

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**LAKKAZ ÜRETİCİSİ *STREPTOMYCES*
TÜRLERİNİN KATI
KÜLTÜR PERFORMANSLARININ
KARŞILAŞTIRILMASI**

Mustafa DURAN

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Sayıt SARGIN

Biyomühendislik Ana Bilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 621.01.00

Sunuş Tarihi: 07.09.2011

**Bornova – İZMİR
2011**

Mustafa DURAN tarafından Yüksek lisans tezi olarak sunulan “Lakkaz Üreticisi *Streptomyces* Türlerinin Katı Kültür Performanslarının Karşılaştırılması” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 07.09.2011 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı

Yrd. Doç. Dr. Sayit SARGIN

Raportör Üye

Prof. Dr. Murat ELİBOL.....Üye

Doç. Dr. Oğuz BAYRAKTAR

.....

ÖZET**LAKKAZ ÜRETİCİSİ *STREPTOMYCES* TÜRLERİNİN KATI KÜLTÜR PERFORMANSLARININ KARŞILAŞTIRILMASI**

DURAN, Mustafa

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Bölümü

Tez Danışmanı: Yrd . Doç. Dr. Sayit SARGIN

Eylül, 2011

Bu çalışmada, katı kültür fermantasyonu yöntemi ile lakkaz üretiminde optimum koşullar belirlenmiştir. Biyokatalist olarak *Streptomyces coelicolor* ve Ege üniversitesi Biyomühendislik bölümü aktinomiset kültür koleksiyonundan elde edilen *Streptomyces* M33-1 izolatu kullanılmıştır.

Lakkaz üretim veriminin artırılması amaçlı yapılan çalışmalar uygun besi ortamı bileşenlerinin belirlenmesi, katı kültür proses değişkenlerinin yüzey yanıt yöntemi kullanılarak optimizasyonu ve çeşitli indükleyici maddelerin denenmesi şeklinde olmuştur. Optimum koşullarda lakkaz üretim verimi *S. coelicolor* ve *Streptomyces M 33-1*' de sırası ile 35 U/ml/ gr substrat, 6,3 U/ml/ gr substrat olarak bulunmuştur. Optimize edilen ortamda üretilen lakkazın kinetik parametreleri *S. coelicolor* ve *Streptomyces M33-1* için sırası ile k_m değeri 0,7- 0,43 mM, V_{max} değeri 53,5 - 8,17 μ mol substrat/ dak olarak bulunmuştur.

Optimum pH değeri her iki enzim için de substrat olarak ABTS kullanıldığında pH 3, termal stabilite çalışmasında *S. coelicolor* ve *Streptomyces M33-1* için 70⁰C' deki yarı ömürleri sırası ile 94 dakika ve 38 dakika olarak bulunmuştur.

Anahtar sözcükler: Lakkaz, Buğday kepeği, Katı kültür fermantasyonu, *Streptomyces coelicolor*, optimizasyon

ABSTRACT**Comparison of Laccase Producer *Streptomyces Spp.* Performances under Solid State Fermentation Conditions**

In this study, optimum condition for the production of laccase in solid state fermentation has been determined. *Streptomyces coelicolor* M145 and isolate *Streptomyces M33-1* obtained from Ege University Bioengineering department actinomycetes culture collection were used as biocatalists.

Best conditions for the improvement of laccase production were determined, including medium composition and the effect of various inducers. Optimisation of solid state process variables were determined by using response surface methodology. Laccase production yields for *Streptomyces coelicolor* M145 and *Streptomyces* M33-1 under optimum conditions were 3,5 U/ml/gr substrate and 0,63 U/ml/gr substrate respectively. Kinetic parameters for *S.coelicolor* and *Streptomyces* M33-1 laccases were k_m value 0,7- 0,43 mM and V_{max} value 53,5- 8,17 μmol substrate/ min respectively.

When using ABTS as a substrate, pH 3.0 was found optimum for both laccases and half life of enzymes at 70°C were found as 94 min and 38 min for *S. coelicolor* and *S. M33-1*, respectively.

Key words: Laccase, wheat bran, Solid state fermentation, *Streptomyces coelicolor*, Optimisation

TEŞEKKÜR

Tez süresince desteğini kesmeyen ve kritik noktalarda önemli önerilerle ve müdahalelerle teze büyük katkılar koyan danışmanım Yrd. Doç. Dr. Sayit SARGIN' a, çalıştığım mikroorganizmanın teminini sağlayan, aktinomisetler hakkındaki bilgisi ile mikroorganizmayı daha verimli bir şekilde kullanmamı sağlayan Doç. Dr. Esin KOCABAŞ' a, tezimin çeşitli dönemlerinde bana yardım eden lisans öğrencilerine, bölümün kurulması ve sürdürülmesini sağlayan bölüm başkanımız Prof. Dr. Fazilet Vardar SUKAN ve Biyomühendislik ekibine, aileme, düşünce ve paylaşımları ile birlikte olmaktan keyif duyduğum sevgili dostlarıma çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
1.GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
2.1 Lakkaz Enzimi	3
2.1.1 Lakkaz enziminin yapısı	3
2.1.2. Lakkazın çalışma mekanizması	9
2.1.3. Lakkazın substratları	10
2.1.4. Lakkazın genel özellikleri.....	14
2.1.5 Lakkazın canlılar alemindeki dağılımı ve görevleri	18
2.1.6 Lakkazın endüstriyel kullanım alanları.....	22
2.2 Katı Kültür Fermantasyonu.....	25
2.2.1 Katı kültür fermantasyonunun tanımı	25

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.2.2 Katı kültür fermantasyonu ile derin kültür fermantasyonunun karşılaştırılması	27
2.2.3 Katı kültür fermantasyonunu etkileyen faktörler	30
2.2.4 Katı kültür fermantasyonunun genel aşamaları	36
2.2.5 Katı kültür fermantasyonu kullanılarak lakkaz üretimi	38
2.3 <i>Streptomyces</i> ' lar	39
2.3.1 <i>Streptomyces</i> ' ların özellikleri	40
2.3.2. <i>Streptomyces</i> ' ların kültivasyonu	41
2.3.3 <i>Streptomyces</i> ' ların kültivasyonu	42
2.3.4 Literatürde, lakkaz üretimi çalışması yapılmış <i>Streptomyces</i> türleri....	43
2.4 Yanıt Yüzeyi Yöntemi (YYY)	45
3. MATERYAL METOD	47
3.1 Materyal	47
3.1.1 Mikroorganizma	47
3.1.2 Substratlar	47
3.1.3 Üretimde kullanılan besi ortamları	47
3.2 Metod	48

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2.1 Lakkaz üreticisi organizmaların taranması	48
3.2.2 Üretim öncesi işlemler	48
3.2.3 Üretim	50
3.2.4 Üretim sonrası işlemler	51
3.2.5 Lakkaz aktivite tayini.....	51
3.2.6 Lakkaz üretiminde verim artırma çalışmaları	54
4 ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	59
4.1 Lakkaz Üreticisi Türlerin Taranması	59
4.2 Substratın pH Değerlerinin Ayarlanması.....	60
4.3 <i>Streptomyces Coelicolor</i> M145 İçin Üretim Koşullarının Optimizasyonu	63
4.3.1 Azot kaynağı türü, konsantrasyonu ve optimum üretim süresinin belirlenmesi.....	64
4.3.2 Optimum azot miktarının belirlenmesi	64
4.3.3 İki farklı azot kaynağı kullanımının lakkaz üretimine etkisi	66
4.3.4 Mineral madde ve iz elementlerin optimizasyonu	67
4.3.5 Besi ortamı bileşenlerinin belirlenmesi	69

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.3.6 Yüzey yanıt yöntemi ile katı kültür değişkenlerinin optimizasyonu	70
4.3.7 Harici bir karbon kaynağı ile besi ortamının desteklenmesinin lakkaz enzimi üretimi üzerine etkisinin incelenmesi.....	80
4.3.8 İndükleyici maddelerin lakkaz üretimine etkisi	80
4.4. <i>Streptomyces</i> M33-1 İzolatı ile Yapılan Üretim Denemeleri	81
4.4.1 pH ayarlama yöntemi	81
4.4.2 Azot kaynağının belirlenmesi.....	82
4.4.3 Optimum azot konsantrasyonunun belirlenmesi	82
4.4.4 çeşitli bileşiklerin aktiviteye olan etkileri ve besi ortamı bileşimi	83
4.4.5 <i>Streptomyces</i> M33-1' de katı kültür değişkenlerinin optimizasyonu ..	86
4.4.6 Harici bir karbon kaynağı ile besi ortamının desteklenmesi	90
4.4.7 indükleyici maddelerin lakkaz sentezine etkileri	90
4.5 Üretilen Enzimlerin Kinetik ve Stabilite Özelliklerinin İncelenmesi	91
4.5.1 Lakkazların kinetik sabitleri.....	92
4.5.2 Sıcaklık ve pH' ın enzim aktivite ve dayanıklılığına etkisi.....	92
4.5.3 Organik çözügenlerde lakkaz aktivitesi.....	95

5 SONUÇLAR.....	98
6 ÖNERİLER.....	100
7 KAYNAKLAR.....	101
8 ÖZGEÇMİŞ.....	106

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 <i>Bacillus subtilis</i> lakkazı.....	4
2.2 Lakkaz aktif bölgesinin yapısı.....	10
2.3 Fungal lakkazın katalitik mekanizması	12
2.4 Lakkaz' ın mediyatörü oksitleme mekanizmaları	14
2.5 Lakkazın canlılar alemindeki dağılımı	19
2.6 Substrat üzerindeki mikrobiyal büyüme.....	35
2.7 Substrat hücre arasındaki ilişkinin yakından görünümü	36
2.8 <i>Streptomyces</i> ' ların hayat döngüsü.....	42
4.1 Lakkaz aktivitesinin varlık yokluk testi	59
4.2 Lakkaz üreticisi <i>Streptomyces</i> türleri	59
4.3 Buğday kepeği üzerinde büyüyen <i>S.coelicolor</i> M145.....	63
4.4 5. günde değişen NH ₄ NO ₃ konsantrasyonlarına göre lakkaz aktivitesi.....	66
4.5 İkinci bir azot kaynağının kullanımında 0,33 gr NH ₄ NO ₃ ' lı ortamda elde edilen aktivite değerleri.....	67
4.6 İkinci bir azot kaynağı kullanımında 0,11 gr NH ₄ NO ₃ içeren ortamdan elde edilen aktivite değerleri.....	67

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.7 MgSO ₄ miktarının lakkaz üretimine etkisi	68
4.8 CuSO ₄ miktarının lakkaz üretimine etkisi.....	68
4.9 Çeşitli metal ve mineral kaynaklarının lakkaz üretimine etkisi.....	69
4.10 <i>S. coelicolor</i> M145' in Çizelge 4.12'deki verilere göre oluşturulan lakkaz üretiminin yüzey yanıtı.....	72
4.11 <i>S. coelicolor</i> M145' in Çizelge 4.15' teki verilere göre oluşturulan lakkaz üretiminin yüzey yanıtı.....	76
4.12 <i>S. coelicolor</i> M145' in Çizelge 4.18' deki verilere göre oluşturulan lakkaz üretiminin yanıt yüzeyi.....	78
4.13 Lakkaz aktivitesinin inokule edilen spor sayısı ile değişimi	79
4.14 <i>S. coelicolor</i> M145' te indükleyici maddelerin lakkaz sentezine etkisi.....	81
4.15 <i>Streptomyces</i> M33-1'de NH ₄ NO ₃ miktarı ile lakkaz sentezi arasındaki ilişki	83
4.16 <i>Streptomyces</i> M33-1' in lakkaz sentezine çeşitli maddelerin etkisi ...	83
4.17 <i>Streptomyces</i> M33-1 de Demir ve borun lakkaz sentezine etkisi	85

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.18 Merkezi Karma Tasarım da (MKT) kodlanan değerler ve gözlenen yanıt.....	85
4.19 <i>Streptomyces</i> M33-1’de lakkaz aktivitesinin yanıt yüzey grafiği	88
4.20 <i>Streptomyces</i> M33-1 için optimum noktaların belirlenmesi	89
4.21 <i>Streptomyces</i> M33-1 için indükleyici ajanların lakkaz aktivitesine etkisi	91
4.22 70°C’ de inkübe edilen Slac’ ın termal stabilite grafiği	93
4.23 70°C ‘ de inkübe edilen, <i>Streptomyces</i> M33-1’den elde edilen lakkazın zamana göre aktivite değerleri	94
4.24 Slac’ ın farklı etanol su karışımındaki relatif aktivite değerleri	95
4.25 <i>Streptomyces</i> M33-1’ den elde edilen lakkazın farklı etanol su karışımlarındaki bağıl aktiviteleri	96

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Farklı kaynaklardan elde edilen lakkazların T1 bölgesinin redoks potansiyelleri	5
2.2 Farklı kaynaklardan izole edilen lakkazların bazı özellikleri.....	6
2.3 Çeşitli organizmalardan elde edilen lakkazların sabit sıcaklık ve pH' ta Km değerleri.....	16
2.4 Bazı prokaryotik canlılarda lakkaz benzeri proteinler ve olası fonksiyonları	21
2.5 Katı kültür fermantasyonunun tarihsel gelişimi	27
2.6 Literatürde lakkaz üretiminde kullanılan farklı doğal destek maddesi üzerinde büyüyen beyaz çürükçül funguslar.....	38
2.7 Literatürde lakkaz üretimi yapılan <i>Streptomyces</i> türleri, ürettikleri lakkaz ve özellikleri.....	44
3.1 Taranan organik ve inorganik azot kaynakları	47
3.2 <i>S.coelicolor</i> M145' in besi ortamı kompozisyonunun belirlenmesi için kullanılan element ve bileşikler.....	55
3.3 <i>S.coelicolor</i> M145' in lakkaz üretimi için YYY' de kullanılan değişkenler ev tasarım aralıkları (1).....	56

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.4 <i>S. coelicolor</i> M145' in lakkaz üretimi için YYY' de kullanılan değişkenler ve tasarım aralıkları (2)	57
3.5 <i>S. coelicolor</i> M145' in lakkaz üretimi için YYY' de kullanılan değişken ve tasarım aralıkları (3).....	57
3.6 <i>Streptomyces</i> M33-1 ' in lakkaz üretimi için 2 ⁴⁻¹ faktöryel tasarımda kullanılan değişkenler ve tasarım aralıkları.....	57
3.7 <i>Streptomyces</i> M33-1' in lakkaz üretimi için YYY' de kullanılan değişken ve tasarım aralıkları	57
4.1 Lakkaz aktivitesi bulunan <i>Streptomyces</i> türleri	60
4.2 Buğday kepeğinde tris tampon kullanılarak pH' ın ayarlanması.....	61
4.3 Buğday kepeğinde NaOH kullanılarak pH' ın ayarlanması	61
4.4 Buğday kepeğinde CaCO ₃ kullanılarak pH' ın ayarlanması.....	61
4.5 Çayda NaOH- CaCO ₃ kullanılarak pH' ın ayarlanması	62
4.6 Çayda, Tris tampon kullanılarak pH' ın ayarlanması	62
4.7 Zeytinde Tris tampon kullanılarak pH 'ın ayarlanması	62
4.8 <i>S. coelicolor</i> M145' te aktivite bulunan azot kaynakları	64
4.9 Değişen azot konsantrasyonlarında aktivitenin zamana göre dağılımı....	65

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.10 <i>S. coelicolor</i> M145 için farklı azot konsantrasyonlarında lakkaz verim- verimlilik tablosu	65
4.11 Azot oranı korunarak karıştırılan iki farklı azot kaynağındaki lakkaz değerleri	66
4.12 <i>S. coelicolor</i> M145 için merkezi karma tasarımda kodlanan değerler ve gözlenen yanıt (1)	71
4.13 İkinci dereceden tasarımın ANOVA' sı (<i>S. coelicolor</i> M145/ lakkaz)(1).....	71
4.14 Tasarımın güvenilirliği ile ilgili istatistiksel veriler (<i>S. coelicolor</i> M145/ lakkaz)(2)	72
4.15 MKT' de kodlanan değerler ve gözlenen yanıt (<i>S. coelicolor</i> M145/lakkaz)(2)	74
4.16 İndirgenmiş ikinci dereceden modelin ANOVA' sı (<i>S. coelicolor</i> M145/lakkaz)(2)	74
4.17 Modelin güvenilirliği ile ilgili istatistiksel veriler (<i>S. coelicolor</i> M145/ lakkaz)(3)	75
4.18 MKT' de kodlanan değerler ve gözlenen yanıt (<i>S. coelicolor</i> M145/ lakkaz)(3).....	77
4.19 İndirgenmiş ikinci dereceden modelin ANOVA' sı (<i>S. coelicolor</i> M145/ lakkaz)(3)	77

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.20 Model güvenilirliğinin testi için gerekli istatistiki veriler (<i>S. coelicolor</i> M145/ lakkaz).....	78
4.21 <i>S. coelicolor</i> M145' ten lakkaz üretimi prosesi için optimum değerler	79
4.22 <i>S. coelicolor</i> M145 için farklı oranlardaki buğday kepeği- çay karışımından elde edilen lakkaz aktivite değerleri.....	80
4.23 <i>Streptomyces</i> M33-1 için pH ayarlama yöntemi ve elde edilen aktivite değerleri	82
4.24 <i>Streptomyces</i> M33-1' de aktivite bulunan azot kaynakları)	82
4.25 24-1 faktöriyel tasarımda kodlanan değerler ve gözlenen yanıt (<i>Streptomyces</i> M33-1).....	84
4.26 24-1 faktöriyel tasarımının ANOVA' sı (<i>Streptomyces</i> M33-1/ lakkaz)	84
4.27 Model güvenilirliğinin testi için gerekli istatistiki veriler	84
4.28 Demir ve borun miktarının lakkaz aktivitesine etkisi (<i>Streptomyces</i> M33-1).....	86
4.29 MKT' de kodlanan değerler ve gözlenen yanıt (<i>Streptomyces</i> M33-1/ lakkaz).....	87
4.30 MKT' de indirgenmiş ikinci dereceden denklemin ANOVA' sı.....	88

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.31 Modelin güvenilirliği ile ilgili istatistiki veriler (<i>Streptomyces</i> M33-1/ lakkaz)	88
4.32 <i>Streptomyces</i> M33-1' de lakkaz üretimi için optimum koşullar	89
4.33 <i>Streptomyces</i> M33-1 için farklı oranlardaki buğday kepeği- çay karışımından elde edilen lakkaz aktivite değerleri.....	90
4.34 <i>Streptomyces coelicolor</i> M145'ten elde edilen lakkaz ' ın kinetik parametreleri.....	92
4.35 Slac için pH- aktivite değerleri.....	93
4.36 Farklı sürelerde %50 etanolde bekletilen örneklerinin lakkaz aktivite değerleri.....	96

1.GİRİŞ:

Biyoteknoloji yüzyılında birçok biyoteknolojik süreç hızlı bir şekilde gelişmekte ve ilerlemektedir. Biyoteknolojik üretimler; enzimlerden antibiyotiklere, tek hücre proteinlerinden antikora, biyoplastiklerden biyoyakıtlara kadar çok geniş çapta ürün çeşitliliğini içermektedir. Bu üretimler, hücre veya enzim gibi biyokatalist ajanlar kullanılarak gerçekleştirilmektedir.

Günümüzdeki biyoteknolojik prosesler belli başlı organizmalar tarafından yürütülmektedirler Bu sık kullanılan organizma türlerinden bir tanesi de *Streptomyces*' lardır. *Streptomyces* türleri funguslar gibi substrat miseli havasal misel ve spor oluşumunu içeren kompleks bir hayat döngüleri vardır. *Streptomyces*' lar birçok hücre dışı metabolit sentezleyebilmektedirler. Bu metabolitler arasında antibiyotikler, pigmentler gibi ikincil metabolitler, hücre dışı enzimler ve proteinler gelmektedir. Hücre dışı enzimlerin salgılanması ile *Streptomyces*'lar, morfolojik farklılaşma, antibiyotik sentezinin, tamamlanması, pigmentasyon, hücre dışındaki rekalsitrant polimerik materyalin sindirimi gibi birçok metabolik fonksiyonu yerine getirebilmektedir.

Katı kültür fermantasyon (KKF)' u teknolojisi insanlık tarihinde kullanılan en eski teknolojilerden biridir. Günümüzde de geçerliliğini koruyan bu teknoloji sayesinde, ikincil metabolit, enzim gibi önemli ürünlerin üretimleri gerçekleştirilmektedir. KKF' nin günümüzde geçerliliğini korumasını sağlayan ve alternatifi sıvı kültüre göre bazı önemli avantajları bulunmaktadır. Özellikle katı kültür fermantasyonu miselli organizmaların gelişimini ve hayat döngülerini teşvik edici yapıdadır. Statik katı tabaka hücrelerin morfogenezini teşvik eder. Bu sayede morfogenez sırasında salgılanan enzimlerin sentezi gerçekleşebilir. Ayrıca katı kültürde substrat olarak kullanılan lignoselülozik atıklar, hücre dışı sindirim enzimlerinin üretimini teşvik eder.

Lakkaz birçok canlı tarafından kullanılan bir enzimdir. Canlılar lakkaz ile önemli metabolik faaliyetlerini yerine getirebilmiştir. Lakkaz, hücre dışı sindirim

enzimi olarak rekalsitran polimerlerin depolimerizasyonunda, morfolojik farklılaşmada veya pigmentasyon gibi polimerizasyon işlemlerini gerçekleştirebilir. Canlılar aleminde geniş bir kullanım alanı bulan lakkaz, teknolojik alanda da yine aynı düzeyde geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Lakkazın ucuz, zahmetsiz, oksijen ile rejenere olabilen, dayanıklı, çevre dostu doğası geniş bir substrat aralığının olması ve birçok proseste atık olarak açığa çıkan veya birçok biyoteknolojik ürünün temel yapı taşını oluşturan işlenmesi zor fenolik bileşikleri işlenebilir kılması lakkazı vazgeçilmez bir biyokatalist yapmıştır.

Projede hedeflenen; geniş bir metabolik çeşitliliğe sahip *Streptomyces* türleri kullanılarak, katı kültür fermantasyonunun sağladığı avantajlardan yararlanılarak biyoteknolojik öneme sahip lakkaz enzimi üretiminin verimli bir biçimde gerçekleştirilmesidir. Bunun için yapılan işlemler lakkaz üretim prosesinde verimli üretici türlerin seçilmesi, bu türler için uygun besi ortamının belirlenmesi, katı kültür değişkenlerinin optimizasyonu ve çeşitli uygulamalar ile katı kültür performansının geliştirilebilmesidir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Lakkaz Enzimi

Lakkaz; E.C. 1.10.3.2; *p*-difenol: oksijen oksidoredüktaz (Morozova et al, 2007) çoklu- bakır mavi proteini süper ailesine ait bir enzimdir. Lakkaz; tarihte ilk defa Japonya’ da 1883 yılında lacquer ağacından izole edilmiştir. İsmi (LAC-CASE) de bu ağaçtan almıştır (Alcalde, 2004). Çoklu bakır mavi protein süper ailesi (MCBP); çoklu protein domain’ lerini içermekte ve bakır iyonlarının sahip olduğu redoks yeteneğini kullanmaktadırlar. MCBP kabaca domain organizasyonu ve fonksiyonlarına göre 3 gruba ayrılırlar.

- i- Nitrit redüktaz tip 2 domaine sahiptir.
- ii- Lakkaz tip 3 domaine sahiptir
- iii- Seruloplasmin tip 6 domaine sahiptir.

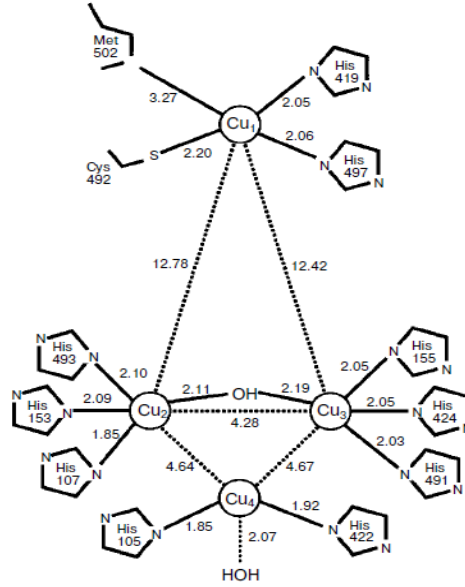
2. ve 3. tip gruplara genellikle çoklu bakır oksidaz grubu (MCO) denmektedir. (Nakamura and Go, 2005). Lakkaz, MCO grubuna ait olmasından dolayı, grubun karakteristik özelliklerini taşımaktadır. Monomerinin molekül ağırlığı 50 – 100 kDa arasında değişmektedir (Claus, 2004). Lakkaz, aktivite gösterebildiği geniş bir substrat aralığına sahiptir. Yükselttiği substratlardan aldığı elektronları içerisinde depolayan lakkaz, rejenerasyonu için havadaki oksijeni kullanması sayesinde, hem NAD/NADH gibi kofaktörlere ihtiyaç duymamakta, hem de oksijen ile tepkimesi sonunda sadece su açığa çıkmasından dolayı, lakkaz çevre dostu bir oksitleyici ajan haline gelmiştir. Genellikle hücre dışı bir enzim olan lakkazın termal ve pH dayanırlılığının yüksek olması ise lakkazı özel yapan diğer bir özelliğidir (Herrera et al, 2007).

2.1.1. Lakkaz enziminin yapısı

Lakkaz 3 domainden meydana gelmektedir. Bu domainlerden; 1. ve 3. domain Bakır iyonlarını taşır ve lakkazın aktif bölgesini oluştururken 2. domain substratın bağlanmasına yardım eden bölgedir (Machczynski et al, 2004).

Lakkaz içindeki bakır iyonları; spektral ve EPR (elektron paramanyetik rezonans) karakteristiklerine göre sınıflandırılmıştır. T1 bölgesi, enzim çözeltisine

açık mavi renk vermektedir. T1 bölgesi; imidazol içeren 2 histidin ile sülfidril gruplu bir sistein tarafından oluşturulan üç köşeli yapıyı oluşturur. Yüksek redoks potansiyeline sahip olması nedeni ile lakkazın substratı oksitleyen kısmı burasıdır. T1 bölgesinin redoks potansiyel değeri ile lakkazın katalitik verimlilik (Kcat/Km) değeri arasında bir ilişki olduğu düşünülmektedir (Kunamneni, 2007). Çizelge 2.1’ de çeşitli organizmalardan elde edilen edilen lakkazların redoks potansiyeli verilmektedir. T1 bölgesindeki bakır iyonu, civa (Hg) veya kobalt ile (Co) değiştirilebilir. (Morozova et al, 2007). Tek çekirdekli T2, bakır iyonunun oluşturabildiği üç köşeli kompleks oluşturmuştur. (Morozova et al, 2007). Şekil 2.1’ de lakkazın aktif bölgelerini oluşturan bakır iyonları ve bunlara bağlanan aminoasitler gösterilmiştir. Lakkaz’ ın T3 bölgesi 2 çekirdekli bakır bölgesidir. T2/T3 yapısına imidazol vasıtası ile 8 histidin bağlanmıştır (Morozova et al, 2007). Bu yapı; lakkazın oksijen ile etkileştiği bölgedir (Dwivedi et al., 2011).



Şekil 2.1: *Bacillus subtilis* lakkazı (Morozova et al, 2007)

Bakır atomlarına bağlı aminoasitler, lakkazın redoks potansiyelini ayarlamaktadır. Birçok fungal lakkaz; monomerik, dimerik veya tetramerik glikoproteinlerdir. Lakkaz proteinlerinin glikolizasyonu;

- Lakkazın hücre tarafından algılanmasında,
- proteolitik degradasyona olan duyarlılığında
- aktif bölgesinin bakırı tutmasında ve

- lakkazın termal dayanıklılığında rol oynadığı düşünülmektedir (Kunamneni, 2007).

Lakkaza bu özellikleri kazandıran karbonhidrat kısmı toplam ağırlığın (fungal hücrelerden elde edilen lakkazlarda) %10- 45' ini oluşturmaktadır (Claus, 2004). 10 ile 45 arasında gelip giden büyük fark; temel olarak lakkazın ortam kompozisyonuna göre yapısının değişmesinden kaynaklanmaktadır (Kunamneni, 2007). Çizelge 2.2' de çeşitli canlılardan elde edilen lakkazların karbonhidrat içerikleri ve glikolizasyon değerleri verilmiştir.

Çizelge 2.1: Farklı kaynaklardan elde edilen lakkazların T1 bölgesinin redoks potansiyelleri (Morozova et al, 2007)

Lakkaz	T1 bölgesinin redoks potansiyeli
Yüksek redoks potansiyelli olanlar	
<i>Trametes trogi</i>	790
<i>Trametes ochracea</i>	790
<i>Trametes hirsuta</i>	780
<i>Trametes villosa</i>	780
<i>Trametes versicolor</i>	780
<i>Cariolopsis fulvocinorea</i>	780
<i>Cerrena maxima</i>	750
<i>Trametes pubescens LAC1</i>	746
<i>Pleurotus ostreatus POXC</i>	740
<i>Trametes pubescens LAC1</i>	738
<i>Basidiomycete C30 Lac1</i>	730
<i>Rigidoporus lignosus B</i>	730
Orta potansiyelliler	
<i>Rhizoctonia solani</i>	710
<i>Rigidoporus lignosus D</i>	700
<i>Pleurotus ostreatus POXA1b</i>	650
<i>Basidiomycete C30 Lac2</i>	560
<i>Coprinus cinereus</i>	550

<i>Trichophyton rubrum</i>	540
<i>Bacidiomycete C30 Lac</i>	530
<i>Scytalidium thermophilum</i>	510
<i>Myceliophthora thermophila</i>	470
Düşük potansiyelliler	
<i>Rhus vernicifera</i>	430
Ascorbate oxidase	

Çizelge 2.2: Farklı kaynaklardan izole edilen lakkazların bazı özellikleri (Morozova et al, 2007).

Lakkaz	M _a kD	Karbonhidrat %	pI	Optimum sıcaklık (°C)	Yarı ömrü(h)
1	2	3	4	5	6
Bitki lakkazı					
<i>Rhus vernicifera</i>	110	45			
<i>Rhus succedanea</i>	130				
<i>Acer pseudaneae</i>	97	40-45			
<i>Pinus taeda</i>	90	22			
<i>Liriodendron tulifera</i>	61		9.3-9.5		
Fungal lakkaz					
<i>Agaricus bisporus</i>	65	15			
<i>Agaricus blazei</i>	66		4.0	20	
<i>Basidiomycete</i>	64	6.5	3.6	80	
<i>Botrytis cinerea</i>	74	49	4.0	60	
<i>Ceriporiopsis subvermispora L1</i>	71	15	3.4		T ⁶⁰ =2
<i>L2</i>	68	10	4.8		T ⁶⁰ =1
<i>Cerrena maxima</i>	67	13	3.5		T ⁵⁰ =52
<i>Cerrena maxima</i>	57	13	3.5	50	T ⁶⁰ =12
<i>Cerrena unicolor</i>	66		3.95		T ⁶⁰ =2.5

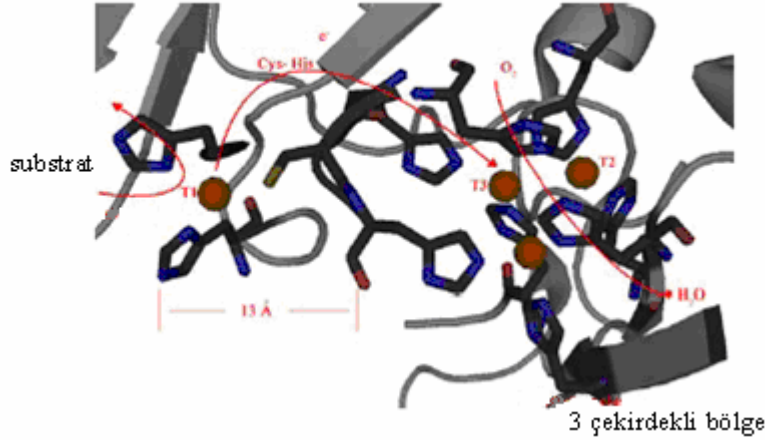
1	2	3	4	5	6
<i>Cerrena unicolor 0784</i>	56	23	3,75		
<i>Cerrena unicolor 137</i>	64		3,6	60	
<i>LaccI</i>	57		3,7	60	
<i>LaccII</i>					
<i>Chaeromium thermophilium</i>	77		5.1	60	T ⁵⁰ =12
<i>Coprinus cinereus</i>	58		4.0	60	
<i>Coriolopsis fulvocinerea</i>	54	32	3.5		
<i>Coriolopsis fulvocinerea</i>	65	32	3.5		T ⁵⁰ =64
<i>Coriolopsis gallica</i>	84	21	4.3	70	T ⁶⁰ =192
<i>Coriolopsis rigida</i>	66	9	3.9		
<i>Coriolus hirsutus</i>	73	11	7.4	45	
<i>Coriolus hirsutus</i>	55	12	4.0		T ⁵⁰ =72
<i>Coriolus zonatus</i>	60	10	4.6	55	
<i>Daedalea quercina</i>	69		3.0	60	T ⁶⁵ =0.5
<i>Gaeumannomyces graminis</i>	190	12	5.6		
<i>Magnaporthe grisea</i>	70		6.0	30	
<i>Marasmiium quercophilus</i>	63	12	3.6	75	
<i>Mauginiella sp.</i>	63	5-7	4.8-6.4		T ⁶⁰ =0.7
<i>Melanocarpus albomyces</i>	80			60-70	T ⁶⁰ =5
<i>Neurospora crassa</i>	65	11	4.0		T ⁵⁰ =72
<i>Panus rads</i>	58	8		60	
<i>Panus tigrinus</i>	69	6.9	3.5	55	T ⁶⁰ =0.4
<i>Phellinus ribis</i>	152	28	3.15		

1	2	3	4	5	6
<i>Pleurotus eryngii</i>	65	7	4.1	65	$T^{50}=0.5$
<i>II</i>	61	1	4.2	55	$T^{55}=0.5$
<i>Pleurotus ostreatus</i> <i>POXA1b</i>	62	3	6.9	20-50	$T^{60}=3$
<i>Pleurotus ostreatus</i> <i>POXA1w</i>	61	9	6.7	45-65	$T^{60}=3.3$
<i>Pleurotus ostreatus</i> <i>POXA2</i>	67		4.0	25-35	$T^{60}=0.2$
<i>Pleurotus ostreatus</i> <i>POXA3a</i>	83-85		4.1	35	$T^{40}=6$
<i>Pleurotus ostreatus</i> <i>POXA3b</i>	83-85		4.3 3.3	35	$T^{40}=14$
<i>Pleurotus ostreatus</i> <i>POXC</i>	59	5		50-60	$T^{60}=0.5$
<i>Polyporus versicolor</i> A	64.4	14	3.0-3.2		
<i>B</i>	64.7	10	4.6-6.7		
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	81	9	3.7		$T^{70}=1$
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	63	11	3.0		$T^{80}=2$
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	58		6.7	55	$T^{75}=3$
<i>Rhizoctonia solani</i>	130	10	7.5		
<i>Rigidoporus lignosus</i>	54		3.2	40	$T^{65}=0.5$
<i>Sclerotium rolfsii</i>	55		5.2	62	$T^{60}=1$
<i>Lac</i>	60	4	3.0	70	
<i>II</i>					
<i>Trametes hirsuta</i>	70	12	4.2		$T^{50}=65$
<i>Trametes ochracea</i>	64	10	4.7		$T^{50}=56$
<i>Trametes pubescens</i> <i>Lac I</i>	67	13	5.1		

1	2	3	4	5	6
<i>Trametes pubescens II</i>	61	1	4.2	55	$T^{55}=0.5$
<i>Trametes pubescens Lac II</i>	67	13	5.3		
<i>Trametes pubescens</i>	65	18	2.6		
<i>Trametes versicolor I</i>	67	10-12			
<i>II</i>	70				
<i>Trametes villoas I</i>	130	14	3.5		
<i>3</i>	126	7	6.5		
<i>Trametes sp C30</i>	65		3.2		
<i>Trametes sp. AH 28-2</i>	62	11-12	4.2		$T^{75}=0.5$
<i>Trichphyton rubrum</i>	65		4.0		$T^{60}=0.25$

2.1.2 Lakkazın çalışma mekanizması

İkili ping pong Bi-Bi tepkime mekanizması lakkazın nasıl çalıştığını anlatan mekanizmadır. Lakkaz bir batarya gibi substrattan kopardığı elektronları bakır iyonlarında tutar (Alcalde, 2007). İndirgenen lakkaz, elektronca doyduktan sonra dışarıdan harici bir elektron koparamaz. Bu nedenden dolayı aktivite gösteremez. Lakkazın yeniden aktivite gösterebilmesi için substratından kopardığı elektronları başka bir kaynağa verebilmesi gerekmektedir. Bu işlem için lakkaz oksijeni kullanmaktadır. Üç çekirdekli bölgeye ulaşan oksijen molekülleri T2-T3 bakır bölgesinden elektronları alarak, lakkazı yükseltger ve bu sayede lakkaz yeniden aktivite gösterebilir. Şekil 2.2' de lakkaz molekülü ve üzerindeki elektron akışı gösterilmiştir.

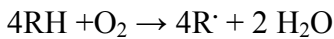


Şekil 2.2: Lakkaz aktif bölgesinin yapısı. Oklar elektronların oksijene ulaşırken izlediği yolu göstermektedir (Giardina, 2009).

Lakkazın oksitleyebildiği substratların geniş bir yelpazesi olmasına karşın, indirgediği kosubstratı olan oksijene karşı yüksek birleşme eğilimi ($K_m O_2 10^{-5} M$ (Alcalde, 2007)) ve seçicilik göstermektedir. Bu özellik;

- Lakkaz içinde bulunan çözgen kanallarının oksijeni 3 çekirdekli bölgeye ulaştırması için uygun yapıda olması,
- Lakkaz' ın O_2 bağlanma paketi; O_2 harici okside edici ajanlarının (H_2O_2 , Cl_2 , $NO_3...$) bağlanma bölgesine girmesine izin vermemesinden kaynaklanmaktadır (Kunamneni et al., 2007).

Lakkazın katalizlediği tepkime için stokiometrik bir eşitlik yazıldığında;



elde edilir.

2.1.3. Lakkazın Substratları

Lakkaz, tercihen fenolik bileşikler üzerinde etki göstermesinin yanında fenolik olmayan bileşikler ve metal iyonlarını da indirgeyebilme özelliğine sahiptir (Giardina et al., 2010).

Lakkazın fenolik substratları arasında;

0- difenoller: kateşol, gallik asit, kafeik asit (Tuncer, 2009)

p- difenoller: Hidrokinon, p-aminofenol, p- fenilendiamin p- pozisyonlu aromatik bileşikler (Tuncer, 2009)

Aminofenoller: Benzoksazol, fenilhidroksi amin

Metoksi substitute fenol L- tirozin, p- kumarik asit ve o-hidroksifenilaseti veya salisilik asit (Tuncer, 2009)

m-difenoller: resorsinol, orsinol

diğer lakkaz substratları: şiringaldezin , 1- naftol, ABTS yer alır.

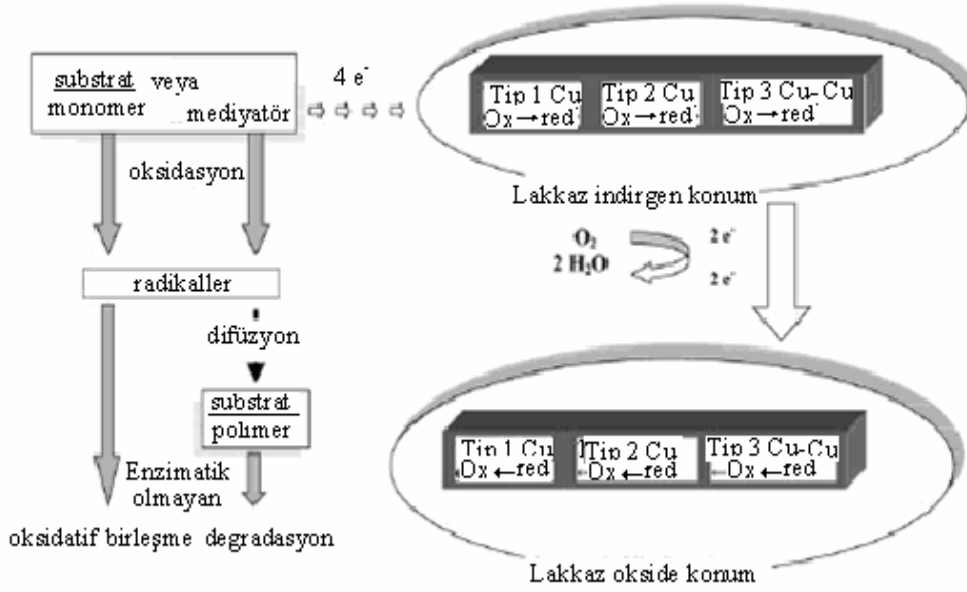
Bilinen bütün lakkazlar askorbik asidi ve fenölü benzer verimlilikte okside edebilmektedir. Hidrokinon ve kateşol gibi basit difenoller, lakkazın verimli çalıştığı guaiakol ise lakkazın çok yüksek verim ile çalıştığı substrattır. p-fenilen diamin sıklıkla kullanılan substratlar arasındadır (Giardina et al., 2010). İnorganik/ organik metal bileşikler de lakkaz substratları arasındadır. Mn^{+2} , Cu^{+2} , FeEDTA yine enzim tarafından indirgenebilen bileşiklerdendir. Lakkazın oksitleyebildiği substrat aralığı bir lakkazdan diğerine değişim göstermektedir.

Lakkazın substratlarına olan özgülüğü 1-10 mM K_m^{DH} arasında değişirken V_{max} (enzimin aktivitesinin en yüksek olduğu değer) değeri ise lakkazın kaynağına ve oksitlediği substrata göre 50- 300 $M\text{sg}^{-1}$ (molar substrat/ gr enzyme) arasında değişmektedir (Alcalde, 2007).

2.1.3.1. Yükseltgenen Substrat:

Substrat lakkaz tarafından oksitlendiğinde, başka bir deyişle elektronunu vererek pozitif yüklü radikal haline geldiğinde, substratın kararlı elektron düzeni zarar görmüştür. Substrat pozitif yüklü iyon haline gelmesi ile eksik elektronunu tamamlamak için dışarıdan bir elektron kaynağı arayarak kararlı hale gelmek isteyecektir. Substrat kararlı hale gelebilmek için 3 farklı yol izler. (Şekil 2.3)

- Monomerlerin çapraz bağlanması
- Polimerlerin degradasyonu
- Aromatik bileşiklerde aromatik halkanın koparılması



Şekil 2.3 : Fungal lakkazın katalitik mekanizması (Claus, 2003).

1. Monomerlerin oksidatif birleşmesi:

Fenolik bileşiklerin ve anilinlerin lakkaz tarafından enzimatik oksitlenmesi (örn guaicol, pirogallol) radikalik bileşikler oluşturur. Bu radikalik bileşikler C-C, C-O, C-N bağları ile birbirlerine bağlanarak tepkimeye girerler ve dimer, oligomer veya polimerleri oluştururlar. Son ürünün ne olacağı; ortamın pH'ına ara ürünlerin reaktivitesine bağlıdır. Toprakta doğal ve ksenobiyotik fenolik bileşikler veya aromatik aminler oksidatif birleşme ile organik humik matrikse tutturulur. Bileşikteki yan halkaya göre, reaksiyon kısmi demetilasyon veya dehalojenizasyon şeklini alır (Sharma and Kuhad, 2008).

2. Polimerlerin degradasyonu:

Lakkaz, kompleks doğal polimerlerin örneğin lignin veya humik asit bozunmasında görev alır. Üretilen reaktif radikaller kovalent bağları parçalayarak (özellikle -aryl, -alkyl) monomerlerin açığa çıkmasını sağlarlar. Yapısal engelden dolayı, lakkaz doğrudan polimer ile temasa geçemez. Lakkaz tarafından okside edilerek aktive edilebilen küçük organik bileşikler veya metaller, radikal katalizli depolimerizasyonu başlatırlar. Fizyolojik olmayan redoks- mediatorler biyoteknolojik proseslerde kullanılarak lakkazın oksitleyebilme potansiyelini arttıırırlar (Sharma and Kumar, 2008).

3. Aromatik bileşiklerde halkanın kırılması:

Elektron kaybeden aromatik halka, ihtiyaç duyduğu elektronu kendi içinden çeker. Böylece aromatik kısım kararsız bir hal alır ve aromatik yapının açılması ile sonuçlanan parçalanma meydana gelir (Sharma and Kuhad, 2008).

2.1.3.2. Mediyatorler:

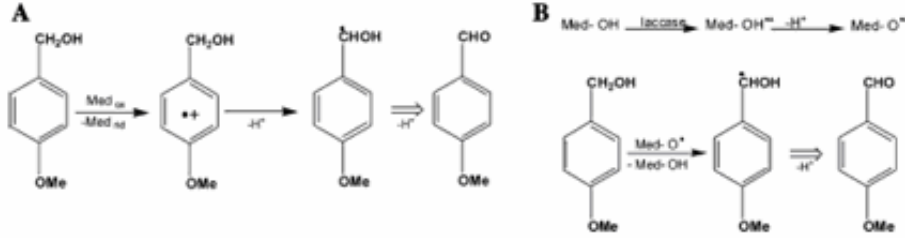
Lakkazın yükseltgeyebildiği bazı substratlar, diğerlerine göre bir takım özellik taşırlar. Taşıdıkları bu özellikler sayesinde lakkaz ile uyumlu bir redoks çifti oluştururlar ve lakkazın redoks özelliğini, gerek lakkazın yapı fonksiyon veya boyutundan dolayı kaynaklanan kısıtlarından kurtulmasını veya bu kısıtları bir adım daha geriletmesini sağlamaktadır. Örneğin lignoselülozik maddenin yoğun yapısından dolayı lakkaz, substratı olan lignini oluşturan fenoliklere ulaşamaz. Ancak küçük boyutlu mediyatörler sayesinde bu kısıt ortadan kalkar ve lignin degradasyonu gerçekleşir (Giardina et al., 2009).

İyi bir redoks mediyatörü;

- Lakkaza yüksek ilgisi olmalı
- Radikal formunun yarı ömrü, radikalın substrata ulaşım, substratı oksitleyebileceği kadar uzun olmalıdır.
- Kararlı bir yapısı olmalı
- Boyut olarak küçük olmalı
- Etkili bir oksidasyon için yüksek bir oksidasyon potansiyeline sahip olmalıdır (Giardina et al., 2009).

Lakkaz/ mediyatör katalizli nonfenolik substratların oksidasyonu 2 farklı mekanizma içerir. ABTS (2,2'- azno-bis-[3- etil benzotiazolin- 6- sülfonik asit]) yardımı ile gerçekleşen mekanizmalar elektron transfer (ET) yolu, >N-OH tip mediyatörlerin kullanıldığı sistemlerde ise hidrojen atomu transferi (HAT) yolu ile hidrojen atomunun koparılması sonucu oluşan >N-O' radikali substratı oksitler. Lakkazın elektron koparabilmesi için, ABTS' nin oksitlenmesinde görev alan ET yol izinde substratın (ABTS) düşük oksidasyon potansiyeline sahip olması,

>N-OH tip mediyatör kullanıldığında ise zayıf C-H bağının olması gerekir (Giardina et al., 2009). Şekil 2.4' te elektron transferi, hidrojen koparılması yol izleri gösterilmiştir.



Şekil 2.4: Lakkaz'ın mediyatörü oksitleme mekanizmaları: ET yol izi (a), radikal HAT (b) yol izi ile yükseltgemesi (Giardina et al., 2010).

2.1.3.3. Lakkazın inhibitörleri:

Lakkaz, birçok ajan tarafından inhibe olmaktadır. Küçük anyonlar, halojenler, azit, siyanür ve hidroksit. Bu iyonlar T2-T3 bakıra bağlanıp, enzim içindeki elektron transferini engelleyerek, enzimi inhibe eder. Metal iyonları (Hg^{+2} , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Sn^{+2} , Ba^{+2} , Co^{+2} , Cd^{+2} , Mn^{+2} ve Zn^{+2}), yağ asitleri, sülfidril re ajanları, hidroksiglisin, kojik asit, EDTA, l-sistein, ditiotritol, glutatyon, tiyoüre ve kuaterner amonyum deterjanları da inhibisyona neden olmaktadır. Lakkaz organik çözenlerde de gerek inhibisyon gerekse denatürasyondan dolayı aktivite kaybı yaşamaktadır. İnhibitörler; Cu(II) atomunu şelatlayarak, aminoasit uçlarını değiştirerek veya glikoproteinlerin üç boyutlu yapısında değişime neden olarak lakkazı inhibe etmektedirler (Dwivedi et al., 2010; Alcalde, 2007).

2.1.4. Lakkazın genel özellikleri

2.1.4.1. İzozim:

Funguslar tarafından salgılanan birçok lakkaz aynı enzimin izoformları şeklindedir. Bu izozimler; lakkaz kodlayan aynı veya farklı genler tarafından kodlanmaktadır. İzozim sayısı türden türe, hatta türün kendi içinde bile indüklenip indüklenmemesine göre değişiklik göstermektedir. Bu izozimler stabilite, optimum pH ve sıcaklık farklı substratlara olan ilgileri bile değişiklik

göstermektedir. Dahası bu farklı izozimler farklı türlerde farklı fizyolojik rol oynamakta veya aynı türün bulunduğu farklı koşullarda farklı fizyolojik roller üstlenmektedir (Kunamneni et al., 2007). Lakkazların yapı ve fonksiyonlarındaki bu farklılıklar sıralanırsa;

- Lakkaz; hücrenin farklı bölgelerinde farklı fonksiyonlara,
- Protein davranışı; hücrenin içinde ve hücre dışında farklı özelliklere,
- Farklı hücre tiplerinde lakkaz farklı fonksiyonlara,
- Substrata, ürüne veya kofaktöre bağlanmalarına göre farklı aktiviteye,
- Farklı substratlara karşı farklı bağlanma bölgesine sahiptirler.

2.1.4.2. pH' ın lakkaz aktivite ve stabilitesine olan etkisi:

Lakkaz için optimum çalışma pH' ı substrata göre değişiklik göstermektedir. ABTS, substrat olarak kullanıldığında optimum pH 3-5 arası bulunmuştur. Genelde lakkaz aktivitesi çan eğrisi şeklinde bir profil sergilemektedir. Bu farklılık, substrat, oksijen veya enzimin kendisinden kaynaklı olabilmektedir. Fenolik substrat ve T1 bakır arasındaki redoks potansiyeli farkı sistem pH' ı arttıkça artar. Bu özelliğinden dolayı, substrat lakkaz tarafından yüksek pH' larda daha iyi oksitlenirken, bazik pH' larda OH⁻ iyonunun T2/T3 bakır bölgesine bağlanması, bu bağlanma sonucunda ise T2/T3 bölgesi ile T1 bölgesi arasındaki elektron transferinin kesilmesine neden olur. Böylece OH⁻ iyonları kaynaklı lakkaz inhibisyonu gerçekleşir. Bu 2 zıt etki lakkaz aktivitesinde optimum pH' ın oluşmasında temel teşkil etmektedir. *Trametes modesta* pH 4 te en yüksek düzeyde aktif ve pH 4.5 ta stabil iken pH 3 te yarı ömrü 125 dakikadır (Kunamneni, 2007).

Ancak OH⁻ inhibisyonu ile lakkazın kendisi oksitlemesi engellenebilmekte böylelikle lakkaz çözeltileri daha uzun süreli saklanabilmektedir. Lakkaz' ın OH⁻ inhibisyonuna örnek olarak incelenen 3 lakkazın pH 6.5 üzeri pH' larda inhibe oldukları görülmüş, literatürde incelenen diğer bir lakkazın ise pH 7.4' te aktivitesinin %50 azaldığı belirlenmiştir. Ancak istisnai örneklerden *Streptomyces coelicolor M145'* dan elde edilen lakkaz (SLac)' ta yüksek pH larda aktivite

gözlenmiştir. DMP üzerindeki aktivitesinde SLac' ın optimum aktivitesi pH 8.2 de yakaladığı görülmüştür (Machczynsky et al., 2004).

Kunamneni (2007)' ye göre aktivite, enzim kaynağına, substrat türüne, reaksiyon türüne göre değişim göstermektedir. Kinetik sabitler pH' a göre farklılık gösterir. Km; hem substrat hem kosubstrat için pH' tan bağımsız iken Kcat, pH' a bağlıdır.

Dwivedi et al. (2010)' a göre ise lakkazın; hem substrat özgülüğü hem de substrata olan ilgisi pH ile değişmektedir. Substratlardan, oksidasyonu proton değişimi şeklinde olmayan substratlarda (örneğin ferrosiyanit), lakkaz aktivitesi, pH' ın artması ile azalmaktadır. Substratlarda proton değişimine dayalı oksitlenme (örneğin fenol)' nin olduğu substratlarda ise bir optimum pH değeri elde edilmektedir. Fenol için fungal ve bakteriyel lakkazın optimum pH aralığı 3 ile 7 arasında iken bitkilerde bu değer 9' a çıkmaktadır. Fungal lakkazlardaki optimum değerinin düşük pH olmasının nedeni fungusların asidik ortamda gelişmeye adapte olmaları iken bitki lakkazının optimal pH değerinin bazik (7-9) olması, bitkileri fizyolojik çalışma aralığının bu değerlerde olmasından kaynaklanmaktadır (7-9) (Dwivedi et al, 2010). Çizelge 2,3' te belirli pH ve sıcaklıkta çeşitli organizmalardan elde edilen lakkazların kinetik sabiti (Km) değerleri gösterilmiştir.

Çizelge 2.3: Çeşitli organizmalardan elde edilen lakkazların sabit sıcaklık ve pH' ta Km değerleri (Dwivedi et al., 2010)

Substrat/ organizma	Km	Organizma	pH	Sıcaklık
Bakteri				
Şiringaldezin	0,008	<i>Bacillus subtilis</i>	7.6	37
2,6- dimetoksifenol	0,035	<i>Bacillus subtilis</i>	7.6	37
K ₄ (FeCN ₆)	0,027	<i>Bacillus subtilis</i>	7.6	37
	0,069	<i>Bacillus subtilis</i>	7.6	37
N,N dimetil- 1,4-fenilene diamin	0.42	<i>Streptomyces griseus</i>	6.5	40
2,6	0.0567	<i>Bacillus</i>	7	85

dimetoksifenol		<i>licheniformis</i>		
ABTS	0.049	<i>Bacillus subtilis</i>	7.6	37
	0.11	<i>Bacillus subtilis</i>	3	
Fungus				
Şiringaldezin	0.0028	<i>Physisporinus rivulosus</i>	3	25
	0.0018	<i>Melenocarpus albomyces</i>	6	
	0.004	<i>Agaricus blazet</i>	5.5	20
	0.008	<i>Trametes versicolor</i>	4.5	25
	0.091	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	5	25
	0.026	<i>Basidiomycota sp.</i>	4.5	25
2,6-Dimetoksifenol	0.00086	<i>Phlebia fascicularia</i>	3	70
	0.026	<i>Trametes versicolor</i>	4.5	25
	0.203	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	4	25
	0.43	<i>Pleurotus ostreatus</i>	7	25
	1.026	<i>Agaricus blazet</i>	5.5	20
	8.8	<i>Pleurotus ostreatus</i>	5.5	25
	56	<i>Cyathus bulleri</i>	5.2	45
Askorbik asit	0.175	<i>Lentinus edodes</i>	4	50
	0.192	<i>Podospora anserine</i>	5.5	
Kateşol	1.05	<i>Chaetomiaceae sp.</i>	7	30
	1.72	<i>Lentinula edodes</i>	3	30
Dikateşol	3.65	<i>Pleurotus ostreatus</i>	7	25
Ferulik asit	1.39	<i>Lentinula edodes</i>	5	30
	14	<i>Cyathus bulleri</i>	5.2	45
Askorbik asit	0.192	<i>Podospora anserine</i>	5.5	
Kateşol	1.05	<i>Chaetomiaceae sp.</i>	7	30
N,N-dimetil-1,4-fenilendiamin	0.212	<i>Chaetomiaceae sp.</i>	7	30
Pirogalol	0.023	<i>Chaetomiaceae sp.</i>	7	30
	24.6	<i>Lentinula edodes</i>	3	30
Vanilik asit	0.28	<i>Trametes versicolor</i>		
	2.92	<i>Fomes fomentarius</i>		

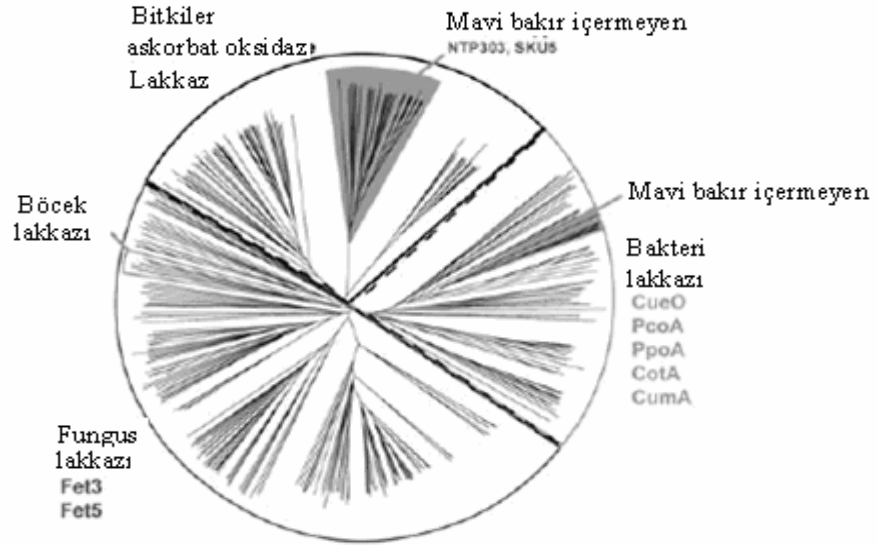
O ₂	0.25	<i>Botyitis cinerea</i>		
ABTS	0.0107	<i>Physisporinus rivulosus</i>	3	25
	0.0065	<i>Bacillus licheniformis</i>	4	85
	0.27	<i>Fomitella fraxinea</i>	3	70
	0.00134	<i>Trametes hirsute</i>	4.5	50
	0.00632	<i>Trametes hirsute</i>	4.5	50
	0.00128	<i>Trametes versicolor</i>	3	50
	0.063	<i>Agaricus blazet</i>	5.5	20
	0.045	<i>Trichophyton rubrum</i>	5.5	20
Bitki				
Koniferil alkol	0.002	<i>Populus euramericana</i>		
p-kumaril alkol	0.02	<i>Populus euramericana</i>		
o-fenilenediamn	41	<i>Rhus vernicifera</i>	5	
4-metil kateşol	1.56	<i>Populus euramericana</i>		
	4.5	<i>Acer pseudoplatanus</i>	6.6	
Hidrokinon	0.001	<i>Populus euramericana</i>		
	0.123	<i>Chaeromiaceae sp.</i>	7	30
N,N-dimetil-1,4-fenilenediamin	3.3	<i>Rhus vernicifera</i>	7	25
O ₂	0.02	<i>Acer pseudoplatanus</i>	6.6	
ABTS	0.03	<i>Populus euramerkana</i>		

2.1.4.3. Sıcaklığın lakkaz aktivite ve stabilitesine etkisi:

Lakkaz için optimum sıcaklık değeri 50- 70°C arasında değişir. Ancak bazı lakkazlarda optimum sıcaklık 35°C' nin altındadır. Lakkazın termal dayanıklılığı, sentezlendiği hücrenin büyüme sıcaklığı ile ilişkilidir. Fungal lakkazlar bakteriyel lakkaza göre daha düşük bir termal dayanıklılığa sahiptirler. Lakkazın termal stabilitesi, bakır merkezlerindeki bakır iyonlarının ve tuz köprülerinin etkileşiminden kaynaklandığı gibi lakkaz içindeki protein yapının kurduğu hidrojen bağları ile de ilişkilidir. (Dwivedi et al., 2010)

2.1.5. Lakkazın canlılar alemindeki dağılımı ve görevleri

Lakkaz, böceklerden bitkilere funguslardan aktinomisetlere, *bacillus* sporlarından, siyanobakterilere kadar canlılar aleminde çok geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Şekil 2.5' te 3 domainli çoklu bakır oksidazların canlılar alemindeki dağılımını göstermektedir (Sharma and Kuhad, 2008).



Şekil 2.5: Lakkazın canlılar üzerindeki dağılımı (Nakamura and Go, 2005)

2.1.5.1. Fungal lakkaz:

Funguslarda lakkaz; ascomycetes, duteromycetes ve basidiomycetes türlerinde yoğun bir şekilde gözlenmektedir.

Fungal lakkazlar;

- Ligninin parçalanması
- Pigmentasyon (çevre stresine karşı geliştirilen dihidroksinaptalen melanin)
- Funguslarda meyvelenme yapılarının pigmentasyonunda
- Fungal morfogenez
- Detoksifikasyon, fenolik bileşiklerin uzaklaştırılmasında (Giardina, 2010)
- Sporulasyon
- Bakır homeostasisi (Giardina et al., 2010)
- Patojenlikte görev almaktadır.

Bitki patojeni funguslar bitkinin sentezlediği toksik bileşikleri detoksifiye ederek fungal hücrelerin hayatta kalmasını sağlamaktadırlar. *Cryptococcus neoformans*; lakkaz konukçu kateşolaminlerini kullanarak melanin sentezlemekte ve böylece konukçunun savunma hücrelerine karşı savunma geliştirebilmekte ve konukçuya daha fazla zarar verebilmektedir (Giardina et al., 2010).

2.1.5.2. Bitki lakkazı:

Tarihte izole edilen ilk lakkaz *Rhus vernicifera*' dan izole edilen lakkaz olmuştur. Akabinde lakkaz birçok bitki türünde de gözlenmiştir. Bazı bitkilerde lakkazın çoklu formu görünmektedir.

- *Pinus taeda*, (çam) da 8 adet lakkaz görülmüştür
- Kavaklarda, odun borusu dokularında 5 adet lakkaz izozimi görülmüştür.
- Çınar ağacının hücre süspansiyonunda lakkazın üretilip, salgılandığı gözlenmiştir.
- Lale' nin ksilem dokularında lakkaz varlığı gözlenmiştir.

Bitkilerde lakkaz;

- Lignin polimerizasyonu ve hücre duvarı sentezinde
- Yaralanmaya karşı toksik fenolik bileşik sentezi ile yanıt (Alcalde, 2007)
- Yara iyileşmesi
- Demirin oksitlemesinde (Fe^{+2} , Fe^{+3}) kullanılmaktadır.

Hem bitkisel, hem fungal lakkaz glikozitlenmiş enzimlerdir. Bitki lakkazı fungal lakkaza göre (10- 25%) daha yüksek düzeyde glikozitlenme göstermektedir (22- 45%). Bitki lakkazı fungal lakkaza göre daha büyük boyuttadır.(Dwivedi et al., 2010)

2.1.5.3. Böcek lakkazı:

Lakkaz tipi 3 domain MCBP' ler böceklerde de bulunmatadır. Filogenetik ağaçta 3- domain MCBP, böcek lakkazı fungal lakkazın ortasında kalan bağımsız bir gruptur. Domates kurdu, Sıtma sivrisineği lakkazı klonlanıp karakterize edilmiştir. Arı zehrinde de lakkaz aktivitesi gözlenmiştir. Böcek lakkazı ile bitki ve fungal lakkaz arasındaki önemli farklar böcek lakkazının diğer lakkazlara göre; sisteinler, aromatik ve yüklü uçlar ile korunan daha uzun amino terminal

sekanslara sahip olması gelmektedir. Böceklerde lakkaz- tipi proteinler; epidermiste, dış kabuğun sağlamlaştırılmasını sağlamaktadır. Enzimin birçok kateşolik substrata karşı aktivitesinin olduğu görülmüştür. Böceklerde bulunan lakkaz tipi enzimler böcek epidermisinde dağılmıştır. Ayrıca böceklerin orta midesinde, malpigi tüplerinde ve salgı bezlerinde de gözlenmiştir. Enzimin iç organlarda ne iş yaptığı tam olarak anlaşılamamıştır.

2.1.5.4. Bakteriyel lakkaz:

İlk bakteriyel lakkaz bitki köklerinde yaşayan *Azospirillum lipoferum*' da bulunmuştur. Bu organizmada lakkaz melanin sentezinde görev aldığı görülmüştür. *Bacillus subtilis*' te sıcaklığa dayanıklı Cot A lakkaz' ın varlığı keşfedilmiştir. Cot A endosporu kaplayan kahverengi spor pigmentlerinin sentezini gerçekleştirmektedir. Cot A ile *Bacillus* sporları UV ışığa ve hidrojen peroksit'e karşı dayanıklılık kazanmışlardır. Lakkaz, *Pseudomonas* türlerinde Mn^{+2} ' nin oksitlenmesinde kullanılmaktadır (Claus, 2003). Çizelge 2.4' te çeşitli canlılarda bulunan lakkazın canlıdaki olası işlevlerini göstermektedir.

Çizelge 2.4: Bazı prokaryotik canlılarda lakkaz benzeri proteinler ve olası fonksiyonları (Claus,2003)

Tür	Olası fonksiyonları
<i>Aquifex aeolicus</i>	Hücre bölünme proteini
<i>Azospirillum lipoferum</i>	Pigmentasyon, elektron transportu,
<i>Bacillus sp</i> (mnxG)	Sporulasyon, Mn^{+2} oksidasyonu
<i>Bacillus sphaericus</i>	Sporulasyon, pigmentasyon
<i>Bacillus subtilis</i> (CotA)	Sporların pigmentasyonu, UV ve H_2O_2 ' ye karşı dirençlilik
<i>Escherichia coli</i>	Bakır akışı, fenolat-siderofor oksidasyonu, ferrokسيداز aktivitesi
<i>Marinomonas mediterranea</i> (ppoA)	Pigmentasyon
<i>Oceanobacillus iheyensis</i> (cotA)	Sporulasyon
<i>Pseudomonas maltophila</i>	Nükleoside oksidaz aktivitesi

<i>Pseudomonas putida</i> (CumA)	Mn oksidasyonu
<i>Pseudomonas spp.</i> (CumA)	Mn okidasyonu
<i>Pseudomonas syringae</i> (copA)	Cu dirençliliği
<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	Bilinmiyor
<i>Streptomyces antibiyoticus</i>	Fenoksazinon sentezi
<i>Xanthomonas campestris</i>	Cu dirençliliği

2.1.6. Lakkazın endüstriyel kullanım alanları

Lakkaz ile yapılan araştırmalarda, lakkazın endüstriyel bir katalist olması için

- Yüksek Kcat/ Km değerleri
- Endüstriyel atıkları ve diğer endüstriyel substansları inhibe olmadan oksitleyebilmesi
- Yüksek termal dayanıklılık ve yüksek pH larda aktivite gösterebilmesi'nin gerekli olduğu gösterilmiş ve özellikle protein mühendisliği ve genetik araştırmaları bu yöne kaymıştır. Ayrıca lakkaz ile yapılan diğer araştırmaların içerisinde diğer endüstriyel enzimler gibi lakkaz da, zararlı kimyasalların yerini almıştır. Bu alanda temel olarak;
 - Enerji kullanımını azaltmakta
 - Yeni ürün kimyası oluşturmakta.
 - Proseslerin ekonomik ve çevresel maliyetinin azaltılmasını içermektedir (Skalova et al., 2007). Lakkazın geniş bir substrat aralığına sahip olması, bu enzimi birçok endüstriyel kuruluşa hitap edebilecek konuma getirmiştir. Lakkazın düşük sıcaklık ve basınçta çalışması ile sağlanan enerji tasarrufu, biyobozunur olması, lakkaz tabanlı biyokatalistlerin yüksek verimde, kabul edilebilir ve doğa dostu bir oksitleyici ajan olması lakkazı vazgeçilmez kılan önemli özellikleridir. Günümüzde lakkaz başlıca;
 - Kağıt hamuru ve kağıt
 - Tekstil
 - Organik sentez
 - Çevresel
 - Gıda

- Farmasötik
- Nanobiyoteknoloji alanlarında kullanılmaktadır (Kunamneni et al., 2008).

2.1.6.1. Hamur (Kağıtçılık Endüstrisi):

Kağıdın hazırlanmasında, ligninin bozunması, klor veya oksijen tabanlı kimyasal oksidanlar aracılığı ile yapılmaktadır. Lakkaz ile yapılan klor-süz ağartma işlemi daha beyaz kağıtların eldesinde kullanılmıştır. Odun hamurunun ön işlemden geçirilmesinde kullanılan geleneksel klor tabanlı ağartıcıların aksine lakkaz ile yapılan ağartma işlemleri alternatif kimyasal uygulamalara göre daha yumuşak ve daha temiz bir oksitleme kaynağıdır. Diğer bir proses ise boya giderimi ve renk giderme işlemlerinde kullanılmasıdır.

Tekstil endüstrisinde; ticari tekstil uygulamalarında kullanılır. Bu alanda; denim kumaşların ağartılmasında ve biyo- taşıma işlemlerinde kullanılmaktadır. Bu uygulama ile kimyasal, enerji ve su girdilerinden tasarruf edilmekte ayrıca sağlığa zararlı kimyasallar kullanılmayarak gerek çalışan gerek kıyafeti giyen için daha sağlıklı bir ortam sağlanmaktadır. Kıyafet ve bulaşıklarda arındırıcı olarak kullanılmaktadır. Kumaşlar, kanepeler, perde veya deterjanlarda kıyafet yıkama esnasında oluşan kokunun giderilmesinde kullanılmaktadır (Kunamneni et al., 2008).

2.1.6.2. Gıda endüstrisi:

Birçok lakkaz substratı olan; karbonhidrat, doymamış yağ asitleri, fenol ve tiol içeren proteinler gıdaların içindeki önemli bileşenlerdir. Bu bileşenlerin lakkaz ile modifikasyonu yeni fonksiyonellik, kalite geliştirilmesi veya maliyetlerin azaltılmasını sağlar. Bazı durumlarda oksijen gıdanın kalitesini bozmaktadır. Sistemdeki oksijenin uzaklaştırılmasında kullanılır. Bitkisel yağlardaki yağ kalitesi keza oksijen giderilmesi ile artmaktadır. Kakaonun işleme sürecinde de oksijensizleştirme lakkaz ile yapılmaktadır.

Fungal lakkaz ile etkileşime sokulan çay tabanlı ürünlerin renklerinin geliştirilmesi sağlanmıştır. Ferulik asit ve şeker pancarı pektininin oksidatif bağlanma ile jel oluşturması, meyve suyu stabilizasyonu yine lakkaz tarafından gerçekleştirilebilen bir prostestir. Hamurdaki gluten yapılarını kuvvetlendirici etkide bulunarak hamur kalitesinin veya hamur işi ürünlerin kalitesini artırır.

Şarap stabilizasyonu lakkaz tarafından yapılabilmektedir geleneksel fizikokimyasal adsorbsiyon yöntemlerine bir alternatif oluşturmaktadır (Kunamneni et al., 2008).

2.1.6.3. Biyoremediasyon:

Lakkaz, biyoremediasyon da birçok işlemi gerçekleştirebilir. Lakkaz, birçok maddeyi degrade edebilir. Örneğin istenmeyen kontaminantlar, yan ürünler veya atılan materyaller. Lakkaz, olefin içeren plastik ürünleri de degrade edebilmektedir. LMS (lakkaz mediyatör sistemi) radikal zincir reaksiyonu başlatarak plastiğin parçalanmasını sağlar. LMS sistemi poliüretanlarında parçalanmasını sağlamaktadır. LMS; bifenol ve alkil fenol safhasındaki fenolik bileşiklerin (çevresel hormonların) parçalanmalarını kolaylaştırır (Kunamneni et al., 2008).

2.1.6.4. Organik sentez :

Mayalara klonlanan lakkaz geni etanol üretiminde, inhibitör olarak açığa çıkan lignoselülozik hidrolizatlara karşı direnç sağlamaktadır. Ayrıca; Akrilamid polimerizasyonu, Nişastanın oksidasyonunda, Selüloz ve diğer polisakkaritlerin kısmi parçalanmasında lakkaz sayesinde gerçekleştirilebilen uygulamalardır.

Yapımı geleneksel formaldehit tabanlı kimyasallar kullanılarak üretilen polimerik polifenollerin sentezinde alternatif olarak kullanılmaktadır. Birçok fonksiyonel organik bileşik sentezinde kullanılmaktadır. Örneğin özgül mekanik/elektriksel/ optik özelliği olan polimerler, tekstil boyaları, kozmetik pigmentler, tatlandırıcılar ve pestisitlerin sentezi gibi birçok organik maddenin sentezinde kullanılırlar (Kunamneni et al., 2008).

2.1.6.5. Farmasötik sektörü:

Anestetikler, anti-inflamatory ilaçlar, antibiyotikler, yatıştırıcılar gibi sağlık alanında kullanılan aktif bileşenlerin sentezinde görev almaktadır.

Lakkaz tabanlı uygulamalar iyot' un in situ oluşturulması, ayrıca günümüzde en büyük hastalıklardanbiri olan AIDS' in nedeni olan HIV nin çoğalmasını

engellemek (HIV-1 revers transkriptaz inhibitörü)' tedir. Aceruloplasminemia (seruloplasmin yokluğunda ortaya çıkan sağlık durumu) ile mücadelede kullanılmaktadır.Morfin ve kodeini birbirinden ayırmaya yarayan sensörlerin geliştirilmesinde.Kozmetik sektöründe ise lakkaz tabanlı saç boyaları saçları daha az tahriş ederek saçları boyamakta. Deri beyazlatıcısı olarak kullanılmaktadır. Kişisel hijyen ürünü olarak kullanılan diş macunu, ağız çalkalama suyu, deterjan, sabun ve pedlerde deodorant olarak kullanılmaktadır (Kunamneni et al., 2008).

2.1.6.6. Nanobiyoteknoloji:

Biyosensör ve biyoyakıt hücrelerinde kullanılmaktadır. Glukoz, aromatik amin ve fenolik bileşiklerin tanısında, diğer enzimlerin tanısında kullanılmaktadır. Biyosensör yapımında ve biyoyakıt hücrelerinde kullanılmaktadır Lakkaz biyoyakıt hücresinin katot kısmına tutuklandırılarak enerji elde edilmesi sağlanmıştır (Kunamneni et al., 2008).

2.2. Katı Kültür Fermantasyonu (KKF)

2.2.1. Katı kültür fermantasyonunun tanımı:

Mikroorganizmaların doğal yaşamında serbest su bulunmamaktadır. Keza denizel mikroorganizmaların %98 bile su içinde yüzmek yerine su altında bulunan katı bir yüzeye tutunmayı tercih etmektedirler. Doğal habitatı katı bir yüzey (toprak) olan mikroorganizmalar birçok metabolik faaliyetlerini de evrimsel süreçte bu ortamlara uyum sağlamak için ayarlamışlardır. Bu yüzden özellikle yabani tip organizmaların kullanıldığı derin kültür fermantasyonu ile enzim veya ikincil metabolit üretimi prosesleri, az bir alanda uygulama imkanı bulabilmiştir. Bu avantajlarına rağmen katı kültür fermantasyon sistemi, karşılaşılan mühendislik problemlerinden dolayı kendisine çok az bir alanda kullanım imkanı bulabilmiştir (Hölker and Lenz, 2004).

Katı kültür fermantasyonu; mikroorganizmanın, serbest su içermeyen nemli katı madde üzerinde üretimi sürecidir. Nemli katı madde, inert taşıyıcı veya karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılan çözünmeyen substrat şeklinde olabilir. (Guerra, 2003; Singhania, 2008; Hölker and Lenz, 2004). Fermantasyon serbest

suyun yokluğu veya çok az miktarda bulunduğu koşullarda gerçekleşir. KKF'un amacı mikroorganizmayı çözünmeyen substrat ile karşılaştırmak böylece yüksek substrat konsantrasyonlarında fermantasyonu gerçekleştirmektir. Bu teknoloji küçük ölçekte verimli bir şekilde çalışmakta ve derin kültüre nazaran çok önemli avantajlara sahip olmakta iken büyük ölçekte birçok sıkıntı yaşanmaktadır (Hölker and Lenz, 2004).

Son yıllarda katı kültür fermantasyonundaki biyokimya mühendisliği bakış açısını anlamak için yoğun çalışmalar yapılmıştır. Katı kültür fermantasyonu teknolojisinin insanlık tarihindeki en eski teknolojilerden birisi olmasına rağmen hala teknik problemler çözüme kavuşturulamamıştır. Kökeni 5000 yıllık bir geçmişe dayanmakta olan katı kültür; *Aspergillus oryzae* kullanılarak pirinç' in fermantasyonunun 5000 yıllık, küf *Penicillium roquefortii* kullanılarak peynir yapımının 4000 yıllık ve Asyada kullanılan soya sosu ise 3000 yıllık bir katı kültür geçmişe sahiptir. Çizelge 2.5' te katı kültür fermantasyonunun tarihsel gelişimi gösterilmektedir (Hölker and Lenz, 2004).

Çizelge 2.5: Katı kültür fermantasyonunun zamanla kullanım alanlarının çeşitlenmesi (Herrera et al, 2007).

Zaman	Gelişim
MÖ 2,600	Mısırdaki Ekmek yapımı
MÖ 1000 yılları Asya	<i>Penicillium roquefortii</i> den peynir yapımı
2,500	Balık fermantasyonu/şeker, nişasta, tuz vb şeyler ile koruma Koji prosesi
7. yüzyıl	Koji prosesi Çin den japonya' ya
18. yüzyıl	Üzüm posasından sirke yapımı
1860-1900	Lağım suyu (sewage) arıtımı
1900-1920	Fungal enzimler (amilaz), kojik asit
1920-1940	Fungal enzimler, glukonik asit, döner tamburlu fermentörler, sitrik asit
1940-1950	Fermantasyon endüstrisinde gelişme. Sıvı ve Katı kültürde Penisilin üretimi
1950-1960	Fungal kültürler ile steroid

	transformasyonu
1960-1980	Mikotoksin üretimi, proteince zengin besinler
1980- günümüze	Alkolden- giberilik asite kadar birçok ürün

2.2.2 Katı kültür fermantasyonu ile derin kültür fermantasyonunun karşılaştırılması:

2.2.2.1. Katı kültür fermantasyonunun Avantajlar

Doğada mikroorganizmalar katı bir yüzey üzerinde bulunmaktadır. Doğal ortamı en iyi taklit eden katı kültürün; birçok özelliği bakımından sıvı kültüre göre birçok avantajı vardır. Katı kültürün avantajları arasında;

- Sıvı kültüre göre benzer veya daha yüksek verimde çalışmaları
- Düşük seviyede su içermesi ile bakteri ve maya kontaminasyonunun önlenmesi bu sayede de aseptik koşulların sağlanması
- Doğal habitatı ile benzer çevresel koşulların oluşturulması
- Yüksek seviyede havalandırma sağlanabilmesi
- Spor şeklinde inokülasyon ile eşit şekilde dağılması sağlanmaktadır.
- Sporun direk ekimi ile uzun bir süre alan ön kültür çalışmalarına gerek duyulmaması
- Kültür ortamı göreceli olarak daha basittir. Kullanılan substrat genellikle büyüme için gerekli maddeleri sağlamaktadır.
- Reaktör dizaynı daha basit olup az miktarda özel gereksinime ihtiyaç duyar.
- Düşük enerji gereksinimi (bazı durumlarda otoklav veya buhar uygulaması, mekanik karıştırma ve havalandırma gerekmemektedir.
- Açığa çıkan kirletici atık miktarı düşüktür.
- Ürün ekstraksiyonunda çözücülere olan gereksinim daha azdır.
- Düşük nem varlığı sıvı kültürde sentezlenemeyen veya çok az miktarda sentezlenebilen özel bileşiklerin sentezlenmesini sağlar

- Bazı durumlarda elde edilen ürün daha değişik özelliklerde olmaktadır (sıcaklığa daha dayanıklı)
- Substratın daha konsantre olmasından dolayı, aynı miktar substrat için katı kültürde sıvı kültüre nazaran daha küçük reaktörler kullanılmaktadır.
- Kolay bulunabilen ucuz substratlar kullanılmaktadır
- Daha konsantre ürün eldesi böylelikle ayırma saflaştırma işleminin daha kolay olması
- Üretim sonrası kalan kısmın hayvan yemi olarak kullanılabilmesi
- Filamentli yapısı olan hücrelerin (fungus, aktinomiset) statik koşullarda filamentleri zarar görmeden büyüebilmektedirler.
- Düşük nem içeriği nedeni ile özellikle maya ve bakteri kontaminasyonlarına karşı daha korumalıdır.
- Daha yüksek volumetrik verimliliğe sahiptir (Hölker and Lenz, 2005)
- Substrat inhibisyonuna daha az meğilli olması (Hölker and Lenz, 2005)
- Enzimlerin yüksek sıcaklık ve pH stabilitesinde olmasıdır (Hölker and Lenz, 2005).
- Fermentasyon süresinin daha az olması ve istenmeyen proteazlardan dolayı enzimlerin parçalanması sıvı kültüre göre daha azdır (Hölker and Lenz, 2005; Herrera et al, 2007).

Ekolojik bakış açısından bakıldığında

- Katı kültür fermentasyonu sistemleri az miktarda su istediği için su tüketimini minimize etmektedir
- Çok daha az atık su ile proses tamamlanmaktadır.
- Ayrıca köpük kırıcı ajanlara ihtiyaç duyulmamaktadır
- Belirli üretimlerin yarı steril bir şekilde yapılabilmesi katı kültürün önemli avantajları arasındadır.
- Enerji ve enstrümantasyon gibi yüksek maliyetli işletim elemanlarını elemine etmektedir.
- Ek olarak katı kültürün çevre dostu diğer yanı ise zirai atıkların karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılmasıdır.
- Enzim üretimi prosesleri özellikle hücre dışı sindirim enzimleri; katı kültürde sıklıkla karbon kaynağı olarak kullanılan bitki artıklarının indükleyici veya mediyatör özelliklerinin olmasıdır (Herrera et al, 2007).

2.2.2.2. Katı kültür fermantasyonunun dezavantajları:

KKF birçok avantajına rağmen özellikle büyük ölçekli üretimlerde rakibi olan derin kültür fermantasyonuna birçok üretimi bırakmıştır. İnsanların katı kültür fermantasyonunu seçmemelerindeki temel nedenler;

- Sadece düşük su aktivitesinde büyüeyebilen mikroorganizmalar kullanılabilir.
 - Genellikle substrat bir ön işlemden geçirilir. (parçalama ile boyut küçültme)
 - Biyokütlenin belirlenmesi zordur.
 - Substratın katı doğası proses parametrelerinin belirlenmesinde problemlere neden olmaktadır.
 - Karıştırma zordur, bu nedenle statik kültür tercih edilmektedir.
 - Yüksek inokulum hacmine ihtiyaç duyulmaktadır.
 - Birçok önemli bilimsel ve mühendislik bakış açısı zayıf tanımlanabilmiştir. Tasarım hakkındaki bilgi az ve büyük ölçek reaktörlerin çalışması nadirdir.
 - İstenmeyen bir fungus ile kontaminasyon yaşanması olasılığı vardır.
 - Metabolik aktivite ile üretilen ısının uzaklaştırılmasında problemler yaşanmaktadır
 - Ürünün özütleme yolu ile fermente katıdan alınmasında fermente katının viskoz (ağdalı) doğası süreci zorlaştırmaktadır.
 - Kütle aktarımının difüzyon ile sınırlanması
 - Bazı katı kültür fermantasyonu sistemlerinde, yüksek katı konsantrasyonu nedeni ile havalandırmanın zor yapılması
 - Sporların çimlenmesi için gerekli sürenin uzun olması (lag faz)
 - Kültivasyon süresinin sıvı kültüre göre daha uzun olması.
 - Sistem değişkenlerinin kontrolünün zor olması. (Mitchell et al., 2006)
 - Heterojenite (sıcaklık, ürün, besin konsantrasyonlarındaki farklılık)
 - Hücre ve katı materyalin ayrılmasındaki güçlükler.
 - Hücre içi ürünlerin alınmasındaki zorluklar
- (Herrera et al., 2007)

2.2.3. Katı kültür fermantasyonunu etkileyen faktörler:

Katı kültür fermantasyonunda üretim sürecini etkileyecek çeşitli parametre ve değişkenler bulunmaktadır.

- İnokulum türü
- Substrat
- Karbon kaynağı ve karbon- azot oranı (C/N)
- Sıcaklık
- Nem ve su aktivitesi
- pH
- Tanecik büyüklüğü
- Havalandırma ve karıştırma' dır (Mitchell et al., 2006).

2.2.3.1. İnokulum şekli:

İnokulasyon için, spor kullanımının, vejetatif hücre kullanımına göre birçok avantajı vardır. Örneğin sporlar inokulum hazırlanırken esneklerdir. Uzun süreli saklanabilmektedirler, uygun olmayan transfer koşullarına karşı dayanıklıdırlar. Ancak sporların bazı dez avantajları vardır. Örneğin uzun lag zamanları, spor çimlenmesi ve vejetatif büyümenin farklı optimum koşullara sahip olması ve daha büyük inokulum hacmine gereksinim duyulmasıdır. Sporlar metabolik olarak faaliyetleri yoktur. Dolayısı ile metabolik faaliyetleri indüklenmelidir. (Krishna, 2005)

2.2.3.2. Substrat:

Bütün katı substratların genel bir ortak özelliği vardır. Yapılarında; nişasta, selüloz, lignosellüloz, pektin ve diğer polisakkaritler vardır. Katı kültürde kullanılan substratlar ya zirai bir ürün ya da zirai bir yan ürün olmaktadır. Makromolekülün yapısı gereği molekül, mikroorganizma için hem bir matriks oluşturmakta hem de kullanacağı karbon ve enerji kaynağını içermektedir. Substratın hazırlanması ve ön işlemlerinin gerçekleşmesi gerekmektedir. (Krishna, 2005)

1. Substrata uygulanan ön işlemler: Substratın mikroorganizma için daha elverişli hale getirilmesi katı kültür performansını etkileyecek önemli bir diğer parametredir. Bu işlemler temel olarak;

- Boyut küçültme: eleme, dövme, rendeleme, parçalama
- Substratın dış tabakasının hasarlanması: ezme, parlatma,
- Polimerlerin kimyasal ve enzimatik parçalanması:
- Besin desteği, nemin ve pH' nın uygun mineral çözeltisi ile istenilen düzeye çekilmesi
- Haşlama veya buhar uygulaması: makromoleküler yapının ön degradasyonunu ve sterilizasyonunu içerir. (Krishna, 2005)

2. Destek materyali ve besin kaynağı: Katı kültür fermentasyonu; kullanılan destek materyali çeşidine göre 2' ye ayrılmaktadır.

a- Katı kültür ortamının hem substrat hem de destek maddesi olarak kullanıldığı durum: Katı faz materyal fonksiyonel olarak hem destek hem de besin olarak kullanılmaktadır. Tarımsal veya hayvansal atıklar destek- besin olarak kullanılabilir.

b- Katı kültür ortamı inert destek maddesi ve substratın ayrı olarak kullanıldığı durum: Katı faz bir inert materyal den oluşmakta ve besin bu materyale emdirilmiş durumdadır. İnert destek besin ve su sağlamaktadır. Şeker kamışı küspesi süngeri, poliüretan gibi inert maddeler kullanılmaktadır. (Gonzales, 2005)

2. model genellikle pek tercih edilmemek ile birlikte bu modelin bazı avantajları vardır. Örneğin tanımlı bir sıvı ortam inert materyale emdirildiğinde homojen fiziksel yapı sayesinde sürecin kontrolünü, monitörlemesini ve fermentasyonun geliştirilmesini sağlayabilir. Ancak inert destek materyali kullanımı ekonomik dezavantajları vardır. Her iki durumda da; sürecin başarısı; destek materyalin fiziksel karakteristiği (partikül büyüklüğü, şekil, porozite,...) ile doğrudan ilgilidir. Destek materyalinin gaz ve besin difüzyonunu, mikroorganizmanın tutunmasını destekler nitelikte olması istenir. Kullanılan materyalin kimyasal kompozisyonu da üretim üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada; araştırmacı, kullandığı substrattaki lignin içeriğinin amaçladığı lignin peroksidaz enzimi sentezini etkilediğini göstermiştir. Ayrıca başka bir çalışmada muz kabukları üzerinde üretilen lakkazın sentetik boyalardaki renk giderimini daha hızlı gerçekleştirdiği görülmüştür (Herrera et al, 2007).

2.2.3.3. Karbon- Azot oranı (C/N)

Her organizmanın kendine özgü bir metabolizması vardır. Bu metabolik faaliyetler sonucu hücre ve ürün oluşumu gerçekleşmektedir. Hücredeki metabolik aktivitelerin ne olduğunun bilinmemesine rağmen (kara kutu modeli); substratı, hücre ve ürünler ile ilişkilendiren kimyasal bir denklem ile göstermek mümkündür. (Türker, 2005). Böyle bir denklikte hücreleri oluşturan ve metabolik faaliyeti için gerekli olan temel bileşenlerin hangi oranlarda gerektiğini görülür. Bu sayade substrat olarak kullandığımız besin elementlerinin (karbon, azot kaynaklarının) dengeli bir şekilde besi ortamına konması ile üretim sonucu herhangi bir bileşenin ortamda kalması veya üretimin az konulan bileşen nedeni ile yarım kalması önlenir. Ayrıca bazı üretimlerde ürünün besi ortamı kompozisyonu ile doğrudan ilişkilidir. Özellikle azot açlığı nedeni ile metabolizmanın polimer sentezine çevrildiği polibütirik asit (PBA) üretimi örnek olarak verilebilir (Türker, 2005).

2.2.3.4. Nem içeriği ve su aktivitesi (Aw)

Katı kültür fermantasyonu prosesi; serbest suyun olmadığı katı tanecik üzerindeki mikrobiyal gelişme olarak tanımlanmıştır. Katı kültür fermentasyonu sisteminde bulunan su, katı matriks üzerinde katı matrikse birleşmiş formda veya tanecik yüzeyine absorblanmış ince tabaka şeklinde veya katının kılcak bölgesinde daha zayıf bir şekilde bağlanmış biçimde bulunur. Serbest su, su miktarı katı matriksin doygunluk kapasitesini aşınca görülür. Ancak nem seviyesi substrata ve su bağlama kapasitesine bağlı olarak değişmektedir. Örneğin kasava ve pirinçte %50- 55 iken çoğu lignoselülozik substratta serbest su % 80 nem düzeylerinde görülür. Katı kültürdeki nem seviyesi 30 ile 85 arasında değişmektedir. Nem değerinin büyüme kinetiği üzerinde belirgin bir etkisi vardır (Mitchell et al, 2006).

Her canlı için bir optimum nem değerinden bahsedilir. Eğer sistemdeki nem çok düşük ise besin difüzyonu, mikrobiyal büyüme, kısıtlı olmakta enzim stabilitesi azalmaktadır. Yüksek nem değerlerinde ise tanecikler kümeleşir, gaz transferi azalır ve bakteriler ile rekabet başlar. Bakteriler için bu değer % 70' in üstünde olması gerekirken funguslarda genellikle % 20- %70 arasındadır.

Genellikle kabul edilen kriter nemlilikten yerine su aktivitesi olmuştur (A_w). Fermantasyon sürecinde su aktivitesi çözünmeyen polimerik substratın çözünebilen monomerik ürünlere dönüşmesinden, suyun buharlaşmasından dolayı azalma göstermektedir.

Düşük su aktivitesinde hücrelerin lag fazı artmakta, özgül üreme hızı düşmekte ve düşük miktarda biyokütle üretilmektedir. Bakteriler, funguslara nazaran daha yüksek su aktivitesi değerine ihtiyaç duymaktadırlar (Krishna, 2005).

2.2.3.5. Sıcaklık ve ısı transferi:

Katı kültür performansına etki eden en önemli faktör sıcaklıktır. Mikrobiyal büyüme, metabolit veya enzim üretimleri sıcaklığa çok hassastır. Fungusların yaşayabilecekleri sıcaklık aralıkları, pH aralıkları gibi geniş olup 20 ile 55 °C arasında (Krishna, 2005), aktinomisetlerin 25- 35 °C arasındadır (Keiser et al, 2000). Katı kültürdeki bu önemli kriteri kontrol edebilmek ise zor olmaktadır. Isı üretimi kaynaklı sıcaklık artışı metabolik aktivite ile doğru orantılıdır. Bölgesel nem içeriği, kültürdeki hava boşlukları ile birleştiğinde sistemde sıcaklık farkları oluşmaktadır (Krishna, 2005).

2.2.3.6. pH:

Her mikroorganizmanın büyüyebileceği ve aktivite gösterebileceği bir pH aralığı vardır.

- Fungus 3.5-6
- Maya 4.5-7
- Bakterilerin pH aralık değerleri ise mayanın pH isteklerine göre daha yüksektir (Pandey, 2003).

Kültür pH' ı metabolik aktivite sonucu değişmektedir. Bunlar içinde başlıca; metabolik ürün olarak açığa çıkan organik asitler (örneğin sitrik, asetik veya laktik asit) veya amonyum tuzları ya da ortamda tampon görevi gören bileşiklerin tüketilmesi ile pH azalmakta; aynı şekilde organik asitlerin tüketilmesi

ve ürenin hidrolizi, pH artışına neden olmaktadır. pH değişimi organizma türünün güçlü bir fonksiyonudur. *Aspergillus sp*, *Penicillium sp* ve *Rhizopus sp* de pH çok hızlı bir şekilde 3' ün altına düşmektedir. *Trichoderma*, *Sporotrichum*, *Pleurotus sp* gibi diğer tür funguslarda pH 4-5 arasında stabil kalmaktadır. Ayrıca substrat türü de pH' a büyük etkide bulunur. Özellikle lignoselülozik maddelerin yüksek tamponlama kapasitesi bulunmaktadır (Raimbault, 1998).

Fermentasyon sistemindeki pH' ı kontrol edebilmek için;

- Çok hızlı asitleşen ortama, üre gibi metabolizması sonucu bazik bileşen açığa çıkartan materyal eklenmesi
- Substrat formülasyonu içeriğinin tamponlama kapasitesine sahip olması gelmektedir (Pandey, 2003).

Özellikle düşük pH seçimleri, fungusların geniş pH aralığında büyüebilmesi, bakteriyel kontaminasyonu önlemek veya azaltmak için iyi bir yöntemdir (Krishna, 2005).

2.2.3.7. Tanecik büyüklüğü:

Substratın tanecik büyüklüğü, substrat karakterizasyonu ve mikrobiyal büyüme ile değişen sistem kapasitesinde, ısı ve kütle aktarımında önemli bir role sahiptir. Birçok parametre tanecik büyüklüğü ile ilişkilidir. Tanecik büyüklüğünün ifadesi için boşluk kesri “ ϵ ” kullanılmaktadır.

$$\epsilon = V/V_0$$

ϵ : boşluk kesri

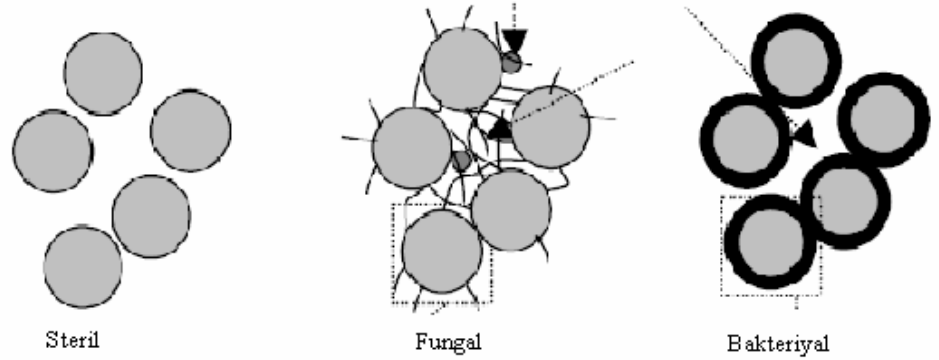
V: tanecikli ortamdaki tanecikler ile boş hacim

V_0 :boşluk hacmi

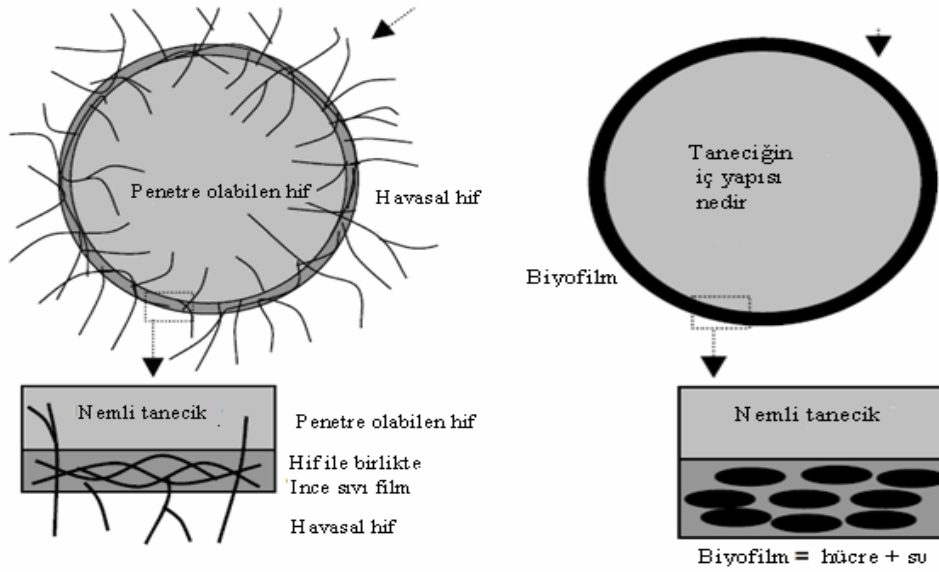
Tanecik boyutu; zaman ile substratın tüketilmesi ve miselyal yapının oluşmasından dolayı sürekli değişim göstermektedir. Matriks ya da katı substratın özelliği katı kültür fermentasyonunu doğrudan etkiler. Bu özelliklerden bir tanesi; üretim sürecinin yürütüldüğü substrat yüzeyidir. Sentetik madde veya organik tarımsal atıklar hücrelerin büyüebileceği matriks olarak kullanılmaktadır. Agro

endüstriyel maddeler kullanılırken genellikle bir ön işlemden geçirilirler. Substratın tanecik boyutu; substrat karakterizasyonu ve sistem kapasitesini yakından ilgilendirir. Mikrobiyal büyüme ile tanecik boyutu büyüklüğü değişim gösterir. Şekil 2.6 ve 2.7’ de tanecik ile mikroorganizmanın etkileşimini göstermektedir. Tanecik büyüklüğü; taneciğin yüzey alanının hacmine olan oranını etkiler bu da mikroorganizmaca ilk ulaşılabilen substrat miktarını belirler. Sabit geometride tanecik büyüklüğü azaldıkça yüzey alanının hacme oranı artmaktadır (Krishna, 2005).

Tanecik boyutu büyüklüğü ön işlem ile küçültülerek mikrobiyal büyüme için daha fazla yüzey alanı oluşturulabilir. Ancak tanecik boyutu kritik bir değere sahiptir. Eğer tanecikler çok küçük olursa mikroorganizmanın büyüdüğü matriksin birleşmesine veya kompakt hale gelmesine neden olmaktadır. Bu nedenden dolayı havanın geçebileceği kanalların kapanması organizmanın havayı verimli bir şekilde alamayışına neden olur. Ayrıca sistem içindeki ısı ve kütle aktarımında da problemlerle karşılaşılır (Mitchell et al, 2006).



Şekil 2.6: Substrat üzerindeki mikrobiyal büyüme. Fungal büyümede boşluk hacmi su damlacığı içermektedir. Ancak su sürekli fazda bulunmamaktadır. Boşluk hacmi kısmen mikroorganizma tarafından kapatılmıştır (Mitchell et al, 2006).



Şekil 2.7: Substrat hücre arasındaki ilişkinin daha yakından görünümü (Mitchell et al., 2006)

2.2.3.8. Havalandırma ve Karıştırma:

Yukarıda sayılan faktörlerin yanı sıra özellikle ölçek büyütüldüğünde (reaktör düzeyinde üretime geçildiğinde) diğer birçok parametre ve değişkeni kendisinin bir fonksiyonu olan havalandırma ve karıştırma işlemi de katı kültür fermantasyonunda göz önüne alınması gereken önemli bir değişken olmaktadır (Mitchell et al., 2006).

2.2.4. Katı kültür fermantasyonunun genel aşamaları:

Genel olarak KKF' nünü gerçekleştirebilmek için gerekli 8 ana basamak vardır. Bu basamaklarda kullanılan teknikler/ birim işlemler; kullanılan hücre türüne, kullanılan substrat türüne, amaçlanan ürünün eldesine göre farklılık gösterebilmektedir.

Katı kültür fermantasyonunun ana basamakları: (Mitchell et al., 2006)

1. İnokulumun hazırlanması
2. Substratın hazırlanması
3. Biyoreaktörün (erlenlerin) hazırlanması
4. İnokulum ve yükleme
5. biyoreaktörün (erlenlerin) çalıştırılması
6. Ortamın boşaltılması

7. Alt akım işlemleri
8. Atıkların uzaklaştırılması

2.2.4.1. Substratın hazırlanması

Substratların uygun boyuta gelmesi için substratlar kesilebilir, öğütülebilir, parçalanabilir veya granül haline getirilebilir. Su ve besinsel kaynakların eklenmesi veya pişirilmesi ya da substrata ön işlem uygulanması ile substrattaki fermante edilebilecek besinin varlığı artırılır (Mitchell et al., 2006).

2.2.4.2. İnokulum hazırlanması:

İnokulum hazırlanmasının çeşidini kullanılan organizmanın türü belirler. Birçok katı kültür fermantasyonu prosesi filamentli fungusları veya fungus sporlarını içermektedir. (Keza aktinomisetlerde de aynı şekildedir). Bu basamağın asıl amacı; yeterli miktarda ve yüksek canlılık oranında hücreyi inokulasyon için hazırlamaktır (Mitchell et al., 2006).

2.2.4.3. Biyoreaktörün hazırlanması hazırlanması

Reaktörün temizlenmesi ve substrat eklenerek sterilizasyonunun gerçekleştirilmesidir (Mitchell et al., 2006).

2.2.4.4. Biyoreaktörün işletilmesi:

Uygun çalışma koşullarının ayarlanması ile (sıcaklık, nemlilik, ışık ...) bu koşulları hücreye zarar vermeyecek düzeyde tutarak fermantasyonun gerçekleştirilmesidir (Mitchell et al., 2006).

2.2.4.5. Boşaltım:

Bazı koşullarda katı sıvı özütlemesi (ekstraksiyon) veya kurutma aşaması reaktör içerisinde veya reaktör dışında gerçekleştirilir. Her koşulda katı kısım reaktörden uzaklaştırılır (Mitchell et al., 2006).

2.2.4.6. Alt akım işlemleri:

Prosesle bağlı olarak ya tüm fermente katı ya da özgül bir ürün katıdan geri kazanılır ve saflaştırılır. Sonraki aşama ürünün katıdan özütlenmesidir (ekstraksiyonudur). Özütlemeyen sonraki aşamalar katı kültür ve sıvı kültürde aynıdır (Mitchell et al., 2006).

2.2.4.7. Atık imhası:

Katı kültür fermantasyonu; yapısı gereği katı organik atıkları azaltmaktadır. Bazı durumlarda bütün katı ürün olarak kullanılır. Örneğin hayvan yemleri (Mitchell et al., 2006).

2.2.5. Katı kültür fermantasyonu kullanılarak lakkaz üretimi

Katı kültür fermantasyonu; kullandığı substratların doğası gereği filamentli büyüyen organizmalara uygun bir ortam sağlamakta (Niladevi et al., 2007), hayat döngüsü kompleks olup, morfolojik farklılaşmalar içeren canlıların bu özelliklerini destekler nitelikte olması, ayrıca substrat olarak kullanılan zirai atıkların içeriğinin hücre dışı sindirim enzimlerinin sentezini (çoğu lignoselülozik atık olması, içlerinde lakkaz sentezini imdüklebilecek besi maddelerini barındırmaları) teşvik edici olması nedeni ile katı kültür fermantasyonu prosesini, lakkaz üretimi açısından avantajlı kılmaktadır (Herrera et al, 2007). Çizelge 2.6' de lakkaz üretimi gerçekleştirebilen fungal organizmalar ve fermantasyonda kullanılan substratları gösterilmiştir.

Çizelge 2.6: Literatürde lakkaz üretiminde kullanılan farklı doğal destek maddesi üzerinde büyüyen beyaz çürükçül funguslar (Herrera et al, 2007).

Destek maddesi	Mikroorganizma
Şeker pancarı küspesi	<i>Trametes versicolor</i>
Buğday kepeği	<i>Phlebia radiata</i>
Ballıko tohumu	<i>Botryosphaeria sp.</i>
Mısır sapı	<i>Lentinus edodes tür CS-495</i>
saman	<i>Pleurotus sp.</i>
Arpa kepeği	<i>P.chrysopodium</i>
Pamuk sapı	<i>P. chrysopodium, Funalia trogii</i>
Mısır koçanı	<i>P.chrysopodium</i>
Talaş, şarap üzümü	<i>Coriolus hirsutus, Daedaleopsis confragosa, Marasmiium</i>

	<i>allaceus, P chrysosporium</i>
Buğday sapı	<i>P. ostreatus</i>
Mısır koçanı	<i>P. chrysosporium, P. Radiata</i>
Buğday sapı, kepeği	<i>P. pulmonarius</i>
Maun kabuğu, buğday kepeği, şeker kamışı küspesi	<i>P. ostreatus, P. Chrysosporium</i>
Buğday sapı, arpa sapı, odun yongası, arpa kepeği	<i>T. versicolor</i>
Arpa kepeği, elma kabuğu, portakal kabuğu, patates kabuğu	<i>T. hirsuta</i>
Kanola kökleri	<i>Cyathus olla</i>
Okalıptüs fıncığı	<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>
Asma tohumu, arpa kepeği	<i>T.hirsuta</i>
Buğday sapı	<i>Fomes sclerodermeus</i>
Muz atıkları	<i>P. ostreatus, Pleurotus sajor-caju</i>
Arpa kepeği	<i>T.versicolor</i>
Mısır koçanı	<i>P. pulmonaris</i>
Arpa kepeği	<i>T. hirsuta, T. Versicolor</i>
Kestane kabuğu, arpa kepeği	<i>Corioloopsis rigida</i>
Hindistan cevizinin eti	<i>T. hirsuta</i>
Kivi	<i>T. hirsuta</i>
Buğday kepeği tanesi	<i>T. pubescens</i>
Yer fıstığı	<i>T. hirsuta</i>
Yer fıstığı kabuğu	
Üzüm çekirdekleri	<i>T. hirsuta</i>
Kauçuk talaş tozu	<i>Pyconoporus sanguineus</i>
Palmiye yaprağı	
Hint irmiği parankiması	
Muz kabukları	<i>T.pubescens</i>
Kağıt atıkları	<i>T.hirsuta</i>
Portakal kabuğu	<i>T.hirsuta</i>

2.3. *Streptomyces*' lar

Streptomycetaceae ailesi 1943 te Waksman ve Henrici tarafından oluşturulmuştur. *Streptomyces* genusu; 500 den fazla türü olan bu grup, aktinomisetler içinde en geniş genusu teşkil etmektedir (Keiser et al, 2000).

2.3.1. *Streptomyces*' ların özellikleri

2.3.1.1 *Streptomyces*' ların genel özellikleri:

Yaşam alanı toprak olan *Streptomyces* toprağa kokusunu veren geosmin denilen seskiterpen bileşikler sentezlerler. *Streptomyces*' lar aerobik, gram pozitif

bakterileridir. Oksidatif kemoorganotrofik metabolizmaya sahiptirler. Optimum büyüme pH' ları 6.5- 8 büyüebildikleri pH aralıkları 5- 11.5' tur. Sıcaklık gereksinimi olarak 25- 35 °C arasındaki sıcaklıkları severler. Psikrofilik ve termofilik türleri de vardır. Hücre dışı birçok enzime sahiptirler. Birçok çeşitte organik ve inorganik maddeyi besin ögesi olarak kullanabilmektedirler. Bu özellikleri *Streptomyces*' ları; birçok inatçı bitki ve hayvan materyalini ve ksenobiyotik polimerik maddeleri parçalayarak karbon çevrimine katkıda bulunan az sayıda mikroorganizma türünden birisi yapar. Parçalayabildikleri polimerik maddeler arasında;

- Polisakkaritler: nişasta, pektin, selüloz, kitin, lignoselüloz,
- Kopolimer: kazein, jelatin, hipoksantin
- Proteinler: keratin ve elastin
- ve aromatik bileşikler gelmektedir (Kampfer, 2006)

Bu bakterilerin karmaşık yaşam döngüleri vardır. Büyümeleri esnasında birçok yapısal değişim geçirirler. Uzun dallanmış substrat miseli, havasal misel (sporofor) ve spor (konidia) oluşumu büyümelerinin çeşitli safhalarında geçirdikleri yapısal değişimlerdir (Madigan et al, 2003; Borodina et al., 2009;).

Streptomyces genusu vejetatif ve havasal misellerine renk veren birçok çeşitlilikte pigment üretebilmektedir. Ek olarak difüzlenebilen renkli pigmentlere de sahiptir. Üretilen pigmentler kültür ortamı kompozisyonu ve kültivasyon koşullarına bağlıdır (Borodina et al., 2009).

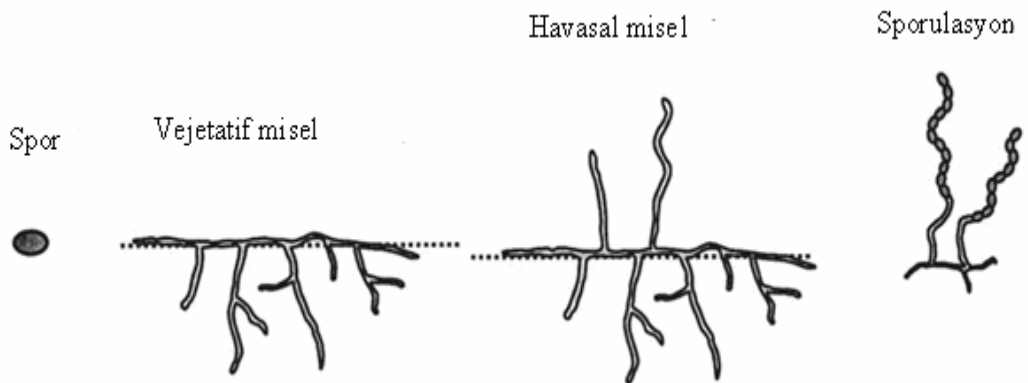
2.3.1.2. *Streptomyces*' ların yapısal özellikleri:

Streptomyces genusunun üyeleri kompleks bir hayat döngüsüne sahiptir. *Streptomyces* kolonileri çok hücreli, farklılaşabilme yeteneğine sahip organizmalardır. *Streptomyces*' ların katı ortamda farklılaşması, çıplak göz ile ayırt edilebilmektedir. Havasal misellerin oluşumu koloniye beyaz ve kabarık bir görünüm kazandırmakta, spor oluşumunda ise renk genellikle değişmektedir. Sporlar genellikle gri renk almaktadırlar (Worrall and Vijgenbaum, 2009). Sporlar hareketsizdir. Kompleks besi ortamı içeren agar üzerinde; ayrık ve likenimsi, derimsi koloniler oluştururlar. Koloniler ilk başlarda düzgün yüzeylidir ancak sonraları havasal misel geliştirerek; yığınimsı, tanecikli, tozumsu veya kadifemsi görünüm kazanırlar (Borodina et al., 2009).

2.3.2. *Streptomyces*' ların hayat döngüsü ve morfolojileri:

Streptomyces' ların hayat döngüleri karmaşık ve birçok morfogenetik farklılaşma içermektedir. *Streptomyces*' ların üreyebilen formu spor içermektedir. Sporlar çimlenerek 2 germ tüp oluşturur. Böylelikle canlı vejetatif misel oluşumunu başlatmış olur. Miselde büyüme filament uçlarında gerçekleşir. Uzayan uçlar dallanarak; hifsel ağı oluşturur. Hifsel ağ vejetatif miseli oluşturur. Vejetatif misel dallanma ile kompleks sıkı bir matriks oluşturur. Bu süreçte vejetatif misel, substrat miseline dönmekte böylece havasal miselin inşası için besin sağlanabilmektedir. Havasal miselin oluşturulmasından sonra hücre bölünmesinin bir sonraki aşaması olan spor oluşmaktadır. Septa denilen yapı düzenli aralıklar ile konumlanır ve havasal miseli sporlara ayırır. Yaşam döngüsü sporların olgunlaşması ile tamamlanır. Sporların dağılması ile çimlenme ve yeni misellerin oluşumu ile hayat döngüsü devam eder. (Worall and Wijgenboom, 2009). *Streptomyces*' ların bazı türleri substrat misellerinde de spor oluşumunu gerçekleştirebilmektedir (Keiser et al, 2000).

Durgun sıvıda büyüyen kültürler yüzeyde ince bir tabaka oluşturacak şekilde büyürler ve oluşan hücre tabakası harici, besi ortamının başka bölgeleri *Streptomyces* içermemektedir. Çalkalamalı kültürlerde ise hücreler pellet oluşturmakta ve çalkalandığı kaptaki sıvı ile temas eden en son noktada, bulunduğu kabın üzerine tutunmuşlardır.



Şekil 2.8: *Streptomyces*' ların hayat döngüsünü (Worall and Vijgenbaum, 2009)

2.3.3. *Streptomyces*' ların kültürasyonu :

2.3.3.1. Karbon ve azot kaynağı:

Birçok *Streptomyces* türü besinsel gereksinimleri birçok durumda; organik karbon kaynağı (nişasta, glukoz, gliserol ve laktat) ve inorganik azot kaynağı (NH₄ veya NO₃)' na ek olarak büyümesi için gerekli olan mineral tuzları içerir.

Streptomyces' ların; vitamin, organik büyüme faktörü gibi gereksinimleri olmamasından dolayı sentetik ortamlarda bu organizmalar için kullanılabilir. Kompleks organik substratları verimli bir biçimde kullanabilmekte, büyüme hızı ve biyokütle üretimini arttırmaktadır. Kompleks organik karbon kaynağı ve tek bir aminoasidin azot kaynağı olarak kullanıldığı durumlarda bu organizmalar için uygun olduğu görülmüştür.

Streptomyces' lar için birçok otoritenin kabul ettiği genel ortamların ortak yanı; organizmanın hayat döngüsünü tamamlamasını (Çimlenme, substratta büyüme havasal miseller ve spor oluşumu) sağlamaktadır. Mineral madde olarak CaCO₃ ortamlara eklenerek hem Ca⁺⁺ iyonu sağlamakta hem de asit üretimini dengeleyici etkide bulunarak tampon görevi görmektedir. Ayrıca bu ortamlar sporulasyonu teşvik etmektedir (Kampfer, 2006).

Bakır (Cu⁺⁺) iyonları ise *Streptomyces*'lar için ayrı bir önem teşkil etmektedirler. Bakır iyonlarının, bakır proteinlerinin ve bakır içeren enzimlerin *Streptomyces*' ların morfolojik gelişiminde ve bazı ikincil metabolit sentezinde önemli rolleri vardır (Worall and Vijgenboom, 2009).

2.3.3.2. Sıcaklık ve oksijen

Birçok *Streptomyces*, mezofilik organizmadır ancak psikrofilik ve termofilik türleri de bilinmektedir. Çoğu *Streptomyces*, zorunlu aerobik metabolizmaya sahiptir. Ancak bazı aktinomisetler anaerobik koşullarda da nitratı nitrite indirgeyerek enerji üretebilirler (Borodina et al., 2009).

Besi ortamı içeren yarı katı agarlı ortamda, ortamın yüzeyinde büyüme gözlenmekte ancak agarlı ortam besin açısından yoksun ise mikroaerofilik şekilde büyümektedirler (Borodina et al., 2009; Kampfer, 2006).

2.3.4. Literatürde, lakkaz üretimi çalışması yapılmış *Streptomyces* türleri

2.3.4.1. *Streptomyces coelicolor* M145 lakkazı (Slac):

Küçük Lakkaz (Small LACCase) Slac düşük redoks potansiyeline sahip lakkazdır. Tip1 bakırının elektropotansiyeli 0.5 V (standart hidrojen elektrodu (SHE)) ‘ na göre)’ tur.

Slac, üyesi olduğu lakkaz grubu üyeleri gibi çoklu bakır oksidazlar grubuna girer, organik ve inorganik substratları diğer 3 domainli lakkazlar gibi oksitleyebilmektedirler. *Streptomyces coelicolor* M145 tarafından sentezlenen Slac, 2 domain’ lidir. (Machczynski et al., 2004) Bu nedenden dolayı diğer lakkazlara kıyasla yarı boyuttadır. (300’ e 600 amino asit)

Slac’ ın moleküler ağırlığı 32 kDa dur. Slac’ ın dimerikif formu birçok fenolik substrata ve negatif yüklü fenolik olmayan substrata karşı aktivitesi alkali pH’ larda en yüksek değerini almaktadır (Worall and Vijgenboom, 2009).

2.3.4.2. *Streptomyces griseus*: EpoA

EpoA, *Streptomyces* türlerinde morfogenezisin teşvikinde ve havasal misel oluşumunda görev yapmaktadır (Endo et al., 2003). Hücre dışı fenoloksidaz (EpoA) denature edici koşullara karşı dayanıklı olduğu bildirilmektedir. 70⁰C de 60 dakika inkübasyon sonunda, enzimde %40 aktivite gözlenmiştir (Nakamura and Go, 2005).

Çizelge 2.7: Literatürde lakkaz üretimi yapılan *Streptomyces* türlerinin lakkazlarının özellikleri

Organizma	Substrat	Aktivite	MA	K_{cat}	K_m (mM)	Kaynak
<i>S. lividans</i>	ABTS / DMP	350mg/l *8U/mg =2,8U/ml	32			Dube et al., 2008
<i>S. cyaneus</i>	ABTS	0.763 AU/100 µg protein	75			Arias et al., 2003
<i>S. cyaneus</i>	DMP	0.830 AU/100µg protein	75			Arias et al., 2003
<i>S. cyaneus</i>	ABTS	14.6 U/mg		5.55U/mg	0,38	Arias, 2003
<i>S. giseus</i>	DMP			0.85 nmol/d (V_{max})	0.42	Endo et al., 2003
<i>S.lavendulae</i>	kateşol	7,3U/mg		103 s ⁻¹	1	Suzuki et al., 2003
<i>S. lavendulae</i>	hidrokino n			5.3 s ⁻¹	0.039	Suzuki et al., 2003
<i>S.lavendulae</i>	guaiakol			1.6 s ⁻¹	0.058	Suzuki et al., 2003
<i>S. lavendulae</i>		0,1079U/ml				Jing et al., 2010
<i>S.psammaticus</i>	ABTS	5.3 U/ml			0.39	Niladevi, 2007
<i>S.psammoticus</i>		55.4 U/g				Niladevi, 2007
<i>S. ipomoea</i>	ABTS	V_{max} 7,59mU/ µg		9.99 s ⁻¹	0,4	Gujarro et al., 2009
<i>S. ipomoea</i>	DMP	V_{max} mU/ µg		K_{cat}/ K_m 0,98*10 ³	4,29	Gujarro et al, 2009

Literatürdeki diğer lakkaz üreticileri:

- *Streptomyces cyaneus* (Arias et al, 2003)
- *Streptomyces lavendulae* (Suzuki et al, 2003)
- *Streptomyces lividans* (Dube et al, 2008)
- *Streptomyces psammoticus*(Niladevi et al, 2008)
- *Streptomyces ipomea* (Guijarro et al, 2009)
- *Streptomyces griseus* (Endo et al, 2003)
- *Streptomyces griseorubens C-5* (Xu et al, 2009)

Bu türlerden elde edilen lakkazların özellikleri Çizelge 2.7' de gösterilmiştir.

2.4. Yanıt Yüzeyi Yöntemi (YYY) (response surface methodology)

İlk defa 1951 yılında Box ve Wilson tarafından bulunan yanıt yüzeyi yöntemi; istatistiksel ve matematiksel tekniklerin bir bütünü olup süreçlerin geliştirilmesi, iyileştirilmesi ve optimizasyonunda kullanılan bir tekniktir.

YYY yönteminde temel olarak 3 fazdan oluşur. Bunlar;

- Tarama
- optimum alana doğru ilerleme
- yanıtın optimum bölgedeki davranışı ‘dır.

Faz 0: Tarama deneyleri: İlk etapta hangi faktörlerin önemli olup hangilerinin önemsiz olduğunun belirlendiği fazdır. Bu fazın asıl amacı önemli bağımsız değişkenlerin saptanmasıdır. Tarama yapılması ile değişkenlerin sayısını azaltarak daha verimli bir tasarım yapılmasını sağlamaktadır (Carley, 2004).

Faz 1: Bu fazda tasarımcının araştırdığı değer aralığı optimum noktaya yakın sonuç verip vermediğinin gözlemlendiği fazdır. Bağımsız değişkenlerdeki mevcut değerlerin optimum performans göstermediği durumlarda bu basamak kullanılır. Bu basamakta tasarımcı, deneyin optimum değerlere yaklaşması için deneyinde bir dizi düzenleme yapmalıdır. Bu faz YYY’ de 1. dereceden modeller kullanılarak anlaşılabilir (Carley, 2004).

Faz 2: Bu faz; proses optimum noktaya yaklaştığında başlar. Bu noktada tasarımcı optimum etrafındaki küçük alanda modelinin doğru ve hassas bir şekilde yanıt ile örtüşmesini istemektedir. Gerçek yanıt genellikle optimum nokta etrafında eğrilik içermektedir. Bu eğriliğin belirlenebilmesi için genellikle 2.

dereceden hatta gerekirse daha yüksek derecelerden polinomlara gerek vardır. Gerçek ile örtüşen bir yüzey modeli oluşturduktan sonra, modeldeki optimum nokta belirlenir (Carley, 2004).

1. 1. dereceden model: Değişkenler arasındaki ana etkileşimleri inceleyen model türüdür. Eğer değişkenler arasında bir etkileşim var ise modelde bu da gösterilebilir. 1. dereceden modelin formülü

$$\eta = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k$$

Etkileşimlerin modele eklenmesi ile küçük bir eğim yanıt uzayında oluşturulabilir. (Carley, 2004)

2. 2. Dereceden model: 1. modelin yetersiz kaldığı 2. dereceden modeller kullanılmaktadır. 2. dereceden modellerin formülü

$$\eta = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j x_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} x_j^2 + \sum_{i < j=2}^k \sum_{j=2}^k \beta_{ij} x_i x_j$$

η : öngörülen yanıt

X_i, X_j : girdi değişkenleri

β_0 ofset değeri

β_j doğrusal katsayılar

β_{jj} ikinci dereceden katsayılar

β_{ij} 'ij' inci etkileşim katsayısı' dır.

k girdi değişkenleri miktarıdır.

2. dereceden modelin seçim nedenleri:

- 2. dereceden modeller esnektir. Birçok çeşitlilikteki fonksiyonel formu ifade edebilir.
- Parametrelerin tahminlenmesi kolaydır.
- 2. derece modellerin gerçek yanıtı yüzeyi problemlerinin çözümünde iyi gözlenmiştir (Carley, 2004).

3. MATERYAL VE METOD:

3.1. Materyal:

3.1.1. Mikroorganizma:

Bu çalışmada kullanılan *Streptomyces* türleri *Streptomyces coelicolor* M145, *Streptomyces* izolatları Ege üniversitesi Biyomühendislik bölümü aktinomiset kültür koleksiyonundan alınmıştır. Hücreler, soya unu mannitol agarda +4 °C' de veya %20 (hacim/hacim) gliserol içeren tüplerde spor süspansiyonu şeklinde -20°C' de saklanmıştır.

3.1.2. Substratlar

Üretimde kullanılan buğday kepeği Bayraklı Altınbaşak un fabrikasından temin edilmiştir. Çay; Biyomühendislik bölümü çay ocağındaki atık çaylar kullanılmıştır. Zeytin, Ege Üniversitesi kampüsünde yer alan ağaçlardan temin edilmiştir. Kullanılan kimyasallar Ege Üniversitesi Biyomühendislik bölümünden temin edilmiştir ve analitik saflıktadır. Çalışmada kullanılan azot kaynakları Çizelge 3.1 de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 : Taranan organik ve inorganik azot kaynakları

İnorganik Azot Kaynakları	Organik Azot Kaynakları
NH ₄ NO ₃	Soya
NaNO ₃	Pepton
KNO ₃	Maya özütü
(NH ₄) ₂ SO ₄	Tripton
Üre	Mısır ıslatma katısı
Sodyum glutamat	yağsız süt tozu
NH ₄ HPO ₄	Malt çimi

3.1.3. Üretimde kullanılan besi ortamları:

İnokulasyon için hücrelerin yetiştirildiği Soya unu mannitol agar (SFM)

Soya unu 20 gr/l , Mannitol 20 gr/l, Saf su 1 lt

3.2. Metod

Optimizasyon çalışmalarına Niladevi et al (2008)' in lakkaz sentezi için kullandığı ortam ile başlanmıştır. Bu ortam Çizelge 1' de gösterilmiştir. Üretim ortamları 250 ml' lik erlenlerde 10 gr buğday kepeği/ 7,5 gr çay/ 10 gr zeytin yaprağı ile çalışılmıştır.

3.2.1. Lakkaz üreticisi organizmaların taranması

- 1- Lakkaz üreticisi streptomyces türlerinin taranması amacı ile Doç Dr H. Esin KOCABAŞ tarafından oluşturulan aktinomiset kültür koleksiyonundan faydalanılmıştır.
- 2- Bu hücreler buğday kepeğini; nemlendirme sıvısı içerisinde mineral madde olarak bakır sülfatın yanında; azot kaynağı olarak soya unu veya amonyum nitrat ile zenginleştirilen katı kültür besi ortamına ekimi yapılmıştır.
- 3- Bu ortamda büyümeye bırakılan hücreler havasal miselleri görünür hale gelinceye kadar inkübe edilmiştir. (2- 7 gün arası)
- 4- Havasal miselleri belirgin hale gelen hücreler; 50 ml su ile ekstraksiyon işlemi yapılmıştır.
- 5- Enzim olup olmadığını kontrol için; 100µl ekstrakte edilen sıvı, 100 µl (10mM) ABTS içeren 800 µl farklı pH' lardaki (pH 3, pH 4, pH 5, pH 6, pH 7) tampon çözeltilere konmuştur.
- 6- Aktivite varlığı ABTS' nin okside formunun verdiği koyu çam yeşili renge bakılarak görsel olarak anlaşılmıştır.
- 7- Aktivite görülen örnekler daha sonra spektrofotometrik yöntem kullanılarak nicel olarak analiz edilmiştir.
- 8- Kültür koleksiyonundan elde edilen enzim üreticileri; "Üretim süresi, enzim aktivitesi " gibi kriterlere dayanılarak bir ön elemenden geçirilmiştir.

3.2.2. Üretim öncesi işlemler

3.2.2.1. Spor süspansiyonunun hazırlanması:

Streptomyces türleri, petri kaplarındaki agarlı SFM ortamına ekilir. Olgun spor oluşuncaya kadar beklenir. Spor oluşumu görsel olarak kontrol edilir. Tez boyunca kullanılan *Streptomyces* türleri için olgun spor oluşumu 7- 8 gün kadardır. Petri içerisindeki 1 haftalık spor ve havasal misel içeren kültürler alınır. Agar üzerinde büyümüş kültürler aseptik şartlar altında 10 ml steril %20 (V/V) gliserol ilave edilir. Steril bir pamuk ve pens yardımı ile sporlar; pamuğun, agar üzerinde hafif bastırılarak dolaştırılması ile pamuğa emdirilir. Pamuk; steril bir şırınganın içine yerleştirilir. Şırınganın çıkış kısmına spor süspansiyonunun depolanacağı steril tüp konur. Şırınganın sıkıştırılması ile şırınga içerisindeki pamuk; içerisindeki spor ve havasal misel taşıyan gliserollü spor içeren sıvıyı depo kabı olarak kullanılacak olan tüpün içine bırakır. Tüp içerisinde bulunan hücreler -20 °C' de saklanır. Spor süspansiyonunun mililitresindeki spor sayısını belirlemek için Thoma lamında sayım yapılır.

3.2.2.2. pH tayini:

pH tayini için Metler toledo marka pH metre ile yapılmıştır.

3.2.2.3. Nem tayini:

Kullanılan substratlardaki nem oranı Mettler- Toledo Halojen marka nem tayini cihazı ile yapılmıştır.

3.2.2.4. Substratlara uygulanan ön işlemler:

Ortamda kullanılacak substratın gerekli görüldüğünde boyutlarının küçültülmesi için Moulinex marka blender kullanılmıştır.

3.2.2.5. Substrat pH değerlerinin ayarlanması:

Substratlara 3 farklı yöntem ile pH ayarlaması yapılmıştır.

1- NaOH eklenerek

2- Tampon çözelti eklenerek

3- CaCO₃ eklenerek

Substratın pH' sı; NaOH' in farklı oranlarda besi ortamlarına eklenmesinin ardından 121⁰ C de 20 dakika sterilizasyona sokulan örneklere 50 ml su ilave edilerek pH değerleri ölçülmüştür. Elde edilen değerlere göre pH/ eklenen NaOH grafiği çıkarılmıştır Grafikten, istenilen başlangıç pH değeri için gerekli NaOH miktarı bulunmuştur. Aynı işlemler Tris tampon çözeltisi ve CaCO₃ içinde yapılmıştır.

3.2.2.6. pH ayarlamasında uygun yöntemin seçimi

pH ayarlaması için uygun yöntemin seçiminde kriter olarak, ekilen mikroorganizma görsel olarak değerlendirilerek karar verilmiştir. Mikroorganizmanın çıplak göz ile görülebilen havasal misel, spor yapıları bunların canlılık ve büyüklükleri ile substrat üzerindeki kapladığı alanın genişliğine bakılarak karar verilmiştir. Karar vermek için; buğday kepeğine nemlendirme sıvısı ilave edilmiştir. Nemlendirme sıvısı olarak Niladevi et al (2007)' nin kullandığı ortam alınmıştır. Besleme sıvısı miktarı substratın nemini %70' seviyesine getirecek kadar kullanılmıştır.

3.2.2.7. Erlenmayerlerin hazırlanması :

Üretimler; 250 ml hacimli Erlenmayerler kullanılarak yapılmıştır. 10 gr substrat, nemlendirme sıvısı ile zenginleştirilerek organizma için uygun nem oranına getirilmiştir. Besi ortamı içeren Erlenmayerler pamuk tıpa ile kapatılmış. Pamuk kısmı alüminyum folyo ile sarılarak, 121⁰C sıcaklık 1.2 bar basınç' ta 20 dakika sterilizasyonu yapılmıştır.

3.2.3. Erlenmayerlerde üretim:

3.2.3.1. İnokulasyon:

İnokulasyon için, spor süspansiyonundan gerekli miktarda sıvı alınarak uygun miktarda steril distile su içerisinde homojen hale getirilir. 1 ml spor havasal misel

karişimini içeren su; besi ortamı içeren erlenmayerlere aktararak inokulasyon gerçekleştirilir.

3.2.3.2. Üretim koşulları ve örnek alma:

Üretimler, 28°C’ de Sanyo marka inkübatörde gerçekleştirilir. Örnek alma işlemi her gün bir Erlenmayerin alınması şeklinde olmuştur.

3.2.4. Üretim sonrası işlemler:

3.2.4.1. Ayrırma işlemleri:

- **Ekstraksiyon ve filtrasyon:**

Üretimde kullanılan katı miktarın (10 gr veya 7.5gr) 5 katı kadar su (50 ml veya 37.5 ml) üretim ortamına ilave edilerek ekstraksiyon işlemi yapılır. Erlenlere oda sıcaklığında su ilave edilerek 200 rpm de orbital çalkalayıcıda çalkalanarak yarım saat beklenir. Yarım saat sonunda erlenmayerler kaba filtreden geçirilerek büyük boyutlu katı tanecikler ile enzim içeren sıvı birbirinden ayrılır.

- **Santrifügasyon:**

Makro boyuttaki katı tanecikler ayrıldıktan sonra sıvı örneğini Hettich marka santrifüjde 5 dakika 8000 rpm’ de oda sıcaklığında santrifüjlenir. Enzim süpernatant’ ta kalır.

3.2.4.2. Depolama:

Süpernatanttan 1 ml’ lik örnek alınarak -20°C de saklanır.

3.2.5. Lakkaz aktivite tayini:

3.2.5.1. Kullanılan kimyasalların hazırlanması:

- Tampon çözelti: Tampon çözelti olarak 0.1 M sitrat tampon pH 3' te kullanılır. Bunun için 0,1M * 46,5 ml sitrik asit ile 0,1 M* 3,5 ml sodyum sitrat çözeltisi karıştırılarak hazırlanır.

- Stok ABTS Çözeltisi: ABTS (2-,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) molekül ağırlığı 548 gr/ mol dür.

ABTS stok çözeltisi için 0,0274 gr ABTS 5 ml suda çözdürülerek 10mM' lık stok ABTS çözeltisi hazırlanır.

3.2.5.2. Lakkaz aktivitesinin belirlenmesi (Spektrofotometrik yöntem):

Lakkaz aktivitesi, oda sıcaklığında ABTS'nin oksidasyon hızının saptanması ile ölçülür. 420 nm dalga boyunda absorbanstaki değişim 45 saniye boyunca incelenmiştir. Kör olarak 900µl tampon çözeltisi 100 µl ABTS kullanılmıştır. Reaksiyon sıvısı ise 800 µl tampon 100 µl ABTS 100 µl enzim çözeltisi ile yapılır. (İhtiyaç duyulduğunda enzim çözeltisi 1/10 ve 1/ 100 oranlarında seyreltilir). Absorbanstaki değişim spektrofotometrenin kinetik modu ile ölçülmüştür. (Madzak, 2006) Spektrofotometre de okunan değer birim zamanda absorbanstaki değişimdir (abs/sn). Bu değeri enzim aktivitesine çevirmek için

$$U = \text{Abs} * V * 6 * 10^5 / \epsilon * v$$

U enzim aktivitesi (µmol substrat/ dakika)

V toplam tepkime hacmi (1 ml)

ϵ ABTS' nin yükseltgenmiş formunun ekstinksiyon katsayısı (36000 M⁻¹ cm⁻¹)

v tepkimenin gerçekleşeceği ortama konulan enzim hacmi (100µl)

abs: Spektrofotometrede okunan değer

3.2.5.3. Lakkaz kinetik parametrelerinin belirlenmesi:

Michaelis- Menten kinetik parametreleri (K_m ve V_{max}) oda sıcaklığında pH 3 sitrat tampon kullanılarak belirlenmiştir. Substrat olarak 0,0625 ile 4 mM arasındaki konsantrasyonlarda ABTS kullanılmıştır. Elde edilen kinetik değerler,

Microsoft Excel yardımı ile çizgisel Lineweaver- Burk grafiğinde verilerin yerine konması ile kinetik parametreler elde edilmiştir.

3.2.5.4. Enzimin ısıl dayanıklılığının belirlenmesi:

Enzim örneği 70 °C’ deki sitrat tamponda (0.1 mol/l, pH 3) 2 saatlik zaman periyodunda bekletilerek ölçülmüştür. Enzim örnekleri her yarım saatte bir alınmış, hızlıca soğutulmuş ve enzim aktivitelerine bakılmıştır. Enzim aktivite tayininde substrat olarak son konsantrasyon 1 mM olacak şekilde ABTS kullanılmıştır.

3.2.5.5. Isıl bozunma hızlarının hesaplanması:

Isıl bozunma hızının 1. dereceden kinetik denklem olduğu düşünüldüğünde;

$r = \Delta A / \Delta t = k[A]$ denklemi çözüldüğünde

$\ln[A] = -kt + [A]_0$

k: bozunma hız sabiti

t : zaman

$t_{1/2}$: yarı ömür

A: enzimin t anındaki aktivitesi

A_0 : başlangıçtaki enzim aktivitesini simgeler.

$\ln[A]$ ya karşı t değerlerinin grafiği çizildiğinde oluşan eğimden “k” hız sabiti değeri bulunmuştur. k hız sabitinin bulunması ile birlikte

$\ln[0,5]/k = t_{1/2}$ denkleminin çözülmesi ile yarı ömür değerleri elde edilmiştir.

3.2.5.6. Organik çözenlerde enzim aktivitesi:

Enzimler 25 °C’ de pH 3 sitrat tamponda substrat olarak ABTS kullanılarak aktivite değerleri ölçülmüştür. Tepkime çözeltisi tampon içeren su ve etanol hacim olarak tampon çözeltiden 0.5 ml azaltılıp, etanolden (%100 (h/h)) 0.5 ml arttırılarak farklı konsantrasyonlarda etanol çözeltileri elde edilmiştir. Bu çözeltilerdeki tepkime hızlarına bakarak aktivitedeki değişim belirlenmiştir.

3.2.6. Lakkaz üretiminde verim artırma çalışmaları

Lakkaz üretim performansı iyi olan *Streptomyces* türleri için üretim verimi ve verimliliğini artırıcı çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar başlıca; substratın organizma için uygun hale getirilmesi, ortam değişken ve parametrelerinin optimum değerine getirilmesi, üretimi teşvik edici uygulamaların denenmesi şeklinde gerçekleşmiştir.

- 1- Buğday kepeği/ çay /zeytin yaprağı için pH ayarlaması
- 2- Azot kaynağı seçimi (organik, inorganik)
- 3- Azot kaynağının miktarının belirlenmesi
- 4- Günlere göre aktivitenin değişimi
- 5- Besi ortamı kompozisyonunun belirlenmesi
- 6- Besi ortamı girdilerinin optimum değerlerinin belirlenmesi
- 7- Yüzey yanıt yöntemi kullanılarak (YYY); katı kültür parametre ve değişkenlerinin optimum değerlerinin bulunması
- 8- İndükleyici maddelerin etkisi
- 9- Harici bir karbon kaynağının etkisi

3.2.6.1. Uygun azot kaynağının belirlenmesi

Niladevi et al., (2007)' nin kullandığı besi ortamındaki maya özütü ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bileşenleri kaldırılarak yerlerine her bir erlende bir azot kaynağı olacak şekilde 0,2 gr test edilecek azot kaynaklarından kullanılmıştır. Test edilecek azot kaynakları materyal kısmında verilmiştir. Denemeler % 75 nem oranında gerçekleştirilmiştir. Toplama işlemi inokulasyonun ardından 4. günde yapılmıştır.

3.2.6.2. Besi ortamı bileşiminin belirlenmesi:

Besi ortamı bileşiminin belirlenmesi amacı ile 10 gr buğday kepeği ve 0,66 gr NH_4NO_3 içeren ortama; mineral maddelerden 0,1 gr, iz elementler ise 1 mM olacak şekilde konulmuştur. Kullanılan bileşenler Çizelge 13' te gösterilmiştir. Asit şeklinde olan element kaynakları (Bor için borik asit) besi ortamına 1M NaOH ile nötrleştirilerek sisteme ilave edilmiştir.

Çizelge 3.2: *S. coelicolor* M145' in besi ortamı kompozisyonunun belirlenmesi için kullanılan element ve bileşikler.

Mineral maddeler (0.1 gr / 10 gr substrat)	İz elementler 1mM
Sodyum sülfat (NaSO_4)	Gümüş sülfat (AgSO_4)
Potasyum hidrojen fosfat (KH_2PO_4)	Mangan sülfat (MnSO_4)
Sodyum hidrojen fosfat (NaH_2PO_4)	İyot (I)
Fosforik asit (H_3PO_4)	Borik asit (H_3BO_4)
Dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4)	Çinko sülfat (ZnSO_4)
Sodyum klorür (NaCl)	Demir sülfat (FeSO_4)
Sodyum sülfat (NaSO_4)	Kobalt sülfat (CoSO_4)
Potasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4)	Sodyum molibdat (NaMoO_4)
	Potasyum dikromat ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)
	Titanyum dioksit (TiO_2)

3.2.6.3. Lakkaz sentezini indükleyici bileşiklerin hazırlanması

İndükleyici bileşiklerin lakkaz üretimine etkisini incelemek amacı ile bir çok aromatik bileşik ve metal iyonu test edilmiştir. Test edilen bileşikler

- Kafeik asit (3,4-Dihydroxyphenyl 2-propenoic acid)
- Ferulik asit (4-hidroksi,3 metoksi sinnamik asit)
- Gallik asit (3,4,5-trihidroksi benzoik asit) ,
- Tannik asit ,
- Fe^{+3} ,
- Mn^{+2}
- sodyum tartarat (50 μM) kullanılmıştır.

Kullanılan indükleyici bileşikler 1 mM şeklinde hazırlanmıştır. (sistem 50 ml olarak düşünülmüştür. Bu değere göre molar hesabı yapılmıştır). Metal iyonları; üretim ortamına doğrudan konmuş, diğer bileşik çözeltileri 0,45 μm membran filtreden geçirilerek steril edilmiş ve inokulasyondan önce besi ortamına ilave edilmiştir. İndükleyici bileşiklerden gallik asit, ferulik asit ve kafeik asit % 50 (hacim/hacim) etanolde çözülerek hazırlanmıştır.

3.2.6.4. İstatistiki yöntem ile optimizasyon

Tasarımda ve veri analizinde, Design Expert® versiyon 7 (Stat Ease, Inc, Minneapolis, USA) yazılımı kullanılarak yanıt yüzey yöntemi ile inceleme yapılmıştır. Deneyin tasarım kısmında merkez karma tasarım (Central Composite Design) (CCD) kullanılmıştır.

1. İstatistiksel tasarım: Tasarım kısmında; CCD yanıt uzayının tanımlanabilmesi için merkezi nokta aksiyel noktalar ve uzayın dışını görebilmek amaçlı faktöriyel noktalara sahiptir. Bu noktalar programda 0, 1 ve 1,68 sayıları ile kodlanmışlardır.

Merkez nokta (0)

Aksiyel noktalar (-1,1)

Faktöriyel noktalar (-1,68, 1,68)

Streptomyces coelicolor M145' in lakkaz üretimi için yapılan optimizasyon çalışmasında kullanılan değişkenler ve tasarım aralıkları çizelge 3.3, 3.4, 3.5 t; *Streptomyces spp* için kullanılan değişkenler ve tasarım aralıkları çizelge 3.6, 3.7' de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3: *S. coelicolor M145'* in lakkaz üretimi için YYY' de kullanılan bağımsız değişkenler ve tasarım aralıkları (1)

Değişken	Merkez nokta	Aksiyel noktalar	Faktöriyel noktalar
pH	7,25	7 - 7,5	6,8 - 7,7
nem (%)	75	70 - 80	66,5 - 83,4
Sıcaklık (°C)	28	24 - 32	21 - 35

Çizelge 3.4: *S. coelicolor M145 'in* lakkaz üretimi için YYY' de kullanılan değişkenler ve tasarım aralıkları (2)

Değişkenler	Merkezi nokta	aksiyel noktalar	Faktöriyel noktalar
Nem (%)	80	75 - 85	71 - 89
pH	7,75	7,25- 8,25	6,91 - 8,6
zaman (gün)	5	4- 6.	3 - 7

Çizelge 3.5: *S. coelicolor* M145' in lakkaz üretimi için YYY' de kullanılan değişkenler ve tasarım aralıkları.(3).

değişken	Merkezi nokta	aksiyel noktalar	dışarıdaki noktalar
İnokulasyon oranı (adet)	10^5	$10^4 - 10^6$	$10^{3.2} - 10^{6.68}$
azot miktarı (gr)	0,6	0,3 - 0,9	0,1 - 1,1
Zaman (gün)	3	2 - 4	1,32 - 4,68

Çizelge 3.6: *Streptomyces* M33-1'm lakkaz üretimi için 2^{4-1} faktöriyel tasarımda kullanılan değişkenler ve tasarım aralıkları.

Kodlanmış faktör	FeSO ₄	CuSO ₄	H ₃ BO ₄	ZnSO ₄
-1	0.1gr	0.1gr	0.1gr	0.1gr
1	10gr	1gr	1gr	1gr

Çizelge 3.7: *Streptomyces* M33-1' in lakkaz üretimi için YYY' de kullanılan değişken ve tasarım aralıkları.

değişken	Merkezi nokta	aksiyel noktalar	dışarıdaki noktalar
Nem (%)	75	70-80	67-83
Sıcaklık (°C)	28	24-32	21-35
Zaman (gün)	3	2 - 4	1,32 - 4,68

2. Veri analizi:

Elde edilen istatistiksel modelin güvenilirliğini programın hesapladığı p-değeri, model uygunsuzluğu (lack of fit), yeterli tahminleme (adeq precision), düzeltilmiş regresyon katsayısı (adj R²), tahminlenmiş regresyon katsayısı (Pred R²), Box- Cox dönüşümü gibi istatistiksel verilere bakılarak karar verilmiştir. Karar verme kriteri olarak;

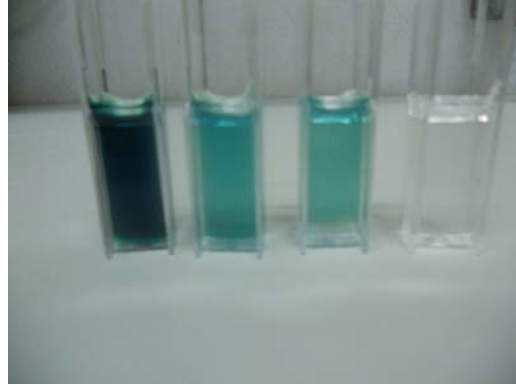
Düzeltilmiş regresyon katsayısı ve tahminlenmiş regresyon katsayısı değerleri arasındaki farkın 0.2' den daha az olması, yeterli tahminleme değerinin 4' ten büyük olması, model uygunsuzluğu değerinin istatistiksel olarak anlamsız olması, P değerinin ise 0,05' ten küçük olması göz önüne alınmıştır. 0,05 ten

küçük p değerlerinde değişkenin yanıtı etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu, 0,1' den büyük p değerindeki değişkenlerin ise yanıtı etkilerinin istatistiksel olarak anlamsız olduğunu gösterir.

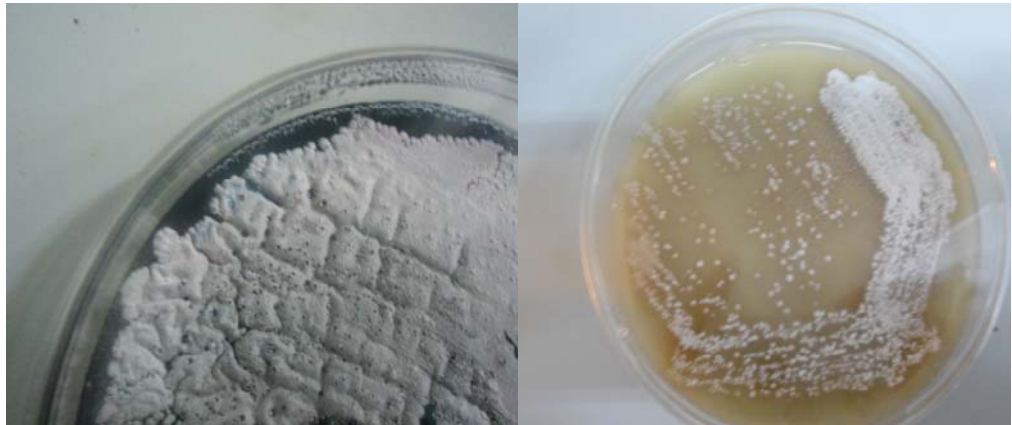
4.ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA:

4.1 Lakkaz Üreticisi Türlerin Taranması:

İlk aşama olarak Ege üniversitesi Biyomühendislik bölümü aktinomiset kültür koleksiyonundan temin edilen *Streptomyces* izolatları lakkaz üretim potansiyelleri yönünden taranmıştır. Taranan aktinomisetler arasında tanımlaması yapılmış olan *Streptomyces coelicolor M145*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces lividans* suşları da yer almaktadır. Tarama yöntemi materyal metod 3.2.1 de belirtilmiştir. 70 organizmanın taranması sonucunda 5 türün lakkaz ürettiği belirlenmiştir (Şekil 4.1). Çizelge 4.1’ de lakkaz aktivitesi veren, Şekil 4.2 de aktivite veren ve optimizasyon çalışmasında kullanılan *Streptomyces* türleri gösterilmiştir.



Şekil 4.1: Lakkaz aktivitesinin varlık yokluk testi: Şekilde oksitlenen ABTS’ deki renk değişimleri gösterilmiştir. Sol taraftaki koyu yeşil yüksek aktivite(*S. coelicolor M145*), ortadaki açık yeşil düşük aktiviteyi (*Streptomyces M 63-1*) göstermektedir. Renk değişimi olmayan en sağdaki örnekte ise (*S. griseus*) aktivite bulunamamıştır.



Şekil 4.2: Lakkaz üreticisi *Streptomyces* türleri: *S. coelicolor M145* (solda) ve izolat *Streptomyces M33-1* (sağda) gösterilmiştir

Çizelge4.1: Lakkaz aktivitesi bulunan *Streptomyces* türleri

<i>Streptomyces</i> türü	Bulunan aktivite (U/ml)	Bulunduğu gün	Verimlilik (U/ml/gr substrat /gün)
M137 SY2	1,47	3	0,0580
M 63-1	0,1216	4	0,00365
M 33-1	1,735	3	0,0693
125-2	0,38	4	0,0114
M 96	0,0129	4	0,00039
<i>S. coelicolor</i> M145	4,93	3	0,16

Çizelge 4.1' deki verilere göre hem verim, hem verimlilik bakımından izolatlardan en iyi üretici olarak *Streptomyces* M 33-1 seçilmiştir. Literatürde aktivite veren *S. griseus* ve *S. lividans*' ta hem katı kültür hem de lakkaz ürettiği bilinen sıvı kültür ortamlarında aktivite gözlenmemiştir.

4.2 Substratın pH değerinin ayarlanması:

Besi ortamında karbon kaynağı olarak kullanılan organik substratlar (buğday kepeği, zeytin yaprağı, çay atıkları) yüksek tamponlama kapasitesine sahip substratlardır. Otoklav sonrası pH ölçümü yapıldığında pH değerleri

Buğday kepeği: 5,5

Zeytin yaprağı: 5,2

Çay: 4,9

olarak bulunmuştur. Deneyde kullanılan *Streptomyces* türlerinin optimum pH' ları 6,5- 8 arasında olduğu belirtilmiştir (Kampfer, 2000). Bu nedenden dolayı substratların pH değerlerinin artırılma çalışmaları yapılmıştır. Niladevi et al., (2007)' de substratların pH değerleri besleme sıvısının pH' sının ayarlanması şeklinde gerçekleştirilmektedir. Ancak kullanılan substratların tamponlama kapasitesi ve düşük pH değerlerine sahip olmaları nedeni ile besleme sıvısının pH' sının ayarlanması yöntemi kullanılarak, substrat pH' sı organizmaya uygun düzeye çekilememiştir. Bu nedenden dolayı Materyal Metod 3.2.2.6' da

bahsedilen yöntemler kullanılarak pH ayarlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemle göre elde edilen sonuçlar buğday kepeği için Çizelge 4.2, 4.3 ve 4.4' te verilmiştir.

Çizelge 4. 2: Buğday kepeğinde Tris tampon kullanılarak pH' ın ayarlaması

Tris için; 200 ml çözeltilde çözündürülen miktar	Otoklav sonrası buğday kepeğinin pH ' sı
1,44 gr	6,7
1,8 gr	6,85
2,2 gr	6,92
2,5 gr	7

Çizelge 4.3 Buğday kepeğinde NaOH kullanılarak pH' ın ayarlanması

NaOH ile Buğday kepeğinin pH' ının ayarlaması:	
1,5*2	8,05
0,85*2	7,37
0,65*2	7,25
0,55*2	7,08
0,45*2	7,06

Çizelge 4.4: Buğday kepeğinde CaCO₃ kullanılarak pH' ın ayarlaması

CaCO ₃ ile buğday kepeğinin pH ının ayarlanması	
0,95	7
0,85	6,95
0,75	6,87
0,65	6,82
0,55	6,8
0,45	6,76

Çay için CaCO₃ kullanımında pH değeri en fazla 6,8 'e kadar yükseltilebilmiştir. Bu nedenden dolayı NaOH- CaCO₃ karışımı ile denemeler yapılmıştır. Çizelge 4.5' te NaOH- CaCO₃ karışımı ile yapılan pH ayarlama denemeleri gösterilmiştir.

Çizelge 4.6 da ise tris tamponu kullanılarak yapılan pH ayarlama denemeleri gösterilmiştir.

Çizelge 4. 5: Çay’ da NaOH- CaCO₃ karışımı kullanılarak pH’ in ayarlanması

Eklenen 2M NaOH	Eklenen CaCO ₃ (gr)			
	0gr	0,25gr	0,5gr	0,75gr
3ml	7,03	7,1	7,2	7,41
4ml	7,36	7,4	7,52	7,75
5ml	7,39	7,75	7,83	7,9

Çizelge 4. 6: Çayda Tris tampon kullanılarak pH’ in ayarlanması

Eklenen Tris pH’ sı (1M* 30 ml Tris-HCl tamponu)	Çay atıkları ortam pH’ sı
7,35	5,97
8	6,13
9,5	6,67
10	7,8
11,25	8,17

Zeytin yapraklarında çayda olduğu gibi CaCO₃ ‘ lı ortamlar pH 7 değerine ulaşamamıştır. Bu nedenden dolayı CaCO₃ ile pH ayarlaması yapılamamıştır. Zeytin yapraklarının pH değerleri çizelge 4.7 de verilmiştir.

Çizelge 4. 7: Zeytin yapraklarında Tris tampon kullanılarak pH’ in ayarlanması

Eklenen Tris pH’ sı (1M * 30 ml Tris – HCL tamponu)	Zeytin yaprakları ortam pH’ sı
7	5,91
8	6,06
8,6	7,2
9	7,8
9,36	8,26
11	8,43

Buğday kepeğinde, CaCO_3 kullanılarak yapılan pH ayarlamasında *Streptomyces*' lara özgü havasal misel ve spor oluşumu gerçekleşirken (Şekil 4.3), diğer pH ayarlama yöntemlerinde havasal miseller görülmemiştir. Çay ve zeytin yaprağında ise 3 farklı pH uygulamasında da havasal misel ve spor oluşumu görülmemiştir.



Şekil 4.3: Buğday kepeği üzerinde büyütülen *S. coelicolor* M145: CaCO_3 kullanımı ile pH ayarlaması yapılan ortamdaki 8 günlük *Streptomyces coelicolor* M145.

4.3 *Streptomyces coelicolor* M145 için üretim koşulları optimizasyonu

Üretim de 10 gr buğday kepeği kullanılmıştır. 250 ml' lik erlenin taban yüzeyini en uygun şekilde dolduran miktar buğday kepeğinde 10 gr olduğu için bu değer ile çalışmalar yürütülmüştür. Çay 7,5 gr; zeytin yaprağı ise 10 gr kullanılmıştır. Üretim ortamı olarak Niladevi et al., (2007)' nin kullandığı ortam kullanılmıştır. Bu ortamın seçilme nedenleri;

- Bu ortamın katı kültürde pirinç kepeğinin nemlendirilmesi için kullanılmış olması,
- Basit bir ortam bileşimine sahip olması,
- Niladevi'nin kullandığı ortamın bileşiminde *Streptomyces*' ların hayat döngülerinde önemli rolü olan CaCO_3 ve lakkaz sentezini indüklediği düşünülen CuSO_4 olmasıdır.

4.3.1. Azot kaynağı türü, konsantrasyonu ve optimum üretim süresinin belirlenmesi

10 gr buğday kepeği/ 7.5 gr çay/ 10 gr zeytin yaprağı üzerine 0,2 gr organik veya inorganik azot kaynaklarının eklenmesi ile denemeler yapılmıştır. Taranan azot kaynakları materyal metod 3.1.2 de gösterilmiştir. Deneme sonuçları *S. coelicolor M145* için Çizelge 4.8' deki gibidir. En iyi sonuç NH_4NO_3 kullanıldığında alınmıştır. Çizelge 4.8' de yer almayan diğer inorganik ve organik azot kaynaklarında ise aktivite bulunamamıştır. Ayrıca literatürdeki lakkaz üreticisi *Streptomyces* türleri (*S. lividans*, *S. griseus*)' çay, zeytin yaprağı ve buğday kepeğinin materyal metotta (bkz çizelge 3.2) geçen azot kaynakları ile zenginleştirilerek lakkaz aktivitelerine bakılmış ancak aktivite bulunamamıştır.

Çizelge 4. 8: *S.coelicolor M145* ' te aktivite bulunan azot kaynakları

Azot kaynağı/ karbon kaynağı	Aktivite (U/ml)
NH_4NO_3 / buğday kepeği	4,93
NaNO_3 / buğday kepeği	2,63
KNO_3 / buğday kepeği	1,062

4.3.2 Optimum azot miktarının belirlenmesi

En iyi aktivite veren azot kaynağı olarak NH_4NO_3 bulunduktan sonra NH_4NO_3 ' ın optimum miktarının belirlenmesi çalışmaları yapılmıştır. Bunun için farklı miktarda NH_4NO_3 içeren mineral maddelerce zenginleştirilmiş (bakır sülfat ve Magnezyum sülfat) substratların günlere göre lakkaz aktivite değerlerine bakılmıştır. Çizelge 4.9 da farklı azot konsantrasyonlarında elde edilen lakkaz aktivitelerinin zamanla değişimi gösterilmiştir.

Lakkaz üretimi için en uygun NH_4NO_3 miktarı verimlilik değerlerine bakılarak belirlenmiştir. Çizelge 4.10 de 0,5 ve 0,66 gr NH_4NO_3 içeren örneklerin günlere göre verim ve verimlilik değerleri gösterilmiştir. Bu verilere göre 5.

günde 0,66 gr NH_4NO_3 kullanıldığında 3,42 U/ml gün ile en yüksek verimlilik değeri elde edilmiştir.

Çizelge 4.9: Değişen azot konsantrasyonlarında aktivitenin zamana göre dağılımı

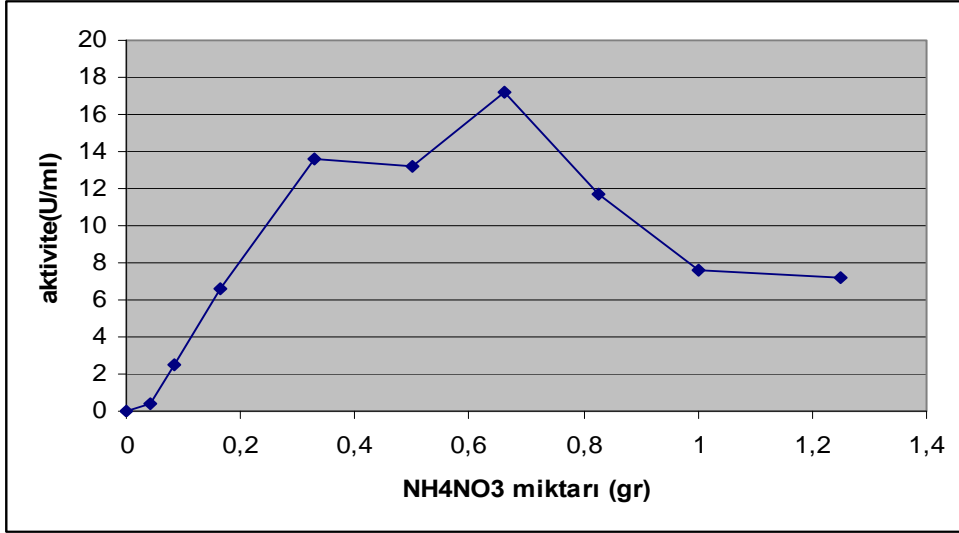
NH ₄ NO ₃ miktarı	Zaman (gün)		
	3	4	5
1,25 gr	5,53	5,83	7,25
1 gr	5,63	5,83	7,58
0,825 gr	6,88	6,67	11,67
0,66 gr	10,08	11,83	17,15
0,5 gr	9,90	13,08	13,25
0,33 gr	7,42	11,63	13,58
0,165 gr	3,83	4,63	6,63
0,0825 gr	2,12	2,27	2,53
0,04125 gr	1,04	0,27	0,39
0 gr	0	0	0

Çizelge 4.10: *S. coelicolor* M145 için farklı azot konsantrasyonlarında lakkaz verim-verimlilik tablosu

Zaman (gün)	Verim verimlilik tablosu			
	0,5gr NH ₄ NO ₃	0,5 NH ₄ NO ₃	0,66 NH ₄ NO ₃	0,66 NH ₄ NO ₃
	Verim (U/ml/ g substrat)	Verimlilik U/ ml/ gün/ g substrat	Verim U/ml/g substrat	Verimlilik U/ml/gün/ gsubstrat
3	1,09	0,33	1,1	0,3367
4	1,30	0,327	1,18	0,295
5	1,32	0,262	1,71	0,342
6	1,38	0,218	1,62	0,27
7	1,77	0,253	1,9	0,27

Verimliliğin en yüksek olduğu 5. gün aktivite değerleri grafiğe aktarıldığında NH_4NO_3 konsantrasyonu ile lakkaz aktivitesi arasındaki ilişki daha belirgin hale

gelmiştir. Şekil 4.4' de optimum NH_4NO_3 konsantrasyonunun 0,66gr olarak bulunmuştur.



Şekil 4. 4: 5. günde değişen NH_4NO_3 konsantrasyonlarına göre lakkaz aktivitesi

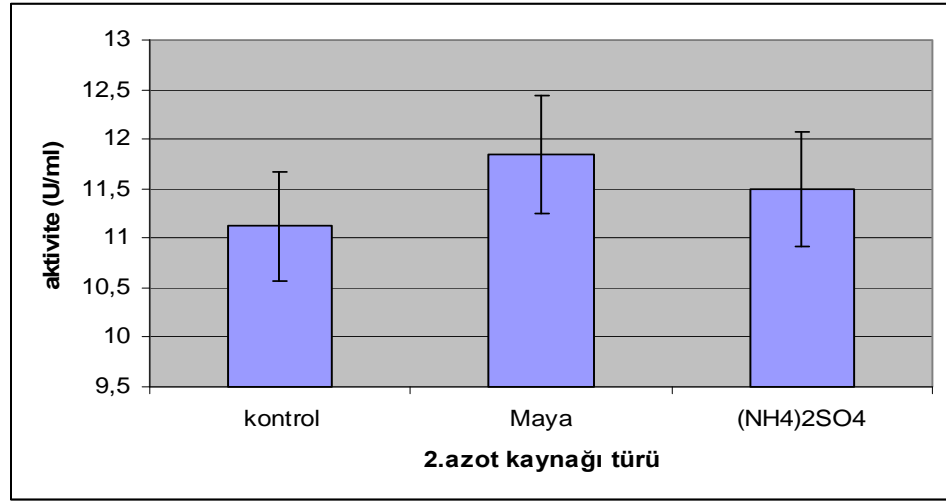
4.3.3. İki farklı azot kaynağı kullanımının lakkaz üretimine etkisi

Optimum azot kaynağı ve miktarı belirlendikten sonra bu miktardaki azot gramına eş değer 2 farklı azot kaynağının kullanılmasının lakkaz aktivitesine etkisi incelenmiştir. Üretimler 5. günde sonlandırılmıştır. *S. coelicolor M145* için elde edilen sonuçlar Çizelge 4.11' de gösterilmektedir.

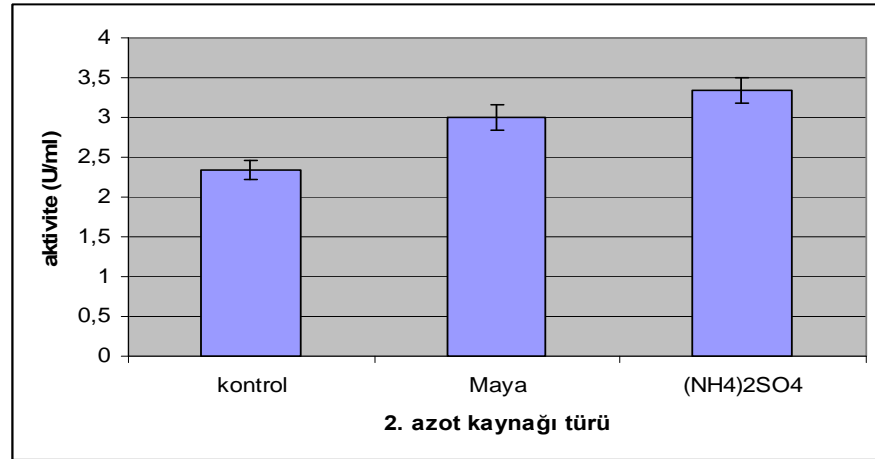
Çizelge 4. 11: Azot oranı korunarak karıştırılan iki farklı azot kaynağındaki lakkaz aktivite değerleri

Azot kaynakları	Enzim aktivitesi (U/ml)
0,66 gr NH_4NO_3 (kontrol)	19 (U/ml)
0,33 gr NH_4NO_3 (kontrol)	11,12 (U/ml)
0,11 gr NH_4NO_3 (kontrol)	2,34 (U/ml)
0,87 gr maya özütü + 0,33 gr NH_4NO_3	11,84 (U/ml)
1,65 gr maya özütü + 0,11 gr NH_4NO_3	3 (U/ml)
0,55 gr $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 0,33 gr NH_4NO_3	11,5 (U/ml)
0,92 gr $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 0,11 gr NH_4NO_3	3,34 (U/ml)

Çizelge 4.8' e göre NH_4NO_3 dışındaki bir azot kaynağının doğrudan enzim üretimine etkisinin olmadığı, lakkaz üretimi ile NH_4NO_3 miktarının güçlü bir ilişkisinin olduğu görülmektedir. Şekil 4.5 ve 4.6' da 0,11 gr NH_4NO_3 içeren sistemde harici bir azot kaynağı kullanmak sistem verimini % 6 arttırmışken, 0,33 gr NH_4NO_3 miktarı arttığında (0,33 gr) ikinci azot kaynağı kullanımı sistem veriminde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim yaratmamıştır.



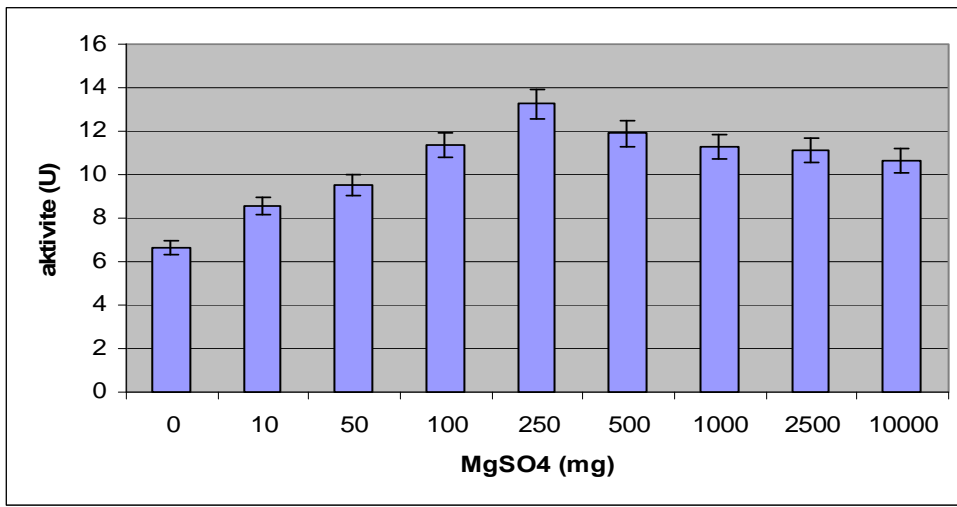
Şekil 4.5: İkinci azot kaynağın kullanımında 0,33 gr NH_4NO_3 ' lı ortamdan elde edilen aktivite değerleri



Şekil 4.6: İkinci azot kaynağı kullanımında 0,11 gr NH_4NO_3 içeren ortamdan elde edilen aktivite değerleri

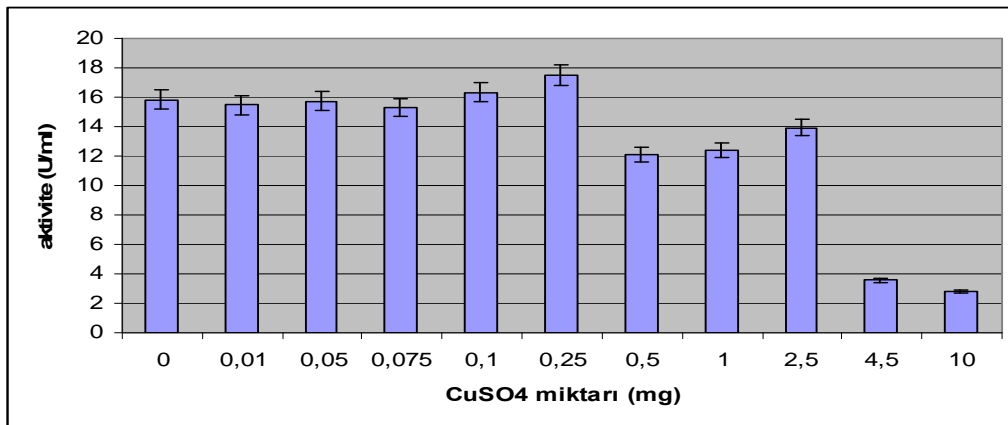
4.3.4. Mineral madde ve iz elementlerin optimum konsantrasyonlarının belirlenmesi:

Üretim ortamında kullanılan $MgSO_4$ ve $CuSO_4$ bileşenlerinin optimum oranlarının bulunması için, sisteme değişen miktarlarda $MgSO_4$ ve $CuSO_4$ eklenerek bu bileşenlerin miktarlarının lakkaz sentezine etkileri incelenmiştir. Şekil 4.7’ de $MgSO_4$ ve Şekil 4.8’ de $CuSO_4$ ’ ın değişen konsantrasyonlarında elde edilen lakkaz aktiviteleri gösterilmiştir.



Şekil 4.7: $MgSO_4$ miktarının lakkaz üretimine etkisi

$MgSO_4$ miktarı 250 mg’ a kadar arttığında aktivitede bir artış gözlenmiştir. 250 mg’ dan yüksek $MgSO_4$ lakkaz aktivite değerlerini düşürmüştür.

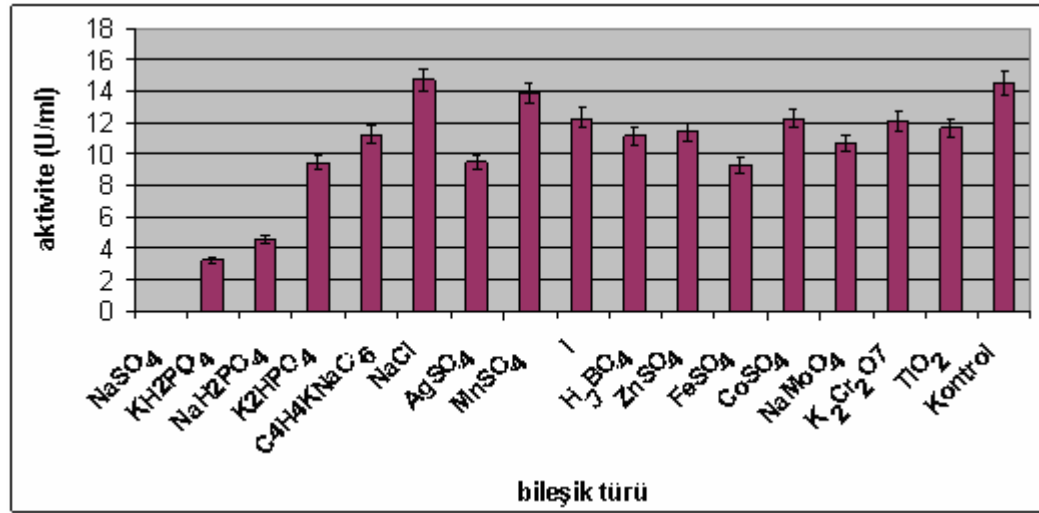


Şekil 4.8: $CuSO_4$ miktarının lakkaz üretimine etkisi

Bakır canlılar için önemli bir iz elementtir. Yapısında bakır iyonları bulunduran çoklu bakır mavi proteinleri (MCBP) canlıların temel yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmesi için gereklidir. Ancak bakır iyonları aynı zamanda hücrelere toksik etkide de bulunmaktadır (Worrall and Vijgenboom, 2009). Şekil 4.8’ de görüldüğü gibi bakır iyonları belirli bir konsantrasyona kadar hücre başına lakkaz sentezini indüklediği ancak belirli bir noktadan sonra hücrelere toksik etkide bulunmasından dolayı toplam lakkaz sentezinde bir azalışa neden olduğu görülmektedir.

4.3.5 Besi ortamı bileşenlerinin belirlenmesi:

Çeşitli metal, fosfat, potasyum, sodyum kaynaklarının lakkaz enzimi üretimine etkileri incelenmiştir. Yapılan üretimler, % 75 nem değerinde başlatılmıştır. Şekil 4.9’ da aktivite değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.9: Çeşitli metal ve mineral kaynaklarının lakkaz üretimine etkisi

Şekil 4.9’ a bakıldığında kontrol grubu ile yapılan kıyaslamalarda fazladan kullanılan birçok maddenin lakkaz sentezine olumsuz etkide bulunduğu bazıların ise lakkaz sentezine etki etmediği görülmüştür. Bu bileşikler arasında aktiviteyi destekleyen bileşik bulunmamaktadır.

- Lakkaz sentezine etki etmeyen maddeler: NaCl, MnSO₄’ tır.
- Lakkaz sentezine olumsuz etkide bulunan bileşikler:
 1. Metal iyonlarından Fe, Ag, I, B, Ti, Co, Zn, Cr, Mo

2. Fosfat kaynakları: (KH_2PO_4) , $(\text{NaH}_2\text{PO}_4)$, (H_3PO_4) , (K_2HPO_4) ' dir.

Bu veriler ışığında *Streptomyces coelicolor M145* kullanıldığında lakkaz üretimi için basit bir ortam kompozisyonu ile lakkaz üretimi başarılı bir şekilde gerçekleştirilebilirken, ağır metal ve fosfat kaynağı içeren atıklar ise lakkaz verimini düşürmüştür. Sistem 1mM demir içerdiği zaman lakkaz aktivitesi kontrol üretimine göre % 60 oranında, fosfat kaynağı varlığında ise % 20 oranında düşmüştür. Bu nedenle atık değerlendirme çalışmalarında bu tip bileşenleri içeren atık ortamlarının kullanılması pek tercih edilmemelidir.

4.3.6.Yüzey yanıt yöntemi (YYY) ile katı kültür değişkenlerinin optimizasyonu;

Lakkaz üretimi optimizasyonunda; deney tasarımında hangi değişken ve parametrelerin değerlendirilmesi gerektiği, bu değişken ve parametrelerin hangi aralıklarda incelenmesi gerektiği; hem literatürdeki veriler taranarak hem de kişisel bilgi ve tecrübeye dayanarak gerçekleştirilmiştir. Buna göre *S. coelicolor M145*' in optimum koşullarının belirlenmesi aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir.

4.3.6.1. pH- Sıcaklık- Nem (pH, T, Nem)

Literatürde (Kampfer,2006) pH için *Streptomyces* türlerinin optimum aralığının 6,5- 8 olduğundan behsedilmiştir. Daha önce yapılan denemelerde de *S. coelicolor M145*' in pH 7- 7,5 arasında en iyi büyümeyi gösterdiği görülmüştür. Literatürde nem ile ilgili olarak katı kültür fermantasyonunda nem değerinin bakteriler için % 70 ve üzeri değerlerde optimum olduğu belirtilmiştir.(Mitchell et al, 2006)

Ayrıca bu bilgi; daha önce yapılan ön denemelerle de teyit edilmiştir. Kampfer, (2006), bu organizmalar için optimum sıcaklık değerinin 25- 35 ° C arasında olduğu belirtilmiştir. Bu tasarımda kullanılan değişkenler ve hangi aralıklarda analiz edildikleri Materyal Metod da (bkz. Çizelge 3.3) gösterilmiştir. Deneyler sonucunda elde edilen yanıtların tasarım şablonu Çizelge 4.12' de, verilerin analizi ise Çizelge 4.13- 4.14' te yapılmıştır.

Çizelge 4.12: *S. coelicolor* M145 için merkezi karma tasarımda (MKT) kodlanan değerler ve gözlenen yanıt (lakkaz aktivitesi) (1)

Sıcaklık	pH	Nem	Aktivite (U/ml)
0	0	0	16,07
-1	-1	1	12,09
-1	1	-1	19,97
0	0	0	22,51
-1,68	0	0	18,09
1,68	0	0	14,39
0	-1,68	0	6,59
0	0	0	9,84
0	0	0	7,1
1	-1	-1	16,23
0	0	1,68	18,15
0	0	0	16,07
1	-1	1	11,94
0	0	-1,68	8,09
1	1	1	12,42
-1	1	1	9,31
-1	-1	-1	25,76
0	1,68	0	23,32
0	0	0	14,55
1	1	-1	12,13

Çizelge 4.13: İkinci dereceden tasarımın ANOVA' sı (*S. coelicolor* M145/ lakkaz)

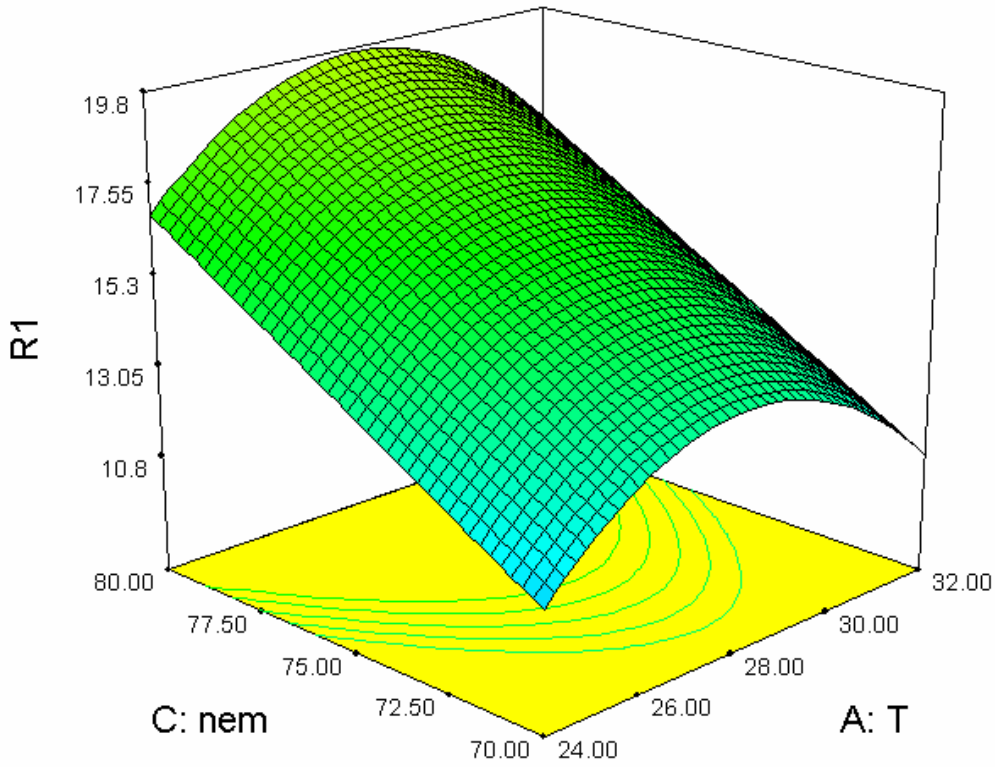
Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik derecesi	Ortalamaların karesi	F değeri	P- değeri
Model	242,11	2	121,06	6,45	0,0083
Hata	319,23	17	18,78		
Model uygunsuzluğu	190,32	12	15,86	0,62	0,773
Pure error	128,91	5	25,78		
Toplam	561,34	19			

Çizelge 4.14: Tasarımın güvenilirliği ile ilgili istatistiki veriler (*S. coelicolor* M145 / lakkaz)

Std sapma	4,33	Regresyon katsayısı (R ²)	0.4313
Ortalama	14,73	(Adj R ²) ³	0.3644
Varyasyon katsayısı	29.42	(Pred R ²) ⁴	0.2319
PRESS ²	431,17	Yeterli tahminleme	7.800

Model denklemini:

$$R1 = 16.67 + 3.01 * C - 2.84 * A^2$$



Şekil 4.10: *S. coelicolor* M145' un Çizelge 4.12' deki verilere göre oluşturulan lakkaz üretiminin yanıt yüzeyi

² PRESS: Tahminlenmiş kalıntı hata kareler toplamı,

³ Adj R²: Düzeltilmiş regresyon katsayısı,

⁴ Pred R²: Tahminlenmiş regresyon katsayısı

Deneyde sıcaklık, nem, pH' ın ve bu değişkenlerin birbiri ile etkileşimlerinin lakkaz aktivitesi (R1)' ne etkisi incelenmiştir. Bu faktörlerden istatistiksel olarak anlamlı olan değerler, Nem, ve Sıcaklık²' dir. pH 'ın 7- 7,5 arasındaki değerlerinin enzim aktivitesine etkisi istatistiksel olarak anlamsızdır. Ancak pH değerinin optimumunun belirlenmesi için 7,5 değerinin dışındaki noktalarında incelenmesi gerektiği düşünülerek yeni bir deney tasarlanmıştır. Sıcaklık değeri ise 28 °C 'de maksimum lakkaz aktivitesi vermekte ve diğer değişkenlerden bağımsız olmaktadır (diğer değişkenler ile etkileşimi yoktur). Şekil 4.7' de görüldüğü gibi nem değeri artışı ile lakkaz aktivitesi artmaktadır. Bu nedenden dolayı bu deneyde sıcaklığı 28 °C' de sabitleyip diğer değişkenlerin optimum değerlerine ulaşmak için yeni bir deney tasarlanmıştır.

4.3.6.2. Nem, pH, zaman

4.3.6.1 denemesinden yola çıkarak nem değerleri %75- 85 arasında taranmıştır. pH değerleri 7,25- 8,25 arasında taranmıştır. Önceki denemelerde 5. günün maksimum verimlilikte olduğu ispatlanmıştır. Bu veriyi YYY ile de teyit ettirmek için ve gün ile diğer faktörlerin etkileşim içinde olup olmadığını görmek için zaman değişkeni YYY' de tekrar incelenmiş ve merkezi nokta olarak 5. gün alınmıştır. *Streptomyces*' ların katı ortamdaki yaşam döngüleri 7- 8 gün arasında olduğu için merkezi noktadan 1 günlük mesafe ile aksiyel noktalar seçilmiştir. Bu tasarımda kullanılan değişkenler ve hangi aralıklarda analiz edildikleri Materyal Metod' ta (bkz. Çizelge 3.4) gösterilmiş, deneylerden elde edilen yanıtlar ve tasarım şablonu Çizelge 4.15 te verilmiştir. Verilerin analizi ise Çizelge 4.16- 4.17' te yapılmıştır.

Çizelge 4.15: MKT' de kodlanan değerler ve gözlenen yanıt (S. coelicolor M145/lakkaz aktivitesi) (2)

Nem	pH	Zaman	Aktivite (U/ml)
0	0	0	10,24
-1	-1	1	11,92
-1	1	-1	22,81
0	0	0	8,38
-1,68	0	0	21
1,68	0	0	6,57
0	-1,68	0	11,67
0	0	0	19,60
0	0	0	13,99
1	-1	-1	12,01
0	0	1,68	9,71
0	0	0	12,14
1	-1	1	14,12
0	0	-1,68	9,17
1	1	1	22,39
-1	1	1	23,73
-1	-1	-1	24,66
0	1,68	0	22,48
0	0	0	29,56
1	1	-1	20,61

Çizelge 4.16: İndirgenmiş ikinci dereceden modelin ANOVA' sı (S .coelicolor M145/ lakkaz) (2)

kaynak	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Ortalamaların karesi	F değeri	P- değeri
Model	431,58	4	107,9	3,92	0,0227
Hata	413,34	15	27,56		
Model uygunsuzluğu	232,74	10	23,27	0,64	0,7412
Saf hata	180,6	5	36,12		
Toplam	844,92	19			

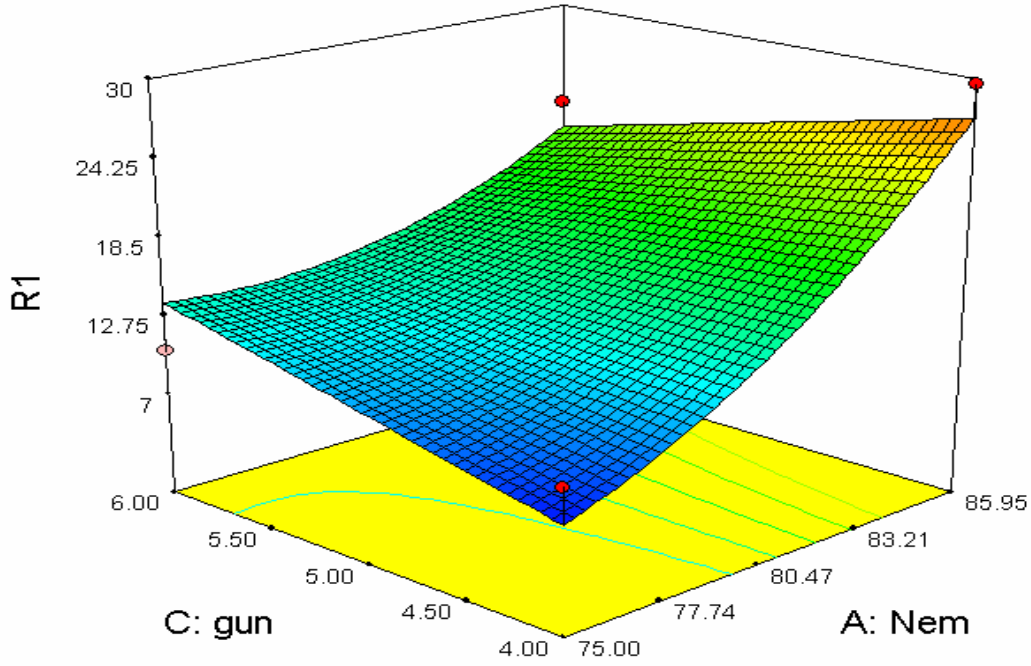
Çizelge 4. 17: Modelin güvenilirliği ile ilgili istatistik veriler (*S. coelicolor* M145/ lakkaz) (2)

Std sapma	5,25	Regresyon katsayısı (R ²)	0.5108
Ortalama	16,34	Adj R ²	0.3803
Varyasyon katsayısı	32.13	Pred R ²	0.2208
PRESS	658,32	Yeterli tahminleme	7.801

Model denklemi:

$$R1 = 14,57 + 3,4 * A - 3,25 * A * B - 3,37 * A * C + 2,58 A^2$$

Şekil 4.11’ de görüldüğü gibi lakkaz aktivitesi nem değerinin kuvvetli bir fonksiyonudur. Nem değeri arttıkça aktivitenin artacağı gözükmemektedir. Ancak kontrol denemelerinde nem % 80’ in üzerine çıktığında aktivitede azalma meydana gelmektedir. Nem değeri %85 olduğunda aktivite yaklaşık 8 kat azalmaktadır. Ayrıca kullanılan buğday kepeğinin nem tutuculuğu maksimum % 80 nem değerindedir (görsel olarak karar verilmiştir.). Bu değer üzerinde sisteme eklenen su, substrat tarafından emilmemekte ve katı tanecikler arasındaki hava boşluğunu doldurmaktadır. Bu durumun üretim sürecinde kütle ve ısı transferi sorunlarına yol açtığı bildirilmektedir (Mitchell et al., 2006). Bu nedenlerden dolayı nem değeri % 80’ de optimum olacağı düşünülerek (bir önceki rsm çalışmasından da yararlanarak) bu değere ayarlanmıştır. % 80 nem değeri için pH’ ın azalan değerlerinde daha fazla aktivite daha kısa sürede gözlenmektedir. Şekil 4.11’e bakarak; enzimin, % 80 nem oranındaki düşük pH değerlerinde, 4. günden önceki bir zamanda sentezlenmiş ve zamanla aktivite kaybederek diğer günlere aktarıldığı şeklinde yorumlanmıştır. 3. deney düzeneğinin tasarımı bu bilgiler ışığında yapılmıştır. Bu deneyde ise başlangıç pH değerinin 7,25 ‘ in üzerine çıktığında ise sistemimizde aktivite kaybı gözlenmektedir. Bu da ilk deneydeki 7-7,5 aralığının istatistiksel olarak anlamsız olduğu bilgisi ile birleştirildiğinde 7-7,25 aralığının anlamsız olup pH 7 de başlatılan üretimlerin optimum aktivite olduğu sonucu çıkarılmıştır.



Şekil 4.11: *S. coelicolor M145*' in Çizelge 4.15' teki verilere göre oluşturulan lakkaz üretiminin yanıt yüzeyi

4.3.6.3. İnokulasyon oranı, azot konsantrasyonu, zaman (inok, N, zaman)

İlk iki deneyde sıcaklık, pH, nem değerleri optimum koşullarına getirilmiştir. Katı kültür verimini etkileyen diğer değişkenler ise inokulasyon oranı ve C/N oranıdır. C/N oranı değişkeni, karbon kaynağı olan buğday kepeği miktarını 10 gr' da sabitleyip doğrudan azot miktarı şeklinde alınmıştır. Önceki denemelerden optimum olarak elde edilen 0,6 gr NH_4NO_3 miktarı YYY' deki merkezi nokta olarak alınmıştır. İnokulasyon oranı değerleri elde edilen spor süspansiyonunun ml' sindeki spor sayısına göre alınmıştır. Kullanılan spor süspansiyonunda $4 \cdot 10^7$ adet/ml spor bulunmaktadır. Bu neden ile merkezi noktayı 10^5 alıp dışarıdaki (aksiyel) noktaları 10^6 ve 10^4 atandığında, CCD kullanılarak 10^7 ve 10^3 inokulasyon oranlarında da sistemin nasıl yanıt vereceği test edilmiştir. 2. deneyde kararlaştırılan 4. gün öncesinin gözlenmesinde ise merkezi nokta olarak 3 gün alınmış böylelikle aksiyel nokta olarak 4. gün alınıp CCD ile 5. gündeki aktivite de gözlenmiştir. Bu tasarımda kullanılan değişkenler ve hangi aralıklarda analiz edildikleri Materyal Metod' ta (bkz. Çizelge 3.5) gösterilmiş, deneylerden elde edilen yanıtlar ve tasarım şablonu Çizelge 4.18' de verilmiştir. Verilerin analizi ise Çizelge 4.19- 4.20' de yapılmıştır.

Çizelge 4.18: MKT' de kodlanan değerler ve gözlenen yanıt (*S. coelicolor* M145/lakkaz aktivitesi) (3)

İnokulasyon oranı	Azot miktarı	Zaman	Aktivite (U/ml)
-1	-1	-1	12,1
1	-1	-1	16,13
-1	1	-1	2,01
1	1	-1	4,29
-1	-1	1	
1	-1	1	14,79
-1	1	1	4,71
1	1	1	4,9
-1,68	0	0	8,72
1,68	0	0	30
0	-1,68	0	14,57
0	1,68	0	7,604
0	0	-1,68	1,72
0	0	1,68	
0	0	0	16,49
0	0	0	2,22
0	0	0	24,18
0	0	0	18,33
0	0	0	17,15
0	0	0	16,44

Çizelge 4.19: İndirgenmiş ikinci dereceden modelin ANOVA' sı (*S. coelicolor* M145/ lakkaz) (3)

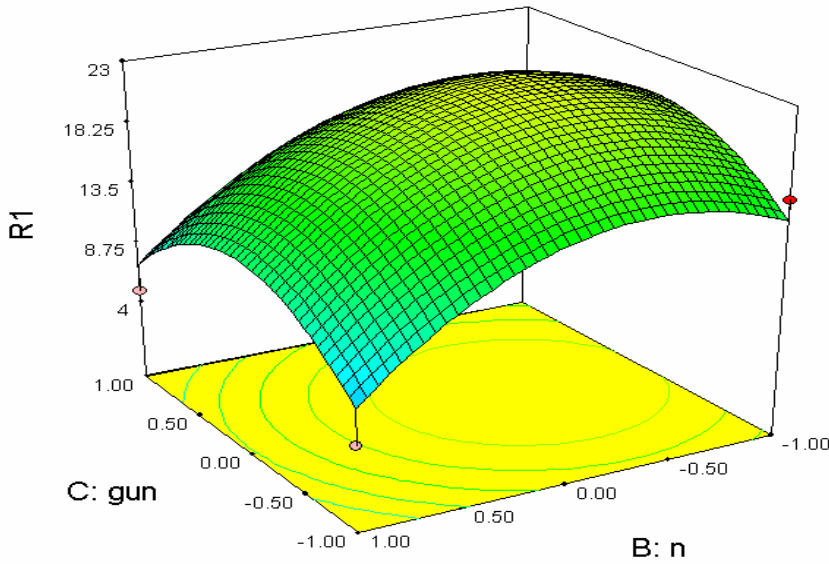
Kaynak	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Ortalamaların karesi	F-değeri	P- değeri
Model	726,88	4	181,7	6,25	0,0049
Hata	377,46	13	29		
Model uygunsuzluğu	113,77	8	14,22	0,269	0,95
Saf hata	263	5	52,74		
toplam	1104	17			

Çizelge 4.20: Model güvenilirliğinin testi için gerekli istatistiki veriler (*S.coelicolor* M145/lakkaz) (3)

Std Sapma	5,39	Regresyon katsayısı(R^2)	0,6582
Ortalama	12.02	Adj R^2	0,553
Varyasyon katsayısı	44.83	Pred R^2	0,3613
PRESS	705.32	Yeterli tahminleme	9,241

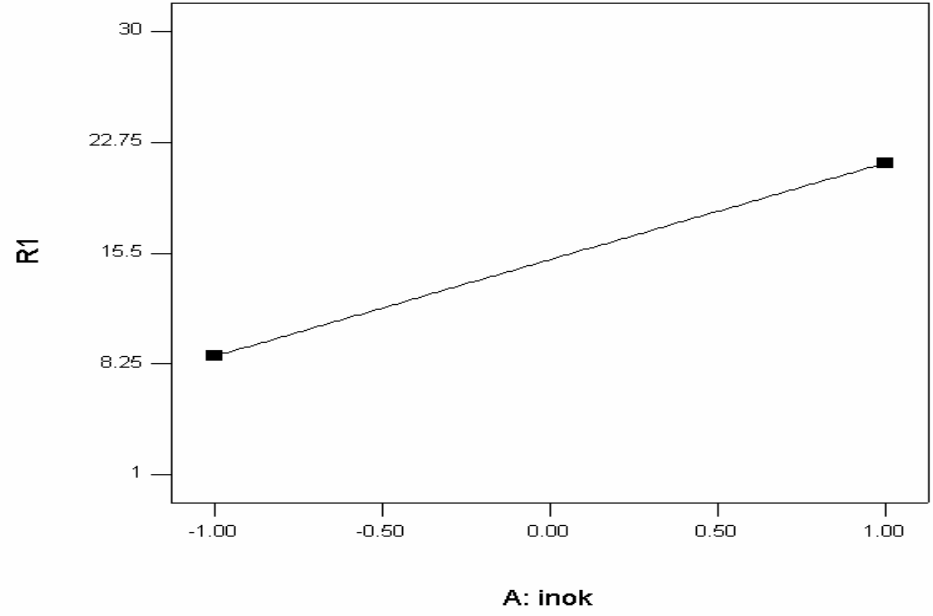
Model denklemi;

$$R1=15,18 + 6,33 * A - 3,74 * B - 5,52 * C^2 - 5,2* A* B^2$$



Şekil 4.12: *S. coelicolor*' ın Çizelge 4.18' deki verilere göre oluşturulan deneyden elde edilen lakkaz üretiminin yanıt yüzeyi.

Şekil 4.12' de aktivitenin azot konsantrasyonu 0,53gr olduğu 3. günde maksimum aktiviteyi vermektedir. İnokulasyon oranı arttıkça aktivitede artış görülmektedir. İnokulasyon miktarını optimize etmek için 2. deney tasarlanmıştır.



Şekil 4.13: Lakkaz aktivitesinin inokule edilen spor sayısı ile değişimi

4.3.6.4. İnokule edilecek spor sayısının belirlenmesi:

Spor süspansiyonundan alınan örnekler 10^6 , 10^7 oranlarında erlenlere ekilmiştir.

Elde edilen aktivite değerleri;

- 10^6 değeri için 24,2
- 10^7 değeri için 23,5

elde edilmiştir. YYY kullanılarak yapılan optimizasyon denemelerinin sonucunda;

Optimum koşullar çizelge 4.21'deki gibi bulunmuştur.

Çizelge 4.21: *S. coelicolor M145*' dan lakkaz üretimi prosesi için optimum değerler

Sıcaklık	28 °C
pH	7
nem oranı	% 80
inokulasyon miktarı	10^6
Üretim süresi	3
NH ₄ NO ₃ miktarı	0,53

4.3.7. Harici bir karbon kaynağı ile besi ortamının desteklenmesinin lakkaz enzimi üretimi üzerine etkisinin incelenmesi:

Optimize edilmiş üretim ortamına çay gibi fenolik içeriği yüksek, kompleks bileşenlerin substrat olarak kullanılan buğday kepeği ile farklı oranlarda (9,5/0,5, 9/1, 8/2) karıştırılıp, lakkaz aktivitesindeki değişim incelenmiştir. Aktivite değerleri Çizelge 4. 22' de verilmiştir.

Çizelge 4. 22: *S. coelicolor M145* için farklı oranlardaki buğday kepeği- çay karışımından elde edilen lakkaz aktivite değerleri

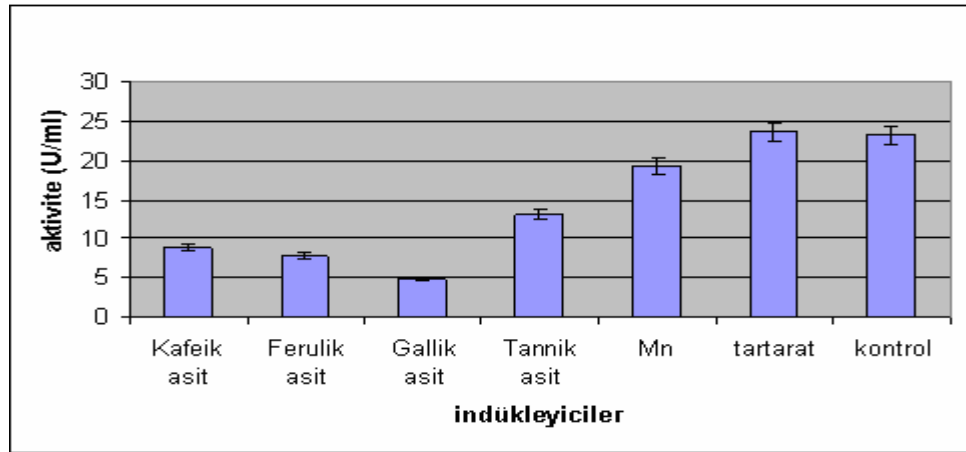
Buğday kepeği/ çay oranı (gr/gr)	U/ml
10/0	30,24
9,5/0,5	15,39
9/1	0,33
8/2	0,13

S. coelicolor M145 çay içeren örneklere ekildiğinde aktivite kaybı yaşamaktadır. 0,5 gr çay içeren optimize besi ortamına ekilen *S. coelicolor M145* lakkaz aktivitesinin % 50 sini kaybetmiştir. 1 gr çay içeren örnekte ise aktivite %1' e düşmüştür.

4.3.8. İndükleyici maddelerin lakkaz üretimine etkisi:

Lakkaz üretimi için optimum ortam kompozisyonu ve şartları belirlendikten sonra enzim üretimini teşvik edici fenolik ve fenolik olmayan 7 bileşik denenmiştir. İnokulasyondan 4 gün sonra aktivite tayini yapılmıştır. Kullanılan bileşikler (bkz Materyal Metod 3.2.6.3) Şekil 4.14' te gösterildiği gibi % 80 nem düzeyinde kontrol grubu ile kıyaslama yapıldığında tartaratlı ortamdaki aktivite yüksek çıkmasına rağmen aralarındaki fark anlamsızdır. Diğer bileşikler ise aktiviteyi düşürmektedir. Çizelge 4.26' da % 80 nem düzeyindeki aktiviteler gösterilmiştir. Kontrol grubu ile yapılan kıyaslamalarda lignin model bileşikleri olan kafeik asit, ferulik asit gallik asit ve tannik asitin lakkaz sentezini azaltmıştır. Örneğin gallik asit aktivite değerini %80 azaltmıştır. Ayrıca çay atığı buğday kepeği karışımlarında da çay atıklarının oranının artışı ile birlikte elde edilen lakkaz aktivitesi azalmaktadır. Bu bulgulara dayanarak, fenolik bileşiklerin

Streptomyces coelicolor M145 hücrelerine toksik etkiye bulunduğu ve bu hücrelerin lakkaz sentezini indüklemediği, *Streptomyces*' ların lakkaz salgılama nedenlerinin fenolik bileşik detoksifikasyonu veya bu bileşiklerin karbon kaynağı olarak kullanılmasının olmadığı şeklinde yorumlanmıştır. Literatürde, Niladevi (2008) optimize edilen ortam bileşimine konan birçok indükleyici maddenin *Streptomyces psammaticus*'tan elde edilen lakkazın aktivite değerlerini arttırdığını görmüştür.



Şekil 4.14: *Streptomyces coelicolor M145* 'te indükleyici maddelerin lakkaz sentezine etkisi

Bu değerlerden en yüksek pirogallol kullanıldığında aktivitenin 9,6 U/ml ye kadar çıktığı gözlenmiştir. (kontrol grubunun aktivitesi 5,9 U/ml ' dir.). Fungal kaynak olan *Lentinula edodes*' tan elde edilen lakkazda ise hücreler amonyum tartarat ile indüklendiklerinde 30. günde 251 U/ml aktivite vermektedir.. *S. coelicolor M145* 3 günde 35 U/ml aktivite vermektedir. Bunun verimlilik değerleri 11,67 U/ ml/ gün olurken *L. edodes* kullanıldığında verimlilik değeri 8,33 U/ ml/ gün olmaktadır.

4.4. *Streptomyces M 33-1* İzolatı ile Yapılan Üretim Denemeleri

4.4.1. pH ayarlama Yöntemi

Streptomyces M 33-1 izolatı için çeşitli yöntemler ile pH ayarlaması yapılarak aktivite değerlerine bakılmıştır. Elde edilen aktiviteler Çizelge 4. 23' de

gösterilmiştir. Çizelge 4.23' e göre *Streptomyces* M33-1 hücrelerinden lakkaz üretimi için pH değerinin ayarlanmasında CaCO₃ kullanılması kararlaştırılmıştır.

Çizelge 4.23: *Streptomyces* M 33-1 için pH ayarlama yöntemi ve elde edilen aktivite değerleri

pH ayarlama yöntemi	Aktivite (U/ml)
NaOH	-
Tris	2,25
CaCO ₃	3

4.4.2. Azot kaynağının belirlenmesi:

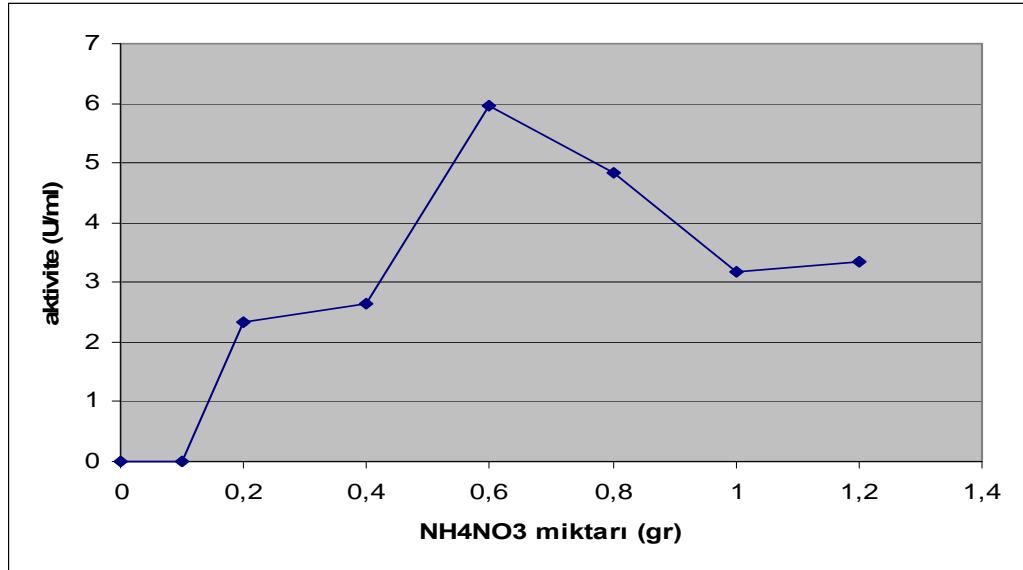
10 gr buğday kepeği/ 7.5 gr çay/ 10 gr zeytin yaprağı üzerine 0,2 gr organik veya inorganik azot kaynaklarının eklenmesi ile denemeler yapılmıştır. Taranan azot kaynakları materyal metod 3.1.2 de gösterilmiştir. Deneme sonuçları *Streptomyces* M 33-1 için Çizelge 4.24' deki gibidir. En iyi sonuç NH₄NO₃ kullanıldığında alınmıştır. Çizelge 4.28' de yer almayan diğer inorganik ve organik azot kaynaklarında ise aktivite bulunamamıştır.

Çizelge 4.24: *Streptomyces* M 33-1 'de lakkaz aktivitesi bulunan azot kaynakları

Azot kaynakları/ karbon kaynağı	Aktivite (U/ml)
NH ₄ NO ₃ /buğday kepeği	2,42
KNO ₃ /buğday kepeği	0,40
NaNO ₃ /buğday kepeği	0,20

4.4.3. Optimum azot konsantrasyonunun belirlenmesi:

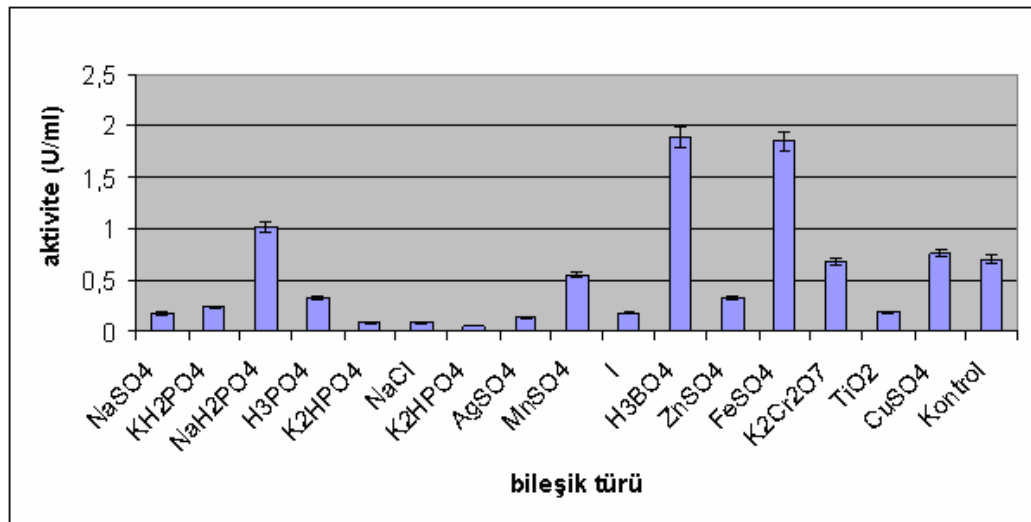
Farklı miktarlarda azot içeriği olan buğday kepekli ortamların incelenmesi ile elde edilmiştir. Şekil 4.15 de azot miktarına göre aktivitedeki değişim gözükmemektedir. *Streptomyces* M 33-1' için optimum azot miktarı 0,6 gr NH₄NO₃ olarak bulunmuştur.



Şekil 4.15: *Streptomyces M33-1* ' de NH₄NO₃ miktarı ile lakkaz sentezi arasındaki ilişki

4.4.4 Çeşitli bileşiklerin aktiviteye olan etkileri ve besi ortamı bileşimi:

Streptomyces M33-1. izolatu kullanılarak yapılan mineral madde taraması sonucu çıkan sonuçlar şekil 4.13' deki gibidir. Taranan maddeler Materyal metod kısmında verilmiştir. (bkz çizelge 3.3) Şekil 4.13' te bor ve demir bileşiklerinin lakkaz aktivitesini arttırdığı görülmektedir.



Şekil 4.16: *Streptomyces M33-1*' in lakkaz sentezine çeşitli maddelerin etkisi

Aynı zamanda bakır sülfatın da aktiviteyi arttırdığı düşünülerek bu 3 bileşik ve çinko sülfatın aktiviteyi nasıl etkilediği istatistiki analiz ile karşılaştırılmıştır. Tasarım 2⁴⁻¹ faktöriyel tasarım şeklinde gerçekleştirilmiştir. Bu

tasarımda kullanılan değişkenler ve hangi aralıklarda analiz edildikleri materyal metod ta (bkz. Çizelge 3.6) gösterilmiş, deneylerden elde edilen yanıtlar ve tasarım şablonu Çizelge 4.25 te verilmiştir. Verilerin analizi ise Çizelge 4.26-4.27' de yapılmıştır.

Çizelge 4.25: 2^{4+1} faktöriyel tasarımda kodlanan değerler ve gözlenen yanıt (*Streptomyces* M33-1/lakkaz)

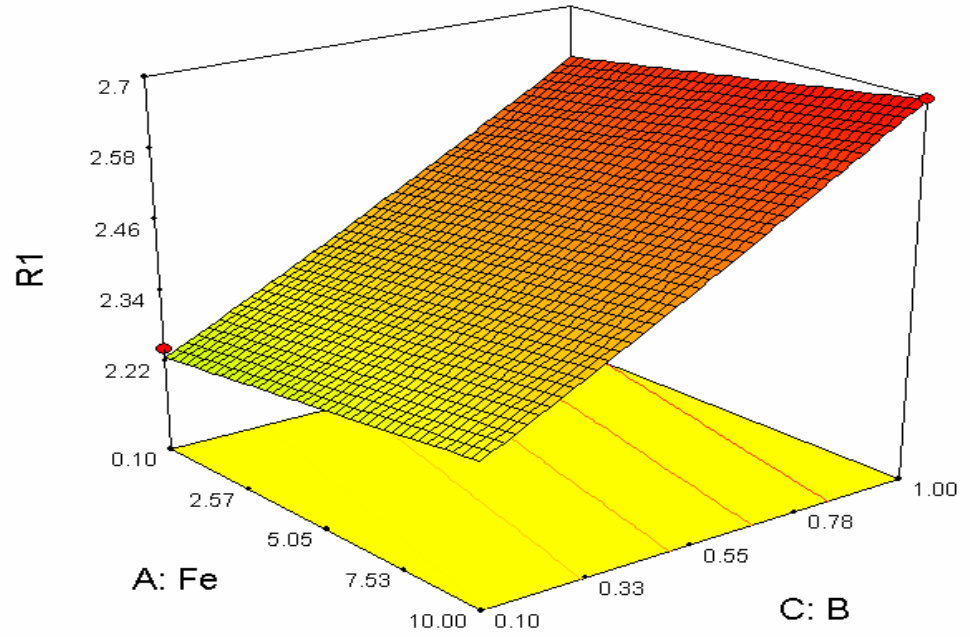
Fe	Cu	B	Zn	Aktivite (U/ml)
0,1	0,1	1	1	1,77
0,1	0,1	0,1	0,1	2,24
10	1	1	1	1,095
10	1	0,1	0,1	1,35
10	0,1	1	0,1	2,7
0,1	1	1	0,1	2,35
0,1	1	0,1	1	1,37

Çizelge 4.26: 2^{4+1} faktöriyel tasarımın Anova' sı (*Streptomyces* M33-1/ lakkaz)

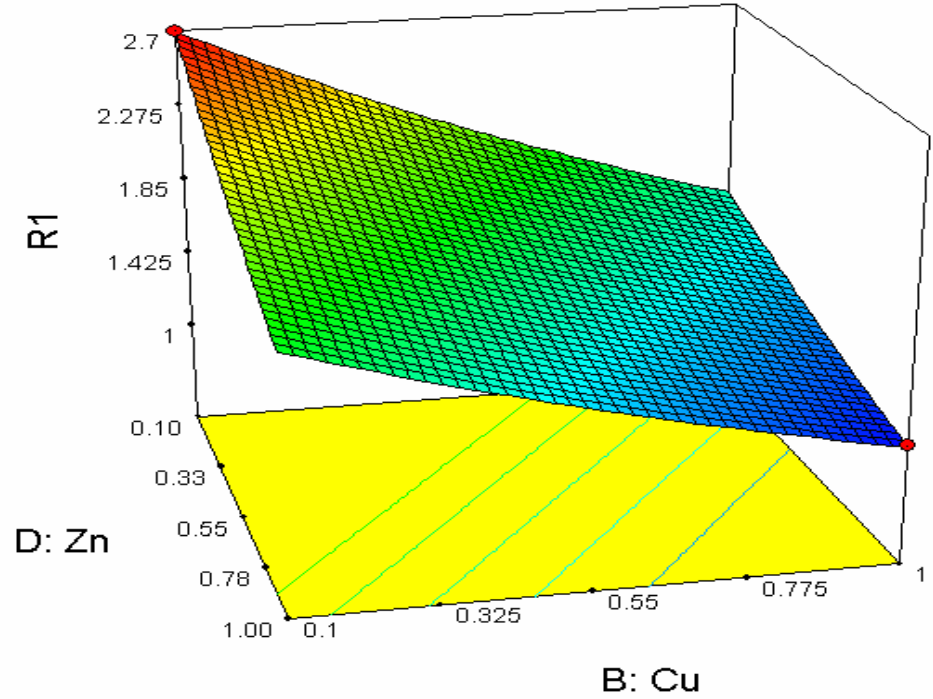
Kaynak	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Ortalamaların karesi	F-değeri	P- değeri
Model	0,69	5	0,14	1607,81	0,0006
hata	$1,726 \cdot 10^{-3}$	2	$8,628 \cdot 10^{-5}$		
toplam	0,69	7			

Çizelge 4.27: Model güvenilirliğinin testi için gerekli istatistiki veriler

Std Sapma	$9,289 \cdot 10^{-0,03}$	Regresyon katsayısı (R^2)	0,9998
Ortalama	0,55	Adj R^2	0,9991
Varyasyon katsayısı	1,7	Pred R^2	0,996
PRESS	$2,761 \cdot 10^{-0,03}$	Yeterli tahminleme	112.925



Şekil 4.17: *Streptomyces* M33-1' de Demir ve borun lakkaz sentezine etkisi



Şekil 4.18: S. M33-1 Bakır ve çinko miktarına bağlı olarak lakkaz aktivitesinin değişimi

Şekil 4.17' te görüldüğü gibi FeSO_4 ve H_3BO_4 miktarına bağlı olarak aktivitedeki değişim gösterilmektedir. İstatistiksel veri analizi sonucu; CuSO_4 ve ZnSO_4 ' ın azalan konsantrasyonlarında (şekil 4,18); FeSO_4 ve H_3BO_4 ' ün artan

konsantrasyonlarında aktivitenin arttığı görünmüştür. Bu nedenden dolayı ortam bileşeni olarak CuSO_4 ve ZnSO_4 çıkartılmıştır. Demir ve bor'un optimum değerini bulmak için 3. bir deneme kurulmuştur.

Deneme 3

Bu denemede FeSO_4 ' tan 10- 15- 20- 25 mg H_3BO_4 ' ten ise 1,875- 3,75- 7,5- 10 mg kullanılarak lakkaz aktivite değerlerine bakılmıştır.

Çizelge 4.28: Demir ve borun miktarının lakkaz aktivitesine etkisi (*Streptomyces* 33-1)

FeSO_4	Aktivite	H_3BO_4	Aktivite
10	3,064	1,875	1,5
15	3,3	3,75	1,89
20	3,67	7,5	4,1
25	2,39	10,0	3,78

Optimum aktivite değerleri FeSO_4 için 20 mg H_3BO_4 için 7,5 mg 'dır.(Çizelge 4.28). Metal atıklarının varlığı bu organizmanın lakkaz sentezini olumlu ve olumsuz yönde etkileyebilmektedir.

20 mg FeSO_4 aktiviteyi 5,25 kat arttırmakta 7,5 mg H_3BO_4 5,87 kat arttırmıştır. 1mM Bakır sülfatın aktiviteye etki etmediği, 1mM mangan ilavesi ile aktivitenin %18 azalmıştır. 1mM Çinko ilavesinde ise aktivite %50 azalmıştır. Çinko hariç diğer metal kirleticilerinin bulunduğu ortamlarda lakkaz sentezi için *Streptomyces* M 33-1'in kullanılabilceği sonucuna varılmıştır. Özellikle Fe ve B' elementlerinin lakkaz sentezini bu derece yüksek seviyede indüklemesi bu organizma için lakkazın demir metabolizmasında ilgili bir metabolik fonksiyonu yerine getirdiği ya da ender olarak görünen beyaz veya sarı lakkaz (yapılarında bakır iyonu yerine başka bir iyon bulunan) sentezlediği düşünülmektedir.

4.4.5. *Streptomyces* M 33-1 'de katı kültür değişkenlerinin optimizasyonu

Bu tasarımda kullanılan değişkenler ve hangi aralıklarda analiz edildikleri Materyal Metod'ta (bkz. Çizelge 3.7) gösterilmiş, deneylerden elde edilen yanıtlar

ve tasarım şablonu Çizelge 4.29' te verilmiştir. Verilerin analizi ise Çizelge 4.30-4.31' te yapılmıştır.

Çizelge 4.29: MKT' de kodlanan değerler ve gözlenen yanıt (Streptomyces M33-1/lakkaz aktivitesi)

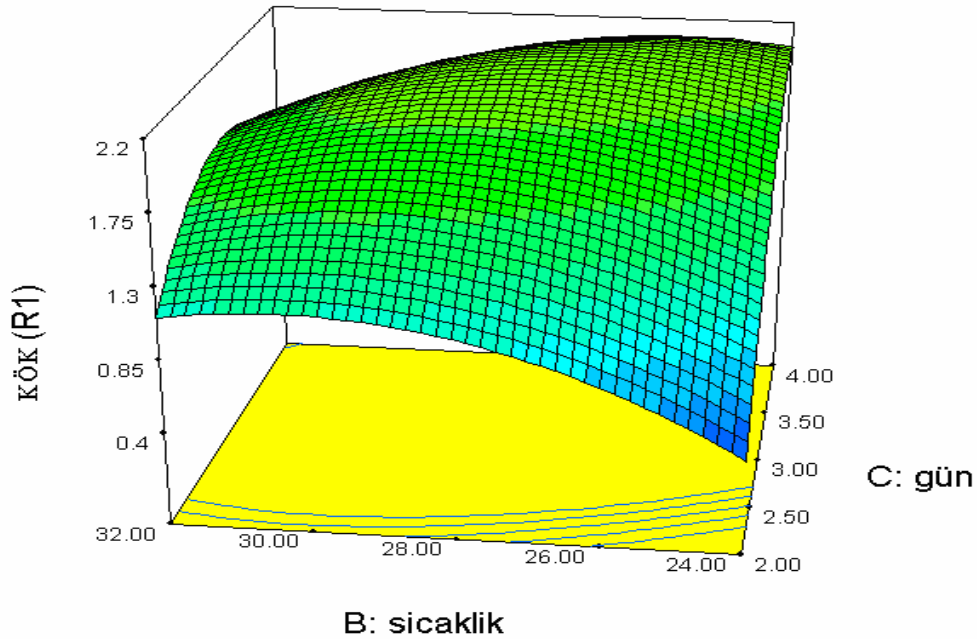
nem	Sıcaklık	Gün	Aktivite (U/ml)
-1	-1	-1	0,016
1	-1	-1	0,85
-1	1	-1	0,094
1	1	-1	1,38
-1	-1	1	5,75
1	-1	1	4,14
-1	1	1	0,15
1	1	1	2,47
-1,68	0	0	11,6
1,68	0	0	3,41
0	-1,68	0	2,95
0	1,68	0	0,81
0	0	-1,68	0,008
0	0	1,68	2,13
0	0	0	1,73
0	0	0	3,22
0	0	0	
0	0	0	4,83
0	0	0	3,50
0	0	0	

Çizelge 4.30: MKT' da indirgenmiş ikinci dereceden denklemin ANOVA' sı

Kaynak	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Ortalamaların karesi	F-değeri	P- değeri
Model	7,8	4	1,95	5	0,0116
hata	5,08	13	0,39		
Model uygunsuzluğu	4,68	10	0,47	3,53	0,1636
Saf hata	0,4	3	0,13		
toplam	12,88	17			

Çizelge 4. 31: Modelin güvenilirliği ile ilgili istatistiki veriler. (*Streptomyces M33-1/lakkaz*)

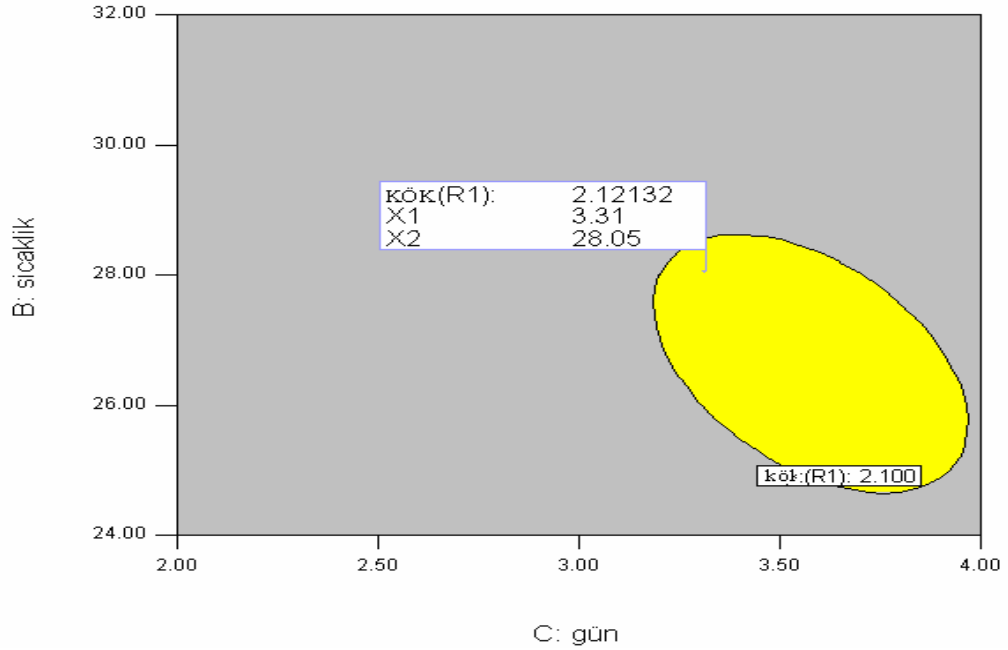
Std Sapma	0,62	Regresyon katsayısı (R^2)	0,6059
Ortalama	1,42	Adj R^2	0,4846
Varyasyon katsayısı	44,09	Pred R^2	0,3176
PRESS	8,79	Yeterli tahminleme	6,607

Şekil 4. 19: *Streptomyces M33-1*' de lakkaz aktivitenin yanıt yüzeyi grafiği

Model denklemi:

$$KÖK (R1) = +2,03 + 0,45 * C - 0,36 * B * C - 0,31 * B^2 - 0,5 * C^2$$

Köklü ifadenin gelmesinin nedeni Box-Cox' ta ki güç dönüşümü grafiğine bakıldığında bir dönüşümün gerekliliği gözükmektedir. Dönüşüm biçimleri (ln, kök, üssel,...) denenmiş ve bunlar içinde uygun olan dönüşümün kök dönüşümü olduğu görülmüştür



Şekil 4. 20 *Streptomyces M33-1* için optimum noktanın belirlenmesi.

Şekil 4.19' a bakıldığında sistem 3. gün 28 °C' de optimum değerine ulaşmıştır. Şekil 4. 20' de de işaretli nokta alınıp kontrol denemesi yapıldığında aktivite 4,8 U/ ml olarak elde edilmiştir. Bu da tahminlenen değer olan 4,5 U/ ml' ye yakın bir değerdir. Bu verilere göre optimum koşullar çizelge 4.30' da gösterilmiştir.

Çizelge 4. 32: *Streptomyces M33-1*' de lakkaz üretimi için optimum koşullar

Değişken	Optimum değeri
Sıcaklık	28 °C
Üretim süresi	3 gün
Nem	80%
Azot miktarı	0,6 gr

Streptomyces türleri kullanılarak üretilen lakkazlar ile kıyaslama yapıldığında Niladevi, (2007)' de *Streptomyces psammaticus*' tan lakkaz üretiminde 3 faktörün etkili olduğu belirlenmiştir. Bu faktörler maya özütü miktarı, inokulasyon oranı, CuSO₄ miktarı olarak bulunmuştur. Bu faktörlerin optimize edilmesi sonucunda 2. günde 55.4 U/g değerinde enzim aktivitesi elde etmişlerdir. Jing et al, (2010)' da *Streptomyces lavendulae* kullanılarak yapılan çalışmalarda asparajin, üre, fruktoz ve malt özütü değerlerinin optimizasyonu yapılmıştır. Optimizasyon sonucunda 0,1079 U/ml aktivitesi elde edilmiştir.

4.4.6. Harici bir karbon kaynağı ile besi ortamının desteklenmesi:

İki farklı substrat karışımının lakkaz sentezine etkisi incelenmiştir. Bunun için fenol içeriği yüksek çay kullanılmıştır.

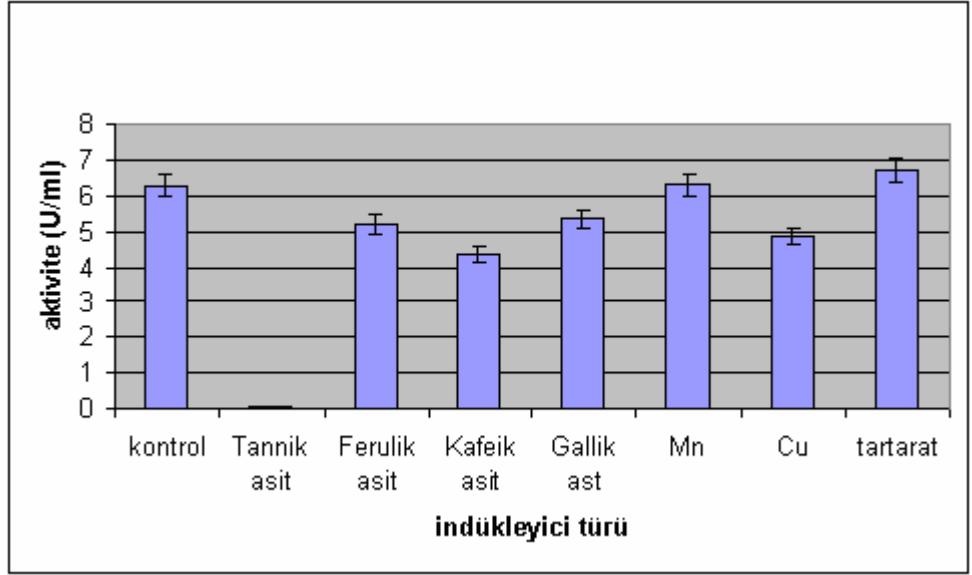
Çizelge 4. 33: *Streptomyces M33-1* için farklı oranlardaki buğday kepeği- çay karışımından elde edilen lakkaz aktivite değerleri

Buğday kepeği/çay oranı (gr/gr)	Aktivite (U/ml)
10/0	6,29
9/1	2,48
8,5/1,5	1,89
8/2	1,26
7/3	1

Çizelge 4.31' de gösterildiği gibi üretim ortamına çay eklenmesi ile aktivitede düşüş gözlenmiştir. 1 gr çay lakkaz aktivitesini % 40' a düşürmüştür. Çayın artan konsantrasyonlarında aktivite kaybı devam etmiştir. 3 gram çay kullanımında aktivite değeri % 15' e düşmüştür. Ancak *Streptomyces M33-1* deki aktivite düşüşü *S. coelicolor M145 ile* karşılaştırıldığında daha düşüktür (bkz çizelge 4.24).

4.4.7 İndükleyici maddelerin lakkaz sentezine etkileri:

Test edilen indükleyiciler materyal metod 3.2.6.3' teki belirtilmiştir.



Şekil 4.21: *Streptomyces M 33-1* için %80 nem oranında indükleyici ajanların lakkaz aktivitesine etkisi.

Şekil 4.21’deki verilere göre fenolik indükleyicilerin kullanımında %15’lik bir aktivite kaybı meydana gelmektedir. Fenolik bileşikler *Streptomyces M 33-1* izolatına da toksik etkide bulunmaktadır. Ancak bu organizma *S. coelicolor M145*’e göre fenolik bileşiklere daha dirençli olduğu ve toksik metallerin yanı sıra toksik fenoliklere karşı kendini koruyabildiği ancak fenolik bileşiklerden korunurken bunu lakkaz yolu ile yapmadığı sonucuna varılmıştır.

4.5 Üretilen enzimlerin kinetik ve stabilite özelliklerinin incelenmesi

Optimize edilen ortamda *Streptomyces coelicolor M145* ve izolat *Streptomyces M 33-1*’ten üretilen lakkazın optimal verimde çalışmasının sağlanması ve diğer lakkazlar ile kıyaslanabilmesi için temel olarak 3 değerlendirme kriteri alınmıştır. Bunlar;

1. Enzimin verimliliğini belirten kinetik parametreler (V_{max} , K_m)
2. Enzimin optimumda çalışmasını belirleyen çevresel değişkenler (T ve pH)
3. Enzimin dayanıklılığı ile ilgili stabilite ve enzimin inhibisyonu gelmektedir.

4.5.1. Lakkazların Kinetik Sabitleri:

Streptomyces türlerinden elde edilen lakkazların kinetik değerleri Çizelge 4.34' te verilmiştir.

Çizelge 4.34: *Streptomyces coelicolor M145*' ten (Slac) ve izolat *Streptommyces M33-1*' den elde edilen lakkazların kinetik sabitleri

	K_m (mM)	V_{max} (μmol substrat/ dak)
<i>S. coelicolor M145</i>	0,7	53,5
<i>Streptomyces M33-1</i>	0,43	8,17

Literatürde çalışılan lakkazların K_m değerleri 2- 5000 μM arasında değişmektedir (Desai and Nityanand, 2011). Literatür özeti kısmında (bkz. Çizelge 2.7 ve Çizelge 2.3)' te sırası ile *Streptomyces* türlerinde bulunan ve funguslara ait lakkazların kinetik parametreleri verilmiştir. Ayrıca başka bir bakteriyel kaynak olarak Reiss et al. (2011) *Bacillus pumilus* lakkazı ile çalışmış ve bu lakkaz da ABTS için K_m 80 μM , k_{cat} 291 s^{-1} değerlerini bulmuştur.

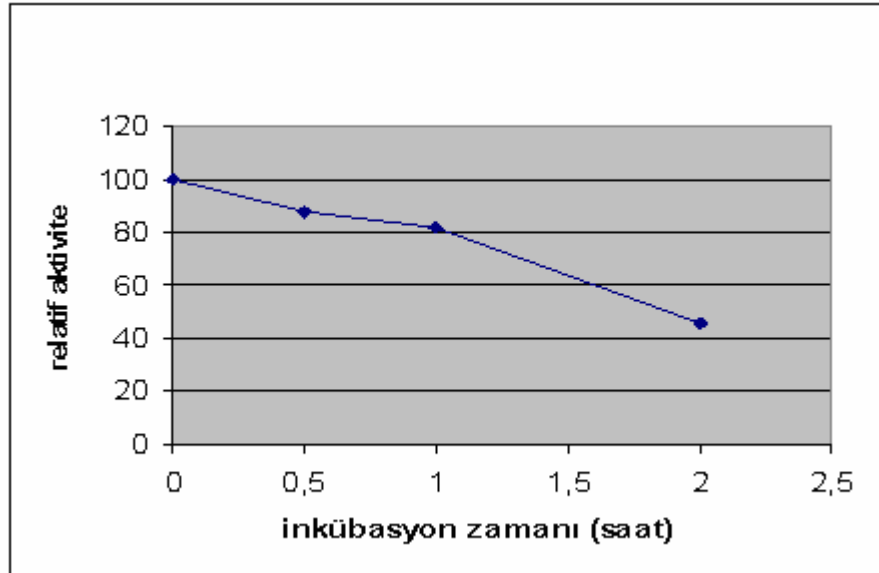
4.5.2. Sıcaklık ve pH' nın enzim aktivite ve dayanıklılığına etkisi:

Lakkaz enzimi için optimum pH aralığının belirlenmesinde substrat olarak ABTS kullanılmıştır. Aktiviteler pH 2- 8 arasında bakılmıştır. Çizelge de farklı pH' larda enzim aktivite değerleri verilmektedir. pH tamponu olarak; pH 2- 3 arası için fosforik asit/ monopotasyum fosfat, pH 3- 6 için sitrat tampon (sitrik asit- trisodyum sitrat), pH 7- 8 için Tris-HCl tamponu kullanılmıştır.

Çizelge 4. 35: Slac için pH- aktivite değerleri.

pH	tampon	Aktivite (U/ml)
2,2	fosfat	6,57
2,5	fosfat	7,8
2,8	fosfat	4,21
3	sitrat	8,80
3,1	sitrat	7,28
3,5	sitrat	4,56
4	sitrat	0,17
5	sitrat	0
6	sitrat	0
7	Tris-HCl	0
8	Tris- HCl	0

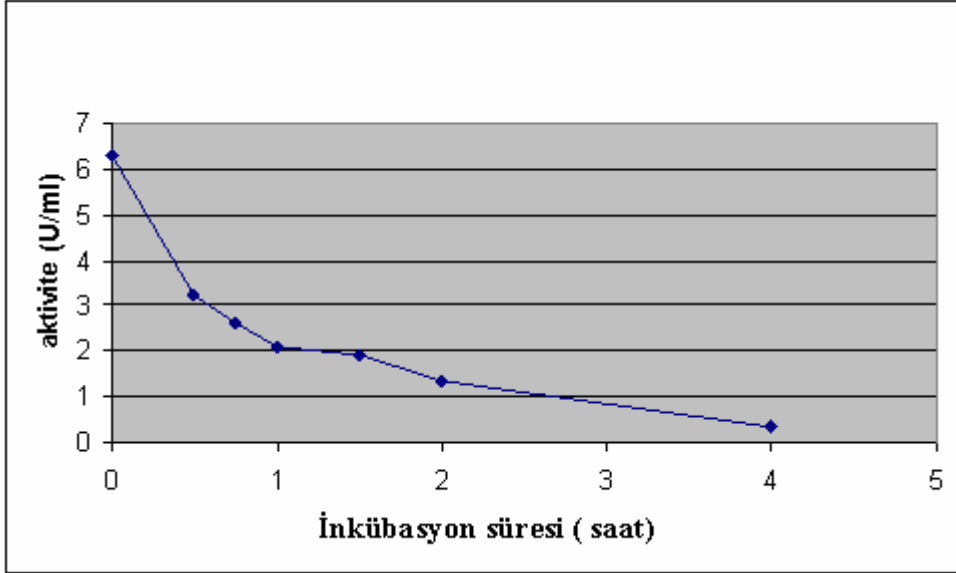
Çizelge 4.35' e bakıldığında enzim optimum aktiviteyi pH 3' te vermekte pH 5' in üzerinde ise lakkaz ABTS' yi oksitleyememektedir.



Şekil 4.22: 70 °C de inkübe edilen Slac 'ın termal stabilite grafiği.

Şekil 4.23 'te 70 °C deki lakkaz enziminin zamana göre aktivite kaybı gösterilmiştir. Enzimin yarı ömrü $T_{1/2}$ 70 °C' de 94 dakika hesaplanmıştır.

Streptomyces M33-1' den elde edilen lakkazın termal stabilitesi Slac' a göre düşüktür. Şekil 4.25' de enzimin denatürasyon hızı gösterilmiştir. *Streptomyces M33-1*' den elde edilen lakkazın 70 °C' deki yarı ömrü 38 dakika olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4. 23: 70 °C de inkübe edilen, *Streptomyces M33-1*' den elde edilen lakkazın termal stabilite grafiği

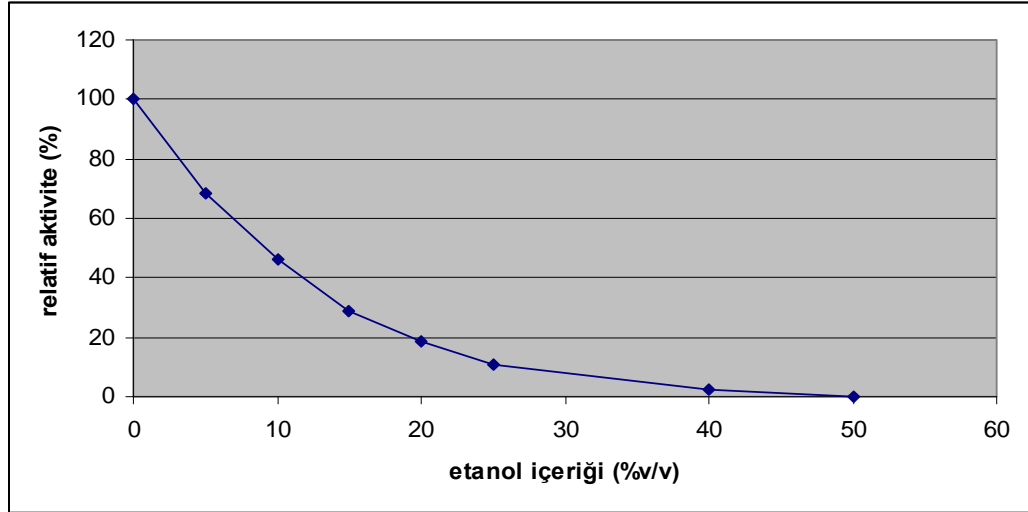
Morozova et al (2007)' de literatürde geçen çeşitli mikroorganizma türlerinden elde edilen lakkazların termal stabilitelelerinden bahsedilmiştir. Literatür özeti kısmında Çizelge 2.2' de çeşitli lakkaz türleri ve termal stabiliteleleri verilmiştir. Çizelge 2.2' de geçen yüksek termal stabiliteye sahip lakkaz üreticilerine örnek olarak iki farklı *Pycnoporus cinnabarinus*' tan elde edilen lakkaz verilebilir. Bu lakkazlardan bir tanesinin yarı ömrü 70°C' de 1 saat iken diğer lakkazın yarı ömrü 70 °C' de 2 saat bulunmuştur. Sharma and Kuhad, (2008)' de *Basillus subtilis*' ten elde edilen cotA lakkazının termal stabilitesinin 80 °C' de 2 saat olduğu belirtilmiştir.

Streptomyces' lardan elde edilen bakteriyel lakkazın, fungal lakkazlara göre termal stabilitelelerini Dube et al, (2008) karşılaştırmıştır. *Trametes versicolor*' dan elde edilen fungal lakkaz 70 °C' de 1 saat bekletildiği zaman tamamen denatüre olmakta iken rekombinant Slac ise 70 °C de 120 dakika bekletildiğinde aktivitesinin %40' ını koruduğu bildirilmiştir. *Streptomyces griseus*' tan elde

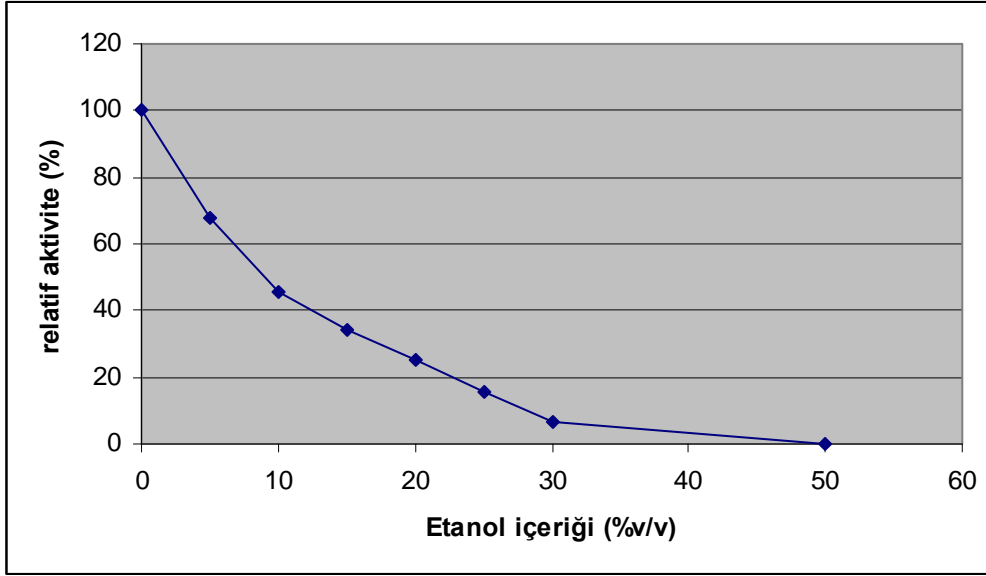
edilen lakkaz (EpoA) 70 °C’ de 1 saat bekletildiğinde aktivitesi % 40’ a düşmekte 80 °C’ de 1 saat bekletildiğinde ise %18’ e düşmektedir. Suzuki, (2003)’ te *Streptomyces lavendulae*’ dan elde edilen termostabil *Streptomyces* lakkazı (STSL) 70 °C’ de 95 dakika bırakıldığında aktivitesinin % 50 azaldığı bildirilmiştir. Niladevi et al., (2008). *S. psammaticus*’ dan elde ettiği lakkazın termal stabilitesini 60 °C de 90 dakika inkübasyona bırakıldığında enzimin % 35 aktivite kaybettiği bildirilmiştir.

4.5.3. Organik çözüenlerde lakkaz aktivitesi:

Lakkaz enziminin substratlarından birçoğu suda çözünmeyen bileşiklerdir. Lakkazın suda çözünmeyen bileşiklere daha rahat ulaşabilmesi için farklı polaritedeki çözüenler kullanılır. Bu nedenden dolayı farklı polartedeki çözüenlerde lakkaz aktivitelerine bakılmıştır. Şekil 4.25 ve 4.26 ‘ da sırası ile *S. coelicolor M145* ve *Streptomyces M33-1*’ in aktivitelerinin etanol konsantrasyonu ile azalışı grafiksel olarak gösterilmiştir.



Şekil 4. 24: Slac’ ın farklı etanol su karışımındaki relatif aktivite değerleri.



Şekil 4. 25: *Streptomyces M33-1*' den elde edilen lakkazın farklı etanol su karışımlarındaki relatif aktivite değerleri.

Slac ve *Streptomyces M33-1* den elde edilen lakkazın etanol inhibisyon değerleri birbiri ile aynı çıkmıştır. Şekil 4.26 ve 4.27' de görüldüğü gibi etanol miktarı arttıkça her iki *Streptomyces* türünden elde edilen lakkazların aktiviteleri düşmüştür. %10' luk bir etanol çözeltisinde her iki enzimde %54 aktivite kaybı yaşamaktadır. %50 etanol çözeltisinde ise her iki lakkaz da aktivite gösterememiştir. Etanolün lakkaza olan etkisinin tersinir / tersinmez olduğunu belirlemek için lakkaz %50 etanol çözeltisinde farklı sürelerde inkübe edilmiş ve seri seyreltmeler sonucu lakkazın bulunduğu ortamdaki etanol oranı % 0.5' e kadar düşürülerek tekrar aktivite değerlerine bakılmıştır. Bulunan aktivite değerleri Çizelge 4.36' da gösterilmiştir.

Çizelge 4. 36: Farklı sürelerde % 50 etanolde bekletilen lakkaz örneklerinin aktivite değerleri

%50 etanolde bekletilme süresi (dakika)	Aktivite (U/ ml)
0	26,43
10	26,06
60	25,45
100	23,15

Bu değerlere göre % 50 (hacim/hacim) etanole maruz kalan enzim etanol seyreltilerek uzaklaştırıldığında yeniden aktivite göstermektedir. Bu veriye dayanarak enzimin denatürasyondan ziyade etanoldeki OH⁻ iyonları nedeni ile inhibe olduğu düşünülmektedir. %50 (h/h) etanolde oda sıcaklığında 100 dakika bekletilen lakkazda, % 87,6 aktivitenin korunduğu görülmüştür. Buna göre Slac ve *Streptomyces M33-1*' den elde edilen lakkazın organik özgenlerin yaratacağı denatürasyona karşı dayanıklı olduğu düşünülmektedir. Organik özgenlerdeki aktivite azalması ile ilgili olarak; Wan et al., (2010)' un yaptığı çalışmada *Rhus vernicifera*' dan elde edilen bitkisel lakkazın %10' luk etanol çözeltisinde aktivitesini % 66 kaybettiği belirtilmiştir. Reiss et al, (2011) *Bacillus pumilus*' tan elde edilen bakteriyel lakkazın farklı miktarda DMSO (dimetilsülfoksit) içeren sulu çözeltilerdeki lakkaz aktivitesini incelemiştir. Substrat olarak ABTS kullanıldığında % 10 (h/h) DMSO, aktiviteyi % 50 düşürürken, substrat olarak şiringaldezin kullandığında % 25 DMSO değerine kadar aktivitede artış görüldüğü belirtilmiştir.

5.SONUÇLAR

Katı kültür fermantasyonu kullanılarak *Streptomyces*' lardan lakkaz üretimi gerçekleştirilmiştir. Tarama aşamasında *Streptomyces coelicolor M145*' ten elde edilen lakkaz aktivitesi 4,93 U/ml olarak bulunmuş, aktivite değeri optimizasyon çalışmaları sonucunda 6 kat artarak 35 U/ml' ye çıkarılmıştır. İzolat, *Streptomyces M 33- 1* için tarama sonucunda aktivitesi 1,74 U/ml bulunmuş optimizasyon çalışmaları ile bu değer 2,6 kat artarak 6,3 U/ ml' ye çıkarılmıştır. Yapılan çalışmalarda lakkaz sentezinin gerçekleşebilmesi için NO₃ iyonlarının varlığına gerek duyulduğu görülmüş, diğer ortam bileşenleri ve katı kültür değişkenlerinin optimizasyonu ile elde edilen lakkazın miktarı arttırılmıştır. *S. coelicolor M145* için optimum ortam koşulları olarak sıcaklık 28 °C, pH 7, %80, inokulasyon miktarı 10⁶ spor/ ml üretim süresi 3 gün NH₄NO₃ miktarı 0,53 gr olarak bulunmuştur. *Streptomyces M33-1* için optimum koşullar, sıcaklık 28 °C, üretim süresi 3 gün, nem % 80, NH₄NO₃ miktarı 0,6 gr olarak bulunmuştur. Optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen lakkaz aktivite değerleri aşağıdaki gibidir.

S. coelicolor M145 için;

NH₄NO₃ kullanımı ile lakkaz sentezinin gerçekleştirilmesi ile aktivite 4,9 U/ml Besi ortamı bileşenlerinin belirlenmesi ve optimizasyonu ile aktivite 17 U/ ml YYY ile katı kültür değişkenlerinin ve parametrelerinin optimizasyonu ile aktivite 35 U/ml olmuştur.

İzolat *Streptomyces M33- 1* için;

NH₄NO₃ kullanımı ile lakkaz sentezinin gerçekleştirilmesi ile aktivite 1,74 U/ml Besi ortamı bileşenlerinin belirlenmesi ve optimizasyonu ile aktivite 4.1 U/ ml YYY ile katı kültür değişkenlerinin ve parametrelerinin optimizasyonu ile aktivite 6,3 U/ml olmuştur.

Oda sıcaklığında, pH 3 tamponunda substrat olarak ABTS kullanılarak yapılan aktivite ölçümlerinde *S. coelicolor M145* ve *Streptomyces M33-1* için Km değerleri sırası ile 0,7 mM ve 0,43 mM, V_{max} değeri sırası ise 53,5 µmol substrat/ dakika ve 8,17 µmol substrat/ dakika olarak bulunmuştur. Enzimlerin 70°C' deki

yarı ömürleri *S. coelicolor* M145 ve *Streptomyces* M33-1 için sırası ile 94 dakika ve 38 dakika olarak bulunmuştur. Literatürde elde edilen lakkaz kaynaklarından fungal lakkazların 60 °C' deki yarı ömürleri 10 dakika ile 2 saat arasında değişmektedir (Morozova et al, 2007). Literatürde geçen *Streptomyces* türlerinden elde edilen lakkazların yarı ömürleri ise 70°C de 30 dakika ile 100 dakika arasında değişmektedir. *Bacillus pumilus* türünden elde edilen cotA lakkazının yarı ömrü 80°C' de 2 saat bulunmuştur (Sharma and Kuhad, 2008). Literatürdeki lakkaz dayanıklılıkları ile tez boyunca kullanılan *Streptomyces* türlerinden elde edilen lakkazın termal dayanıklılıkları karşılaştırıldığında, özellikle *S. coelicolor* M145' ten elde edilen lakkazın fungal varyantlarına göre daha dayanıklı olduğu görülmektedir. Diğer *Streptomyces* türlerinden elde edilen lakkazlar ile eşit veya daha dayanıklı olan *S. coelicolor* lakkazının hücre dışı olması, termal dayanıklılığı daha iyi olan *Bacillus* sporlarına bağlı olarak bulunan CotA lakkazına göre *S. coelicolor* M145 lakkazını avantajlı kılmaktadır. Enzimlerin organik çözümlerdeki dayanıklılıklarını incelemek amacı ile kullanılan etanol- su karışımında her iki enzim de (*Slac* ve *Streptomyces M33-1* den elde edilen lakkaz) etanolde aynı düzeyde inhibe olmuştur. % 10 etanol çözeltisinde enzimler aktivitelerinin % 54' ünü kaybetmiş, %50 etanol çözeltisinde ise aktivite bulunamamıştır. 100 dakika boyunca % 50 etanol içerisinde bekletilen *S. coelicolor* M145 enziminde etanolün seri seyreltmeler sonucu uzaklaştırılmasından sonra lakkaz, uygulamadan önceki aktivite değerinin % 87,5 korunduğu belirlenmiştir. Literatürde bitki *Rhus vernicifera*' dan elde edilen lakkazın %10 etanol çözeltisinde aktivitesi %64 azalırken, bakteriyel kaynak *Bacillus pumilus*' tan elde edilen cotA lakkazının % 10 (h/h) DMSO çözeltisindeki aktivitesi % 50 azalmıştır. Bu verilere göre çözümler olarak etanol kullanıldığında literatürdeki diğer lakkazlara göre *Streptomyces*' lardan elde edilen lakkazların daha dayanıklı olduğu görülmektedir.

6. ÖNERİLER

S. coelicolor M145' ten elde edilen lakkazın termal dayanıklılığı ve çözümlere karşı diğer lakkazlara göre daha dayanıklı olması ve 3 günde 35 U/ml aktivite elde edilmesi bu lakkazın endüstriyel bir biyokatalist olarak kullanılabilir olabileceğini göstermektedir. İzolat *Streptomyces M33-1*, ağır metal içeriği olan ortamlara karşı dayanıklılığı ve bu ortamların lakkaz sentezini indüklemesi, fenoliklere karşı *S. coelicolor M145'* a göre daha dayanıklı olması nedeni ile bu tip bileşiklerle kirlenmiş substratların kullanıldığı lakkaz üretim prosesinde izolat *Streptomyces M33- 1* kullanılabilir. İzolatın nem değeri %70- 80 arasında iken nem değerinin lakkaz sentezine etki etmediği belirlenmiştir. Bu da katı kültür fermantasyon sistemlerinde karşılaşılan substratın zamanla nem kaybetmesinin sistem verimine etkisinin olmaması anlamına gelmektedir. Her iki organizma içinde ölçek büyütme çalışmalarında dikkate alınması gereken bir diğer nokta; erlenlerde gerçekleştirilen üretimlerde *Streptomyces* hücrelerinin 0,1- 1,5 mm boyutunda koloni çaplarının olduğu görülmüştür. Koloni çapına sahip hücreler, inokulasyon esnasında sporların homojen bir şekilde dağılmadığı durumlarda substratı verimli bir şekilde kullanılamaz. Bu nedenle homojen dağılım sağlayabilen iyi bir inokulasyon sistemi geliştirilmesi bu organizmalar için çok daha önemlidir. *Streptomyces* türlerinin katı kültür açısından en büyük dezavantajı aktivite gösterebildikleri sıcaklık aralığının 25-35 °C olmasıdır (Kampfer, 2006). Bu da ölçek büyütme çalışmalarında katı kültürde yaşanan ısı transferi problemleri ile birleşince sistem verimini önemli ölçüde etkileyecektir. Bu nedenden dolayı ısı transferinin iyi olduğu bir sistemde çalışma yapılmalıdır.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ

Alcalde, M., 2007, Laccases: Biological functions, molecular structure and industrial applications, *Industrial enzymes*, 461-476

Arias, M.E., 2004, The analysis of handsheets from wheat straw following solid substrate fermentation by *Streptomyces cyaneus* and soda cooking treatment, *Bioresource Technology*, 4:27-31

Berrocal, M.M., Rodriguez, J., Hernandez, M., Perez, M.I., Roncero, M.B., Vidal, T., Ball, A.S and Arias, M.E., 2003, The analysis of handsheets from wheat straw following solid substrate fermentation by *Streptomyces cyaneus* and soda cooking treatment, *Bioresource Technology*, 94:27-31

Borodina, I., Krabben, P and Nielsen, J., 2009, Genome- scale analysis of *Streptomyces coelicolor* A3(2) metabolism, *Genome Research*, 15:820-829

Call, H.P and Mücke, I., 1997, History, overview and application of mediated ligninolytic systems, especially laccase- mediator- systems (Lignozym®-process), *Journal of Biotechnology*, 53:163-202

Carley, K.M., Kamneva N.Y and Reminga, J., 2004, Response Surface Methodology, CASOS Technical Report,

Claus, H., 2003, Laccases: Structure, reactions, distribution, *Micron*, 35:93-96

Desai, S.S and Nityanand, C., 2011, Microbial laccase and their applications: A review, *Asian Journal of Biotechnology*, 3(2):98-124

Dube, E., Shareck, F., Hurtubise, Y., Daneault, C., and Beauregard, M., 2008, Homologous cloning, expression, and characterisation of a laccase from *Streptomyces coelicolor* M145 and enzymatic decolourisation of an indigo dye. *Apply Microbiol Biotechnol*, 79:597-603

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Dwivedi, U.N., Singh, P., Pandey, V.P., and Kumar, A., 2011, Structure- function relationship among bacterial, fungal and plant laccases, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68:117-128

Endo, K., Hayashi, Y., Hibi, T., Hosono, K., Beppu, T., and Ueda, K., 2003, Enzymological characterization of EpoA, a laccase- like phenol oxidase produced by *Streptomyces griseus*, *J. Biochem.*, 133:671-677

Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S and Sannia, G., 2010, Laccase: a never-ending story, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67:369-385

Guijarro, J., M., Perez, J., Dorado, J.M., Guillen, F., Moya, R., Hernandez, M., and Arias, M., 2009, *International Microbiology*, 12:13-21

Herrera, J.L.T., Osma, J.F and Couto, S.R., 2007, Potential of solid-state fermentation for laccase production, *Communication Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 391-400

Hölker, U., Hölker, M and Lenz, J., 2004, Biotechnological advantages of laboratory- scale solid state fermentation with fungi, *Appl. Microbiol Biotechnol*, 64:175-186

Hölker, U and Lenz J., 2005, Solid state fermentation- are there any biotechnological advantages?, *Current Opinion in Microbiology*, 8:301-306

Kampfer, P., 2006, The family *Streptomycetaceae*, Part I: taxonomy, *Prokaryotes*, 3:538-604

Krishna, C, 2005, Solid-state fermentation systems- An overview, *Critical Review in Biotechnology*, 25:1-30

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F and Hopwood, D.A., 2000, Practical *Streptomyces* Genetics, John Innes Centre, Ltd, 613p
- Kunamneni, A., Plou, F. J., Ballesteros, A and Alcalde. M., 2008, Laccases and their applications: A patent review. *Recent Pat Biotechnol*, 2(1):10-24
- Machczyński, M.C., Vliegenhart, E., Samyn, B and Canters, G.W., 2004, Characterization of SLAC: A small laccase from *Streptomyces coelicolor* M145 with unprecedented activity, *Protein Science*, 13: 2388-2397
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., and Parker, J., 2003, Brock Biology of Microorganisms, Prentice Hall, 1019p
- Mitchell, D.A., Krieger, N., and Berovic, 2006, Solid State Fermentation Bioreactors Fundamentals of Design and Operation, Springer, 447p
- Morozova, O.V., Shumakovich, G.P., Gorbacheva, M.A., Shleev, S.V., Yaropolov, A.I., 2007, "blue laccase" , *Biochemistry*, 72:1136-1150
- Nakamura, K., Go, N., 2005, Function and molecular evolution of multicopper blue proteins, *CMLS, Cell. Mol. Life Sci*, 1-17
- Niladevi, K.N., and Prema, P., 2008, Effect of inducers and process parameters on laccase production by *Streptomyces psammoticus* and its application in dye decolourization, *Bioresources Technology*, 99:4583-4589
- Niladevi, K.N., Sukumaran R.K., and Prema, P., 2007, Utilization of rice straw for laccase production by *Streptomyces psammoticus* in solid- state fermentation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, 34:665-674

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Nowak, J.R., Kasture, S.M., Dudek, B., Haber, J., 2000, Effect of various water-miscible solvents on enzymatic activity of fungal laccases, *Journal of Molecular Catalysis*, 11:1-11

Pandey, A., 2000, Solid state fermentation, *Biochemical Engineering Journal*, 23:81-84

Raimbault, M., 1998, General and microbiological aspects of solid substrate fermentation, *EJB Electronic Journal of Biotechnology*, 1:174-188

Reiss, R., Ihssen, J., and Meyer, L.T., 2011, *Bacillus pumilus* laccase: a heat stable enzyme with a wide substrate spectrum, *BMC Biotechnology*, 11:9

Sharma, K.K., and Kuhad, R.C., 2008, Laccase: enzyme revisited and functional redefined, *Indian J. Microbiol*, 48:309-316

Skalova, T., Dohnalek, J., Ostergaard, L.H., Ostergaard, P.R., Kolenko, P., Duskova, J., Stepankova, A., and Hasek, J., 2009, The structure of the small laccase from *Streptomyces coelicolor* reveals a link between laccases and nitrite reductases, *Journal of Molecular Biology*, 4:1165-1178

Suzuki, T., Endo, K., Ito, M., Tsujibo, H., Miyamoto, K., and Inamori, Y., 2003, A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: purification, characterization, Nucleotide sequence and expression, *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 67:2167-2175

Tuncer, M., 2010, Lakkaz kısmı1: yapısı, katalitik özellikleri ve dağılımları, *Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 22:19-63

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Wan, Y.Y., Lu, R., Xiao, L., Du, Y.M., Miyakoshi, T., Chen, C.L., Knill, C.J., and Kennedy, J.F., 2010, Effects of organic solvents on the activity of free and immobilised laccase from *Rhus vernicifera*, International Journal of Biological Macromolecules, 47:488-495

Worrall, J.A.R., and Vijgenboom, E., 2009, Copper mining in *Streptomyces*: enzymes, natural products and development, Natural Product Reports, 27:742-756

Xu, J., and Yang, Q., 2009, Isolation and characterization of rice straw degrading *Streptomyces griseorubens* C-5, Biodegradation, 21:107-116

8 ÖZGEÇMİŞ:

Mustafa DURAN, 1985 yılında İzmir de doğdu. İlk- orta lise öğrenimini İzmir' in Aliğa ilçesinde gördükten sonra 2003 yılında Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümün kazandı. 2008 yılında öğrenimini tamamladı. Yine aynı yıl Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümünde yüksek lisans programına başladı.