
Araştırma Makalesi / Research Article

Bazı Mantar Türlerinin Lakkaz Aktivitelerinin Kıyaslanması ve *Clytocibe nebularis* Türünün Biyosensör Sistemlerine Uygulanabilirliğinin İncelenmesi

Engin ASAV*

*Kırklareli Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü
(ORCID: 0000-0002-6232-3388)*

Öz

Lakkaz, moleküler oksijen kullanarak fenolik bileşikler yükseltgeyen ve mantarlarda yaygınca bulunan bir enzimdir. Bu çalışmada, *Stropharia aeruginosa*, *Trametes versicolor*, *Hypholoma fasciculare*, *Cantharellus cibarius*, *Clytocibe nebularis* ve *Amanita muscaria* gibi mantar türlerinin lakkaz aktivitelerinin yanı sıra toplam protein miktarlarının belirlenmesi ve kıyaslanması amaçlanmaktadır. Sonuçlar değerlendirildiğinde, en yüksek lakkaz aktivitesi değerinin *Trametes versicolor* türüne, en düşük aktivite değerinin de *Amanita muscaria* türüne ait olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, *Clytocibe nebularis* ve *Amanita muscaria* türlerinin lakkaz aktivitesi ilk kez bu çalışmada rapor edilmiştir. Çalışmanın bir diğer hedefi de aktivitesi değeri görece yüksek olan ve daha önce biyosensör sistemlerinde kullanılmamış bir mantar türünün, doku homojenatı temelli bir biyosensör yapımında kullanılmasıdır. Bu bağlamda, *Clytocibe nebularis* dokusu kullanılarak geliştirilen biyosensör ile 100 – 1000 µM aralığındaki artan katekol konsantrasyonları için doğrusal bir amperometrik yanıt elde edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Lakkaz aktivitesi, Mantarlar, Biyosensörler

Comparison of Laccase Activities of Some Fungi and Investigation of Applicability of *Clytocibe nebularis* species to Biosensor Systems

Abstract

Laccase is an enzyme commonly found in fungi that oxidizes phenolic compounds using molecular oxygen. This study aims to determine and compare the total protein amount as well as the laccase activities of fungal species such as *Stropharia aeruginosa*, *Trametes versicolor*, *Hypholoma fasciculare*, *Cantharellus cibarius*, *Clytocibe nebularis* and *Amanita muscaria*. When the results were evaluated, it was observed that the highest laccase activity value belongs to *Trametes versicolor* species and the lowest activity value belongs to *Amanita muscaria* species. Moreover, laccase activity of *Clytocibe nebularis* and *Amanita muscaria* species was reported for the first time in this study. Another goal of the study was to use a fungal species with relatively high activity value, which has not been used in biosensor systems before, to construct a tissue homogenate-based biosensor. Therefore, a linear amperometric response was obtained for increasing catechol concentrations in the range of 100 – 1000 µM with the biosensor developed using the *Clytocibe nebularis*.

Keywords: Laccase activity, Fungi, Biosensors

1. Giriş

Dünyadaki en zengin ve çeşitli organizma gruplarından birini temsil eden mantarlar, simbiyotik ilişkiler yoluyla enerji ve besinlerin geri dönüşümünde temel bir rol oynar [1,2]. Mantarlar, bileşenlerinin besinsel özelliklerinin [3] yanı sıra antiinflamatuvar [4], nöroprotektif [5], antioksidan [6], antimikrobiyal [7] ve sitotoksik [8] etkiler gibi popüler özelliklerinden dolayı üzerinde yaygınca çalışılan organizmalardan biridir. Mantarlardan elde edilen enzimler, proteinler, toksinler ve metabolitler gibi

*Sorumlu yazar: engin.asav@klu.edu.tr

Geliş Tarihi: 25.06.2021, Kabul Tarihi: 13.09.2021

materyaller; son yıllarda tıp, sanayi ve tarım gibi alanlarda kullanılmaya başlanmıştır [2]. Mantarlar; tür, iklim koşulları, toprak ve substrat tipine bağlı olarak proteaz [9], selülaz [10], ksilanaz [11], lipaz [12], polifenol oksidaz [13] ve lakkaz [14] gibi çeşitli enzim tiplerine sahiptirler.

Lakkaz enzimi (E.C 1.10.3.2), monofenoller, polifenoller, aminofenoller gibi fenolik bileşikler yükseltgerken; moleküler oksijeni de suya indirgeyen bir enzimdir [15]. Substrat spesifikliğin düşük ve birçok molekülü dönüştürebilme yeteneğinden dolayı çevresel süreçlerde, endüstride, biyosensörlerde ve biyoteknoloji uygulamalarında yaygınca kullanılan bir enzimdir [16]. Lakkaz enzimi, odunsu gövdelerde bulunan lignini parçalama yeteneğine de sahip olduğundan dolayı, mantarlarda yaygınca bulunur [17]. Ancak, lakkaz enzimini kodlayan genin, pek çok mantarda bulunduğu rapor edilmesine rağmen [18–20], bazı mantar türleri için lakkaz aktivitesi tayinine yönelik çalışmalar literatürde yer almamaktadır. Bu çalışmada yer alan *Stropharia aeruginosa* [21], *Trametes versicolor* [22], *Hypholoma fasciculare* [23], *Cantharellus cibarius* [24] türleri için lakkaz aktivitesinin varlığı rapor edilmişken; *Clytocibe nebularis* ve *Amanita muscaria* gibi türler için lakkaz aktivitesi ilk kez bu çalışmada ölçülmüştür.

Biyosensörler; enzim, nükleik asit, antikor veya doku gibi bir biyolojik tanıma/dönüştürme materyalinin elektrot, optik fiber, piezoelektrik kristal gibi bir fiziksel sinyal iletici ile birleştirilmesi sonucunda oluşmuş cihazlardır. Analiz edilecek maddenin türüne göre biyosensör tasarımında ve geliştirilmesinde farklı biyolojik tanıma bölgesi ve sinyal iletici kombinasyonu kullanılmaktadır [25]. Bu nedenle biyosensörler, tıbbi analizlerin yanı sıra gıda ve çevre analizlerinde de yaygınca kullanılmaktadır [25,26]. Mantarlar, çok farklı sayıda ve bol miktarda enzim içerdiğinden dolayı - özellikle doku-temelli biyosensör tasarımında- en çok kullanılan biyolojik materyallerden biridir [27]. Bu nedenle, fenolik bileşiklerin tayinine yönelik mantar doku-temelli biyosensörlerin tasarımında çoğunlukla *Trametes versicolor* [28] *Phanerochaete chrysosporium* [29] *Pleurotus ostreatus* [30], *Boletus edulis* [31] ve *Agaricus bisporus* [32] gibi lakkaz veya polifenol oksidaz aktivitesi görece yüksek mantarlar kullanılmıştır.

Bu çalışmanın amacı; *Stropharia aeruginosa*, *Trametes versicolor*, *Hypholoma fasciculare*, *Cantharellus cibarius*, *Clytocibe nebularis* ve *Amanita muscaria* türlerinin lakkaz aktivitelerini belirlemek ve protein miktarlarını saptamaktır. Ayrıca lakkaz aktivitesi en yüksek olan ve daha önce biyosensör tasarımında kullanılmamış bir mantar türü ile fenolik bileşik tayinine yönelik biyosensör geliştirmek de hedeflerden biridir.

2. Materyal ve Metot

2.1 Materyaller

2,2'-azinobis [3-etilbenzothiazolin-6-sülfonik asid] diamonyum tuzu (ABTS), sığır albümini, grafit, mineral yağ, katekol ve diğer tüm kimyasallar Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)'ten temin edilmiştir. ABTS yapılan ile lakkaz aktivitesi tayini literatürdekiyle uygun olarak 100 mM pH 4.0 sitrat tamponu ile gerçekleştirilmiştir. Bunun dışındaki diğer denemelerde 100 mM pH 7.0 dihidrojen fosfat/monohidrojen fosfat tamponu kullanılmıştır. Mantarlar, Kırklareli'nin kuzeyinde yer alan Istranca Ormanlarından 2020 Ekim-Kasım aylarında toplanmış ve kullanılabildiği kadar -80°C 'de bekletilmiştir.

Protein miktarı ve lakkaz aktivitesi gibi spektrofotometrik ölçümler, ThermoFisher Scientific (Renfrewshire, UK) marka spektrofotometre ile gerçekleştirilmiştir. Mantarların homojenizasyonunda, Potter-Elvehjem tipi bir el homojenizatörü kullanılmıştır.

Biyosensör uygulamalarında BASi® Şirketinden temin edilmiş bir karbon pasta çalışma elektrotu, Ag/AgCl referans elektrotu ve platin tel karşıt elektrotu kullanılmıştır. Biyosensör analizlerinde PalmSens BV (Utrecht, Hollanda) şirketinden temin edilmiş PalmSens3® potansiyostat ve PSTrace® yazılımı kullanılmıştır.

2.2 Mantar dokularının homojenizasyonu

Mantar dokuları, literatürde daha önce belirtilmiş bir yöntemle göre homojenize edilmiştir [31,33]. Buna göre, öncelikle her bir mantar kirliliklerin uzaklaşması için yıkanıp kurutulmuştur. Sonra her bir mantar türünden ayrı ayrı 150 mg tartılıp, el tipi homojenizatöre yerleştirilmiştir. Mantarların parçalanması ve enzimlerin açığa çıkarılması amacıyla, homojenizatöre 600 mL, 0.15 M NaCl çözeltisi eklenerek 10 dk.

boyunca homojenizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Enzimlerin denatüre olmaması ve aktivite kaybetmemesi için homojenizasyon işlemi buz ceketi içinde yapılmıştır. Sonrasında, elde edilen bulanık homojenat olası girişimleri engellemek amacı ile 8000 rpm'de 15 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında elde edilen süpernatant protein ve lakkaz aktivitesi tayinlerinde kullanıldı. Doku temelli biyosensör yapımında ise girişim etkisi olmayacağı için homojenizasyon sonrası elde edilen sıvı kullanılmıştır.

2.3 Protein tayini

Protein tayini, literatürde yaygınca kullanılan standart Bradford yöntemi ile gerçekleştirilmiştir [34]. Sığır albümini ve Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası kullanılarak elde edilen standart grafik yardımı ile her bir mantar süpernatantı için toplam protein miktarı tayin edildi. Elde edilen veriler, Microsoft Excel® yazılımı kullanılarak değerlendirilmiştir.

2.4 Lakkaz aktivitesi tayini

Her bir mantar türünün lakkaz aktivitesinin belirlenmesi için, önceki mantar lakkaz aktivitesi çalışmalarında yaygınca kullanılan ABTS yöntemi kullanılmıştır [31,33,35,36]. Bu yöntemde, bir enzim ünitesi (U); sabit bir sıcaklıkta, bir dakikada 1 µmol ABTS'yi yükseltgeyen enzim miktarı olarak tanımlanır. Bu bağlamda, 25°C'de, 0,9 mL ABTS çözeltisine, mantar doku süpernatant çözeltisinden 0,1 mL ilave edilip 420 nm'de 3 dakika boyunca spektrofotometrik ölçüm alınmıştır. Ölçümler, aktivitenin gözlemlenmesi için 0. saniyeden itibaren her 30 saniyede bir absorbans değeri elde edilecek şekilde programlanmıştır. Lakkaz aktivitesi, Baltierra-Trejo ve arkadaşlarının [37] detaylı olarak incelediği aşağıdaki formüle göre yapılmıştır:

$$Hacimsel\ aktivite\ (UL^{-1}) = \frac{\Delta A \times V_t\ (mL) \times 10^6}{\epsilon \times V_s\ (mL) \times t\ (dk.)} \quad (1)$$

Bu formüllerde,

ΔA: Son absorbans değeri – Başlangıç absorbans değeri

V_t: Toplam hacim (mL)

V_s: Kullanılan süpernatant hacmi

ε: ABTS'nin 420 nm'deki molar ekstinksiyon katsayısı (36,000 L mol⁻¹ cm⁻¹)

Spesifik aktivite (U/mg) ise hacimsel aktivitenin, protein miktarına bölünmesi ile elde edilir.

2.5 Biyosensör geliştirme

Lakkaz aktivitesi belirlenen mantar türlerinden, aktivitesi en yüksek olan mantar türünün biyosensör sistemlerine uygulanabilirliğini incelemek amacı ile daha önceden denenmiş ve optimize edilmiş bir yöntem kullanılarak, doku homojenatı temelli bir biyosensör geliştirilmiştir [38–40]. Bu amaç doğrultusunda, öncelikle, boşluklarında yer alabilecek olası kirliliklerin uzaklaştırılması için karbon pasta elektrot, etanol ve bidistile su ile 10 dk. boyunca ultrasonikasyon işlemine tabi tutuldu. Karbon pasta hazırlamak amacıyla, bir cam havan içerisinde 120 mg grafit tozu tartılıp üzerine 140 µL (60 mg) mineral yağ eklendi. Sonra bu karışım, düz bir metal yardımı ile homojen bir pelte haline gelene kadar karıştırılır. Potter-Elvehjem homojenizatörü ile taze hazırlanmış mantar doku homojenatından 60 µL pelte üzerine eklenir ve doku tüm pelte içerisinde yayılana kadar karıştırılır. Daha sonra, doku içeren pelte kıvamındaki grafit/mineral yağ karışımı, grafit çubuk yardımı ile çalışma elektrotunun boşluğuna dikkatli bir şekilde yerleştirilir. Elektrot yüzeyi yağlı kağıt kullanılarak pürüzsüzleştirilir. Fiziksel tutunmaları ve kirlilikleri gidermek için elektrot bidistile su ile yıkanır.

Katekol substratı için biyosensör ile alınan amperometrik ölçümler, oksijenin indirgenme potansiyeli olan -700 mV değerinde gerçekleştirilmiştir [41,42]. Farklı konsantrasyonlardaki katekol ilaveleri için, 60 saniye sonunda amperometrik sinyalde meydana gelen değişimler ölçülmüş ve bir standart grafik elde edilmiştir. Her bir katekol derişimi için ayrı ayrı ölçüm alındığından dolayı, her ölçüm öncesinde reaksiyon hücresi temizlenip elektrot 3 dakika rejenerasyona bırakılmıştır. Ayrıca geliştirilen biyosensörün, sıralı bir şekilde eklenen aynı derişimdeki katekol çözeltileri için olan cevabı

da izlenmiştir. Ölçümler, 100 mM pH 7.0 dihidrojen fosfat/monohidrojen fosfat tamponunda ve 35°C sabit sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. Toplam protein tayini

Stropharia aeruginosa, *Trametes versicolor*, *Hypholoma fasciculare*, *Cantharellus cibarius*, *Clytocibe nebularis* ve *Amanita muscaria* türleri için Bradford yöntemi ile elde edilen protein tayini sonuçları Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Bradford Yöntemi ile elde edilen toplam protein miktarı

| Mantar Türü | Total Protein Miktarı (mg/mL) (n=3) |
|------------------------------|----------------------------------------|
| <i>Stropharia aeruginosa</i> | 0,496 ± 0,012 |
| <i>Cantharellus cibarius</i> | 1,187 ± 0,096 |
| <i>Hypholoma fasciculare</i> | 1,242 ± 0,102 |
| <i>Amanita muscaria</i> | 1,225 ± 0,114 |
| <i>Trametes versicolor</i> | 0,864 ± 0,084 |
| <i>Clytocibe nebularis</i> | 1,273 ± 0,096 |

Tablo 1’de de açıkça görüldüğü üzere, *Clytocibe nebularis* türü en yüksek protein miktarına sahipken, *Stropharia aeruginosa* en düşük protein miktarına sahip olmuştur. *Cantharellus cibarius*, *Stropharia aeruginosa* ve *Trametes versicolor*, en çok çalışılan mantar türlerinden üçü olmasına rağmen, daha çok mikrobiyoloji laboratuvarlarında besi ortamında yetiştirilerek kullanılmıştır. Protein sentezi için, besi ortamında doğal ortama kıyasla daha kontrol edilebilir düzeyde aminoasit, vitamin ve mineral bulunduğu için, bu mantarlar için ölçülen protein miktarları, bu çalışmada elde edilen sonuçlara kıyasla yüksek çıkması olağan bir durumdur [21,43–45]. Pandey ve Budhathoki tarafından yapılan benzer nitelikteki bir çalışmada *Trametes versicolor* ve *Cantharellus cibarius* için protein miktarı, sırasıyla 0,409 mg/mL ve 1,057 mg/mL olarak rapor edilmiştir [46]. Bu değerler, elde ettiğimiz protein miktarı verileri ile örtüşmektedir. Doğal *Clytocibe nebularis* ve *Hypholoma fasciculare* türleri için, protein tayini ilk kez bu çalışmada gerçekleştirilmiştir.

3.2. Lakkaz aktivitesi tayini

Stropharia aeruginosa, *Trametes versicolor*, *Hypholoma fasciculare*, *Cantharellus cibarius*, *Clytocibe nebularis* ve *Amanita muscaria* türleri için ABTS yöntemi ile elde edilen lakkaz aktivitesi değerleri Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. ABTS yöntemi ile elde edilen lakkaz aktivite değerleri

| Mantar Türü | Hacimsel aktivite (U/L) (n=3) | Spesifik aktivite (U/mg) (n=3) |
|------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Stropharia aeruginosa</i> | 26,546 ± 0,32 | 53,541 ± 0,64 |
| <i>Cantharellus cibarius</i> | 32,713 ± 0,39 | 27,559 ± 0,99 |
| <i>Hypholoma fasciculare</i> | 15,944 ± 0,19 | 12,834 ± 0,40 |
| <i>Amanita muscaria</i> | 10,764 ± 0,13 | 8,784 ± 0,18 |
| <i>Trametes versicolor</i> | 223,347 ± 2,68 | 258,407 ± 3,88 |
| <i>Clytocibe nebularis</i> | 144,542 ± 1,73 | 113,528 ± 1,48 |

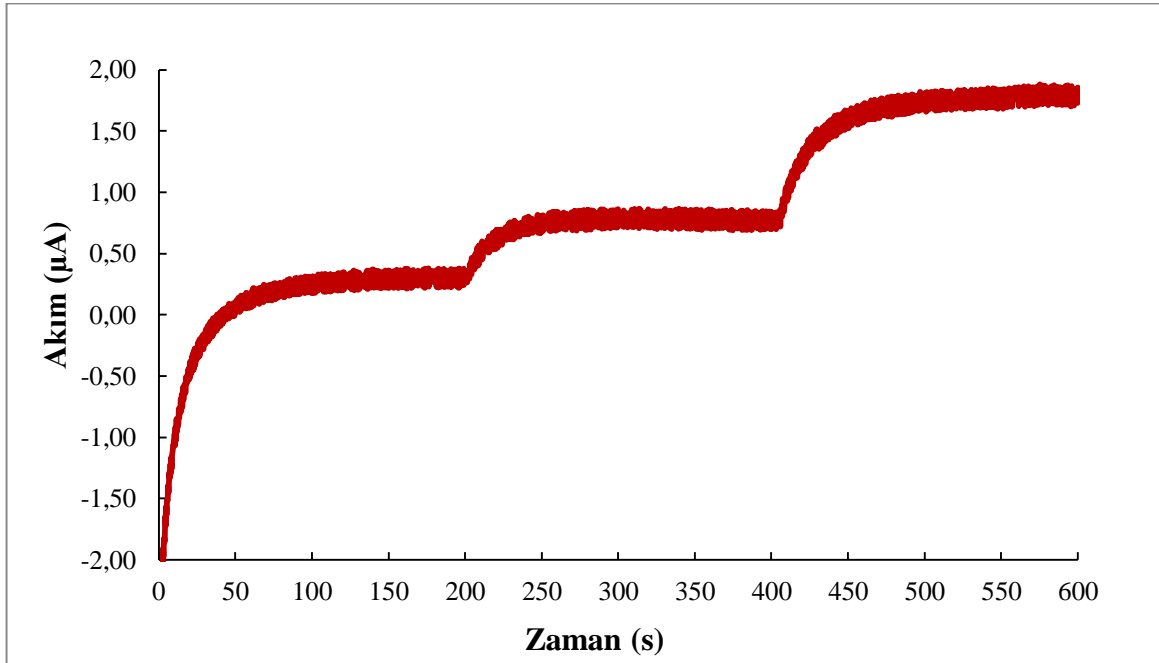
Lakkaz aktivite değerlerine bakıldığında en yüksek lakkaz aktivitesi değerinin *Trametes versicolor* türüne, en düşük aktivite değerinin de *Amanita muscaria* türüne ait olduğu gözlenmektedir. Kıyaslama yapmak amacıyla, bu mantarlar ile yapılan diğer çalışmalara bakıldığında; çoğunlukla mantarların fermentasyon ile üretildiği ve sonrasında da lakkaz enzimi için saflaştırma işlemlerinin gerçekleştirildiği açıkça gözlenmektedir [21–24]. Ayrıca bu çalışmaların bazılarında da elde edilen lakkaz miktarını arttırmak amacı ile çeşitli fenolik bileşiklerle indükleme yapılmıştır [47,48]. Bu

nedenle, bu çalışmada olduğu gibi doğal mantarlar veya onların ekstraktlarıyla elde edilen lakkaz aktivitesi değerleri ile kıyaslama yapmak daha makul olacaktır. Moon-Jong ve ark. kültür ortamında geliştirdikleri *Trametes versicolor* ekstraktı ile yaptıkları bir çalışmada total lakkaz aktivitesini 131,90 U, spesifik lakkaz aktivitesini de 437,4 U/mg olarak belirtilmiştir [49]. Daroch ve ark. yaptığı bir çalışmada ise *Stropharia aeruginosa* ekstraktı için spesifik lakkaz aktivitesi 0,60 U/mg olarak rapor edilmiştir [21]. Ng ve Wang tarafından yapılan *Cantharellus cibarius* ekstraktı ile yapılan bir çalışmada da spesifik lakkaz aktivitesi 0,65 U/mg olarak tayin edilmiştir [24]. Tablo 2'deki verilerden de görüldüğü üzere, bu çalışmada elde edilen lakkaz aktivite değerleri literatürdeki diğer çalışmalara kıyasla daha düşük çıkmıştır. Bunun sebebi olarak, pek çok çalışmada lakkaz aktivitesi hesabında kullanılan formülün açıkça belirtilmemesini ve farklı formüllerin kullanılmasını gösterebiliriz. Literatürde lakkaz aktivitesi hesap edilirken farklı formüller kullanılması sonucu oluşan tutarsızlıklar, hatalar ve yanlışlıklar Baltierra-Trejo ve ark. tarafından kıyaslama ve örneklerle incelenip, rapor edilmiştir [37]. Son olarak, *Amanita muscaria* ve *Clytocybe nebularis* türü mantarlar için lakkaz aktivitesi ilk kez bu çalışmada rapor edilmiştir.

3.3. Biyosensör sistemine uygulanması

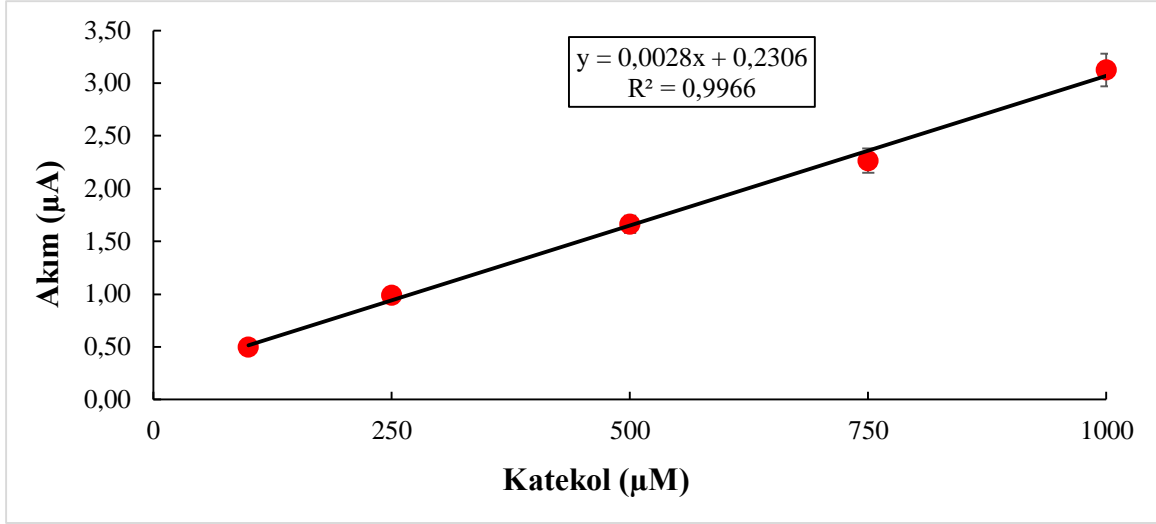
Lakkaz aktiviteleri tayin edilen mantarlara bakıldığında, aktivitesi görece yüksek ve daha önce biyosensör uygulamalarında hiç kullanılmamış bir tür olan *Clytocybe nebularis* biyosensör uygulaması için seçilmiştir.

Hazırlanan *Clytocybe nebularis* doku homojenatı temelli biyosensör ile katekol substratı için gözlenen amperometrik yanıtlar izlenerek, bir standart grafik oluşturulmuştur. Bu bağlamda, öncelikle biyosensörün amperometrik karakterini saptamak için 200. saniyede 100 μM ve 400. saniyede 200 μM katekol eklenerek amperometrik sinyaldeki değişimler izlendi. PSTrace yazılımı ile elde edilen cihaz çıktıları, Şekil 1'de gösterilmiştir. Şekil 1'de de görüldüğü üzere; 200. saniyede katekol eklendiğinde, geliştirilen doku temelli biyosensör hızlıca (~ 20 s) yanıt vermiş ve stabil konuma geçmiştir. Cevap süresinin kısa olması, biyosensör tasarımı ve geliştirilmesinde önemli bir parametredir.



Şekil 1. Geliştirilen *Clytocybe nebularis* doku homojenatı temelli biyosensör ile katekol substratı için elde edilen amperometrik yanıtlar.

Elde edilen amperometrik cevaplar ışığında geliştirilen biyosensör ile 100 μM , 250 μM , 500 μM , 750 μM ve 1000 μM katekol konsantrasyonları için de ayrı ayrı amperometrik ölçümler alınıp kaydedilmiştir. Katekol konsantrasyonları ile amperometrik cevaplar arasında çizilen standart grafik Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. *Clytocibe nebularis* doku homojenatı temelli biyosensör ile elde edilen katekol kalibrasyon grafiği

Şekil 2’den de görüldüğü üzere artan katekol konsantrasyonu ile amperometrik sinyal arasında iyi bir doğrusallık vardır. Bu da *Clytocibe nebularis* türü mantarın, doku temelli biyosensör uygulamalarında kullanılabilir bir mantar türü olduğunu göstermektedir.

4. Sonuç ve Öneriler

Bu çalışmada, birincil olarak, *Stropharia aeruginosa*, *Trametes versicolor*, *Hypholoma fasciculare*, *Cantharellus cibarius*, *Clytocibe nebularis* ve *Amanita muscaria* mantar türlerinin toplam lakkaz aktivitelerini belirleme ve toplam protein miktarlarını saptama amaçlanmıştır. Bu bağlamda lakkaz aktivitesi tayini için ABTS yöntemi, protein tayini için Bradford yöntemi kullanılmıştır. Doğal *Amanita muscaria* ve *Clytocibe nebularis* türleri için ilk kez bu çalışmada lakkaz aktivitesi ve protein tayini yapılmıştır. Bununla birlikte, *Hypholoma fasciculare* türü protein tayini de ilk kez bu çalışmada gerçekleştirilmiştir. Özellikle lakkaz aktivitesi görece daha yüksek olan *Clytocibe nebularis* türü, benzer nitelikteki diğer mantarlar gibi enzim saflaştırma ve eldesi, atık sulardan fenolik bileşik giderimi ve boya ağartma gibi çalışmalarda kullanılma potansiyeline sahiptir. Ayrıca, *Clytocibe nebularis* türü için besi ortamında lakkaz üretimine dair çalışma bulunmadığından dolayı, bu çalışma, gelecekte yapılacak mikrobiyolojik çalışmalar için de bir kaynak niteliği oluşturmaktadır.

Çalışmanın bir diğer amacı da lakkaz aktivitesi en yüksek olan ve daha önce biyosensör tasarımında kullanılmamış bir mantar türünün biyosensör sistemlerinde kullanılabilirliğinin gösterilmesiydi. Bu bağlamda, lakkaz aktivitesi görece yüksek olan ve daha önce biyosensör sistemlerinde kullanılmamış mantar türü olan *Clytocibe nebularis*, fenolik bileşik tayinine yönelik bir biyosensör sistemi yapımında biyoaktif tabaka olarak kullanıldı. Biyosensör denemelerinde elde edilen sonuçlar; *Clytocibe nebularis* dokusunun, biyosensör tasarımında ümit vaat eden bir biyoaktif bileşen olabileceğini gösterdi. Biyosensör denemelerinde elde edilen sonuçlar ışığında yakın gelecekte yapacağımız çalışmada; *Clytocibe nebularis* dokusu kullanarak, çeşitli fenolik bileşikler tayin edebilecek bir biyosensör geliştirilmesi planlanmaktadır. Bu kapsamlı çalışmada, geliştirilen doku temelli biyosensör sisteminin optimizasyon, karakterizasyon ve validasyonu ile ilgili denemeler de gerçekleştirilecektir.

Teşekkür

Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Hülya YAĞAR ve Doç. Dr. Hakkı Mevlüt ÖZCAN’A laboratuvar olanaklarını sağladıkları için teşekkürü bir borç bilirim.

Yazarların Katkısı

Makalede tüm katkı şahsıma aittir.

Çıkar Çatışması Beyanı

Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Araştırma ve Yayın Etiği Beyanı

Yapılan çalışmada araştırma ve yayın etiğine uyulmuştur.

Kaynaklar

- [1] Zotti M., Persiani A.M., Ambrosio E., Vizzini A., Venturella G., Donnini D., Angelini P., Di Piazza S., Pavarino M., Lunghini D., Venanzoni R., Polemis E., Granito V.M., Maggi O., Gargano M.L., Zervakis G.I. 2013. Macrofungi as ecosystem resources: conservation versus exploitation. *Plant Biosystems*, 147 (1): 219-225.
- [2] Newbound M., Mccarthy M.A., Lebel T. 2010. Fungi and the urban environment: a review. *Landscape and Urban Planning*, 96 (3): 138-145.
- [3] Yalçın M., Akçay Ç., Düzkale Sözbir G. 2020. Meşe, kayın odunu ve fındık kabuğu atıklardan *lentinus edodes* (şitaki) mantarı üretimi. *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 8 (3): 2051-2061.
- [4] Chen W.-Y., Chang C.-Y., Li J.-R., Wang J.-D., Wu C.-C., Kuan Y.-H., Liao S.-L., Wang W.-Y., Chen C.-J. 2018. Anti-inflammatory and neuroprotective effects of fungal immunomodulatory protein involving microglial inhibition. *International Journal of Molecular Sciences*, 19 (11): 3678.
- [5] Yurchenko E., Menchinskaya E., Pislyagin E., Trinh P., Ivanets E., Smetanina O., Yurchenko A. 2018. Neuroprotective activity of some marine fungal metabolites in the 6-hydroxydopamin- and paraquat-induced parkinson's disease models. *Marine Drugs*, 16 (11): 457.
- [6] Yadav M., Yadav A., Yadav J.P. 2014. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of endophytic fungi isolated from eugenia jambolana lam. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7 (S1): 256-261.
- [7] Canlı K., Akata İ., Yetgin A., Benek A., Altuner E.M. 2020. In vitro antimicrobial activity screening of *leucoagaricus leucothites* and determination of the ethanol extract composition by gas chromatography/mass spectrometry. *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 8 (2): 1250-1257.
- [8] Vaz J.A., Almeida G.M., Ferreira I.C.F.R., Martins A., Vasconcelos M.H. 2012. *Clitocybe alexandri* extract induces cell cycle arrest and apoptosis in a lung cancer cell line: identification of phenolic acids with cytotoxic potential. *Food Chemistry*, 132 (1): 482-486.
- [9] de Souza P.M., de Assis Bittencourt M.L., Caprara C.C., de Freitas M., de Almeida R.P.C., Silveira D., Fonseca Y.M., Filho E.X.F., Pessoa Junior A., Magalhães P.O. 2015. A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46 (2): 337-346.
- [10] Ahmed A., Bibi A. 2018. Fungal cellulase; production and applications: minireview. *LIFE: International Journal of Health and Life Sciences*, 4 (1): 19-36.
- [11] Ahmed S., Riaz S., Jamil A. 2009. Molecular cloning of fungal xylanases: an overview. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84 (1): 19-35.
- [12] Singh A.K., Mukhopadhyay M. 2012. Overview of fungal lipase: a review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166 (2): 486-520.
- [13] Marusek C.M., Trobaugh N.M., Flurkey W.H., Inlow J.K. 2006. Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100 (1): 108-123.
- [14] Senthivelan T., Kanagaraj J., Panda R.C. 2016. Recent trends in fungal laccase for various industrial applications: an eco-friendly approach - a review. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 21 (1): 19-38.
- [15] Wang F., Terry N., Xu L., Zhao L., Ding Z., Ma H. 2019. Fungal laccase production from lignocellulosic agricultural wastes by solid-state fermentation: a review. *Microorganisms*, 7 (12): 665.
- [16] Agrawal K., Chaturvedi V., Verma P. 2018. Fungal laccase discovered but yet undiscovered.

- Bioresources and Bioprocessing, 5 (1): 4.
- [17] Buée M., Courty P.E., Mignot D., Garbaye J. 2007. Soil niche effect on species diversity and catabolic activities in an ectomycorrhizal fungal community. *Soil Biology and Biochemistry*, 39 (8): 1947-1955.
- [18] Pointing S.B., Pelling A.L., Smith G.J.D., Hyde K.D., Reddy C.A. 2005. Screening of basidiomycetes and xylariaceous fungi for lignin peroxidase and laccase gene-specific sequences. *Mycological Research*, 109 (1): 115-124.
- [19] Luis P., Walther G., Kellner H., Martin F., Buscot F. 2004. Diversity of laccase genes from basidiomycetes in a forest soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 36 (7): 1025-1036.
- [20] D'Souza T.M., Boominathan K., Reddy C.A. 1996. Isolation of laccase gene-specific sequences from white rot and brown rot fungi by pcr. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (10): 3739-3744.
- [21] Daroch M., Houghton C.A., Moore J.K., Wilkinson M.C., Carnell A.J., Bates A.D., Iwanejko L.A. 2014. Glycosylated yellow laccases of the basidiomycete *stropharia aeruginosa*. *Enzyme and Microbial Technology*, 58-59: 1-7.
- [22] Lorenzo M., Moldes D., Rodríguez Couto S., Sanromán M.A. 2005. Inhibition of laccase activity from *trametes versicolor* by heavy metals and organic compounds. *Chemosphere*, 60 (8): 1124-1128.
- [23] Šnajdr J., Steffen K.T., Hofrichter M., Baldrian P. 2010. Transformation of ¹⁴C-labelled lignin and humic substances in forest soil by the saprobic basidiomycetes *gymnopus erythropus* and *hypholoma fasciculare*. *Soil Biology and Biochemistry*, 42 (9): 1541-1548.
- [24] Ng T.B., Wang H.X. 2004. A homodimeric laccase with unique characteristics from the yellow mushroom *cantharellus cibarius*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313 (1): 37-41.
- [25] Tüylek Z. 2017. Biyosensörler ve nanoteknolojik etkileşim. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 6 (2): 71-80.
- [26] Çakar B. 2018. Mikrobiyal ped biyosensörü ile su toksitesi izlenmesi. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 7 (2): 484-491.
- [27] Raymundo-Pereira P.A., Silva T.A., Caetano F.R., Ribovski L., Zapp E., Brondani D., Bergamini M.F., Marcolino L.H., Banks C.E., Oliveira O.N., Janegitz B.C., Fatibello-Filho O. 2020. Polyphenol oxidase-based electrochemical biosensors: a review. *Analytica Chimica Acta*, 1139: 198-221.
- [28] Haghghi B., Gorton L., Ruzgas T., Jönsson L.J. 2003. Characterization of graphite electrodes modified with laccase from *trametes versicolor* and their use for bioelectrochemical monitoring of phenolic compounds in flow injection analysis. *Analytica Chimica Acta*, 487 (1): 3-14.
- [29] Akyilmaz E., Turemis M., Yasa I. 2011. Voltammetric determination of epinephrine by white rot fungi (*phanerochaete chrysosporium me446*) cells based microbial biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 26 (5): 2590-2594.
- [30] Leite O.D., Lupetti K.O., Fatibello-Filho O., Vieira I.C., Barbosa A. de M. 2003. Synergic effect studies of the bi-enzymatic system laccaseperoxidase in a voltammetric biosensor for catecholamines. *Talanta*, 59 (5): 889-896.
- [31] Tuncay D., Yagar H. 2020. Decolorization of reactive blue-19 textile dye by *boletus edulis* laccase immobilized onto rice husks. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 17 (6): 3177-3188.
- [32] Silva L.M.C., Salgado A.M., Coelho M.A.Z. 2010. *Agaricus bisporus* as a source of tyrosinase for phenol detection for future biosensor development. *Environmental Technology*, 31 (6): 611-616.
- [33] Zhang G.Q., Wang Y.F., Zhang X.Q., Ng T.B., Wang H.X. 2010. Purification and characterization of a novel laccase from the edible mushroom *clitocybe maxima*. *Process Biochemistry*, 45 (5): 627-633.
- [34] Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1-2): 248-254.
- [35] Shin K.S., Lee Y.J. 2000. Purification and characterization of a new member of the laccase family from the white-rot basidiomycete *coriolus hirsutus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*,

- 384 (1): 109-115.
- [36] Wang H.X., Ng T.B. 2006. Purification of a laccase from fruiting bodies of the mushroom *pleurotus eryngii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69 (5): 521-525.
- [37] Baltierra-Trejo E., Márquez-Benavides L., Sánchez-Yáñez J.M. 2015. Inconsistencies and ambiguities in calculating enzyme activity: the case of laccase. *Journal of Microbiological Methods*, 119: 126-131.
- [38] Moressi M.B., Zon A., Fernández H., Rivas G., Solis V. 1999. Amperometric quantification of alternaria mycotoxins with a mushroom tyrosinase modified carbon paste electrode. *Electrochemistry Communications*, 1 (10): 472-476.
- [39] Kozan J.V.B., Silva R.P., Serrano S.H.P., Lima A.W.O., Angnes L. 2007. Biosensing hydrogen peroxide utilizing carbon paste electrodes containing peroxidases naturally immobilized on coconut (*cocos nucifera* l.) fibers. *Analytica Chimica Acta*, 591 (2): 200-207.
- [40] Anik Ü., Çevik S. 2009. Double-walled carbon nanotube based carbon paste electrode as xanthine biosensor. *Microchimica Acta*, 166 (3-4): 209-213.
- [41] Ozcan H.M., Sagioglu A. 2014. Fresh broad (*vicia faba*) tissue homogenate-based biosensor for determination of phenolic compounds. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 42 (4): 256-261.
- [42] Odaci D., Timur S., Telefoncu A. 2008. Bacterial sensors based on chitosan matrices. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 134 (1): 89-94.
- [43] Lemieszek M.K., Nunes F.M., Marques G., Rzeski W. 2019. *Cantharellus cibarius* branched mannans inhibits colon cancer cells growth by interfering with signals transduction in nf-kb pathway. *International Journal of Biological Macromolecules*, 134: 770-780.
- [44] Wang F., Hu J.H., Guo C., Liu C.Z. 2014. Enhanced laccase production by *trametes versicolor* using corn steep liquor as both nitrogen source and inducer. *Bioresource Technology*, 166: 602-605.
- [45] Lebrun J.D., Demont-Caulet N., Cheviron N., Laval K., Trinsoutrot-Gattin I., Mougin C. 2011. Secretion profiles of fungi as potential tools for metal ecotoxicity assessment: a study of enzymatic system in *trametes versicolor*. *Chemosphere*, 82 (3): 340-345.
- [46] Pandey N., Budhathoki U. 2007. Protein determination through bradford's method of nepalese mushroom. *Scientific World*, 5 (5): 85-88.
- [47] Tong P., Hong Y., Xiao Y., Zhang M., Tu X., Cui T. 2007. High production of laccase by a new basidiomycete, *trametes* sp. *Biotechnology Letters*, 29 (2): 295-301.
- [48] Xiao Y.Z., Chen Q., Hang J., Shi Y.Y., Wu J., Hong Y.Z., Wang Y.P. 2004. Selective induction, purification and characterization of a laccase isozyme from the basidiomycete *trametes* sp. ah28-2. *Mycologia*, 96 (1): 26-35.
- [49] Moon-Jeong Han, Hyoung-Tae Choi, Hong-Gyu Song 2005. Purification and characterization of laccase from the white rot fungus *trametes versicolor*. *Journal of Microbiology*, 43 (6): 555-560.