

***Enterococcus faecium* A2'den LAKKAZ ENZİMİNİN
ÜÇLÜ FAZ AYIRMA SİSTEMİ İLE SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU VE BİYOTEKNOLOJİK
UYGULANABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Aybüke EROL

**Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Biyoteknoloji Bilim Dalı
Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU**

2018

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Enterococcus faecium A2'den LAKKAZ ENZİMİNİN ÜÇLÜ FAZ
AYIRMA SİSTEMİ İLE SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU VE BİYOTEKNOLOJİK
UYGULANABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Aybüke EROL

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
Biyoteknoloji Bilim Dalı

ERZURUM
2018

Her Hakkı Saklıdır



TEZ ONAY FORMU

Enterococcus faecium A2 LAKKAZ ENZİMİNİN ÜÇLÜ FAZ AYIRMA SİSTEMİ İLE SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BİYOTEKNOLOJİK UYGULANABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU danışmanlığında, Aybüke EROL tarafından hazırlanan bu çalışma, ~~22.06.2018~~ tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Biyoteknoloji Bilim Dalı'nda Yüksek lisans tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (3./3)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

İmza :

Üye : Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

İmza :

Üye : Doç. Dr. S. Beyza ÖZTÜRK SARIKAYA

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun ~~19.07/2018~~ tarih ve ~~29...../18.....~~ nolu kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Mehmet KARAKAN
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

***Enterococcus faecium* A2'den LAKKAZ ENZİMİNİN ÜÇLÜ FAZ AYIRMA SİSTEMİ İLE SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BİYOTEKNOLOJİK UYGULANABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Aybüke EROL

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Biyoteknoloji Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

Bu tez çalışması kapsamında; Ağrı-Diyadin ilçesinden temin edilen sıcak su örneğinden, toplam 2 adet termotolerant bakteri izole edildi. İzolasyon sonrasında yapılan, konvensiyonel ve moleküler analizler sonucunda 2 izolat A2:*Enterococcus faecium*; A4:*Lysinibacillus macroides* tür düzeyinde belirlendi. Sıvı besiyerine alınan bakterilerde lakkaz üretimi denemeleri sonucunda, 2 suşta da lakkaz enzim aktivitesinin pozitif olduğu gözlemlendi, en yüksek aktivite ise A2 izolatında tespit edildi. *Enterococcus faecium* A2 (GenBank No:MH424896) suşundan lakkaz enziminin saflaştırılması TPP yöntemiyle yapıldı. pH: 6,0'da, 1,0:2,0 (ham enzim çözeltisi:t-bütanol oranı) ve %70 doymuş amonyum sülfat kullanılarak uygulanan TPP yöntemi sonucunda enzim, %64,59 verimle 0,95 kat saflaştırıldı. Enzimin molekül kütlesi SDS-PAGE ile yaklaşık 50,11 kDa olarak hesaplandı. Lakkaz enzimi için optimum pH 8,0 ve optimum sıcaklık 80°C olarak belirlendi. Enzimin 20-90°C sıcaklık aralığında tüm sıcaklık değerlerinde, 1 saatlik inkübasyon süresinin sonunda %90 oranında aktivitesini koruduğu tespit edildi. Yüzey aktif maddelerinin varlığında enzimin yüksek oranda stabil kaldığı, organik çözücüler ve Ag⁺, Cu²⁺, Cr²⁺ metalleri varlığında ise enzimin aktivitesini arttırdığı belirlendi. *E. faecium* A2 lakkaz enziminin ABTS substratı için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,366 mg/mL ve 5,29 µmol.mL⁻¹.dk⁻¹ olarak hesaplandı. Son olarak lakkaz enziminin tekstil boyalarının giderimi üzerine etkisini incelemek için Asit Siyah L, Kongo Kırmızı, Metilen Mavisi, Turuncu, Asit Kırmızı 27, Asit Siyah 5 boya kullanıldı. Yapılan incelemeler sonucunda en yüksek boya gideriminin Asit Kırmızı 27 boyası üzerinde %40 oranında olduğu tespit edildi.

2018, 118 sayfa

Anahtar Kelimeler: Termotolerant bakteri, *Enterococcus faecium*, lakkaz, üçlü faz ayırma sistemi (TPP), enzimatik karakterizasyon

ABSTRACT

Master Thesis

PURIFICATION, CHARACTERIZATION AND BIOTECHNOLOGICAL FEASIBILITY OF THE ENZYME LACCASE BY THE THREE PHASE PARTITIONING SYSTEM, FROM *Enterococcus faecium* A2

Aybüke EROL

Ataturk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics
Department of Biotechnology

Supervisor: Assoc. Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

In this thesis work, a total of 2 thermotolerant bacteria were isolated from the hot water sample obtained from Ağrı-Diyadin springs. 2 isolates were identified as follows using conventional and molecular analysis; A2:*Enterococcus faecium*; A4:*Lysinibacillus macroides*. Two strains were observed to be positive in terms of laccase activity and A2 had the highest activity. Purification of laccase enzyme from strain *E. faecium* A2 (GenBank No: MH424896) was carried out by the TPP method. Enzyme was 0.95 fold purified with 64.59% yield by the method of TPP obtained by using 70% saturated ammonium sulphate and crude enzyme solution: t-butanol in 1.0:2.0 ratio at pH 6.0. The molecular weight of the enzyme was calculated as about 50.11 kDa by SDS-PAGE. The optimum pH and temperature for laccase enzyme was 8.0 and 80°C respectively. It has been found that the enzyme maintains 90% activity at the temperature range of 20-90 °C at the end of the 1 hour incubation period at all temperature values. The results showed that enzyme activity was stabilized at high levels in the presence of surfactants; and the enzyme activity was increased in the presence of organic solvents and Ag⁺, Cu²⁺, Cr²⁺ metals. The K_m and V_{max} values for ABTS substrate of the *E. faecium* A2 laccase enzyme were calculated to be 0.366 mg / mL and 5.29 µmol.mL⁻¹ min⁻¹, respectively. Finally, Acid Black L, Congo Red, Methylene Blue, Orange, Acid Red 27, Acid Black 5 dyes were used to examine the effect of laccase enzyme on the removal of textile dyes. As a result of the investigations, it was determined that the highest color removal rate was 40% on Acid Red 27.

2018, 118 pages

Keywords: *Enterococcus faecium*, laccase, three phase partitioning system, thermotolerant bacteria, enzymatic characterization.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımı en iyi şekilde ilerletebilmem için laboratuvarında birçok imkan oluşturan ve bu tezin mikrobiyolojik aşamasında yaptığım çalışmalarda benimle değerli fikirlerini paylaşan Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e,

Tez konumu belirlemede ve deneysel çalışmalarında aktardığı fikirleriyle, bilgi birikimini ve tecrübesini benden esirgemeyen, bu tezi yazmamda büyük desteği bulunan hocam Sayın Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU'na, tez çalışmamda bana yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Mesut TAŞKIN, Sayın Doç. Dr. Hakan ÖZKAN ve Sayın Dr. Melike YILDIZ'a,

Tez çalışmam boyunca laboratuvar çalışmalarında; cihazlar, deney yöntemlerinde yol gösteren, güler yüz ve samimi yaklaşımlarıyla yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Sayın Arş. Gör. Sümeyye AKBULUT ve Sayın Arş. Gör. Mustafa Özkan BALTACI'a, tez çalışmamda deneyler sırasında bana karşı yardımları, yol göstericiliği ve gerçekleştirdiği özveriler için Sayın Dr. Yeliz DEMİR'e,

Tezi yazmamda ve bana yol göstermede yardımlarını hiç bir zaman esirgemeyen, her sorumu bıkmadan yanıtlayan Esra ALÇİÇEK'e, tez dönemim boyunca sıkıntıma katlanan, beni motive eden, canım çalışma arkadaşlarım Betül BAYDAR ve Şeyda ALBAYRAK'a,

Tüm hayatım boyunca maddi ve manevi destek ve fedakârlıklarını her zaman hissettiğim dua ve sabırlarıyla yanımda olan babam Kulu EROL, annem Berrin EROL ve abilerim Buminhan EROL, Ali Ekber EROL'a teşekkürü borç bilirim.

Aybüke EROL

Temmuz, 2018

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Endüstriyel Enzimler	1
1.2. Lakkaz Enzimi.....	2
1.2.1. Lakkaz enzimlerinin yapısı	2
1.2.2. Bakır merkezleri	2
1.2.3. Medyator sistemleri.....	4
1.2.4. Protein karakterizasyonu	6
1.2.5. Lakkaz Enzimlerinin Biyo-Fiziksel ve Katalitik Özellikleri.....	7
1.2.5.a. Lakkaz enzimlerinin substratları	7
1.2.5.b. Lakkaz enzimlerinin reaksiyon mekanizmaları.....	8
1.3. Lakkazların Biyoteknolojik Kullanım Alanları.....	10
1.3.1. Kağıt endüstrisi.....	12
1.3.2. Biyolojik iyileştirme.....	13
1.3.3. Tekstil boyarmaddelerinin renklerinin giderilmesi	13
1.3.4. Tekstil endüstrisinde.....	14
1.3.5. Gıda endüstrisinde	15
1.3.6. Biyosensör ve diagnostik uygulamalar.....	15
1.3.7. Sentetik kimyasallar	15
1.3.8. Kozmetik	16
1.4. Lakkaz Enzimi Kaynakları	17
1.4.1. Bitkisel lakkazlar	17
1.4.2. Fungal lakkazlar	17
1.4.3. Böceklerden üretilen lakkazlar	18

1.4.4. Bakteriyeel lakkazlar.....	19
1.5. Termostabil Enzimlerin Biyoteknolojik Açıdan Önemi	19
1.6. Ekstremofilik Bakteriler	20
1.7. Termotolerant Laktik Asit Bakterileri ve Enzim Üretimleri	20
1.8. Ağrı/ Diyadin Kaplıcası'nın Özellikleri	21
1.9. Ekstrem Bakterilerin Saptanması	22
1.9.1. 16S ribozom analizi.....	22
1.9.2. GTG ₅ dizi analizi	23
1.10. Enterokokların Özellikleri	24
1.11. Enzimlerin Saflaştırılma Stratejileri	24
1.11.1. TPP (Three Phase Purification/Üç Fazlı Ayırma) yöntemi.....	25
1.11.2. TPP tekniğinin önemli avantajları.....	27
2. KAYNAK ÖZETLERİ	29
2.1. Tezin Amacı	34
3. MATERYAL ve METOD.....	35
3.1. Materyal.....	35
3.1.1. Tez kapsamında kullanılan kimyasallar ve kitler	35
3.1.2. Tez kapsamında kullanılan materyal ve cihazlar.....	36
3.1.3. Tez Kapsamında yapılan deneylerde kullanılan çözeltilerin hazırlanışı	37
3.1.3.a. Bakteri izolasyonu için kullanılan çözeltiler	38
3.1.3.b. Bakterilerin besiyerleri	38
3.1.3.c. Bakteri izolatlarının morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve tamponlar.....	39
3.1.3.d. Bakteri izolatlarının moleküler analizi için kullanılan çözeltiler ve tamponlar.....	39
3.1.3.e. Enzim aktivite tayini için kullanılan çözeltiler ve tamponlar	40
3.1.3.f. Protein analizi için kullanılan çözeltiler ve tamponlar	41
3.1.3.g. SDS-PAGE için kullanılan çözeltiler ve tamponlar	41
3.1.3.h. Gümüş boyama için kullanılan çözeltiler ve tamponlar	42
3.1.3.i. Endüstriyel boya çözeltilerinin hazırlanışı.....	42
3.2. Yöntem	43
3.2.1. Mikroorganizmaların izolasyonu, fenotipik ve genotipik karakterizasyonu	43

3.2.1.a. Örneklerin toplanması ve mikroorganizma izolasyonu	43
3.2.1.b. İzolatların Konvensiyonel Özelliklerinin Belirlenmesi	43
3.2.1.c. Bakteri izolatlarının moleküler analizi	45
3.2.2. <i>E. faecium</i> A2' den lakkaz enziminin saflaştırılması	55
3.2.2.a. Lakkaz enzimi üreten bakteri izolatlarının TSA ve TSB besiyerinde belirlenmesi	55
3.2.2.b. <i>E. faecium</i> A2 izolatından lakkaz üretimi	56
3.2.2.c. Lakkaz enziminin aktivitesinin belirlenmesi	56
3.2.2.d. Protein tayini	57
3.2.2.e. Lakkaz enziminin üçlü faz ayırma (TPP) sistemi ile saflaştırılması	58
3.2.3. <i>E. faecium</i> A2'den saflaştırılan lakkaz enziminin karakterizasyonu	59
3.2.3.a. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	59
3.2.3.b. Örneklerin gümüş boyama yöntemiyle boyanması	61
3.2.3.c. <i>E. faecium</i> A2'den saflaştırılan lakkaz enzimi için optimum pH ve pH kararlılığının belirlenmesi	63
3.2.3.d. <i>E. faecium</i> A2'den saflaştırılan lakkaz enziminin optimum sıcaklığının ve sıcaklık kararlılığının belirlenmesi	64
3.2.3.e. <i>E. faecium</i> A2'den saflaştırılan lakkaz enzimi için K_m ve V_{max} parametrelerinin belirlenmesi	64
3.2.3.f. <i>E. faecium</i> A2'den saflaştırılan lakkaz enziminin aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi	65
3.2.3.g. <i>E. faecium</i> A2'den saflaştırılan lakkaz enziminin aktivitesi üzerine bazı inhibitörlerin etkisinin belirlenmesi	65
3.2.3.1. <i>E. faecium</i> A2'den saflaştırılan lakkaz enziminin aktivitesi üzerine yüzey aktif maddelerinin ve okside edici ajanın etkisinin belirlenmesi	66
3.2.3.i. <i>E. faecium</i> A2'den saflaştırılan lakkaz enziminin doğal substratlara olan özgünlüğünün belirlenmesi	67
3.2.3.j. <i>E. faecium</i> A2'den saflaştırılan lakkaz enziminin endüstride kullanılan bazı boyaların lakkaz enzimi ile giderimi	67
3.2.3.k. Verilerin İstatistiksel Analiz	68
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	69
4.1. Mikroorganizmaların izolasyonu, fenotipik ve genotipik karakterizasyonu	69

4.1.1. Mikroorganizmaların izolasyonu	69
4.1.2. Konvensiyonel test sonuçları.....	70
4.1.3. Seçilen izolatların moleküler yöntemlerle tanılarının yapılması.....	71
4.1.3.a. Genomik DNA izolasyonu	71
4.1.3.b. Rep-PCR yöntemiyle bakterilerin gen profillerinin belirlenmesi	71
4.1.3.c. 16S rRNA PCR işlemi.....	72
4.1.4.d. Transformasyon işlemi	73
4.1.5.e. Koloni PCR.....	74
4.1.6. Plazmit izolasyonu	74
4.1.6.a. DNA dizi analiz sonuçları	75
4.2. <i>E. faecium</i> A2'den lakkaz enziminin üretimi ve saflaştırılması.....	76
4.2.1. Lakkaz enzimi üreten bakteri izolatlarının TSB (Sıvı) besiyerinde belirlenmesi.....	76
4.2.2. Protein tayini için kullanılan standart grafik	76
4.2.3. <i>E. faecium</i> A2'den lakkaz enziminin üçlü faz ayırma (TPP) sistemi ile saflaştırılması	77
4.2.4. Lakkaz enziminin saflaştırılmasında TPP sistemine pH'nın etkisi	81
4.2.5. Lakkaz enziminin üçlü faz yöntemiyle saflaştırma sonuçları	82
4.2.6. SDS-PAGE ile enzimin saflık kontrolü ve molekül kütlesinin tayini.....	83
4.3. <i>E. faecium</i> A2'den saflaştırılan lakkaz enziminin karakterizasyonu	84
4.3.1. <i>E. faecium</i> A2'den saflaştırılan lakkaz enzimi için optimum pH ve stabil pH bulunmasına yönelik bulgular	84
4.3.2. <i>E. faecium</i> A2'den saflaştırılan lakkaz enzimi için optimum sıcaklığın ve stabil sıcaklığın belirlenmesine yönelik bulgular.....	86
4.3.3. Enzim kinetiğinin (K_m ve V_{max}) değerlerinin belirlenmesine yönelik sonuçlar	88
4.3.4. <i>E. faecium</i> A2'den saflaştırılan lakkaz enzimi üzerine bazı metal iyonlarının etkisine yönelik bulgular	89
4.3.5. <i>E. faecium</i> A2'den saflaştırılan lakkaz aktivitesi üzerine bazı inhibitörlerin etkisinin belirlenmesine yönelik bulgular	91
4.3.6. <i>E. faecium</i> A2'den saflaştırılan lakkaz aktivitesi üzerine bazı organik çözücülerin etkisinin belirlenmesine yönelik bulgular	92

4.3.7. <i>E. faecium</i> A2 'den saflaştırılan lakkaz enzimin aktivitesi üzerine yüzey aktif maddelerinin ve okside edici ajanının etkisinin belirlenmesine yönelik bulgular	94
4.3.8. <i>E. faecium</i> A2 'den saflaştırılan lakkaz enzimin substratlara olan zgnlgn belirlenmesine yönelik bulgular	95
4.3.9. <i>E. faecium</i> A2 'den saflaştırılan lakkaz enzimin tekstil boyalarının giderilmesi işlemine etkisine yönelik bulgular	96
5. TARTIşMA ve SONUÇ.....	101
KAYNAKLAR	112
ZGEMİř	118

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat Derece
µl	: Mikrolitre
A	: Absorbans
AA	: Akrilamid
ABTS	: 2,2-Azino-bis(3-etilbenzotiyezolin-6-sülfonik asit)
APS	: Amonyum Persülfat
Bis – AA	: Bis Akrilamid
Bp(bç)	: Base pair(Baz çifti)
Dk	: Dakika
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EtOH	: Etanol
G	: Gram
IPTG	: İzopropil β-D-1- Tiyogalaktopiranosid
kDa	: Kilodalton
L	: Litre
M	: Molar
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
OD	: Optik Dansite
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Rnaz	: Ribonükleaz Enzimi
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametiletildiamin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Lakkazın bakır koordinasyon merkezlerinin şematik gösterimi	3
Şekil 1.2. Çeşitli organizmalar tarafından üretilen çoklu-bakır içeren oksidazların genel katlanmalarını gösteren kurdela modelleri	7
Şekil 1.3. Lakkaz enzimlerinin katalitik mekanizması	9
Şekil 1.4. Lakkazların biyoteknolojik kullanım alanları.....	11
Şekil 1.5. Lakkaz enzimi kaynağı olan mikroorganizmalar ve uygulama alanları	16
Şekil 1.6. TPP'nın uygulanmasıyla oluşan fazların gösterimi	27
Şekil 4.1. %0,9'luk serum fizyolojik su kullanılarak hazırlanıp (10^{-3} – 10^{-7}) dilüe edilen bakteriler.....	69
Şekil 4.2. Saf olarak elde edilen bakteri izolatları	69
Şekil 4.3. Lakkaz üretim şeması	70
Şekil 4.4. İzolatlara ait genomik DNA'ların jel görüntüsü.....	71
Şekil 4.5. Çeşitli izolatlara ait (GTG) ₅ -PCR bant profilleri.....	72
Şekil 4.6. İzolatlara ait 16S rRNA jel görüntüsü	73
Şekil 4.7. Mavi beyaz koloni örnek görüntüsü	73
Şekil 4.8. Koloni Pcr görüntüsü.....	74
Şekil 4.9. Filogenetik ağaç.....	75
Şekil 4.10. Protein tayininde kullanılan standart grafik.....	76
Şekil 4.11. TPP prosesinin %20 tuz konsantrasyonu varlığında farklı alkol oranının (Ham enzim ekstraktı:t- bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) lakkazın saflaştırma katsayısına ve akitivite verimine etkisi	78
Şekil 4.12. TPP prosesinin %30 tuz konsantrasyonu varlığında farklı alkol oranının (Ham enzim ekstraktı:t- bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) lakkazın saflaştırma katsayısına ve akitivite verimine etkisi	78
Şekil 4.13. TPP prosesinin %40 tuz konsantrasyonu varlığında farklı alkol oranının (Ham enzim ekstraktı:t- bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) lakkazın saflaştırma katsayısına ve akitivite verimine etkisi	79

Şekil 4.14. TPP prosesinin %50 tuz konsantrasyonu varlığında farklı alkol oranının (Ham enzim ekstraktı:t- bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) lakkazın saflaştırma katsayısına ve akitivite verimine etkisi	79
Şekil 4.15. TPP prosesinin %60 tuz konsantrasyonu varlığında farklı alkol oranının (Ham enzim ekstraktı:t- bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) lakkazın saflaştırma katsayısına ve akitivite verimine etkisi	80
Şekil 4.16. TPP prosesinin %70 tuz konsantrasyonu varlığında farklı alkol oranının (Ham enzim ekstraktı:t- bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) lakkazın saflaştırma katsayısına ve akitivite verimine etkisi	80
Şekil 4.17. TPP prosesinin %80 tuz konsantrasyonu varlığında farklı alkol oranının (Ham enzim ekstraktı: t- bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) lakkazın saflaştırma katsayısına ve akitivite verimine etkisi	81
Şekil 4.18. Lakkaz enziminin saflaştırılmasında TPP sistemine pH'nın etkisi	82
Şekil 4.19. SDS-PAGE sonucu çizilen Log MK-Rf grafiği	83
Şekil 4.20. <i>E. faecium</i> A2'den saflaştırılan lakkaz enziminin SDS-PAGE görüntüsü a) Alt faz b) Homojenat c) Ara faz)	84
Şekil 4.21. Lakkaz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm grafiği.....	85
Şekil 4.22. Lakkaz enzimi için elde edilen stabil pH grafiği	86
Şekil 4.23. Lakkaz enzimi optimum sıcaklık ölçülmesi için çizilen sıcaklık-bağlı aktivite grafiği	87
Şekil 4.24. Sıcaklığın lakkaz enzim kararlılığı üzerine etkisi.....	88
Şekil 4.25. ABTS substratı için K_m ve V_{max} bulunmasına yönelik Lineweaver-Burk grafiği	88
Şekil 4.26. Bazı metal iyonlarının lakkaz aktivitesi üzerine etkisi	90
Şekil 4.27. Bazı inhibitörlerin lakkaz aktivitesi üzerine etkisi	92
Şekil 4.28. Bazı organik çözücülerin lakkaz enzim aktivitesi üzerindeki etkisine yönelik bulgular.....	93
Şekil 4.29. Bazı yüzey aktif maddelerinin lakkaz aktivitesi üzerine etkisi	95
Şekil 4.30. Boyarmaddeler için oluşturulan standart eğriler.....	98
Şekil 4.31. <i>E. faecium</i> A2'den saflaştırılan lakkaz enziminin tekstil boyalarının giderilmesi işlemine etkisi.....	99

Şekil 4.32. a) Ham kültür filtratı (1) ve saf lakkaz (2) kullanarak metilen mavisi boyasının renginin giderimi b) Ham kültür filtratı (1) ve saf lakkaz (2) kullanarak kongo kırmızı boyasının renginin giderimi c) Ham kültür filtratı (1) ve saf lakkaz (2) kullanarak asid black 1 boyasının renginin giderimi 99

Şekil 4.33. a) Ham kültür filtratı (1) ve saf lakkaz (2) kullanarak asit siyah 5 boyasının renginin giderimi b) Ham kültür filtratı (1) ve saf lakkaz (2) kullanarak asid red 27 boyasının renginin giderimi c) Ham kültür filtratı (1) ve saf lakkaz (2) kullanarak turuncu boyasının renginin giderimi 100



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Tez kapsamında kullanılan kimyasallar ve kitler	35
Çizelge 3.2. Tez kapsamında kullanılan materyal ve cihazlar	36
Çizelge 3.3. (GTG) ₅ - PCR işleminde kullanılan reaktiflerin yoğunluk ve miktarları.....	47
Çizelge 3.4. (GTG) ₅ - PCR programı, sıcaklık döngüsü.....	48
Çizelge 3.5. 16S rRNA PCR işleminde kullanılan reaktiflerin yoğunluk ve miktarları.....	49
Çizelge 3.6. PCR Programı, sıcaklık döngüsü	50
Çizelge 3.7. Ligasyon işleminde kullanılan reaktiflerin yoğunluk ve miktarları	51
Çizelge 3.8. Koloni PCR işleminde kullanılan reaktiflerin yoğunluk ve miktarları.....	53
Çizelge 3.9. Koloni PCR programı, sıcaklık döngüsü	54
Çizelge 3.10. Yürütme jeli bileşenleri	60
Çizelge 3.11. Gümüş boyamada kullanılan tespit çözeltileri bileşenleri.....	62
Çizelge 3.12. Gümüş boyamada kullanılan redüksiyon çözeltileri bileşenleri.....	62
Çizelge 3.13. Gümüş boyamada kullanılan boyama çözeltileri bileşenleri.....	62
Çizelge 3.14. Gümüş boyamada kullanılan yıkama çözeltileri bileşenleri.....	63
Çizelge 3.15. Gümüş boyamada kullanılan yıkama çözeltileri bileşenleri.....	63
Çizelge 4.1. İzolatların morfolojik ve biyokimyasal özellikleri	71
Çizelge 4.2. Dizi analizi sonucu belirlenen bakteriler ve benzerlik oranları	75
Çizelge 4.3. <i>E. faecium</i> A2'den izole edilen lakkazın saflaştırma tablosu	83
Çizelge 4.4. <i>E. faecium</i> A2' den saflaştırılan lakkaz enziminin pH stabilitesi için 0,1 M sodyum asetat (pH 3,0–5,0), sodyum fosfat (pH 6,0–7,0) ve Tris-HCl (pH 8,0–9,0) tampon çözeltileri kullanılarak optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları	84
Çizelge 4.5. <i>E. faecium</i> A2'den saflaştırılan lakkaz enziminin 0,1 M sodyum asetat (pH 3,0-5,0), sodyum fosfat (pH 6,0–7,0) ve Tris-HCl (pH 8,0–9,0) tampon çözeltileri kullanılarak stabil pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	85
Çizelge 4.6. <i>E. faecium</i> A2'den saflaştırılan lakkaz enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık- bağıl aktivite (%) ölçüm sonuçları çizelgesi	86

Çizelge 4.7. <i>E. faecium</i> A2' den saflaştırılan lakkaz enziminin sıcaklık kararlılığını belirlemek için zaman-sıcaklık- kalan aktivite (%) ölçüm sonuçlarının gösterimi	87
Çizelge 4.8. <i>E. faecium</i> A2'den saflaştırılan lakkaz enzimi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi	89
Çizelge 4.9. <i>E. faecium</i> A2'den saflaştırılan lakkaz enzimi üzerine bazı inhibitörlerin etkisi.....	91
Çizelge 4.10. <i>E. faecium</i> A2'den saflaştırılan lakkaz enzimi üzerine bazı organik çözücülerin etkisi	93
Çizelge 4.11. <i>E. faecium</i> A2' den saflaştırılan lakkaz enzimi üzerine yüzey aktif maddelerin ve okside edici ajanın etkisi	94
Çizelge 4.12. <i>E. faecium</i> A2'den saflaştırılan lakkaz enziminin doğal substratlar varlığında aktivitesi.....	96
Çizelge 4.13. <i>E. faecium</i> A2'den saflaştırılan lakkaz enziminin boyar maddeler varlığında aktivitesi boya giderimi (%)	98

1. GİRİŞ

1.1. Endüstriyel Enzimler

Enzimler, canlı organizmalarda meydana gelen tüm reaksiyonların ılımlı koşullarda gerçekleşmesine olanak tanıyan büyük bir kısmı protein yapısında olan katalizörlerdir. Biyolojik sistemlerde gerçekleşen tepkimelerin laboratuvar şartlarında oluşturulması için yüksek sıcaklık, basınç, pH vb. ağır koşulların uygulanması gerekmektedir. Bu koşullarda bile birçok tepkime izlenemeyecek düzeyde yavaş gerçekleşir. Enzimler, çok daha ılımlı koşullarda yüksek derecede katalitik aktivite gösteren moleküllerdir. Bu sebeple endüstride enzimlerin kullanılması, yüksek sıcaklık ve basınç gibi fazla enerjiye ihtiyaç duyan koşullar gerektirmeyeceği gibi kimyasal katalizörlere kıyasla daha ekonomik ve daha pratik faydalar sağlar (Alçıçek 2017).

Enzimler hücreden çıkıp, çeşitli yönleriyle günlük ve ekonomik hayata girmiştir. Bunların gıda, ziraat, tekstil, kağıt, eczacılık, tıp, deri, ekmek yapımı, invert şeker eldesi, şarap, bira gibi alkollü içecek üretimi, süt ve peynir ürünleri yapımı, su arıtımı kozmetik, deterjan üretimi, vb. birçok alanda uygulamaları vardır. Enzimlerin analitiksel ve endüstriyel amaçlı, tıpta tedavi, teşhis ve ilaç tasarımı vb. amaçlı kullanımları da geniş uygulama alanı imkanı sunmaktadır.

Enzimlerin çevre ile ilgili proseslerde kullanımı ele alındığında, protein yapısında olmaları onların biyolojik olarak bozunmalarına sebep olabilir ve atıkların yok edilmesini çabuk bozunmaları kolaylaştırır. Kullanılır durumdaki tatlı su kaynakları, hızla kirlenmekte ve giderek azalmaktadır. Özellikle kozmetik, tekstil, boya, deri, kâğıt, plastik, gıda gibi birçok endüstriyel atıksularının neden olduğu organik (proteinler, yağ, karbonhidratlar, gres, pestisidler, sürfaktanlar, fenoller, klorlu bileşikler vb.), inorganik (krom, kurşun, çinko, bakır, kadmiyum, nikel, civa, antimon, arsenik vb.) ve çeşitli boyar madde kirlilikleri gibi etkenler insan sağlığı ve ekolojik dengeyi tehdit etmektedir. Bu nedenle endüstriyel atıklardan bu gibi kirletici maddelerin uzaklaştırılması oldukça

önemlidir. Hayvan, bitki ve mikroorganizmalar gibi canlılarda meydana gelen metabolik tepkimelerin tümü birbirinden farklı ve spesifik özellikteki enzimler tarafından katalize olduğundan enzimlerin sayısı çok fazladır (Kutlu 2015).

1.2. Lakkaz Enzimi

1.2.1. Lakkaz enzimlerinin yapısı

Lakkaz enzimi, (EC 1.10.3.2, benzendiol: oksijen oksidoredüktaz) çoklu bakır içeren oksidaz grubunun bir üyesidir. Lakkaz enzimi, üç redoks bölgesine dağılmış, her bir monomeri dört bakır atomu içeren dimerik ya da tetramerik glikoprotein yapıda bulunur. Bu enzim, moleküler dioksijenin suya indirgenmesi ile birleştirilen, bazı inorganik iyonları, poliaminleri, orto ve paradifenoller, polifenoller, aminofenoller, ligninleri ve aril diaminleri oksidasyonlarının gerçekleşmesini katalizlemektedir. Lakkaz enzimi, fenolik bileşiklerin oksidasyonunu katalizleme özelliğindeki polifenol oksidaz grubu olan bir enzimdir.

Lakkaz enzimi kaynakları doğada yaygın olarak bulunmaktadır. Lakkaz enzimi ilk olarak Schoenbein tarafından, 1856 yılında *Boletus luciferus* ekstraktından mavi pigment olarak elde edilmiştir. Lakkaz adını ise 1883 yılında, bu enzimin tanımlanmış olduğu Japon vernik ağacı (lacquer) olan *Rhus vernicifera*'dan almıştır. Enzim daha sonra 1895 yılında Bertrand tarafından da bazı fungus türlerinde tanımlanmıştır. İlerleyen dönemlerde ise tütün, şeftali ve kavak gibi birçok bitkide yine lakkaz enziminin varlığı belirlenmiştir (Altındağ 2013).

1.2.2. Bakır merkezleri

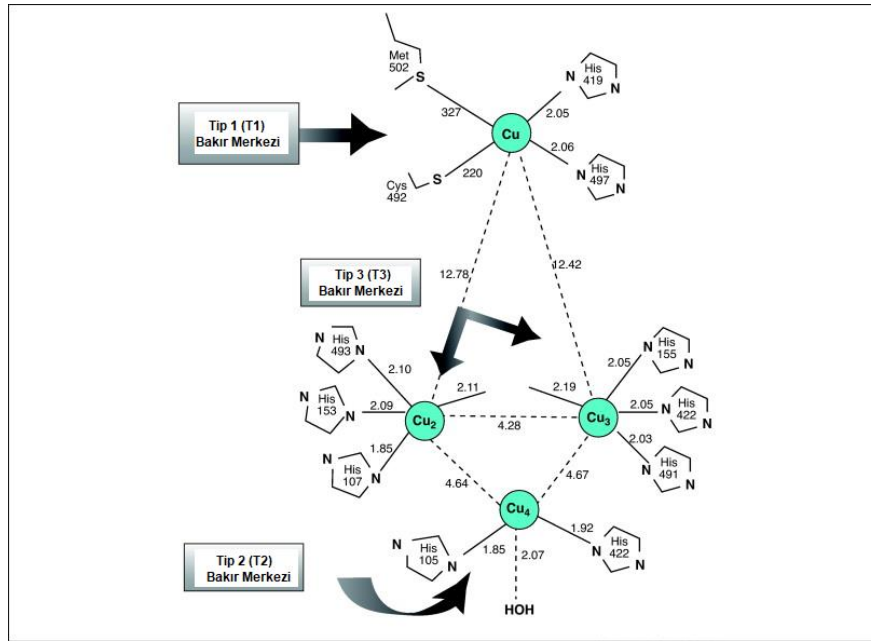
Lakkazların katalitik aktivite sergileyebilmeleri için, her bir lakkaz proteini için en az 4 bakır atomu gerekmektedir. Bakır atomlarının bağlanma bölgeleri korunmuş özellikte olup, lakkaz enzimlerinin hepsinde bulunur. Lakkazlarda bulunan bakır iyonlarının, ışık absorbansları ve elektronparamanyetik davranışları birbirinden farklıdır. Bu sebeple,

lakkaz enzimlerinde bulunan bakır iyonları, spektroskopik özellikleri doğrultusunda üç ana sınıfa ayrılır. Lakkaz proteinlerinin taşıdığı bakır iyonlarından birisi Tip1 veya “mavi bölge” olarak adlandırılan bölgeye bağlı iken, Tip2 ve Tip3 bölgelerinin oluşturduğu trinükleer kümeyle bağlı 3 bakır iyonu daha bulunmaktadır:

Tip1: paramanyetik “mavi” bakır (Cu1), absorpsiyon 610 nm (okside formda iken), redoks potansiyeli +785 mV.

Tip2: paramanyetik “mavi-olmayan” bakır (Cu4); azid, florid ve siyanide karşı affinitesi vardır.

Tip3: diamanyetik spin-eşleşmeli bakır-bakır çifti (Cu2 ve Cu3), absorpsiyon 330 nm (okside formda iken) (Decker 2000).



Şekil 1.1. Lakkazın bakır koordinasyon merkezlerinin şematik gösterimi (Santhanam 2011)

Tip1 bakır, çoklu-bakır içeren proteinlerin, 26 mavi renginden sorumludur. Bu mavi rengi bakır-sistein kovalent bağının sebep olduğu yoğun elektronik absorpsiyon verir. Yüksek redoks potansiyeli (+785 mV) sayesinde Tip1 bakır, substrat oksidasyonunu gerçekleştirir.

Tip2 bakır, görünür spektrumda absorpsiyon göstermez ve EPR (Elektron Paramagnetik Resonans) çalışmalarında paramanyetik özellikler sergiler. Çoklu-bakır içeren oksidazlarda Tip2 bakır, binükleer olan Tip3 bakıra yakın şekilde konumlanmaktadır.

Tip3 bakır merkezi, 330 nm’de (okside formda iken) bir elektron adsorpsiyonu sayesinde spektrofotometrik olarak karakterize edilebildiği gibi, bakır çiftinin anti-ferromanyetik eşleşmesinin sonucu olarak EPR sinyalinin olmaması ile karakterizasyonu yapılır.

Tip2 ve Tip3 bakır merkezleri, bütün olarak değerlendirilebilir ve genellikle “trinükleer küme” olarak adlandırılırlar. Trinükleer küme, moleküler oksijenin indirgendiği ve suyun serbest bırakıldığı yerdir. Tip2 bakır atomu 2, Tip3 bakır atomu ise 6 histidin kalıntısı ile koordine halde bulunur. Tip3 bakır atomları arasındaki kuvvetli anti-ferromanyetik eşleşme lineer yapıya yakın, hidroksil köprüsü aracılığıyla sürdürülmektedir (Enguita 2003).

1.2.3. Medyatör sistemleri

Lakkazların fenolik bileşikleri okside etmesinin yanı sıra fenolik olmayan bileşikler üzerinde de etkili olması bazı aracı moleküllerle sağlanmıştır. 1990 yılında ABTS’nin diamonyum tuzlarının lakkaza farklı substratı okside edebilen yeteneğini kazandırmada önemli rol oynadığının bulunmasıyla bu enzimle ilgili çalışmalar farklı bir boyut kazanmıştır. Aracı molekül olarak ABTS ve remazol Blue ile birlikte kullanılan *T.hirsuta* lakkazı, veratril alkol ve 1-(3,4-dimetoksifenil)-2-(2-metoksifenoksi) propan-1,3-diol gibi yüksek redoks potansiyeline sahip olan bileşikler parçalayarak ratraldehit ve benzaldehit ürünlerini vermiştir (Morozova vd 2007). İdeal bir redoks aracı molekül iyi bir lakkaz substratı olmalıdır, onların okside edilmiş ve indirgenmiş formları stabil olmalıdır fakat enzimatik reaksiyonla inhibe olmamalıdır. Bununla birlikte siklik (halkasal) olmalıdır. Özellikle son 10 yılda lakkazın substrat aralığı lakkaz aracılı sistemler (LMS) aracılığıyla genişletilmiştir. 2,2’-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) (ABTS) veya 1-hidroksibenzotriazol (HBT) gibi düşük molekül ağırlığına sahip moleküllerle enzimlerin kombinasyonu hem bilinen

substratların dönüşümünde yüksek verimlilik sağlamakta hem de portföyüne lakkazın tek başına yapamayacağı yeni reaksiyonları eklemektedir. Kağıt hamuru beyazlatma endüstrisinde veya zararlı ksenobiyotiklerin (polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi) uzaklaştırılması, LMS ile yapılan deneylerle desteklenmiştir. Genellikle tüm aracı moleküller (örneğin syringaldizin) lakkazın substratlarıdır. Onlar T1 bölgesinde kolayca okside edilebilir. Bu mekanizmada aracı molekül, lignin gibi yüksek molekül ağırlıklı substratların okside edilebilmesine izin veren difüzlenebilir bir elektron taşıyıcısı olarak rol oynamaktadır. Lakkaz molekülü ile elde edilen elektronlar sonunda su oluşturması için oksijene transfer edilir (T2/T3 üç çekirdekli grupta). Bir aracı molekülün çalışması avantajlıdır çünkü bu lakkazın iki hedefi gerçekleştirmesini sağlar:

- i) Sterik engel problemlerini aşarak polimerlerin oksidasyonun sağlamak (enzim ve polimer direkt olarak birbirini etkilememek zorundadır)
- ii) Substrat aralığını genişletmek. Etkili bir aracı molekül, lakkazinkinden daha yüksek bir redoks potansiyeline sahip olmamalıdır.

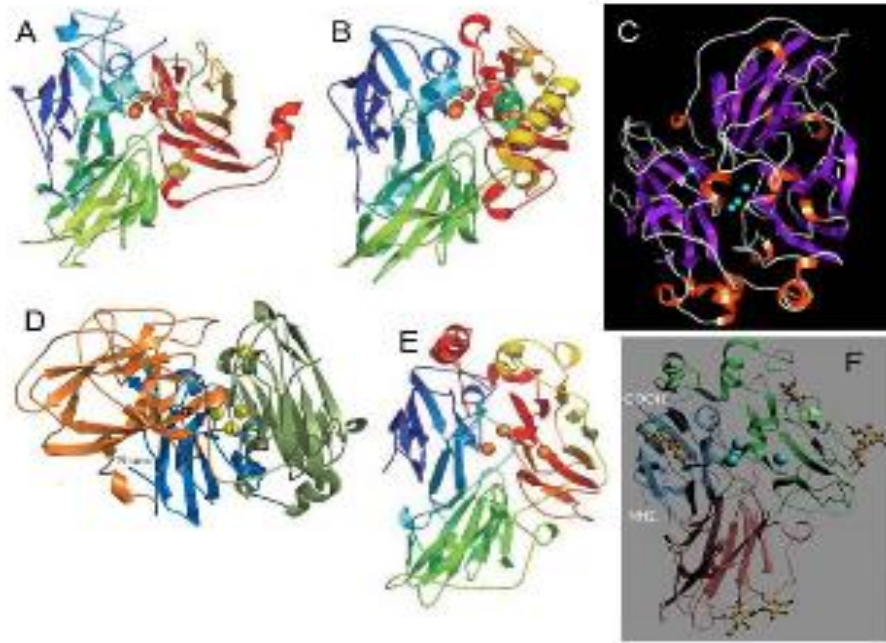
Substratinkinden daha yüksek bir potansiyel ve serbest difüzlenebilme yeteneği genelde daha önemlidir. Karışık aracı moleküllerin sinerjik etkisi ile lakkazın gerçekleştirdiği oksidasyon geliştirebilir. Kimyasal araçlar çok daha toksiktir, pahalıdır ve stabil değildir. Bundan başka onlar yan ürün oluşumuna neden olmaktadır ve enzimi inaktive etmektedirler. Bunun üstesinden gelmek için lakkazın yönlendirilmiş evrimi veya tirozin gibi doğal aracı moleküller için arayışlarda bulunmak gibi yeni yaklaşımlar geliştirilmektedir (Alcalde vd 2007). Lakkazların en önemli indisleri 3 bakır merkezinin sahip olduğu standart redoks potansiyelidir. T1 potansiyeli 430-780 mV arasında değişkenlik gösterir. Enzimin T3 potansiyeli nispeten yüksektir (*R.vernicifera*'da 460 mV, *T.versicolor*'da 785 mV). Tüm bakır oksidazlar için T1 potansiyelleri 3 alt grupta sınıflandırılabilir: Düşük, orta ve yüksek potansiyelli lakkazlar. Lakkazlar normal şartlarda, T1 bakır iyonunun redoks potansiyellerini aşmayan iyonizasyon potansiyellerine sahip bileşikler oksidasyona uğratabilirler (Reinhammar 1972). Fenolik olmayan bileşikler yıkımda enzimin yeteneğini belirlemede ana özelliğin T1 merkezinin redoks potansiyeli olduğu düşünülmektedir. Veratril alkol, 1,2-dimetoksibenzen gibi fenolik olmayan lignin yapılarının

iyonizasyon potansiyelleri yüksektir (>1.4 V). O nedenle bu bileşikler ancak yüksek potansiyelli enzimlerin (lignin peroksidaz gibi) substratları olabilirler. Lakkaz (<800 mV) substratı olarak düşünülecekse, redoks potansiyelini yükseltecek aracı molekülün kullanılması şarttır (Solomon 1996; Li 1999). İdeal olarak bir redoks aracı molekülü yan reaksiyonlar olmadan degradasyon da meydana getirmeden birçok döngüyü gerçekleştirebilir. Yükseltenecek substratın redoks potansiyeli ile T1 bakır iyonlarının potansiyeli arasındaki fark reaksiyonu zorlamaktadır. Fakat lakkaz redoks potansiyeline yakın potansiyele sahip bileşikler lakkaz substratı değilse termodinamik ve kinetik faktörler hesaba katılmalıdır (Morozova vd 2007). Doğru bir redoks aracı molekülü redoks sürecinde çoklu reaksiyon döngülerinin gereksinimlerini karşılayabilen bileşiklerdir. Bunlar geçiş elementlerinin çeşitli kompleksleri (potasyum oktosiyanomolibdat ve oktosiyanotungstat), o-fenantrolin ve 4,4'-dimetilbi-piridinli Fe(II) kompleksleri bunun yanı sıra ABTS ve 2,2,6,6-terametil-1-piperidiniloksil (TEMPO) gibi lakkaz substratlarıdır. Bu bileşikler yeterince yüksek redoks potansiyeline sahiptir ve kimyasal parçalanma olmaksızın birçok döngüyü gerçekleştirebilir. Organik bileşikler arasından en iyi aracı molekül ABTS olarak bilinmektedir. Önceleri ABTS, fenolik olmayan bileşikler okside edebilen enzimatik oksidasyonla meydana gelen bir katyon radikali olarak bilinmekteydi. Fakat daha sonra yapılan özellikle elektrokimyasal ve spektroeletrokimyasal çalışmalar prosesin başka bir mekanizma olduğunu göstermiştir. Lakkaz aracılı ABTS oksidasyonunun 2 aşamada meydana geldiği gösterilmiştir. Hızlı gerçekleşen ilk basamak $ABTS^+$ katyon radikalinin oluşumudur. İkinci ve yavaş gerçekleşen basamak ise katyon radikalinin $ABTS^{2+}$ dikatyonuna oksidasyonudur (Morozova vd 2007).

1.2.4. Protein karakterizasyonu

Çok sayıda bakteriyel türün genomik analizlerinde bakteriler arasında lakkaz-benzeri çoklu-bakır içeren oksidazların yaygın olduğu görülmüştür (Alexandre,2000). Bakterlerdeki bu potansiyele rağmen günümüze kadar yapısal olarak karakterize edilmiş, *C. cinerius*, *T. versicolor*, *M. albomyces*, *Lentinus(Panus)tigrinus* ve *Cerrena maxima* kaynaklı lakkaz enzimlerinin hepsi fungal kökenlidir. X-ışını kristallografisine dayalı üç-

boyutlu yapısı rapor edilen bakteriyel lakkaz enzimleri, *E. Coli* kaynaklı CueO ve *B. Subtilis* kaynaklı CotA proteinleridir.



Şekil 1.2. Çeşitli organizmalar tarafından üretilen çoklu-bakır içeren oksidazların genel katlanmalarını gösteren kurdela modelleri

A:CotA (*B. subtilis*), B:CueO (*E. coli*), C:LtLa (*L. tigrinus*), D:CmLa (*C. maxima*), E:CcLa (*C. cinerius*) ve F:TvLa (*T. versicolor*) (Kutlu 2015).

1.2.5. Lakkaz Enzimlerinin Biyo-Fiziksel ve Katalitik Özellikleri

1.2.5.a. Lakkaz enzimlerinin substratları

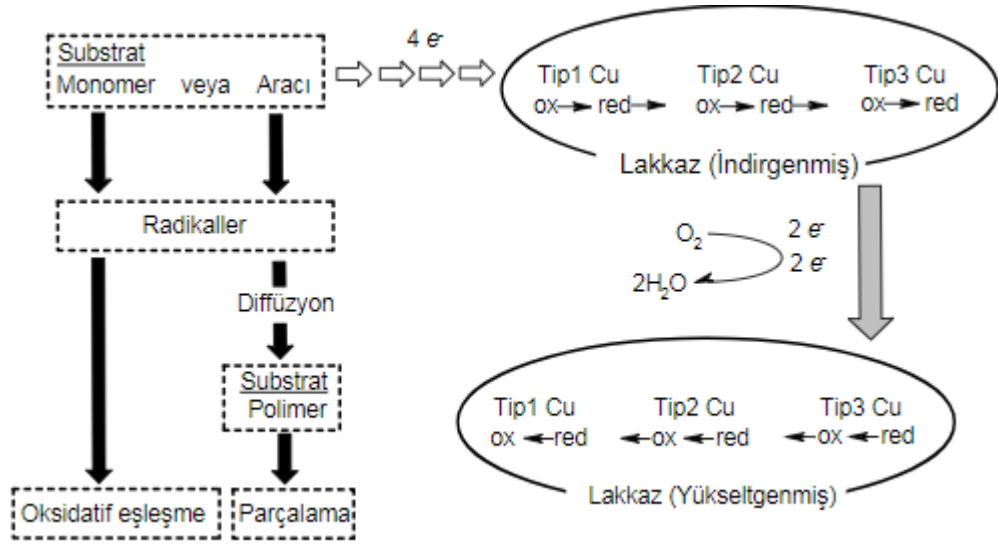
Lakkaz enzimleri tarafından oksitlenen substratlar; aromatik daiminler, amino-monofenoller, ABTS [2,2'-azino-bis-(3-etilbenzodiazolin-6-sülfonik asit)] hidroksiindoller, şiringaldazin ve 1-naftol gibi fenolik-olmayan bileşiklerdir. Bunun yanısıra, normal koşullarda kendi başlarına lakkazların substratı olmayan bazı bileşiklerin ABTS bulunan yerlerde lakkazlar tarafından okside edildikleri bilinmektedir (Bourbonnais 1992).

Bitkisel ve fungal kaynaklı lakkazlar üzerine etkisi olan substratlarla ilgili çok fazla sayıda çalışma bulunmasına rağmen, bakteriyel kaynaklı lakkazlar üzerine yapılan çalışmaların sayısı oldukça azdır.

Farklı organizmalardan elde edilen lakkazların substrat özgüllükleri farklıdır. Bu bileşiklerden özellikle ikisini ABTS (2,2'-Azino-bis (3-etilbenziltiazolin-6-sülfonik asit) ve SGZ (N,N' = bis-3,5-dimetoksi-4-hidroksibenzilidinhidrazin; Şiringaldezin) oluşturmaktadır. Bu iki substratın her ikisi de lakkaz enzimleri için özgüllük gösterme yeteneğindedir. Bu iki substrat zehirli-olmadığı gibi, oksitlendiklerinde oluşturdukları yoğun renkleri, lakkaz aktivitelerinin fotometrik olarak tespitinin yapıldığı durumlarda kullanışlıdır. 2,6 - Dimetoksifenol substratı ise, doğal olarak bulunan bir lakkaz substratı olmasına rağmen, zehirlidir. Zamanla oto-oksidasyona uğrama eğilimindedir.

1.2.5.b. Lakkaz enzimlerinin reaksiyon mekanizmaları

Lakkaz enzimlerinin içinde bulunan bakır merkezleri, indirgenmiş substrattan aldıkları elektronları, toksik peroksit ara-ürünlerinin oluşmasına neden olmadan, atmosferik moleküler oksijene gönderirler. Reaksiyon, Tip1 bakır tarafından katalizlenen substratın oksidasyonu ile gerçekleşmektedir. Elektronlar bir sonraki aşamada, moleküler oksijenin indirgendiği ve suyun serbest bırakıldığı trinükleer kümeye transfer edilir.



Şekil 1.3. Lakkaz enzimlerinin katalitik mekanizması (Tuncer 2010)

Lakkaz enzimi, Tip1 bakır aracılığıyla her defasında 1 elektron transferiyle dört-basamakta substrat moleküllerini oksitler. Lakkaz molekülünün yeniden oksidasyonu (yükseltgenmesi), diamanyetik Tip3 bakır çifti tarafından iki basamakta gerçekleşen dört elektronun, moleküler oksijene (O₂) transferi ile gerçekleştirilir. Monomerler oksidasyonu sonucunda ortaya çıkan reaktif radikaller, enzimatik-olmayan reaksiyonlarına katılır. Polimerlerin parçalanması düşük moleküler kütleli aracı (redoks-aracıları) bileşikler tarafından katalizlenir. Bu aracı moleküllerin lakkaz tarafından aktivasyonundan sonra, bunlar aktif enzim bölgesinden polimerlerin hedef bölgelerine diffüzenir. Substrat oksidasyonu reaktif radikallerin oluşmasını sağlar. Oluşan reaktif radikaller, enzimatik-olmayan reaksiyonlar aracılığıyla aşağıdaki reaksiyonlara katılır:

i. Monomerlerin çapraz-bağlanması: 2,6- dimetoksifenol, guaikol, p-kresol, pirogallol gibi aromatik anilinlerin ve fenolik bileşiklerin lakkaz ile enzimatik oksidasyonu, radikal oluşumuna sebep olur. Ortaya çıkan radikaller birbiri ile tepkimeye girerek, C-C, C-O ve C-N bağlarıyla kovalent olarak bağlanarak dimer yada polimer yapı oluşumunu sağlar. Ara-ürünlerin reaktivitesi ve reaksiyonun gerçekleştiği bölgenin pH'sı tarafından oluşan son-ürünün yapısı belirlenir. Topraktaki ksenobiyotik yada doğal fenoller, aromatik aminler, bu sayede organik humik matrikse bağlanabilir. Lakkaz enzimlerinin bu

kapasitesi, atık suların ve kontamine toprakların detoksifikasyonunda enzimlerin kullanımının temelini oluşturmaktadır. Yüksek yapılı bitkilerde fenol-öncüllerinin lakkaz aracılığı ile çapraz-bağlanması, lignifikasyon proseslerinde kullanılır. Bunlar böceklerde lakkaz tarafından katalizlenen kateşollerin proteinlerle birleştirildiği oksidatif birleştirme reaksiyonları kutikula sklerotizasyonunda rol alır. Mikroorganizmalarda ise lakkaz enziminin, protein kalıntılarının çapraz-bağlanmasında (örneğin, tirozinden ditirozin) fonksiyonunun olduğu düşünülmektedir. Örneğin, UV ışınlarına ve sıcaklığa dirençli olan *Bacillus sp.* sporlarındaki proteinlerinin birleştirilmesinde lakkazın fonksiyonel olduğu görülmüştür (Sjoblad 1981).

ii. Polimerlerin parçalanması: Lakkaz, humik asit ve lignin gibi polimerlerin parçalanmasında rol almaktadır. Oluşan reaktif radikaller, kovalent bağların (özellikle alkil-aril) ayrılmasına ve monomerlerin serbest kalmasına yol açar. Lakkazlar, sterik engelleme nedeniyle doğrudan polimerle temas etmeyebilir. Bunun yerine, lakkaz tarafından okside ve aktive olabilen küçük organik molekül veya metaller (örneğin, veratril alkol, 3-hidroksi-antranilik asit ve Mn^{2+}) radikal-katalizli polimerizasyonu oluşturabilirler. Lakkazın oksidasyon potansiyelini artırmada fizyolojik-olmayan redoks-aracıları biyoteknolojik uygulamalarda kullanılmaktadır (Li 1999, Claus 2002).

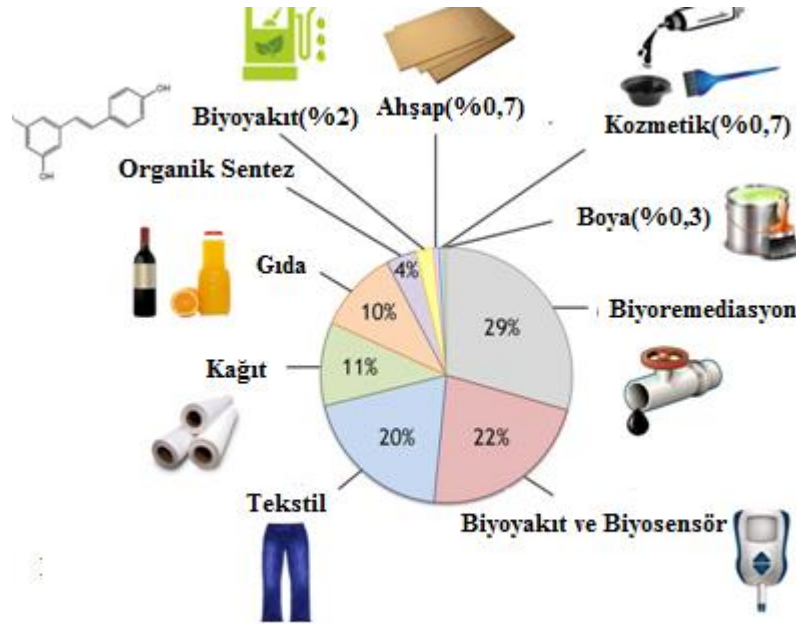
iii. Aromatik halkaların kırılması: Aromatik halkaların lakkaz aracılığıyla kırıldığı bilinmektedir. Bu reaksiyon, sentetik boyalar ve nitroaromatikler gibi ksenobiyotik bileşiklerin parçalanmasında biyoteknolojik öneme sahiptir (Durán 2000, Tuncay 2014).

1.3. Lakkazların Biyoteknolojik Kullanım Alanları

Lakkazların fenolik ve fenolik olmayan lignin türü bileşikleri ve çevresel kirlilikleri oksitleyebilme gibi özellikleri onları birçok biyoteknolojik uygulama için kullanışlı hale getirmiştir. Bu yetenekleri nedeniyle lakkazlar araştırmacılar tarafından yoğun ilgi görmektedir. Özellikle çevreye atılan atık suların ve toksiklerin enzimatik olarak arıtılması, tekstilde boyaların ağartılması gibi uygulamalarda kullanılmaktadır. Bu alanlardaki uygulamalarda; yüksek ve düşük kontaminant konsantrasyonlarında işlev görmeleri, geniş pH, sıcaklık ve tuzluluk aralıklarında işlev görebilmeleri, yüksek reaksiyon hızına sahip olmaları, seçilen belli bir kirleticinin uzaklaştırılmasına olanak

tanımları, etki ettikleri reaksiyondan değişmeden çıkmaları, hızlı çalışmaları gibi avantajları bulunmaktadır.

Tüm bu avantajlara dayanarak enzimatik arıtım yöntemlerinin atık sulara, toksik atıklarda, fabrika atıklarında, denim yıkamada vs. uygulanabilirliğine ilişkin araştırmalar her geçen gün daha da artmaktadır (Karam ve Nicell 1997; Duran and Esposito 2000). Özellikle kağıt hamuru ve kağıt nedeniyle oluşan endüstriyel atıkların detoksifikasyonu, medikal diagnostik alanda, tekstil ve petrokimya endüstrisi ve biyolojik iyileştirme aracı olarak topraktaki ksenobiyotik maddelerin, pestisit, herbisit ve bazı tahrip edicilerin ortadan kaldırılmasında kullanılmaktadır. Lakkazlar ayrıca, anti-kanser ilaçlarının üretilmesinde katalizör, su arıtma sistemlerinde temizleme ajanı olarak görev yapar. Ayrıca kozmetik ve polimerik üretimde de ürünlerinde kullanılmaktadır.



Şekil 1.4. Lakkazların biyoteknolojik kullanım alanları (Mate *et al.* 2016)

Lakkazların kullanıldığı reaksiyonlar, genellikle çevre dostudur ve uygulama alanları kapsamlıdır. Lakkazın reaksiyon ürünü olarak sadece su açığa çıkarması, ko-substrat olarak yalnızca oksijene ihtiyaç duyması, lakkaz medyatör sistemleri ile genişleyen substrat çeşitliliği, bu enzimlerin biyoteknolojik ve endüstriyel alanlarda dikkat çekmesi

için yeterlidir. Son yıllarda lakkazın uygulama alanları ile ilgili yapılan araştırmalarda, çok büyük artış görülmektedir.

Bu alanları genel anlamda sınıflandıracak olursak;

- kağıt endüstrisi (Biyolojik kağıt ve ağartma)
- biyolojik iyileştirme(Renk giderme, poliaromatik hidrokarbon degradasyonu, vb)
- tekstil endüstrisi (Ağartma, Denim işlemleri)
- gıda endüstrisi
- organik sentez
- biyosensör ve immünassay teknikler (Tuncay 2014)

1.3.1. Kağıt endüstrisi

Kağıt üretimi için gerekli olan ligninin uzaklaştırılması, kağıdın ağartılması gibi işlemler için lakkazlar kullanılmaktadır. Odun yapısındaki fiber ve ligninler birbirlerine yapışık halde bulunur. Kağıt üretimi için, fiberlerden ligninin uzaklaştırılması gerekmektedir (delignifikasyon). Klasik yöntemlerle yapılan lignin uzaklaştırma işlemleri ile elde edilen kağıt çok iyi olmaz, güneş ışığına maruz kaldığında çabucak sararır. Ayrıca bu işlemler sırasında enerji tüketimi çok yoğundur ve kullanılan kimyasallar (ClO₂, vb.) çevre için büyük sorun oluşturur. Beyaz çürükçül fungusların, ligninolitik enzimlerce (Lakkaz, mangan bağımlı peroksidaz, lignin peroksidaz vb.) verimli kaynak olmaları, kağıt üretimi ve kağıt ağartılması işlemlerinde yapılan lignin degradasyonundaki enzimatik işlemlerde etkili oldukları ortaya çıkmıştır.

Fungal lakkazlar lignin yapısında bulunan fenollerin yaklaşık %10'nunu yükseltgeyebilirken, medyatör aracılı kullanımları ile bu oran arttırılmış ve lakkazları delignifikasyon ve ağartma işlemleri için potansiyel hale getirmiştir. Kompozit malzeme yapımında da, lakkazlar lignini yükseltgeyerek tepkimeye girmeleri sonucu daha sıkı yapıların elde edilmesini sağlar (Kuhad 1999).

1.3.2. Biyolojik iyileştirme

Fungal lakkazlar, dirençli olan çevresel kirliliklerin degradasyonunda kullanılmaktadır. Lakkazlar, endüstriyel atıklarda, kirli su ve kirli toprakda bulunan farklı aromatik ksenobiyotiklerin ve kirliliklerin oksidatif detoksunu sağlamaktadır. Lakkazlar ile klor giderimi, polisiklik aromatik hidrokarbonların mineralizasyonu, aromatik halka kırılması, kağıt hamuru ve pamuk mili artıklarının degradasyonu, tekstil boyarmaddelerinin renk giderimi gibi işlemler gerçekleştirilir.

Ksenobiyotiklerle birlikte poliallilamin hidroklorürler (PAH) toprak kirliliğine yol açar. Bu nedenle, bu tür bileşiklerin parçalanması ekolojik denge için çok önemlidir. Lakkaz enzimlerinin katalitik özellikleri, fosil yakıtların atıkları ve petrolden kaynaklanan PAH'ların parçalanabilmesini sağlamaktadır.

Trametes hirsuta fungusundan elde edilen lakkaz ile farklı alken bileşikleri, HBT gibi medyatörler varlığında keton veya aldehite oksitlenir. *Coriolopsis gallica* lakkazı ABTS ve HBT varlığında N-etil karbazol, karbazol, dibenzotiofen ve flüorin gibi zararlı bileşikler oksitleyebilir. Ayrıca, 2,6-dimetoksifenol, bisfenol-A, 4-izopropenil fenol gibi fenolik bileşikler de çeşitli fungal lakkazlar ve medyatörler yardımıyla buldukları çeşitli ortamdan uzaklaştırılabilir (Nyanhongo 2006).

1.3.3. Tekstil boyarmaddelerinin renklerinin giderilmesi

Tekstil boyarmaddelerinin renk giderimi üzerinde lakkazların etkisinin araştırılması biyolojik iyileştirmede kullanılan yöntemlerden biridir. Lakkazlar, tekstil boyarmaddelerinin renk giderimi için iyi bir potansiyele sahiptir. Tekstil ürünlerinin renklendirilmesinde, boyamadan artakalan boyarmadde artıklarının yaklaşık %10-15'i çevreye bırakılmaktadır. Bu durum, sularda da yüksek oranda istenmeyen kirlilik birikimine yol açar.

Piyasada ticari olarak satılan 100.000'den daha fazla maddede, boyarmadde bulunmaktadır. Renklendiricilerin en az %10'u atık sularla çevreye yayılmaktadır. Işığa, sıcaklığa ve mikrobiyal etkilere karşı dayanıklı olan bu boyarmaddeler, çevrede bozulmadan kalmaktadır. Bu endüstriyel atıklar zehirlidir. Renk giderimi kimyasal ve adsorbsiyon, oksidasyon, iyon değişimi, koagülasyon-flokülasyon ve elektrokimyasal yöntemlerle sağlanabilir. Bu yöntemlerin geneli pahalı ve uygulamaları sınırlıdır. Tekstil endüstrisinde yer alan boyarmaddelerin yapısal çeşitliliği, arıtma ile ilgili yöntemlerin tartışılmasına yol açmıştır ve pratik biyokimyasal yöntemlerin iyileştirilmeleri için gözden geçirilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Lignin degradasyonunda etki eden enzimlerin kullanılabilirliği boyarmaddelerin arıtımı ile ilgili alternatif yöntemlere yönelmeyi sağlamıştır. Beyaz çürükçül fungusların sahip oldukları ligninolitik enzim sistemleri, heterosiklik, azo, polimerik, reaktif boyarmaddelerin degradasyonu için oldukça etkili sonuçlar göstermiştir. Lakkazların diğer ligninoselülozik enzimlere göre daha avantajlı olmaları onların uygulama alanları oldukça genişletmiştir. Serbest, immobilize lakkaz ve lakkaz medyatör sistemleri ile çok sayıda renklendirici için renk giderme prosesleri çalışılmıştır (Demiralp 2015).

1.3.4. Tekstil endüstrisinde

Liflerin yapısında bulunan yağlar, pektinler, mumlar, pigmentler ve proteinler gibi doğal renklendiriciler ön işlemler ile liflerden uzaklaştırılmalıdır. Ön işlemler, tekstil yüzeyinin boya, baskı işlemlerine hazırlanmaları için yapılan işlemlerdir. Renklendiricilerin uzaklaştırılması için ağır koşullar altında tekstil yüzeyleri yükseltgen maddeler ile birkaç işlemden geçirilerek ağartma işlemi gerçekleştirilir. Yoğun miktarda kullanılan ağartıcılardan artakalanlar, işlem sonunda kumaşın defalarca yıkanması ile atık sulara geçmektedir.

Atık yıkama sularının çevreye verdiği zarar nedeniyle alternatif yöntemler aranmış ve lakkazların bu tür kumaşların ortak boyarmaddesi olan indigo'nun rengini açabildiği görülmüştür. Novozyme (Novo Nordisk, Danimarka) firması 1996'dan beri bu işlemler için lakkazı kullanmaya başlamıştır. Ayrıca lakkazlar, tekstil fiberlerinin yüzeylerine

bağlanarak tekstil ürünlerine antibakteriyel, antioksidan olmaları ve su itici özellik kazandırmaları gibi özellikleri sayesinde çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır (Setti 1999).

1.3.5. Gıda endüstrisinde

Gıda endüstrisinde içme suyu, bira ve yağ fabrikalarının atık sularında bulunan fenolik bileşiklerin biyolojik olarak iyileştirilmesi; meyve suyu ve alkollü içeceklerde fenolik bileşikler nedeniyle oluşan bulanıklığın giderilmesinde kullanılan proseslerde lakkazlar kullanılmaktadır (Cantarelli 1989).

1.3.6. Biyosensör ve diagnostik uygulamalar

Biyosensörler, çevre analizlerinde ve klinik tanılarda reaksiyon izleyici olarak kullanılmaktadır. Lakkaz temelli birçok biyosensörün çalışma prensibi, analitin oksidasyonu sırasında gerçekleşen oksijen tüketiminin lakkazlar tarafından izlenmesidir. Lakkazların kofaktöre ihtiyaçları olmadan elektron transfer tepkimelerini katalizleyebilme özellikleri, biyosensör geliştirme ile ilgili çalışmalarda kullanımının önünü açmıştır. Fenol, kodein, anilin, morfin, kateşolamin, bitki flavonoidleri gibi maddelerin tanınması ve immünoassay çalışmalarında lakkazın immobilize edildiği biyosensörler geliştirilmiştir. Lakkazlar antijen, antibadi, DNA, RNA, biyotin gibi moleküllere kovalent olarak bağlanabildikleri için immünokimyasal, histokimyasal veya nükleik asit tanıları için de kullanılabilirler.

1.3.7. Sentetik kimyasallar

Oksidatif bozulma ile kompleks polimer üretiminde kullanılması amaçlanan lakkaz enzimleri, sentetik kimyanın da oldukça ilgisini çekmektedir. Mustafa vd yapmış oldukları çalışmada Suberase® (Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Danimarka) olarak adlandırılan ticari bir lakkaz enzimiyle fenolik renklendiricileri sentezlediklerini rapor etmişlerdir (Mustafa 2005).

1.3.8. Kozmetik

Kozmetik dünyası da lakkaz enzimlerinin uygulanma alanları arasında yerini almıştır. Lakkaz temelli saç boyalarının daha az tahriş etme potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir. Normal saç boyası içerisinde oksitleyici ajan olarak bulunan hidrojen peroksit (H₂O₂) yerine lakkaz kullanıldığında, bu tip saç boyalarının kullanımı geleneksel saç boyalarına göre daha kolaydır. Bunlar cilt beyazlatıcı olarak kullanılan ve çeşitli proteinleri içeren kozmetik ve dermatolojik preparasyonlar da geliştirilmiş halde bulunmaktadır (Gozl-Berner 2004).

Uygulama Alanı	Lakkaz Kaynağı	Uygulama Alanı	Lakkaz Kaynağı
Boyalarda Renk Giderimi	<i>Aspergillus niger</i> <i>Cerrena unicolor</i> <i>Coriopsis gallica</i> <i>Funalia trogii</i> <i>Gaeumannomyces graminis</i> <i>Irpex lacteus</i> <i>Pleurotus ostreatus</i>	Sıvı Atık Muamelesi	<i>Coriopsis gallica</i> <i>Gliocladium virens</i> <i>Lentinula edodes</i> <i>Coriopsis tigrinus</i> <i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Pleurotus spp.</i> <i>Pycnoporus coccineus</i> <i>Rhus vernicifera</i> <i>Trametes sp.</i> <i>Trametes versicolor</i>
Ksenobiyotik-lerin Parçalanması	<i>Coriolus hirsutus</i> <i>Coriolus versicolor</i> <i>Panus tigrinus</i> <i>Polyporus pinsitus</i> <i>Pyricularia oryzae</i> <i>Rhizoctonia solan</i> <i>Rhus vernicifera</i> <i>Trametes pubesce</i>	Biyolojik Kağıt Hamuru	<i>Coriolus versicolor</i> <i>Fomes fomentarius</i> <i>Ganoderma collosum</i> <i>Lentinus edodes</i> <i>Merulius tremellosus</i> <i>Phlebia radiata</i> <i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Pycnoporus sanguineus</i> <i>Trametes versicolor</i> <i>Streptomyces cyaneus</i>
Organik Sentezi	<i>Coriolus hirsuta</i> <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> <i>Phaseolus coccineus</i> <i>Pyricularia oryzae</i> <i>Trametes versicolor</i> <i>Trametes villosa</i>	Gıda Endüstrisi	<i>Polyporus pinsitus</i> <i>Trametes hirsuta</i> <i>Trametes versicolor</i>
Biyosensörler	<i>Aspergillus niger</i> <i>Cerrena unicolor</i> <i>Coriolus hirsutus</i> <i>Myceliophthora thermophila</i> <i>Rigidoporus lignosus</i> <i>Rhus vernicifera</i> <i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Pyricularia oryzae</i> <i>Polyporus pinsitus</i> <i>Trametes versicolor</i>	Biyo-Beyazlatma	<i>Coriolus versicolor</i> <i>Pleurotus eryngii</i> <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> <i>Trametes versicolor</i>

Şekil 1.5. Lakkaz enzimi kaynağı olan mikroorganizmalar ve uygulama alanları (Demiralp vd 2015)

1.4. Lakkaz Enzimi Kaynakları

1.4.1. Bitkisel lakkazlar

Lakkaz ilk kez Japon vernik ağacı olarak bilinen *Rhus vernicifera*'da tanımlanmış, daha sonra mango, mung fasülyesi, şeftali, çam, erik, firavun inciri, kavak gibi farklı bitkilerde de belirlenmiştir. Bazı bitkilerde, lakkazın çoklu formları bulunmaktadır. Gelişen tekniklerle birlikte, tütün (*Nicotiana tabacum*), mısır tohumları (*Zea mays*) ve delice otunda da (*Lolium perenne*) lakkaz enzimleri elde edilerek karakterizasyonu yapılmıştır. Lakkazlar, bitkilerde dehidrojenatif mekanizmasıyla ligninin polimerizasyonunda, iyileştirme süreci ve Fe(II) iyonunun Fe(III) iyonuna oksidasyonunda rol alırlar.

1.4.2. Fungal lakkazlar

Doğada bulunan mantar türlerinin çoğunda lakkaz enzimi üretimi gerçekleşmektedir. Lakkazlar, en çok funguslardan saflaştırılmış ve karakterizasyonları yapılmıştır. Bilinen en iyi lakkaz üreticileri, *Basidiomycetes* sınıfına ait *Duteromycetes* ve *Ascomycetes* funguslarıdır.

Trametes versicolor, *Pleurotus eryngii*, *Chaetomium thermophile*, *Trametes hirsute*, *Trametes ochracea*, *Trametes villosa*, *Trametes gallica*, *Cerrena maxima*, *Phlebia radiata*, *Coriolopsis polyzona*, *Lentinus tigrinus* beyaz çürükçül fungusları, iyi bilinen lakkaz üreticilerindedir. Lakkazlar soft, beyaz çürükçül ve Geophildae saprofit mantarlarının birçok türünde üretilmektedir. *Myceliophthora thermophila*, *Aspergillus*, *Curvularia*, *Penicillium* ve *Chaetomium thermophile* gibi saprofit *Ascomycetes* kompostlarında ve toprakta *Mycelia sterlia* funguslarında da lakkazların varlığı rapor edilmiştir. Lakkazlar aynı zamanda fungus türü olan birkaç şapkallı yenilebilir mantardan da izole edilip saflaştırılarak karakterize edilmiştir. Bunlar; *Agrocybe cylindracea*, *Clitocybe maxima*, *Ganoderma sp. MK05*, *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus eryngii*, *Albatrella dispansus*, *Hericium erinaceum*, *Tricholoma giganteum*, *Cantharelluscibarius*, *Boletus edulis* şapkallı mantar türleridir. Aynı zamanda *Pleurotus*

ostreatus, *Lentinula edodes* ve *Agaricus bisporus* gibi yenilebilir birçok mantar da lakkaz kaynağıdır. Beyaz çürükçül fungusların etkili bir şekilde ligninin yapısını bozdukları bilinmektedir. Beyaz çürükçül funguslardaki yüksek aktiviteye sahip lakkazların; hücre duvarının yapısında bulunan lignin gibi kompleks bir yapıyı depolimerize etme, pigment üretimi, şapka oluşumu sağlama, detoksifikasyon gerçekleştirme, patojenez yol açma, morfogenez gelişimi gösterme gibi farklı işlevleri de vardır.

Fungal lakkazlar, farklı kültür koşulları altında çoklu enzimler olarak oluşur. Molekül kütleleri yaklaşık 50-100 kDa olan glikoproteinlerdir. Lakkazlar, yüksek kararlılığa neden olan %10-45 oranında karbonhidrat içerir. Lakkazların çoğu mannoz, N-asetil glukozamin ve galaktozdan oluşan karbohidrat parçası içermektedir. Fungal lakkazlar; sadece havaya ihtiyaç duymaları, ürün olarak sadece su üretmeleri, geniş substrat spesifitesine sahip olmaları nedeniyle biyoteknolojik çalışmalar için idealdir.

Bitkisel ve fungal lakkazlar arasında bir karşılaştırma yapılacak olursa; bitkisel lakkazlar ligninin radikal temelli polimerizasyonunda görev alırken fungal lakkazlar lignin biyodegradasyonuna katkıda bulunurlar. Bitkisel lakkazlar %22-45 ve fungal lakkazlar %10-25 glikolize enzimlerdir. Bitki lakkazları fungal lakkazlara göre daha yüksek oranda glikozilasyonda yer alırlar. Fungal lakkazlar bitki lakkazlarından daha düşük molekül kütlesine sahiptirler.

1.4.3. Böceklerden üretilen lakkazlar

Lakkaz enzimi, *Bombyx*, *Calliphora*, *Diptera*, *Drosophila*, *Lucilia*, *Manduca*, *Musca*, *Oryctes*, *Papilio*, *Phormia*, *Rhodnius*, *Sarcophaga*, *Schistocerca* ve *Tenebrio* gibi farklı böceklerden de tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. Böceklerde lakkazların, kütikül tabakasını sertleştirmede etkili olduğu bilinmektedir.

1.4.4. Bakteriyel lakkazlar

Lakkaz geninin ilk defa bitki kökeni ile ilişkili *Azospirillum lipoferum* adlı bir bakteride bulunması ile prokaryotlarda da lakkaz varlığı ispatlanmıştır. Prokaryotlardaki lakkazlar ile ilgili yapılan çalışmalarda yaygın olarak, toprakta ve farklı ot ile tahıl türlerinin rizosferde bulunan, aşılındığı kültür bitkilerinin büyümelerini sağlayan *Azospirillum* ve bir siyanobakteri olan *Anabaena azollae* adlı bakterilerde de lakkaz aktivitesine rastlanmıştır. Ayrıca, *Bacillus subtilis* adlı bakterinin endospor kabuğunda termostabil bir CotA lakkazı içerdiği rapor edilmiştir. Bu lakkazlar, sporların UV ışınları ve H₂O₂' den korunmasına yardımcı olur.

Streptomyces cyaneus, *Streptomyces lavendulae*, *Bordetella compestrus*, *Caulobacter crescentus*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia pestis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas desmolyticum NCIM 2112*, *Bacillus sp.ADR* rapor edilen bakteriyel lakkaz kaynaklarıdır. Bakteriyel lakkazların çoğu (*A. lipoferum*, *Marinomonas mediterranea*, *B. subtilis*) hücre içinde lokalize durumdadır. Fungal lakkazların aksine bakteriyel lakkazlar oldukça aktiftirler ve yüksek sıcaklıklarda, bakır ve klor iyonlarının yüksek konsantrasyonlarında ve yüksek pH değerlerinde kararlıdır ve immobilize spor lakkazlarının neredeyse hepsi endüstriyel prosesler için uygundur (Tuncay 2014).

1.5. Termostabil Enzimlerin Biyoteknolojik Açıdan Önemi

Termostabil enzimler, endüstrinin neredeyse her alanında kullanılan ve genelde mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerdir. Yüksek sıcaklıkta yaşayabilme özelliğindeki termofilik organizmalar termostabil enzimler elde etmek için en önemli kaynaklardır. Bu kaynaklardan üretilen enzimler, mezofilik organizmalardan üretilen enzimlere oranla belirgin olarak aktivitelerini kaybetmeden daha uzun süre oda sıcaklığında saklanabilmektedirler. Mikroorganizma kaynaklı enzimler, bitkisel veya hayvan kaynaklı enzimlere göre; katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, daha stabil ve ucuz olmaları, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, fazla miktarda elde

edilebilmeleri, endüstriyel işlemlerde kullanılmaları ile, yüksek sıcaklıkta bakteriyel ve viral kontaminasyonların az olması gibi avantajları vardır.

Ayrıca termostabil proteinler denatüre edici şartlara karşı yüksek tolerans gösterebilme özelliğindedir. Termostabil proteinler mezofilik proteinlerden, daha fazla α -heliks ve β tabakası içeriğine sahiptir. Bu özellik onlara değişik denatüre edici şartlara karşı doğal yapıyı korumada birçok avantaj sağlar. Endüstriyel enzimlerin kullanıldığı prosesler genelde yüksek sıcaklıklarda ($>50^{\circ}\text{C}$) gerçekleştirilir. Bundan dolayı, ekstremofilik organizmalardan elde edilen yeni enzimlerin araştırılması çok daha fazla önem kazanmıştır. Özellikle termofil bakterilerden elde edilen enzimler sahip oldukları dayanıklılıktan dolayı ticari kullanımlarda çok fazla tercih edilir. Biyoteknolojik işlemlerin yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilmesinin birçok faydası vardır. Sıcaklığın arttırılması organik bileşiklerin çözünürlüğü ve biyolojik olarak kullanılabilmesi açısından birçok öneme sahiptir. Bununda küçük alanlarda yüksek reaksiyon hızı oluşturma gibi birçok avantajı vardır (Güven 2011).

1.6. Ekstremofilik Bakteriler

Yüksek sıcaklık, yüksek basınç, aşırı soğuk, aşırı tuzluluk, düşük oksijen miktarı, yüksek doz radyasyon ve ultraviyole gibi koşullarda yaşayabilen, yani “ekstrem ortamları seven” mikroorganizmalara “ekstremofiller” denir. Bu bakteriler, diğer canlıların hayatta kalamayacağı koşullarda yaşamlarını sürdürebilirler (Güven 2017).

1.7. Termotolerant Laktik Asit Bakterileri ve Enzim Üretimleri

Sıcaklık, canlı yaşamı için en önemli değişkenlerden biridir. Yaşayan organizmaların sınıflandırılmasında onların sıcaklıkla olan ilişkileri önemli bir yer tutar. Bundan dolayı sıcaklık biyolojik sistematığın dayandığı en temel öğelerden biri olarak kabul edilir. Ekstremofil mikroorganizmalardan yüksek sıcaklık aralığında aktivite gösterenlerine “termotolerant” lar denir (Godfrey and West 1996; Anvar and Saleemuddin 1998; Bal

2005; Öztürk 2007). Termotolerant organizmalar yüksek sıcaklık aralığında yaşamaya adaptedir.

Laktik asit bakterileri ise et ve süt ürünleri gibi fermente gıdalarda, sebzelerde, içeceklerde ve fırıncılık ürünlerinde bu bakterilerin sıklıkla bulunduğu ortaya konmuştur. Ayrıca insan ve hayvanların sindirim sistemi florasında da laktik asit bakterilerine yaygın olarak rastlanmaktadır. Bu organizmalar gelişmek için yüksek besin içeren ortamlara ihtiyaç duyarlar. Temel işlevleri hammaddede bulunan şekerleri enerjiye ve laktik aside çevirmektir. Pek çok durumda, laktik asit bakterilerini endüstriyel ve geleneksel gıda fermantasyonlarında fermente gıdaların korunmasına, aroma ve tekstür oluşumuna katkıda bulunmak amacıyla başlatıcı kültür olarak kullanılırlar. Bunun yanı sıra, antimikrobiyel peptitlerin ve ekzopolisakkaritlerin üretimini gerçekleştirirler (Yüce 2017).

Günümüzde, dar bir pH, sıcaklık ve iyonik güç aralığında aktivite gösteren enzimlere sahip mezofilik organizmalardan izole edilmiş, 3000'den fazla enzim tanımlanmıştır. Fakat mezofilik organizmalardan üretilen enzimlerin aktivite aralığının kısıtlı olması, endüstriyel talepleri tam olarak karşılayamamaktadır. Bu durum yeni enzimlerin ortaya çıkarılıp araştırılmasına teşvik etmektedir. Özellikle ekstrem koşullarda yaşayabilen mikroorganizmaların geniş pH, sıcaklık, basınç vs. aralıklarda yaşaması, biyoteknolojik uygulamalarda kullanılması yönünden avantaj sağlamaktadır. Bu nedenle ekstremofiller, günümüzde önemli enzim kaynakları olarak göz önünde tutulmaktadır.

1.8. Ağrı/ Diyadin Kaplıcası'nın Özellikleri

Ağrı'nın Diyadin ilçesinde bulunan kaplıcanın suyu tahlil edildiğinde, ortalama 2-3 gr civarında total minerilizasyon bulunduğu tespit edilmiştir. Suyun içerdiği mineraller; kalsiyum, bikarbonat, hidrojen, sülfür, karbondioksit, kükürt, sülfat ve magnezyumdur. Suyun sıcaklığı ortalama 40-55°C ve pH'sı 7,0' dir. Kaplıca suyunun; romatizma, nevrit, nörolojik hastalıklar, deri-cilt hastalıkları, mide-bağırsak, böbrek ve solunum yolu hastalıkları, siyatik ve metabolizma bozukluğu gibi çeşitli rahatsızlıklar için tavsiye

edildiği bilinmektedir. Diyardin kaplıcaları, şifalı sular sıralamasında dünyada 7. sırada gelmektedir. Fakat, yeteri kadar tanıtılmaması nedeniyle bu kaplıcadan, ne bölge insanı ne de ülke insanı yeterince faydalanamamıştır. Ayrıca, farklı birçok mikroorganizmanın yaşam alanı olan kaplıcanın sahip olduğu biyolojik çeşitlilik ve bu canlıların sahip olduğu özellikler şimdiye kadar aydınlatılmamıştır (Bozoğlu 2014).

1.9. Ekstrem Bakterilerin Saptanması

1.9.1. 16S ribozom analizi

Bakterilerin filogenetik olarak analiz edilmesi genetik bilginin korunmuş bir bölgesi ile karşılaştırılması sonucu gerçekleşebilir (Kolbert and Persing 1999). Yapılan çalışmalarda, daha önce incelenen korunmuş bölgelerin; 5S, 16S ve 23S rRNA'yı şifreleyen genlerden oluştuğu belirlenmiştir. Bu gen bölgeleri içerisinde bakteri sistematigi için genelde 16S rRNA gen bölgesi kullanılır (Garrity and Holt 2001). Sistematik içerisinde bu gen bölgesi bakteriler arasında ayırımın yanısıra arkelerin 16S ve ökaryotların 18S rRNA gen bölgeleri ile de kıyaslanabilir (Tortoli 2003). 16S rRNA gen bölgesinin;

- tüm bakterilerde bulunması,
- fonksiyonel olarak korunmuş bir bölge olması,
- gen analizi için uygun büyüklükte olması (~1550 bç),
- iyi korunmuş ve bunun yanı sıra heterojen bölgeler içermesi,
- yeterli veritabanına sahip olması gibi önemli özellikleri vardır (Harmsen and Karch 2004).

16S rRNA gen bölgesi korunmuş bölge olduğundan hücresel fonksiyonlar için oldukça önemlidir. Bunun yanı sıra bölgede meydana gelebilecek herhangi bir mutasyon kolaylıkla tolere edilebilir. 16S rRNA geni bölgesindeki değişim tam olarak açıklanmasa da organizmalar arasındaki benzerlik ve farklılığı yani bağlantıyı net bir şekilde ortaya koymaktadır (Harmsen and Karch 2004). 16S rRNA geninin antimikrobiyel kimyasallara

duyarlılığı vardır. Gende oluşabilecek herhangi bir mutasyonun farkedilebilmesi de yine 16S rRNA gen bölgesine bağlıdır. Çünkü meydana gelecek mutasyon, organizmanın antimikrobiyel kimyasallara karşı duyarlılığını etkiler ve fenotipik bir direnç meydana gelir. Bu da 16S rRNA gen dizilimi ile ortaya çıkar. Gen bölgesinin bu özelliği özellikle klinik mikrobiyolojide oldukça önemli yere sahiptir ve bakteriyal sistematik açısından da herhangi bir engel teşkil etmemektedir (Pfister *et al.* 2003a; Pfister *et al.* 2003b). 16S rRNA gen bölgesinin bu özelliği genetik olarak daha uzak mesafeli ilişkileri aydınlatmada oldukça büyük bir öneme sahiptir (Garrity and Holt 2001). Sonuç olarak 16S rRNA gen bölgesi bakterilerde ortak olarak bulunan korunmuş, farklı heterojen bölgeler içeren ve bundan ötürü bakteriler arasındaki filogenetik ilişkinin belirlenmesi açısından önemli bir gen bölgesidir. Ayrıca 16S rRNA gen analiz yöntemi; yeni cins ve türlerin belirlenmesi, zor üreyen mikroorganizmaların tanısı, klinik önemi olan patojenlerin tanımlanması ve antibiyotik tedavisi altında etken belirlenmesi yönüyle oldukça güçlü ve önemli bir yöntemdir (Çetinkaya 2011).

1.9.2. GTG₅ dizi analizi

Genom içerisinde bilinen tekrarlı diziler; REP, ERIC, BOX ve GTG₅ bölgeleri arasındaki genomik bölgeler olarak tanımlanmaktadır. Bu bölgeler korunmuş olup, sistematikte kullanımı, tekrarlayan bu bölgelerin PCR ile amplifikasyonundan oluşmaktadır. Tekrarlayan dizilere spesifik PCR yöntemleri; REP-PCR, ERIC-PCR, BOX-PCR ve (GTG)₅-PCR olarak adlandırılmakta, bu yöntemlerin hepsine birden rep-PCR adı verilmektedir. Bu PCR yöntemi; bakteri genomunda korunmuş ve tekrarlayan DNA dizilerinin amplifikasyonu ile karakterize edilen bir genomik parmak izi analiz yöntemidir (Lupski and Weinstock 1992).

Genom içerisinde tekrarlayan dizilerde temelde üç farklı türün tanımlandığı görülmüştür. Bunlar:

- REP dizileri: Bu diziler yaklaşık 35-40 baz çifti büyüklüğündeki elementlerdir.

- ERIC dizileri: Bu diziler yaklaşık 124-127 baz çifti büyüklüğündeki korunmuş olan palindromik dizilerdir.
- BOX dizileri: Bu diziler yaklaşık 154 baz çiftlik dizilerdir. BOX diziler BOXA, BOXB ve BOXC olmak üzere korunmuş üç alt üniteye sahiptir.

Yapılan çalışmalar sonucunda; REP ve ERIC PCR yönteminin uygulanabilirliğinin kolay olduğu, çok sayıda izolatın aynı anda ayrımının yapılabildiği, ayırt edici özelliğinin yüksek olduğu ortaya konmuştur. (Carson *et al.* 2003).

1.10. Enterokokların Özellikleri

Enterokoklar *Streptococcaceae* familyası içinde yer alan katalaz negatif, Gram pozitif koklardır. *Streptococcus* cinsinden morfolojik olarak ayrılması güç olduğundan, 1980'li yıllara dek streptokok olarak sınıflandırılmış, taksonomik analizlerle ilgili genetik teknolojide kaydedilen gelişmeler sonucu, daha sonra içinde en az 12 türün bulunduğu ayrı bir cins olarak kabul edilmiştir. Son yıllarda enterokokların üreme, biyokimyasal, antijenik, hastalandırıcılık ve genetik özelliklerinin gösterdiği ayırım nedeniyle *Enterococcus* olarak ayrı bir cins içinde toplanması uygun görülmüştür. Enterokoklar toprak, su, yiyeceklerde, insan ve hayvanların barsak, safra yolları, ağız ve bazen de derilerinde (özellikle perineal deri) normal florada bulunurlar. Yiyecek, sebze ve yemlerden de izole edilmiştir. İki biyotipi vardır. *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis*. *E. faecium* cinsi *E. faecalis*'e göre antimikrobiyalere daha rezistandır. Alfa hemolitikdir. %6,5'lük NaCl ve pH 9,6'da ürer.

1.11. Enzimlerin Saflaştırılma Stratejileri

Proteinler, heterojen özellik taşıyan makromoleküller olmaları nedeniyle biyolojik proseslerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlar, doğal ortamları dışında kararlı değildir. Proteinler, hücre içi ve hücre dışı ortamlarda farklı özellikler sergiler. Hücrenin büyük bir miktarını oluşturmaları, canlı organizmanın önemli bir bileşeni olmalarını sağlar ve hücrelerin ana fonksiyonlarını gerçekleştirirler. Proteinlerin çeşitli biyolojik

fonksiyonları, biyoteknolojik çalışmalarda bu makromoleküllere duyulan ihtiyacın farkına varılmasına ve protein izolasyonu ve saflaştırma proseslerinin önem kazanmasına yol açmıştır. Günümüzde farklı birçok izolasyon, saflaştırma ve yapı analizi tekniği geliştirilmiştir. İzole edilerek saflaştırılacak protein için hedeflenen saflık oranı, proteinin kullanım amacına göre belirlenir. Yapı analizi gibi araştırma amaçlı kullanılacak ise saflık düzeyi çok yüksek olmalıdır. Ancak, endüstriyel işlemlerde kullanılacak proteinin saflık düzeyi daha düşük olabilir. Aynı zamanda bu proteinlerin kararlı, bol miktarda ve iyi karakterize edilmiş olmaları gerekir.

Hücrelerde binlerce farklı çeşit protein içeriği vardır ve bunlardan yalnızca birinin saflaştırılması o proteinin diğer proteinlerden farklı özelliklerinin olmasıyla gerçekleşebilir. Enzim saflaştırmanın en önemli stratejisi, düşük maliyetle en yüksek saflık oranına ulaşmaktır. Saflaştırılacak enzimin, tespit edilmesinde strateji belirlenirken önemli hususlardan birisi de enzim kaynağının bulunabilirliğidir. Çünkü saflaştırma stratejisinde maliyet ve zaman oldukça önemlidir. Enzim saflaştırma sürecinde dikkat edilmesi gereken diğer bir husus enzim aktivitesinin korunması ve mümkünse artmasıdır. Enzim aktivitesinin korunmasını sağlamak için yapılan işlemler ve enzimin muhafazası her zaman +4°C'de yapılmalıdır (Bollag *et al.* 1994; Erarslan vd 2008). Endüstriyel amaçlı proseslerde oldukça yüksek oranda kullanılan lakkaz enziminin, saflığının yüksek olmasından daha çok, maliyetinin az olması ve fazla miktarda üretilmesi adına kısmi saflaştırma yapılarak işlemlere tabi tutulabilir (Tuncay 2014).

1.11.1. TPP (Three Phase Purification/Üç Fazlı Ayırma) yöntemi

Geleneksel protein saflaştırma yöntemlerine göre; üçlü faz ayırma tekniği, saflaştırmada uygulanan hızlı, kolay ve etkili bir yöntemdir. Enzim çözeltisine yüksek konsantrasyonda amonyum sülfatın (0,8-2,4 M) ve suda çözünürlüğü az alifatik bir alkolün (genellikle t-bütanol) ilavesiyle yöntem gerçekleştirilir. Bu işlem sonucunda, iki ayrı sıvı faz (alkol fazı üstte ve tuzlu sulu faz altta olmak üzere) oluşur. Amonyum sülfat tuzu, sulu çözeltilerden proteinlerin salting-out yöntemine göre alınmasını sağlayan geleneksel bir kosmotropik maddedir. Kosmotroplar, protein ekstraksiyonu ve saflaştırma işlemlerinin

farklı basamaklarında ve farmakolojik preparasyonlardaki proteinlerin çöktürülmesinde kullanılırlar. Amonyum sülfat tuzu, proteinlerin yüklü yüzeylerindeki etkileşimi artırıp çökmelerini sağlar. Metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol ve t-bütanol gibi alkoller suda çözünmelerine karşın kozmotrop tuzları çözme yeteneğine sahip değildirler. t-bütanol ise bağlı olduğu protein çökeleklerinin yüzdürme kuvvetini artırarak yoğun tuz çözeltisi üzerinde yüzmesini sağlar. Kalan proteinler, sakkaritler, hücre parçaları, zenginleştirilmiş halde en alt fazda bulunurken, pigmentler, lipitler veya hidrofobik materyaller üst fazda konsantre haldedir. Protein içeriği fazla olan orta faz ise diğer iki fazı birbirinden ayırmaktadır. Orta fazda çöken proteinlerin nedenleri kozmotropi, salting out, kosolvent çöktürme, izoionik çöktürme, osmotik elektrostatik güçler ve protein hidrasyon değişimlerinin tamamıdır.

Organik çözücüler ile çöktürme, izoelektronik noktada çöktürmenin prensibi ile aynı prensibe sahiptir. Organik çözücüler dielektrik sabiti sayesinde çözme kuvvetini düşürürler. Böylece proteinlerin çözünürlüğü azalır. Elektrostatik çekimlerin etkisi ile agregasyon meydana gelir. TPP ile çöken enzimlerin tekrar çözdürülmesi hacimsel ve spesifik aktivitelerini geri kazandırmaktadır. t-bütanol, oda ve daha yüksek sıcaklıklarda bir araya getirme ajanıymış gibi davranmaktadır. C-1 ve C-2 kosolventlerinin (etanol gibi) bu tip özellikleri yoktur.

Biyolojik ve kimyasal proseslerde çözeltideki iyonların etkileri, o iyonlara özgüdür. Özgün iyon etkilerine Hofmeister olayı denir. Aşağıda Hofmeister serisi olarak tanımlanan anyon ve katyon sıralamaları verilmiştir. Sıralama proteini çöktürme kapasitelerine göre yapılmıştır (Nostro and Ninham 2012).

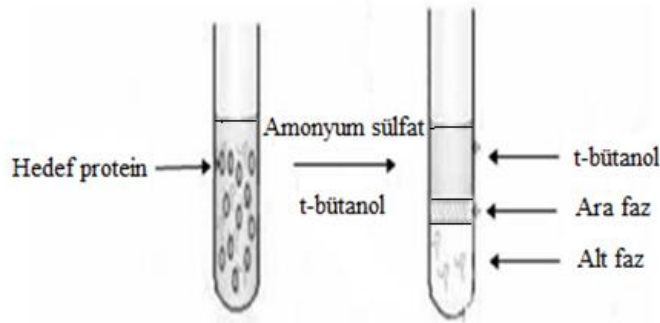


Liyotropik (su çekme gücü) seride, klordan önceki anyonlar kozmotrop, klordan sonrakiler ise kaotrop olarak adlandırılır (Atav ve ark., 2009). Kozmotroplar çözeltiyi dengeleme görevi yapar. Kaotropolar ise “konum bozucu” olarak proteinlerin yapısını düzleştirerek hidrofobik kısımları etkisiz hale getirip çözünürlüğünü artırır. Tuz içeren

çözeltiler, içerdği tuzun kozmotropik ya da kaotropik olmasına bağlı olarak; kozmotrop etki gösteren tuz, çözeltinin iyonik özelliğini yükselteceğinden oluşan hidrofobik etkileşimlerle proteinlerin sudan uzaklaşması ve kümeleşmesini sağlayıp çökmesine (salting-out) neden olur. Eğer tuz kaotrop etkiye sahip ise, iyonik etkinin düşük olmasıyla birlikte proteinlerin hidrofobik yüzeyinin düzleşmesine ve hidrofobik etkileşime girerek çözünürlüğünü arttırıcı (salting-in) etki göstermesine neden olur.

Çöktürmenin (salting-out) mekanizması

NaCl ve t-bütanol varlığında çöktürme şu şekilde açıklanmıştır: düşük konsantrasyondaki t-bütanol moleküllerinin çevresine 20 su molekülü kafes gibi yerleşmektedir. Bunun sonucunda t-bütanolde bulunan alkol grubu ile metil grubu arasındaki dimer yapının hidrofobik etkileşimler sonucunda gevşemesi sağlanmaktadır. NaCl ilavesiyle, bütanolün alkol grupları anyona (Cl^-) ilgi gösterir ve amfifil kümeleşme eğilimini arttırarak faz ayrımı gerçekleşir.



Şekil 1.6. TPP'nin uygulanmasıyla oluşan fazların gösterimi (Duman 2016)

1.11.2. TPP tekniğinin önemli avantajları

- Büyük ve küçük ölçekli çalışmalara uygulanabilir. Düşük hızda uygulanan santrifüj ile proteinler pelet (ara) faza geçer. Oluşan üst fazda genellikle organik solventlerde çözünebilen kontamine yapılar vardır.

- TPP'de düşük moleköl ağırlıklı yapıları; lipid ve fenol gibi yapıların kolaylıkla uzaklaştırılır.
- TPP, maliyet açısından diğer yöntemlerle kıyaslandığında; harcanan amonyum sülfat miktarı, protein saflaştırmada ara işlemlerden biri olan tuzla çöktürme işlemine göre çok düşüktür.
- İşlemden geri kazanımının da mümkün olduğu düşünülürse oldukça makul bir maliyet tablosu ortaya çıkmaktadır.
- Uygulamanın bir önemli artışı da optimal pH ve sıcaklık gibi biyokimyasal karakterizasyon çalışmalarını kolaylaştıran bir uygulama olmasıdır (Duman 2016).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Lakkazlar, bir medyatör varlığında veya yokluğunda çok çeşitli fenolik ve fenolik olmayan aromatik bileşiklerin oksidasyonunu katalize eden çok bakırlı enzimler olarak tanımlanmıştır. Lakkazlar çoğunlukla mantar ve bitkilerden izole edilmekle birlikte bakterilerden elde edilen lakkazlarla ilgili çok az çalışma bulunmaktadır. Bakteriye lakkazların, yüksek sıcaklıkta ve yüksek pH'ta stabil kalma gibi diğer kaynaklardan elde edilen lakkazlardan daha üstün özellikleri vardır. Ayrıca bakteriler lakkazları hücre dışı veya hücre içi olarak üretebilme yeteneğindedir. Bakteriye lakkazların hamur biyo-ağartma, biyoremediasyon, tekstil boyası renk giderimi, kirletici bozunması, biyosensörler vb. uygulamalarda kullanılabilceği belirlenmiştir. Bu nedenle, bu enzimlerin endüstriyel alanda etkin bir şekilde kullanılması ve uygulanması için kaynaklar, üretim koşulları, karakterizasyon, klonlama ve biyoteknolojik uygulamaları içeren kapsamlı bir bilgiye ihtiyaç vardır. Sonuç olarak lakkazların, fenolik ve fenolik olmayan bileşikleri oksitleyebilme özellikleri nedeniyle endüstride ve çevresel kirliliklerin giderilmesinde kullanılma avantajı, endüstriyel ve biyoteknolojik süreçlerde bu enzimlere olan talebi fazlasıyla artırmaktadır.

Wang *et al.* (2018) yaptıkları çalışmada ekstraselüler lakkazı, DEAE Sepharose ve SP-Sepharose ile iki ardışık iyon değişim kromatografisi ve Superdex 75 üzerinde afinite jel filtrasyonunu içeren üç aşamalı bir protokolle beyaz çürükçül mantar olan *Trametes F1635*'i fermantasyon et suyundan saflaştırmışlardır. Enzimin 64,8 kDa'lık moleküler kütleyle sahip monomerik bir protein olduğu ortaya çıkmıştır. Lakkaz enziminin ABTS substratı için $4.00 \cdot 10^4$ U/mg aktivite gösterdiği görülmüştür. Optimum pH'ın 2,6, optimum sıcaklığın ise 50°C olduğu belirlenmiştir. ABTS'ye yönelik K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 18,58 mM ve 1,35 mmol/dakika olarak tespit edilmiştir. Enzimin, erikrom siyah T (EBT), remazol parlak mavi R (RBBR), malakit yeşili (MG) ve erikrom siyah T (EBT) (%60'ın üzerinde) üstünde etkili renk giderme aktivitesi göstermiştir. Kloşurik asit (VA) ve asetosiringon (AS) boya dekompozisyonunda lakkaz için uygun medyatörler olduğu belirlenmiştir. Bu enzimin boya renk giderimi ve su arıtımı için büyük bir potansiyel sergilediğini rapor edilmiştir.

Kahem *et al.* (2017) yaptıkları çalışmada, yeni bir termofilik bakterinin izolasyonunu gerçekleştirmiş ve bu bakterilerin özelliklerini belirlemişlerdir. Organizmanın, 16S rRNA geninin filogenetik analiziyle *Anoxybacillus* cinsinin bir üyesi olduğu tespit edilmiştir. İzolat *Anoxybacillus sp.* olarak adlandırılmıştır. Lakkaz aktivitesiyle ilgili yapılan araştırmada, optimum sıcaklığın 90°C, optimum pH'ın 9,0 olduğu belirlenmiştir. Enzimin stabil sıcaklığının 80-100°C arasında olduğu tespit edilmiştir. Daha sonra *Anoxybacillus sp.*, *Escherichia coli*' e klonlanmış UARK-01 lakkazı (Anox_Lacc) elde edilmiş, bu rekombinant lakkazın yüksek oranlarda eksprese olduğu görülmüştür. Oluşturulan rekombinantın (Anox_Lacc), multicopper polifenol oksidoredüktaz lakkaz ailesinin (pfam02578 Cu-oksidad_4) bir üyesi olduğu saptanmıştır. Bu sayede, hem lignin kullanımını hem de hipertermoz alkali lakkaz üretimi *Anoxybacillus* cinsindeki bulgular tespit edilmiştir.

Safary *et al.* (2016) yaptıkları çalışmada, halo-termotolerant *Bacillus sp.*'den rekombinant lakkazın (rpCotA (SL-1)) ekspresyonunu belirlemişlerdir. Bunu *Escherichia coli*'ye aktarmayla gerçekleştirmişlerdir. rpCotA (SL-1) lakkazının indüklediği oksidasyon reaksiyonları için kinetik K_m and k_{cat} parametreleri, ABTS (2,2a-Azotino-bis (3-etilbenztiyazolin-6-sülfonik asit) substaratı için 46 MM ve $23s^{-1}$, ve SGZ(syringaldazine) için 19,6 MM ve $24s^{-1}$ bulunmuş, optimum sıcaklık 70°C olarak belirlenmiştir. İnhibitör olarak NaCl, NaN_3 , EDTA ve SDS'in farklı konsantrasyonlarda nispeten stabil oldukları görülmüştür.

Yanmış vd (2016) yaptıkları çalışmada Erzurum-Ilıca kaplıcalarından izole edilen *Anoxybacillus gonensis P39* (Gen Bankası No: FJ808725)'dan lakkaz enzimini, DEAE-selüloz ve Sephacryl S200 kolonunu kullanılarak 4,16 kat saflaştırmış ve 160 kDa molekül kütlesine sahip olduğunu belirlemişlerdir. V_{max} ve K_m değerleri sırasıyla 0,442 umol/dak.mg ve 0,077 mM olarak hesaplanmıştır. Optimum pH 5,0 ve optimum sıcaklık 60°C olarak bulunmuştur. Lakkazın yüksek sıcaklığa ve pH koşullarına karşı kararlı olduğu görülmüştür. Metal iyonlarının çoğunun, lakkaz aktivitesini arttırmasına karşın, Mn^{2+} , Cu^{2+} ve Fe^{2+} güçlü inhibitörler olduğu ortaya çıkmıştır. Bazı tekstil boyalarının uzaklaştırılması ve lakkazın Reaktif Siyah, Fuksin, Allura Kırmızısı ve Asit Kırmızı 37

boyalarını sırasıyla 22,1, 5,96, 1,34 ve %1,15 boya gideriminde bulunduğu görülmüştür. Sonuç olarak *A. gonensis P39*' un atık biyoteknolojisinde için başarıyla kullanılabileceği rapor edilmiştir.

Ai *et al.* (2015) yaptıkları çalışmada lakkaz enzimini beyaz bir rot mantarı *Trametes trogii*'den saflaştırmışlardır. Monomerik yapıdaki mavi lakkazın moleküler kütlelerini SDS-PAGE ile yaptıkları analiz sonucunda 64 kDa olarak hesaplanmıştır. Enzimin stabil pH aralığı 2,2 ile 4,5 arasında olduğu ve optimum sıcaklığının 70°C olduğu ve bu sıcaklıkta enzimin aktivitesini koruduğu ortaya çıkmıştır. Ayrıca enzimin 60°C'de 1,6 saatlik bir yarı ömre sahip olduğu bunun sonucunda yüksek termal stabilite gösterdiği ortaya çıkmıştır. Çalışmada çeşitli substratlar aracılığıyla fenolik olmayan azo boyalar lakkaz tarafından oksitlenmesi araştırılmıştır. Lakkazın ABTS ve şiringaldazin'e karşı yüksek afinite sergilediği rapor edilmiştir. Lakkazın oldukça metal toleranslı olduğu tespit edilmiştir.

Liu *et. all.* (2015) yaptıkları çalışmada katı fermentasyon yöntemiyle elde edilen *Coriolopsis trogiilaccase*'den lakkaz üretimini araştırmak amacıyla saflaştırma yöntemi olarak üç fazlı ayırma tekniğini (TPP) kullanmışlardır. Üçlü faz ayırma yönteminde ana faktörler olarak amonyum sülfat konsantrasyonu, t-bütanol konsantrasyonu, sıcaklık ve pH değerlerini optimize etmişlerdir. Üç fazlı ayırma yönteminin optimum şartları; amonyum sülfat konsantrasyonu %40, t-bütanol 1:1, sıcaklık 20°C, pH:5,0 olarak belirlenmiştir. Saflaştırma sonucu verim %75 olarak tespit edilmiştir. SDS-PAGE elektroforezi, saflaştırılmış proteinin 38 kDa'lık molekül kütlelerine sahip olduğu ve monomerik yapıda olduğu rapor edilmiştir.

Sharma1 *et al.* (2014) yaptıkları çalışmada *Bacillus tequilensis SN4* (SN4LAC)'dan yeni bir hücre dışı termo-alkali kararlı bir lakkaz saflaştırmışlardır. Elde edilen monomerik lakkazın moleküler kütlelerini 32 kDa olduğu tespit edilmiştir. Lakkazın, çok çeşitli fenolik ve fenolik olmayan substratlar varlığında aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Enzimin 2,6-dimetoksifenol substratı varlığında en yüksek aktivite gösterdiği olduğu görülmüştür. Lakkaz enziminin, sodyum azid, sistein, ditiyotreitol ve b-merkaptotanol gibi

inhibitörler tarafından inhibe olduğu tespit edilmiştir. SN4LAC'ın, 85°C'de optimum sıcaklığa sahip olduğu ve 70°C'de 24 saat boyunca %80'den fazla aktivitesini koruduğu, bu özellikler doğrultusunda yüksek derecede termostabil özellikte olduğu bulunmuştur. Enzimin 2,6-dimetoksifenol, ABTS, syringaldazin ve guaikol gibi substrat varlığında optimum pH aktivitesi sırasıyla 8,0, 5,5, 6,5 ve 8,0 olarak rapor edilmiştir. Enzim, 24 saat boyunca pH 9,0'da %75'ten fazla aktivitesini muhafaza ettiği için alkali stabil olarak tespit edilmiştir. Enzimin aktivitesi Cu^{2+} , Co^{2+} , SDS ve CTAB ile önemli ölçüde artarken, halojenürlerin, diğer metal iyonlarının ve yüzey aktif maddelerin çoğunda kararlı olduğu görülmüştür. Yüksek sıcaklık, pH, ağır metaller, halojenürler ve deterjanlar gibi ekstrem koşullarda SN4LAC'ın hücre dışı yapısı ve stabilitesi ile, biyoteknolojik ve endüstriyel uygulamalar için oldukça uygun bir aday olduğu rapor edilmiştir.

Çabuk vd (2014) yaptıkları çalışmada batık fermentasyon koşulları altında *Trametes versicolor* 2008001 suşu ile lakkaz üretimini araştırmışlardır. Üretilen lakkaz enzimi ile Box-Behnken metodu kullanılarak boyar madde dekolizasyonunun optimizasyonu amaçlanmıştır. Elde edilen ham lakkaz ile Box-Behnken yöntemi kullanılarak Reaktif Mavi 49' un renk giderimi için en uygun koşullar incelenmiştir. Reaktif Mavi 49 boyasında renk gideriminin %98 olduğunu belirlenmiştir. Renk giderim deneylerinin sonuçlarına göre, *Trametes versicolor* 2008001 ile üretilen lakkaz enzimi etkin bir şekilde enzimatik renk gideriminde kullanılabileceği görülmüştür.

Chen *et al.* (2013) yaptıkları çalışmada termofilik aktinomisetlerden olan, *Thermobifida fusca* BCRC 19214' ten lakkaz üretmişlerdir. Lakkazı, ultrafiltrasyon, Q-Sepharose FF ve Sephacryl™ S-200 kolon kromatografisi ile 4,64 kat saflaştırdıklarını belirtmişlerdir. SDS-PAGE ve Sephacryl™ S-200 jel filtrasyonu ile saflaştırılmış enzimin moleküler kütesinin sırasıyla 73,3 kDa ve 24,7 kDa olarak rapor edilmiştir. *T. fusca* BCRC 19214'den gelen lakkaz enziminin trimer yapıda olduğu belirlenmiştir. 3 saatlik 50°C'de muameleden sonra orijinal aktivitenin yaklaşık %95'inin kaldığı ve pH 10.0'da 24 saatlik inkübasyondan sonra orijinal aktivitenin yaklaşık %75'inin kaldığı tespit edilmiştir. Elde edilen lakkazın, özellikle 2,6-dimetilfenilalanin ve p-aminofenolü oksitleyerek renklendirdiği görülmüştür.

Kumar *et al.* (2011) yaptıkları çalışmada *PurifyPleurotus ostreatuslaccase*'a üç faz ayırma (TPP) metodunu kullanarak yeni bir yaklaşım geliştirilmiştir. TPP parametrelerinin lakkaz enziminin saflık ve verimi üzerine etkisini araştırmışlardır. Enzimin çalışması için en önemli üç değişkenin farklı miktarları ile etkileşimleri üzerinde çalışmalar yapmışlardır; amonyum sülfat doygunluğu (w/v) (%20-80), ham ekstraktın t-bütanol'e oranı (1: 1;1: 3) (v/v) ve sıcaklık (20-60°C) aralığına bakılmıştır. Kritik bileşenler için optimum değerleri: amonyum sülfat doygunluğu (w /v), 50-60%; ham ekstrenin t-bütanole oranı (hacim/hacim) 1.0:1.8; sıcaklık sırasıyla 42–45°C olarak belirlemişlerdir. Optimal koşullar altında, lakkaz verimini %184 ve saflaştırma katsayısını 7.22 olarak tespit edilmiştir (Kumar *et al.* 2011).

Rajeva *et al.* (2011) yaptıkları çalışmada lakkazın *Ganoderma sp. WR-1* fermentasyon karışımından saflaştırılması için üç fazlı ayırma (TPP) yöntemini kullanmışlardır. İki aşamalı bir prosedürde, amonyum sülfat konsantrasyonu, sulu faz-t-bütanol oranı, sıcaklık ve pH'nin fizyokimyasal parametreleri, lakkaz saflaştırılması için optimize edilmiştir. Aşama 1'de %20 amonyum sülfat ve 35°C'de ve pH 7,0'da 1:0,5 (hacim / hacim) sulu fazlı-t-butanol oranı ile lakkazın çoğunun alt sulu fazda kaldığı görülmüştür. Aşama 2' de ise ,%90 amonyum sülfat çöktürmesi ve diğer değişkenler adım 1 ile aynı tutularak, lakkaz ara fazda elde edilmiştir. İki aşamalı TPP ile, 13,2 kat saflaştırma ve %60 verim ile lakkaz enzimi saflaştırılmıştır.

Wang *et al.* (2010) yaptıkları çalışmada topraktan aldıkları numuneden *Bacillus sp.*WD23 suşunda lakkaz aktivitesini taramışlardır. Cu²⁺ içeren M9 besiyerinde syringaldazin'i oksitleyebilen bakteriyel suşları izole etmişlerdir. İzole edilen suş, fizyolojik ve biyokimyasal testlerin ve 16S rDNA dizi analizinin sonuçlarına göre *Bacillus subtilis* WD23 olarak tanımlamışlardır. WD23'ün, 20-55°C arasında değişen sıcaklıklarda büyüebildiği, optimum büyüme koşullarının 25°C ve pH 7,0 olduğu görülmüştür. Lakkazın sıcaklık yarı ömrü 80°C'de 2.5 saat ve pH yarı ömrü ise pH 9.0'da 15 dk olarak belirlenmiştir. Lakkazın Remazol parlak mavi R (RBBR), alizarin kırmızısı %50 – 90'ı oksitleyebildiği görülmüştür. Kongo kırmızısı, metil turuncu ve metil menekşe gibi boyaların gideriminde lakkazların kullanılabileceği rapor edilmiştir.

Koschorreck *et al.*(2008) yaptıkları çalışmada *Bacillus licheniformis*'ten lakkaz (kotA) genini, *Escherichia coli*'e klonlayarak ifadesini sağlamışlardır. Enzimin moleküler kütlesi ~65 kDa olarak bulunmuştur. Lakkaz substratları 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS), syringaldazin (SGZ) ve 2,6-dimetoksifenol (2,6-DMP) için K_m değerleri sırasıyla; $6.5 \pm 0.2 \mu M$, $4.3 \pm 0.2 \mu M$ ve $56,7 \pm 1.0 \mu M$ olarak bulunmuştur. 70°C ve 80°C'de 1 saatlik inkübasyondan sonra, sırasıyla %43 ve %8'lik bir kalan aktivite ölçülmüştür. Ayrıca, CotA'nın birkaç fenolik asit ve non-fenolik asitin oksidasyonu araştırılmıştır. CotA'nın, kumarik asit, sinnamik asit ve vanil asidi okside etmekte başarısız olduğu, siringik asit, 2,6-dimetoksi-1, 4-benzokuinona'yı ise oksitlediği tespit edilmiştir.

2.1. Tezin Amacı

Çevre ve atık biyoteknolojisi, canlı organizmalar ve onlardan elde edilen ürünler ile, birçoğu sağlık ve çevre sorunlarına neden olan atıkların arıtımına ve çevre kirliliğinin önlenmesine yönelik çalışmaları kapsamaktadır. Boyar maddeler başta olmak üzere endüstriyel birçok atığın yok edilmesinde kullanılan yöntemlerin başında, oksidaz grubu enzimlerin mavi-bakır proteinler olarak isimlendirilen gen ailesine ait olan lakkaz enziminin kullanımı gelmektedir. Lakkaz enzimlerinin endüstriyel anlamda kullanıldıkları ortamların birçok ekstrem şartlara (pH, sıcaklık, kimyasal içerik) sahip olmaları nedeniyle çok yüksek sıcaklık ve geniş pH aralığında varlığını sürdürebilen ekstremofilik mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin bu alanlarda çok daha etkin bir biçimde kullanılabilmesi açıktır. Bu tez kapsamında termotolerant özellikteki *E. faecium* A2 bakterisinin izolasyonu, identifikasyonu, bu bakteri suşundan lakkaz enziminin hızlı, basit ve genellikle tek adımda gerçekleştirilen TPP yöntemiyle saflaştırılması gerçekleştirildi. Saflaştırmanın ardından biyokimyasal karakterizasyonu yapılarak, enzimin boyarmadde dekolizasyondaki etkileri araştırıldı.

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Tez kapsamında kullanılan kimyasallar ve kitler

Çizelge 3.1. Tez kapsamında kullanılan kimyasallar ve kitler

KİMYASALLAR ve KİTLER	ŞİRKET
Agaroz	Sigma
Agaroz DNase-RNase-Protease free	Sigma
Amfisilin	Sigma
Amonyum sülfat	Sigma
DTNB	Sigma
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma
Distile Su	Thermo
DNA Marker	Thermo
DNTP	Thermo
Etidyum Bromür	Sigma
Etil Alkol	Sigma
Etilendiamintetraasetikasit (EDTA)	Sigma
Gliserol	Sigma
Hidroklorik Asit (HCl)	Sigma
Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	Sigma
Izopropil β-D-tiyogalaktozit (IPTG)	Sigma
İzopropanol	Sigma
Kalsiyum Klorür (CaCl ₂)	Sigma
Lizozim	Sigma
Magnezyum Klorür (MgCl ₂)	İnvitrogen

Çizelge 3.1. (devam)

N,N,N',N'-Tetrametilendiamin (TEMED) WizardR	Sigma
Plus Minipreps DNA Purification Systems (Plazmit izolasyon kiti)	Promega
WizardR Plus Minipreps DNA Purification Kit (DNA İzolasyon Kiti)	Promega
RNaz A	Sigma

3.1.2. Tez kapsamında kullanılan materyal ve cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan ekipmanlar Çizelge 3.2'te verilmiştir.

Çizelge 3.2. Tez kapsamında kullanılan materyal ve cihazlar

MATERYEL ve CİHAZ	MARKASI
Hassas terazi	Ohaus Pioneer
Çalkalayıcı İnkübatör	ZHWY – 2102C
Spektrofotometre	Beckman coulter
Santrifüj	Hettich
Buzdolabı (+4°C)	Vestel
Kuru Hava Sterilizatörü	Telstar Bio II-A
Otoklav	HMC Hirayama
Su Banyosu	PolyScience
Mikroskop	Leica
Jel Görüntüleme Cihazı	Quantum Vilber Courmat

Çizelge 3.2. (devam)

Su Banyosu	Memmert
Çoklu Blok Isıtıcı	Lab-Line
Dijital Isıtıcı	VWR
Etüv	Binder
PCR Cihazı	SensoQuest
Manyetik Karıştırıcı	Heidolph
pH Metre	Mettler Toledo
Vorteks	Fisons
Mini Santrifüj	Hangzhou Allheng
SDS-PAGE Elektroforez Cihazı	Bio-rad
Agaroz Jel Elektroforez cihazı	Thermo EC
Çalkalayıcı İnkübatör (37 ⁰ C)	Edmund Bühler Gmbhl
Mikrodalga Fırın	Beko
Saf Su Cihazı	MP Minipure
Çeker Ocak	TÜV-SÜD
Deep- Freeze (-86°C)	Glacier

3.1.3. Tez Kapsamında yapılan deneylerde kullanılan çözeltilerin hazırlanışı

Tez kapsamında kullanılan çözeltiler, hazırlanış şekilleri ve kullanıldıkları yerler aşağıda verilmiştir.

3.1.3.a. Bakteri izolasyonu için kullanılan çözeltiler

%0,9'luk Fizyolojik Su Çözeltisi; 9 g NaCl 1 L didistile su içerisinde çözüldü ve 121°C 15 dakika otoklavlandı.

3.1.3.b. Bakterilerin besiyerleri

LB Broth

20 g LB Broth (Sigma) tartılarak, 1 L saf su içerisinde çözüldü. pH'sı 7,4'e ayarlandıktan sonra otoklavlanarak steril edildi. Sıvı besiyeri oda ısısında bekletildi.

LB Agar

35 g LB Agar (Sigma) tartılarak, 1 L saf su içerisinde çözüldü. pH'sı 7,4'e ayarlandıktan sonra otoklavlanarak steril edildi. 45-50°C' ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere döküldü ve katılaşmaya bırakıldı.

TSB (Tryptone Soy Broth)

17 g/L Tripton, 3 g/L soya pepton, 5 g/L, NaCl₂, 2,5 g/L dipotasyum hidrojen fosfat, 2,5 g/L dekstroz içerikli hazır besiyerinden (LabM) 30 g tartılıp, 1 L didistile suda çözüldü ve 121°C 15 dakika otoklavlandı.

TSA (Tryptone Soy Agar)

15 gr/L tripton, 5gr/L soya pepton, 5gr/L NaCl₂, 12gr/L agar içerikli hazır besiyerinden (LabM) tartılıp 1 L didistile suda çözüldü ve 121°C 15 dakika otoklavlandı.

Stok Besiyeri

30 g LB Broth karışımına, 180 mL gliserol eklendikten sonra son hacim saf su ile 1 L'ye tamamlandı. Magnetik karıştırıcıda karıştırılan besiyeri, otoklavda steril edildi. Steril 2 mL'lik stok tüplerine konularak hazırlandı.

Lakkaz Sıvı Besiyeri

17 g/L Tripton, 3 g/L soya pepton, 5 g/L NaCl₂, 2,5 g/L K₂HO₄P*3H₂O, 2,5 g/L dekstroz içerikli hazır besiyerinden (LabM) 3 g tartılıp, içerisine 0,5 mM CuSO₄'dan 0,1 g eklendi ve 1 L didistile suda çözüldü. 121°C 15 dakika otoklavlandı.

3.1.3.c. Bakteri izolatlarının morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesinde kullanılan çözelti ve tamponlar

Gram reaksiyon testi için:%3'lük KOH çözeltisi; 6 g KOH 200 mL steril didistile su içerisinde çözüldü.

Katalaz testi için: %7'lik H₂O₂ çözeltisi; 7 mL H₂O₂'in hacmi, steril didistile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.d. Bakteri izolatlarının moleküler analizi için kullanılan çözelti ve tamponlar

EDTA Tamponu (50mM pH:8,0); 1.46 g EDTA 90 mL didistile su içerisinde çözüldü, 1 N HCl ve 1 N NaOH ile pH'sı 8,0'e ayarlandı. Daha sonra tamponun son hacmi 100 mL olacak şekilde didistile su ile tamamlandı.

%70'lik EtOH; 70 mL EtOH 30 mL didistile su ile son hacim 100 mL olacak şekilde tamamlandı.

1X TAE Tamponu: 100 ml 10X TAE'den alınıp, hacmi 1000 mL'ye tamamlandı.

Dimetil sülfoksit (DMSO): %100'lük DMSO (Sigma) 2ml'lik ependorf tüplere aktarılarak, kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

CaCl₂ Solüsyonu (100mM); 1,11 g CaCl₂, didistile su içinde çözdürüldü, ağzı pamukla kapatılarak otoklavlandı ve buzdolabında +4°C'de kullanılıncaya kadar muhafaza edildi.

Amfisilin Solüsyonu; 20 mg/mL olacak şekilde steril didistile su ile hazırlandı ve 0,22 µm çaplı milipor filtreden geçirilerek steril edildi. Steril edilen çözelti, kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

X-Gal Solüsyonu; 40 mg/mL olacak şekilde hazırlanan çözelti, ışık almayacak şekilde -20°C'de kullanılıncaya kadar muhafaza edildi.

IPTG Solüsyonu; 23,8 mg/mL olacak şekilde steril didistile su ile hazırlandı ve 0,22 µm çaplı milipor filtreden geçirildi. Steril edilen çözelti -20°C'de kullanılıncaya kadar muhafaza edildi.

3.1.3.e. Enzim aktivite tayini için kullanılan çözelti ve tamponlar

ABTS Çözeltisi (0,5 mM);0,014 g ABTS 50 mL didistile su içerisinde çözüldü.

Sodyum Asetat Tamponu (1mM pH:5,0);0,04 g sodyum asetat, 90 mL didistile su içerisinde çözüldü ve 10M NaOH ve HCl ile pH'sı 5,0'a ayarlandı sonrasında tamponun son hacmi 500 mL olacak şekilde didistile su ile tamamlandı.

3.1.3.f. Protein analizi için kullanılan çözelti ve tamponlar

Bradford (Commassie Blue) Çözeltisi; 0,1 g Commassie Brilliant Blue G-250 tartılarak, balon joje içerisinde 50 mL %95'lik EtOH ile çözüldü. Daha sonra bu çözeltiliye, 100 mL %95'lik fosforik asit eklendi ve çözeltinin son hacmi 1000 mL olacak şekilde didistile su ile tamamlandı. Çözelti, karanlık ortamda hazırlandı ve kullanılıncaya kadar oda sıcaklığında muhafaza edildi.

3.1.3.g. SDS-PAGE için kullanılan çözelti ve tamponlar

Tris-HCl (1M pH:8,8); 12,1 g Tris 90 mL didistile su içerisinde çözüldü ve 1 M HCl ile pH'sı 8,8'e ayarlandı daha sonra tamponun son hacmi 100 mL olacak şekilde didistile su ile tamamlandı.

Tris-HCl (1M pH:6,8); 12,1 g Tris 90 mL didistile su içerisinde çözüldü ve 1 M HCl ile pH'sı 6,8'e ayarlandı daha sonra tamponun son hacmi 100 mL olacak şekilde didistile su ile tamamlandı.

Akrilamid - Bisakrilamid Çözeltisi(%30-%0,8); 6 g akrilamid ve 0,16 g bisakrilamid tartılarak 13,84 mL didistile su çözüldü.

SDS Çözeltisi (%10); 0,5 g sodyum dodesil sülfat tartılarak, 4,5 mL didistile suda çözüldü.

APS Çözeltisi (%10); 0,5 g amonyum persülfat tartılarak, 4,5 mL didistile suda çözüldü.

Yürütme Tamponu; 3 g Tris, 14,4 g glisin tartıldı ve üzerine 10 mL %10'luk SDS eklenerek son hacim 1000 mL'ye tamamlandı.

Numune Tamponu; 650 μ L Tris-HCl (1M pH:6,8), 100 μ L %10'luk SDS, 1 L gliserin ve 1 L %1'lik Bromfenol mavisi 50 mL'lik bir erlen içerisinde pipetlendi ve çözeltinin son hacmi 10 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan tamponun içerisine 0,5 L β -Merkaptoetanol pipetlendi ve kullanıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

3.1.3.h. Gümüş boyama için kullanılan çözelti ve tamponlar

Tespit Çözeltisi; 60 mL didistile su, 30 mL %96'lık EtOH ve 10 mL asetik asit 250 mL'lik bir erlen içerisinde karıştırılarak hazırlandı.

Redüksiyon Çözeltisi; 80 mL didistile su 45 mL EtOH ile karıştırıldı. Hazırlanan bu karışıma 4,8 g sodyum asetat eklendi ve asetik asit ile pH'sı 6,0 olacak şekilde ayarlandı. 0,15 g sodyum tiyosülfat ve 4 mL glutaraldehit eklenip, çözeltinin son hacmi 150 mL olacak şekilde didistile su ile tamamlandı.

Boyama Çözeltisi; 50 mL didistile su, 20 μ L formaldehit ve 0,1 g gümüş nitrat 100 mL'lik bir beher içerisinde karanlık ortamda karıştırılarak hazırlandı.

Yıkama 1 Çözeltisi; 3,75 g sodyum karbonat, 270 mL didistile su ile karıştırıldı ve üzerine 120 μ L formaldehit ilave edilerek hazırlandı.

Yıkama 2 Çözeltisi; 1 mL gliserol ve 12,5 mL asetik asit karıştırıldı ve çözeltinin son hacmi 270 mL olacak şekilde didistile su ile tamamlandı.

3.1.3.i. Endüstriyel boya çözeltilerinin hazırlanışı

Endüstriyel boyalar (reaktif siyah 5, turuncu, asit kırmızı 27, asit siyah L, kongo kırmızı, metilen mavisi) 50 mg/L olacak şekilde 100 mL saf suda hazırlandı, her bir boya için bu işlem yapıldı. Önce 0,005 g boya tartıldı ve 100 mL saf su içerisinde çözüldü.

3.2. Yöntem

3.2.1. Mikroorganizmaların izolasyonu, fenotipik ve genotipik karakterizasyonu

3.2.1.a. Örneklerin toplanması ve mikroorganizma izolasyonu

Çalışmada kullanılan sıcak su kaynağı Ağrı/Diyadin kaplıcasından temin edilerek aseptik koşullarda laboratuvar ortamına getirildi. Termofilik bakteri izolasyonu için alınan su örneğinden 100 mL alınarak, erlene konuldu. Üzerine TSB besiyeri ilave edilerek 47,5°C'deki ayarlı çalkalamalı inkübatörde 24 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, 47,5°C'de büyüyen bakterilerin izolasyonu ve identifikasyonu için hazırlanan %0,9'luk serum fizyolojik su kullanılarak, bir seri (10^{-1} – 10^{-7}) dilüsyon tüpü hazırlandı. Dilüe edilen bakteriler, katı besi yerine (TSA) yayma ekim yöntemiyle inoküle edildi. İnoküle edilen petriyeler, 47,5°C'ye ayarlı etüvde 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda gelişen çok sayıdaki koloniden hücre ve koloni morfolojisi bakımından farklı olduğu düşünülen izolatlar seçildi. Seçilen izolatlar katı besiyerlerine (TSA), 4 faz çizgi ekim yöntemi kullanılarak çizildi ve 47,5°C'de inkübasyona bırakıldı. Bu işlem petrilere tek koloni düşene kadar tekrarlandı (Adıgüzel 2006).

3.2.1.b. İzolatların Konvensiyonel Özelliklerinin Belirlenmesi

a. Seçilen İzolatların Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

İzole edilen bakterilerin morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla stoktan alınan izolatlar 3-4 faz çizgi ekimi ile TSA besiyerine aktarıldı ve 47,5°C'de 1 gece inkübe edildi. Gelişen kolonilerden alınan örnekler mikroskopta incelendi. Bu sayede bakterilerin morfolojik özellikleri tespit edildi.

b. Gram reaksiyon testi

Bu test ile bakteri hücrelerinin duvarlarındaki farklılıklar sayesinde bakteri gram özellikleri tespit edilmektedir. Bu amaçla 2 farklı yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden birincisi; temiz bir lam üzerinde, taze bakteri kültüründen hazırlanan smear, kristal violet ile 1 dakika boyanır. Boyanın hücreye etki etmesiyle hem Gram(+) hem de Gram(-) bakteriler mor renkli boyanır. Sürenin sonunda fazla boya, su ile uzaklaştırılır. Preparatın üzerine lügol eklenir, 1 dakika bekletilir. Lügol uygulanan preparat %96'lık etil alkol ile yıkanır. Alkol ile yıkama sonrası Gram(+) bakteriler peptidoglikan tabakalarının kalın olması nedeniyle kristal violet-lügol kompleksini bırakmaz ve mor renkli kalmaya devam ederken, Gram(-) bakterilerin dış membranları bozulur ve ince peptidoglikan tabakaları boyayı tutamadığı için renksizleşir. Yıkama sonrasında saf sudan geçirilen preparat, safranin ile 20 saniye boyanır. Boyama sonunda hafif su ile yıkanan preparat kurutularak, immersiyon objektifinde inceleme yapılır. Mor renk Gram(+), pembe-kırmızı renk Gram(-) olarak değerlendirilir (Harley and Prescott 2002). Bu metodlardan ikincisinde ise; lam üzerine damlatılan %3'lük potasyum hidroksit solüsyonu üzerine TSA'da geliştirilen 24-48 saatlik bakteri kültüründen alınan bir öze dolusu bakteri, KOH solüsyonu ile 5-10 saniye karıştırıldıktan sonra öze yukarıya doğru kaldırılır. Karışımda sakız gibi bir uzamanın olması KOH pozitif, olmaması ise KOH negatif olarak değerlendirildi (Adıgüzel 2006).

c. Katalaz testi

Elde edilen bakteri izolatının katalaz aktivitesine sahip olup olmadığı bu test ile belirlendi. Bu amaçla TSA'da geliştirilen 24-48 saatlik bakteri kültüründen bir öze dolusu alınarak lam üzerine konuldu ve üzerine bir damla %5'lik H₂O₂ damlatıldı. Kabarcık oluşumu katalaz pozitif; oluşmaması ise katalaz negatif olarak değerlendirildi (Harley and Prescott 2002).

d. Oksidaz testi

Oksidaz testi için %1 Tetra methyl-p-phenylendiamine dihydrochloride içeren kitdeki diskler kullanıldı. Bu diskler 1 damla steril saf su ile doyurulup, üzerine thyrptone agar besiyerinde geliştirilen 24-48 saatlik bakteri kültüründen bir öze dolusu eklendi. Bakteride sitokrom C proteini varsa, bu diskte kodlu olan substratıyla reaksiyona girerek, mavi- mor bir renk oluşumuna neden olur. Mavi-mor renk oluşması durumunda bakteri oksidaz pozitif; renk değişiminin görülmemesi durumunda, bakteri oksidaz negatif olarak değerlendirildi (Harley and Prescott 2002; Adıgüzel 2006; Acar 2009).

e. Glikozdan gaz üretim testi

Bu test için öncelikle 8 ml'lik glikoz içeren Nutrient Broth besiyeri hazırlandı ve içerisine durham tüpleri ters çevrilerek yerleştirildi. Ardından sterilizasyon işlemi gerçekleştirildi. Sterilizasyonun ardından deney tüplerine steril öze ile bakterilerin ekimi yapıldı. Tüpler 47,5°C'de 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda gaz üretim potansiyeli gözlemlendi. Gaz üreten bakteriler pozitif ve heterofermantatif, gaz üretmeyen bakteriler ise negatif ve homofermantatif olarak değerlendirildi (Holzapfel and Schillinger 1992; Stiles and Holzapfel 1997).

3.2.1.c. Bakteri izolatlarının moleküler analizi

a. 16S rRNA Gen Bölgesinin Klonlanması

1. Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA bir hücredeki ve/veya virüsteki bütün genleri içeren DNA'ya denir. Genomik DNA bütün hücrelerde bulunur ve bunlar genomik DNA analizleri için kullanılabilir. Genomik DNA izolasyonu için stokta muhafaza edilen bakteri izolatları TSA besiyerine steril öze yardımıyla çizgi ekim yöntemiyle ekimi yapılarak inokülasyon gerçekleştirildi ve 47,5°C'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. 24 saatlik inkübasyon

sonunda petrilere büyütülen bakteriler TSB sıvı besiyerine inoküle edildi. Bakteri inoküle edilen cam tüpler 47,5°C'lik çalkalayıcı inkübatörde, 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İkinci bir inkübasyonun ardından, genomik DNA izolasyonuna başlandı. İzolasyon için Promega wizard^R genomic DNA purification kit (A2360) protokolü uygulandı:

- 24 saat inkübasyona bırakılan 5 mL TSB besiyerlerinden, 2 mL'lik ependorflara aktarıldı ve 16000 rpm'de 2 dk çöktürüldü. Hücreler çöktürüldükten sonra, süpernatant uzaklaştırıldı. Daha sonra 50 mM EDTA'dan çökelti üzerine 480 µL eklendi. 10 mg/mL olan 120 µL lizozim ilave edilerek, 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Gram (-) bakterilerde hücre duvarı olmadığından, lizozim eklenmeden diğer aşamaya geçildi.
- İnkübasyon sonrası karışım 13000 rpm'de 2 dk santfirüj edilip, süpernatant uzaklaştırıldı. Üzerine 600 µL Nüklei Lizis eklendi ve hafifçe pipetajlandı.
- Ependorf 5 dk boyunca 80°C'lik çoklu blok ısıtıcıda inkübe edildikten sonra, oda sıcaklığına gelinceye kadar soğumaya bırakıldı ve üzerine 3 µL RNase A eklendi. Elde edilen karışımın tam çözünebilmesi için dikkatlice alt üst edildi ve 30 dk 37°C'de inkübe edildi.
- Oda sıcaklığında soğutulan karışıma, Protein Presipitasyon Solüsyonundan 200 µL pipetlendi ve 20 sn vorteks yapıldı.
- Ependorflar buzda 5 dk bekletildikten sonra, 13000 rpm'de 30 sn santfirüj edildi. Elde edilen süpernatant, içinde 600 µL izopropanol bulunan yeni ependorf içerisine alındı ve pellet oluşumu görünür olana kadar, ependorf dikkatlice alt üst edildi.
- Pellet oluşumu görünür olduktan sonra tüpler 13000 rpm'de 2 dk tekrar santfirüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Kurutma kağıdında, içindeki sıvı tamamen uzaklaşmaya kadar bekletildi.
- Üzerine -20'de bekletilen etanolden %70'lik etanol 600 µL eklendi ve 13000 rpm'de 2 dk santfirüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, 20 dk 37°C'de inkübe edildi.
- Ependorflara 100'er µl DNA Rehidrasyon solüsyonu eklenerek, 65°C'lik çoklu blok ısıtıcı içerisinde, 1 saat inkübe edildi.
- Hazır olan DNA içerikli ependorflar kullanılana kadar, +4°C'de muhafaza edildi.

2. rep-PCR Yöntemiyle Bakterilerin Gen Profillerinin Belirlenmesi

Bakteri DNA'sında sürekli tekrarlayan elementler bulunmaktadır. DNA içindeki değişken sayıda tekrarlayan ve ökaryotik organizmalarda "rep" olarak adlandırılan bu elementler, bakteri hücrelerinde merkezi korunmuş palindromik yapıya sahip sekanslardır (Kıran ve Osmanağaoğlu 2011). rep-PCR tiplendirme yönteminde, birçok bakteri genomunda çoklu kopya halinde bulunan, doğal olarak var olan ve yüksek oranda korunmuş, tekrarlayan DNA dizilerine spesifik olan primerler kullanılmaktadır. Bu primerlerin ve PCR'ın kullanımı REP, ERIC, BOX ve GTG₅ elemanları arasındaki, farklı genomik bölgelerin amplifikasyonu ile karakterizedir (Baltacı 2016). Tez çalışmasında sıcak su örneklerinden izole edilen bakteri izolatlarının gen profillerinin belirlenmesi için (GTG)₅-PCR yöntemi kullanıldı.

3. (GTG)₅-PCR yöntemiyle bakterilerin gen profillerinin belirlenmesi

Bakteri izolatlarının, genomik identifikasyonu için kullanılan yöntemlerden ilki (GTG)₅-PCR yöntemidir. Bu yöntem evrensel primer kullanılarak gerçekleştirildi.

Çizelge 3.3. (GTG)₅- PCR işleminde kullanılan reaktiflerin yoğunluk ve miktarları

Reaktif	Konsantrasyon	Kullanılan Miktar (µL)
10X Buffer	10X	5
Dntp	25 mM	1,25
BSA	-	1,25
Primer GTG₅	-	4
Taq DNA Polimeraz	5 unit/µL	0,3
DMSO	%99	2,5
ddH₂O	-	12,7
Kalıp DNA	70 ng/µL	3

(GTG)₅-PCR yönteminde ilk olarak, steril bir ependorf içerisine Çizelge 3.3'te verilen oranlar, örnek sayısına göre miktarları hesaplanarak pipetlendi. Daha sonra bu karışım mini santrifüjde spinlenerek, PCR tüplerine 27'şer μ L dağıtıldı. Üzerlerine her bir örnek için izole edilmiş kalıp DNA'dan, 3'er μ L eklenerek spin yapıldı ve PCR cihazına yerleştirildi. PCR cihazında, Çizelge 3.4'te verilen değerlere göre bir program oluşturuldu ve çalıştırıldı.

Çizelge 3.4. (GTG)₅- PCR programı, sıcaklık döngüsü

Aşamalar	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95	7	1
Denatürasyon	94	1	35
Bağlanma	53	1	35
Uzama	65	8	35
Son Uzama	65	16	1
Saklama	4	∞	

- **(GTG)₅-PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi**

(GTG)₅-PCR ürünlerinin elektroforezi için agaroz jel hazırlandı. Bunun için ilk olarak, 0,8 gr agaroz tartılarak, 80 mL konsantrasyonu %1 olacak şekilde 1X TAE tamponu içerisinde çözüldü. Çözünme işlemi, mikrodalga fırında 2 dk süreyle ısıtılarak gerçekleştirildi ve sıcaklığı biraz düşüne kadar beklenip içerisine 4mg/ml etidyum bromür eklendi. (Etidyum bromür mutajen olduğu için bu işlem çeker ocak içerisinde gerçekleştirildi). Agaroz jel tankının içerisi ve tüm kenarları, 1X TAE tamponu ile ıslatıldıktan sonra, tank elektroforeze, jel kenarlardan dökülmeyecek şekilde yerleştirildi. Hazırlanmış olan jel, tankın köşesinden kabarcık oluşmayacak şekilde dikkatlice döküldü. Daha sonra taraklar yerleştirilerek, polimerleşmeye bırakıldı. Jel polimerleştikten sonra, taraklar dikkatlice çıkartıldı. Jelin ilk kuyucuğuna, 10 kb'lık DNA markırından, diğer kuyucuklara, (GTG)₅-PCR ürünleri, 6X yükleme boyası ile onluk pipet ucu yardımıyla karıştırılarak, belli bir sırayla yüklendi. Elektroforez jel düzeneği, 90 volta ayarlanarak, örnekler 120 dk

yürütüldü. Jel üzerinde bulunan ve etidyum bromür ile boyanan DNA bantları, jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenip bilgisayar ortamında (Quantum Vilber Lournat Gel Documentation System), analiz edildi (Adıgüzel 2006).

4. 16S rRNA PCR İşlemi

16S rRNA gen bölgesi bakteri sistematigi açısından çok önemlidir ve evrimsel açıdan da korunmuş bölge olma özelliği taşımaktadır (Arslan 2017). 16S rRNA dizisini, PCR yöntemiyle çoğaltabilmek için, öncelikle kullanılacak primerlerin belirlenmesi gerekmektedir (Marul 2007). Her bir izolattan saflaştırılan genomik DNA'dan, 16S rRNA gen bölgesi, 27F ve 1492R primerleri kullanılarak, PCR yardımı ile çoğaltıldı (Yanmış ve Adıgüzel 2014).

Çizelge 3.5. 16S rRNA PCR işleminde kullanılan reaktiflerin yoğunluk ve miktarları

Reaktif	Konsantrasyon	Kullanılan Miktar (μL)
PCR Buffer	10X	3
Dntp	25 Mm	0,6
MgCl₂	25 Mm	1,8
27F	5 pmol	3
1492R	5 pmol	3
DMSO	-	1,2
ddH₂O	-	14,1
Kalıp DNA	100 ng	3

16S rRNA PCR hazırlık aşamaları şu şekildedir: İlk olarak steril bir ependorf içersine Çizelge 3.5'de verilen oranlar örnek sayısına göre miktarları hesaplanarak pipetlendi. Daha sonra bu karışım mini santrifüjde spinlenerek PCR tüplerine 27'şer μ L pipetlenerek dağıtıldı. Üzerlerine her bir örnek için izole edilmiş kalıp DNA'dan, 3'er μ L eklenerek spinlendi ve PCR cihazına yerleştirildi. PCR cihazında Çizelge 3.6'da verilen değerlere göre bir program oluşturuldu ve çalıştırıldı.

Çizelge 3.6. PCR Programı, sıcaklık döngüsü

Aşamalar	Sıcaklık (°C)	Süre(dk)	Döngü Sayısı
Ön Denatürason	94	2	1
Denatürasyon	94	1	36
Bağlanma	49	1	36
Uzama	72	2	36
Son Uzama	72	5	1
Saklama	4	∞	-

- **16S rRNA PCR ürünlerinin jel elektroforezi**

16S rRNA PCR tekniği ile çoğaltılan genomik DNA, agaroz jel elektroforez tekniği ile görüntülendi. Agaroz ile hazırlanan jelin, ilk kuyucuğuna 10 kb DNA markırı (New England Bio Labs, N0550S) konuldu. Diğer PCR ürünleri 6X yükleme boyası ile onluk pipet ucu yardımıyla karıştırılarak, belli bir sırayla yüklendi. Elektroforez jel düzeneği 80 volta ayarlanarak, örnekler 45 dk yürütüldü. Jel üzerinde bulunan ve etidyum bromür ile boyanan DNA bantları, jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenip bilgisayar ortamında (Quantum Vilber Lournat Gel Documentation System) analiz edildi (Adıgüzel 2006).

5. Kompetent Hücre Hazırlanması

Serbest DNA'yı içine alabilen bakterilere 'kompetent bakteri' adı denir. *Escherichia coli* hücreleri plazmid DNA'sı ile transformasyonu için sıklıkla kullanılan bir kompetent bakteridir. Kompetent hücre hazırlama prosedürü şu şekildedir:

- Kompetent hücre hazırlamak amaçlı stokta muhafaza edilen *E. coli* JM101 suşu LB katı besiyerine 3-4 faz ekim yapılarak ve 16-24 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı.
- Daha sonra bu besiyerinde oluşan tek bir koloni, öze yardımıyla LB Broth sıvı besi yerine inoküle edildi ve bir gece 37°C'de çalkalamalı inkübatörde büyümeye bırakıldı.

- 30 mL'lik LB Broth sıvı besiyerine inoküle edilmesi gereken hücre miktarını, mililitre cinsinden hesaplamak amacıyla 300 μ L kültür 2700 μ L su ile seyreltip spektrofotometede 600 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. Çıkan değer, seyreltme oranı olan 10 ile çarpıldı ve $3/zX10$ formülü kullanılarak elde edilen sonuca göre ön kültürden 30 mL'lik besiyerine steril pipet yardımıyla inoküle edilip, 37°C'de 60-90 dk 150 rpm'de inkübasyona bırakıldı.
- Yaklaşık 40 dk sonrasında kültürden örnek 3 kat seyreltilerek 600 nm'de 0,044-0,055 değerine ulaşınca dek belirli zaman aralıklarında ölçüm yapıldı.
- Uygun değere ulaşan kültürden steril tüpler içerisine 8'er mL eklendi ve kültür içerisindeki hücreler 4400 rpm'de 7 dk çöktürülüp süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı.
- Çökelti üzerine 10 mL soğuk CaCl₂ (100 mM) pipetlendi ve 30-40 dk buzda bekletildi.
- Süre sonunda +4°C'de 4400 rpm'de 10 dk süreyle santrifüjle çöktürüldü ve süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra üzerine 2 mL CaCl₂ (100 mM) eklenip +4°C'de bir gece bekletildi.

6. Ligasyon işlemi

Çizelge 3.7. Ligasyon işleminde kullanılan reaktiflerin yoğunluk ve miktarları

Reaktif	Kullanılan Miktar (μ L)
Ligasyon Buffer	5
PCR Ürünü	3
Vektör	1
T ₄ DNA Ligaz	1

0,2 mL'lik steril tüplerde Çizelge 3.7'de verilen oranlar örnek sayısına göre miktarları hesaplanarak pipetlendi. Daha sonra bu karışım mini santrifüjde spinlenerek, PCR cihazında 16°C'de 13-15 saat bekletildikten sonra, kullanılmaya kadar +4°C'de muhafaza edildi.

7. Transformasyon işlemi

Klonlama işleminde vektörün bakteri hücrelerine transformasyonu için yapılan işlemler şöyledir:

- Önceden hazırlanıp bir gece +4°C’de bekletilen kompetent hücrelerden 200’er μL örnek sayısı kadar ependorfların herbirine pipetlendi.
- Her bir ependorf tüplerinin üzerlerine 2,5 μL ligasyon ürünü eklenerek, 30 dk buzda bekletildi.
- Karışım ısı şokuna uğratılmak üzere buzdan dikkatlice çıkarılıp, 42°C’de sabit bir şekilde 2 dk tutuldu.
- Daha sonra üzerlerine LB Broth sıvı besiyerinden 200 μL konulup yaklaşık 1 saat 40 dk süre ile 37°C’lik etüvde inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon süresi sırasında, önceden otoklavlanmış amfisilinli katı besiyeri, oda ısısına geldikten sonra steril kabin içerisinde 40 X-Gal ve 40 μL IPTG pipetlenip petrilere döküldü.
- Hazırlanmış petrilere inkübasyon süresi dolan karışımdan, 150 μL eklendi ve drigalski özesi ile iyice yayılımı yapıldı.
- Yayma ekim yapılan petrilere 37°C’de 12-14 saat süreyle inkübasyona bırakıldı.

8. Kolonilerin Seçilmesi ve Sıvı Kültüre Alınması

37°C’ye ayarlanmış inkübasyona bırakılan petrilere, 14 saatin sonunda etüvden alınıp +4°C’ye bırakıldı ve bir gece burada bekletildi. Mavi beyaz koloni oluşumu gözlemlendikten sonra, beyaz koloniler steril bir pipet ucu ile alındı ve içinde 3 mL amfisilinli LB broth besiyeri bulunan tüplere inoküle edildikten sonra, 37°C’lik çalkalayıcıda bir gece inkübasyona bırakıldı.

9. Koloni PCR İçin rneklerin Hazırlanması ve PCR İşlemi

Amfisilinli LB broth sıvı besiyerinde bir gece inkübasyona bırakılan kültürden 4 µL alınıp, içinde 16 µL steril didistile su bulunan tüplere konularak seyreltildi. Seyreltme işleminin ardından ısı şokuna maruz bırakmak amacıyla önce su banyosuna alınarak, 10 dk kaynatıldı, hemen sonra 2 dk buzda bekletildi. Elde edilen bu karışım 12000 rpm’de 5 dk süre ile santifirüj edildi. Daha sonra Çizelge 3.8’de verilen reaktifler ve miktarlara göre PCR tüpleri hazırlandı.

Çizelge 3.8. Koloni PCR işleminde kullanılan reaktiflerin yoğunluk ve miktarları

Reaktif Tampon	Kullanılan Miktar (µL)
Dntp	0,6
MgCl₂	1,8
T7 Primer	2
SP6 Primer	2
DMSO	1,2
ddH₂O	16,1
Taq Polimeraz	0,3
Süpernatant	3

Hazırlanan tüpler PCR cihazına yerleştirilip Çizelge 3.9’da verilen program değerleri girilerek koloni PCR programı olarak kaydedildi ve çalıştırıldı.

Çizelge 3.9. Koloni PCR programı, sıcaklık döngüsü

Aşamalar	Sıcaklık(°C)	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	94	2dk	1
Denatürasyon	94	30 sn	35
Bağlanma	55	30 sn	35
Uzama	72	2 dk	35
Son Uzama	72	10 dk	1
Saklama	4	∞	-

PCR işlemi sonunda ürünlerinin elektroforezi için agaroz jel hazırlandı. EtBr ilaveli %1'lik agaroz jele, markır ve içerisinde istenen geni içeren (pozitif) içerisinde gen bulunmayan (negatif) kontroller yüklenerek, 90 voltta 1 saat süre ile yürütüldü. Görüntülenen jele bakılarak istenen aralıkta bant veren koloniler seçilerek plazmit izolasyonu için amfisilinli LB Broth'a inoküle edildi.

10. Plazmit İzolasyonu

Plazmit izolasyonu için Promega (A1330) plazmit izolasyon kitine ait protokol uygulandı. Buna göre;

- LB Broth besiyerinde bir gece inkübasyona bırakılan kültürden, 4 ml alınarak 11000 rpm'de santrifüj edilerek çöktürüldü ve süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı.
- Çöken pelletin üzerine Cell Resuspension Solüsyonu eklendi ve pipetajlanarak homojen hale getirildi.
- Homojen hale getirildikten sonra karışımın üzerine, 250 μ L Cell Lysis Solüsyonundan eklendi alt üst edilerek oda sıcaklığında 5 dk bekletildi.
- Süre sonunda üzerine Alkaline Protease Solüsyonundan 10 μ L ilave edildi ve oda sıcaklığında 5 dk beklemeye bırakıldı.

- Daha sonra üzerine 350 μL Nötralizasyon çözeltilisinden eklenip 13000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi.
- Kullanılacak olan süpernatanttan yaklaşık 650–750 μL alındı ve içerisinde kolon bulunan ependorf tüpüne aktarıldı ardından 13000 rpm’de 1 dk süre ile santrifüjlendi.
- Santrifüj sonunda kolonun üstte kalan kısmına 750 μL Wash Solution eklendi ve tekrar 13000 rpm’de 1 dk santrifüjlendi.
- Ardından kolonun üzerine 250 μL Wash Solüsyonundan eklendi ve 13000 rpm’de 2 dk santrifüjlendi.
- Alta geçen sıvı uzaklaştırılıp 1 dk 13000 rpm’de tekrar santrifüj edildikten sonra, kolon yeni bir ependorfa aktarıldı ve üzerine Nuclease-Free Water Solüsyonundan 100 μL eklendikten hemen sonra 13000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi.
- Son olarak kolon çıkarılıp uzaklaştırıldı ve tüpler ölçüm yapılincaya kadar -20°C ’de muhafaza edildi

11. Plazmit Konsantrasyonunun Belirlenmesi

- 2 μL plazmit, 998 μL didistile su ile karıştırılarak, spektrofotometrede OD_{260} nm dalga boyunda konsantrasyonu tespit edildi.
- $A_{260} \times 50$ (sabit katsayı) $\times 500$ (dilüsyon oranı) denklemine göre hesaplama yapılarak plazmit konsantrasyonunun 100-200 ng olması sağlandı.
- Uygun konsantrasyona sahip örneklerden 30-50 μL alınarak sekans analizi için Macrogen (Hollanda) firmasına gönderildi.

3.2.2. *E. faecium* A2’ den lakkaz enziminin saflaştırılması

3.2.2.a. Lakkaz enzimi üreten bakteri izolatlarının TSA ve TSB besiyerinde belirlenmesi

Stokta (-86°C) muhafaza edilen bakteri izolatları (A2,A4) stoktan çıkartılarak önceden hazırlanıp petrilere dökülen TSA katı agar besiyerlerine, steril öze yardımıyla 3-4 faz ekim yöntemiyle inoküle edilip canlandırıldı ve $47,5^{\circ}\text{C}$ ’de 24 saat süreyle inkübasyona

bırakıldı. Etüvde bir gece büyüyen bakteriler, sıvı besiyerine (TSB) 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda (24. Saat) bakterilerin besiyerlerinde büyüdüğü görüldü.

3.2.2.b. *E. faecium* A2 izolatından lakkaz üretimi

Lakkaz üreten bakteri izolatlarından TSB besiyerinde, en iyi aktivite veren *E. faecium* A2 suşu seçilerek bundan sonraki işlemlerde bu bakteri izolatı kullanıldı. *E. faecium* A2 suşu TSA katı besiyerine inoküle edilip 47,5°C’de 24 saat süreyle etüvde bir gece inkübasyona bırakıldı. Daha sonra bu suş TSB sıvı besiyerine alınıp 47,5°C’lik çalkalamalı inkübatörde bir gece üremeye bırakıldı. Sıvı besiyerinde büyüyen bakterilerin hücre miktarını mililitre cinsinden hesaplamak amacıyla 300 µl kültür 2700 µl su ile seyreltilip spektrofotometede 600 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. Çıkan değer seyreltme oranı olan 10 ile çarpıldı ve 3/zx10 formülü kullanılarak elde edilen sonuca göre ön kültürden 100 mL’lik hazırlanan TSB sıvı besiyerine 0,05 mM’lık bakır ilavesiyle hazırlanan lakkaz besiyerine bakteriler inoküle edildi.

3.2.2.c. Lakkaz enziminin aktivitesinin belirlenmesi

Lakkaz aktivitesi ABTS [2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit)]’nin substrat olarak kullanıldığı yöntemle göre belirlendi. Aktivite tayini için; 1 mL sodyum asetat tampon çözeltisi (1 mM pH:5,0), 1 mL substrat çözeltisi (ABTS; 0,5 mM) ve 0,5 mL enzim çözeltisi ilave edilerek 5 dakika süre ile 55°C’de inkübasyona bırakıldı. Kör olarak enzim çözeltisi yerine tampon çözeltisi eklenerek elde edilen reaksiyon karışımı kullanıldı. Ardından 420 nm’de spektrofotometrik olarak absorbans köre karşı ölçüldü. Dakikada 1 µmol ABTS’nin oksidasyonu için gerekli enzim miktarı bir ünite lakkaz aktivitesi (U/mL) olarak tanımlandı.

Lakkaz enzim aktivitesinin hesaplanması;

$$U/ mL = [(\Delta A / \Delta T)] [t / (\epsilon \cdot d \times V_0)] \cdot (10^6 \mu\text{mol} / 1 \text{ mol}) \times (1 \text{ L} / 1000 \text{ mL}) \times S.F$$

ΔA = Absorbans Değişikliği (420 nm);

t = İnkübasyon Süresi;

V_t = Toplam Hacim (ml);

ϵ = Substratın Ekstinksiyon Katsayısı [$\epsilon_{420} = 36000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}(\text{ABTS})$];

d = Ölçüm Küveti Işık Yolu (cm);

V_0 = Enzim Hacmi (mL);

S.F = Seyreltme Faktörü formülüne göre yapıldı.

3.2.2.d. Protein tayini

Tez kapsamında protein tayini için, Bradford yöntemi (Bradford 1976) yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem, Coomassie brilliant blue G-250 boyasının proteinlere bağlanarak, değişik renk şiddetinde mavi renkli çözeltiler ortaya koymasından yararlanılarak geliştirilmiştir. Mavi rengin oluşmasında proteinin aminoasit bileşimi etkin olmaktadır. Boyanın özellikle arjinin gibi bazik amino asitlere ve bazı aromatik amino asitlere bağlanma eğiliminde olduğu ortaya konulmuştur. Dolayısıyla bu yöntemde proteinin primer yapısının önemi vardır. Yöntemde boyaya bağlanmış protein 595 nm dalga boyunda en yüksek absorbansı verir. Yöntemin hassasiyeti 1-100 μg arasındadır.

Protein Miktarını Belirlemek Amacıyla Standart Grafiğin Hazırlanması;

➤ (1 :1 mg/ml) oranında protein içeren standart BSA (Bovin Serum Albumin) hazırlandı. Bu çözeltiden 10 ayrı tüpe sırayla 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 μL alınarak, üzerlerine didistile su ile ekleme yapılarak tüm tüplerin hacmi 0,1mL'ye tamamlandı.

➤ Tüpteki karışımlara 4,9 mL renklendirme reaktifi ilave edilip, vorteks yapıldı ve 10 dk beklemeye bırakıldı. Sürenin sonunda 595 nm'de 3 mL'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri bakıldı. Kör içeriği olarak 0,1 mL aynı tampon ve 4,9 mL renklendirme reaktifinden oluşan karışım kullanıldı. Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen μg protein değerleri kullanılarak standart grafik elde edildi.

➤ Protein tayini yapılan numuneler için aynı şekilde 0,1 mL enzim çözeltisi üzerine 4,9 mL boya çözeltisi eklendi ve 10 dk sonra 595 nm’de absorbans değerine bakıldı. Absorbans değeri ve standart grafiğın eğimi kullanılarak, protein miktarı hesaplandı.

3.2.2.e. Lakkaz enziminin üçlü faz ayırma (TPP) sistemi ile saflaştırılması

Lakkaz enziminin kısmi olarak saflaştırılması için ilk olarak 24°C’de 6000 rpm’de 25 dk santrifüj edildi. Süpernetantta elde edilen ham ekstrakt, üçlü faz saflaştırma sisteminde enzim kaynağı olarak kullanıldı.

TPP işlemi; ham ekstrakta önce tuz ve ardından organik çözügen eklendikten yaklaşık bir saat sonra, üç faz oluşması esasına dayanır. Lakkaz enziminin saflaştırılmasında kullanılan TPP sisteminde, organik çözügen olarak; t-bütanol, tuz olarak; amonyum sülfat tercih edildi.

a. TPP işlemi için uygun tuz yüzdesi ve organik çözügen oranının belirlenmesi

TPP işlemiyle saflaştırmada en iyi verimi elde edebilmek için uygun amonyum sülfat yüzdesi ve uygun t- bütanol oranı optimize edilmelidir. Bunun için aşağıdaki formüle göre %20, %30, %40, %50, %60, %70, %80 olmak üzere 7 farklı tuz oranı; (Ham enzim ekstraktı:t- bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) olmak üzere, 4 farklı alkol oranı kullanılarak deneme yapıldı. Her bir oran için alt ve ara faz dikkatlice ayrılıp aktivite tayini ve protein tayini yapıldı. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda saflaştırma katsayısına karşı, % verim grafikleri oluşturuldu. Çıkarılan grafikler incelenerek en uygun tuz yüzdesi ve organik çözügen miktarı belirlendi.

$$g(NH_4)_2SO_4 = \frac{1,77 \times V \times (S_2 - S_1)}{3,54 - S_2}$$

b. TPP işleminin için pH optimizasyonu

TPP işleminde uygun tuz yüzdesi ve organik çözügen oranı belirlenip ardından bu değerlere göre farklı pH değerlerinde işlemler tekrarlandı. Bunun için 2 mL ham özüt içine %70 oranında tuz eklenip karışımın pH değeri 9 farklı değerde ayarlandı (pH:4,0-12,0). pH değerleri, farklı her bir tüpün üzerine 2,0:2,0 oranında *t*-bütanol eklenerek 30 sn vortekslenip 37°C'de 1 saat beklemeye bırakıldı. Süre sonunda fazlar ayrıştırılarak aktivite tayini ve protein miktarı (bradford yöntemiyle) hesaplandı. Elde edilen sonuçlar kullanılarak saflaştırma katsayısına karşı % verim grafikleri oluşturuldu. Çıkarılan grafikler incelenerek TPP işlemi için en uygun pH belirlendi.

c. Lakkaz Enziminin TPP işlemi ile saflaştırılması

Lakkaz enzimi optimize edilen koşullarda kısmi saflaştırılması yapıldı. Bu işleme göre ilk olarak 2 mL ham ekstrakt bir tüpe alındı. Üzerine %70 oranında amonyum sülfat çöktürmesi yapılarak yavaşça vortekslenildi. Karışımın pH'sı 6,0'ya ayarlanıp üzerine, 4 mL *t*-bütanol eklendi ve 30 sn yavaşça vortekslenildi. Daha sonra karışım, 37°C'de 1 saat süreyle beklemeye bırakıldı. Süre sonunda üst organik faz, pastör pipetiyle alındı. Lakkazın saflaştırıldığı ara faz ayrıştırılıp, karakterizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere, +4'te muhafaza edildi.

3.2.3. *E. faecium* A2'den saflaştırılan lakkaz enziminin karakterizasyonu

3.2.3.a. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

TPP işleminde saflaştırılan alt ve ara faz örnekleri, enziminin saflığını kontrol etmek ve yaklaşık molekül kütlelerini belirlemek amacıyla SDS-PAGE analizi yapıldı (Laemmli 1970). Yürütme jeli için %10'luk, yığılma jeli için %4'lük akrilamid jel hazırlandı. Protein bantlarının görünür hale gelmesi için gümüş boyama metodu kullanıldı.

Elektroforez plakaları önce ardından alkol ile iyice yıkandı. İki cam plaka arada jel aralığı olacak biçimde kısıkaçlarla tutturuldu. Sabitleştirilen plakalar, içindeki jeli dışarı sızdırmayacak şekilde, jel hazırlama kabinine bırakıldı. SDS için daha önceden hazırlanan kimyasallar sırası ile cam beherde hazırlandı. Jel bileşenlerinden TEMED son aşamada eklendi. Hızlıca pipetaj yapıp toplam hacmi 4,5 mL olan ayırma jeli polimerleşme başlamadan önce hızlı bir şekilde hazırlanan plakalara dikkatlice döküldü. Jelin üst kısmı izopropil alkol ile düzgünleştirmek amacıyla eklenip, 20-30 dakika süre ile jelin polimerleşmesi beklendi. Jel polimerleştikten sonra üzerindeki alkol uzaklaştırıldı ve bir kurutma kağıdı ile jelden tamamen ayrılması sağlandı. Bu işlemde sonra yığılma jeli yine TEMED sonda eklenmek üzere hazırlanıp, ayırma jelinin üzerine döküldükten hemen sonra numune kuyularının oluşması için tarak dikkatlice yerleştirildi ve 20 dakika süre ile yükleme jeli polimerleşmeye bırakıldı.

Örneklerin hazırlanması: Elektroforeze yüklenecek örneklerden (Ham enzim ekstraktı, alt faz, ara faz) 30'şer µl, hazırlanan numune çözeltilisinden 30 µL ve gliserolden 30 µL alınarak bir ependorfta karıştırıldı. Hazırlanan örnekler kaynayan suda 5 dk süre ile bekletilerek proteinin denatüre edilmesi sağlandı.

Polimerleşen jel önce saf su, daha sonra da yürütme tamponuyla yıkandı ve jel plakaları birlikte elektroforez tankına yürütme tamponu dışarıya sızmayacak şekilde yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu ile dolduruldu, hazırlanan enzim örneklerinin karışımından 30 µL kuyucukları eklendi. İlk kuyucuğa markırdan 2,5 µl olacak şekilde yüklendi. Elektroforez tankı kapatılarak alt tarafı (+) anota, üst tarafı ise (-) katoda gelecek şekilde yerleştirildi. Önce 60 voltta 30 dakika yürütüldü ve akrilamid yoğunluğunun düşük olması ve pH 6,8 olduğundan örnekler ayırma jeline kadar hızlıca yürüdü. Ardından 120 volt akımda numuneler jelin alt ucuna gelinceye kadar yürütüldü (1 saat). Ayırma jelinde akrilamid yoğunluğunun fazla olması ve pH 8,8 olması nedeniyle proteinler yavaş yürüyerek molekül kütlesine göre ayrılacaklardır. Yürütme işlemi bittikten sonra akım durdurularak plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı.

Çizelge 3.10. Yürütme jeli bileşenleri

Kimyasallar	Ayırma Jeli	Yığıma Jeli
	Bileşenleri (mL)	Bileşenleri (mL)
ddH ₂ O	2,35	1,84
%30 Akrilamid/bisakrilamid	3,3	0,325
1,0 M Tris-HCl (pH 6,8)	-	0,31
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	3,75	-
% 1,5 PER	0,2	0,05
%5 TEMED	0,1	0,025
% 10 SDS	0,15	0,025

3.2.3.b. Örneklerin gümüş boyama yöntemiyle boyanması

Örnekler jel elektroforezi ile yürütüldükten sonra plakalar yürütme kabından çıkartıldı. Kaset açıldıktan sonra jel, cam bloklardan dikkatlice ayrılıp iç kısmı düz bir kap içerisine bırakıldı. Jel, gümüş boyama kabında hazırlanan tespit çözeltisiyle 30 dk boyunca karanlık ortamda çalkalandı. Sürenin sonunda tespit çözeltisi dökülüp, jel didistile su ile iki kez yıkandı. Yıkama işleminden hemen sonra redüksiyon çözeltisi kaba eklenerek, yine 30 dk boyunca karanlık ortamda çalkalamaya bırakıldı. Daha sonra redüksiyon çözeltisi dökülerek yıkama işlemine geçildi. Bu işlem didistile su ile 5'er dakika olmak üzere, üç kez tekrarlandı. Yıkama işlemlerinin yapıldığı sırada hazırlanan boyama çözeltisi yıkama işlemleri bittikten sonra kaba eklendi ve 20 dk çalkalamaya bırakıldı. Gümüş boyama çözeltisiyle muamele edilen jel bantlar belirginleşinceye kadar yıkama 1 çözeltisinde hafifçe çalkalandı. Jelde bantlar görünmeye başladığı an ve jel yıkama 2 çözeltisine aktarılarak boyama işlemi sonlandırıldı.

Çizelge 3.11. Gümüş boyamada kullanılan tespit çözeltisi bileşenleri

Tespit Çözeltisi	
Saf su	30 mL
Etanol	15 mL
Asetik Asit	5 mL

Çizelge 3.12. Gümüş boyamada kullanılan redüksiyon çözeltisi bileşenleri

Redüksiyon Çözeltisi	
Saf su	40 mL
Etanol	22,5 mL
Na-Asetat	2,4 g
Na-tiyosülfat	0,75 g
Glutaraldehit	2 mL

Çizelge 3.13. Gümüş boyamada kullanılan boyama çözeltisi bileşenleri

Boyama Çözeltisi	
Saf su	50 mL
Formaldehit	10 µL
AgNO₃	0,08 g

Çizelge 3.14. Gümüş boyamada kullanılan yıkama çözeltisi bileşenleri

Yıkama Çözeltisi-1	
Na-Karbonat	1,875 gr
Saf Su	135 mL
Formaldehit	60 µL

Çizelge 3.15. Gümüş boyamada kullanılan yıkama çözeltisi bileşenleri

Yıkama Çözeltisi-2	
Gliserin	500 µL
Asetik asit	6,25 Ml

3.2.3.c. *E. faecium* A2'den saflaştırılan lakkaz enzimi için optimum pH ve pH kararlılığının belirlenmesi

Lakkaz enziminin optimum pH'sını belirlemek amacıyla 0,5 mL enzim çözeltisi ile 0,1 M farklı pH değerlerindeki asetat tamponu (pH:3,0-5,0), fosfat tamponu (pH:6,0-7,0) ve Tris-HCl (pH:8,0-9,0) tamponu kullanıldı. Aktivite tayini yapılarak enzimin pH profilinin grafik çiziminde en yüksek aktivitenin gözlemlendiği pH değeri 100 olarak kabul edildi ve diğer sonuçlar ona göre bağlı aktivite (%) cinsinden birbiriyle kıyaslandı (Bozoğlu 2014).

Enzimin stabil olduğu pH' yı belirlemek amacıyla farklı pH değerlerindeki 3,0-5,0 için 0.1M' lık sodyum asetat tamponu, pH 6,0, 7,0 için 0.1 M'lık fosfat tamponu, pH 8,0 ve 9,0 için 0.1 M'lık Tris-HCl tamponu kullanıldı. Belirtilen pH' lardaki 2 mL tampon çözeltisine 0,5 mL enzim çözeltisi ilave edilerek oda sıcaklığında inkübe edildi. 30, 60, 90, 120, 150. dakikalarda aktivite ölçümü yapıldı. Her bir deneme, 3 kez tekrarlandı. Enzimin pH stabilitesi grafiğinin çiziminde, farklı pH değerlerinde, inkübasyondan

önceki aktivite miktarı 100 olarak kabul edilerek, inkübasyon sonrası elde edilen değerler kalan aktivite yüzdesi (%) olarak ifade edildi.

3.2.3.d. *E. faecium* A2'den saflaştırılan lakkaz enziminin optimum sıcaklığının ve sıcaklık kararlılığının belirlenmesi

Lakkaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla 0,5 mL enzim çözeltisi ile sodyum asetat (100 mM pH: 5,0) tamponunda hazırlanan ABTS çözeltisinin 2 mL'si karıştırıldı ve 20°C'den 90°C'ye kadar olan sıcaklık aralıklarında 10 dakika süreyle su banyosunda inkübasyona bırakıldı (Bozoğlu, 2014). Enzimin optimum sıcaklığını belirlemek için çizilen grafikte en yüksek aktivitenin gözlemlendiği sıcaklık değeri 100 olarak kabul edildi ve diğer sonuçlar ona göre bağıl aktivite (%) cinsinden birbiriyle kıyaslandı.

Enzimin sıcaklık kararlılığının belirlenmesi için; 2,5 mL enzim çözeltisi 20°C'den 90°C'ye kadar olan sıcaklık aralıklarında her bir sıcaklık için 15, 30, 45 ve 60 dk'lık inkübasyon sürelerinin sonunda aktivite tayini yapıldı. Enzim sıcaklık kararlılığını gösteren grafiğinin çiziminde, farklı sıcaklık değerlerinde inkübasyondan önceki aktivite miktarı 100 olarak kabul edilerek, inkübasyon sonrası elde edilen değerler kalan aktivite yüzdesi (%) olarak ifade edildi.

3.2.3.e. *E. faecium* A2'den saflaştırılan lakkaz enzimi için K_m ve V_{max} parametrelerinin belirlenmesi

Kinetik sabitlerinin (K_m ve V_{max}) değerlerini belirlemek amacıyla substrat çözeltisinden (ABTS) 500, 1000, 1500, 2000 ve 2500 μ L alındı ve her birinin toplam hacmi sodyum asetat tampon çözelti (0,5 M, pH:5,0) ile 2500 μ L'ye tamamlandı. Daha sonra 0,5 mL saf enzim ilave edilerek 5 dakika süre ile 55°C'de inkübe ettikten sonra spektrofotometrik olarak absorbans değişikliği belirlendi. Elde edilen değerlerle Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve bu grafikten yararlanılarak K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı.

3.2.3.f. *E. faecium* A2'den saflaştırılan lakkaz enziminin aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi

Bazı metal iyonlarının A2 lakkaz enzimi aktivitesi üzerine etkisini incelenmek amacıyla sabit substrat ve enzim konsantrasyonlarında; Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Li^{+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Ag^{+} , Cr^{2+} iyonları kullanıldı. 5 mM'lık stok metal iyonu solüsyonları sodyum asetat (100 mM, pH: 5,0) tamponu ile seyreltilerek 0,5, 1, 1,5 ve 2 mM'lık metal iyon solüsyonları elde edildi. Daha sonra üzerlerine 1 mL tampon ve 1 mL substrat çözeltisi, 0,5'er mL enzim çözeltisi ilave edildi. Kör olarak 0,5 mL enzim, 1 mL tampon ve 1 mL substrat çözeltisi kullanıldı. Metal iyonları içermeyen enzim çözeltisinin aktivite miktarı 100 olarak kabul edildi ve metal iyonu içeren örneklerin aktivitesi kalan aktivite olarak hesaplandı.

3.2.3.g. *E. faecium* A2'den saflaştırılan lakkaz enziminin aktivitesi üzerine bazı inhibitörlerin etkisinin belirlenmesi

Lakkaz aktivitesi üzerinde etkili olduğu bilinen lakkaz inhibitörleri, sodyum azid, sodyum florid, SDS ve metal şelatlayıcı EDTA'dır. Bu inhibitörlerin 2 mM ve 5 mM oranında çözeltileri hazırlandı. 0,5 mL enzim çözeltisi üzerine hazırlanan çözeltilerden 1 mL eklenip son olarak 1 mL substrat çözeltisi ilave edilerek bu maddelerin inhibe edici etkileri, enzimin inkübasyonundan sonra analiz edildi. 180 rpm'de 30 dk süreyle 55°C'lik çalkalayıcıda bekletildikten sonra aktivite ölçümü yapıldı. Kör olarak tampon çözeltisi yerine, her bir inhibitör çözeltisinin hazırlanmış farklı konsantrasyonlarından 1 mL eklenerek, tayin işleminde kullanıldı. Kontrol için de 0,5 mL enzim çözeltisi üzerine 1 mL sodyum asetat (100 mM pH: 5,0) tamponu ve 1 mL substrat çözeltisi kullanılarak aynı şartlarda inkübasyona bırakıldı. İnhibitör içermeyen çözeltinin aktivite miktarı 100 olarak kabul edildi ve inhibitör içeren örneklerin aktivitesi kalan aktivite olarak hesaplandı.

3.2.3.h. *E. faecium* A2'den saflaştırılan lakkaz enziminin aktivitesi üzerine bazı organik çözücülerin etkisinin belirlenmesi

Lakkaz enziminin organik çözücüler varlığında aktivitedeki değişimini incelemek için; etanol, metanol, izopropanol, *t*-bütanol, aseton, DMSO gibi organik çözücülerin %15 ve %50'lik konsantrasyonları kullanıldı. Her bir organik çözücü sodyum asetat (100 mM pH: 5,0) tamponu içinde hazırlandı. 0,5 mL enzim çözeltisi üzerine, 1 mL'lik farklı konsantrasyonlardaki organik çözücüler eklendi. Son olarak 1 mL'lik, substrat çözeltisi ilavesi yapılarak 2 saatlik inkübasyonun ardından aktivite tayini yapıldı. Kör olarak tampon çözeltisi yerine, her bir organik çözücünün hazırlanmış farklı yüzde konsantrasyonlarından 1 mL eklenerek, tayin işleminde kullanıldı. Kontrol için de 0,5 mL enzim çözeltisi üzerine 1 mL sodyum asetat (100 mM pH: 5,0) tamponu ve 1 mL substrat çözeltisi kullanılarak aynı şartlarda inkübasyona bırakıldı. Organik çözücü içermeyen enzim çözeltisinin aktivite miktarı 100 olarak kabul edildi ve organik çözücü içeren örneklerin aktivitesi kalan aktivite olarak hesaplandı (Bozoğlu, 2014).

3.2.3.i. *E. faecium* A2'den saflaştırılan lakkaz enziminin aktivitesi üzerine yüzey aktif maddelerinin ve okside edici ajanın etkisinin belirlenmesi

Yüzey aktif maddelerinden, Triton X-100, Tween-20, Tween-80 ve okside edici ajan H₂O₂ varlığında lakkaz enziminin aktivitesinde meydana gelen değişim incelendi. Bunun için her bir yüzey aktif maddesi için %1 ve %5 oranında çözeltiler hazırlandı. 0,5 mL enzim çözeltisi, 1 mL belirlenen konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerden ve 1 mL substrat çözeltisi ile karıştırıldı ve 30 dk 180 rpm hızındaki 55°C'lik çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında aktivite tayini yapıldı. Kör olarak tampon çözeltisi yerine, her bir yüzey aktif maddesinin hazırlanmış farklı yüzde konsantrasyonlarından 1 mL eklenerek, tayin işleminde kullanıldı. Kontrol için de 0,5 mL enzim çözeltisi üzerine 1 mL sodyum asetat (100 mM pH: 5,0) tamponu ve 1 mL substrat çözeltisi kullanılarak aynı şartlarda inkübasyona bırakıldı. Aynı koşullarda inkübe edilen örneğin aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve inkübasyon sonrası aktiviteler kalan aktivite olarak değerlendirildi.

3.2.3.i. *E. faecium* A2'den saflaştırılan lakkaz enziminin doğal substratlara olan özgünlüğünün belirlenmesi

Lakkaz enziminin doğal substratlara olan özgünlüğünün belirlenmesi için, ABTS (0,5 mM, $\epsilon=36000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), guaikol (5 mM, $\epsilon=12000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) 2-6 dimetoksifenol (5 mM, $\epsilon=14800 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) kullanıldı. 0,5 mL enzim çözeltisi ile 1 mL substrat çözeltisi ve 1 mL sodyum asetat çözeltisi karıştırıldı ve sırasıyla tüm substratlar için aktivite tayini yapıldı.

3.2.3.j. *E. faecium* A2'den saflaştırılan lakkaz enziminin endüstride kullanılan bazı boya lakkaz enzimi ile giderimi

Lakkaz enziminin endüstride kullanılan bazı boyalar üzerine etki edip etmediği araştırmak için reaktif siyah 5, metilen mavisi, turuncu, asit siyah L, kongo kırmızı, asit kırmızı 27 olmak üzere 6 farklı boya kullanıldı.

Her bir boya için kalibrasyon grafiği hazırlandı. Boyaların standart grafiği oluşturulmak üzere, 2-10 mM arasında değişen konsantrasyonlarda boya çözeltileri hazırlanarak her boyanın kendine özgü olan dalga boyunda absorbansları ölçüldü ve elde edilen değerlere göre standart grafiği oluşturuldu (Kutlu,2015). Ardından 2,5 mM konsantrasyondaki her bir stok boya çözeltisinden 0,5 mL alındı ve toplam hacim saf su ile 1 mL'ye tamamlandı. 0,5 mL enzim ve 1 mL substrat çözeltisinde küvete eklenerek her boya için ayrı ayrı belirtilen dalga boylarında absorbans ölçümü yapıldı. Kör olarak saf su kullanıldı. Oluşturulan reaksiyon ortamı 47,5°C'ye ayarlanıp 15, 30, 60, 90. dk'larda ortamdaki numune alınıp belirtilen dalga boylarında (reaktif siyah 5 için 597 nm, turuncu için 622 nm, asit kırmızı 27 için 520 nm ve asit siyah L için 620 nm, kongo kırmızı için 350 nm, metilen mavisi için 660 nm) absorbans ölçümleri yapıldı. Boya renklerinin yüzde giderimi aşağıdaki denkleme göre hesaplandı (Altındağ,2013).

%Boya Giderimi= $[(B_0-B_i)/B_0] \times 100$ uygulanarak bulunmuştur.

B₀: Boyanın başlangıç konsantrasyonu,

B_i: Giderim sonrası boya konsantrasyonu

3.2.3.k. Verilerin İstatistiksel Analiz

Verilerin değerlendirilmesinde GraphPad Prism 5 (GraphPad,La,Jolla,CA) Software 7,0 istatik programı kullanıldı. Bütün sonuçlarda mean=standart hata (SEM) değerleri analiz edildi.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Mikroorganizmaların izolasyonu, fenotipik ve genotipik karakterizasyonu

4.1.1. Mikroorganizmaların izolasyonu

Termofilik bakteri izolasyonu için su örneğinden alınan bakterilerin izolasyonu ve identifikasyonu için %0,9'luk serum fizyolojik su kullanılarak dilüe edilen bakteriler ($10^3 - 10^{-7}$), katı besiyerine (TSA) yayma ekim yöntemiyle inoküle edildi.



Şekil 4.1. %0,9'luk serum fizyolojik su kullanılarak hazırlanıp ($10^3 - 10^{-7}$) dilüe edilen bakteriler

Çalışma kapsamında termotolerant bakterilerinin izolasyonu için AŐRI/Diyadin kaplıcalarından temin edilen sıcak su kaynağı örneğinden izolasyon için toplam 2 adet bakteriyel izolat elde edildi ve stok kültürleri hazırlandı. Saf kültürleri elde edilen bakterilere ait petri görüntüleri Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2. Saf olarak elde edilen bakteri izolatları



Şekil 4.3. Lakkaz üretim şeması

1) TSA katı besiyeri 2) TSB Sıvı Besiyeri Ön Çoğalma Ortamı (8 mL) 3) Lakkaz üretim ortamı 48°C'de 24 saat (100 mL)(TSB+0,05 mM Cu²⁺ iyonu)

4.1.2. Konvansiyonel test sonuçları

Bakterilerin izolasyonu sonrasında elde edilen izolatların, çözültüsü ile belirlendi. Bu amaç doğrultusunda, bir öze dolusu bakteri bir damla KOH solüsyonu ile boş bir petride muamele edildi. İşlem sonucunda sakız gibi uzayanlar Gram (-) uzamayanlar ise Gram (+) olarak değerlendirildi. Yapılan analizler sonucunda izolatların tümünün Gram(+) olduğu gözlemlendi. Daha sonra izolatların biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla katalaz ve oksidaz testi yapıldı. Yapılan çalışmaların sonucunda izole edilen bakterilerde A4 izolatının katalaz ve oksidaz pozitif, A2 izolatının ise katalaz ve oksidaz negatif olduğu tespit edildi. Ayrıca test suşlarının hücre morfolojilerinin tespitine yönelik yapılan çalışmalar sonucunda; A2 izolatının kok, A4 izolatının ise çubuk hücre morfolojisine sahip olduğu gözlemlendi. Son olarak izolatların gaz üretim potansiyelleri araştırıldı. Gaz üreten bakteriler pozitif ve heterofermantatif, gaz üretmeyen bakteriler ise negatif ve homofermantatif olarak değerlendirildi (Çizelge 4.1). Yapılan testlerin sonuçlarına göre her iki izolattada gaz üretimi gözlemlenmemiştir.

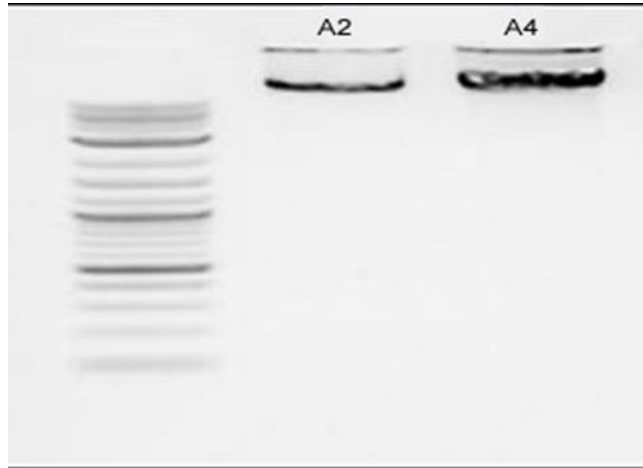
Çizelge 4.1. İzolatların morfolojik ve biyokimyasal özellikleri

Stok Kodu	Morfolojisi	Gram	Oksidaz	Katalaz	Gaz Üretim Potansiyeli
A2	Kok	+	-	-	-
A4	Çubuk	+	+	+	-

4.1.3. Seçilen izolatların moleküler yöntemlerle tanılarının yapılması

4.1.3.a. Genomik DNA izolasyonu

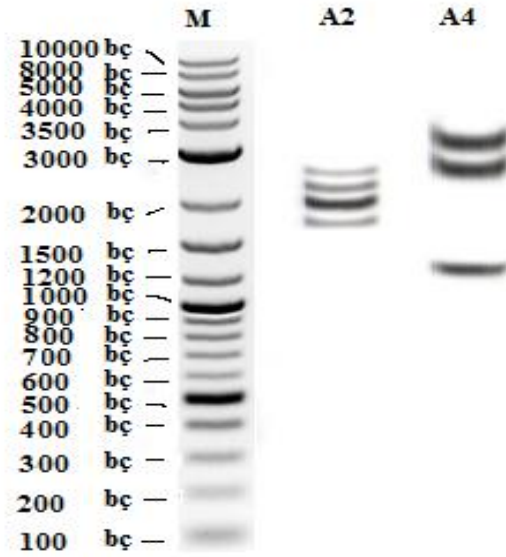
İzolatların moleküler tanılarının yapılabilmesi için öncelikle genomik DNA'ları izole edildi. Elde edilen DNA'lar agaroz jelinde yürütülerek jel dökümantasyon sisteminde görüntülendi (Şekil 4.3).

**Şekil 4.4.** İzolatlara ait genomik DNA'ların jel görüntüsü

4.1.3.b. Rep-PCR yöntemiyle bakterilerin gen profillerinin belirlenmesi

- (GTG)₅-PCR yöntemiyle bakterilerin gen profillerinin belirlenmesi

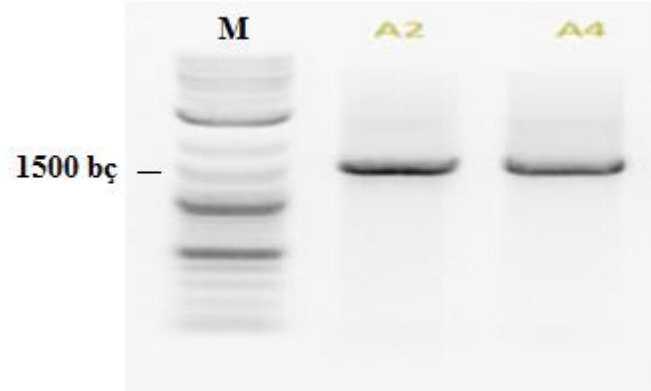
Tür ve tür altı seviyede mikroorganizmalar arasındaki farklılıkları ortaya koymak için (GTG)₅-PCR metodu yapıldı ve test izolatları arasındaki farklılıkları ortaya koymada oldukça başarılı olduğu gözlemlendi. Bu çalışma esnasında test izolatlarının; 100-750 bç arasında en az, 6100-6500 bç arasında ise en fazla 5 polimorfik bant varlığı gözlemlendi (Şekil 4.4).



Şekil 4.5. Çeşitli izolatlara ait (GTG)₅-PCR bant profilleri

4.1.3.c. 16S rRNA PCR işlemi

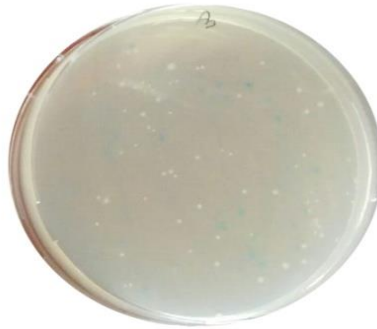
Bakterilerde bulunan 16S rRNA gen bölgesi, 27F ve 1492R primerleri kullanılarak amplifiye edildi. Daha sonra elde edilen PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve tüm izolatların 1500 bç büyüklüğünde tek bant verdiği gözlemlendi (Şekil 4.5).



Şekil 4.6. İzolatlara ait 16S rRNA jel görüntüsü

4.1.4.d. Transformasyon işlemi

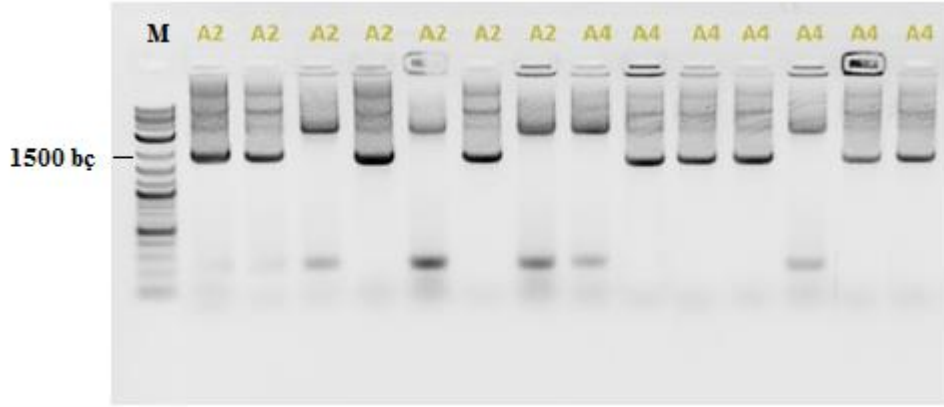
16S rRNA gen bölgesinin amplifiye edilmesinin ardından, uygun vektör sistemi kullanılarak klonlama aşamasına geçildi. Bu işlem için öncelikle ligasyon işlemi gerçekleştirildi ve sonrasında transformasyon yapıldı. Daha sonra rekombinant ürünleri ihtiva eden *E.coli* izolatları amfisilin, X-gal ve IPTG içeren LB Agar besiyeri bulunan petrilere yayıldı ve inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından mavi-beyaz tarama yapıldı. Mavi-beyaz tarama sonucunda, istenen geni içeren beyaz koloniler seçilerek çalışmaya devam edildi. Bakterilere ait mavi beyaz koloniler Şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.7. Mavi beyaz koloni örnek görüntüsü

4.1.5.e. Koloni PCR

İlgili gen bölgesini ihtiva eden en uygun koloninin tespiti amacıyla koloni PCR yapıldı. Elde edilen PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve jel dökümantasyon sisteminde analiz edildi (Şekil 4.7).



Şekil 4.8. Koloni Pcr görüntüsü

Sonuç olarak 1500 bç'de bant veren koloniler seçilerek işleme devam edildi (Şekil 4.7).

4.1.6. Plazmit izolasyonu

Agaroz jelde, 1500 bç'de bant veren koloniler seçilerek plazmit izolasyon aşamasına geçildi. Bunun için koloni PCR sonucunda pozitif sonuçlu koloniler petriden alınarak amfisilinli LB Broth besiyerine aktarıldı ve 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonunun ardından Promega firmasına ait izolasyon kiti (A1330) kullanılarak plazmitler izole edildi. Daha sonra plazmitin istenen gen bölgesini taşıyıp taşımadığı *EcoRI* kesim enzimi kullanılarak incelendi. Pozitif sonuç veren ve en uygun konsantrasyona sahip olan örnekler Macrogen (Hollanda) firmasına sekans analizi için gönderildi.

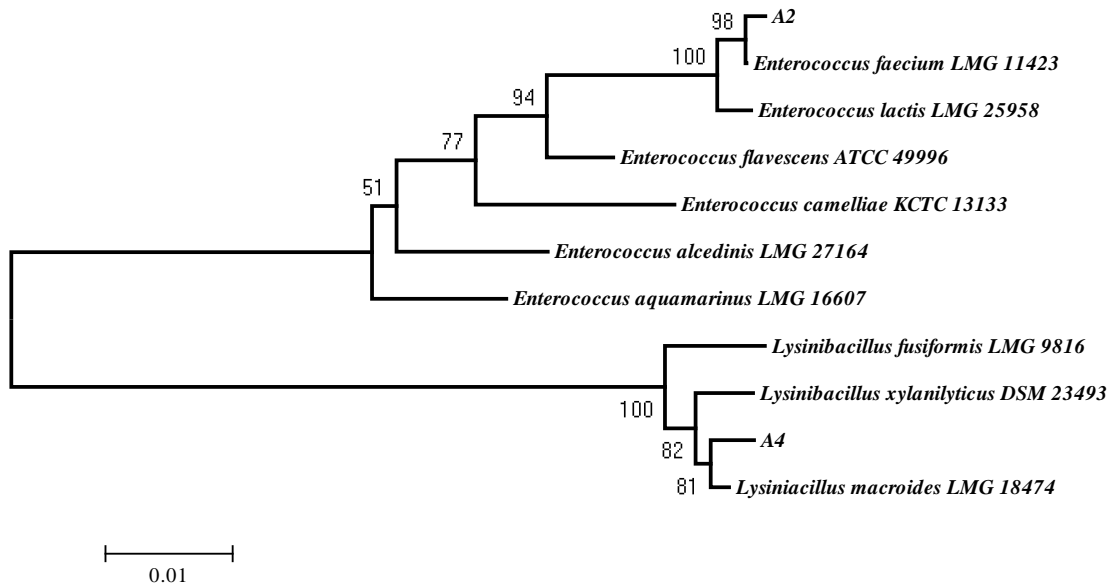
4.1.6.a. DNA dizi analiz sonuçları

Macrogen firmasından gelen 16S rRNA sekans dataları anlamlı hale getirildikten sonra Eztaxo'daki diziler ile Blast'lama çalışmasıyla mukayese edilerek % benzerlikleri belirlendi. Daha sonra elde edilen veriler Genbank'a sunularak numaralar alındı.

Çizelge 4.2. Dizi analizi sonucu belirlenen bakteriler ve benzerlik oranları

İzolat Kodu Numaraları	İzolat İsmi	Benzerlik Oranı	GenbankNo
A2	<i>Enterococcus faecium</i>	%99	MH424896
A4	<i>Lysinibacillus macroides</i>	%99	MH424894

Çalışma kapsamında elde edilen 16S rRNA verileri kullanılarak bakteriler arasındaki filogenetik ilişkiyi ortaya koymak amacıyla NJ (Neighbor-joining; Komşu katılımı-bağlama) yöntemi ile bir filogenetik ağaç çizildi (Kimura 1980; Saitou and Nei 1987) (Şekil 4.8).



Şekil 4.9. Filogenetik ağaç

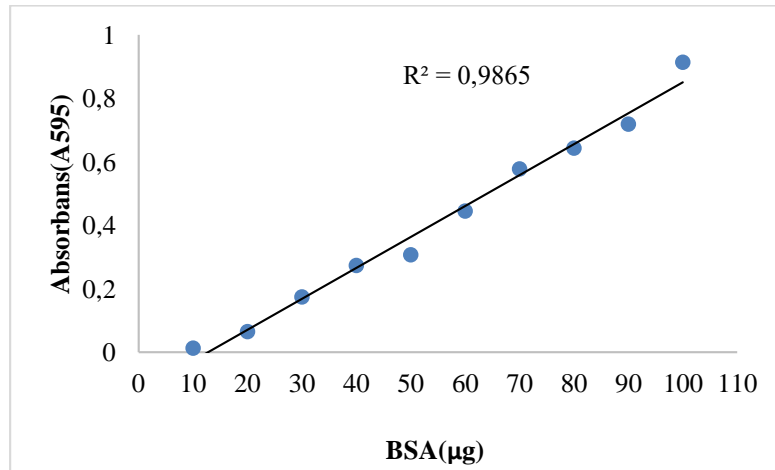
4.2. *E. faecium* A2'den lakkaz enziminin üretimi ve saflaştırılması

4.2.1. Lakkaz enzimi üreten bakteri izolatlarının TSB (Sıvı) besiyerinde belirlenmesi

Sıcak su kaynaklarından izole edilen bakteriler lakkaz üretimi için optimize edilen TSB+Cu²⁺ besiyerine inoküle edilip, 47,5°C'de yaklaşık 4 günlük süreyle inkübasyona bırakıldı. Her 24 saatte bir lakkaz aktivitesine bakıldı. Yapılan incelemeler sonucunda, A2 ve A4 izolatlarının her ikisinde de lakkaz aktivitesi belirlenmiştir. En yüksek aktiviteye sahip A2 izolatıyla yola devam edildi.

4.2.2. Protein tayini için kullanılan standart grafik

Tez Kapsamında elde edilen enzim çözeltilerindeki protein tayini Bradford yöntemiyle yapıldı. Bunun için standart grafik oluşturuldu.



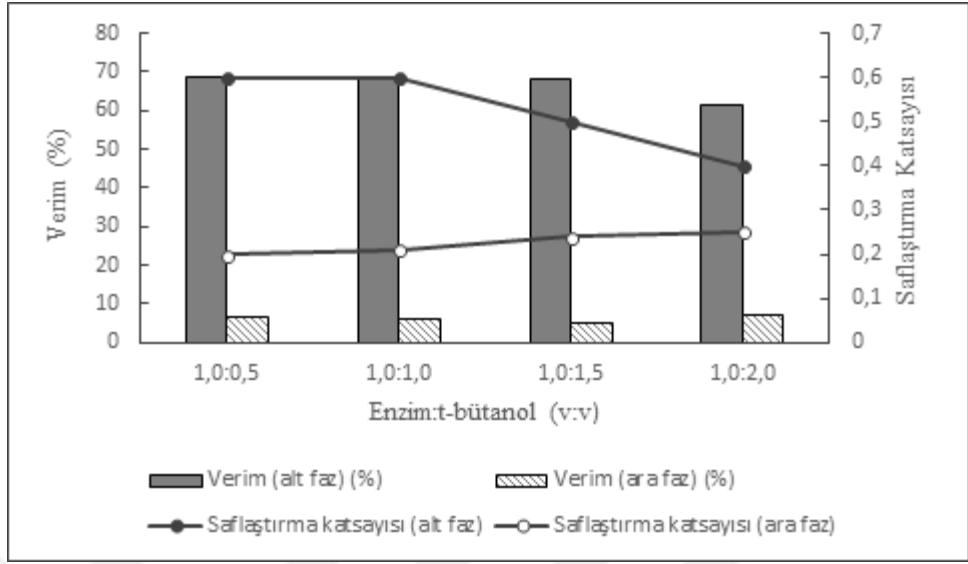
Şekil 4.10. Protein tayininde kullanılan standart grafik

4.2.3. *E. faecium* A2'den lakkaz enziminin üçlü faz ayırma (TPP) sistemi ile saflaştırılması

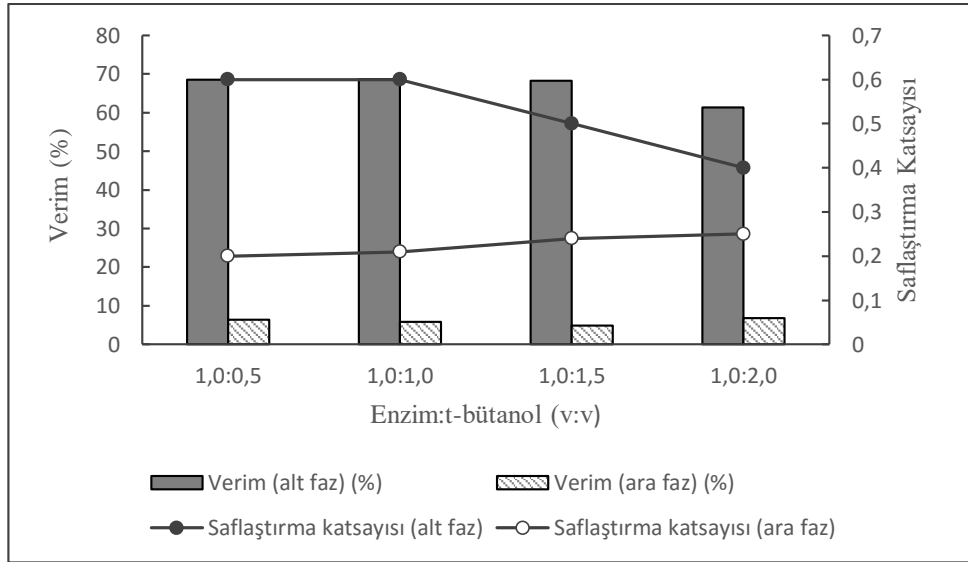
Üçlü faz ayırma sisteminde (TPP) lakkaz enziminin iyi bir verimle saflaştırılabilmesi için, tuz konsantrasyonu, enzim miktarının organik çözügene oranı ve pH gibi sistemi etkileyen temel parametrelerin optimizasyonu gereklidir. Bu sebeple tez kapsamında farklı ham enzim çözültisi organik çözügen oranları, farklı tuz konsantrasyonları ve farklı pH'ların saflaştırma katsayısı ve aktivitenin geri kazanımı üzerine etkileri incelenmiştir.

TPP sistemlerinde proteinleri ara yüzeyde etkin bir şekilde toplayabilmek için amonyum sülfat ve t-bütanol arasındaki ilişkiden yararlanılır. Proteinlerin salting-out etkinliği sülfat konsantrasyonu ve proteinlerin net yüküne bağlıdır. Bu nedenle amonyum sülfat doygunluğu önemli bir parametre olup optimize edilmelidir (Bayraktar 2011).

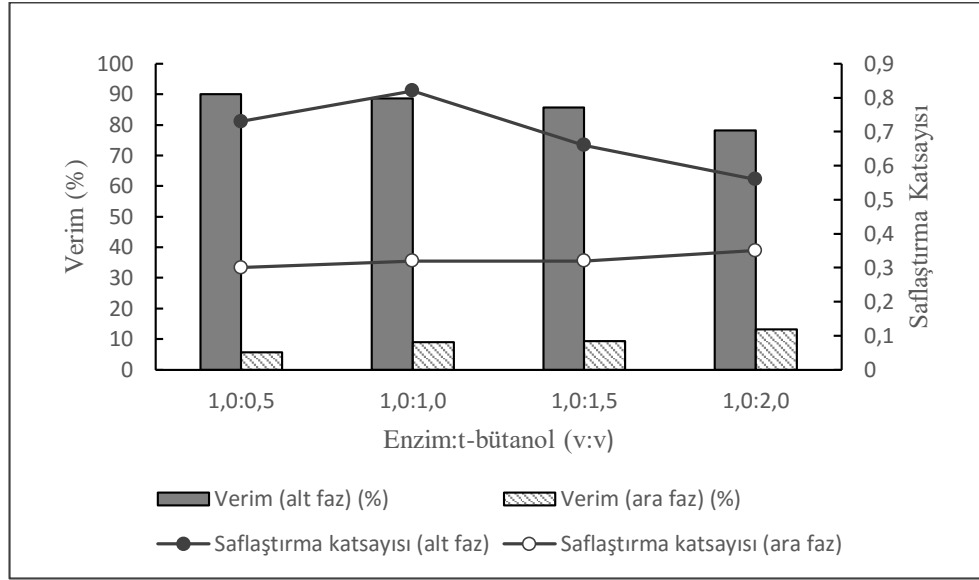
TPP proseslerinde optimizasyon çalışmaları farklılık gösterebilmektedir. Literatürlerde sabit bir tuz konsantrasyonu seçilip bu tuz konsantrasyonlarıyla farklı ham ekstrakt: t-bütanol oranları denenerek alkol oranı belirlendikten sonra bu alkol oranıyla farklı tuz konsantrasyonları çalışılarak gerekli olan tuz miktarı belirlenmektedir. Bu tez kapsamında her bir tuz konsantrasyonunda tüm alkol oranları denenmiştir. Yapılan çalışmaların grafiksel gösterimi sırasıyla Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15, Şekil 4.16'daki gibidir. Gösterilen şekiller incelendiğinde izole edilen lakkazın ara fazda kaldığı görülmüştür. En yüksek verim %70 tuz konsantrasyonunda ve 1,0:2,0 alkol oranında olduğu belirlenmiştir. Bu aşamadan sonraki saflaştırma prosesine bu oranlarla devam edilmiştir.



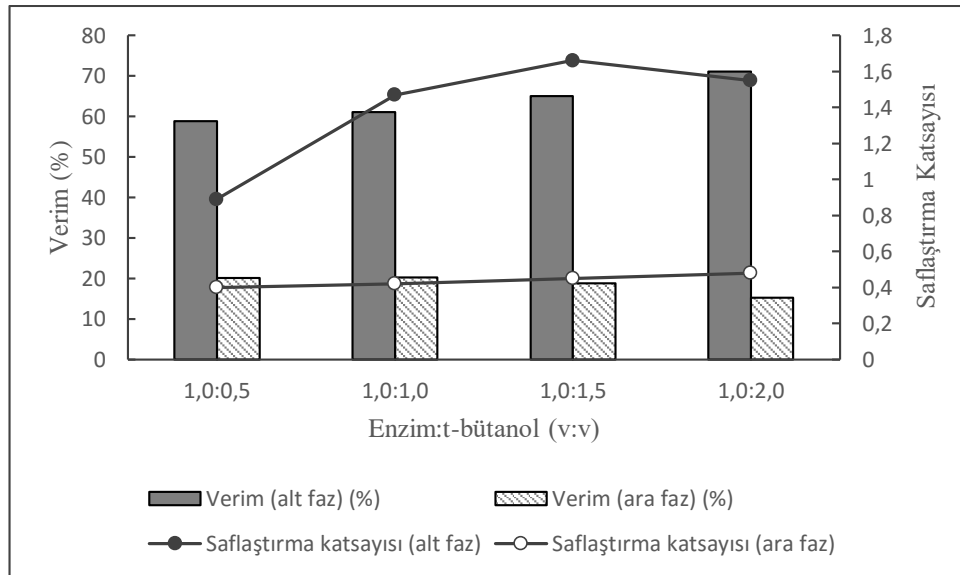
Şekil 4.11. TPP prosesinin %20 tuz konsantrasyonu varlığında farklı alkol oranının (Ham enzim ekstraktı:t- bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) lakkazın saflaştırma katsayısına ve aktivite verimine etkisi



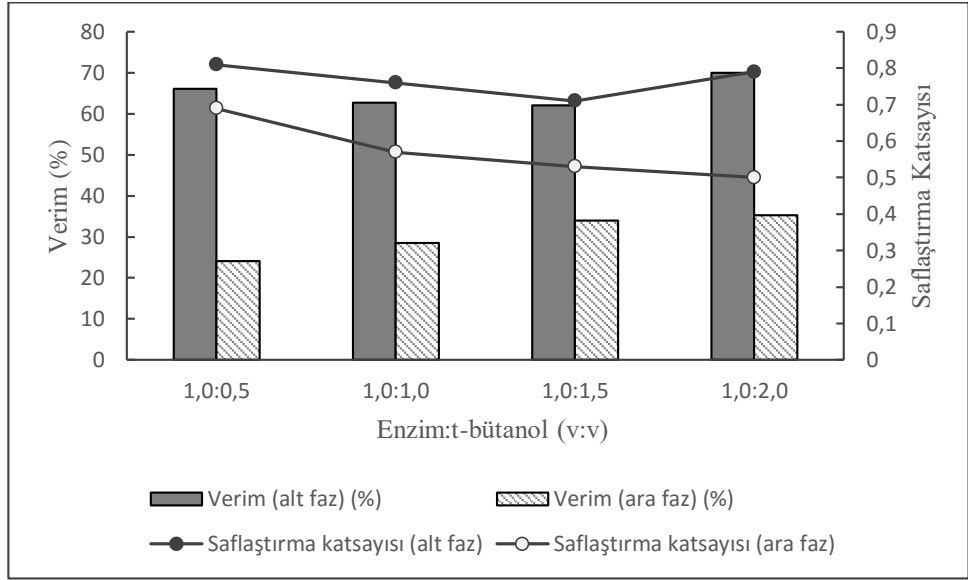
Şekil 4.12. TPP prosesinin %30 tuz konsantrasyonu varlığında farklı alkol oranının (Ham enzim ekstraktı:t- bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) lakkazın saflaştırma katsayısına ve aktivite verimine etkisi



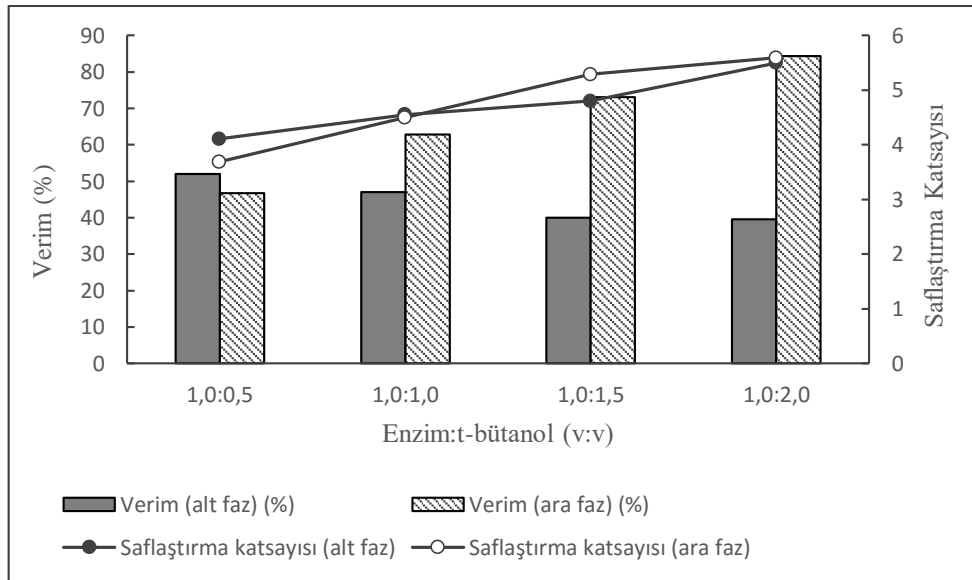
Şekil 4.13. TPP prosesinin %40 tuz konsantrasyonu varlığında farklı alkol oranının (Ham enzim ekstraktı:t- bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) lakkazın saflaştırma katsayısına ve aktivite verimine etkisi



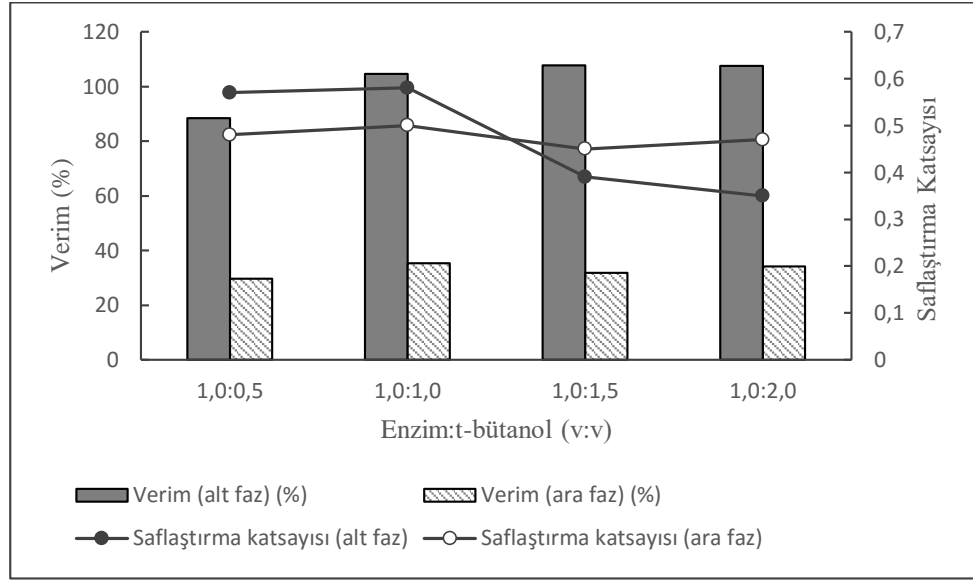
Şekil 4.14. TPP prosesinin %50 tuz konsantrasyonu varlığında farklı alkol oranının (Ham enzim ekstraktı:t- bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) lakkazın saflaştırma katsayısına ve aktivite verimine etkisi



Şekil 4.15. TPP prosesinin %60 tuz konsantrasyonu varlığında farklı alkol oranının (Ham enzim ekstraktı:t- bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) lakkazın saflaştırma katsayısına ve aktivite verimine etkisi



Şekil 4.16. TPP prosesinin %70 tuz konsantrasyonu varlığında farklı alkol oranının (Ham enzim ekstraktı:t- bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) lakkazın saflaştırma katsayısına ve aktivite verimine etkisi

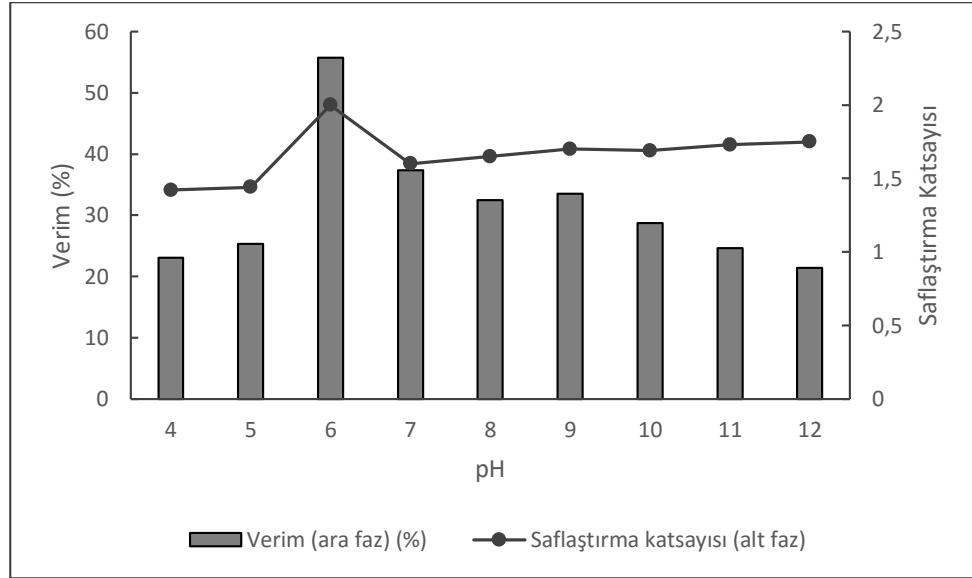


Şekil 4.17. TPP prosesinin %80 tuz konsantrasyonu varlığında farklı alkol oranının (Ham enzim ekstraktı: t- bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) lakkazın saflaştırma katsayısına ve aktivite verimine etkisi

4.2.4. Lakkaz enziminin saflaştırılmasında TPP sistemine pH'nın etkisi

Üçlü faz ayırma sistemlerinde önemli bir parametre sistemin pH'sı ve hedef proteinin izoelektrik noktasıdır. Ortamın pH'sı ayrımı gerçekleştirecek preparat içerisindeki biyomoleküllerin dağılımını etkin bir biçimde değiştirmektedir. Saflaştırılması hedeflenen proteinin ve iyon kompozisyonunun yüküne ve kontaminantların yüzey karakteristiğine pH etki eder. Böylece fazlar arasında dağılımda farklılaşmalar meydana gelir (Kati 2013). Bu nedenle sistemin pH'sı TPP sistemini etkileyen önemli parametrelerden biri olduğundan optimize edilmesi gerekmektedir.

TPP işleminde en uygun tuz yüzdesi ve organik çözügen belirlendikten (%70 tuz konsantrasyonu ve 1,0:2,0 oranında *t*-bütanol) sonra bu değerlere göre farklı pH değerlerinde işlemler tekrarlandı. Farklı pH denemeleri sonucunda en yüksek aktivite pH:6,0' da görülmüştür. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.16'da gösterilmiştir.



Şekil 4.18. Lakkaz enziminin saflaştırılmasında TPP sistemine pH'nın etkisi

4.2.5. Lakkaz enziminin üçlü faz yöntemiyle saflaştırma sonuçları

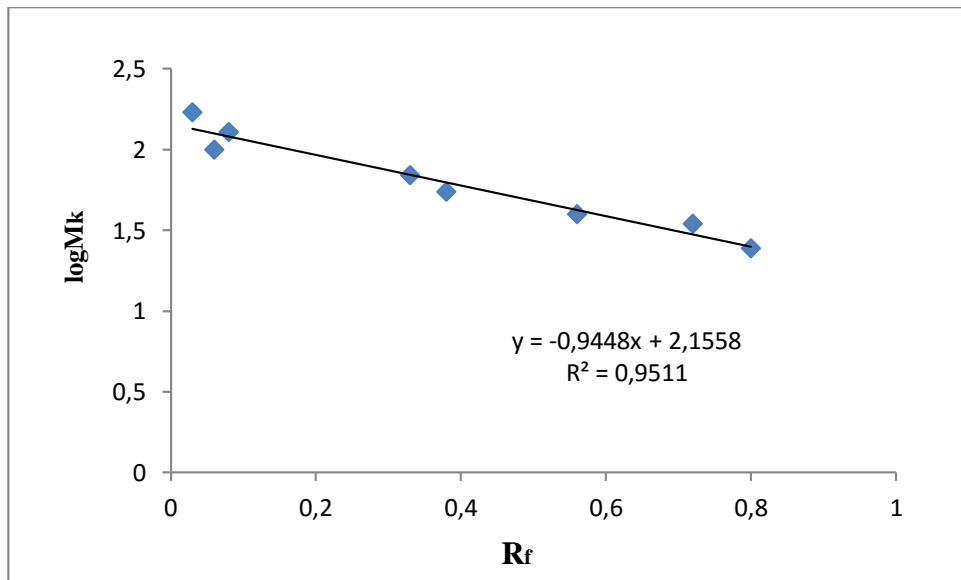
E. faecium A2'den izole edilen lakkaz TPP prosesinin optimizasyonunun hemen ardından belirlenen parametreler doğrultusunda %70 (w/v) amonyum sülfat doygunluğu, (v/v) homojenat 1,0:2,0 *t*-bütanol oranı ve pH 6,0' da lakkaz enzimi 0,95 kat ve % 64,59 verimle TPP sisteminin ara fazından saflaştırıldı. Elde edilen verilere göre ara faz ve alt fazın aktivite kazanım yüzdesi ve saflaştırma katsayıları hesaplanarak saflaştırma tablosu oluşturuldu.

Çizelge 4.3. *E. faecium* A2'den izole edilen lakkazın saflaştırma tablosu

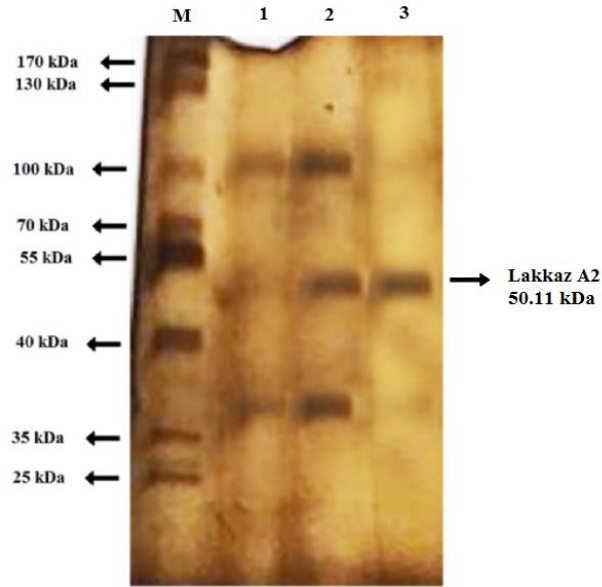
Basamak	Total Hacim (mL)	Aktive (EU/mL)	Protein (mg/mL)	Total Aktivite (EU/mL)	Total Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	% Verim	Saflaştırma Katsayısı
Ham ekstrakt	2	0,0274	0,260	0,0543	0,520	0,105	100	1
TPP Ara faz	2	0,0177	0,177	0,0354	0,354	0,100	64,59	0,95
TPP Alt faz	2	0,0091	0,128	0,0182	0,256	0,071	33,21	0,67

4.2.6. SDS-PAGE ile enzimin saflık kontrolü ve molekül kütesinin tayini

E. faecium A2'den elde edilen lakkaz enziminin saflığının kontrol etmek ve molekül kütesini belirlemek için SDS-PAGE yapıldı. Elde edilen bantları gösteren görüntü Şekil 4.20'de gösterildi. *E. faecium* A2'den üçlü faz ayırma yöntemiyle saflaştırılan lakkaz enziminin SDS-PAGE görüntüsü incelendiğinde enzimin ara fazda kaldığı görüldü. Standart proteinlerin ve enzimin jelde yürüdükleri mesafeler ölçülerek R_f değerleri hesaplandı. Log MK- R_f değerleri ile çizilen grafik Şekil 4.19'de gösterildi. Enzimin molekül kütesi 50,1 kDa olarak hesaplandı.



Şekil 4.19. SDS-PAGE sonucu çizilen Log MK- R_f grafiği



Şekil 4.20. *E. faecium* A2'den saflaştırılan lakkaz enziminin SDS-PAGE görüntüsü a) Alt faz b) Homojenat c) Ara faz)

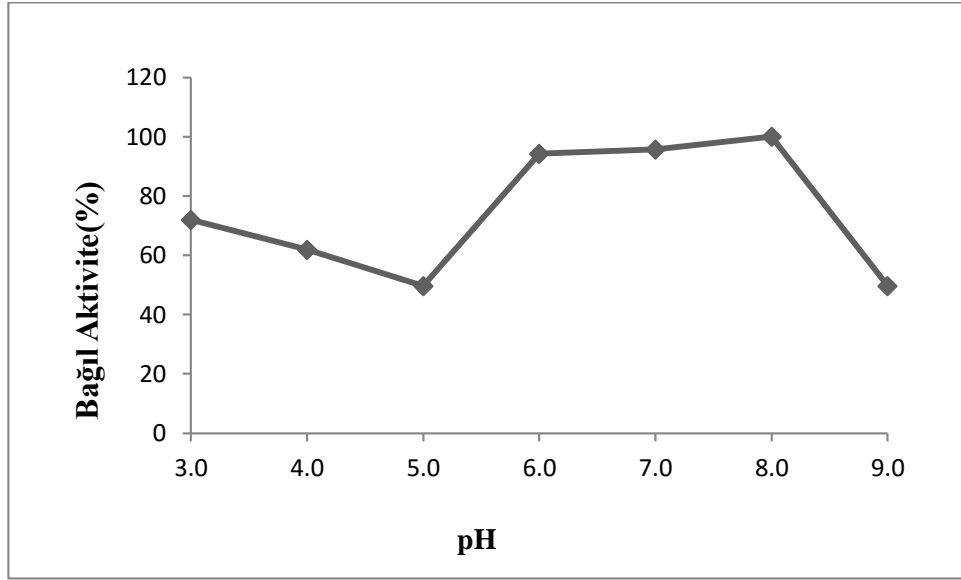
4.3. *E. faecium* A2'den saflaştırılan lakkaz enziminin karakterizasyonu

4.3.1. *E. faecium* A2'den saflaştırılan lakkaz enzimi için optimum pH ve stabil pH bulunmasına yönelik bulgular

E. faecium A2'den üçlü faz ayırma yöntemiyle saflaştırılan lakkaz enziminin optimum pH'sı stabil pH'sı belirlendi. Elde edilen verilere göre çizilen grafik incelendiğinde lakkaz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği optimum pH 8,0 olarak belirlendi.

Çizelge 4.4. *E. faecium* A2' den saflaştırılan lakkaz enziminin pH stabilitesi için 0,1 M sodyum asetat (pH 3,0–5,0), sodyum fosfat (pH 6,0–7,0) ve Tris-HCl (pH 8,0–9,0) tampon çözeltileri kullanılarak optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0
Bağıl Aktivite(%)	71,9	61,8	49,6	94,2	95,6	100	49,6

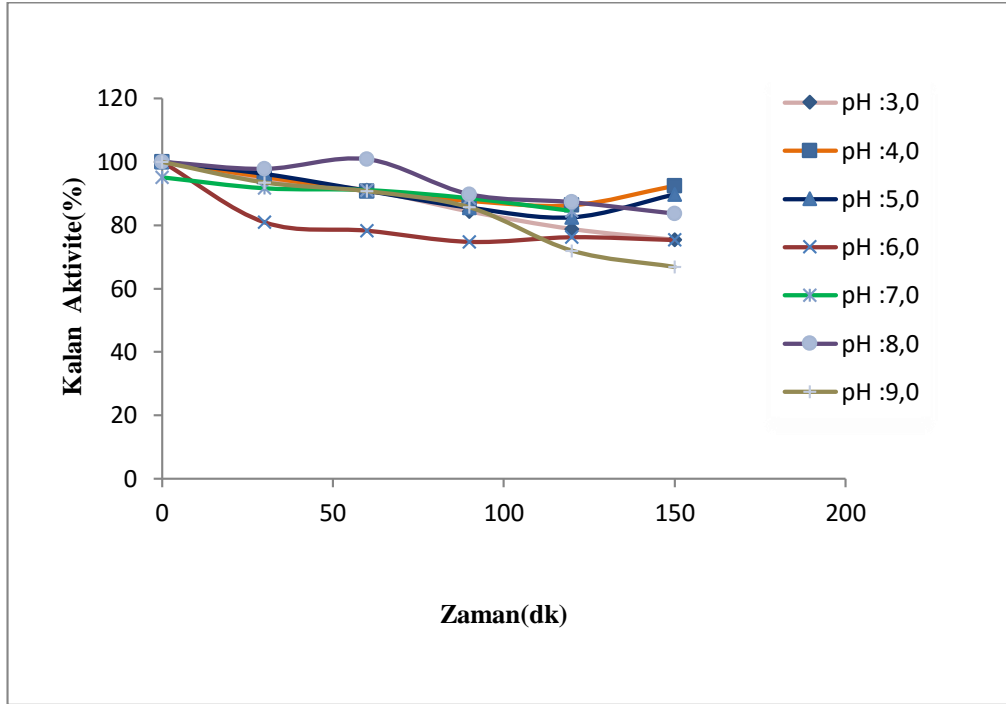


Şekil 4.21. Lakkaz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm grafiği

Enzimin pH stabilitesi için 0,1 M sodyum asetat (pH: 3,0–5,0), sodyum fosfat (pH: 6,0–7,0) ve Tris-HCl (pH: 8,0–9,0) tampon çözeltileri kullanıldı. Elde edilen verilere göre grafik oluşturuldu ve lakkaz enzimi için pH 4,0'da 150 dk.' da, %90, pH 8,0' de 60.dk' da %100, pH 9'da 60. dk' ya kadar ise aktivitenin %90 oranında korunduğu stabil belirlendi.

Çizelge 4.5. *E. faecium* A2'den saflaştırılan lakkaz enziminin 0,1 M sodyum asetat (pH 3,0-5,0), sodyum fosfat (pH 6,0–7,0) ve Tris-HCl (pH 8,0–9,0) tampon çözeltileri kullanılarak stabil pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

İnkübasyon Sonrasında Kalan Aktiviteler (%)							
Süre(dk)	pH:3,0	pH:4,0	pH:5,0	pH:6,0	pH:7,0	pH:8,0	pH:9,0
30dk	94,4	95,2	96,1	80,9	95,1	97,7	93,4
60dk	91,0	90,7	90,8	78,2	91,6	100	90,7
90dk	84,3	87,6	85,4	74,7	91,1	89,7	85,6
120 dk	78,7	86,3	82,4	76,2	88,5	87,2	71,9
150 dk	75,3	92,4	89,6	75,3	84,5	83,7	66,7



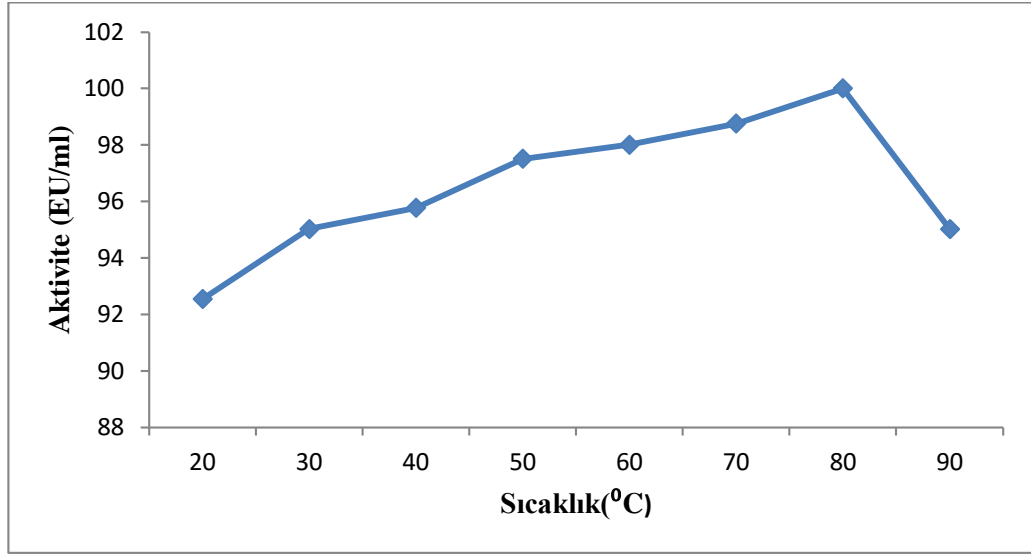
Şekil 4.22. Lakkaz enzimi için elde edilen stabil pH grafiği

4.3.2. *E. faecium* A2'den saflaştırılan lakkaz enzimi için optimum sıcaklığın ve stabil sıcaklığın belirlenmesine yönelik bulgular

E. faecium A2'den saflaştırılan lakkaz enziminin sıcaklık profili ve kararlılığı belirlendi. Çizelge 4.6.'da saflaştırılan lakkaz enziminin optimum sıcaklığı 80°C olarak tespit edildi.

Çizelge 4.6. *E. faecium* A2'den saflaştırılan lakkaz enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık- bağıl aktivite (%) ölçüm sonuçları çizelgesi

Sıcaklık (°C)	20°C	30°C	40°C	50°C	60°C	70°C	80°C	90°C
Bağıl Aktivite (%)	92,5	95,0	95,7	97,5	98,0	98,7	100	95,0

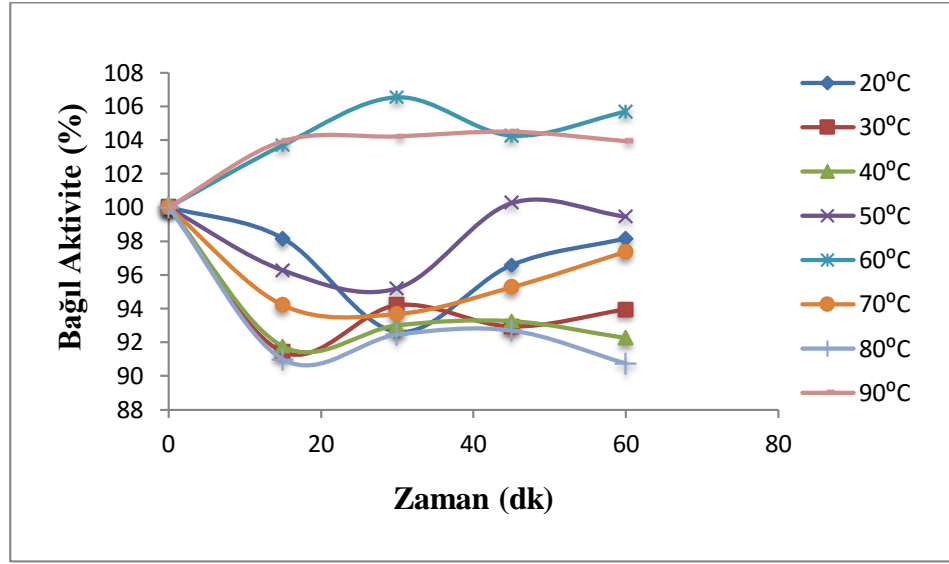


Şekil 4.23. Lakkaz enzimi optimum sıcaklık ölçülmesi için çizilen sıcaklık-bağıl aktivite grafiği

E. faecium A2'den saflaştırılan lakkaz enziminin stabil sıcaklığını belirlemek amacıyla 20°C' den 90°C' ye kadar olan sıcaklık aralığında 15, 30, 45 ve 60 dk' lık inkübasyon sürelerinde bekletildikten sonra aktivite tayinleri yapıldı. Enzimin her bir sıcaklık aralığında iki saat inkübasyon sonunda aktivitesini %90' nından fazlasını muhafaza ettiği ve geniş bir sıcaklık aralığında stabilitesini koruduğu tespit edildi. Özellikle 60 ve 90°C sıcaklıklarda daha dayanıklı olduğu belirlendi.

Çizelge 4.7. *E. faecium* A2' den saflaştırılan lakkaz enziminin sıcaklık kararlılığını belirlemek için zaman-sıcaklık- kalan aktivite (%) ölçüm sonuçlarının gösterimi

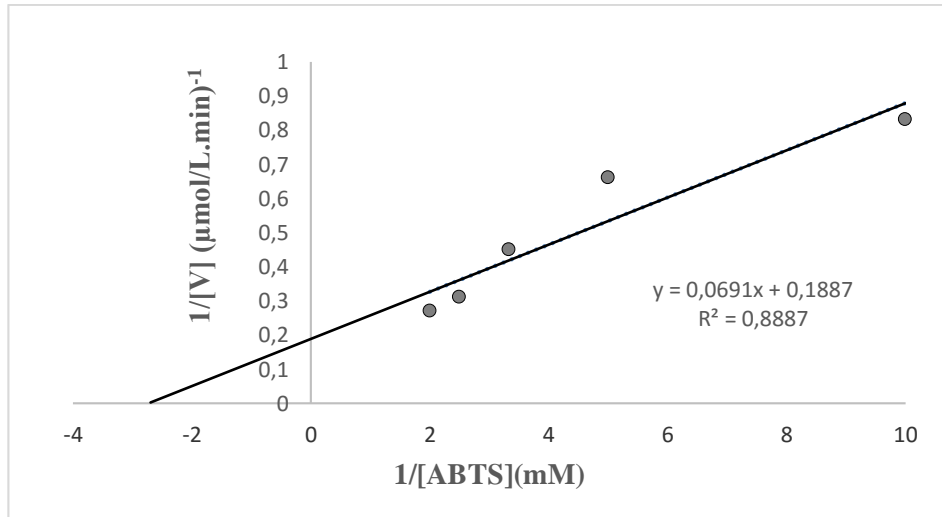
İnkübasyon Sonrasında Kalan Aktiviteler (%)								
Süre(dk)	20°C	30°C	40°C	50°C	60°C	70°C	80°C	90°C
15	98,1	91,4	91,7	96,2	103,6	94,2	90,9	103,9
30	92,6	94,1	93,0	95,2	106,5	93,6	92,4	104,2
45	96,5	92,9	93,2	100,2	104,2	95,2	92,7	104,4
60	98,1	93,9	92,2	99,4	105,4	97,3	90,7	103,9



Şekil 4.24. Sıcaklığın lakkaz enzim kararlılığı üzerine etkisi

4.3.3. Enzim kinetiğinin (K_m ve V_{max}) değerlerinin belirlenmesine yönelik sonuçlar

E. faecium A2'den saflaştırılan lakkaz enziminin ABTS substratı varlığında K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanılarak ABTS substratı için sırasıyla K_m 0,366 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ve V_{max} değeri 5,29 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{dk}^{-1}$ olarak tespit edildi. Elde edilen değerler Şekil 4.23'de gösterildi.



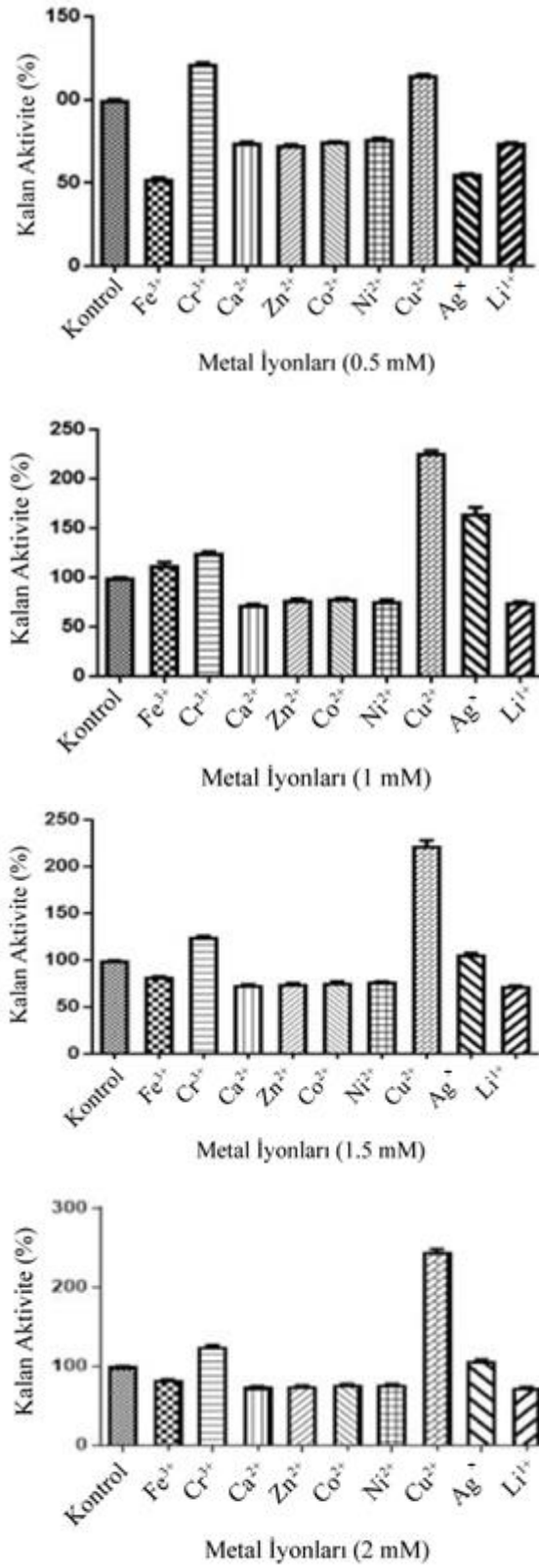
Şekil 4.25. ABTS substratı için K_m ve V_{max} bulunmasına yönelik Lineweaver-Burk grafiği

4.3.4. *E. faecium* A2'den saflaştırılan lakkaz enzimi üzerine bazı metal iyonlarının etkisine yönelik bulgular

Metal iyonlarının lakkaz enzimi üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla, 0,5, 1, 1,5 ve 2 mM'lık konsantrasyonlarda (Cr^{2+} , Ag^+ , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Li^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+}) metal iyonları kullanılarak lakkaz aktivitesi belirlendi. Elde edilen sonuçlara Çizelge 4.8'de verildi. Bu sonuçlara göre lakkaz enziminin genel olarak kullanılan tüm metallerin varlığında enzim aktivitesini koruduğu gözlemlendi. Özellikle, Ag^+ , Cr^{2+} , Cu^{2+} iyonlarının varlığında enziminin aktivitesinin arttığı, diğer metal iyonlarının varlığında ise %75'in üzerinde aktivitesini koruduğu tespit edildi.

Çizelge 4.8. *E. faecium* A2'den saflaştırılan lakkaz enzimi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi

Metal İyonları	0,5 mM	1 mM	1,5 Mm	2 mM
Kontrol	100±0,00	100±0,00	100±0,00	100±0,00
Fe³⁺	112,5 ± 2,908	114,5 ± 2,908	82,4 ± 0,115	72,4 ± 0,215
Cr²⁺	125,1 ± 1,114	129,1 ± 1,74	132,1 ± 1,114	130,1 ± 1,114
Ca²⁺	72,9 ± 0,145	74,93 ± 0,545	76,67 ± 0,437	78,67 ± 0,237
Zn²⁺	76,9 ± 1,202	75,97 ± 1,302	77,2 ± 0,057	76,2 ± 0,573
Co²⁺	78,6 ± 0,145	77,63 ± 0,145	76,87 ± 0,270	76,87 ± 0,470
Ni²⁺	76,5 ± 0,642	78,5 ± 0,742	77,03 ± 0,328	79,03 ± 0,428
Ag⁺	165,1 ± 5,97	163,1 ± 5,977	106,7 ± 0,857	102,7 ± 0,857
Li⁺	74,9 ± 0,480	73,9 ± 0,680	72,73 ± 0,338	72,43 ± 0,238
Cu²⁺	167 ± 8,173	403,3 ± 11,7	271 ± 3,215	286 ± 12,06



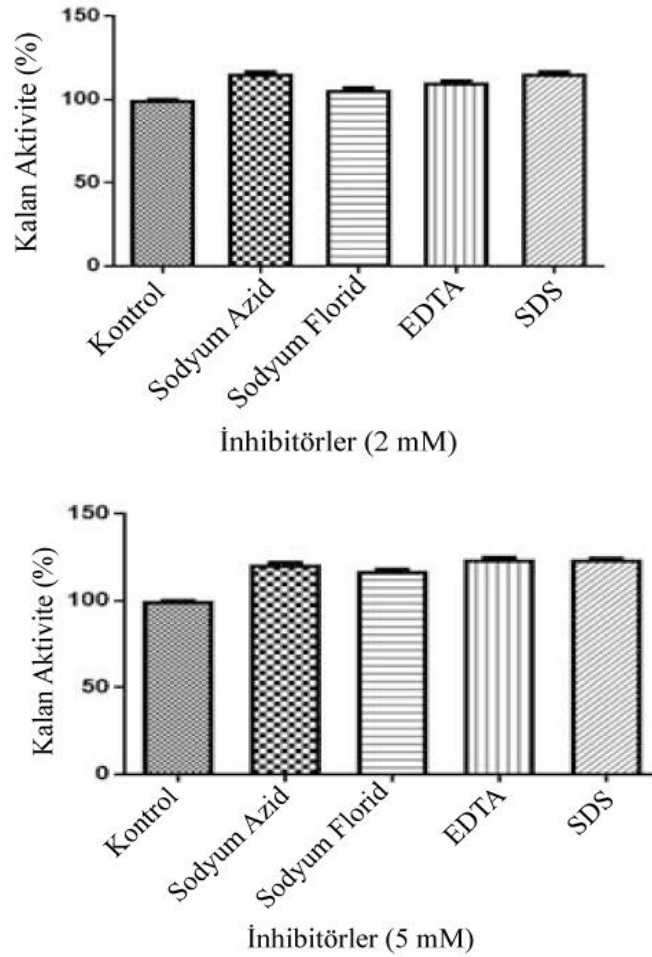
Şekil 4.26. Bazı metal iyonlarının lakkaz aktivitesi üzerine etkisi

4.3.5. *E. faecium* A2'den saflaştırılan lakkaz aktivitesi üzerine bazı inhibitörlerin etkisinin belirlenmesine yönelik bulgular

E. faecium A2'den saflaştırılan lakkaz enziminin üzerine inhibisyon ajanlarının etkisinin belirlenmesi amacıyla 2 mM ve 5 mM konsantrasyonlarında EDTA, SDS, sodyum florid, sodyum azid ve %1 ve %5'lik konsantrasyonları kullanıldı. Yapılan deney sonuçları Çizelge 4.9'da verildi. Bu sonuçlara göre, lakkaz enzimini inhibitör maddelerinin aktive ettiği görüldü.

Çizelge 4.9. *E. faecium* A2'den saflaştırılan lakkaz enzimi üzerine bazı inhibitörlerin etkisi

İnhibitörler	2 mM	5 Mm
Kontrol	100±0,00	100±0,00
Sodyum azid	115,1 ± 1,405	120,9 ± 1,065
Sodyum florid	106 ± 1,240	117 ± 0,970
EDTA	110 ± 0,636	124 ± 0,921
SDS	115,2 ± 1,387	123,5 ± 0,837



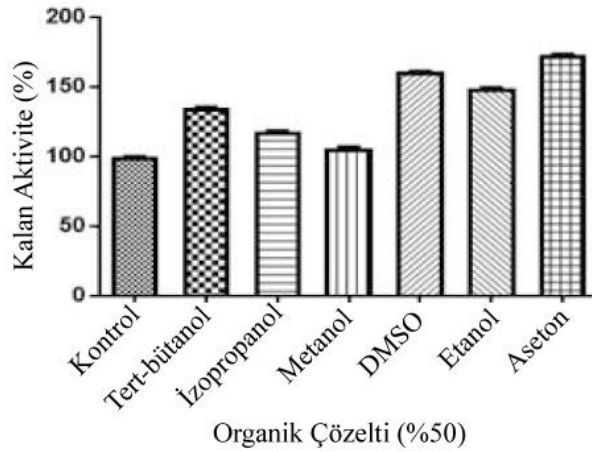
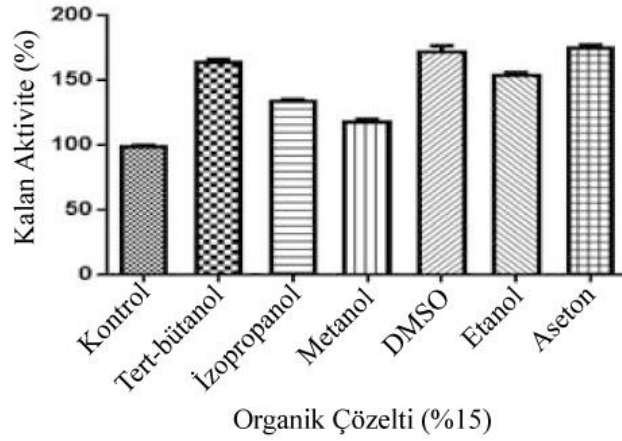
Şekil 4.27. Bazı inhibitörlerin lakkaz aktivitesi üzerine etkisi

4.3.6. *E. faecium* A2'den saflaştırılan lakkaz aktivitesi üzerine bazı organik çözücülerin etkisinin belirlenmesine yönelik bulgular

E. faecium A2'den saflaştırılan lakkaz enziminin üzerine bazı organik çözücülerin etkisinin belirlenmesi amacıyla %15 ve %50 oranlarında t-bütanol, izopropanol, metanol, DMSO, etanol ve aseton kullanıldı. Yapılan deney sonuçları Çizelge 4.10'da verildi. %15-50'lik konsantrasyonda tüm organik çözücülerde enzim aktivitesinin arttığı belirlendi. Özellikle DMSO, aseton, t-bütanol ve etanolün %15'lik konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin çok daha yüksek olduğu gözlemlendi. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde kullanılan organik çözücülerin hepsinde lakkaz enziminin kararlılığını koruduğu görüldü.

Çizelge 4.10. *E. faecium* A2'den saflaştırılan lakkaz enzimi üzerine bazı organik çözücülerin etkisi

Organik Çözücüler	% 15	%50
Kontrol	100±0.00	100±0.00
Tert-Bütanol	164,8 ± 1,392	135,2 ± 0,264
İzopropanol	135 ± 0,524	118 ± 0,057
Metanol	119 ± 0,549	106 ± 0,367
DMSO	172,7 ± 3,65	116,7 ± 0,393
Etanol	155,4 ± 0,463	114,3 ± 0,115
Aseton	176,1 ± 0,938	172,8 ± 0,450



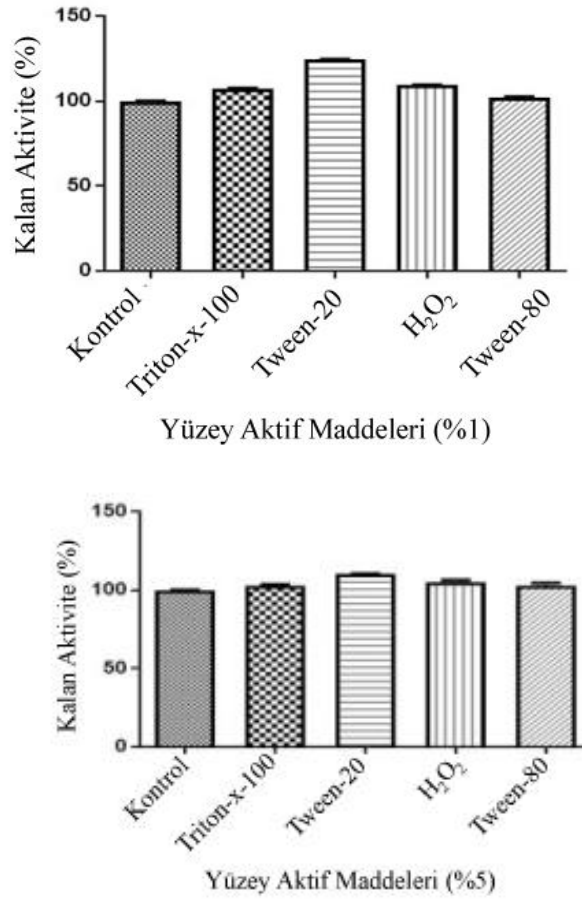
Şekil 4.28. Bazı organik çözücülerin lakkaz enzim aktivitesi üzerindeki etkisine yönelik bulgular

4.3.7. *E. faecium* A2'den saflaştırılan lakkaz enzimin aktivitesi üzerine yüzey aktif maddelerinin ve okside edici ajanının etkisinin belirlenmesine yönelik bulgular

E. faecium A2'den lakkaz enziminin üzerine yüzey aktif maddelerin etkisini ve okside edici ajanın etkisini incelemek için %1-5'lik konsantrasyonlarda Tween-20, Tween-80, Triton-X-100 ve H₂O₂ kullanıldı. Yapılan deney sonuçları Çizelge 4.11'de verildi. Enzimin bu maddeler karşısında dayanıklı olduğu aktivitesinde artış olduğu gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.11. *E. faecium* A2'den saflaştırılan lakkaz enzimi üzerine yüzey aktif maddelerin ve okside edici ajanın etkisi

Yüzey Aktif Maddeleri	% 1	%5
Kontrol	100±0,00	100±0,00
Triton -X- 100	107,5 ± 0,057	102,9 ± 0,709
Tween- 20	124 ± 0,176	110 ± 0,120
H₂ O₂	109,4 ± 0,057	105,3 ± 1,053
Tween 80	102,4 ± 0,033	103,1 ± 1,168



Şekil 4.29. Bazı yüzey aktif maddelerinin lakkaz aktivitesi üzerine etkisi

4.3.8. *E. faecium* A2'den saflaştırılan lakkaz enzimin substratlara olan özgünlüğün belirlenmesine yönelik bulgular

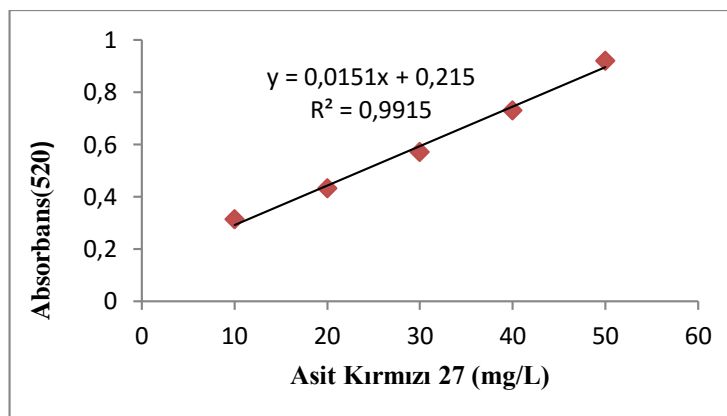
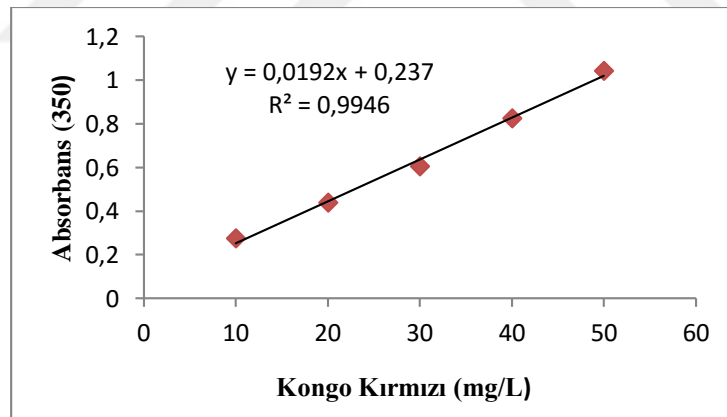
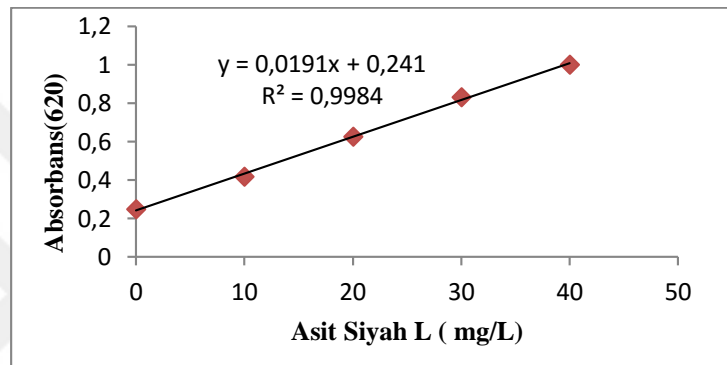
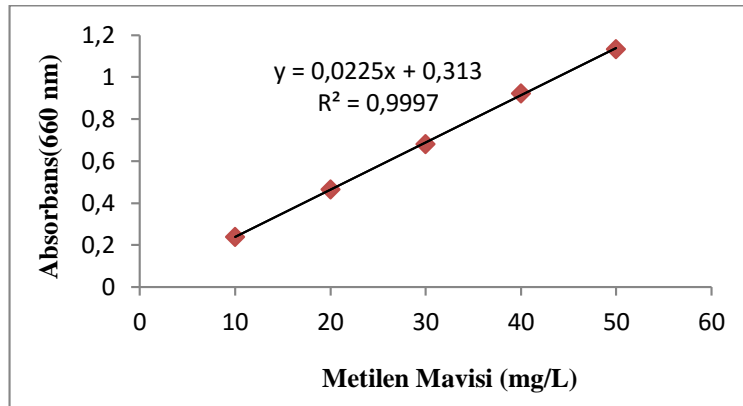
E. faecium A2'den saflaştırılan lakkaz enziminin ABTS, guaikol ve 2-6 dimetoksifenol gibi substratlar varlığında aktivitesi incelendi. Yapılan deney sonuçları Çizelge 4.12'de verildi. Enzimin en yüksek aktiviteyi guaikol substratında gösterdiği belirlendi.

Çizelge 4.12. *E. faecium* A2'den saflaştırılan lakkaz enziminin doğal substratlar varlığında aktivitesi

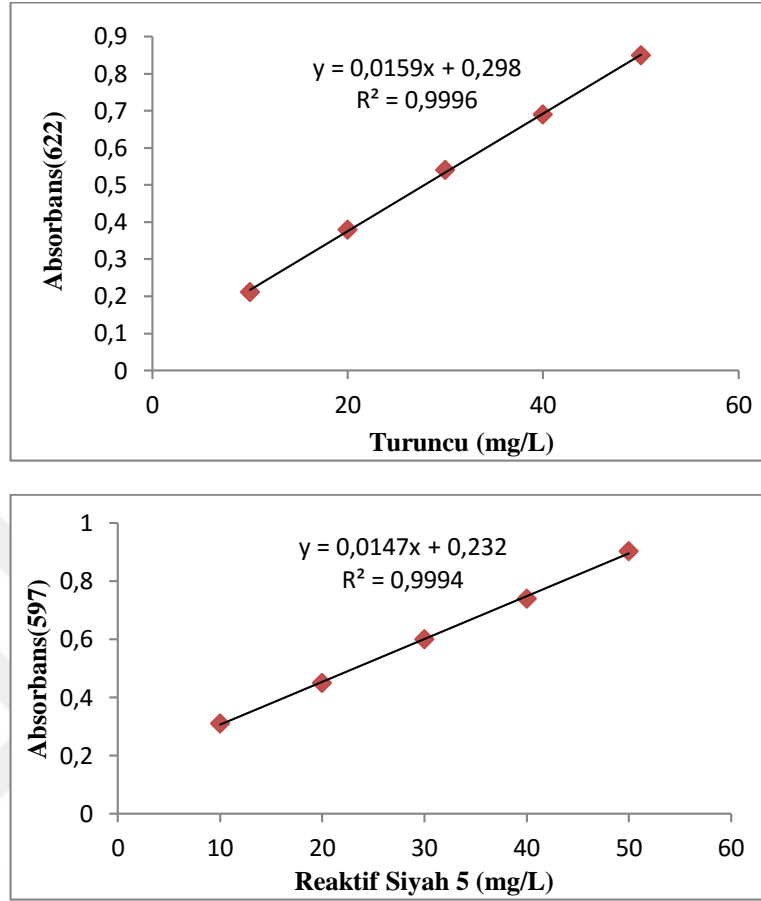
Doğal substratlar	Konsantrasyon	λ (nm)	Aktivite(U/mL)
ABTS	0,5 mM	420	25,4
Guaicoil	5 mM	465	60,4
2-6 dimetoksifenol	5 mM	470	51,9

4.3.9. *E. faecium* A2'den saflaştırılan lakkaz enzimin tekstil boyalarının giderilmesi işlemine etkisine yönelik bulgular

E. faecium A2'den saflaştırılan lakkaz enziminin boyalarının giderimine etkisini incelemek için asit siyah L, kongo kırmızı, metilen mavisi, turuncu, asit kırmızı 27, asit siyah 5 boyaları kullanılarak hazırlanan standart grafikleri Şekil.4.30' da verilmiştir. Standart grafikler kullanılarak boya giderim oranları hesaplanıp sonuçlar Çizelge.4.13' de gösterilmiştir. Boyaların başlangıç ve giderimden sonraki görünüşleri Şekil.4.30 ve Şekil.4.31' de görülmektedir. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek boya gideriminin asit kırmızı 27 boyasında olduğu görülmüştür.



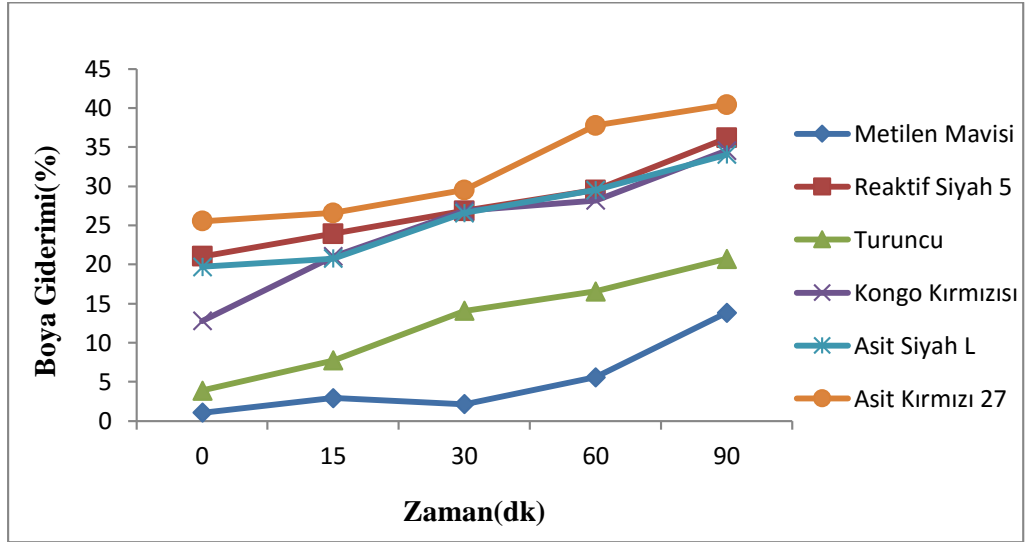
Şekil 4.30. (Devamı)



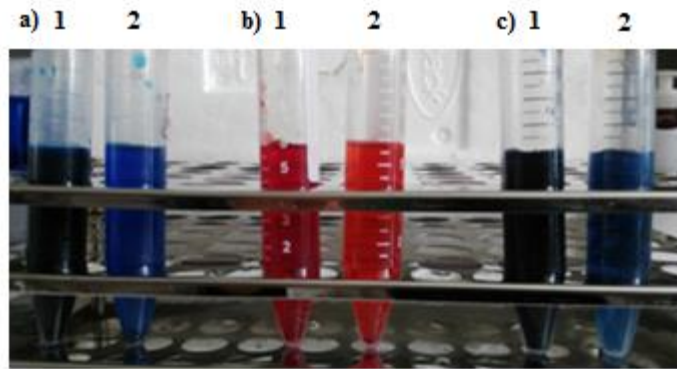
Şekil 4.30. Boyarmaddeler için oluşturulan standart eğriler

Çizelge 4.13. *E. faecium* A2'den saflaştırılan lakkaz enziminin boyar maddeler varlığında aktivitesi boya giderimi (%)

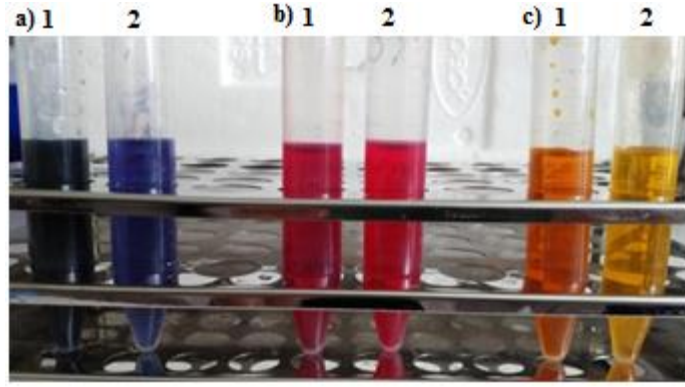
Boyar Maddeler	15 dk	30 dk	60 dk	90 dk
Metilen Mavisi	2,9255	2,1276	5,5851	13,8297
Reaktif Siyah 5	23,9361	26,8617	29,5212	36,1702
Turuncu	7,7348	14,0884	16,5745	20,7182
Kongo Kırmızı	21,0106	26,8617	28,1914	34,5744
Asit Siyah L	20,7446	26,5957	29,5212	34,0425
Asit Kırmızı 27	26,5957	29,5212	37,7659	40,4255



Şekil 4.31. *E. faecium* A2'den saflaştırılan lakkaz enziminin tekstil boyalarının giderilmesi işlemine etkisi



Şekil 4.32. a) Ham kültür filtratı (1) ve saf lakkaz (2) kullanarak metilen mavisi boyasının renginin giderimi b) Ham kültür filtratı (1) ve saf lakkaz (2) kullanarak kongo kırmızı boyasının renginin giderimi c) Ham kültür filtratı (1) ve saf lakkaz (2) kullanarak asit black 1 boyasının renginin giderimi



Şekil 4.33. a) Ham kültür filtratı (1) ve saf lakkaz (2) kullanarak asit siyah 5 boyasının renginin giderimi b) Ham kültür filtratı (1) ve saf lakkaz (2) kullanarak asid red 27 boyasının renginin giderimi c) Ham kültür filtratı (1) ve saf lakkaz (2) kullanarak turuncu boyasının renginin giderimi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler, çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere günlük ve ekonomik hayata girmiştir. Enzim teknolojisinin gelişmesi elde edilen ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle biyoteknolojide endüstriyel enzimlerin kullanımı ile ilgili çalışmaların yapılmasının önemi giderek artmaktadır. Lakkazlar, fenolik ve fenolik olmayan bileşikleri oksitleyebilme özellikleri nedeniyle endüstride ve çevresel kirliliklerin giderilmesi ile ilgili işlemlerde yaygın şekilde kullanılmaktadır. Endüstride lakkazların kullanılmasının; oksitleme mekanizmalarında yalnızca atmosferik O₂'ni kullanmaları, katalizledikleri tepkimelerde son ürünün H₂O olması, substrat aralıklarının fazla olması ve elde edildiği kaynakların doğada bol miktarda bulunması gibi çeşitli avantajları vardır.

Son zamanlara kadar lakkaz enzimlerinin izole edildiği ve tanımlandığı organizmaların büyük bir çoğunluğunu funguslar ve bitkiler oluşturmuştur. Bunun sonucu olarak da biyoteknolojik uygulamalarda çoğunlukla fungal lakkazlar kullanılmıştır. Her ne kadar, son zamanlarda hızlı bir şekilde ilerleme gösteren bütün-genom analizleri, lakkaz enzimlerinin bakterilerde de yaygın olarak bulunduğu işaret etse de bakteriyel lakkazlar hakkında bilinenler henüz çok daha azdır. Mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilmeleri endüstrinin hemen her alanında kullanılmasını sağlamaktadır. Bugün endüstride mikrobiyal kökenli enzimlerin kullanımda artışlar görülmektedir.

Lakkaz enzimlerinin endüstriyel anlamda kullanıldıkları ortamlarda birçok konuda oldukça ekstrem şartları (pH, sıcaklık, kimyasala karşı duyarlılık) gerektirdiği göz önüne alınırsa, genellikle geniş pH, sıcaklık ve iyonik şiddet aralığında aktivite gösteren mezofilik karakterdeki mikroorganizmalardansa, çok yüksek sıcaklık ve geniş pH'da varlığını sürdürebilen ekstremofilik mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin daha etkin kullanılabileceği açıktır. Ekstremofil canlıların önemli bir grubunu oluşturan yüksek sıcaklıklara dayanıklı termofilikler yoğun olarak araştırılan ve kullanılan bir enzim

kaynaklarıdır. Birçok farklı enzimi araştırılmış, patentlenmiş ve endüstriyel kullanıma sunulmuş olan termofilik mikroorganizmalardan sadece bir kaçından lakkaz enzimi elde edilmiş ve özellikleri araştırılmıştır. Yapılan literatür taraması sonucunda lakkaz enziminin bakterilerden saflaştırılarak karakterize edilmesi üzerine çok az sayıda araştırma yapıldığı görülmektedir. Araştırma yapılan bakterilerden bazıları *Azospirillum lipoferum*, *Marinomonas mediterranea*, *Pseudomonas syringae*, *Streptomyces griseus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus halodurans*'tır (Endo *et al.* 2002; Ruijssenaars and Hartmans 2004; Sharma *et al.* 2007). Endüstride kullanılan proteinler (enzimler) heterojen özellik taşıyan biyomoleküllerdir ve doğal ortamları dışında kararlı olmayabilirler. Hücre içi bir proteinin saflaştırılması için öncelikle bulunduğu hücre ve dokuların proteine zarar verilmeden parçalanması gerekmektedir. Proteinin izolasyonu, protein için uygun koşullar sağlanarak (pH ve sıcaklık) belirlenen fiziksel ya da kimyasal bir yöntem ile gerçekleştirilebilir. Endüstriyel ve çevresel uygulamalarda kullanılan enzimlerin bol miktarda ve ucuz olarak elde edilebilme özelliğine sahip olmalıdır. Bu nedenle kullanılan klasik saflaştırma yöntemlerinin yanında üçlü faz ayırma tekniği (TPP) gibi ham ekstraktta direkt uygulanabilen, ucuz ve ölçeklendirilebilir alternatif yöntemler proteinleri çöktürmek ve kısmi olarak saflaştırmak için geliştirilmektedir. Bu yöntem enzim aktivitesini %100-1000 oranında arttırabilmektedir. TPP yönteminin sözü edilen avantajları ve literatür araştırmalarına göre bu amaçla kullanılan yeni bir teknik olması nedeniyle bu tez çalışmasında lakkazın kısmi saflaştırılması TPP yöntemi ile gerçekleştirildi.

Bu tez kapsamında ilk olarak ekstrem koşullara dayanıklı lakkaz enzimi üretmek amacıyla Ağrı/Diyadin kaplıcasından temin edilen sıcak su örneğinden, 2 adet bakteri izole edilmiştir. İzolasyon sonrasında yapılan konvensiyonel ve moleküler analizler sonucunda 2 izolat (A2:*Enterococcus faecium*, A4:*Lysinibacillus macroides*) tür düzeyinde tanımlanmıştır.

Tez kapsamında lakkaz taraması yapmadan önce izole edilen bakterilerin tanımlarının yapılması amacı ile 16S rRNA gen bölgesi özel evrensel primerlerle gerçekleştirilen PCR sonucunda çoğaltılmış, pGEM-T-easy vektörüne klonlanarak sekans analizine

gidilmiştir. Elde edilen sekans analizi sonucunda izolat %99 bezerlikle *E. faecium* A2 olarak cins düzeyinde tanımlanabilmiştir. Yapılan literatür taramaları sonucunda, son yıllarda sistematik çalışma gerçekleştiren bilim insanları, bakterilerin familya, cins ve tür düzeyinde tanılanması için, 16S rRNA'yı içeren makromolekül bölgelerinin analizinden yaygın bir şekilde faydalandığı belirlenmiştir (Acar 2009; Adıgüzel vd 2009). Literatür incelendiğinde Adıgüzel vd. (2009)'da aynı kaplıcadan (Hasanabdal Kaplıcasından) aldıkları su örneklerinden termofilik bakteri izole ederek, fenotipik ve genotipik yöntemlerle karakterize etmişlerdir. Yaptıkları bu çalışma ile *Brevibacillus sp.* (Z1) (Gen Bank No:KC292196.1) bakterisini 16S rRNA gen sekanslamayla tanımlanmıştır. Literatüre bakıldığında lakkaz üretimi için termofilik bakterilerin tanılanması amacı ile yapılan başka bir çalışmada aerobik, çubuk şeklinde, hareketli ve Gram-pozitif termofilik DB2 suşu Türkiye'deki Diyarın ilçesi Dibekli sıcak su kaynağından izole edilerek morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal testler yapılmış ve 16S rRNA gen sekanslamayla tanımlanmıştır (Bekler 2017).

Tez kapsamında izolatların özelliklerini belirlemek amacıyla yapılan biyokimyasal testlerde *E. faecium* A2 izolatının gram pozitif, katalaz negatif ve oksidaz negatif olduğu ortaya çıkmıştır. A4 izolatının ise konvensiyonel test sonuçları incelendiğinde; *E. faecium* A2 izolatının Gram-pozitif, katalaz-negatif, oksidaz-negatif olduğu sonuçları literatür verileri ile paralellik gösterdiği tespit edilmiştir (Rahman 2015). *E. faecium* A2 izolatına yapılan glikozdan gaz üretim testinde tüplerin 47,5°C'de 24-48 saat süreyle inkübasyonundan sonra gaz üretim potansiyeli gözlemlendi. Gaz üretimi olmadığından bakteri homofermantatif olarak değerlendirildi. Bu bakteriler glikoz parçalanmasında son ürün olarak laktik asit üretmektedir (Holzapfel and Schillinger 1992; Stiles and Holzapfel 1997).

Tez kapsamında izole edilen bakterilerin her ikisinin lakkaz enzim aktivitesi bakımından pozitif olduğu gözlemlenmiş, en yüksek aktiviteyi ise A2 izolatının verdiği tespit edilmiştir. Böylece termotolerant özellikteki *E. faecium* A2 izolatından lakkaz enzimi

literatürde ilk kez ekstraselüler olarak üretimi sağlanmış ve karakterizasyonu yapılmıştır. Literatür incelendiğinde ektramofilik özellikteki bakterilerle yapılan lakkaz üretimiyle ilgili benzer çalışmada kaplıcadan (Hasanabdal Kaplıcasından) alınan su örneklerinden termofilik bakteri izole ederek, lakkaz üretimi yapıp bu lakkazın karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Yaptıkları bu çalışma ile *Brevibacillus sp.* (Z1) (Gen Bank No:KC292196.1) bakterisinden ekstraselüler lakkaz enzimi elde ettiğini ortaya çıkarmıştır (Adıgüzel vd 2009). Lakkazlarla ilgili diğer bir çalışma yine ekstrasellüler termostabil lakkaz taraması amacı ile yapılmıştır. Seçilen yirmi iki (22) lakkaz suşundan ekstrasellüler lakkaz aktivitesi gösteren beş suş tespit edilmiştir; TMT1, PK4, PS1, TMS1 ve ASP3. Bunlardan PK4'ten üretilen lakkaz enziminin daha fazla olduğu bulunmuştur. PK4 suşu seçilmiş ve *Bacillus* PK4 olarak adlandırılmıştır (Çabuk 2014). Enzimoloji alanında termofilik bakterilerden ekstraselüler olarak lakkaz üretimi kapsamında yapılan diğer çalışmalardan bazıları şunlardır: *Streptomyces lavendulae* REN-7'den elde edilen lakkaz (Suzuki *et al.* 2003), termofilik bir arke olan *Pyrobaculum aerophilum* IM2'den elde edilen lakkaz benzeri protein (Fitz-Gibbon *et al.* 2002), hipertermofilik bir bakteri olan *Aquifex aeolicus* VF5'den elde edilen lakkaz benzeri 31 protein (Claus *et al.* 2003), *Thermus thermophilus*'dan ve *Bacillus pumilus*'dan elde edilmiştir (Miyazaki 2005; Sharma 2007) .

E. faecium A2'den lakkaz enziminin saflaştırılması TPP yöntemiyle uygulanmış ve bunun için tuz, organik çözügen ve pH optimizasyonu yapılmıştır. Lakkaz enzimi pH 6,0'da, 1,0:2,0 (ham enzim çözeltisi: t-bütanol oranı) ve %70 doymuş amonyum sülfat kullanılarak uygulanan TPP sistemi ile %64,59 verimle 0,95 kat saflaştırılmıştır. TPP yönteminin, *E. faecium* A2'den izole edilen lakkazın kısmi saflaştırılması için kolay ve etkili bir yöntem olduğu sonucuna varıldı. Literatüre bakıldığında lakkaz enziminin *PurifyPleurotus ostreatus* laccase'den üç faz ayırma (TPP) yöntemi kullanarak saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Öncelikle TPP parametrelerinin lakkaz enziminin saflık ve verimi üzerine etkisini araştırılmıştır. Enzimin saflaştırılması için optimum değerler: amonyum sülfat doymuşluğu (w/v), % 50-60; ham ekstrenin t-bütanole oranı (hacim / hacim) 1,0:1,8; sıcaklık sırasıyla 42–45°C olarak belirlenmiştir. Lakkaz %184 verim ve 7,22 kat saflaştırıldığı belirtilmiştir (Kumar *et al.* 2011). Literatüre bakıldığında

lakkazın *Ganoderma sp.* WR-1 fermentasyon karışımından saflaştırılması için yine üç fazlı bölümlenme (TPP) yöntemini kullanmışlardır. İki aşamalı bir prosedürde, amonyum sülfat konsantrasyonu, sulu faz-t-bütanol oranı, sıcaklık ve pH'nin fizyokimyasal parametreleri, lakkaz ayırımı için optimize edilmiştir. Aşama 1'de %20 amonyum sülfat ve 35°C'de ve pH 7,0'de 1:0,5 (hacim / hacim) sulu fazlı-t-bütanol oranı ile lakkazın çoğunun alt sulu fazda kaldığı görülmüştür. Aşama 2 ise, %90 amonyum sülfat ve diğer değişkenler, adım 1 ile aynıdır, lakkaz ara fazda konsantre edilmiştir. İki aşamalı TPP ile enzim, 13,2 kat %60 verimle saflaştırılmıştır (Rajeeva *et al.* 2011).

SDS-PAGE ile *E. faecium* A2 suşundan saflaştırılan lakkaz enziminin saflığı ve molekül kütlesi 50,11 kDa olarak belirlenmiştir. Literatürdeki çalışmalara bakıldığında lakkazların genelde ~50-110 kDa molekül kütlesine sahip olduğu görülmüştür. *Bacillus tequilensis* SN4 (SN4LAC)'dan yeni bir ekstraselüler termo-alkali kararlı lakkazın 32 kDa molekül kütlesine sahip monomerik bir protein olduğu bulunmuştur (CA 2014). Bir başka çalışmada yeni bir lakkaz geni (kotA), *Bacillus licheniformis*'ten klonlanmış ve *Escherichia coli*'de ifade edilmiştir. Enzimin moleküler ağırlığı ~65 kDa olarak bulunmuştur (Koschorreck 2008). Yine beyaz bir rot mantarı *Trametes trogii*'den saflaştırılan lakkaz enziminin, SDS-PAGE ile 64 kDa'lık bir monomerik protein olduğu belirlenmiştir (Ai 2014). *A. gonensis* P39'dan saflaştırılan lakkaz enziminin, 160 kDa molekül kütlesine sahip olduğu belirlenmiştir (Yanmış vd 2015). Jel filtrasyon kromatografisi ile *Brevibacillus sp.*(Z1)'den saflaştırılan lakkaz enziminin 122,02, 93,756 ve 73,790 kDa ağırlığında, 3 alt birim bulunmuştur.

E. faecium A2 suşundan saflaştırılan lakkaz enziminin biyokimyasal özelliklerini belirlemek amacıyla pH ve sıcaklık profili incelenmiştir. Endüstriyel açıdan önemli enzimlerin yüksek pH stabilitesi göstermesi ve kararlı kalabilmesi istenilen önemli özelliklerden biridir. Saflaştırılan A2 lakkaz enziminin yüksek pH aralığında aktivitesini koruduğu bu koşullarda dayanıklı olduğu görülmüştür. *E. faecium* A2 suşundan saflaştırılan lakkaz enzimi için optimum pH 8,0 olarak belirlenmiştir. Yapılan literatür araştırmasında lakkaz aktivitesinin optimum pH'ı 7,5 olarak gözlenmiştir (Chen *et al.* 2013). Diğer bir çalışmada *S. Coelicolor* kaynaklı lakkaz enzimi (SLAC), substrat olarak

2,6-dimetoksifenol (DMP) kullanıldığında maksimum aktivitesini pH 9,0'da göstermiştir (Dubé *et al.* 2008). *E. faecium* A2 suşundan saflaştırılan lakkaz enzimin optimum pH değeri literatürde çok sık rastlanan bir durum değildir. Genelde asidik pH aralığında aktif olan lakkazlara rastlanmıştır. Bununla birlikte maksimum aktivitenin pH 9,0-10,0 gibi bazik aralıklarda olduğu lakkaz enzimleri de bulunmaktadır. Lakkaz enzimlerinin yüksek pH'larda aktivite göstermesi ise bu enzimlerin endüstriyel uygulamaları açısından arzu edilen bir özelliktir (Dubé *et al.* 2008).

E. faecium A2 suşundan saflaştırılan lakkaz enziminin stabil pH profili incelendi. Elde edilen verilere göre grafik oluşturuldu ve lakkaz enzimi için pH 4,0'da 150 dk.' da, %90, pH 8,0' de 60.dk' da %100, pH 9,0'da 60. dk' ya kadar ise aktivitenin %90 oranında korunduğu belirlendi. Literatüre bakıldığında lakkaz enziminin 24 saat pH 9,0'da %75'ten fazla aktivitesini muhafaza ettiği için alkali stabil olarak tespit edilmiştir (Sharmal *et al.* 2014). Başka bir çalışmada pH 10,0'da lakkaz enzimi aktivitesinin 24 saat inkübasyondan sonra orijinal aktivitenin ise yaklaşık %75'inin ise kaldığı tespit edilmiştir (Chen *et al.* 2013). Yine başka bir çalışmada endüstriyel atıksu ile kirlenen topraklardan izole edilen α -proteobakteri üyesi alkalitolerant bir bakteri izolatının ürettiği lakkaz enziminin ise en az 24 saat süreyle pH 3,0-10,6 arasında kararlı olduğu rapor edilmiştir (Bains 2003).

E. faecium A2 suşundan ekstraselüler olarak üretilip saflaştırılan lakkaz enziminin ABTS substratı için optimum pH'da ve 20-90°C aralığında aktivitelerine bakılmıştır. Saflaştırılan lakkaz enziminin optimum sıcaklığı 80°C olarak tespit edilmiştir. Endüstriyel açıdan önemli enzimlerin yüksek sıcaklık stabilitesi göstermesi ve kararlı kalabilmesi istenilen önemli özelliklerden biridir. Saflaştırılan lakkaz enziminin yüksek sıcaklık aralığında aktivitesini koruduğu bu koşullarda dayanıklı olduğu görülmüştür. Literatür incelendiğinde, Dubé *et al.* 2008'de *S. coelicolor*'dan saflaştırdıkları lakkaz enzimini 70°C'deki termostabilitesinin ise oldukça yüksek olduğu rapor edilmiştir. Martins *et al.* 2002 *B. subtilis* en yüksek lakkaz aktivitesini 75°C olarak belirlemiştir.

E. faecium A2' den saflaştırılan lakkaz enzimin stabil sıcaklığına 20 ile 90°C'ler aralığında bakıldığında yapılan araştırmada enzimin her bir sıcaklık aralığında iki saat inkübasyon sonunda aktivitesini %90' nından fazlasını muhafaza ettiği ve geniş bir sıcaklık aralığında stabilitesini koruduğu tespit edildi. Özellikle 60 ve 90°C sıcaklıklarda daha dayanıklı olduğu belirlendi. *A. lipoferum* tarafından üretilen lakkaz enziminin ise 10 dk süreyle 70°C'a kadar kararlı olduğu rapor edilmiştir (Diamantidis *et al.* 2000). *S. lavendulae* tarafından üretilen termostabil bir lakkaz ise 70°C'de 20 dk'lık inkübasyon sonucunda orijinal aktivitesinin tamamını koruduğu belirlenmiştir (Suzuki *et al.* 2003). *S. Cyaneus* tarafından üretilen lakkaz enzimin optimal sıcaklığının ise 70°C olduğu belirlenmiştir. Bu enzimin 40°C'de, 120 dk. inkübe edildiğinde aktivitesinin %100'ünü 50°C'de 120 dk. sonra %75; 60°C'de 60 dk. sonra ise %60 aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Arias *et al.* 2003). Bu tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar *E. faecium* A2 suşundan saflaştırılan lakkaz enziminin sıcaklığa karşı uzun süre oldukça yüksek seviyede bir kararlılık sergilediğini göstermektedir ve literatürdeki diğer çalışmalar ile karşılaştırıldığında sıcaklığa toleransının oldukça fazla olduğu açıktır. *E. faecium* A2 saflaştırılan lakkaz enziminin yüksek sıcaklıklarda uzun süreli kararlı kalabilmesi bu enzimin endüstriyel açıdan oldukça önemli bir enzim olduğunu göstermektedir.

E. faecium A2 'den saflaştırılan lakkaz enzimi için ABTS varlığında kinetik parametreleri K_m ve V_{max} değerleri Lineweaver-burk grafiği kullanılarak sırasıyla 0,376 mg/ml ve 5,29 $\mu\text{mol}.\text{ml}^{-1}.\text{dk}^{-1}$ olarak hesaplandı. *Brevibacillus sp.* (Z1)'den ekstraselüler olarak üretilip saflaştırılan lakkaz enziminin 25°C ve pH: 4,0'de ABTS substratı için V_{max} ve K_m değerleri sırasıyla 14,08 EU/mL.dak ve 5,34 mM olarak bulunmuştur (Bozoğlu,2014). Diğer bir çalışmada rpCotA (SL-1) lakkazının indüklediği oksidasyon reaksiyonları için kinetik K_m ve k_{cat} parametreleri, ABTS için 46 μM ve 23s^{-1} , ve SGZ için 19,6 μM ve 24s^{-1} bulunmuştur (Safary *et al.* 2016). Diğer bir çalışmada V_{max} ve K_m değerleri sırasıyla 0,442 $\mu\text{mol}/\text{dak}.\text{mg}$ ve 0,077 mM olarak hesaplanmıştır (Yanmış vd 2016). Başka bir çalışmada çeşitli lakkaz substratları için ABTS, SGZ ve 2,6-DMP için kinetik sabitler ABTS için $6,5\pm 0,2 \mu\text{M}$, SGZ için $4,3\pm 0,2 \mu\text{M}$ ve 2,6-DMP için $56,7\pm 1,0 \mu\text{M}$ olarak bulunmuştur (Koschorreck *et al.* 2008). Arıca vd *Rhus vernicifera* lakkazı ile yaptıkları

çalışma sonucu immobilize enzim için K_m değerini 0.47 mM; V_{max} değerini 77.6 U/mg protein olarak belirlemişlerdir

Metal iyonları lakkaz üretiminde karakterize edilmesi gereken önemli bir parametredir. Tez kapsamında *E. faecium* A2 suşundan saflaştırılan lakkaz enzimine metal iyonlarının etkisi incelendiğinde Ag^+ , Cr^{2+} metallerinin 1 mM'a kadar olan konsantrasyonlarının enzim aktivitesini artırdığı, diğer metal iyonlarının varlığında ise %75'in üzerinde aktivitesini koruduğu tespit edildi. Özellikle Cu^{2+} iyonu aktivitenin 4 katına çıkmasını sağlamıştır. Endüstriyel proseslerde çeşitli metal iyonlarının yüksek oranda kullanımı nedeniyle, bu iyonlara karşı dayanıklı enzimler yine bu alanda avantaj sağlar. Yapılan literatür taramasında *Bacillus tequilensis* SN4 (SN4LAC)'dan saflaştırılan lakkaz lakkaz enzimin başta Cu^{2+} , Co^{2+} olmak üzere diğer metal iyonlarının çoğunda kararlı olduğu bulunmuştur (CA 2014).

E. faecium A2 suşundan saflaştırılan lakkaz enzim aktivitesi üzerine bazı inhibitörlerin etkisinin belirlenmesi amacıyla; EDTA, SDS, sodyum florid, sodyum azid kullanıldı. Tez kapsamında inhibitörlerin aktiviteyi artırıcı etkisinin olduğu saptanmıştır. varlığında ise enzimin aktivitesinin yeniden restore edildiği rapor edilmiştir. Literatürde aynı duruma inhibitör etkisindeki SDS ile rastlanmıştır. Bu durum, enzim ile ilişkisi bulunan zorunlu bir faktörün kromatografik işlemler esnasında enzimden ayrılmış olabileceğini ve bu faktörün SDS tarafından yedeklenmiş olabileceği yönünde değerlendirilmiştir (Paloheimo 2004). Literatür araştırılmasında rekombinant lakkaz aktivitesine inhibitörlerin etkisi, sonra 0,1 mM sodyum azid, 1 mM sodyum florür, 1 mM L-sistein, 1 mM SDS ve 1 mM EDTA ile enzimin 5 dakika 30°C'de inkübasyonundan kullanılarak test edilmiştir. Buna göre sodyum azidin %96.75, sodyum florid %90.2, L-sistein %99.14, SDS'nin ise %90 oranlarında inhibisyona sebep olmuştur (Gür 2010). DTT, indirgeyici bir maddedir, bu nedenle lakkaza bir elektron verir ve bu nedenle O_2 indirgemesi için bir elektron elde etmek üzere substratları oksitleyemediği ortaya çıkmıştır. DTT gibi bir başka indirgeyici ajan olan L-sistein, tip 1 Cu merkezi yoluyla katalizi durdurmak için enzime bağlanabildiği, lakton aktivitesi çeşitli inhibitörler tarafından azaltıldığı ve 0.1 mM sodyum azit ve 5 mM L-sistein ile tamamen inhibe edildiği rapor edilmiştir. 1 mM

L-sistein ve 2 mM DTT, lakkaz üzerinde %95 inhibisyon gösterdiği, sodyum florür, %98 inhibisyona neden olduğu görülmüştür (Hunger 2003).

Tez kapsamında *E. faecium* A2 suşundan saflaştırılan lakkaz enziminin aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisi incelendiğinde enzimin organik çözücüler varlığında önemli derecede kararlılık gösterdiği tespit edilmiştir. *t*-bütanol, izopropanol, metanol, DMSO, etanol ve aseton gibi organik çözücülerin %15-%50'lik konsantrasyonlarda lakkaz enzimi üzerine etkisi araştırıldı. %15-50'lik konsantrasyonda tüm organik çözücülerde enzim aktivitesinin arttığı belirlendi. Özellikle DMSO, aseton, *t*-bütanol ve etanolün %15'lik konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin çok daha yüksek olduğu gözlemlendi. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde endüstride organik çözücü kullanımına çok fazla rastlanması nedeniyle kullanılan organik çözücülere karşı lakkaz enziminin kararlılığını koruması avantaj olarak görülmektedir.

Tez kapsamında *E. faecium* A2 suşundan saflaştırılan lakkaz enziminin üzerine yüzey aktif maddelerin etkisini ve okside edici ajanın etkisini incelemek için %1-5'lik konsantrasyonlarda SDS, Tween-20, Tween-80, Triton-X-100 ve H₂O₂ kullanılmıştır. Enzimin bu maddeler karşısında dayanıklı olduğu aktivitesinde yükselme olduğu gözlemlenmiştir. Tekstil atık sularına bu maddelerin karışması lakkaz enzim aktivitesini düşürmediğinden, biyoremediasyon çalışmalarında lakkazların kullanımını sınırlandırmadığı tespit edilmiştir. Literatürde lakkaz enzimi üzerine yüzey aktif maddelerinin etkisinin araştırılması ile ilgili yapılan bir çalışmada 0.1-1,0 mM konsantrasyonlarındaki yüzey aktif maddeleri (triton X-100, tween-20, tween-80), anyonik (SDS), katyonik (CTAB) kullanılmıştır. Enzimin aktivitesinin SDS ve CTAB ile önemli ölçüde arttığı, diğer yüzey aktif maddelerin çoğunda kararlı olduğu belirlenmiştir (Sharmal 2014).

E. faecium A2'den saflaştırılan lakkaz enziminin doğal substratlara olan spesifitesini belirlemek amacıyla 2,6 dimetoksifenol, guaikol ve ABTS substratların kullanılmasıyla yapılan aktivite ölçümleri sonucunda enziminin en iyi guaikol varlığında aktivite gösterdiği tespit edildi. Lakkazlar , çok çeşitli oksidasyon substratlarının nedeniyle

endüstriyel uygulamalar için büyük bir potansiyele sahiptir; Bu nedenle, birçok araştırmacı, yeni lakkaz genlerini klonlamaya ve aktivitelerini ve stabilitelelerini iyileştirmeye çalışmıştır (Ma 2018). Literatür taramasında lakkaz substratlarının aktivite üzerine etkisi incelendiğinde SN4LAC'ın, fenolik olan ve aynı zamanda fenolik olmayan substratlarda aktiviteleri incelenmiştir (ABTS, Şiringalzadin, 2,6-DMP, guaikol). Yapılan araştırmalar sonuunda en iyi aktivite gösteren substratın 2,6-dimetoksifenol olduğu belirlenmiştir (Sharmal et.all.,2014). Başka bir çalışmada çeşitli substratlar varlığında lakkaz aktivitesine bakılmıştır ve lakkaz ABTS ve syringaldazin'e karşı yüksek afinite sergilemiştir (Ai *et al.* 2015).

Tez kapsamında *E. faecium* A2'den saflaştırılan lakkaz enzimini kullanarak çevre kirliliğine tekstil boyalarının giderimine etkisini incelemek için asit siyah L, kongo kırmızı, metilen mavisi, turuncu, asit kırmızı 27, asit siyah 5 boya ları kullanıldı. Boyaların 15, 30, 45, 60 dk. sonunda yapılan ölçümlerinde etkili bir boya giderimi gerçekleştiğini göstermektedir. Renk değişiminin gerçekleşmesinin oksokromların pozisyonları ve sayılarındaki değişim ile de ilişkili olduğu ifade edilmektedir (Park 2007). Moorhti, boyaların renk gideriminin lakkaz üretimine, besi ortamına ve boyaların türüne bağlı olduğunu belirtmiştir (Moorhti 2007). Elde edilen sonuçlara göre en yüksek boya gideriminin asit kırmızı 27 boyasında %40 oranında olduğu görülmüştür. Literatürde *P. pastoris* konakçısında üretilen rekombinant lakkaz PsLcc2 enzimi ile renk giderimi yapılmıştır. Bu kapsamda (Azo ve Triarilmetan sınıfı boya grubuna ait) 7 farklı boya kullanılmıştır. Dekolorizasyon çalışmalarında lakkaz enzimi tek başına kullanıldığı gibi üç farklı medyatörle birlikte lakkaz-medyatör sistemi kurularak da çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda sentetik medyatör olarak ABTS, doğal medyatörler olarak da şiringalzedin ve p-kumarik asit kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda rekombinant lakkaz Pslcc2 enzimi ile beraber kullanılan medyatörlerin söz konusu yedi boya üzerindeki renk giderim verimini bir hayli arttırdığı tespit edilmiştir (Malcı 2017). Bu çalışma ile medyatörlerin lakkaz oksidasyon potansiyelini artırıcı etkisi görülmüştür. *E. faecium* A2 izolatından saflaştırılan lakkaz enziminin medyatör kullanmadan %40 oranında renk gideriminde etkin olmasının önemli olduğu düşünülmektedir. Bu da *E. faecium* A2 izolatından saflaştırılan lakkaz enziminin biyoremediasyon çalışmalarında

etkin olarak kullanılabilceğini göstermektedir. Literatür de lakkaz enzimi üzerine boyar maddelerin araştırılması ile ilgili yapılan bir çalışmada 180 dk sonunda enzimin Reaktif Siyah 5 boyar maddesini %66 oranında azalttığı belirlenmiştir. Enzim 180 dk. sonunda Fuksin' i %50.8, Allura Kırmızısını %53.6 ve Asit Kırmızısı 37'i ise %47.3 oranında azalttığı bulunmuş ve elde edilen bulguların literatür verileriyle uyum içerisinde olduğu gözlenmiştir (Si and Cui 2013). Literatürdeki bir başka çalışmada, tekstil boyalarının uzaklaştırılması değerlendirilmiş ve lakkaz Reaktif Siyah, Fuchsine, Allura Red ve Acid Red 37 boyalarını sırasıyla 22,1, 5,96, 1,34 ve 1,15% düşürdüğü, böylece *A. gonensis P39* atıksu bioremediasyonu için başarıyla kullanılabilceği rapor edilmiştir (Yanmış vd 2015). Yine başka bir çalışmada, boya konsantrasyonunun 55,6 mg L⁻¹, enzim miktarının 0,76 mL ve reaksiyon süresinin 46,91 dakika olduğu koşullarda, en yüksek renk gideriminin %98 oranında Reaktif Mavi 49' da olduğu tespit edilmiştir (Çabuk vd 2014). Başka bir çalışmada yenilebilir bir mantar olan *Ganoderma sp.*'den elde edilen lakkazın RB-19'un rengini 30°C'de, beş saatte %80 oranında giderdiğini bildirmişlerdir. Cristovao *et al.* adsorbsiyon tekniği ile yeşil hindistan cevizi kabuğuna immobilize ettikleri ticari lakkazın Reaktif Sarı (15, 176), Reaktif Kırmızı (239, 180), Reaktif Siyah-5 ve Reaktif Mavi 114 boyarmaddelerinin rengini giderme etkilerini incelemiştir (Khammuang *et al.* 2007). *Trametes versicolor*'dan elde edilen lakkaz enziminde ise 55°C'de (pH 4.0) 75 mg/L derişimli kot boyarmaddesinin rengini 120 dakikada %68.02 oranında giderildiği rapor edilmiştir (Gedikli vd 2011).

Sonuç olarak bu tezde kullanılan, termotolerant özellikteki *E. faecium* A2 suşunun yüksek oranda lakkaz aktivitesine sahip olduğu görüldü. Yapılan literatür taramaları sonucunda bu suştan lakkaz enzimi üretimi, karakterizasyonu ve endüstriyel anlamda kullanılabilme potansiyelinin araştırılması ilk defa çalışıldı. *E. faecium* A2 suşundan lakkaz enzimi saflaştırılması TPP yöntemiyle gerçekleştirildi. Bunun sonucunda pH: 6,0'da, 1,0:2,0 (ham enzim çözeltisi:t-bütanol oranı) ve %70 doygun amonyum sülfat kullanılarak uygulanan TPP yöntemi ile enzim, %64,59 verimle 0,95 kat saflaştırıldı. Enzimin optimum sıcaklık ve optimum pH'sı sırasıyla 80°C ve 6,0 olarak belirlendi. Enzimin pH stabilitesine bakıldığında 7,0 ile 9,0 aralığında kararlılığını muhafaza ettiği, sıcaklık stabilitesi için 20-80°C aralığına bakıldığında ise bu enzimin tüm aralıklarda %90

oranında aktivitesinde kararlılık olduğu tespit edildi. Enzim metal iyonları ile muamele edildiğinde Cu^{2+} başta olmak üzere genelde aktivitesinin korunduğu gözlemlendi. İnhibitör ve organik çözücü muamelelerinde enzimin yine kararlılığını muhafaza ettiği tespit edildi. Endüstriyel atık sularında sıkça rastlanan problemlerden biri olan boyar maddelerin giderimi için yapılan deney sonucunda saflaştırılan A2 enziminin boyar madde gideriminde etkin olabildiği görüldü.

KAYNAKLAR

- Adıgüzel A., 2006. Bazı Termal Tesislerden Alınan Su Örneklerinden İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Adıgüzel G., 2008. Fermente Türk Sucuğundan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Fenotipik Ve Genotipik Yöntemlerle Karakterizasyonu.
- Alcalde M., 2007. Laccases: Biological functions, molecular structure and industrial applications, industrial enzymes structure, function and applications, J. Poliana, AP. MacCabe (Eds), Springer, Netherlands, 461-70.
- Alexandre G., Zhulin, I.B., 2000. "Laccases are widespread in bacteria", Trends Biotechnol.,18 41-42.

- Altındağ G. İ., 2013. Modifiye Kitosan Türevlerinde İmmobilize Edilen Lakkaz İle Boya Gideriminin İncelenmesi Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa.
- Arias M. E., 2003. Arenas M., Rodríguez J., Soliveri J, Ball AS, Hernández M. Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Appl Environ Microbiol.*; 69: 1953–58
- Arslan S., 2016. Türkiye'nin Farklı Yörelere Toplanan Beyaz Peynir Örneklerinden aktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Erzurum.
- Atav R., Karaboğa S.E., 2017. Proteazlarla Enzimatik Modifikasyon Yoluyla İpek Liflerinin Boyanabilirliğinin Geliştirilmesi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, No: 015301- 138-146.
- Azam S., Rezvan M., Maryam H., Siavoush D., 2016. A strategy for soluble overexpression and biochemical characterization of halo-thermotolerant *Bacillus laccase* in modified *E. Coli*. *Journal of Biotechnology* 227, 56–63
- Bains J., Capalash N., Sharma, P., 2003. Laccase from a nonmelanogenic, alkalotolerant-proteobacterium JB isolated from industrial waste water drained soil. *Biotechnol Lett.*; 25: 1155–59.
- Bayraktar H., 2011. α -Galaktozidaz Enziminin Üçlü Faz Sistemi ile Saflaştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Bornova - İzmir
- Bekler F. M., 2017. Türkiye'deki Dibekli Sıcak Su Kaynağından Termofilik *Geobacillus sp. DB2* Suşunun Fizyo-Biyokimyasal Karakterizasyonu ve 16S rRNA Sekanslaması, Iğdır Üni. Fen Bilimleri Enst. Der. / Iğdır Univ. J. Inst. Sci. & Tech. 7(1): 63-71,
- Bourbonnais R. E., Paice M. G., 1992. "Demethylation and delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor* laccase in the presence of 2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline- 6-sulphonate)", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36 823–827.
- Bozoğlu C., 2014. Ağrı Diyarın Kaplıcasından İzole Edilen Termofilik *Brevibacillus sp. (Z1)* Bakterisinden Lakkaz Enziminin Saflaştırılıp, Karakterize Edilmesi ve Endüstride Kullanılabilirliğinin Araştırılması, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi
- Cantarelli C., Brenna O., Giovanelli G., Rossi M., 1989. Beverage stabilization through enzymatic removal of phenolics. *Food Biotechnol.*; 3: 203-13.
- Carson C. A., Shear, B. L., Eilersieck M. R., Schnell J. D. 2003. Comparison of ribotyping and repetitive extragenic palindromic-PCR for identification of fecal *Escherichia coli* from humans and animals. *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 1836–1839.
- Cheng-Yu C., Yu-Chun H., Chien-Mei W., Menghsiao M., Wen-Hsiung L., Chao-Hsun Y., 2013. Properties of the newly isolated extracellular thermo-alkali-stable laccase from thermophilic actinomycetes, *Thermobifida fusca* and its application in dye intermediates oxidation *Chenet al. AMB Express*, 3:49 <http://www.amb-express.com/content/3/1/49>
- Claus H., Faber G., König H., 1999. "Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59 (2002)672–678.
- Çabuk A., Gedikli S., Aytar P., Buruk Y., Apohan E., Yeşilada Ö., Burnak N., 2014. *Trametes versicolor* ile lakkaz üretimi ve renk giderimi: Taguchi ve Box-Behnken

- Yöntemlerinin uygulaması. *Türk Biyokimya Dergisi, Turk J Bioch.* 39(3): 298-306 | DOI: 10.5505/tjb.2014.62533
- Çetinkaya E., 2011. Gıdalardan izole edilen *Enterobacter* sp. ve *Cronobacter sakazakii* suşlarının biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle tanımlanması. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 88s.(Basılmamış).
- Decker H., Terwilliger N., 2000. "Cops and robbers: putative evolution of copper oxygen-binding proteins", *J. Exp. Biol.*, 203, 1777–1782.
- Demiralp B., Büyük İ., Aras S., Cansaran-Duman D., 2015. Lakkaz enziminin endüstriyel ve biyoteknoloji alanında kullanımı, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*
- Dubé E., Shareck F., Hurtubise Y., Daneault C., Beauregard M., 2008. Homologous cloning, expression, and characterisation of a laccase from *Streptomyces coelicolor* and enzymatic decolourisation of an indigo dye. *Appl Microbiol Biotechnol.*; 79(4): 597-603.
- Duman Y., 2016. Üçlü Faz Ayrımı (ÜFA) ile Geleneksel Enzim Saflaştırma Tekniğinin Karşılaştırılması; ÜFA ile Saflaştırılan β -Galaktosidazın Termodinamik Özellikleri, *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*
- Durán N., Esposito E., 2000. "Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review", *Appl. Cat. B: Environ.*, 28, 83- 99.
- Enguita F. J., Martins L. O., Henrique A. O., Carrondo M. A., 2003. "Crystal structure of a bacterial endospore coat component: a laccase with enhanced thermostability properties", *J. Biol. Chem.*, 278 (21), 19416–19425.
- Garrity G. M., Holt J. G., 2001. The road map to the manual, p. 119–166. In G. M. Garrity (ed), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer-Verlag, New York, N.Y.
- Gedikli S., Aytar, P., Çabuk, A., Ünal A., Kolankaya N., 2011. Lakkaz Enzimi ile Kot Boyarmaddesinin Dekolorizasyonu. *A.Ü. Dergileri, Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi C - Yaşam Bilimleri ve Teknoloji* Cilt.01 Sayı.1
- Güven R. G., 2011. Termofilik Bakteriler ve Biyoteknolojik Açından Önemli Bazı Enzimleri. Eski adı: *OrLab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, Yıl: 2011 Cilt: 09 Sayı: 1 Sayfa: 1-10
- Harley J. P., Prescott L. M., 2002. *Laboratory Exercises in Microbiology*, Fifth Edition New York: The McGraw–Hill Companies, 466p.
- Harmsen D., Karch H., 2004. 16S rDNA for diagnosing pathogens: a living tree. *Am. Soc. Microbiol. New.*, 70: 19–24.
- Johnvesly B., Naik, G. R., 2001. Studies on Production of Thermostable Alkaline Protease from Thermophilic and Alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a Chemically Defined Medium. *Process Biochemistry*, 37, 139-144.
- Karam J. , Nicell J. A. 1999. Potential Applications of Enzymes in Waste Treatment.
- Katı H., Karaca B., Gülşen Ş. H., 2016. *SAÜ Fen Bilimleri Dergisi* Sayı:2 No:281-290.
- Kazan D., Denizci A. A., Kerimak Ö.M.N., Eraslan A., 2005. Purification and characterization of a serine alkaline protease from *Bacillus clausii* GMBAE-42. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 32:335-344.

- Khammuang S., Sarnthima R., 2007. Laccase from Spent Mushroom Compost of *Lentinus polychrous* Lev. and its Potential for Remazol Brilliant Blue R Decolorisation , *Biotechnology*, 6(3): 408-413.
- Kıran F., Osmanoğlu, Ö., 2011. Laktik asit bakterilerinin identifikasyonunda kullanılan moleküler yöntemler. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 27: 62-74.
- Kolbert C.P., Persing D.H., 1999. Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2: 299–305.
- Koschorreck K., Richter S. M., Swierczek A., Beifuss U., Schmid R. D., Urlacher V. B. ,2008. Comparative characterization of four laccases from *Trametes versicolor* concerning phenolic C-C coupling and oxidation of PAHs. *Arch Biochem Biophys.* ;3(1):213–219.
- Kumar V. V., M.P. P. Kumar, K. V. Thiruvankadaravi P., Baskaralingam P., Senthil K., Sivanesan S., 2012. Preparation and characterization of porous cross linked laccase aggregates for the decolorization of triphenyl methane and reactive dyes. *Bioresource Technology* 119, 28–34
- Kurt Gür G., 2010. Cloning Of The Laccase cDNAs From *Pycnoporus Sanguineus* Mucl 38531, Expression In *Pichia Pastoris* And Characterization Of Recombinant Laccase, Istanbul Technical Universty Institute Of Science And Technology. Ph.D. Thesis
- Kutlu P., 2015. Modifiye Kitosan Kompozitleri Üzerinde Lakkaz İmmobilizasyonu, Karakterizasyonu ve İmmobilize Enzim ile Tekstil Boyalarının Giderim Kinetiğinin İncelenmesi Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimler Enstitüsü, MANİSA
- Laemmli D. K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the heat of bacteriophage T4. *Nature*, London, 227,680
- Li K., Xu F., Eriksson K.E., 1999. Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65:2654-2660.
- Liu, Y., Yan M., Huang, J., 2015. Three-Phase Partitioning for Purification of Laccase Produced by *Corioloropsis trogi* under Solid Fermentation. *American Journal of Food Technology* 10 (3): 127-134, 2015 ISSN 1557-4571 / DOI: 10.3923/ajft.127.134
- Lupski J. R., Weinstock G.M., 1992. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *Journal of Bacteriology*. 174, 4525– 4529.
- Malcı K., 2017. İstanbul Teknik Üniversitesi / Fen Bilimleri Enstitüsü / Moleküler Biyoloji-Genetik ve Biyoteknoloji Anabilim Dalı.
- Martins L. O., Soares C. M., Pereira M. M., Teixeira M., Costa T., Jones G. H., Henriques A.O., 2002. Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *J. Biol. Chem*, 277(21): 18849–18859
- Mate D., Garcı a-Ruiz E., Camarero S., Alcalde M., 2011. Directed evolution of fungal laccases. *Curr Genomics* 12(2):113-22.
- Ming-Qiang Ai., Fang-Fang W., Feng H., 2015. Purification and Characterization of a Thermostable Laccase from *Trametes trogi* and Its Ability in Modification of Kraft Lignin *J. Microbiol. Biotechnol.* 25(8), 1361–1370 <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1502.02022> Research Article *jmb*.

- Moorthi P. S., S. Periyar Selvam, A. Sasikalaveni, K. Murugesan, P.T. Kalaichelvan, 2007. Decolorization textile dyes and their effluent using white rot fungi, *African J Biotech*6, 424-429.
- Morozova O. V., Shumakovich G. P., Shleev S. V., Yaropolov Y. I., 2007. Laccasemediator systems and their applications, *Applied Biochemistry and Microbiology*, vol:43, 5:523-35.
- Murugesan R., Vembu B., 2016. African Journal of BioteFull Length Research PaperProduction of extracellular laccase from the ne isolated *Bacillus sp. PK4* *Biochemistry*,31 Vol. 15(34), pp. 1813-1826, 24
- Mustafa R., Muniglia L., Rovel B., Girardin M., 2005. Phenolic colorants obtained by enzymatic synthesis using a fungal laccase in a hydroorganic biphasicsystem. *Food Res Int*, 2005. 38: 995-1000.
- Nyanhongo G. S., Rodríguez Couto S., Gübitz G. M., 2006. Coupling of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) metabolites onto humic monomers by a new laccase from *Trametes modesta*. *Chemosphere*, 2006; 64(3): 359-70.
- Özden S., 2014. *Bacillus subtilis* (RSKK-11014)'den proteaz enziminin saflaştırılması, aktivitesinin tayini ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gazi Üniversitesi, Ankara.
- Öztürk S., 2007. Ülkemizden izole edilen *Bacillus licheniformis* BA17'den Elde Edilen Alkaken Proteaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Marmara Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.
- Park C., Lee M., Lee B., Seung-Wook K., Chase H. A., Lee J., Kim S., 2007. Biodegradation and biosorption for decolorization of synthetic dyes by *Funalia trogii*, *Biochem Eng J*, 36, 59/65
- Paloheimo M., Valtakari L., Puranen T., Kruus K., Kallio J., Mantyla A., Fagerstrom R., Ojapalo P., Vehmaanpera J., 2004. Novel laccase enzyme and use thereof, USPTO Applicaton #: 20060063246 - Class: 435183000 (USPTO), 21.9.
- Pfister P., Risch M., Brodersen D.E., Bottger E.C., 2003. Role of 16S rRNA helix 44 in ribosomal resistance to hygromycin B. *Antimicrob. Agents Ch.*, 47: 1496–1502.
- Piard J., Hau Rahman R., Geok L., Basri M., Salleh A., 2006. An organic solvent-stable alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain K: Enzyme purification and characterization. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 1484-1491
- Rajeeva S., Lele S.S., 2011. Three-phase partitioning for concentration and purification of laccase produced by submerged cultures of *Ganoderma sp. WR-1*. Food Engineering and Technology Department, Institute of Chemical Technology, Nathanlal Parekh Marg, Matunga, Mumbai 400 019, India
- Rao J. L., U. M. Satyanarayana, Aool T., 2008. *Biochem. Biotechnol.* 150, 205-219.
- Reinhammar B. R. M., 1972. Oxidation-Reduction potentials of the electron acceptors in laccases and stellacyanin, *Biochim. Biophys. Acta.*,vol. 275, 2, pp. 245–259.
- Robinson T., McMullan G., Marchant R., 2001. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative, *Bioresour. Technol.*, 77 247.
- Setti L., Giuliani S., Spinozzi G., Pifferi P.G., 1999. Laccase catalyzed oxidative coupling of 3-methyl 2-benzothiazolinone hydrazone and methoxyphenols. *Enzyme Microb Technol*, 25: 285–89.

- Shah K., Mody K., Keshri J., Jha B., 2010. Purification and characterization of a solvent, detergent and oxidizing agent tolerant protease from *Bacillus cereus* isolated from the Gulf of Khambhat. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 67, 85-91
- Sjoblad R. D., Bollag J. M., 1981. Oxidative coupling of aromatic compounds by enzymes from soil microorganisms, In *Soil Biochemistry*, Paul, E.A., Ladd, J.N. Ed. Marcel Dekker, Inc., New York, USA, 5 113–152.
- Solomon E. I., Sundaram U. M., Machonkin T.E., 1996. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.*, vol. 96, no. 7, pp. 2563–2606.
- Sondhi S., Sharma P., Saini S., Puri N., Gupta N., 2008. Purification and Characterization of an Extracellular, Thermo-Alkali-Stable, Metal Tolerant Laccase from *Bacillus tequilensis* SN4. *Plos one*
- Suzuki T., Endo K., Iro M., Tsujibo H., Miyamoto K., Inamori Y., 2003. A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: Purification, chracterization, nucleotide sequence, and expression. *Biosci Biochem.*; 67: 2167–75.
- Thurston F. C., 1994. The structure and function of fungal laccases, *Microbiology* 140: 19-26, doi: 10.1099/13500872-140-1-19
- Tortoli E., 2003. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin. Microbiol. Rev.*, 16: 319–354
- Tuncay D., 2014. Trakya Bölgesinde Yetişen *Boletus Edulis* Mantarından İzole Edile Lakkaz Enziminin Çeşitli Desteklere İmmobilizasyonu ve Tekstil Atıksularındaki Boyarmaddelerin Renksizleştirilmesinde Kullanılması. EDİRNE
- Tuncer M., 2010. Lakkaz, Kısım 1: Yapısı, Katalitik Özellikleri ve Dağılımları, Mersin Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, MERSİN
- Wang G., Xie T., Liu Z., Liu Q., 2015. Structural insight into the oxidation of sinapic acid by CotA laccase. *Journal of Structural Biology* journal homepage: www.elsevier.com/locate/yjsbi
- Wang S., Chen Q., Zhu M., Xue F., Li W., Zhao T., Li G., Zhang G., 2018. An extracellular yellow laccase from white rot fungus *Trametes* sp. F1635 and its mediator systems for dye decolorization. *Biochimie* 148 46e54
- Wong K.S., Huang Q., Au C.H., Wang J., Kwan H.S., 2012. Biodegradation of dyes and polyaromatic hydrocarbons by two allelic forms of *Lentinula edodes* laccase expressed from *Pichia pastoris*. *Bioresource Technology*, 104: 157–64.
- Yanmış D., Adıgüzel A., Nadaroğlu H., Güllüce M., Demir N., 2015. Purification and Characterization of Laccase from Thermophilic *Anoxybacillus Gonensis* P39 and its Application of Removal Textile Dyes. *Romanian Biotechnological Letters*, Vol. 21, No. 3, 11485
- Yıldırım V., 2014. *Aeribacillus pallidus* C10'dan Alkalın Proteaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulanılabilirliği Atatürk Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi
- Yüce S., Tahtacı S., Kılıç G. B., 2017. Halofilik Laktik Asit Bakterilerinin Ürettiği Hidrolitik Enzimler.

ÖZGEÇMİŞ

27.05.1993 yılında Iğdır' da doğdu. ilk, orta ve lise öğrenimini Iğdır' da tamamladı. 2012 yılında girdiği Erzurum Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü' nden 2016 yılında mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı.

