak şeklinde büyüyen mantarlarda iç, şapka altı ve şapka üstü kısımlarından alınan örneklerden verimli üreme elde edilmiştir. Mantarın dış yüzeyinden alınan örneklerden yapılan ekimlerde çok fazla kontaminasyon olduğu gözlemlenmiştir ve saf kültürün izole edilmesi mümkün olmamıştır. Mantarın dış yüzeyinin çevre ile çok fazla temas halinde olması onu kontaminasyona açık hale getirmektedir ve bu yüzden de petride çok farklı organizmalar üremektedir. Mantarların iç bölgeleri çevre ile temas etmediği için buradan gelecek yabancı mikroorganizmalardan korunmaktadır. Ayrıca oldukça steril bir ortamda mantar bölünerek içinden, şapka altı ve şapka üstünden örnekler alındığı için kontaminasyon riski de oldukça azaltılmıştır.

A2 ve A3 gibi ağacın kovuğundan alınan mantarlarda sadece mantarın içinden alınan örnekte üreme görülmüştür. Bunun sebebi de mantarların bir çanak veya şapka gibi çıkıntılarının çok az olması ve bu bölgelerden uygun örnekler alınamamasıdır. Yine mantarın dışı ağaç ve çevre ile temas halinde olduğu için uygun üreme gözlemlenememiştir.

Çimlerden toplanan A6 mantarının da içinden ve şapkasının altında bulunan lamellerden alınan örneklerde az kontaminasyonlu ve aktif üreme gözlenmiştir.

	İç	Dış	Şapkaaltı	Şapkaüstü
HM	+	-	+	+
A1	+	-	+	+
A2	+	-	-	-
A3	+	-	-	-
A4	+	-	+	+
A5	+	-	+	-
A6	+	-	+	-

Tablo 4.1 Mantarlardan alınan örnek bölgelerinden elde edilen üremeler

4.1.1.2. Saklama koşulları

Mantarlar doğadan toplandığı için yüksek kontaminasyon riski mevcuttur. Bu yüzden mantarın üzerinde var olan farklı organizmaların yarattığı riski azaltabilmek için mantarlar +4°C, -18°C ve oda sıcaklığında saklanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.2'de verilmiştir.

	Taze	+4 C	- 18 C
HM	-	+	-
A1	+	-	+
A2	-	+	-
A3	+	+	-
A4	+	-	+
A5	+	-	-
A6	+	-	+

Tablo 4.2 Mantarlardan alınan örneklerin saklama koşullarına göre elde edilen üremeler

Sonuçlara göre taze olarak ekilen mantarlar daha verimli üremişlerdir. +4°C'de ve -18°C'de saklandıktan sonra ekilen örneklerin çoğunluğu ya hiç ürememiştir ya da kontaminasyona maruz kalmıştır. Bu da saf kültürün izolasyonunu zorlaştırmıştır.

Lakkaz enzimi üretiminde kullanılan ve en fazla aktiviteyi gösteren A1 ve A4 mantarlarının kültür izolasyonu tazeyken yapılmış ekimlerden sağlanmıştır.

4.1.1.3. Katı besiyerleri

Kullanılan beyaz çürükçül mantarların iki farklı besiyerine ekilerek hangisinde daha aktif ve daha az kontaminasyonla ürediği tespit edilmiştir. Tablo 4.3'de görüldüğü üzere hemen tüm mantarlarda PDA katı besiyerinde verimli olarak üremişlerdir. Fakat MEA'da üreme yok denecek kadar azdır. Varolan üremelerin büyük bir kısmı da kontaminasyona maruz kalmıştır.

	MEA	PDA
HM	-	+
A1	-	+
A2	-	+
A3	+	+
A4	-	+
A5	-	+
A6	-	+

Tablo 4.3 Mantarlardan alınan örneklerin farklı katı besiyerlerinde elde edilen üremeler

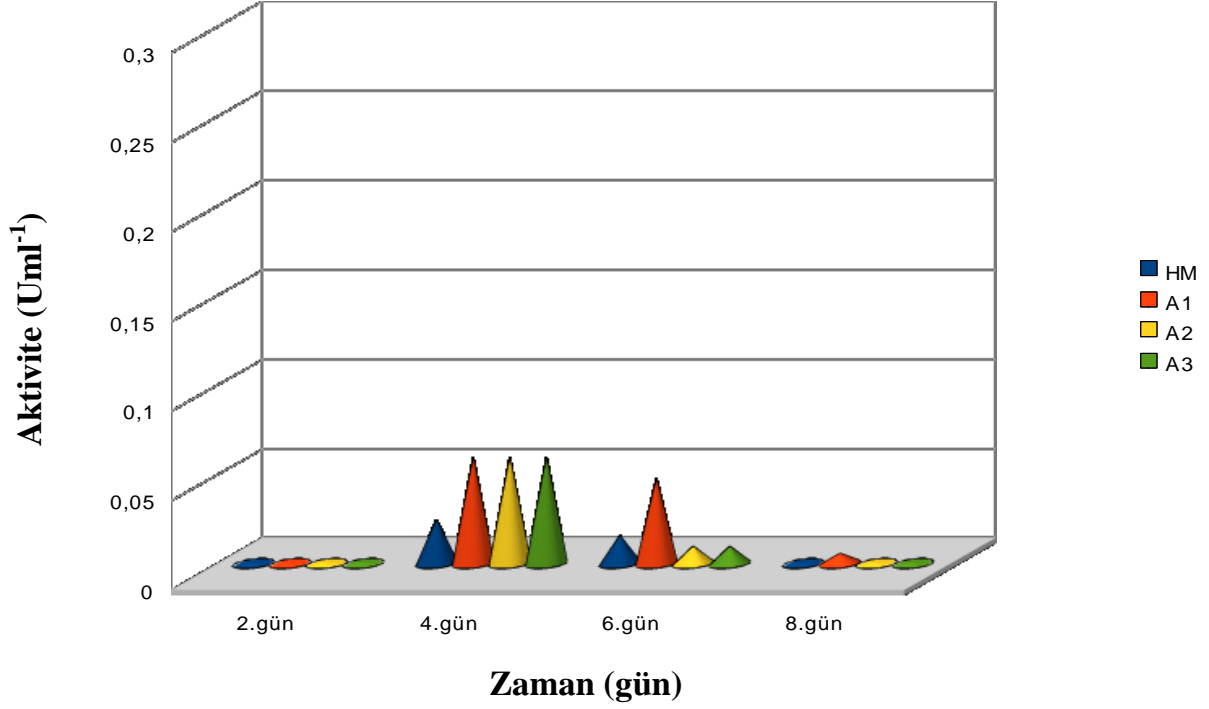
4.2. Farklı besiyerlerinin lakkaz üretimine etkisi

İz elementler, mikroorganizmaların gelişme ve üreme evrelerinde oldukça önemli bir etkiye sahip olduğundan besiyerinde bulunmaları fungusun büyümesi ve enzim üretmesi için gereklidir. Bu durumu gözlemlemek için iz elementler içeren ve içermeyen iki farklı besiyeri hazırlanıp enzim üretimine etkisi karşılaştırılmıştır.

4.2.1. Besiyeri 1

İz elementler içermeyen Besiyeri 1'e dört farklı mantar ekilmiştir ve sabit pH'da (pH: 5.5) 8 gün inkübe edilmiştir. Şekil 'de görüldüğü gibi A1 mantarında en yüksek enzim üretimi 4. günde gözlemlenmiştir. A2 ve A3 mantarlarında 8 gün boyunca çok düşük aktivite elde edilmiştir. Ve HM mantarı da A1'e göre az enzim üretmiştir.

Besiyeri 1'de iz elementler olmamasına rağmen A1 mantarının enzim ürettiği dikkat çeken noktadır ve bu yüzden A1 mantarı daha sonra iz elementler içeren Besiyeri 2'de tekrar inkübe edilip aktivitesine bakılmak üzere ayrılmıştır.



Şekil 4.8 HM, A1,A2,A3 mantarlarının besiyeri 1'de inkübasyonu sonucu 8 günlük lakkaz aktivitesi

4.2.2. Besiyeri 2

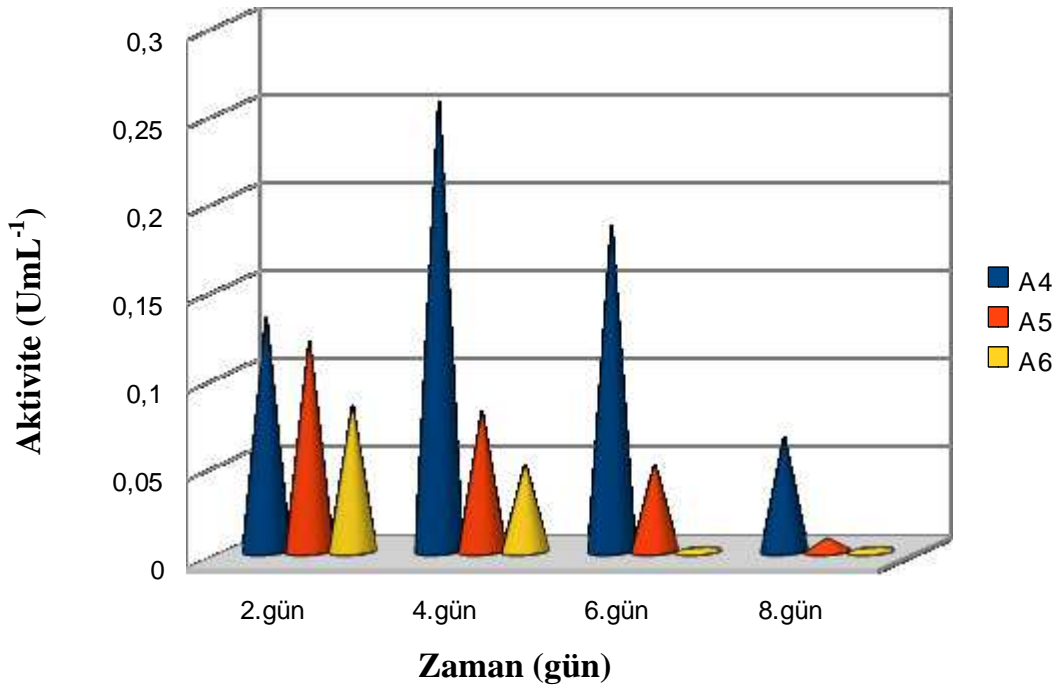
İz element içeren Besiyeri 2'ye üç adet mantar ekilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi her üç mantarda da enzim aktivitesi Besiyeri 1'e oranla daha yüksektir.

Glukoz değerinin artması ve iz elementlerin varlığı mantarların ürettiği enzimin artmasında büyük rol oynamıştır.

A5 ve A6 mantarlarında en yüksek aktivite 2. gün görülürken 4. gün azalıp 6 ve 8. gün en alt düzeye inmiştir.

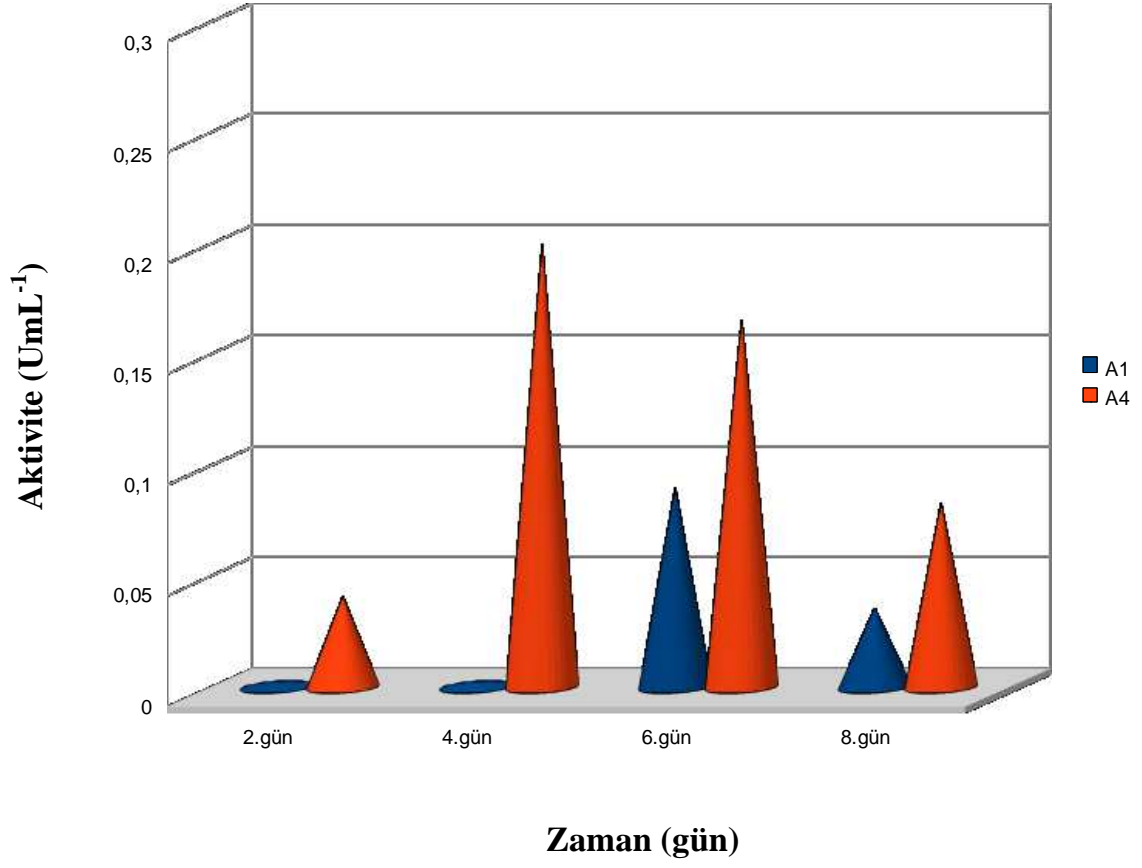
A4 mantarı ise tüm mantarlar arasında en yüksek aktiviteye sahip mantardır. A4 mantarı 4. günde en yüksek seviyeye ulaşmış 6. ve 8. günlerde orantılı biçimde düşüş göstermiştir.

A4 mantarı bir önceki mantar grubunda en yüksek aktiviteye sahip A1 mantarı ile karşılaştırılmak ve hangi mantarın kısmi olarak saflaştırılacağına karar vermek üzere ayrılmıştır.



Şekil 4.9 A4,A5,A6 mantarlarının besiyeri 2'de inkübasyonu sonucu 8 günlük lakkaz aktivitesi

Besiyeri 1'de inkübe edilip en yüksek aktivite gösteren A1 mantarı ile Besiyeri 2'de inkübe edilip en yüksek aktivite gösteren A4 mantarları karşılaştırılmak için Besiyeri 2'de tekrar inkübe edilmiştir. Koşullar tamamen aynı tutularak iki mantar tekrar 8 gün inkübe edilmiştir. Ve elde edilen değerlerde A4 mantarının yine en yüksek aktiviteyi gösterdiği görülmektedir. A4 mantarı 4.günde en yüksek aktiviteyi gösterirken A1 mantarı daha düşük bir aktivite göstermektedir.



Şekil 4.10 A1,A4 mantarlarının besiyeri 2'de inkübasyonu sonucu 8 günlük lakkaz aktivitesi

5. TARTIŞMA

Lignini verimli olarak mineralize edebilen tek organizma beyazçürükçül mantarlar ve buna bağlı olarak atık ayrıştırıcı mantarlardır (Kirk ve Cullen., 1998). Beyaz çürükçül mantarlar Basidiomycetes sınıfına ait heterojen bir gruptur. Farklı beyaz çürükçül mantarlar, odunsu dokulardaki karbonhidrat ve lignini göreceli olarak farklı düzeylerde indirgerler (Blanchette., 1995).

Lignin parçalayan funguslardan *Phanerochaete crysosporium* ve *Trametes versicolor* en çok çalışılmış funguslardır. Ligninolitik basidiomycete *Phanerochaete crysosporium*'un lignini oldukça iyi degrade ettiği bulunmuştur ve ligninin biyolojik parçalanmasının fizyolojik gereksinimlerinin çalışılması için model organizma olarak kullanılmıştır. *Trametes versicolor* oldukça fazla çalışılmış ve önemli miktarda lakkaz salgılayan bir diğer beyaz çürükçül fungustur. *Corolius versicolor* ve *Polyporus versicolor* olarakta bilinmektedir. *Phanerochaete crysosporium*'a benzer şekilde *Trametes versicolor*'da lignin peroksidaz ve mangan peroksidaz enzimlerini salgılar (Call ve Mucke., 1997).

Ligninolitik aktiviteler ve atık ayrıştırıcı basidiomycete mantar enzimleri henüz çok az çalışılmıştır. *Agaricus bisporus* ve *Stropharia rugosoannulata* gibi atık ayrıştırıcı mantarların başlıca ligninolitik enzimleri lakkaz ve MnP'dır. Bir çalışmada lakkazın *Marasmius quercophilus* tarafından üretilen tek ligninolitik enzim olduğu belirlenmiştir (Thurston., 1994).

Lele ve arkadaşları (Lele ve Revankard., 1994), etkili bir şekilde lakkaz üreten *Trametes versicolor* MTCC 138 suşu endüstriyel olarak önemli olduğunu belirten bir çalışma yapmışlardır. Farklı besiyeri bileşenlerinin lakkaz üretimine etkisi orthogonal düzenleme metoduyla optimize edilmiştir. Azot kaynağı olan maya ekstraktı, karbon kaynağı olarak nişasta ve glikoz kullanıldığında aktivitenin (305 Uml^{-1}) iki kat arttığı bulunmuştur. Optimize edilmiş besiyerine 1mM bakır ilavesi yapıldığında da aktivite 406 Uml^{-1} değerine ulaşmıştır. Aynı konsantrasyonda farklı aromatic bileşikler kullanıldığında da aktivitede oldukça büyük artışlar kaydedilmiştir.

Lorenzo ve arkadaşları (Lorenzo vd., 2005), *Trametes versicolor* kültürlerindeki aktiviteyi activator olarak ağır metaller kullanılmasıyla indüklenmesine çalışmıştır.

Cd^{2+} , Ag^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} ve Cu^{2+} metallerinin ilavesi karşılaştırıldığında sadece Cu^{2+} metalinin lakkaz aktivitesini arttırdığını bulmuştur. Bakır metalinin aktiviteyi 12 kat kadar büyük bir oranda arttırdığı rapor edilmiştir. Bu aktivite artışı da tekstil boyası olan İndigo Karmen boyasının lakkaz tarafından yıkımında önemli rol oynayan bir faktör olduğu bulunmuştur.

Bu çalışmada Yıldız Teknik Üniversitesi Davutpaşa kampüsünden çeşitli zamanlarda toplanan ve beyaz çürükçül olduğu tahmin edilen mantarlardan saf kültürler elde edilmesi ve bu mantarların lakkaz üretiminin araştırılması hedeflenmiştir.

Toplanan mantarların tanımlanması için mikolog Jilber Barutçıyan'dan yardım alınmıştır ve çekilen resimlerden bazı mantarların familyaları tanımlanmıştır.

Mantar türlerinin resimlerden tanımlanması oldukça zordur. Mantarın bulunduğu ağacın türü, toplandığı mevsim, sapının toprak ile teması veya ağaç ile birleştiği nokta, kokusu, kesildiği veya kırıldığı anda salgıladığı sıvı, kesit alındığında değiştirdiği renk ve bunun gibi birçok farklı faktörden dolayı mantarlar ancak uzman kişilerce ve bulunduğu ortamda sağlıklı tanımlanabilmektedir.

Çalışmanın devamında toplanan mantarların çeşitli bölgelerinden alınan ve farklı saklama koşullarına maruz bırakılan örneklerden elde edilen lakkaz aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Mantarın iç, dış, şapkaüstü ve şapka altı olmak üzere 4 farklı bölgesinden örnekler alınmıştır ve ağaçtan çanak şeklinde büyüyen mantarlarda iç, şapka altı ve şapka üstü kısımlarından alınan örneklerden verimli üreme elde edilmiştir. Mantarın dış yüzeyinden alınan yani ağaç ve çevre ile temas halinde olan örneklerden yapılan ekimlerde çok fazla kontaminasyon olduğu gözlemlenmiştir fakat oldukça steril bir ortamda mantar bölünerek içinden, şapka altı ve şapka üstünden örnekler alındığı takdirde kontaminasyon riski de oldukça azaltılmıştır.

Saklama koşullarına göre üremeyi karşılaştırdığımızda taze olarak ekilen mantarların daha verimli üredikleri görülmüştür. $+4^{\circ}C$ 'de ve $-18^{\circ}C$ 'de saklandıktan sonra ekilen örneklerde kontaminasyondan dolayı saf kültürün izolasyonunda zorlanılmıştır. Ve en verimli üremenin PDA katı besiyerinde olduğu gözlemlenmiştir.

Yedi adet mantar arasında sıvı besiyerlerinde inkübasyonları sonucu en yüksek lakkaz aktivitesini *Polyporus sp. A4* mantarı göstermiştir.

Diğer mantarlar 8 günlük inkübasyon sonucu oldukça düşük aktivite gösterirlerken, farklı denemelerde orantılı sonuçlar da gözlemlenememiştir. Ayrıca sıvı besiyerine katılan iz elementler sayesinde mantarın aktivitesi de arttırılmıştır.

Devam eden çalışmalarda beyaz çürükçül mantarlardan elde edilen lakkazın çeşitli maddelerle indüksiyonu, optimizasyonu ve saflaştırılıp nitelendirilmesi sağlanacaktır.

Saflaştırılan lakkaz enzimi lignin biyodegradasyonu ve renk giderimi amacı ile tekstil endüstrisinde kullanılabilir. Ayrıca farklı sektörlerde atık suların renksizleştirilmesi, ağartma, denim yıkama, biyosensör, organik sentez, şarap ve bira stabilizasyonunda da lakkaz enzimi aktif olarak kullanılabilen bir enzimdir.

KAYNAKLAR

Akhtar, M., Attridge, M.C., Myers, G.C., Kirk, T.K., Blanchette, R.A. (1992), "Biomechanical Pulping of Loblolly Pine with Different Strains of the White Rot Fungus *Ceriporiopsis subvermispora*", TAPPI J. 75,105-109.

Ander, P. And Messner, K. (1998). "Oxidation Of 1-Hydroxybenzotriazole By Laccase And Lignin Peroxidase". *Biotechnology Techniques*, 12: 191-195.

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.

Archibald, F., Roy, B. (1992) "Production Of Manganic Chelates By Laccase From The Lignin- Degrading Fungus *Trametes Versicolor*", *Appl.Environ.Microbiol.* 58,1496-1499.

Archibald, F.S., Bourbannis, R., Jurasek, L., Paice, M.G. & Reid, I.D.(1997), "Kraft Pulp Bleaching and Delignification by *Trametes vesicolor*", *J. Biotechnol.* 53:215-236.

Arda, M., (2000), "Temel Mikrobiyoloji" *Medisan Yayın Serisi No:46.*

Argyropoulos, D.S., Menachem, S.B. (1997), "Lignin, in: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*", pp.127-158. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.

Audesirk, T., Audesirk, G., Byers, B.E. (2008), *Biology: Life on Earth*. Pearson International Edition, NewYork.

Auterinen A-L, (2006), "White Biotechnology & Modern Textile Processing", *Textile World*, May/June, Pp. 40–44.

Banci, L. (1997) "Structural Properties Of Peroxidases", *J. Biotechnol.*53,253-263.

Banci, L., Ciofi-Baffoni, S., Tien, M. (1999), "Lignin and Manganperoksidaz Catalyzed Oxidation of Phenolic Lignin Oligomers", *Biochemistry*, 38:3205-3210.

Bao, W., Fukushima, Y., Jensen Jr., K.A., Moen, M., Hammel, K.E. (1994) "Oxidative Degradation Of Non-Phenolic Lignin During Lipid Peroxidation By Fungal Manganese Peroxidase", FEBS Lett. 354,297-300.

Bao, W., O'Malley, D.M., Whetten, R., Sederoff, R.R. (1993), "A Laccase Associated with Lignification in Loblolly Pine xylem", Science 260,672-674.

Bar, M. (2001), "Kinetics and Physico-Chemical Properties of White- Rot Fungal Laccases" Magister Scientiae, In the Faculty of the Requirements for the Degree.

Basto C., Tzanov T., And Cavaco-Paulo A., (2007), "Combined Ultrasound-Laccase Assisted Bleaching Of Cotton", Ultrasonics Sonochemistry,14, Pp. 350–354.

Beilen, J., Li, Z. (2002), "Enzyme Technology: an Overview" Current Opinion in Biotechnology, 13: 338-344.

Blanchette, R.A. (1984a) "Screening Wood Decayed by White Rot Fungi for Preferential Lignin Degradation", Appl. Environ.Microbiol.47,647-653.

Blanchette, R.A. (1984b), "Manganese Accumulation in Wood Decayed by White Rot Fungi", Phytopathology 74, 153-160.

Blanchette, R.A. (1995) "Degradation of the Lignocellulose Complex in Wood", Can.J.Bot. 73 (Suppl.D), S999-S1010.

Bollag, J.M., Leonowicz, A. (1984), "Comparative Studies of Extracellular Fungal Laccases", Appl.Environ. Microbiology.48,849-854.

Bourbannis, R., Paice, M.G.(1990), "Oxidation of Nonphenolic Substrates. An Expanded role for Laccase in Lignin Biodegradation", FEBS Lett.267,99-102.

Bourbannis, R., Paice, M.G., Freiermuth, B., Bodie, E., Borneman, S. (1997a), "Reactivities of Various Mediators and Laccases with Kraft Pulp and Lignin Model Compounds", Appl.Environ.Microbiol. 63,4627-4632.

Bourbannis, R., Paice, M.G., Reid, I.D., Lanthier, P., Yaguchi, M.(1995), "Lignin Oxidation by Laccase Isozymes from *Trametes versicolor* and Role of the Mediator ABTS in Kraft Lignin Depolymerization", *Appl. Environ.Microbiol.* 61,1876-1880.

Bourbonnais, R., Paice, M.G., Leech, D. and Freiermuth, B. (1997b). "Reactivity And Mechanism Of Laccase Mediators For Pulp Delignification", *Tappi Proceedings*: 335-338.

Bumpus, J.A., Aust, S.D., (1987) "Studies On The Biodegradation Of Organopollutants By A White Rot Fungus", *International Conference On New Frontiers For Hazardous Waste Management*, 1985, 404-410.

Buswell, J.A., Odier, E.(1987) "Lignin Biodegradation" *CRC Crit.Rev. Biotechnology.* 6,I-60.

Cai, D., Tien, M. (1989) "On The Reactions Of Lignin Peroxidase Compound III (Isozyme H8)", *Biochem. Biophys. Res.Commun.* 162,464-469.

Call, H.P., Mucke, I. (1994) "State Of The Art Enzyme Bleaching and Disclosure of a Breakthrough Process" *Lignozym Gmbhl.*

Call, H.P, Mucke, L., (1997). "History, Overview and Applications of Mediated Lignolytic Systems, Especially Laccase-Mediator-Systems (Lignozym process)". *J. Biotechnol.*, 53: 163-202.

Carlile, M.J., Watkinson, S.C., (2000) " *The Fungi* " Academic Press, London.

Claus, H (2004), "Laccases: Structure, Reactions, Distribution", *Micron.*35:93-96.

Collins, P.J., Dobson, A.D.W., Field, J.A. (1998) "Reduction of the ABTS Cation Radical by Physiological Organic Acids in the Absence and Presence of Manganese", *Appl.Environ.Microbiol.* 64, 2026-2031.

Cowling, E.B. (1961) "Comparative Biochemistry of Decay of Sweetgum Sapwood by White rot and Brown Rot Fungi", *USDA Techn. Bull.No.1258*, I-79.

D' Souza, T.M., Merritt, C.S., Reddy, C.A. (1999), "Lignin-modifying Enzymes of the White Rot Basidiomycete *Genoderma Lucidium*", *Appl. Environ. Microbiol.* 65,5307-5313.

Dedeyan, B., Klonowska, A., Tagger, S., Tron, T., Iacazio, G. et al. (2000), "Biochemical and Molecular Characterization of a Laccase from *Marasmius quercophilus*", *Appl. Environ. Microbiol.* 66,925-929.

Dittmer, J.K., Patel, N.J., Dhawale, S.W., Dhawale, S.S. (1997), "Production of Multiple Laccase Isoforms by Phanerochaete *Chrysosporium* Grown Under Nitrogen Sufficiency", *FEMS Microbiol. Lett.* 149,65-70.

Ducros, V., Brzozowski, A.M., Wilson, K.S., Brown, S.H., Ostergaard, P. et al. (1998), "Crystal Structure of the Type-2 Cu Depleted Laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 Å Resolution", *Nature Struct. Biol.* 5, 310-316.

Edwards, S.L., Raag, R., Wariishi, H., Gold, M.H., Poulos, T.L. (1993) "Crystal Structure Of Lignin Peroxidase", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90,750-754.

Eggert, C., Temp. U., Dean, J.F.D., Eriksson, K.E.L. (1995) "Laccase-Mediated Formation of the Phenoxazinone Derivate, 3-Hydroxanthranilic Acid", *FEBS Lett.* 376,202-206.

Eggert, C., Temp. U., Dean, J.F.D., Eriksson, K.E.L. (1996a), "A Fungal Metabolite Mediates Degradation of Non-Phenolic Lignin Structures and Synthetic Lignin by Laccase", *FEBS Lett.* 391,144-148.

Eggert, C., Lafayette, P.R., Temp, U., Eriksson, K.E.L., Dean, J.F.D. (1998), "Molecular Analysis of a Laccase Gene from the White Rot Fungus *Pycnoporus cinnabarinus*", *Appl. Environ. Microbiol.* 64,1766-1772.

Eggert, C., Temp, U., Eriksson, K.-E.L. (1997), "Laccase is Essential for Lignin Degradation white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*", *FEBS Lett.* 407,89-92.

English, A.M., Tsaprailis, G. (1995), "Catalytic Structure- Function Relationship In Heme Peroxidases". *Adv.Inorg.Chem.* 43:79-125.

Eriksson , K.E.L. Blanchette, R.A. Ander, P. (1990), "Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components". Berlin Heidelberg:Springer-Verlag.

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.

Farrell, R.L., Murtagh, K.E., Tien, M., Mozuch, M.D., Kirk, T.K. (1989) "Physical And Enzymatic Properties Of Lignin Peroxidase Isoenzymes From *Phanerochaete Chrysosporium*", *Enzyme Microb. Technol.* 11,322-328.

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.

Fengel, D., Wegener, G.(1989) "Wood. Chemistry, Ultrastructure Reactions". Berlin:Walter De Gruyter.

Gellerstedt, G., Northy, R.A., (1989), " Analysis of Birch Wood Lignin by Oxidative Degradation" , *Wood Sci. Technol.*, 23:75-83.

George, S.J. Kvratskhelia, M., Dilworth, M.J. 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.

Gerini, M.F., Roccatano, D., Baciocchi, E., Di Nola, A. (2003) "Molecular Dynamics Simulations Of Lignin Peroxidase In Solition. *Biophys*". *J.* 84: 3883-3893.

Gilbertson, R.L. (1980) "Wood Rotting Fungi of North America", *Mycologia* 72, I-49.

Glenn, M., Gold, M. (1985) "Purification And Characterization Of An Extracellular Mn(II)-Dependent Peroxidase From The Lignin-Degrading Basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*". *Fems Microbiol. Lett.* 29:37-41.

Gold, M.H., Alic, M. (1993), "Molecular Biology of the Lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*", *Microbiol.Rev.* 57,605- 622.

Hatakka, A., (1994), "Lignin-Modifying Enzymes From Selected White Rot Fungi: Production And Role In Lignin Degradation". *Fems Microbol. Rev.* 13:125-35.

Hatakka, A., (2001) "Biodegradation Of Lignin. Lignin, Humic Substances And Coal". Weinheim, Germany:Wiley-Vch. 1:129-180.

Hatakka, A., Lundell, T.K. Tervila-Wilo, A.L.M., Brunow, G. (1991) "Metabolism Of Nonphenolic B-O-4 Lignin Model Compounds By White Rot Fungus *Phlebia radiata*", *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36,270-277.

Hatakka, A., Uusi-Rauva, A.K. (1983) Degradation of C-labeled poplar wood lignin by selected white-rot fungi, *Eur.J. Appl.Microbiol.Biotechnol.*17, 235-242.

Heather, A. Vandertol-Vanier (2000) The Role of laccase from *Corlopsis gallica* in polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism.

Heinfling, A., Martinez, M.J., Martinez, 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

Hough, M.A., Hall, J.F., Kanbi, L.D.&Hasnain, S.S. (2001) *Acta. Crystallogr.Sect.D.Biol.Crystallogr.*57:355-360.

Howes, B.D., Feis A., Raimondi, L., Indiani, C., Smulevich G. (2001) "The Critical Role Of The Proximal Calcium Ion In The Structural Properties Of Horseradish Peroxidase". *J.Biol. Chem.* 276:40704-40711.

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.

Jönsson, L., Saloheimo, M., Penttilä, M. (1997), "Laccase from the White Rot Fungus *Trametes versicolor*: cDNA Cloning of *Lcc1* and Expression in *Pichia pastoris*", *Curr.Genet.* 32,425-430.

Kaarik, A. (1965), "The Identification of the Mycelia of Wood-decay Fungi by Their Oxidation Reactions with Phenolic Compounds", *Stud. For. Suec.* 31,I-79.

Kapdan, I., Kargı, F., McMullan, G., Et. Al.,(2000)“Comparison Of White Rot Fung Cultures For Decolorization Of Textile Dyestuffs”, *Bioprocess Engineering*, 22, 347-351, 2000.

Kapich, A., Hofrichter, M., Vares, T. , Hatakka, A. (1999). “Coupling Of Manganese Peroxidase-Mediated Lipid Peroxidation With Destruction Of Nonphenolic Lignin Model Compounds And C14 Labeled Lignins”, *Biochem. Biophys. Rescommun.* 259,212-219.

Kawai, S., Nakagawa,M., Ohashi, H. (1999), "Aromatic ring cleavage of a nonphenolic *b*-O-4 Lignin Model Dimer by Laccase of *Trametes versicolor* in the Presence of 1-hydroxybenzotriazole", *FEBS Lett.* 446,355-358.

Kirk, O., Borchert, T.V., Fuglsang, C.C. (2002), "Industrial Enzyme Applications" *Current Opinion In Biotechnology*, 13: 345-351.

Kirk, T.K., Cullen, D. (1998) "Enzymology and Molecular Genetics of Wood Degradation by White Rot Fungi, in: *Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry*" (Young, R.A., Akhtar, M., Eds.), pp.273-307. New York: John Wiley&Sons.

Kirk, T.K., Farrel, R.L. (1987), "Enzymatic combustion": The Microbial Degradation of Lignin", *Annu.Rev.Microbiol.* 41,465-505.

Kirk, T.K., Tien, M., Kersten, P.J., Mozuch, M.D., Kalyanaraman, B.(1986) “Ligninase Of *Phanerochaete Chrysosporium*. Mechanism Of Its Degradation Of The Nonphenolic

Arylglycerol B-Aryl Ether Substructure Of Lignin”, *Biochem.J.* 236,279-287.

Kumanneni A., Ghazi I., Camarero S., Ballesteros A., Plou F.J., And Alcalde M., (2008), “Decolorization Of Synthetic Dyes By Laccase Immobilized On Epoxy-Activated Carriers”, *Process Biochemistry*, 43, Pp.169–178.

Kuwahara, M., Glenn, J., Morgan, M., Gold, M. (1984) “Separation And Characterization Of Two Extracellular H₂O₂ Dependet Oxidases From Ligninolytic Cultures Of *Phanerochaete Chrysosporium*”. *Febs. Lett.* 169:247-250.

Lai, Y.-Z. (1992), " Determination of Phenolic Hydroxyl Groups, in: *Methods in Lignin Chemistry* " (Lin, S.Y, Dence, C.W., Eds.), pp.423-434. Berlin: Springer-Verlag.

Lamar, R.T., Glaser, J.A., Kirk, T.K. (1992), "White Rot Fungi in the Treatment of Hazardous Chemicals and Wastes, in: *Frontiers of Industrial Mycology*", pp.127-143. New York: Chapman and Hall.

Leobtievsky, A., Myasoedova, N., Pozdnyakova, N., Golovleva, L. (1997b), "Yellow Laccase of *Panus Tigrinus* Oxidizes Non-phenolic Substrates without Electron-transfer Mediators", *FEMS Lett.* 413,446-448.

Leontievsky, A., Vares, T., Lankinen, P., Shergill, J.K., Pozdnyakova, N.N. Et al. (1997a), "Blue and Yellow Laccases of Ligninolytic Fungi", *FEMS Microbiol.Lett.* 156,9-14.

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.* 65,2654-2660.

Lorenzo, M., Moldes, D., Sanroma, M.A., (2005), “Effects of Heavy Metal on the Production of Several laccase Isoenzymes by *Trametes versicolor* and their Ability to Decolourise Dye”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90,750-754.

- Lundell, T., Hatakka, A. (1994) "Participation Of Mn (II) In The Catalysis Of Laccase, Manganese Peroxidase And Lignin Peroxidase From *Phlebia Radiata*", FEBS Lett. 348,291-296.
- Luterek, J., Gianfreda, L., Wojtas-Wasilewska, M., Cho, N.S., Rogalski, J. et al. (1998), "Activity of free Immobilized Extracellular *Cerrena Unicolor* Laccase in Water Miscible Organic Solvents", *Holzforschung* 52,589-595.
- Maijala, P.(2000), "Heterobasidion Annosum and Wood Decay: Enzymology of Cellulose, Hemicellulose, and Lignin Degradation", Diss.Biocentri Viikki Universitatis Helsingiensis 6/2000.
- Majcherczyk, A., Johannes, C. and Hutterman, A. (1998), "Oxidation Of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) By Laccase Of *Trametes Versicolor*". *Enzyme and Microbial Technology*, 22: 335-341.
- Marquez, L., Wariishi, H., Dunford, H.B., Gold, H.M. (1988) "Spectroscopic And Kinetic Properties Of The Oxidized Intermediates Of Lignin Peroxidase From *Phanerochaete Chrysosporium*". *J.Biol.Chem.* 263:10549-10552.
- Messerschmidt, A. (1997), "Spatial Structures of Ascorate Oxidase, Laccase and Related Proteins: Implication for Catalytic Mechanism Multicopper Oxidases", World scientific, Singapore, Pp.23-80.
- Messner, K., Srebotnik, E. (1994), "Biopulping: An Overview of Developments in an Environmentally Safe Paper-making Technology", *FEMS Microbiol. Rev.* 13,351-364.
- Mester, T., Tien, M. (2000), "Oxidation Mechanism of Ligninolytic Enzymes Involved in the Degradation of Environmental Pollutants", *International Biodeterioration & Biodegradation* 46:51-59.

- Moilanen, A.M., Lundell, T., Vares, T., Hatakka, A. (1996) "Manganese And Malonate Are Individual Regulators For The Production Of Lignin And Manganese Peroxidase Isozymes And In The Degradation Of Lignin *Phlebia Radiata*", *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45, 792-799.
- Nie, G., Aust, S.D. (1997) "Spectral Changes Of Lignin Peroxidase During Reversible Inactivation". *Biochem.* 36:5113-5119.
- Niku-Paavola, M.L., Karhunen, E., Kantelinen, A., Viikari, L., Lundell, T., Hatakka, A. (1990) "The Effect Of Culture Conditions On The Production Of Lignin Modifying Enzymes By The White Rot Fungus *Phlebia Radiata*", *J. Biotechnol.* 13, 211-221.
- Ossola M., And Galante Y.M., (2004), "Scouring Of Flax Rove With The Aid Of Enzymes", *Enzyme And Microbial Technology*, 34, Pp. 177–186.
- Otjen, L., Blanchette, R. (1987) "Assessment of 30 White Rot Basidiomycetes for Selective Lignin Degradation", *Holzforschung* 41, 343-349.
- 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.
- 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.
- Park C., Lee M., Lee B., Kim S-W, Chase H.A., Lee J., And Kim S., (2007), "Biodegradation And Biosorption For Decolorization Of Synthetic Dyes By *Funalia Trogii*", *Biochemical Engineering Journal*, 36, Pp. 59–65.
- Parshetti G.K., Kalme S.D., Gomare S.S., And Govindwar S.P., (2007), "Biodegradation Of Reactive Blue-25 By *Aspergillus Ochraceus* NCIM-1146", *Bioresource Technology*, 98, Pp. 3638–3642.

Paszczynski, A., Huynh, V., Crawford, R (1986). "Comparison Of Ligninase-1 And Peroxidase-M2 From The White Rot Fungus *Phanerochaete Chrysosporium*." *Arch.Biochem. Biophys.* 244:750-65.

Pazarlıoğlu N.K., Sarıısık M., And Telefoncu A., (2005), "Laccase: Production By *Trametes Versicolor* And Application To Denim Washing", *Process Biochemistry*, 40, Pp. 1673–1678.

Philippe, Champagne. Juliana, A. Ramsay. (2005) "Contribution Of Manganese Peroxidase And Laccase To Dye Decoloration By *Trametes Versicolor*", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 69: 276–285.

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.

Piontek, K., Glumoff, T., Winterhalter, K. (1993) "Low Ph Crystal Structure Of Glycosylated Lignin Peroxidase From *Phanerochaete Chrysosporium* At 2.5 Å Resolution". *Febs Lett.* 315: 119-124.

Popp, J.K., Kirk, T.K. (1991) "Oxidation Of Methoxybenzenes By Manganese Peroxidase And By Mn^{3+} ". *Arch.Biochem.Biophys.* 288,145-148.

Poulos, T.L., Edwards, S.L., Wariishi, H., Gold, M.H. (1993) "Crystallographic Refinement Of Lignin Peroxidase At 2Å", *J. Biol. Chem.* 268,4429-4440.

Reid, I.D. and Paice, M.G. (1994), "Biological bleaching of Kraft Pulps by White-Rot Fungi and their Enzymes". *FEMS Microbiology Reviews*, 13: 369-376.

Renganathan, V., Gold, M.H. (1994) "Purification Of A 1,2,4-Trihydroxybenzene 1,2-Dioxygenase From The Basidiomycete *Phanerochaete Chrysosporium*", *J. Bact.* 176, 4838-4844.

Revankar¹, S.M., Lele, S.S., (2006), "Increased Production Of Extracellular Laccase By The White Rot Fungus *Coriolus Versicolor* MTCC 138", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*.

Riva , S., (2006), "Laccases: Blue Enzymes for Green Chemistry" , *Trends In Biotechnol.*, 24: (5) 219-226.

Saloheimo, M., Niku-Paavola, M.L.(1991), "Heterologous Production of a Ligninolytic Enzyme: Expression of the *Phlebia radiata* Laccase Gene in *Trichoderma reesei*, *Bio/Technol*", 9,987-990.

Schneider, P., Caspersen, M.B., Mondorf, K., Halkier, T., Skov, K.L., et al. (1999), "Characterization of a *Coprinus cinereus* Laccase", *Enzyme Microbiol. Technol.* 25,502-508.

Schneider, P., Caspersen, M.B., Mondorf, K., Halkier, T., Skov, L.K. Et al. (1999), "Characterization of a *Coprinus Cinereus* laccase", *Enzyme Microb. Technol.* 25,502-508.

Srebotnik, E. and Hammel, K. (2000). Degradation Of Nonphenolic Lignin By The Laccase/1hydroxybenzotriazole System. *Journal Of Biotechnology*, 81: 179-188.

Srebotnik, E., Jensen Jr., K.A., Kawai, S., Hammel, K.E. (1997) "Evidence That *Ceriporiopsis* *Subvermispora* Degrades Nonphenolic Lignin Structures By A One-Electron-Oxidation Mechanism", *Appl. Environ. Microbiol.* 63,4435-4440.

Srinivasan, C., D'Souze, T.M., Boominthan, K., Reddy, C.A.(1995), "Demonstration of Laccase in the White Rot Basidiomycete *Phanerochaete Chrysosporium*", BKM-F1767, *Appl. Environ. Microbiol.* 61,4274-4277.

Steven, L., Edwards, T., Reeta, R., Hiroyuki, W., Michael, H.G., Thomas, L.P. (1993) "Crystal Structure Of Lignin Peroxidase". 90:750- 754.

Sundaramoorthy, M., Kishi, K., Gold, M.H., Poulos, T.L. (1997) "The Crystal Structures Of Substrate Binding Site Mutants Of Manganese Peroxidase", *J. Biol. Chem.* 272,17574-17580.

Thakker, G.D., Evans, C.S. And Rao, K.K., (1992) "Purification and Characterisation of Laccase From *Monocillium indicium* Saxena" *Applied Microbiol Biotechnology*, 37:321-323.

Thurston, C.F. (1994), "The structure and function of fungal laccases." *Microbiology*, 140:19-26.

Tzanov T., Basto C., Guebitz G, And Cavaco-Paulo A., (2003), "Laccases To Improve The Whiteness In A Conventional Bleaching Of Cotton", *Macromol. Mater. Eng.*, 288, Pp. 807–810.

Van Aken, B., Hofrichter, M., Scheibner, K., Hatakka, A., Naveau, H., Agathos, S., (1994) "Transformation And Mineralization Of 2,4,6-Trinitrotoluene By Manganese Peroxidase From The White Rot Basidiomycete *Phlebia Radiata*". *Biodegradation*. 10:83-91.

Vares, T., Kalsi, M., Hatakka, A. (1995) "Lignin Peroxidases, Manganese Peroxidases And Other Ligninolytic Enzymes Produced By *Phlebia Radiata* During Solid- State Fermentation Of Wet Straw", *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3515-3520.

Wariishi, H., Gold, M.N. (1990) "Lignin Peroxidase Compound III. Mechanism Of Formation And Decomposition", *J. Biol. Chem.* 265, 2070-2077.

Welinder, K.G. And Gajhede, M., (1993) "In Plant Peroxidases: Biochemistry And Physiology". Pp. 35-42, Universe Of Geneva.

Willman, G., Fakoussa, Rm. (1997) "Biological Bleaching Of Water Soluble Coal Macromolecules By A Basidiomycete Strain". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47:95-101.

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.

Xu, F., Kulys, J.J., Duke, K., Li, K., Krikstopaitis, K., Deussen, H-J.W., Abbate, E., Galintye, V. and Schneider, P. (2000), Crystal Structure of a Laccase from the Fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å Resolution Containing a Full Complement of Coppers" *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2052-2056.

Yoon M-Y, (2005), "Denim Finishing With Enzymes-Bio-bleaching With Laccase And Mediator", International Dyer, December, Pp. 1–3.

Yoshida, H. (1883), "Chemistry of Lacquer (Urushi)" part I, J.Chem.Soc.43,472-486.

Zille A. (2005), "Laccase Reactions for Textile Applications".

www.scienceaid.co.uk

www.bahcenet.com

www.simonphotography.com

www.dwm.ks.edu.tw

www.wb332306.bahnhofbredband.se

www.cartage.org

www.fig.cox.miami.edu

www.web.utk.edu

www.website.nbm-mnb.ca

ÖZGEÇMİŞ

Ad, Soyad: Vildan Özan
Doğum Tarihi : 19.07.1983
Doğum Yeri: Almanya/Hattingen
Ortaokul / Lise: 1993-2001 Kartal Anadolu lisesi
Lisans: 2001-2006 Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi
Kimya Bölümü
Yüksek Lisans: 2006-2010 Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Programı
Çalıştığı Kurumlar: Ülker-Hero Baby , Medikal Tanıtım Sorumlusu 2007-2009
Şişli Belediyesi Bilim Merkezi Rehber Öğretmen 2002-2007
YTÜ Mediko Tıbbi Tahlil Lab. Asistan Öğrenci 2001-2007