

# Lakkaz enziminin endüstriyel ve biyoteknoloji alanında kullanımı

## Industrial and biotechnological applications of laccase enzyme

Begüm DEMİRALP<sup>1</sup>, İlker BÜYÜK<sup>2</sup>, Sümer ARAS<sup>2</sup>, Demet CANSARAN-DUMAN<sup>1</sup>

### ÖZET

Çevre kirliliği kentsel yaşamın başlamasıyla birlikte ortaya çıkmış ve endüstriyel gelişmeler sonucu artış göstermiştir. Hızla artan endüstriyel faaliyetler ve bunun sonucu olarak fabrikaların çevreye bırakmış olduğu atıklar ile toksik kimyasal salınımı insan sağlığını olumsuz etkilenmektedir. Lakkaz enzimi oldukça geniş bir çeşitlilikteki substratları oksitleyebilme özelliğinden dolayı son zamanlarda bu enzimlerin farklı endüstriyel alanlarda kullanılmalarına yol açmıştır. Lakkaz enzimi, gıdaların veya meşrubatların görünüm renklerinin artırılması, kağıt ve kağıt hamurundaki ligninin ayrıştırılması ve kağıt hamurundan uzaklaştırılması, tekstil endüstrisinde boyar madde olarak kullanımı, tekstil ürünlerinin ağartılması, kot yıkama, çeşitli kaynatma işlemleri, tekstil atık sularının biyolojik parçalanması ve renksizleştirilmesinde kullanımı, biyoremediasyon ve kozmetik gibi farklı endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamalarda biyokatalizör olarak kullanılmaktadır. Lakkaz enzimleri başta fungus türleri olmak üzere çeşitli organizmalardan elde edilmektedir. Günümüz koşullarında lakkaz enzimi endüstriyel alanlarda kullanım için ucuz ve kolay elde edilememektedir. Özellikle endüstriyel alanlarda kirlenmiş bölgelerin biyogiderimi için fazla miktarlarda lakkaz enzimi üretimi gerekmektedir. Lakkaz üreten en etkili kaynağı bulmak için en uygun fungal türünü seçmek, yeniden üretilebilir ve pahalı olmayan izolasyon yöntemlerini bulmak ya da enzim üretim koşullarını optimize etmek gerekmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Lakkaz, Lakkaz gen, Biyoteknolojik uygulamalar

### ABSTRACT

Environmental pollution had emerged by the beginning of urban life and increased parallel to the industrial development. Rapidly increasing industrial activities, dumping of the wastes to the environment by the factories and releasing of the toxic chemicals have adverse impact on human health. Due to their ability to oxidise a wide range of substrates, which makes laccases very useful biocatalysts for their application to different industrial and biotechnological areas in recent years. Laccase enzyme is used in enhancing appearance color of the foods and drinks, in separating lignin from paper and paper pulp and removing lignin from paper pulp, in textile industry as a colourant, bleaching of textile products, denim washing, various boiling processes, biological degradation and discoloration of textile waste waters, in different industries such as bioremediation and cosmetic industries and in biotechnology applications as biocatalyst. Laccase enzymes are obtained mainly from fungi and various types of organisms. In today's conditions laccase enzyme are not obtained cheaply and easily for use in the industrial field. Surplus amount of laccase enzyme production is required for the bioremoval of the contaminated zones especially in industrial areas. To find the most effective laccase-producing source, it is required to choose the most appropriate fungal type, to find out the regenerative and inexpensive isolation methods or to optimize the enzyme production conditions.

**Key Words:** Laccase, Laccase gene, biotechnological applications

<sup>1</sup> Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı, ANKARA

<sup>2</sup> Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, ANKARA



**İletişim / Corresponding Author:** Demet CANSARAN-DUMAN

Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı, ANKARA

Tel : +90 533 344 47 44

E-posta / E-mail : dcansaran@yahoo.com

Geliş Tarihi / Received : 10.11.2014

Kabul Tarihi / Accepted : 06.01.2015

DOI ID : 10.5505/TurkJHijyen.2015.09581

Demiralp B, Büyük İ, Aras S, Cansaran-Duman D. Lakkaz enziminin endüstriyel ve biyoteknoloji alanında kullanımı. Türk Hij Den Biyol Derg, 2015; 72(4): 351-68.

## GİRİŞ

Enzimler, hücrelerde biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen protein yapısında moleküllerdir. Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere günlük ve ekonomik hayata girmiştir (1). Enzimlerle katalize edilen ve tepkimeye katılan kimyasal moleküllere substrat adı verilir. Bir enzim sadece kendi aktif bölgesinin üç boyutlu yapısına uygun substrat ile tepkimeye girebilir. Bu yüzden her enzim sadece belirli tip substrata etki eder (2). Hücrelerde oldukça önemli metabolik görevleri olan enzimler biyokimyasal reaksiyonları katalize eden protein yapısında moleküllerdir. Mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilmeleri endüstrinin hemen her alanında kullanılmasını sağlamaktadır (1). Bu mikroorganizmalar yalnızca enzim üretme yeteneklerine göre değil, toksik ve patojen olmamalarına göre de seçilmişlerdir. Bugün endüstride mikrobiyal kökenli enzimlerin kullanımı artmıştır (3).

Enzim biyoteknolojisi;

- Mikrobiyal işlem (üretici suşların seçimi, geliştirilmesi vb.),
- Enzimlerin fermentasyon yoluyla üretimi (büyük ölçekte üretimi için yapılan besiyeri, ortam koşulları vb. düzeylerdeki optimizasyonlar),
- Katalitik etkinliğin artırılması için enzimlerin üç boyutlu yapılarının değiştirilmesi (protein mühendisliği),
- İzolasyon,
- İmmobilizasyon (enzimlerin çözünmeyen destek materyaller yardımıyla suda çözünmeyen hale getirilmesi) çalışmalarını kapsar.

Enzim biyoteknolojisi; çevre kirliliği gideriminde, Avrupa Birliği'nin yeni entegre kirlilik

önleme ve kontrol direktifi kapsamında tekstil biyoteknolojisinde, biyo-ağartma, biyo-yıkama veya taşlanmış yıkama ve sentetik elyaf üretimi sırasında kullanılır. Enzim biyoteknolojisinden en iyi şekilde yararlanmak için multi enzim kompleksi veya enzim (protein) immobilizasyonu yapılması, enzimatik biyokatalistler, diğer proseslerin kullanılması son yıllarda daha yaygın yer edinmektedir. Fakat enzim miktarının veya aktivitesinin yüksek olması yeterli değildir. Endüstriyel alanda kullanılan enzimlerde bir takım özellikler aranmaktadır. Enzim; uzun ömürlü ve dayanıklı olmalı, aktivite göstereceği ortam hücre içi şartlarından farklı şartlar olsa da verilen substratı kullanabilmeli, endüstriyel ortamda (ekstrem koşullarda) da bozunmadan iş görebilmelidir. Bu taleplere bakılarak enzimlerin ihtiyacı karşılayacak şekilde düzenlenmesini gerektirir (4).

Bu özellikler:

- Kinetik sabitler
- Optimum pH ve sıcaklık
- Enzimin susuz çözücülere karşı stabilitesi
- Substrat ve reaksiyon spesifikliği
- Kofaktör gereksinimi
- Moleküler ağırlığı ve alt birim yapısı

Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle biyoteknolojinin endüstriyel enzimler ile ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar daha da önem kazanmaktadır (5).

### Lakkaz enzimi

Çoklu bakır içeren lakkaz (benzenediol: oksijen oksidoredüktaz; EC 1.10.3.2) enzimleri, hem fenolik hem de fenolik-olmayan ligninle ilişkili bileşikleri okside edebildiği gibi biyolojik yıkıma dirençli olan çevre kirliticilerini de oksitleyebilmektedirler. Buna ek olarak, elektron alıcısı olarak moleküler oksijeni kullanmaları ve toksisitesi olan hidrojen peroksit ihtiyacı duymamalarından dolayı, lakkaz enzimleri

son zamanlarda oldukça ilgi çeken bir araştırma alanı oluşturmaktadır (6).

Lakkaz enzimi multimerik kompleksler oluşturacak şekilde oligomerize olan izoenzimlerden meydana gelmektedirler. Monomerlerin moleküler kütleleri ise 50-110 kDa arasında değişmektedir. Lakkaz enzimlerinin önemli bir özelliği ise protein kısma kovalent olarak bağlanmış olan ve proteinin toplam kütesinin %10-45'ini oluşturan bir karbonhidrat kısmının da bulunmasıdır. Karbonhidrat kısım enzimin yüksek kararlılık göstermesine katkıda bulunmaktadır (7).

Lakkaz enzimlerinin katalitik aktivitelerini gösterilebilmeleri için aktif olan her bir lakkaz proteini için en az dört bakır atomu gerekmektedir. Bakır bağlama bölgeleri oldukça korunmuş özellikte olan lakkaz proteinlerinin her birinde bulunan bu bakır iyonlarının ışık absorbanları ve elektron paramanyetik davranışları farklıdır. Bu nedenle, lakkaz enzimlerinde bulunan bakır iyonları spektroskopik özelliklerine bağlı olarak üç ana sınıfta gruplandırılırlar (8). Lakkaz proteinlerinde bulunan bakır iyonlarından birisi Tip1 veya "mavi bölge" olarak adlandırılan bölgeye bağlı iken, Tip2 ve Tip3 olarak adlandırılan bölgelerin oluşturduğu trinükleer kümeye bağlı olarak ise üçbakır iyonu daha bulunmaktadır (8).

Tip1: paramanyetik "mavi" bakır (Cu1), absorban 610 nm (okside formda iken), redoks potansiyeli +785 mV. Tip1 bakır, çoklu-bakır içeren protein moleküllerinin tipik mavi renginden sorumludur. Bu mavi renkbakır-sistein kovalent bağının neden olduğu yoğun elektronik absorpsiyonun bir sonucudur (4). Yüksek redoks potansiyeli (+785 mV) nedeniyle Tip1 bakır, substrat oksidasyonunun gerçekleştirildiği bölgedir. Tip2 bakır ise görünür spektrumda absorpsiyon göstermez.

Tip2: paramanyetik "mavi-olmayan" bakır (Cu4). Çoklu-bakır içeren oksidazlarda ise Tip2 bakır, binükleer olan Tip3 bakıra yakın olarak konumlanmaktadır (8).

Tip3 bakır merkezi ise 330 nm'de (okside formda iken) bir elektron adsorpsiyonu gösterir.

Tip2 ve Tip3 bakır merkezleri ise bir bütün olarak değerlendirilebilir ve bu nedenle de genellikle "trinükleer küme" olarak adlandırılırlar. Trinükleer küme ise moleküler oksijenin indirgendiği ve suyun serbest bırakıldığı yerdir (5). Lakkaz enzimleri düşük substrat özgüllükler ile karakterize olmalarından dolayı biyolojik yıkıma dirençli olan çevre kirleticilerini de oksitleyebilirler (9). Lakkaz enzimlerinin sahip olduğu bu oksidasyon yeteneği bazı endüstriyel ve biyoteknolojik süreçlerde bu enzimlere olan talebi de fazlasıyla artırmaktadır.

#### Lakkaz Enziminin Endüstriyel ve Biyoteknoloji Alanlarında Kullanımı

Çevre kirliliği; kentsel yaşamın başlamasıyla birlikte ortaya çıkmış ve endüstriyel gelişmeler sonucu artış göstermiştir. Son yıllarda hızla artan endüstriyel faaliyetler, motorlu taşıtların karbon monoksit salınımı, maden yatakları ve işletmeleri, volkanik olaylar, tarımda kullanılan suni gübre ve ilaçlar ile kentsel atıklar nedeniyle, ağır metallerin aşırı birikimi günümüzün en önemli sorunlarından biri haline gelmiştir. Bu oluşumlar sonucu insan sağlığı olumsuz etkilenmektedir. Atık sularda çeşitli türlerde ve istenmeyen miktarda bulunan boyar maddeler ise renk kirliliğine neden olan, sudaki yaşamı olumsuz yönde etkileyen kimyasallardır (9). Lakkaz enzimleri, çeşitli substitüye fenolik bileşikler, aromatik aminleri ve hatta bazı inorganik bileşikler dahi elektron akseptörü olarak moleküler oksijeni kullanarak oksitleyebilmektedirler. Lakkaz enzimlerinin oldukça geniş bir çeşitlilikteki substratlar üzerinde aktivite gösterebilme yeteneği, son zamanlarda bu enzimlerin tekstil boyalarının renk giderimleri, kâğıt hamurunun biyolojik olarak ağartılması ve biyoremediasyon gibi farklı biyoteknolojik uygulamalarda biyokatalizör olarak kullanılmalarına yol açmıştır. Lakkaz enzimleri organizmaların patojenitesinde, immünitesinde, morfogenezinde ve pigmentasyonunda rol aldıkları gibi

lignin ve humik asit gibi kompleks organik maddelerin metabolize edilmesinde de rol almaktadırlar (10).

Son zamanlara kadar lakkaz enzimlerinin izole edildiği ve tanımlandığı organizmaların büyük bir çoğunluğunu funguslar ve bitkiler oluşturmuştur. Bunun sonucu olarak da biyoteknolojik uygulamalarda neredeyse sadece fungal lakkazlar kullanılmıştır. Her ne kadar, son zamanlarda hızlı bir şekilde ilerleme gösteren bütün-genom analizleri, lakkaz enzimlerinin bakterilerde de yaygın olarak bulunduğuna işaret etse de bakteriyel lakkazlar hakkında bilinenler henüz çok daha azdır (10). Lakkaz enziminin endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamalarının çoğunluğunu oluşturan alanlar aşağıdaki gibidir.

#### Gıda Endüstrisi

Gıdaların veya meşrubatların görünüm renklerinin artırılması veya modifiye edilmesi amacıyla lakkaz enzimleri kullanılmaktadır. Meyve sularında, biralarda ve şaraplarda kararmaya, puslanmaya ve bulanıklığa yol açan istenmeyen fenolik bileşiklerin giderilmesi amacıyla lakkazlar kullanılmaktadır (11-13). Lakkaz enzimleri, biyopolimerlerin çapraz bağlanmasını sağlaması nedeniyle, hamurun karışma özelliklerini ve hamur ürününün yapısal özelliklerini iyileştirmek amacıyla fırıncılıkta da kullanılmaktadırlar (14, 15).

Selinheimo ve ark. yapmış oldukları bir çalışmada, beyaz çürükçül bir fungus olan *Trametes hirsuta* tarafından üretilen lakkaz enziminin hem unda hem de gluten hamurda hamur uzamasını düşürürken, hamurun maksimum direncini artırdığını göstermişlerdir (16). Flander ve ark. ise yapmış oldukları bir çalışmada yine *T. hirsuta* kaynaklı lakkaz enzimi ile Pentopan Mono BG ksilanaz enzimlerinin tek tek veya bir kokteyl halinde yulaf, buğday ve yulaf-buğday karışımından oluşan hamurlarda kullanışlar ve lakkaz ilave edilen hamurlardan elde edilen taze ekmeklerin sıklığını arttığını, sonuç olarak lakkaz ve ksilanaz enzimlerinden oluşan bir kokteylin ise hem yulaf hem de buğday unundan yapılan ekmeklerin

tekstürleri açısından yararlı olduğunu rapor etmişlerdir (17).

Minussi ve ark. ise biyo-iyileştirme, meşrubat işleme, askorbik asitin tanımlanması, şeker pancarı pektin jelatinasyonu, fırıncılık ve biyosensör olarak kullanılması gibi gıda endüstrisinin farklı alanlarında lakkaz enzimlerinin potansiyel uygulamalarını tanımlamışlardır (13). Buna rağmen, bu araştırmacılar lakkaz enzimlerinin endüstriyel kullanımının daha da geliştirilmesi için bu enzimlerin düşük maliyetlerle üretilmesini ve tutuklanmasını sağlayan tekniklerin daha fazla araştırılması gerektiğini ifade etmişlerdir (13).

#### Kâğıt ve Kâğıt Hamuru Endüstrisi

Kâğıdın endüstriyel üretimi, kâğıt hamurundaki ligninin ayrıştırılmasını ve kâğıt hamurundan uzaklaştırılmasını (delignifikasyon) gerektirmektedir. Kâğıdın geleneksel tekniklerle üretildiği ve kirliliğe yol açan klorin temelli beyazlatma işlemleri ise çeşitli çevresel sorunlara yol açmakta ve bu da yeni çözüm arayışına yol açmaktadır (18).

Delignifikasyonun oksijen ile sağlandığı süreçler ise endüstriyel olarak kullanılmaktadır (19). Fakat odunsu kâğıt hamurlarının ligninolitik enzimlerle ön muamelesi ile yapılan delignifikasyon işlemi, hem daha ılımlı işlem koşulları gerektirmesi hem de daha çevre dostu olmasının yanında kâğıdın ana yapısı olan selülozun bütünlüğünü de korumaktadır (18).

Alternatif biyo-beyazlatma sistemlerinin geliştirilmesi amacıyla gerçekleştirilen araştırmaların çoğunluğu ise lignin-degradasyonunu gerçekleştiren funguslardan elde edilen lignin peroksidaz (LiP), mangan bağımlı peroksidaz (MnP), çok-yönlü peroksidaz (VP; LiP, MnP ve fenolik bileşikler oksitleyen bitkisel/mikrobiyal peroksidazların katalitik özelliklerine sahiptir) ve lakkazlar üzerinde yoğunlaşmıştır. Yapılan yoğun araştırmalara rağmen, modern kimyasal beyazlatma tekniklerinin sunduğu delignifikasyon/beyazlatma yeteneğini sunabilen yalnızca birkaç enzimatik muamele belirlenebilmiştir.

Bu genellemenin birkaç istisnasından birisini ise kraft hamuru için geliştirilmiş olan ve patenti alınmış olan Lakkaz modifiye edilmiş sistemi (LMS) delignifikasyon teknolojisi oluşturmaktadır (20).

LMS delignifikasyon teknolojisi oldukça seçici olup, kâğıt hamurundan çok az karbonhidrat kaybına veya hasara yol açmaktadır (21). Lakkazların da dahil olduğu fenoloksidazlar düşük redoks potansiyellerine sahip olduklarından, lignin polimeri içerisindeki sadece fenolik birimlerin oksidasyonlarını doğrudan gerçekleştirebilmektedirler. Fenolik birimlerin oranı ise lignin polimerinin tamamının ancak %10 kadarını oluşturmaktadır. Bu nedenle, fungal kaynaklı lakkaz enzimlerinin biyoteknolojik uygulamalarda, lakkazın oksidasyon potansiyelini artırmak amacıyla fizyolojik-olmayan redoks araçları kullanılmaktadır. Ayrıca, sterik engelleme nedeniyle lakkaz, doğrudan doğruya lignin polimeri ile temas edemeyebilir. Bunun yerine, kâğıt hamurunun beyazlatılmasında lakkaz enzimleri ile birlikte kullanılan 2,2'-azino-bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sülfonik asit (ABTS) gibi redoks-aracıları ise lakkaz tarafından oksitlenerek reaktif radikallere dönüştürülürler (22, 23).

Kâğıt ve kâğıt hamurunun beyazlatılmasında biyolojik sistemlerin kullanılması kâğıt fabrikalarında, kâğıt hamurunun beyazlatılması amacıyla klorin kullanımını ortadan kaldırmaktadır. Bunun sonucu olarak da bu fabrikaların atıkları aracılığı ile çevreye verilen ve toksik olan klorinli bileşikler elimine edilmektedirler. Buna ilaveten, lakkaz enzimleri çok daha kolay temin edilebildiği gibi hem LiP hem de MnP enzimlerine göre daha kolay kullanılabilir. Ayrıca lakkaz enzimleri, oksidatif olarak aktivite gösterdiklerinden ve aromatik bileşiklerin oksidasyonlarını çok daha az özgüllükte sağladıklarından dolayı da çok fazla çeşitlilikteki bileşiklerin parçalanmasında kullanılacak bir potansiyele sahiptirler (22).

Camarero ve ark. yapmış oldukları çalışmada yüksek-kaliteli keten hamurundan, renk oluşumundan sorumlu olan lignin türevlerinin uzaklaştırılması

için LMS'nin potansiyelini araştırmışlardır (24). Bu araştırmacılar, yüksek fiyatlı bu keten hamurlarının üretiminde kullanılan klorin-içerikli beyazlatma yerine LMS'nin kullanılabilir olduğunu göstermişlerdir (24).

Lignin bileşiklerinde reaktif radikaller oluşturma yeteneğine sahip olan lakkazlar, aynı zamanda odun liflerinin maksatlı olarak modifikasyonunda da kullanılabilirler (25, 26). Örneğin, sunta gibi lignoselüloz temelli kompozit materyallerin üretilmesinde odun liflerinin birbirine enzimatik olarak yapışmasını sağlamak amacıyla lakkazlar kullanılabilir. Lakkazlar, sunta gibi odunlu kompozit materyallerin üretimi esnasında odun liflerine bağlı olan ligninin aktive edilmesini sağlayarak liflerin birbirine yapışmasını sağlayacak ve böylece elde edilen suntalar, iyi bir mekanik özellik taşıyan aynı zamandada toksik olan sentetik yapıştırıcıları içermeyeceklerdir (27, 28). Diğer bir olasılık ise lif ürünlerinin kimyasal veya fiziksel özelliklerini iyileştirmek amacıyla, lignoselüloz liflerinin lakkaz enzimleri ile fonksiyonlaştırılmasıdır (25, 29).

### Tekstil Endüstrisi

Tekstil endüstrisi boyar madde üretiminin üçte ikisini kullanmaktadır (30). Tekstil ürünlerinin işlenmesini sağlayan yaş işlemler esnasında büyük hacimlerde su ve kimyasal madde tüketilmektedir. Tekstil sanayiinde kullanılan kimyasal ajanlar ise kimyasal çeşitlilik açısından oldukça fazla olup inorganik bileşiklerden polimerlere ve organik ürünlere kadar değişmektedir (31-33).

Tekstil sanayiinde kullanılan ticari boyaların çeşitliliği ise 100.000'den fazla olup bu boyaların yıllık üretimi  $7 \times 10^5$  tonun üzerindedir (34). Kimyasal yapıları nedeni ile tekstil boyaları ışığa, suya ve farklı kimyasal oksitleyici ajanlara maruz kaldıklarında ise renk solmalarına karşı oldukça dirençlidirler (35, 36). Ayrıca sentetik orijinleri nedeniyle bu boyaların çoğunun renk giderimlerini (dekolorizasyon) sağlamak da oldukça zordur. Üstelik farklı kategorilere sahip

olan tekstil boyalarının tamamını fiziksel veya kimyasal yöntemler kullanarak parçalamak veya renk-giderimlerini sağlamak da mümkün değildir. Bazen bu boyaların parçalanma ürünleri çok daha toksik olabildiğinden, tekstil boyası içeren atıkların muamelesinde fiziko-kimyasal yöntemler yerine enzimatik yöntemler tercih edilmektedirler (37).

Özellikle gelişmiş ülkeler başta olmak üzere, son zamanlarda endüstriyel atıklardaki boyaların giderilmesi konusundaki yasal zorunluluklar her geçen gün daha zorlayıcı olmaktadır. Bazı boyaların ise benzidin ve diğer aromatik bileşikler gibi bilinen kanserojenlerden elde edilmesi nedeniyle, bu konudaki kaygılar giderek artmaktadır (38).

Boya içeren atık suların arıtılmasında kullanılan geçerli metotların çoğu ise etkili olmadığı gibi ekonomik de değildirler (39, 40). Tekstil boyalarının enzimatik olarak parçalanmasını veya renk giderimini sağlayan yaklaşımlar ise genellikle LiP, MnP ve lakkaz gibi ligninolitik enzimlere dayanmaktadır. Lakkaz enzimlerinin LiP ve MnP enzimlerine göre daha kullanılabilir olmaları ve aromatik bileşiklerin oksidasyonlarını çok daha az özgülükte sağlamaları nedeniyle, lakkazlar çok fazla çeşitlilikteki bileşiklerin parçalanmasında kullanılabilen bir potansiyele sahiptirler (40).

Tekstil boyalarını içeren atık suların muamelesine ek olarak, lakkaz enzimlerine dayalı arıtma sistemleri zeytinyağı fabrika atıklarındaki renkli fenolik bileşiklerin oksidasyonlarını sağlayarak bu atıkların muamelesinde de kullanılmaktadırlar (41, 42). Ayrıca dokümalarn ağartılmasında ve hatta boyaların sentezinde de lakkazın kullanılması nedeniyle, lakkaz enzimlerinin tekstil endüstrisinde kullanımı her geçen gün hızla artmaktadır (43). Aynı zamanda lakkaz enzimleri, redoks-aracıları ile birlikte kullanıldığında ise indigoboyasının beyazlatılmasını sağlayarak, kullanılmış görüntüsü veren kotların üretiminde kullanılmaktadır (24, 44).

### Lakkaz Enzimlerinin Tekstil Ürünlerinin Ağartılmasında Kullanımı

Lakkazlar, selülozik liflerde bulunan yağlar, mumlar, pektinler, proteinler ve pigmentler gibi doğal renklendirici maddelerin uzaklaştırılması ve bu sayede boyama, baskı ve bitim gibi işlemlere hazırlanması amacıyla kullanılmaktadır. Tekstillerin ağartılması işlemi klasik olarak asidik ve bazik koşullarda, geniş sıcaklık aralığında ve farklı yükseltgen maddelerle yapılmaktadır. Yüksek beyazlık dereceleri istendiğinde ard arda oksidasyon işlemleri uygulanmaktadır. Ağartma maddeleri, liflere aşırı miktarlarda verilmekte, bu da ileriki işlemlerin düzgün yapılabilmesini olumsuz yönde etkileyen zararlı atıklara neden olmaktadır. Bu nedenle tekrarlı yıkamalar gerekmektedir (44). Tzanov ve ark. yaptıkları çalışmada kısa süreli lakkaz ön işleminin pamuklu kumaşların beyazlığını geliştirdiğini ve sonraki ağartma işleminde kullanılan hidrojen peroksitin konsantrasyonunu önemli derecede azalttığını belirtmişlerdir (45).

### Lakkaz Enzimlerinin Kot Yıkamada Kullanımı

Lakkazlar, kot yıkamada taşlama işleminde pomza taşlarının yerine kullanılabilir. Kot yıkamada taşlama işleminin esası, pomza taşı ile istenilen aşındırmanın sağlanması için ürünlerin yıkanmasıdır. Yıkamanın ardından ürünler, sodyum hipoklorit ile kısmen ağartılmakta, nötralize edilmekte ve tekrar yıkanmaktadır. Bu işlemlerin tümü büyük çevresel kirliliğe yol açtığından enzim uygulamaları da yapılmaktadır. Lakkazlar indigo boyalı kot giysileri daha açık tonlara ağartabilme etkisine sahiptir (44).

Lakkazlar, kot üzerindeki indigoyu renksizleştirme açısından tek başlarına yeterli olmadıkları için indigodan moleküler oksijene elektron transferi sağlayan medyatörlü sistemler de geliştirilmiştir. Lakkaz ve medyatör sistemi, atkı ipliklerini etkilemeden yalnızca indigoyu parçaladığı için işlem sonucu grunuanslı kot elde edilmektedir. Kotun klasik hipoklorit ağartması ucuz, hızlı ve etkilidir. Ancak çevreye ve kota zarar vermektedir (46, 47).

### Lakkaz Enzimlerinin Kaynatma İşleminde Kullanımı

Kaynatma işlemleri, çeşitli kimyasal maddelerle yapılmakta ve çevresel açıdan kirlilik oluşturmaktadır. Bu nedenle daha ekolojik bir proses olan enzimatik kaynatma tercih edilmektedir. Enzimatik kaynatma işlemlerinde daha çok pektinaz kullanılmakta olup ksilanaz, proteaz, lakkaz, lipaz ve selülaz gibi enzimlerle de denemeler yapılmıştır (48).

### Lakkaz Enzimlerinin Tekstil Atık Sularının Biyolojik Parçalanması ve Renksizleştirilmesinde Kullanımı

Azo, trifenil metan ve ftalosianin gibi farklı kromofor grupların varlığı, boyarmaddelerin yapısal çeşitliliğini sağlamaktadır. Görsel etki ve kimyasal oksijen ihtiyacı (COD) açısından yan etkilerinin yanı sıra çoğu sentetik boyarmaddeler, toksik, kanserojen ve genotoksik etkiler de göstermektedir. Mevcut atık su sistemleri ise bu tip atıklardan inatçı boyarmaddeleri ve diğer organik kalıntıları tamamen uzaklaştırmakta yetersiz kalmaktadırlar. Boyama atık sularının arıtılması, adsorpsiyon, koagülasyon, oksidasyon, filtrasyon ve iyonlaştırıcı radyasyon gibi kimyasal ve fiziksel yöntemler gerektirmektedir. Bu yöntemlerin tümü farklı renksizleştirme yeteneğine, sermaye maliyetine ve operasyon hızına sahiptir. Bu yöntemler arasından koagülasyon ve adsorpsiyon yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bunlar büyük miktarlarda atığa yol açmaktadır (49). Bu nedenle lakkaz enzim uygulamaları ile düşük maliyet ve az çamur oluşturmaları nedeniyle giderek önem kazanmaktadır.

### Nanobiyoteknoloji

Son yirmi beş yıldır biyoelektrokimya alanında yapılan çalışmalar oldukça yoğunluk kazanmıştır. Biyoelektrokimya alanında kaydedilen ilerlemeler ise analitik kimya uygulamalarına entegre edilmiştir. Örneğin, klinik ve çevresel analizlerde kullanılan dedektörler olarak biyosensörlerin kullanılmasına çalışılmaktadır (50). Nanoteknoloji;

biyomoleküllerin farklı tiplerdeki yüzeylere özgül olarak adsorplanmasını ve kontrollü bir şekilde depolanmasını sağlayarak, mikro venanometre düzeyinde daha küçük ve daha etkili biyosensörlerin geliştirilmesine katkıda bulunmaktadır. Lakkaz enzimlerine ilişkin olarak biyosensör duyarlılığı üzerine ise enzim yapıştırılmasının önemli bir etkisi bulunmaktadır (51).

Martele ve ark. yapmış oldukları çalışmada katı bir yüzey üzerine lakkaz enziminin tutuklanarak çok fonksiyonlu bir biyosensör geliştirilebilmesi için mikro-desenlemenin etkili bir metot olduğunu göstermişlerdir (52). Roy ve ark. ise *Trametes versicolor* kaynaklı lakkazın, çapraz-bağlı enzim kristalleri (CLEC) halinde iken çözünmüş durumdaki enzimlere göre çok daha avantajlı bir şekilde biyosensör uygulamalarında kullanılabileceğini belirtmişlerdir (53). Cabrita ve ark. da *Coriolus versicolor*'dan elde ettikleri lakkazı, altın üzerine kendiliğinden birleşen ve N-hidroksisüksinimidile sonlanan tekli tabakaya yapıştırmışlardır. Bu işlem biyosensörlerin daha da geliştirilmesi için kullanışlı olabilir. *Biosmium redoks polimeri* ve *T. versicolor* kaynaklı lakkaz enziminin camı karbon elektrodu üzerine birlikte yapıştırılmasına dayalı bir enzim elektrodu, kateşolamin nörotransmitterleri dopamin, epinefrin ve norepinefrinin nanomolar düzeyinde belirleme limitine sahip olan ultra duyarlı amperometrik belirlenmesinde kullanılmıştır (54).

Lakkaz enzimleri; biyo-yakıt hücrelerinin katotlarına yapıştırılarak, örneğin küçük transmitter sistemleri için gerekli olan güç gibi, güç üretmek amacıyla kullanılabilirler. Biyo-yakıt hücreleri ise yakıt kullanmadan elektrik enerjisi ürettikleri için ve temiz bir enerji kaynağı sağladığı için çevresel açıdan oldukça cazip hale gelmiştir (54).

### Biyolojik İyileştirme (Biyoremediasyon)

Diğer ksenobiyotiklerle birlikte Polisiklik Aromatik Hidrokarbon (PAH)'lar toprak kontaminasyonunun temel kaynağını oluştururlar. Bu nedenle, bu

tür bileşiklerin parçalanması çevre açısından oldukça önemlidir. Lakkaz enzimlerinin katalitik özellikleri ise PAH'lar ve klorofenoller gibi bileşiklerin parçalanmasında kullanılabilir (55, 56). Fosil yakıtların kullanılmasından ve petrolden kaynaklanan PAH'ların da lakkaz enzimleri tarafından parçalandığı belirlenmiştir (57). Nyanhongo ve ark. yapmış oldukları çalışmada *Trametes modesta* kaynaklı lakkaz enziminin 2,4,6-trinitrotoluen (TNT) degradasyon ürünlerinin immobilizasyonunda rol aldığını göstermişlerdir (51). Lakkaz enzimleri indirgenmiş TNT metabolitlerini organik toprak matrisine bağlayabilmekte, böylece de savaş amaçlı kullanılan patlayıcı kalıntılarının detoksifikasyonu sağlanmaktadır (58). Bu tip uygulamalar için en kullanışlı metot ise saflaştırılmış olan lakkaz enzimleri ile büyük ölçekli toprak remidasyonunun ekonomik olmayacağı nedeniyle kuşkusuz, ksenobiyotik bileşiklerle kontamine olmuş toprakların lakkaz enzimlerini üreten mikroorganizmalar ile kontamine edilmesi olacaktır (58).

### Sentetik Kimyasallar

Oksidatif bozulma ile kompleks polimerlerin ve klinik ajanlarının üretiminde kullanılması amaçlanan lakkaz enzimleri, sentetik kimyanın da oldukça ilgisini çekmektedir. Mustafa ve ark. yapmış oldukları çalışmada *Suberose*<sup>®</sup> (Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Danimarka) olarak adlandırılan ticari bir lakkaz enzimini kullanarak fenolik renklendiricileri sentezlediklerini rapor etmişlerdir (59).

### Kozmetik

Kozmetik dünyası da lakkaz enzimlerinin uygulamalarına kayıtsız kalamamıştır. Örneğin, lakkaz temelli saç boyaları çok daha az tahriş edicidirler ve normal saç boyası içerisinde oksitleyici ajan olarak bulunan hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) yerine lakkaz bulunduğundan, bu tip saç boyalarının kullanımı geleneksel saç boyalarına göre daha kolaydır (60-63). Cilt beyazlatıcı olarak kullanılan ve çeşitli proteinleri

içeren kozmetik ve dermatolojik preparasyonlar da geliştirilmiş bulunmaktadır (64).

### Lakkaz Enzimi Kaynağı Olarak Kullanılan Organizmalar

Birhanlı ve Yeşilada yaptıkları çalışmada beyaz çürükçül fungus kullanarak biyoteknolojik önemi olan lakkaz enzimi üretimini çalışmışlardır (69). Fakat bu organizmalar normal şartlarda yeterli miktarda lakkaz üretmediklerinden gerçekleştirdikleri bu çalışmada Türkiye'de izole edilen *Funalia trogii* ATCC 200800 ve *Trametes versicolor* ATCC 200801 suşları kullanılarak lakkaz enziminin zenginleştirilmesi amaçlanmıştır. Alıkonma süresi, sıcaklık, karıştırma, pH ve pellet miktarının tekrarlanan batch yöntemi ile lakkaz üretimine etkisinin önemli boyutta olduğu bulunmuştur. Immobilize hale getirilen fungusun yüksek miktarda lakkaz üretebildiği gösterilmiştir (69). Aktaş ve ark. da yaptıkları çalışmada, 1-naftol'ün lakkaz katalizleyen oksidatif polimerizasyonu için sodyum asetatlı ve aseton içeren tampon çözeltisi ile kapalı bir sistem içerisinde gerçekleştirmişlerdir. Başlangıç reaksiyon oranı üzerine çözülmemiş oksijen konsantrasyonu ve başlangıç 1-naftol'ün etkisini araştırmışlardır. Çoklu matematiksel modelleme ile 1-naftol'un işlevselliği çözülmemiş oksijen konsantrasyonu kullanılarak enzimatik polimerizasyon ve biyokinetik parametreler için bu çalışma ilk defa değerlendirilmeye alınmıştır (70). Kahraman ve Gürdal'da iki beyaz çürükçül fungusun (*Coriolus versicolor*, *Funalia trogii*) farklı beslenme şartları altında lakkaz enzimi üretimini çalışmışlardır. Bu anlamda çalışma da değişik sentetik ve doğal kültür ortamları test edilmiştir. Değişik kültür ortamları kullanılarak denenen enzim üretimi sonucunda vinasse kültür ortamı sentetik kültür ortamlarından daha iyi lakkaz üreten besiyeri olduğu gösterilmiştir. En yüksek lakkaz aktivitesi pamuk sapı ile zenginleştirilmiş vinasse kültür ortamında elde etmişlerdir (71). Erkut ve ark. Remazol Brillant Blue Royal (RBBR) ve Drimaren Blue CL-BR (DB) boyar maddelerinin giderimi için *Pleurotus ostreatus*, *Coriolus versicolor*



ve *Funalia trogii* üç farklı beyaz çürükçül fungusu kullanarak araştırmışlardır. Renk giderimi çalışmaları 48 sa. 30°C ve pH 5,0'da yürütmüşlerdir. Maksimum ve minimum boyar madde giderimi *F. trogii* ve *P.*

*ostreatus*'dan elde edilmiştir (72). Erden ve ark. *Trametes versicolor* tarafından mangan peroksidad ve lakkaz üretimi için yeni ve farklı lignoselüloz materyaller geliştirmişlerdir. Lakkaz üretimi için

Tablo 1. Lakkaz enzimi kaynağı olan mikroorganizmalar ve uygulama alanlar

Uygulama Alanı	Lakkaz Kaynağı	Uygulama Alanı	Lakkaz Kaynağı
Boyalarnın Renk Giderimi	<i>Aspergillus niger</i> <i>Cerrena unicolor</i> <i>Coriolopsis gallica</i> <i>Coriolopsis rigida</i> <i>Funalia trogii</i> <i>Gaeumannomyces graminis</i> <i>Irpex lacteus</i> <i>Myceliophthora thermophila</i> <i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> <i>Polyporus pinsitus</i> <i>Pleurotus eryngii</i> <i>Sclerotium rolfsii</i> <i>Streptomyces cyaneus</i> <i>Streptomyces coelicolor</i> <i>Streptomyces psamaticus</i> <i>Streptomyces viridosporus</i> <i>Trametes hirsuta</i> <i>Trametes modesta</i> <i>Trametes trogii</i> <i>Trametes versicolor</i> <i>Trametes villosa</i>	Biyosensörler	<i>Agaricus bisporus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Cerrena unicolor</i> <i>Coriolus hirsutus</i> <i>Coriolus versicolor</i> <i>Myceliophthora thermophila</i> <i>Rigidoporus lignosus</i> <i>Rhus vernicifera</i> <i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Pyricularia oryzae</i> <i>Polyporus pinsitus</i> <i>Trametes versicolor</i>
	Ksenobiyotiklerin Parçalanması		<i>Chaetomiaceae</i> <i>Cladosporium sphaerospermum</i> <i>Coprinus cinereus</i> <i>Coriolopsis gallica</i> <i>Coriolus hirsutus</i> <i>Coriolus versicolor</i> <i>Myceliophthora thermophila</i> <i>Panus tigrinus</i> <i>Polyporus pinsitus</i> <i>Pleurotus osteratus</i> <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> <i>Pyricularia oryzae</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Rhus vernicifera</i> <i>Trametes pubescens</i> <i>Trametes hirsuta</i> <i>Trametes sp.</i> <i>Trametes versicolor</i> <i>Trametes villosa</i> <i>Trichophyton sp.</i>
Organik Sentezi		<i>Coriolus hirsuta</i> <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> <i>Phaseolus coccineus</i> <i>Pyricularia oryzae</i> <i>Trametes versicolor</i> <i>Trametes villosa</i>	Biyolojik Kağıt Hamuru
	Kot Eskitme	<i>Coriolus hirsuta</i> <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> <i>Phaseolus coccineus</i> <i>Pyricularia oryzae</i> <i>Trametes versicolor</i> <i>Trametes villosa</i>	
Organik Sentezi		<i>Coriolus hirsuta</i> <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> <i>Phaseolus coccineus</i> <i>Pyricularia oryzae</i> <i>Trametes versicolor</i> <i>Trametes villosa</i>	Biyo-Beyazlatma
	Organik Sentezi	<i>Coriolus hirsuta</i> <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> <i>Phaseolus coccineus</i> <i>Pyricularia oryzae</i> <i>Trametes versicolor</i> <i>Trametes villosa</i>	

2,2-azinobis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate ve guaiacol ile desteklenen besi ortamı kullanılarak potensiyel lakkaz üreticisi olan dokuz farklı mantar izolatu kullanılarak izolasyon yöntemi geliştirmişlerdir (73). Şanlıer ve ark. da lakkaz enzimini alginat boncuk içinde immobilize hale getirmişler ve immobilizasyon şartlarını tanımlamışlardır. Hazırlanan boncukların kullanımı ile 25 mg/mL lakkaz enzimi ile kaplama etkinliği yaklaşık %94 olarak hesaplanmıştır. 10 günlük bekleme süresi sonrasında serbest şekilde olan lakkaz ve immobilize hale gelmiş lakkaz yaklaşık sırasıyla %8,08 ve %80,83'de kaldığı gözlemlenmiştir (74). Lakkaz enzimi tarafından Azo Dye Drimaren Blue X3LR boyasının renk giderimi kinetiği Ünyayar ve ark. tarafından 2005 yılında çalışılmıştır (75). *Funalia trogii*'nin saflaştırılmış enzimi ve saf filtratı tarafından azo dye Drimaren Blue X3LR boya maddesinin giremini çalışmışlardır (75).

*S. coelicolor*'un lakkaz geni *Streptomyces lividans*'a klonlanarak bu enzimin konakçı tarafından 350 mg/L düzeyinde homolog olarak ekspresyonu sağlanmıştır. *S. lividans* tarafından ifade edilen lakkaz enziminin 70°C'deki termostabilitesinin ise oldukça yüksek olduğu rapor edilmiştir (76). Bains ve ark. tarafından endüstriyel atıksu ile kirlenen topraklardan izole edilen proteobakteri üyesi alkalitolerant bir bakteri izolatının ürettiği lakkaz enziminin ise en az 24 saat süreyle pH 3-10 arasında kararlı olduğu, optimal aktivitesini ise 55°C'de ve pH 6,5'de gösterdiği rapor edilmiştir (77). *B. subtilis* endospor kılıf proteini olan CotA ise substrat olarak ABTS'ye karşı en yüksek lakkaz aktivitesini 75°C'de göstermiştir. Bu enzimin 80°C'deki yarılanma ömrü ise kılıf proteinleri ile birlikte iken 4 saat, saf iken ise 2 saat olarak tespit edilmiştir (78). *A. lipoferum* tarafından üretilen lakkaz enziminin ise 10 dk süreyle



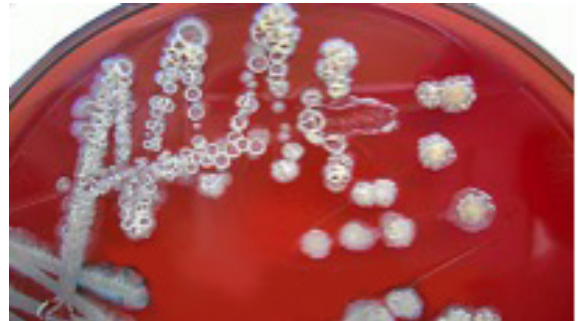
Şekil 1. *Trametes versicolor* (65)



Şekil 2. *Trametes hirsuta* (66)



Şekil 3. *Pleurotus ostreatus* (67)



Şekil 4. *Pseudomonas stutzeri* (68)

70°C'a kadar kararlı olduğu rapor edilmiştir (79). *S. lavendulae* tarafından üretilen termostabil bir lakkaz ise 70°C'de 20 dk'lık inkübasyon sonucunda orijinal aktivitesinin tamamını korurken aynı sıcaklıktaki yarılanma ömrü ise 100 dk olarak belirlenmiştir (80). *S. cyaneus* tarafından üretilen lakkaz enziminin optimal sıcaklığının ise 70°C olduğu belirlenmiştir. Bu enzim, ortam pH'sının 5-8 olduğu koşullarda ve 40°C'de, 120 dk. inkübe edildiğinde aktivitesinin %100'ünü korurken; aynı sıcaklıkta fakat ortam pH'sının 3-4 olduğu koşullarda ise aktivitesinin %50'sini koruduğu belirlenmiştir. Aynı lakkaz enzimi, ortam pH'sının 4,5 olduğu koşullarda ise 50°C'de 120 dk sonra %75; 60°C'de 60 dk sonra ise %60 aktivite göstermiştir (81).

Lakkaz mediatör sistemler (LMS) (lakkaz aracılıklı sistemler) ise kâğıt hamurunun delignifikasyonu ve beyazlatılması, organik kirleticilerin oksidasyonu, çaylardaki drogların ve fenollerin analizi gibi biyosensörlerin veya biyo-yakıt hücrelerinin geliştirilmesi, polimer sentezi, tekstil boyalarının renk giderimi, biyoremidasyon, fungusidaller, meyve sularının ve şarapların berraklaştırılması gibi çok sayıdaki sürece uygulanmıştır (27, 82-85). Claus ve ark. ise LMS'nin tekstil boyalarının renk giderimlerini artırdığını hatta lakkaz aracılığı ile parçalanmaya karşı dirençli olan bazı tekstil boyalarının dahi renk giderimlerinin gerçekleştirildiğini belirlemişlerdir (84).

Bakteriyel lakkazların kâğıt endüstrisinde kullanımına ilişkin çalışmaların sayısı ise fungal lakkazlara oranla oldukça düşüktür. *Streptomyces cyaneus* CECT 3335 ve *Pseudomonas stutzeri* tarafından üretilen lakkaz enzimleri ise ökaliptus kâğıt hamurunun biyo-beyazlatılması amacıyla, redoks araçları olarak ABTS ve HBT varlığında araştırılmış olan iki bakteriyel lakkazdır (86, 87). Buna rağmen, hem fungal hem de bakteriyel kökenli LMS'nin kâğıt hamurunun beyazlatılmasında ABTS gibi sentetik redoks araçlarına gereksinim duyması ise bu sistemlerin endüstriyel ölçekte kullanılmasının maliyetini artırmaktadır. Bu nedenle, LMS sistemleri

ile kullanılacak ve maliyeti düşürecek bazı lignin türeveli fenoller gibi doğal redoks araçlarının keşfedilmesine yönelik çalışmalar ise sürdürülmektedir (88). Bu tip doğal redoks araçlarından birisi olan p-hidroksibenzoik asitin ise PAH oksidasyonunda ABTS kadar etkili olduğu rapor edilmiştir (89).

Parshetti ve ark. yaptıkları çalışmada *Aspergillus ochraceus* NCIM 1146'nın miselyumu (mantarın lifsel kısmı) tarafından tekstil boyarmaddesi Reactive blue-25 (0,1g/l)'in renksizleştirilmesi ve parçalanmasını incelemişlerdir. Reactive blue-25, kromofor olarak bakır ftalosiyanın (CuPC) ve reaktif kısım olarak monoklortriazin içeren reaktif bir boyarmadde olup tekstil sanayinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışmanın esas amacı, bu boyar maddenin renksizleştirilmesini, biyolojik parçalanmasını ve parçalanma ürünlerinin tanımlanmasını incelemek ve bunun yanı sıra renksizleştirme prosesi esnasında kültür süzüntüsündeki lakkaz, trosinaz ve lignin peroksidaz gibi hücre dışı enzimleri belirlemektir. Yapılan spektrofotometrik ve görsel incelemeler, renksizleştiriminin fungal adsorpsiyonu takip eden parçalanma sayesinde olduğunu göstermiştir. Çalışmada statik koşullar ile kıyaslandığında çalkalamalı koşulların, Reactive blue-25 boyarmaddesinin tamamen ve hızlı adsorpsiyonu (7 saat) ve renksizleştirilmesinde (20 gün) daha etkili olduğu bulunmuştur. Ortamda glikozun bulunması ise daha hızlı bir adsorpsiyon (4 saat) ve renksizleştirme (7 gün) sağlamıştır. Renksizleştirme sonrası süzüntüde lignin peroksidaz, lakkaz ve trosinaz gibi oksidatif enzimlerin varlığı, Reactive blue-25'in ftalimid ve di-iso-butil ftalat gibi iki büyük metabolite (ara ürün) parçalanma işleminden sorumlu olduğunu göstermiştir (49).

Park ve ark. mantarların katı veya sıvı faz olan iki farklı reaksiyon şekli ile kültürünün elde edilmesi sayesinde boyar maddelerin renksizleştirilmesini ve iki temel renksizleştirme mekanizmasını (ekstraselular ve biyosorpsiyon) incelemek ve tekrarlı banyo kültürleriyle pratik uygulama

olanaklarını doğrulamak amacıyla bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada altı ticari boyarmaddenin on değişik mantar yardımıyla renksizleştirilmesi üzerine çalışılmıştır. Renksizleştirme derecesi, UV/Vis spektrofotometre ile ölçülmüştür. Daha sonra enzim aktivitesi, renksizleştirme eğilimleri ve renksizleştirme mekanizmaları gibi özellikler incelenmiştir. Deneysel koşullar altında hücre dışı lakkaz ve mangan peroksidaz (MnP) tespit edilirken lignin peroksidaz (LiP) tespit edilememiştir. *F. trogii* ATCC 200800 katı faz ile kültür edildiğinde altı boyarmaddenin renksizleştirilmesinde en büyük verimliliği göstermiştir. Ancak *F. trogii* ATCC 200800 ile elde edilen renksizleştirme mekanizmaları, enzim aktivitesi ve biyosorpsiyonun kompleks etkileşimini gerektirmektedir. Yüksek oranda renksizleştirme tekrarlı banyo deneylerinde beş günlük sürede sağlanmıştır. Çalışmada yüksek konsantrasyondaki ticari boyarmaddelerin renksizleştirilebildiği ve bu sayede boyarmadde içeren atık suların arıtılması için bu yöntemlerin avantaj sağlayacağı ifade edilmiştir (90).

Maximo ve ark. *Geotrichum* sp. mantarından elde edilen enzimlerin sanayide kullanılan üç reaktif azo boyarmaddesini (Reactive Black 5, Reactive Red 158 ve ReactiveYellow 27) parçalama yeteneği araştırılmıştır. Her bir boyarmadde *Geotrichum* sp. ile işleme tabi tutulduğunda mantar siyah boyarmaddeyi hızlı bir şekilde dönüşüme uğratarken, diğer iki boyarmadde için iki kat süre gerekmiştir. 20 günlük eski kültürler, boyarmaddelerin ardışık miktarları (200 ppm) ile reaksiyona sokulduğunda ise toplam dönüşüm süresi üç boyarmadde için de yaklaşık beş güne düşürülmüştür. Çalışmada, siyah boyarmaddenin dönüşümünde lignolitik enzimler olan Mn peroksidaz, Mangansız peroksidaz ve lakkazın etkisinin olası olduğu, ancak sarı ve kırmızı boyarmaddeler için ilave enzimlerin veya faktörlerin gerektiği ifade edilmiştir. Ayrıca *Geotrichum* sp.'nin büyük miktarlarda boyarmaddeyi (ardışık ilaveler sonrası 800 ppm) dönüşüme uğratabilme yeteneği sayesinde tekstil

atık sularının renksizleştirilmesinde uygulama potansiyeli olabileceği belirtilmiştir (91).

Kunamneni ve ark. yaptıkları çalışmada *Myceliophthora thermophila*'dan elde edilen lakkaz enzimi, epoksi grupları ile aktifleştirilmiş polimetakrilat esaslı polimerler üzerine kovalent olarak immobilize edilmiştir. Bu şekilde elde edilen enzimin yüksek aktivite (203 U/g), pH, sıcaklık ve depolama süresi karşısında dayanıklılığının arttığı ancak organik çözücülere karşı dayanıklılığında herhangi bir değişiklik olmadığı görülmüştür. Ayrıca, biyokatalizörün iyi operasyonel dayanıklılık gösterdiği, 17 kez kullanıldıktan sonra bile ilk aktivitesinin %84'ünü koruduğu görülmüştür. Immobilize lakkaz, altı sentetik boyarmaddenin (Reactive Black 5, Acid Blue 25, Methyl Orange, Remazol Brilliant Blue B, Methyl Green ve Acid Green 27) renginin giderilmesinde uygulanmıştır. Çalışmada, bu biyokatalizörlerin yüksek mekanik dayanıklılık ve suda şişmeme gibi özelliklerinin, tekstil sanayiinde boyarmaddelerin renginin giderilmesinde uygulama açısından elverişli olduğu belirtilmiştir (92).

Fan ve ark. yüksek lakkaz verimine ve farklı boyaların renginin ağartılmasında güçlü etkiye sahip olan yeni beyaz çürükçül fungus *Trametes* sp. 48424' lardan elde edilen yeni bir lakkaz geninin klonlamış ve işlevsel analizini çalışmışlardır (93). Terro'n ve ark. ligninolytic fungus *Trametes* sp. I-62 de yapısal yakın ilişkili aromatik bileşiklerin lakkaz aktivitesi ve lcc gen ekspresyonu üzerine farklı etkileri araştırılmıştır (94). Belinky ve ark. beyaz çürükçül fungus olan *Phanerochaete chrysosporium*'dan elde edilen manganez içeren süperoksit dismutazın işlevi, ifadesi ve gen yapısı çalışılmıştır. Transkript seviyesi ile enzim aktivitesi arasında iyi bir korelasyon olduğu ölçülmüştür (95). Seddas ve ark. tarafından arbüsküler mikorizal fungusların extraradical ve intraradical gelişimsel basamaklarındaki gen aktivitesi direkt floresan in situ RT-PCR ile izlenmiştir (96). Yang ve ark.

tarafından beyaz çürükçül fungus *Trametes* sp. 5930' dan lakkaz gen karakterizasyonu ve farklı sentetik boya renk giderimi yeteneği üzerine çalışılmıştır (97). Zhuo ve ark. tarafından beyaz çürükçül fungus suşu *Ganoderma* sp. En3' ten lakkaz geni klonlanmış ve fonksiyonel analizi yapılmıştır. Lakkazın farklı boya renk gideriminde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (98). Ekstremlerde bulunan fungus türlerinin stres direnç genlerinin kaynağı olduğu temsil edilir ve bu genlerin ekonomik açıdan önemli olan mikroorganizmalar ile bitkilerin stres toleransını geliştirme potansiyeline sahip olduğu belirtilmiştir. Gonza'lez ve ark. tarafından beyaz çürükçül küf fungusu *Trametes* sp. 1-62' de melas atıksuları ve melanoidlerle maruz kaldıktan sonra ilk kez lakkaz gen ekspresyonu olduğu bildirilmiştir (99).

Büyük ve ark.'da gerçekleştirdiği çalışmada *Pseudevernia furfuracea* liken türü lakkaz enzim kaynağı olarak gösterilmiştir. Ayrıca lakkaz enziminin optimum koşullarda verdiği lakkaz enzim aktivitesi ve lakkaz gen ekspresyonu seviyesi de belirlenmiştir (100).

## SONUÇ

Beyaz biyoteknoloji, modern biyokimyasal ve moleküler biyoloji teknikleri kullanılarak daha az atık üreten, daha az enerji tüketen, kimyasal proseslere alternatif biyolojik üretim prosesleri olarak tanımlanabilir. Beyaz biyoteknolojinin kullanıldığı yeni veya iyileştirilmiş proseslerin geliştirileceği açıktır. Böylece yenilenemez

kaynaklara olan bağımlılıkta ortadan kalkacak ve hızlı, doğa dostu ve maliyeti düşük prosesler geliştirilebilecektir. Lakkaz enzimi olağanüstü çok yönlü enzim olup bütün aktivitelerin orijinlendiği temel bir reaksiyonu katalizlemektedir. Lakkaz enzimi; canlıların bütün domainlerinde yayılmış olarak bulunan enzim olup bu enzimlerin fizyolojik rollerinin çok daha iyi anlaşılması için daha ileri çalışmaların yapılması ve bu enzimin potansiyel biyoteknolojik uygulamalarının ileri düzeylerde tanımlanması gerekmektedir.

Ham enzim preparasyonlarının kullanımı da pahalı olabilir. Bu nedenle günümüz koşullarında lakkaz enzimi ucuz ve kolay elde edilememektedir. Kirlenmiş sistemleri iyileştirmek için büyük ölçekli lakkaz uygulaması için büyük miktarlarda üretimi gerektirmektedir. En etkili lakkaz enzimi üreten kaynağı bulmak için en uygun fungal türü seçme, yeniden üretilebilir ve pahalı olmayan izolasyon yöntemlerini bulma, enzim üretim koşullarını optimize etme açısından çeşitli çalışmalar yapılmalıdır.

Lakkaz enzimlerinin ticari uygulamalarının önündeki en önemli engel yeterli enzim stoğunun bulunmaması ve redoks araçlarının fiyatıdır. Bu problemlerin çözümüne yönelik önemli çalışmalar ise son zamanlarda yapılmaya başlanmıştır. Bu nedenle, lakkaz enzimlerinin ucuza ve aşırı üretimini sağlayacak olan heterolog konakçıların araştırılması ve aynı zamanda da bu enzimlerin çok daha aktif ve güçlü olması için ileri teknikler kullanılarak modifiye edilmelerine yönelik çalışmaların devam ettirilmesi gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Wiseman A. Handbook of Enzymes Biotechnology. Second Ed. Chapter 3. The Application of Enzymes in Industry, 1987: 274-373.
2. Erkaya E, Çaylıkoca AB, Kalınyaprak F. Enzimatik Kataliz, Kimya Mühendisliği Uygulaması, Konya: Selçuk Üniversitesi, 2006: 78.
3. Demain AL, Solomon NA. Industrial Microbiology and the advent of genetic engineering. San Francisco: A Scientific American Book, Freeman &Comp, 1981: 3-14.
4. Gray HB, Malmstrom BG, Williams RJ. Copper coordination in blue proteins. J Biol Inorg Chem, 2000; 5: 551-59.
5. Solomon EI, Sundaram UM, Machonkin TE. Multicopper oxidases and oxygenases. Chem Rev, 1996; 96: 2563-605.
6. Mayer AM. Polyphenol oxidases in plants-recent progress. Phytochemistry, 1987; 26: 11-20.
7. Tuncer M. Lakkaz, Kısım 1: Yapısı, Katalitik Özellikleri ve Dağılımları. Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 2010; 22: 19-63.
8. Decker H, Terwilliger N. Cops and robbers: putative evolution of copper oxygen-binding proteins. J Exp Biol, 2000; 203: 1777-82.
9. Paloheimo M, Valtakari L, Puranen T, Kruus K, Kallio J, Mantyla A, et al. Novel laccase enzyme and use thereof. USPTO Applicaton:20060063246, Class: 435183000 (USPTO), 2004.
10. Alexandre G, Zhulin IB. Laccases are widespread in bacteria. Trends Biotechnol, 18, 2000; 41-42.
11. Cantarelli C, Brenna O, Giovanelli G, Rossi M. Beverage stabilization through enzymatic removal of phenolics. Food Biotechnol, 1989; 3: 203-13.
12. Giovanelli G, Ravasini G. Apple juice stabilization by combined enzyme membrane filtration process. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, 1993; 26, 1-7.
13. Minussi RC, Pastore GM, Durán N. Potential applications of laccase in the food industry. Trends Food Sci Technol, 2002; 13: 205-16.
14. Si JQ. Use of laccases in baking. Int Pat Appl WO9428728.1993.
15. Labat E, Morel MH, Rouau X. Effect of laccase and manganese peroxidase on wheat gluten and pentonans during mixing. Food Hydrocoll, 2001;15: 47- 52.
16. Selinheimo E. Kruus K, Buchert J, Hopia A, Autio K. Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheological properties of wheat doughs. J Cereal Sci, 2006; 43: 152-59.
17. Flander L, Rouau X, Morel MH, Autio K, Seppänen-Laakso T, Kruus K, Buchert J. Effects of Laccase and Xylanase on the Chemical and Rheological Properties of Oat and quality parameters of gluten-free oat breads, 2011; 59(15): 8385-90.
18. Kuhad RC, Singh A, Eriksson KEL. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell Wall. Adv Biochem Eng Biotechnol 1997; 57: 47-125.
19. Carter DN, McKenzie DG, Johnson AP, Idner K. Performance parameters of oxygen delignification. Tappi J, 1997; 80: 111-17.
20. Call HP. Process for modifying, breaking down or breaching lignin, materials containing lignin or like substances. PCT World patent WO 94/29510, December 1994.
21. Wong KS, Huang Q, Au CH, Wang J, Kwan HS. Biodegradation of dyes and polyaromatic hydrocarbons by two allelic forms of Lentinula edodes laccase expressed from Pichia pastoris. Bioresource Technology, 2012;104: 157-64.
22. Call HP, Mücke I. History, overview and applications of mediated ligninolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozymprocess). J Biotechnol, 1997; 53: 163-202.
23. Crestini C, Argyropoulos DS. The early oxidative biodegradation steps of residual kraft lignin models with laccase. Bioorg Med Chem, 1998; 6: 2161- 69.
24. Camarero S, Garcia O, Vidal T, Colom J, del Rio JC, Gutierrez A et al. Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system. Enzyme Microb Technol, 2004; 35: 113-20.
25. Chandra RP, Ragauskas AJ. Evaluating laccase-facilitated coupling of phenolic acids to high-yield kraft pulps. Enzyme Microb Technol, 2002; 30: 855-61.

26. Kenealy W, Klungness J, Tshabalala M, Horn E, Akhtar M, Gleisner R, et al. Modification of lignocellulosic materials by laccase. TAPPI Fall Techn Conf, Engineering, Pulping & PCE&I Chicago, IL. 2003.
27. Huttermann A, Mai C, Kharazipour A. Modification of lignin for the production of new compounded materials. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001; 55: 387-94.
28. Felby C, Pedersen LS, Nielsen BR. Enhanced auto adhesion of wood fibers using phenol oxidases. *Holzforschung*, 1997; 51: 281-86.
29. Lund M, Ragauskas AJ. Enzymatic modification of kraft lignin through oxidative coupling with water-soluble phenols. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001; 55: 699-703.
30. Riu J, Schönsee I, Barcelo D. Determination of sulfonated azo dyes in groundwater and industrial effluents by automated solid-phase extraction followed by capillary electrophoresis/mass spectrometry. *J. Mass Spectrom*, 1998; 33: 653-63.
31. Mishra G, Tripathy M. A critical review of the treatments for decolorization of textile effluent. *Colourage*, 1993; 40: 35-8.
32. Banat IM, Nigam P, Singh D, Marchant R. Microbial decolorization of textile-dye- containing effluents: a review. *Bioresour Technol*, 1996; 58: 217- 27.
33. Juang RS, Tseng RL, Wu FC, Lin SJ. Use of chitin and chitosan in lobster shell wastes for colour removal from aqueous solutions. *J Environ Sci Health Part A Environ Sci Eng*, 1996; 31: 325-38.
34. Zollinger H. Synthesis, properties and applications of organic dyes and pigments. *Colour chemistry*. New York: John Wiley-VCH Publishers, 2002; 92-100.
35. Poots VJP, McKay JJ. The removal of acid dye from effluent using natural adsorbents- Peat. *Water Res*, 1976; 10: 1061-66.
36. McKay G. Waste colour removal from textile effluents. *Am Dyest Report*, 1979; 68: 29-36.
37. Spadaro JT, Lorne I, Renganathan V. Hydroxyl radical mediated degradation of azo dyes: evidence for benzene generation. *Environ Sci Technol*, 1994; 28: 1389-93.
38. Baughman GL, Perenich TA. Fate of dyes in aquatic systems: I solubility and partitioning of some hydrophobic dyes and related compounds. *Environ Toxicol Chem*, 1988; 7: 183-99.
39. Cooper P. Removing colour from dye house wastewater. *Asian Textile J*, 1995; 3: 52-6.
40. Stephen JA. Electrooxidation of dyestuffs in waste waters. *J Chem Technol Biotechnol*, 1995; 62: 111-7.
41. D'Annibale A, Ricci M, Quarantino D, Federic F, Fenice M. *Panus tigrinus* efficiently removes phenols, color and organic load from olive-mill wastewater. *Res Microbiol*, 2004; 155: 596-603.
42. Dias AA, Bezerra RM, Pereira A.N. Activity and elution profile of laccase during biological decolorization and depolymerization of olive mill wastewater. *Biores Technol*, 2004; 92: 7-13.
43. Setti L, Giuliani S, Spinozzi G, Pifferi PG. Laccase catalyzed oxidative coupling of 3-methyl 2-benzothiazolinone hydrazone and methoxyphenols. *Enzyme Microb Technol*, 1999; 25: 285-89.
44. Pazarlıoğlu NK, Sarıışık M, Telefoncu A. Laccase: production by *Trametes versicolor* and application to denim washing. *Process Biochem*, 2005; 40: 1673-78.
45. Tzanov T, Basto C, Guebitz G, Cavaco-Paulo A. Laccases to improve the whiteness in a conventional bleaching of cotton. *Macromol Mat Eng*, 2003; 288: 807-10.
46. Yoon MY. Denim Finishing with Enzymes- Biobleaching with Laccase and Mediator. *International Dyer*, 2005; 1-3.
47. Auterinen AL. White Biotechnology & Modern Textile Processing. *Textile World*, 2006; 40-44.
48. Ossola M, Galante YM, Scouring of flax rove with the aid of enzymes. *Enzyme Microbial Technol*, 2004; 34: 177-86.
49. Parshetti GK, Kalme SD, Gomare SS, Govindwar SP. Biodegradation of Reactive blue-25 by *Aspergillus ochraceus* NCIM-1146. *Bioresource Technol*, 2007; 98: 3638-42.

50. Freire RS, Durán N, Kubota LT. Effects of fungal laccase immobilization procedures for the development of a biosensor for phenol compounds. *Talanta*, 2001; 54: 681- 86.
51. Martele Y, Callewaerta K, Naessens K, Van Daeleb P, Baetsb R, Schacht E, Controlled patterning of biomolecules on solid surfaces. *Mater Sci Eng Biomim Mater Sens Syst*, 2003; 23: 341-45.
52. Roy JJ, Abraham TE, Abhijith KS, Sujith KPV, Thakur M.S. Biosensor for the determination of phenols based on Cross-Linked Enzyme Crystals (CLEC) of laccase. *Biosens Bioelectron*, 2005; 21: 206-11.
53. Cabrita JF, Abrantes LM, Viana AS. N - Hydroxysuccinimide - terminated self - assembled monolayers on gold for biomolecules immobilisation. *Electrochim Acta*, 2005; 50: 2117-24.
54. Collins PJ, Kotterman MJJ, Field JA, Dobson ADW. Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by laccases from *Trametes versicolor*. *Appl Environ Microbiol*, 1996; 62: 4563-7.
55. Ahn MY, Dec J, Kim JE, Bollag JM. Treatment of 2,4-dichlorophenol polluted soil with free and immobilized laccase. *J Environ Qual*, 2002; 31: 1509-15.
56. Pointing SB. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001; 57: 20-33.
57. Nyanhongo GS, Rodríguez Couto S, Gübitz GM. Coupling of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) metabolites onto humic monomers by a new laccase from *Trametes modesta*. *Chemosphere*, 2006; 64(3): 359-70.
58. Durán N, Esposito E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Appl Cat B: Environ*, 2000; 28: 83-99.
59. Mustafa R, Muniglia L, Rovel B, Girardin M. Phenolic colorants obtained by enzymatic synthesis using a fungal laccase in a hydroorganic biphasicsystem. *Food Res Int*, 2005; 38: 995-1000.
60. Xu F. Recent progress in laccase study: properties, enzymology, production and applications. In: Flickinger MC, Drew SW, eds. *The encyclopedia of bioprocessing technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation*. JohnWiley & Sons. New York, 1999: 1545-54.
61. Roure M, Delattre P, Froger H. Composition for an enzymic coloration of keratin fibres, especially for hair and its use in a dyeing process. *Eur Pat Appl*, 1992; 37: 273-302.
62. Aaslyng D, Rorbaek K, Sorensen NH. An ezyme for dying keratinous fibres. *Int Pat Apl*, 1996; 62: 4563-7.
63. Lang G, Cotteret J. Hair dye composition containing a laccase. *Int Pat Appl*, 1999; 53: 357-63.
64. Golz-Berner K, Walzel B, Zastrow L, Doucet O. Cosmetic and dermatological preparation containing copperbinding proteins for skin lightening. *Int Pat Appl*, 2004; 64: 2788-93.
65. Anonim 5 [www.medicalmushrooms.net/trametes-versicolor](http://www.medicalmushrooms.net/trametes-versicolor) (Erişim tarihi: 10.11.2014)
66. Anonim 12 [www.wikipedia.org/wiki/Trametes\\_hirsuta](http://www.wikipedia.org/wiki/Trametes_hirsuta) (Erişim tarihi: 10.11.2014)
67. Anonim 7 [www.mushroomexpert.com/pleurotus\\_ostrea\\_tus.html](http://www.mushroomexpert.com/pleurotus_ostrea_tus.html) (Erişim tarihi: 10.11.2014)
68. Anonim 3 [www.elmundo.es/elmundo/2012/06/12/baleares/1339485290.html](http://www.elmundo.es/elmundo/2012/06/12/baleares/1339485290.html) (Erişim tarihi: 10.11.2014)
69. Birhanlı E, Yeşilada Ö. Enhanced production of laccase in repeated-batch cultures of *Funalia trogii* and *Trametes versicolor*. *Biochem Engin J*, 2010; 52: 33-7.
70. Aktaş N, Çiçek H, Taşpınar-Ünal A, Kibarer G, Kolonkaya N, Tanyolaç A. Reaction kinetics for laccase-catalyzed polymerization of 1-naphthol. *Bioresource Technol*, 2001; 80: 29-36.
71. Kahraman SS, Gürdal IH. Effect of synthetic and natural culture media on laccase production by white rot fungi. *Bioresource Technol*, 2002;82: 215-17.



72. Erkurt EA, Ünyayar A, Kumbur H. Decolorization of synthetic dyes by white rot fungi, involving laccase enzyme in the process. *Process Biochemistry*, 2007; 42: 1429-35.
73. Erden E, Ucar MC, Kaymaz Y, Pazarlioglu NK. New and different lignocellulosic materials from Turkey for laccase and manganese peroxidase production by *Trametes versicolor*. *Eng Life Sci*, 2009; 9: 60-5.
74. Şanlıer AH, Gider S, Köprülü A. Immobilization of laccase for biotechnology applications. *Artificial Cells Nanomedicine Biotechnol*, 2012; 1-5.
75. Ünyayar A, Mazmancı MA, Erkurt A, Atacaga H. Decolorization Kinetics Of The Azo Dye Drimaren Blue X3lr By Laccase. *React Kinet Catal Lett*, 2005; 86: 99-107.
76. Dubé E, Shareck F, Hurtubise Y, Daneault C, Beaugregard M. Homologous cloning, expression, and characterisation of a laccase from *Streptomyces coelicolor* and enzymatic decolourisation of an indigo dye. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008; 79(4): 597-603.
77. Bains J, Capalash N, Sharma, P. Laccase from a nonmelanogenic, alkalotolerant-proteobacterium JB isolated from industrial waste water drained soil. *Biotechnol Lett*, 2003; 25: 1155-59.
78. Martins LO, Soares CM, Pereira MM, Teixeira M, Costa T, Jones GH. et al. 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*, 2002; 277(21): 18849-59.
79. Diamantidis G, Effosse A, Potier P, Bally R. Purification and characterization of the first bacterial laccase in the rhizospheric bacterium *Azospirillum lipoferum*. *Soil Biol Biochem*, 2000; 32: 919-27.
80. Suzuki T, Endo K, Iro M, Tsujibo H, Miyamoto K, Inamori Y. A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: Purification, characterization, nucleotide sequence, and expression. *Biosci Biochem*, 2003; 67: 2167-75.
81. Arias ME, Arenas M, Rodríguez J, Soliveri J, Ball AS, Hernández M. Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Appl Environ Microbiol*, 2003; 69: 1953-58.
82. Palonen H, Viikari L. Role of oxidative enzymatic treatments on enzymatic hydrolysis of softwood. *Biotechnol Bioeng*, 2004; 86: 550-7.
83. Kuznetsov BA, Shumakovich GP, Koroleva OV, Yaropolov AL. On applicability of laccase as label in the mediated and mediatorless electroimmunoassay: effect of distance on the direct electron transfer between laccase and electrode. *Biosens Bioelectron*, 2001; 16: 73-84.
84. Claus H, Faber G, König H. Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002; 59: 672-8.
85. Wesenberg D, Kyriakides I, Agathos SN. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnol Adv*, 2008; 5732-42.
86. Campos R, Kandelbauer A, Robra KH, Cavaco-Paulo A, Gübitz G.M. Indigo degradation with purified laccases from *Trametes hirsuta* and *Sclerotium rolfsii*. *J Biotechnol*, 2001; 89: 131-9.
87. Kumar A, Vanamala A, Kumar R. Exploration of bacterial laccase in *Pseudomonas stutzeri* and its application in bleaching the wood pulp. *FEBS J*, 2005; 272 (1): 6-8.
88. Camarero S, Ibarra D, Martinez MJ, Martinez AT. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Appl Environ Microbiol*, 2005; 71: 1775-84.
89. Johannes C, Majcherczyk A. Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Appl Environ Microbiol*, 2000; 66: 524-28.
90. Park C, Lee M, Lee B, Kim SW, Chase HA, Lee J, Kim S. Biodegradation and biosorption for decolorization of synthetic dyes by *Funalia trogii*. *Biochemical Engineering J*, 2007; 36: 59-65.
91. Maximo C, Amorim MTP, Costa-Ferreira M. Biotransformation of industrial reactive azo dyes by *Geotrichum* sp. CCM 1019. *Enzyme Microbiol Technol*, 2003; 32: 145-51.
92. Kumanneni A, Ghazi I, Camarero S, Ballesteros A, Plou FJ, Alcalde M. Decolorization of synthetic dyes by laccase immobilized on epoxy-activated carriers. *Process Biochemistry*, 2008; 43:169-78.

93. Fan F, Zhuo R, Sun Su, Wan X, Jiang M, Zhang X et al. Cloning and functional analysis of a new laccase gene from *Trametes* sp. 48424 which had the high yield of laccase and strong ability for decolorizing different dyes. *Bioresource Technol*, 2011; 102: 3126-37.
94. Terro'n MC, Gonzá'lez T, Carbajo JM, Yagüe S, Arana-Cuenca A, Te'llez A, et al. Structural close-related aromatic compounds have different effects on laccase activity and on lcc gene expression in the ligninolytic fungus *Trametes* sp. I-62. *Fungal Genetics Biol*, 2004; 41: 954-62.
95. Belinky PA, Goldberg D, Krinfeld B, Burger M, Rothschild N, Cogan U, et al. Manganese-containing superoxide dismutase from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: its function, expression and gene structure. *Enzyme Microbial Technol*, 2002; 31: 754-64.
96. Seddas PMA, Arnould C, Tollot M, Arias CM, Gianinazzi-Pearson V. Spatial monitoring of gene activity in extraradical and intraradical developmental stages of arbuscular mycorrhizal fungi by direct fluorescent in situ RT-PCR. *Fungal Genetics Biol*, 2008; 45: 1155-65.
97. Yang Y, Ma F, Fan F, Wan X, Zhang X, Jiang M. Characterization of a laccase gene from the white-rot fungi *Trametes* sp. 5930 isolated from Shennongjia Nature Reserve in China and studying on the capability of decolorization of different synthetic dyes. *Biochemical Engin J*, 2011; 57: 13-22.
98. Zhuo R, Ma L, Fan F, Gong Y, Wan X, Jiang M, et al. Decolorization of different dyes by a newly isolated white-rot fungi strain *Ganoderma* sp. En3 and cloning and functional analysis of its laccase gene. *J Hazard Mat*, 2011; 192: 855- 73.
99. Gonzá'lez T, Terro'n MC, Yagüe S, Junca H, Carbajo JM, Zapico EJ, et al. Melanoidin-containing wastewaters induce selective laccase gene expression in the white-rot fungus *Trametes* sp. I-62. *Res Microbiol*, 2008; 159: 103-9.
100. Büyük İ, Demiralp B, Özenođlu S, Aras S, Cansaran-Duman D. Expression levels of the laccase gene in lichen *Pseudevernia furfuracea* subjected to Pb+2 heavy metal stress. 10-12 Eylül 2014. *Moleküler Biyoloji Kongresi*. İzmir.