

**AĞRI DİYADİN KAPLICASINDAN İZOLE EDİLEN  
TERMOFİLİK *Brevibacillus sp.* (Z1) BAKTERİSİNDEN  
LAKKAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILIP,  
KARAKTERİZE EDİLMESİ VE ENDÜSTRİDE  
KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Ceyda BOZOĞLU**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı**

**Doç. Dr. Ahmet ADIGÜZEL**

**2014**

**Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AĞRI DİYADİN KAPLICASINDAN İZOLE EDİLEN TERMOFİLİK  
*Brevibacillus sp. (Z1)* BAKTERİSİNDEN LAKKAZ ENZİMİNİN  
SAFLAŞTIRILIP, KARAKTERİZE EDİLMESİ VE ENDÜSTRİDE  
KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Ceyda BOZOĞLU

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANA BİLİM DALI

ERZURUM  
2014

Her hakkı saklıdır



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

AĞRI DİYADİN KAPLICASINDAN İZOLE EDİLEN TERMOFİLİK *BREVIBACILLUS*  
*SP. (Z1)* BAKTERİSİNDEN LAKKAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILIP,  
KARAKTERİZE EDİLMESİ VE ENDÜSTRİDE KULLANILABİLİRLİĞİNİN  
ARAŞTIRILMASI

Doç. Dr. Ahmet ADIGÜZEL danışmanlığında, Ceyda BOZOĞLU tarafından hazırlanan bu çalışma 22/01/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak ~~oybirliği/oy çokluğu~~ (3./3) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN  
Üye : Doç. Dr. Ahmet ADIGÜZEL  
Üye : Doç. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU

İmza :

İmza :

İmza :

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU  
Enstitü Müdürü

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

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### AĞRI DİYADIN KAPLICASINDAN İZOLE EDİLEN TERMOFİLİK *Brevibacillus sp.* (Z1) BAKTERİSİNDEN LAKKAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILIP, KARAKTERİZE EDİLMESİ VE ENDÜSTRİDE KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Ceyda BOZOĞLU

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Bu tezde, Ağrı/Diyadin kaplıcasından izole edilen, konvensiyonel ve moleküler yöntemler kullanılarak karakterize edilen *Brevibacillus sp.* (Z1) (Gen Bank No:KC292196.1) bakterisinden ekstraselüler lakkaz enzimi sırasıyla; amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE sefadeks iyon değişim kromatografisi ve sephadex G100 jel filtrasyon kromatografisi basamakları kullanılarak saflaştırıldı. Saflaştırılan enzimin optimum pH, optimum sıcaklık,  $V_{max}$ - $K_m$  değerleri, ayrıca sıcaklık ve pH stabiliteyi belirlendi. Enzimin ABTS, 2,6-dimetoksifenol ve guaikol substratlarına karşı substrat spesifikliğı belirlendi. Enzim üzerine  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  ve  $Fe^{2+}$  gibi bazı metal iyonlarının ve EDTA, sodyum azid, dithioeritrol ve SDS gibi bazı kimyasalların etkisi araştırıldı. Saflaştırılan lakkaz enziminin endüstriyel süreçlerde ve de çevresel atıkların biyolojik olarak yıkımında kullanılabilirliğinin araştırılması amacıyla ticari olarak satılan ve tekstilde kullanılan bazı boya ların enzimatik olarak dekolorizasyonu çalışıldı. Gerçekleştirilen deney sonucunda elde edilen verilere göre; lakkaz enziminin optimum pH'sı 4.0, optimum sıcaklığını 60°C, moleköl ağırlığı 122.02, 93.756 ve 73.790 kDa büyüklüğünde, 3 alt birimden oluştuğı tespit edildi. ABTS ve 2,6-dimetoksifenol substratları için  $V_{max}$  değerleri sırasıyla 14.08 EU/mL.dak., 16.12 EU/mL.dak.,  $K_m$  değerleri ise ABTS, 2,6-dimetoksifenol substratları için sırasıyla 5.34 mM ve 3.03 mM olarak hesaplandı. *Brevibacillus sp.* (Z1)'den ekstraselüler olarak üretilip saflaştırılan lakkaz enzimini kullanarak çevre kirliliğine sebep olan Reaktif Siyah 5, Fuksin, Allura Kırmızısı ve Asit Kırmızısı 37 gibi bazı tekstil boya larının giderilmesinde kullanılabilirliği araştırıldı. Enzimin Reaktif Siyah 5, Fuksin, Allura Kırmızısı ve Asit Kırmızısı 37 boya larının 3 saat sonunda %66.0, %50.8, %53.6 ve %47.3 oranında azalttığı belirlendi.

**2014, 113 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Lakkaz, Moleküler karakterizasyon, *Brevibacillus sp.*, Dekolorizasyon, Saflaştırma, Karakterizasyon

## ABSTRACT

Master Thesis

### PURIFICATION OF LACCASE ENZYME OF THERMOPHILIC *Brevibacillus sp.* ISOLATED FROM AĞRI DİYADİN HOT SPRING AND DETERMINATION OF POTENTIAL INDUSTRIAL USAGE OF THE ENZYME

Ceyda BOZOĞLU

Atatürk University

Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Molecular Biology and Genetic

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ahmet ADIGUZEL

In this thesis, thermophilic bacterial isolates were obtained from Ağrı/Diyadin hot spring. Then, the laccase activities of these isolates were investigated to find the isolate, which has the highest laccase activity. The isolate with the highest laccase activity was identified as *Brevibacillus sp.* (GEN BANK NO: KC292196.1) by using conventional and molecular methods. The extracellular laccase enzyme of *Brevibacillus sp.* was purified by using respectively ammonium sulfate precipitation, DEAE cellulose ion exchange chromatography and Sephadex G100 gel filtration chromatography steps. Optimum pH, optimum temperature, V<sub>max</sub>-K<sub>m</sub> values and separately temperature and pH stabilities of the purified enzyme were determined. The substrate specificity of the enzyme was determined against to the substrates of ABTS, 2,6-dimethoxyphenol and guaiacols. The influence of some metal ions Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> and Fe<sup>2+</sup> some chemicals such as EDTA, sodium azide, dithioeritrol, SDS on the enzyme was studied. With the purpose of the investigation of the purified laccase enzyme in industrial processes and also in the biological breakdown of environmental waste, decolorising enzymatically of some dyes which are available in textile and commercially was studied. According to the data obtained as a result of the performed experiments, it has been detected that the optimum pH of laccase enzyme is 4.0, its optimum temperature is 60°C and its molecular weight is 122.02, 93.756 ve 73.790 kDa. It has been calculated that V<sub>max</sub> values for ABTS and 2,6-dimethoxyphenol substrates are respectively 14.08 EU/mL.dak., 16.12 EU/mL.dak. ; K<sub>m</sub> values for those substrates are respectively 5.34 mM, 3.03 mM. It was researched whether the purified enzyme which has been produced as extracellular may be used for the removing of some textile dyes such as Reactive Black 5, fuchsin, Allura red and Acid Red 37 which has caused environment contamination or not. It was determined that the enzyme reduces Reactive Black 5 enzyme, Fuchsin, Allura Red and Acid Red 37 dye to 66.0%, 50.8%, 53.6% and 47.3% at the end of 3 hours.

**2014, 113 pages**

**Keywords:** Laccase, Molecular Characterization, *Brevibacillus sp.*, Decolorization, Purification, Characterization

## TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın planlanması ve yürütülmesinde emeği olan tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e, bölümün imkanlarından faydalanmamı sağlayan Sayın bölüm başkanı Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN'a, çalışmalarımın çoğu aşamasında; tezin hazırlanma, değerlendirilme sürecinde yardım ve fikirlerinden istifade ettiğim büyük emeği geçen Sayın hocam Doç. Dr. Hayrunissa NADAROĞLU'na, hiçbir zaman yardım ve desteklerini esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE'ye en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımda manevi desteğini esirgemeyen Sayın Arş. Gör. Derya YANMIŐ'a, Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji Laboratuvarı çalışanlarına, teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım boyunca benim bütün zorluklarıma katlanan, eğitimimin her aşamasında maddi, manevi desteklerini esirgemeyen ve bana olan güvenlerinden dolayı anneme, babama ve kardeşlerime de sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**Ceyda BOZOĞLU**

**Ocak, 2014**

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ .....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xi
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KURAMSAL TEMELLER.....</b>	<b>5</b>
2.1. Ekstremofilik Bakteriler .....	5
2.1.1. Termofilik bakteriler .....	6
2.2. Termofilik Mikroorganizmaların ve Sahip Oldukları Enzimlerin Biyoteknolojik Kullanım Alanları.....	10
2.2.1. Enzimlerin genel özellikleri .....	10
2.2.2. Termofilik enzimler ve bazı kullanım alanları .....	14
2.2.3. Ağrı/ Diyadin kaplıcası'nın özellikleri.....	19
2.2.4. <i>Brevibacillus</i> cinsinin özellikleri.....	19
2.3. Lakkaz Enziminin Genel Özellikleri .....	20
2.3.1. Lakkaz enziminin elde edildiği organizmalar .....	21
2.3.2. Lakkaz enzimlerinin yapısı .....	23
2.3.3. Protein karakterizasyonu .....	27
2.3.4. Lakkaz enzimlerinin substratları .....	28
2.3.6. Lakkaz enzimlerinin reaksiyon mekanizmaları.....	29
2.3.6. Lakkaz enzimlerinin optimal aktivite pH'ları .....	33
2.3.7. Lakkaz enzimlerinin optimal aktivite sıcaklıkları ve termostabiliteleri .....	34
2.3.8. Lakkaz enzimlerinin potansiyel endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamaları.....	34
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEMLER.....</b>	<b>42</b>
3.1. Materyal.....	42
3.1.1. Kullanılan kimyasal madde ve malzemeler.....	42
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar .....	42

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması .....	43
3.1.4. Çalışmada kullanılan termofilik bakteri .....	51
3.2. Yöntemler .....	52
3.2.1. Kaynaktan örneklerin alınması ve bakteri izolasyonu .....	52
3.2.2. Morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler .....	52
3.2.2.a. Morfolojik testler .....	52
3.2.2.b. Fizyolojik testler .....	54
3.2.2.c. Biyokimyasal testler .....	55
3.2.3. Moleküler testler .....	57
3.2.4. Protein tayini .....	62
3.2.5. Lakkaz enzimi tayini .....	63
3.2.6. Lakkaz enziminin saflaştırılması .....	64
3.2.7. Optimum pH'nın belirlenmesi .....	67
3.2.8. Enzimin stabilitesinin üzerine pH'nın etkisi .....	67
3.2.9. Optimum sıcaklığın belirlenmesi .....	68
3.2.10. Enzim stabilitesinin üzerine sıcaklığın etkisi .....	68
3.2.11. Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığının tayini .....	68
3.2.12. $V_{max}$ ve $K_m$ Değerlerinin Belirlenmesi .....	69
3.2.13. <i>Brevibacillus sp. (Z1)</i> 'den üretilip saflaştırılan lakkaz enziminin aktivitesi üzerine metal iyonların etkisinin incelenmesi .....	69
3.2.14. Endüstride kullanılan bazı boyaların lakkaz enzimi ile etkileşimi .....	70
3.2.15. Tekstil boyaları için standartların hazırlanması .....	70
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>71</b>
4.1. Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Test Sonuçları .....	71
4.2. Moleküler Test Sonuçları .....	71
4.3. Protein Tayini .....	72
4.4. <i>Brevibacillus sp. (Z1)</i> 'den Lakkaz Enziminin Ekstraselüler Olarak Üretim Kapasitesi .....	73
4.5. <i>Brevibacillus sp. (Z1)</i> 'den Üretilip Saflaştırılan Lakkaz Enziminin Deae- Sefadeks İyon Değişim Kromatografisi ile Saflaştırma Sonuçları .....	74



4.6. <i>Brevibacillus sp.</i> (Z1)'den Lakkaz Enziminin Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Saflaştırılma Sonuçları .....	75
4.7. <i>Brevibacillus sp.</i> (Z1)'den Ekstraselüler Olarak Üretilip Saflaştırılan Lakkaz Enziminin Sds-Poliakrilamid Jel Elektroforez Sonucu .....	77
4.8. <i>Brevibacillus sp.</i> (Z1)'den Üretilip Saflaştırılan Lakkaz Enziminin Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Molekül Ağırlık Tayin Sonuçları .....	79
4.9. <i>Brevibacillus sp.</i> (Z1)'den Üretilip Saflaştırılan Lakkaz Enzimlerinin Optimum pH Sonuçları.....	79
4.10. Lakkaz Enziminin Stabil pH Çalışması Bulguları .....	80
4.11. <i>Brevibacillus sp.</i> (Z1)'den Üretilip Saflaştırılan Lakkaz Enziminin Optimum Sıcaklık Sonuçları .....	81
4.12. <i>Brevibacillus sp.</i> (Z1)'den Üretilip Saflaştırılan Lakkaz Enziminin Sıcaklık Stabilitesi Sonuçları .....	82
4.13. Ekstraselüler Olarak <i>Brevibacillus sp.</i> (Z1)'den Saflaştırılan Lakkaz Enziminin $V_{max}$ ve $K_m$ Değerlerinin Sonuçları .....	83
4.14. <i>Brevibacillus sp.</i> (Z1)'den Ekstraselüler Olarak Saflaştırılan Lakkaz Enzimlerinin Aktiviteleri Üzerine $Ca^{2+}$ , $Mg^{2+}$ , $Co^{2+}$ , $Fe^{3+}$ , $Zn^{2+}$ , $Cu^{2+}$ , $Hg^{2+}$ , EDTA ve Askorbik Asit'in Etkisi.....	85
4.15. <i>Brevibacillus sp.</i> (Z1)'den Ekstraselüler Olarak Saflaştırılan Lakkaz Enzimi Kullanılarak Bazı Tekstil Boyarlarının Giderimi ile İlgili Sonuçlar .....	91
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>	<b>96</b>
5.1. Tartışma.....	96
5.2. Öneriler.....	96
KAYNAKLAR .....	104
ÖZGEÇMİŞ .....	114

## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

A	Absorbans
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiyezolin-6-sülfonik asit)
bp (bç)	Base pair (Baz çifti)
CTAB	Hekzadesil trimetil-amonyum bromit
DNA	Deoksiribonükleotik asit
dNTP	Deoksinükleotittrifosfat
dak	Dakika
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
E.C.	Enzim kod numarası
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
E.Ü.	Enzim Ünitesi
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
KI	Potasyum iyodit
KOH	Potasyum hidroksit
NaCl	Sodyum klorür
L	Litre
M	Molar
mL	Mililitre (10 <sup>-3</sup> )
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre (10 <sup>-6</sup> )
µM	Mikromolar
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TAE	Tris Asetat EDTA tamponu
TE	Tris-EDTA tamponu
Tris-HCl	Trihidroksimetil amino metan-hidroklorik asit
tRNA	Transfer RNA

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Enzim substrat ve Enzim ürün kompleksi .....	12
Şekil 2.2. Enzim Substrat Anahtar Kilit Modeli b. Enzim Substrat İndüklenmiş Uyum Modeli.....	12
Şekil 2.3. EC 1.1.1.27 L-Laktat: NAD <sup>+</sup> oksidoredüktaz .....	14
Şekil 2.4. Lakkaz enziminin mediatörsüz ve mediatör varlığında katalitik mekanizması .....	21
Şekil 2.5. <i>Bacillus subtilis</i> lakkazının (CotA) bakır merkezleri. ....	25
Şekil 2.6. Lakkaz aktif bölge yapısı ve katalitik döngüsü. ....	26
Şekil 2.7. Lakkaz enziminin yapısı .....	27
Şekil.2.8. Çeşitli organizmalar tarafından üretilen çoklu-bakır içeren oksidazların genel katlanmalarını gösteren kurdela modelleri.....	28
Şekil 2.9. Fungal lakkaz enzimlerinin katalitik mekanizması. ....	30
Şekil 2.10. Bazı lakkaz mediatörlerinin kimyasal yapıları .....	32
Şekil 2.11. Mediatör varlığında gerçekleşen lakkaz reaksiyonu ve bazı lakkaz mediatörleri.....	33
Şekil 4.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayinin için kullanılan standart grafik.....	72
Şekil 4.2. DEAE-sefadeks iyon değişim kromatografi kolonu kullanılarak <i>Brevibacillus sp.</i> ....	75
Şekil 4.3. <i>Brevibacillus sp.</i> (Z1)'den lakkaz enziminin Sephakril S200 jel filtrasyon kromatografisi yöntemi ile saflaştırılmasından elde edilen elüsyon grafiği .....	76
Şekil 4.4. <i>Brevibacillus sp.</i> (Z1)'den ekstraselüler olarak üretilip saflaştırılan lakkaz enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforez fotoğrafı .....	78
Şekil 4.5. <i>Brevibacillus sp.</i> (Z1)'den üretilip saflaştırılan lakkaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi metodu ile molekül kütlelerinin belirlemek amacıyla kullanılan standart proteinlerin Kav değerlerine karşılık çizilen Log MA grafiği. ....	79

<b>Şekil 4.6.</b> <i>Brevibacillus sp. (Z1)</i> 'den ekstraselüler olarak üretilip saflaştırılan lakkaz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi .....	80
<b>Şekil 4.7.</b> <i>Brevibacillus sp. (Z1)</i> 'den ekstraselüler olarak üretilip saflaştırılan lakkaz enziminin ABTS substratı ile stabil pH'sının belirlenmesi için belirli bir süre inkübasyondan sonra elde edilen aktivite ölçüm bulguları.....	81
<b>Şekil 4.8.</b> <i>Brevibacillus sp.(Z1)</i> 'den Ekstraselüler Olarak Üretilip Saflaştırılan Lakkazenziminin Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi .....	82
<b>Şekil 4.9.</b> <i>Brevibacillus sp. (Z1)</i> 'den ekstraselüler olarak üretilip saflaştırılan lakkaz enziminin ABTS substratı ile stabil sıcaklığın belirlenmesi için belirli bir süre inkübasyondan sonra elde edilen aktivite ölçüm bulguları .....	83
<b>Şekil 4.10.</b> <i>Brevibacillus sp. (Z1)</i> 'den saflaştırılan lakkaz enziminin farklı ABTS substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	84
<b>Şekil 4.11.</b> <i>Brevibacillus sp. (Z1)</i> 'den saflaştırılan lakkaz enziminin farklı 2,6-dimetoksifenol substratı konsantrasyonu ile elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği..	84
<b>Şekil 4.12.</b> $HgCl_2$ 'nin <i>Brevibacillus sp. (Z1)</i> 'den ekstraselüler olarak saflaştırılan lakkaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	85
<b>Şekil 4.13.</b> Bazı metal ions and chemicals nin <i>Brevibacillus sp. (Z1)</i> 'den ekstraselüler olarak saflaştırılan lakkaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	91
<b>Şekil 4.14.</b> $CuCl_2$ 'nin <i>Brevibacillus sp. (Z1)</i> 'den ekstraselüler olarak saflaştırılan lakkaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	86
<b>Şekil 4.15.</b> $NiCl_2$ 'nin <i>Brevibacillus sp. (Z1)</i> 'den ekstraselüler olarak saflaştırılan lakkaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	86
<b>Şekil 4.16.</b> $ZnCl_2$ 'nin <i>Brevibacillus sp. (Z1)</i> 'den ekstraselüler olarak saflaştırılan lakkaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	87
<b>Şekil 4.17.</b> $CoCl_2$ 'nin <i>Brevibacillus sp. (Z1)</i> 'den ekstraselüler olarak saflaştırılan lakkaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	87
<b>Şekil 4.18.</b> $CaCl_2$ 'nin <i>Brevibacillus sp. (Z1)</i> 'den ekstraselüler olarak saflaştırılan lakkaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	88
<b>Şekil 4.19.</b> $MnCl_2$ 'nin <i>Brevibacillus sp. (Z1)</i> 'den ekstraselüler olarak saflaştırılan lakkaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	88

<b>Şekil 4.20.</b> FeCl <sub>2</sub> 'nin <i>Brevibacillus sp. (Z1)</i> 'den ekstraselüler olarak saflaştırılan lakkaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	89
<b>Şekil 4.21.</b> BaCl <sub>2</sub> 'nin <i>Brevibacillus sp. (Z1)</i> 'den ekstraselüler olarak saflaştırılan lakkaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	89
<b>Şekil 4.22.</b> Askorbik asit'in <i>Brevibacillus sp. (Z1)</i> 'den ekstraselüler olarak saflaştırılan lakkaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	90
<b>Şekil 4.23.</b> EDTA'nın <i>Brevibacillus sp. (Z1)</i> 'den ekstraselüler olarak saflaştırılan lakkaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	90
<b>Şekil 4.24.</b> Reaktif Siyah 5 tekstil boyası için hazırlanan standart grafik .....	92
<b>Şekil 4.25.</b> Fuksin tekstil boyası için hazırlanan standart grafik .....	92
<b>Şekil 4.26.</b> Alura Kırmızısı tekstil boyası için hazırlanan standart grafik.....	93
<b>Şekil 4.27.</b> Asit Kırmızısı tekstil boyası için hazırlanan standart grafik .....	93
<b>Şekil 4.28.</b> <i>Brevibacillus sp. (Z1)</i> 'den ekstraselüler olarak saflaştırılan lakkaz enziminin Reaktif Siyah 5, Fuksin, Allura Kırmızısı ve Acid Red 37 gibi bazı tekstil boyaalarının atık sulardan giderilmesi işlemine etkisi .....	94
<b>Şekil 4.29.</b> <i>Brevibacillus sp. (Z1)</i> 'den ekstraselüler olarak saflaştırılan lakkaz enziminin Allura Kırmızısı ve Fuksin gibi bazı tekstil boyaalarının atık sulardan giderilmesi işleminin fotoğrafı .....	94
<b>Şekil 4.30.</b> <i>Brevibacillus sp. (Z1)</i> 'den ekstraselüler olarak saflaştırılan lakkaz enziminin Reaktif Siyah 5 ve Asit Kırmızısı 37 gibi bazı tekstil boyaalarının atık sulardan giderilmesi işleminin fotoğrafı .....	95

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 2.1.</b> Termofilik bakterilerin enzimlerinin kullanıldığı biyoteknolojik uygulamalar. ....	16
<b>Çizelge 4.1.</b> <i>Brevibacillus sp.</i> (Z1)'den lakkaz enziminin saflaştırma basamakları .....	77
<b>Çizelge 4.2.</b> <i>Brevibacillus sp.</i> (Z1)'den ekstraselüler üretilip saflaştırılan lakkaz enzimi için yapılan optimum pH çalışmasından elde edilen sonuçlar .....	81
<b>Çizelge 4.3.</b> <i>Brevibacillus sp.</i> (Z1)'den ekstraselüler üretilip saflaştırılan lakkaz enzimi için yapılan optimum sıcaklık çalışmasından elde edilen sonuçlar .....	83
<b>Çizelge 4.4.</b> <i>Brevibacillus sp.</i> (Z1)'den ekstraselüler olarak saflaştırılan lakkaz enzimi için yapılan optimum sıcaklık çalışmasından elde edilen sonuçlar .....	85
<b>Çizelge 4.5.</b> <i>Brevibacillus sp.</i> (Z1)'den saflaştırılan lakkaz enzimi bazı metal iyonları ve kimyasallar için $I_{50}$ (mM) değerleri .....	91
<b>Çizelge 4.6.</b> <i>Brevibacillus sp.</i> (Z1)'den ekstraselüler olarak saflaştırılan lakkaz enziminin Reaktif Siyah 5, Fuksin, Allura Kırmızısı ve Acid Red 37 gibi bazı tekstil boyalarının atık sulardan giderilmesi işlemine etkisi .....	95

## 1. GİRİŞ

Medeniyetin oluşmaya başladığı ilk çağlardan beri insanoğlu enzimlerin rol aldığı birçok biyoteknolojik süreci gündelik hayatında kullanmıştır. Ekmek, şarap, peynir, yoğurt yapımı gibi birçok biyoteknolojik olayın uygulanması gözlem yoluyla elde edilen bilgilerin tekrar tekrar uygulanmasıyla gerçekleştirilirken, 19. yy.'ın başında biyoloji ve enzimoloji biliminde gerçekleşen baş döndürücü ilerlemeler sayesinde şuan biyoteknoloji çağımızın getirdiği tüm problemlere çözüm bulmaya aday bir bilim dalı haline gelmiştir (Beg *et al.* 2001).

Enzimler, biyokimyasal reaksiyonların gerçekleşmesi için gerekli olan aktivasyon enerjisini düşürerek oldukça hızlı gerçekleştirmelerini sağlayan biyokatalizörlerdir. Enzimlerin endüstriyel uygulamalarda büyük ölçekli olarak kullanılmalarının önünü açan bir diğer önemli gelişme enzimlerin sadece *in vivo*'da değil, *in vitro* ortamda da aktivite gösterdiğinin keşfedilmesi olmuştur. Günümüzde enzimler gıda, sağlık, kozmetik, deri, kağıt gibi bir çok endüstrinin yanısıra bu endüstrilerin sebep olduğu çevre kirliliği sorunlarının bertarafında da etkin bir şekilde kullanılmaktadırlar. Tüm canlıların yaşamını olumsuz yönde etkileyen çevre kirliliği, hava kirliliği, toprak kirliliği, su kirliliği, gürültü kirliliği ve radyoaktif kirlenme olmak üzere beş ana başlıkta incelenmektedir (Guerra 2001; Ünal 2004).

Gelişmekte olan ancak çevre bilincinin yeterince oluşmadığı ülkelerde ortaya çıkan hızlı sanayileşme ve şehirleşme çabaları, birçok sanayi dalının gelişmesi, var olanların etkinliğini artırma ve sürekli artan nüfus doğal kaynakların kirlenmesine neden olmuştur (Li *et al.* 1991). Özellikle gıda, tekstil, kağıt, deri, kozmetik alanında üretim yapan sanayi kuruluşları, atıklarını çevrede doğal olarak bulunan akarsu, deniz, göl gibi su ekosistemlerine gerekli arıtımı yapmadan atmaktadırlar. Çoğunluğunu renkli boyar maddelerin oluşturduğu atıklar, suyun ışık geçirme kapasitesini azalttığından fotosentezin dikkate değer miktarda azalmasına neden olurlar. Sucul ekosistemdeki besin zincirinin ve doğal yaşamın zarar görmesinin yanı sıra buralardan oluşan sızıntılar

sonucu toprak ekosistemine zarar verebilirler ya da içme sularına karışarak insanları da içeren birçok canlı grubunda şiddetli alerji, astım, kronik karaciğer, böbrek rahatsızlıkları ve kansere neden olabilirler (Zhang *et al.* 2008). Tekstil endüstrisinde kullanılan boyar maddelerin çevre ve insan sağlığı açısından doğurduğu tehlikeli sonuçlar fark edildikten sonra birçok Avrupa Ülkesinde bu atıkların doğaya doğrudan salınmasıyla ilgili birçok kısıtlayıcı kanun yürürlüğe konmuştur (McMullan *et al.* 2001).

Endüstriyel atıkların bertaraf edilmesi; zaman, sıcaklık, pH, endüstriyel süreçte kullanılan deterjan, metal tuzları, asitler, bazlar, kompleks madde yapıcılar yüzey aktif maddeler, okside edici maddeleri de içeren çeşitli yardımcı kimyasallar gibi birçok faktörden etkilenir. Ayrıca, başta boyar maddeler olmak üzere birçok sanayi atığının klasik arıtma yöntemleriyle (kimyasal ve fiziksel yöntemler) bertaraf edilememesi, kullanılan yöntemlerin yüksek maliyetli oluşu, yeni zehirli yan ürünler oluşturması, konsantrasyon çamur oluşturması ve farklı özelliklere sahip atık sulara uygulanabilen standart bir yöntem geliştirilememesi, bu problemin çözümüne yönelik alternatif biyolojik teknolojilerin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır (McMullan *et al.* 2001). Bu teknolojilerden biri olan çevre ve atık biyoteknolojisi, canlı organizmalar ve onlardan elde edilen ürünler ile belirli bir zaman ve yerde kullanılmayan, geri kazanılmayan ve dönüştürülemeyen, pek çoğu sağlık ve çevre sorunlarına neden olan atıkların arıtımına ve çevre kirliliğinin önlenmesine yönelik çalışmaları kapsamaktadır. Çevre ve atık biyoteknolojisi çalışmaları atıklardan metal uzaklaştırılması veya geri kazanılması, plastik gibi doğada varlığını uzun süre koruyan polimerlerin degradasyonu, radyoaktif maddelerin yıkılması, toprak ve su gibi ekosistemlerin pH'sının düzenlenmesi gibi konuların yanı sıra atık sularındaki boyar maddelerin yok edilmesi konularına da çözüm arar. Çevre ve atık biyoteknolojisi çözüme yönelik teknolojiler geliştirirken birçok bitkiyi, fungusu ve mikroorganizmayı ve bu canlıların ürettikleri metabolitleri kullanmaktadır.

Boyar maddeler başta olmak üzere endüstriyel birçok atığın yok edilmesinde kullanılan metabolitlerin başında oksidaz grubu enzimlerin mavi-bakır proteinler olarak



adlandırılan gen ailesine ait olan Lakkaz (EC 1.1.3.2, p-difenol; dioksijen oksidoredüktaz) enzimi gelmektedir (Thurston 1994). Lakkaz enzimi; ekstraselüler, bakır iyonu içeren, electron alıcısı olarak moleküler oksijeni kullanabildiği için hem fenolik bileşikleri hem de fenolik olmayan bileşikleri okside edebilen polifenol oksidaz grubu bir enzimdir (Gedikli vd 2010). Lakkazlar; fenolik ve fenolik olmayan atıkların yok edilmesinin yanısıra, kağıt endüstrisinde odunsu maddeden ligninin uzaklaştırılması ve ağartılması, pestisit ve ksenobiyotiklerin biyolojik iyileştirilmesi, etanol üretim veriminin artırılması, biyosensör, gıda ve içecek endüstrisinde yiyecek ve içeceklerin renklerinin berraklaştırılması, tekstil endüstrisinde kot kumaşının ağartılması, biyoyakıt pillerinin yanısıra saç boyaları ve antikanser ilaçların üretilmesi gibi birçok biyoteknolojik kullanım alanına sahiptir. Bu kadar geniş bir yelpazede kullanım alanına sahip olan lakkaz enzimleri şimdiye kadar birçok fungus türünden (*Coriolus versicolor*, *Dichomitus squalens*, *Junghuhnia separabilma*, *Phanerochaete crysospodium*, *Phlebia ochraceofulva*, *Phlebia radiata* ve *Rigidoporus lignosus*) saflaştırılarak karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Call and Mucke 1997). Lakkaz ayrıca ağaç, lahana, şalgam, şekerpancarı, elma, şeftali, kuşkonmaz gibi birçok sebze de teşhis edilmiştir (Thurston 1994). Lakkaz enzimlerinin endüstriyel anlamda kullanıldıkları ortamlarda birçok konuda oldukça ekstrem şartların (pH, sıcaklık, kimyasal içerik) hakim olduğu göz önüne alınırsa genellikle geniş bir pH, sıcaklık ve iyonik şiddet aralığında aktivite gösteren mezofilik karakterdeki mikroorganizmalardansa, çok yüksek sıcaklık ve geniş pH aralığında varlığını sürdürebilen ekstremofilik mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin çok daha etkin kullanılabileceği aşikardır. Yüksek pH değerine dayanıklı alkalifilikler, düşük pH değerine dayanıklı asidofilikler, yüksek tuz konsantrasyonuna dayanıklı halofilikler gibi birçok farklı yaşam formunu barındıran ekstremofil canlıların önemli bir grubunu oluşturan yüksek sıcaklıklara dayanıklı termofilikler yoğun olarak araştırılan ve kullanılan bir enzim kaynağıdır. 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. Üzerinde

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).

Enzimoloji alanında termofilik bakteriler kullanılarak yapılan 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 31 benzeri protein (Deckert *et al.* 1998), *Thermus thermophilus*'dan (Miyazaki 2005; Sharma 2007) ve *Bacillus pumilus*'dan elde edilen lakkazdır.

Bu nedenle, bu tez kapsamında Ağrı/Diyadin kaplıcasından izole edilerek saflaştırılan ve *Brevibacillus sp.* (Z1) (Gen bank no: KC292196.1) olarak tanılanan test bakterisinden, ekstraselüler lakkaz enzimi saflaştırıldı ve saflaştırılan enzimin biyokimyasal karakterizasyonu gerçekleştirildi. Enzim aktivitesi üzerine birçok metal iyonunun ve kimyasalın etkisi belirlendi. Son olarak, elde edilen lakkaz enziminin çevresel atıkların dekolorizasyonunda kullanılabilirliği araştırıldı.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1. Ekstremofilik Bakteriler

Sahip oldukları birçok adaptasyon mekanizması sayesinde çok yüksek veya düşük sıcaklık, pH, tuz konsantrasyonu ve ağır metal konsantrasyonu gibi bazı aşırı fiziksel veya kimyasal koşullarda optimum üreme gösteren mikroorganizmalara ekstremofilik mikroorganizmalar denir. Artık bilim dünyası, daha önceden hayatın varolmadığına inanılan kutup bölgesindeki buzullarda, bir yanardağın ağzında, bir tuz gölünde de mikrobiyal yaşamın olduğunu bilmektedir. Ekstremofil bakteriler adaptasyon sağladıkları ekstrem çevreye göre sınıflandırılmakta olup, aşağıda bazı ekstremofilik mikroorganizma grupları belirtilmiştir (Horikoshi 2011).

**Asidofiller:** Optimum büyüme pH'sı, pH 3-4'ün altında olan mikroorganizmalar,

**Alkalifiller:** Optimum büyüme pH'sı pH 10'un üzerinde olan mikroorganizmalar,

**Endolitler:** Kayaların içinde yaşayan mikroorganizmalar,

**Halofiller:** Büyüme ve gelişme için en az 1 M tuz konsantrasyonuna ihtiyaç duyan mikroorganizmalar,

**Hipolit:** Kutuplarda bulunan buz kayalarının içinde yaşayan mikroorganizmalar,

**Metalotolerantlar:** Bakır, kadmiyum, arsenik ve çinko gibi ağır metallerin yüksek dozlarını tolere etme yeteneğindeki mikroorganizmalar,

**Oligotrof:** Besin bakımından çok fakir olan bölgelerde gelişme yeteneğindeki mikroorganizmalar,

**Barofiller:** 40 MPa veya daha yüksek hidrostatik basınç altında optimum büyüeyebilen mikroorganizmalar,

**Psikrofiller:** Optimum büyüme sıcaklıkları 10 °C veya altındaki sıcaklıklar olan, en fazla 20°C'ye tolerans gösteren mikroorganizmalar,

**Radioresistant:** Yüksek seviyede iyonize radyasyona karşı direçli olan mikroorganizmalar,

**Termofiller:** 55-85 °C arasındaki sıcaklıklarda gelişebilen mikroorganizmalar,

**Hipertermofiller:** Optimum büyüme sıcaklığı 80°C veya 80°C 'den yüksek olan mikroorganizmalar,

**Toksitolerantlar:** Organik çözücüler, deterjanlar gibi parçalayıcı ajanlara karşı yüksek dayanıklılık gösteren mikroorganizmalar,

**Kserofiller:** Çok düşük su konsantrasyonlarında gelişme yeteneği gösteren ve kurutma işlemine karşı dirençli mikroorganizmalardır.

### 2.1.1. Termofilik bakteriler

Mikroorganizmaların yaşamsal faaliyetlerini gerçekleştirebilmeleri ve üremeleri için en önemli çevresel faktörlerden biri de sıcaklıktır. Her mikroorganizmanın sahip olduğu özelliklere bağı olarak optimum gelişme sıcaklığı, tolerans gösterebileceği alt ve üst sınır sıcaklıkları farklıdır. Bazı mikroorganizmalar 0°C gibi düşük sıcaklıklarda optimum gelişme gösterirken, bazıları 90°C gibi yüksek sıcaklıklarda optimum gelişme gösterirler. Mikroorganizmalar adaptasyon sağladıkları sıcaklık aralığına göre psikrofiller (10-20°C), mezofiller (20-40°C), termofiller (55-85°C) ve hipertermofiller (90°C-üzeri) olmak üzere dört temel gruba ayrılırlar (Aguilar 1996). Termofilik

mikroorganizmalar ilk olarak 1966 yılında Thomas Brock tarafından keşfedilmiş ve daha sonra dünyanın çeşitli yerlerindeki sıcak su kaynaklarından optimum gelişme sıcaklıkları 45-80°C olan çok sayıda termofilik mikroorganizma izole edilmiştir. Birçok bakteri cinsinin içerisinde bulunan termofilik türler, genellikle fermente ettikleri karbonhidratlar, kullandıkları azot kaynakları, oksijene duydukları ihtiyaç gibi özellikleri bakımından o cins içerisinde bulunan mezofilik temsilcilerine benzerlik gösterirler. Bununla birlikte, termofilik mikroorganizmaların da maruz kaldıkları sıcaklıklara karşı dayanıklı olmaları için diğer ekstremofilik mikroorganizmalar gibi sahip oldukları çeşitli adaptasyonları mevcuttur (Horikoshi 2011).

Bunlar;

### **Nükleik asitlerin yapısı**

Bir canlının tüm özelliklerini belirleyen ve tüm metabolik faaliyetlerini yöneten en önemli kalıtsal materyalin canlının yaşadığı çevreye bağlı olarak bir takım farklı yapısal özellikler kazanması beklenen bir durumdur. İlk önceleri, genomik DNA'nın yüksek G+C içeriğinin DNA'yı denatürasyona karşı daha dayanıklı yaptığına inanılırken, sonradan yapılan bilimsel çalışmalar DNA'nın G+C içeriği ile termofiliklerin optimum büyüme sıcaklıkları arasında hiçbir anlamlı korelasyon olmadığını göstermiştir. Buna karşın, Marguet ve Forterre (1994) yapmış oldukları bir çalışmada, rRNA'nın GC içeriği ile optimum büyüme sıcaklıkları arasında pozitif bir korelasyonun olduğunu göstermiştir (Marguet and Forterre 1994). Mikroorganizmaların sahip olduğu süpersarmal yapılu plazmitler nükleik asitlerin yüksek sıcaklıklara karşı dayanıklı olmasının en önemli nedenlerinden biridir. Çünkü süper sarmal plazmitler topolojik olarak kapalı olduklarından ortalama 110°C gibi yüksek bir sıcaklığa bile adapte olabilirler. Ancak, bu adaptasyonların tamamı günümüzde halen tam olarak aydınlatılamamıştır. Plazmitler çok yüksek sıcaklıklarda bile denatürasyona uğramazken, çift zincirli doğrusal DNA'lar 65°C'de denatürasyona uğramaya başlarlar. Ancak, süpersarmal plazmit DNA'sı termal denatürasyona karşı çok dirençli olmasına rağmen, termal degradasyona karşı dirençli değildir. Mikroorganizmanın termal

degradasyona karşı nasıl korunduğunun tespitine yönelik çalışmalar sonucunda termofilik bakterilerin tamamının hücre içi yüksek tuz konsantrasyonuna sahip olduğu görülmüştür. Yüksek tuz konsantrasyonu çift zincirli DNA'yı 100 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda bile termal degradasyona karşı korumaktadır (Marguet and Forterre 1994). Ayrıca, DNA'ya bağlanan histon ve histon benzeri proteinler yüksek sıcaklıklarda DNA'nın çift zincirli yapıda kalmasında önemli rol oynamaktadırlar (Lopez-Garcia 1999). Mezofilik mikroorganizmalar ile termofilik mikroorganizmalar karşılaştırıldığında göze çarpan çok önemli bir diğer faktörde pozitif süper sarmal DNA oluşmasını ve bu yapıda bağlantı sayısının fazla olmasını sağlayan reverse giraz (RG) enzimidir. RG enzimi tüm hipertermofillerde, arkeobakterilerde ve termofiliklerin birçoğunda bulunurken, mezofiliklerde ve birçok canlıda bulunmaz. Bu nedenle, mezofilik canlıların DNA'sı pozitif süper sarmala göre daha kolay denatüre olan negatif süpersarmal yapı gösterir (Duguet 1995). Termofilik bakterilerin sahip olduğu RNA'ların nasıl daha dayanıklı olduğu hala birçok bilim insanının aydınlatmaya çalıştığı bir konudur. Özellikle, baz modifikasyonları ve protein bağlanma bölgelerindeki değişmelerin RNA'ları kararlı hale getirdiği, transfer RNA geninin bir bazındaki tek bir aminoasitin değişmesi yüzünden bakterinin ısıya karşı direnç özelliği kazandığı elde edilmiş bilgilerden bazılarıdır (Fang *et al.* 2001; Kaçağan 2008).

### **Proteinlerin Yapısı**

Mezofilik ve termofilik mikroorganizmaların sahip olduğu proteinler arasındaki farklılıkları belirlemek üzere yapılan bir çalışmada her iki canlı grubunda da bulunan glutamat dehidrojenaz enzimi incelenmiştir. Mezofilik canlıdaki enzim 107 adet tuz köprüsüne sahipken, termofilik canlıdaki enzimin 168 adet tuz köprüsü içerdiğini belirlediler. Yapılan çalışmalar termofilik proteinlerdeki tuz köprüsü sayısının mezofilik proteinlerdeki tuz köprüsü sayısından ortalama %70 daha fazla olduğunu göstermiştir. Gerçekleştirilen bir diğer araştırmada, proteinlerin termal kararlılığı arttıran faktörler arasında tuz köprülerinin optimizasyonu; proteinlerin yapısında bulunan daha kısa halkalar; halkalarda glisin miktarının az olması; prolin miktarının fazla olması; hidrojen bağlarını fazlalığı ve proteinlerin iç kısımlarında hidrofobik paketlemelerin olduğu

belirlenmiştir (Querol *et al.* 1996; Vieille *et al.* 1996; Colacino and Crichton 1997; Vogt and Argos 1997; Jaenicke and Bohm 1998; Scandurra *et al.* 1998; Das and Gerstein 2000; Kumar and Swati 2001). Termofilik organizmaların yüksek sıcaklıklarda stabilitesini nasıl koruyabildiğinin açıklanması sadece bilimsel merakın giderilmesi için değil endüstriyel uygulamalar içinde çok önemlidir. Termofilik proteinlerin yüksek sıcaklıklarda stabiliteelerini korumaları ve aktivitelerini sürdürmeleri, protein yapısında mutasyonlar oluşturan ve böylece protein mühendisliği ile proteinlerin kararlılığını arttıran çalışmalara ilgiyi her geçen gün arttırmıştır. Bu çalışmalar sonucunda proteinin termal kararlılığının oluşmasında, aminoasit değişimlerinin önemli bir rol oynadığı ortaya koyulmuştur. Ayrıca, termofilik proteinlerin yapıları incelendiğinde yüklü aminoasitlerin (Arg, Lys, His, Asp ve Glu), valin ve izolösin içeriği bakımından zengin olduğu, ancak yüklü polar aminoasitler (Ser, Thr, Gln, Asn, Cys) ve denatürasyona sebep olan asparagin ve glutamin içeriği bakımından ise fakir olduğu görülmüştür. Bunun yanı sıra, mezofilik proteinler termofilik proteinler ile karşılaştırıldığında, bunların daha az halka delesyonuna maruz kaldığı ve bu yüzden termofilik proteinlerin mezofilik proteinlere göre daha kısa olduğu görülür (Thompson and Eisenberg 1999).

### **Hücre Membran Yapısı**

Tüm tek hücreli organizmaların dış ortamla doğrudan temas eden yapıları hücre membranlarıdır. Bu nedenle ekstremofilik ortamlara adaptasyon için, hücre membranlarında uygun uyum yapıları göstermeleri gerekir. Mezofilik mikroorganizmalar termostabil olmayan çift tabakalı bir membran sistemine sahipken, termofilik organizmalar yüksek sıcaklıklarda erimeyen tek tabakalı bir lipid membran tabakasına sahiptir. Ayrıca, hipertermofiller ve arkealar hücre membran yapılarında sıcaklığa ve degradesyona karşı dirençli olan eter lipitlerini bulundururlar (Daniel and Cowan 2000). Sıcaklık artışı sitoplazma membranının proton geçirgenliğini arttırarak yüksek sıcaklıklarda bakteri büyümesini olumsuz etkiler. Bu nedenle termofilik mikroorganizmalar, yüksek sıcaklıklarda taşıma sisteminde iyon olarak daha az geçirgen olan sodyum iyonunu kullanarak bu olumsuz etkiyi bertaraf ederler (Tolner *et al.* 1997).

**Diğer Faktörler:**

ATP, UTP, NAD, FAD ve GTP gibi birçok küçük molekül yüksek sıcaklıklara karşı oldukça dayanıksızdır. Termofilik organizmalarda bu sorunun üstesinden gelmek için ihtiyaç duyulan bu moleküller kullanılacakları zaman sentezlenilir ve hemen kullanılırlar (Çanakçı 2003).

**2.2. Termofilik Mikroorganizmaların ve Sahip Oldukları Enzimlerin Biyoteknolojik Kullanım Alanları****2.2.1. Enzimlerin genel özellikleri**

Enzimler, prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde gerçekleşen tüm biyokimyasal reaksiyonları diğer bir deyişle tüm metabolik faaliyetleri katalizleyen çoğunluğu protein yapılı biyokatalizörlerdir. Biyokatalizör kavramını anlayabilmek için öncelikle, biyokimyasal açıdan katalizör nedir anlamamız gereklidir. Biyokimyasal açıdan katalizör tepkimelerin aktivasyon enerjisini düşüren dolayısıyla tepkimelerin oluşma hızını artıran, girdikleri reaksiyonlardan bozunmadan çıkan maddelerdir. Katalizör yokluğunda aktivasyon enerji engelinin aşılması oldukça güç olduğu halde, uygun bir katalizörün varlığında bu engelin aşılması çok daha kolaydır. Enzimlerin de çalışma şekli katalizörlerde olduğu gibi aktivasyon enerjisini düşürmektir. Enzimin aktivasyonu, sahip olduğu katalitik yapısından kaynaklanmakta olup aktivasyonunu reaksiyon esnasında enzim tüketilmeksizin gerçekleşir. Yeryüzünde farklı enzim sistemlerine sahip olmaksızın canlılık belirtisi gösteren hiçbir varlık yoktur. Enzimleri diğer katalizörlerden ayıran üç önemli özellik mevcuttur; (i) son derece hızlı çalışırlar, (ii) reaksiyonlara ve substratlarına özgüdürler (kemoselektif-steroselektiftirler), (iii) biyokimyasal reaksiyonları düşük enerji ve buldukları canlının hücre ısısında gerçekleştirirler. Enzimlerle katalize edilen tepkimeye katılan kimyasal moleküllere substrat adı verilir.

Enzimlerin yapısal özellikleri incelenecek olursa, katalitik RNA moleküllerinin küçük



bir grubu hariç bütün enzimler proteindirler ve proteinlere ait tüm yapısal özellikleri gösterirler. Dolayısıyla, enzimlerin primer, sekonder, tersiyer ve kuarterner yapıları bulunup katalitik aktiviteleri için esastır. Bir enzim denatüre edilirse veya alt ünitelerine ayrıştırılırsa katalitik aktivitesi genellikle kaybolur; bir enzim aminoasit bileşenlerine yıkılırsa katalitik aktivitesi daima harap olur (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Bazı enzimler aktivite için, protein yapıyı oluşturan aminoasitlerden başka kimyasal bileşen gerektirmezler. Bazı enzimler ise kofaktör ve koenzim diye adlandırılan bir ek kimyasal bileşen gerektirirler. Kofaktörü veya koenzimi ile birlikte tam, katalitik olarak aktif bir enzim, holoenzim olarak adlandırılır. Holoenzimin bir protein kısmı bir de kofaktör veya koenzim kısmı vardır. Holoenzimin protein kısmı *apoenzim* veya *apoprotein* olarak adlandırılır. Enzimlerin aktivite göstermeleri için gerekli olan ve protein yapısında olmayan, genellikle  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$  gibi metal iyonlarından oluşan yan gruplara “kofaktör” denilir. Enzimlerin aktivite göstermeleri için gereksinim duyduğu biositin, flavin adenin gibi kompleks organik moleküllere ise ‘koenzim’ denir.

Enzim ile birlikte iş gören bu küçük moleküller enzim ile ortaklık kurma şekillerine göre prostetik gruplar ve kosubstratlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. Prostetik gruplar enzimlerine kovalent bağlarla ve daimi olarak sıkıca bağlanmışlardır. Sitokromlarda bulunan hem grubu prostetik gruplara ait bir örnektir. Koenzimlerin enzim proteinine çok gevşek bir şekilde nonkovalent olarak bağlı olup enzim proteininden ayrılabilenleri ise kosubstrat olarak adlandırılırlar.

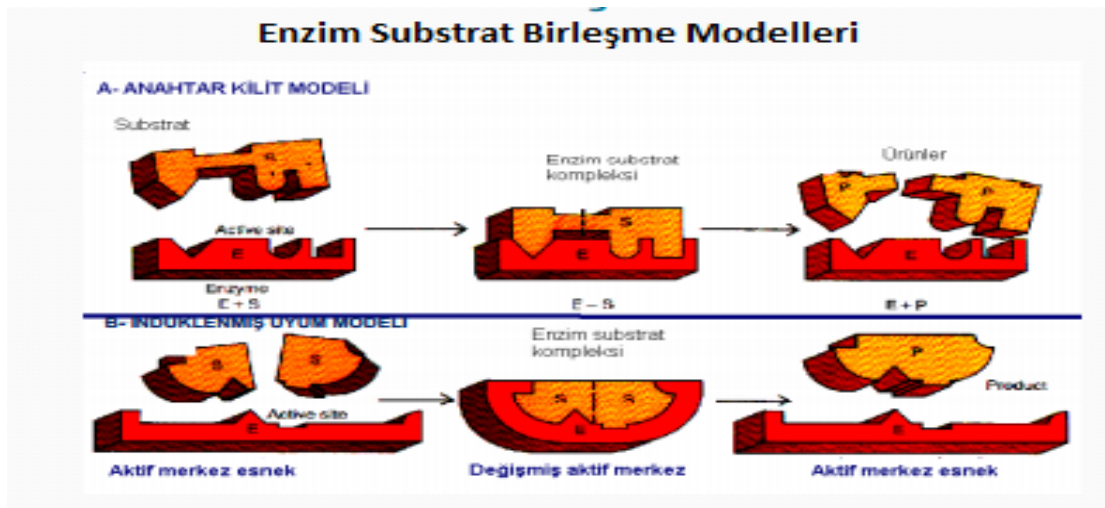
Enzimle katalizlenen bir reaksiyonun ayırt edici özelliği, enzim üzerinde aktif merkez denen bir cep sınırları içinde meydana gelmesidir. Aktif merkez, enzim molekülü üzerinde, substrat bağlama özelliğine sahip özel bölgedir; substratı tutar ve enzim-substrat kompleksi oluşur, substratın ürüne dönüşmesiyle oluşan enzim-ürün kompleksinden enzimin ayrılmasıyla ürün serbestleşir.



**Şekil 2.1.** Enzim substrat ve Enzim ürün kompleksi

Teorik olarak bütün enzimler, her iki yöndeki tepkimeyi de katalizlerler. Ancak pratikte, çok ekzergonik ya da çok endergonik olan enzimatik tepkimeler tek yönlüdür. Hücre metabolizması sırasında eğer belirli bir ekzergonik ya da endergonik tepkimenin ters yönde gerçekleşmesi gerekiyorsa, bu tepkime genelde farklı bir enzim tarafından katalizlenir.

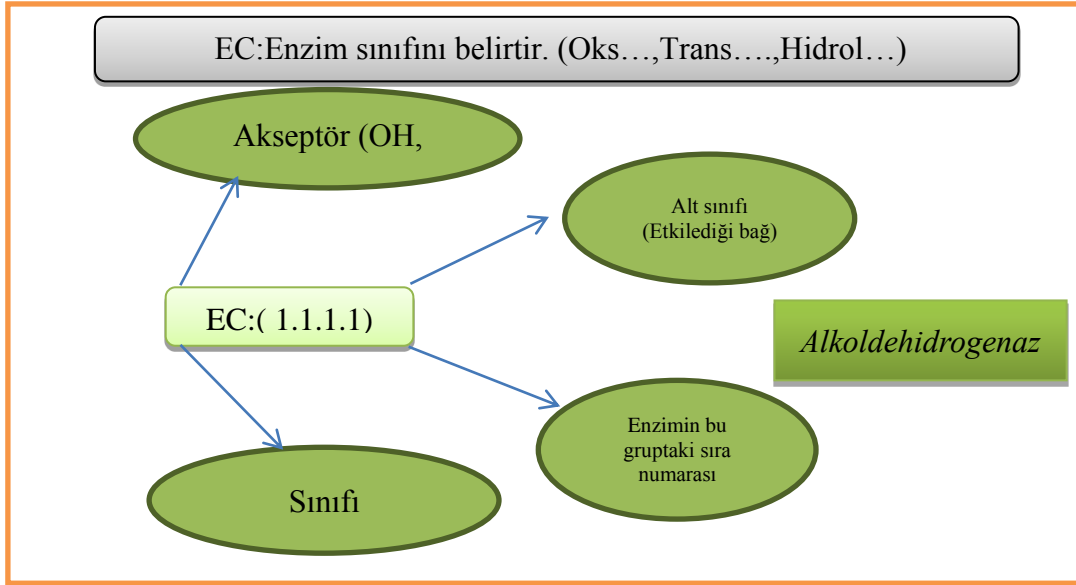
Aktif merkez için, enzim-substrat bağlanmasını açıklayan iki model ileri sürülmüştür; (i) Fisher'in anahtar-kilit modelinde, substrat ve enzimin aktif yerinin birbirine uyacak şekilde önceden belirlenmiş olduğu varsayılır. (ii) Koshland'ın uyum oluşturma modeline göre aktif merkez esnek yapıdadır; substrat varlığında, proteinin tersiyer yapısında oluşan bir değişiklikle, enzim substratını katalize uygun en doğru biçimde bağlayacak biçimsel bir değişikliğe uğrar (Keeton *et al.* 2003).



**Şekil 2.2.** Enzim substrat anahtar kilit modeli b. enzim substrat indüklenmiş uyum modeli

### **Enzimlerin isimlendirilmesi**

Başlangıçta, her enzimin isimlendirilmesi, reaksiyon substratının veya enzimin etki ettiği grup ismine ek bir–az takısının eklenmesi suretiyle olmuştur (ürezaz, ksilanaz, proteinaz, vb.). Daha sonra D-amino asit oksidaz örneğinde olduğu reaksiyon tipine göre adlandırılma yapılmıştır. Bazı enzimlere ise tripsin örneğinde olduğu gibi deneysel yani ampirik adlar verilmiştir. Ancak, keşfedilen enzim sayısı binlerce olunca ve farklı enzimler bazen aynı substratı farklı reaksiyonlarda kullanınca, isimlendirmelerle ilgili çok ciddi problemler ortaya çıkmıştır. Bu nedenle, Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) Enzim Komitesinin (EC) önerdiği sistematik isim, katalizlenen reaksiyonun doğasını tanımlar ve özel bir sayısal kod ile gösterilmeye başlanmıştır. Bu isimlendirme sistemine göre, her enzim için özel sayısal kod 4 rakamdan oluşur ve her biri nokta ile ayrılır, numaranın önünde EC kısaltması bulunur (Örn: EC 2.6.1.2). Bu isimlendirmede; (i) ilk numara enzimin ilintili olduğu sınıfı belirtir ki tüm enzimler katalizledikleri reaksiyon türü ile belirlenen altı sınıftan birine aittir. (ii) Sonraki iki rakam enzimin ilintili olduğu alt sınıfları ve alt-alt sınıfları gösterir. (iii) Son sayı her enzim için, enzimin alt-alt sınıfında verilen özgün bir seri numarasıdır. (iv) Her enzimin sistematik ismi iki kısımdan oluşur; birincisi substratın veya etkilenen substratların ismidir, ikincisi –az ile biten bir sözcüktür ve gruptaki tüm enzimler tarafından katalizlenen reaksiyon tipini gösterir (Keha ve Küfrevioğlu 2009).



**Şekil 2.3.** EC 1.1.1.27 L-Laktat: NAD<sup>+</sup> oksidoredüktaz

Enzimler, insanlık tarihinin en başından beri ekmek, peynir, bira, şarap gibi ürünlerin elde edilmesinde bu işlemlerin gerçekleşmesinde kullanılan yapının ne olduğu bilinmeksizin kullanılmıştır. Enzimlerle gerçekleştirilen işlemlere dair ilk kayıtlar eski Mısır'a kadar dayanmaktadır. Yakın tarihte ise Doğu ülkelerinde birçok gıdanın fermentasyonu için iplikli mantarların enzim kaynağı olarak kullanıldığı bilinmektedir. Ancak, gerçek anlamda modern enzim teknolojisi 1800'lü yıllarda başlamıştır (Smith, 1996). Modern enzim teknolojinin önünü açan, biyoteknolojik uygulamalara inanılmaz derecede ivme kazandıran gelişme ise enzimler hücre içerisinde (*in vivo*) üretilmelerine rağmen birçoğunun hücre dışına salınarak (*in vitro* ortamda da) aktivitelerini devam ettirmesidir. Bugün enzimler bilimsel araştırmalardan adli tıp uygulamalarına, deterjan endüstrisinden zirai uygulamalara kadar yüzlerce kullanım alanına sahiptir (Keeton *et al.* 2003).

### 2.2.2. Termofilik enzimler ve bazı kullanım alanları

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olmaları, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleridir (Çanakçı 2003).

Bu mikroorganizmalar yalnızca enzim üretme yeteneklerine göre değil, mikroorganizmaların toksik ve patojen olmamasına göre de seçilmiştir. Bugün endüstride kullanılan birçok enzim mikrobiyal kökenli olduğu için, endüstriyel enzimlerin kullanımında, mikroorganizma kullanımı da artmıştır (Demain and Solomon 1981). Mikroorganizma grupları içerisinde biyoteknolojik uygulamalar için en çok kullanılan grup ise termofilik mikroorganizmalardır. Termofilik organizmalar, mikrobiyologlar ve biyokimyacılar için oldukça cezbedici bir konudur. Termofilik organizmaların hücre bileşenleri termal olarak çok kararlı olduğu gibi, aşırı derecede asidik ve alkalik şartların denatürasyonlarına da dirençlidir (Kıran vd 2006). Bu nedenle termofilik organizmalar biyoteknoloji açısından oldukça büyük önem taşımaktadır. Biyoteknolojide termofilik organizmalar, bazı yakıt ve kimyasalların üretilmesinde ve genetik manipulasyonların yapılabilmesinde kullanılmasına rağmen, biyoteknoloji açısından en önemli özellikleri biyokimyasal reaksiyonları çok yüksek sıcaklıklarda katalizleyebilen enzimleri üretmeleridir.

Termofilik enzimlerin pH değişikliklerine ve yüksek sıcaklıklara karşı gösterdiği kararlılık, bu enzimlerin endüstri alanlarında tercih edilme nedenleridir. Ayrıca, enzimler, mikroorganizmaların optimum büyüme sıcaklığından daha yüksek bir sıcaklıkta bile kararlı ve aktiftirler. Bu yüksek sıcaklıklar, reaksiyon sırasında meydana gelebilecek kontaminasyon riskini önemli derecede azaltır. Çünkü biyolojik döngüde kontaminasyona sebep olan bakterilerin çoğu mezofiliktir (Burg 2003). Ayrıca, bu yüksek sıcaklıklarda, reaksiyona katılan maddelerin difüzyon hızları ve çözünürlükleri önemli derecede artar ve bu da daha fazla ürün oluşumunu sağlar (Mozhaev 1993; Kumar and Swati 2001). Bu sıcaklıklarda suyun yüzey geriliminin ve vizkozitesinin azalması da diğer bir avantajdır.

Termofilik enzimler, belirtilen bu avantajlarından dolayı birçok endüstriyel alanda tercih edilmektedirler. Bununla birlikte bu enzimlerden bazıları, son zamanlarda saflaştırılmış ve başarılı bir şekilde klonlanıp mezofilik konaklarda ekspre edilmiştir. Bu enzimlere örnek olarak, DNA polimerazlar, amilazlar, arabinofuranosidazlar, ksilanazlar, kitinazlar, selülazlar, proteazlar, lipazlar ve gıda ve kimya endüstrilerinde

DNA'yı modifiye edebilen enzimler verilebilir. Bu enzimler moleküler biyoloji alanında, nişasta, gıda, petrol, kimyasal, kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi gibi pek çok endüstri alanında geniş ölçüde kullanılmaktadır.

**Çizelge 2.1.** Termofilik bakterilerin enzimlerinin kullanıldığı biyoteknolojik uygulamalar.

Enzim	Sıcaklık Aralığı	Reaksiyonları	Kullanım alanları
<b>Amilolitik enzimler</b>	90-100	Nişasta → dekstroz şurup	Fırıncılık, mayalanma, deterjan, gıda, ve içecek endüstrisinde
<b>Arabinofuranosidazlar</b>	55-90	Arabinan→Arabinoz	Meyve suyu, şarap, ekmek endüstrisi
<b>DNA polimeraz</b>	90-95	DNA arttırılması	Genetik mühendisliği/ PCR
<b>Kitinazlar</b>	65-75	Kitin → kitobioz Kitin → N-asetil glukozamin Kitin → deasetilaz	Gıda, kozmetik, ilaç, çimento endüstrisinde, atık su temizlenmesinde, kağıt üretiminde
<b>Ksilanaz</b>	45-65, 105	Kraft hamuru → ksilan+lignin	Kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde
<b>Lakkazlar</b>	30-80	Fenolik olan ve olmayan lignin esaslı bileşenleri yükseltgeyebilme	Kağıt, selüloz, tekstil ve petrokimya sanayilerinin neden olduğu atıkların detoksifikasyonu, nanobiyoteknoloji
<b>Lipazlar</b>	30-70	Yağ uzaklaştırması, hidrolizis, alkolizis, aminolizis	Süt, deterjan, kağıt, ilaç, kozmetik, deterjan, deri ve tekstil endüstrisi
<b>Proteaz</b>	65-85	Protein → peptidler ve amino asitler	Fırıncılık, mayalanma, deterjan, gıda, ilaç ve deri endüstrisinde
<b>Selülaz</b>	45-55, 95	Sefadeks → glukoz	Deterjan ve tekstil endüstrisinde, çöp ve atıkların işlenmesinde

Moleküler çalışmaların temelini, PCR kullanımı oluşturmaktadır. DNA'yı arttırma kapasitesine sahip olan PCR yöntemiyle, genetik mühendisliğinde önemli bir ilerleme kaydedilmiştir. Bu yöntemde peş peşe gelen üç adım, 90-95°C'de DNA zincirlerinin denatürasyonu, 55-70°C'de primerin bağlanması ve 75°C de primerin uzaması aşamasıdır (Dülger 1997). Bu nedenle, bu reaksiyonlarda kullanılan enzimlerin bu sıcaklıklara dayanıklı olması gerekmektedir. PCR yönteminin kullanıldığı ilk

zamanlarda, primer DNA zincirinin uzatılmasını katalizleyen DNA polimerazlar *Escherichia coli*'den izole edilirdi. Bu enzimler yüksek sıcaklıklarda enzimatik aktivitelerini kaybettiklerinden her bir denatürasyon ve primerin bağlanması aşamasından sonra yeni bir polimeraz enziminin ilavesi gerekmekteydi. Bu nedenle PCR, çok fazla zaman harcanan ve pahalı bir yöntemdi (Erlich *et al.* 1988). Termal kararlı polimerazların bulunmasıyla, PCR yöntemi oldukça kolaylaştı ve önemli ölçüde gelişti. İlk termal kararlı DNA polimeraz, termofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus*'dan karakterize edildi. Daha sonra *Phyrococcus furiosus* ve *Thermococcus litoralis* bakterilerinin de DNA polimeraz enzimleri karakterize edildi. Bu mikroorganizmalardan elde edilen DNA polimerazlar, 99°C'de bile aktivitelerinin önemli bir kısmını korumaktadırlar (Kaçağan 2008). Termofilik DNA polimeraz enzimleri, PCR reaksiyonlarını katalizledikleri için dünya ticaretinde büyük paya sahiptirler. Bu reaksiyonlar, spesifik DNA sıralarını hızlı ve verimli bir şekilde arttırdığı için besin analizi, klinik tıp ve adli tıp alanlarında önemli araştırmalar ve incelemeler yapılırken kullanılmaktadırlar. Ayrıca bu reaksiyonlar bugün biyoteknoloji ile ilgili birçok işlemin oluşturulmasında önemli bir rol oynamaktadır (Aguilar 1996).

Termofilik enzimlerin en geniş kullanıldığı alanlardan biri nişasta endüstrisidir. Endüstriyel nişasta işleme, nişastanın glukoz, maltoz veya oligosakkarit şuruplarına hidrolizini içerir. Nişastanın tam hidrolizi için pek çok enzim kullanılmaktadır. Bu enzimler, amilazlar, pullulanazlar, siklodekstrin glikoziltransferazlar, glukoamilazlar ve ksiloz izomerazlardır (Poonam and Dalel 1995). Bu enzimler veya bu enzimleri içeren şuruplar nişastanın işlenmesi yanında içecek endüstrisinde, ekmek yapımında ve peynir endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Ayrıca tatlandırıcı üretiminde ve pek çok gıda ürününün koku, yapı ve görünüşünün değişime uğratılmasında da bu enzimler yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Nişasta endüstrisi, termofilik enzimlerin yıllık endüstriyel tüketiminin %30'unu oluşturmaktadır (Van der Maarel *et al.* 2002).

Kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi en hızlı büyüyen endüstrilerden biridir. Bu alanda, klorlu bileşiklerin yerine termal kararlı ksilanazların kullanımı artmaktadır. Kraft kağıt hamurunun ağartılmasında çok fazla miktarda kullanılan klorlu bileşikler, toksik ve

mutajenik olan sürekli biriken yan ürünleri oluşturur. Bu yan ürünler de çevresel kirliliğe ve biyolojik sistemlerde sorunlara sebep olur. Bu nedenle, günümüzde bu kimyasalların kullanımını en aza indirmek amacıyla, kağıt endüstrisinde ksilanazlar kullanılmaktadır (Vikari *et al.* 1994). Ksilanazlar kağıt ve kağıt hamuru endüstrisindeki kullanımlarından başka, zirai hayvan yemlerinin besin değerini arttırmakta, hasır ve keten gibi bitki elyafının zamkının giderilmesinde ve meyve sularının ağartılmasında kullanılmaktadır.

Dünya üzerinde en fazla miktarda bulunan ve yenilenebilir fosilsiz karbon kaynağı selülozdur. Selülozun hidrolizi için endoglukanazlar, eksoglukanazlar ve  $\beta$ -glukosidazlar kullanılmaktadır. Endüstriyel işlemlerde, termal kararlı selülozitik enzimler deterjanların yapısına katılarak yıkama sonucunda çamaşırların yumuşak ve daha parlak renkte olmasını sağlarlar. Ayrıca tekstil endüstrisinde, çöp ve atıkların işlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Bhat 2000).

Yukarıda bahsedilen termofilik karakterdeki enzimler ve kullanım alanları en belli başlı olanları olmakla birlikte, her geçen gün ya keşfedilen enzimlere bir yenisi eklenmekte ya da daha önce keşfedilmiş enzimlerin yeni bir aktivitesi yeni bir özelliği keşfedilmektedir. Buna bağlı olarakta, termofilik enzimler, birçok biyoteknolojik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Sıcak su kaplıcaları, volkan ağızları gibi farklı ekolojik alanlardan izole edilen termofilik mikroorganizmalardan faydalı enzimlerin ekstraksiyonu ve araştırılması ile biyoteknoloji alanında atılabilecek daha büyük adımların önü açılacaktır (Kohilu *et al.* 2001).

Bu tez kapsamında çalışılan lakkaz enzimi de birçok biyoteknolojik uygulamada kullanılma potansiyeline sahip olan, endüstriyel olarak çok kıymetli bir enzimdir. Elde edilen lakkaz enziminin ekstraksiyonunun yapıldığı mikroorganizma ise daha önce çalışılmamış olan bir termal kaplıca olan Ağrı/Diyadin kaplıcasından izole edilerek saflaştırılmıştır.



### 2.2.3. Ağrı/ Diyadin kaplıcası'nın özellikleri

Ağrı Diyadin kaplıcası suyunun tahlili sonucunda kaplıca suyunda ortalama 2-3 gr civarında total minerilizasyon bulunmaktadır. Bu mineraller; kalsiyum, bikarbonat, hidrojen, sulfur, karbondioksit, kükürt, sülfat ve magnezyumdur ve suyun radyoaktivite etkisi fazladır. Suyun sıcaklığı ortalama 40-55°C, pH' sı 7'dir. Kaplıca suyunun; romatizma, nevrit, nörolojik hastalıklar, deri-cilt hastalıkları, mide-bağırsak, böbrek ve solunum yolu rahatsızlıkları ve kadın hastalıklarına tavsiye edildiği bilinmektedir. Diyadin kaplıcaları, şifalı sular sıralamasında dünyada 7. sırada gelmektedir. Fakat, yeteri kadar tanıtılmamış ve altyapı çalışmaları yapılmamış olması nedeniyle bu kaplıcadan ne bölge insanı ne de ülke insanı günümüze kadar yeterince faydalanamamıştır. Ayrıca, farklı birçok mikroorganizmanın yaşam alanı olan kaplıcanın daha önce sahip olduğu biyolojik çeşitlilik ve bu canlıların sahip olduğu özellikler şimdiye kadar aydınlatılmamıştır.

### 2.2.4. *Brevibacillus* cinsinin özellikleri

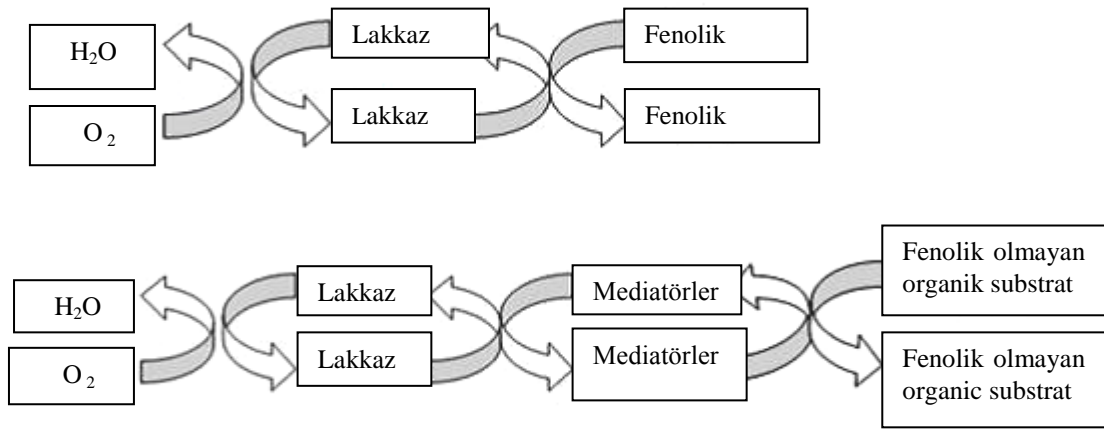
*Brevibacillus* cinsi Shida *et al.* tarafından *Paenibacillaceae* ailesi içerisinde tanımlanmıştır (Shida *et al.* 1996). Shida *Bacillus* cinsindeki *Bacillus brevis*, *laterosporus*, *thermoruber*, *agri*, *centrosporus*, *choshinensis*, *borstelensis*, *formosus* ve *reuszeri* bakterilerini yeniden sınıflandırarak, bu türleri yeni bir cins olan *Brevibacillus* cinsine dahil etmiştir (Migula 1900; Claus and Berkeley 1986; Shida *et al.* 1995). Daha sonra, bu türlerin geçerli isimlerini bu cins içerisinde: *Brevibacillus invocatus*, *limnophilus*, *levickii*, *ginsengisoli*, *panacihumi*, *fluminis*, *aydinogluensis* ve *nitrificans* olarak belirtti (Allan *et al.* 2005; Kim *et al.* 2009; Inan vd 2012). Bu cinsin üyeleri çubuk biçimli, Gram-pozitif veya Gram-değişken, peritrik kamçısıyla kendiliğinden hareketli ve zorunlu aerobiktirler. Cinsin üyelerinin G+C içeriği %42.8 ile 57.4 arasında değişir. Daha önce yapılan birçok çalışma bu cinsin birçok üyesinin biyokontrol ajanı olarak kullanıldığını göstermiş ve cinsin tarımsal önemine dikkat çekmiştir (de Oliveira *et al.* 2004). Bu yüzden, laboratuvar kontaminantı olarak izole edilen *Brevibacillus* sp. BAB-2500 suşunun, genomik çalışmalar için tüm gen sekansı belirlenmiştir ve böylece

bu cinsin diğer türlerinin tarımsal uygulamaların yanısıra ne gibi uygulama alanlarına sahip olabileceği araştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda, bu suşun 5,349 protein kodlayan gen, 94 transfer RNA, ve 14 ribozomal RNA kodlayan bir genomu sahip olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca genom çalışma sonucunda mikroorganizmanın; B<sub>12</sub> ve B<sub>5</sub> vitaminlerinin biyosentezi, çoklu ilaç direnci için taşıyıcı, potasyum alımı ve arsenik pompa sistemi, birçok farklı şekerin biyosentezi ve aminoşekerlerin degradasyonu için gen bölgeleri tanımlanmıştır. Bu suş ayrıca toksik bir bileşik olan arsenatı arsenite redüksiyonunu katalizleyerek arsenat redüktaz aktivitesi de göstermektedir. Yine, bakterinin sahip olduğu Cystathionine beta-lyaz proteini, önemli alüminyum direnci sağlamaktadır ve bu bilgi bu suşun asidik topraklar gibi metalle kontamine olmuş arazilerde tarımsal ürün yetiştirilmesinde hayatsal bir öneme sahip olabileceğini önermektedir. Burada belirtilen değerli ürünlerinin yanısıra *Brevibacillus* cinsi amilaz, ksilanaz, lakkaz gibi birçok değerli endüstriyel enziminde kaynağıdır.

### 2.3. Lakkaz Enziminin Genel Özellikleri

Lakkaz enzimi (EC 1.1.3.2, p-difenol; dioksijen oksidoredüktaz) oksidazların mavi-bakır proteinler olarak adlandırılan gen ailesine ait, 31-68 kDa molekül ağırlığına sahip, optimum pH'sı 3.5-6 arasında değişen, optimum sıcaklığı izole edildiği canlıya göre oldukça geniş bir yelpaze gösteren oksidoredüktaz sınıfına dahil hücre dışı bir enzimdir (Thurston 1994). İzolasyonundan yaklaşık 10 yıl sonra ise "lakkaz" olarak adlandırılmıştır (Thurston 1994). Lakkaz enzimi bir veya birden fazla alt üniteleri olan 4 bakır iyonu içeren bir glikoproteindir ve içerdiği karbohidrat oranı %11-25'dir. Bu enzimin dahil olduğu oksidoredüktaz sınıfının en belirgin özelliği geniş substrat spesifikliğı sayesinde biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilirliğidir. Çoklu-bakır içeren bir protein olan lakkaz, radikal-katalizli reaksiyon mekanizması ile aromatik ve aromatik-olmayan farklı bileşiklerin oksidasyonu için moleküler oksijeni kullanmaktadır. Kullanılan moleküler oksijenin ise suya indirgenmesi sağlanarak, fenolik bileşiklerin oksidasyonu katalizlenmektedir (Kiiskinen *et al.* 2002). Reaksiyon tiplerine bağlı olarak bu enzimler, elektronları bir substrattan başka bir akseptöre transfer eden oksidoredüktaz enzimlerdirler. Lakkaz enzimleri geniş substrat

özgüllükleri ile karakterize edilmekte olup, difenoller, polifenoller, farklı süstitiye fenoller, diaminler, aromatik aminler ve hatta iyodin gibi inorganik bileşikler de dahil olmak üzere çok fazla çeşitlilikteki substratları okside etmektedirler. Ayrıca, bazı mediatörlerin eklenmesi ile substrat çeşitliği arttırılabilir (Gochev and Krastanov 2006). Örneğin, Lakkaz, fenolik bileşiklerin çoğunu kataliz edebilmesine rağmen, bazı mediatörlerin varlığında ABTS (2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) and 1-hydroxybenzotriazole) tek başına okside edemediği substratları okside edebilmektedir (Archibald *et al.* 1997).



**Şekil 2.4.** Lakkaz enziminin mediatörsüz ve mediatör varlığında katalitik mekanizması (Gochev and Krastanov 2006).

### 2.3.1. Lakkaz enziminin elde edildiği organizmalar

Lakkaz adı ilk kez 1883 yılında bu enzimin ekstrakte edilerek tanımlanmış olduğu Japon vernik ağacı (lacquer) olan *Rhus vernicifera*'dan ekstrakte edilmiş olmakla beraber daha sonraları ise şeftali fırvuninciri, tütün ve kavak gibi çok sayıdaki bitkide de lakkaz enzimlerinin varlığı belirlenmiştir (Lehman *et al.* 1974; Bligny and Douce 1983; De Marco and Roubelakis-Angelakis 1997; Ranocha *et al.* 1999). Lakkaz enzimleri bitkilerde yaygın olarak bulunmasına rağmen, bitkisel lakkazların karakterizasyonu ve kullanımı mikrobiyal kökenli lakkaz enzimlerine göre çok da yaygın değildir. Bu durumun en önemli nedenleri; ham bitkisel özütlerin oldukça geniş bir substrat özgüllüğü gösteren çok sayıda oksidatif enzimleri içermesi ve bu nedenle

bitkisel lakkazların belirlenmesinin ve saflaştırılmasının zor olmasıdır (Ranocha *et al.* 1999). Şimdiye kadar, karakterizasyonu yapılmış ve endüstriyel uygulamalar için kullanılmış olan lakkaz enzimlerinin büyük bir çoğunluğu ise genellikle iyi bir lignin parçalayıcısı olan beyaz-çürükçül funguslardan elde edilmiştir. İyi bilinen lakkaz üreticileri arasında *Podospora anserina*, *T. versicolor*, *Polyporus ostreatus* (yeni adı, *Trametes cubensis*), *Neurospora crassa*, *A. bisporus*, *Botrytis cinerea*, *Pleurotus ostreatus*, *Phlebia radiata*, *Coriolus (Trametes) polyporus*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Chaetomium thermophilum* ve *Coprinus cinereus* gibi çok sayıda fungus bulunmaktadır (Froehner and Eriksson 1974; Sannia *et al.* 1986; Schneider *et al.* 1999).

Geniş bir substrat çeşitliliğine sahip olan fungal lakkazların görevleri; fenolik bileşiklerin polimerizasyonunun, depolimerizasyonunun, metilasyonu ve/veya demetilasyonunun, bitki patojenitesinde ligninin parçalanmasının, katalizlenmesidir (Leonowicz *et al.* 1979; Leonowicz *et al.* 1985; VanEtten *et al.* 1989). Lakkaz enzimi ökaryotların yanı sıra birçok prokaryot canlıda da yaygın olarak bulunan bir enzimdir. Bu enzimlerin, prokaryotlarda genellikle hücre pigmentasyonunda, fenolik bileşiklerin oksidasyonunda ve metal oksidasyonlarında rol aldığı tespit edilmiştir (Thurston 1994).

Birçok prokaryot organizmanın lakkaz enzimine sahip olduğu tespit edilmiş olmasına rağmen, şu ana kadar tam olarak saflaştırılan ve karakterizasyonu yapılan bakteriyel kaynaklı lakkaz enzimlerinin sayısı oldukça azdır. Prokaryotik lakkaz aktivitesi için ilk ikna edici veriler ise rizosferik bir bakteri olan *A. lipoferum* için rapor edilmiştir (Givaudan *et al.* 1993). Daha sonra ise melanojenik bir deniz bakterisi olan *Marinomonas mediterranea*'da, *Pseudomonas syringae*'da CopA proteini ve *E.coli*'de ise PcoA proteini gibi, lakkaz-benzeri enzimlerin Aktinomisetler'de lakkaz enzimlerinin varlığına dair çalışmalar yapılmıştır (Mellano and Cooksey 1988; Isono and Hoshino 1989; Sanchez-Amat *et al.* 2001). Daha sonraki yıllarda yapılan bilimsel çalışmalarla lakkaz enzimlerinin varlığı *S. Griseus*, *S. cyaneus*, *S. lavendulae*, *S. coelicolor*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas compestris* ve *Streptomyces psammoticus*'da gösterilmiştir (Lee *et al.* 1994; Endo *et al.* 2002; Arias *et al.* 2003; Suzuki *et al.* 2003; Machczynski *et al.* 2004).

Termofilik bakterilerde yapılan çalışmalar çok nadirdir. Son zamanlarda termofilik organizmalarla yapılan çalışmalar şunları kapsamaktadır: *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 31 benzeri protein (Deckert *et al.* 1998), *Thermus thermophilus*'dan ve *Bacillus pumilus*'dan elde edilen lakkazdır (Sharma *et al.* 2007).

### 2.3.2. Lakkaz enzimlerinin yapısı

Lakkaz enzimlerinin moleküler yapısı belirlenirken, en çok funguslardan izole edilen enzimler kullanılmıştır. Fungal lakkazlar, multimerik kompleksler oluşturacak şekilde oligomerize olan izoenzimlerden meydana gelmektedirler. Monomerlerin moleküler kütleleri ise 50-110 kDa arasında değişmektedir. Lakkaz enzimlerinin önemli bir özelliği ise protein kısma kovalent olarak bağlanmış olan ve proteinin toplam kütesinin %10-45'ini oluşturan bir karbonhidrat kısmının da bulunmasıdır. Karbonhidrat kısım enzimin yüksek kararlılık göstermesine katkıda bulunmaktadır.

### Bakır Merkezleri

Lakkaz enzimlerinin katalitik aktivitelerini gösterilebilmeleri için, aktif olan her bir lakkaz proteini için en az 4 bakır atomu gerekmektedir. Bakır bağlama bölgeleri oldukça korunmuş özellikte olan lakkaz proteinlerinin her birinde bulunan bu bakır iyonlarının ışık absorbanları ve elektronparamanyetik davranışları farklıdır. Bu nedenle, lakkaz enzimlerinde bulunan bakır iyonları spektroskopik özelliklerine bağlı olarak üç ana sınıfta gruplandırılırlar. Lakkaz proteinlerinde bulunan bakır iyonlarından birisi Tip1 veya “mavi bölge” olarak adlandırılan bölgeye bağlı iken, Tip2 ve Tip3 olarak adlandırılan bölgelerin oluşturduğu trinükleer kümeye bağlı olarak ise 3 bakır iyonu daha bulunmaktadır.

Tip1: Paramanyetik “mavi” bakır (Cu1), absorban 610 nm (okside formda iken),

redoks potansiyeli +785 mV.

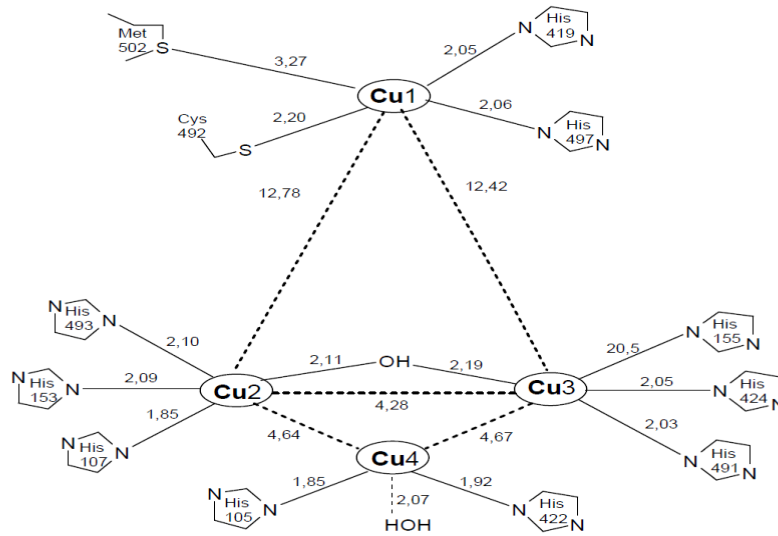
Tip2: Paramanyetik “mavi-olmayan” bakır (Cu<sup>4</sup>); azid, florid ve siyanide karşı affinitesi vardır.

Tip3: Diamanyetik spin-eşleşmeli bakır-bakır çifti (Cu<sup>2</sup> ve Cu<sup>3</sup>), absorbands 330 nm (okside formda iken).

Tip1 bakır, korunmuş ekvatorial ligandlar olarak iki histidin ve bir sistein kalıntısı ile, bir pozisyonda ise genellikle değişken olan bir amino asit kalıntısı ile trigonal bir koordinasyona sahiptir. Değişken olan bu eksensel (aksial) ligand ise *Bacillus subtilis* CotA proteininde, *E. coli* CueO proteininde ve Asoks’da metionin kalıntısı iken, fungal lakkazlarda ise lösin (CcLa) veya izolösin (TvLa) gibi alifatik bir amino asit kalıntısından oluşabilmektedir (Enguita *et al.* 2003). Eksensel pozisyondaki ligandın ise muhtemelen enzimin aktivitesini düzenlemek için gerekli mekanizmayı sağlayarak, enzimin oksidasyon potansiyelini kuvvetli bir şekilde etkilediği ise geniş bir şekilde tartışılmıştır (Gray *et al.* 2000). *Trametes villosa* tarafından üretilen lakkazın yapısındaki eksensel pozisyondaki fenilalanin ligandının metionin ile değiştirildiği mutantlarda ise lakkaz enziminin oksidasyon potansiyelinin bariz bir şekilde düştüğü belirlenmiştir (Kumar *et al.* 2003). Tip1 bakır, çoklu-bakır içeren protein moleküllerinin tipik mavi renginden sorumludur. Bu mavi rengin nedeni ise bakır-sistein kovalent bağının neden olduğu yoğun elektronik absorpsiyonun bir sonucudur. Yüksek redoks potansiyeli (+785 mV) nedeniyle Tip1 bakır, substrat oksidasyonunun gerçekleştirildiği bölgedir.

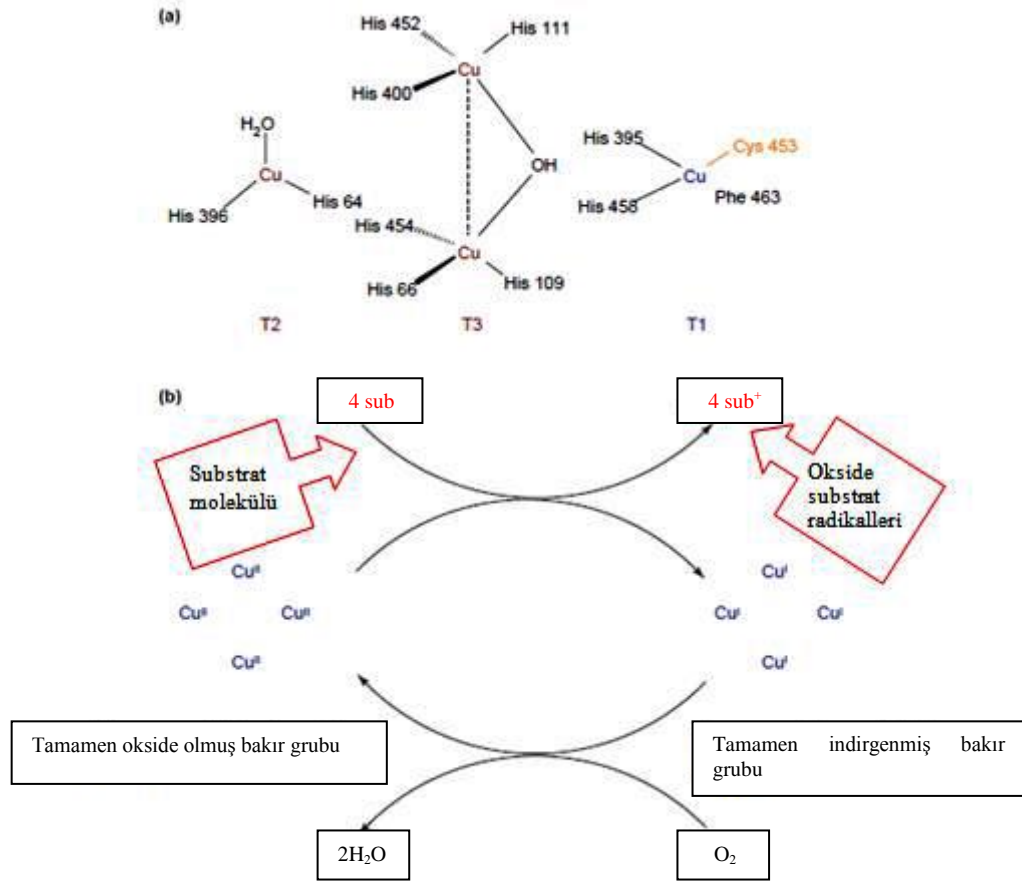
Tip2 bakır ise görünür spektrumda absorpsiyon göstermez ve EPR (Elektron Paramagnetik Resonans) çalışmalarında paramanyetik özellikler göstermektedir. Çoklu-bakır içeren oksidazlarda ise Tip2 bakır, binükleer olan Tip3 bakıra yakın olarak konumlanmaktadır. Tip3 bakır merkezi ise 330 nm’de (okside formda iken) bir elektron adsorpsiyonu nedeni ile spektrofotometrik olarak karakterize edilebildiği gibi, bakır çiftinin anti-ferromanyetik eşleşmesinin bir sonucu olarak EPR sinyalinin olmaması ile de karakterize edilebilmektedir. Tip3 bakır merkezi ise aynı zamanda, tirozinaz ve haemosiyanınların de dâhil olduğu başka bir protein süper ailesinin de yaygın özelliğidir

(Kumar *et al.* 2003). Tip2 ve Tip3 bakır merkezleri ise bir bütün olarak değerlendirilebilir ve bu nedenle de genellikle “trinüklear küme” olarak adlandırılırlar. Trinüklear küme ise moleküler oksijenin indirgendiği ve suyun serbest bırakıldığı yerdir. Tip2 bakır atomu 2, Tip3 bakır atomu ise 6 histidin kalıntısı ile koordine edilmektedir. Tip3 bakır atomları arasındaki kuvvetli anti-ferromanyetik eşleşme ise neredeyse lineer olan hidroksil köprüsü aracılığı ile sürdürülmektedir.



**Şekil 2.5.** *Bacillus subtilis* lakkazının (CotA) bakır merkezleri (Enguita *et al.* 2003).

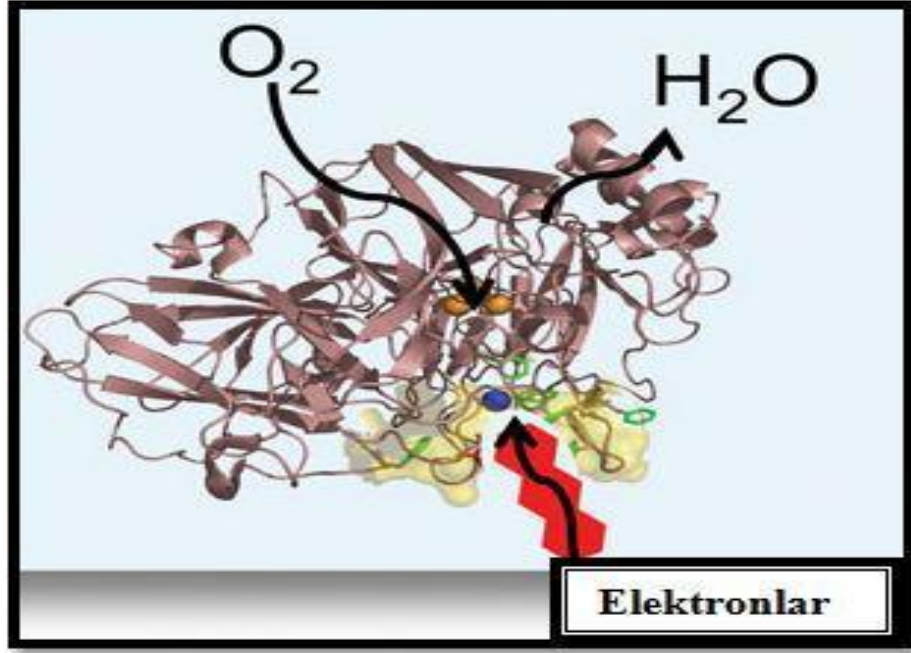
Yukarıda bahsedilen bu özellikler ise üç veya dört bölge bulunduran tipik lakkaz enzimleri için geçerlidir. Buna rağmen, *Streptomyces griseus* kaynaklı EpoA ve *Streptomyces coelicolor* kaynaklı SLAC lakkazları ise tipik lakkaz enzimlerinden farklı olarak, sadece iki bölge içeren lakkaz enzimleridirler (Machczynski *et al.* 2004; Dubé *et al.* 2008). EpoA ve SLAC enzimleri arasındaki benzerlik %69 olmasına rağmen, EpoA aynı zamanda trimer olarak da aktivite göstermektedir. İkinci bölgenin bulunmadığı SLAC, bariz bir lakkaz aktivitesine sahip olup, lakkaz enzimlerinin karakteristik özelliği olan üç bakır bölgesinin de bu enzimde tam olarak bulunduğu ve NMR (Nükleer Manyetik Rezonans) sonuçlarına göre trinüklear kümenin var olduğu gösterilmiştir (Machczynski *et al.* 2004).



**Şekil 2.6.** Lakkaz aktif bölge yapısı ve katalitik döngüsü (Riva 2006).

Şekil 2.6'da *Trametes Versicolor* lakkazının katalitik döngüsü gösterilmiştir. a) Lakkazlar tipik olarak 3 farklı tipte 4 bakır atomu içerir. Farklı bakır domainlerinin varlığı lakkazın katalitik aktivitesi için oldukça önemlidir. Birincil elektron alıcı olarak görev alan Tip-1 bakır, 2 histidin ve bir sisteine bağlıdır. Tip-1 bakır elektronları redükleyici fenolik substrattan alır ve bu elektronları Tip-2 ve Tip-3 bakır bölgelerindeki trinükleer merkeze taşır. Trinükleer merkez 8 histidin kısımlarıyla düzenlenmiştir ve moleküler oksijenin bağlanma bölgesidir. Oksijen atomu suya redüklenmek için Tip-1 bakırdan elektronları alır b) Bu bölümde ise lakkaz enziminin katalitik döngüsü belirtilmiştir. Moleküler oksijenin indirgenmesi ile oluşan iki molekül su ve buna eşlik eden oksidasyon reaksiyonları bu döngüde görülmektedir (Riva 2006).

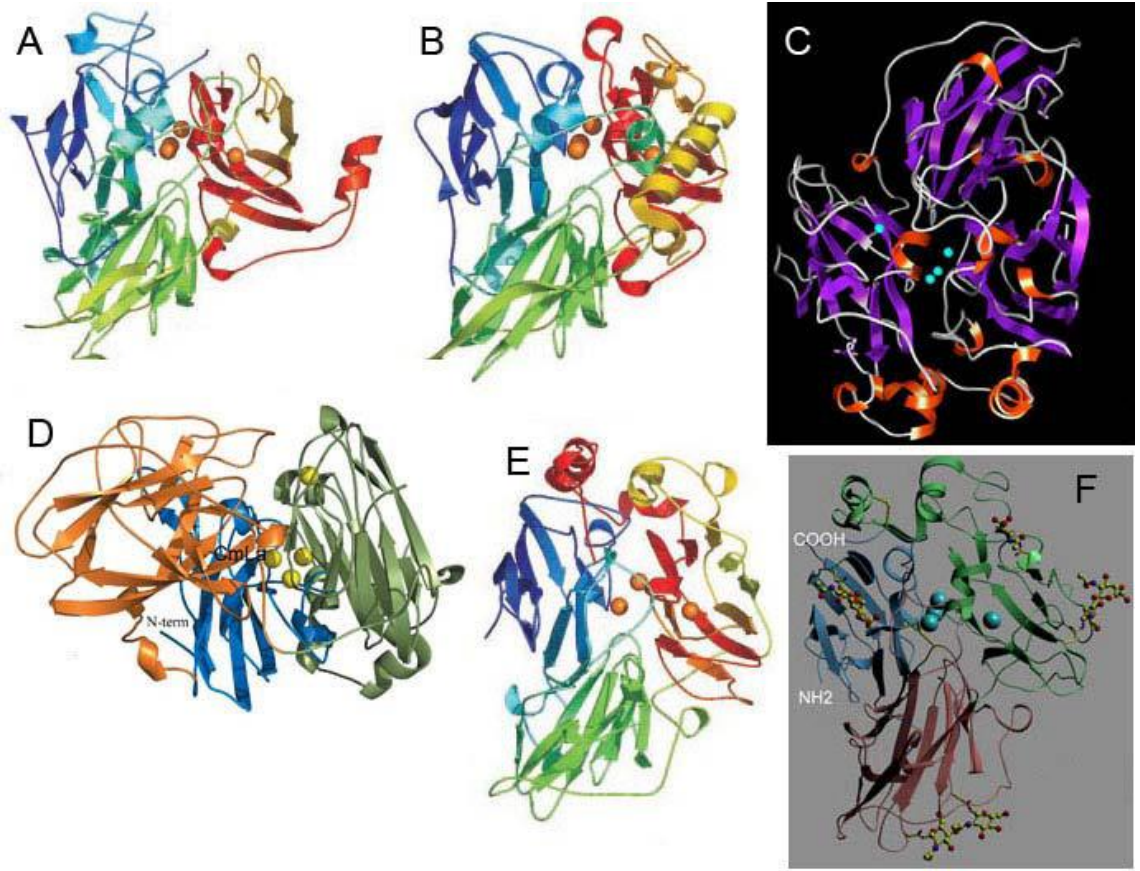




Şekil 2.7. Lakkaz enziminin yapısı (Anonymous 2013).

### 2.3.3. Protein karakterizasyonu

Çok sayıdaki bakteriyel türün genomik analizleri sonucunda, bakteriler arasında lakkaz-benzeri çoklu-bakır içeren oksidazların oldukça yaygın olduğu görülmüştür (Alexandre and Zhulin 2000). Buna rağmen, günümüze kadar yapısal olarak karakterize edilmiş olan *C. cinerius*, *T. versicolor*, *M. albomyces*, *Lentinus (Panus) tigrinus* ve *Cerrena maxima* kaynaklı lakkaz enzimlerinin hepsi de fungal kökenlidir (Ducros *et al.* 1998; Ducros *et al.* 2001; Bertrand *et al.* 2002; Hakulinen *et al.* 2002; Ferraroni *et al.* 2005; Lyashenko *et al.* 2006; Ferraroni *et al.* 2007). X-ışını kristallografisine dayalı olarak üç-boyutlu yapısı rapor edilen bakteriyel lakkaz enzimleri ise *B. subtilis* kaynaklı CotA ve *E. coli* kaynaklı CueO proteinleri olmuştur (Roberts *et al.* 2002; Li *et al.* 2007).



**Şekil.2.8.** 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*).

#### 2.3.4. Lakkaz enzimlerinin substratları

Son yıllarda lakkaz enzimleri tarafından oksitlendiği tespit edilen substratların sayısı oldukça artmıştır. Öncelikle, metokis- veya amino-monofenoller ve aromatik daiminler, ABTS [2,2'-azino-bis-(3-etilbenzothiazoline-6-sulfonik asit)], 1-naftol, hidroksiindoller ve şiringaldazin gibi fenolik-olmayan bileşikler, lakkazlar için substrat olarak kullanılmaktadırlar (Couto *et al.* 2004; Sharma *et al.* 2007). Ayrıca, tek başına iken lakkazların substratı olmayan bazı bileşikler ABTS varlığında lakkazlar tarafından okside edilmektedirler.

Faure ve ark. yaptıkları bir çalışmada lakkaz enzimleri için substrat olarak 5 sınıf

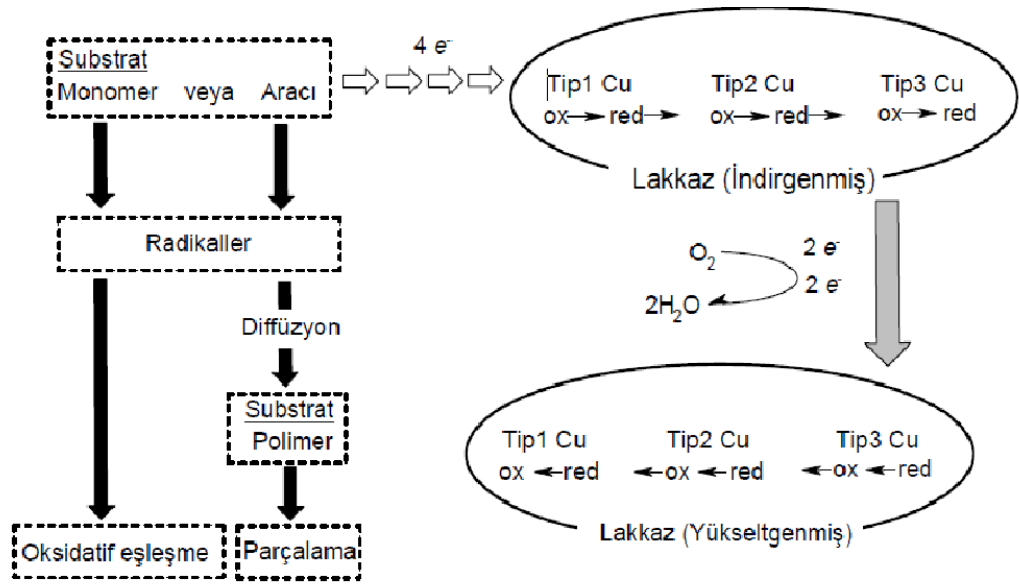
kimyasal bileşik araştırılmıştır:

- i. L-tirozin ve *p*-kumarik asit ve *o*-hidroksifenilasetik veya salisilik asit gibi substitüye monofenoller.
- ii. *o*-Difenoller (kateşol, pirogallol, guaikol, protokateşik asit, gallik asit ve kaffeik asit), L-3,4-dihidroksifenilalanin ve hem lakkaz hem de kateşol oksidaz tarafından oksitlenebilen *o*-aminofenol.
- iii. *p*-Difenol ve *p*-fenol oksidazlar (*p*-PO) için tipik substrat olan hidrokuinon, *p*-kresol, *p*-aminofenol ve *p*-fenilendiamin gibi *p*-pozisyonlu aromatik bileşikler.
- iv. Resorsinol, orsinol, 4-heksilresorsinol ve 5-pentadesilresorsinol gibi *m*-difenoller.
- v. Şiringaldazine, 1-naftol, ABTS ve 4- ve 5-hidroksindoleler gibi diğer lakkaz substratları (Faure *et al.* 1995).

Farklı organizmalardan elde edilen lakkazların substrat özgüllükleri farklılık göstermekle birlikte, lakkaz aktivitesini belirlemek ve ölçmek için yaygın olarak kullanılan birkaç bileşik de bulunmaktadır. Bu bileşiklerden ikisi gualkol ve ABTS'dir. Bu iki substratın her ikisi de lakkaz enzimleri için özgüldür. Fakat hidrojen peroksit varlığında peroksidaz enzimleri tarafından da oksitlenirler. Bu iki bileşiğin her ikisi de zehirli-olmadığı gibi, oksitlendiklerinde oluşturdukları yoğun renkleri nedeniyle özellikle lakkaz aktivitelerinin fotometrik olarak belirlendiği durumlarda kullanışlıdır. 2,6-dimetoksifenol ise doğal olarak bulunan bir lakkaz substratı olmasına rağmen, zehirlidir ve zamanla oto-oksidasyona uğrama eğilimindedir (Sharma *et al.* 2007).

### 2.3.6. Lakkaz enzimlerinin reaksiyon mekanizmaları

Lakkaz enzimlerinde bulunan farklı bakır merkezleri, indirgenmiş bir substrattan aldıkları elektronları, toksik peroksit ara-ürünlerinin oluşmasına yol açar.



**Şekil 2.9.** Fungal lakkaz enzimlerinin katalitik mekanizması.

Lakkaz enzimi, Tip1 bakır aracılığı ile her defasında 1 elektron transferiyle dört-basamakta substrat moleküllerini oksitler. Lakkaz molekülünün yeniden oksidasyonu (yükseltgenmesi) ise diamanyetik Tip3 bakır çifti tarafından iki basamaklı olarak dört elektronun, moleküler oksijene (O<sub>2</sub>) transferi ile sağlanır. Monomerlerin oksidasyonu sonucunda oluşan reaktif radikaller ise enzimatik-olmayan eşleşme reaksiyonlarına katılırlar. Polimerlerin parçalanması düşük moleküler kütleli aracı (redoksaracıları) bileşikler tarafından katalizlenir. Bu aracı moleküllerin lakkaz tarafından aktivasyonu gerçekleştirildikten sonra, bu araçlar aktif enzim bölgesinden polimerlerin hedef bölgelerin difüzlenirler ve atmosferik moleküler oksijene aktarırlar. Bu reaksiyon ise Tip1 bakır tarafından katalizlenen substratın dört monoelektronik oksidasyonu ile başarılmaktadır. Elektronlar ise daha sonra, moleküler oksijenin indirgendiği ve suyun serbest bırakıldığı trinuklear kümeye transfer edilirler (Şekil 2.9.) Substratların oksidasyonu ise reaktif radikallerin oluşmasına yol açmaktadır (Claus 2003). Oluşan reaktif radikaller ise enzimatik-olmayan reaksiyonlar ile aşağıdaki reaksiyonlara katılırlar:

**i. Monomerlerin çapraz-bağlanması:** Guaikol, pirogallol, *p*-kresol, 2,6-

dimetoksifenol gibi fenolik bileşiklerin ve aromatik anilinlerin lakkaz ile enzimatik oksidasyonu, radikallerin oluşmasına yol açar. Oluşan radikaller birbiri ile tepkimeye girerek C-C, C-O ve C-N bağları aracılığı ile kovalent olarak bağlanarak dimerleri, oligomerleri veya polimerleri oluştururlar. Oluşan son-ürünün yapısı ise ara-ürünlerin reaktivitesi ve reaksiyonun gerçekleştiği çevrenin pH'sı tarafından belirlenir. Toprakta ise doğal veya ksenobiyotik fenoller veya aromatik aminler, böylece organik humik matrikse bağlanabilirler. Substitiye bileşiklerin olması durumunda ise reaksiyona, kısmi demetilasyon ve dehalojenizasyon eşlik edebilir (Filip and Claus 1995; Leonowicz *et al.* 2001). Lakkaz enzimlerinin sahip olduğu bu kapasite ise bu enzimlerin, kontamine toprakların ve atık suların detoksifikasyonunda kullanılma potansiyelinin temelini oluşturmaktadır (Durán and Esposito 2000). Yüksek yapılı bitkilerde lakkaz aracılığı ile fenol-öncüllerinin çapraz-bağlanması lignifikasyon prosesinin bir parçasıdır. Böceklerde ise lakkaz tarafından katalizlenen kateşollerin proteinler ile birleştirildiği oksidatif birleştirme reaksiyonları ise kutikula sklerotizasyonunda rol alıyor olabilir (Kramer *et al.* 2001). Mikroorganizmalarda lakkaz enziminin, protein kalıntılarının çapraz-bağlanmasında (örneğin, tirozinden ditirozin) fonksiyon gösterdiği ileri sürülmektedir. Örneğin, sıcaklığa ve UV ışınlarına dirençli olan *Bacillus* sp. sporlarındaki proteinlerinin birleştirilmesinde lakkazın fonksiyonel olduğu ileri sürülmektedir (Hullo *et al.* 2001; Martins *et al.* 2002).

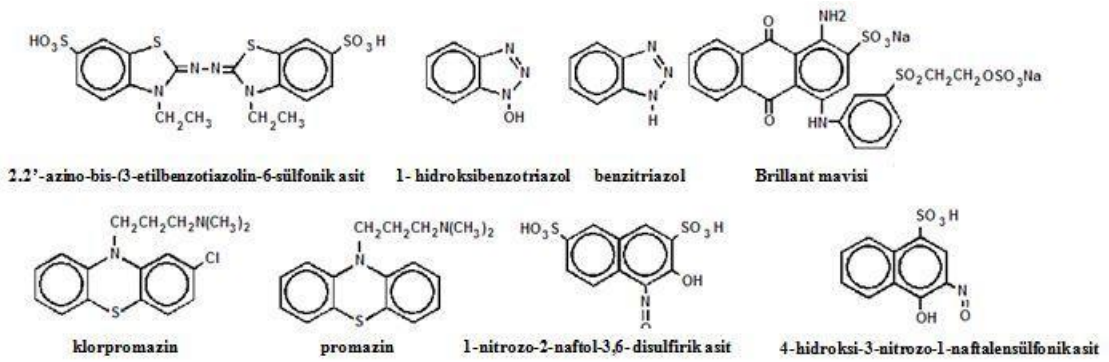
**ii. Polimerlerin parçalanması:** Lakkaz, lignin veya humik asit gibi kompleks doğal polimerlerin parçalanmasında rol almaktadır (Claus and Filip 1998). Üretilen reaktif radikaller, özellikle alkil-aril kovalent bağların kırılmasına ve monomerlerin serbest bırakılmasına yol açarlar. Sterik engelleme nedeniyle lakkaz, doğrudan doğruya polimer ile temas edemeyebilir. Bunun yerine, lakkaz tarafından okside ve aktive edilebilen küçük organik moleküller veya metaller (örneğin, veratril alkol, 3-hidroksi-antranilik asit ve  $Mn^{2+}$ ) radikal-katalizli polimerizasyonu sağlayabilirler. Biyoteknolojik uygulamalarda ise lakkazın oksidasyon potansiyelini artırmak amacıyla fizyolojik-olmayan redoks-aracıları kullanılmaktadır (Claus *et al.* 2002). Örneğin, özellikle fungal kaynaklı lakkaz enzimlerinin ve *Streptomyces cyaneus* lakkazının, ABTS gibi kimyasal araçların varlığında kraft hamurunun kappa numarasını önemli ölçüde düşürdüğü ve

ağartılmasını artırdığı bilinmektedir (Arias *et al.* 2003).

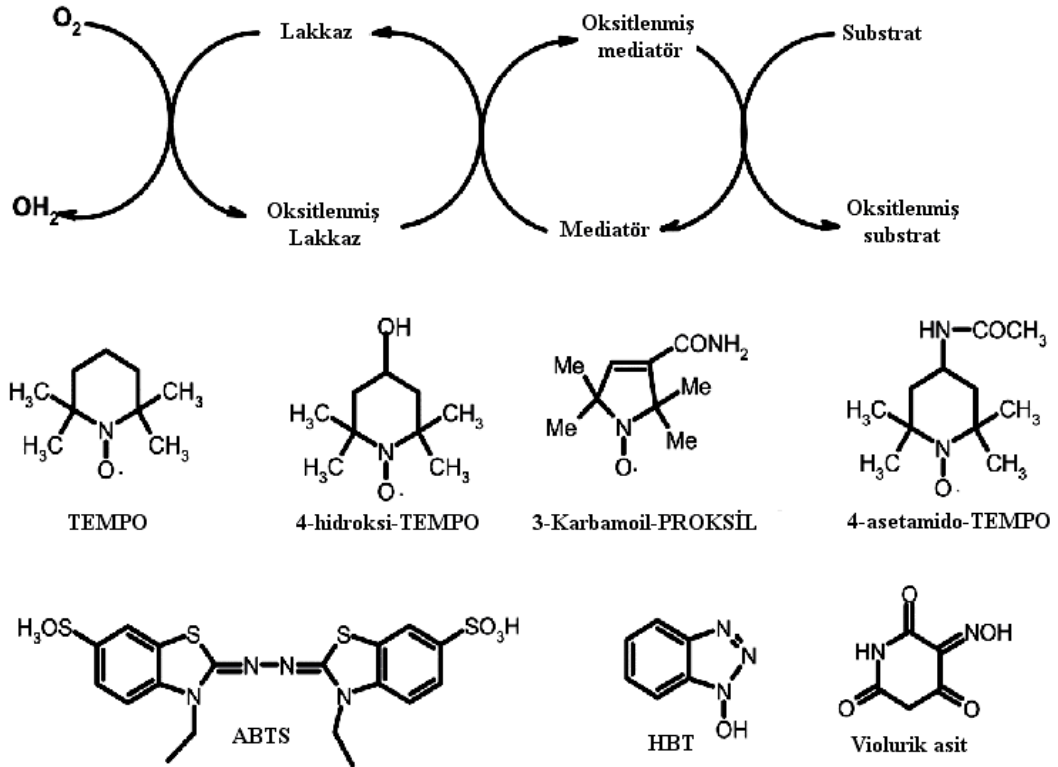
**iii. Aromatik halkaların kırılması:** Birkaç çalışmada, aromatik halkaların lakkaz aracılığı ile kırıldığı rapor edilmektedir. Bu reaksiyon ise nitroaromatikler ve sentetik boyalar gibi ksenobiyotik bileşiklerin parçalanması açısından biyoteknolojik olarak oldukça ilgi çekmektedir (Durán and Esposito 2000; Claus *et al.* 2002).

### Lakkaz mediatörleri

Lakkaz mediatörlerinin gerekliliği fenolik olmayan ambalaj kağıtlarının delignifikasyonu üzerinde yapılan yoğun çalışmalara dayanmaktadır. Bilinen bazı mediatörler; 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS), 1-hidroksibenzotriazol (HBT), benzitriazol (BT), brilliant mavisi (RBB), klorpromazin (CPZ), promazin (PZ), 1-nitrozo-2-naftol-3,6- disulfirik asit (NNDS) ve 4-hidroksi-3-nitrozo-1-naftalensülfonik asit (HNNS) olarak sıranabilir (Bourbonnais and Paice 1990).



**Şekil 2.10.** Bazı lakkaz mediatörlerinin kimyasal yapıları (Bourbonnais and Paice 1990).



**Şekil 2.11.** Mediatör varlığında gerçekleşen lakkaz reaksiyonu ve bazı lakkaz mediatörleri (Givaudan *et al.* 1993).

Mediatörlerden ABTS ve HBT daha çok kağıt hamuru delignifikasyonu, tekstil boyalarının dekolorizasyonu ve detoksifikasyonu, polisiklik aromatik hidrokarbonları (PAHs) gibi işlenmesi zor olan organik atıkların proseslerinde kullanılmaktadır (Corral *et al.* 2006).

Lakkaz mediatör sistemi (LMS) kağıt beyazlatma işlemine alternatif bir sistem olarak gösterilebilir. Lakkaz, ABTS gibi mediatörlerin varlığında fenolik olmayan bileşikleride katalizleyebilmektedir (Bourbonnais and Paice 1990).

### 2.3.6. Lakkaz enzimlerinin optimal aktivite pH'ları

pH, lakkaz enzimleri için oldukça önemli bir parametredir. Çünkü, bu enzimlerin aktiviteleri pH'a bağlıdır. Fenolik substratlar için lakkaz enzimlerinin pH

bağımlılıklarına bakıldığında, ortaya çıkan aktivite-pH grafiği çan eğrisi şeklindedir. Bunun nedeni ise pH'daki artışın, fenolik bileşiklerin pH'ya bağlı olarak fenol-fenolat dönüşümleri nedeniyle redüksiyon potansiyelindeki bir düşüşe bağlanırken, aktivitenin pH ile olan yarışmacı körelmesi ise trinuklear kümedeki hidroksid inhibisyonuna bağlanmıştır (Xu 1997). Çan eğrisi şeklindeki eğrinin maksimum noktası ise genellikle asidik pH'larda meydana gelmektedir. Fakat maksimum aktivitenin pH 9-10 gibi bazik bölgelerde meydana geldiği lakkaz enzimleri de bulunmaktadır. Örneğin, Dubé ve ark. tarafından *S. coelicolor* kaynaklı lakkaz enzimi (SLAC), substrat olarak 2,6-dimetoksifenol (DMP) kullanıldığında maksimum aktivitesini pH 9'da göstermiştir. Lakkaz enzimlerinin yüksek pH'larda aktivite göstermesi ise bu enzimlerin endüstriyel uygulamaları açısından arzu edilen bir özelliktir (Dubé *et al.* 2008).

### **2.3.7. Lakkaz enzimlerinin optimal aktivite sıcaklıkları ve termostabiliteleeri**

*S. coelicolor*'un sahip olduğu lakkaz enziminin 70°C'deki termostabilitesinin ise oldukça yüksek olduğu rapor edilmiştir (Dubé *et al.* 2008). Bains ve ark. tarafından endüstriyel atıksu ile kirlenen topraklardan izole edilen  $\alpha$ -proteobakteri üyesi alkalitolerant bir bakteri izolatının ürettiği lakkaz enziminin ise en az 24 saat süreyle pH 3-10,6 arasında kararlı olduğu, optimal aktivitesini ise 55°C'de ve pH 6,5'de gösterdiği rapor edilmiştir. *B. subtilis* endospor kılıf proteini olan CotA ise substrat olarak ABTS'ye karşı en yüksek lakkaz aktivitesini 75°C'de göstermiştir (Bains *et al.* 2003). Bu enzimin 80°C'deki yarılanma ömrü ise kılıf proteinleri ile birlikte iken 4 saat, saf iken ise 2 saat olarak tespit edilmiştir (Martins *et al.* 2002). *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 korurken, aynı sıcaklıktaki yarılanma ömrü ise 100 dak olarak belirlenmiştir (Suzuki *et al.* 2003).

### **2.3.8. Lakkaz enzimlerinin potansiyel endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamaları**

Lakkaz enziminin kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde kullanımı



Odunsu dokulardan lignin uzaklaştırılması, kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde kaliteli kağıt üretimi için çok gerekli bir parametredir (Mayer and Staples 2002). Kimyasal olarak kağıt hamuru üretiminde ligninin yaklaşık %10'u hamur içerisinde kalır ve kalan ligninin ya mekanik ya da kimyasal metotlarla uzaklaştırılması gerekir (Anke and Hall 1997). Kimyasal olarak odun hamuru oluşturma işlemlerinde odun liflerine sıkıca bağlanmış olan lignin katmanını gidermek için güçlü kimyasallar kullanılır. Özellikle daha önce kullanılan klorlu organik bileşikler akut veya kronik olarak toksik etki göstermelerinin yanında mutajenik ve karsinojeniktirler (Souza *et al.* 2006; Couto and Herrera 2006). Bu nedenlerle günümüzde  $Cl_2$  kullanımı yasaklanmış,  $Cl_2O$  kullanımı ise sınırlandırılmıştır. Buna göre ağartma işleminde yeni yaklaşımların geliştirilmesi gerekir. Alternatif bir yöntem olan biyolojik olarak kağıt hamuru oluşturma termomekanik olarak kağıt hamuru oluşturmada önce oksidatif lignin yıkıcı fungal enzimler ile lignoselülozik maddelerin muamele edilmesi işlemidir. Kağıt hamurunun lignolitik enzimler ile ön muamelesi sonucu gerçekleşen lignin giderimi hem selülozun bütünlüğünün korunması hem de lignin giderim veriminin artırılması açısından faydalı olmaktadır (Souza *et al.* 2006). Ayrıca bu biyolojik işlem hem kağıdın dayanıklılığını artırmakta hem de enerji ve kimyasal kullanımını azaltarak çevresel etkiyi azaltmaktadır (Whiteley and Lee 2006). Lakkazlar gibi oksidatif enzimleri kullanarak lignin yıkımını gerçekleştirebilirler (Mayer and Staples 2002). Kağıt hamurundan lignin gideriminde lakkazlar lignin içerisinde reaktif radikaller oluşturarak odun lifinde değişiklikler oluşturmak amacıyla kullanılmaktadır (Couto and Herrera 2006). Ligninin yıkılması işleminde enzimin aktif bölgesi ile lignin çekirdeği arasında sürekli hareket ederek redoks reaksiyonlarını gerçekleştiren ve lignin giderim verimini artıran küçük aracı moleküller oldukça önemlidir. Lakkaz gibi oksidatif enzimler kağıt hamuru üretiminde maliyeti azaltmada umut verici çözümler sağlamaktadır (Riva 2006).

### **Lakkaz enziminin çeşitli atık suların muamelesinde kullanımı**

Ülkemizde zeytinyağı, boya, tekstil ve kağıt fabrikaları gibi çeşitli endüstriyel alanlarda faaliyet gösteren pek çok ticari işletme atık sularını herhangi bir arıtmaya tabi tutmadan direkt olarak doğaya boşaltmakta, bu atık sular da gerek alıcı çevrede gerekse o çevrede

bulunan çeşitli canlılar üzerinde son derece olumsuz etkilere neden olmaktadır. Bazı işletmeler ise kimyasal yollarla atık sularını arıtmaktadır. Ancak arıtmada kullanılan kimyasalların kendileri de birer kirleticidir. Bu nedenle atık su arıtılmasında kullanılabilecek en akıllıca yöntem biyolojik arıtmadır (Birhanlı 2003). Endüstriyel atık suların arıtımı amacıyla gerçekleştirilen biyolojik iyileştirme çalışmaları atık sularda bulunan fenol türevlerinin direkt olarak oksidasyonuna yönelik olup, lakkazların hem fenolik hem de mikrobiyal yıkıma dirençli çevre kirleticileri gibi fenolik olmayan lignin benzeri bileşikler oksitleyebilme özellikleri bu enzimlerin çeşitli biyoteknolojik işlemlerde kullanılmalarını olanaklı kılar (Couto and Herrera 2006).

Beyaz çürükçül funguslar tekstil boyası atıksularının renginin gideriminde kullanılabilir ve lakkazlar bu işlemde önemli bir rol oynar. Bu nedenle lakkazlar biyolojik ağartma için cazip bir tercih olmaktadır. Bu enzimin yüksek renk giderim yeteneği tekstil atık sularının arıtımında lakkaz enziminin kullanılabileceğini göstermektedir (Zhang *et al.* 2006). Endüstriyel alanlarda kullanılan bazı boyalar benzidin ve diğer aromatik bileşikler gibi karsinojenlerden yapılmakta olup, bu tür boyalara ait atık suların arıtımı için kullanılan mevcut yöntemlerin çoğu etkisiz ve pahalıdır. Bu nedenle endüstride kullanılan sentetik boyalar da dahil farklı kimyasal yapıdaki boyaları yıkma potansiyeline sahip lakkaz tabanlı işlemlerin gelişimi bu problemlere cazip bir çözüm olabilir. Bu nedenlerle tekstil endüstrisinde lakkaz enziminin kullanımı çok hızlı bir şekilde gelişmiş, lakkaz tekstillerin ve hatta sentezlenmiş boyaların ağartılması amacıyla kullanılmıştır. Novozyme (Novo Nordisk, Danimarka) 1996 yılında DeniLite adı altında aracı bir molekül ile biyolojik ağartma yapan ilk endüstriyel lakkaz enzimini kot kumaşları için kullanmıştır. Zytex (Zytex Pvt. Ltd., Bombay, Hindistan) şirketi de çok özgül olarak indigo boyasını yıkabilen ticari adı Zylite olan bir lakkaz aracı molekül sistemi geliştirmiştir (Couto and Herrera 2006).

Bu uygulamaların yanısıra, lakkaz enzimi atık sulardaki boyar maddelerin, alkol fabrikası atık sularında bulunan vinas (organik madde) içeriğinin ve kahverenginin, zeytinyağı fabrikası atık suyunun asidik karakterinin ve içerdiği kolloidal fenolik maddeler nedeniyle oluşan bulanık morumsu kahverenginin gideriminde

kullanılmaktadır (Annibale *et al.* 1999; Cing vd 2003; Apohan 2007).

### **Lakkaz enziminin çeşitli pestisit ve ksenobiyotiklerin biyolojik iyileştirilmesinde kullanımı**

Lakkazlar pek çok aromatik bileşiği oksitleyerek daha az toksik ürünlerin oluşumunu gerçekleştirirler. Lakkaz enzimi fenollerin, triklorofenollerin, organofosforlu pestisitlerin, karasal ve sucul ortamlarda yaygın olarak dağılım gösteren ve yüksek oranda mutajenik ve karsinojenik ksenobiyotiklerden olan benzo[ $\alpha$ ]pren gibi poliaromatik hidrokarbonların toksisitesini giderebilen bir enzimdir (Alcalde *et al.* 2006). Bu enzimin benzoprenin yanısıra dioksinler gibi yüksek oranda toksik ksenobiyotiklerin yıkımını gerçekleştirdiği rapor edilmiştir (Lee *et al.* 1999). Diğer ksenobiyotiklerle birlikte doğal petrol yataklarından ve fosil yakıtların kullanımından ortaya çıkan polisiklik aromatik hidrokarbonlar toprak kirliliğinin ana sorumlusudur. Bu bileşiklerin yıkımı çevre açısından önemlidir ve lakkaz enziminin katalitik özellikleri bu tip bileşiklerin yıkımı için kullanılabilir (Han *et al.* 2005). Lakkaz enzimi herbisitleri de yapısal değişikliğe uğratarak inaktif analoglarına dönüştürebilmektedir. Reaksiyon ortamına mediatör olarak ABTS eklenmesiyle biyolojik yıkım daha da fazla gerçekleşebilmektedir (Birhanlı 2003). TNT (2,4,6-trinitrotoluen) sık kullanılan ve çevre kirliliğine neden olan patlayıcı bir maddedir. Bu nedenle TNT'in yıkımı ilgi çekici bir araştırma alanıdır. TNT yüksek toksisite ve mutajenite gösterdiğinden TNT yıkımı çevre güvenliği açısından çok önemlidir. Bakteriler ve funguslar tarafından TNT yıkımı ile ilgili çok sayıda çalışma vardır (Cheong *et al.* 2006).

### **Lakkaz enzimi geninin etanol üretim veriminin artırılması amacıyla klonlanması**

Lakkaz enziminin kullanım alanlarından biri de yenilenebilir ham materyallerden yakıt etanol üretiminin artırılmasıdır (Larsson *et al.* 2001). Üretimi artırma çalışmalarında lignoselüloz hidrolizatlarında bulunan fenolik inhibitörlere karşı *Saccharomyces cerevisiae*'nin direncini artırmak amacıyla *Trametes versicolor*'un lakkaz sentezinden sorumlu genleri *Saccharomyces cerevisiae*'e aktarılmış ve bu işlem sonucunda

ortamdaki fermentasyon inhibitörleri olan fenolik maddeler üretilen lakkaz enzimi ile yıkılmıştır. Yıkım işlemi sonucunda fenolik madde miktarı azalmasına bağlı olarak etanol üretim verimi de artmıştır (Mayer and Staples 2002).

### **Lakkaz enziminin biyosensör olarak kullanımı**

Biyosensör; fizyolojik veya biyokimyasal bir değişim hakkında bilgileri saptayan, nakleden ve kaydeden bir cihazdır. Teknik olarak biyosensör biyolojik bir bileşen ile elektronik bir iletim sisteminin birbirini tamamladığı bir probdur. Bu prob biyokimyasal bir sinyal miktarı ölçülebilir bir elektriksel yanıtla dönüştürür. Enzimler, antikolar, DNA, reseptörler, organeller, mikroorganizmalar, hayvan ve bitki hücreleri veya dokuları biyosensör yapımında kullanılabilir. Lakkaz enzimi de biyosensör yapımında kullanılabilen enzimlerdendir (Birhanli and Yesilada 2006; Roy and Abraham 2006; Odaci vd 2007). Lakkaz ek kofaktör olmadan elektron transfer reaksiyonlarını katalizleyebildiği için çeşitli aromatik aminlerin ve fenolik bileşiklerin, morfinin, kodeinin, kateşolaminlerin ve bitki flavonoidlerinin saptanmasında biyosensör olarak kullanılabilir (Papkovsky *et al.* 1993; Simkus and Laurinavicius 1995). Buna ilaveten bu enzim immunoprolar ve ilaç geliştirme gibi yeni uygulama alanlarını açacak biyosensör geliştirmede de kullanılmaktadır (Gnanamani *et al.* 2006).

### **Lakkaz enziminin gıda endüstrisinde kullanımı**

Lakkazlar besin veya içeceklerin rengini değiştirmek veya artırmak amaçlı yapılan işlemlerde kullanılabilir. Örneğin berrak meyve suyu, bira, şarapta oluşan esmerleşme, pus oluşumu ve bulanıklıktan sorumlu istenmeyen fenoliklerin ortadan kaldırılmasında lakkaz enzimi kullanılabilir. Şıra ve şaraplar etanol, organik asitler, tuzlar ve fenolik bileşikler gibi farklı kimyasal bileşiklerin kompleks karışımlarıdır. Lakkaz enzimi biranın tatsızlaşmasına neden olan bileşiklerin oluşumunu engellemek amacıyla bira yapımında kullanılmakta olup, lakkazın besin endüstrisindeki esas uygulamalarından biri de şarap stabilizasyonudur. Şaraplarda meydana gelen renksizleşme ve tat değişimini önlemek için fenolik grupların ortadan kaldırılmasında PVPP

(Polivinilpolipirrolidon) ve oksitleyicileri engellemek için de kükürt dioksit gibi farklı metodlar kullanılmaktadır. Fizikokimyasal adsorbanlara alternatif olarak hedef polifenollere etki eden enzimler kullanılabilir (Minussi *et al.* 2002). Bu polifenoller enzimler tarafından oksitlenebilir, polimerize edilebilir ve daha sonra durultma işlemi ile uzaklaştırılabilir. Bu amaç doğrultusunda lakkaz enzimi kullanılabilir (Larsson *et al.* 2001). Bunun yanısıra, lakkazlar fırıncılıkta kullanılan hamurda çapraz bağlar oluşturarak hamurun dayanıklılığını artırır (Couto and Herrera 2006). Özellikle bu amaçla lakkaz kullanımı sonucunda hamurun dayanıklılığı, kararlılığı artarken yapışkanlığı azalır ve böylece hamurun işlenilebilirliği de artar. Yağlarda bulunan çözülmüş oksijenin ilave edilen lakkaz enzimi ile tüketilmesi sonucu yağın lezzeti artmaktadır. Kakao içeren çözeltilere *Coriolus versicolor*'dan elde edilen ham lakkaz enziminin ilavesi ile kakaonun lezzeti artmaktadır (Minussi *et al.* 2002).

### **Lakkaz enziminin tekstil endüstrisinde kullanımı**

Boyar madde pazarının üçte ikisini tekstil endüstrisi kapsamaktadır. Bu endüstriler büyük hacimlerde su ve kimyasal tüketirler. Kullanılan kimyasal ayraçlar inorganik bileşiklerden polimerlere ve organik ürünlere kadar çok farklı kimyasal bileşimde olabildiğın çevre ve insan sağlığını tehdit etmektedirler. Bu nedenle endüstride kullanılan sentetik boyalar da dahil farklı kimyasal yapıdaki boyaarı yıkma potansiyeline sahip lakkaz tabanlı işlemlerin gelişimi bu problemlere cazip bir çözüm olabilir (Couto and Herrera 2006). Ayrıca, Novozyme (Novo Nordisk, Danimarka) 1996 yılında DeniLite adı altında aracı bir molekül ile biyolojik ağartma yapan ilk endüstriyel lakkaz enzimini kot kumaşları için kullanmıştır (Couto and Herrera 2006). Bazı kotların belirli bölgelerinde boyanın renginin açılması için taşlama yapılmaktadır (Campos *et al.* 2001; Nyanhongo *et al.* 2002). Her ne kadar taşlamannın amacı kotun belirli bölgelerinde boyanın renginin açılması olsa da taşlama esnasında sürtünmeden dolayı kumaşta zedelenmeler gerçekleşmekte ve kotun kullanım süresi azalmaktadır. Lakkaz enzimiyle kotun belirli bölgelerinde boyanın enzimatik olarak kısmi yıkımıyla kumaşta sürtünmeden dolayı meydana gelen tahribat ortadan kaldırılmış olacaktır. Bu nedenle kot kumaşlarının ağartılmasında lakkaz enzimi kullanılabilir (Birhanlı 2003).

### **Lakkaz enziminin çeşitli boyaların renginin gideriminde kullanımı**

Tekstil, kağıt, kozmetik, farmasötik ve gıda endüstrilerinde sentetik boyalar gittikçe artan oranda kullanılmakta olup, özellikle boya ve tekstil endüstrileri çevreye endüstriyel boyaları boşaltmaktadır (Mechichi *et al.* 2006; Kunamneni *et al.* 2008). Kromofor tipine göre boyalar azo, antrakinin, akridin, arilmetan, siyanin, fitalosiyanın, nitro, nitrozo, kinonimin, tiazol veya ksantin boyaları olarak çeşitli sınıflara ayrılır (Kirk *et al.* 2002). Kimyasal olarak azo, antrakinin, heterosiklik, trifenilmetan veya fitalosiyanın boyaları şeklinde sınıflandırılan bu boyalar ciddi çevre kirliliğine neden olmaktadır. Lakkaz enzimi farklı yapıdaki pek çok boyanın renginin gideriminde kullanılabilir. Bu boyalar arasında; reactive Black 5 (diazo boya), Remazol Brilliant Blue B (indigoid boya), Acid Blue 25 (antrakininik boya), Acid Green 27 (antrakininik boya), Methyl Orange (azo boya), Methyl Green (triarylmethane boya), Direct black 168, Acid Red 119, Direct Blue 78, Acid Yellow 166 gibi çeşitli endüstriyel boyalar mevcuttur (Couto 2007; Kunamneni *et al.* 2008; Michniewicz *et al.* 2008).

### **Lakkaz Enziminin Biyoremidasyon'da Kullanılması**

Diğer ksenobiyotiklerle birlikte metal kirliliği toprak kontaminasyonunun temel kaynağını oluşturur. Bu nedenle, bu tür bileşiklerin parçalanması çevre açısından oldukça önemlidir. Lakkaz enzimlerinin katalitik özellikleri ise klorofenoller gibi bileşiğin parçalanmasında kullanılabilir. Bu tip uygulamalar için en kullanışlı metot ise saflaştırılmış olan lakkaz enzimleri ile büyük-ölçekli toprak remidasyonunun ekonomik olmayacağı nedeniyle kuşkusuz, ksenobiyotik bileşiklerle kontamine olmuş toprakların lakkaz enzimlerini üreten mikroorganizmalar ile iyileştirilmesi mümkün olacaktır (Birhanlı 2008).

### **Lakkaz enziminin diğer endüstriyel alanlarda kullanımı**

Biyoyakıt pilleri yakıt tüketmeden elektrik enerjisi sağlayan ve böylece daha temiz bir enerji kaynağı oluşturan son derece cazip yapılardır (Couto and Herrera 2006). Lakkaz

enzimi de küçük iletken sistemler gibi biyoyakıt pillerinin katot bölgesi üzerine tutuklanarak güç kaynağı olarak kullanılabilir (Couto and Herrera 2006). Lakkazlar biyoyakıt pillerinin katot bölümünden elektronları alabilen birkaç enzimden biri olup, yapılan çalışmalar lakkazların biyoyakıt pilleri ile birleştirmesine yöneliktir (Alcalde *et al.* 2006).

Lakkazlar temizleyici ajan olarak su saflaştırma sistemlerinde kullanılabildiği gibi, katalizör olarak anti-kanser ilaçlarının üretiminde ve kozmetik ürünlerinde özellikle de saç boyalarında kullanılabilmektedir (Dhawan *et al.* 2005). Lakkaz tabanlı saç boyalarında kullanılan lakkazlar, oksitleyici ajan olarak bulunan  $H_2O_2$  ile yer değiştirdiği için yaygın olarak kullanılan boyalardan daha az tahriş edici olup, bu tür boyaların cilt ile temasında problem oluşturma riski çok daha azdır. Cildin parlatılması için kullanılan kozmetik ve dermatolojik ürünlere lakkaz enziminin ilavesi de geliştirilme aşamasındadır (Couto and Herrera 2006).

### 3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kullanılan kimyasal madde ve malzemeler

Çalışmada kullanılan örnek, Ağrı Diyadin kaplıcasından alınmıştır. Bakteri izolasyon, identifikasyon ve karakterizasyon çalışması için genel ve özel besiyerleri, çeşitli kimyasallar, sarf malzemeler, kitler ve primerler kullanılmıştır. Ayrıca enzim saflaştırma işlemleri için ise; serum albumin, diyaliz torbası, metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), glisin, N,N,N',N'-tetrametiletilediamin (TEMED), N,N-metilen-bisakrilamid, ditioeritritol ( $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$ ), asetik asit ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), sodyum karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), akrilamid, Tris (trihidroksimetilaminometan), amonyum persülfat ( $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ ), commassie brilliant blue G-250, etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ), fosforik asit ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), sodium bisfosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), hidroklorik asit (HCl), sodyum hidroksid (NaOH), amonyum sülfat ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), Sephadex G-100, Sefakril S 200, commassie brilliant blue R-250,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid), guaiakol, Reaktif siyah 5 (RB5), fuksin ( $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{N}_3 \cdot \text{HCl}$ ), allura kırmızısı ( $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8\text{S}_2$ ), Asit kırmızı 37 diammonium salt ( $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_8\text{S}_2 \cdot 2\text{H}_3\text{N}$ ),  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{FeCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{HgCl}_2$ , Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), sodium bikarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ), sodium asetat ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) kullanılmıştır.

##### 3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Otomatik pipetler (Eppendorf)

UV-Visible Spektrofotometre (PG Instrument, T80 UV/VIS Spektrofotometre, USA)

İnkübatör (Binder BD53, GERMANY)

Otoklav (HMC Hirayama Hiclava HV-50L, JAPAN)

Steril Kabin (Esco AC2-4E1, SINGAPORE)

Çalkalayıcı (Zhicheng ZHWY-200B, CHINA)



Magnetik Karıştırıcı (Daihan Scientific MSH 20A, KOREA)  
pH Metre (InoLab pH730 wtw Series, GERMANY)  
Derin Dondurucu (Nuaire -86 Ultralow Freezer, NU6613W37, U. S. A.)  
Hassas Terazi (Mettler Toledo AL204, CHINA)  
Buzdolabı (Beko BK9470, TÜRKİYE)  
Su Banyosu (Memmert WNB14, GERMANY)  
Saf Su Cihazı (GFL 2004, GERMANY)  
Vorteks (Heidolph Reax Top, GERMANY)  
Santrifüj (Hettich EBA 21, GERMANY)  
Kolon (Liquid chromatography columns, 1.5 cm x 30 cm, bed: 53 mL )  
Peristartik pompa (Labor-Schlauchpumpe PLP 33 )  
Mikroskop (Boeco BM 180, GERMANY)  
Mikrodalga Fırın (Beko MD1505, TÜRKİYE)  
Vorteks (Heidolph Reax Top, GERMANY)  
Dikey Tüp Karıştırıcı (GFL 3025, GERMANY)  
Mikrobiyal Tanılama Sistemi (MIDI, Inc., Newark, GERMANY)  
PCR (Corbett Research CG1-96, AUSTRALIA)  
Elektroforez Tankı (Yatay) (OWL B2, U.S.A.)  
Elektroforez Akım Sağlayıcı (OWL OSP300-2Q, U.S.A.)  
Jel Görüntüleme Sistemi (DNR BioImaging Systems MiniBis Pro, ISRAEL)  
Buz Makinesi (Scotsman AC45, ITALY)

### 3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Araştırma süresince kullanılan çözeltiler, hazırlanış biçimleri ve kullanıldıkları yerler aşağıda belirtilmiştir.

1. **%0,85'lik NaCl çözeltisi:** 8,5 mg NaCl, 1 L saf suda çözülerek otoklavda steril edildi.
2. **Nutrient broth (NB):** 13 g nutrient broth içeriği (Oxoid,) 1 L saf su içerisine

eklendi. Besiyeri otoklavda steril edildi.

**3. Nutrient agar (NA):** 28 g nutrient agar karışımı (Oxoid) 1 L saf su içerisine ilave edildi. Besiyeri otoklavda steril edildi. 45-50°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülerek katılaşmaya bırakıldı.

**4. Strach agar:** 23 g nutrient agar (Difco) ve 10 g %1'lik nişasta 1 L saf su içerisine konularak, otoklavda 121°C de 15 dakika steril edildi. Sterilizasyon sonrasında 45-50°C ye kadar soğutulan besiyeri steril petrilere dökülerek ve katılaşması sağlandı.

**5. 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.

**6. 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.

**7. Trypticase soy broth (TSB):** 30 g triptikase soy agar karışımı (Oxoid) 1 L saf su içerisine ilave edildi. Besiyeri otoklavda steril edildi.

**8. Trypticase soy agar (TSA):** 40 g tripticase soy agar karışımı (Oxoid) 1 lt saf su içerisine ilave edildi. Besiyeri otoklavda steril edildi. 45-50°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülerek katılaşmaya bırakıldı.

**9. Stok Besiyeri:** 0,65 g nutrient broth karışımına, 36 mL gliserol eklendikten sonra son hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı. Magnetik karıştırıcıda karıştırılan besiyeri, otoklavda steril edildi. Aseptik olarak steril 2 mL'lik eppendorf tüplerine 1,2 mL konularak hazırlandı.

10. **%3'lük KOH çözeltisi:** 3 g KOH 100 mL steril saf su içerisinde çözülerek hazırlandı.
11. **Kristal violet:** 2 g kristal violet, 20 mL %95'lik etil alkolde çözüldü ve son hacim steril saf su ile 100 ml'ye tamamlandı. Amber şişe içinde buzdolabında muhafaza edildi.
12. **Lugol solüsyonu:** 1 g iyot ve 0,5 g KI tartıldı, toplam hacim steril saf su ile 100 ml'ye tamamlandı. Amber şişe içinde buzdolabında muhafaza edildi.
13. **Safranin:** 1 g safranin, 10 mL %95'lik etil alkolde çözüldü ve son hacim steril saf su ile 100 ml'ye tamamlandı. Amber şişe içinde buzdolabında muhafaza edildi.
14. **Malaşit yeşili:** 5 g malaşit yeşili, 100 mL steril saf su içinde çözülerek hazırlandı ve amber şişe içerisinde buzdolabında muhafaza edildi.
15. **%5'lik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi:** 17 mL %30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in hacmi steril saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.
16. **STE (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 50 mM EDTA, pH: 8) çözeltisi:** 1,21 g Tris, 1,75 g NaCl ve 3,72 g EDTA saf su içerisinde çözüldü. 1 N HCl ile pH'sı 8 olana kadar titre edildi. Toplam hacim 200 ml'ye tamamlandıktan sonra otoklavda steril edildi.
17. **TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH: 8) tamponu:** 0,3 g Tris-HCl ve 0,093 g EDTA saf su içerisinde çözüldü ve pH 8'e ayarlandı. Son hacim 250 ml'ye tamamlanarak otoklavda steril edildi.
18. **5 M NaCl çözeltisi:** 29,22 g NaCl'ün, 100 mL saf su içerisinde çözülmesiyle hazırlanarak otoklavda steril edildi.
19. **1XTE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH: 8) çözeltisi:** 0,24 g Tris ve 0,074 g EDTA

saf su içerisinde çözüldü ve pH'sı 8'e ayarlandı. Son hacim 200 ml'ye tamamlanarak otoklavda steril edildi.

**20. %10 luk SDS çözeltisi:** 10 g SDS nin 100 mL saf su içerisinde çözünmesiyle hazırlandı. Çözelti otoklavda steril edildi ve ağzı iyice kapatılarak, oda sıcaklığında muhafaza edildi.

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

**22. %10 CTAB (Hexadecyl trimetil-ammonium bromide)-0,7 M NaCl çözeltisi:** 80 mL saf su içerisinde önce 4,09 g NaCl çözüldü. NaCl tamamen çözüldükten sonra karışıma 10 g CTAB ilave edilerek çözünmesi sağlandı. Toplam hacim 100 mL'ye tamamlandıktan sonra otoklavda steril edilerek, oda sıcaklığında muhafaza edildi.

**23. Fenol: kloroform: izoamilalkol (25:24:1) çözeltisi:** 25 mL fenol, 24 mL kloroform ve 1 mL izoamilalkol karıştırılarak hazırlandı. -20°C'de muhafaza edildi.

**24. Kloroform: izoamilalkol (24:1) çözeltisi:** 24 mL kloroform ve 1 mL izoamilalkol karıştırılarak hazırlandı. -20°C'de muhafaza edildi.

**25. %70'lik Etil alkol:** 70 mL saf etil alkolün hacmi steril distile su ile 100 mL ye tamamlandı. -20°C'de muhafaza edildi.

**26. Proteinaz K:** 1 mL steril distile su içerisinde 20 mg proteinaz K olacak şekilde hazırlandı. -20°C'de muhafaza edildi.

**27. Sığır serum albumin:** 1 mL steril distile su içerisinde, 1 mg sığır serum albumin olacak şekilde hazırlandı. -20°C'de muhafaza edildi.

- 28. 5XTBE Tamponu (pH: 8):** 54 g Tris, 27,5 g borik asit ve 20 mL 0,5 M EDTA 500 mL steril distile su içerisinde çözüldükten sonra karışımın pH'sı 8'e ayarlandı ve toplam hacim steril distile su ile 1 L'ye tamamlandı.
- 29. 5XTAE Tamponu (pH: 8):** 24,2 g Tris, 5,71 mL glacial asetik asit, 10mL 0,5 M EDTA, 500 mL steril distile su içerisinde homojenize edildikten sonra karışımın pH'sı 8 e ayarlandı ve toplam hacim steril distile su ile 1 L'ye tamamlandı.
- 30. 0,5XTBE Tamponu:** 100 mL 5xTBE'nin hacmi steril distile su ile 1 L'ye tamamlanarak hazırlandı.
- 31. 0,5XTAE Tamponu:** 100 mL 5xTAE'nin hacmi steril distile su ile 1 L'ye tamamlanarak hazırlandı.
- 32. Ethidium bromür çözeltisi:** 100 mL distile su içerisinde, 1 g ethidium bromür (10 mg/ml) magnetik karıştırıcı kullanılarak iyice çözüldü ve amber şişe içinde, oda sıcaklığında muhafaza edildi.
- 33. 6X yükleme tamponu:** 100 mL için, %100'lük gliserolden 40 mL alınıp, 0,1 g bromfenol blue ile karıştırıldı ve hacmi 1x TBE ile 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti otoklavda steril edildikten sonra +4°C de muhafaza edildi.
- 34. Amfisilin Solüsyonunun Hazırlanması:** 20 mg ampisilin (Fluka-10044) tartılarak, 1 mL su içerisinde çözüldü. Hazırlanan çözelti 0,22 µm çapındaki bakteriyolojik filtreden geçirilerek steril edildi. Kullanılincaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.
- 35. CaCl<sub>2</sub> Solüsyonunun Hazırlanması:** 100 mM olacak şekilde 1,11 g CaCl<sub>2</sub> tartılarak (Sigma-C5670), 100mL saf su içinde çözüldü. Ağzı pamuk tıkaçla kapatılarak otoklavda steril edildikten sonra +4°C'de muhafaza edildi.

- 36. X-gal Çözeltisi:** 23,8 mg Xgal, 1 mL saf su içerisinde çözülerek hazırlandı. Çözelti 0,22 µm çapındaki bakteriyolojik filtreden geçirilerek steril edildi. Kullanılincaya kadar -20°C’de muhafaza edildi.
- 37. IPTG Çözeltisi:** 40 mg IPTG tartılarak, 1 mL %100’lük Dimetilformamid ‘de (Sigma-D4551) çözüldü. Hazırlanan çözelti ışık almayacak şekilde -20°C’de muhafaza edildi.
- 38. Kullanılan Kitler:** pGEM®-T Easy Vector Sistemi (Promega-A1360), plazmit DNA saflaştırma kiti (Promega-A1330).
- 39. 100 mM 100 mL Sodyum Asetat, pH: 3,4,5 tampon çözeltisi:** 0,8 g sodyum asetat, 60 mL saf su içerisinde çözülür 3 eşit parçaya böldükten sonra sırasıyla pH’ları 3, 4 ve 5 e ayarlandı ve son hacim 100 mL’ye tamamlanır.
- 40. 100 mM 100 mL Sodyum Fosfat, pH: 6, 7 tampon çözeltisi:** 1,15 g sodyum fosfat 80 mL saf su içerisinde çözüldü. 2 eşit parçaya böldükten sonra, sırasıyla pH ’ları 6 ve 7 e ayarlandı ve son hacim 100 mL’ye tamamlanır.
- 41. 100 mM 100 mL Tris-HCl, pH: 8, 9 tampon çözeltisi:** 1,2 g Tris-HCl 60 mL saf su içerisinde çözüldü. 2 eşit parçaya böldükten sonra sırasıyla pH ’ları 8 ve 9’a ayarlandı ve son hacim 100 mL’ye tamamlanır.
- 42. Dengeleme tamponu 100 mM Sodyum sitrat, pH: 4 (Enzimin saflaştırılması esnasında kullanılan tampon çözelti):** 26,3 g sodyum sitrat, 800 mL saf suda çözüldü ve pH’sı 4’e ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 1000 mL’ye tamamlandı.
- 43. Gradient oluşturma çözeltisi (1M NaCl):** 14,6 g NaCl alınarak saf suyla 1000 mL’ye tamamlandı.

**44. Guaiakol substratının hazırlanması:** Bu substratı hazırlamak için 0,179 g guaiacol hassas terazi ile tartıldı. 0,115 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pipetle alındı ve 50 mL sodyum fosfat tamponu içerisinde çözüldü ve bu substrat kullanılarak aktivite ölçümü 470 nm'de bakıldı.

**45. ABTS (2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) substratının hazırlanması:** 0,137 gr ABTS hassas terazi ile tartılıp üzerine 0,115 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilave edildi ve 50 mL sodyum sitrat tamponu içerisinde çözüldü ve bu substrat kullanılarak aktivite ölçümü 734 nm'de bakıldı.

**46. 2,6-dimetoksifenol substratının hazırlanması:** 0,154 g 2,6-dimetoksifenol 100 mL saf su içerisinde çözüldü ve bu substratın aktivitesine 420 nm 'de gerçekleştirildi.

**47. Metal iyonların hazırlanması:**

5 mM CuCl<sub>2</sub> (mA: 134,45 g/mol); m=0,0336 g tartıldı ve 50 mL saf suda çözüldü.

5 mM BaCl<sub>2</sub> (mA: 244,28 g/mol); m=0,061 g tartıldı ve 50 mL saf suda çözüldü.

5 mM MnCl<sub>2</sub> (mA: 126,93 g/mol); m=0,0324 g tartıldı ve 50 mL saf suda çözüldü.

5 mM NiCl<sub>2</sub> (mA: 129,69 g/mol); m=0,0324 g tartıldı ve 50 mL saf suda çözüldü.

5 mM CoCl<sub>2</sub> (mA: 129,93 g/mol); m=0,3059 g tartıldı ve 50 mL saf suda çözüldü.

5 mM ZnCl<sub>2</sub> (mA: 236,3 g/mol); m=0,059 g tartıldı ve 50 mL saf suda çözüldü.

5 mM FeCl<sub>2</sub> (mA: 198,83 g/mol); m=0,0497 g tartıldı ve 50 mL saf suda çözüldü.

5 mM EDTA (mA: 372 g/mol); m=0,093 g tartıldı ve 50 mL saf suda çözüldü.

5 mM Askorbik asit (mA: 176,13 g/mol); m=0,044 g tartıldı ve 50 mL saf suda çözüldü.

5 mM CaCl<sub>2</sub> (mA: 111,1 g/mol); m=0,02777 g tartıldı ve 50 mL saf suda çözüldü.

5 mM HgCl<sub>2</sub> (mA: 472,09 g/mol); m=0,118 g tartıldı ve 50 mL saf suda çözüldü.

**48. Coomassie Brilliant Blue G250 reaktifinin hazırlanması (Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti):** 100 mg Coomassie Brilliant Blue G250, 50

mL %95'lik etanolda çözülerek üzerine 100 mL %89'luk fosforik asit ilave edildi. Daha sonra çözeltinin hacmi saf su ile 1 litre'ye tamamlandı.

**49. Sığır Serum albumin hazırlanması:** 1 mL saf su içerisine, 1 mg SSA eklendi ve vortekslendi.

**50. Endüstriyel boyaların hazırlanması:** Bu boyalar 50 mg/L olarak 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.

**51.  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + Dithioeritrol tamponun hazırlanması (Moleküler ağırlığın belirlemek esasında kullanılan çözelti):** 5.999 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 0,154 g Dithioeritrol tartıldı, daha sonra bu maddeler 800 mL saf suda çözüldü ve pH'sını 6,5'a ayarladıktan sonra, saf su ile 1 litreye tamamlandı. Bu tampon Sefadex G100 için kullanıldı.

**52. 1 M 100 mL'lik Tris-HCl çözeltisi (pH:6.8):** 12.11 g Trizma maddesinden tartıldı, 80 mL saf suda çözüldü ve pH'sı 6.8'e ayarlandı, Son hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

**53. 1 M 100 mL'lik Tris-HCl çözeltisi (pH:8.8):** 12.11 g Trizma tartıldı, 80 mL saf suda çözüldü. pH'sı 8.8'e ayarlanarak son hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

**54. %30 Akrilamid ve Bisakrilamid (%30-%0.8) çözeltisi:** 30 g Akrilamid ve 0,8 g Bisakrilamid tartıldı, 128 mL  $\text{dH}_2\text{O}$  içerisinde çözüldü, 37 °C'de karıştırıldı ve 0,45  $\mu\text{m}$  filtre kağıdı ile filtre edilerek pH'sı 7'ye ayarlandı.

**55. Sabitleştirme çözeltisi:** %50 izopropanol (50 g) + %10 TCA (10 g) + %40 saf su (40 ml) birleştirildi ve 20 dk karıştırıldı.

**56. Elektroforezde kullanılan Boyama çözeltisi:** 50 mL metanol + 10 mL asetik asit



pipet vasıtasıyla alındı ve 40 mL saf su içerisinde, 0,1 g Commassie Brilliant Blue reaktifi ile birlikte çözüldü ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

**57. Elektroforez çözeltisi :** 50 mL metanol + 10 mL asetik asit + 40 mL saf su, pipet vasıtasıyla alındı ve küçük beher içerisinde iyice karıştırıldı.

**58. %10 SDS çözeltisi:** 10 g SDS tartıldı, 50 mL saf su içerisinde ısıtarak çözüldü ve son hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

**59. %10 APS (Amonyum persülfat) (2ml) çözeltisi:** 0,2 g APS, 1,8 g dH<sub>2</sub>O içerisinde çözüldü.

**60. Ayırma jelin hazırlanması:** 15 mL 1M Tris-HCl (pH: 8,8), 10,7 mL %30'luk akrilamid, %0.8'lik bisakrilamid, 0,61 mL %0.1 SDS ve 0,4 mL %5'lik TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin), 11,9 mL suda karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,8 mL %1.5'lik amonyum persülfat (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> ilave edildi.

**61. 0,05 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM Ditioueritritol, pH 7,0 (Molekül ağırlığını tespit etmek için kullanıldı):** 0,1542 g ditiotreitol ve 7,075 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 950 mL deiyonize suda çözüldü. 1 N HCl ile pH'sı 8'e ayarlandıktan sonra, toplam hacmi deiyonize su ile 1 L'ye tamamlandı.

#### **3.1.4. Çalışmada kullanılan termofilik bakteri**

Bu çalışmada, kullanılan termofilik bakteri, Ağrı (Diyadin) termal tesisinden, steril, ağzı kapaklı şişeler içerisinde alınarak laboratuara getirilen su ve çamur örneğinden izole edildi.

## **3.2. Yöntemler**

### **3.2.1. Kaynaktan örneklerin alınması ve bakteri izolasyonu**

Çalışmada kullanılacak olan bakterinin izolasyonu amacıyla; sıcaklık değeri 40°C üzerinde olan lokaliteden (Ağrı-Diyadin), su ve çamur örneği alınarak, 250 mL lik steril plastik şişelere (kapaklı) aktarıldı ve laboratuvara ortamına getirildi. Laboratuarda 01.M fosfat tamponu içerisinde seyreltisi hazırlanan örnekten, zengin besi ortamlarına (Nutrient Agar, Luria-Bertani Agar, Trypticase Soy Agar, Glucose Yeast Extract Peptone Agar) dilisyon ekimi yapılarak aerobik ve anaerobik inkubatörlerde 55°C inkübasyona bırakıldı. İnokule edilen besi ortamlarında gelişen koloniler daha sonra alt kültürlerle alınarak bakteri (Z1) saflaştırıldı ve diğer karakterizasyon işlemlerine kadar %16'lık gliserol içeren NB içerisinde, -86°C'de saklandı (Adıgüzel 2006).

### **3.2.2. Morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler**

#### **3.2.2.a. Morfolojik testler**

##### **Hücre Morfolojisi**

Saflaştırılan bakteri, çizgi ekim yöntemiyle NA besiyerine ekildi ve 56°C'de inkübasyona bırakıldı. 24-48 saatlik bakteri kültürlerinden öze ile alınan hücreler, lam üzerine ilave edilen bir damla dH<sub>2</sub>O içerisine aktarılarak, lam yüzeyine homojen bir şekilde iyice yayıldı, havada kuruması için bir süre bekletildi (Smear hazırlanmıştır). Aynı preparat kuruduktan sonra lamın alt yüzü alevden geçirilmek suretiyle bakteri tespit edildi. Preparat kristal viyole ile basit boyama yapılarak (1-2 dk) bir süre bekletildi. Süre sonunda hücre yapıları (yuvarlak, çubuk veya spiral) mikroskop altında bakılarak kaydedildi (Adıgüzel 2006).

### **Koloni Morfolojisi**

Saflaştırılan bakteri çizgi ekim yöntemiyle nutrient agar besiyerine ekilerek, 55-56°C’de 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakıldıktan sonra koloni özellikleri incelendi (Adıgüzel 2006).

### **Gram reaksiyon testi**

Bu test ile bakteri hücre duvarlarındaki farklılığın belirlenmesi gerçekleştirilmekte ve bu amaç ile 2 farklı yöntem kullanılmaktadır. Bu çalışmada izolatların Gram özelliklerini belirlemek amacı ile her iki yöntem de kullanılmıştır.

Bu yöntemlerden birincisi ve yaygın olarak kullanılanı; temiz bir lam üzerinde, genç bakteri kültüründen hazırlanan smear, kristal violet ile 1 dakika boyanır. Bu boya hücreye nüfus etmesiyle hem Gram (+) hem de Gram (-) bakteriler mor renkli boyanır. Sürenin sonunda fazla boya hafif su akımı ile uzaklaştırılır. Preparatın üzerine lügol eklenir ve 1 dakika bekletilir. Lügol bu aşamada mordan olarak kullanılır. Lügol uygulanan preparat %96’lık etil alkol ile dikkatlice yıkanır. Alkol ile yıkama sonrası Gram (+) bakteriler peptidoglikan tabakalarının kalın olması nedeniyle kristal violet-lügol kompleksini bırakmaz ve mor renkli kalırken, Gram (-) bakterilerin dış membranları bozulur ve ince peptidoglikan tabakaları boyayı tutamadığı için renksizleşir. Yıkama işlemi sonrasında saf sudan geçirilen preparat safranin ile 20 saniye boyanır. Boyama süresi sonunda hafif su akımı ile yıkanan preparat kurutulularak, immersiyon objektifinde inceleme yapılır. Mor renk Gram (+), pembe-kırmızı renk Gram (-) olarak değerlendirilir (Harley and Prescott 2002)

Bu metodlardan ikincisi ise; Gram (-) bakterilerin %3 KOH ile muamelesi sonucu, hücre duvarının parçalanması ile sitoplazma ve nükleer materyalin açığa çıkması nedeniyle bir viskoz yapının oluşması esasına dayanır. Lam üzerine damlatılan %3’lük potasyum hidroksit solüsyonu üzerine NA’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).

### **Endospor Testi**

Endospor durumları için test edilecek olan izolatlar, NA besiyerine ekilmiş, endospor oluşumuna neden olan stres şartlarında (sıcak-soğuk, yaşlanma, kuruma) bekletilmiştir. Bu kültürlerden incelemek için smear hazırlanmış ve hazırlanan smear kaynayan su banyosu üzerine yerleştirilmiştir. Preparatın üzeri malaşit yeşili ile tamamen boyanmış, üzerine kurutma kağıdı koyulmuştur. Kurutma kağıdının sürekli olarak ıslak kalması sağlanarak 5-7 dakika malaşit yeşili ile boyama devam ettirilmiştir. Süre sonunda preparatın üzerindeki kurutma kağıdı kaldırılıp preparat hafif su akımı ile yıkanarak fazla boya uzaklaştırılmıştır. Preparat safranin ile 20-30 sn. kadar boyanmıştır. Bu karşıt boya uygulamasından sonra preparat hafif su akımı ile tekrar yıkanıp kurutulmuş ve immersiyon objektifinde endospor durumları incelenmiştir (Adıgüzel 2006).

### **Hareketlilik testi**

İzolatlar NB+%0,6 agar içeren tüplere iğne öze yardımıyla ekilerek bir gün inkübe edilmiştir. Tüplerde oluşan ekim çizgisine göre gelişim gözlemlenerek hareketlilik durumu incelenmiştir (Arda 2000).

### **3.2.2.b. Fizyolojik testler**

#### **Termofilik izolatın gelişme sıcaklığının belirlenmesi**

Bakteri izolatının büyüme sıcaklıklarının belirlenmesinde nutrient broth besiyerleri kullanılmıştır. İzolat bu besiyerlerine inoküle edilmiş ve farklı sıcaklıklarda inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat inkübasyon süresi sonunda spektrofotometrede OD<sub>600</sub>'de yapılan ölçümler sonucunda izolatın maksimum, minimum ve optimum

büyüme sıcaklıkları belirlenmiştir (Harley and Prescott 2002).

### **İzolatın gelişebildiği pH aralıklarının belirlenmesi**

İzolatın gelişebildiği pH aralığının belirlenmesinde; farklı pH değerlerine (4; 5; 6; 7; 8; 9) sahip nutrient broth besiyerleri kullanılmıştır. İzolat; NB besiyerlerine inoküle edilmiş, inkübasyon sonrasında spektrofotometrede ( $OD_{600}$ 'de) yapılan ölçümler sonucunda izolatların büyüebildikleri maksimum ve minimum pH aralıkları tespit edilmiştir (Dülger 1997).

### **3.2.2.c. Biyokimyasal testler**

#### **Katalaz testi**

Elde edilen bakteri izolatının katalaz enzimine sahip olup olmadığı bu test ile belirlenmiştir. Bu enzim elektron transfer zincirinin sonunda açığa çıkan hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )'i parçalayıp  $H_2O$  ve  $O_2$  gazına dönüştür ve  $O_2$  gazının oluşumu kabarcıklar şeklinde gözlenebilir. Aerobik solunum yapan veya fakültatif olan mikroorganizmalarda bu enzim vardır. Bundan dolayı NA'da geliştirilen 24-48 saatlik bakteri kültüründen bir öze dolusu alınarak lam üzerine konulmuş ve üzerine bir damla %5'lik  $H_2O_2$  damlatılmıştır. Kabarcık oluşumu katalaz pozitif; oluşmaması ise katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir (Harley and Prescott 2002).

#### **Selülaz testi**

Elde edilen bakteri CMC agar besiyerine (pH:10 ve %10 NaCl içeren) çizgi şeklinde ekilerek  $56^{\circ}C$ 'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda petri kutusuna %0,1'lik kongo kırmızısı çözeltilisinden dökülerek örnekler 15 dakika süreyle boyanmıştır. Bu sürenin sonunda boya dökülerek boyanın geri alınması amacıyla besiyerine 1M NaCl çözeltisi ilave edilir ve 15 dakika inkübasyon yapılmıştır. Boyama

işlemi sonunda etrafında sarı hidroliz zonu gözlenen suşlar selülaz (glukanaz) pozitif olarak değerlendirilmiştir (Voget ve ark, 2006).

### **Amilaz testi**

Bu test, bakterilerin nişasta molekülünü parçalayarak amilaz enzimini içerip içermediklerini tespit etmek için gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bakteri starch besiyerine nokta ve/veya çizgi ekim yöntemi ile inoküle edildi. 2-7 günlük inkübasyon süresinin sonunda petrideki bakteri kolonisinin etrafında görülen renk değişimi (daha açık renk) amilaz pozitif olarak, renk değişiminin olmaması ise amilaz negatif olarak değerlendirildi (Adıgüzel 2006).

### **Ksilanaz testi**

Oat spelt ksilan içeren besiyerine çizgi şeklinde ekilen örnek 56°C'de bir gece süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda besiyerine %0.1'lik Kongo kırmızısı çözeltilisinden dökülerek ve 15 dakika boyama işlemi gerçekleştirildi. Boyama süresinin sonunda fazla boyanın ortamdaki uzaklaştırılması için besiyerine 1M NaCl çözeltisi ilave edildi ve 15 dakika inkübasyon yapıldı. Etraflarında sarı hidroliz zonu bulunan suşlar ksilanaz pozitif olarak değerlendirildi (Voget *et al.* 2006).

### **Lipaz testi**

Lipaz aktivitesi, Tween 20 ve Tween 80 agar petri metodlarına göre araştırıldı. Lipaz enzimi aktivitesi taranırken besiyeri hazırlanan LB agara otoklav işlemi uygulandıktan sonra, %1(v/v) Tween 20 veya Tween 80 eklendi. Daha sonra, bakteri izolatu petrilere çizgi ekim yapıldı ve 2 gün boyunca 55°C'de inkübe edildi. Çizgi ekimin etrafında oluşan şeffaf zon lipaz aktivitesinin varlığını gösterdi (Voget *et al.* 2006).

### 3.2.3. Moleküler testler

#### A. İzolatların Bazı Genetiksel Özelliklerinin Belirlenmesi

##### Bakteri hücresinden genomik DNA'ların izolasyonu

Araştırmada kullanılacak olan bakteri izolatlarından DNA ekstraksiyonu, Adıgüzel 2006 tarafından modifiye edilen izolasyon metoduna göre aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

1. DNA'sı izole edilecek olan bakteri NA besiyerine 3 faz halinde ekilerek petriyeler 55-56°C'ye ayarlı inkübatörde 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı.
2. Steril edilmiş, ağzı kapaklı 1,5 ml'lik ependorflara 1000 µl STE (hücre duvarını parçalayarak hücre içeriğinin serbest hale gelmesini sağlar) tamponu konularak içerisine 2-3 öze dolusu bakteri kültürü ilave edildi.
3. Tüp, 2500 rpm'de vortekslenerek homojenize olmaları sağlandı.
4. Vortekslenen tüp, 10 000 rpm'de 10 dak süreyle santrifüjlendikten sonra üst faz mikropipetle alınarak atıldı ve peletin üzerine tekrar 1000 µl STE tamponu eklenerek, 10 dak 10 000 rpm'de santrifüjlendi. Bu işlem üst faz berrak olana kadar tekrar edildi.
5. Santrifüj sonrası, oluşan üst faz atılarak peletin üzerine 500 µl STE tamponu ilave edildikten sonra mikropipetle dikkatlice alıp vermek (pipetaj) suretiyle tamponun peletle iyice karışması sağlandı.
6. Tüp, 75°C'ye ayarlı su banyosunda 30 dak süreyle inkübe edildi. İnkübasyonun 15. dakikasında tüp alınarak 4-5 kez alt üst edilerek tekrar inkübasyona bırakıldı.
7. Su banyosundan çıkartılan tüpe 50 µl %10'luk SDS (proteinler arasındaki disülfid

bağlarını parçalar) ve 7 µl proteinaz K (proteinleri parçalar) eklenmiş ve 40°C'ye ayarlı su banyosunda 1 saat süreyle inkübe edildi.

**8.** İnkübasyon sonrası tüpe ortamdaki tuz konsantrasyonu 0,75-0,8 M olacak şekilde 5M NaCl ve 0,1 hacim %10'luk CTAB/0,7 M NaCl (DNA'yı polisakkaritlerden ve ortamdaki diğer bileşiklerden arındırır) eklendi.

**9.** Tüp, 65°C'ye ayarlı su banyosunda 15 dak inkübe edildi.

**10.** Su banyosundan alınan tüpe eşit hacimde 25:24:1 fenol:kloroform:izoamilalkol (genellikle, nükleik asitlerden proteinlerin uzaklaştırılmasında kullanıldı. Kloroform proteinleri denatüre ederek, sıvı ve organik fazların ayrışmasını sağlar. İzoamilalkol ise ekstraksiyon esnasında meydana gelebilecek köpürmeyi engeller) ilave edilerek 15 dak oda sıcaklığında çalkalayıcı karıştırıldı.

**11.** Tüp, 16 000 rpm'de 15 dak santrifüjlendikten sonra oluşan üst faz yeni steril ependorf tüplere aktarıldı. Üzerine 0,1 hacim %10 CTAB / 0.7 M NaCl (ortamda bulunabilecek polisakkarit kalıntılarını elemine etmede kullanılır) eklendi.

**12.** 65°C'ye ayarlı su banyosunda, tüp 15 dak bekletildi.

**13.** Tüpe eşit hacimde 24:1 kloroform: izoamilalkol eklendi ve tüpler 15 dak oda sıcaklığında, çalkalayıcı çalkalandı.

**14.** Tüp tekrar 16 000 rpm'de 15 dak santrifüj edilmiş, santrifüj sonrası oluşan üst faz yine yeni steril bir ependorfa alındı.

**15.** Tüp üzerine 0,6 hacim izopropanol (DNA'yı bağlayarak, iplikcikler halinde çökmesini sağlar) eklendi.



16. Tüp -20°C'de 1 gece boyunca bekletildi.

17. Buzdolabından çıkartılan tüp 15 000 rpm de 15 dak santrifüjlendi.

18. Üzerine -20°C'de bekletilen %70 lik etanolden (DNA'yı yıkamak amacıyla kullanılır) 500-600 µl eklendi ve 15 000 rpm de 15 dak süreyle santrifüjlendikten sonra süpernatant yavaş ve dikkatlice döküldü.

19. Peletin üzerine yeniden %70 lik etanolden 500-600 µl eklenerek, 15 000 rpm de 15 dak santrifüjlendi. Süpernatant dikkatlice dökülerek tüpler ağzı açık bir şekilde etil alkolün uçması, DNA'nın kuruyarak şeffaf bir görünüm alması amacıyla 2-3 saat süreyle oda sıcaklığında bekletildi.

20. Tamamen kuruduktan sonra, DNA'lar 50-70 µl TE içinde oda sıcaklığında 30 dak bekletilerek, iyice çözünmesi sağlanmış ve üzerlerine 2-3 µl RNAse ilave edildi.

21. DNA'lar %0,6'lık agaroz jelde yürütüldü ve jelde tek parça bant veren örnekler 4°C'ye kaldırılarak sonraki çalışmalar için hazır hale getirildi.

#### **DNA konsantrasyonunun ölçülmesi ve çalışma solüsyonunun hazırlanması**

DNA miktarı, direkt olarak 260 nm'deki absorbans ölçümüyle belirlenirken, genetik materyalin temizliği yani protein kirliliği taşıyıp taşımadığı ise 280 nm'de okunan absorbans değeriyle tespit edildi. Kuvarts küvet içerisine 998 µl TE çözeltisi konularak 260 nm'ye ayarlı spektrofotometrede absorbansı ölçülmüş ve elde edilen değer kör olarak kaydedildi. Ardından küvete 2 µl DNA ilave edilerek karışımın homojen olması sağlandıktan sonra 260 nm'de absorbansı yeniden ölçüldü. Okunan bu değerden köre ait değer çıkarılarak DNA'nın absorbans değeri bulundu. Yapılan işlemlerin aynısı 280 nm için de tekrarlanarak,  $A_{260}$  ve  $A_{280}$  değerlerine bakılarak  $A_{260} / A_{280} = 1-1,7$  olan örnek çalışma solüsyonu hazırlamak için kullanıldı.

### **DNA örneğinin ve DNA çalışma solüsyonunun konsantrasyonu ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )**

DNA Konsantrasyonu ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )= $A_{260}$  x Seyreltme Faktörü (500)x50 (DNA için sabit değer) formülü kullanılarak stok solüsyonun DNA konsantrasyonu belirlendi.

DNA çalışma solüsyonunun konsantrasyonu ise; İstenen Konsantrasyon ( $100\text{ng}/\mu\text{L}$ ) x İstenen Hacim ( $200 \mu\text{L}$ )/Stok DNA Konsantrasyonu ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) formülü ile DNA çalışma solüsyonu hazırlandı ve bu hesaplamadan elde edilen değer stok DNA çözeltisinden alınacak miktarı verdi. Bu miktar TE çözeltisi ile  $200 \mu\text{l}$ 'ye tamamlanarak  $100 \text{ng}/\mu\text{l}$  konsantrasyondaki DNA çalışma solüsyonu hazırlandı ve DNA tüpleri  $-86^\circ\text{C}$ 'de sonraki çalışmalarda kullanılincaya kadar saklandı (Adıgüzel 2006).

### **Bakteri izolatının 16S rRNA bölgesinin PCR ile amplifikasyonu**

Test izolatından saflaştırılan olan genomik DNA'lardan bakteri sistematığı açısından önemli olan 16S rRNA bölgesi, evrensel primerler (forward ve reverse primerler) kullanılarak *in vitro* koşullar altında PCR yardımı ile çoğaltıldı (Adıgüzel vd 2009).

### **Reaksiyonun (Master mix'in) hazırlanması**

PCR'ı yapılacak örnek için  $3 \mu\text{l}$  10 x PCR tamponu (100 mM Tris – HCl, 500 mM KCl, 15 mM  $\text{MgCl}_2$ , %0.01 jelatin pH: 8.3),  $0.6 \mu\text{l}$  dNTP (deoksinükleotidtrifosfatlar: dATP, dGTP, dCTP, dTTP – 10mM),  $3 \mu\text{l}$  UNI 16S-L (forward ATT CTA GAG TTT GAT CAT GGC TCA),  $3 \mu\text{l}$  16S-R (reverse ATG GTA CCG TGT GAC GGG GGG TGT GTA),  $1.2 \mu\text{l}$  DMSO,  $0.6 \mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$ (50  $\mu\text{M}$ ),  $0.3 \mu\text{M} / \text{mL}$  taq DNA polimeraz ve  $15.3 \mu\text{l}$   $\text{sdH}_2\text{O}$  ile  $27 \mu\text{l}$ 'lik reaksiyon karışımı hazırlanmış ve karışıma son olarak  $3 \mu\text{l}$  template DNA ( $100 \text{ng}/\mu\text{l}$ ) eklenerek son hacim  $30 \mu\text{l}$ 'ye tamamlanmıştır..

### **PCR programı**

PCR için hazırlanan örnek, 95°C'de 2dk denatürasyon, bunu takiben 36 döngü olacak şekilde 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 53°C'de 1 dakika bağlanma ve 72°C'de 2 dakika uzama basamakları ve son olarak 72°C'de 5 dakika uzama basamağından oluşacak şekilde programlanan PCR termal döngü (termocycler) cihazına yerleştirildi. Seçilen programda hedef bölgelerin amplifikasyonu yapıldı.

### **16S rRNA PCR ürünlerinin elektroforezi**

1.50 gr agaroz üzerine 150 mL 0.5X TBE (%1'lik agaroz jel) tamponu ilave edilerek karışım mikrodalga fırında iyice çözününceye kadar kaynatıldı. 50°C'ye kadar soğutulan agaroz jele 0.8 µg/mL olacak miktarda ethidium bromür eklenerek içerisine tarak yerleştirilmiş olan elektroforez jel küvetine döküldü. 30-35 dk beklenerek jelin donması sağlandı, donan jelden taraklar dikkatlice çıkarıldı ve içerisinde 0.5X TBE tamponu bulunan elektroforez tankının içine yerleştirildi. Jeldeki ilk çukura, 10 kb DNA markırından [50-100-200-300-400-500-750-1000-1400-1500-2000-3000-4000-6000-8000-10000] (Sigma D-7058) 10 µl yüklendi. Diğer çukurlara ise her bir örnek için 2,5 µl 6X yükleme tamponu, 10 µl PCR ürünü karıştırılarak yüklendi. Elektroforez jel düzeneğı 90 volta ayarlanarak örnekler 2 saat yürütüldü. Jel üzerinde bulunan ve ethidium bromür ile boyanan DNA bantları jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenmiş ve bilgisayar ortamında (DNR BioImaging Systems Software) analiz edildi.

### **16S rRNA gen bölgesinin klonlanması, sekans analizi ve gen bankasındaki verilerle karşılaştırılması**

16S rRNA PCR yöntemi ile çoğaltılan 16S rRNA gen bölgesi, pGEM-T Easy Klonlama Kiti kullanılarak, pGEM-T Easy klonlama vektörüne firmanın önerdiği uygun konsantrasyonlar ve şartlarda klonlandı. Daha sonra klonlama sonucunda pozitif sonuç veren kolonilerden plazmit izolasyonu gerçekleştirildi (Adıgüzel vd. 2009). Bu

plazmitlerden istenilen parçayı taşıyanlar belirlenerek klonların baz dizileri analizi, Hollanda'da bulunan Macrogen firmasına gönderilerek yapıldı. Elde edilen 16S rRNA dizileri Gen Bankasında (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>) var olan diğer bakteriyal dizilerle karşılaştırıldı. Karşılaştırma sonucu aralarındaki benzerlik oranları tespit edilmiş ve gen bankası kabul numaraları alındı (Adıgüzel vd 2011).

### **3.2.4. Protein tayini**

#### **Coomassie Blue Yöntemiyle Protein Tayini**

Bradford yöntemi Coomassie Brilliant Blue G250 boyasının farklı konsantrasyonlardaki proteinlere bağlanarak değişik renk şiddetinde mavi renkli kompleksler ortaya koymasından yararlanılarak geliştirilmiştir. Mavi rengin oluşmasında proteinin amino asit bileşimi önemlidir. Boyanın özellikle arjinin gibi bazik amino asitlere ve bazı aromatik amino asitlere bağlanma eğiliminde olduğu gösterilmiştir. Yöntemde boyaya bağlanmış protein 595 nm dalga boyunda maksimum absorbanı verir (Bradford 1976).

Protein miktarları kantitatif olarak Bradford metoduna göre belirlendi. Bu yöntem diğer protein tayin yöntemlerinden avantajlı tarafı kısa sürede uygulanabilirliği fazla bozucu faktörlerin bulunmaması ve protein-boya kompleksinin çözelti ortamında uzun süre kalabilmesidir. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır.

Saflaştırılmanın tüm kademelerinde alınan numunelerde protein tayini yapılarak 595 nm dalga boyunda absorbanı ölçüldü ve protein miktarı tayin edildi. Bu işlemde 5 mL Coomassie Brilliant Blue'nin üzerine 200µl homojenat numunesi eklendi ve oda sıcaklığında 10 dk bekletildi. Daha sonra 595 nm dalga boyunda absorbanları ölçüldü (Bradford 1976).

### 3.2.5. Lakkaz enzimi tayini

Çalışmada lakkaz enzim aktivitesi, 55°C sıcaklıkta ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında, ABTS, gualkol ve 2,6 dimetoksifenol substratları kullanılarak belirlendi.

Lakkaz aktivitesi ölçümü için; toplam hacim 3mL olacak şekilde önceden hazırladığımız 2,6 dimetoksifenol çözeltisinden, 2500 µl alındı ve 500 µl enzim ilave edilerek, 55°C'de 5 dak inkübasyondan sonra sırasıyla 420 nm, dalga boyunda spektrofotometrede absorbans değişikliği ölçüldü. Ayrıca gualkol ve ABTS substratları kullanılarak sırasıyla 470 nm ve 734 nm'de aktivite ölçümü yapıldı. Enzim çözeltisi yerine reaksiyon tamponu ilave edilerekte kör numune hazırlandı.

### ***Brevibacillus sp. (Z1)* sıvı besiyerinde yetiştirilmesi ve homojenatın hazırlanması**

*Brevibacillus sp. (Z1)* suşu %20 gliserol içeren stok besiyerinde -86°C'de muhafaza edildi. Suşun belirli aralıklarla Tryptic Soy Agar (TSA) besiyerine ekimleri yapıldı ve 24-48 saat süre ile 55°C'de inkübe edildi (Adıgüzel, 2009).

### **İndükleme işlemleri**

300 mL sıvı besiyerindeki bakteri kültüründen lakkaz enziminin üretimini arttırmak üzere indükleyici ajan olarak 2,6-dimetoksifenol ilave edilmiş ve sonuçta enzim miktarında artış gözlemlendi. Çalkalayıcıda 3 gün süre ile inkübasyona bırakılan kültür lakkaz enziminin saflaştırılmasında kullanıldı.

### **Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemleri**

Ham enzim ekstraktı santrifüj yardımı ile çöktürüldü ve enzim homojenatı sırasıyla %0-20, %20-40, %40-60, %60-80 ve %80-100 aralıklarında amonyum sülfat çöktürmeleri yapıldı. Elde edilen süpernatant amonyom sülfat kullanılarak %60-80 doygunluğa

getirildi (Nadaroglu, 2009). Çöktürme işlemleri sırasında kullanılacak katı amonyum sülfat miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$g[(NH_4)_2SO_4] = 1,77 \times V \times (S_2 - S_1) / 3,54 - S_2$$

V = Süpernatant

S<sub>1</sub> = 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

S<sub>2</sub> = 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında, ham ekstrakta katı (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> az miktarlarda ilave edilerek çöktürme yapıldı. Her ilave sırasında daha önce katılan (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'ların çözünmüş olmasına dikkat edildi. Bu işlem yarım saatle-bir buçuk saat arasında sürdürüldü, katı amonyum sülfat katılmasından sonra %60-80 doygunluğa getirilen süspansiyon hızlı bir şekilde süzülerek 5.000 rpm'de 15 dak boyunca santrifüj edildi. (Nadaroglu 2009).

Her santrifüj işleminden sonra, enzim varlığına aktivite ve protein tayini yapılarak bakıldı. Tüm bu işlemler +4°C'de gerçekleştirildi. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen enzim çözeltisi diyaliz torbasına yerleştirildi. Diyaliz torbası, içinde pH: 7,0 fosfat tamponuna karşı 6 saat süreyle diyaliz edildi. Bu işlem sırasında tampon çözelti en az 2 defa değiştirilmiş ve bu işlemler magnetik karıştırıcı üzerinde +4°C'de gerçekleştirildi (Nadaroglu 2009).

### **3.2.6. Lakkaz enziminin saflaştırılması**

#### **Enzim DEAE-Sefadex İyon değişim kromatografisi ile saflaştırılması**

Bu çalışmada DEAE-sefadeks iyon değişim kromatografisi kullanıldı. Çalışmada kullanılan anyon değiştirici DEAE-sefadeks iyon değişim materyalinden, 100-120 mL yatak hacmi elde edebilmek için 4 g jel 100 mL tampon aktarılarak 1 gece bekletildi.

HCl ve NaOH ile aktifleştirildikten sonra bu jel kolona aktarılıp 100 mM sodyum sitrat tamponu ile dengelendi. Kolonun akış hızı peristaltik pompa yardımıyla 15 ml/saate ayarlandı. Jel üzerindeki tampon seviyesi jel düzeyine indirilerek diyalizden sonra amonyum sülfat çöktürmesinden elde edilen ekstraselüler homojenat çözeltisi kolona tatbik edildi. Daha sonra 100 mM sodyum sitrat tamponu ile yıkama işlemi yapıldı ve yıkama işlemine üstten ilave edilen tampon ile alttan alınan elüatların pH'sı ve 280 nm'deki absorbans değerleri eşit oluncaya kadar devam edildi. Yıkama tamamlandıktan sonra elüsyon için gradient mikserin kolona bağlı olan ve bir mekanik karıştırıcı ile karıştırılan haznesine 250 mL 100 mM sodyum sitrat tampon ve bu hazneye açılan diğer hazneye ise 250 mL ve 1 M NaCl dolduruldu ve artan iyonik şiddetle lineer gradient elüsyonu başlatıldı. Sonra 3 ml'lik hacimler halinde tüplere alındı ve her bir elüantın 280 nm'de absorbansına ve 420 nm'de 2,6-dimetoksifenol substratı ile aktivitelerine bakıldı. Aktivite gösteren fraksiyonlar birleştirilerek havuz oluşturuldu ve Fraksiyon sayısı-Aktivite/Absorbans grafiği çizildi. Enzimin sıcaktan dolayı aktivite kaybına uğramaması için ham alınan elüantların hem de gradient mikserin içindeki elüsyon tamponununun etrafı buz ile kapatılarak ortamın soğuk olması sağlandı.

### **Enzimin Sefakril S200 jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılması**

Bir önceki basamakta elde edilen enzimin yoğunlaştırılması amacıyla %100 amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı ve fosfat tamponu içerisinde çözüldükten sonra aynı tampona karşı diyalizlendi. Ardından, önceden dengelenmiş olan Sefakril S200 jel filtrasyon kolonuna tatbik edildi ve aynı tampon ile kolondan elüatlar 3'er ml'lik hacimler halinde alındı.

280 nm'de her bir elüatın absorbans değerleri belirlendi, kör olarak fosfat tamponu kullanıldı. Yüksek absorbans veren tüplerde 2,6-dimetoksifenol substratı ile aktivite tayini yapıldı. En yüksek aktivite veren tüpler birleştirilerek enzim havuzu oluşturuldu, enzimin karakterizasyonu ve atık sulardan tekstil boyar maddelerinin giderilmesinde kullanılmak üzere saklandı. Birleştirilen elüantlar ve kolona tatbik edilen numunede Bradford metoduna göre kantitatif protein tayini ve enzim aktivite tayinleri yapılarak

spesifik aktiviteler hesaplandı ve saflaştırma oranları belirlendi. (Nadaroğlu 2009).

### **SDS-PAGE Jel Elektroforezi**

Elde edilen enzim örneğinin alt birim sayısının belirlenmesi amacı ile bu işlem kullanıldı. Bunun için elektroforez plakaları, su ve alkol ile iyice yıkandı. Plakaları birleştiren mikalara ince bir tabaka halinde vazelin sürüldü. İki cam plaka birbirini üstüne konuldu ve kısıkaçlarla tuturularak jel hazırlama cihazına yerleştirildi. Ayırma jeli hazırlanarak plakalar arasına enjektörle sıkıldı. Bu işlemler yapılırken hava almamasına sağlandı. Jel yüzeyinin pürüzsüz olması için %10'luk SDS ile ince bir tabaka oluşturuldu. Katılaşmaya kadar hemen hemen yarım saat beklendi. Katılaştıktan sonra üzerindeki %10'luk SDS ayrıldı. Daha sonra yığıma jel üst yüzeye kadar ilave edildi. Üzerine tarak dikkatlice koyduktan sonra tarağın da üzerine nemli süzgeç kağıdı yerleştirilerek bir gece bekletildi. Ertesi gün tarak dikkatlice çıkarılarak plakalar elektroforez tankına yerleştirildi (Laemmli 1970).

Oluşan boşluklar işaretlendi ve jelin üstü önce saf su, sonra da yürütme tamponu ile yıkandı. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu yerleştirildi. Örnekler her birinde 20 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 100 µg olacak şekilde 1/1 oranında örnek tamponuna eklendi. Üç dakika süre ile kaynar su banyosunda inkübe edildi. Numuneler soğutulurken, elektroforeze çok ince bir enjektör yardımıyla yerleştirildi. Tank kapağı kapatılarak (+) kablo (Anot) ve (-) kablo (katot) bağlandı. İlk olarak yarım saat boyunca sisteme 80 voltluk akım verildi. Daha sonra akım 150 volta ayrıldı 4-5 saat oda sıcaklığında bekletildi. Akım kesilerek, cam plakalar arasındaki jel dikkatlice ayrıldı. Bu yürütme tamponu tekrar kullanılmak üzere saklandı ve sabitleştirme çözeltisinde 15 dakika süre ile bırakıldı. Daha sonra fikse çözeltisinden çıkarılan jel özel kabına konularak, boyama çözeltisi üstünü örtünceye kadar eklendi. 45 dakika kadar çalkalayıcı üzerinde bırakıldı. Daha sonra boyama çözeltisinden çıkarılarak, renksizleştirme çözeltisine alındı. Belirli aralıklarla değiştirilmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp, protein bantları belirginleşinceye kadar 1-2 gün bu çözelti içinde çalkalandı. Bundan sonra jeller %30'luk etil alkol içine alındı ve fotoğrafları



çekildi (Laemmli 1970).

**Ayrırma jeli hazırlanması ;** 15 mL Tris-HCl (pH 8,8), 13,2 mL %30'luk akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid, 0,6 mL %1'lik SDS, 0,4 mL %5'lik TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletlen diamin) ve 9,4 mL su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,8 mL %1,5'lik amonyum persülfat [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>] ilave edildi.

**Yığılma jelinin hazırlanması ;** 1 M'lik Tris-HCl'den 1,24 mL, %30 akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid'den 1 mL, %0,1'lik SDS'den 0,1 mL, %5'lik TEMED'den 0,1 mL ve sudan 7,8 mL alınarak karıştırıldı. Son olarak yine günlük hazırlanmış, %1,5'lik PER'den 0,2 mL ilave edildi.

### **3.2.7. Optimum pH'nın belirlenmesi**

Optimum pH çalışması için pH 3-9 aralığında çalışıldı. pH 3.0, 4.0, 5.0 için 0.1M'lık 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. Bu tampon çözeltilerinde enzimin aktivitesi 3 farklı substrat ile bakıldı ve spektrofotometrik olarak aktivite ölçülüp, bulgular grafik halinde verildi (Nadaroğlu 2009; Dawkar *et al.* 2009).

### **3.2.8. Enzimin stabilitesinin üzerine pH'nın etkisi**

Belirtilen pH'lardaki tampon çözeltilerinin 2500 µl'sine, 500 µl enzim çözeltisi ilave edilerek 4°C'de muhafaza edildi. Başlangıçta aktiviteler ölçüldükten sonra 240 saat boyunca her 48 saatte bir aktivite ölçümü yapılarak enzimin stabil olduğu pH belirlendi ve sonra aktivite değerleri grafikler halinde gösterildi (Nadaroğlu 2009; Dawkar *et al.* 2009).

### 3.2.9. Optimum sıcaklığın belirlenmesi

Lakkaz enzimin optimum sıcaklığını belirlemek için 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 ve 90°C'lerde çalışıldı. Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan çalışmalar her substrat için enzimin optimum pH'sında yapıldı. İstenilen sıcaklıklar, sirkülatörlü su banyosu kullanılarak ayarlandı. Mümkün olduğu kadar hızlı bir şekilde enzim çözeltisi aktararak aktivite ölçümleri yapıldı. Her bir substrat için optimum sıcaklık belirlendi. Bu işlemde 500 µl enzim ependorflara konulup denenen sıcaklık bloğunda 5 dk bekletildi. Daha sonra 2.5 mL substrat içine ilave edildi ve aktivite ölçümü yapıldı. Bulgular grafik halinde verildi. En yüksek absorbans değerinin elde edildiği sıcaklık derecesi enzimin en iyi çalıştığı (optimum aktivite gösterdiği) değer olarak değerlendirilir (Dawkar *et al.* 2009).

### 3.2.10. Enzim stabilitesinin üzerine sıcaklığın etkisi

Enzimin stabil sıcaklığını belirlemek için bu çalışma optimum sıcaklık şeklinde yapıldı fakat sadece 15, 30, 45, 60 dak süre ile enzimi belirtilen sıcaklıklarda bekletip sonra substrat ilave edilerek aktivite ölçümleri alındı. Bu çalışma 3 farklı substrat da yapıldı (Nadaroglu 2009; Dawkar *et al.* 2009).

### 3.2.11. Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığının tayini

Enzim saflaştırıldıktan sonra jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak molekül ağırlığı tayin edildi. Bunun için önce, Sefadex G-100 destile su içerisine 90°C'de 5 saat süreyle şişirildi. Hazırlanan jel bir huni vasıtasıyla (1,3x30 cm) kolona paketlenildi. Kolon 24 saat süreyle 0,05 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM ditiotritol, pH 7,0 tamponu ile dengelendi. Dengelenme işlemine, kolonun altından alınan çözelti 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar devam edildi. Dengelenmiş olan kolona önce konsantrasyonu 0,2 mg/mL olacak şekilde standart protein yüklendi ve 0,05 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM ditiotritol, pH 7,0 tamponu ile elüe edildi. Elüatlar 3 mL olacak şekilde alındı. Peristatik pompa vasıtasıyla akış hızı 20 mL/saat olacak şekilde ayarlandı (Whitaker 1963). Elüatların

280 nm'de absorbans değerleri belirlendi. Alınan sonuçlar grafik halinde verildi. Aynı şartlarda, dengelenmiş kolona ayrı ayrı saf enzim yüklendi ve elüsyonlar alındı. Elüatların 280 nm'de absorbans değerleri belirlendi ve sonuçlar grafik halinde verildi.

### 3.2.12. $V_{max}$ ve $K_m$ Değerlerinin Belirlenmesi

*Brevibacillus sp.* (Z1)'den kültüre edilen ve saflaştırılan lakkaz enziminin maksimum hızları ( $V_{max}$ ) ve hız sabitleri ( $K_M$ ), beş farklı substrat konsantrasyonuna karşı aktivitesi bulunarak hesaplandı.

Aktivite ölçümlerinde ana substrat çözeltisinden 500, 1000, 1500, 2000 ve 2500  $\mu$ L alındı ve her birinin toplam hacmi tampon çözelti (0,05 M fosfat, pH:8) ile 2500  $\mu$ L'ye tamamlandı. Daha sonra 500'şer  $\mu$ L saf enzim ilave edilerek 5 dakika süre ile 55°C 'de inkübe ettikten sonra spektrofotometrik olarak absorbans değişikliği belirlendi. Lineveawer-Burk grafikleri belirlendi. Bu grafiklerden elde edilen denklemlerden yararlanılarak her bir substrat için ayrı ayrı  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplandı.

### 3.2.13. *Brevibacillus sp.* (Z1)'den üretilip saflaştırılan lakkaz enziminin aktivitesi üzerine metal iyonların etkisinin incelenmesi

Ağır metallerin etkisini incelenmesi amacıyla sabit substrat ve enzim konsantrasyonlarında;  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ , EDTA ve askorbik asit çözeltilerinden enzim aktivitesindeki etkisi incelendi. Substrat olarak 2,6-dimetoksifenol kullanıldı (Dawkar vd 2009). Hazırlanan metal iyonları ve kimyasalların çözeltilerinden 100, 300, 500, 700 ve 1000 $\mu$ L alındı ve her birinin toplam hacmi saf su ile 1000  $\mu$ L'ye tamamlandı. Daha sonra üzerlerine 1000 mL tampon ve 500'er  $\mu$ L enzim çözeltisi ilave edildi. Sonuçlar %Aktivite-Konsantrasyon şeklinde grafik edildi.

### **3.2.14. Endüstride kullanılan bazı boya ların lakkaz enzimi ile etkileşimi**

Tekstil sektöründe yüksek miktarda kimyasal ve su harcayan boyama işle mi sonucunda oluşan atık sulardaki boya ların doğaya bırakılmadan önce parçalanması gerekmektedir. Bu çalışmada saflaştırılan lakkaz enziminin endüstride kullanılan bazı boya lar üzerine etki edip etmediği araştırıldı. Bu amaçla, Reaktif siyah 5, Fuksin, Allura kırmızısı, Asit kırmızı 37 olmak üzere 4 farklı boya kullanıldı.

### **3.2.15. Tekstil boya ları için standartların hazırlanması**

Standart grafiği çizmek için aşağıdaki tabloda verilen 5 mM konsantrasyondaki stok boya çözeltisinden 100, 300, 500, 700, 900 ve 1000µL alındı ve her birinin toplam hacmi saf su ile 1000 µL'ye tamamlandı. Her boya için ayrı ayrı belirtilen dalga boylarında absorbans ölçümü yapıldı ve Absorbans-mg boya olarak kalibrasyon grafiği oluşturuldu. Kör olarak saf su kullanıldı.

Oluşturulan reaksiyon ortamı 55°C'ye ayarlanıp 15, 30, 60, 90, 120, 150 ve 180. dak'larda ortamdaki numune alınıp belirtilen dalga boylarında (Reaktif Black 5 için 597 nm, fuchsine için 547 nm, acid red 37 için 523 nm ve allura red için 504 nm) absorbans ölçümleri yapıldı. Elde edilen sonuçlar Absorbans-mg boya olarak grafik halinde verildi (Gudelj vd 2001).

## **4. ARAŞTIRMA BULGULARI**

### **4.1. İzolatların Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Test Sonuçları**

#### **İzolatların morfolojik test sonuçları**

Lakkaz aktivitesi veren Z1 bakterisinin; çubuk formda, krem koloni rengine sahip, hareketli ve endospor pozitif olduğu gözlemlendi.

#### **İzolatların fizyolojik test sonuçları**

*Brevibacillus sp.* (Z1) izolatının; maksimum 60°C, minimum 30°C ve optimum büyüme sıcaklığının ise 56°C olduğu gözlemlendi. İzolatın gelişebildiği minimum ve maksimum pH aralıkları ise 6.5-8.5 olarak tespit edildi. Ayrıca bakterinin, besiyerinde gelişim gösterdiği bölgeler incelendiğinde izolatın oksijen isteği yönünden aerob olduğu gözlemlendi.

#### **İzolatların biyokimyasal test sonuçları**

*Brevibacillus sp.* (Z1) izolatının; Gram, katalaz, lipaz, ksilinaz ve selüloz pozitif, amilaz negatif olduğu gözlemlendi.

### **4.2. Moleküler Test Sonuçları**

#### **16S rRNA PCR amplifikasyon sonuçları**

Test edilen bakteri izolatlarının 16S rRNA PCR amplifikasyon sonuçları değerlendirilmiş ve yapılan analiz sonuçlarına göre Z1 izolatının ortalama 1425 bp uzunluğunda tek bant verdiği belirlenmiştir.

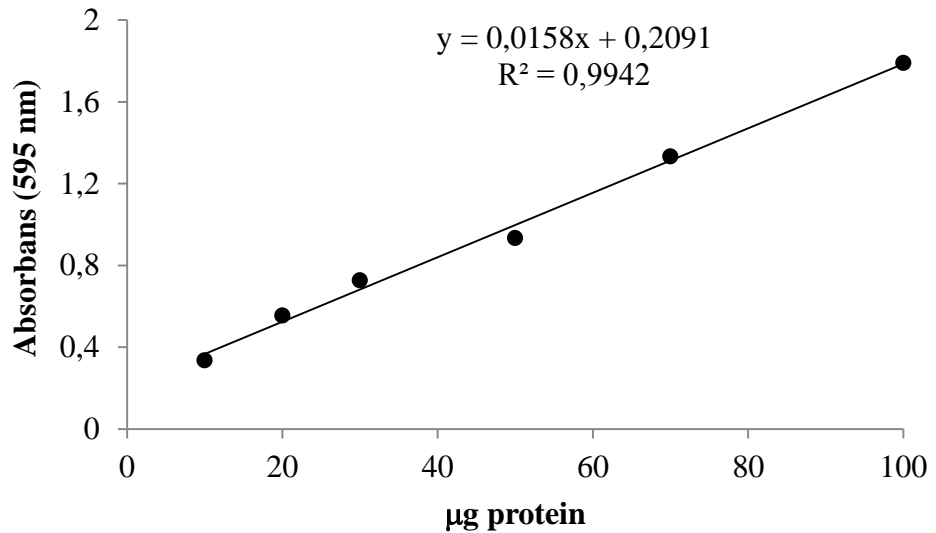
### İzolatuının 16S rRNA gen bölgesinin Sekans Analizi

Elde edilen sekans datası Blast search programı kullanılarak GenBank'da mevcut olan verilerle karşılaştırılmış (Adıgüzel ark 2009) ve sonuçta Z1'in *Brevibacillus sp.* (Gen Bank no: KC292196.1) türüne %99 oranında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

### 4.3. Protein Tayini

#### Kantitatif protein tayini için hazırlanan standart eğri

Kantitatif protein tayini Bradford metoduna göre yapılmıştır (1976). Bu yöntem için önce SSA kullanılarak standart bir eğri hazırlanmıştır. *Brevibacillus sp.* (Z1) kültür ortamından alınan homojenat, amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve saflaştırma işlemlerinden sonra elde edilen numenelerde bulunan protein miktarı, bu standart grafikten faydalanılarak hesaplanmıştır. Standart çözeltideki mikrogram proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayinin için kullanılan standart grafik

#### 4.4. *Brevibacillus sp. (Z1)*'den Lakkaz Enziminin Ekstraselüler Olarak Üretim Kapasitesi

Test izolatları sıvı ortam fermantasyonu ile geliştirilerek lakkaz enzimi üretilmiştir. Ekstraselüler olarak üretilebilmesi için ortama ABTS ve 2,6-dimetoksifenol substratı eklenerek indükleme işlemi gerçekleştirilmiştir.

Ağrı-Diyadin kaplıcasından izole edilen *Brevibacillus sp. (Z1)* TSA besiyerinde bir gece 55°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Besiyeri 10.000 xg'de (4°C, 20 dak) santrifüjlenerek süpernatant ve çökelek (mikroorganizma) kısmı ayrılmış, süpernatantta ABTS substratı kullanılarak lakkaz enzim aktivitesine bakılmıştır.

#### Amonyum sülfat çöktürmesi sonuçları

Ham enzim ekstraktı süzöldükten sonra santrifüjde 5.000 rpm'de 15 dak süresince santrifüjlenmiş ve enzim homojenatı sırasıyla %0-20 %20-40 %40-60 %60-80 %80-100 aralıklarında amonyum sülfat çöktürmeleri yapılmıştır. Elde edilen süpernatant amonyom sülfat kullanılarak %60-80 doygunluğa getirilmiştir (Nadaroglu, 2009). Çöktürme işlemleri sırasında kullanılacak katı amonyom sülfat miktarı aşağıdaki formülle göre hesaplanmıştır:

$$g[(NH_4)_2SO_4] = 1,77 \times V \times (S_2 - S_1) / 3,54 - S_2$$

V = Süpernatant

S<sub>1</sub> = 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

S<sub>2</sub> = 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında, ham ekstrakta katı (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> az miktarlarda ilave edilmiştir. Her ilave sırasında daha önce katılan (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'ların çözünmüş olmasına dikkat edilmiştir. Bu işlem yarım saatle-bir buçuk saat arasında sürdürölmüş,

katı amonyum sülfat katılmasından sonra %60 doygunluğa getirilen süspansiyon hızlı bir şekilde süzülerek 5.000 rpm'de 15 dak boyunca santrifüj edilmiştir. (Nadaroglu, 2009).

Her santifirüj işleminden sonra, enzim varlığına aktivite ve protein tayini yapılarak bakılmıştır. Tüm bu işlemler +4 °C'de gerçekleştirilmiştir. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen enzim çözeltisi diyaliz torbasına yerleştirilmiştir. Diyaliz torbası, içinde pH: 7,0 fosfat tamponuna karşı 6 saat süreyle diyaliz edilmiştir. Bu işlem sırasında tampon çözelti en az 2 defa değiştirilmiş ve bu işlemler magnetik karıştırıcı üzerinde +4°C'de gerçekleştirilmiştir (Nadaroglu, 2009). Lakkaz enziminin %60-80 aralığında çöktüğü belirlenmiş ve amonyum sülfat çöktürmesi yapılmıştır. Elde edilen çökelek fosfat tamponunda (20mM fosfat tamponu, pH: 5.0) çözülerek bir sonraki işleme hazır hale getirilmiştir.

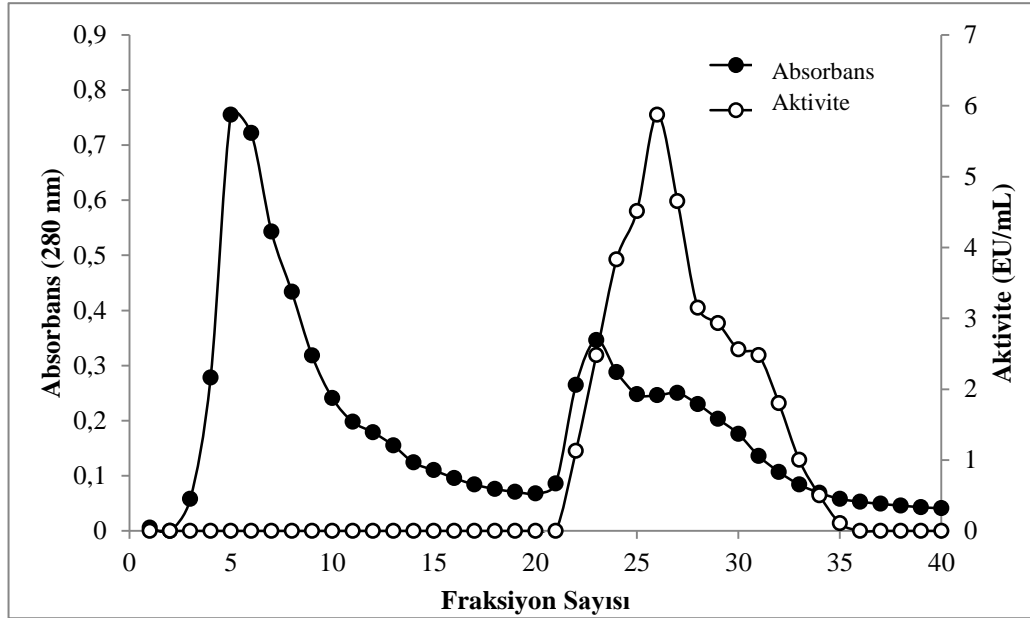
#### **4.5. *Brevibacillus sp. (Z1)*'den Üretilip Saflaştırılan Lakkaz Enziminin Deae-Sefadeks İyon Değişim Kromatografisi Ile Saflaştırma Sonuçları**

Kinetik çalışmalarda ve çevre kirliliğine sebep olan bazı tekstil boyaalarının giderilmesi işlemlerinde kullanılmak üzere *Brevibacillus sp. (Z1)*'den üretilen lakkaz enzimi iyon değişim kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır.

DEAE-sefadeks iyon değişim jeli hazırlanmış, kolona paketlenmiş ve *Brevibacillus sp. (Z1)*'nin kültür ortamlarından alınan, amonyum sülfat çöktürmesi yapılan ve diyaliz edilen homojenat kolona yüklenmiştir. Daha sonra 20 mM fosfat tamponu (pH:5.0) içinde 0'dan 1 M NaCl ile bir konsantrasyon gradienti oluşturularak, enzimler 3'er mililitrelik fraksiyonlar halinde iyon değişim kolonundan elüe edilmiştir. Her tüpteki numune için 280 nm'de kantitatif protein tayini yapılmıştır. Absorpsiyon gösteren fraksiyonlarda; ABTS substratı kullanılarak aktivite ölçümleri yapılmış, aktivite gösteren fraksiyonlar birleştirilerek bir sonraki saflaştırma basamağında kullanılmak üzere 4°C'de bekletilmiştir.



*Brevibacillus sp.* (Z1)'den üretilip saflaştırılan lakkaz enziminin DEAE-sefadeks iyon değişim kromatografi kolon sonucu Şekil 4.2’de verilmiştir.

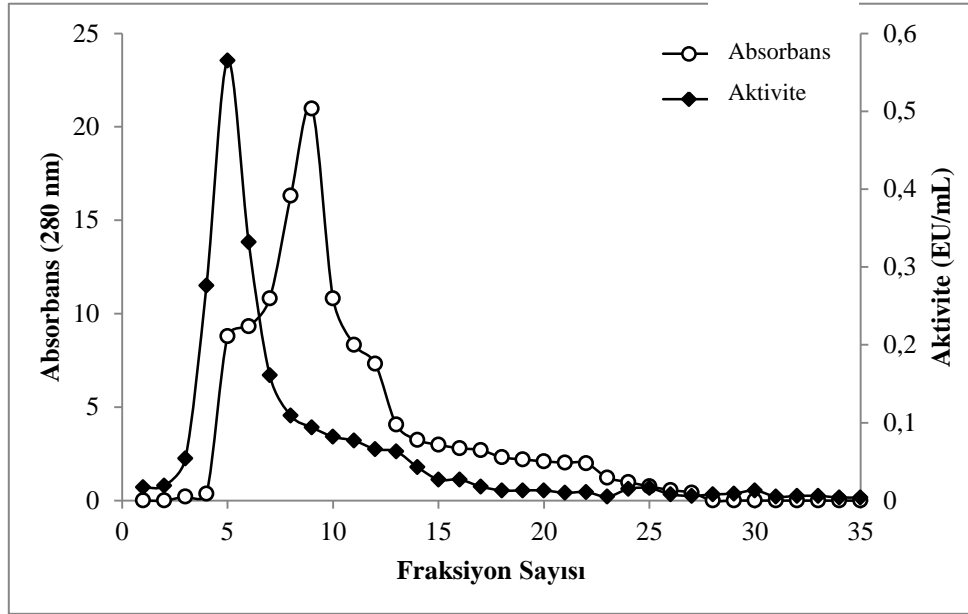


**Şekil 4.2.** DEAE-sefadeks iyon değişim kromatografi kolonu kullanılarak *Brevibacillus sp.* (Z1)'den ekstraselüler olarak üretilip saflaştırılan lakkaz enziminin 20 mM (pH:5.0) fosfat tamponu içinde 0-1 M NaCl ile gradient elüsyonu

\* (—○—): 280 nm’de absorbansı, (—●—): aktivite, kolon 3 x 30 cm, jel yüksekliği 20 cm, elüsyon hızı 80 ml/saat ve fraksiyon hacmi 3 ml

#### 4.6. *Brevibacillus sp.* (Z1)'den Lakkaz Enziminin Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Saflaştırılma Sonuçları

DEAE-sefadeks iyon değişim kolonundan elde edilen elüsyonun ardından lakkaz enzim aktivitesi gösteren fraksiyonlar birleştirilmiştir. %100 amonyum sülfat çöktürmesi yapıldıktan sonra Sefakril S 200 jel filtrasyon kolonuna uygulanmıştır. Elde edilen elüsyonla ilgili absorbans ve aktivite değerlerini gösteren grafik Şekil 4.3’de verilmiştir.



**Şekil 4.3.** *Brevibacillus sp.* (Z1)'den lakkaz enziminin Sephacril S200 jel filtrasyon kromatografisi yöntemi ile saflaştırılmasından elde edilen elüsyon grafiği: (—○—): 280 nm'de absorbansı, (—●—): aktivite, kolon 3 x 30 cm, jel yüksekliği 20 cm, elüsyon hızı 80 ml/saat ve fraksiyon hacmi 3 ml

*Brevibacillus sp.* (Z1)'den lakkaz enziminin saflaştırılması aşamalarında uygulanan her bir yöntem basamağında, protein miktarı ve aktivite tayini yapılarak saflaştırma tablosu oluşturulmuştur (Çizelge 4.1).

**Çizelge 4.1.** *Brevibacillus sp. (Z1)*'den lakkaz enziminin saflaştırma basamakları

Saflaştırma Basamakları	Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Toplam Aktivite EU	%	Protein Miktarı (mg/mL)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Saflaştırma Katı
Ham Ekstrakt	50	55,86	2793	100	3,39	16,5	-
Amonyum sülfat Çöktürmesi (%60-80)	25	42,63	1065,8	38,2	0,67	63,6	3,85
DEAE-Seluloz	25	38,89	972,25	34,8	0,18	216,1	13,1
Sefakril S200	25	33,77	844,3	30,2	0,022	1535,0	93,03

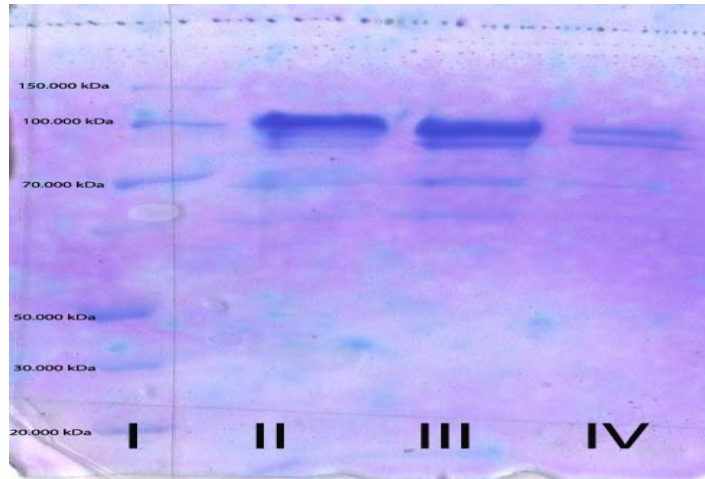
#### 4.7. *Brevibacillus sp. (Z1)*'den ekstraselüler Olarak Üretilip Saflaştırılan Lakkaz Enziminin Sds-Poliakrilamid Jel Elektroferez Sonucu

Elde edilen enzim örneğinin alt birim sayısının belirlenmesi amacı ile bu işlem kullanıldı. Bunun için elektroferez plakaları, su ve alkol ile iyice yıkandı. Plakaları birleştiren mikalara ince bir tabaka halinde vazelin sürüldü. İki cam plaka birbiri üstüne konuldu ve kısıkaçlarla tutularak jel hazırlama cihazına yerleştirildi. Ayırma jeli hazırlanarak plakalar arasına enjektörle sıkıldı. Bu işlemler yapılırken hava almamasına sağlandı. Jel yüzeyinin pürüzsüz olması için %10'luk SDS ile ince bir tabaka oluşturuldu. Katılaşınca kadar hemen hemen yarım saat beklendi. Katılaştıktan sonra üzerindeki %10'luk SDS ayrıldı. Daha sonra yığma jel üst yüzeye kadar ilave edildi. Üzerine tarak dikkatlice koyduktan sonra tarağın da üzerine nemli süzgeç kağıdı yerleştirilerek bir gece bekletildi. Ertesi gün tarak dikkatlice çıkarılarak plakalar elektroferez tankına yerleştirildi (Laemmli 1970).

Oluşan boşluklar işaretlendi ve jelin üstü önce saf su, sonra da yürütme tamponu ile yıkandı. Elektroferez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu yerleştirildi. Örnekler her birinde 20 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 100 µg olacak şekilde 1/1 oranında örnek tamponuna eklendi. Üç dakika süre ile kaynar su

banyosunda inkübe edildi. Numuneler soğutularak, elektroforeze çok ince bir enjektör yardımıyla yerleştirildi. Tank kapağı kapatılarak (+) kablo (Anot) ve (-) kablo (katot) bağlandı. İlk olarak yarım saat boyunca sisteme 80 voltluk akım verildi. Daha sonra akım 150 volta ayrıldı 4-5 saat oda sıcaklığında bekletildi. Akım kesilerek, cam plakalar arasındaki jel dikkatlice ayrıldı. Bu yürütme tamponu tekrar kullanılmak üzere saklandı ve sabitleştirme çözeltisinde 15 dakika süre ile bırakıldı. Daha sonra fikse çözeltisinden çıkarılan jel özel kabına konularak, boyama çözeltisi üstünü örtünceye kadar eklendi. 45 dakika kadar çalkalayıcı üzerinde bırakıldı. Daha sonra boyama çözeltisinden çıkarılarak, renksizleştirme çözeltisine alındı. Belirli aralıklarla değiştirilmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp, protein bantları belirginleşinceye kadar 1-2 gün bu çözelti içinde çalkalandı. Bundan sonra jeller %30'luk etil alkol içine alındı ve fotoğrafları çekildi (Laemmli 1970)

*Brevibacillus sp.* (Z1)'den üretilip DEAE-sefadeks iyon değişim kromatografisi ve Sefakril S 200 jel filtrasyon kolunu kullanılarak saflaştırılan lakkaz enzimlerinin alt birim sayısını kontrol etmek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektroforezine numuneler tatbik edilmiştir. Belirginleşen protein bantlarının fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 4.5).

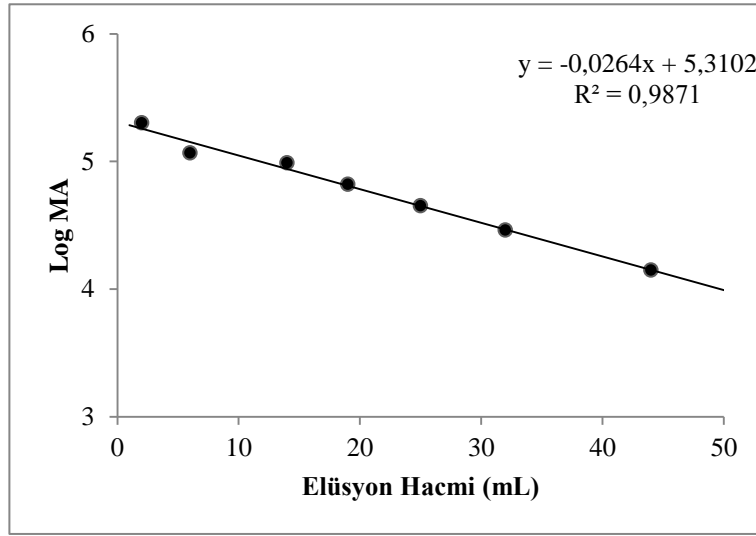


**Şekil 4.4.** *Brevibacillus sp.* (Z1)'den ekstraselüler olarak üretilip saflaştırılan lakkaz enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforez fotoğrafı

\***I**-Standart protein, **II**-Homojenat, **III**-DEAE-sefadeks saflaştırılmasından elde edilen lakkaz, **IV**-Jel filtrasyon kromatografisinden saflaştırılan lakkaz enzimi

#### 4.8. *Brevibacillus sp.* (Z1)'den Üretilip Safılaştırılan Lakkaz Enziminin Jel Filtrasyon Kromatografisi İle Molekül Ağırlık Tayin Sonuçları

*Brevibacillus sp.* (Z1)'den üretilen ve safılaştırılan lakkaz enzimlerinin molekül ağırlıklarını bulmak amacıyla Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi kullanılmıştır. Jel filtrasyon kolonundan önce standart proteinler geçirilmiş ve log MA- $K_{av}$  grafiği çizilmiştir (Şekil 4.6). Daha sonra safılaştırılan lakkaz enzim çözeltisi kolondan geçirilmiştir. Bu işlemler sırasında standart proteinlere ait elüatların 280 nm'deki absorbanları ve lakkaz enzime ait fraksiyonlarda aktivite tayini yapılmıştır. Standart grafiğe (Şekil 4.5) göre enzimin doğal halinin molekül kütlesi 122.02, 93.756 ve 73.790 kDa ağırlığında, 3 alt birimden oluştuğu belirlenmiştir.



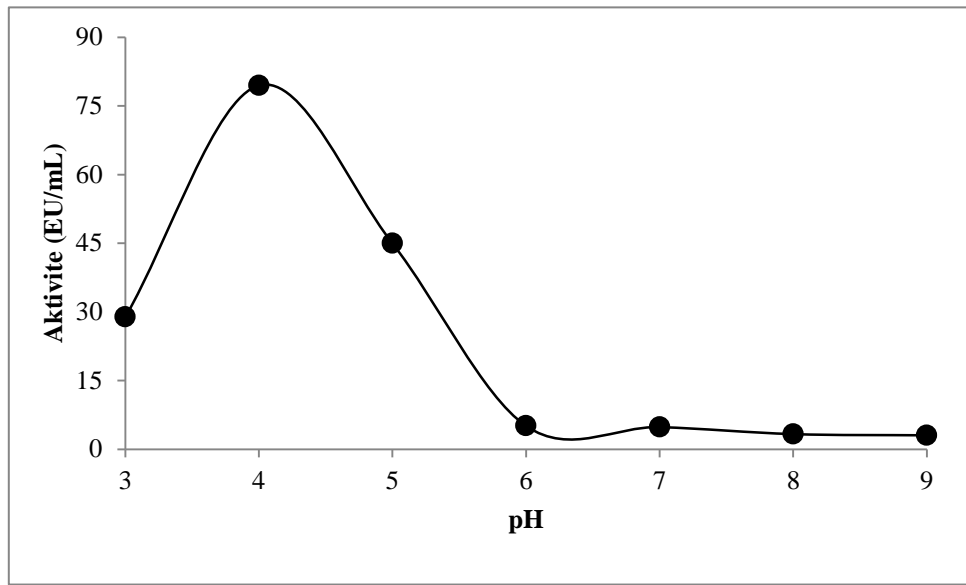
Şekil 4.5. *Brevibacillus sp.* (Z1)'den üretilip safılaştırılan lakkaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi metodu ile molekül kütlesinin belirlemek amacıyla kullanılan standart proteinlerin  $K_{av}$  değerlerine karşılık çizilen Log MA grafiği.

\*(Sephadex G-100, 20 mM Sitrata tamponu, 1 mM ditiotritol, pH:7).

#### 4.9. *Brevibacillus sp.* (Z1)'den Üretilip Safılaştırılan Lakkaz Enzimlerinin Optimum pH Sonuçları

*Brevibacillus sp.* (Z1)'den üretilip safılaştırılan lakkaz enziminin optimum pH'sını

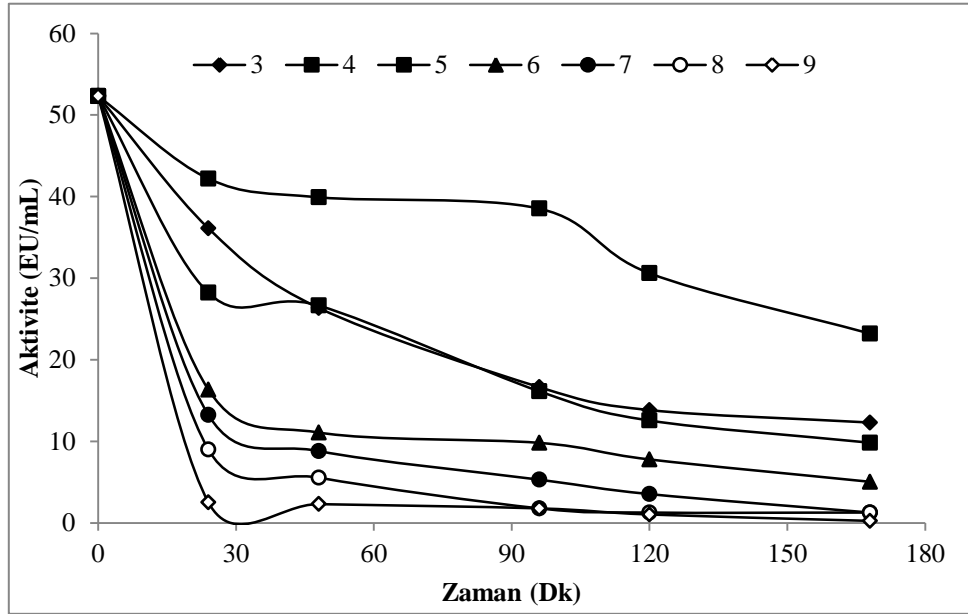
belirlemek için için pH 3'ten 9'a kadar yedi farklı pH ortamında çalışılmıştır. pH 3'den 5'e kadar asetat, pH 6'dan 8'e kadar fosfat ve pH 8'den 9'a kadar da Tris / HCl tamponları kullanılmıştır. ABTS substratı kullanılarak aktivite ölçümleri yapılmış, elde edilen sonuçlar kullanılarak aktivite hesaplanmış, Aktivite-pH grafikleri çizilmiş ve sonuçları Şekil 4.6'da verilmiştir. *Brevibacillus sp.* (Z1)'den üretilip saflaştırılan lakkaz enziminde optimum pH değeri ABTS substratı için 4.0 olarak bulunmuştur.



**Şekil 4.6.** *Brevibacillus sp.* (Z1)'den ekstraselüler olarak üretilip saflaştırılan lakkaz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

#### 4.10. Lakkaz Enziminin Stabil pH Çalışması Bulguları

Lakkaz enzimi pH 3'den 5'e kadar asetat, pH 6'dan 7'e kadar fosfat ve pH 8'den 9'a kadar da Tris/HCl tamponları kullanılarak dokuz gün boyunca +4°C'de inkübe edilmiş, periyodik aralıklarla aktivite ölçümleri yapılmış ve bulgular Şekil 4.7'da verilmiştir. Grafiklerden de görülebileceği gibi lakkaz enziminin stabil pH'sı ABTS için 5.0 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar toplu halde Çizelge 4.2'de verilmiştir.



**Şekil 4.7.** *Brevibacillus sp. (Z1)*'den ekstraselüler olarak üretilip saflaştırılan lakkaz enziminin ABTS substratı ile stabil pH'sının belirlenmesi için belirli bir süre inkübasyondan sonra elde edilen aktivite ölçüm bulguları

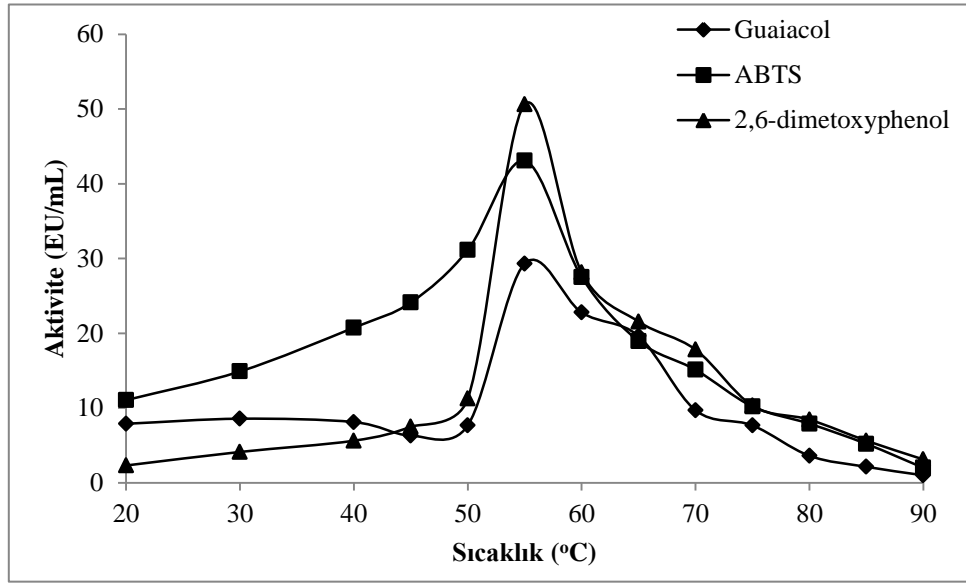
**Çizelge 4.2.** *Brevibacillus sp. (Z1)*'den ekstraselüler üretilip saflaştırılan lakkaz enzimi için yapılan optimum pH çalışmasından elde edilen sonuçlar

Substratlar	Optimum pH	Aktivite Gösterdikleri pH Aralığı
ABTS	4	3-6

#### 4.11. *Brevibacillus sp. (Z1)*'den Üretilip Saflaştırılan Lakkaz Enziminin Optimum Sıcaklık Sonuçları

*Brevibacillus sp. (Z1)*'den üretilip saflaştırılan lakkaz enzimlerinin optimum sıcaklıklarını belirlemek için 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ve 90°C'lerde çalışıldı. Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan çalışmalar her substrat için enzimin optimum pH'sında yapıldı. İstenilen sıcaklıklar, sirkülatörlü su banyosu kullanılarak ayarlandı. Mümkün olduğu kadar hızlı bir şekilde enzim çözeltisi aktarılarak aktivite ölçümleri yapıldı. Her bir substrat için optimum sıcaklık belirlendi.

Bu işlemde 500 µl enzim ependorflara konulup denenen sıcaklık bloğunda 5 dk bekletildi. Daha sonra 2.5 mL substrat içine ilave edildi ve aktivite ölçümü yapıldı. Bulgular grafik halinde verildi. En yüksek absorbans değerinin elde edildiği sıcaklık derecesi enzimin en iyi çalıştığı (optimum aktivite gösterdiği) değer olarak değerlendirilir (Dawkar *et al.* 2009). Elde edilen sonuçlarla aktivite hesaplanmış ve Aktivite- °C grafikleri çizilmiştir (Şekil 4.8). Bu bulgulara göre lakkaz enzimi optimum sıcaklık değeri tüm substratlar (Guaicol, ABTS ve 2,6-dimetoksifenol) için 55°C olarak belirlenmiştir.

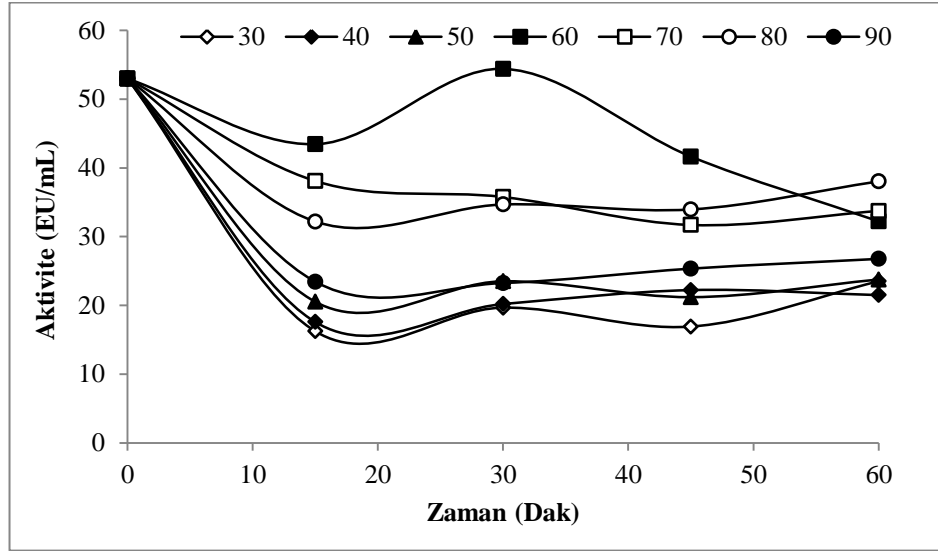


**Şekil 4.8.** *Brevibacillus sp.* (Z1)'den Ekstraselüler Olarak Üretilip Saflaştırılan Lakkazenziminin Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

#### 4.12. *Brevibacillus sp.* (Z1)'den Üretilip Saflaştırılan Lakkaz Enziminin Sıcaklık Stabilitesi Sonuçları

Enzimin stabil sıcaklığı belirlemek için bu çalışma optimum sıcaklık gibi yapıldı ama sadece değişikli zamanlarda yapıldı. 15, 30, 45, 60 dak sure ile enzimi belirtilen sıcaklıklarda bekletip sonra substrat ilave edilerek aktivite ölçümleri alındı. Bu çalışma ABTS substratı kullanılarak yapıldı. Bulgular grafik olarak Şekil 9'da verilmiştir. Bu grafiklerden elde edilen bulgular toplu olarak Çizelge 4.3'de gösterilmiştir.





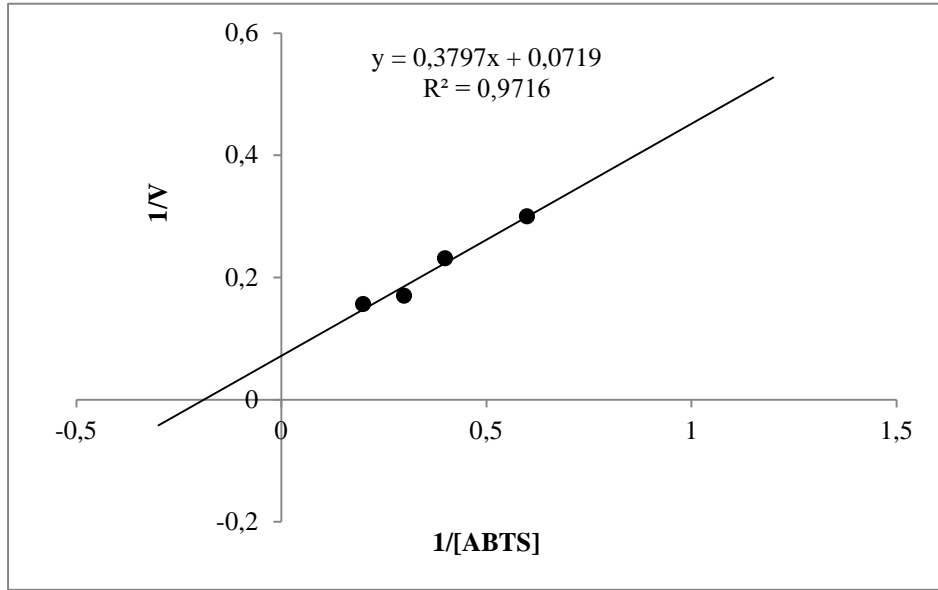
**Şekil 4.9.** *Brevibacillus sp.* (Z1)'den ekstraselüler olarak üretilip saflaştırılan lakkaz enziminin ABTS substratı ile stabil sıcaklığın belirlenmesi için belirli bir süre inkübasyondan sonra elde edilen aktivite ölçüm bulguları

**Çizelge 4.3.** *Brevibacillus sp.* (Z1)'den ekstraselüler üretilip saflaştırılan lakkaz enzimi için yapılan optimum sıcaklık çalışmasından elde edilen sonuçlar

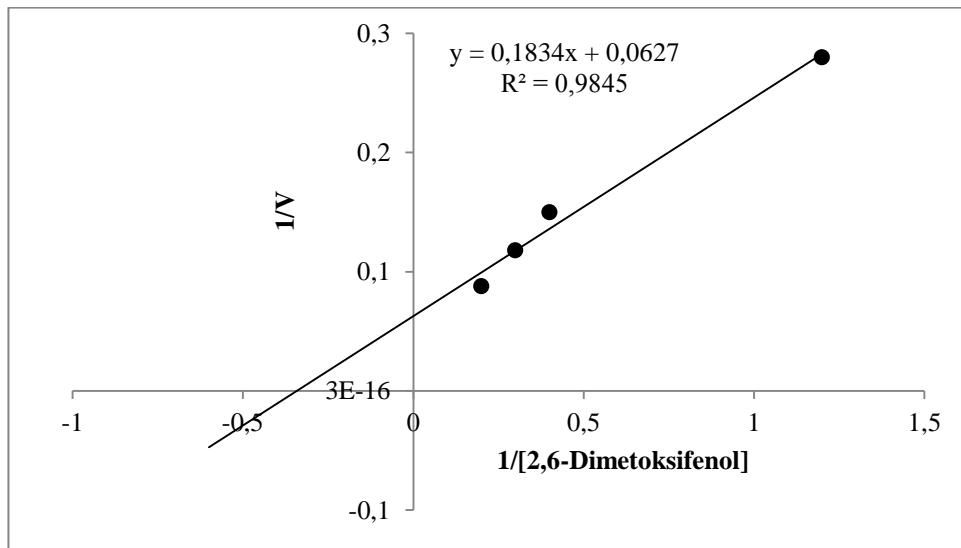
Substratlar	Optimum °C	Aktivite gösterdikleri °C aralığı
ABTS	55	40-90
Guaikol	55	50-80
2,6-dimetoksifenol	55	50-80

#### 4.13. Ekstraselüler Olarak *Brevibacillus sp.* (Z1)'den Saflaştırılan Lakkaz Enziminin $V_{max}$ ve $K_m$ Değerlerinin Sonuçları

Lakkaz enziminin  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerleri ile ilgili çalışmalar 5 mM'lık ABTS ve 2,6-dimetoksifenol substratları ile yapılmıştır. Bunun için önce lakkaz enzimi ile ABTS ve 2,6-dimetoksifenol substratlarının beş farklı substrat konsantrasyonunda optimum aktive ölçümleri yapılmış ve Lineveawer-Burk grafikleri çizilerek Şekil 4.10-4.11'de verilmiştir. Bu grafiklerden elde edilen denklemlerden yararlanılarak her bir substrat için ayrı ayrı  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerleri hesaplanmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.10.** *Brevibacillus sp.* (Z1)'den saflaştırılan lakkaz enziminin farklı ABTS substratı konsantrasyonu ile elde edilen  $1/V-1/[S]$  grafiği



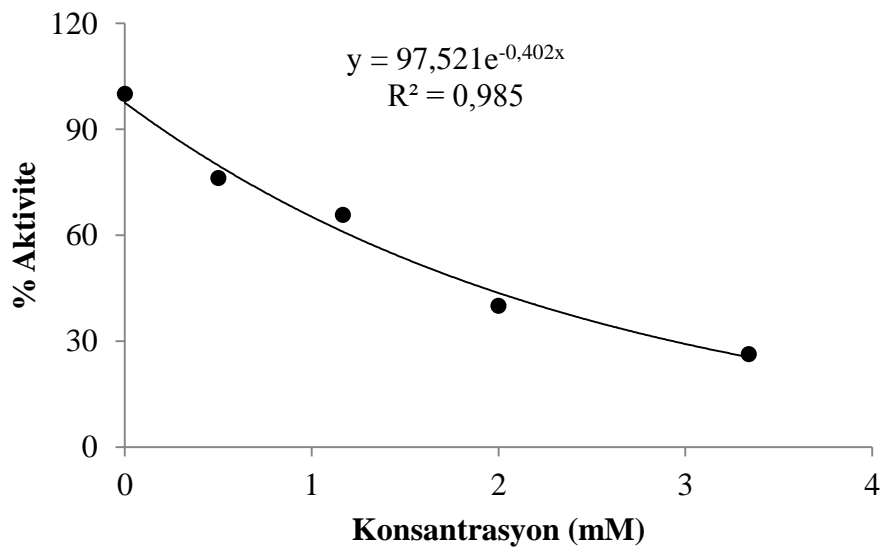
**Şekil 4.11.** *Brevibacillus sp.* (Z1)'den saflaştırılan lakkaz enziminin farklı 2,6-dimetoksifenol substratı konsantrasyonu ile elde edilen  $1/V-1/[S]$  grafiği

**Çizelge 4.4.** *Brevibacillus sp.* (Z1)'den ekstraselüler olarak saflaştırılan lakkaz enzimi için yapılan optimum sıcaklık çalışmasından elde edilen sonuçlar

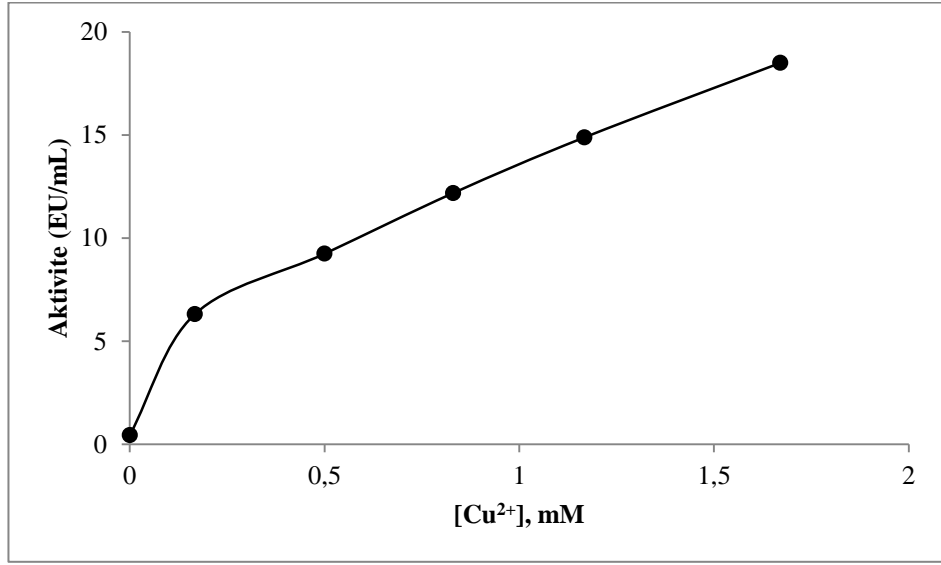
Substratlar	Vmax (EU/mL.dak)	Km (mM)
ABTS	14,08	5,34
2,6-dimetoksifenol	16,12	3,03

#### 4.14. *Brevibacillus sp.* (Z1)'den Ekstraselüler Olarak Saflaştırılan Lakkaz Enzimlerinin Aktiviteleri Üzerine $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ , $\text{Co}^{2+}$ , $\text{Fe}^{3+}$ , $\text{Zn}^{2+}$ , $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Hg}^{2+}$ , EDTA ve Askorbik Asit'in Etkisi

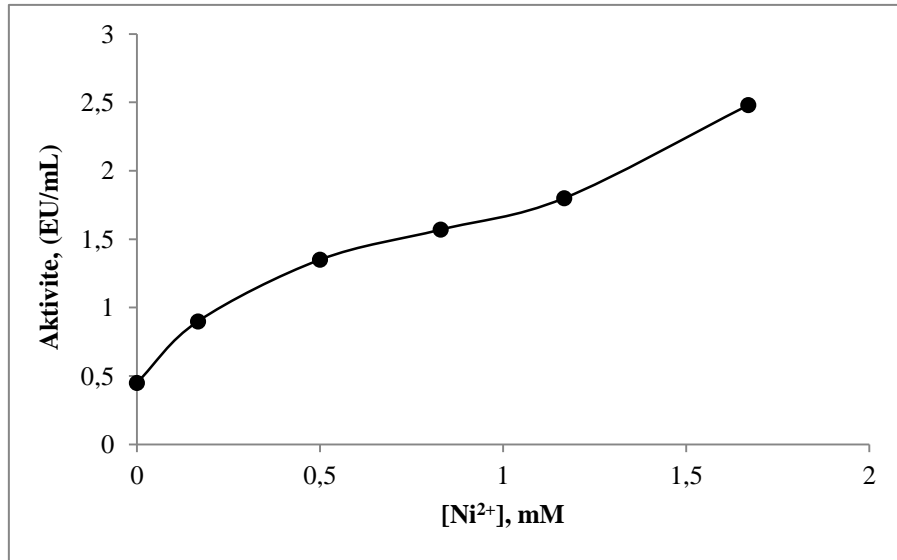
*Brevibacillus sp.* (Z1)'den ekstraselüler olarak üretilip saflaştırılan lakkaz enziminin aktiviteleri üzerine  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ , askorbik asit ve EDTA'nın etkileri araştırılmıştır. Çalışmalar sonucu elde edilen inhibisyon etkileri konsantrasyona karşı %Aktivite grafikleri olarak Şekil 4.14-4.25'de gösterilmiştir. İnhibisyon gösterenler için I50 değerleri hesaplanmış ve Çizelge 4.5'de gösterilmiştir.



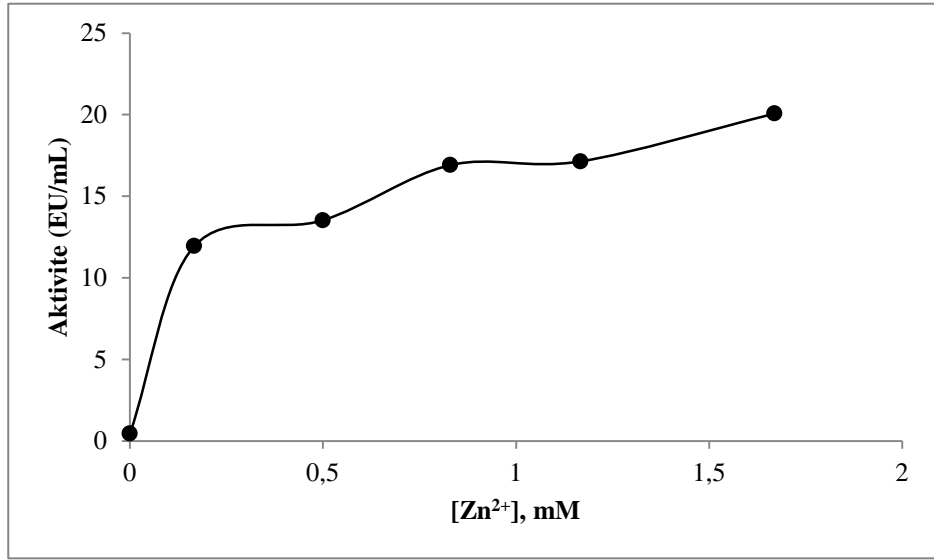
**Şekil 4.12.**  $\text{HgCl}_2$ 'nin *Brevibacillus sp.* (Z1)'den ekstraselüler olarak saflaştırılan lakkaz enzim aktivitesi üzerine etkisi



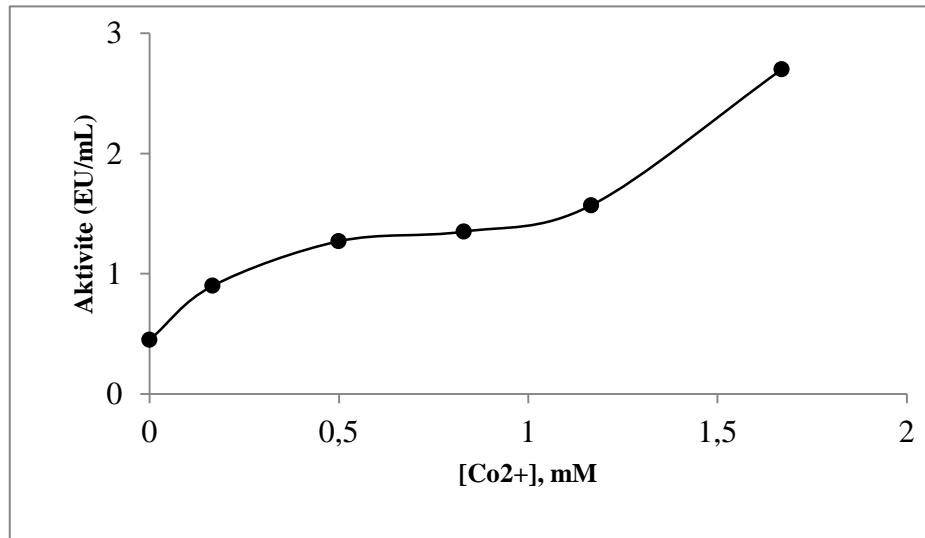
**Şekil 4.14.**  $\text{CuCl}_2$ 'nin *Brevibacillus sp.* (Z1)'den ekstraselüler olarak saflaştırılan lakkaz enzim aktivitesi üzerine etkisi



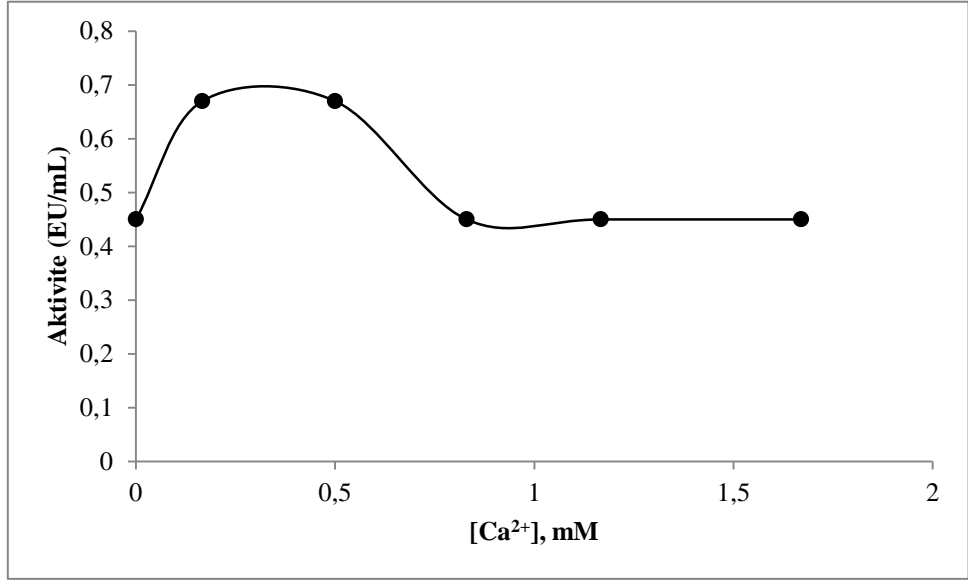
**Şekil 4.15.**  $\text{NiCl}_2$ 'nin *Brevibacillus sp.* (Z1)'den ekstraselüler olarak saflaştırılan lakkaz enzim aktivitesi üzerine etkisi



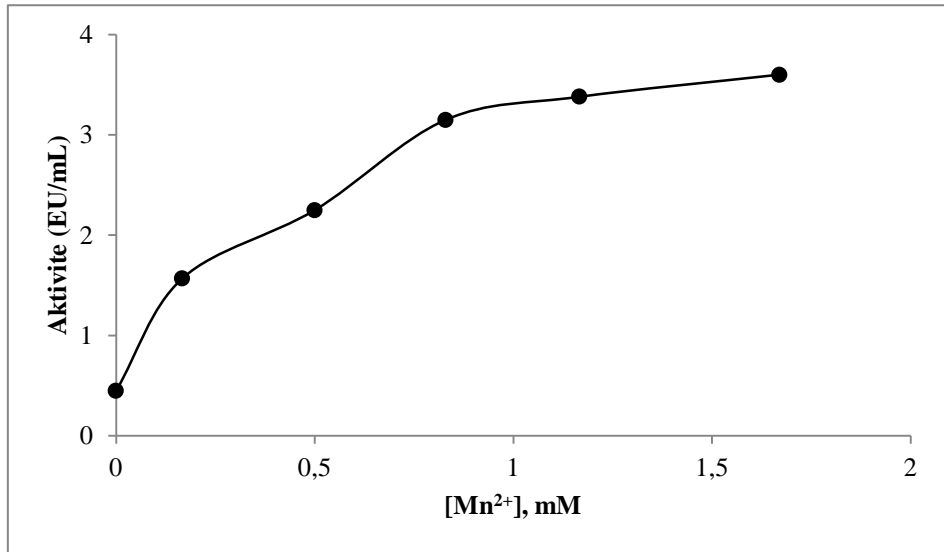
**Şekil 4.16.** ZnCl<sub>2</sub>'nin *Brevibacillus sp.* (Z1)'den ekstraselüler olarak saflaştırılan lakkaz enzim aktivitesi üzerine etkisi



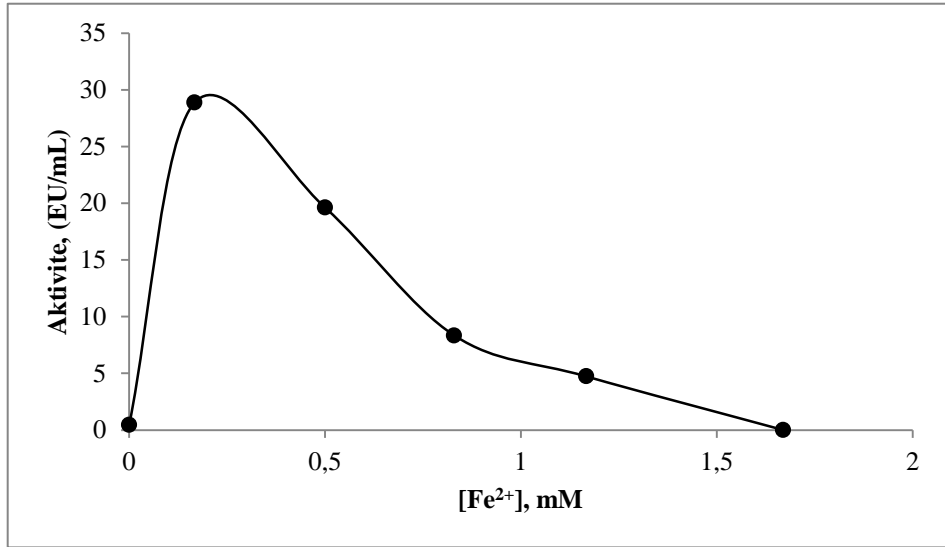
**Şekil 4.17.** CoCl<sub>2</sub>'nin *Brevibacillus sp.* (Z1)'den ekstraselüler olarak saflaştırılan lakkaz enzim aktivitesi üzerine etkisi



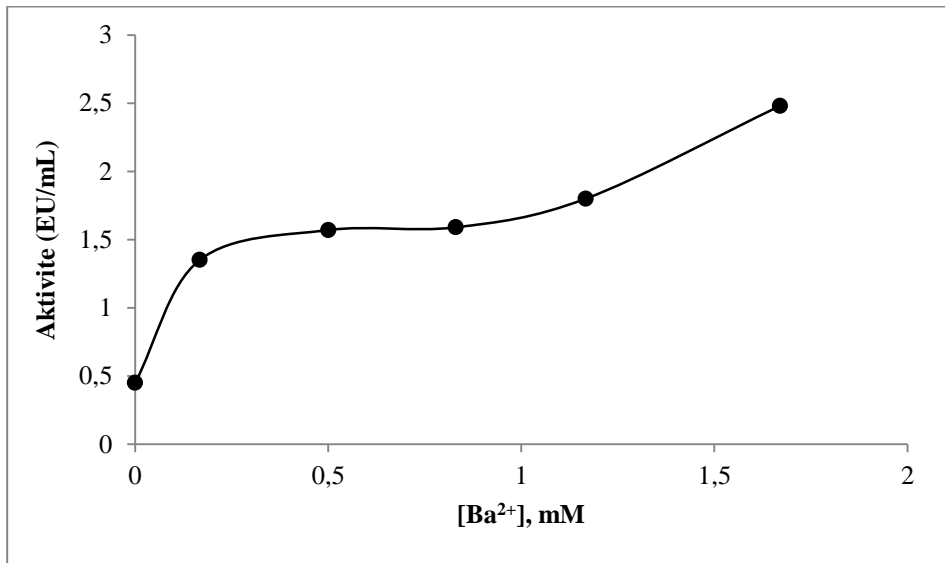
**Şekil 4.18.** CaCl<sub>2</sub>'nin *Brevibacillus sp.* (Z1)'den ekstraselüler olarak saflaştırılan lakkaz enzim aktivitesi üzerine etkisi



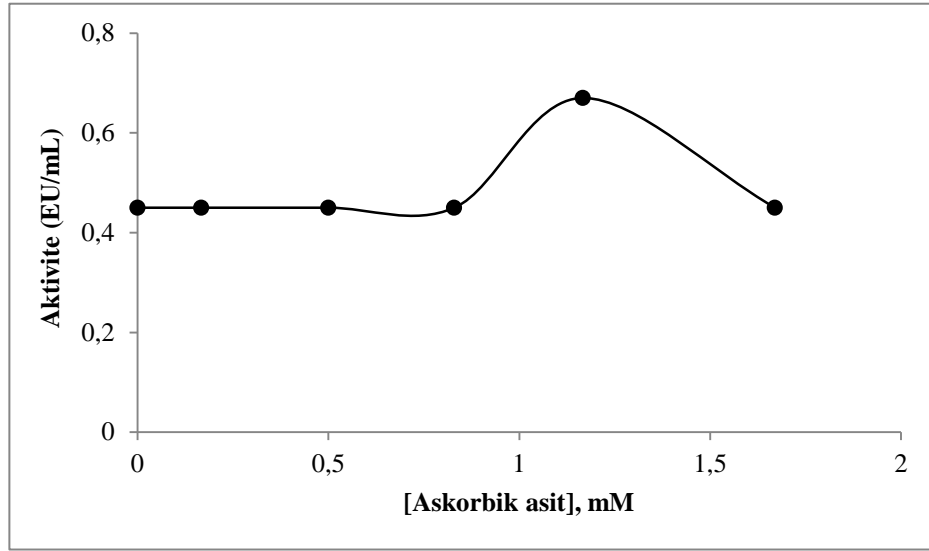
**Şekil 4.19.** MnCl<sub>2</sub>'nin *Brevibacillus sp.* (Z1)'den ekstraselüler olarak saflaştırılan lakkaz enzim aktivitesi üzerine etkisi



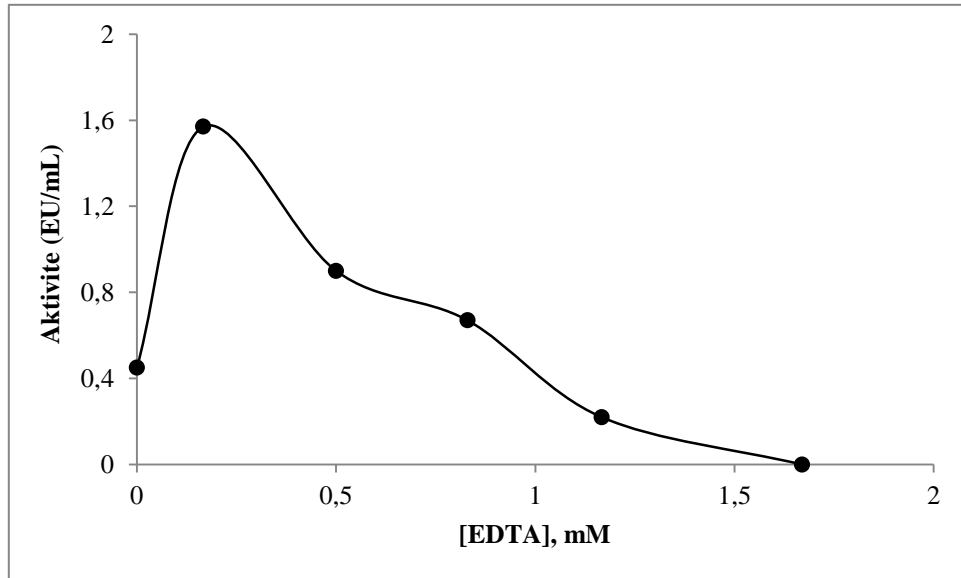
**Şekil 4.20.** FeCl<sub>2</sub>'nin *Brevibacillus sp. (Z1)*'den ekstraselüler olarak saflaştırılan lakkaz enzim aktivitesi üzerine etkisi



**Şekil 4.21.** BaCl<sub>2</sub>'nin *Brevibacillus sp. (Z1)*'den ekstraselüler olarak saflaştırılan lakkaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

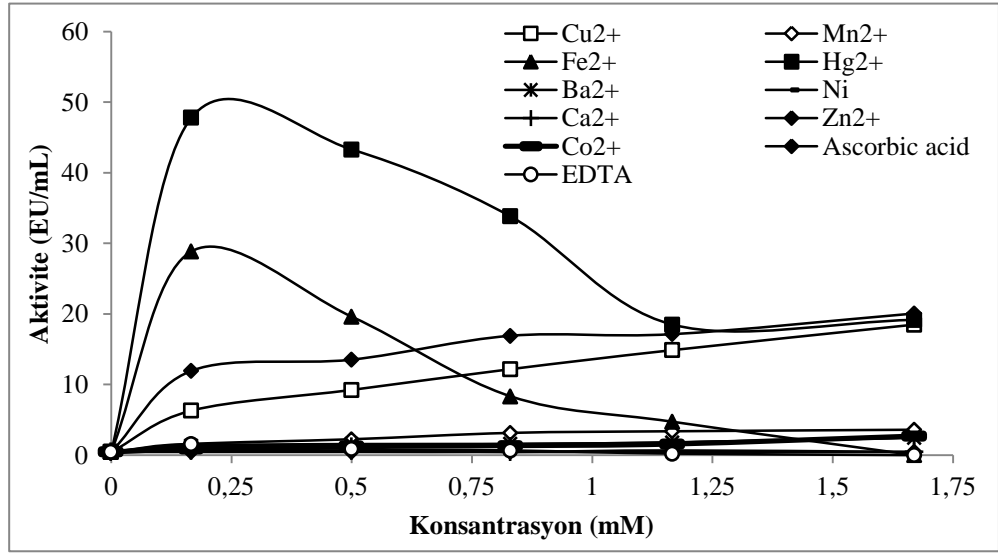


**Şekil 4.22.** Askorbik asit'in *Brevibacillus sp. (Z1)*'den ekstraselüler olarak saflaştırılan lakkaz enzim aktivitesi üzerine etkisi



**Şekil 4.23.** EDTA'nın *Brevibacillus sp. (Z1)*'den ekstraselüler olarak saflaştırılan lakkaz enzim aktivitesi üzerine etkisi





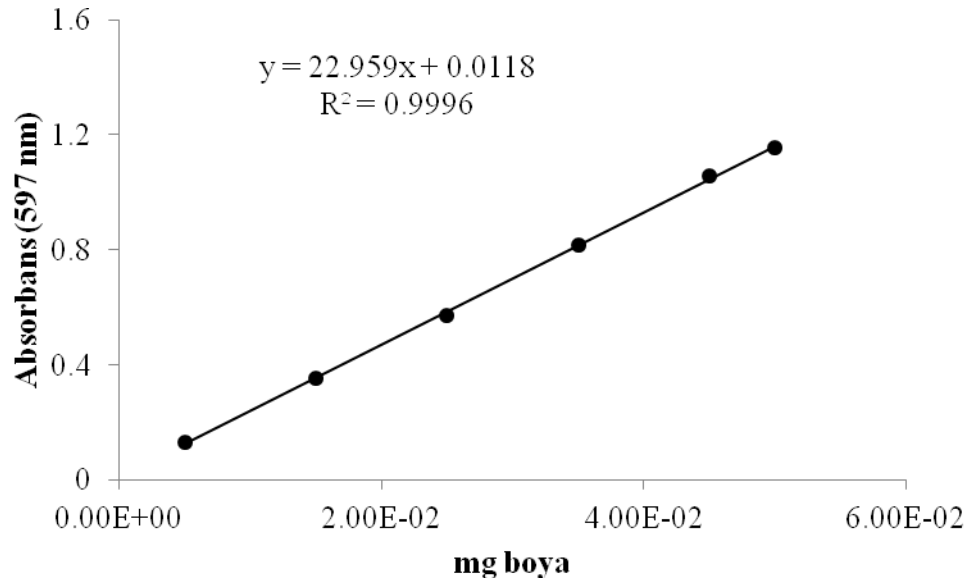
**Şekil 4.13.** Bazı metal iyonları ve kimyasalların *Brevibacillus sp. (Z1)*'den ekstraselüler olarak saflaştırılan lakkaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

**Çizelge 4.5.** *Brevibacillus sp. (Z1)*'den saflaştırılan lakkaz enzimi bazı metal iyonları ve kimyasallar için  $I_{50}$  (mM) değerleri

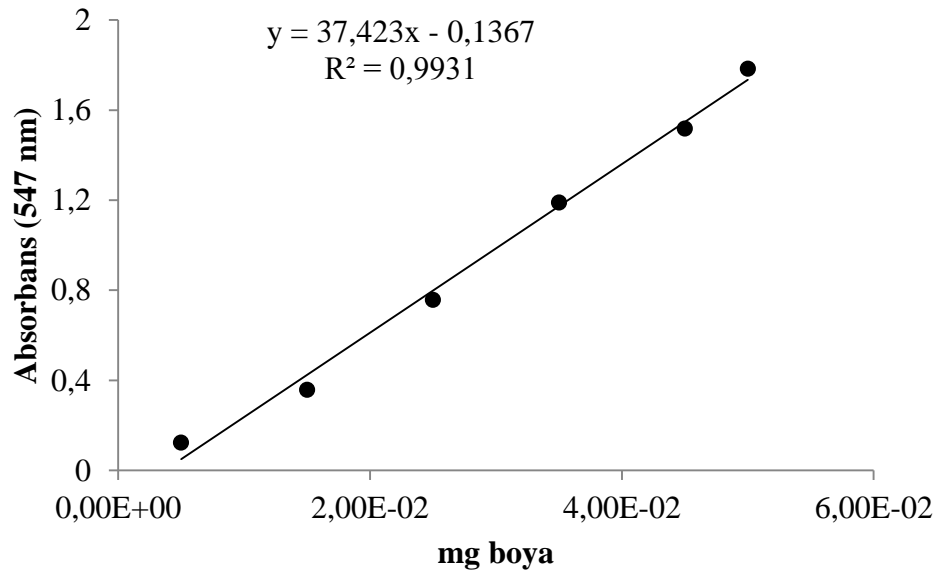
KİMYASALLAR	$I_{50}$
HgCl <sub>2</sub>	0,59

#### 4.15. *Brevibacillus sp. (Z1)*'den Ekstraselüler Olarak Saflaştırılan Lakkaz Enzimi Kullanılarak Bazı Tekstil Boyarlarının Giderimi ile İlgili Sonuçlar

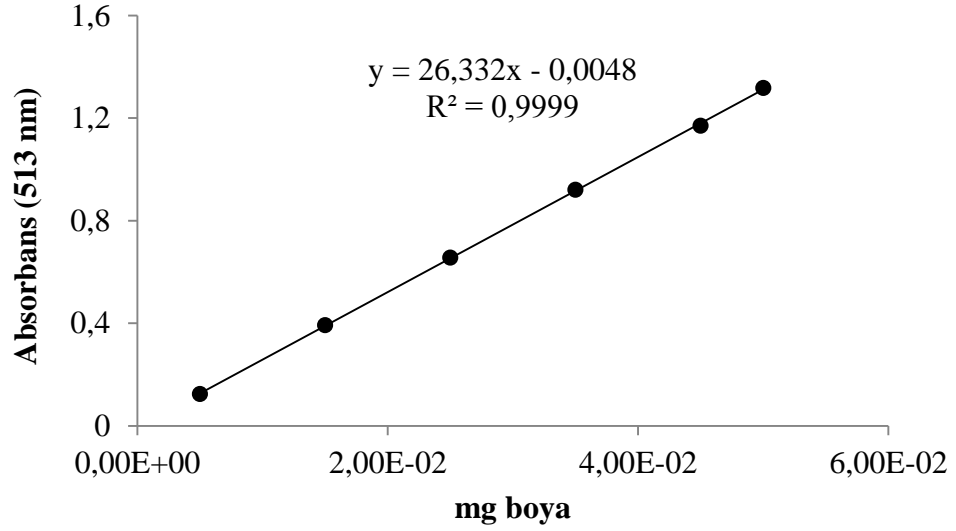
Çözelti ortamındaki Reaktif Siyah 5, Fuksin, Allura Kırmızısı ve Asit Kırmızısı 37 tekstil boyarlarının miktarını belirlemek amacıyla standart eğriler hazırlanmış ve Şekil 4.26-29'da gösterilmiştir.



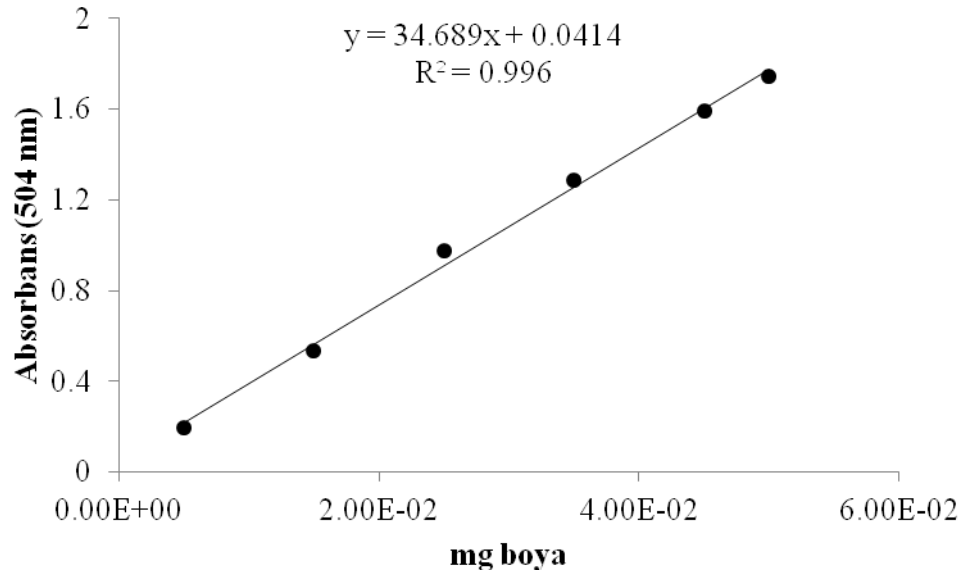
Şekil 4.24. Reaktif Siyah 5 tekstil boyası için hazırlanan standart grafik



Şekil 4.25. Fuksin tekstil boyası için hazırlanan standart grafik

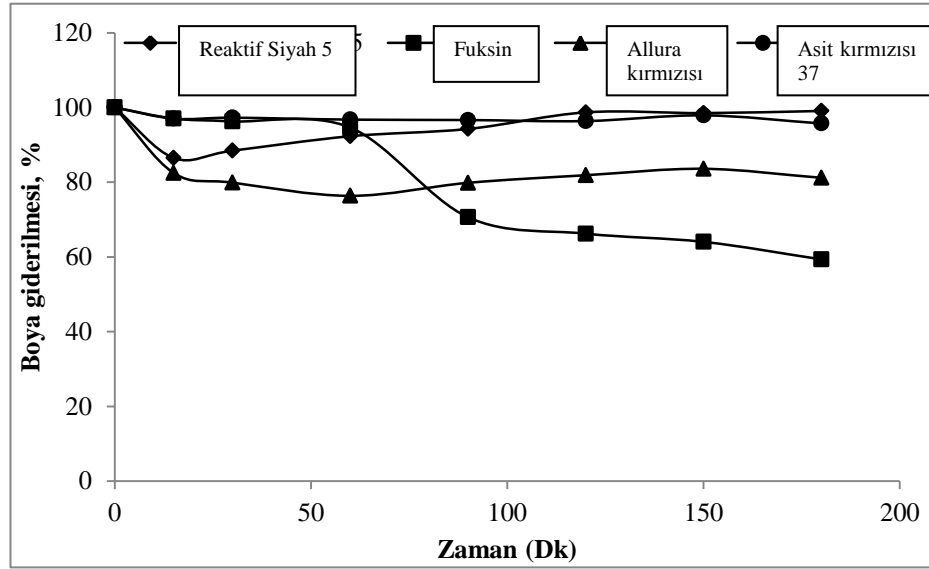


Şekil 4.26. Alura Kırmızısı tekstil boyası için hazırlanan standart grafik

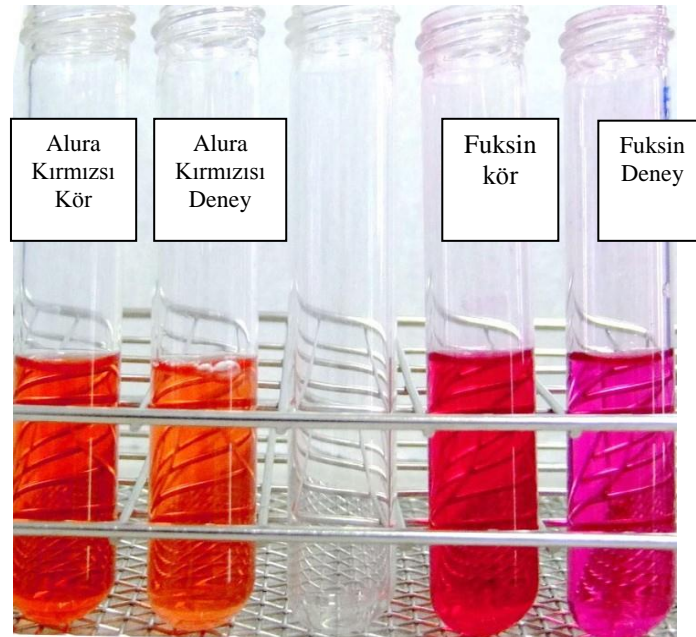


Şekil 4.27. Asit Kırmızısı tekstil boyası için hazırlanan standart grafik

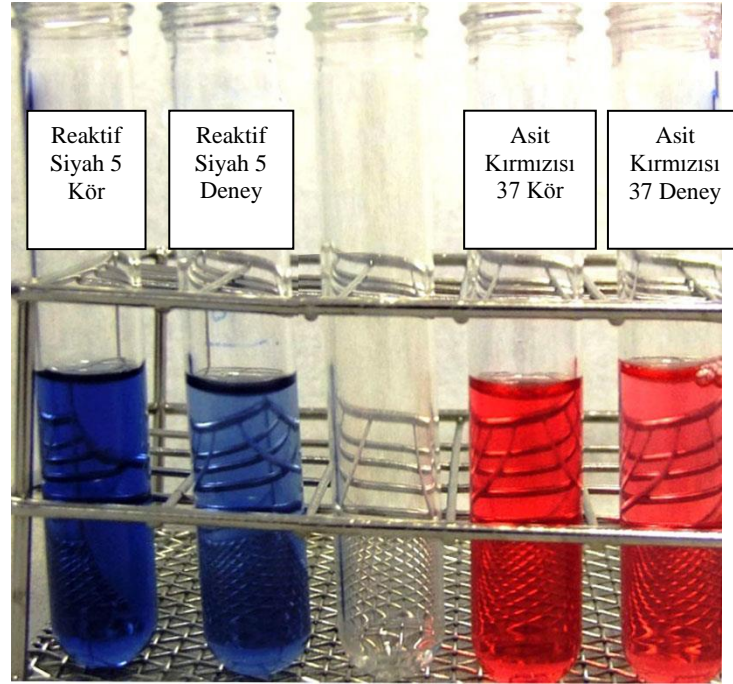
*Brevibacillus sp.* (Z1)'den ekstraselüler olarak üretilen ve saflaştırılan lakkaz enziminin Reaktif Siyah 5, Fuksin, Allura Kırmızısı ve Asit Kırmızısı 37 gibi bazı tekstil boyalarının atık sulardan giderilmesi işlemini nasıl etkilediği incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.30-Şekil 4.32 ve Çizelge 4.6'da verilmiştir.



**Şekil 4.28.** *Brevibacillus sp. (Z1)*'den ekstraselüler olarak saflaştırılan lakkaz enziminin Reaktif Siyah 5, Fuksin, Allura Kırmızısı ve Asit Kırmızısı 37 gibi bazı tekstil boyalarının atık sulardan giderilmesi işlemine etkisi



**Şekil 4.29.** *Brevibacillus sp. (Z1)*'den ekstraselüler olarak saflaştırılan lakkaz enziminin Allura Kırmızısı ve Fuksin gibi bazı tekstil boyalarının atık sulardan giderilmesi işleminin fotoğrafı



**Şekil 4.30.** *Brevibacillus sp. (Z1)*'den ekstraselüler olarak saflaştırılan lakkaz enziminin Reaktif Siyah 5 ve Asit Kırmızı 37 gibi bazı tekstil boya larının atık sulardan giderilmesi işleminin fotoğrafı

**Çizelge 4.6.** *Brevibacillus sp. (Z1)*'den ekstraselüler olarak saflaştırılan lakkaz enziminin Reaktif Siyah 5, Fuksin, Allura Kırmızı 37 ve Acid Red 37 gibi bazı tekstil boya larının atık sulardan giderilmesi işlemine etkisi

Tekstil Boyaları	0.dak	15.dak	30.dak	60.dak	90.dak	129.dak	150.dak	180.dak
	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg
	boya	boya	boya	boya	boya	boya	boya	boya
Reaktif Siyah 5	50	48,6	48,5	48,4	47,1	44,25	37,65	33
Fuksin	50	41,2	40,35	38,4	36,6	35,45	30,8	25,4
Allura Kırmızı 37	50	48,8	48,55	44,1	40,9	38,75	33,05	26,8
Asit Kırmızı 37	50	39,95	34,05	31,05	29,15	27,55	25,1	23,65

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

### 5.1. Tartışma

Bu çalışmada, Ağrı-Diyadin kaplıcasından Z1 test izolatu saflaştırılmış ve lakkaz enzim aktivitesine bakılmıştır. Değerlendirilme sonucunda, yüksek lakkaz enzim aktivitesine sahip olan bu izolat çeşitli konvensiyonel ve moleküler yöntemler kullanılarak identifiye edilmiştir.

16S rRNA gen bölgesine özel evrensel primerlerle gerçekleştirilen PCR sonucunda bu bölge çoğaltılmış, pGEM-T-easy vektörüne klonlanarak sekans analizine gidilmiştir. Elde edilen sekans analizi sonucunda izolat %99 bezerlikle *Brevibacillus sp.* (Z1) olarak cins düzeyinde tanımlanabilmiştir. Yapılan literature taramaları sonucunda, son yıllarda sistematik çalışma gerçekleştiren bilim insanları, bakterilerin familya, cins ve tür düzeyinde tanılanması için, 16S rRNA'yı da içeren makromolekül bölgelerinin analizinden yaygın bir şekilde faydalanmaktadırlar (Acar 2009; Adiguzel vd. 2009). Bunun temel nedeni, 16S rRNA bölgesinin evrimsel süreçte mutasyona kapalı olmasındandır. Ancak, bazı çalışmalarda aynı cinse ait türlerin 16S rRNA genlerinin dizi analizleri arasındaki benzerliğin %97'den az, aynı türe ait suşlarda ise bu oranın %97'den daha fazla olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, aralarında 16S rRNA gen dizisi açısından %95'ten daha fazla benzerlik gösteren bakterilerin aynı cinse ait türler olduğu bilinmektedir (Madigan and Martinko 2010). *Brevibacillus* cinsi Shida *et al.* tarafından *Paenibacillaceae* ailesi içerisinde tanımlanmış bir cinstir (Shida *et al.* 1996). Tanımlanan bu cins içerisinde bulunan bakteri türleri, *Brevibacillus invocatus*, *Brevibacillus limnophilus*, *Brevibacillus levickii*, *Brevibacillus ginsengisoli*, *Brevibacillus panacihumi*, *Brevibacillus fluminis*, *Brevibacillus aydinogluensis* ve *Brevibacillus nitrificans*'tır (Allan *et al.* 2005; Kim *et al.* 2009; Inan *et al.* 2012). Z1 izolatu gen bankasında yapılan karşılaştırmalar sonucu sadece *Brevibacillus sp.* olarak tanımlanması bu izolatu *Brevibacillus* cinsine ait yeni bir tür olabileceğini göstermektedir. Bu izolatu tür düzeyinde tanımlayabilmek için DNA-DNA

hibridizasyonu, G+C içeriği analizi gibi ek moleküler metodları ki çalışmalarda gerçekleştirilecektir.

Konvensiyonel test verileri incelendiğinde; Z1 izolatının Gram, endospor, katalaz pozitif, hareketli, çubuk şeklinde bir bakteri olduğu ve bu sonuçların literatür verileri ile paralellik gösterdiği tespit edilmiştir (Oliveira *et al.* 2004). Yapılan analizler sonucunda test straininin lakkaz aktivitesinin yanı sıra lipaz, ksilanaz, katalaz ve selüloz aktivitesinin bulunduğu belirlenmiştir. Daha önceki çalışmalarda da *Brevibacillus* cinsinin amilaz, ksilanaz, lakkaz gibi birçok değerli endüstriyel enzimin kaynağı olduğunu gösteren farklı çalışmalar yapılmıştır (Oliveira *et al.* 2004; Kim *et al.* 2009; Inan *et al.* 2012). Bu çalışmada, termofilik bakteri izolasyonu ve identifikasyon çalışmalarına ek olarak lakkaz enzimi üretme potansiyeline bakılmıştır. Bu çalışma sonucunda test izolatının, 2,6-dimetoksifenol substratlarının indükleyici etkisiyle lakkaz enzimini yüksek aktiviteyle ekstrasellüler olarak ürettiği tespit edilmiştir. Elde edilen ekstraktlardan  $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$  çöktürmesi, DEAE-Sefadex iyon değişim kromatografisi ve Sephacril S200 jel filtrasyon kromatografisi teknikleri kullanılarak 30.2 verimle yaklaşık olarak 93 kat saflaştırma gerçekleştirilmiştir (Tablo 4.1).

*Brevibacillus sp.* (Z1)'den saflaştırılan lakkaz enziminin optimum pH'sını belirlemek amacıyla pH 3.0-9.0 aralığında aktivite ölçümleri yapılmıştır. pH 3.0-5.0 aralığı için 0,1 M'lık asetat tamponu, pH 6.0-7.0 aralığı için 0,1 M'lık fosfat tamponu, pH 8.0-9.0 için 0,1 M'lık Tris/HCl tamponu ile ABTS/  $\text{H}_2\text{O}_2$  substrat çiftleri ile enzimin gösterdiği aktivite spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. pH'nın lakkaz enzimleri için önemli bir parameter olmasının nedeni enzimlerin aktivitelerinin pH'ya bağımlı olmasıdır. Fenolik substratlar için lakkaz enzimlerinin pH bağımlılıkları çan eğrisi şeklindedir. Bunun nedeni ise pH'daki artışın, fenolik bileşiklerin pH'ya bağlı olarak fenol-fenolat dönüşümleri nedeniyle redüksiyon potansiyelindeki bir düşüşe bağlanırken, aktivitenin pH ile olan yarışmacı körelmesi ise trinükleer kümedeki hidroksid inhibisyonuna bağlanmıştır (Xu 1997). Çan eğrisi şeklindeki eğrinin maksimum noktası ise genellikle asidik pH'larda meydana gelmektedir. Örneğin; Farklı bakterilerden elde edilen lakkaz enzimlerinin optimum pH'sı; *Escherichia coli* için 5,5, *Trametes pubescens* için 3,

*Pycnoporus cinnabarinus* için 4, *Streptomyces lavendula* için 4,5 olarak belirlenmiştir (Galhaup *et al.* 2002; Roberts *et al.* 2003; Suzuki *et al.* 2003). Yaptığımız çalışmanın sonuçlarına göre, gibi optimum pH ABTS için 4.0 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.3). Bulduğumuz sonuç diğer literatürle de uyumludur. Saf lakkaz enziminin stabil pH'sına yönelik yapılan çalışmalar sonucunda enzimin oldukça dayanıklı olduğu gözlemlenmiştir. Örneğin +4°C'de yapılan stabil pH'ya ilişkin çalışmalarda, dördüncü günde bile pH 6'da 2,6-dimetokifenol substratı ile enzim aktivitesinin %33.27'ini, pH 7.0'da %67.8'ini ve pH 8.0'de ise %49'unu koruduğu belirlenmiştir.

*Brevibacillus sp.* (Z1)'den ekstraselüler olarak üretilip saflaştırılan lakkaz enziminin optimum sıcaklığının ABTS substratı için optimum pH'da ve 40-90°C aralığında, 2,6-dimetoksifenol substratı için optimum pH'da 50-80°C aralığında, guaikol substratı için optimum pH'da 50-80°C aralığında aktiviteler belirlenmiştir. Enzimin her üç substratında optimum sıcaklık çalışmalarında 30 ile 80°C'ler arasında oldukça aktif olduğu ve maksimum aktiviteyi 55°C'de gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca, enzimlerin optimum çalışma sıcaklığında bile 90 dk sonunda aktivitesini tamamen kaybetmediği görülmüştür. *S. coelicolor*'un lakkaz enzimini 70 °C'deki termostabilitesinin ise oldukça yüksek olduğu rapor edilmiştir (Dubé *et al.* 2008). Bains ve ark. tarafından endüstriyel atıksu ile kirlenen topraklardan izole edilen  $\alpha$ -proteobakteri üyesi alkalitolerant bir bakteri izolatının ürettiği lakkaz enziminin ise en az 24 saat süreyle pH 3-10,6 arasında kararlı olduğu, optimal aktivitesini ise 55 °C'de gösterdiği rapor edilmiştir (Bains *et al.* 2003). *B. subtilis* endospor kılıf proteini olan CotA ise substrat olarak ABTS'ye karşı en yüksek lakkaz aktivitesini 75 °C'de göstermiştir. Bu enzimin 80 °C'deki yarılanma ömrü ise kılıf proteinleri ile birlikte iken 4 saat, saf iken ise 2 saat olarak tespit edilmiştir (Martins *et al.* 2002). *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 korurken, aynı sıcaklıktaki yarılanma ömrü ise 100 dk. olarak belirlenmiştir (Suzuki *et al.* 2003). *S. Cyaneus* tarafından üretilen lakkaz enzimin optimal sıcaklığının ise 70°C olduğu belirlenmiştir. Bu enzim, ortam pH'sının 5-8 olduğu koşullarda ve 40 °C'de, 120 dk. inkübe edildiğinde aktivitesinin



%100'ünü korurken; aynı sıcaklıkta fakat ortam pH'sının 3-4 olduğu koşullarda ise aktivitesinin %50'sini koruduğu belirlenmiştir. Aynı lakkaz enzimi, ortam pH'sının 4,5 olduğu koşullarda ise 50 °C'de 120 dk. sonra %75; 60 °C'de 60 dk. sonra ise %60 aktivite göstermiştir (Arias *et al.* 2003). Bulunan bulguları destekler nitelikte, literatürde bazı termofilik bakterilerden saflaştırılan lakkaz enzimlerinde de benzer olarak 60°C ve üzerindeki sıcaklıklarda maksimum lakkaz aktivitesi belirlenmiştir (Sangar *et al.* 2012).

Yapılan literatür taramaları sonucunda lakkaz enziminin molekül ağırlığı ile ilgili yayınlanmış birçok veri bulunmuştur. *Streptomyces griseus* bakterisinden saflaştırılan lakkaz enziminin 34 kDa ve 43 kDa alt birimlerinin olduğu belirlenmiştir (Zeiner *et al.* 1988). Diamantidis ve arkadaşlarının (2000) yaptığı bir çalışmaya göre bazı *Bacillus* sp. suşlarından ve *A. lipoferum*'dan elde edilen lakkaz enzimlerinde olduğu gibi, lakkaz enzimleri poliakrilamid jellerde yüksek moleküler kütleli kompleksler veya multimerler olarak bulunmaktadır (Diamantidis *et al.* 2000). *A. lipoferum* tarafından sentezlenen lakkaz ise katalitik bir alt-birimden ve bir veya iki daha büyük polipeptid zincirinden oluşan bir multimerik enzimdir. Bu enzimin SDS-PAGE analizleri ise her birisi farklı moleküler kütleyle sahip üç alt-birimden (48,9; 97,8 ve 179,3 kDa) oluştuğunu göstermiştir. Başka bir rapora göre, *S. griseus* tarafından üretilen ekstrasitoplazmik fenol oksidaz (EpoA) 114 kDa'luk homotrimer olduğu ve SDS-PAGE esnasında dahi stabil olarak kaldığı tespit edilmiştir (Endo *et al.* 2002). *S. cyaneus* tarafından üretilen lakkaz enziminin moleküler kütesinin ise 75 kDa olduğu belirlenmiştir (Arias *et al.* 2003). Jel filtrasyon kromatografisi ile *Brevibacillus* sp. (Z1)'den saflaştırılan lakkaz enziminin molekül kütlesi 122.02, 93.756 ve 73.790 kDa ağırlığında, 3 alt birimli olarak bulunmuştur. Bu bulgu, bakterilerden saflaştırılan lakkazların molekül ağırlıkları ile uyum içerisindeydir.

Çalışmada kullanılan enzimin bütün substratları için Km ve Vmax değerleri Linweaver-Burk grafikleri çizilerek elde edilen denklemlerden hesaplanmıştır (Şekil 4.10-4.13). *Brevibacillus* sp. (Z1)'den ekstraselüler olarak üretilip saflaştırılan lakkaz enziminin 25oC ve pH: 4'de ABTS substratı için Vmax ve Km değerleri sırasıyla 14.08 EU/mL.dak ve 5.34 mM olarak bulunmuştur. Vmax ve Km değerleri enzimin farklı

substratları içinde belirlenmiştir. Aynı koşullarda  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerleri; 2,6-dimetoksifenol için 16.12 EU/mL.dak ve 3.03 mM olarak bulunmuştur. Elde edilen değerlerden enzimin ABTS'ye karşı en yüksek afiniteye sahip olduğu ve en yüksek  $V_{max}$  değerini ise 2,6-dimetoksifenol substratına karşı gösterdiği tespit edilmiştir. Lakkaz enziminin doğal substratı olan gualkolu ise hidroliz etmediği belirlenmiştir. Enzimin kullanabildiği substratlar daha önceki literatürlerce desteklenmektedir (Nannipieri and Bollag 1991; Roy-Arcand and Archibald 1991).

*Brevibacillus sp.* (Z1)'den ekstraselüler olarak üretilip saflaştırılan lakkaz enziminin aktiviteleri üzerine  $Hg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $K^+$ ,  $Ba^{2+}$  gibi metal iyonlarının, Askorbik asit ve EDTA gibi bazı kimyasalların etkileri araştırılmıştır.  $Hg^{2+}$  iyonu lakkaz enzimini inhibe ederken diğer bütün metal iyonları ve kimyasal bileşikler enzimi aktive etmiştir. Lorenzo ve arkadaşlarının (2006) yapmış oldukları çalışmada lakkaz aktivitesini artırmak amacıyla batık fermentasyon koşulları altında üretilen *Trametes versicolor* CBS100.29 soyunun besiyeri olan arpa kepeğine ayrı ayrı 2 mM  $Cd^{2+}$ , 1 mM  $Ag^+$ , 1 mM  $Mn^{2+}$ , 1 mM  $Zn^{2+}$  ve 2 mM  $Cu^{2+}$  ilave etmişlerdir. Yapılan aktivite ölçümleri sonucunda  $Ag^+$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  ve  $Zn^{2+}$  nin lakkaz aktivitesini az miktarda artırdığı saptanmıştır. Araştırmacılar en yüksek enzim aktivitesinin 2 mM  $Cu^{2+}$  nin ilave edildiği kültür ortamlarında yaklaşık 6000 U/L olduğu ifade edilmektedir. Bu aktivite değeri de kontrol kültürlerinden elde edilen lakkaz aktivitesinin 9 katı olarak belirlenmiştir. Bakırın enzim aktivitesi üzerine oldukça etkili olması nedeniyle araştırmacılar kültür ortamına bu defa 2, 3.5 ve 5 mM konsantrasyonlarda  $Cu^{2+}$  ilave etmiş ve en yüksek aktivitenin 3.5 mM  $CuSO_4$  eklenmiş kültür ortamında yaklaşık olarak 8000 U/L olduğunu saptamışlardır (Lorenzo *et al.* 2006). Yaptığımız çalışma ile daha önce enzimin aktivitesine etkisi araştırılmamış olan bazı iyonlarında etkisi araştırılmışken, birçok metal iyonunun enzimin aktivitesi üzerine etkisi ile ilgili bulduğumuz veriler literatürle paralellik göstermektedir.

*Brevibacillus sp.* (Z1)'den ekstraselüler olarak üretilip saflaştırılan lakkaz enzimini kullanarak çevre kirliliğine sebep olan Reaktif Siyah 5, Fuksin, Allura Kırmızısı ve Asit Kırmızısı 37 gibi bazı tekstil boyalarının giderilmesinde kullanılmıştır. 180 dak sonunda

enzimin Reaktif Siyah 5 boyar maddesini %66 oranında azalttığı belirlenmiştir. Enzim 180 dak 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 (Aslam *et al.* 2004; Si and Cui 2012).

Bu sonuçlar göz önüne alındığında *Brevibacillus sp. (Z1)*'den üretilen ve saflaştırılan lakkaz enzimi için;

1. *Brevibacillus sp. (Z1)* 'den üretilen ve saflaştırılan lakkaz enziminin optimum pH'sı 4.0 olduğu tespit edilmiştir.
2. Bu çalışmada saflaştırılan lakkaz enziminin optimum sıcaklığının, 55°C olduğu bulunmuştur.
3. Üretilip saflaştırılan lakkaz enziminin molekül ağırlığının 12.202, 93.756 ve 73.790 kDa ağırlığında, 3 alt birimden oluştuğu tespit edilmiştir.
4. Saf lakkaz enzimi için ABTS ve 2,6-dimetoksifenol substratları için Vmax değerleri sırasıyla 14.08 EU/mL.dak., 16.12 EU/mL.dak. olarak belirlenmiştir. Km değerleri ise ABTS, 2,6-dimetoksifenol substratları için sırasıyla 5.34 mM, 3.03 mM olarak hesaplanmıştır.
5. *Brevibacillus sp. (Z1)*'den ekstraselüler olarak üretilip saflaştırılan lakkaz enzimini kullanarak çevre kirliliğine sebep olan Reaktif Siyah 5, Fuksin, Allura Kırmızısı ve Asit Kırmızısı 37 gibi bazı tekstil boyalarının giderilmesinde kullanılabilirliği araştırılmıştır. Enzimin Reaktif Siyah 5, Fuksin, Allura Kırmızısı ve Asit Kırmızısı 37 boyalarının 3 saat sonunda %66.0, %50.8, %53.6 ve %47.3 oranında azalttığı belirlenmiştir.
6. Elde ettiğimiz verilere göre *Brevibacillus sp. (Z1)*'den elde edilen lakkaz enziminin endüstriyel kullanım için oldukça gelecek vaad ettiği düşünülmektedir.

## 5.2. Öneriler

Bu tezde, termofilik bir mikroorganizmadan izole edilen lakkaz enzimi (EC 1.1.3.2, p-difenol; dioksijen oksidoredüktaz) ve endüstriyel anlamda kullanılabilme potansiyeli ilk defa çalışılarak hem ülkemiz bilimine hem de dünya bilimine oldukça önemli bilgiler

kazandırılmıştır. Gıda endüstrisinden tekstil sanayiine kadar bir çok alanda kullanım alanı bulan lakkaz enziminin, boyar maddeler başta olmak üzere endüstriyel birçok atığın yok edilmesinde de etkin bir şekilde kullanılabileceği gösterilmiştir.

Günümüzde, karşılaşılan bir çok problemin çözümüne yönelik süreçlerin ancak biyoteknolojik yöntemlerle çözülebilecek olması, daha gelişmiş özelliklere sahip enzimlerin bulunmasına yönelik çalışmaların daha uzun yıllar devam edeceğini göstermektedir. Bu nedenle, endüstriyel uygulamalara çok daha çok uygun olan, daha düşük  $K_m$  değerine sahip, arzu edilen pH ve sıcaklıklarda aktif olan ve stabilitesini daha uzun süre koruyan, etki ettiği substrat çeşitleri daha fazla olan yeni lakkaz enzimi üreticisi mikroorganizmaların aranmasına devam edilmesi gerekmektedir.

Ayrıca, üreticisi tarafından düşük seviyede üretilen lakkaz enzimlerinin ticari uygulamalarının en önemli engeli yeterli enzim stoğunun bulunmaması ve redoks mediatörlerinin yüksek maliyetidir. Bu nedenle, lakkaz enziminin endüstriyel uygulamalarda kullanılabilirliğini geliştirmek için maliyetinin daha düşük olması gerekir. Bu nedenle hem lakkaz üretimi hem de immobilizasyon teknikleri üzerine daha fazla çalışma yapılması gerekir. Diğer yandan lakkazın tutuklanması için etkili bir sistem geliştirilmesi de önemli bir konudur. Yapılan çalışmaların genel amacı, kararlı, uzun ömürlü ve düşük maliyetli katalizörler elde etmektir. Enzimin uygun bir substrata tutundurulması ve lakkaz aktivitesinin ömrünü uzatacak yeni tekniklerin geliştirilmesi ile istenen özelliklere sahip lakkaz elde edilebilecektir. Dolayısıyla, *Brevibacillus sp.*'den elde edilen enzimin farklı immobilizasyon yöntemleri ile daha çok daha fazla enzim elde edilmesi imkanı araştırılmalıdır.

İmmobilizasyon uygulamalarıyla birlikte, ucuz ve fazla miktarda lakkaz üretimi için; bu enzimin sahip olduğu nükleotit dizisinin belirlenmesi, nükleotit dizisi belirlenen genin uygun bir ekspresyon vektörü aracılığı ile diğer organizmalarda da ifade edilmesi araştırmanın sonraki aşamalarında mutlaka gerçekleştirilmelidir.

Rekombinant DNA teknolojisindeki gelişmeler dikkate alındığında, bu teknolojinin sunduğu imkanlardan faydalanarak, enzimin protein mühendisliği ile değişikliğe uğratılması ve daha sağlam ve aktif enzimler elde etmeye yönelik çalışmaların yapılması şarttır.

**KAYNAKLAR**

- Acar, S., 2009. Hasanabdal köyü termal tesislerinden alınan su örneklerinden izole edilen termofilik bakterilerin moleküler karakterizasyonu. Yüksek Lisan Tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi.
- Adıgüzel, A., 2006. Bazı termal tesislerden alınan su örneklerinden izole edilen termofilik bakterilerin moleküler karakterizasyonu. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi.
- Adıgüzel, A., Ozkan, H., Baris, O., Inan, K., Gulluce, M. and Sahin, F., 2009. Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey. *J Microbiol Methods*, 79(3): 321-328.
- Aguilar, A., 1996. Extremophile research in the european union: from fundamental aspects to industrial expectations. *F.E.M.S. Microbiol. Rev*, 18: 89-92.
- Alcalde, M., Ferrer, M., Plou, F.J. and Ballesteros A., 2006. Environmental biocatalysis: From remediation with enzymes to novel green processes. *Trends Biotechnol*, 24(6): 281-287.
- Alexandre, G. and Zhulin, I.B., 2000. Laccases are widespread in bacteria. *Trends Biotechnol*, 18: 41-42.
- Allan, R.N., Lebbe, L., Heyrman, J., De vos, P., Buchanan, C.J. and Logan, A., 2005. *Brevibacillus levickii* sp. nov. and *Aneurinibacillus terranovensensis* sp. nov., two novel thermoacidophiles isolated from geothermal soils of northern Victoria Land, Antarctica. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 55: 1039 -1050.
- Anke, T., 1997. Fungal biotechnology. Chapman & Hall, Weinheim, pp.213, 214, 216-219, 221, 222.
- Annibale, D., Stazi, A., Vinciguerra, S.R., Mattia, V.D., 1999. Characterization of immobilized laccase from *Lentinus edodes* and its use in olive-mill wastewater treatment. *Process Biochem*, 34: 697-706.
- Anonymous, 2013. ([http://www.rsc.org/Publishing/ChemTech/Volume/2007/06/hot-iring\\_enzymes.asp](http://www.rsc.org/Publishing/ChemTech/Volume/2007/06/hot-iring_enzymes.asp))
- Apohan, E., 2007. Vinas ve zeytinyağı fabrikası atık suyunun değerlendirilmesi ve biyolojik iyileştirilmesinde beyaz çürükçül fungus peletlerinin kullanımı, Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İnönü Üniversitesi.
- Archibald, F.S., Bourbonnais, R., Jurasek, L., Paice, M.G. and Reid, I.D., 1997. Kraft pulp bleaching and delignification by *Trametes versicolor*. *J. Biotechnol*, 53: 215-236.
- Arda, M., 2012. Temel Mikrobiyoloji. Veterinerlik Fakültesi, Ankara, <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?>, (10.06.2012).
- Arda, M., 2000. Temel mikrobiyoloji. Medisan Yayın Serisi, 46: 548.
- Arias, M.E., Arenas, M., Rodríguez, J., Soliveri, J., Ball, A.S. and Hernández, M., 2003. Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Appl. Environ. Microbiol*, 69:1953-1958.
- Aslam, M.M., Baig, I.M.A., Hassan, I.H., Qazi, I.A., Malik, M. and Saeedl, H., 2004. Textile wastewater characterization and reduction of its COD&BOD by oxidation. *EJEAFChe*, 3(6): 804-811.

- Bains, J., Capalash, N. and Sharma, P., 2003. Laccase from a nonmelanogenic, alkalotolerant  $\alpha$ -proteobacterium JB isolated from industrial waste water drained soil. *Biotechnol. Lett.*, 25:1155–1159.
- Bal, T., 2012. Aşkale (Erzurum) manyezit ocaklarından cevher zenginleştirme potansiyeli bulunan bakterilerin izolasyonu ve moleküler karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi.
- Beg, Q.K., Kapoor, M., Mahajan, L. and Hoondal, G.S., 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56: 326-338.
- Bertrand, T., Jolival, C., Briozzo, P., Caminade, E., Joly, N., Madzak, C. and Mougín, C., 2002. Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: insights into substrate recognition and correlation with kinetics. *Biochemistry*, 41: 7325–7333.
- Bhat, M., 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology, *Biotechnol. Adv.*, 18: 355–383.
- Birhanlı, E., 2003. Mikroorganizmaların Lakkaz Üretimine Çeşitli Faktörlerin Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İnönü Üniversitesi.
- Birhanlı, E. and Yesilada, O., 2006. Increased production of laccase by pellets of *Funalia trogii* ATCC 200800 and *Trametes versicolor* 200801 in repeated-batch mode. *Enzyme Microbial Technol.*, 39: 1286–1293.
- Birhanlı, E., 2008. Tekrarlı kesikli işleme lakkaz üretimi. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İnönü Üniversitesi.
- Bligny, R. and Douce, R., 1983. Excretion of laccase by sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) cells. purification and properties of the enzyme. *J. Biochem.*, 204: 489–496.
- Bourbonnais, R. and Paice, M., 1990. Oxidation of non-phenolic substrates, an expanded role for laccase in lignin biodegradation, *F.E.B.S. Lett.*, 267: 99–102.
- Burg, B.V.D., 2003. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, 6: 213-218.
- Call, H. and Mucke, L., 1997. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (lignozym process). *J. Biotechnol.*, 53: 163-202.
- Campos, R., Kandelbauer, A., Robra, K.H., Cavaco-Paulo, A. and Gübitz G.M., 2001. Indigo degradation with purified laccases from *Trametes hirsuta* and *Sclerotium rolfsii*. *J. Biotech.*, 89: 131–139.
- Cha, J. and Cooksey, D.A., 1991. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* by periplasmic and outer membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88: 8915-8919.
- Cheong, S., Yeo, S., Song, H.G. and Choi, H.T., 2006. Determination of laccase gene expression during degradation of 2,4,6-trinitrotoluene and its catabolic intermediates in *Trametes versicolor*. *Microbiol. Res.*, 161: 316–320.
- Cing, S., Asma, D., Apohan, E. and Yesilada, O., 2003. Decolorization of textile dyeing wastewater by *Phanerochaete chrysosporium*. *Folia Microbiol.* 48(5): 639–642.
- Claus, D., Berkeley, R.C.W., 1986. Genus *Bacillus* Cohn 1872: 1105–1140.
- Claus, H. and Filip, Z., 1998. Degradation and transformation of aquatic humic substances by laccase-producing fungi *Cladosporium cladosporioides* and *Polyporus versicolor*. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, 26: 180–185.

- Claus, H., Faber, G. and König, H., 2002. Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 59: 672–678.
- Claus, H., 2003. Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Arch. Microbiol*, 179: 145–150.
- Colacino, F. and Crichton, R.R., 1997. Enzyme thermostabilization: the state of the art. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev*, 14: 211-277.
- Corral, L.O., Irma, P.P.C., Juan Ricardo, B.R. and Francisco V.O., 2006. Laccases. *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*, 323-340.
- Couto, R.S., Sanromán, M.A., Hofer, D. and Gübitz, G.M., 2004. Stainless steel sponge: a novel carrier for the immobilisation of the white-rot fungus *Trametes hirsuta* for decolourisation of textile dyes. *Bioresour Technol*, 95: 67–72.
- Couto, S.R. and Herrera, J.L.T., 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotech. Adv*, 24: 500–513.
- Couto, S.R., 2007. Short communication Decolouration of industrial azo dyes by crude laccase from *Trametes hirsuta*. *J. Hazard. Mater*, 148: 768–770.
- Çanakçı, S., 2003. Gönen, Kestanbol ve Diyadin kaplıcalarından termofilik bakteriler izolasyonu, moleküler yöntemlerle karakterizasyonu ve tanımlanması. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Karadeniz Teknik Üniversitesi.
- Daniel, R.M. and Cowan, D.A.C., 2000. Biomolecular stability and life at high temperatures. *Cell. Mol. Life Sci*, 57: 250-254.
- Das, R. and Gerstein, M., 2000. The stability of thermophilic proteins: a study based on comprehensive genome comparison. *Funct. Integr. Genomics*, 1: 76-88.
- Dawkar, V.V., Jadhav, U.U., Telke, A.A. and Govindwar, S.P., 2009. Peroxidase from *Bacillus* sp. VUS and its role in the decolorization of textile dyes. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14: 361-368.
- Deckert, G., Warren, P.V., Gaasterland, T., Young, W.G., Lenox, A.L., Graham, D.E., Overbeek, R., Snead, M.A., Keller, M., Aujay, M., Huber, R., Feldman, R.A., Short, J.M., Olson, G.J. and Swanson, R.V., 1998. The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Nature*, 393: 353-358.
- Demain, A.L. and Solomon, N.A., 1981. In industrial microbiology and the advent of genetic engineering. *Scientific American*, Freeman and Comp. San Francisco, pp. 3-14.
- Demir, N., Nadaroglu, H., Tasgin, E., Adiguzel, A. and Gulluce, M., (In press). Purification and characterization of a pectin lyase produced by *Geobacillus stearothermophilus* Ah22 and its application in fruit juice production. *Annals of Microbiology*, (DOI: 10.1007/s13213-011-0217-6).
- Dhawan, S., Lal, R., Hanspal, M. and Kuhad, R.C., 2005. Effect of antibiotics on growth and laccase production from *Cyathus bulleri* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *Bioresour. Technol*, 96: 1415-1418.
- Diamantidis, G., Effosse, A., Potier, P. and Bally, R., 2000. Purification and characterization of the first bacterial laccase in the rhizospheric bacterium *Azospirillum lipoferum*. *Soil Biol. Biochem*, 32: 919–927.
- Dubé, E., Shareck, F., Hurtubise, Y., Daneault, C. and 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.



- Ducros, V., Brzozowski, A.M., Wilson, K.S., Brown, S.H., Østergaard, P., Schneider, D.S., Pedersen, A.H. and Davies, G.J., 1998. Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.*, 5: 310–316.
- Ducros, V., Brzozowski, A.M., Wilson, K.S., Østergaard, P., Schneider, D.S., Svendsen, A. and Davies, G.J., 2001. Structure of the laccase from *Coprinus cinereus* at 1.68 Å resolution: evidence for different type 2 Cu-depleted isoforms. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 57: 333–336.
- Duguet, M., 1995. *Nucleic acids and molecular biology*. Springer Verlag., Berlin, Germany, 84.
- Durán, N. and 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.
- Dülger, S., 1997. Ayder kaplıcasından termofilik bakteri izolasyonu ve teşhisi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Karadeniz Teknik Üniversitesi.
- Endo, K., Hosono, K., Beppu, T. and Ueda, K., 2002. A novel extracytoplasmic phenol oxidase of *Streptomyces*: its possible involvement in the onset of morphogenesis. *Microbiology*, 148: 1767–1776.
- Enguita, F.J., Martins, L.O., Henrique, A.O. and 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.
- Erlich, H., Gelfand, D. and Saiki, R., 1988. Specific DNA amplification product review. *Nature*, 33: 461–462.
- Fang, X.W., Golden, B.L., Littrell, K., Shelton, V., Thiyagarajan, P., Pan, T. and Sosnick, T.R., 2001. The thermodynamic origin of the stability of a thermophilic ribozyme. *P.N.A.S.*, 8: 4355–4360.
- Farrab, W.E. and Reboli, A.C., 2006. The Genus *Bacillus*—Medical. Dworkin, M.(Editor-in-Chief), *The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria*. Third Edition. Springer Science, 609–630.
- Faure, D., Bouillant, M.-L. and Bally, R., 1995. Comparative study of substrates and inhibitors of *Azospirillum lipoferum* and *Pyricularia oryzae* laccases. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 1144–1146.
- Ferraroni, M., Duchi, I., Myasoedova, N.M., Leontievsky, A.A., Golovleva, L.A., Scozzafava, A. and Briganti, F., 2005. Crystallization and preliminary structure analysis of the blue laccase from the ligninolytic fungus *Panus tigrinus*. *Acta Cryst.*, 61: 205–207.
- Ferraroni, M., Myasoedova, N.M., Schmatchenko, V., Leontievsky, A.A., Golovleva, L.A., Scozzafava, A. and Briganti F., 2007. Crystal structure of a blue laccase from *Lentinus tigrinus*: evidences for intermediates in the molecular oxygen reductive splitting by multicopper oxidases. *B.M.C. Structural Biology*, 7(60) doi: 10.1186/1472-6807-7-60.
- Filip, Z. and Claus, H., 1995. Effects of soil minerals on the microbial formation of enzymes and their possible use in remediation of chemically polluted sites. C.R.C. Press, Boca Raton, 407–419.
- Fitz-Gibbon, S.T., Ladner, H., Kim, U.J., Stetter, K.O., Simon, M.I. and Miller, J.H., 2002. Genome sequence of the hyperthermophilic crenarchaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99: 984–989.

- Froehner, S.C. and Eriksson, K.E., 1974. Purification and properties of *Neurospora crassa* laccase. *J. Bacteriol*, 120: 458–465.
- Galhaup, C., Goller, S., Peterbauer, C.K., Strauss, J. and Haltrich, D., 2002. Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiology*, 148: 2159–2169.
- Gedikli, S., Aytar, P., Çabuk, A., Ünal, A. and Kolonkaya N., 2010. Lakkaz enzimi ile Kotboyar maddelerinin dekolorizasyonu. *Anadolu üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 1: 59-70.
- Gey, M. and Unger, K., 1995. Calculation of the molecular masses of two newly synthesized thermostable enzymes isolated from thermophilic microorganisms. *J. Chromatogr*, 166: 188–193.
- Givaudan, A., Effosse, A., Faure, D., Potier, P., Bouillant, M.L. and Bally, R., 1993. Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere: evidence for laccase activity in nonmotile strains of *Azospirillum lipoferum*. *F.E.M.S. Microbiol. Lett*, 108: 205–210.
- Gnanamani, A., Jayaprakashvel, M., Arulmani, M. and Sadulla, S., 2006. Effect of inducers and culturing processes on laccase synthesis in *Phanerochaete chrysosporium* NCIM 1197 and the constitutive expression of laccase isozymes. *Enzyme Microbial Technol*, 38: 1017–1021.
- Gochev, V.K. and Krastanov, A.I., 2006. Fungal Laccases. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 13: 75-83.
- Gray, H.B., Malmstrom, B.G. and Williams, R.J., 2000. Copper coordination in blue proteins. *J. Biol. Inorg. Chem*, 5: 551–559.
- Guerra, R., 2001. Ecotoxicological and chemical evaluation of phenolic compounds in industrial effluents. *Chemosphere*, 44:1737-1747.
- Hakulinen, N., Kiiskinen, L., Kruus, K., Saloheimo, M., Paananen, A., Koivula, A. and Rouvinen, J., 2002. Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear site. *Nat. Struct. Biol*, 9: 601–605.
- Han, M.J., Choi, H.T. and Song, H.G., 2005. Purification and characterization of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor*, *The Journal of Microbiology*, 555–560.
- Harley, J.P. and Prescott, L.M., 2002. *Laboratory exercises in microbiology*. Fifth Edition New York: The McGraw–Hill Companies, 466p.
- Horikoshi, K., 2011. *Extremophiles Handbook*, doi:10.1007/978-4-431-53898-1\_1.1, Springer.
- Hullo, M.F., Moszer, I., Danchin, A. and Martin-Verstraete, I., 2001. CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase. *J. Bacteriol*, 183: 5426-5430.
- Inan, K., Canakci, S., Belduz, A.O. and Sahin, F., 2012. *Brevibacillus aydinogluensis* sp. nov., a moderately thermophilic bacterium isolated from Karakoc hot spring. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 62: 849–855.
- Isono, Y. and Hoshino, M., 1989. Laccase-like activity of nucleoside oxidase in the presence of nucleosides. *Agric. Biol. Chem*, 53: 2197–2203.
- Jaenicke, R. and Bohm, G., 1998. The stability of proteins in extreme environments. *Curr. Opin. Struct. Biol*, 8: 738-748.
- Kaçagan, M., 2008. *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26 sarı suşundan arabinofuranosidaz geninin klonlanması, ekspresyonu ve enzimin

- karakterizasyonu. Y. Lisans tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Karadeniz Teknik Üniversitesi.
- Keha, E. E., Küfrevioğlu Ö. İ., 2009. Biyokimya Kitabı. Aktif Yayınevi. 89-115.
- Keeton, W. T., James, L. And Gould, C. G., 2003. Keeton/Gould Genel Biyoloji. Palme Yayıncılık.
- Kıran, Ö., Çömlekçioğlu, U. and Dostbil, N., 2006. Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları. Fen ve Mühendislik Dergisi, 9(1):
- Kiiskinen, L., Viikari, L. and Kruus, K. 2002. Purification and characterisation of a novel laccase from the ascomycete *Melsnocarpus albomyces*. Appl. Microbial. Biotechnology. 59: 198-204.
- Kim, M.K., Sathiyaraj, S., Pulla, R.K. and Yang, D.C., 2009. *Brevibacillus panacihumi* sp. nov., a-glucosidase-producing bacterium. Int. J. Syst. Evol. Microbiol, 59: 1227–1231.
- Kirk, O., Borchert, T.V. and Fuglsang, C.C., 2002. Industrial enzyme applications. Curr. Opin. Biotechnol, 13: 345–351.
- Kohilu, U., Nigam, P., Singh, D. and Chaudhary, K., 2001. Thermostable, alkaliphilic and cellulase free xylanases production by *thermoactinomyces thalophilus* subgroup C., Enzyme Microb. Technol, 28: 606–610.
- Kramer, K.J., Kanost, M.R., Hopkins, T.L., Jing, H., Zhu, Y.C., Xu, R., Kerwin, J.L. and Turecek, F., 2001. Oxidative conjugation of catechols with proteins in insect skeletal systems. Tetrahedron, 57: 385–392.
- Kumar, H.D. and Swati, S., 2001. Modern Concepts of Microbiology. Second Revised, Vikas Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi.
- Kumar, S.V.S., Phale, P.S., Durani, S. and Wangikar, P.P., 2003. Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. Biotechnol. Bioeng, 83: 386–394.
- Kunamneni, A., Ghazi, I., Camarero, S., Ballesteros, A., Plou, F.J. and Alcalde, M., 2008. Decolorization of synthetic dyes by laccase immobilized on epoxy-activated carriers. Process Biochem, 43: 169–178.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the heat of bacteriophage, T4. Nature, 227: 680-685.
- Larsson, S., Cassland, P. and Jonsson L.J., 2001. Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase. Appl. Environ. Microbiol, 67: 1163–1170.
- Larsson, S., Cassland, P. and Jonsson L.J., 2001. Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase. Appl. Environ. Microbiol, 67: 1163–1170.
- Lee, Y., Hendson, M., Panopoulos, N.J. and Schroth, M.N., 1994. Molecular cloning, chromosomal mapping, and sequence analysis of copper resistance genes from *Xanthomonas campestris* pv. juglandis: homology with small copper proteins and multicopper oxidases. J. Bacteriol, 176: 173–188.
- Lee, I.Y., Jung, K.H., Lee, C.H. and Park, Y.H., 1999. Enhanced production of laccase in *Trametes versicolor* by the addition of ethanol, Biotech. Lett, 21: 965–968.
- Lehman, E., Harel, E. and Mayer, A.M., 1974. Copper content and other characteristics of purified peach laccase. Phytochemistry, 13: 1713–1717.

- Leonowicz, A., Trojanowski, J. and Barbara, O., 1979. Basidiomycetes: apparent activity of the inducible and constitutive forms of laccase with phenolic substrates. *Acta Biochim. Pol.*, 25: 369–378.
- Leonowicz, A., Szklarz, G. and Wojtas-Wasilewska, M., 1985. The effect of fungal laccase on fractionated lignosylphonates (Peritan Na). *Phytochemistry*, 24: 393–396.
- Leonowicz, A., Cho, N.S., Luterek, J., Wilkolazka, A., Wojtas-Wasilewska, M., Matuzewska, A., Hofrichter, M. and Rogalski, W.D., 2001. Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J. Basic Microbiol.*, 41: 185–227.
- Li, D.Y., Eberspacher, J., Wagner, B., Kuntzer, J. and Lingings, F., 1991. Degradation of 2,4,6-trichlorophenol by *Azotobacter sp.* strain GP1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 1920–1928.
- Li, X., Wei, Z., Zhang, M., Peng, X., Yu, G., Teng, M. and Gong, W., 2007. Crystal structures of *E. coli* laccase CueO at different copper concentrations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354: 21–26.
- Lopez-Garcia, P., 1999. DNA supercoiling and temprature adaptation: a clue to early diversification of life. *J. Mol. Evol.*, 49: 439–452.
- Lorenzo, M., Moldes, D. and Sanromán, M.Á., 2006. Effect of heavy metals on the production of several laccase isoenzymes by *Trametes versicolor* and on their ability to decolourise dyes. *Chemosphere*, 63: 912–917.
- Lyashenko, A.V., Zhukhlistova, N.E., Gabdoulkhakov, A.G., Zhukova, Y.N., Voelter, W., Zaitsev, V.N., Bento, I., Stepanova, E.V., Kachalova, G.S., Koroleva, O.V., Cherkashyn, E.A., Tishkov, V.I., Lamzin, V.S., Schirwitz, K., Morgunova, E.Y., Betzel, C., Lindley, P.F. and Mikhailova, A.M., 2006. Purification, crystallization and preliminary X-ray study of the fungal laccase from *Cerrena maxima*. *Acta Cryst.*, 62: 954–957.
- Machczynski, M.C., Vijgenboom, E., Samyn, B. and Canters, G.W., 2004. Characterization of SLAC: A small laccase from *Streptomyces coelicolor* with unprecedented activity. *Protein Science*, 13: 1–10.
- Marco, A. and Roubelakis-Angelakis, K.A., 1997. Laccase activity could contribute to cell-wall reconstitution in regenerating protoplasts. *Phytochemistry*, 46: 421–425.
- Marguet, E. and Forterre, P., 1994. DNA stability at temprature typical for hyperthermophiles. *Nuc. Acid. Res.*, 22: 1681–1686.
- Martins, L.O., Soares, C.M., Pereira, M.M., Teixeira, M., Costa, T., Jones, G.H. and 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.
- Mayer, A.M. and Staples, R.C., 2002. Laccase: New functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, 60: 551–565.
- McMullan, G., Meehan, C., Conneely, A., Kirby, N., Robinson, T., Nigam, P., Banat, I.M., Marchant, R. and Smyth, W.F., 2001. Microbial decolourisation and degradation of textile dyes. *Appl. Microbiol. Biotech.*, 56: 81–87.
- Mechichi, T., Mhiri, N. and Sayadi, S., 2006. Remazol Brilliant Blue R decolourization by the laccase from *Trametes trogii*. *Chemosphere*, 64: 998–1005.

- Mellano, M.A. and Cooksey, D.A., 1988. Nucleotide sequence and organization of copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *J. Bacteriol*, 170: 2879–2883.
- Michniewicz, A., Ledakowicz, S., Ullrich, R. and Hofrichter M., 2007. Kinetics of the enzymatic decolorization of textile dyes by laccase from *Cerrena unicolor*. *Dyes Pigm*, 77: 295–302.
- Migula, W., 1900. System der bakterien, Gustav Fischer, Jena, Germany, vol 2.
- Minussi, R.C., Pastore, G.M. and Duran, N., 2002. Potential applications of laccase in the food industry. *Trends Food Sci. Technol*, 13: 205–216.
- Murray, R.G.E., Sneath, P.H.A., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. (ed). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. The Williams & Wilkins Co, vol 2.
- Mozhaev, V., 1993. Mechanism-based strategies for protein thermostabilization. *Trends Biotechnol*, 11: 88–95.
- Nannipieri, P. and Bollag, J.M., 1991. Use of enzymes to detoxify pesticide-contaminated soils and waters. *J Environ Qual*, 20: 510-517.
- Nyanhongo, G.S., Gomes, J., Gübitz, G.M., Zvuya, R., Read, J. and Steiner, W., 2002. Decolorization of textile dyes by laccases from newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Water Research*, 36: 1449-1456.
- Odaci, D., Timur, S., Pazarlioglu, N., Montereali, M.R., Vastarella, W., Pilloton, R. and Telefoncu, A., 2007. Determination of phenolic acids using *Trametes versicolor* laccase. *Talanta*, 71: 312–317.
- Oliveira, E.J., Rabinovitch, L., Monnerat, R.G., Jannotti Passos, L.K. and Zahner, V., 2004. Molecular characterization of *Brevibacillus laterosporus* and its potential use in biological control. *Appl. Environ. Microbiol*, 70: 6657–6664.
- Özkan, H., 2009. Erzurum çevresinde biyolojik bozulmaya neden olan heterotrofik bakterilerin izolasyonu, karakterizasyonu ve tanısı. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi.
- Papkovsky, D.B., Ghindilis, A.L. and Kurochkin, I.N., 1993. Flow-cell fiberoptic enzyme sensor for phenols. *Anal. Lett*, 26: 1505–1518.
- Poonam, N. and Dalel, S., 1995. Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enzyme Microb. Technol*, 17: 770–778.
- Rademaker, J.L.W. and de Bruijn, F.J., 1997. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. DNA markers: protocols, applications and overviews. In G. Caetano-Anolle's and P.M. Gresshoff (ed.), John Wiley and Sons, Inc, New York, N.Y., 151-171.
- Ranocha, P., McDougall, G., Hawkins, S., Sterjiades, R., Borderies, G., Stewart, D., Cabanes-Macheteau, M., Boudet, A.M. and Goffner, D., 1999. Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases-a divergent gene family in poplar. *Eur. J. Biochem*, 259: 485–495.
- Rao, M., Tankasale, A., Ghatge, M. and Desphande, V., 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases, *Microbiol. Mol. Biol. Rev*, 62: 597-634.
- Riva, S., 2006, Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology*, 24(5): 220-225.
- Roberts, S.A., Weichsel, A., Grass, G., Thakali, K., Hazzard, J.T., Tollin, G., Rensing, C. and Montfort, W.R., 2002. Crystal structure and electron transfer kinetics of

- CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*. Proc. Nat. Acad. Sci, 99: 2766–2771.
- Roberts, S.A., Wildner, G.F., Grass, G., Weichsel, A., Ambrus, A., Rensing, C. and Montfort, W.R., 2003. A labile regulatory copper ion lies near the T1 copper site in the multicopper oxidase CueO. J Biol Chem, 278: 31958–31963.
- Roy-Arcand, L. and Archibald, F.S., 1991. Direct dechlorination of chlorophenolic compounds by laccases from *Trametes (Coriolus) versicolor*. Enzyme Microb Technol, 13: 194-202.
- Roy, J.J. and Abraham, T.E., 2006. Preparation and characterization of cross-linked enzyme crystals of laccase. J. Mol. Catal. B: Enzymatic, 38: 31–36.
- Ruijsenaars, H.J. and Hartmans, S., 2004. A cloned *Bacillus halodurans* multicopper oxidase exhibiting alkaline laccase activity. Appl Microbiol Biotechnol, 65: 177-182.
- Querol, E., Perez-Pons, J.A. and Mozo-Villarians, A., 1996. Analysis of protein conformational characteristics related to thermostability. Protein Eng, 9: 265-271.
- Sanchez-Amat, A., Lucas-Elio, P., Fernandez, E., Garcia-Borron, J.C. and Solano, F., 2001. Molecular cloning and functional characterization of a unique multipotent polyphenol oxidase from *Marinomonas mediterranea*. Biochim. Biophys. Acta, 1547: 104–116.
- Sannia, G., Giardina, P., Luna, M., Rossi, M. and Buonocore, V., 1986. Laccase from *Pleurotus ostreatus*. Biotechnol. Lett, 8: 797–800.
- Saygılı, H., Sahin, F. and Aysan Y., 2006. Fitobakteriyoloji, Meta Basım Matbaacılık, İzmir, Türkiye, pp 550.
- Scandurra, R., Consalvi, V., Chiaraluce, R., Politi, L. and Engel, P.C., 1998. Protein thermostability in extremophiles. Biochimie, 80: 933-941.
- Schneider, P., Caspersen, M.B., Mondorf, K., Halkier, T., Skov, L.K., Østergaard, P.R., Brown, K.M., Brown, S.H. and Xu, F., 1999. Characterization of a Coprinus cinereus laccase. Enzyme Microbial. Technol, 25: 502–508.
- Sharma, P., Goel, R. and Capalash, N., 2007. Bacterial laccases. World J. Microbiol Biotechnol, 23: 823-832.
- Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K., Nakamura, L.K. and Komagata, K., 1995. Proposal of *Bacillus reusten* sp. nov. *Bacillus formosus* sp. nov., nom. rev. and *Bacillus horstelensis* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol, 45: 93–100.
- Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K., and Komagata, K., 1996. Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. Int. J. Syst. Bacteriol, 46: 939-946.
- Simkus, R.A. and Laurinavicius, V., Laccase containing sol-gel as a signal enhancer in optical bioassay of aromatic amines. Biologica, 1(2): 44-46.
- Souza, D.T.D., Tiwari, R., Sah, A.K. and Raghukumar, C., 2006. Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes. Enzyme Microbial Technol, 38: 504–511.
- Suzuki, T., Endo, K., Ito, M., Tsujibo, H., Miyamoto, K. and Inamori Y., 2003. A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: purification, characterization, nucleotide sequence, and expression. Biosci Biotechnol Biochem, 67: 2167-2175.

- Temiz, A., 2000. Genel mikrobiyoloji uygulama teknikleri. Hatipoğlu Yayınevi, Ankara.
- Thompson, M.J and Eisenberg, D., 1999. Transproteomic evidence of a loop-deletion mechanism for enhancing protein thermostability. *J. Mol. Biol*, 290: 595-604.
- Thurston, C.F., 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiol.* 140: 19-26.
- Tolner, B., Poolman, B. and Konings, W.N., 1997. Adaptation of microorganisms and their transport systems to high temperatures, *Comp. Biochem. Physiol*, 118: 423-428.
- Ünal, A., 2004. Lakkaz enzimi ile bazı toksik klorofenolik bileşiklerin detoksifikasyonu. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora tezi, 104.
- Xu, F., 1997. Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. *J. Biol. Chem*, 272: 924–928.
- Whitaker, J.R., 1963. Determination of Molecular Weight of Proteins by Gel Filtration on Sephadex. *Anal, Chem*, 35: 1950-1953.
- Whiteley, C.G. and Lee, D.J., 2006. Enzyme technology and biological remediation (Review). *Enzyme Microbial Technol*, 38: 291–316.
- Van der Maarel, M., Van der Veen, B., Uitdehaag, H., Leemhuis, H. and Dijkhuizen, L., 2002. Properties and applications of starchconverting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family, *J. Biotechnol*, 94: 137–155.
- VanEtten, H., Matthews, D. and Matthews, P., 1989. Phytoalexin detoxification: importance for pathogenicity and practical implications. *Annu. Rev. Phytopathol*, 27: 143–164.
- Vieille, C., Burdette, D.S. and Zeikus, J.G., 1996. Thermozyms. *Biotechnol. Ann. Rev*, 2: 1-83.
- Vikari, L., Kantelinen, A., Sundquist, J. and Linko, M., 1994. Xylanases in bleaching: from an idea to the industry. *F.E.M.S. Microbiol. Rev*, 13: 335–350.
- Voget, S., Steele, H.L. and Streit, W.R., 2006. Characterization of metagenome-derived halotolerant cellulase. *J Biotechnol*, 126: 26-36.
- Vogt, G. and Argos, P., 1997. Protein thermal stability: hydrogen bonds or internal packing. *Folding design*, 2: 40-46.
- Zhang, M., Wu, F., Wei, Z., Xiao, Y. and Gong, W., 2006. Characterization and decolorization ability of a laccase from *Panus rudis*, *Enzyme Microbial Technol*, 39: 92–97.
- Zhang, Z., Cissoko, N., Wo, J. and Xu, X., 2008. Factors influencing the dechlorination of 2,4-dichlorophenol by Ni-Fe nanoparticles in the presence of humic acid. *Journal of Hazardous Materials*, 165: 78-86.
- [http://www.rsc.org/Publishing/ChemTech/Volume/2007/06/hot-wiring\\_enzymes.asp](http://www.rsc.org/Publishing/ChemTech/Volume/2007/06/hot-wiring_enzymes.asp). (10.12.2009).

## **ÖZGEÇMİŞ**

1987 yılında Erzurum'da doğdu. İlk, orta, lise ve lisans öğrenimini Erzurum'da tamamladı. 2006 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Kimya Bölümü'nden 2010 yılında mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı.