

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**LAKKAZ ÜRETİMİ VE HAM KÜLTÜR FİLTRATININ TEKSTİL
BOYALARININ RENGİNİN VE TOKSİSİTESİNİN GİDERİMİNDE
KULLANIMI**

Nesrin ÖZMEN

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

MALATYA

Temmuz 2008

Tezin Başlığı: Lakkaz Üretimi ve Ham Kültür Filtratının Tekstil Boyalarının Renginin ve Toksisitesinin Gideriminde Kullanımı

Tezi Hazırlayan: Nesrin ÖZMEN

Sınav Tarihi: 17.07.2008

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


Sınav Jürisi Üyeleri

Prof. Dr. Mahmut ÇALIŞKAN  Mustafa Kemal Üniversitesi

Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA  İnönü Üniversitesi

Prof. Dr. Muhittin YÜREKLİ  İnönü Üniversitesi

Doç. Dr. Hikmet GEÇKİL  İnönü Üniversitesi

Doç. Dr. Dilek ASMA  İnönü Üniversitesi

İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. Ali ŞAHİN
Enstitü Müdürü

Onur Sözü

Doktora tezi olarak sunduğum “**Lakkaz Üretimi Ve Ham Kültür Filtratının Tekstil Boyalarının Renginin ve Toksisitesinin Gideriminde Kullanımı**” başlıklı bu çalışmanın, bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hemde kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Nesrin ÖZMEN



ÖZET

Doktora tezi

LAKKAZ ÜRETİMİ VE HAM KÜLTÜR FİLTRATININ TEKSTİL BOYALARININ RENGİNİN VE TOKSİSİTESİNİN GİDERİMİNDE KULLANIMI

Nesrin ÖZMEN

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

93+xii sayfa
2008

Danışman: Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA

Türkiye'nin tekstil ürünleri imalatı bakımından dünyada önemli bir yeri vardır. Tekstil endüstrisinde kullanılan bazı boyar maddelerin doğada yıkımı zor ve uzun zaman almaktadır. Bu nedenle bu endüstrinin atıksuyu çevresel bakımdan suçul ortamlarda önemli kirlilik sorunlarına yol açmaktadır. Bu sorunların çözümünde klasik uygulamalara alternatif olarak öne sürülen biyoteknolojik yaklaşımlar giderek daha ön plana çıkmakta, çevre dostu yöntemler geliştirilerek çevresel kirleticilerin ortamdan uzaklaştırılması amaçlanmaktadır. Bu çalışma farklı ortamlar ve süreçlerde lakkaz enzimi üretiminin yanı sıra, kullanılan substratlara bağlı olarak üretilecek lakkaz enziminin de değerlendirilebilmesini amaçlamaktadır.

Çalışmalar temel olarak üç ana başlıkta toplanabilir. Öncelikle suçul ortamdan Astrazon mavi ve Astrazon siyah boyar maddeleri biyosorbisyonla %75-95 oranında uzaklaştırılmış ve bu işlemde adsorban olarak kullanılan lignoselulozlu substratlar lakkaz enzimi üretiminde kullanılmıştır. İkinci olarak enzim üretimi çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla fermantasyon ortamına buğday kepeği ve bakır eklenmiş, buna bağlı olarak hem kepek eklenen gruplarda hem de bakır eklenen gruplarda lakkaz aktivitesi araştırılmıştır. Ayrıca *Trametes versicolor* ve *Funalia trogii* hücreleri aljinat jele tutuklanarak yapılan çalışmalarda, özellikle serbest ve tutuklanmış fungusların birlikte kullanıldığı karma kültürlerde lakkaz aktivitesinin dikkate değer oranda arttığı saptanmıştır. Çalışmaların üçüncü bölümünde ise, ham kültür filtratlarıyla (HKF) ve saf lakkazla (SL) muamele edilen, Reaktif mavi 19, Reaktif siyah 5 ve Reaktif mavi 198 boyalarının rengindeki değişim 24 saatlik peryotta spektrofotometrik olarak izlenmiştir. Sonuçlara göre, Reaktif mavi 19'un rengi, HFL ile %41, saf lakkazla %70 oranında giderilebilirken, reaktif siyah 5'in rengi HKF ile %30 ve SL ile %35, Reaktif mavi 198'in rengi ise HKF ile %56 ve SL ile %71 oranında giderilmiştir. Kullanılan boyar maddeler içerisinde Reaktif mavi

198, rengi en kolay açılan boya olmuştur. Rengi giderilen boya çözeltilerinin toksik etkileri, biyoluminesent bir bakteri olan *Vibrio fischeri*'nin biyoyışıma yeteneğinin inhibisyonu esasına göre Mikrotoks testi ile belirlenmiştir. Buna göre renk gideriminden önce toksik olan Reaktif mavi 19'un toksisitesi, HKF uygulaması sonucunda çok az düzeyde artış gösterirken, SL uygulamasıyla da toksik etkide azalış meydana gelmiştir. Başlangıçta çok toksik olan Reaktif siyah 5'in toksisitesi, her iki uygulama sonucunda da artış göstermiştir. Reaktif mavi 198 için ise uygulamalardan önce ve sonra toksik bir etki gözlenmemiştir.

ANAHTAR KELİMELER: boyar madde, renk giderimi, beyaz çürükçül fungus, katı substrat fermantasyonu, kültür filtratı, lakkaz, mikrotoks

ABSTRACT

PhD. Thesis

PRODUCTION OF LACCASE AND USE OF CULTURE FILTRATE FOR THE DECOLORIZATION AND DETOXIFICATION OF TEXTILE DYES

By

Nesrin ÖZMEN

A thesis submitted to

Department of Biology
Institute of Natural Sciences
Malatya, Turkey

93+xii pages

2008

Supervisor: Prof. Özfer YEŞİLADA (PhD)

Turkey has a significant role in the world in terms of textile production. Some of the dye stuff used in the textile industry are persistent matter. Therefore, the wastewater produced from this industry has some pollution problems in the aquatic environment. In the recent years, alternative biotechnological methods are becoming more preferable to the classical applications and environmentally friendly methods are being developed for the removal of pollutants. This study aims, in addition to the production of laccase enzyme in different culture media and processes assess the usability of produced laccase depending on the used substrates.

This study consists of three main sections. Initially, Astrazon blue and Astrazon black dyes were removed from aqueous environment by biosorption using lignocellulose as adsorbent in 75 to 95 %, then, these substrate were utilized for the production of laccase. Secondly, enzyme production studies were carried out. For this aim, wheat bran and copper were added to the fermentation media, and depending on this, the activities of enzyme on both bran and copper added experimental groups were investigated. Also, the cell of *Trametes versicolor* and *Funalia trogii* were adsorbed into alginate gels and it was determined that when free- and immobilized fungi mixture is used, laccase activities significantly increased. In the third section of the study, Reactive blue 19, Reactive black 5 and Reactive blue 198 dyes were exposed to both crude culture filtrate and pure (commercial) laccase enzyme and their color changes ratio were observed for 24 h period

by spectrophotometrically. According to the results, while the color of Reactive blue 19 was decreased 41% with crude culter filtrate (CCF) and 70% while the with pure laccase (PL) the color of reactive black 5 was decreased 30% by CCF and 35% by PL. The color of reactive blue 198 was reduced to 56% by CCF and 71% by PL. It was found that Reactive blue 198 had the highest color change ratio. The toxic effects of decolorized dye solutions were determined by Microtox test which utilizes the inhibition characteristics of a bioluminescent bacteria, namely *Vibrio fischeri*. Accordingly, the toxicity of Reactive blue 19, showed very little increase after CCF application, while showing decrease with PL application. The toxicity of Reactive black 5, which was highly toxic initially, increased toxicity with both applications. There was no toxic effect for Reactive blue 198 before and after applications.

KEYWORDS: dye, decolorization, white rot fungus, solid substrat fermentation, culture filtrate, laccase, microtox

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın seçimi, planlaması, yürütülmesi ve yazımı sırasında değerli fikirleri ve desteğiyle her zaman yardımlarını gördüğüm, çalışmanın her aşamasında karşılaşılan sorunların çözümünde büyük bir emekle, sabırlı ve özverili yaklaşım sergileyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA'ya;

Tez çalışmalarını sürecinde fikir ve önerileriyle araştırmalara yön veren Tez İzleme Komitesi Üyeleri Sayın Doç. Dr. Dilek ASMA ve Doç. Dr. Hikmet GEÇKİL'e;

Çalışmalarım sırasında yardımlarını ve desteğini her zaman hissettiğim, ihtiyaç duyduğumda heran yanımda olan değerli çalışma arkadaşım Dr. Elif APOHAN'a;

Çalışmamın deneysel aşamasında ihtiyaç duyduğum anda yardımlarını esirgemeyen Dr. Seval CİNG YILDIRIM, Arş.Grv. Emre BİRHANLI ve Uzm. Ufuk Günay DOĞAN'a;

Manevi destekleriyle her zaman yanımda olan bölüm arkadaşlarıma teşekkürü borç bilirim.

Bu tez çalışması İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje no: 2006/21.

Çalışmalarım süresince ilgilenemediğim ve istemeyerek de olsa ihmal ettiğim halde bana sabır gösteren, kızlarım İrem, İpek ve annem Nermin YENİCE'ye ve tez yazımı sırasında fikir ve önerileriyle yanımda olan sevgili eşim Murat ÖZMEN'e çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Çevre Kirliliği.....	1
1.2. Tekstil Endüstrisi Atıksuları.....	2
1.3. Boyar Maddeler.....	4
1.3.1. Tarihçe.....	4
1.3.2. Tanımı ve Sınıflandırılması.....	5
1.4. Tekstil Boyarmaddelerinin Ortaya Çıkardığı Problemler.....	8
1.5. Boyar Maddelerin Renginin Gideriminde Kullanılan Teknikler.....	9
1.6. Boyar Maddelerin Gideriminde Biyoteknolojik Uygulamalar.....	11
1.6.1. Biyosorpsiyon.....	11
1.6.2. Mikroorganizma veya enzimlerle renk giderimi.....	12
1.7. Enzim Üretiminde ve Renk Gideriminde Beyaz Çürükçül Fungusların Kullanımı.....	12
1.8. Lakkaz.....	13
1.8.1. Moleküler özellikleri.....	14
1.8.2. Lakkazın katalitik mekanizması.....	15
1.9. Lakkazın Endüstriyel ve Biyoteknolojik Uygulama Alanları.....	18
1.9.1. Tekstil endüstrisi.....	18
1.9.2. Kağıt endüstrisi.....	18
1.9.3. Besin endüstrisi.....	19
1.9.4. Şarap ve bira kararlılığı.....	19
1.9.5. Tıbbi uygulamaları.....	19
1.9.6. Nanobiyoteknoloji.....	19
1.9.7. Toprak iyileştirilmesi.....	20
1.9.8. Sentetik kimya.....	20
1.9.9. Kozmetik.....	20
1.10. Mikrotoks Test Sistemi.....	21
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	22
2.1. Beyaz Çürükçül Fungal Enzim Kaynakları İle Yürütülen Renk Giderim Çalışmaları.....	22
2.2. Toksikite ve Detoksifikasyon Çalışmaları.....	28
3. MATERYAL VE METOT.....	32
3.1. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar.....	32
3.2. Çalışmada Kullanılan Fungusların Agar Ortamında Lakkaz Aktivitelerinin Saptanması.....	32
3.3. Çalışmanın Çeşitli Aşamalarında Kullanılan Besiyerleri.....	32
3.4. Çalışmada Kullanılacak Beyaz Çürükçül Fungus Kültürlerinin Hazırlanması ve Homojenizasyonu.....	33

3.5.	Çalışmada Kullanılan Boyar Maddeler	33
3.6.	Boyar Madde Adsorbsiyonunda Kullanılan Lignosellülozlu Kaynakların Hazırlanması ve Adsorbsiyon Çalışması	34
3.6.1.	Buğday kepeği çalışması	34
3.6.2.	Çam kozalağı çalışması	34
3.6.3.	Pamuk sapı çalışması	34
3.7.	Katı Fermantasyon Çalışmaları.....	35
3.8.	Yarı Katı Fermantasyon Çalışmaları	35
3.9.	Kesikli Kültürde Sıvı Fermantasyon Çalışmaları	36
3.10.	Kesikli Kültürde Sıvı Fermantasyon Ortamı Olarak Malt Özütü Besiyerinin Kullanıldığı Çalışmalar	36
3.10.1.	Kepek eklenmesi	36
3.10.2.	Bakır eklenmesi	36
3.11	Aljinat Jele Tutuklanmış Fungus Çalışmaları	37
3.11.1.	Aljinat jele tutuklama	37
3.11.2.	Fungusları aynı aljinat jel içerisinde tutuklama	37
3.11.3.	Tutuklanmış hücrelerinin kesikli süreçte lakkaz üretimine bakırın etkisi	37
3.11.4.	Ayrı jellerde tutuklanmış <i>T. versicolor</i> ve <i>F. trogii</i> karışık kültürlerinde bakırın lakkaz üretimine etkisi	38
3.11.5.	Aynı jel içerisinde tutuklanmış <i>T. versicolor</i> ve <i>F. trogii</i> karışık kültürlerinde bakırın lakkaz üretimine etkisi	38
3.12.	Fungus Üretilmiş Kompostta Lakkaz Aktivitesinin Araştırılması.....	38
3.13.	Lakkaz Enziminin Sıcaklık Kararlılığı	38
3.14.	Ham Kültür Filtratlarıyla Boyar Maddelerin Renginin Giderimi	39
3.15.	Ticari Lakkazla Boyar Maddelerin Renginin Giderimi	39
3.16.	Protein Elektroforezi çalışmaları	39
3.17.	Analizler	40
3.17.1.	Ham kültür filtratı veya ticari lakkazla muamele edilmiş boyar maddelerin toksisite değişiminin Mikrotoks yöntemiyle analizi (Mikrotoks Toksisite Testi)	40
3.18.2.	Kültür ortamındaki lakkaz aktivitesinin ölçümü	40
3.19.	İstatistiksel Analizler	40
4.	BULGULAR ve TARTIŞMA	41
4.1.	Fungusların Sabouraud Dekstroz Agar Ortamında Lakkaz Aktivitesi	41
4.2.	Boyar Madde Tutundurulmuş Lignosellülozlu Katı Substrat Ortamında <i>F. trogii</i> ve <i>T. versicolor</i> 'un Lakkaz Aktivite Değişimi	43
4.2.1.	Kepek Katı Ortamı	44
4.2.2.	Kozalak katı ortamı	46
4.2.3.	Pamuk Sapı Katı Ortamı	47
4.3.	<i>F.trogii</i> ve <i>T.versicolor</i> 'un Boyar Madde Absorblanmış Çeşitli Lignosellülozlu Substrat İçeren Ortamda Yarıkatı Fermentasyonla Lakkaz Üretimi	49

4.3.1	Kepek Uygulaması.....	49
4.3.2.	Kozalak Uygulaması	51
4.4.	Sıvı Kültür Çalışmaları.....	52
4.4.1.	Kepek eklenmiş sıvı kültür	52
4.5.	Stok Temel Ortam ve Maya Özütü Ortamında Lakkaz Üretimi	56
4.6.	Kesikli Kültürde Lakkaz Üretimine Bakırın Etkisi	57
4.7.	Tutuklanmış Funguslar ve Serbest Pelletlerle Yürütülen Kesikli Kültür Çalışmaları	60
4.7.1.	Serbest <i>T. versicolor</i> ve <i>F. trogii</i> pelletleri kullanarak kesikli süreçte lakkaz üretimi	60
4.7.2.	Tutuklanmış <i>T. versicolor</i> ve <i>F. trogii</i> peletleri ile kesikli süreçte lakkaz üretimi	62
4.8.	Atık Komposttan Lakkaz Eldesi	66
4.9.	Lakkaz Enziminin Moleküler Ağırlığı ve Sıcaklık Kararlılığı	67
4.10.	Enzim Uygulamalarına Bağlı Olarak Boyar Madde Renginin Giderimi ...	69
4.11.	Boyar Maddelerin Toksikitesi ve Toksik Etkide Renk Giderimine Bağlı Değişim	73
5.	SONUÇ ve ÖNERİLER	76
5.	KAYNAKÇA	77
	Özgeçmiş	92

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	Anaerobik bakterilerle azo boyaların yıkımı	10
Şekil 1.2	Lakkazın bakır merkezleri	15
Şekil 1.3	Lakkazın katalitik döngüsü	16
Şekil 1.4	ABTS nin yapısı	17
Şekil 4.1	SDA+ABTS ortamlarında üreyen funguslarda lakkaz varlığının belirlenmesi	41
Şekil 4.2	<i>F. trogii</i> 'nin SDA, SDA+ABTS ve farklı konsantrasyonlarda bakır içeren SDA ortamlarında lakkaz aktivitesi	42
Şekil 4.3	<i>T. versicolor</i> 'un SDA, SDA+ABTS ve farklı konsantrasyonlarda bakır içeren SDA ortamlarında lakkaz aktivitesi	43
Şekil 4.4	<i>T. versicolor</i> 'da boyar madde adsorblanmış kepek ile hazırlanmış katı fermantasyon sürecinde lakkaz üretimi	45
Şekil 4.5	<i>F. trogii</i> ile, kepek içeren katı substrat fermantasyon sürecinde lakkaz üretimi	45
Şekil 4.6	Boyar madde adsorblanmış kepek katı substrat fermantasyonu sürecinde renk giderimi	46
Şekil 4.7	<i>T. versicolor</i> ve <i>F. trogii</i> ile kozalak içeren ortamda katı substrat fermantasyonu sürecinde lakkaz üretimi	47
Şekil 4.8	<i>T. versicolor</i> ile pamuk sapı içeren katı substrat fermantasyonu sürecinde lakkaz üretimi	48
Şekil 4.9	<i>F. trogii</i> 'nin boyar madde adsorblanmış pamuk sapı ile hazırlanan katı fermantasyon sürecinde günlere bağlı lakkaz üretimi	48
Şekil 4.10	Astrazon siyah adsorblanmış pamuk sapı katı ortamında bölgesel renk giderimi.	49
Şekil 4.11	<i>T. versicolor</i> ile boyar madde adsorblanmış buğday kepeği ortamında yarı katı fermantasyon sürecinde lakkaz üretimi	50
Şekil 4.12	<i>F. trogii</i> ile boyar madde adsorblanmış buğday kepeği ortamında yarı katı fermantasyon sürecinde lakkaz üretimi	50
Şekil 4.13	<i>T. versicolor</i> ile kozalak içeren ortamda yarı katı fermantasyon sürecinde lakkaz üretimi	51
Şekil 4.14	<i>F. trogii</i> 'de kozalak içeren ortamda yarı katı fermantasyon sürecinde lakkaz üretimi	52
Şekil 4.15	Başlangıçta kepek içeren ve içermeyen (kontrol) <i>T. versicolor</i> sıvı kültürlerinin lakkaz aktivite değişimi	53
Şekil 4.16	Üretimin 4. gününde kepek eklenmiş <i>T. versicolor</i> sıvı kültürlerinin lakkaz aktivite değişimleri	54
Şekil 4.17	Başlangıçta kepek içeren ve kepek içermeyen (kontrol) <i>F. trogii</i> sıvı	55

	kültürlerinin lakkaz aktivite değişimi	
Şekil 4.18	Üretimin 4. gününde kepek eklenmiş <i>F. trogii</i> sıvı kültürlerinin lakkaz aktivite değişimleri	55
Şekil 4.19	Boyar madde tutundurulmuş kepek eklenen sıvı fermantasyon ortamında renk değişimi	56
Şekil 4.20	<i>T. versicolor</i> 'un bakır sülfat içeren malt özütü ortamında üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi	58
Şekil 4.21	<i>F. trogii</i> 'nin bakır sülfat içeren malt özütü ortamında üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi	59
Şekil 4.22	Serbest <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üreimine bakırın etkisi	60
Şekil 4.23	Serbest <i>F. trogii</i> peletlerinin lakkaz üretimine bakırın etkisi	61
Şekil 4.24	Serbest <i>F. trogii</i> ve <i>T. versicolor</i> karışık peletlerinin lakkaz üretimine bakırın etkisi	62
Şekil 4.25	Tutuklanmış <i>T. versicolor</i> hücrelerinin kesikli süreçte inkübasyonu sırasında lakkaz üretimi	63
Şekil 4.26	Tutuklanmış <i>F. trogii</i> hücrelerinin kesikli süreçte inkübasyonu sırasında lakkaz üretimi	63
Şekil 4.27	Ayrı jellerde tutuklanmış <i>F. trogii</i> ve <i>T. versicolor</i> karışık kültürlerinin kesikli süreçte inkübasyonu sırasında lakkaz üretimi	64
Şekil 4.28	Aynı jellerde tutuklanmış <i>F. trogii</i> ve <i>T. versicolor</i> hücrelerinin kesikli süreçte inkübasyonu sırasında lakkaz üretimi	65
Şekil 4.29	Atık kompost ortamında lakkaz varlığı	67
Şekil 4.30	<i>T. versicolor</i> ham enzim kaynağının sıcaklık kararlılığı	68
Şekil 4.31	<i>F. trogii</i> ' de farklı sıcaklıklarda, 5. ve 24. saatlerde kalan lakkaz aktivitesi	68
Şekil 4.32	Çalışmada kullanılan boyar maddeler	69
Şekil. 4.33	Ham kültür filtratı ve saf lakkaz kullanarak Reaktif mavi 19 boyasının renginin giderimi	70
Şekil 4.34	Çeşitli boyaların saf lakkazla renginin giderimi	71
Şekil. 4.35	Ham kültür filtratı ve saf lakkaz kullanarak Reaktif siyah 5 boyasının renginin giderimi	72
Şekil. 4.36	Ham kültür filtratı (en başta) ve saf lakkaz (en sonda) kullanarak Reaktif mavi 198 boyasının renginin giderimi	72

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1	Zeytinyağı fabrikası atıksularının içeriği	1
Çizelge 1.2.	Bir sucul alıcı ortama boşaltılan tekstil atıksuyunda bazı parametreler	2
Çizelge 1.3	Boyama atıksularının karakteristikleri	4
Çizelge 1.4	Farklı boyaların ipliğe tutunma yüzdeleri	8
Çizelge 1.5	Tekstil atıksuyu iyileştirilmesinde kullanılan son teknolojiler	11
Çizelge 3.1	Stok temel ortamın içeriği	32
Çizelge 4.1	<i>T. versicolor</i> ve <i>F. trogii</i> 'nin STO ve malt özü besiyerlerinde (MÖB) elde edilen en yüksek lakkaz aktivitesi	57
Çizelge 4.2	<i>F. trogii</i> ve <i>T. versicolor</i> 'un tutuklanmış ve tutuklanmamış gruplarında saptanan en yüksek lakkaz aktiviteleri	66

1. GİRİŞ

1.1. Çevre Kirliliği

Sanayileşmiş ve sanayileşmekte olan toplumlarda çevre kirliliği ve bunun getirdiği çevresel sorunlar giderek artmaktadır. Bu nedenle çevre ile uyumlu ve sürdürülebilir bir sanayileşme şarttır. Sürdürülebilir kalkınma modeline uygun bir sanayileşme bu sorunları çözebilecektir. Endüstriler, çeşitli formlarda atık oluşturabilir ve bu atıklar verildikleri alıcı ortamlarda çevre kirliliği ve sağlık riski oluşturabilir. Bu atıkların olası riskini ortadan kaldırmak veya azaltmak için, ya çevreye dost sistemler kullanılarak atık sorunu giderilmeli ya da alıcı ortama verilmeden önce atık yükü, arıtım dahil çeşitli sistemlerce azaltılmalıdır.

Her endüstri farklı özelliklerde atıksu oluşturabildiğinden, sorun ve sorunun çözümü de farklı boyutlarda olacaktır. Örneğin, gıda ve tekstil endüstrilerinde farklı içerikli atıksular oluştuğundan, soruna yaklaşımların farklı olması kaçınılmazdır. Örneğin tekstil endüstrisi atıksularında boyalar, deterjanlar, yağlar, parlaticılar, renklendiriciler, lateks ürünleri vs. bulunabilirken [1,2], şeker fabrikası atıksuyunda polisakkaritler, karbonhidrat olmayan bileşikler, polimerik bileşikler, amino asitler, inorganik iyonlar ve organik asitler bulunmaktadır [3]. Endüstriyel atıksuların içeriği, endüstriyel faaliyetin tipine bağlı olarak büyük farklılıklar gösterebilmektedir. Çizelge 1.1’de zeytinyağı fabrikası atıksu içeriği ve Çizelge 1.2.’de tekstil endüstrisi atıksuyunun genel karakteristik özellikleri verilmiştir [4, 5].

Çizelge 1.1. Zeytinyağı fabrikası atıksularının içeriği [4]

Parametre	Kesikli İşlem (g/L)	Sürekli İşlem (g/L)
BOİ	90-100	35-48
KOİ	120-130	45-60
AKM	1	9
TKM	120	60
İnorganik katı	15	5
Uçucu Katı	105	55
pH	4.5-5	4.7-5.2

Çizelge 1.2. Bir sucul alıcı ortama boşaltılan tekstil atıksuyunda bazı parametreler [5]

Örnek No	Parametreler	Atıksu				NEQS (mg/L)
		Örnek A	Örnek B	Örnek C	Örnek D	
1	pH	5.8- 10.5	5.6-11.2	5.9-11.5	5.7-10.9	6-10
2	KOİ	370- 455	410-665	395-595	425-618	150
3	BOİ	145- 190	165-214	158-206	190-236	80
4	TÇM	2100- 4400	1985- 3864	1800- 3885	1888-4120	3500
5	TKM	150- 1100	195-750	165-865	185-985	150
6	Fenol	-	-	-	-	-
7	Sülfat	3- 12	-	-	-	-
8	Klorid	85	-	-	-	-
9	Cr	2	3.5	4	3	-
10	Zn	4	4	3	5	-
11	Cu	2	2	4	3	-
12	Petrol ve yağ	15- 35	20-45	18-40	15-40	-
13	sülfat	554	-	-	-	-
14	sodyum	450	-	-	-	-

NEQS: Ulusal kalite Standardı

TÇM: toplam çözünmüş madde

TKM: toplam katı madde

1.2. Tekstil Endüstrisi Atıksuları

Endüstriyel atıksu: Endüstri kuruluşlarından, imalathanelerden, atölyelerden, tamirhanelerden, küçük sanayi sitelerinden ve organize sanayi bölgelerinden kaynaklanan her türlü işlem ve yıkama artığı suları, işleme suları ile karıştırılmadan ayrı olarak işlem görüp uzaklaştırılan kazan ve soğutma sularını ifade etmektedir [6].

Hızlı şehirleşme ve endüstrileşmeye bağlı olarak, boya dahil birçok kimyasal günlük yaşantımızda kullanılmaktadır [7]. Günlük ihtiyaçlara bağlı olarak, tekstil endüstrisi de gün

geçtikçe gelişmekte ve bunun sonucu olarak, işlem sonrası yüksek miktarda oluşan boyar madde içeren atıksu doğaya verilmektedir. Boyar maddeler, renklerinden dolayı ve toksik etkileri nedeniyle çevrede kirlilik oluşturmaktadırlar [8 -10].

Türkiye’de ham materyalin oldukça fazla olması, ucuz işçilik, üretim kapasitesi ve modernleşme süreci nedeniyle tekstil sektörü sürekli gelişmektedir [11]. Ülkemizde yıllık pamuk ipliği üretimi yaklaşık 788 000 ton ve pamuklu kumaş üretimi 1403 000 000 m’dir [12]. Türkiye’deki tekstil fabrikalarında, 1 kg kumaş için 20-30 m³ suya gereksinim vardır [13]. Aynı zamanda 454 kg kumaşın boyanması için yaklaşık 1.2 kg boya kullanılmaktadır [14]. Hacmi ve kompozisyonu göz önüne alındığında tekstil endüstrisinden kaynaklanan atıksular diğer endüstri sektörlerine oranla daha fazla kirletici özelliğe sahiptir [15, 16].

Tekstil ve boyar madde endüstrilerinin atık suları farklı tipte boyar maddeler, BOİ, KOİ ve AKM (askıda katı madde) sahip atıksulardır ve verildikleri ortamlarda çeşitli çevresel sorunlara neden olmaktadır [17]. Bu tip atıksularda bulunan kirleticiler kimyasal arıtmaya ek olarak biyolojik arıtma işlemi uygulandıktan sonra deşarj edilmelidir. Ancak renk sorunu klasik arıtma sistemleriyle giderilmediğinden ve mevcut yönetmelikte deşarj kriteri bulunmadığından, sadece kimyasal arıtım sonucu alıcı ortama deşarj edilmeye devam edilmektedir [17].

Tekstil endüstrisinde boyama, diğer işlemler olan hazırlama, yıkama ve aprelemeye göre oldukça fazla miktarda su ve kimyasal madde tüketen bir süreçtir [16, 18] Gerek boyamada gerekse diğer işlemlerde kullanılan bu organik ve inorganik formdaki bileşiklerin çeşitliliğine bağlı olarak, ortaya çıkan atıksuların özellikleri de farklı olmaktadır [18, 19].

Çizelge 1.3.’te farklı boyaların kullanıldığı ve farklı elyafların boyandığı boyahane atıksularının özellikleri verilmiştir [18]. Boyanın iplik üzerine adsorbe olması, ipliğin türüne ve boyaya bağlı olarak değişim göstermektedir. Adsorbsiyon derecesi zaman, sıcaklık, pH ve yardımcı kimyasallar gibi değişik faktörlerin etkisi altındadır. Tek bir boyama işlemi için farklı yapıdaki boyaların kullanılıyor olması, atıksuyun bileşimini daha da karmaşık hale getirmektedir.

Ülkemizde bazı tekstil endüstrisi atıksuları alıcı ortama verilmeden önce, geleneksel arıtım sistemlerine gönderilmekte iken, bazıları arıtım sistemleri olmadığı ya da çalıştırılmadığı için, doğrudan alıcı ortamlara verilmektedir. Geleneksel arıtım sistemlerinde, boyaların önemli bir kısmı uzaklaştırılmamakta ve çevreye verilmektedir [20, 21]. Yeteri kadar arıtılmayan atıksular, hem şehir kanalizasyon sistemlerine ya da ikincil arıtma ünitelerine zarar verir hem

de alıcı ortamdaki sucul yaşamın olumsuz yönde etkilenmesine ve estetik açıdan problemlerin oluşmasına neden olur [16].

Çizelge 1.3. Boyama atıksularının karakteristikleri

Boya	Elyaf Çeşidi	Renk (ADMI)	BOİ, mg/L	TOK, mg/L	AKM, mg/L	ÇKM, mg/L	pH
Asit	Poliamid	4000	240	315	14	2028	5.1
1:2MetalKompleks	Poliamid	370	570	400	5	3945	6.8
Bazik	Akrilik	5600	210	255	13	1469	4.5
Direkt	Viskoz	12500	15	140	26	2669	6.6
Reaktif, kesikli	Pamuklu	3890	0	150	32	12500	11.2
Reaktif, sürekli	Pamuklu	1390	102	230	9	691	9.1
Vat	Pamuklu	1910	294	265	41	3945	11.8
Dispers, yüksek sıcaklıkta	Polyester	1245	198	360	76	1700	10.2

ADMI: Amerikan Boya İmalatçıları Enstitüsü renk birimi.

BOİ: Biyolojik Oksijen İhtiyacı

TOK: Toplam Organik Karbon

AKM: Askıda Katı Madde

ÇKM: Çözülmüş Katı Madde

1.3. Boyar Maddeler

1.3.1. Tarihçe

Doğal boyar maddelerin kullanılması çok eski dönemlere dayanır. En son Fransa'da bir mağarada Paleolitik döneme ait taşlarda, hematit, manganoksit gibi inorganik pigmentlerin kullanıldığına rastlanmıştır [22]. Eski Mısırlılar tarafından bitki özütleri kullanılarak geliştirilen yöntemler 19. yüzyıla kadar kullanılmıştır. Doğal boyalar, bitkilerin haricinde (*Tinctoria isatis*'den İndigo, *Rubia tinctorum*'dan kırmızı alizarin) böceklerden (Persian scarlet), yumuşakçalardan (Tyrian purple), funguslardan ve likenlerden de elde edilmiştir. 1856'da

İngiliz kimyacı W.H. Perkin, çok iyi boyama özelliğine sahip, daha sonraları aniline moru olarak bilinen sentetik boyayı sentezlemiş ve patentini almıştır. [23]. Sentetik boyalar, 20.yüzyılın başlarında hemen hemen tamamen doğal boyaların yerini almıştır [24].

1.3.2. Tanımı ve Sınıflandırılması

Boyar Madde Üretim Endüstrisi Ekoloji ve Toksikoloji Birliği (ETAD), boyaları yoğun bir şekilde renkli ve ışığı seçici absorbe ederek bir substrata renk veren floresan organik maddeler olarak tanımlar [25]

Renklendiriciler, elektromanyetik spektrumun görünür bölgesindeki (400-700 nm) ışığı kısmen ya da tamamen soğurma yeteneği olan maddelerdir. Bunlar boyarmaddeler ve pigmentler olarak sınıflandırılırlar. Bu terimler arasındaki fark çok kesin olmayıp, pigmentler bazen boyar maddelerin bir grubu olarak da kabul edilmektedir. İdeal pigmentler, uygulandıkları ortamda hiç çözünmeyen bileşiklerdir. Pigment partikülleri, substrata polimer, plastik gibi bir katkı maddesiyle bağlanır. Boyar maddeler ise, tekstil materyalleri, deri, kağıt, saç gibi çeşitli substratlara tamamen ya da kısmen çözüldüğü bir sıvı içinde uygulanır. Pigmentlerin aksine, boyar maddelerin kullanıldıkları substratlara karşı özel bir ilgilerinin olması gereklidir.

Boyar maddeler çift bağ içerirler ve kromofor ve oksokrom gruplarını taşırlar. Kromofor, rengin oluşumunu sağlayan gruptur. En önemli kromoforlar $-C=C-$, $-C=N-$, $-C=O$, $-N=N-$, $-NO_2$ ve $-NO$ gruplarıdır [26, 23]. Oksokromlar ise, elektron verici grup olup, kromofor tarafından oluşturulan rengin çözünebilirliğini ve boyanın ipliğe bağlanmasını sağlar. En önemli oksokromlar, NH_2 , $-NR_2$, $-NHR$, $-COOH$, $-SO_3H$, $-OH$ ve $-OCH_3$ ve $-OCH_3$ gruplarıdır [27].

Kimyasal yapıları ya da kromoforları temel alındığında, 20-30 farklı boya grubu tanımlanabilir. Azo (monoazo, diazo, triazo, poliazo), antrakinin, fitalosiyanın ve triarilmetan boyaları başlıca kromoforlardır. Ticari olarak kullanılan boyalar, 1924'ten itibaren her üç ayda bir "Society of Dyers and Colourists" ve "American Association of Textile Chemists and Colorists" tarafından yayımlanan Renk İndeksi (C.I)'de renklerine, yapılarına ya da uygulama yöntemlerine göre sınıflandırılır. En son yayımlanan Renk indekslerinden birinde 13.000

civarında farklı boya belirtilmiştir [23]. Renk İndeksinde boyalar uygulama tiplerine göre aşağıda belirtildiği gibi sınıflandırılmaktadır [28].

Asit Boyalar

Yapılarındaki sülfonik asit nedeniyle sudaki çözünürlükleri yüksektir. İyonik formda, ipliğin pozitif grubu ($-NH_3^+$) ve boyanın negatif yükü arasında reaksiyon gerçekleşerek Van-der-vals, bipolar, ve hidrojen bağları oluşur. Bu boyalar anyonik bileşikler olduğundan, azot içeren yün, poliamid, ipek ve modifiye akrilik kumaşların boyanmasında kullanılırlar [26]. En yaygın olan yapılar azo, antrokinon ve triarilmetandır.

Reaktif Boyalar

Pamuk, yün, ipek ve naylondaki $-OH$, $-N$ ya da $-SH$ gruplarıyla kovalent bağ yaparlar. Bu boyaların kullanıldığı boyama işlemi sırasında, reaktif grupların hidroliz olması nedeniyle, boyanın %10-50'si kumaşla reaksiyona giremez ve boyama tanklarında kalır. Bu nedenle renkli atık su problemi özellikle reaktif boyalarla ortaya çıkar [29]. En yaygın yapıları, azo, metal bileşikli azo, antrokinon ve fitalosiyanindir.

Direkt Boyalar

En yaygın olanları sülfonatlı azo boyalardır ve yıkama sırasında renk kaybedildiğinden dolayı, 1600 direkt boyadan sadece %30'u üretilmektedir [23, 29].

Bazik Boyalar

Bu boyaların $-NR_3^+$ ya da $=NR_2^+$ gibi fonksiyonel grupları ile akriliklerin negatif yükleri arasında güçlü bir etkileşim olur ve boyanma sağlanır. Renk İndeksindeki boyaların %5'ini oluştururlar. En fazla bulunan yapılar azo, diarilmetan, triarilmetan ve antrokinondur [23, 29].

Mordant Boyalar

Bunlar genellikle sodyum ya da potasyumdikromat tuzlarıdır. Kumaştan renk solmasını düzenletici sabitleyici ajan olarak etkilidirler. Yün, deri, ipek ve modifiye seluloz liflerini boyamak için kullanılır. En fazla bulunanlar azo, okzazin, ya da triarilmetandır [23, 29, 26].

Dispers Boyalar

-NO₂ ve -CN gibi fonksiyonel grupları nedeniyle noniyonik yapıda olup, suda zor çözünürler. Daha çok polyester boyanmasında kullanılırlar. En yaygın yapılar azo, nitro, antrokinonlar, ya da metal kompleksleridir.

Pigment Boyalar

Bunlar suda çözünmeyen noniyonik bileşikler ya da tuzlardır. İndeksteki bütün ticari boyaların %25'ini oluştururlar. Uygulama sırasında kristal ya da partiküllü yapılarını korurlar. Çoğu azo ya da metal kompleks fitalosiyanınlerdir.

Vat Boyalar

Vat boyalar, suda çözünmezler ancak alkali indirgenmeyle (sodium hidroksit varlığında) çözünür hale gelebilir. Selüloz liflere Van-der Vals bağlarıyla bağlanır ve hidrojen peroksitle oksitlenerek çözünmeyen forma dönüşür. Plastiklerin renklendirilmesinde ve boyalarda kullanılır. Antrakoninler ve indigolar en yaygın olanlardır [23, 26].

İngrain Boyalar

İngrain terimi in situ olarak oluşan bütün boyalar için kullanılabilir. Diazo aromatik aminler ile naftol, fenol, asetoasetilamin gibi bileşenler arasındaki reaksiyonlarla oluşur [23, 29].

Kükürt Boyalar

Aromatik aminlerle sülfür ya da sodyum polisülfürlü fenollerin ısıtılmasıyla oluşan kompleks polimerik aromatiklerdir. Tüm dünyada üretilen boyaların %15'ini oluştururlar. Kükürtlü boyama da vat boyama gibi redüksiyon ve oksidasyon işlemleri gerektirir. Genel olarak pamuk boyamasında kullanılır [23, 26].

Solvent Boyalar

Plastik, cila, mürekkep gibi katı ve sıvı maddelerin renklendirilmesinde kullanılan noniyonik boyalardır. Tekstil boyamalarında fazla kullanılmazlar. Diazo bileşikleri, triarilmetan, antrakonin ve fitalosiyanın en fazla bulunan yapılarıdır [23].

1.4. Tekstil Boyarmaddelerinin Ortaya Çıkardığı Problemler

Dünyada endüstriyel olarak 10.000 den fazla boya ve pigment çeşiti kullanılmakta olup, yaklaşık olarak yıllık 7×10^5 ton boyar madde üretildiği rapor edilmektedir [30]. Boyar maddeler suda 1 mg/L düzeyinde bile kendini gösterir. Tipik olarak bir tekstil endüstrisi atıksuyunda en az 10-200 mg l⁻¹ oranında boyar madde bulunur [31]. Oldukça renkli olan bu atıksular, alıcı ortama boşaltıldığında estetik açıdan problem yaratır (Çizelge 1.4). Daha da önemlisi, su ortamına geçen güneş ışık miktarını azaltarak fotosentez aktivitesinin ve dolayısıyla çözünmüş oksijen miktarının azalmasına neden olur.

Çizelge 1.4. Farklı boyaların ipliğe tutunma yüzdeleri [31]

Boya Sınıfı	İplik Tipi	Tutunma Derecesi %	Atıksuda Kalan Boya Miktarı %
Asidik	Poliamid	80-95	5-20
Bazik	Akrilik	95-100	0-5
Direkt	Seluloz	70-95	5-30
Dispers	Polyester	90-100	0-10
Metal Kompleks	Yün	90-98	2-10
Reaktif	Seluloz	50-90	10-50
Kükürt	Seluloz	60-90	10-40
Vat	Seluloz	80-95	5-20

Boyar maddeler, kimyasal yapılarından ve fotolitik kararlılıklarından dolayı doğal çevrede yüksek oranda kalıcıdır. Bu nedenle ekotoksik zararı ve besin zinciri yoluyla insanlarda biyobirikim olabilme gibi potansiyel bir tehlikesi vardır [29-34].

Boyaların toksik etkileri (öldürücü etki, genotoksisite, mutajenite, ve karsinojenite) balık, alg, bakteri gibi sucul organizmalardan memelilere kadar birçok organizmalarda farklılık

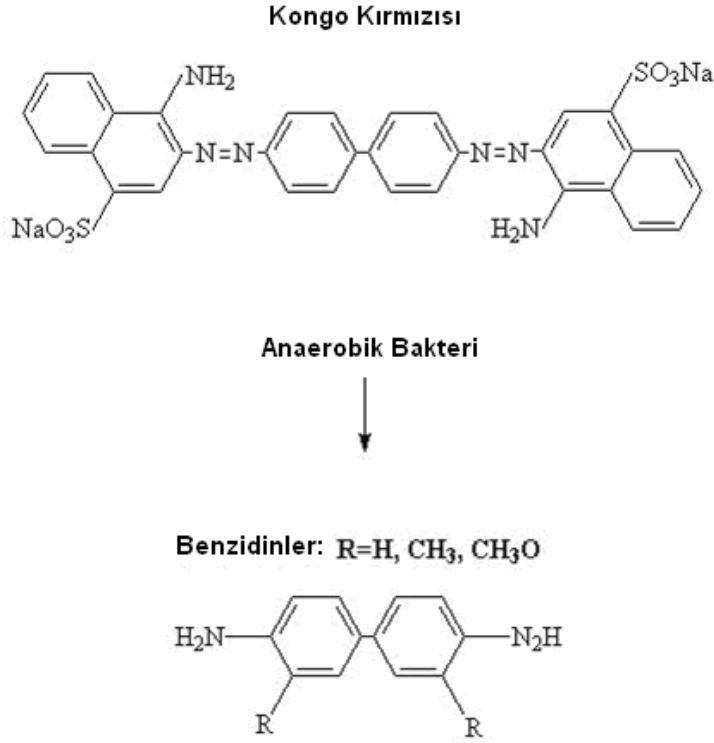
gösterebilir. Boyaların akut toksisitesi genellikle düşüktür. Alg büyüme testinde 1.0 mg/l'den daha düşük konsantrasyondaki boyalar büyümeyi inhibe etmemiştir. Ancak katyonik bazik boyalar akut toksik etki göstermiştir [29]. *Salmonella typhimurium* ile yapılan testte boyaların %28 (15/53)'i mutajenik etkiye neden olmuştur. Fare lenfoma testinde Ames-pozitif boyaların %67 (6/9)'ı mutajenik bulunmuştur [35]. Balık deneylerinde 3000 ticari boyar maddenin %2'si, farelerde yapılan toksisite çalışmalarında ise boyar maddelerin %1'i ölüme yol açmıştır. Bundan dolayı insanda da akut boyar madde toksisitesine bağlı ölümlerin çok düşük düzeyde olduğu iddia edilmektedir [29]. Fakat insanlarda boyalara karşı akut duyarlılık sık görülen bir olgudur. Özellikle dispers boyaların egzama, kontakt dermatit gibi allerjik reaksiyonlara neden olduğu bildirilmektedir [36-38].

Azo boyaların indirgenmesiyle azo bağları kırılır ve mutajenik ve karsinojenik özellikteki aromatik aminler oluşur [30, 39-41]. Memelilerde azo boyaların indirgenmesi barsaklardaki anaerobik bakterilerce yapılır (Şekil 1.1). Karaciğer ve böbrekte de boyar maddeler indirgenebilir. İndirgenme sonucu serbest kalan aromatik aminler, barsaklardan emilir ve idrara verilir. Aromatik aminler özellikle idrar kesesinde kansere yol açar. Kansereleşme mekanizması muhtemelen aromatik aminlerin N-asetilasyonu ve N-hidroksilasyonu sonucu oluşan açiloksi (acyloxy) nedeniyledir. Bu aminler, DNA ve RNA'daki N ve C gruplarını değiştirerek, mutasyona ve tümör oluşumuna yol açabilir [29].

Asidik karakterli boyar madde içeren atıksuların şehir kanalizasyon sisteminde borularda aşınmaya neden olarak zarar verdiği rapor edilmiştir [16]. Ülkemizde bazı aminlerin boya üretiminde üretimi ve ithalatı 1995 yılından itibaren yasaklanmıştır [42].

1.5. Boyar Maddelerin Renginin Gideriminde Kullanılan Teknikler

Atıksu arıtımı, suların çeşitli kullanımlar sonucunda atıksu haline dönüşerek yitirdikleri fiziksel, kimyasal ve bakteriyolojik özelliklerinin bir kısmını veya tamamını tekrar kazandırabilmek ve/veya boşaldıkları alıcı ortamın doğal fiziksel, kimyasal, bakteriyolojik ve ekolojik özelliklerini değiştirmeyecek hale getirebilmek için uygulanan fiziksel, kimyasal ve biyolojik arıtma işlemlerinin birini veya birkaçını ifade etmektedir [6].



Şekil 1.1. Anaerobik bakterilerle azo boyaların yıkımı [32].

Çeşitli fiziksel, kimyasal, biyolojik ön uygulamaları, ana uygulama ve son uygulama teknikleri boya içeren atıksuların renginin giderimini sağlar [29]. Fizikokimyasal teknikler, membran filtrasyonu, koagülasyon/flokülasyon, çöktürme, adsorbsiyon, iyon değişimi, ultrasonik minerilizasyon, elektroliz, oksidasyon ve kimyasal redüksiyondur [29,19]. Biyolojik yöntemler bakteriler, funguslar, bitkiler, maya, alg ve enzimlerin kullanıldığı biyosorbsiyon ve aerobik, anaerobik biyolojik yıkımı sayılabilir [43-58].

Genellikle her yöntemin kullanılması sınırlıdır. Çoğu zaman tek bir yöntemle renk giderilmesi başarısız olur. Bu nedenle çoğunlukla renk gideriminde farklı teknikler birlikte kullanılırlar. Fizikokimyasal yöntemlerin avantajlarının yanı sıra, yüksek maliyet, her boya için uygulanabilir olmayışı ve bazılarında yüksek miktarda atık oluşması gibi dezavantajları da vardır.

1.6. Boyar Maddelerin Gideriminde Biyoteknolojik Uygulamalar

Biyolojik arıtım, endüstriyel atıksularından alıcı sistemlere transfer olan organikler için en etkili giderim işlemidir ve alternatif renk giderim yöntemi olarak önerilmektedir [19, 60-62,]. Tekstil endüstrisi atıksuları için önerilen fiziksel ve kimyasal yöntemlerin yüksek maliyet gerektirmeleri ve her boya için kullanılamıyor olmaları, uygulanmalarını sınırlamaktadır [63].

Boyar maddelerin biyoteknolojik giderimi iki farklı yaklaşımla ele alınabilir. Bunlardan biri, boyar maddelerin biyolojik bir yüzeye tutundurulması (biyosorpsiyon) ortamdan giderimi, diğeri ise enzimatik/mikrobiyolojik renk giderimidir (Çizelge 1.5).

Çizelge 1.5. Tekstil atıksuyu iyileştirilmesinde kullanılan teknolojiler [59].

UYGULAMA	Etkileme Alanı	DEZAVANTAJLARI
Biyolojik Uygulamalar	BOİ azalması	Uzun kalma süresi, besin gereksinimi, geniş tanklar, lagun ve alanlar, çok toksik bileşiklerin giderilememesi
Kimyasal Ayrıştırma	Ağır metaller, askıda katı madde, BOİ, KOİ	Farklı boyalar için çeşitli giderim yolları, KOİ,BOİ giderimi hakkında yetersiz bilgi
Aktif Karbon	BOİ, KOİ, renk	Pahalı kurulum, düşük absorpsiyon kapasitesi, sık ve pahalı yenileme
Ultrafiltrasyon	BOİ, KOİ, renk	Membran kolayca tıkanır, ağır metaller giderilmez, sık sık membran temizliği gerekir
Ozon	BOİ, KOİ, renk	Pahalı kurulum, ağır metal ve katı gereksimi

1.6.1. Biyosorpsiyon

Boyar maddelerin gideriminde bitkisel materyallerin kullanımına yönelik çalışmalar yapılmaktadır (sorpsiyon) [21, 64-72]. Bu amaçla, mısır koçanı ve sapı, buğday kepeği, pirinç kabuğu, odun talaşı, şeker kamışı ve muzun süngerimsi öz dokusu, şeker endüstrisi çamuru, pamuk atıkları gibi birçok lignoselulozik maddeler test edilmektedir [73-77]. Bu süreçte boyar

maddeler bitkisel desteğe tutundurulmuş olur. Fakat bu durumda da, boyarmadde tutundurulmuş bitkisel desteğin ne yapılacağı sorunu ortaya çıkmaktadır.

Biyosorbisyonda temel olarak boyar maddelerin, hücre yüzeyine tutundurulması ve böylece sıvıdan uzaklaştırılması amaçlanmaktadır. Boyar maddeleri tutundurmak için çeşitli funguslar, bakteriler ve algler kullanılabilir [55, 57, 58, 60, 78-80]. Beyaz çürükçül fungusların da bu amaçla kullanımına yönelik çeşitli çalışmalar yürütülmektedir. [61, 66, 81-85].

Tekstil boyalarının kimyası geniş bir yelpazede değişiklik gösterdiği için, mikroorganizmalarla olan etkileşimler boyanın kimyasına ve mikrobiyal kütlelerin kimyasına dayanmaktadır. Bu nedenle kullanılan mikroorganizmanın cinsine ve boyaya bağlı olarak farklı bağlanma hızları ve kapasiteleri söz konusudur. Boyar madde içeren atıksu çok toksik olduğunda, biyosorbsiyon avantajlı olmaktadır [86].

1.6.2. Mikroorganizma veya enzimlerle renk giderimi

Mikroorganizmalarla yapılan çalışmalarda, boyar maddelerin renginin giderimi üzerine yoğunlaşmıştır. Bu amaçla çok çeşitli organizmalar kullanılmakla birlikte, çalışmalar özellikle beyaz çürükçül mikroorganizmalarla yapılmaktadır [21, 84, 85, 87-92]. Boyar maddelerin, mikrobiyal yöntemlerle renginin gideriminde bu mikroorganizmaların oksidatif enzimlerinin önemi yüksektir.

Bakterilerin, azo boyalarını yıkım özellikleri birçok araştırmacı tarafından çalışılmıştır [32, 55, 57, 58, 79, 93]. Fakat boyanın yıkımı sonucu oluşan aromatik aminler, memelilerde karsinogenik ve mutajanik etki yapabilmektedir [35, 94]. Bu nedenle, bu işleme ek olarak, aerobik oksidasyon gibi diğer yöntemlerin uygulanması gerekir [80, 95-97, 99]. Bakterilerle, azo boyalar dışındaki boyaların yıkımına yönelik çeşitli çalışmalar yapılmaktadır [100, 101]. Alglerin boyalar madde yıkım yeteneklerinin test edildiği çalışmalar da vardır [102,103].

1.7. Enzim Üretiminde ve Renk Gideriminde Beyaz Çürükçül Fungusların Kullanımı

Beyaz çürükçül funguslar, *Basidiomycetes* sınıfına dahildir. Bunlar, lignin dahil fenolik kökenli polimerleri tamamen yıkabilen birkaç mikroorganizma grubundan biridir [104]. Beyaz

çürükçül fungusların bu özellikleri, lignin peroksidaz, mangan peroksidaz ve lakkaz gibi aktivitesi özgül olmayan lignolitik enzimlere bağlıdır [21, 32, 86, 105-116].

Funguslarla boyaların yıkımı ilk defa 1983'de *P. chrysosporium* ile test edilmiş ve bazı polimerik boyaların rengini giderdiği gösterilmiştir [83]. Farklı boya gruplarının hemen hepsi fungal olarak yıkılabilmektedir. Fakat yıkım gücü ve boya seçiciliği, kullanılan fungus türü veya soyuna göre değişmektedir. Boya yapısı ve fungal yıkılabilirlik arasında çok net bir ilişki henüz açıklanmamıştır [117].

Renk gideriminde mikroorganizmanın kendisinin kullanılmasının yanı sıra, bu mikroorganizmaların enzimleriyle de renk giderim çalışmaları yapılmaktadır. Burada özellikle lakkazlar ve peroksidazlar öne çıkmaktadır [23, 43, 106, 118-127].

1.8. Lakkaz

Enzimler yüksek katalitik aktiviteleri ve yüksek özgüllükleri nedeniyle kullanım avantajı sağlamaktadır. Biyolojik olarak yıkılmaları, çevreden kolayca temizlenmeleri ve ticari olarak standardize edilmeleri de ayrı bir avantajdır. Çevre dostu olan enzimler kullanıldıkları işlemlerde enerji tasarrufu sağlayarak üretim maliyetini düşürürler. Bununla birlikte enzimler, doğal ortamından ayrıştırıldığında yapılarının kararlı olmaması, izolasyonlarının ve saflaştırılmalarının hala yüksek maliyet gerektirmesi, yaygın olarak kullanılmasını zorlaştırmaktadır. Genel olarak enzimler yüksek özgüllük göstermekle beraber, lakkaz daha az özgüldür [23].

Lakkazlar, aralarında askorbik asit oksidaz ve seruloplazminin de bulunduğu multibakırlı, geniş bir grup enzimlere verilen addır. İlk defa Yoshida tarafından 1883 yılında *Rhus* ağacının lateksinde bulunmuştur. Daha sonra Bertrand 1894 yılında enzimin varlığını funguslarda rapor etmiş ve metal içerikli oksidaz olarak tanımlayarak adlandırmıştır [1, 23].

Lakkazlar (benzenediol: oksijen oksidoredüktaz, E.C. 1.10.3.2) mono, di ve polifenoller, aminofenoller, metoksifenoller, aromatik aminler ve askorbat gibi çeşitli organik ve inorganik substratları oksitleyen ve serbest radikallerin oluşmasını sağlayan bakır içerikli enzimlerdir [128, 129, 124]. Lakkazın çeşitli fenollerin ve halojenlerin, polimerizasyonunu da katalizlediği bilinmektedir [130-132].

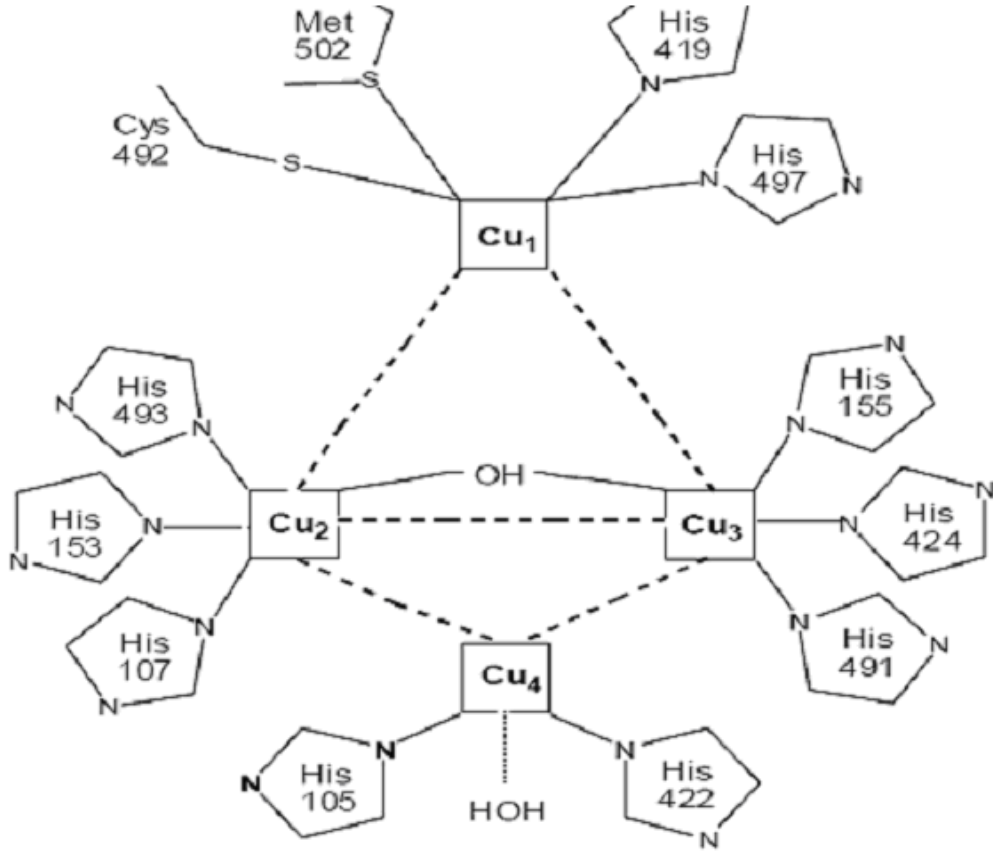
Lakkaz enzimi, pek çok filamentli fungus tarafından (*Basidiomycetesler*, *Ascomycetesler*, *neurospora*), bitkiler (*Rhus vernicifera*) bazı böcekler (*Bombyx sp.*) ve bakteriler (*Azosprillum lipoferum*) tarafından üretilmektedir. Yüksek bitkilerde lakkaz, lignifikasyonda rol alır [133, 134]. Lakkaz, ayrıca bitkileri fungal patojenlere karşı korur [135, 136,134]. Ağaçların üzerinde yaşayan bazı funguslar, lakkazı toksik metabolitlerden korunmak amacıyla salgırlar [137-141] ve bu nedenle de üzerinde yaşadıkları bitkinin lignifikasyonunu azaltırlar [23, 134].

Lakkaz, fenol miktarının ölçümünde biyosensör olarak, biyoyakıt hücrelerde oksijen katodu olarak, tekstil boyalarının gideriminde, organik sentezlerde, immunoassay işaretlemelerinde, delignifikasyonda, demetilasyonda, kağıt hamurunun ağartılmasında olduğu gibi çeşitli biyoteknolojik ve çevresel uygulamalarda serbest ya da tutuklanmış olarak kullanılmaktadır [128, 129, 142-153]. Lakkazın endokrin bozucuların yıkımını katalizlediği de bilinmektedir [154].

Bazı prokaryotlarda da lakkaz varlığı bildirilmiştir. Özellikle ekstrem habitatlarda yaşayan gram (+) ve gram (-) bakterilerde lakkaz üretildiği gösterilmiştir [155, 156]. Çeşitli *Bacillus* soylarının ısıya dayanıklı sporlarında, lakkaz benzeri enzim aktivitesi saptanmıştır [157, 158]

1.8.1. Moleküler özellikleri

Aktif bir holoenzim formunda olan lakkaz molekülü monomerik, dimerik ya da tetramerik bir glikoproteindir (Şekil 1.2). Genellikle monomer başına dört bakır atomu içerir ve bunlar üç redoks bölgesine bağlanmıştır (T1, T2 ve T3 Cu çifti). Moleküler ağırlığı 50-100 kDa. arasında değişmektedir [23]. Karbonhidrat grupları, enzime kovalent bağla bağlanır (%10-45) ve bu durum enzime yüksek oranda kararlılık kazandırır [159, 160].



Şekil 1.2. Lakkazın bakır merkezleri [23].

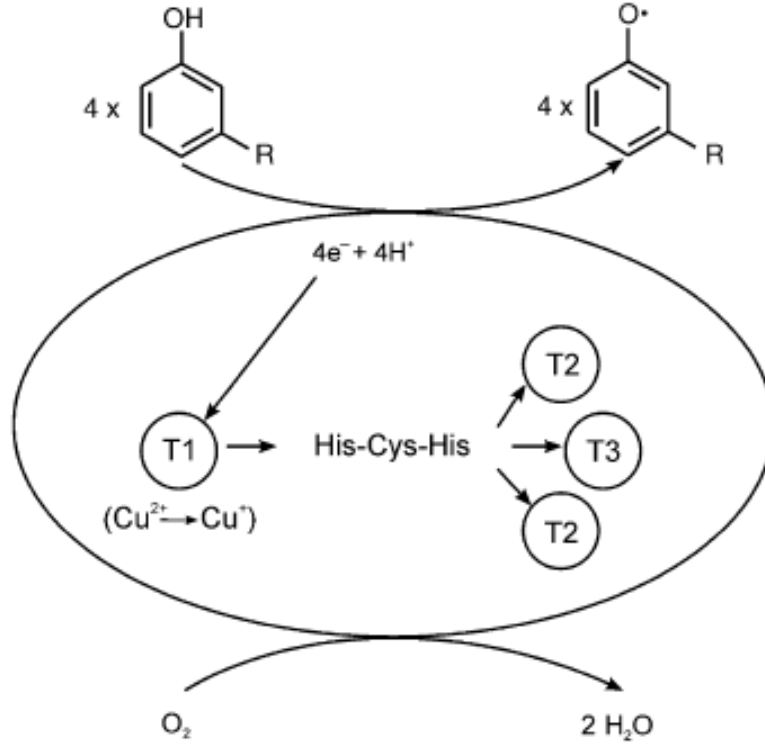
Lakkaz, bakır bölgeleriyle bağlanabilen azid, siyanid, tiosiyamid, ve florid gibi bazı anyonlar tarafından inhibe edilebilmektedir. [157, 161-165].

1.8.2. Lakkazın Katalitik Mekanizması

Lakkazın elektron transferi ve oksijeni suya redüksiyonu mekanizması tam olarak henüz anlaşılmamıştır. Bununla birlikte eldeki kinetik ve yapısal verilere göre birkaç mekanizma öne sürülmüştür [166]. Lakkazın katalitik döngüsünde, substrat elektronun transferiyle T1 bölgesinde oksitlenir. Oksijenin elektron alarak suya indirgenmesi ise T2/T3 merkezinde gerçekleşir (Şekil 1.3).

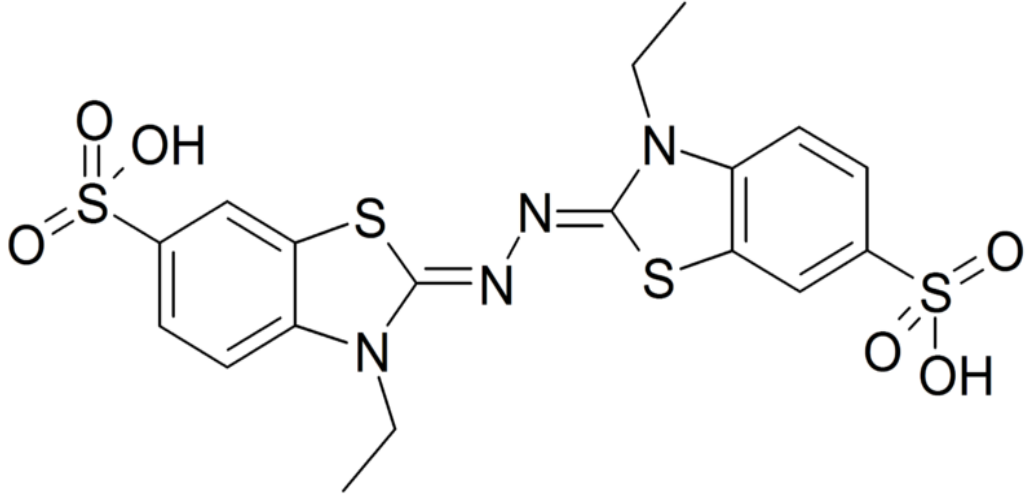
Çeşitli inorganik ve organik substratların elektron oksidasyonunu katalizleyen lakkaz, bir defada dört elektronu aktararak oksijenin suya indirgenmesini sağlar. Lakkaz sadece mono,

orto ve difenollerin hidroksil gruplarından hidrojen atomunun uzaklaştırmasını katalizlemekle kalmamakta aynı zamanda aromatik aminler şiringaldezin ve fenol olmayan bileşikleri serbest radikal formlarına dönüştürmektedir [167, 168].



Şekil 1.3. Lakkazın katalitik döngüsü [124].

Doğrudan katalizlediği reaksiyonların yanısıra lakkaz, ayrıca fenol ya da amin olmayan kimyasalların oksidasyonlarını da katalizler. Fakat bu durumda genelde redoks mediatörlere ihtiyaç vardır. En iyi bilinen mediator ABTS [2,2'-azino-bis(etilbenzthiazolin-6-sulfonik asit)]'dir (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. ABTS nin yapısı [169].

Ligninin polimer yapısı ve lakkazın düşük redoks potansiyeli nedeniyle lakkaz, ligninin sadece fenolik kısmını oksitleyebilir Oysa küçük molekül ağırlıklı, yüksek redoks potansiyele sahip olan ve mediator denen bileşikler, fenolik olmayan bileşiklerin de oksidasyonunu katalizler [168].

Lakkazın, ksenibiyotiklerin de yıkımını katalizleyen sentetik mediatörleri vardır [128, 170]. Lakkazın birçok mikroorganizma tarafından üretilmesi ve bu canlıların üretim yeteneklerinin artırılması, biyoteknolojik alanda önemlidir. Ekstraselular lakkaz, genellikle düşük lakkaz aktivitesine sahip *Basidiomycetes*'de görülür. Bunlardaki lakkaz üretimi çeşitli maddelerle artırılabilir. Lakkaz üretimi, çeşitli besin kaynakları, veratril alkol, 2,5-ksilidin, ferulik asit, guaiakol ve ligninli maddeler (indulin, reaks, lignosülfat) gibi indükleyicilerle artırılabilmektedir [64, 119]. Ayrıca üreme ortamına bazı vitaminlerin ve amino asitlerin eklenmesi de lakkaz üretimini artırmaktadır. [171, 172].

Doğal lakkaz, endüstriyel kullanım için her zaman uygun değildir. Çünkü;

1. Bazı durumlarda aktivite gösterebilmeleri için mediatörlere ihtiyaç duyarlar.
2. Asidik pH'da aktivite gösterdikleri için çevresel şartlar uygun olmayabilir.

Genetik mühendislik teknolojisi ile, daha geniş substrat özgüllüğü, daha yüksek oksidasyon potansiyelliği ve nötral pH'da çalışabilen rekombinant enzim üretimi yapılabilir [79, 122].

1.9. Lakkazın Endüstriyel ve Biyoteknolojik Uygulama Alanları

1.9.1. Tekstil endüstrisi

Ticari olarak 100.000'den fazla boya çeşidinin, yıllık üretimi 7×10^5 tona ulaşmaktadır [173]. Üretilen boyaların 2/3'ü tekstil endüstrisinde kullanılmakta ve bu endüstrideki boyama işlemleri sonunda bol miktarda atıksu oluşmaktadır. Boyalar kimyasal yapılarından dolayı ışığa, suya ve kimyasala karşı dirençlidir [168]. Renk giderimi için kullanılan geleneksel yöntemlerin, bazı boyalarda etkisiz olması ya da ekonomik olmaması nedeniyle, lakkazı temel alan yöntemler geliştirilmektedir [21,174-176].

Lakkazın çeşitli boyar maddelerin renginin gideriminde etkili olması, renk giderimi işlemlerinde kullanılabileceği fikrini vermektedir [7, 21, 92, 106,127, 150, 174, 177]. Fakat lakkazın bazı substratlara düşük özgülük göstermesi bazı boyaların yıkımını sınırlar. Bu sorunu gidermek için lakkaz/mediator sistemleri (LMS) kullanılarak renk giderimi artırılabilir [170, 175]. Lakkaz tekstil sektöründe pamuğun ağartılmasında ve biyotaşlama işleminde kullanılmakta [178] ve denim kumaşlarda indigo boyaların renginin açılmasını sağlamaktadır [179].

1.9.2. Kağıt Endüstrisi

Kağıt yapımı sırasında önemli bir aşama kağıt hamurundan ligninin uzaklaştırılmasıdır. Bu amaçla klorin bazlı ağartıcıların kullanılması, çevresel açıdan uygun değildir. Oksijenle delignifikasyon işleminin kullanılması endüstriyel alanda artış göstermekte ise de ön basamak olarak lignolitik enzimlerle lignin giderimi daha temiz uygulamadır. [180-182]. Lignini yıkan *Basidiomycetes* cinsinin üyeleri oldukça farklı çeşitte lakkaz üretirler [170].

Yapılan biyoağartma çalışmalarında dikkatler odun hamurunda yoğunlaşmıştır ve lakkaz mediator sistemi (LMS)'nin özel kağıt üretiminde kullanılan odun olmayan hamurdaki etkisi çok az bilinmektedir [168].

1.9.3. Besin endüstrisi

Lakkaz, bitkisel yağların kokusunu çözünmemiş oksijenin elimine edilmesiyle iyileştirebilir. Lakkaz içeren çözeltide bekletilen kakao tohumları, kurutulup fırınlanırsa, koku ve tadında iyileşme sağlanmaktadır [183]. Fırıncılıkta, lakkazın biyopolimerle çapraz bağlanmasıyla, hamura maksimum dayanıklılık verir ve hamurun yayılmasını önler [184, 185]. Bunların yanısıra içecek sektöründe, askorbik asit saptanmasında, şeker pancarı pektininin jel oluşumunda pastacılıkta ve biyosensör yapımında kullanılabilir [184].

1.9.4. Şarap ve bira kararlılığı

Lakkazın ana uygulamalarından biri, şarabın kararlılığı için fiziko-kimyasal adsorbanlara alternatif olarak kullanılmasıdır [184]. Şarap etanol, organik asit, tuzlar ve fenolik bileşikler gibi kimyasaldan oluşan kompleks bir yapıdır. Tutuklanmış lakkaz, fenollerin gideriminde başarılı bir şekilde kullanılır [186, 187]. Biracılıkta bulanıklık önemli bir sorundur. Lakkaz eklenmesiyle polifenoller uzaklaştırılarak, berraklık sağlanabilmektedir [184].

1.9.5. Tıbbi uygulamaları

Lakkaz anestetiklerin, anti-inflamatörler, yatıştırıcılar gibi kompleks tıbbi bileşiklerin sentezinde kullanılabilir [188]. Morfini kodeinden ayırt etmekte kullanılan sistemlerde, lakkazı temel alan yeni enzimatik yöntemler geliştirilmiştir [189] Morfin, oksijen tüketimiyle lakkaz tarafından oksitlenir ve glikoz dehidrogenaz tarafından yenilenir. Lakkaz kodeini oksitleyemez, böylece sensör morfini tanır. Parasetamol biyosensörü olarak da kullanımı geliştirilmiştir [190].

1.9.6. Nanobiyoteknoloji

Biyoelektrokimyada, işlemlerin analitik uygulamalara entegre edilerek, klinik ve çevresel analizlerde dedektör olarak geliştirilen biyosensörler kullanılmaktadır [191]. Lakkaz, kofaktörlere ihtiyaç duymadan reaksiyonları katalizlediğinden dolayı, biyosensörlerde fenolik

bileşiklerin, oksijen ya da azidin bulunması için kullanılmaktadır. Bunlara ek olarak, morfin ve kodein, kateşolaminler, bitkisel flavonoidlerin tanısında biyosensörlerde ve elektroimmunoassayde kullanılmaktadır [127, 192]. Nanoteknoloji, daha küçük ve daha hassas biyosensörlerin geliştirilmesini sağlamıştır.

1.9.7. Toprak iyileştirilmesi

Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), diğer ksenobiyotiklerle beraber toprak kontaminasyonunda ana etkenlerdir. Bu nedenle, bunların yıkılması çevresel açıdan çok önemlidir. Lakkaz, 2,4,6-trinitrotoluenin (TNT) indirgenmesi sonucu oluşan metabolitlerini bağlayarak detoksifiye edebilmektedir [146].

Lakkaz ayrıca EPA tarafından toksik madde olarak belirtilen 2,4-dimetilfenolü oksitleyerek gidermektedir [153].

1.9.8. Sentetik kimya

Kompleks polimerlerin ve medikal ajanların sentezlenmesinde kullanılmaktadır [193,194]. Endüstriyel lakkaz kullanılarak fenolik renklendiriciler de sentezlenmiştir [195].

1.9.9. Kozmetik

Saç boyalarında hidrojen peroksitin yerine oksitleyici ajan olarak, dermatolojik ürünlerde deri rengini beyazlatıcı olarak kullanılmaktadır [175, 196]. Birleşmiş Milletler Gıda ve İlaç Örgütü tüzüğünde GRAS olarak kabul edilmiştir. Sakız, ağız yıkama solusyonu ve diş macunlarında izin verilen ölçülerde kullanılmaktadır [197].

Tekstil boyar maddelerin enzimatik olarak yıkımı sonucu toksik (kanserojenik ve mutajenik) aromatik aminlerin oluştuğu bilinmektedir. Bu nedenle yıkım sonucunda oluşan metabolitlerin toksik özelliklerinin bilinmesi gerekmektedir. Bu amaçla farklı test organizmaları ile çeşitli testler yapılmaktadır. Son yıllarda, biyoluminisent bakterilerin kullanıldığı test sistemleri de geliştirilmiştir ve etkili şekilde kullanılmaktadır.

1.10. Mikrotoks Test Sistemi

Mikrotoks, çevresel örneklerde ve saf bileşiklerde akut toksisiteyi ölçen bir test sistemidir. Test sistemi esas olarak bir deniz biyoışıma (biyoluminesent) bakterisi olan *Vibrio fischeri* temel alınarak, biyoışıma düzeyinin inhibisyonunu ölçme esasına göre hazırlanmıştır. Ortamda bulunan toksik ajanın varlığına ve konsantrasyonuna bağlı olarak, bakterinin biyoışımında meydana gelen azalma bir biyoluminometre yardımı ile ölçülür. Bu şekilde salınan ışığa göre elde edilen toksisite değeri ortamda bulunan ışımının %50 inhibisyonuna bağlı olarak “*Etkili Konsantrasyon 50 (EC50)*” yada “*İnhibe Edici Konsantrasyon 50 (IC50)*” değeri ile ifade edilmektedir [198].

Mikrotoks analizinde, test organizması olarak donmuş luminesent bakteri (*Vibrio fischeri-Photobacterium phosphoreum*) kullanılır. Bakterinin ışık üretme mekanizması, hücrenin metabolik işleyişine bağlıdır. Eğer bu işleyiş toksik maddelerce değiştirilir ya da bozulursa bakterinin ürettiği ışığın azalmasıyla sonuçlanır. Sonuçlar 5-30 dakikada alınmaktadır [199].

Diğer test sistemlerine göre Mikrotoks sisteminin bazı avantajları vardır. Bu sistem, hızlı, basit ve diğer kimyasal analizlerle karşılaştırıldığında daha ucuzdur. Tam bir Mikrotoks ölçümü örnek başına 150- 250 \$ arasında değişmektedir . Bu da diğer testlerden yaklaşık 10 defa daha ucuzdur [200].

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Beyaz Çürükçül Fungal Enzim Kaynakları İle Yürütülen Renk Giderim Çalışmaları

Beyaz çürükçül funguslar lignin yıkımında rolü olan çeşitli ekstraselüler enzimler salgırlar. Bu enzimlerden önemli olanları; lignin peroksidazlar (LiP), mangan peroksidazlar (MnP) ve lakkazdır. Peroksidazlar, H₂O₂ varlığında reaksiyonları katalizler. LiP, hem fenolik hem de fenolik olmayan aromatik bileşikleri yıkar. MnP, divalent Mn (Mn²⁺)'ı trivalent Mn (Mn³⁺)'a dönüştürürken, fenolik bileşikleri de oksitler [106, 159, 201]. Bu enzimlerin substrat özgülükleri düşük olduğundan, benzer yapıdaki çok çeşitli substratı kullanabilirler. Bu nedenle lakkaz, pestisitler, TNT ve nitrogliserin gibi patlayıcılar, poliklorlu bifeniller (PCB), polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), sentetik polimerler ve sentetik boyalar gibi çok sayıda organik kökenli kirletici bileşiği yıkabilirler [121, 123, 148, 201-203].

Knapp ve Newby [81], renk gideriminde ilk mekanizmanın boyaların mikrobial hücre yüzeyine adsorblanması olabileceğini bildirmişlerdir. Woung ve Yu [82], renk gideriminin boyaların fungus hiflerine bağlanmasıyla fiziksel olarak ve hücre dışı ve hücre içi enzimlerce yıkılması ile olduğunu öne sürmüşlerdir. Boyayı tamamen tutmuş olan miseller kendilerini yenileyebilir ve tekrar boya adsorblamada kullanılabilirler. Canlı fungus hiflerinde boya moleküllerinin adsorbsiyonu ve ardından yıkımı, endüstriyel alanda beyaz çürükçül fungusları kullanılışlı hale getirebilmektedir [82].

Renk gideriminde boya sınıfının ve kimyasal yapısının etkisi hakkında farklı görüşler bulunmaktadır. Bir görüşe göre, boya özellikleri renk giderimini doğrudan etkilerken, diğer bir görüşe göre ise renk giderimi ve boya özelliği arasında doğrudan bir ilişki bulunmaktadır [63, 204]. Lakkaz, indigoid ve antraknon grubu boyaların rengini yüksek oranda gidermekle beraber, bir azo boyası olan kırmızı 29'ın rengini giderememektedir. Lakkaz, elektron açısından zengin olan substratları daha iyi indirgemektedir [205]. Yeşilada ve Özcan [206] tarafından yapılan bir çalışmada Oranj II boyasının rengi, *T. versicolor*'un ham filtratıyla giderilmiştir. *F. trogii* ile yapılan renk giderim çalışmasında Reaktif Siyah 5 boyasının renginin en iyi pH 6.5 ve 28⁰C de giderildiği gösterilmiştir [207].

Phellinus ribis tek tip lakkaz üretir. Bu protein dimerdir. Sodyum dodesil sülfat (SDS) poliakrilemid jel elektroforez ile 76 Kilodaltonluk iki alt ünitiden oluştuğu gösterilmiştir.

Enzimin yaklaşık %28'i karbonhidrattır. Enzim molekülü bir bakır, bir manganez ve iki çinko atomu içerir. Enzim pH 4.0-6.0 arasında optimum aktivite gösterir. Dimetoksifenol ve aromatik amin bileşiklerini oksitler [208].

Deveci ve arkadaşları tarafından buğday kepeği ve soya kabuklarının kullanıldığı fermantasyon ortamında üretilen *F. trogii*'nin ham kültür filtratı kullanılarak azo boyası olan Remazol Brilliant Blue-R (RBBR)'nin renginin giderimi, çalışılmıştır. Bu çalışmada, lakkazın 10. günde maksimum düzeyde üretildiği bulunmuştur. *F. trogii* kültür filtratı kullanılarak, RBBR nin enzimatik olarak rengi giderilmiştir. Araştırmacılar, enzimatik renk gideriminin maksimum pH 3.0 ve 50⁰C sıcaklıkta olduğunu rapor etmektedirler. Ayrıca, sodyum azid (NaN₃), sistein ve sodyum siyanidin (NaCN) lakkaz aktivitesini inhibe ederek, renk giderim aktivitesini durdurduğunu belirtilmektedir [209].

Machado ve arkadaşları [125] RBBR'yi substrat olarak kullandıkları bir çalışmada, tropikal ekosistemden izole edilmiş *Basidiomycetes* sınıfına dahil 125 fungus türünü denemişlerdir. Funguslardan 106 sınıfın, malt ekstre agar (MEA, %2) ortamında RBBR'nin rengini giderdiği; misel büyümesi gösteren 96 fungusun, *P. chrysosporium*'dan çok daha yüksek oranda renk giderdiği belirtilmektedir. Şeker kamışı atıklarında (baggase) üretilen 35 fungusun ekstraselüler ekstraktlarının RBBR için renk giderim özellikleri ve peroksidaz aktiviteleri araştırıldığında ise, funguslardan hepsinin peroksidaz aktivitesi gösterdiği ancak, beş fungusun renk gidermediği görülmüştür. Funguslardan hepsi lakkaz üretirken, *Peniophora cinerea*, *Psilocybe castanella*, *Trametes villosa*'nın üç soyu, *T. versicolor*, *Melanoporia nigra* ve *Trichaptum byssogenum*'un ise ayrıca MnP ürettikleri gösterilmiştir. Funguslardan *Trogia buccinalis*'de MnP aktivitesi olmadığı fakat, en yüksek renk giderimi yaptığı belirtilmektedir. Araştırmacılar, lakkaz ve peroksidaz seviyelerinin yüksek olması ile RBBR için yüksek derecede renk gideriminin ilişkili olmadığını savunmaktadır.

Lakkaz, beyaz çürükçüllerin yanı sıra *Deuteromycetes* grubu üyeleri tarafından da üretilmektedir. *Pestalotiopsis sp.* üyelerinin sıvı fermantasyon kültürüne 2.0 mM Cu eklenmesiyle, yaklaşık 37 U/ml⁻¹ lakkaz aktivitesi ölçülmüştür [210]. Bu fungusun ham kültür filtratıyla, bir azo boyası olan Direct Fast Blue B2RL nin rengi pH 4.0 de 12 saat içinde %84.4 oranında giderilmiştir. *T. hirsuta* ve bu organizmadan elde edilen lakkazla yapılan diğer bir çalışmada da triarilmetan, indigoid, azo ve antrakinoik boyalar yıkılmıştır. Reaktif Siyah 5 ve bazik kırmızı 9 boya hariç, mikrobiyal ve enzimatik yıkımda benzerlik olduğu gözlenmiştir.

Bu durum, boyaların yıkımında esas olarak hücre dışı lakkazın rolü olduğu fikrini vermektedir. Bu çalışmada antrakinin ve indigo karmin (Asit Mavi 74) boyalarının, azo boyalarından iki kat daha hızlı yıkıldığı belirtilmektedir [21].

Moorthi ve arkadaşları [7] agar ortamında yaptıkları çalışmada, *T. hirsuta* ve *Pleurotus florida*'nın Mavi CA, Siyah B133, Corazol violet SR boyalarının renginin giderimi yeteneklerini test etmiştir. İnkubasyonun 10.gününde *P. florida* ile Mavi CA'nın rengi %96.4, *T. hirsuta* ile %91.1 oranında giderilmiştir. Siyah B133 boyasının rengi *P. florida* ile %95.2 ve *T. hirsuta* ile %65.5 oranında giderilmiştir. Corazol Violet SR için ise bu oranlar, *P. florida* ile %99.5 ve *T. hirsuta* ile %56.98 olarak bulunmuştur. Aynı boyalar kullanılarak sıvı kültür ortamında da çalışmalar yapılmıştır. Mavi CA boyası için maksimum renk giderimi (25 mg/l konsantrasyonda), *P. florida* ile 10. günde %93.5, *T. hirsuta* ile %92.1 oranında gözlenmiştir. Konsantrasyon arttıkça, renk giderimide buna bağlı olarak azalmıştır. En az giderim 75mg/l boya konsantrasyonu için 52.4 (*P. florida*) ve %39.4 (*T. hirsuta*) olarak saptanmıştır. Siyah B133 boyasının rengi diğer boyalara göre daha az giderilebilmiştir. En düşük konsantrasyon olan 25mg/l için *P. florida* ile %64.4 ve *T. hirsuta* ile %57.2 oranında giderim olurken, 75 mg/l konsantrasyonda sırasıyla %28.5 ve %24 oranında giderim gözlenmiştir. Corazol viyole boyası için ise, 75 mg/l konsantrasyonda sırasıyla %58 ve %43.4 oranında renk giderimi bulunmuştur [7].

Beyaz çürükçül fungus olan *Dichomitus aqualens* ile agar ortamında Oranj G, Amaran, Oranj I, Remazol Brilliant Blue R, Cu-fitalosiyenin, poli R-478, Malaşit yeşili ve Kristal viyole'nin renk giderim özellikleri çalışılmıştır. Bu fungus bütün boyaları farklı oranlarda yıkabilmiştir. Malaşit yeşili, Kristal viyole ve Oranj I hariç diğer boyaların rengi 2g/l gibi yüksek konsantrasyonda bile giderilmiştir. Malaşit yeşili ve Kristal viyolenin rengi sadece 0.05g/l, Oranj I'nın rengi ise en fazla 1g/l konsantrasyonda giderilebilmiştir [117]. Başka bir çalışmada da *Dichomitus squalens*'in yanı sıra *Ischnoderma resinosum* ve *Pleurotus calypttratus* beyaz çürükçül funguslarının RBBR ve Oranj G boyalarının rengini giderim yetenekleri araştırılmıştır. Çalışmalar agar ortamında yapılmıştır. Her üç fungusun da iki boyanın rengini etkili bir şekilde giderdiği ancak, renk giderim kapasitelerinin kültür ortamına ve lignolitik enzim üretimine bağlı olduğu gösterilmiştir. *I. resinosum* ve *P. calypttratus* ile Oranj G'nin renginin esas olarak lakkaz tarafından giderilirken, RBBR'nin renk

gideriminde MnP'nin etkili olduğu; *Dichomitus squalens*'da ise hem lakkaz hem de MnP'nin etkili olduğu rapor edilmektedir [61].

Yeşiladalı ve arkadaşları [211], *Trichophyton rubrum* ile yaptıkları bir çalışmada sıvı kültür ortamına boya ilave etmişler ve iki gün içinde Remazol Tiefschwarz'ın %83'ü, Remazol Mavi RR'nin %86'sı, Supranol Turkuaz'ın %80 oranında rengini gidermiştir. Reaktif boyalar olan Remazol Tiefschwarz ve Remazol Mavisinin rengi yıkım sonucunda giderilirken, asit grubu boya olan Sopranol Turkuaz'ın rengi temel olarak adsorbsiyonla giderilmiştir. Araştırmacılar, boya yıkımının ekstraselular MnP ve lakkaz gibi lignolitik enzimlerle ilişkili olduğunu da belirtmişlerdir.

Beyaz çürükçül funguslarla yapılan renk giderim çalışmalarında çoğunlukla reaktif ve azo boyalar kullanılırken, diğer boya gruplarıyla da çalışmalar sürdürülmektedir. *T. versicolor*'la yürütülen bir çalışmada, altı çeşit ksantan boyasının renk giderimi araştırılmış ve çalışmalar, 100 ppm boyar maddeleri içeren sıvı kültür ortamında 24⁰C'de ve 120 rpm'de 14 gün süreyle yürütülmüştür. Sonuç olarak, Flororesein'in rengi %85, 4-Aminflorosein'in %95 ve 5-Aminflorosein'in de %91.9 oranında giderilmiştir. Bunların yanı sıra Rodamin B, Rodamin 123 hidrat ve Rodamin 6G boyaalarında renk giderimi gerçekleşmemiştir. Çalışmayı yapan araştırmacılar, renk gideriminin, ksantan halkasındaki gruplara bağlı olduğunu ileri sürmektedirler. Flororesein, 4-Aminflorosein ve 5-Aminflorosein'in ksantan halkalarında hidroksi grubu bulunurken, Rodamin B, Rodamin 123 hidrat ve Rodamin 6G boyaalarının ksantan halkalarında hidroksi grubu bulunmamaktadır. Fungusun ekstraselular sıvısında bulunan lakkaz enziminin, hidroksil gruplarını etkileyerek renk giderimini sağladığı öne sürülmektedir [84].

Arjantin'de izole edilen 26 beyaz çürükçül fungusun renk giderim kapasitelerinin araştırıldığı bir çalışmada, ekstraselular lignolitik enzim üretimine de bakılarak, Maya özütü/glukoz katı ortamına Malaşit yeşili, Azur B, Poli R-478, Antraquin mavi, Kongo kırmızısı ve Ksilidin boyar maddelerinin renginin gideriminin, enzim üretimiyle ilişkisi araştırılmıştır. Çalışılan funguslardan sadece on tanesi boyaaların tümünü yıkmış ve bu fungusların hepsinde lakkaz, MnP ve LiP üretildiği saptanmıştır. Fakat, diğer dört fungus türünün hiçbirinin boyayı yıkamadığı ve bunlarda aynı zamanda LiP üretilmediği ve, 0.05 U/g'dan daha az MnP üretildiği saptanmıştır. Yeni izole edilen bu funguslar, boya yıkım özelliği iyi bilinen bir fungus olan *Phanerochaete chrysosporium* ile karşılaştırıldığında,

Coriolus (Trametes) versicolor f. antarcticus'un, biyolojik renk gideriminde potansiyel bir aday olabileceği belirtilmektedir. Bu fungusların onsekiz günlük kültürlerinde Ksilidin (24 mg/L), Poli R-478 (75 mg/L), Remazol Brilliant Blue R (9 mg/L), Malaşit yeşili (6 mg/L) ve Indigo karmin (23 mg/L)'in rengi bir saat içinde sırasıyla, 28%, 30%, 43%, 88% ve 98% giderilmiştir. Fungusların hücre dışı sıvılarında lakkaz aktivitesi 0.13 U/ml iken, LiP veya MnP aktivitesi saptanmamıştır [212].

Champagne ve Ramsay [213], *T. versicolor* ATCC 20869 soyunun, modifiye edilmiş Kirk ortamında boya rengini giderim sürecinde MnP ve lakkaz ürettiği ancak LiP, sellobiyoz dehidrogenaz ya da Mn- bağlı peroksidaz üretmediği rapor edilmiştir. Saf MnP, Amaranat, Reaktif siyah 5 (RB5) ve Sibakron Brilliant Sarı gibi azo boyaların rengini giderirken, bir Antraquin boyası olan Remazol Brilliant Blue R (RBBR)'nin rengini giderememiştir. Saf lakkaz ise, RBBR'nin rengini azo boyalardan beş ila on kat daha hızlı gidermiştir. ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) eklenmesinin renk giderim oranını değiştirmediği ve MnP'nin, Amaranat ve RB5'in rengini, hidroksil ve sulfanat gruplarıyla ilişkili olarak en hızlı olarak giderdiği belirtilmektedir. Kültürde, renk giderim sırasında lakkaz/Mn oranı 10:1 ile 20:1 arasında iken, renk giderimi tamamlandığında bu oran 30:1 den daha büyük olacak şekilde artmıştır. Bir ünite birim başına MnP, lakkazdan 30 kat daha hızlı Amaranatın rengini gidermiştir [213].

F. (Trametes) trogii'nin ham kültür filtratlarıyla yapılan bir çalışmada, tekstil sektöründe en fazla kullanılan Antraquin ve mono azo Cr kompleks sınıfına ait boyaların renginin enzimatik giderimi araştırılmıştır. Farklı kültür ortamlarında üretilen *F. trogii* fungusunda aktivatörlerin, lakkaz ve sellobiyoz dehidrogenaz enzimlerinin sentezlenmesini uyardığı bulunmuştur. Lakkaz içeren filtratların farklı sınıflara ait bazı boyaların rengini giderirken, rekalsitran olan boyaların renginin lakkaz ve HBT (1-hydroxybenzo-triazole/violuric acid) medyatörü, ya da lakkaz- sellobiyoz dehidrogenaz uygulamasında etkili şekilde giderildiği rapor edilmiştir. Araştırmacılar, azo boyaların renginin gideriminde sellobiyoz dehidrogenazın, lakkaz aktivitesini desteklediği sonucuna varmışlardır ve enzimatik renk gideriminin, pahalı ve çevreye zarar veren kimyasal uygulamaların yerine kullanılabileceğini öne sürmektedirler [214].

Casas ve arkadaşları [215], akışkan biyoreaktörde *T. versicolor* peletleriyle, Oranj G azo boyasının yıkımını çalışmışlar ve %97 oranında renk giderimi sağlandığını bildirmişlerdir.

Araştırmacılar biyokütlede de, besiyerinde de renk kalmadığını ifade etmektedir. *T. versicolor*'dan elde edilen ticari lakkazla yapılan in vitro yıkım çalışmaları, lakkazın boyaları yıkabileceğini göstermiştir. Araştırmacılar, fungusla veya saf lakkazla yüksek seviyede renk giderimi elde edilebildiğini, fakat bunlar arasında önemli farklılık olduğu belirtmektedirler. *In vitro* uygulamam sonucunda, geride bir renk kalmaktadır [215]. Mısır şurubunun substrat olarak kullanıldığı bir çalışmada, *Lentinula (Lentinus) edodes* ile bazı boyaların renginin giderilebilirliği araştırılmıştır. Amido Siyah, Kongo kırmızısı, Triptan mavi, Metilen mavi, RBBR, Metil viyole, Etil viyole ve Poli R478 200 ppm olacak şekilde ortama eklenmiş ve 18 günlük inkübasyon döneminde rengin tamamen giderildiği gözlenmiştir. Kültür ortamında yüksek MnP aktivitesi (2600 U/g substrat) saptanırken, çok düşük LiP (<10 U/g substrat) ve lakkaz aktivitesi (16 U/substrat) bulunmuştur. Ortamda mangan iyonları ve H₂O₂ yokken, renk gideriminin çarpıcı şekilde azaldığı, bu nedenle *L. edodes* ile renk gideriminde esas olarak MnP'nin rolü olduğu bildirilmektedir [216].

Renk giderim çalışmalarında enzimler serbest olarak kullanılabilirdiği gibi, tutuklanmış funguslarda enzim kaynağı olarak kullanılabilir. *Geotrichum sp.* türleri ile Oranj G, Tripan mavi, Azorubin ve Metil kırmızı boyalarının renk gideriminin araştırıldığı bir çalışmada, kalsiyum aljinat ve poliakrilamid jelle tutuklanmış olarak kullanılmış ve en yüksek renk gideriminin kalsiyum aljinata tutuklanmış funguslarla yapılan çalışmada gerçekleştiği bildirilmiştir. Tutuklanmış funguslar sekiz kez renk gideriminde kullanılmış olup, çalışma süresince herhangi bir aktivite kaybı da gözlenmemiştir [217].

Li ve Jia [218] Kongo kırmızısı boyasının renginin giderimi için pirinç kabuğunu adsorban olarak kullanarak *Schizophyllum sp.* F17 kültürlerinde sürekli bir dekolorizasyon sistemi geliştirmiştir. Araştırmacılar bu sistemde renk giderimini iki mekanizma ile gerçekleştirmişlerdir. Bunlardan birincisi *Schizophyllum sp.* F17 ile, diğeri de pirinç kabuklarının boyar maddeyi adsorbe etmesiyle gerçekleştirilmektedir. Katı fermantasyon ortamında toplamda % 89.71 renk giderimi sağlanırken, *Schizophyllum sp.* F17 kültürü ile renk %60.44 oranında giderilebilmiştir.

Moldes ve arkadaşları [64] tarafından yapılan bir araştırmada, *T. hirsuta* lignoselulozik bir madde olan üzüm çekirdeği içeren ortamda üretilmiş ve 23 kU l⁻¹ lakkaz aktivitesi elde edilmiştir. Elde edilmiş olan bu enzim aktivitesi değeri, lignoselülozlu atık kullanılmayan kültürde elde edilenin yaklaşık on katıdır. Kültür sıvılarının kullanılmasıyla, İndigo karmin ve

Bromfenol mavisinin rengi 24 saatte %100, Metil oranjin %65, Fenol kırmızının ise %36 oranında giderilebilmiştir. Farklı renk giderim oranları lakkazın farklı boya yapılarına olan özgülüğünü göstermektedir.

Dominguez ve arkadaşları [219], veratril alkol ve bakır sülfatın, tutuklanmış *T. versicolor*'un lakkaz aktivitesi üzerine etkisini araştırmışlardır. Çalışmada, indükleyicilerin eklenmediği kültürlerde lakkaz aktivitesi 200 U/l⁻¹ iken, bakır sülfat (3nM) ve veratril alkolün eklenmesi (20mM), lakkaz aktivitesi 4,000 U l⁻¹'e ulaşmıştır.

Palmieri ve arkadaşları [220], bakır ve ferulik asit eklenmiş *Pleurotus ostreatus* kültürlerinden elde edilen ham lakkazı, antraquin boya ve RBBR'nin renk giderimi için kullanılmışlar ve maksimum %70 giderim sağlamışlar. Araştırmacılar, ham kültürün bakır aljinatla tutuklandığında, lakkaz kararlılığının önemli ölçüde arttığını belirtmektedirler. Optimum koşullarda tutuklanmış enzimle işlem 20 kez tekrarlandığında bile hala % 70 renk giderimi sağlanmıştır.

P. ostreatus 32 soyu, önemli ölçüde fazla lakkaz üreten bir fungustur. Fungusun azot sınırlı ortamda üretilmesi, lakkaz üretmesini sağlamaktadır. Karbon azot kaynağı olarak sellobiyoz ve pepton kullanıldığında, daha yüksek aktivite gözlenmiştir. Lakkaz üretimi en fazla ABTS (1 mM) tarafından artırılmıştır ve 400 U/ml' ye ulaşmıştır. Cu⁺² da(1mM) lakkaz üretimini etkileyerek, 360 U/ml' ye ulaşmasını sağlamıştır. Ayrıca bir antraquin boyası olan SN4R'nin rengi, ham lakkazla (30 U/ml) %66 giderilmiş ve bu oran ABTS (%0.16) eklenmesiyle %90' a ulaşmıştır [221].

Trametes hirsute ham kültürünün, bir sentetik asit boyası olan RBBR'nin renk giderimi üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada ABTS, 1-hydroxybenzotriazole (HBT) gibi medyatörlerin lakkaz aktivitesini artırdığını belirtilmektedir Bu anlamda, Sella Solid kırmızının rengini 10 dakikada %88 ve Luganil yeşilini 20 dakikada 49% giderimini sağlayan en etkili mediyatörün HBT olduğu söylenmektedir [175].

2.2. Toksikite ve Detoksifikasyon Çalışmaları

Farklı çalışmalarda tekstil endüstrisinde kullanılan boyaların toksik etkileri rapor edilmiştir. Wang ve arkadaşları [223] onbir reaktif boyanın toksisitesini araştırmış ve luminesent bakteriler üzerine inhibisyon etkisi gösterdiğini rapor etmiştir. Rajaguru ve

arkadaşları [224], dört kükürt boyasının genotoksik etkisini *R. hexadactyla* iribaşları kullanarak araştırmışlar ve Sandopel Bazik Siyah BHLN'nin yüksek derecede, Negrosin ve Turkuaz mavi'nin orta derecede, Dermapel siyah FNI'in ise en az genotoksik etki gösterdiğini bulunmuşlardır. Sharma ve Sobti [225] ise boyar maddelerin önemli oranının toksik, genotoksik, teratojenik ya da karsinojenik olduğunu rapor etmişlerdir. Sülfürlü kırmızı-kahverengi 360 (SRB), Jade yeşili 2G (JG), Reaktif Turkuaz mavisi 5GFL (RTB) ve Direkt Scarlet 4BS (DS) boya ların genotoksik etkisi *Bacillus subtilis* kullanılarak araştırılmış ve tüm boya ların yüksek dozda toksik olduğu bulunmuştur. Hassan Moawad ve arkadaşları [226], Ames testi ve çimlenme testi kullanarak çeşitli boya ların mutajenik etkisini saptamışlardır. Maxilon sarı, Remakril kırmızı, Erio kırmızı, Fast Skarlet sarı, Polar kırmızı (13.5 µg/ml) Direkt kahverengi (13.5 µg/ml) Direkt sarı boyasının (18 µg/ml) *Salmonella typhimurium*'da mutajeniteyi indüklediği bildirilmiştir.

Mathur ve arkadaşları [227] tarafından da boyar maddelerin toksik/genotoksik etkilerini saptamak amacıyla yaptıkları çalışmada yedi farklı boyar maddenin etkisini test edimliler ve çalışmada boyar maddelerin mutajenik etkisini belirlemek üzere AMES testi kullanmışlardır. Test edilen boyar maddelerden sadece birinin mutajenik etki göstermediğini rapor etmişlerdir.

Boyar maddelerin mutajenik veya toksik etkilerinin olmasının yanı sıra, yıkım ürünlerinin de benzer etkiler gösterdiği, çeşitli çalışmalarda belirtilmektedir. Ramsay ve Nguyen [228], Amarant, Tropaeolin O, Reaktif mavi 15, Kongo kırmızısı ve Reaktif siyah 5 boya larının renginin *T. versicolor* ile tamamen giderildiğini, Cibacron Brilliant kırmızısı 3G-P, Brilliant sarısı 3B-A ve Remazol Brilliant mavisi R boya larının renginin bazı boya adsorbleyen biyokütleler ile kısmen giderildiğini bildirdikleri çalışmalarında, Mikrotoks yöntemi ile boya ların toksik etkilerini de incelemişlerdir. Araştırmacılar renk giderimi öncesinde Amaranth ve Tropaeolin O boya larının toksik bir etki göstermediğini ($EC_{20} > \%100$), Cibacron Brilliant Sarı 3B-A, Reaktif mavi 15 ve Cibacron Brilliant kırmızı 3G-P'nin ise düşük toksik etkisinin bulunduğunu ($EC_{20} < \%100$, $> \%75$) saptamışlardır. Remazol Brilliant mavi R toksik bir boya olarak bulunmuş ($75\% > EC_{20} > 50\%$); Kongo kırmızı ve Reaktif siyah 5 boyası ise orta-yüksek toksik etkili bir boya ($50\% > EC_{20} > 25\%$) olarak saptanmıştır. Renk giderimi sonrasında yapılan toksisite testlerinde ise Amaranth, Tropaeolin O ve Reaktif siyah 5 boya ları için toksisitede bir değişim saptanmamış; Reaktif mavi 15, Remazol Brilliant mavi R ve Cibacron Brilliant kırmızı 3G-P boya larının toksik etkilerinin ortadan kalktığı bulunmuştur. Buna karşın

Cibacron Brilliant sarı 3B-A ve Kongo kırmızısı boya ları başlangıçta düşük/orta derecede toksik boya lar iken, renk giderimi uygulamaları sonucunda çok toksik (EC₂₀ <%25) boya lar haline dönüşmüşlerdir.

T. hirsuta ve bu organizmadan saflaştırılmış olan lakkaz enzimi triarilmetan, indigo, azo ve antraquinoik yapıdaki boya ları yıkabilmektedir. Bu boya larla yapılan bir çalışmada *T. hirsuta* lakkaz enziminin boya ların fenolik halkalarındaki yan grupların yapısının, başlangıç renk gideriminde önemli olduğu, enzimin aluminaya tutuklanmasıyla sıcaklığa, halidlere, bakır kela tları ve boya katkı maddeleri gibi bazı inhibitörlere karşı toleransının artırılabilceği bildirilmektedir. Lakkaz 50 mM NaCl ortamında %50 aktivite kaybına uğramakta iken, bu değer tutuklanmış enzim için 85 mM NaCl dir. Araştırmacılar tutuklanmış lakkaz ile boya ların toksik etkisinin %80'e varan oranlarda azaldığını (örneğin antraquinoik yapıdaki boya lar) rapor etmektedirler [21].

T. versicolor fungusu ile Amaranth boyasının renginin giderildiği bir araştırmada, toksisite üzerine etkiler de incelenmiştir [227]. Toksik etkideki değişim Mikrotoks Sistemi kullanılarak incelenmiştir. Ortama boya eklenmeden önce de kültür filtratlarının toksik etki gösterdiği, ancak boya ilavesinden sonra toksik etkinin arttığı bildirilmektedir. Boya ile muamele edilmiş kültürde toksisite uygulama süresince giderek azalmaktadır. Ortamda toksik etki azalışının renk giderimi ile paralellik gösterdiği de ifade edilmektedir. Ortamın pH'sının değiştirilmesi renk giderimi ile birlikte boya maddenin detoksifiye edilmesini de etkilemektedir.

Steril olmayan şartlarda, içeriğinde iki çeşit Antraquin boya sı bulunan bir halı fabrikası atık suyunda *T. versicolor*, çalkalamalı ortamda 10 saat inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonucunda boya %95 oranında ortamdaki uzaklaştırılmıştır [230]. Renk gideriminden sonra hücreden arındırılmış ortamda KOİ değerinin arttığı, buna karşın *Vibrio fischeri* bakterisinin kullanıldığı Mikrotoks test analizinde toksik etkide bir değişim gözlenmediği ve bu nedenle kullanılan fungusun ortamda toksik etkinin azalması ya da artması bakımından bir etkisinin bulunmadığı bildirilmektedir.

Apohan ve Yeşilada [231] tarafından yürütülen bir çalışmada *Funalia trogii* ve *Staphylococcus aureus* üzerine iki farklı azo boyasının (Astrazon kırmızı ve Astrazon mavi) toksik etkisi araştırılmıştır. Araştırmacılar boya maddelerin mikroorganizmaların üremesini

önemli düzeyde inhibe ettiğini bildirmektedir. Bununla birlikte fungus pelletleri ile ön işlemden geçirilen boyar maddelerin toksik etkisinin azaldığı rapor edilmiştir.

Tekstil fabrikası atıksu arıtım sisteminden artımından öncesi ve sonrası alınan giriş ve çıkış suları swiss albino fareler ve soyu bilinmeyen sıçanlara ağız yolu ile uygulanmış ve erkek hayvanların üreme sistemi üzerine etkileri incelenmiştir. Çalışma sonucunda tekstil boyası atıksularının hayvanlarda vücut ağırlığını %7-25 oranında azalttığı ve testis, epididimis, prostat bezi ve seminal keselerin ağırlığında da %2-48 oranında azalmaya yol açtığı bildirilmektedir. Ayrıca tekstil fabrikası atık suyu uygulanan hayvanların üreme organları ve sperm hücrelerinde toplam protein, kolesterol ve toplam lipid değerlerinde de önemli oranda azalış saptanmıştır. Çalışmada histopatolojik yönden yapılan değerlendirmeler de anomalilerin gelişimini gösterir nitelikte bulunmuştur. Bununla birlikte hayvanlara verilen muamele edilmiş atık suyun toksik etkileri daha düşük düzeyde bulunurken, dişilerle eşleştirilen bu hayvanların normal üreme başarısı gösterdikleri gözlenmiştir [232].

Peroksidaz enziminin sucul ortamlardan fenolik bileşikleri, aromatik aminleri ve tekstil boyalarının rengini giderdiği bilinmektedir. Turp peroksidazı Remazol Turkuaz mavi G'nin rengini %59, Lanesat mavi 2R'nin rengini %94 ve tekstil atıksuyunun rengini %52 oranında giderdiği belirtilmektedir. Renk giderimi sonrası *Daphnia magna* toksisite testi yapılmış ve enzimatik uygulamadan sonra boyar maddelerin toksikliğinde bir azalma olduğu, tekstil atıksuyunda *Artemia salina* testinde toksisitede bir değişim olmadığı rapor edilmiştir [233].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar

Ön çalışmalarla çeşitli fungusların lakkaz üretimleri agar ortamında test edildikten sonra en iyi üretim yeteneği olan funguslarla çalışmalar yürütülmüştür.

Bu çalışmada, *Basidiomycetes* sınıfına dahil olan beyaz çürükçül funguslardan *Funalia trogii* ATCC 200800 ve *Trametes versicolor* ATCC 200801 kullanıldı. Bu funguslar İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji-Biyoteknoloji laboratuvarında saf kültür olarak muhafaza edilmektedir.

Çalışmada kullanılan funguslar, sabouraud dekstroz agar (SDA) plaklarında, 30°C'ye ayarlanmış inkübatörde (Sanyo) 6 gün süreyle inkübe edildi ve her 4-5 haftada bir taze besiyerine pasajlamaları yapılarak devamlılığı sağlandı. Fungus kültürleri +4°C' de buzdolabında saklandı.

3.2. Çalışmada Kullanılan Fungusların Agar Ortamında Lakkaz Aktivitelerinin Saptanması

Son konsantrasyonda 0.2 mM ABTS [2.2'-azino-bis(etilbenzthiazolin-6-sulfonik asit) içeren SDA besiyerleri, farklı konsantrasyonlarda $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ içerecek şekilde (0.1, 0.5, 1 ve 2 mM) hazırlandı ve petrilere döküldü. Bölüm 3.1'de belirtildiği şekilde hazırlanmış fungus kültürlerinden 1 cm çapında fungus diskleri kesilerek katı ortamlara ekildi ve 30 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresince her gün misel çapı ve ABTS renk değişim çapı ölçülerek ABTS ve bakır içermeyen kontrol gruplarıyla karşılaştırılmalar yapıldı.

Agar plaklarındaki lakkaz aktivitesinin ölçülmesi için öncelikle fungus agar yüzeyinden kazınarak uzaklaştırıldı. Agardan birer gram olacak şekilde tartılarak tüplere konuldu ve üzerlerine 4'er ml distile su eklendikten sonra ve homojenize edildi. Daha sonra lakkaz aktivitesi belirlendi.

3.3. Çalışmanın Çeşitli Aşamalarında Kullanılan Besiyerleri

Çalışmada kültür ortamı olarak malt özütü ortamı ve stok temel ortam (STO) kullanıldı. STO'nun içeriği Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Stok temel ortamın içeriği

Organik ve İnorganik Maddeler	Miktar (g)
KH_2PO_4	0.2
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05
$(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$	0.5
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.035
Glikoz	2
Maya özütü	1
Distile su (ml)	1000

3.4. Çalışmada Kullanılan Beyaz Çürükçül Fungus Kültürlerinin Hazırlanması ve Homojenizasyonu

Yatık agarda üretilen beyaz çürükçül fungus kültürlerine 10 ml steril distile su eklenerek misel süspansiyonu hazırlandı. Hazırlanan misel süspansiyonun 5 ml'si 100 ml sabouraud dekstroz sıvı besiyeri (SDB) içeren 250 ml'lik erlene aktarıldı ve 30°C, 150 rpm'de çalkalamalı etüvde (G24 Environmental incubator shaker) 5 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası kültür, homojenizatör kullanılarak (Kinematica GmbH) düşük devirde homojenize edildi.

3.5. Çalışmada Kullanılan Boyar Maddeler

Boyar maddelerin lignosellülozlu materyale tutundurulması çalışmasında tekstil boyalarından Astrazon mavi FGRL ve Astrazon siyah FDL kullanılırken, toksisitenin saptanması amacıyla da bu boyalara ek olarak Everzol siyah Reaktif 5 (Reaktif siyah 5),

Remazol Brilliant Blue R (Reaktif mavi 19), Chrocion mavi H-EGN (Reaktif mavi 198) kullanıldı.

3.6. Boyar Madde Adsorbsiyonunda Kullanılan Lignosellülozlu Kaynakların Hazırlanması ve Adsorbsiyon Çalışması

3.6.1. Buğday kepeği çalışması

Buğday kepeği kullanılan çalışmalarda, kepekler elenerek parça büyüklükleri yaklaşık 0.25 mm olacak şekilde hazırlandı. 250 ml'lik erlenlere 1 g olacak şekilde eklendi ve üzerlerine 50 mg/L stok Astrazon mavi veya Astrazon siyah boya çözeltilerinden 100 ml ilave edildi. Daha sonra 30°C'de 150 rpm de 30 dakika uygulama yapıldı ve boyar madde tutundurulmuş kepekler süzülerek alındıktan sonra oda sıcaklığında kurutuldu. Boyar madde tutundurulmuş buğday kepekleri lakkaz üretim çalışmalarında kullanılmak üzere saklandı. Sıvı kısım 6000 rpm'de 8 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatanın rengi spektrofotometrik olarak belirlendi. Renk giderimi % olarak ifade edildi.

3.6.2. Çam kozalağı çalışması

Karaçam (*Pinus nigra*) kozalakları çalışmasında kozalaklar toplanarak kurutulduktan sonra öğütüldü. Eleklerde elenerek parça büyüklükleri 0.25-0.50 mm olacak şekilde hazırlandı ve 250 ml'lik erlenlere birer g olarak eklendi. Daha sonra üzerlerine 50 mg/L Astrazon mavi veya Astrazon siyah boya çözeltilerinden 100 ml ilave edilerek 30°C'de 150 rpm de 30 dakika çalkalandı. Boyar madde tutundurulmuş kozalaklar süzülerek alındı ve oda sıcaklığında kurutuldu. Boyar madde tutundurulmuş kozalaklar, lakkaz üretim çalışmalarında kullanılmak üzere saklandı Sıvı kısım 6000 rpm'de 8 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatanın rengi spektrofotometrik olarak belirlendi. Renk giderimi % olarak ifade edildi.

3.6.3. Pamuk sapı çalışması

Çalışmada kullanılan pamuk sapları, kabukları soyulduktan sonra küçük parçalara ayrıldı. Küçültülen pamuk sapları öğütüldükten sonra boyutları yaklaşık 0.25 mm olacak şekilde hazırlandı. Son konsantrasyon 50 mg/L olacak şekilde Astrazon mavi veya Astrazon siyah boya çözeltileri hazırlandı ve 250 ml'lik erlenlere, 50 ml olacak şekilde, aktarıldı. Bu ortamlara 0.5 gr olacak şekilde pamuk sapları eklendi. Adsorbsiyon çalışması 150 rpm çalkalama hızında 30°C'de 30 dk sürdürüldü. Daha sonra boya tutundurulmuş pamuk sapları süzülerek alındı ve oda sıcaklığında kurutuldu. Boyar madde tutundurulmuş pamuk sapları, lakkaz üretim çalışmalarında kullanılmak üzere saklandı Sıvı kısım 6000 rpm'de 8 dk santrifüj edildikten sonra süpernatanın rengi spektrofotometrik olarak belirlendi. Renk giderimi % olarak ifade edildi.

3.7. Katı Fermantasyon Çalışmaları

Bölüm 3.6.1 ve 3.6.2'de belirtildiği şekilde hazırlanan boya tutundurulmuş ve tutundurulmamış buğday kepeği, kozalak ve pamuk sapları, 250 ml'lik erlenlere 1.5 g, kozalaklar ve pamuk sapları 1g olacak şekilde eklendikten sonra otoklavda 20 dakika sterilize edildi. Üzerlerine 10 ml STO (pamuk sapı için 5 ml) eklendikten sonra Bölüm 3.4'de belirtildiği şekilde hazırlanmış ve homojenize edilmiş fungus kültürlerinden 2 ml ekilerek statik koşulda 30 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun 5., 10., 15. ve 20. günlerinde erlenlere 15'er ml distile su eklendikten sonra 30°C ve 150 rpm 2 saat çalkalandı. Elde edilen süzüntüde daha sonra lakkaz aktivitesi saptandı.

3.8. Yarı Katı Fermantasyon Çalışmaları

Bölüm 3.6.1'de belirtildiği gibi hazırlanan boya tutundurulmuş ve tutundurulmamış kepek ve kozalaklar 250 ml'lik erlenlere 1.5 g olacak şekilde eklendikten sonra otoklavda 20'er dakika sterilize edildiler. Üzerlerine 15'er ml STO eklendikten sonra bölüm 3.4'de belirtildiği şekilde üretilmiş ve homojenize edilmiş fungus kültürlerinden 2'er ml ekim yapılarak 30 °C'de statik koşulda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun 5., 10., 15. ve 20.

günlerinde erlenlere 152'şer ml distile su eklenerek 30 °C ve 150 rpm de 2 saat inkübe edildiler. Daha sonra süzüntülerin lakkaz aktiviteleri ölçüldü.

3.9. Kesikli Kültürde Sıvı Fermantasyon Çalışmaları

Steril edilmiş 50 ml STO ya da malt özütü içeren 250 ml'lik erlenlere, Bölüm 3.4'de belirtildiği şekilde hazırlanan 5'er ml homojenize fungus ekildi. 30 °C'de ve 150 rpm'de 15 gün inkübasyona bırakıldı. Steril koşullarda örnek alınarak lakkaz aktivitesi belirlendi.

3.10. Kesikli Kültürde Sıvı Fermantasyon Ortamı Olarak Malt Özütü Besiyerinin Kullanıldığı Çalışmalar

3.10.1. Kepek eklenmesi

Homojenize fungus kültürlerinden 5'er ml olacak şekilde 50 ml steril malt özütü içeren 250 ml'lik erlenlere ekildi. Daha sonra bölüm 3.6.1'de belirtildiği şekilde hazırlanan boya tutundurulmuş ve tutundurulmamış kepeklerden 1'er g olacak şekilde çalışma planına göre, başlangıçta veya 4. günde olmak üzere kültürlerle eklenerek 30 °C ve 150 rpm'de 15 gün inkübe edildi. Her gün steril koşullarda örnek alınarak lakkaz aktivitesi belirlendi.

3.10.2. Bakır eklenmesi

50 ml malt özütü besiyeri içeren 250 ml'lik erlenlere son konsantrasyonu 0.5 mmol olacak şekilde $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ eklendi ve bölüm 3.4'de belirtildiği şekilde hazırlanan fungus kültürlerinden 5'er ml ekilerek üretime bırakıldı. Çalışmada ayrıca üretim başladıktan sonra bakırın lakkaz üretimine olası etkisini test etmek amacıyla inkübasyonun 4. gününde bakır içermeyen besiyerine son konsantrasyonda 0.5 mmol $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ olacak şekilde eklendi ve 30 °C ve 150 rpm'de 15 gün inkübe edildi. Steril koşullarda örnek alınarak lakkaz aktivitesi belirlendi.

3.11. Aljinat Jele Tutuklanmış Fungus Çalışmaları

3.11.1. Aljinat jele tutuklama

T. versicolor veya *F. trogii* Bölüm 3.4.'de belirtildiği şekilde STO'da üretilerek, %1'lik aljinat çözeltisiyle (w/v) karıştırıldıktan sonra düşük devirde homojenize edildi. Bu çözelti, 0.1 mol CaCl₂ çözeltisine pastör pipeti ile damlatılarak tutuklama gerçekleştirildi. Tutuklama işlemi sonrası tutuklanmış olan funguslar serum fizyolojik çözeltisi içerisinde 1-2 saat bekletildi. Tutuklanmış hücreler steril distile su ile yıkandıktan sonra SDB besiyerinde 24 saat inkübe edildi [234]. İnkübasyon sonrası tutuklanmış hücreler süzüldü ve tartılarak steril koşullarda ortamlara eklendi.

3.11.2. Fungusları aynı aljinat jel içerisinde tutuklama

T. versicolor veya *F. trogii* Bölüm 3.4.'de belirtildiği şekilde STO'da üretilerek eşit miktarda alınıp, %1'lik aljinat çözeltisiyle w/v karıştırıldıktan sonra düşük devirde homojenize edildi. Bu çözelti, 0.1 mol/L CaCl₂ çözeltisine pastör pipeti ile damlatılarak tutuklama gerçekleştirildi. Tutuklama işlemi sonrası tutuklanmış olan funguslar serum fizyolojik çözeltisi içerisinde 1-2 saat bekletildi. Tutuklanmış hücreler steril distile su ile yıkandıktan sonra SDB besiyerinde 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tutuklanmış hücreler süzüldü ve tartılarak steril koşullarda ortamlara eklendi.

3.11.3. Tutuklanmış hücrelerinin kesikli süreçte lakkaz üretimine bakırın etkisi

Aljinat jele tutuklanmış *T. versicolor* ve *F. trogii* hücreleri 50 ml malt özütü içeren 250 ml'lik erlenlere steril koşullarda eklendi. Çalışma planına göre inkübasyonun başlangıcında veya 4. gününde son konsantrasyonda 0.5 mmol olacak şekilde CuSO₄.5H₂O ilave edilerek 30 °C ve 150 rpm'de 10 gün inkübe edildi. Her iki günde bir steril koşullarda örnek alınarak lakkaz aktivitesi belirlendi.

3.11.4. Ayrı jellerde tutuklanmış *T. versicolor* ve *F. trogii* karışık kültürlerinde bakırın lakkaz üretimine etkisi

Tutuklanmış *T. versicolor* ve *F. trogii* hücreleri ile karışık kültür hazırlandı ve 50 ml malt özütü içeren 250 ml'lik erlenlere eklendi Çalışma planına göre, son konsantrasyon 0.5 mmol olacak şekilde $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ başlangıçta veya 4.günde ilave edilerek 30 °C ve 150 rpm'de 10 gün inkübe edildi ve daha sonra lakkaz aktivitesi belirlendi.

3.11.5. Aynı jel içerisinde tutuklanmış *T. versicolor* ve *F. trogii* karışık kültürlerinde bakırın lakkaz üretimine etkisi

Bölüm 3.11.2'de belirtildiği şekilde hazırlanan tutuklanmış hücreler, 50 ml malt özütü içeren 250 ml'lik erlenlere eklendi Çalışma planına göre, son konsantrasyon 0.5 mmol olacak şekilde $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ başlangıçta veya 4.günde ilave edilerek 30 °C ve 150 rpm'de 10 gün inkübe edildi ve daha sonra lakkaz aktivitesi belirlendi.

3.12. Fungus Üretilmiş Kompostta Lakkaz Aktivitesinin Araştırılması

Agaricus bisporus'un üretildiği atık kompost ortamından alınan katı örnekler, uygun miktarda distile suyla karıştırıldıktan sonra, 30°C ve 150 rpm'de 5 saat çalkalandı. Bu süre sonunda karışım süzülerek, 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatanda lakkaz aktivitesi belirlendi.

3.13. Lakkaz Enziminin Sıcaklık Kararlılığı

Malt özütü besiyerinde üretilmiş *F. trogii* ve *T. versicolor* kültür sıvılarındaki lakkaz enzimlerinin sıcaklık kararlılığını saptamak için enzim kaynakları 20, 30, 40, 50, 60 ve 70°C'de inkübe edildi ve 0., 5. ve 24. saatlerde enzim aktivitesi saptandı

3.14. Ham Kùltür Filtratlarıyla Boyar Maddelerin Renginin Giderimi

Başlangıçta, her boyanın maksimum absorbands dalga boyu saptandı. Yıkım çalışması için boyalar Bölüm 3. 9'da belirtildiği şekilde hazırlanarak, üretilen fungusların hücre dışı sıvıları 2/8 (v/v) oranında boya çözeltileriyle (50 mg/L) karıştırılıp, renk değişimi belirli aralıklarda izlendi. Her boyanın işlem sonrası renk değişimi maksimum dalga boyunda (Astrazon mavi FGRL: 601 nm, Astrazon siyah FDL: 601 nm) spektrofotometre (UV-1601 Shimadzu) kullanılarak ölçüldü. Renk değişimi kontrole karşı % renk giderimi olarak ifade edildi.

3.15. Ticari Lakkazla Boyar Maddelerin Renginin Giderimi

Ticari lakkaz (Biochemika, 53738) aktivitesi 26.8 U/ml olacak şekilde hazırlandıktan sonra, konsantrasyonları 50 mg/L olan boya çözeltileri ile 2/8, (v/v (enzim/boya)) oranında karıştırıldı. Böylece karışımdaki son aktivite 5.36 U/ml oldu. Her boyanın işlem sonrası renk değişimi maksimum dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Renk değişimi kontrole karşı % renk giderimi olarak ifade edildi.

3.16. Protein Elektrofözezi

Lakkaz enziminin moleküler ağırlığı SDS-poliakrilamid jel elektrofözezi (SDS-PAGE) ile saptandı. SDS-PAGE'de %10 ayırma jeli ve % 4 sıkıştırma jeli ve protein standartları kullanıldı. SDS-PAGE elektrofözezi sonrası bandlar Coomassie Brilliant Blue R-250 çözeltilisi ile boyanarak proteinlerin moleküler ağırlıkları saptandı [249].

3.17. Analizler

3.17.1. Ham kültür filtratı veya ticari lakkazla muamele edilmiş boyar maddelerin toksisite değişiminin Mikrotoks yöntemiyle analizi (Mikrotoks Toksisite Testi)

Bölüm 3.14 ya da 3.15’de belirtildiği şekilde hazırlanan örneklerin ve kontrol gruplarının Mikrotoks toksisite tayini, Analyzer 500 (SDI, ABD) cihazında Basic test protokolüne göre yapıldı.

3.17.2. Kültür ortamındaki lakkaz aktivitesinin ölçümü

Lakkaz aktivitesinin saptanması için ABTS [2,2’-azino-bis(etilbenzthiazolin-6-sulfonik asit)] substrat olarak kullanıldı. Enzim aktivitesinin ölçümünde 833µl sodyum asetat tamponu (pH 5), 100 µl ABTS ve uygun miktarda enzim içeren kültür sıvısı içerecek şekilde reaksiyon karışımı hazırlandı [119]. Enzim aktivitesi 420 nm dalga boyuna ayarlanmış spektrofotometrede 1 dakikada oluşan absorbans değişimi olarak belirlendi ve U/ml cinsinden ifade edildi.

3.18. İstatistiksel Analizler

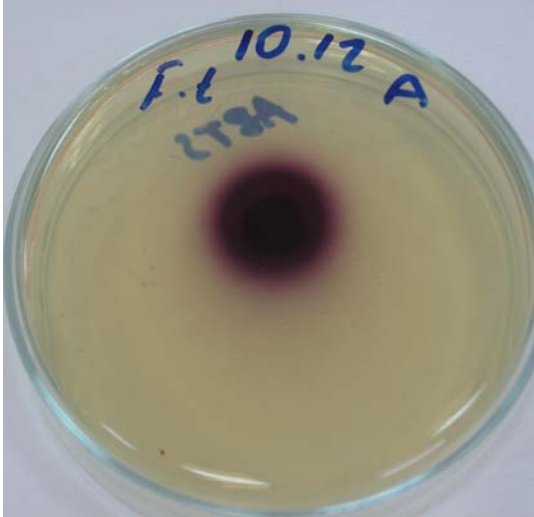
Enzim aktivitesinin hesaplanmasında ve ortalama alınarak standart sapmanın belirlenmesinde SPSS programı (SPSS Inc. USA) kullanıldı.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Fungusların Sabouraud Dekstroz Agar Ortamında Lakkaz Aktivitesi

Çeşitli fungusların lakkaz üretiminin katı ortamda ön testi mümkündür. Çalışmada, bu amaçla Sabouraud dekstroz agar (SDA) katı ortamı kullanılmış ve bu ortamda çeşitli fungusların lakkaz aktivite değişimi incelenmiştir. Bunun için laboratuvarımızda bulunan ve çevreden izole edilen çeşitli beyaz çürükçül fungusların lakkaz aktivite değişimi öncelikle katı ortamda araştırılmış ve bu fungusların içerisinde de en yüksek lakkaz aktivite zonu *F. trogii* ve *T. versicolor* ile saptandığından, tez çalışmalarının bu iki fungus ile sürdürülmesine karar verilmiştir (Şekil 4.1).

F. trogii



P. chrysosporium



Şekil 4.1. SDA+ABTS ortamlarında üreyen funguslarda lakkaz varlığının makroskobik belirlenmesi

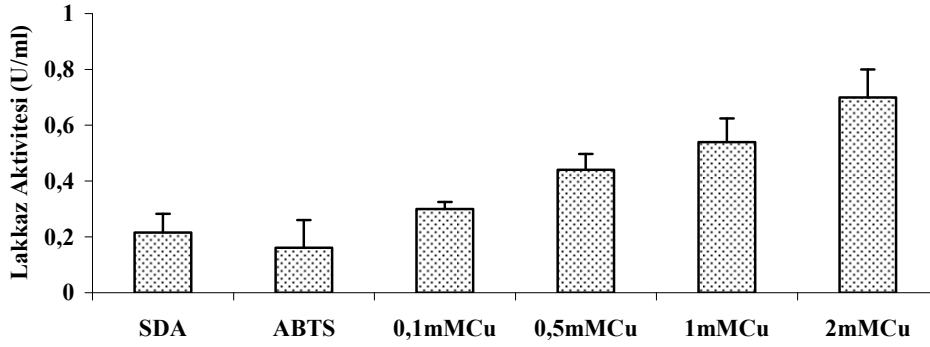
Lakkaz üretimi, veratril alkol, guaikol, 2,5 ksilidin, ABTS, ferulik asit gibi maddelerle indüklenebilir [89, 121, 221]. Bakırın da lakkaz üretimini artırdığına yönelik çalışmalar vardır [64, 90, 235]. Bakır eklenmesi, hem lakkaz üretiminin erken başlamasına yol açmakta hem de üretimi indüklemektedir [64, 221].

Çalışmada agar ortamına farklı konsantrasyonlarda eklenen bakırın ve ayrıca ABTS'nin lakkaz üretimine etkisi araştırıldı. Son konsantrasyonda 0.1, 0.5, 1.0 ve 2.0 mM olacak şekilde

hazırlanan $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ steril şartlarda agar ortamına eklendi ve fungusun petri kabını tamamen doldurduğu yedinci günde örnekler alınarak enzim aktivitesi saptandı.

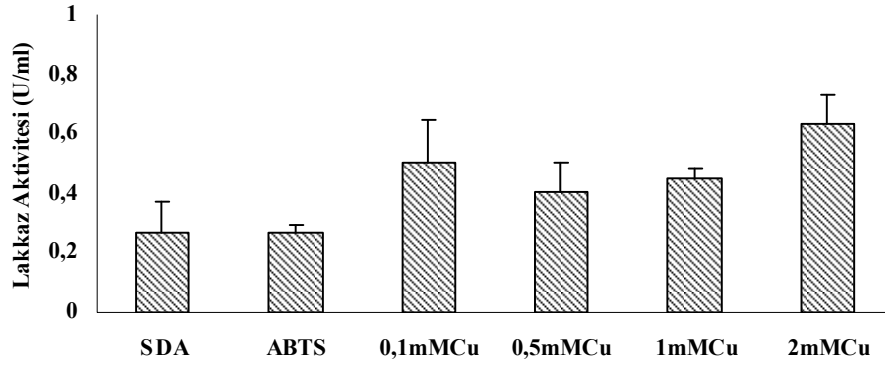
ABTS içeren ve içermeyen SDA ortamlarında *F. trogii* ile benzer enzim aktivite değerleri saptanırken, ortama bakır eklenmesi enzim aktivitesini indüklemiştir. En yüksek aktivite 2 mM bakır içeren ortamda 0.7 U/ml olarak saptanmıştır (Şekil 4.2).

Birhanlı ve Yeşilada [119] *F. trogii* ve *T. versicolor*'la SDA ortamında yaptıkları büyüme testinde bakırın, 0.1-10mM konsantrasyonlarda etkisine bakmışlar ve 2 mM'dan daha yüksek konsantrasyonlarda büyümei inhibe ettiğini belirtmişlerdir.



Şekil 4.2. *F. trogii*'nin SDA, SDA+ABTS ve farklı konsantrasyonlarda bakır içeren SDA ortamlarında lakkaz aktivitesi

Benzer olarak, bakır içeren SDA ortamında üretilen *T. versicolor*'un lakkaz üretimi indüklenmiştir (Şekil 4.2). ABTS'nin ise agar ortamında enzim üretimi açısından pozitif bir etkisi gözlenmemiştir. Bakır ve ABTS'nin her iki fungusu da agar ortamında benzer etkileri gösterdiği gözlenmiştir (Şekil 4.2.ve 4.3).



Şekil 4.3. *T. versicolor*'un SDA, SDA+ABTS ve farklı konsantrasyonlarda bakır içeren SDA ortamlarında lakkaz aktivitesi

Çalışmanın bu kısmında çeşitli fungusların agar ortamında izleme yöntemiyle lakkaz aktiviteleri araştırılmış ve *F. trogii* ve *T. versicolor* en iyi lakkaz üreticisi olarak saptandığından bundan sonraki çalışmalara *F. trogii* ve *T. versicolor* ile devam edilmiştir.

4.2. Boyar Madde Tutundurulmuş Lignosellülozlu Katı Substrat Ortamında *F. trogii* ve *T. versicolor*'un Lakkaz Aktivite Değişimi

Tez çalışmasında birkaç hedef birden oluşturulmuştur. Bunlardan birisi yüksek lakkaz üretimi, bir diğeri de lakkaz üretimi sürecinde tekstil boyalarının neden olduğu çevre kirliliği olasılığının azaltılmasıdır. Yani çevre kirliliği potansiyeli olan maddelerin değerlendirme sürecinde giderimidir.

Tekstil, boya ve bunun gibi fabrika atıksularında bulunan boyar maddelerin giderimi çevre ve insan sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır. Boyar maddelerin gideriminde uygulanabilecek yöntemlerden biri de sorbsiyondur. Bu amaçla sorbent olarak birçok madde kullanılmaktadır. Fakat bu şekilde sıvı ortamdan boyar maddelerin uzaklaştırılması sorunun sadece bir bölümünü çözmektedir. Boyar maddeler çeşitli maddelere adsorbe edildikten sonra, karşımıza boyar madde tutundurulmuş atık problemi çıkmaktadır. Bu amaçla çalışmanın bu bölümünde lignosellülozlu maddeler boyar madde adsorbe etmek için kullanılmış ve boya

tutundurulmuş bu maddelerin çeşitli üretim süreçlerinde lakkaz enziminin üretimi amacıyla değerlendirilme olasılığı araştırılmıştır.

Sorbsiyon işleminde boyar maddenin başlangıç konsantrasyonu, sorbentin yapısı ve parça büyüklüğü, ortamın sıcaklığı ve pH gibi faktörler rol oynamaktadır [236] Laboratuvarımızda yapılan çalışmalarla optimum şartlar belirlenmiş ve adsorbsiyon işlemleri buna göre yürütülmüştür.

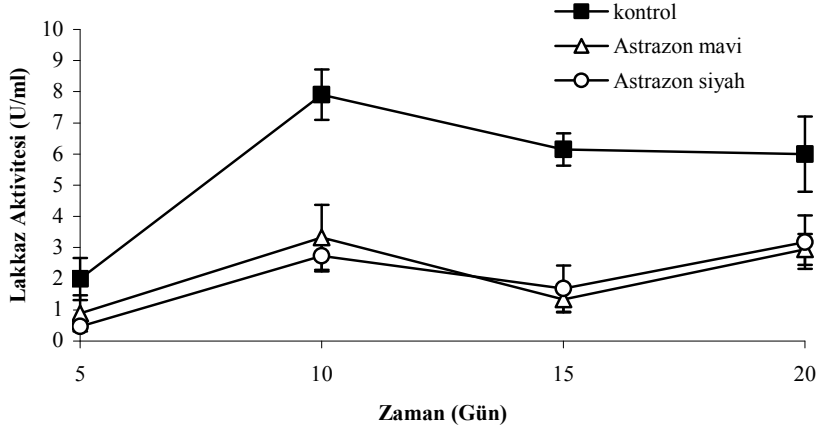
Lakkaz çeşitli boyar maddeleri yıkabilmekte ve rengini giderebilmektedir [7, 61, 92, 207, 210]. Bu açıdan bakıldığında fungusların bu tip substrat ortamında hem lakkaz üretebilmeleri hem de ortamda bulunan boyar maddeleri yıkabilmeleri olasıdır. Bu nedenle çalışmanın bu bölümünde çeşitli lignoselulozik maddeler adsorban olarak kullanılmış ve boya adsorbe edilmiş kaynağın, enzim üretiminde kullanılma olasılığı test edilmiştir.

4.2.1. Kepek Katı Ortamı

Bölüm 3.6.1 de belirtildiği şekilde, boyar maddelerin adsorban olarak kepeğe tutundurulması gerçekleştirilmiştir. Bu süreçte %90 renk giderimi elde edilmiştir. Daha sonra buğday kepeğiyle deney düzeneği hazırlanmış boya adsorbe edilmemiş kontrol, Astrazon mavi ve Astrazon siyah boyaları tutundurulmuş buğday kepeği katı ortamlarına funguslar ekilmiştir [şekil 4.6].

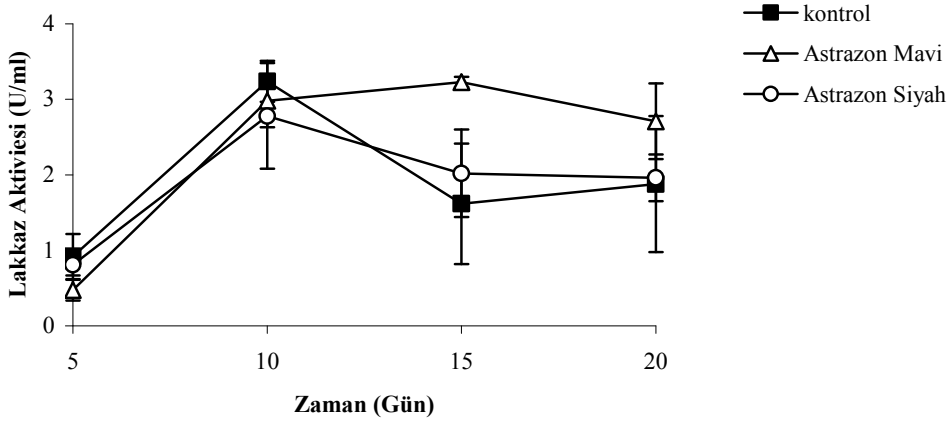
T. versicolor ile yürütülen çalışmalarda en yüksek lakkaz aktivitesi boya içermeyen kontrol grubunda 10. günde 8.57 U/ml, Astrazon mavi tutundurulmuş kepek uygulamasında 20. günde 3.26 U/ml ve Astrazon siyah tutundurulmuş kepek uygulamasında 10. günde 4.39 U/ml olarak saptanmıştır. Kontrol grubunda aktivite, boya tutundurulmuş ortamlardakine göre yaklaşık iki kat daha fazladır (Şekil 4.4). Bunun nedeni, boyanın misel gelişimini inhibe etmesi olabilir. Bu tip boyar maddelerin mikroorganizma gelişimi üzerine negatif etkisi rapor edilmiştir [231].

Misel gelişimi ve buna bağlı olarak lakkaz üretimi ortam nemi ile ilişkilidir. Şekil 4.3'de de görüldüğü üzere, 20. günde aktivite 15. günden daha fazladır. Bu durum ise, aşırı kuruma olması nedeniyle erlenlerin tekrar 2ml SBM ile nemlendirilmiş olması ile açıklanabilir.



Şekil 4.4. *T. versicolor*'da boyar madde adsorblanmış kepek ile hazırlanmış katı fermantasyon sürecinde lakkaz üretimi

F. trogii ile yürütülen çalışmalarda kontrol grubu, Astrazon mavi ve Astrazon siyah tutundurulmuş kepek ortamlarında sırasıyla 10. günde 3.23 U/ml, 15. günde 3.22 U/ml 10. günde 2.78 U/ml olarak saptanmıştır. Şekil 4.5'de de görüldüğü gibi, kontrol grubu ve boyar madde tutundurulmuş gruplar arasında 5. ve 10. günlerde lakkaz üretimi açısından önemli bir fark gözlenmemiştir. Bununla birlikte boyar madde içeren kepek ile hazırlanmış ortamda 2-3 U/ml lakkaz aktivite değerine ulaşılmıştır.



Şekil 4.5. *F. trogii* ile, kepek içeren katı substrat fermantasyon sürecinde lakkaz üretimi

Sonuçlar kepek içeren katı ortamda oldukça yüksek lakkaz aktivitesi elde edilebileceğini göstermektedir. Daha da önemlisi boya gideriminde adsorban madde olarak kullanılacak bu tip katı maddelerin ikinci bir işlemde; enzim üretmek amacıyla değerlendirilebileceğini de göstermiştir. Bu tip işlemle son yıllarda yoğun olarak test edilen katı fermantasyon süreci, olası çevre kirliliği riskini de azaltabilecektir [64, 212, 237].

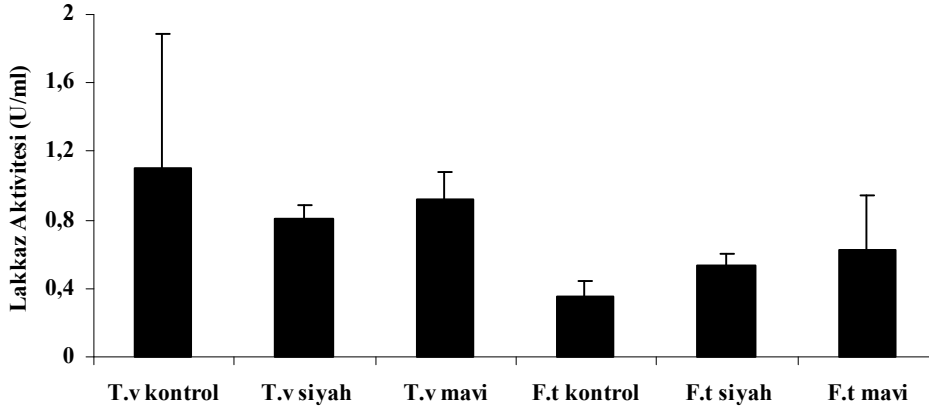


Şekil 4.6. Boyar madde adsorblanmış kepek katı substrat fermantasyonu sürecinde renk giderimi

4.2.2. Kozalak katı ortamı

Kozalaklarının adsorban madde olarak kullanıldığı çalışmada her iki boyar madde de yaklaşık %70 oranında giderilmiştir. Kontrol ve boyar madde tutundurulmuş kozalaklarla katı ortamlar hazırlanmış, *F. trogii* ve *T. versicolor* bu ortamlarda üretilmiş ve 10. günde lakkaz aktivitesi saptanmıştır (Şekil 4.7). Bu ortamda elde edilen en yüksek enzim aktivitesi kontrol

ortamında *T. versicolor* ile 1.10 U/ml dir. Boyar madde içeren substratlarla hazırlanan ortamlarda *T. versicolor* ile 0.8 U/ml'nin üzerinde lakkaz değerine ulaşılmıştır. *F. trogii*'de makroskopik olarak izlenen misel gelişimi, kozalak katı ortamında yavaş ve az olmuştur. *F. trogii*'nin lakkaz aktivitesinin, *T. versicolor*'a göre daha düşük olmasının nedeni bu olabilir.

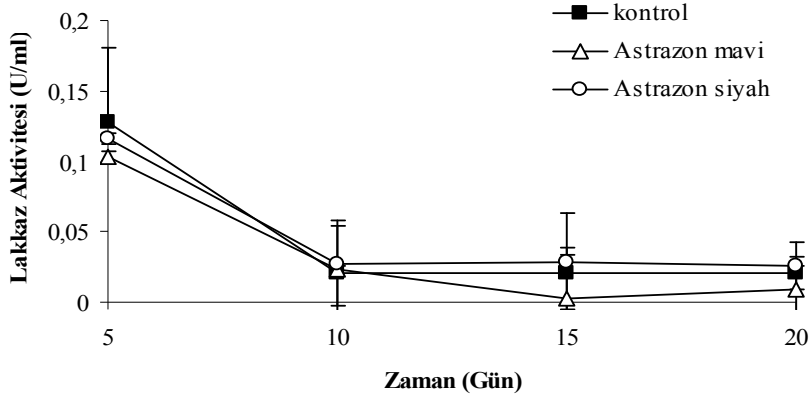


Şekil 4.7. *T. versicolor* ve *F. trogii* ile kozalak içeren ortamda katı substrat fermantasyonu sürecinde lakkaz üretimi

4.2.3. Pamuk Sapı Katı Ortamı

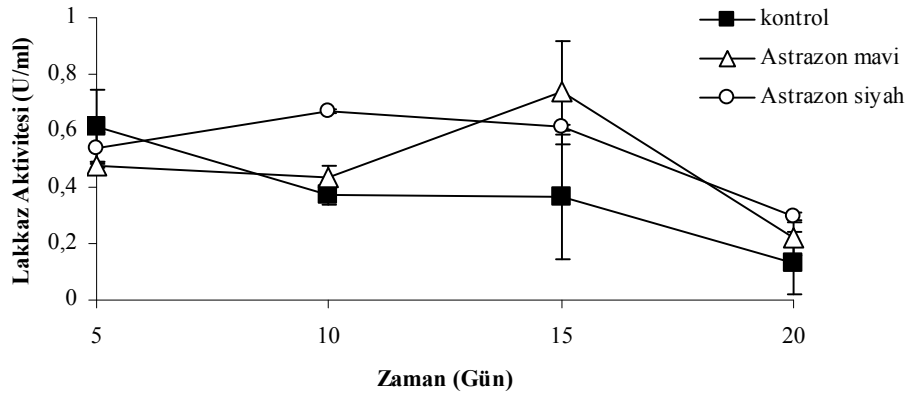
Parça büyüklükleri yaklaşık 0.25 mm olarak hazırlanan pamuk sapsarı, Bölüm 3.5.3'de belirtildiği şekilde boya adsorblamasında kullanılmıştır. Astrazon mavi boyası %98 ve Astrazon siyah boyasının rengi %99 oranında giderilmiştir.

Boyar madde tutundurulmamış (kontrol) tutundurulmuş pamuk sapsarı ile kurulan katı substrat ortamlarında *F. trogii* ve *T. versicolor* ile çalışılmıştır. İnkübasyonun 5. 10. 15. ve 20. günlerinde lakkaz aktivitesi saptanmıştır. *T. versicolor*'la yürütülen çalışmalarda en yüksek lakkaz aktivitesi 5. günde kontrol, Astrazon mavi ve Astrozon siyah gruplarında sırasıyla 0.2 U/ml, 0.11 U/ml ve 0.12 U/ml olarak saptanmıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. *T. versicolor* ile pamuk sapı içeren katı substrat fermantasyonu sürecinde lakkaz üretimi

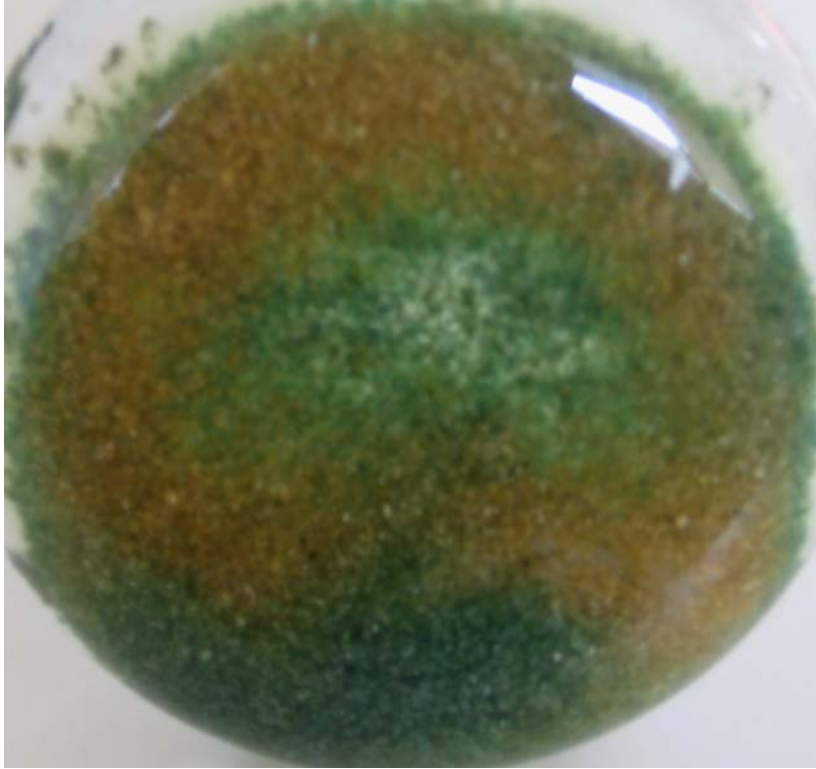
F. trogii ile yapılan çalışmalarda ise en yüksek aktivite kontrolde 5. günde 0.61 U/ml, Astrazon siyah tutundurulmuş ortamlarda 10. günde 0.67 U/ml ve Astrazon mavi tutundurulmuş ortamlarda 15. günde 0.73 U/ml olarak elde edilmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. *F. trogii*'nin boyar madde adsorblanmış pamuk sapı ile hazırlanan katı fermantasyon sürecinde günlere bağlı lakkaz üretimi

Çalışmalar, boyar madde adsorbe edilmiş katı maddenin katı fermantasyon sürecinde lakkaz üretimi için değerlendirilebileceğini de göstermektedir [Şekil 4.10]. Lignoselulozlu katı maddeler, fungusların doğal habitatlarına benzedikleri için bu gibi ortamlarda rahatça

üreyebilirler [80]. *T. versicolor*'un buğday samanı, odun kabuğu, fıstık kabuğu kullanılan katı ortamlarda üreyerek, yüksek lignolitik enzim ürettiği Libra tarafından rapor edilmiştir [80]. Cauto ve arkadaşları da [238] çeşitli tarımsal substratların, katı fermantasyonunda lignolitik enzim üretiminde başarıyla kullanılabileceğini belirtmişlerdir.



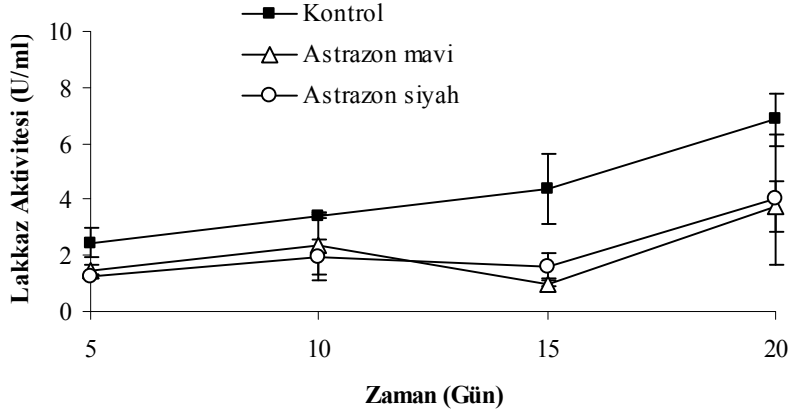
Şekil 4.10. Astrazon siyah adsorblanmış pamuk sapı katı ortamında bölgesel renk giderimi.

4.3. *F. trogii* ve *T. versicolor*'un Boyar Madde Adsorblanmış Çeşitli Lignosellulozlu Substrat İçeren ortamlarda YarıKatı Fermantasyonla Lakkaz Üretimi

4.3.1 Kepek Uygulaması

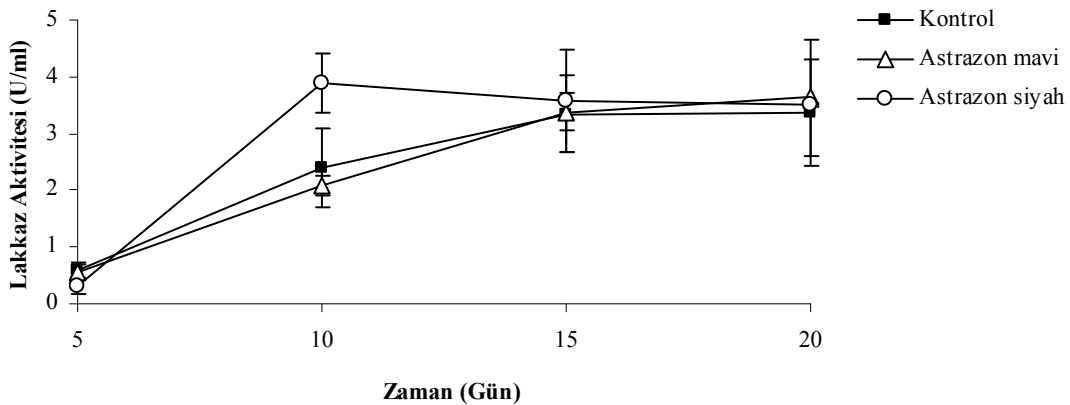
T. versicolor ile yapılan çalışmada tüm gruplarda en yüksek aktivite 20. günde bulunmuştur. Kontrol grubunda 20. günde 6.8 U/ml, Astrazon mavisi adsorbe edilmiş kepek

içeren ortamda 4.0 U/ml ve Astrazon siyah boyası adsorbe edilmiş kepek içeren ortamda ise 3.78 U/ml aktivite saptanmıştır (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. *T. versicolor* ile boyar madde adsorblanmış buğday kepeği ortamında yarı katı fermantasyon sürecinde lakkaz üretimi

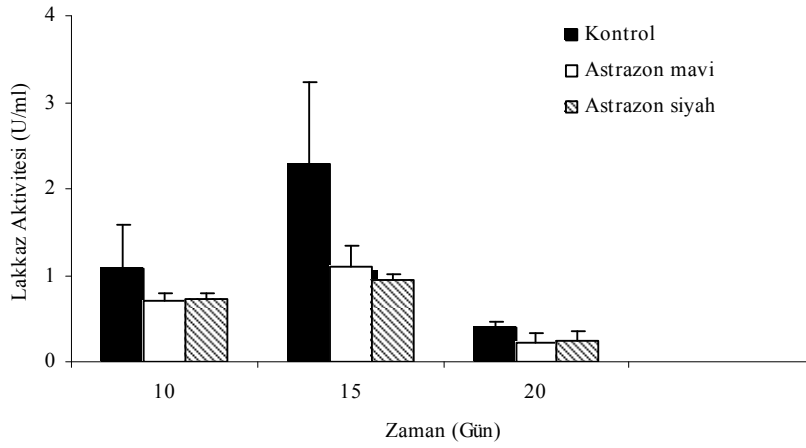
F. trogii ile de yüksek aktivite değerlerine ulaşılmıştır. Astrazon siyahı adsorbe edilmiş kepek içeren yarı katı ortamda 10. günde 4.0 U/ml'ye ulaşan önemli bir aktivite değeri elde edilmiştir. Astrazon mavisi adsorbe edilmiş kepek içeren kültürde de 15. günde 3.0 U/ml'nin üzerinde aktivite saptanmıştır (Şekil 4.12). Yarı katı kepek ortamında yapılan çalışmalarda, *T. versicolor*'un kontrol grubunda elde edilen aktivite değeri *F. trogii*'nin kontrol grubunda elde edilen değere göre daha yüksekken, diğer gruplardan elde edilen sonuçlar arasında önemli bir farklılığın bulunmadığı da saptanmıştır.



Şekil 4.12. *F. trogii* ile boyar madde adsorblanmış buğday kepeği ortamında yarı katı fermantasyon sürecinde lakkaz üretimi

4.3.2. Kozalak Uygulaması

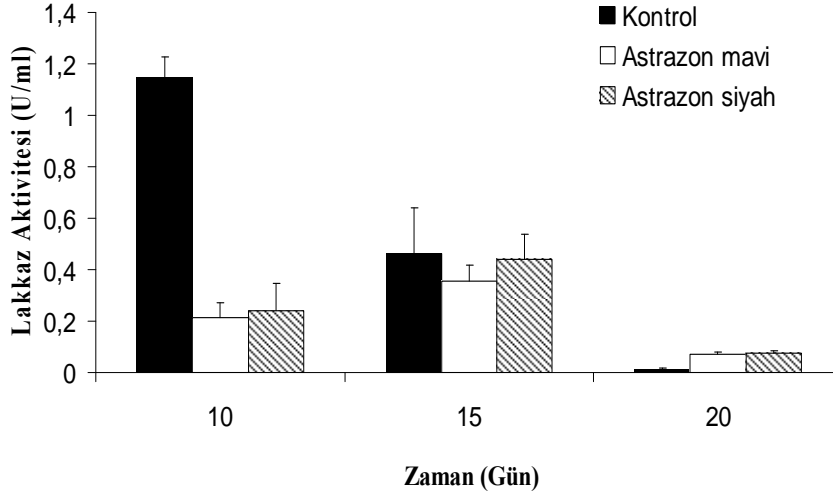
Boya adsorbe edilmiş veya edilmemiş kozalak içeren ortamlarda, *T. versicolor* için en yüksek aktivite 15.günde saptandı. Kontrol için 15. günde aktivite değeri 2.3 U/ml olarak saptanırken, Astrazon mavi adsorbe edilmiş kozalak içeren yarı katı kültürde 1.10 U/ml ve Astrazon siyah adsorbe edilmiş kültürde 0.94 U/ml aktivite değeri saptanmıştır (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. *T. versicolor* ile kozalak içeren ortamda yarı katı fermantasyon sürecinde lakkaz üretimi

F. trogii ile yürütülen çalışmada kontrol için 10.günde 1.15 U/ml, Astrazon mavi adsorbe edilmiş kozalak içeren kültürde 15.günde 0.36 U/ml ve Astrazon siyah adsorbe edilmiş kozalak içeren kültürlerde 15.günde 0.44 U/ml olarak saptanmıştır (Şekil 4.14).

Bu ortamda, kepek ortamına göre daha düşük aktivite elde edilmiştir. Kepeğin kozalağa göre daha iyi bir besin kaynağı görevi görmesi, bunu sağlayabilir. Buğday kepeği sadece fungus miselleri için mekanik destek oluşturarak üremeyi etkilemez [239]. Aynı zamanda yüksek miktarda ferulik, vanilik ve kumarik asit gibi fenolik bileşikler içermesi lakkaz aktivitesinin artmasında etkilidir [238, 240].



Şekil 4.14. *F. trogii*'de kozalak içeren ortamda yarı katı fermantasyon sürecinde lakkaz üretimi

Kozalak kullanılan katı ve yarıkatı ortam arasındaki aktivite karşılaştırıldığında, yarı katı ortamdaki lakkaz aktivitesinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu durumun, ortamdaki besin miktarından ve serbest su miktarından kaynaklanmış olduğu düşünülebilir. Katı ve yarı katı fermantasyon ortamlarının avantajları karşılaştırıldığında, yüksek verim düşük enerji ihtiyacı ve atıksu çıkışının olmaması nedeniyle, lakkaz üretimi için, katı fermantasyonu daha avantajlı yaptığı belirtilmektedir [241].

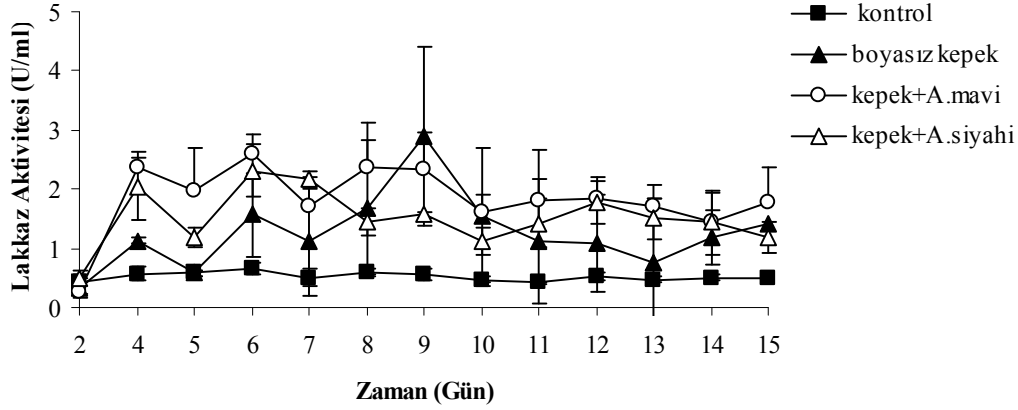
4.4. Sıvı Kültür Çalışmaları

4.4.1. Kepek eklenmiş sıvı kültür

Çalışmaların bu bölümde kesikli kültürde sıvı kültür çalışmaları yapılmış ve ek katkı maddesi olarak kullanılan kepeğin lakkaz üretimi üzerine etkisi test edilmiştir. Bu amaçla üretimin başlangıcında ve ayrıca üreme başladıktan sonra 4. günde besiyerlerine/kültürlere kepek eklenmiştir.

T. versicolor ile yürütülen sıvı fermantasyon çalışmalarında kepek eklenmesi enzim üretimini indüklemiştir. *T. versicolor*'da ortama başlangıçta kepek eklenmesi, dördüncü günde ortama kepek eklenmesine göre daha yüksek bir aktiviteye neden olmuştur. Boya tutundurulmamış kepek eklenmiş kültürlerde de yüksek bir enzim aktivitesi elde edilebilmiştir

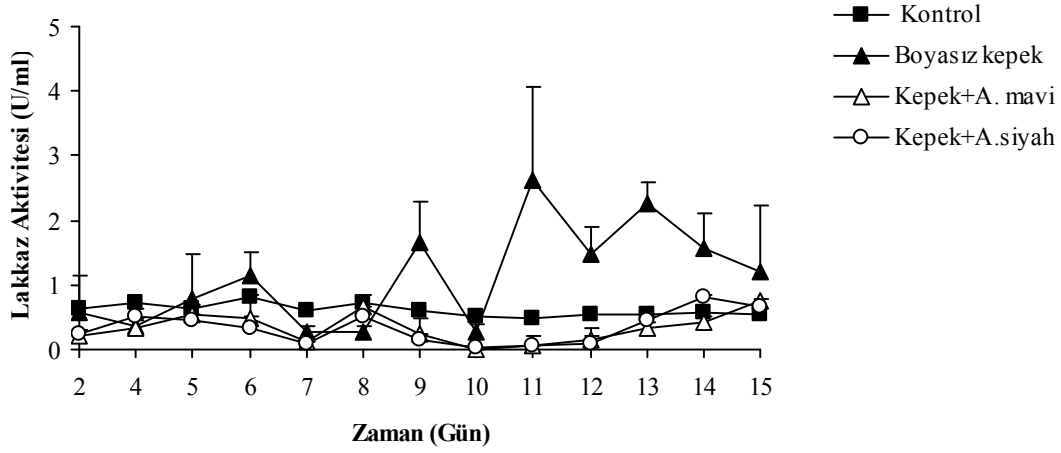
(Şekil 4.15). Üremenin başlangıcında kepek eklenen çalışmalarda, kepek eklenmemiş kontrol kültüründe en yüksek aktivite 8. günde 0.6 U/ml, boyasız kepek kültüründe 9. günde 2.9 U/ml, Astrazon mavisi eklenmiş olan kepekli kültürde 6. günde 2.3 U/ml ve Astrazon siyahı eklenmiş olan kepekli kültürde ise 6. günde 2.6 U/ml olarak bulunmuştur (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Başlangıçta kepek içeren ve içermeyen (kontrol) *T. versicolor* sıvı kültürlerinin lakkaz aktivite değişimi

Üremenin 4. gününde kepek eklenmiş kültürde, boya tutundurulmuş ve tutundurulmamış kepek ve kepeksiz kontrol kültürlerinden elde edilen bulgulara göre en yüksek aktivite; kontrol kültüründe 6. günde 0.82 U/ml, boyasız kepek kültüründe 11. günde 2.63 U/ml, Astrazon mavisi eklenmiş olan kepekli kültürde 15. günde 0.7 U/ml ve Astrazon siyahı eklenmiş olan kepekli kültürde ise 14. günde 0.82 U/ml olarak bulunmuştur (Şekil 4.16).

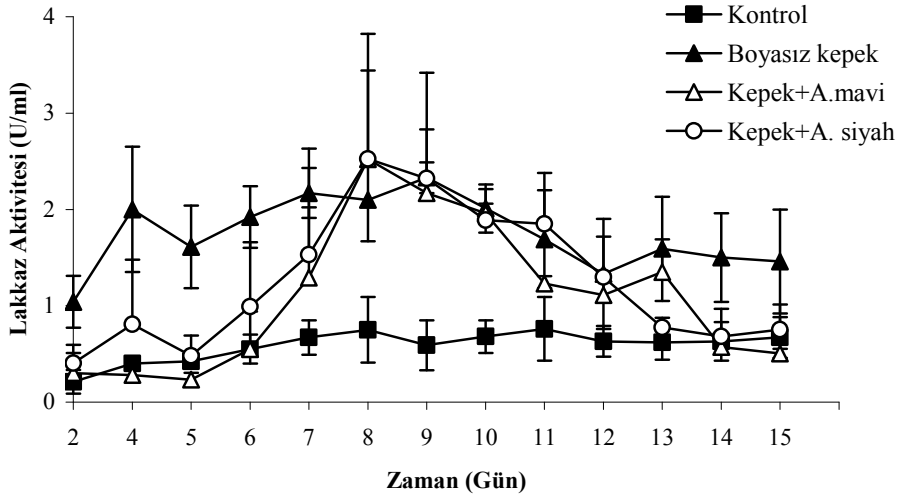
F. troglia sıvı kültür ortamına üretimin başında kepek eklenmesi, kepek eklenmemiş sıvı kültür ortamına (kontrol), göre lakkaz üretimini önemli oranda indüklemiştir. Şekil 4.17'den izlenebileceği gibi boya tutundurulmamış kepek, başlangıçtan itibaren lakkaz üretimi üzerine olumlu etki yapmıştır.



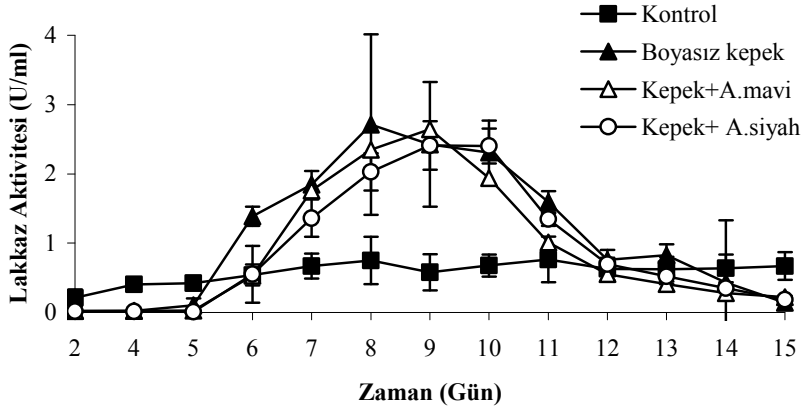
Şekil 4.16. Üretimin 4. gününde kepek eklenmiş *T. versicolor* sıvı kültürlerinin lakkaz aktivite değişimleri

Boya tutundurulmamış ve tutundurulmuş kepeğin başlangıçta eklenmesi 6. günden itibaren kontrole göre lakkaz aktivitesi üzerine pozitif etki göstermiştir (Şekil 4.17). Kontrol kültürde en yüksek aktivite 8. günde 0.76 U/ml, boya tutundurulmamış kepek içeren kültürde 9. günde 2.4 U/ml, Astrazon mavi boyası tutundurulmuş kepek içeren kültürde 8. günde 2.52 U/ml ve Astrazon siyah boyası tutundurulmuş kepek içeren kültürde 8. günde 2.52 U/ml olarak saptanmıştır (Şekil 4.17).

Bulgulardan görüleceği üzere, ortama kepek eklenmesi lakkaz aktivitesi üzerine olumlu etki yapmıştır. Kepek eklenmesine bağlı olarak 2 tür etkiden bahsedilebilir; kepek, mikroorganizmalar için kısmi tutunma yüzeyi oluşturabilir ve ayrıca kepek, ek besin kaynağı görevi görebilir. Kepeğin yapısında bulunan fenolik bileşikler [240] ve selüloz [64] hemiselüloz gibi karbonhidratların yıkılmasıyla oluşan veratril alkol, lakkaz üretimini indüklemiş olabilir [241]. Astrazon mavi ve Astrazon siyah boya tutundurulmuş kepek eklenmesi durumunda da, kepek eklenmemiş sıvı kültür ortamına göre lakkaz aktivitesi üzerine pozitif etki gözlenmiştir.



Şekil 4.17. Başlangıçta kepek içeren ve kepek içermeyen (kontrol) *F. trogii* sıvı kültürlerinin lakkaz aktivite değişimi



Şekil 4.18. Üretimin 4. gününde kepek eklenmiş *F. trogii* sıvı kültürlerinin lakkaz aktivite değişimleri

Üretimin 4. gününde boya tutundurulmuş ve tutundurulmamış kepeklerin eklenmesi, 5. günden itibaren lakkaz üretimini indüklemiştir. Kontrol grubunda en yüksek aktivite 11. günde 0.76 U/ml, boya tutundurulmamış kepek eklenen grupta 8. günde 2.71 U/ml, Astrazon mavisi grubunda 9. günde 2.64 U/ml ve Astrazon siyahı grubunda 10.günde 2.40 U/ml olarak elde

edilmiştir (Şekil 4.18). Sıvı fermantasyon sürecinde boya tutundurulmuş kepeklerin renginin açıldığı gözlenmektedir (Şekil 4.19). Bu da boyar maddelerin bu süreçte yıkıldığını göstermektedir.



Şekil 4.19. Boyar madde tutundurulmuş kepek eklenen sıvı fermantasyon ortamında renk değişimi

4.5. Stok Temel Ortam ve Malt Özütü Ortamında Lakkaz Üretimi

Bu çalışmada fungus üretiminde sıklıkla kullanılan iki farklı besiyerinde lakkaz üretiminin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışma kesikli kültürde çalkalamalı olarak yürütülmüş ve bakırın bu ortamlarda lakkaz üretimine etkisi araştırılmıştır (Çizelge 4.1).

Malt özütü kullanılan fermantasyon ortamında *T. versicolor* kontrol grubu ve bakır eklenmiş olan grupta en yüksek lakkaz aktivitesini 10. günde sırası ile 0.64 U/ml ve 3.4 U/ml olarak göstermiştir. STO kontrol grubunda ise en yüksek aktivite 10. günde 0.47 U/ml olarak saptanırken, bakır eklenen kültürlerde en yüksek aktivite 6. günde 2.95 U/ml olarak

bulunmuştur. *T. versicolor* ile malt özütü ortamında ise daha yüksek lakkaz aktivitesi değerlerine ulaşılabilmiştir.

Çizelge 4.1. *T. versicolor* ve *F. trogii*'nin STO ve malt özü besiyerlerinde (MÖB) elde edilen en yüksek lakkaz aktivitesi

Funguslar	MÖB		STO	
	Kontrol	Bakır eklenmiş	Kontrol	Bakır eklenmiş
	Lakkaz aktivitesi (U/ml)		Lakkaz aktivitesi (U/ml)	
<i>T. versicolor</i>	0.64	3.4	0.47	2.95
<i>F. trogii</i>	0.67	25	0.13	5.95

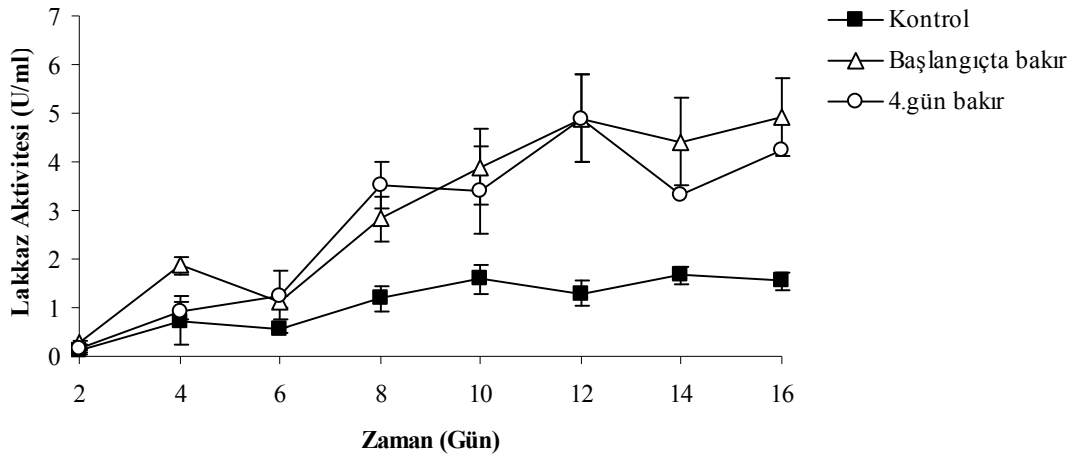
F. trogii kontrol grubunda malt özütü besiyerinde en yüksek lakkaz aktivitesi 2. günde 0.074 U/ml, 6. günde ise 0.67 U/ml olarak saptanırken, bakır içeren ortamda başlangıçta 0.22 U/ml olan aktivite, 10. günde yüz katından daha fazla artış göstererek yaklaşık 25 U/ml düzeyine ulaşmıştır (Şekil.4.21). STO'da ise, kontrol grubunda aktivite çok düşük düzeyde saptanmış olup, en yüksek aktivite 10. günde 0.13 U/ml olarak saptanmıştır. Bakır eklenen grupta başlangıçta 0.017 U/ml olan aktivite, giderek artış göstermiş ve 10. günde 5.95 U/ml düzeyine erişmiştir (Çizelge 4.1).

Sonuçlar değerlendirildiğinde, malt özütü besiyerinde daha yüksek lakkaz üretimi yapılabileceği gözlenmiştir ve devam eden çalışmalarda bu ortamın kullanılmasına karar verilmiştir.

4.6. Kesikli Kültürde Lakkaz Üretimine Bakırın Etkisi

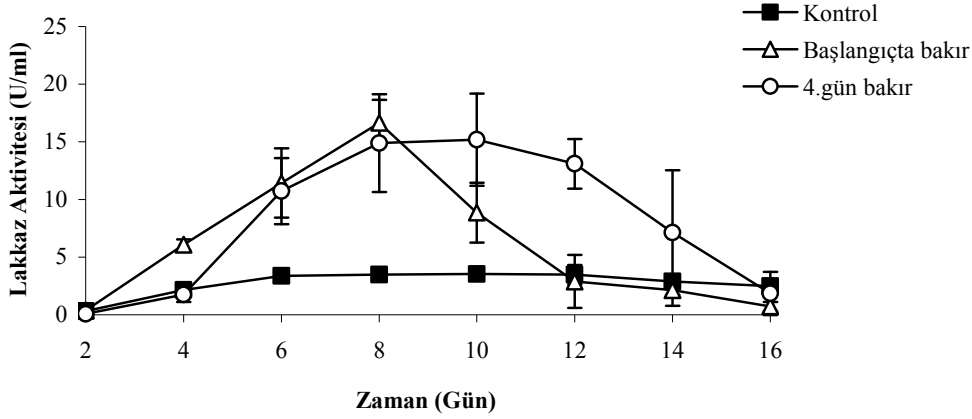
Kesikli üretim sürecinde lakkaz üretimine bakırın etkisi malt özütü besiyerinde test edildi ve bir grup kültüre başlangıçta, diğer bir grup kültüre ise üretimin 4. gününde 0.5 mM ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) eklenerek araştırmalar yürütülmüştür.

T. versicolor'da başlangıçta Cu eklenmesi üretim üzerine pozitif bir etki yapmış ve 12. günde en yüksek aktivite 4.9 U/ml olarak bulunmuştur. Dördüncü günde ortama bakır eklenen kültürlerde ise lakkaz aktivitesi yine 12. günde 4.3 U/ml olarak saptanmıştır (Şekil 4.20). Kesikli kültürlerin lakkaz üretimine bakır eklenmesinin olumlu etkisi olduğunu bu sonuçlar ışığında söyleyebiliriz.



Şekil 4.20. *T. versicolor*'un bakır sülfat içeren malt özütü ortamında üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi

Başlangıçta bakır eklenmiş *F. trogii* kültürlerinde en yüksek lakkaz aktivitesi 8. günde 16.6 U/ml olarak saptanırken, ortama 4. günde bakır eklenmiş olan kültürlerde en yüksek aktivite 10. günde 15.1 U/ml olarak bulunmuştur. Kontrol grubunda ise en yüksek aktivite 10. günde 3.55 U/ml olarak saptanmıştır (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. *F. trogii*'nin bakır sülfat içeren malt özütü ortamında üretimi sürecinde lakkaz aktivitesi

Bakırın sıvı kültürlerde enzim üretimine olumlu etkisi olduğu çeşitli çalışmalarda rapor edilmektedir [119, 210, 219, 235]. Galhaup ve arkadaşları [235] ortama bakır eklenmesinin lakkaz aktivitesinin artırdığını, ancak bunu lakkaz sentezini artırmak yerine, ortamda var olan enzimin aktivasyonunu artırarak yaptığını belirtmişlerdir. Birhanlı ve Yeşilada [119], ortama 1.0mM bakır eklenmesinin *T. versicolor*'da lakkaz üretimini indüklediğini belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar, benzer olarak *F. trogii* ile yaptıkları çalışmada da ortama 0.5 mM bakır eklenmesinin lakkaz aktivitenin 60 kat artmasına yol açtığını bildirmektedir. *Pestalotiopsis* sp.ile yapılan bir başka araştırmada sıvı fermantasyon ortamına bakır eklenmesiyle lakkaz aktivitesinin arttığı ve bu artışın nedeninin de gen transkripsiyonu seviyesinde bir düzenleme ile ilişki olduğu ileri sürülmektedir. Ayrıca araştırmacılar ortama bakır ekleme zamanının, lakkaz formasyonunu etkilediğini, inokulasyonun başlangıcında eklenen bakırın aktiviteyi daha fazla artırdığını belirtmektedirler [210].

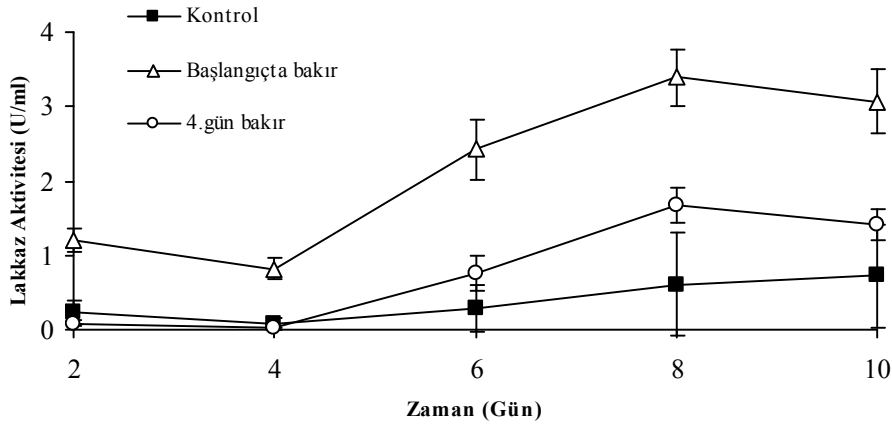
Tez çalışmasının bu aşamasındaki amacımız başlangıçta ve 4. günde ortama eklenen bakırın lakkaz üretimine olası etkisinin araştırılması idi. Çalışmalarda *T. versicolor* için benzer aktivite değerlerine ulaşılırken, *F. trogii* için 4. günde ortama bakır eklenmesi daha uzun süreli etki gösteren bir lakkaz üretimini sağlayabilmiştir (Şekil 4.20 ve Şekil 4. 21). Bu nedenle kültür ortamına bakır eklenmesinin verimi arttırmada önemli bir yol olduğunu ifade edebiliriz.

4.7. Tutuklanmış Funguslar ve Serbest Pelletlerle Yürütülen Kesikli Kültür Çalışmaları

4.7.1. Serbest *T. versicolor* ve *F. trogii* pelletleri kullanarak kesikli süreçte lakkaz üretimi

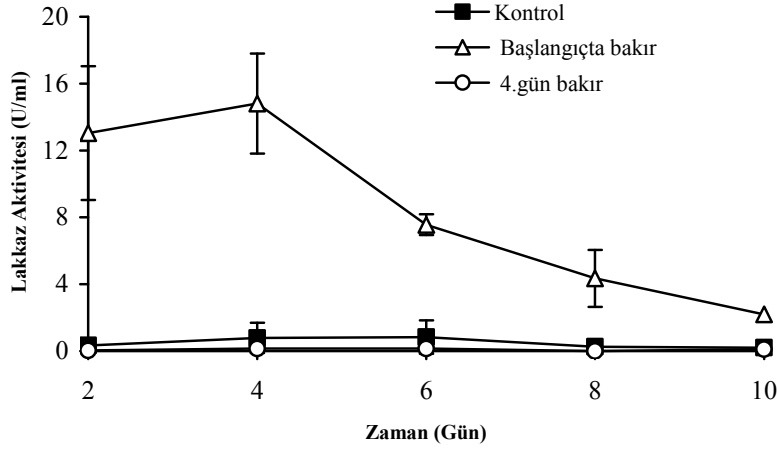
Çalışmanın bu kısmında, Bölüm 3.11’de belirtildiği şekilde aljinat jele tutuklanmış fungusların ve ayrıca serbest peletlerin kesikli süreçte malt özü besiyerinde lakkaz üretim yetenekleri araştırılmıştır.

Serbest *T. versicolor* peletlerinin bakır eklenmemiş besiyerinde inkübasyonu sürecinde aktivite dördüncü günden itibaren artmaya başlamış ve 10. günde en yüksek aktivite değeri olan 0.72 U/ml düzeyine ulaşılmıştır. En yüksek aktivite başlangıçta ortama bakır eklenmesi durumunda ise 8. günde 3.4 U/ml olarak bulunmuştur (Şekil 4. 22).



Şekil 4.22. Serbest *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimine bakırın etkisi

Serbest *F.trogii* peletlerinin kullanıldığı kesikli kültür çalışmalarında ortama bakır eklenmemiş kontrol grubunda 2. günde 0.33 U/ml düzeyinden başlayan aktivite, 6. günde en yüksek seviyeye ulaşarak 0.83 U/ml olmuştur. Başlangıçta ortama bakır eklenmiş olan kültürlerde 2. günde çok yüksek bir aktivite değeri saptanırken (13.0 U/ml), aktivite 4. günde 14.8 U/ml düzeyine ulaşmıştır. İzleyen günlerde ise enzim aktivitesi giderek düşmüş ve 10. günde 2.2 U/ml düzeyine gerilemiştir. Bakırın inkübasyonun başlangıcında ortama eklenmesiyle aktivite 4. günde kontrole göre yaklaşık 18 kat artış göstermiştir (Şekil 4.23).

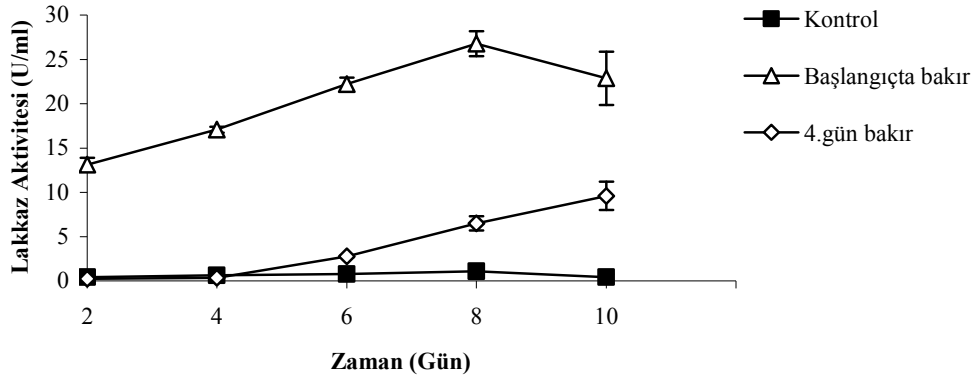


Şekil 4.23. Serbest *F. trogii* peletlerinin lakkaz üretimine bakırın etkisi

Bu çalışmanın ikinci kısmında hazır peletler (7 gün üretilmiş olan stok peletler) ortama karışık olarak eklenmiş ve karışık kültürün lakkaz üretimi üzerine sinerjistik veya antagonistik etkileri araştırılmıştır.

Bakır içermeyen kontrol kültürlerinde en yüksek aktiviteye 8. günde ulaşılmış ve lakkaz aktivitesi 1.10 U/ml olarak saptanmış, başlangıçta ortama bakır eklenmiş olan kültürlerde en yüksek aktivite yine 8. günde ulaşılmış ve enzim aktivitesi 27.76 U/ml olarak saptanmıştır. Ortama 4. günde bakır eklenmiş kültürlerde ise aktivite bakırın eklenmesiyle artmaya başlamış ve en yüksek değere 10. günde ulaşılmıştır (9.5 U/ml).

Sonuçlar değerlendirildiğinde, *F. trogii* ve *T. versicolor* birlikte kullanıldıklarında ortamdaki lakkaz aktivitesi arttığından, sinerjistik bir etki olduğu kanaatine varılmıştır (Şekil 4.24). Diğer çalışmalarda da boyaların renginin gideriminde fungusların birlikte kullanıldığı karma kültürlerin daha etkili olduğu belirtilmekte olup, bu durum bulgularımızı desteklemektedir [125].

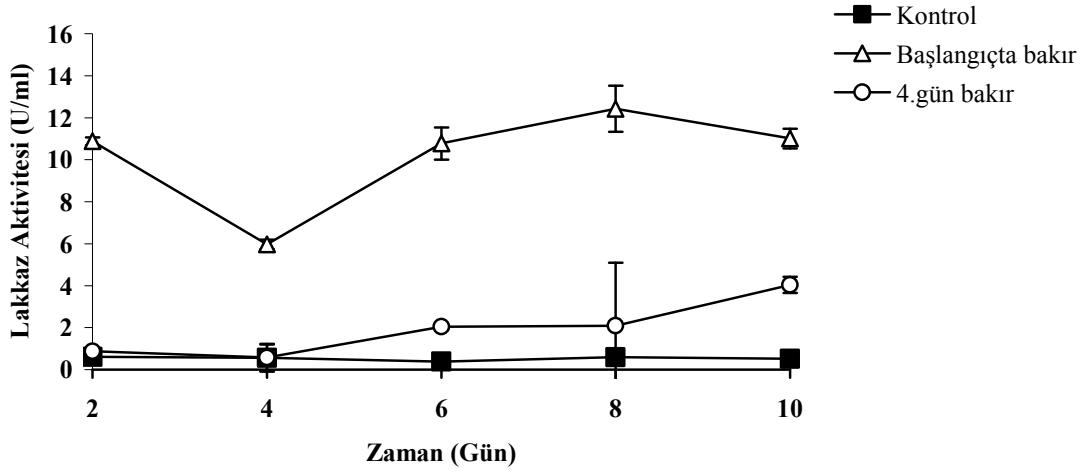


Şekil 4.24. Serbest *F. trogii* ve *T. versicolor* karışık peletlerinin lakkaz üretimine bakırın etkisi

4.7.2. Tutuklanmış *T. versicolor* ve *F. trogii* peletleri ile kesikli süreçte lakkaz üretimi

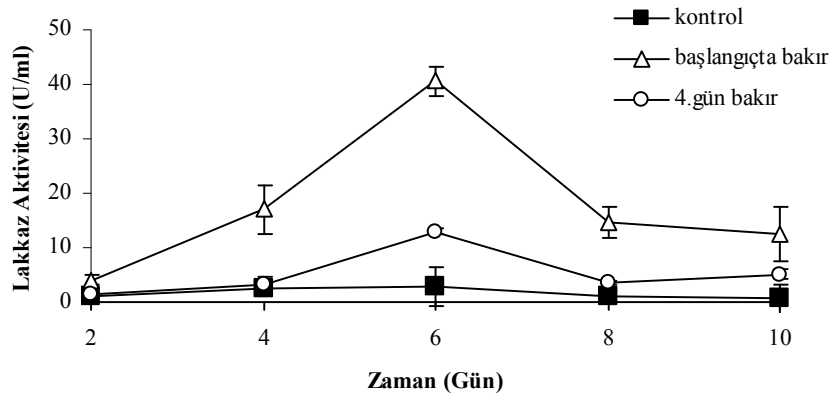
Çalışmanın bu kısmında aljinat jel içerisine tutuklanmış *T. versicolor* ve *F. trogii* hücreleri çalışma planına bağlı olarak ayrı ayrı ya da birlikte (karışık kültür olarak) kullanılarak, lakkaz aktivite değişimi izlenmiştir. Tutuklanmış funguslar ile 3 ayrı çalışma grubu oluşturuldu. Birinci grupta aljinat jellere ayrı ayrı tutuklanmış fungusların saf kültür olarak üretim verimleri izlenirken, 2. grupta ayrı ayrı jellere tutuklanan funguslar aynı besiyerine aktarılarak birlikte inkübe edilmiştir. 3. grupta ise, aynı miktarda alınan homojenize funguslar aynı jel içerisinde tutuklanmış ve üretim verimleri kesikli süreçte izlenmiştir.

Tutuklanmış *T. versicolor* hücreleri ile kurulan çalışmada, ortama başlangıçta bakır eklenen grupta en yüksek aktivite 8. günde 12.42 U/ml olarak saptanırken, 4. günde bakır eklenmiş olan grupta enzim aktivitesi 10.günde 4.0 U/ml olarak saptanmıştır (Şekil 4. 25). Bu grupta, ortama başlangıçta bakır eklenmesi, aktiviteyi 4. günde ortama bakır eklenen gruptaki aktiviteye göre daha fazla arttırabilmiştir.



Şekil 4.25. Tutuklanmış *T. versicolor* hücrelerinin kesikli süreçte inkübasyonu sırasında lakkaz üretimi

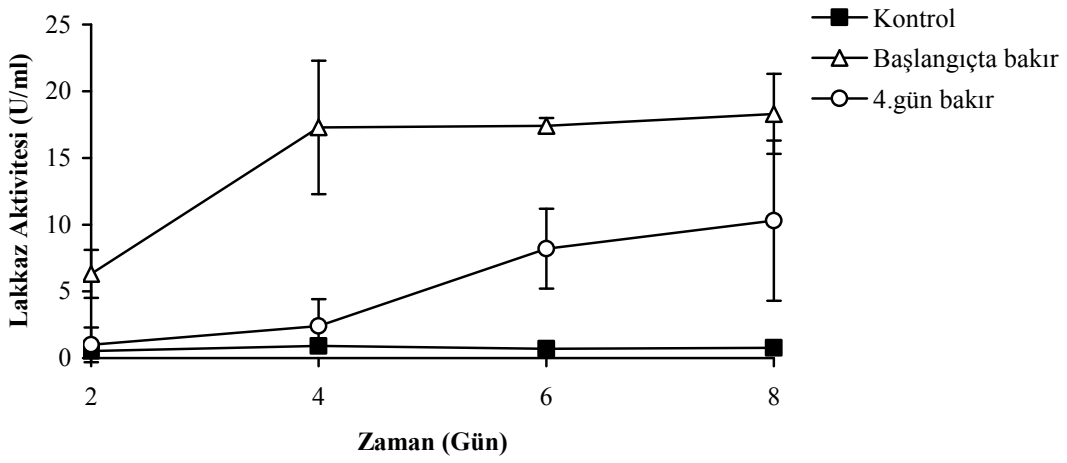
F. trogii ile yapılan çalışmada ise en yüksek aktivite tüm gruplar için 6. günde bulunmuştur. Kontrol grubunda, ortama başlangıçta bakır eklenen grupta ve 4. günde ortama bakır eklenen grupta en yüksek aktivite sırasıyla 3.0, 40.6, 13.0 U/ml olarak saptanmıştır (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. Tutuklanmış *F. trogii* hücrelerinin kesikli süreçte inkübasyonu sırasında lakkaz üretimi

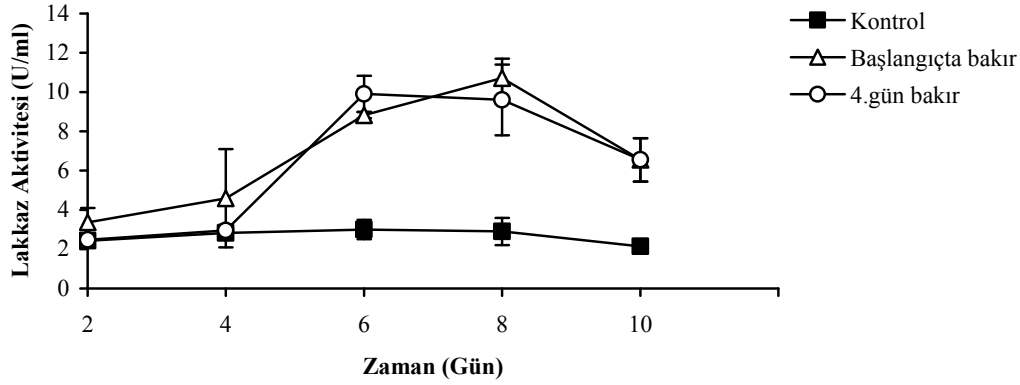
Bu çalışmanın ikinci kısmında ayrı jellerde tutuklanan funguslar daha sonra aynı ortama alınmış ve 10 günlük inkübasyon sürecinde lakkaz aktivitesi belirlenmiştir. Bakır eklenmemiş

olan kültürlerde en yüksek lakkaz aktivitesi 0.82 U/ml olarak 6. günde saptanmış, ortama başlangıçta bakır eklenmiş olan grupta ise aktivite 2. günden başlayarak artış göstermiş ve en yüksek düzeye 10. günde ulaşmıştır. Onuncu gündeki aktivite 21.0 U/ml olarak saptanmıştır. Ortama 4. günde bakır eklenmiş olan grupta da başlangıçtan itibaren aktivite artışı saptanmış olup, 10. gündeki lakkaz aktivitesi 8.36 U/ml olarak en yüksek düzeyde bulunmuştur (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. Aynı jellerde tutuklanmış *F. trogii* ve *T. versicolor* karışık kültürlerinin kesikli süreçte inkübasyonu sırasında lakkaz üretimi

Çalışmamızın üçüncü kısmında, aynı miktarlarda alınan *F. trogii* ve *T. versicolor* hücreleri aynı jellerde tutuklanarak çalışmada kullanılmıştır. Kontrol grubunda en yüksek aktivite 6. günde 3.0 U/ml olarak bulunurken, ortama başlangıçta eklenen grupta ise 8. gündeki lakkaz aktivitesi 10.72 U/ml olarak saptanmıştır. Üremenin 4. gününde ortama bakır eklenen grupta enzim aktivitesi 6. günde 9.90 U/ml olarak belirlenmiştir (Şekil 4.28).



Şekil 4.28. Aynı jellerde tutuklanmış *F. trogii* ve *T. versicolor* hücrelerinin kesikli süreçte inkübasyonu sırasında lakkaz üretimi

Çizelge 4.1 uygulama gruplarında saptanan lakkaz aktivitelerinin genel bir değerlendirmesini göstermektedir. Buna göre, serbest *F. trogii* peletlerinin enzim üretim yeteneğinin *T. versicolor*'dan daha yüksek olduğu görülmektedir. İlgi çekici olarak, her iki fungus peletlerinin birlikte kullanıldığı karışık kültürdeki aktivite, kontrol grubuna göre 8 kat daha fazla bulunmuştur. Elde edilen bu sonuçlar, iki ayrı fungus peletinin bir arada bulunmasının sinerjistik bir etkiye neden olduğu ve bu nedenle de bunun yüksek düzeyde enzim üretimi ile sonuçlandığını düşündürmektedir. Tutuklanmış *F. trogii* ve *T. versicolor* peletlerinin ayrı ayrı kullanıldığı çalışmalarda, serbest olarak kullanılan pelet çalışmalarına göre daha yüksek düzeyde enzim aktivitesi saptanmıştır. Benzer olarak, tutuklanmış *P. ostreotus* ile yapılan bir çalışmada da tutuklanmış hücrelerin kullanıldığı kültürlerde aktivite, serbest kültürlerden daha yüksek düzeyde bulunmuştur [145]. Tutuklanmış karışık kültür çalışmaları ile serbest kültür çalışmaları karşılaştırıldığında pozitif bir etki gözlenmektedir. Bakır eklenen tüm gruplarda başlangıçta bakır eklenmesi, üremenin 4. gününde ortama bakır eklenmesine göre daha etkili görülmektedir. Hao ve arkadaşlarının [210] bulguları da bulgularımızı destekler niteliktedir. Dominguez ve arkadaşları [219], aljinata tutuklanmış *T. versicolor* kültür ortamına veratril alkol ve bakır ekleyerek lakkaz aktivitesini artırmaya yönelik yaptıkları çalışmalarda, en yüksek enzim aktivitesini veratril alkol (20 mM) ve bakırın (3mM) birlikte kullanıldıkları grupta 4.0 U/ml olarak bulunmuşlardır. Bu değer, bir indükleyici kullanılmadığı kontrol grubundan 24 kat daha fazla yüksek olduğu da rapor edilmiştir. [210].

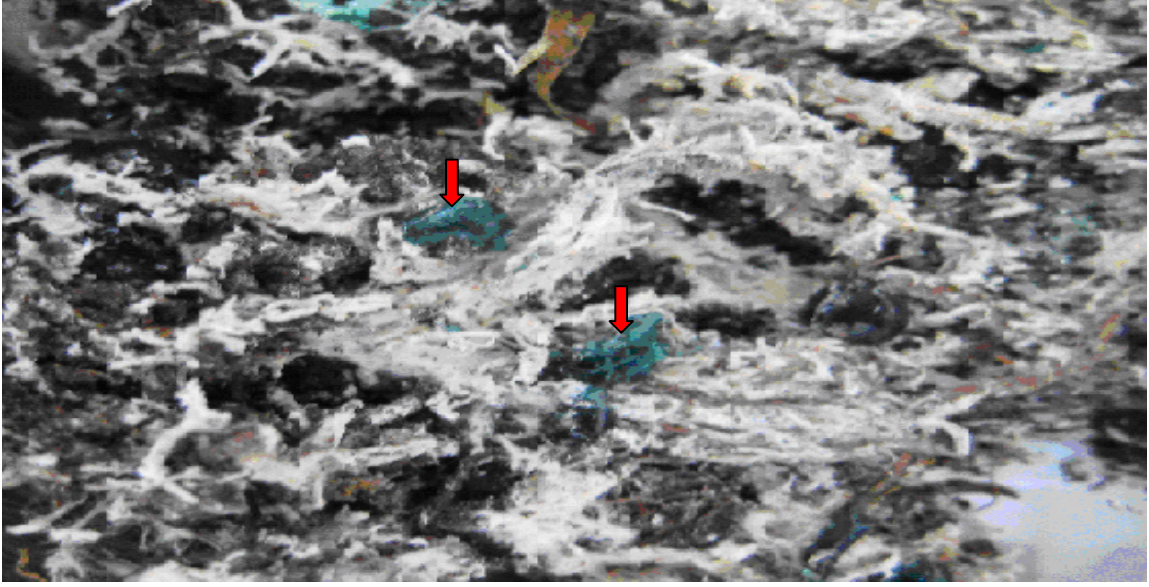
Çizelge 4.2. *F. trogii* ve *T. versicolor*'un tutuklanmış ve tutuklanmamış gruplarında saptanan en yüksek lakkaz aktiviteleri

Maksimum Lakkaz Aktivitesi (U/ml)							
Serbest			Aljinat jele tutuklanmış				
	<i>T.versicolor</i>	<i>F. trogii</i>	Karışık	<i>T. versicolor</i>	<i>F.trogii</i>	Ayrı jellerde	Aynı Jellerde
Kontrol	0.72	0.83	1.1	0.6	3.0	0.82	3.0
Başlangıçta bakır eklenmiş	3.4	14.8	27.76	12.42	40.6	21.0	10.72
4. günde bakır eklenmiş	1.66	0.157	9.5	4.0	13.0	8.36	9.9

4.8. Atık Komposttan Lakkaz Eldesi

Kompost biyokimyasal olarak ayrışabilir çok çeşitli organik maddelerin organizmalar tarafından stabilize edilmiş, mineralize olmuş ürünlerdir [243]. Kompost, yaygın olarak kültür mantarcılığında besiyeri olarak kullanılmaktadır. Şapkalı fungus üretimi sonucunda atık kompost açığa çıkmaktadır. Ticari fungus üretiminde kullanılan atık kompostdan enzim eldesi ikincil bir yarar sağlayacaktır. Sınırlı sayıda yapılan çalışmada kompostun lakkaz eldesi amaçlı kullanılabilirliği araştırılmıştır. *P. sajur caju*'nun kompost ortamında üretimi sırasında lakkaz ürettiği rapor edilmiştir [243]. Ayrıca *P. pulmonarius*'un üretildiği atık kompost ortamında da lakkazın varlığı gösterilmiştir [244].

Araştırmanın bu kısmında atık kompostta lakkaz enziminin varlığı araştırılmıştır. Çalışmada Malatya'da ticari kültür mantarı üretimi yapılan bir şirketten atık kompost temin edilmiş ve öncelikle atık kompost ortamına ABTS eklenerek lakkaz enziminin varlığı makroskobik olarak saptanmıştır (Şekil 4.29). Daha sonra lakkaz aktivitesi araştırılmış ve yaklaşık olarak 0.45 U/ml enzim aktivitesi saptanmıştır. Elde edilen bu sonuç düşük bir enzim aktivitesi değeri olarak görünmesine rağmen, atık bir maddeden enzim eldesi açısından düşünüldüğünde bunun önemli olduğu düşünülmektedir.



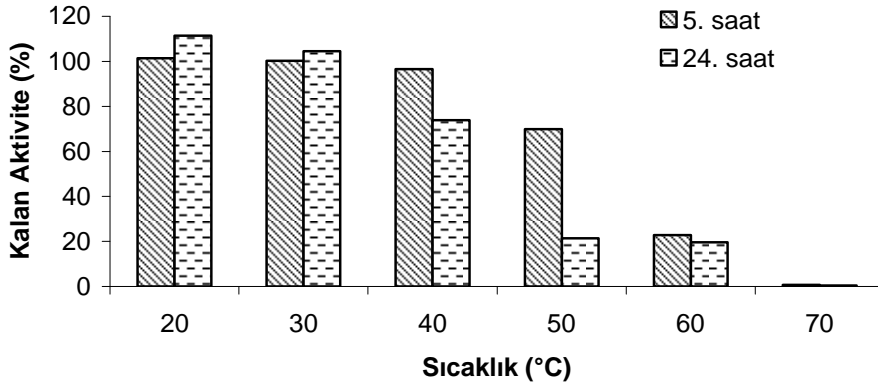
Şekil 4.29. Atık kompost ortamında lakkaz varlığı (okla işaretlenen yeşil bölgeler ABTS uygulanmış kısımları göstermektedir).

4.9. Lakkaz Enziminin Moleküler Ağırlığı ve Sıcaklık Kararlılığı

Substrat olarak buğday kepeği kullanılan, *T. versicolor* ve *F. trogii*'nin üretildiği katı, yarı katı ve sıvı fermantasyon ortamlarından alınan kültür filtratı örnekleri kullanılarak, SDS elektroforezi yapıldı. Elektroforez sonucunda bütün örneklerde Cing'in [249] sonucuna benzer olarak 65 kDa'luk tek bir bant gözlenmiştir. Bu koşullarda kullanılan fungusların, besiyeri ve fermantasyon farklılığına bağlı olarak, farklı bir izozim üretmediği anlaşılmaktadır. Deveci ve arkadaşları [209], *F. trogii* lakkazını SDS elektroforezi ile 65 kDa olarak bulmuşlardır.

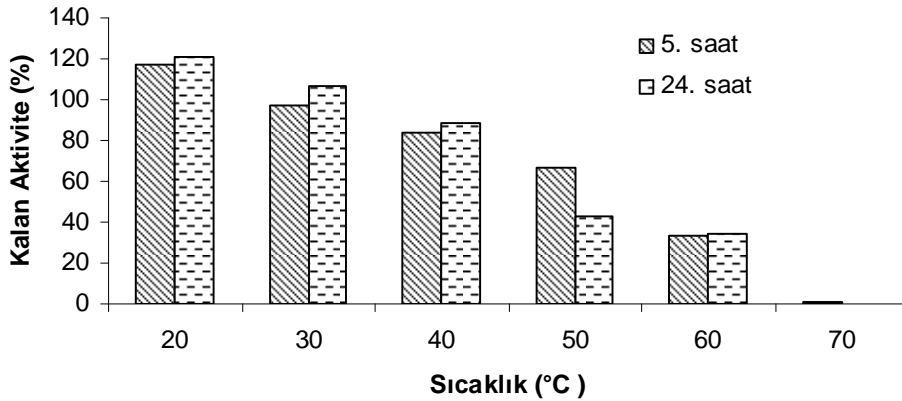
Lakkaz geniş bir uygulama alanı olan bir enzim olduğundan, saf veya ham enzim kaynağı olarak kullanılabilir. Lakkazın uygulama açısından sıcaklık kararlılığı önem taşımaktadır. Farklı fungus enzimlerinin farklı sıcaklık kararlılığı olduğu da bilinmektedir. Çalışmanın bu bölümünde *T. versicolor* ve *F. trogii* nin kültür sıvıları kullanılarak, ham lakkaz örneğinin farklı sıcaklıklarda kararlılığı araştırılmıştır. Şekil 4. 30'da *T. versicolor* ham kültür filtratının sıcaklık kararlılığı verilmiştir. Şekil 4. 30'dan da görüldüğü gibi, 5 saatlik süreçte 50⁰C'de bile önemli oranda (%70'in üzerinde) lakkaz aktivitesi kararlı kalmaktadır. 24 saatlik

kararlılık çalışmalarında ise 40⁰C'ye kadar önemli oranda kararlılık varken, 40⁰C'in üzerinde aktivite hızla azalmaktadır (Şekil 4. 30).



Şekil 4. 30. *T. versicolor* ham enzim kaynağının sıcaklık kararlılığı

F. trogii ham enzim kaynağı 50⁰C'da 5. saat bırakıldığında aktivitesinin %66'sını korurken, 24 saat süreyle aynı sıcaklıkta bırakıldığında aktivitenin %42'si korunabilmiştir. 5 ve 24 saat süre ile 60⁰C sıcaklığa maruz kalan filtratta ise enzim aktivitesinin %33'ü kalmaktadır (Şekil 4.31).

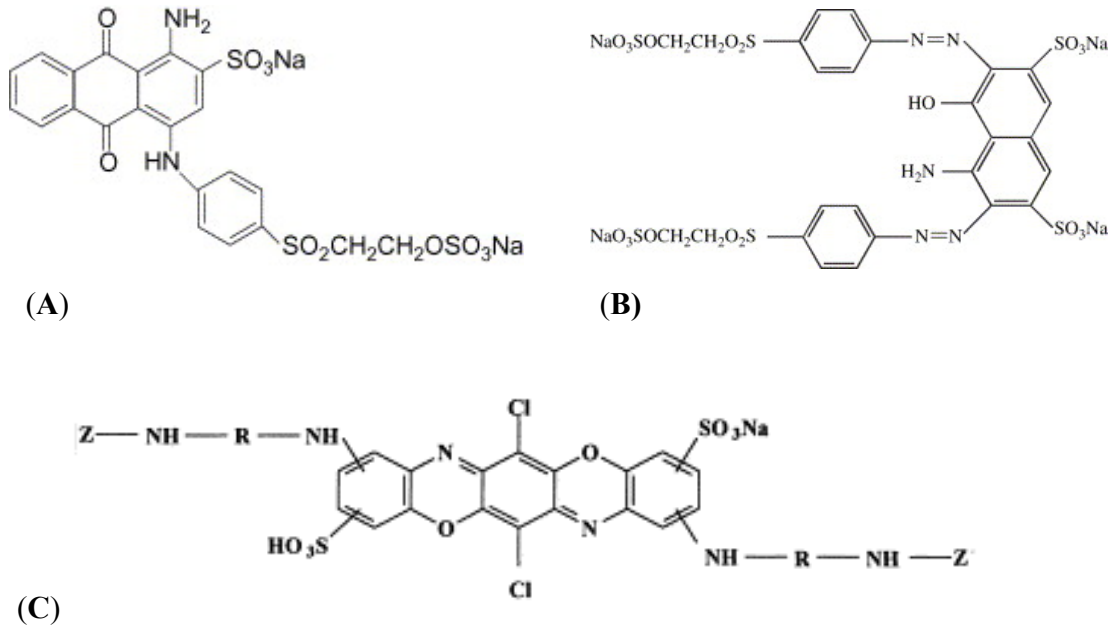


Şekil 4.31. *F. trogii*' de farklı sıcaklıklarda, 5. ve 24. saatlerde kalan lakkaz aktivitesi

Lakkaz enziminin olası sıcaklık kararlılığı boyar madde renk giderim uygulamaları gibi çeşitli, uygulamalarda avantaj yaratabilir. Aljinat jele tutuklanmış *T. versicolor* lakkazının 30-60°C arasında sıcaklık kararlılığına bakıldığı bir çalışmada, sıcaklık 40°C'nin üzerine çıktıkça lakkaz aktivitesinde azalma başlamıştır [219]. Benzer olarak, sıcaklığın artmasına bağlı olarak enzim aktivitesinde azalış rapor edilmiştir [245]. *Peniophora* lakkazı 60°C'de aktivitesinin %74'ünü korumuş ve enzimin yarılanma ömrü 5 saat olarak saptanmıştır. Sıcaklık 70°C'ye çıktığında yarılanma ömrü 15 dakikaya düşmüştür [246].

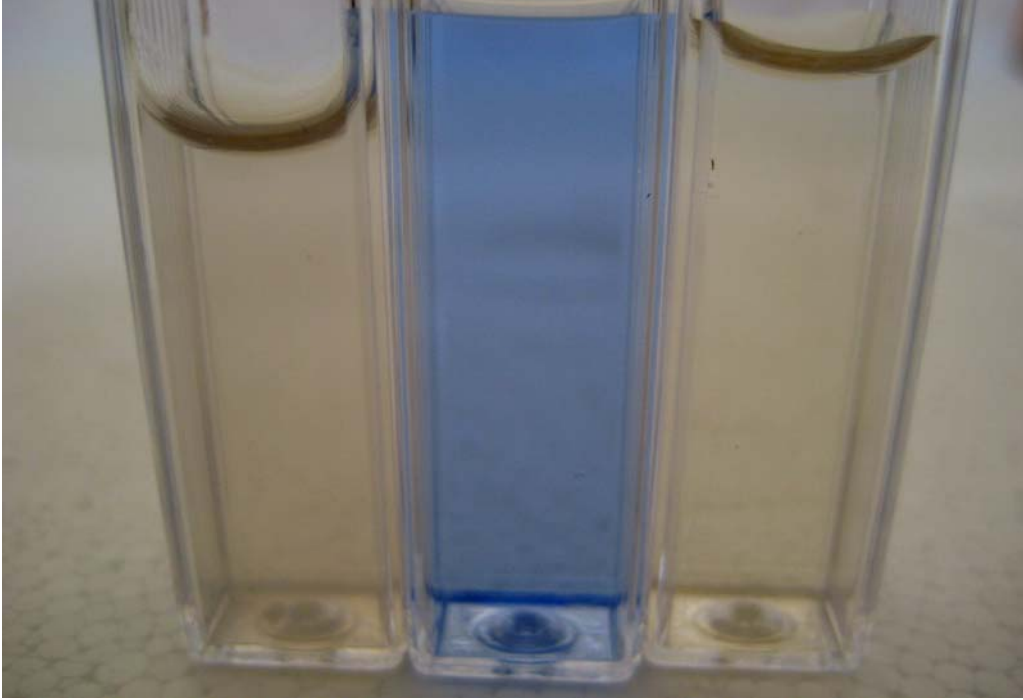
4.10. Enzim Uygulamalarına Bağlı Olarak Boyar Madde Renginin Giderimi

Değişik kimyasal gruplara ait boyar maddelerin rengi hem ham kültür filtratlarıyla, hem de saf lakkazla muamele sonucu değişik oranlarda giderildi. Çalışmamızın bu bölümünde Remazol Brilliant mavi-R (RBBR: C.I. 61200, Reaktif mavi 19), Everzol Siyah (Reaktif siyah 5) ve Chrocion Mavi H-EGN (Reaktif mavi 198) boyar maddeleri kullanılmıştır (Şekil 4.32).



Şekil 4.32. Çalışmada kullanılan boyar maddeler. (A): Reaktif Blue 19 (RBBR), (B): Reaktif siyah 5 (Everzol Siyah 5) ve (C): Reaktif Blue 198 (Chrocion Mavi H-EGN) [213, 247]

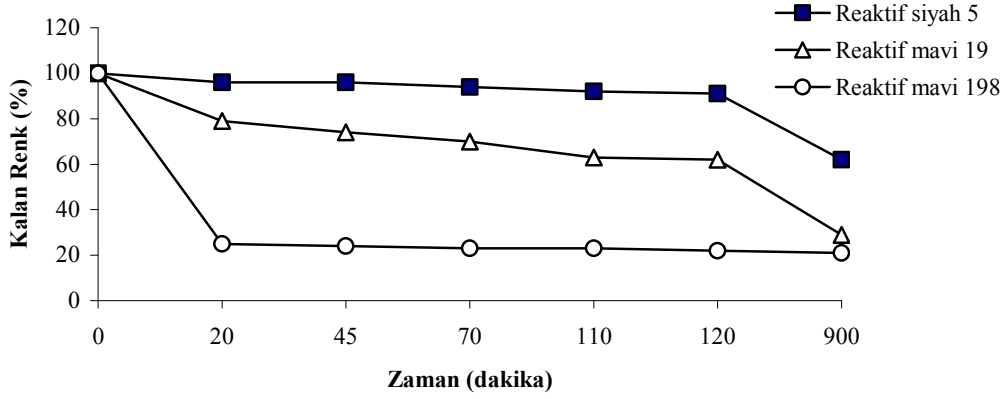
Reaktif mavi 19 boyası ayrı ayrı olmak üzere hem ham kültür filtratlarıyla, hem de ticari lakkazla muamele edilmiş ve renk değişimi maksimum dalga boyunda (598 nm) spektrofotometrik olarak izlenmiştir (Şekil 4.33). Ham kültür filtratı uygulaması sonucunda 24. saatte rengin %41'i giderilebilmiştir. Saf lakkaz uygulamasında ise 24 saatte %70 oranında renk giderimi sağlanmıştır (Şekil 4.33). Sonuçlar farklı çalışmalarda elde edilen bulgular ile de uyusmaktadır. Murugesan ve arkadaşları [89] *Ganoderma lucidum* ile yaptıkları renk giderim çalışmasında 25 U/ml saf lakkaz kullanarak RBBR boyasının rengini %90 oranında giderebildiklerini rapor etmişlerdir. Buna karşın, araştırmacılar enzim uygulaması sonucunda Reaktif siyah 5 boyasının renginin oldukça zor giderildiğini ve ortama ABTS gibi mediatörler eklendiğinde %62 oranında renk giderimine ulaşıldığını rapor etmişlerdir.



Şekil. 4.33. Ham kültür filtratı (en başta) ve saf lakkaz (en sonda) kullanarak Reaktif mavi 19 boyasının renginin giderimi

Reaktif mavi 19 boyasının renginin ham kültür filtratı, lakkaz veya fungus miselleriyle giderilebileceği yapılan çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir [61,125, 175, 209, 210] Palmieri ve arkadaşları [220] *P. ostreatus* ham kültür filtratı ile Reaktif mavi 19'un rengini %70 gidermeyi başaramışlardır. Reaktif mavi 19'un renginin gideriminde saf lakkaz ve ham filtratın yanısıra fungusun pellet formu da etkili olmaktadır [60]. Birhanlı ve Yeşilada [119] tekrarlı kesikli

fermantasyon sürecinde elde ettikleri lakkaz içeren filtrat ile RBBR'nin rengini gidermişlerdir. Farklı araştırmacılar, bu boyanın renginin gideriminde lakkaz enziminin etkili olduğunu savunurlarken [61], bazıları da, RBBR (Reaktif mavi 19) renginin gideriminde ana rolün mangan bağımlı peroksidaz olduğu savunmaktadır [216].



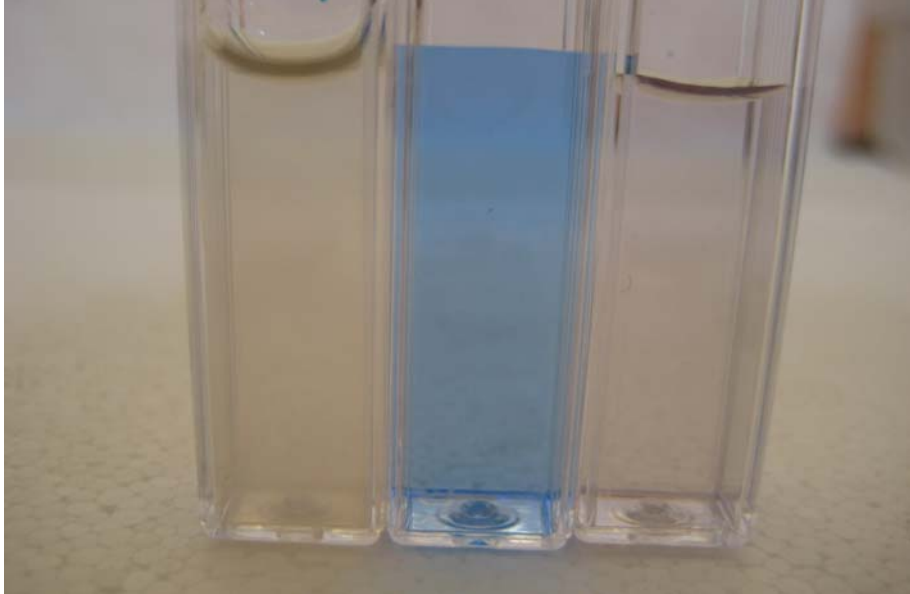
Şekil 4.34. Çeşitli boya renklerinin saf lakkazla giderimi

Reaktif siyah 5 çalışmalarında 24 saatlik ham kültür filtratı uygulamasıyla boyar madde rengi %30 oranında giderilebilirken, saf lakkaz kullanılması sonucunda ise %35 oranında giderim sağlanmıştır (Şekil 4.34). Şekil 4.35, Reaktif siyah-5 boyasının renginin giderimi çalışmasında elde edilen sonuçları makroskobik olarak göstermektedir. Park ve arkadaşları [207] *F. trogii* ile yaptıkları renk giderim çalışmasında Reaktif siyah 5'in renginin en iyi pH 6.5'da ve 28°C'de giderilebildiğini rapor etmişlerdir. *T. hirsuta* lakkazı ile yürütülen diğer bir çalışmada da bu boyanın renginin giderilebilirliği belirtilmiştir [21].



Şekil. 4.35. Ham kültür filtratı (en başta) ve saf lakkaz (en sonda) kullanarak Reaktif siyah 5 boyasının renginin giderimi

Reaktif Mavi 198, kullanılan diğer boyalara göre rengi en hızlı açılan boya olmuştur (Şekil 4.35). Ticari lakkaz ile 2 saat içerisinde rengin yaklaşık %71'i giderilebilirken, ham kültür filtratıyla 24 saatte %56 oranında renk giderimi sağlanabilmiştir.



Şekil. 4.36. Ham kültür filtratı (en başta) ve saf lakkaz (en sonda) kullanarak Reaktif mavi 198 boyasının renginin giderimi

Kullanılan boyalar içerisinde saf lakkazla rengi en az giderilebilen boya Reaktif siyah 5 (%33) olurken, en fazla rengi giderilebilen boya ise Reaktif mavi 198 (% 71) olmuştur. Uygulama sonucunda kontrole göre oluşan renk değişimi Şekil 4.33, Şekil 4.35 ve Şekil 4.36'da gösterilmiştir.

Park'a [207] göre, *F. troglia* ile boyaların renginin gideriminde biyosorbsiyondan çok biyolojik yıkım önemlidir. Çünkü boyaların lakkaz ya da mangan bağımlı peroksidaz ile mineralize olması, renk giderimi açısından daha önemlidir. Bununla birlikte araştırmacılar, biyolojik yıkımla renk gideriminde farklı fungus türlerinin ya da soylarının, farklı etki yapabileceğini de belirtmektedir [63]. Antraquin boyaların renginin azo boyalara göre daha hızlı giderildiği de bildirilmektedir [21, 127]. Bu durumun boyaların kimyasal yapısıyla ilişkili olduğu gibi, redoks potansiyeli ve sterik etki ile de ilişkili olabilir. Ayrıca renk değişiminin gerçekleşmesinin oksokromların pozisyonları ve sayılarındaki değişim ile de ilişkili olduğu ifade edilmektedir [207]. Moorhti [7], boyaların renk gideriminin lakkaz üretimine, besi ortamına ve boyaların türüne bağlı olduğunu belirtmiştir.

4.11. Boyar Maddelerin Toksikitesi ve Toksik Etkide Renk Giderimine Bağlı Değişim

Araştırmaların bu kısmında renk giderimi çalışmalarında kullanılan boyar maddelerin enzimatik uygulama öncesi ve sonrasında toksisitesi ve toksik etkide ortaya çıkan değişim Mikrotoks test sistemi kullanılarak araştırılmıştır. Bu sistem temel olarak *Vibrio fischeri*'nin biyoışım özelliğine bağlı olarak çalışmakta ve biyoışımın toksik madde etkisine göre inhibe olması düzeyine göre, ortalama inhibe edici konsantrasyon (IC50 veya EC50) değeri belirlenmektedir. Çeşitli boyar maddelerin ve bu boyar maddelerin denature enzim, hücre dışı sıvı ve ticari lakkaz ile muamele edilmiş örneklerinin biyolojik ışımaya yapma yeteneği sergileyen *Vibrio fischeri* bakterisi kullanılarak, bu bakterilerden elde edilen toksik etki bulguları değerlendirildiğinde, Reaktif mavi 198 boyası 50 mg/l konsantrasyonda *V. fischerii*

üzerine toksik bir etki göstermemiştir. Reaktif siyah 5 ve Reaktif mavi 19 boya ları ise toksik olup bu boyalar için EC50 değerleri sırası ile 16 ve 32 olarak saptanmıştır. Reaktif siyah 5, Reaktif mavi 19 'a göre daha fazla toksik etki göstermiştir. Reaktif siyah 5'in ham kültür filtratı ve ticari enzim ile renginin giderilmesi sonrasında kontrole göre toksik etkinin arttığı da gözlenmiştir (sırası ile EC50=5 ve EC50=10). Ham kültür filtratı ile muamele edilen Reaktif mavi 19'un toksik etkisi, kontrole göre artış gösterirken (EC50=25), ticari lakkaz uygulaması sonucunda toksisitenin kısmen azaldığı görülmektedir (EC50=39).

Çeşitli çalışmalarda boyar maddelere maruz kalma sonucunda organizmalarda çeşitli düzeylerde toksik etkiler meydana gelebileceği rapor edilmiştir. Birhanlı ve Özmen [248]'e göre bazı tekstil boya ları, kurbağa embriyolarının gelişimini etkileyen toksik sonuçlara yol açmaktadır. Bazı boyar maddenin yıkım ürünlerinin ana bileşene göre daha toksik olabileceği bildirilmiştir. Ramsay ve Nguyen [228], Cibacron Brilliant sarı 3B-A ve Kongo kırmızısı boya larının başlangıçta düşük/orta derecede toksik boya lar olduğunu belirtmekte, renk giderimi uygulamaları sonucunda Mikrotoks yöntemi ile elde edilen toksisite değeri sonuçlarına göre çok toksik (EC₂₀ <%25) özellik kazandığını bildirmektedir. Diğer taraftan aynı araştırmada, başlangıçta çeşitli düzeylerde toksik bir özellik gösteren Reaktif mavi 15, Remazol Brilliant mavi R ve Cibacron Brilliant kırmızı 3G-P boya larının toksik etkilerinin uygulama sonrası ortadan kalktığı da ifade edilmektedir. Ancak Amarant, Tropaeolin O, Reaktif mavi 15, Kongo kırmızısı ve Reaktif siyah 5 gibi boya ların ise toksik özelliğinde bir değişim gözlenmediği de rapor edilmiştir. Gavril ve arkadaşları [229] *T. versicolor* ile rengi giderilen Amaranth boyasının toksik özelliğinin muamele süresine ve renk giderim düzeyine bağlı olarak azaldığını bildirmişlerdir [229].

Çalışma sonuçlarının literatür sonuçları ile karşılaştırılmasıyla, araştırmalarda kullandığımız boya lar bakımından da benzer sonuçlar elde edildiği söylenebilir. Bazı boya ların toksik etkisinde yıkıma bağlı olarak bir değişim gözlenmez iken (Reaktif mavi 198), Reaktif siyah 5 boyasının toksik etkisinin artmış olması, Reaktif mavi 19 boyasının toksisitesinin ise

ham kültür filtratı uygulamasına bağlı olarak azalması biyolojik renk giderimi işleminin toksik etki üzerinde farklı sonuçları olabileceğini göstermektedir. Bu durum boyar maddenin kimyasal yapısı ve kullanılan enzim kaynağı ile ilişkili olabilir. Abadulla ve arkadaşları [21] *T. hirsuta*'dan elde ettikleri enzim ile çeşitli boya­ların rengini giderip, giderim sonrasında oluşan yıkım ürünlerinin etkisini solunum-inhibisyon testi ile araştırmışlar ve bazı boya­ların toksik etkisinin lakkaz uygulaması sonucunda azaldığını ileri sürmüşlerdir.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmada öncelikle çeşitli fungusların farklı ortamlarda lakkaz üretim yetenekleri araştırılmıştır. Lignoselülozlu ham maddeye boyar madde tutundurulması çalışmaları sonucu geriye kalan boyar madde tutmuş lignoselülozlu kaynağın lakkaz üretiminde değerlendirilmesine yönelik çalışmalarda, bu kaynağın ikinci bir işlem ile lakkaz üretiminde değerlendirilebileceği gözlenmiştir. Çalışma sürecinde çok çeşitli koşullar denenmiş ve bu süreçte lakkaz üretimi karşılaştırılmıştır. Sonuçlar uygun yöntem ile yüksek lakkaz elde edilebileceğini göstermektedir.

Farklı üretim ortamlarında farklı lakkaz izozimlerinin üretilebileceğinden yola çıkılarak, farklı üretim koşullarında protein elektroforezi çalışmaları yapılmış, ancak tek bir bant gözlenmiştir. Yine de farklı koşullar ve ortamlarda farklı genlerin ifadesi ile farklı lakkazların üretiminin olası olduğu unutulmamalıdır.

Çalışmada renk gideriminde kullanılan lakkaz içeren ham kültür filtratının (HKF) sıcaklık kararlılığı da araştırılmış ve 50 °C'da, belirli zaman aralıklarında enzimin kararlı kalabileceği ve bununla çeşitli uygulamalarda avantaj sağlayabileceği fikri oluşmuştur.

Enzimatik renk giderimi sürecinde tekstil boyamasında yaygın olarak tercih edilen üç boyar madde kullanılmış ve enzim kaynağı ile, bu kullanılan boyar maddelerin farklı oranlarda yıkılabilmesi sağlanmıştır.

Yıkım sonrası yapılan toksisite çalışmaları, enzimatik uygulamaların farklı etkilerini göstermektedir. Farklı enzim kaynaklarının benzer veya farklı boyar maddeler üzerinde farklı yıkım ve toksisite değişimi etkisi oluşturabilme olasılığı olduğu da göz ardı edilmemelidir.

Sekonder arıtım işlemine girmeden önce yapılacak enzimatik renk giderimi işleminin sekonder arıtım ile birlikte bu problemi ortadan kaldırabilme olasılığı da bulunmaktadır. Bunun yanı sıra, mikrobiyolojik ve enzimatik renk giderimi işleminin birlikte kullanılmasının olası avantajı da test edilmelidir.

KAYNAKÇA

- [1] C.M. Chen, M.L. Shih, S.Z. Lee, J.S. Wang, *Increased toxicity of textile effluents by a chlorination process using sodium hypochlorite*, **Water Sci Technol**, 43, (2001), 1-8.
- [2] P.G. Tratnyek, vd. *Photoeffects of textile dye wastewaters: toxicity to bacteria*, **Environ Toxicol Chem**, 13, (1994), 27-33.
- [3] E. Apohan, *Vinas ve Zeytin yağı fabrikası atık suyunun değerlendirilmesi ve biyolojik iyileştirilmesinde Beyaz çürükçül fungus peletlerinin kullanımı*, **Doktora Tezi**, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2003.
- [4] Ö. Yeşilada, *Zeytin Yağı Fabrikası Atık Suyunun Değerlendirilmesi ve Arıtımı*, **Biyoteknoloji Dergisi**, 24, (2), (2000), 69-81.
- [5] M.M. Aslam, I.M.A. Baig, I.H. Hassan, I.A. Qazi, M. Malik, H. Saeedl, *Textile wastewater characterization and reduction of its COD&BOD by oxidation*, **EJEAFChe**, 3, (6), (2004), 804-811.
- [6] *Su kirliliği kontrolü yönetmeliğinin yayımlandığı Resmi Gazete*, 31 Aralık 2004 Sayı: 25687.
- [7] P. Sathiya Moorthi, S. Periyar Selvam, A. Sasikalaveni, K. Murugesan, P.T. Kalaichelvan, *Decolorization textile dyes and their effluent using white rot fungi*, **African J Biotech** 6, (4), (2007), 424-429.
- [8] K. Al-Sabti, *Chlorozatione reactive azo red 120 textile dye induces micronuclei in fish*, **Ecotox Environ Safety**, 47, (2), (2000), 149-155.
- [9] F. Zhang, j.Yu *Decolourisation of Acid Violet 7 with complex pellets of white rot fungus and activated carbon*. **Bioprocess Eng**, 23,(2000),295-301.
- [10] T.L. HU, ands.S.C WU,. *Assessment of the effect of azo dye RP2B on the growth of nitrogen fixing cyanobacterium – Anabaena sp.* **Biores Technol**,77, (2001) 93–95
- [11] I.A. Alaton, G. Insel, G. Eremektar, F.G. Babuna, D. Orhon, *Effect of textile auxiliaries on the biodegradation of dyehouse effluent in activated sludge*, **Chemosphere**, 62, (2006), 1549–1557.
- [12] www.igeme.org.tr
- [13] D.Orhon, I.Kabdasli, F.Germirli Babuna, S.Sozen, H.Dulkadiroglu, S.DogrueI, O.Karahan, G.Insel, *Wastewater reuse for the minimization of fresh water demand in coastal areas-selected cases from the textile finishing industry*, **J Environ Sci Health A**, 38, (2003), 1641-1657.
- [14] S.V.Kulkarni, C.D.Blackwell, A.L.Blackard, C.W.Stackhouse, M.W.Alexander, *Textile Dyes and Dyeing Equipment : Classification, Properties, and Environmental Aspects*, **EPA/600**,
- [15] P.C. Vandervivere, R. Bianchi, W. Verstraete, *Treatment and reuse of wastewater from the textile wet-processing industry: review of emerging technologies*, **J Chem Technol Biotech** 72, (1998), 289-302.
- [16] A.Birgöl, S.K. Akal Solmaz, *Tekstil endüstrisi atıksuları üzerinde ileri oksidasyon ve kimyasal arıtma prosesleri kullanılarak KOİ ve renk gideriminin araştırılması*, **Ekoloji**, 15, (62), (2007), 72-80.
- [17] K.Kestioğlu, M.Yahlı, *Yüksek KOİ içerikli tekstil atık sularının kimyasal çökeltim ve adsorpsiyon yöntemleriyle arıtılabilirliği*, **Ekoloji Çevre Dergisi**, 15, (2006), 27-31.

- [18] V.M.Correia, T.Stephonson, S.J.Judd, *Characterisation of textile wastewater-A Review*, **Environ Technol**, 15, (1994), 917-929.
- [19] F.O.Kocaer, U.Alkan, *Boyar madde içeren tekstil atık sularının arıtım alternatifleri*, **Uludağ Üniv Müh Mim Fak Derg**, 1, (7), (2002), 47-55.
- [20] J.Pierce, *Color in textile effluents: the origins of the problem.*, **J Soc Dyers Colorists**, 110, (1994), 131-134.
- [21] E. Abadulla, T. Tzanov, S. Costa, K.H. Robra, A. Cavaco-Paulo, G.M. Gubitzi., *Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsute*.*, **Appl Environ Microbiol.**, 66, (33), (2000), 57-62.
- [22] C.Chippindale, P.S.C.Taçon, *The Archaeology of Rock-Art*, **Cambridge University Press**, (1998).
- [23] A.Zille, *Laccase reactions for textile applications*, **Tese de Doutoramento em Engenharia Têxtil**, Universidade do Minho, (2005)
- [24] A.Welham, *The theory of dyeing (and the secret of life)*, **J. Soc. Dyers Colour**, 116, (2000), 140-143.
- [25] ETAD, *Pollution prevention in the dye manufacturing industrial*, **U.S. Dye Manufacturers Operating Committee**, 1994.
- [26] J.A. Kiernan, *Classification and naming of dyes, stains and fluorochromes*, **Biotech. Histochem.**, 76,(5), (2001), 261 – 278.
- [27] J. Rocha Gomes, *Estrutura e propriedades dos corantes. Barbosa e Xavier Lda.*, **Braga**, Portugal. (2002), 12-16.
- [28] R. M. Christie, *Colour Chemistry*, **Royal Society of Chemistry**, Cambridge, UK (2001).
- [29] F.P. Zee, *Anaerobic azo dye reduction*, **Thesis Wageningen University**, 2002.
- [30] M.A.Brown, S.C.DeVito, *Predicting azo dye toxicity.*, **Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.** 23, (1993), 249-324.
- [31] C.O'Neill, F.R.Hawkes, D.L.Hawkes, N.D.Lourenço, H.M.Pinheiro, W.Delée, *Colour in textile effluents - sources, measurement, discharge consents and simulation: a review*, **J. Chem. Technol. Biotech.**, 74, (1999), 1009-1018.
- [32] G. McMullan, C. Meehan, A. Conneely, N. Kirby, T. Robinson, P. Nigam, I.M. Banat, R. Marchant, W.F. Smyth, *Microbial decolourisation and degradation of textile dyes*, **Appl. Microbiol. Biotech.**, 56 (2001), 81-87.
- [33] P.Nigam, G.Armour, I.M.Banat, D.Singh, R.Marchant, *Physical removal of textile dyes from effluents and solid-state fermentation of dye-adsorbed agricultural residues*, **Biores. Technol.** 72, (2000), 219-226.
- [34] P.G.Rieger, H.M.Meier, M.Gerle, U.Vogt, T.Groth, H.J.Knackmuss, *Xenobiotics in the environment: present and future strategies to obviate the problem of biological persistence*, **J. Biotech.**, 94, (2002), 101-123.
- [35] K.Schneider, C.Hafner, I.Jäger, *Mutagenicity of Textile Dye Products*, **J. Appl. Toxicol.** 24, (2004), 83-91
- [36] K.Specht, T.Platzek, *Textile dyes and finishes - Remarks to toxicological and analytical aspects*, **Deut. Lebensm.-Rundsch.**, 91, (1995), 352-359.
- [37] F.Giusti, L.Mantovani, A.Martella, S.Seidenari, *Hand dermatitis as an unsuspected presentation of textile dye contact sensitivity.*, **Contact Dermatitis**, 47, (2002), 91-95.

- [38] S.Seidenari, F.Giusti, F.Massone, L.Mantovani, *Sensitization to disperse dyes in a patch test population over a five-year period.*, **Am. J. Contact. Dermat.**, 13, (2002), 101-107.
- [39] J.H.Weisburger, *Comments on the history and importance of aromatic and heterocyclic amines in public health.*, **Mutat. Res.**, 9, (20), (2002), 506-507.
- [40] H.M.Pinheiro, E.Touraud, O.Thomas, *Aromatic amines from azo dye reduction: status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters.*, **Dyes and Pigments**, 61, (2004), 121-139.
- [41] M.C. Ferreira, G. Soares, M.T. Pessoa de Amorim, *Development of an eco-sustainable biotechnical process for dye decolorisation in the textile industry*, **EJEAFChe**, 2, (2), (2003).
- [42] *Bazı boyar maddelerin ithaline ilişkin tebliğ*, (İthalat: 2005/15) (31.12.2004 tarihli, **25687 sayılı Resmi Gazete**).
- [43] A.Heinfling, M.J.Martínez, A.T.Martínez, M.Bergbauer, U.Szewzyk, *Purification and characterization of peroxidases from the dyedecolorizing fungus Bjerkandera adusta.*, **FEMS Microbiol. Lett.**, 165, (1998), 43-50.
- [44] F.Rafii, T.Coleman, *Cloning and expression in Escherichia coli of an azoreductase gene from Clostridium perfringens and comparison with azoreductase genes from other bacteria.*, **J. Basic. Microbiol.**, 39, (1999), 29-35.
- [45] K.T.Semple, R.B.Cain, S.Schmidt, *Biodegradation of aromatic compounds by microalgae.*, **FEMS Microbiol. Lett.**, 170, (1999), 291-300.
- [46] G.S.Nyanhongo, J.Gomes, G.M.Gübitz, R.Zvauya, J.S.Read, W.Steiner, *Production of laccase by a newly isolated strain of Trametes modesta.*, **Bioresource Technol.**, 84, (2002), 259-263.
- [47] P.A. Ramalho, M.H. Cardoso, A. Cavaco-Paulo, M.T. Ramalho, *Characterization of Azo Reduction Activity in a Novel Ascomycete Yeast Strain*, **Appl. Environ. Microbiol.**, 70, (2004), 2279-2288.
- [48] S.V.Mohan, K.K.Prasad, N.C.Rao, P.N.Sarma, *Acid azo dye degradation by free and immobilized horseradish peroxidase (HRP) catalyzed process.*, **Chemosphere.**, 58, (2005), 1097-1105.
- [49] S.V.Mohan, N.C.Rao, K.K.Prasad, J.Karthikeyan, *Treatment of simulated Reactive Yellow 22 (Azo) dye effluents using Spirogyra species.*, **Waste Management.**, 22, (2002), 575-582.
- [50] S.E.Mbuligwe, *Comparative treatment of dye-rich wastewater in engineered wetland systems (EWSs) vegetated with different plants.*, **Water Res.**, 39, (2005), 271-280.
- [51] P.A.Ramalho, H.Scholze, M.H.Cardoso, M.T.Ramalho, A.M.Oliveira-Campos, *Improved conditions for the aerobic reductive decolourisation of azo dyes by Candida zeylanoides.*, **Enz. Microbiol. Technol.**, 31, (2002), 848-854.
- [52] R.Shrivastava, V.Christian, B.R.M.Vyas, *Enzymatic decolorization of sulfonphthalein dyes.*, **Enz. Microbiol. Technol.**, 36, (2005), 333-337.
- [53] S.Blümel, A.Stolz, *Cloning and characterization of the gene coding for the aerobic azoreductase from Pigmentiphaga kullae K24.*, **Appl. Microbiol. Biotech.**, 62, (2003), 186-190.
- [54] E.Acuner, F.B.Dilek, *Treatment of tectilon yellow 2G by Chlorella vulgaris.*, **Process Biochem.**, 39, (2004), 623-631.

- [55] N.Bhatt, K.C.Patel, H.Keharia, D.Madamwar, *Decolorization Of Diazo-Dye Reactive Blue 172 By Pseudomonas aeruginosa NBAR12*, **J Basic Microbiol**, 45, (2005), 407–418.
- [56] Jo-Shu Chang, Chia-Yu Lin, *Decolorization kinetics of a recombinant Escherichia coli strain harboring azo-dye-decolorizing determinants from Rhodococcus sp.*, **Biotech Letters**, 23, (2001), 631–636.
- [57] M.Yasuhiko, O. Hiroshi, S. Hiroshi, H. Tadashi, *Application of Decolorization Bacteria to Dyeing Waste Water.*, **J Japan Sewage Works Assoc.**, 39, (472), (2002), 123-132.
- [58] S.Mutafov, T.Avramova, L.Stefanova, B.Angelova, *Decolorization of Acid Orange 7 by bacteria of different tinctorial type: a comparative study*, **World J Microbiol. Biotech.**, 23, (2007), 417-422.
- [59] R.Timothy Demmin, D.Kevin, *Uhrich Andco Environmental Processes, Inc. amherst, New Y A New development for (Textile Mill) wastewater treatment*, **The American Dyestuff Reporter**, June 1988.
- [60] S.Cing, D.Asma, E.Apohan, Ö.Yeşilada, *Decolorization of textile dyeing wastewater by Phanerochaete chrysosporium.*, **Folia Microbiol.**, 48,(5), (2003), 639–642.
- [61] I.Eichlerova, L.Homolka, L.Lisa, F.Nerud, *Orange G and Remazol Brilliant Blue R decolorization by white rot fungi Dichomitus squalens, Ischnoderma resinosa and Pleurotus calyptratus*, **Chemosphere**, 60, (2005), 398–404.
- [62] U.Sack, T.M. Heinze, J.Deck, C.E.Cerniglia, R. Martens, F. Zadrazil, W. Fritsche, *Comparison of phenantrene and pyrene degradation by different wood-decaying fungi*, **Appl. Environ. Microbiol.**, 63, (1997), 3919-3925.
- [63] Y.Fu, T.Viraraghavan, *Fungal decolorization of dye wastewaters: a review*, **Biores. Technol.**, 79, (2001), 251-262.
- [64] D.Moldes, P.P.Gallego, S.R.Couto, A.Sanroman, *Grape seeds: the best lignocellulosic waste to produce laccase by solid state cultures of Trametes hirsuta*, **Biotechnol Lett**, 25, (2003), 491-495.
- [65] Y.Guo, S.Yang, W.Fu, J.Qi, R.Li, Z.Wang, *Adsorption of malachite green on micro and mesoporous rice husk based activated carbon.*, **Dyes & Pigments**, 3, (2003), 219-229.
- [66] K.M.Kadirvelu, C.Kavipriya, M.Karthika, N.Radhika, Vennilamani, S.Pattabhi, *Utilization of various agricultural wastes for activated carbon preparation and application for the removal of dyes and metals ions from aqueous solutions.*, **Biores Technol**, 87, (2003), 129-132.
- [67] Z.Aksu, *Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review*, **Process Biochem.**, 40, (3-4), (2007), 997-1026
- [68] P.S.Maulin, G.V.Reddy, R.Banerjee, P.Ravindra Babu, I.L.Kotharia, *Microbial degradation of banana waste under solid state bioprocessing using two lignocellulolytic fungi (Phylosticta spp. MPS-001 and Aspergillus spp. MPS-002)*, **Process Biochem.**, 40, (2005), 445–451.
- [69] S.S.Azhar, A.G.Liew, D.Suhady, K.Farizul Hafiz, M.D Irfan Hatim, *Dye Removal from Aqueous Solution by using Adsorption on Treated Sugarcane Bagasse*, **Am J Appl Sci**, 2, (11), (2005), 1499-1503,
- [70] N.Genç, *Applicability Of Agricultural By-Product As Adsorbent In Wastewater Treatment*, **J Eng Nat Sci Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi**, 2, (2005) Sigma

- [71] Z.Aksu, S.Tezer, *Equilibrium and kinetic modeling of biosorption of Remazol Black B by Rhizopus arrhizus in a batch system: effect of temperature*. **Process Biochem.**, 36, (2000), 431–439.
- [72] S.Kahraman, Ö.Yeşilada, *Effect of spent cotton stalks on color removal and chemical oxygen demand lowering in olive oil mill wastewater by white rot fungi*. **Folia Microbiol**, 44, (6), (1999), 673–676.
- [73] M.M. Nassar, M.S.El Geundi, *Comparative cost of color removal from textile effluents using natural adsorbents*, **J Chem Technol Biotech**, 50, (1991), 257-264.
- [74] P.Nigam, G.Armour, I.M.Banat, D.Singh, R.Marchant, *Physical removal of textile dyes from effluents and solid-state fermentation of dye-adsorbed agricultural residues*. **Biores. Technol.**, 72, (2000), 219-226.
- [75] S.S.Nawar, H.S.Doma, *Removal of dyes from effluents using low-cost agricultural by-products*, **Sci Total Environ.**, 79, (1989), 271-279.
- [76] V.Meyer, F.H.H.Carlsson, R.A.Oellermann, *Decolourization of textile effluent using a low cost natural adsorbent material*, **Water Sci. Technol.**, 26, (1992), 1205-1211.
- [77] A.Bousher, X.Shen, R.G.J.Edyvean, *Removal of coloured organic matter by adsorption onto low-cost waste materials*, **Water Res**, 31 (1997), 2084-2092.
- [78] S.Ohmomo, W.Daengsubha, H.Yoshkawa, M.Yui, K.Nozaki, T.Nakajima, I.Nakamura, *Screening of Anaerobic Bacteria with the Ability to decolorize molasses melanoidin*, **Agric Biol Chem**, 52, (10), (1998), 2429-2435.
- [79] J.S.Chang, C.Y.Lin, *Decolorization kinetics of a recombinant Escherichia coli strain harboring azo-dye-decolorizing determinants from Rhodococcus sp.*, **Biotech Letters**, 23, (2001), 631–636.
- [80] J.A.Libra, M.Borchert, S.Banit, *Competition Strategies for the Decolorization of a Textile-Reactive Dye With the White-Rot Fungi Trametes versicolor Under Non-sterile Conditions*, **Biotech. Bioeng.**, 82, (2003), 736-744.
- [81] J.S.Knapp, P.S.Newby, *The decolourisation of a chemical industry effluent by white rot fungi.*, **Water Res.**, 33, (1999), 575– 577.
- [82] Y.Wong, J.Yu, *Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes.*, **Water Res**, 33, (1999) 3512– 3520.
- [83] K.Selvam, K.Swami Nathan, K.S.Chae, *Decolorization of azo dyes and a dye industry effluent by a white rot fungus Thelephora sp.*, **Biores. Technol.**, 88, (2003), 115-119.
- [84] K.Itoh, C.Yatome, *Decolorization and degradation of xanthene dyes by a white rot fungus, Coriolus versicolor*, **J Environ. Sci Health. A**, 39, (2004), 2383-2389.
- [85] U. Boahmer, S.H. Suhardi, T. Bley, *Decolorizing Reaktive textile dye with White root fungi by temporary immersion cultivation* **Eng. Life Sci.**6(4),2006,417-420
- [86] T.Robinson, B.Chandran, P.Nigam, *Studies on the production of enzymes by white-rot fungi for the decolorisation of textile dyes*, **Enzyme Microb. Technol.**, 29, (2001b), 575-579.
- [87] Ö.Yeşilada, D.Asma, S.Cing, *Decolourization of Textile Dyes by Fungal Pellets.*, **Process Biochem.**, 38, (2003), 933-938.
- [88] M.Sam, Ö.Yesilada, *Decolorization of Orange II Dye by White Rot Fungi*, **Folia Microbiol**. 46, (2), (2001), 143-146.
- [89] K. Murugesan, I.H. Nam, Y.M. Kim, Y.S. Chang, *Decolorization of reactive dyes by a thermostable laccase produced by Ganoderma lucidum in solid state culture*, **Enzyme Microbial Tech.**, 40, (2007), 1662–1672.

- [90] P.Baldrian, J.Gabriel, *Copper and cadmium increase laccase activity in Pleurotus ostreatus*, **FEMS Microbiol Lett.**, 20, (6), (2002), 69–74.
- [91] D.S. Arora, M. Chander, *Decolourisation of diverse industrial dyes by some Phlebia spp. and their comparison with Phanerochaete chrysosporium.*, **J Basic Microbiol**, 44, (2004), 331–338.
- [92] S. Cing, Ö. Yeşilada, *Astrazon red dye decolorization by growing cells pellets of Funalia trogii*, **J. Basic Microbiol**, 44, (2004), 263-269.
- [93] H. Claus, G. Faber, H. König, *Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases.*, **Appl Microbiol Biotech**, 59, (2002), 672–678.
- [94] H.M. Pinheiro, E. Touraud, O. Thomas, *Aromatic amines from azo dye reduction: status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters.*, **Dyes and Pigments**, 61, (2004), 121-139.
- [95] O’Neill, C.A.Lopez, S.Esteves, F.Hawkes, D.L.Hawkes, S.Wilcox, *Azo-dye degradation in an anaerobic-aerobic treatment system operating on simulated textile effluent.*, **Appl Biochem. Biotechnol.**, 53, (2000), 249–254.
- [96] M.İşik, D.T.Sponza, *Effect of oxygen on decolorization of azo dyes by Escherichia coli and Pseudomonas sp. and fate of aromatic amines*, **Process Biochem.**, 38, (2003), 1183-1192.
- [97] S.Kalyuzhnyi, V.Sklyar, *Biomineralisation of azo dye and their breakdown products in anaerobic-aerobic hybrid and UASB reactors.*, **Water Sci Technol.**, 41, (2000), 23.
- [98] D.T.Sponza, M.Isik, *Decolorization and azo dye degradation by anaerobic /aerobic sequential process.*, **Enzyme Microbiol. Technol.**, 31, (2002), 102.
- [99] D.T.Sponza, M.İşik, H.Atalay, *İndigo Boyar Maddelerinin Anaerobik Aritilabilirliklerinin İncelenmesi*, **DEÜ Müh. Fakültesi Fen ve Müh. Derg**, 3, (2), (2000), 23-34
- [100] G.M.Walker, L.R.Weatherley, *Biodegradation and biosorption of acid anthraquinone dye*, **Environ. Pollut.**, 108, (2000), 219-223
- [101] E.J.Fontenot, M.I.Beydilli, Y.H.Lee, S.G.Pavlostathis, *Kinetics and inhibition during the decolorization of reactive anthraquinone dyes under methanogenic conditions*. In: 9th World Congress Anaerobic Digestion 2001 - Anaerobic conversion for sustainability.A.F.M. Van Velsen and Verstraete, W.H. (Eds.), Antwerpen, Belgium, 2-6 Sept., 2001. Technologisch Instituut vzw, p. 215-220
- [102] L.Jinqi, L.Houtian, *Degradation of azo dyes by algae*, **Environ Pollut**, 75, (1992), 273-278.
- [103] K.T.Semple, R.B.Cain, S.Schmidt, *Biodegradation of aromatic compounds by microalgae*. **FEMS Microbiol Lett.**, 170, (1999), 291-300.
- [104] D.Ryan, W.Leukes, S.Burton, *Improving the bioremediation of phenolic wastewaters by Trametes versicolor*, **Biores. Technol.**, 98, (2007), 579-587.
- [105] J.Swamy, J.A.Ramsay, *The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes*, **Enzyme and Microbiol Technol.**, 24 (1999), 130-137.
- [106] D.Wesenberg, I.Kyriakides, S.N.Agathos, *White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents*, **Biotech Adv**, 22, (2003), 161-187.

- [107] A. Stolz, *Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes*, **Appl Microbiol Biotechnol.**, 56 (2001), 69-80.
- [108] A. Hatakka, *Biodegradation of lignin*, In: M. Hofrichter and A. Steinbüchel, Editors, *Biopolymers. Biology, Chemistry, Biotechnology, Applications, Lignin, Humic Substances and Coal Vol. 1*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, (2001), 129-180.
- [109] M. Hofrichter, *Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP)*, **Enzyme Microb Technol**, 30 (2002), 454-466.
- [110] E. Forgacs, T. Cserhati, G. Oros, *Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review*, **Environ. Int.** 30 (2004), 953-971.
- [111] G. A. Ehlers, P. D. Rose, *Immobilized white-rot fungal biodegradation of phenol and chlorinated phenol in trickling packed-bed reactors by employing sequencing batch operation*, **Biores Technol**, 96, (2005), 1264-1275.
- [112] E. Srebotnik, J. N. Boisson, *Peroxidation of linoleic acid during the oxidation of phenols by fungal laccase*. **Enz Microbiol. Technol.**, 36 (2005), 785-789.
- [113] K. Harazono, K. Nakamura, *Decolorization of mixtures of different reactive textile dyes by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete sordida* and inhibitory effect of polyvinyl alcohol*. **Chemosphere**. 59 (2005), 63-68.
- [114] N. K. Pazarlioglu, R. O. Urek, F. Ergun, *Biodecolourization of Direct Blue 15 by immobilized *Phanerochaete chrysosporium**, **Process Biochem.**, 40 (2005b), 1923-1929.
- [115] Y. C. Toh, J. J. L. Yen, J. P. Obbard, Y. P. Ting *Decolourisation of azo dyes by white-rot fungi (WRF) isolated in Singapore*, **Enz Microbiol Technol.**, 33 (2003), 569-575.
- [116] S. Ş Kahraman, Ö. Yeşilada, *Industrial and Agricultural Wastes as Substrates for Laccase Production by White Rot Fungi*, **Folia Microbiol.** 46 (2001), 133-136.
- [117] Ivana Eichlerova, Ladislav Homolka, Frantisek Nerud, *Synthetic dye decolorization capacity of white rot fungus *Dichomitus squalens**, **Bioresource Technology** 97 (2006) 2153–2159
- [118] Sergio Riva, *Laccases: blue enzyme for green chemistry*, **TRENDS in Biotech.** 24 (5), (2006),
- [119] E. Birhanlı, Ö. Yeşilada, *Increased Production of Laccase by Pellets of *Funalia trogii* ATCC 200800 and *Trametes versicolor* ATCC 200801 in repeated batch mode*, **Enzyme and Microbiol Technol.**, 39 (2006), 1286-1293.
- [120] A. Wells, M. Teria, T. Eve, *Green oxidations with laccase–mediator systems*, **Biochemical Society Transactions**, 34(2), (2006)
- [121] A. Leonowicz, N.S. Cho, J. Luterek, A. Wilkolazka, M. Wojtas-Wasilewska, A. Matuszewska, M. Hofrichter, W. D. J. Rogalski, *Fungal laccase: Properties and activity on lignin*. **J Basic Microbiol.**, 41 (2001), 183- 225.
- [122] Christian Mougin, Claude Jolival, Pierre Briozzo, Catherine Madzak, *Fungal laccases: from structure-activity studies to environmental applications*, **Environ Chem Lett** 1, (2003), 145–148
- [123] A.M. Mayer, R.C. Staples, *Laccase: new functions for an old enzyme*. **Phytochem.** 60 (2002), 551–565
- [124] P. Baldrian, *Fungal laccases-occurrence and properties*, **FEMS Microbiol Rev** 30 (2006), 215–242.
- [125] K.M.G. Machado, D.R. Matheus, V.L.R. Bononi, *Ligninolytic enzymes production and remazol Brilliant BlueR decolorization by tropical Brazilian Basidiomycetes fungi*, **Brazilian J Microbiol** 36 (2005), 246-252.

- [126] L. Levin, F. Forchiassin, A.Viale, *Ligninolytic enzyme production and dye decolorization by *Trametes trogii*: application of the Plackett–Burman experimental design to evaluate nutritional requirements*. **Process Biochem** 40 (2005), 1381–7.
- [127] J.A.Wilkołazka, T. Ruzgas, L.Gorton, *Amperometric detection of mono- and diphenols at *Cerrena unicolor* laccase-modified graphite electrode: correlation between sensitivity and substrate structure*. **Talanta**, 66 (2005), 1219–1224.
- [128] R. Bourbonnais, M.G. Paice, B. Freiermuth, E. Bodie, S. Borneman, *Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds*, **Appl Environ Microbiol.** 12 (1997), 4627-4632.
- [129] K. Li, F. Xu, K. E. L. Erikssen, *Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a non-phenolic lignin model compound*, **Appl Environ** 65 (1999), 2654-2660.
- [130] T. Hoff, S. Y. Liu, J. M. Bollag, *Transformation of halogen-, alkyl-, and alkoxy-substituted anilines by a laccase of *Trametes versicolor**, **Appl Environ Microbiol**, 49, (1985), 1040-1045.
- [131] S. Kobayashi, H. Uyama, S. Kimura, *Enzymatic Polymerization*, **Chem Rev**, 101 (2001), 3793-3818.
- [132] S. Kobayashi, H. Higashimura, *Oxidative polymerization of phenols revisited*. **Prog Polym Sci** 28 (2003), 1015-1048.
- [133] W. Bao, D.M. O'Malley, R. Whetten and R.R. Sederoff , *A laccase associated with lignification in Loblolly pine xylem*. **Science** 260 (1993), 672–674.
- [134] Baldrian P (2005) Fungal laccases-occurrence and properties. **FEMS Microbiol Rev** XX:1–28
- [135] M. Johansson, M. Denekamp and F.O. Asiegbu , *Production and isozyme pattern of extracellular laccase in the S and P intersterility groups of the root pathogen *Heterobasidion annosum**. **Mycol Res** 103 (1999), 365–371
- [136] M. Brasier and S.A. Kirk , *Designation of the EAN and NAN races of *Ophiostoma novouelmi* as subspecies*. **Mycol Res** 105 (2001), 547–554.
- [137] A. Schouten, C.A.M. Wagemakers, F. Stefanato, R.M. Van Der Kaaij, J.A.L. Van Kan, *Resveratrol acts as a natural antifungicide and induces self-intoxication by a specific laccase*, **Mol. Microbiol.**, 43, (2002), 883-894.
- [138] N.L. Gilad, N.BarNun, T. Noy, A.M. Mayer, *Enzymes of *Botrytis cinerea* capable of breaking down hydrogen peroxide*, **FEMS Microbiol Lett**, 190, (2000), 121-126.
- [139] N.L.Gilad, N.BarNun, A.M.Mayer, *The possible function of the glucan sheath of *Botrytis cinerea*: effects on the distribution of enzyme activities*, **FEMS Microbiol Lett.**, 199, (2001), 109-113.
- [140] H.Van Etten, E.Temporini, C.Wasmann, *Phytoalexin (and phytoanticipin) tolerance as a virulence trait: why is it not required by all pathogens*. **Physiol Mol Plant Pathol**, 59, (2001), 83-93.
- [141] H. Schoonbeek, G. del Sorbo, M. A. de Waard, *The ABC transporter 143 BcatrB affects the sensitivity of *Botrytis cinerea* to the phytoalexin resveratrol and the fungicide fenpiclonil*. **Mol Plant-Microbe Int.**, 14, (2001), 562-571.
- [142] R.Bourbonnais, M.G.Paice, *Enzymatic delignification of kraft pulp using laccase and a mediator.*, **Tappi J**, 79, (1996), 199-204.

- [143] F. Xu, *Oxidation of Phenols, Anilines, and Benzenethiols by Fungal Laccases: Correlation between Activity and Redox Potentials as Well as Halide Inhibition*, **Biochem.**, 35, (1996), 7608-7614.
- [144] A. Gardiol, R. Hernandez, B. Reinhammar, B.R. Harte, *Development of a gas-phase oxygen biosensor using a blue copper-containing oxidase*, **Enz Microb Technol.** 18, (1996), 347-352.
- [145] G. Hublik, F. Schinner, *Characterization and immobilization of the laccase from *P. ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutant*, **Enzyme Microb Technol**, 27, (2000), 330-336
- [146] N.Duran, E. Esposito, *Potential applications of oxidative enzymes and phenoxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review*, **Appl Cat B: Environ.**, 28, (2000), 83-99.
- [147] S.C.Barton, H.H.Kim, G.Binyamin, Y.Zhang, A.Heller. *The "Wired" laccase cathode: High current density electroreduction of O₂ to water at +0.7 V (NHE) at pH 5*. **J. Am. Chem Soc.**, 123, (2001), 5802-5803.
- [148] S.B. Pointing, *Feasibility of bioremediation by white root fungi*, **Appl Microbiol Biotechnol**, 57, (2001), 20–33
- [149] M.A. Martins, M.J. Queiroz, A. J. D. Silvestre, N. Lima. *Relationship of chemical structures of textile dyes on the pre-adaptation medium and the potentialities of their biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*.*, **Res Microbiol**, 153, (2002b), 361-368.
- [150] C.Maximo, M.Costa-Ferreira, *Decolourisation of reactive textile dyes by *Irpex lacteus* and lignin modifying enzymes.*, **Proc Biochem.**, 39, (2004), 1475-1479.
- [151] S.Ciecholewski, E.Hammer, K.Manda, G.Bose, V.T.H.Nguyen, P.Langer, F. Schauer, *Laccase-catalyzed carbon-carbon bond formation: oxidative dimerization of salicylic esters by air in aqueous solution.*, **Tetrahedron**, 61, (2005), 4615-4619.
- [152] C. Madzak, C. Gaillardin, J.M Beckerich *Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review*. **J Biotechnol** 109, (2004), 63–81
- [153] J.P.Ghosh, K.E. Taylor, J.K. Bewtra, N. Biswas, *Laccase-catalyzed removal of 2,4-dimethylphenol from synthetic wastewater: Effect of polyethylene glycol and dissolved oxygen*, **Chemosphere**, 71, (2008), 1709-1717.
- [154] S.Kazunari, T.Tomoaki, S.Satoshi, O.F.Masanori, I.Michihiko, *Removal characteristics of endocrine-disrupting chemicals by laccase from white-rot fungi*, **J Environ Sci Health**, 43, (2008), 53 – 60
- [155] A.Sanchez-Amat, F.Solano. *A Pluripotent Polyphenol Oxidase from the Melano-genic Marine *Alteromonas* sp Shares Catalytic Capabilities of Tyrosinases and Laccases*, **Biochem Biophys Res Commun.**, 240, (1997), 787–792.
- [156] H.Suzuki, Y.Sawai, T.Suzuki, K.Kawa, *Purification and Characterization of an Extracellular β -Agarase from *Bacillus* sp. MK03*, **J Biosci Bioeng**, 95, (2003), 328-334
- [157] L.O. Martins, C.M. Soares, M.M. Pereira, M.Teixera, T.Costa, G.H. Jones, A.O. Henriques, *Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat.* **J Biol Chem**, 277, (2002), 18849-18859.
- [158] J.Hirose, M.Nasu, H.Yokoi, *Reaction of substituted phenols with thermostable laccase bound to *Bacillus subtilis* spores*, **Biotech Lett.**, 25, (2003), 1609-1612.

- [159] N.Duran, M.A.Rose, A.D.Annibale, L.Gianfreda, *Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidase) immobilized on different supports: a review*, **Enzyme Microbiol Technol.**, 31, (2002), 907-931.
- [160] R. Maurice, Marshall, Jeongmok Kim and Cheng-I Wei, *Enzymatic Browning in Fruits, Vegetables and Seafoods*, **FAO, 2000**
- [161] S.V.S.Kumar, P.S.Phale, S.Durani, P.P.Wangikar, *Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family*, **Biotechnol Bioeng.**, 83, (2003), 386-394.
- [162] F.Xu, J.J.Kulys, K.Duke, K.Li, K.Krikstopaitis, H.J.Deussen, E.Abbate, V.Galinyte, P.Schneider, *Redox chemistry in laccasecatalyzed oxidation of N-hydroxy compound.*, **Appl Environ Microbiol**, 66, (2000), 2052-2056.
- [163] O.V.Koroleva, I.S.Yavmetdinov, S.V.Shleev, E.V.Stepanova, V.P.Gavrilova, *Isolation and study of some properties of laccase from the Basidiomycetes *Cerrena maxima**, **Biochem (Moscow)**, 66, (2001), 618-622.
- [164] A.E. Palmer, R.K. Szilagyi, J.R.Cherry, A.Jones, F.Xu, E.I. Solomon, *Spectroscopic characterization of the Leu513His variant of fungal laccase: effect of increased axial ligand interaction on the geometric and electronic structure of the type I Cu site*, **Inorg Chem**, 42, (2003), 4006-4017.
- [165] L.L. Kiiskinen, L.Viikari, K. Kruus, *Purification and characterisation of a novel laccase from the ascomycete *Melanocarpus albomyces**, **Appl Microbiol Biotechnol**, 59, (2002), 198-204.
- [166] S. Shleev, J. Tkac, A. Christenson, T. Ruzgas, A.I. Yaropolov, J.W. Whittaker, I. Gorton. *Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes*, **Biosens. Bioelectr**, 20, (2005), 2517-2554.
- [167] A. Robles, R. Lucas, A.G. De Cienfuegos, A.Galvez, *Phenol-oxidase (laccase) activity in strain of the hyphomycete *Chalara paradoxa* isolated from olive mill wastewater disposal ponds.*, **Enzyme Microb. Technol.**, 26, (2000), 484-490.
- [168] S. Rodriguez Couto, E. Rosales, M.A. Sanroman. *Decolourization of synthetic dyes by *Trametes hirsuta* in expanded-bed reactors*, **Chemosphere**, 62, (2006), 1558-1563.
- [169] www.commonswiki.org
- [170] S.Camarero, D.Ibarra, M.J.Martinez, A.T.Martinez, *Lignin derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes*, **Appl Environ Microbiol**, 71, (2005), 1775-1784
- [171] K.Ikehata, I.D.Buchanan, D.W.Smith, *Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment*, **J Environ Eng. Sci**, 3, (2004), 1-19.
- [172] S.Dhawan, R.C.Kuhad, *Effect of amino acids and vitamins on laccase production by the bird's nest fungus *Cyathus bulleri**. **Biores. Tech.**, 84, (2002), 35-38.
- [173] H. Zollinger. *Synthesis, properties and applications of organic dyes and pigments*. **Colour chemistry**. New York: John Wiley-VCH Publishers. 2002.
- [174] P. Blanquez, N.Casas Font, Gabarrell, M, Sarra, G. Caminal, T. Vicent, *Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor**, **Water Res.**, 38, (2004), 2166-2172
- [175] S.R. Couto, M.A. Sanroman, G.M. Gubitz, *Influence of redox mediators and metal ions on synthetic acid dye decolorization by crude laccase from *Trametes hirsute**,

- Chemosphere**, 58 (2005), 417–422.
- [176] S. Rodríguez Couto, D. Hofer, M.A. Sanroman, G.M. Gübitz, *Production of laccase by *Trametes hirsuta* grown in an immersion bioreactor. Application to decolourisation of dyes from a leather factory*, **Eng Life Sci.**, 4, (2004), 233–238.
- [177] M.Martins, A.J.D. Lima, M.J. Silvestre, J. Queiroz. *Comparative studies of fungal degradation of single or mixed bioaccessible reactive azo dyes*, **Chemosphere**, 52, (2003), 967-973.
- [178] S. Rodriguez Couto, M. A. Sanroman. *Effect of two wastes from groundnut processing on laccase production and dye decolourizationability*, **J Food Eng.**, 73, (2006), 388–393.
- [179] R.Campos, A.Kandelbauer, KH.Robra, Artur Cavaco-Paulo, G.M.Gubitz, *Indigo degradation with purified laccases from *Trametes hirsuta* and *Sclerotium rolfsii** **J Biotech** 89 (2001) 131–139
- [180] Anna Maria Barreca, Maura Fabbrini, Carlo Galli, Patrizia Gentili, L.Sten, Junggren, *Laccase/mediated oxidation of a lignin model for improved delignification procedures*, **J Mol Catal B: Enzymatic**, 26, (2003), 105–110
- [181] C.Sigoillot, S.Camarero, T.Vidal, E.Record, M.Asther, M.Perez-Boada, M. J. Martinez, J. Sigoillota, M. A. Jose, F. Colom, A. T. Martinez, *Comparison of different fungal enzymes for bleaching high-quality paper pulps*, **J Biotech**, 115, (2005), 333–343
- [182] J.A.F.Gamelas, A.R.Gaspar, D.V.Evtuguin, C.Pascoal Neto, *Transition metal substituted polyoxotungstates for the oxygen delignification of kraft pulp*, **Applied Catalysis A: General**, 295, (2005), 134–141
- [183] <http://www.freepatentsonline.com/5160760.html>
- [184] Rosana C. Minussi, M.Glaucia, *Pastore and Nelson Durany, Potential applications of laccase in the food industry*, **Trends in Food Science & Technology**, 13, (2002), 205–216
- [185] E.Labat, M.H.Morel, X.Rouau, *Effect of laccase and manganese peroxidase on wheat gluten and pentosans during mixing*, **Food Hydrocolloids**, 15, (2001), 47-52
- [186] M.Servili, R.Selvaggini, A.Taticchi, A.L.Begliomini, *Relationships between the volatile compounds evaluated by solid phase microextraction and the thermal treatment of tomato juice: optimization of the blanching parameters*, **Food Chemistry**, 71, (2000), 407-415
- [187] D.Tanrıöven, A.Ekşi, *Phenolic compounds in pear juice from different cultivars*, **Food Chemistry**, 93, (1), (2005), 89-93
- [188] S.Nicotra, M.R.Cramarossa, A.Mucci, U.M.Pagnoni, S.Riva, L.Forti, *Biotransformation of resveratrol: synthesis of trans-dehydrodimers catalyzed by laccases from *Myceliophthora thermophyla* and from *Trametes pubescens**, **Tetrahedron**, 60, (2004), 595–600.
- [189] C.G.Bauer, A.Kuhn, N.Gajovic, O.Skorobogatko, P.J.Holt, N.C. Bruce *et al.*, *New enzyme sensors for morphine and codeine based on morphine dehydrogenase and laccase*, **Fresenius J Anal Chem.**, 364, (1999), 179–183.
- [190] D.Odacı, S.Timur, N.Pazarlıoğlu, Ü.A.Kirkgöz, A.Telefoncu, *The Effect Of Mediator On Laccase Biosensor Response For Paracetamol Detection*, **Biotech Appl Biochem.**, 45, (2006), 23-28.

- [191] B.Haghighi, L.Gorton, T.Ruzgas, L.J. Jonsson, *Characterization of graphite electrodes modified with laccase from *Trametes versicolor* and their use for bioelectrochemical monitoring of phenolic compounds in flow injection analysis*, **Anal. Chim. Acta.**, 487, (2003), 3-14.
- [192] Y.Ferry, D.Leech, *Amperometric detection of catecholamine neurotransmitters using electrocatalytic substrate recycling at a laccase electrode*, **Electroanalysis**, 17, (2005), 2113–2119.
- [193] C.Mai, A.Majcherczyk, A.Hütterman, *Chemo-enzymatic synthesis and characterization of graft copolymers from lignin and acrylic compounds*, **Enzyme Microbiol Technol.**, 27, (2000), 167–175.
- [194] H. Uyama, S.Kobayashi, *Enzyme-catalyzed polymerization to functional polymers*, **J Mol Catal B Enzym**, 19, (20), (2002), 117–127.
- [195] R.Mustafa, L.Muniglia, B.Rovel, M.Girardin, *Phenolic colorants obtained by enzymatic synthesis using a fungal laccase in a hydro-organic biphasic system*, **Food Res Int.**, 38, (2005), 995–1000.
- [196] K.Golz-Berner, B.Walzel, L.Zastrow, O.Doucet, *Cosmetic and dermatological preparation containing copper-binding proteins for skin lightening*, **Int Pat Appl**, (2004)
- [197] U.S Food and Drug Administration, 2003
- [198] F.Onorati, M.Mecozzi, *Effects of two diluents in the Microtox[®] toxicity bioassay with marine sediments*, **Chemosphere**, 54, (5), (2004), 679-687
- [199] www.alasco.net
- [200] www.leederconsulting.com/toxicology_services_microtox.html
- [201] C.Jolival, L.Neuville, F.D.Boyer, L.Kerhoas, C.Mougin, *Identification and Formation Pathway of Laccase-Mediated Oxidation Products Formed from Hydroxyphenylureas*, **J Agric Food Chem.**, 54, (14), (2006), 5046-5054
- [202] R.Muhtezhilan, N.Yogananth, S.Vidhya, S.Jalakshmi, *Dye degrading mycoflora from industrial effluents*, **Res J Microbiol**, 3, (3), (2008), 204-208
- [203] E.Torres, I.Bustos-Jaimes, S.L.Borgne, *Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants*, **Appl Catalysis B: Environmental**, 46, (2003), 1–15
- [204] Y.Miao, *Biological remediation of dyes in textile effluent: a review on current treatment technologies*, **Colors in Dyehouse Effluent, Society of Dyers and Colorist**, (2003), 9-21
- [205] M.Chivikula, V.Renganathan, *Phenolic azo dye oxidation by laccase from *Pyricularia oryzae**, **Appl Environ Microbiol**, 61, (1995), 437-477
- [206] Ö.Yeşilada, B.Özcan, *Decolorization of Orange II Dye With the Crude Culture Filtrate of White rot Fungus, *Coriolus versicolor**, **Tr J Biology**, 22, (1998), 463-476
- [207] C.Park, M.Lee, B.Lee, Seung-Wook Kim, H.A.Chase, J.Lee, S.Kim, *Biodegradation and biosorption for decolorization of synthetic dyes by *Funalia trogii**, **Biochem Eng J**, 36, (2007) 59/65
- [208] Kyung-Lyum Min, *Characterization of Novel Laccase produced by the wood rotting fungus *Phellinus ribis**, **Arch Biochem Biophys**, 392, (2), (2001), 279–286
- [209] T.Deveci, A.Unyayar, M.A.Mazmanci, *Production of Remazol Brilliant Blue R decolourising oxygenase from the culture filtrate of *Funalia trogii* ATCC 200800*, **J Mol Catalysis B**, 30, (2004), 25–32

- [210] Jiejie Hao, Fuqiang Song, Feng Huang, Changlin Yang, Zhijun Zhang, Yi Zheng, Xingjun Tian, Production of laccase by a newly isolated deuteromycete fungus *Pestalotiopsis* sp. and its decolorization of azo dye, **J Ind Microbiol Biotech**, 34, (2007), 233–240
- [211] S.K. Yeşiladali, G. Pekin, H. Bermek, İ.A. Alaton, D. Orhon, C. Tamerler, Bioremediation of textile azo dyes by *Trichophyton rubrum*, **World J Microbiol Biotech**, 22, (2006), 1027-1031
- [212] L. Levin, L. Papinutti, F. Forchiassin, Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzymes and decolorize industrial dyes **Biores Technol**, 94, (2), (2004), 169-176.
- [213] Paul-Philippe Champagne and Juliana Akit Ramsay, Contribution of manganese peroxidase and laccase to dye decoloration by *Trametes versicolor* **Appl Microbiol Biotech** (2005) 69: 276–285
- [214] I. Ciullini, S. Tilli, A. Scozzafava, F. Briganti, Fungal laccase, cellobiose dehydrogenase, and chemical mediators: Combined actions for the decolorization of different classes of textile dyes. **Biores Technol**, 2008
- [215] Casas, N.; Blázquez, P.; Gabarrell, X.; Vicent, T.; Caminal, G.; Sarrà, M. Degradation of Orange G by laccase: fungal versus enzymatic process. **Environ Technol** 28(10), (2007), 1103-10.
- [216] C.G. Boer, L. Obici, C.G. Marques de Souza and R.M. Peralta, Decolorization of synthetic dyes by solid state cultures of *Lentinula (Lentinus) edodes* producing manganese peroxidase as the main ligninolytic enzyme, **Bioresour Technol** 94 (2004), 107–112.
- [217] M. Blaghen, K.M. Lee, Decolorization of Some Azo Dyes by Immobilized *Geotrichum* sp . Biomass in Fluidized Bed Bioreactor. **Appl Biochem Biotechnol** 142(3), (2007) 307-16.)
- [218] X. Li, R. Jia, Decolorization and biosorption for Congo red by system rice hull-*Schizophyllum* sp. F17 under solid-state condition in a continuous flow packed-bed bioreactor. **Biores Technol**, 99 (2008) 6885–6892
- [219] Alberto Dominguez, Susana Rodriguez Couto and M Angeles Sanroman, Dye decolorization by *Trametes hirsuta* immobilized into alginate beads **World J Microbiol Biotech** 21 (2005), 405–409
- [220] Gianna Palmieri, Paola Giardina, and Giovanni Sannia, Laccase-Mediated Remazol Brilliant Blue R Decolorization in a Fixed-Bed Bioreactor, **Biotechnol. Prog.** 21 (2005), 1436-1441
- [221] Hongman Hou, Jiti Zhou, Jing Wang, Cuihong Du, Bin Yan, Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye, **Process Biochem** 39 (2004) 1415–1419
- [222]. S. Rodriguez Couto, Ma. Sanroman, G.M. Gubitz. Influence of redox mediators and metal ions on synthetic acid dye decolorization by crude laccase from *Trametes hirsute*, **Chemosphere** 58 (2005), 417–422.
- [223] Wang, C., Yediler, A., Lienert, D., Wang, Z. and Kettrup, A., 2002. Toxicity evaluation of reactive dyestuffs, auxiliaries and selected effluents in textile finishing industry to luminescent bacteria *Vibrio fischeri*. **Chemosphere**, 46, 339–344.
- [224] Rajaguru, P., Kalpana, R., Hema, A., Suba, S., Baskarathupathi, B., Kumar, P. A. and Kalaiselvi, K., Genotoxicity of some sulfur dyes on tadpoles (*Rana hexadactyla*) measured using the comet assay. **Environ Mol Mutagen.**, 38, (2001), 316–22.

- [225]. M. Kaushal Sharma and R. C. Sobti, *Rec effect of certain textile dyes in Bacillus subtilis* **Mutat Res: Genetic Toxicol Environ Mut** 465 (1-2), (2000), 27-28.
- [226] Hassan Moawad, Wafaa M. Abd El-Rahim and M. Kalafallah, Evaluation of biotoxicity of textile dyes using two bioassays, **J Basic Microbiol.** **43** (2003) 3, 218–229
- [227] N. Mathur, P. Bhatnagar, P. Bakre, *Assessing mutagenicity of textile dyes from pali (rajasthan) using ames bioassay*, **Appl Ecology Environ Res** 4, (2005), 111-118.
- [228] JA Ramsay, T. Nguyen, *Decoloration of textile dyes by Trametes versicolor and its effect on dye toxicity*, **Biotechnol. Lett.** 24, (2002), 1757-1761.
- [229] M. Gavril, PV. Hodson, *Investigation of the toxicity of the products of decoloration of amaranth by trametesversicolor*, **J Environ Qual**, 36 (6), (2007), 1591-1598
- [230] JA.Ramsay, C. Goode, *Decoloration of a carpet dye effluent using Trametes versicolor*, **Biotech Letters**, 26, (3), (2004),197-201
- [231] E. Apohan and Ö.Yesilada, *Role of white rot fungus Funalia trogii in detoxification of textile dyes.* **J Basic Microbiol.**, 45 (2005), 99-105.
- [232] V. Suryavathi, S.Sharma, S.Sharma, P. Saxena, S.Padney, R. Grover, S. Kumar and K.P. Sharma, *Acute toxicity of textile dye wastewater (untreated and treated) of Sanganer on male reproductive systems of albino rats and mice.* **Rep Toxicol.**, 19 (2005), 547-556.
- [233] SM. Ulson de Souza, E. Forgiarini, AA.Ulson de Souza, *Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP).* **J Hazard Mater**, 147(3) (2007), 1073-8.
- [234] O. Yesilada, S. Sik, M. Sam, *Biodegradation of olive oil mill wastewater by Coriolus versicolor and Funalia trogii: effects of agitation, initial COD concentration, inoculum size and immobilization*, **World J Microbiol Biotech.**, 14 (1998), 37-42.
- [235] C.Galhaup, H. Wagner, B. Hinterstoisser, D. Haltrich, *Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete Trametes pubescens.* **Enzyme Microbiol Technol**;30 (2002), 529–36.
- [236] V.K Garg., R.Gupta, R Kumar., R.K Gupta., *Adsorption of chromium from solution on treated sawdust*, **Biores Tech**, 92, (2004), 79-81,
- [237] C. Ellen Giese, F.H. Robert Dekker Aneli M. Barbosa, *Orange bagasse as substrate for the production of pectinase and laccase by Botryosphaeria rodina MAMB-05 in submerged and solid state fermentation*, **Biores** 3(2), (2008), 335-345
- [238] S.R.Cauto, *Laccase from Trametes hirsuta grown on papaer cuttings: Application to synthetic dye decolorization at different pH value*, **Eng Life Sci.** 7(3), (2007), 229-234
- [239] K.Hilden, T.K. Hakala, P. Maijala, T.K. Lundell, A. Hatakka, *Novel thermotolerant laccases produced by white root fungus Physisporinus rivulosus*, **Appl Microbiol Tech.** 77, (2007), 301-309
- [240] D. Farani de Souza, G.K. Tychanowicz, C. G. Marques de Souza, R.M. Peralta, *Co-production of ligninolytic enzymes by Pleurotus pulmonarius on wheat bran solid state cultures.*, **J Basic Microbiol.** 46, (2), (2006)26-134
- [241] W. Qiu, H. Chen, *Solid state fermentation of a Mycelia Sterilia laccase using steamexploded wheat straw* **World J Microbiol Biotechnol** 24 (2008), 219–224
- [242] A.Dominguez, Gómez, L. Jose, S.Miriam, Angeles, *Enhanced production of laccase activity by Trametes versicolor immobilized into alginate beads by the addition of different inducers*, **World J Microbiol Biotech**, 23(3), (2007), 367-373
- [243] Prof. Dr. Ertuğrul Erdin, web.deu.edu.tr/erdin

- [244] Avneesh D Singh,¹ Noorlidah Abdullah² and S Vikineswary², *Optimization of extraction of bulk enzymes from spent mushroom compost*, **J Chem Technol Biotechnol** 78 (2003), 743–752
- [245] K.L. Lau, Y.Y. Tsang, S.W. Chiu, Use of spent mushroom compost to bioremediate PAH-contaminated samples, **Chemosphere** 52 (2003) 1539–1546
- [246] H. Palonen, M. Saloheimo, L. Viikari L, K. Kruus, *Purification, characterization and sequence analysis of a laccase from the ascomycete Mauginiella sp.* **Enzyme Microbiol Tech** 33,(2003), 854–862
- [247] M.L. Niku Paavola, R.Fagerström, K. Kruus, L. Viikari, *Thermostable laccases produced by a white root fungus from Peniophora sp.* **Enzyme Microbiol Tech.** 35 (2004) 100-102
- [248] A. Birhanlı A. and M. Ozmen, *Evaluation of the toxicity and teratogenicity of six commercial textile dyes using the frog embryo teratogenesis assay-Xenopus (FETAX)* **Drug Chem Toxicol**, 28(1), (2005), 51-65.
- [249] Seval Cing Yıldırım, *Beyaz çürükçül funguslarla tekstil boyalarının renginin giderimi*, Doktora Tezi, **İnönü Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü**, (2007)

ÖZGEÇMİŞ

1. KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Nesrin (Yenice) ÖZMEN
Doğum Yeri : Yeşilyurt
Doğum Yılı : 04 Ağustos 1966
Medeni Durumu : Evli ve iki çocuklu
Görevi ve Atanma Yılı : Öğretim Görevlisi, 2000

2. ÖĞRENİM DURUMU

İlkokul : Malatya Atatürk İlkokulu (1972-1977)
Ortaokul : Malatya Hasan Varol Ortaokulu (1977-1980)
Lise : Malatya Kız Lisesi (1980-1983)
Lisans : İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü (1984-1988)
Yüksek Lisans : İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı, (1989-1991)
Tez Başlığı : Phanerochete Chrysosporium ME 446 tarafından üretilen
absisik asit, sentetik absisik asit ve metil esterlerinin biyolojik
aktivitelerinin karşılaştırılması.

BİLİMSEL DENEYİMİ

- 1) İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalında Bitki Fizyolojisi Laboratuvarında Bilimsel Çalışmalar (1989-1991).
- 2) A.B.D.'de Oregon State University, Department of Plant Molecular Biology and Pathology'de Dr. Terri LOMAX laboratuvarında Bitki Fizyolojisi ile ilgili çeşitli araştırmalara 21 ay süre ile Misafir Araştırmacı yapılan çalışmalar (1991-1993).

MESLEKİ DENEYİMLERİ

- 1) Biyoloji Öğretmeni, Malatya Lisesi, 1990-2000
- 2) Öğretim Görevlisi, İnönü Üniveristesi Eğitim Fakültesi, Fen Bilgisi Öğretmenliği Programı, 2000-

BİLİMSEL ESERLERİ

Kongre Bildirileri ve Poster Bildiriler

- 1- Rice, M.S., L.A. Hassell, **N. Özmen**, T.L. Lomax, Developmentally-Regulated Gravitropic Response in an Indole Acetic Acid-Insensitive Tomato Mutant, Assoc. Plant Physiol. June 9-12, 1992, Pittsburg, USA.
- 2- Lomax, T.L., M.S. Rice, L.A. Hassell, **N. Özmen**, M.R.G. Roelfsema, C. Coenen, Developmental Analysis of Growth Response in the Diageotropica Mutant of Tomato, Assoc. Plant Physiol. June 9-12, 1992, Pittsburg, USA (Poster Presentation).
- 3- Rice, M.S., L.A. Hassell, **N. Özmen**, T.L. Lomax, Developmentally regulated Gravitropism in an Auxin-Insensitive Tomato Mutant, ASGSB Bulletin, October 1992, Vol.6, Number 1, Assoc. Space and Gravit. Biol., Tuscon, AZ, USA.
- 4- Yeşilada, O., Cing, S., Birhanlı, E., Hamamcı, D., Apohan, E.⁵, Özmen, N., Decolorization and Detoxification of the Textile Dye by White Rot Fungal Pellets. SETAC 26th Annual Meeting in North America, 13-17 November 2005, Baltimore, Maryland, USA.
- 5- Cing S., Apohan E., Birhanlı E., Yeşilada Ö., Asma D., Özmen N., Kahraman S. Sentetik Tekstil Atıksuyunun/Tekstil Boyalarının Renginin Gideriminde ve Detoksifikasyonunda Fungus Kullanımı. 31.8.-02.09.2005, 14. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Eskişehir.
- 6- Yeşilada Ö., Apohan E., Cing S., Birhanlı E., Kuru F., Hamamcı D., Kahraman S. ve Özmen N. Beyaz Çürükçül Fungusların Biyolojik Önemi. 18. Ulusal Biyoloji Kongresi, 26-30 Haziran 2006, Kuşadası, Aydın.
- 7- Özmen N ve Yeşilada Ö., Boya Absorblanmış Lignosellülozlu Atık Hammaddelerin Besi Ortamı Olarak Kullanılması. VII. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, 10-13 Eylül 2007, Malatya.
- 8- Özmen N and Yeşilada Ö., A Biotechnological Approach: Environmental Protection and Laccase Enzyme Production by *Funalia troglia*. The Sixth Prencess Chulabhorn Science Congress, 25-29 Nov. 2007, Thailand.
- 9- Özmen N ve Yeşilada, Ö. Boya Absorblanmış Lignoselülozlu Hammaddelerin *Trametes versicolor* ile Lakkaz Üretiminde Kullanılması, 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, 23-27 Haziran 2008, Trabzon.