

Tekrarlı Kesikli Süreçte *Funalia trogii* ve *Trametes versicolor* ile Lakkaz Enziminin Çeşitli Ortamlarda Üretimi

Emre BİRHANLI¹, Özfer YEŞİLADA¹

¹İnönü Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, MALATYA

e-mail: emre.birhanli@inonu.edu.tr

Öz: Lakkaz enzimi (EC 1.10.3.2) yapısında dört bakır iyonu bulunan bir polifenol oksidaz olup, en iyi lakkaz üreten organizmalar beyaz çürükçül funguslardır. Oldukça geniş bir substrat özgüllüğüne sahip olan lakkaz enzimi pek çok biyoteknolojik, endüstriyel ve çevresel alanlarda kullanılabilir. Ancak lakkaz enziminin bu alanlarda kullanılabilmesi için yüksek miktarlarda üretilmesi gerekir. Bu nedenle yüksek miktarlarda lakkaz üreten organizmaların, düşük maliyetli ve uygun enzim üretim ortamlarının ve de yöntemlerinin araştırılması son derece önemlidir. Bu amaç doğrultusunda enzim üreticisi olarak yüksek lakkaz üretim potansiyeline sahip olan *Funalia trogii* ATCC 200800 ve *Trametes versicolor* ATCC 200801 kullanılmıştır. Enzim üretim ortamları olarak bakır içeren ve bakır içermeyen distile su, Sabouraud Dekstroz Broth, Malt Ekstrakt Broth ve peynir altı suyu ortamları kullanılmıştır. Lakkaz üretim yöntemi olarak daha önceki çalışmalarımızda verimli bir yöntem olarak saptadığımız tekrarlı kesikli işlem kullanılmıştır. En yüksek lakkaz aktiviteleri bakır ilave edilmiş Malt Ekstrakt Broth ortamlarında *F. trogii* ve *T. versicolor* için sırasıyla 17.68 ve 6.27 U mL⁻¹ olarak elde edilmiştir. Lakkaz üretimi açısından bakır ilave edilmiş ortamların etkinlik sıralaması her iki fungus için de; Malt Ekstrakt Broth > Sabouraud Dekstroz Broth > distile su şeklindedir. Bakırsız ortamlardaki etkinlik sıralaması *F. trogii* için Malt Ekstrakt Broth > Sabouraud Dekstroz Broth > %25 peynir altı suyu > distile su > %50 peynir altı suyu iken, *T. versicolor* için; Malt Ekstrakt Broth > %25 peynir altı suyu > Sabouraud Dekstroz Broth > %50 peynir altı suyu > distile su şeklindedir. Sonuç olarak her iki fungus da tüm ortamlarda lakkaz üretebilmiş ve bakırlı ortamlarda lakkaz üretimi son derece artmıştır.

Anahtar kelimeler: *Funalia trogii*, *Trametes versicolor*, Lakkaz, Bakır

Production of Laccase Enzyme in Various Media by *Funalia trogii* and *Trametes versicolor* in Repeated Batch Process

Abstract: Laccase enzyme (EC 1.10.3.2) is a polyphenol oxidase which has four copper ions in the structure and the best laccase-producing organisms are white rot fungi. Laccase enzyme which has a rather broad substrate specificity can be used in many biotechnological, industrial and environmental fields. However, laccase enzyme should be produced at large amounts as it can be used in these fields. Therefore, it is extremely important to investigate high levels of laccase-producing organisms, the cost-effective and appropriate enzyme production media and also methods. In accordance with this purpose *Funalia trogii* ATCC 200800 and *Trametes versicolor* ATCC 200801 which have high laccase production potential were used as enzyme producers. Distilled water, Sabouraud Dextrose Broth, Malt Extract Broth and cheese whey media with copper and without copper were used as enzyme production media. Repeated batch process is used as laccase production method which we have found as an efficient method in our previous studies. The highest laccase activities for *F. trogii* and *T. versicolor* were obtained from Malt Extract Broth as 17.68 and 6.27 U mL⁻¹, respectively. In terms of the laccase production, the efficiency order of copper added media for both fungus is Malt Extract Broth > Sabouraud Dextrose Broth > distilled water. While the efficiency order of copper free media for *F. trogii* is Malt Extract Broth > Sabouraud Dextrose Broth > 25% cheese whey > distilled water > 50% cheese whey, the efficiency order of copper free media for *T. versicolor* is Malt Extract Broth > 25% cheese whey > Sabouraud Dextrose Broth > 50% cheese whey > distilled water. As a result both fungus could produce laccase in all media and laccase production highly increased in copper added media.

Keywords: *Funalia trogii*, *Trametes versicolor*, Laccase, Copper

Kısaltmalar ve Semboller

EC	: Enzim Komisyonu
ATCC	: Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
U	: Ünite
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
Cu	: Bakır
SO ₄	: Sülfat
H ₂ O	: Su
DS	: Distile su
SDB	: Sabouraud Dekstroz Broth
MEB	: Malt Ekstrakt Broth
PAS	: Peynir altı suyu
<i>F. trogii</i>	: <i>Funalia trogii</i>
<i>T. versicolor</i>	: <i>Trametes versicolor</i>
UV	: Ultraviyole
SPSS	: Sosyal Bilimler için İstatistik Paketi
ABTS	: 2,2'-azino-bis(3-etilbenziazolin-6-sülfonik asit)
µM	: Mikromolar
nkat	: Nanokatal
NFCCI	: Hindistan Ulusal Mantar Kültürü Koleksiyonu
cU	: Santiünite
L	: Litre

1. Giriş

Lakkaz enzimi (EC 1.10.3.2) yapısında dört bakır iyonu bulunan bir polifenol oksidaz olup, bu enzimler mono-, di- ve polifenoller, aminofenoller, metoksifenoller, aromatik aminler ve askorbat dahil çok çeşitli organik ve inorganik substratların bir elektron oksidasyonunu katalizler. Bu

reaksiyon sonucunda da moleküler oksijen dört elektron alarak suya indirgenir. Lakkaz enzimi bazı bakteriler, böcekler, yüksek yapılı bitkiler ve funguslar tarafından üretilebilir. Fakat en iyi lakkaz üreten organizmalar beyaz çürükçül funguslardır (Madhavi ve Lele, 2009; Chandra ve Chowdhary, 2015; Roth ve Spiess, 2015).

Oldukça geniş bir substrat özgüllüğüne sahip olan lakkaz enzimi toprak ve su kirliliğine neden olan çeşitli ksenobiyotiklerin yıkımında, boya ve tekstil fabrikası atık sularının renginin gideriminde kullanılabilir. Buna ilaveten lakkaz enzimi; gıda endüstrisinde fırınlama ve içecek işlemede ayrıca kağıt hamurunun ağartılması, lakkaz tabanlı biyosensör yapımı, bazı su arıtım sistemlerinde temizleyici ajan, anti-kanser ilaçlarının üretiminde katalizör ve kozmetik ürünlerinin bileşeni olarak da kullanılabilir (Couto ve Herrera, 2006; Singh ve Singh, 2014; Pezzella ve ark., 2015). Ancak lakkaz enziminin bahsedilen endüstriyel alanlarda kullanılabilmesi için ucuz ve yüksek miktarlarda üretilmesi gerekir. Bu nedenle yüksek miktarlarda lakkaz üreten organizmaların, düşük maliyetli ve uygun enzim üretim ortamlarının ve yöntemlerinin araştırılması son derece önemlidir. Bu amaç doğrultusunda pek çok araştırmacı lakkaz üreten yeni soylar, kültivasyon metotları ve koşulları ile çeşitli kimyasallar, ksenobiyotikler, tarımsal atıklar, atık sular ve metaller kullanarak lakkaz üretiminin artırılması üzerine yoğunlaşmıştır. Buna göre; yapılan çalışmalar kullanılan organizmanın soyuna, üretim metoduna ve ortama eklenen indükleyici gibi faktörlere bağlı olarak lakkaz üretiminin yüksek oranlarda artırılabilirliğini göstermektedir (Mougin ve ark., 2002; Birhanli ve Yesilada,

2006; Birhanli ve Yeşilada, 2013; Sun ve ark., 2013; Amutha ve Abhijit, 2015; Jegatheesan ve Eyini, 2015; Patel ve Gupte, 2016).

Literatür taramamıza göre lakkaz üretim çalışmalarında sıklıkla çalkalamalı veya statik kesikli üretim kullanılmış, daha sınırlı olarak da kesikli üretimden farklı bir üretim yöntemi olan tekrarlı kesikli üretim metodu test edilmiştir. Ancak tekrarlı kesikli işlem kesikli üretim metoduna kıyasla daha uzun süreli ve daha iyi sonuçlar elde edilebilecek bir yöntemdir (Birhanli ve Yesilada, 2006). Bu yöntem lakkaz üretiminde ekonomik etkinliği arttırmada önemli bir yer tutan fermentör ve inokulum hazırlanması ile sterilizasyon işlemlerinin maliyetini azaltabilir. Buna ilaveten; tekrarlı kesikli işlemin bir diğer avantajı da uygulama sonrasında sıvı ortamdan hücrelerin ayrılmasının kolaylığıdır. Bahsedildiği üzere tekrarlı kesikli işlemden test edilen beyaz çürükçül fungusların öncelikle peletleri elde edilir ve ardından bu peletler kararlı ve uzun süre lakkaz üretiminde veya çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilir. Endüstriyel uygulamalarda ve lakkaz üretiminde tutuklanmış hücreler de büyük bir potansiyele sahiptir. Ancak bu hücrelerin de bazı dezavantajları bulunmaktadır. Örneğin tutuklama işlemi çok ekonomik bir işlem olmayıp, işlemin gerçekleştirilmesi zaman alıcıdır. Fungal hücrelerin kendi kendine

tutuklanması sonucu oluşan peletler kullanılarak bu tür problemlerin üstesinden kolayca gelinebilir (Birhanlı ve Yeşilada, 2006).

Bu çalışmanın amacı *Funalia trogii* ATCC 200800 (*F. trogii*) ve *Trametes versicolor* ATCC 200801 (*T. versicolor*)'un distile su (DS), sabouraud dekstroz broth (SDB), malt ekstrakt broth (MEB) ve bir atık su olan peynir altı suyu (PAS) gibi farklı ortamlarda tekrarlı kesikli süreçteki lakkaz üretme potansiyellerinin ortaya konulmasıdır. Ayrıca çalışmada bakırın lakkaz üretimine olan etkisinin ortaya konması da hedeflenmiştir.

2. Materyal ve Metot

2.1. Çalışmalarda Kullanılan Organizmalar

Çalışmalarda lakkaz üretici organizma olarak Basidiomycetes sınıfına dahil olan beyaz çürükçül funguslardan *F. trogii* ve *T. versicolor* kullanılmıştır. Funguslar her 2–3 haftada bir periyodik olarak taze steril sabouraud dekstroz agar (SDA) içeren plaklara transfer edilerek 30 °C'de saf kültür olarak üretilmiştir. Elde edilen saf kültürler İnönü Üniversitesi Biyoteknoloji Laboratuvarı'nın buzdolabında + 4 °C'de stok kültür olarak muhafaza edilmektedir.

2.2. Fungus Peletlerinin Hazırlanışı

Tekrarlı kesikli koşullar altında lakkaz üretimi için öncelikle fungus peletlerinin hazırlanması gerekmektedir. Bu amaç

doğrultusunda öncelikle her iki fungusunda saf katı kültürlerinden birer parçaları öze ile alınarak kültür tüpleri içerisinde hazırlanan steril yatık SDA ortamına aseptik koşullarda transfer edilmiştir. Transfer sonrasında kültür tüpleri statik inkübatörde 30 °C'de 1 hafta bekletilerek her iki fungusunda fungal miselleri elde edilmiştir. Daha sonra aseptik koşullarda kültür tüplerine 10'ar mililitre steril distile su ilave edilmiş ve kültürler yüzeyden kazınarak misel süspansiyonları elde edilmiştir. Bu işlem sonrasında 5 mL süspansiyon 100 mL SDB içeren 250 mL'lik erlenlere pipetlenmiş ve bu erlenler içindeki fungus miselleri çalkalamalı inkübatörde 30 °C'de 150 rpm'de 5 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kültürler aseptik koşullarda homojenizatörde (Polytron PT 10–35) homojenize edilmiş ve homojenize edilmiş fungal kültürlerden 7 mL'si aseptik koşullarda 600 mL taze SDB içeren ortamlara pipetlenmiştir. Bu inokülasyon işlemi sonrasında kültürler çalkalamalı inkübatörde 30 °C'de 150 rpm çalkalama hızında 5 gün üretilmiştir. İnkübasyon sonrasında fungal peletler aseptik süzgeçler vasıtasıyla steril koşullarda süzülerek elde edilen peletler tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi çalışmalarında kullanılmıştır (Birhanlı ve Yeşilada, 2010).

2.3. Tekrarlı Kesikli Süreçte Lakkaz Üretimi

Tekrarlı kesikli süreçte yürütülen çalışmaların ilk aşamasında önceden

hazırlanmış olan *F. trogii* ve *T. versicolor* peletlerinden yaş ağırlık 30'ar gram olacak şekilde aseptik koşullarda tartılan fungal peletler 250 mL'lik steril erlenlere aktarılmıştır. Aseptik koşullarda ayrı ayrı ve her ortam için üçer tekrarlı olarak hazırlanmış peletler üzerine 50'şer mililitre bakırlı DS, SDB, MEB (DS+Cu, SDB+Cu, MEB+Cu) ve bakırsız steril DS, SDB, MEB ve bir de atık su olarak %25 ve %50 konsantrasyonlarda peynir altı suyu (PAS) ilave edilmiştir. Daha sonra peletler çalkalamalı inkübatörde 30 °C'de, 150 rpm çalkalama hızında, 24 saat inkübe edildikten sonra steril koşullarda süzülerek alınmış ve üzerlerine aynı miktarlarda, test edilen aynı ortamlardan ilave edilmiştir. Üç tekrarlı olarak test edilen bakırlı ve bakırsız tüm ortamlardan beş gün boyunca her 24 saatte bir elde edilen süzüntülerdeki lakkaz aktivitesi spektrofotometrik (Shimadzu-UV-1601, UV/Visible) olarak saptanmıştır. Bu işlem sonrasında elde edilen spektrofotometrik absorbans değerleri paket program (SPSS 15.0) aracılığıyla ortalama enzim aktivite değerlerine dönüştürülmüş ve lakkaz aktiviteleri $U\ mL^{-1} \pm$ standart sapma şeklinde ifade edilmiştir.

2.4. Lakkaz Aktivitesinin Tayini

Lakkaz aktivitesi, 2,2'-azino-bis(3-etilbenziazolin-6-sülfonik asit) (ABTS)'nin katyon radikaline (ABTS^{•+}) oksidasyonunun 30 °C'de 1 dakika boyunca 420 nm'de spektrofotometrik olarak izlenmesiyle

saptanmıştır. Deney karışımı 100 mM sodyum asetat tamponu (pH 5.0), 0.5 mM ABTS ve uygun bir miktar ham enzim içermektedir. Bir ünite lakkaz aktivitesi 30 °C'de 1 dakikada 1 μ mol substratı (ABTS) oksitleyen enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Spektrofotometrik ölçümler sonucu elde edilen spektrofotometrik absorbans değerleri SPSS 15.0 paket program kullanılarak çalışmalarda enzim aktiviteleri $U\ mL^{-1}$ cinsinden tanımlanmıştır. Tüm enzim aktivite değerleri 3 tekrarın ortalaması olup, ortalamalar \pm standart sapmalarıyla birlikte gösterilmiştir (Birhanlı ve Yeşilada, 2013).

3. Araştırma Sonuçları ve Tartışma

Bakır lakkaz enziminin kofaktörü olması nedeni ile pek çok çalışmada lakkaz üretimini arttırmak için test edilen ağır metallerin başında gelir. Ancak her ağır metal gibi bakır da kullanılan organizmaya bağlı olarak belirli bir konsantrasyonun üzerinde toksik etki göstererek gelişimi ve dolayısıyla da enzim üretimini baskılar (Baldrian, 2003; Shutova ve ark., 2008; Zhu ve ark., 2016). Bu nedenle enzim üretimini arttırmak için kullanılan bakırın optimum konsantrasyonunu tespit etmek gerekir. Revankar ve Lele (2006) tarafından yapılan bir çalışmada *WR-1* beyaz çürükçül fungusunun üreme ortamına 0.5–5 mM konsantrasyonlarda bakır sülfat ilave edilmiş ve her 24 saatte bir lakkaz aktivitesi

ölçülmüştür. Buna göre; en yüksek enzim aktivitesinin 1 mM bakır ilave edilmiş ortamda olduğu ve bakır konsantrasyonu arttıkça enzim aktivitesinde düşüş gözlemlendiği rapor edilmiştir. Janusz ve ark. (2006) tarafından *Rhizoctonia praticola* kullanılarak yapılan çalışmada ise fungusun kültür ortamına 5–300 μM bakır ilave edilmiş ve en yüksek lakkaz aktivitesinin 5 μM bakır ilave edilmiş ortamda 3. günde yaklaşık 1000 nkat L^{-1} olduğu saptanmıştır. Artan bakır konsantrasyonlarında (10 μM 'dan 300 μM 'a) ise lakkaz üretiminin baskılandığı ifade edilmektedir. Bu durum test edilen organizmaya bağlı olarak bakır toleransının değiştiğini göstermektedir. Önceki çalışmamızda (Birhanlı ve Yeşilada, 2006) test edilen her iki fungus içinde en uygun bakır konsantrasyonunun 0.5 mM bulunması sebebiyle bu çalışmada da 0.5 mM bakır test edilen ortamlara ilave edilmiştir.

3.1. DS ve DS+Cu ortamlarında *F. trogii* ve *T. versicolor* ile Lakkaz Üretimi

Çalışmada DS ve DS+Cu ortamlarında tekrarlı kesikli süreçte inkübe edilen her iki fungusunda DS'ye kıyasla DS+Cu ortamlarındaki lakkaz aktivitelerinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Hem bakırlı hem de bakırsız DS ortamında her iki fungus için de inkübasyonun 1. gününden 4. gününe kadar lakkaz aktivitelerinde kademeli bir artış gerçekleşirken, inkübasyonun son günü olan 5. günde enzim aktivitelerinde azalış gerçekleşmiştir. Buna göre bakırlı ve bakırsız

DS ortamlardaki en yüksek lakkaz aktiviteleri her iki fungus içinde inkübasyonun 4. gününde gerçekleşmiştir. Bakırsız DS ortamlarında *F. trogii* ve *T. versicolor* peletlerinden elde edilen en yüksek lakkaz aktiviteleri sırasıyla 0.27 ve 0.22 U mL^{-1} iken, bakırlı DS ortamlarındaki en yüksek enzim aktiviteleri sırasıyla 4.04 ve 2.42 U mL^{-1} ' dir (Tablo 1).

Tablo 1. Tekrarlı kesikli süreçte DS ve DS+Cu ortamında *F. trogii* ve *T. versicolor* peletleri ile lakkaz üretimi (U mL^{-1}).

İnkübasyon Zamanı (Gün)	<i>F. trogii</i>		<i>T. versicolor</i>	
	DS	DS+Cu	DS	DS+Cu
1.	0.19±0.01	0.34±0.01	0.13±0.01	0.32±0.01
2.	0.20±0.01	0.41±0.02	0.17±0.01	0.71±0.03
3.	0.24±0.01	3.76±0.13	0.20±0.01	2.21±0.16
4.	0.27±0.01	4.04±0.16	0.22±0.01	2.42±0.16
5.	0.25±0.02	3.23±0.20	0.18±0.03	2.11±0.10

DS: Distile su. Sonuçlar üç tekrarın ortalamasıdır.

DS ve DS+Cu ortamında herhangi bir karbon ve azot kaynağı bulunmamasına rağmen, hem *F. trogii* hem de *T. versicolor*'un lakkaz ürettiği saptanmıştır. Bakırın indükleyici etkisiyle DS ortamına kıyasla DS+Cu ortamında *F. trogii* ve *T. versicolor* peletleri toplamda sırasıyla 10.2 ve 8.6 kat daha fazla lakkaz üretmiştir. Ancak bir süre sonra hücrelerde azalan besin miktarına ve fungal peletlerin yaşlanmasına

bağlı olarak her iki ortamda da lakkaz aktivitesinde bir düşüş gerçekleşmiştir.

3.2. SDB ve SDB+Cu Ortamlarında *F. trogii* ve *T. versicolor* ile Lakkaz Üretimi

SDB ve SDB+Cu ortamlarında inkübe edilen her iki fungusunda en yüksek lakkaz aktiviteleri inkübasyonun 5. gününde belirlenmiş olup, indükleyici madde olarak 0.5 mM bakır ilave edilmiş ortamlarda bakırsız ortamlara kıyasla enzim aktivitelerinin daha yüksek olduğu saptanmıştır. Tekrarlı kesikli süreçte SDB+Cu ortamında inkübe edilen *F. trogii* ve *T. versicolor* peletlerinin 5 günlük inkübasyonu sonucunda elde edilen en yüksek lakkaz aktiviteleri sırasıyla 15.02 ve 4.26 U mL⁻¹ olarak tespit edilmiştir (Tablo 2).

Literatür taramamıza göre SDB oldukça az sayıda araştırmacı tarafından lakkaz üretimi amacıyla test edilmiş bir besiyeri ortamıdır (Manimozhi ve Kaviyaran, 2012; Divya ve ark., 2013). Bu iki çalışmadan birinde *Agaricus heterocystis* (Manimozhi ve Kaviyaran, 2012) diğesinde ise *Trichoderma viride* NFCCI 2745 (Divya ve ark., 2013) SDB besiyerinde inkübe edilmiş ve bu organizmalardan elde edilen en yüksek lakkaz aktiviteleri sırasıyla 30 ve 0.1 U mL⁻¹ olarak belirlenmiştir. Bu iki çalışmadan elde edilen lakkaz aktiviteleri arasındaki bu yüksek farkın, inkübasyon koşulları kadar üretici organizmaların lakkaz

üretim potansiyellerinin farklı olmasından da kaynaklandığı açıktır.

Tablo 2. Tekrarlı kesikli süreçte SDB ve SDB+Cu ortamında *F. trogii* ve *T. versicolor* peletleri ile lakkaz üretimi (U mL⁻¹).

İnkübasyon Zamanı (Gün)	<i>F. trogii</i>		<i>T. versicolor</i>	
	SDB	SDB+Cu	SDB	SDB+Cu
1.	0.42±0.03	4.86±0.28	0.29±0.02	2.25±0.15
2.	0.52±0.02	5.72±0.38	0.32±0.01	3.09±0.18
3.	0.63±0.03	7.98±0.40	0.34±0.03	3.41±0.21
4.	0.65±0.02	9.36±0.56	0.37±0.04	3.62±0.07
5.	0.67±0.03	15.02±0.82	0.39±0.02	4.26±0.23

SDB: Sabouraud Dekstroz Broth. Sonuçlar üç tekrarın ortalamasıdır

Bu çalışmada SDB ve SDB+Cu ortamlarının fungal gelişim ve enzim üretimi için gerekli besinsel kaynakları içerdiği düşünüldüğünde bu ortamlarda inkübe edilen her iki fungusunda DS ve DS+Cu ortamlarında ürettikleri lakkaz miktarlarından daha yüksek olması tahmin edilebilecek bir sonuçtur. Besin faktörleri fungus peletlerinin ömür uzunluğunda arttırmaktadır. Buna göre; SDB ve SDB+Cu ortamlarında inkübe edilen her iki fungusunda en yüksek lakkaz aktiviteleri inkübasyonun 5. gününde belirlenmiştir.

3.3. MEB ve MEB+Cu Ortamlarında *F. trogii* ve *T. versicolor* ile Lakkaz Üretimi

MEB ve MEB+Cu ortamlarında inkübe edilen fungus peletlerinin hem DS ve DS+Cu hem de SDB ve SDB+Cu ortamlarında üretilenlerden daha fazla lakkaz ürettiği saptanmıştır. *F. trogii* ile *T. versicolor*'un MEB ve MEB+Cu ortamlarında 5 gün boyunca üretmiş oldukları lakkaz aktiviteleri kıyaslandığında her iki ortamda da *F. trogii*'nin (Şekil 1a) enzim aktivitesinin *T. versicolor*'un (Şekil 1b) enzim aktivitesinden daha yüksek olduğu görülmektedir. Tekrarlı kesikli süreçte MEB ortamında 5 gün boyunca inkübe edilen *F. trogii* ve *T. versicolor* peletlerinden elde edilen en yüksek lakkaz aktiviteleri sırasıyla 1.64 (Şekil 1a) ve 1.28 U mL⁻¹ (Şekil 1b)'dir. MEB+Cu ortamında inkübe edilen *F. trogii* ve *T. versicolor* peletlerinden elde edilen en yüksek lakkaz aktiviteleri ise sırasıyla 17.68 (Şekil 1a) ve 6.27 U mL⁻¹ (Şekil 1b) olarak belirlenmiştir.

MEB'in lakkaz üretimi için besiyeri ortamı olarak test edildiği bir çalışmada MEB ortamının *T. versicolor*, *Dichomitus squalens*, *Phlebia fascicularis* ve *Phlebia floridensis*'in lakkaz aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. Bu dört beyaz çürükçül fungusun MEB ortamındaki en yüksek lakkaz aktivitelerinin sırasıyla 0.020, 4.955, 3.480 ve 2.650 cU mL⁻¹ olduğu ifade edilmiştir (Arora ve Gill, 2000). Çalışmamızda MEB ortamında *F. trogii* ve *T.*

versicolor ile elde edilen en yüksek lakkaz aktiviteleri ise literatürdeki Arora ve Gill (2000)'in sonuçlarına göre son derece yüksektir. Bu durum hem test edilen fungusların ve inkübasyon koşullarının hem de tekrarlı kesikli üretim metodunun bir sonucu olarak düşünülmektedir.

3.4. %25 PAS ve %50 PAS ortamlarında *F. trogii* ve *T. versicolor* ile Lakkaz Üretimi

Çalışmamızın son kısmında Türkiye'de peynir üretimi sırasında 1 kg peynire karşılık yaklaşık olarak 9 kg gibi yüksek bir oranda oluşan ve önemli bir kısmı değerlendirilmeyen PAS (Siso, 1996; Otlu, 2002), lakkaz üretimi için besiyeri olarak test edilmiştir. Çoğunlukla direkt veya dolaylı yollarla akarsulara karışan PAS oldukça zengin içeriğinden dolayı çevre kirliliğine neden olmaktadır. Bu nedenle bu atık suyun ya arıtılması ya da çeşitli şekillerde değerlendirilmesi gerekmektedir. PAS bileşiminde yaklaşık olarak %6.96 oranında süt kuru maddesi bulunmaktadır. Süt kuru maddesi içerisinde de %0.36 yağ, %0.84 protein, %5.76 laktoz ve tuzlar, %0.2 kadar laktik asit yer almaktadır. Bunlara ek olarak; PAS'da B1, B2, çok az miktarda da A ve D vitaminlerinin bulunduğu rapor edilmektedir (Otlu, 2002). PAS'da ayrıca potasyum oksit %0.188, sodyum oksit %0.075, kalsiyum oksit %0.071, magnezyum oksit %0.018, demir oksit %0.001, fosforpentoksit %0.11, klor %0.107 ve %0.029 oranında kükürt

trioksit bulunduğu saptanmıştır. Daha önce yapılan bir çalışmada (Otlu, 2002) besiyeri olarak PAS'ın üretim sürecinde kullanılmasıyla *F. trogii*'de yüksek lakkaz aktivitesi bildirildiğinden, daha önce test edilmemiş olan tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi amacıyla *F. trogii* ATCC 200800 ve *T. versicolor* ATCC 200801 çalışmamızda kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan PAS %25 ve %50'lik konsantrasyonlarda hazırlanarak fungal besiyeri ve lakkaz üretim ortamı olarak test edilmiş ve değerlendirilmiştir. Tekrarlı kesikli üretim sürecinde her iki fungusunda lakkaz aktivitesinin özellikle %25'lik konsantrasyonda daha yüksek olduğu gözlenmektedir. *F. trogii* (Şekil 2a) ile *T. versicolor*'un (Şekil 2b) lakkaz aktiviteleri kıyaslandığında %25'lik PAS konsantrasyonunda *T. versicolor*'un lakkaz aktivitesinin *F. trogii*'nin lakkaz aktivitesine kıyasla daha yüksek olduğu görülmektedir (Şekil 2). Peletlerin PAS ortamında uzun süreli lakkaz aktivitesini koruyabilmesinin sebebi PAS'ın zengin besinsel içeriğinden kaynaklanmaktadır. Yeşilada ve ark. (2003) da, PAS içeren ortamlarda fungal peletlerin oldukça kararlı kaldığını rapor etmiştir. Bu zengin içerikli atık su lakkaz üretim ortamı olarak oldukça sınırlı sayıda araştırmacı tarafından test edilmiştir. Vivekanand ve ark. (2011), muz kabuğu ortamına ek besin olarak %1 konsantrasyonda PAS ilave etmiş ve katı hal fermentasyonu yöntemiyle inkübe

ettikleri *A. fumigatus*'un lakkaz aktivitesinin 5000 U L⁻¹ olduğunu rapor etmişlerdir. Asıl karbon kaynağı olarak ucuz bir ortam olan PAS'ın kullanıldığı bir çalışmada lakkaz üretici organizmalar olarak *Pleurotus sajor-caju* ve *Phanerochaete chrysosporium* kullanılmış ve çeşitli ön işlemlerden sonra PAS ortamında inkübe edilen bu funguslardan sırasıyla 177 ve 98 U L⁻¹ oranında lakkaz aktivitesi elde edildiği ifade edilmiştir (Khan ve ark., 2016). Bu çalışmaya kıyasla mevcut çalışmada daha verimli ve kolay bir metot olan tekrarlı kesikli işleme her iki fungusunda kısa sürelerde elde edilen lakkaz aktiviteleri hem daha yüksek hem de daha ekonomiktir.

Çalışmanın geneli incelendiğinde kullanılan bakırlı ortamların lakkaz üretim verimi açısından sıralaması her iki fungus içinde; MEB > SDB > DS şeklindedir. Bakırsız ortamlardaki lakkaz üretim verimi ise *F. trogii* için MEB > SDB > %25 PAS > DS > %50 PAS iken, *T. versicolor* için; MEB > %25 PAS > SDB > %50 PAS > DS şeklindedir. Yapılan çalışma bakırın lakkaz enziminin kofaktörü olması sebebiyle her iki fungusunda lakkaz üretim kapasitelerini oldukça arttırdığını göstermiştir. SDB ve SDB+Cu fungal peletlerin gelişimi ve enzim üretimi için gerekli besinsel kaynakları içerdiğinden bu ortamlarda DS ve DS+Cu'ya kıyasla daha fazla lakkaz üretimi gerçekleşmiştir. Kullanılan diğer besiyeri ortamlarına göre PAS ortamlarında enzim

üretimi daha düşük oranda gerçekleşmiştir. PAS konsantrasyonu artırılınca (%50) lakkaz üretim veriminin de düştüğü gözlenmektedir. PAS hariç tekrarlı kesikli süreçte, aynı ortamlarda ve koşullarda inkübe edilen funguslardan *F. trogii*'nin *T. versicolor*'a kıyasla genelde daha yüksek miktarda lakkaz ürettiği saptanmıştır.

Sonuç olarak; yapılan çalışma test edilen her iki fungusun çeşitli ortamlarda kısa süreli inkübasyonlarda bile lakkaz

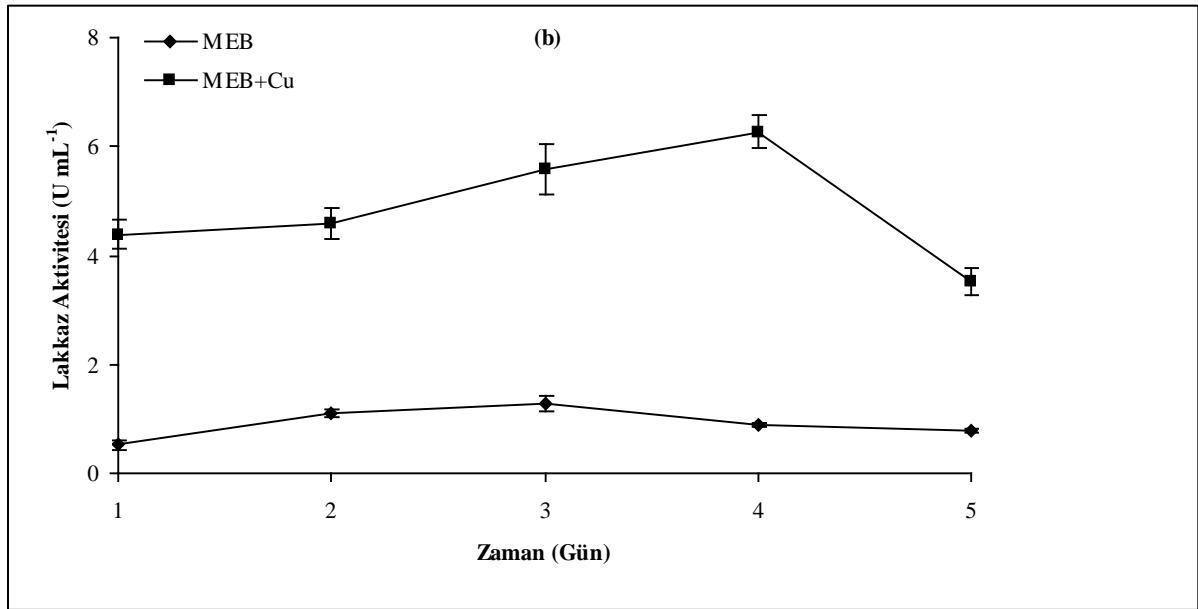
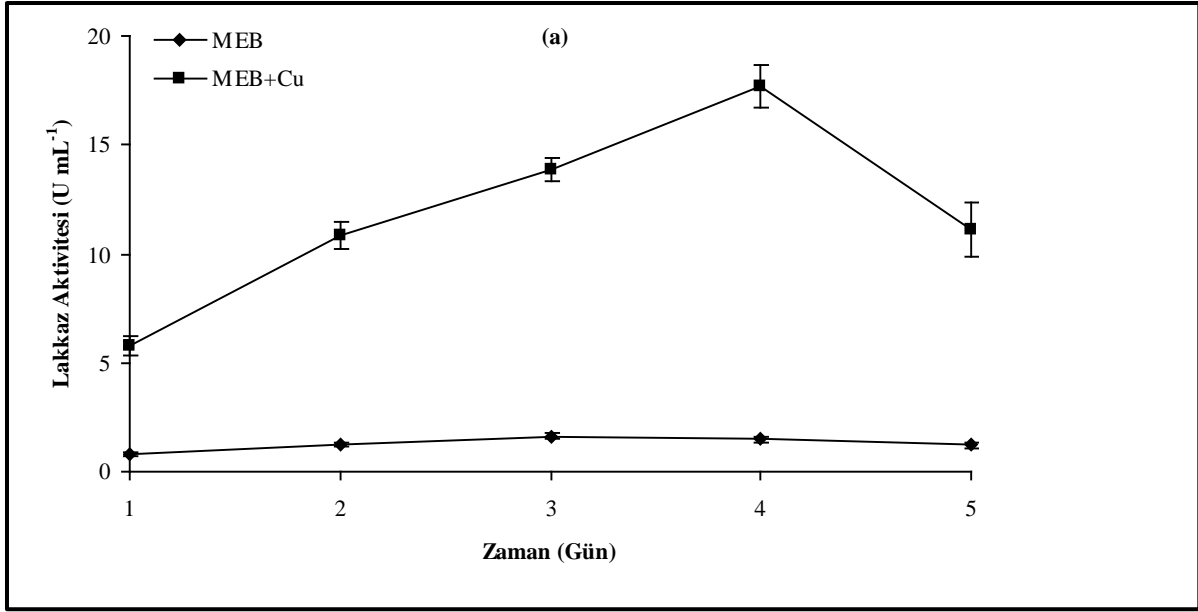
üretebileceğini ve indükleyici varlığında üretimin çok yüksek oranlarda arttığını ortaya koymuştur. Buna göre; enzim üretici organizmaların, besiyeri ortamlarının, inkübasyon koşullarının, indükleyici maddelerin ve konsantrasyonlarının çeşitlendirilmesi daha yüksek miktarlarda ve uzun süre lakkaz üretimini sağlayacak, buda lakkazın endüstriyel olarak kullanılabilirliğini yüksek oranda arttıracaktır.

Kaynaklar

- Amutha C, Abhijit M (2015). Screening and isolation of laccase producers, determination of optimal condition for growth, laccase production and choose the best strain. *Journal of Bioremediation & Biodegradation* 6: 1–8.
- Arora DS, Gill PK (2000). Laccase production by some white rot fungi under different nutritional conditions. *Bioresource Technology* 73: 283–285.
- Baldrian P (2003). Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology* 32: 78–91.
- Birhanli E, Yesilada O (2006). Increased production of laccase by pellets of *Funalia trogii* ATCC 200800 and *Trametes versicolor* 200801 in repeated-batch mode. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 1286–1293.
- Birhanli E, Yesilada O (2010). Enhanced production of laccase in repeated-batch cultures of *Funalia trogii* and *Trametes versicolor*. *Biochemical Engineering Journal* 52: 33–37.
- Birhanlı E, Yeşilada Ö (2013). The utilization of lignocellulosic wastes for laccase production under semisolid-state and submerged fermentation conditions. *Turkish Journal of Biology* 37: 450–456.
- Chandra R, Chowdhary P (2015). Properties of bacterial laccases and their application in bioremediation of industrial wastes. *Environmental Science: Processes & Impacts* 17: 326–342.
- Couto SR, Herrera JLT (2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnology Advances* 24: 500–513.

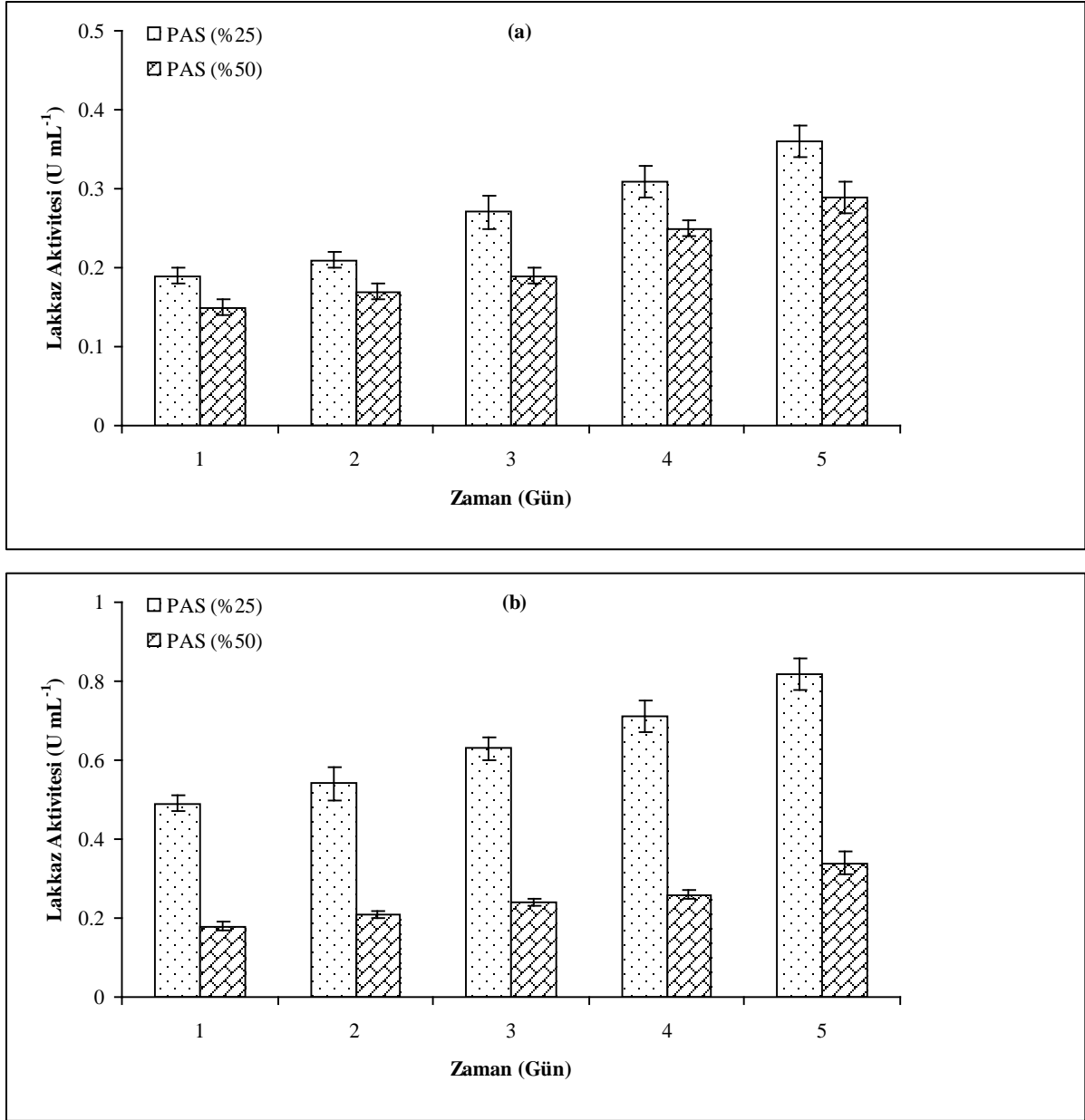
- Divya LM, Prasanth GK, Sadasivan C (2013). Isolation of a salt tolerant laccase secreting strain of *Trichoderma* sp. NFCCI–2745 and optimization of culture conditions and assessing its effectiveness in treating saline phenolic effluents. *Journal of Environmental Sciences* 25: 2410–2416.
- Janusz G, Rogalski J, Barwińska M, Szczodrak J (2006). Effects of culture conditions on production of extracellular laccase by *Rhizoctonia praticola*. *Polish Journal of Microbiology* 55: 309–319.
- Jegatheesan M, Eyini M (2015). Response surface methodology mediated modulation of laccase production by *Polyporus arcularius*. *Arabian Journal for Science and Engineering* 40: 1809–1818.
- Khan MMR, Ray M, Ray L, Guha AK (2016). Extracellular laccase from *Pleurotus sajor-caju*: Fermentative conditions and influence of nitrogenous sources. *Indian Journal of Biotechnology* 15: 230–235.
- Madhavi V, Lele SS (2009). Laccase: Properties and applications. *Bioresources* 4: 1694–1717.
- Manimozhi M, Kaviyarasan V (2012). Screening the effect of nutritional parameters on biomass and laccase production in submerged medium by litter decomposing basidiomycete *Agaricus heterocystis*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 4: 592–599.
- Mougin C, Kollmann A, Jolival C (2002). Enhanced production of laccase in the fungus *Trametes versicolor* by the addition of xenobiotics. *Biotechnology Letters* 24: 139–142.
- Otlu B (2002). *Peyniraltı Suyu ve Alkol Fabrikası Atıksularının Arıtımı ve Değerlendirilmesi*. Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü (Basılmamış), Malatya.
- Patel H, Gupte A (2016). Optimization of different culture conditions for enhanced laccase production and its purification from *Tricholoma giganteum* AGHP. *Bioresources and Bioprocessing* 3: 1–10.
- Pezzella C, Guarino L, Piscitelli A (2015). How to enjoy laccases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 72: 923–940.
- Revankar MS, Lele SS (2006). Enhanced production of laccase using a new isolate of white rot fungus *WR-1*. *Process Biochemistry* 41: 581–588.
- Roth S, Spiess AC (2015). Laccases for biorefinery applications: A critical review on challenges and perspectives. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 38: 2285–2313.

- Shutova VV, Revin VV, Myakushina YA (2008). The effect of copper ions on the production of laccase by the fungus *Lentinus (Panus) tigrinus*. *Applied Biochemistry and Microbiology* 44: 619–623.
- Singh AP, Singh T (2014). Biotechnological applications of wood-rotting fungi: A review. *Biomass and Energy* 62: 198–206.
- Siso MIG (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *Bioresource Technology* 57: 1–11.
- Sun W, Xu M, Xia C, Li A, Sun G (2013). Enhanced production of laccase by *Coriolus hirsutus* using molasses distillery wastewater. *Frontiers of Environmental Science & Engineering* 7: 200–210.
- Vivekanand V, Dwivedi P, Pareek N, Singh RP (2011). Banana peel: A potential substrate for laccase production by *Aspergillus fumigatus* VkJ2.4.5 in solid-state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 165: 204–220.
- Yesilada O, Asma D, Cing S (2003). Decolorization of textile dyes by fungal pellets. *Process Biochemistry* 38: 933–938.
- Zhu C, Bao G, Huang S (2016). Optimization of laccase production in the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* (ACCC 52857) induced through yeast extract and copper. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 30: 270–276.



MEB: Malt Ekstrakt Broth

Şekil 1. Tekrarlı kesikli süreçte MEB ve MEB+Cu ortamlarında *F. trogii* (a) ve *T. versicolor* (b) peletleri ile lakkaz üretimi (U mL⁻¹). Sonuçlar üç tekrarın ortalamasıdır.



PAS: Peynir altı suyu

Şekil 2. Tekrarlı kesikli süreçte %25 PAS ve %50 PAS ortamlarında *F. trogii* (a) ve *T. versicolor* (b) peletlerinin lakkaz üretimi (U mL⁻¹). Sonuçlar üç tekrarın ortalamasıdır.