



T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
Fen Bilimleri Enstitüsü



**ATIKSULARDAKİ BOYALARIN  
BİYOREMEDİASYONUNDA DENİZ ORİJİNLİ  
FUNGUS *PHOMA* SP. K21'İN KULLANIM  
POTANSİYELİNİN *IN VITRO* VE *IN SILICO*  
OLARAK ARAŞTIRILMASI**

**Yüksek Lisans Tezi**

Selin HAKGÖNÜL

Biyoloji Anabilim Dalı

İzmir  
2025



T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
Fen Bilimleri Enstitüsü

**ATIKSULARDAKİ BOYALARIN  
BİYOREMEDİASYONUNDA DENİZ ORJİNLI  
FUNGUS *PHOMA* SP. K21'İN KULLANIM  
POTANSİYELİNİN *IN VITRO* VE *IN SILICO*  
OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Selin HAKGÖNÜL

Danışman: Doç. Dr. Ali KOÇYİĞİT

Biyoloji Anabilim Dalı  
Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı



**Selin HAKGÖNÜL** tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “**Atıksulardaki Boyaların Biyoremediasyonunda Deniz Orijinli Fungus *Phoma* sp. K21’in Kullanım Potansiyelinin *In vitro* ve *In silico* Olarak Araştırılması**” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 03.02.2025 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

**Jüri Üyeleri:**

**İmza**

**Jüri Başkanı**

**: Doç. Dr. Ali KOÇYİĞİT**

.....

**Raportör Üye**

**: Prof. Dr. H. Tansel YALÇIN**

.....

**Üye**

**: Dr. Öğr. Üyesi Burçin KARABEY**

.....



# EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

## ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi / Doktora Tezi olarak sunduğum “**Atıksulardaki Boyaların Biyoremediasyonunda Deniz Orijinli Fungus *Phoma* sp. K21’in Kullanım Potansiyelinin *In vitro* ve *In silico* Olarak Araştırılması**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

03 / 02 / 2025

İmzası

Selin HAKGÖNÜL



**ÖZET****ATIKSULARDAKİ BOYALARIN BİYOREMEDİASYONUNDA  
DENİZ ORİJİNLİ FUNGUS *PHOMA* SP. K21'İN KULLANIM  
POTANSİYELİNİN *IN VITRO* VE *IN SILICO* OLARAK  
ARAŞTIRILMASI**

Hakgönül, Selin

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ali KOÇYİĞİT

Şubat 2025, 122 sayfa

Bu tez çalışmasında deniz orijinli fungus *Phoma* sp. K21 izolatının lakkaz enziminin atık sulardaki boyaların biyoremediasyonundaki kullanım potansiyeli, *in vitro* ve *in silico* entegre yaklaşım ile araştırılmıştır. İlk olarak farklı kimyasal yapılardaki endüstriyel boyalar ile *Phoma* sp. lakkazının moleküler kenetleme çalışması gerçekleştirilmiştir. *Phoma* sp.'nin lakkaz enzimi; remazol brilliant blue R (RBBR) boyası ile -7.0 kcal/mol ile kenetlenirken; metilen mavisi boyası ile -6.1 kcal/mol; kristal viyole ile -5.9 kcal/mol ve metil kırmızısı boyası ile -5.4 kcal/mol bağlanma enerjisiyle kenetlenmiştir. *In silico* sonuçları doğrulama amacıyla gerçekleştirilen *in vitro* deneyler; kalitatif tarama, kantitatif lakkaz aktivitesi ölçümü, dekolorizasyon çalışması ve fitotoksisite testini kapsamaktadır. Kalitatif taramalar, Malt Ekstrakt Pepton Agar ve Glukoz-Maya Ekstrakt Agar besiyerlerinde, tannik asit ve siringaldizin olmak üzere iki farklı lakkaz indikatörü ile yapılmıştır. Lakkaz aktivitesi ölçümlerinde ise en yüksek aktiviteye ulaşabilmek adına çeşitli lakkaz indükleyici sıvı besiyerleri, farklı lakkaz substratları (ABTS ve guaiacol), farklı pH (3-5) aralığına sahip farklı tamponlar (Glisin-HCl, Sitrato-Fosfat, Sodyum-Asetat) kullanılmıştır. Kantitatif tarama sonucunda en yüksek lakkaz aktivitesi, deniz suyu içeren Malt Ekstrakt Pepton sıvı besiyerinde, lakkaz substratı ABTS (5mM) ve pH 3 Glisin-HCl tamponu denemesi ile elde edilmiştir. Bu ortamda 6.günde en yüksek lakkaz aktivitesi 50 U/L olarak belirlenmiştir.

İzolatin çeşitli boyalar üzerindeki 120 saat sonundaki renk giderim değerleri; remazol brilliant blue R (RBBR) için % 64, metilen mavisi için % 60, kristal viyole için % 34 ve metil kırmızısı için % 16 olarak saptanmıştır. *In silico* sonuçlar; *in vitro* sonuçlarla uyum göstermiştir. Daha sonrasında *Phoma* sp. K21'in boya giderimi ürünlerinin, Maş fasulyesi (*Phaseolus aureus*) tohumları üzerindeki biyotoksitesini değerlendirmek için fitotoksitesite testi gerçekleştirilmiştir. Sterilizasyondan sonra 27°C'de 3 gün karanlıkta inkübasyona bırakılan tohumlar, günde 2 mL çeşme suyu ile seyreltilmiş (%10) degradasyon ürünleri ile sulanmıştır. Kontrol grubu ise aynı koşullarda sadece çeşme suyu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 3 gün sonunda ölçülen kök ve embriyonik gövde boyları kontrol grubunda ortalama 8,5 cm; metilen mavisi grubunda ortalama 7,1 cm; RBBR grubunda ortalama 6,7 cm; kristal viyole grubunda ortalama 5,7 cm ve metil kırmızısı grubunda ortalama 5,6 cm olarak belirlenmiştir. Fitotoksitesite deneyinin sonucunda *Phoma* sp. K21'in boya giderimi ürünlerinin, Maş fasulyesi (*Phaseolus aureus*) tohumlarının büyümesi üzerinde herhangi bir inhibasyona sebep olmadığı saptanmıştır.

*In silico* ortamda, atık sulardaki boyalar ile fungal enzimler arasındaki etkileşimi deneysel laboratuvar sonuçlarıyla ilişkilendirerek biyoinformatiğin etkili bir şekilde kullanılmasını destekleyecek ve renk giderme deneylerinin birincil taramasının zamanını ve maliyetini azaltacak daha fazla çalışma yapılması beklenmektedir.

**Anahtar sözcükler:** Biyoremediasyon, deniz orijinli fungus, lakkaz, dekolorizasyon, moleküler kenetleme

**ABSTRACT*****IN VITRO* AND *IN SILICO* INVESTIGATION OF THE USE  
POTENTIAL OF MARINE-DERIVED FUNGUS *PHOMA* SP. K21 IN  
BIOREMEDIATION OF DYES IN WASTEWATERS**

Hakgönül, Selin

MSc in Biology Department

Supervisor: Assoc. Prof. Ali KOÇYİĞİT

February 2025, 122 pages

In this thesis, the potential use of laccase enzyme of marine-derived fungus *Phoma* sp. K21 isolate for bioremediation of dyes in wastewater was investigated by *in vitro* and *in silico* integrated approach. Firstly, molecular docking study of *Phoma* sp. laccase with industrial dyes of different chemical structures was carried out. The laccase enzyme of *Phoma* sp. was docked with remazole brilliant blue R (RBBR) dye with -7.0 kcal/mol, with methylene blue dye with -6.1 kcal/mol, with crystal violet with -5.9 kcal/mol and with methyl red dye with -5.4 kcal/mol binding energy. *In vitro* experiments performed to confirm *in silico* results included qualitative screening, quantitative measurement of laccase activity, decolorization study and phytotoxicity test. Qualitative screening was performed on Malt Extract Peptone Agar and Glucose Yeast Extract Agar media with two different laccase indicators, tannic acid and syringaldysine. In laccase activity measurements, various laccase-inducing liquid media, different laccase substrates (ABTS and guaiacol), different buffers with different pH (3-5) ranges (Glycine-HCl, Citrate-Phosphate, Sodium-Acetate) were used in order to reach the highest activity. As a result of quantitative screening, the highest laccase activity was obtained in Malt Extract Peptone liquid medium containing seawater, laccase substrate ABTS (5 mM) and pH 3 Glycine-HCl buffer. In this medium, the highest laccase activity was determined as 50 U/L on the 6th day. Color removal values of the isolate on various dyes after 120 hours were 64% for remazol brilliant blue R (RBBR), 60% for

methylene blue, 34% for crystal violet and 16% for methyl red. *In silico* results were consistent with *in vitro* results. Phytotoxicity test was then carried out to evaluate the biotoxicity of the dye removal products of *Phoma* sp. K21 on mung bean (*Phaseolus aureus*) seeds. After sterilisation, the seeds were incubated at 27°C for 3 days in the dark and watered daily with degradation products diluted with 2 mL tap water (10%). The control group was carried out under the same conditions using only tap water. At the end of 3 days, the average root and embryonic stem lengths were 8.5 cm in the control group, 7.1 cm in the methylene blue group, 6.7 cm in the RBBR group, 5.7 cm in the crystal violet group and 5.6 cm in the methyl red group. As a result of the phytotoxicity experiment, it was determined that the dye removal products of *Phoma* sp. K21 did not cause any inhibition on the growth of mung bean (*Phaseolus aureus*) seeds.

Further studies are expected to be conducted *in silico* to support the effective use of bioinformatics to correlate the interaction between dyes and fungal enzymes in wastewater with experimental laboratory results and reduce the time and cost of primary screening of decolorization experiments.

**Keywords:** Bioremediation, marine-derived fungi, laccase, decolorization, molecular docking.

## ÖNSÖZ

Yüksek lisansa başladığım yıl, lisanstan yeni mezun olmuşum. İçimde büyük bir heyecan ve istek vardı. Lisans eğitiminde çok şey öğrendiğim, çok güzel zamanlar geçirdiğim Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji ailesiyle yoluma devam etmek istedim. Yüksek lisans derslerim devam ederken tez konum hakkında araştırmalar ve görüşmeler yapmaya başladık.

Fungal lakkaz aracılı boya dekolorizasyonu laboratuvar deneyleri ile bilgisayar çalışmalarını karşılaştıracığım yüksek lisans tez konum beni çok heyecanlandırmıştı. Çünkü biyoinformatik uzak olduğum bir alandı. Yani tez konum bana çok yeni şeyler öğretecekti. Zorlandığım zamanlar oldu tabii ama şimdi fungal lakkaz ile boya dekolorizasyonunda *in silico* ve *in vitro* sonuçları karşılaştırdığım yüksek lisans tezimi tamamlamış bulunuyorum. Bu çalışmanın, bilgisayar destekli laboratuvar deneylerine teşvik edeceğine inanıyorum.

Bu yolda bana farklı fikirler aşıl原因, ön yargılarımı yıkan danışman hocam Doç. Dr. Ali KOÇYİĞİT'e; ilgiyle ve severek öğreten tüm Biyoloji Bölümü öğretim üyelerine ve beni her koşulda destekleyen aileme teşekkürlerimi sunuyorum.

İZMİR

03/02/2025

Selin HAKGÖNÜL



**İÇİNDEKİLER**Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ix</b>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>xi</b>
1.GİRİŞ .....	1
2.GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Lignoselüloz .....	3
2.2. Lignin .....	4
2.3. Ligninin Mikroorganizmalar Yoluyla Parçalanması .....	5
2.3.1. Lignolitik Funguslar .....	6
2.4. Lignolitik Enzim Kaynakları .....	7
2.5. Lakkaz (EC 1.10.3.2) .....	7
2.5.1. Lakkaz Moleküler Yapısı .....	8
2.5.2. Lakkaz Oksidasyon Mekanizması .....	9
2.5.3. Lakkaz Aracılı Sistemler .....	10
2.5.4. Lakkaz Substratları .....	11
2.5.5. Lakkaz Aktivitesi İndükleyicileri .....	11
2.6. Deniz Orijinli Funguslar ve Enzim Üretimleri .....	12
2.7. Lignolitik Fungal İzolat <i>Phoma</i> sp. Özellikleri .....	13
2.8. Endüstriyel Boya Kirliliği ve Atık Sulardaki Biyoremediasyonu .....	15
2.8.1. Endüstriyel Boyalar .....	16
2.9. Biyoremediasyonda Lakkazın Kullanım Potansiyeli .....	18
2.10. Sucul Sistemlerin Biyoteknolojik Önemleri .....	20
2.11. Biyoremediasyonda Biyoinformatik .....	21
2.12. Moleküler Kenetleme (Docking) .....	22
2.12.1. Moleküller Arası Etkileşimler .....	24
2.12.2. Moleküler Kenetleme Metodolojileri .....	25
2.12.3. Moleküler Kenetleme Aşamaları .....	25
2.12.4. Arama Algoritmaları .....	28

## İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.12.5. Skorlama Fonksiyonları .....	29
2.12.6. Moleküler Kenetleme Yazılımları .....	30
3.GEREÇ VE YÖNTEM .....	33
3.1.Gereçler .....	33
3.1.1. <i>In silico</i> Renk Giderimi (Dekolorizasyon) Çalışmasında Kullanılan Yazılımlar.....	33
3.1.2.Kullanılan Besiyerleri .....	34
3.1.3.Tampon ve Çözeltiler.....	36
3.1.4. <i>In vitro</i> Renk Giderimi (Dekolorizasyon) Deneylerinde Kullanılan Boyalar .....	38
3.1.5.Cihaz ve Aletler .....	40
3.2.Yöntem .....	40
3.2.1. <i>In silico</i> Renk Giderimi (Dekolorizasyon) Çalışması .....	40
3.2.1.1.Proteinin Hazırlanması.....	40
3.2.1.2.Ligandların Hazırlanması.....	43
3.2.1.3.Grid Kutusunun Ayarlanması ve Konfigürasyon Dosyasının Oluşturulması .....	45
3.2.1.4. <i>Phoma</i> sp. Lakkazı ile Ligandların (Boya) Moleküler Kenetleme İşlemi .	47
3.2.1.5.Moleküler Görselleştirme Programının Kullanılması.....	49
3.2.2. <i>Phoma</i> sp. K21 Üretimi ve İlk Aktivasyonu.....	49
3.2.3.Lakkaz Üretimi İçin Farklı Besiyerlerinin Araştırılması .....	49
3.2.4.Lakkaz Aktivitesi Deneyleri .....	50
3.2.4.1.İnokulasyonun Hazırlanması.....	50
3.2.4.2.Kalitatif Lakkaz Aktivitesi Deneyi .....	50
3.2.4.3.Kantitatif Lakkaz Aktivitesi Deneyi .....	51
3.2.5. <i>In vitro</i> Renk Giderimi (Dekolorizasyon) Deneyleri .....	54
3.2.6.Fitotoksisite Deneyi .....	54
4.BULGULAR.....	55
4.1. <i>In silico</i> Renk Giderimi (Dekolorizasyon) Sonuçları.....	55
4.1.1.Metilen Mavisi ile Yapılan Kenetleme Çalışması .....	55
4.1.2.Metil Kırmızısı ile Yapılan Kenetleme Çalışması .....	56

**İÇİNDEKİLER (devam)**

	<u>Sayfa</u>
4.1.3.Kristal Viyole ile Yapılan Kenetleme Çalışması.....	57
4.1.4.RBBR ile Yapılan Kenetleme Çalışması.....	58
4.2. <i>Phoma</i> sp. K21 Üretimi Sonuçları.....	60
4.3. <i>Phoma</i> sp. K21 İzolatının Mikroskop Görüntüleri .....	61
4.4.Lakkaz Üretimi Sonuçları .....	62
4.5.Lakkaz Aktivitesi Deneyleri Sonuçları .....	62
4.5.1.Kalitatif Lakkaz Aktivitesi Sonuçları .....	62
4.5.2.Kantitatif Lakkaz Aktivitesi Sonuçları .....	65
4.6. <i>In vitro</i> Renk Giderimi (Dekolorizasyon) Sonuçları.....	67
4.7.Fitotoksisite Deneyi Sonuçları .....	72
5.TARTIŞMA .....	75
6.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	88
KAYNAKLAR DİZİNİ .....	90
TEŞEKKÜR .....	121
ÖZGEÇMİŞ.....	122



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 Lignoselülozik malzemelerin bileşenleri .....	3
Şekil 2.2 Bir lignin molekülünün şematik yapısı . .....	4
Şekil 2.3 Öncül lignin monomerleri ve karşılık gelen lignin birimleri. ....	5
Şekil 2.4 Monomerlerin çapraz bağlanmasından türetilen ana yapısal birimler .....	6
Şekil 2.5 <i>Trametes versicolor</i> lakkazının (PDB:1KYA) katalitik bakırları koordine eden katalitik bölgesindeki farklı amino asitler.....	9
Şekil 2.6 Lakkazların doğrudan katalitik döngüsünün şeması .....	9
Şekil 2.7 Farklı doğal ve sentetik lakkaz medyatörlerinin yapısı .....	10
Şekil 2.8 Potansiyel su kirleticileri ve bunların lakkazlarla biyoremediasyonunun gösterimi .....	19
Şekil 2.9 Farklı boyaların lakkaz yoluyla olası renk giderme mekanizması .....	20
Şekil 2.10 Moleküler kenetleme modelleri .....	23
Şekil 2.11 Moleküller arası etkileşimler.....	24
Şekil 2.12. Moleküler kenetleme işlemi .....	28
Şekil 3.1 <i>Phoma sp.</i> lakkazı B3TLA6'ya ait PDB dosyası .....	41
Şekil 3.2 Biovia Discovery Studio Visualizer programında heteroatomların yokluğunu ve proteinin A zincirini gösteren ekran görüntüsü .....	41
Şekil 3.3 AutoDock Tools programında sırasıyla; su moleküllerinin protein yapısından uzaklaştırılması, kayıp atomların onarımı yapılması, polar hidrojen atomlarının eklenmesi.....	42
Şekil 3.4 AutoDock Tools programında düzenlenen proteinin, makromolekül olarak seçilmesi ve PDBQT formatında kaydedilmesi.....	42
Şekil 3.5 İlgilenilen ligandın PubChem anasayfasında gösterimi .....	43
Şekil 3.6 3D SDF Dosyasının 3D Konformasyonda gösterimi.....	44
Şekil 3.7 UCSF Chimera programında ilgilenilen ligandın enerji minimizasyonunun gerçekleştirilmesi ve PDB formatında kaydedilmesi.....	44
Şekil 3.8 Autodock Tools (ADT ver.1.5.7) programında, kök (root) tespiti için burulma ağacının (torsion tree) uygulanması ve ligand çıktısının PDBQT formatında kaydedilmesi .....	45

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.9 Kenetleme işlemi için proteinin üzerindeki grid kutusunun ayarlanması .....	46
Şekil 3.10 Kenetleme için konfigürasyon dosyası.....	46
Şekil 3.11 Kenetleme komutları .....	47
Şekil 3.12 Kenetleme sonuçlarının gösterimi .....	48
Şekil 3.13 Son komut ile kenetleme sonuçlarının her bir bağlanma modu için ayrı olarak kaydedilmiş dosyaları. ....	48
Şekil 4.1 Metilen mavisinin kenetlenme sonucu .....	55
Şekil 4.2 Metilen mavisi ile <i>Phoma</i> sp. lakkazının yerleşimi ve etkileşimi .....	56
Şekil 4.3 Metil kırmızısının kenetlenme sonucu. ....	57
Şekil 4.4 Metil kırmızısı ile <i>Phoma</i> sp. lakkazının yerleşimi ve etkileşimi .....	57
Şekil 4.5 Kristal viyolenin kenetlenme sonucu. ....	58
Şekil 4.6 Kristal viyole ile <i>Phoma</i> sp. lakkazının yerleşimi ve etkileşimi. ....	58
Şekil 4.7 RBBR'nin kenetlenme sonucu .....	59
Şekil 4.8 RBBR ile <i>Phoma</i> sp. lakkazının yerleşimi ve etkileşimi.....	59
Şekil 4.9 Fungal izolatın deniz suyu ve distile su içeren Malt Ekstrakt Pepton Agar besiyerlerindeki gelişimi .....	60
Şekil 4.10 Fungal izolatın deniz suyu ve distile su içeren Glukoz-Maya Ekstraktlı Agar besiyerlerindeki gelişimi .....	61
Şekil 4.11 Fungal izolatın mikroskop görüntüleri .....	61
Şekil 4.12 Deniz suyu içeren steril ve organizma inoküle edilmiş Malt Ekstrakt Pepton sıvı besiyeri .....	62
Şekil 4.13 <i>Phoma</i> sp. K21 izolatının % 50 deniz suyu, % 50 distile su içeren; % 0,5 tannik asitli Malt Ekstrakt Pepton Agar besiyerindeki 10 gün 27°C inkübasyon görüntüsü.....	63
Şekil 4.14 <i>Phoma</i> sp. K21 izolatının %100 distile su içeren; % 0,5 tannik asitli Malt Ekstrakt Pepton Agar besiyerindeki 10 gün 27°C inkübasyon görüntüsü .....	63
Şekil 4.15 <i>Phoma</i> sp. K21 izolatının % 50 deniz suyu, % 50 distile su içeren; % 0,1 siringaldizinli Malt Ekstrakt Pepton Agar besiyerindeki 10 gün 27°C inkübasyon görüntüsü.....	64

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
<b>Şekil 4.16</b> <i>Phoma</i> sp. K21 izolatının % 100 distile su içeren; % 0,1 siringaldizinli Malt Ekstrakt Pepton Agar besiyerindeki 10 gün 27°C inkübasyon görüntüsü. ...	64
<b>Şekil 4.17</b> <i>Phoma</i> sp. K21 izolatının Malt Ekstrakt Pepton Broth besiyerindeki; 14 gün boyunca glisin-HCl tamponu (pH=3) ile ölçülen lakkaz aktivitesi. ....	65
<b>Şekil 4.18</b> <i>Phoma</i> sp. K21'in muz kabuklu Czapek Dox besiyerindeki, 14 gün boyunca sitrat-fosfat tamponu (pH=5) ile ölçülen lakkaz aktivitesi.....	66
<b>Şekil 4.19</b> <i>Phoma</i> sp. K21'in pirinç kepekli Czapek Dox besiyerindeki, 14 gün boyunca sitrat-fosfat tamponu (pH=5) ile ölçülen lakkaz aktivitesi.....	66
<b>Şekil 4.20</b> Boyaların 0., 24., 48., 72., 96. ve 120. saatteki lakkaz aktiviteleri ve dekolorizasyon oranları .....	69
<b>Şekil 4.21</b> Renk giderimi öncesi ve 120.saat sonundaki renk giderimi.....	69
<b>Şekil 4.22</b> Spektrofotometrik tarama sonucunda remazol brilliant blue R'nin absorbands grafiği.....	70
<b>Şekil 4.23</b> Spektrofotometrik tarama sonucunda metilen mavisinin absorbands grafiği.....	70
<b>Şekil 4.24</b> Spektrofotometrik tarama sonucunda kristal viyolenin absorbands grafiği .....	71
<b>Şekil 4.25</b> Spektrofotometrik tarama sonucunda metil kırmızısının absorbands grafiği.....	71
<b>Şekil 4.26</b> 120. saat sonunda boyaların renk giderme oranları.....	72
<b>Şekil 4.27</b> Sadece çeşme suyu (kontrol) ve çeşme suyu ile seyreltilmiş <i>Phoma</i> sp. K21'in boya giderimi ürünleri ile sulanan, 27°C'de 24 saat inkübasyon sonunda elde edilen Maş fasulyesi ( <i>Phaseolus aureus</i> ) tohumları görüntüleri .....	73



**ÇİZELGELER DİZİNİ**

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
<b>Çizelge 2.1</b> Kimyasal yapılarına ve çözünürlüklerine göre boyarmaddelerin sınıflandırılması .....	17
<b>Çizelge 2.2</b> Moleküler kenetleme yazılımları. ....	31
<b>Çizelge 3.1</b> Dekolorizasyon deneylerinde kullanılan boyalar .....	39
<b>Çizelge 3.2</b> Lakkaz Aktivitesi İçin Sıvı Üretim Besiyerleri.....	49
<b>Çizelge 3.3</b> Kantitatif lakkaz aktivitesi deneyinde kullanılan yöntemler.....	53
<b>Çizelge 4.1</b> <i>Phoma</i> sp. lakkazı ile boyaların <i>in vitro</i> ve <i>in silico</i> dekolorizasyon sonuçlarının karşılaştırılması .....	60
<b>Çizelge 4.2</b> 27°C'de 24 saat inkübasyon sonunda elde edilen çimlenme oranları (%) .....	73
<b>Çizelge 4.3</b> 27°C'de 3 gün inkübasyon sonunda elde edilen ortalama kök ve embriyonik gövde boyları (cm) .....	74
<b>Çizelge 5.1</b> Moleküler kenetleme yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen dekolorizasyon çalışmaları .....	86



## 1. GİRİŞ

İnsan faaliyetlerinden dolayı günümüzde doğal su kaynaklarına kirlilik salınmakta ve bu kirlilik ekosistemi tehlikeye atmaktadır. Özellikle sentetik boyalar bu kirliliğe sebep olmaktadır (Pande et al., 2022). Toksik, kanserojenik ve mutajenik özelliklerinden dolayı sentetik boyalar ekosistem için tehdit oluşturmaktadır (Barapatre et al., 2017; Ahlawat et al., 2019). Bu nedenle çevreye zarar vermeyecek, ekonomik ve uygulanabilir boya degradasyonu yöntemleri kullanılarak atık suların arıtılması gerekmektedir (Pande et al., 2022).

Enzim aracılı işlemler, atık sulardaki boya hızla gidermesi ve çevreye zarar vermemesi nedeniyle önem kazanmaktadır (Muhammad Nasir Iqbal and Asgher, 2013). Lakkaz enzimi; düşük substrat özgülüğüne sahip olması ve biyolojik parçalanmaya dirençli olan kirleticileri parçalayabilme özelliği nedeniyle biyoremediasyon alanında iyi bir seçenektir. Özellikle fungal lakkazlar, biyoremediasyon uygulamalarında en sık kullanılan lakkazlardan biridir (Jeyabalan et al., 2023). Lakkazın biyoteknolojide kullanımının olumlu sonuçlarının yanı sıra, ticari başarıya ulaşmak için düzeltilmesi gereken olumsuzluklar da vardır. Bu sorunların çözümleri; gelişmiş lakkaz üretimi sunan mikroorganizmaların uygulanması için omik araçlarını kullanan enzim araştırmalarının iyileştirilmesini, maliyet ve çevresel etki dikkate alınarak enzim üretim süreçlerinin iyileştirilmesini, ölçeklenebilir ve ekonomik olarak uygulanabilir süreçlerin geliştirilmesini içermektedir (Arregui et al., 2019).

Günümüzde bilgisayarlar; verimliliği, güvenilirliği ve iş kolaylığını artırmak için çeşitli görevlerde kullanılmaktadır (Rauf et al., 2015). Biyoinformatik ve moleküler kenetleme yöntemi, çeşitli enzimlerle boya degradasyonunun duyarlılığını tahmin ederek biyoremediasyon mekanizmalarına ilişkin öngörüler sunar (Singh et al., 2014, Srinivasan et al., 2019). Genel olarak moleküler kenetleme yöntemi sayesinde kirleticilerin mevcut enzimler tarafından parçalanma eğilimleri tahmin edilebilmektedir. Çeşitli çalışmalarda boyaların enzim aracılı giderimi için *in vitro* ve *in silico* yönteminin birleşik çalışmasına yönelik raporlar yakın zamanda gerçekleştirilmiş, moleküler kenetlemenin biyoremediasyondaki

rolü araştırılmış ve *in vitro* sonuçların *in silico* sonuçlarla iyi bir uyum içinde olduğu bildirilmiştir (Kumar et al., 2016; Srinivasan et al., 2019). *In silico* tekniklerin ardından deneysel doğrulamayı içeren kombinatoriyal biyoremediasyon yaklaşımı, zaman ve maliyet açısından etkili bir ön tarama yöntemi olarak önerilmektedir.

Bu çalışmanın temel amacı deniz orijinli fungus *Phoma* sp. K21 lakkazının boya parçalama potansiyelinin *in vitro* ve *in silico* olarak araştırılmasıdır. Böylelikle renk giderme deneylerinin birincil taramasının zamanını ve maliyetini azaltmaya yardımcı olunması ve ülkemizden izole edilmiş yerli bir *Phoma* sp. suşunun bu alana entegre edilmesi hedeflenmektedir.



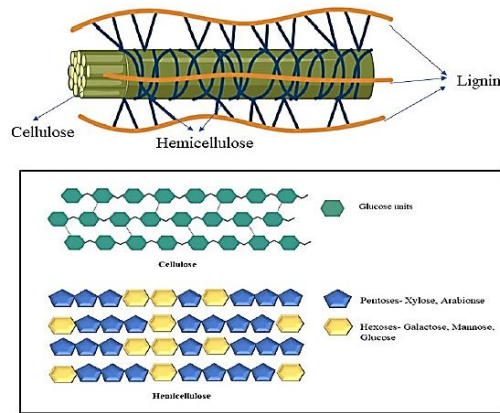
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Lignoselüloz

Biyosferde en çok bulunan organik bileşikler olan lignoselülozlar, tarım ve ormancılık sektörlerinin atıklarından ortaya çıkmaktadırlar (Kuhad and Singh, 1993). Lignoselüloz hammadde kaynağı olarak; enerji kaynağı, gıda ve kimyasal üretiminde önemlidir (Betts and Dart, 1988).

Farklı coğrafi bölgelerdeki farklı kültür, teknoloji ve iklim koşulları; lignoselülozik atıkların türünü, bulunabilirliğini ve bolluğunu etkilemektedir. Lignoselülozik atık miktarının oldukça yüksek olmasının sebeplerinden biri; evsel katı atıkların ve kağıt endüstrileri atıklarının büyük bir kısmının bertaraf edilmesidir (Kuhad and Singh, 1993). Günümüzde düşük maliyetli biyoteknolojik uygulamalar yardımıyla lignoselülozun biyolojik olarak parçalanması mümkündür (Malherbe and Cloete, 2002).

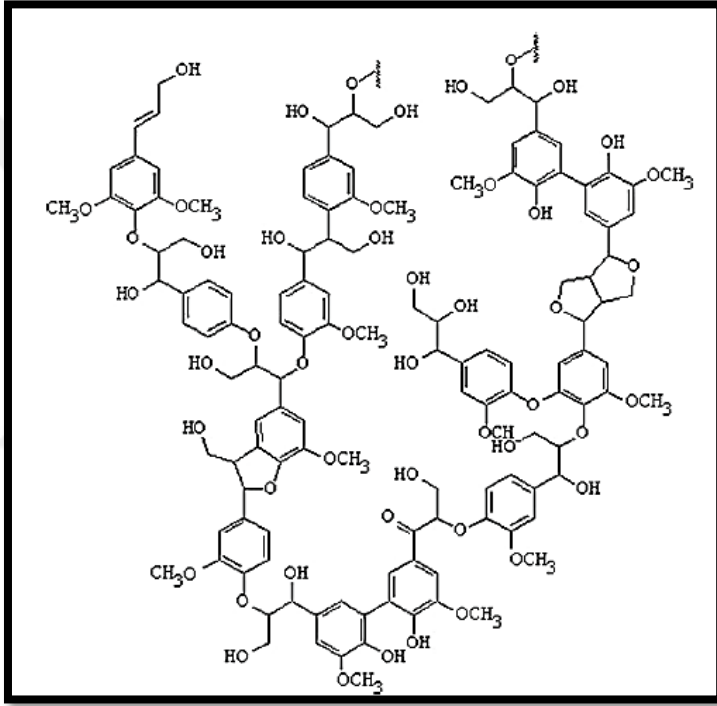
Lignoselülozik materyallerin temel bileşenleri; selüloz, hemiselüloz ve lignindir (Deobald and Crawford, 1997). Biyokütlenin % 40-60'ı selülozdan, % 20-40' hemiselülozdan, % 10-25'i ligninden oluşmaktadır (Civzele et al., 2023) (Şekil 2.1). Lignoselülozların zengin karbon içeriği ve doğada bol miktarda bulunmaları, karbon bozunması gerçekleştirebilen mikroorganizmalar için cazip bir kaynak oluşturmaktadır (Kuila and Sharma, 2017; Phillips, 2022).



Şekil 2.1 Lignoselülozik malzemelerin bileşenleri (Dashora et al., 2023).

## 2.2. Lignin

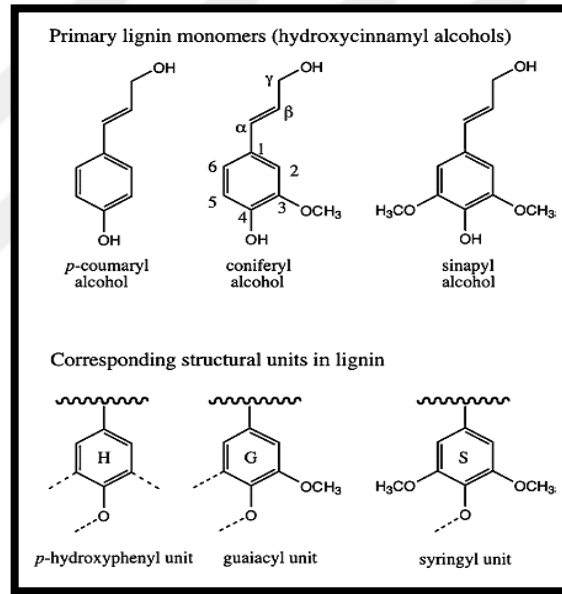
Bitkilerin yapısında selülozdan sonra en bol bulunan doğal amorf polimer olan lignin, vasküler bitkilerin temel bileşenidir ve selüloz-hemiselüloz-pektin matrisinin bütünlüğünü korumaktadır (Huang et al., 2022) (Şekil 2.2). Bununla birlikte lignin; boyalara ve mürekkeplere dolgu maddesi olarak eklenmekte, kağıt hamuru ve biyoetanol endüstrilerinde yan ürün olarak açığa çıkmaktadır (Belgacem et al., 2003; Hatakeyama, 2010; Atiwesh et al., 2022). Bu nedenle endüstriler, büyük bir lignoselülozik atık üreticisi haline gelmektedir (Civzele et al., 2023).



Şekil 2.2 Bir lignin molekülünün şematik yapısı (Niladevi., 2009).

Lignin; koniferil, sinapil ve kumaril alkolün enzimatik dehidrojenatif polimerizasyonu ile oluşmaktadır (Higuchi, 1998, Lebo et al., 2002). Polimerizasyondan sonra bu alkoller sırasıyla; p-hidroksifenil (H), guaiasil (G) ve siringil (S) olmak üzere üç fenilpropanoid birimine dönüştürülmektedir (Hatakeyama, 2010; Lu et al., 2017; Atiwesh et al., 2022) (Şekil 2.3).

Monomerlerin polimerleşmesi dimer, trimer ve oligomerlerle birleşerek kompleks dallanmış yapıları oluşturur. Birleşmeler arasındaki bağlantılar ağaç türlerine göre farklılık gösterir. Lignin;  $\beta$ -O-4,  $\alpha$ -O-4, 5-5,  $\beta$ -5, 4-O-5,  $\beta$ -1 ve  $\beta$ - $\beta$  bağları içeren C-O ve C-C bağlarını barındırır (Abdel-Hamid et al., 2013; Lourenço and Pereira, 2018; Schoenherr et al., 2018; Abdullayeva, 2022).

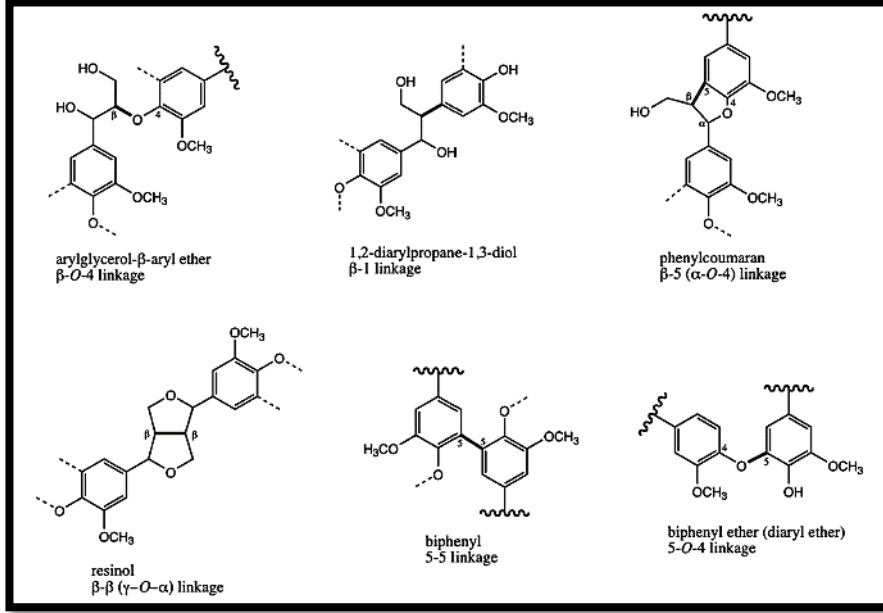


Şekil 2.3 Öncül lignin monomerleri ve karşılık gelen lignin birimleri (Wong, 2009).

### 2.3. Ligninin Mikroorganizmalar Yoluyla Parçalanması

Lignin içeren materyallerin ön işlemden geçirilmesi ve lignin parçalanması, ligninin hammadde olarak uygulanabilmesi için gereklidir. Mikroorganizmalar, lignini parçalamak için ticari olarak kullanılmaktadır (Ayeronfe et al., 2018; Kamimura et al., 2019; Atiwesh et al., 2022).

Ligninin her monomerik ünitesinin iki temel yapısal bileşenini aromatik kısım ve C3 zinciri oluşturmaktadır (Hatakeyama, 2010). Karbon-karbon (C-C) veya eter bağları (C-O) bu birimleri birbirine bağlamaktadır. Fenilpropan monomerleri arasındaki en yaygın bağ, aromatik arilgliserol- $\beta$ -aryl eterdir ve mikroorganizmalar tercihen lignindeki bu bağı parçalamaktadırlar (Atiweh et al., 2022) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 Monomerlerin çapraz bağlanmasından türetilen ana yapısal birimler (Wong, 2009).

### 2.3.1. Lignolitik Funguslar

Karmaşık karbon kaynaklarının metabolize edilmesinde, lignoselülozik materyallerin parçalanmasında funguslar, hayati bir öneme sahiptirler (De Gannes et al., 2013). Ağaç ve odun kalıntıları üzerinde yetişen funguslar, çürükçül funguslar olarak tanımlanmaktadır. Basidiomycetes sınıfında yer alan beyaz çürükçül funguslar, odunsu dokulardaki lignini  $\text{CO}_2$  ve  $\text{H}_2\text{O}$ 'ya tamamen parçalayabilirken; kahverengi çürükçül ve yumuşak çürükçül funguslar kısmi olarak parçalayabilmektedir (Weng et al., 2021). Beyaz çürükçüller tarafından üretilen lignin parçalayıcı enzimler; lignin peroksidazlar, lakkazlar ve mangan bağımlı peroksidazlardır. Bu enzimlerin spesifik aktiviteye sahip olmaması, boyalar

gibi yapısal olarak lignine benzeyen çeşitli bileşikleri parçalamalarına izin verir (Atiwesh et al., 2022).

#### **2.4. Lignolitik Enzim Kaynakları**

Dayanıklı yapısından dolayı ligninin tamamen parçalanması için birden fazla oksidatif enzim gerekmektedir. Lignini parçalayan temel enzimler; lignin peroksidaz, mangan peroksidaz ve lakkaz olmakla birlikte; bu süreçte veratril alkol oksidaz, vanilya hidroksilaz, katalaz, dioksijenaz, glioksal oksidaz ve aromatik asit redüktaz gibi enzimler de görev almaktadır (Nigam and Pandey, 2009). Lignolitik enzimlerin özellikle de lakkazların son zamanlarda; kağıt, gıda, tekstil, ilaç, kozmetik, kimya endüstrileri, biyoremediasyon gibi sektörlerde olmak üzere biyoteknolojik ve çevresel süreçlerde ekonomik önem kazanması nedeniyle, lignolitik mikroorganizmalar ve lignolitik enzim kompleksleri araştırmacıların ilgisini çekmektedir (Nigam and Pandey, 2009; Ben Ayed et al., 2022; Paul et al., 2023).

#### **2.5. Lakkaz (EC 1.10.3.2)**

Lakkaz enzimi (EC 1.10.3.2, benzendiol, oksijen oksidoredüktaz), polifenol oksidaz ailesinde yer alır ve çeşitli organik bileşiklerin oksidasyonunu katalizlemektedir (Mainardi et al., 2018). Fenolik ve fenolik olmayan lignoselülozik materyalleri ve biyolojik parçalanmaya dirençli olan çevre kirleticilerini okside edebilme yetenekleri; lakkazlara geniş substrat yelpazesi sunmaktadır. Lakkaz enzimi moleküler oksijeni elektron alıcısı olarak kullanır ve toksisitesi olduğu bilinen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ihtiyaç duymazlar. Bu nedenle ilgi çekmektedirler (Demiralp vd., 2015). Lakkaz enzimi farklı bakteri ve fungus gruplarında, bitki ve böceklerde yaygın olarak bulunmakta olup, en etkili lakkaz üretimi yapan türün Basidiomycota filumuna ait funguslara ait olduğu görülmüştür (Nigam and Pandey, 2009; Barathikannan et al., 2017; Koçyiğit ve Toker, 2021).

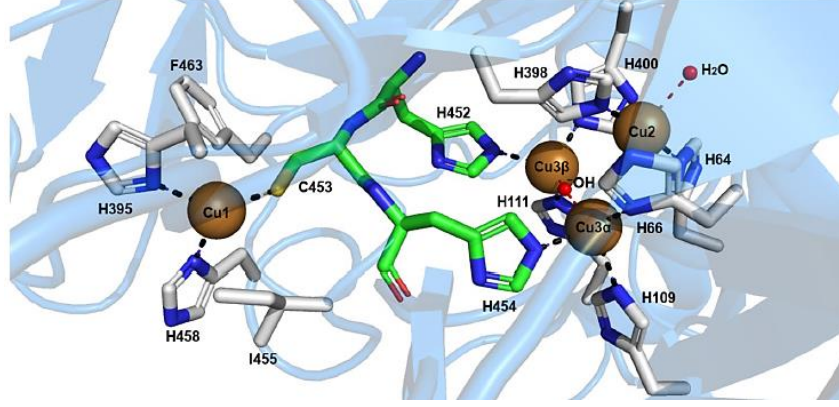
### 2.5.1. Lakkaz Moleküler Yapısı

Lakkazlar; monomerik, homodimerik, multimerik ve heterodimerik olmak üzere farklı formlarda bulunabilir. Moleküler kütleleri 50-140 kDa arasındadır, ancak tipik bir fungal lakkazın moleküler kütlesi 60 ila 70 kDa arasında değişmektedir (Arregui et al., 2019). Fungal lakkazlar, katalitik bölgede yer alan (monomer başına) dört bakır atomlu glikoproteinler olup yaklaşık 520–550 aminoasit içermektedir. Fungal lakkaz, pH 4'lük bir izoelektrik nokta ile glikozile edilir. Lakkazların karbonhidrat kısmı, protein kısmına kovalent bağlanır ve proteinin toplam kütlelerinin %15-30' unu oluşturur (Shraddha et al., 2011). Lakkazların karbonhidrat kısmının konformasyonel stabiliteyi sağladığı, enzimi proteolizden ve radikaller tarafından inaktivasyondan koruduğu gösterilmiştir (Arregui et al., 2019).

Lakkazlar katalitik aktivitelerini gerçekleştirmek için en az dört bakır atomuna sahip olmalıdır. Lakkaz moleküllerinin aktif bölgesinde dört bakır iyonu bulunur: iki tip-3 (T3), bir tip-1 (T1) ve bir tip-2 (T2). T3 bölgesinde, iki bakır iyonu arasında antiferromanyetik bir bağlantı vardır. T2 ve T3 alanlarından oluşan özel bir trinükleer küme, terminal elektron alıcısı olan oksijeni bağlama yeteneğine sahiptir (Nigam and Pandey, 2009). Çoklu-bakır içeren moleküllerin mavi rengi, okside formda absorpsiyonu 610 nm olan; redoks potansiyeli ise +785 mV olan Tip1 bakırdan kaynaklanmaktadır. Bakır-sistein kovalent bağının yoğun elektronik absorpsiyonu mavi renge neden olur (Gray et al., 2000; Demiralp vd., 2015). Tip1 bakır, yüksek redoks potansiyelinden dolayı substrat oksidasyonundan sorumludur (Smirnov et al., 2001).

Lakkazın elektron yoğunluğu nedeniyle, dört bakır atomunun hepsi ile birlikte toplamda 7 N-asetil gliozamin kısmı ve 5 N-glikozilasyon bölgesi ile polipeptidin modellenmesi sağlanır (Kaal and Field., 1993). Üç kupredoksin benzeri domain içeren monomerik bir molekül olduğu, lakkazın kristal yapısı ile gösterilmektedir (Ducros et al., 1998). Tüm mavi bakır oksidazlar, moleküllerinin yapısında  $\beta$ -barrel şeklinde alanlar içermektedir. Bununla birlikte üçüncü alan dört kısa helikal bölgeden oluşan  $\beta$ -sandviç konformasyonundadır. T2 bakır ve T3 bakır, kristal yapıya göre üç çekirdekli merkezde birbirine yakın ve beraberdır.

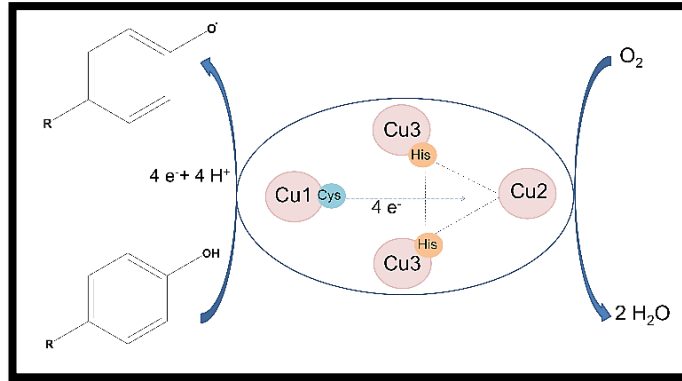
Çalışmalarda T2/T3 bakır bölgesindeki Cu atomlarının, sekiz Histidin (His) ile düzenlenmiş olduğu gösterilmiştir (Ducros et al., 1998; Aykut, 2010) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 *Trametes versicolor* lakkazının (PDB:1KYA) katalitik bakırları koordine eden katalitik bölgesindeki farklı amino asitler (Arregui et al., 2019).

### 2.5.2. Lakkaz Oksidasyon Mekanizması

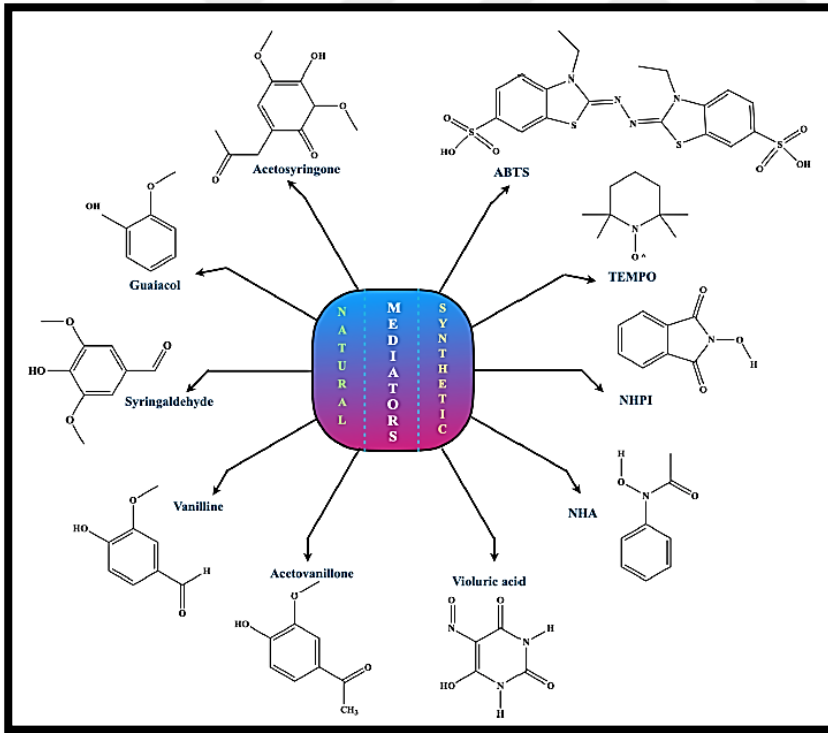
Lakkaz substrat oksidasyonu, bakır atomunun substrattan bir elektron aldığı T1 atom bölgesinde meydana gelmektedir (Ali and Qayyum, 2007; Arregui et al., 2019). Bu elektron daha sonra protein aminoasitlerinden T1/T2 bakırdan oluşan trinükleer bakır kümesine taşınmaktadır. T3 bakır atomu, elektronları T2 bakır atomuna aktarır ve böylece oksijen azalır. Protein aminoasitlerinden gelen iki karboksilat grubu, hidrojen atomlarını aktararak indirgenmiş oksijen atomlarının suya dönüştürülmesine yardımcı olur. Reaksiyondan sonra oluşan serbest radikal, bozunma ve polimerizasyon olmak üzere enzimatik olmayan reaksiyonları başlatabilir (Arregui et al., 2019) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 Lakkazların doğrudan katalitik döngüsünün şeması (Baldrian, 2006; Magalhães et al., 2024).

### 2.5.3. Lakkaz Aracılı Sistemler

Ligninin fenolik olmayan kısmının daha yüksek redoks potansiyeline sahip olmasından dolayı lakkazın oksitlenmesi zorlaşır. Bu nedenle lignin molekülü ile lakkaz aktif bölgesi arasında medyatörler adı verilen aracı moleküller gereklidir. Önce lakkaz tarafından oksitlenirler, sonrasında radikal hidrojen atom transferi veya elektron transferi yoluyla fenolik olmayan substratları oksitlerler. Bu mekanizma lakkaz aracılı sistem olarak bilinmektedir (Kunamneni et al., 2008). Doğal ve sentetik olmak üzere iki grup lakkaz medyatörleri vardır. Doğal araçların bazıları; asetosiringon, vanillin, siringaldehit ve asetovanillondur. Sentetik araçlar; N-hidroksiftalimid (NHPI), 2,2, 6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil (TEMPO), N hidroksiasetanilid (NHA), 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiyazolin-6 sülfonik asit) (ABTS) biyolojik bozunma için kullanılır (Chamoli et al., 2023; Jeyabalan et al., 2023) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7 Farklı doğal ve sentetik lakkaz medyatörlerinin yapısı (Jeyabalan et al., 2023).

#### 2.5.4. Lakkaz Substratları

Lakkazın organik ve inorganik substratları; fenoller, ketonlar, fosfatlar, askorbatlar, aminler ve lignindir. Ayrıca guaiacol, kafeik asit, gallik asit, dihidroksifenilalanin, pirogallol, o-fenilendiamin gibi orto-sübstitüe edilmiş bileşiklerin; p-kresol, p-fenilendiamin gibi parasübstitüe edilmiş bileşiklerden daha uygun lakkaz substratları oldukları bildirilmiştir (Baldrian, 2006). Buna ek olarak, lakkaz üretim maliyetlerini azaltmak amacıyla ucuz fermantasyon ortamları tercih edilmektedir. Tarımsal kalıntılar çevrede bol miktarda bulunduğundan, lakkaz üretimi için sıklıkla araştırılmaktadır. Buğday samanı (Schlosser et al., 1997), pamuk sapı (Kahraman and Gurdal, 2002), şeker kamışı küspesi (Arora and Gill, 2001) gibi endüstriyel ve tarımsal atıkların, lignolitik enzimleri indükleyen lignin ve selüloz içeriklerinden dolayı lakkaz üretimini uyarabildiği gösterilmiştir (Srinavasan et al., 1995; Akpınar ve Urek, 2017). Özellikle pirinç samanı ve talaşın fungal gelişim için en iyi substratlardan biri olduğu rapor edilmiştir (Rambey et al., 2020).

Fenolik bileşikler ile birlikte, siringaldizin, aromatik aminler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, sentetik boyalar, antibiyotikler ve diğer belirgin olmayan lakkaz substratları gibi fenolik olmayan substratları da oksitlemesi nedeniyle fungal lakkazlar; çevrede oluşan doğal veya sentetik toksinlerin ortadan kaldırılması için çok yararlı bir enzimatik araçtır ve bu nedenle fungusların aktif savunmasında yer almaktadır (Mikolasch and Schauer, 2009; Polak and Wilkolazka, 2012; Janusz et al., 2020). Bununla birlikte, asidik pH aralığı (3,5 ila 5,5) ve belirli bir sıcaklık aralığı (30 ila 55°C) gibi çevresel faktörler enzimin aktivitesini sınırlar (Jeyabalan et al., 2023).

#### 2.5.5. Lakkaz Aktivitesi İndükleyicileri

Farklı konsantrasyonlardaki bakırın lakkaz üretimi üzerindeki etkisi; *Trametes versicolor* (400 µM'ye kadar) (Collins and Dobson, 1997), *Trametes pubescens* (2 mM'ye kadar) (Galhaup et al., 2002a; 2002b), *Trametes trogii* (850 µM'ye kadar) (Trupkin et al., 2003), *Pleurotus ostreatus* (150 µM) (Palmieri et al., 2000) veya *Pleurotus sajor-caju* (300 µM) olmak üzere birçok basidiomiset için

rapor edilmiştir (Huber and Lerch 1987). Daha az sayıda çalışma, *Neurospora crassa* (25 µM) (Huber and Lerch, 1987) ve *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (400 µM) (Edens et al., 1999) gibi askomisetlerde lakkaz üretiminin bakır tarafından uyarıldığını göstermiştir.

Lignin ile yapısal benzerlikleri veya ilişkileri olan; 4-hidroksi-benzoik asit, ferulik asit, veratril alkol, 2,5 ksilidin veya vanilin gibi farklı organik indükleyiciler sıklıkla uygulanmaktadır. Ayrıca lignin veya lignin türevi preparatlar gibi daha karmaşık doğal bileşiklerin lakkaz üretimini uyardığı gösterilmiştir (Schlosser et al., 1997; Junghanns et al., 2008). Büyüme ortamında tannik asit kullanılarak birçok çalışmada lakkaz üretiminin arttığı gözlemlenmiştir (Ahmadi Khozani et al., 2021). Tannik asit, transkripsiyonel olarak lakkaz genini indükleyen ve enzimin üretimini artıran, geniş çapta dağılmış bir bitki fenolik bileşiğidir (Carbajo et al., 2002).

Bazı lignin kısımlarına yapısal benzerliklerinden dolayı, Remazol Brilliant Blue R (RBBR) gibi antrakinonik boyalar (ksenobiyotikler), fungusların lignolitik yeteneklerini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Ulmer et al., 1984; Cookson, 1995). Bu tür boyaların aynı zamanda lakkaz üretimini de artırma kapasitesine sahip olması şaşırtıcı değildir, ancak bu konu yalnızca sınırlı sayıda çalışmada ele alınmıştır (D'Souza et al., 2006).

## 2.6. Deniz Orijinli Funguslar ve Enzim Üretimleri

Bakteri, fungus, alg, plankton ve virüsleri içeren deniz mikrobiyal toplulukları, biyojeokimyasal süreçlerde rol aldıkları için deniz ortamlarında önemli ekolojik unsurlardır (Raghukumar, 2017). Sadece deniz veya haliç ekosistemlerinde gelişen ve sporlanan funguslar; zorunlu deniz fungusları olarak kabul edilmektedir (Pang et al., 2016; Le Strat et al., 2022). Bununla birlikte fakültatif deniz fungusları; tatlı suda büyüyebilir ve deniz ekosistemlerinde sporlaşım büyüyebilir (Lydia et al., 2021; Gonçaves et al., 2022). Bu organizmalar için “deniz orijinli funguslar” terimi kullanılmaktadır (Bonugli-Santos et al., 2015).

Birçoğu enzimlerle ilişkilendirilebilen antibakteriyel, antifungal, antiinflamatuvar, antiprotozoal, antiviral, antikanser ve sitotoksik aktiviteler deniz

ortamında tespit edilmiştir (Velmurugan and Lee, 2012). Deniz mikroorganizmaları tarafından üretilen enzimler ile karasal mikroorganizmalardaki homolog enzimler arasındaki farklılıklar; tuzluluk, oligotrofik koşullar, yüksek basınç, düşük sıcaklık, aşırı pH değerleri gibi çeşitli faktörlerden kaynaklanabilir. Deniz orijinli fungal enzimler, uygulama alanlarına göre beş bölüme ayrılmıştır (Bonugli-Santos et al., 2015):

- (i) temizlik, deri, tekstil, kağıt hamuru, biyoyakıt ve kağıt endüstrilerine yönelik enzimler
- (ii) yiyecek ve içeceklere yönelik enzimler
- (iii) hayvan yemine yönelik enzimler
- (iv) çevresel uygulamalara yönelik enzimler
- (v) kozmetik ve farmasötik uygulamalarla ilişkili enzimler

Deniz kökenli fungusların ekolojik rolüne ilişkin çalışmalar, bunların ana aktivitelerinin aslında organik maddenin ayrışmasıyla ilişkili olduğunu göstermiştir. İlginç bir şekilde, suda yaşayan fungus türlerinin lignini ayrıştırma yeteneği uzun yıllar boyunca reddedilmiştir. Bununla beraber Ascomycota, Chytridiomycota ve Oomycota taksonları ise lakkaz üretme yeteneğine sahiptir. Askomisetler, su habitatlarındaki baskın fungus grubudur (Shearer et al., 2007). Suda yaşayan lakkaz aktivitesine sahip olan Ascomycota'ya ait funguslara *Phoma* sp., *Coniothyrium* sp. ve *Clavariopsis aquatica* örnek verilebilir (Junghanns et al., 2008; Janusz et al., 2020).

## 2.7. Lignolitik Fungal İzolat *Phoma* sp. Özellikleri

*Phoma* cinsi Ascomycetes'e ait; toprakta, suda ve havada olmak üzere çeşitli ekolojik nişlerde yaygın olarak bulunan bir takson olup; en büyük fungus cinslerinden biri olarak kabul edilir (Aveskamp et al., 2008). Tipik bir *Phoma* kolonisi, türe göre tozlu olabilen kadifemsi bir dokuya sahiptir. Beyazdan griye, pembe, sarı ve kırmızımsı mor renkte olabilir. Eşysiz olarak ürerler. Piknidia, piknidiosporlar veya konidia olarak bilinen tek hücreli spor kütleleri içerir (Iriyini et al., 2006). Başlangıçta 3000'den fazla tür içeren *Phoma* cinsinin tür sayısı (Montel et al., 1991), morfolojik ve kültürel özelliklerini temel alan 40 yıllık

taksonomik araştırmalar sonucunda 223'e dūřür÷lmüştür (Boerema et al., 2004). Zararsız saprotrofik türlerin yanı sıra, *Phoma*'nın ekonomik açıdan önemli mahsullerde gör÷len bir bitki patojeni olduğu bildirilmiştir. *Phoma* adı ilk olarak yalnızca bitki gövdesi patojenleri için ayrılmıştı (Saccardo, 1880), ancak günümüzde bu cins; patojenleri, fırsatçıları ve ayrıca çok daha geniş bir substrat yelpazesinden gelen saprotrofları içermektedir. *P. herbarum*, *P. glomerata*, *P. pomorum* var. *pomorum* ve *P. eupyrena* gibi daha yaygın türler inorganik materyallerde bulunmuştur; izolatların asbest, çimento, yağlı boya ve alçı (*P. herbarum*), kimyasallar, boya (*P. glomerata*) ve tabak takımlarından (*P. pomorum* var. *pomorum*) ve diğer birçok inorganik substrattan izole edildiği bilinmektedir. Bu mantarlar, organik materyallerin degradasyonuna önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır (Aveskamp et al., 2008).

Bugüne kadar öncelikli olarak araştırılanlar beyaz çürükçül basidiomisetlerden elde edilen fungal lakkazlardır (Baldrian, 2006). Beyaz çürükçül fungal yabani tip suşlar genellikle diğer gruplardaki yabani tip suşlardan daha fazla lakkaz üretmektedir. Sonuç olarak, askomisetlerden elde edilen lakkazlara, biyoteknolojik kullanım potansiyelleri bildirilmiş olmasına rağmen, çok daha az ilgi gösterilmiştir (Junghanns et al., 2008). Bununla birlikte, Jahangiri ve arkadaşları (2018), poliviniliden florür membranlara çapraz bağlı *Phoma* sp. UHH 5-1-03 lakkazının, asetaminofen, bezafibrat, indometasin, ketoprofen, mefenamik asit ve naproksen dahil olmak üzere farmasötik maddeleri atık sudan yüksek verimlilikle giderebildiğini bildirmiştir. Basidiomisetlerin lakkaz üretimini arttırmak için kullanılan yöntemlerin askomisetlere de uygulanıp uygulanamayacağının araştırılması, bilimsel ve endüstriyel açıdan ilgi çekicidir. Yöntemler arasında lakkaz indükleyicileri ve farklı beslenme koşulları yaygın olarak kullanılmaktadır (Junghanns et al., 2008). Çalışmamız kapsamında da askomiset olan *Phoma* sp. K21 izolatının lakkazı ile atık sulardaki çeşitli boyaların giderilmesine odaklanılmış ve askomisetlerin lakkazı ile ilgili bilgi birikimine katkıda bulunulmaya çalışılmıştır.

## 2.8. Endüstriyel Boya Kirliliği ve Atık Sulardaki Biyoremediasyonu

Çeşitli endüstriyel kaynaklardan gelen atık boyalar, atık su arıtma sistemlerine veya doğal su kaynaklarına salınmaktadır (Carmen and Daniela, 2012). Bu boyalar; azo, antrakinon, trifenilmetan ve heterosiklik polimerik yapıya sahip bileşik gruplarına girmektedir. Sonuç olarak toksik ve kanserojen olması, fotosentez ve gazların yayılmasına müdahale edebilmesinden dolayı tehlikeli kimyasallar içeren atık suyun çevreye deşarj edilmeden önce arıtılması; genel halkın sağlığına yönelik riskin kontrol edilmesi için esastır (Baughman and Weber, 1994; Bisschops and Spanjers, 2003; Ciullini et al., 2008).

Tekstil boyları ter, ışık, su, oksitleyici kimyasallar ve mikrobiyolojik saldırı varlığında solmaya dayanacak şekilde üretilmiştir (Wesenberg et al., 2003). Bu nedenle, geleneksel atık su arıtma yöntemleriyle atık sulardan neredeyse hiç uzaklaştırılmazlar. Boya içeren atık sular bir takım fizikokimyasal işlemlerle arıtılabilir, ancak bu yöntemlerin bazıları ksenobiyotikleri parçalayamaz, bu da kirlilik transferine neden olur ve zararlı atık yan ürünler üretilir (Robinson et al., 2001; Kadam et al., 2020). Dolayısıyla atık su arıtımı için ileri teknolojiye ihtiyaç duyulmaktadır.

Günümüzde tekstil atık sularından istenmeyen renk ve toksisitenin giderilmesi için mikroorganizmaların kullanıldığı biyolojik arıtma, diğer konvansiyonel arıtma proseslerine göre cazip bir yaklaşım haline gelmiştir (Kumar et al., 2016). Bu amaçla mikrobiyal enzimler atık su arıtımında çok uygun bir aday olabilir (Jun et al., 2019). Kirleticileri parçalayan mikrobiyal toplulukların incelenmesi, biyoremediasyonun temelini oluşturur (Peixoto et al., 2008). Biyoremediasyonda mikroorganizmaların kullanılması, kirleticinin potansiyel mineralizasyonunu ve daha az tehlikeli yan ürünlere dönüşümünü garanti altına almak için biyoteknolojik bir seçenek olarak görülebilir. Kirleticileri daha hızlı bir şekilde gidermek için tekrar tekrar kullanılabilirlerinden, enzimatik sistemler özellikle atık su arıtımında çok önemlidir (Sharma et al., 2018).

### 2.8.1. Endüstriyel Boyalar

Tüm dünyada yaklaşık 10.000 farklı tipte boya ve pigment, renk verici özellikleri nedeniyle deri, kağıt, kozmetik ve tekstil endüstrileri gibi çeşitli önemli endüstrilerde kullanılmaktadır. Her yıl tahminen 800.000 ton renklendirici üretilmektedir (Hassaan et al., 2017). Tekstil endüstrisinin (%54), kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinin (%10), boyama endüstrisinin (%21), boya endüstrisinin (%8) ve boya üretim endüstrisinin (%7) önemli miktarlarda boya atığı ürettiği bilinmektedir (Mojsov et al., 2016). Boyalar, boyama işlemi sırasında hedef elyaflara tam olarak bağlanmadığından, atık su ile birlikte nehir, göl, dere gibi su kaynaklarına deşarj edilmekte, aromatik ve kompleks yapıları nedeniyle doğada kalarak ciddi çevresel tehditlere neden olmaktadır (Al-Tohamy et al., 2022). Bu boyalar; sudaki çözünmüş oksijen seviyesini azaltabilir, pH seviyesinin değişmesi nedeniyle sucul kaynakların kimyasal ve biyokimyasal oksijen ihtiyacı seviyelerinde artışa sebep olabilir, güneş ışığını engelleyebilir, gaz çözünürlüğünü azaltabilir böylelikle ötrofikasyon sorunlarına yol açabilir (Kishor et al., 2021a).

Tekstil boyaları, görünür spektrumdaki (400-700 nm) ışık radyasyonunu absorbe etme kapasiteleri ile karakterize edilen ve azo ( $N=N-$ ), karbonil ( $-C=O$ ), nitro ( $-N=O$ ) ve kinoid grupları gibi en az bir kromofor grubuna (renk taşıyan grup) sahip olan aromatik ve heterosiklik bileşiklerdir. Kromoforların yanı sıra çoğu boya, hidroksil ( $-OH$ ), amin ( $-NH_2$ ), karboksil ( $-COOH$ ) ve sülfonat ( $-SO_3H$ ) başta olmak üzere oksokrom grupları içerir (Kishor et al., 2021a).

Boyalar, farklı substratlardaki uygulama yöntemine, boyama mekanizmasına veya kimyasal yapıya, özellikle de kromofor grubunun doğasına göre sınıflandırılabilir (Berradi et al., 2019; Tkaczyk et al., 2020; Magalhães et al., 2024). Kimyasal yapılarına ve çözünürlüklerine göre boyarmaddelerin sınıflandırılması Çizelge 2.1'de verilmiştir (Berradi et al., 2019; Ardila et al., 2021; Kishor et al., 2021a).

**Çizelge 2.1** Kimyasal yapılarına ve çözünürlüklerine göre boyarmaddelerin sınıflandırılması (Berradi et al., 2019; Ardila et al., 2021; Kishor et al., 2021a)

<b>Kimyasal Yapılarına Göre Boyar Maddeler</b>	<b>Örnek Boyalar</b>
Azo	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Kongo kırmızısı</li> <li>○ Metilen mavisi</li> <li>○ Metil turuncusu</li> <li>○ Metil kırmızısı</li> <li>○ Reaktif siyah 5</li> <li>○ Orange G</li> <li>○ Amarant</li> </ul>
Antrakininon	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Alizarin</li> <li>○ Reaktif mavi 4</li> <li>○ Asit mavisi 25</li> <li>○ Remazol Brilliant Blue R</li> </ul>
Trifenilmetan	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Bazik kırmızı 9</li> <li>○ Kristal viyole</li> <li>○ Malaşit yeşili</li> <li>○ Bromfenol mavisi</li> <li>○ Anilin mavisi</li> </ul>
Nitro ve nitrozo	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Naftol sarısı</li> <li>○ Mordan yeşili 4</li> <li>○ Dispers sarı 14</li> <li>○ Dispers sarı 26</li> </ul>
İndigo	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ İndigo mavisi</li> <li>○ Asit mavisi 74</li> </ul>
Ksanten	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Fluoresein</li> <li>○ Rodamin 6G</li> <li>○ Rodamin 123</li> </ul>
Akridin	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Akridin turuncusu</li> </ul>
Ftalein	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Timolftalein</li> <li>○ Fenolftalein</li> </ul>

---

### Çözünürlüklerine Göre Boyarmaddeler

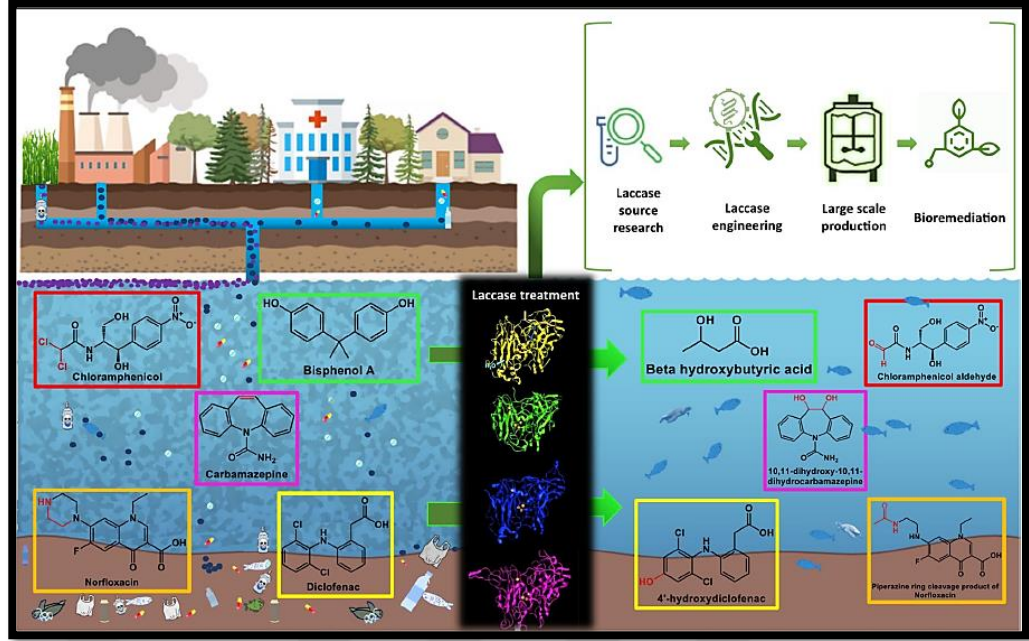
---

Suda çözünen boyalar	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Asit boyalar</li> <li>○ Anyonik boyalar</li> <li>○ Bazik boyalar</li> <li>○ Reaktif boyalar</li> <li>○ Direkt boyalar</li> </ul>
Suda çözünmeyen boyalar	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Dispers boyalar</li> <li>○ Vat boyaları</li> <li>○ Kükürt boyaları</li> <li>○ Pigmentler</li> </ul>

---

### 2.9.Biyoremediasyonda Lakkazın Kullanım Potansiyeli

Atık suyun arıtılması söz konusu olduğunda, biyoremediasyonun genellikle fizikokimyasal tekniklere göre önemli bir fayda sağladığı kabul edilmektedir (Robinson et al., 2001; Dos Santos et al., 2007). Lakkazların temel özelliklerinden biri, indirgeyici substrattan bir elektron çıkarmak için gereken enerji ile doğrudan ilişkili olan redoks potansiyelleridir ( $E^\circ$ ) (Shleev et al., 2004). Bu nedenle fungal lakkazlar gibi yüksek  $E^\circ$ 'ye sahip lakkazlar, biyoteknolojide özel ilgi görmektedir; çünkü yüksek  $E^\circ$ 'ye ( $E^\circ > 400$  mV) sahip substratları oksitleyebilme kapasitesine sahiptirler (Shleev et al., 2004; Agrawal et al., 2018). Örneğin, azo boyası BR114, p-nonilfenol ve bisfenol A (BPA) 600 mV'un üzerinde  $E^\circ$  değerlerine sahiptir (Tavares et al., 2009). Fungal lakkazlar, polisiklik aromatik hidrokarbonların (PAH'lar), plastiklerin, fenolik bileşiklerin, polimerik, azo, reaktif, heterosiklik boyaların oksidasyonu ve farmasötik olarak aktif bileşiklerin bozunması yoluyla biyoremediasyona yardımcı olur (Arregui et al., 2019) (Şekil 2.8).

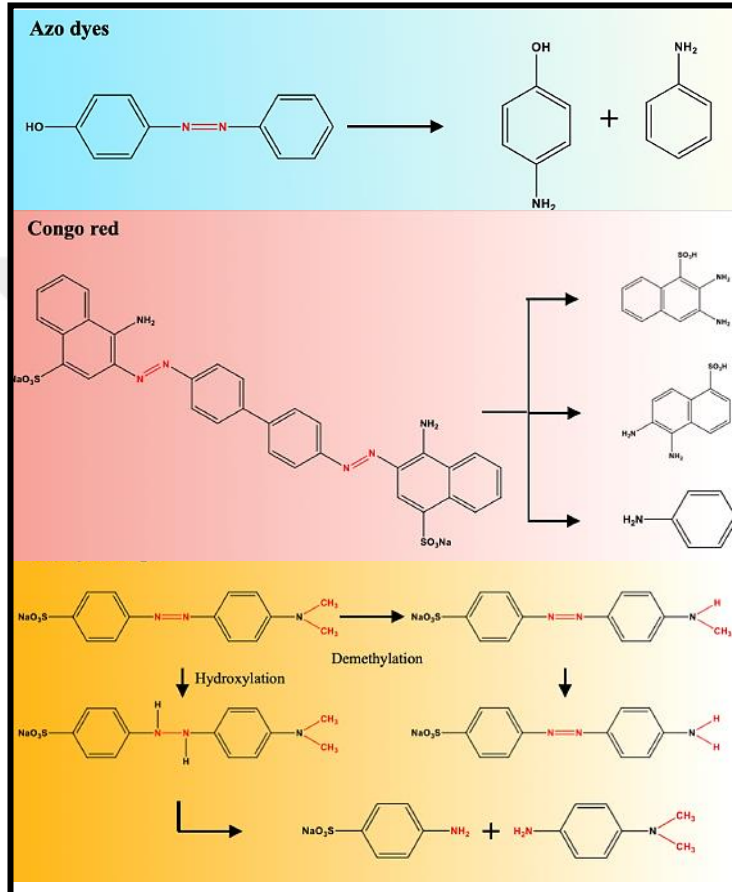


**Şekil 2.8** Potansiyel su kirleticileri ve bunların lakkazlarla biyoremediasyonunun gösterimi (Arregui et al., 2019).

Substrat, serbest radikaller üretmek için elektronları çeken lakkaz enzimi tarafından oksitlenir. Daha sonra bu elektronları alır ve moleküler oksijenin suya dönüştürülmesine yardımcı olur (Shraddha et al., 2011). Enzimatik reaksiyonlar, hem daha az toksik olan hem de ana boyalardan daha küçük boyutta olan bozunma ürünleri üretir. Bu durum spesifik boyalara, yapısına, kullanılan belirli lakkaza ve biyolojik bozunma işlemi sırasındaki reaksiyon koşullarına bağlıdır (Legerska et al., 2016). Belirli durumlarda lakkaz tarafından katalize edilen bozunma ürünü, renginde azalma sergileyebilir veya renksiz hale gelebilir. Bu tür ürünler daha sonra diğer mikroorganizmalar veya enzimler tarafından daha fazla parçalanabilir. Bu da onların  $\text{CO}_2$  ve su gibi daha basit bileşiklere dönüşerek boyanın tamamen mineralleşmesine olanak tanır, böylece çevreden uzaklaştırılmasına yol açar (Jeyabalan et al., 2023) (Şekil 2.9).

Kirleticilerin enzim destekli dönüşümü; karmaşık bir maddeyle reaksiyona girme eğilimleri, hızlı bozunmaları, daha az toksik yan ürünler meydana getirmeleri ve uygun maliyetli olmaları nedeniyle; geleneksel tekniklere kıyasla daha çekici bir alternatif haline gelmiştir (Saravanan et al., 2021). Bu avantajlar, lakkaz enziminin

çeşitli endüstrilerdeki boyaların renksizleştirilmesindeki kapsamını arttırmıştır (Jeyabalan et al., 2023). Geniş substrat spesifikliği ve kofaktörlere ihtiyaç duyulmaması, lakkazın çevrede bulunan çeşitli toksik bileşiklerin dönüştürülmesi ve parçalanması yoluyla biyoremediasyonda kullanılması için mükemmel bir aday olmasını sağlamaktadır.



Şekil 2.9 Farklı boyaların lakkaz yoluyla olası renk giderme mekanizması (Jeyabalan et al., 2023).

## 2.10. Sucul Sistemlerin Biyoteknolojik Önemleri

Denizlerin (tuzlu suların) ve tatlı suların oluşturduğu ekosistemlere ‘sucul ekosistemler’ adı verilir. Sucul ekosistemler, olumsuz koşullardan doğrudan etkilenen hassas yaşam alanlarıdır (Kılıçık, 2021).

Enzimler, ikincil metabolitler, tıbbi bileşikler ve biyolojik olarak aktif kimyasallar deniz ortamlarında bol miktarda bulunur. Biyokatalitik işlemlerde

kullanılan deniz enzimleri, biyoteknolojideki uygulamalarla önemli bir doğal ürün haline gelmiştir (Zhang et al., 2021). Çeşitli biyolojik kaynaklardan elde edilebilen enzimlerden en tutarlı olanları mikroorganizmalardan elde edilenlerdir (Pradeep et al., 2015). Ayrıca üretimlerinin nispeten daha ucuz olması, her zaman doğru bileşime sahip ham maddelere kolay erişime sahip olmaları, hızlı büyümeleri ve açıkça tanımlanmış hücre metabolizmasına sahip olmaları gibi avantajları bulunmaktadır (Sharma et al., 2021; Panda et al., 2021). Deniz mikroorganizmalarından elde edilen enzimler; aşırı pH, tuzluluk ve sıcaklık koşullarında çalışabilme kapasiteleri ve zorlu ortamlarda hayatta kalabilme yeteneklerinden dolayı, araştırmalarda ve çeşitli endüstrilerde yüksek talep görmektedir (Kuddus, 2021; Kumawat et al., 2022; Ghattavi and Homaei, 2023).

### **2.11. Biyoremediasyonda Biyoinformatik**

Büyük biyolojik veri setlerinin bilgisayar tabanlı analiziyle ilgilenen bilim dalı olan biyoinformatik; modern biyoteknolojide uygulanmak üzere hücresel ve moleküler düzeylere odaklanan biyoloji ve bilgi teknolojisinin birleşimidir. Biyoinformatik; makromoleküler diziler, yapılar, ifade profilleri ve biyokimyasal yollar gibi biyolojik veri kümeleri arasındaki ilişkileri analiz etmek ve belirlemek için verileri depolamak ve aramak için istatistiksel araçların ve algoritmaların geliştirilmesini içerir (Fulekar and Jaya, 2008).

Biyoinformatik; biyoremediasyon alanına girerek yeni bir önem kazanmıştır. Çalışmamız kapsamında da; biyoremediasyon alanında uygulanan biyoinformatik bir araca odaklanılmaktadır. Biyoinformatik, diğer tüm tekniklerden daha hızlı ve sağlam bir şekilde biyoremediasyon için hedefi tarama modu sunmaktadır. Bir sonraki bölümde anlatılacak olan moleküler kenetleme yöntemi, halihazırda karakterize edilmiş enzim tarafından kirleticinin bozunma duyarlılığının taranması için bir fikir sağlar. Degradasyon olasılığının tahmin edilmesi yoluyla boya-enzim etkileşim analizleri, substratların özgülüğünü değerlendirmek için bir yol sunmaktadır (Srinivasan et al., 2019).

*In vitro* çalışmalar, canlı organizma dışındaki mikroorganizmalar, hücreler veya biyolojik moleküller kullanılarak laboratuvar ortamında gerçekleştirilen

çalışmalardır. Bu çalışmalar, test tüpleri, şişeler veya petri plakaları gibi ekipmanlarla gerçekleştirilir (Kuramochi and Sakakibara, 2005; Klein, 2010). Biyolojik çevreden izole edilen organizmaları kullanan çalışmalar, tüm organizmalarla yapılabilecekten daha kapsamlı ve daha uygun bir analiz yapmayı sağlar. Bununla birlikte, *in vitro* deneylerin sonuçları, bütün bir organizma üzerindeki etkilerini tam ve doğru bir şekilde göstermeyebilir (Relman, 1998; Smith, 2001; Lipinski and Hopkins, 2004; Atanasov et al., 2015; Altuntaş ve Gök, 2020). Çeşitli *in silico* yöntemler, deneysel yaklaşıma destek sağlama ve alternatif oluşturmak için geliştirilmiştir. *In silico* çalışmalar; bilgisayar veya simülasyonlar ile gerçekleştirilen çalışmalardır (Vivona et al., 2008). Adını bilgisayar teknolojilerinde yoğun kullanılan silikona atfen almıştır. Protein tasarımı, biyoproses optimizasyonu, hücre davranışlarının modellenmesi gibi alanlarda *in silico* teknikler kullanılabilir (Lescot et al., 2002; Wishart et al., 2006). Yüksek maliyetli laboratuvar deneylerine ve klinik araştırmalara olan ihtiyaç, *in silico* çalışmalarla azaltılabilir (Altuntaş ve Gök, 2020).

Boyaların lakkaz aracılı giderimi için *in vitro* ve *in silico* yönteminin birleşik çalışmasına yönelik raporlar yakın zamanda gerçekleştirilmiş ve *in vitro* sonuçların *in silico* sonuçlarla iyi bir uyum içinde olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle bu birleşik yaklaşım, boyaların enzime bağlanma afiniteleri açısından sıralanmasına yardımcı olabilir ve enzim aracılı iyileştirme metodolojisi için uygulanabilir (Kumar et al., 2016). Dolayısıyla; enzim için uygun olmayan boyaların laboratuvar koşullarında maliyetli ve zaman alan analizlerinin gerçekleştirilmesine gerek kalmadan doğru hedeflerin belirlenmesine imkan sağlar.

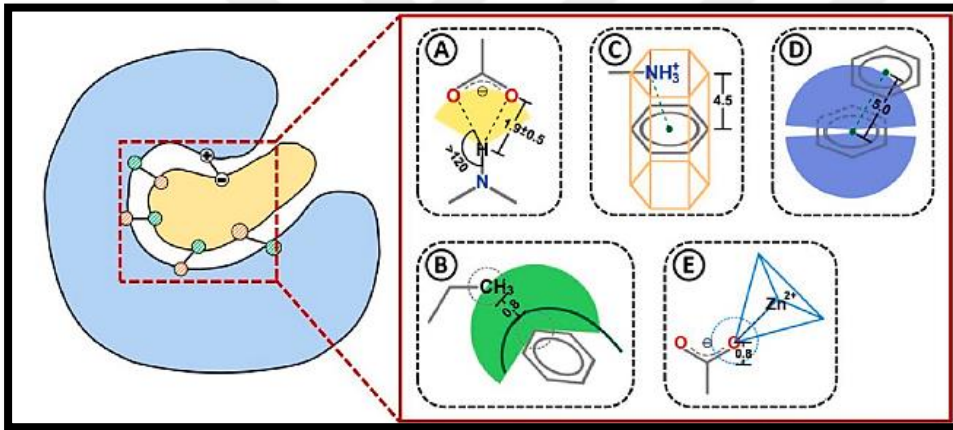
## 2.12. Moleküler Kenetleme (Docking)

Literatürde moleküler simülasyon tekniklerinin ana temelini, molekül yapının görsel olarak tanınmasını sağlayan bir bilgisayar platformu olduğu belirtilmektedir (Wang et al., 2022). Moleküler simülasyon yöntemlerinin uygulanmasının birçok deneysel materyalden tasarruf edilmesine ve aynı zamanda tekrarlanan deneyler için harcanan zaman ve enerjinin azaltılmasına yardımcı olduğu kanıtlanmıştır (Yu et al., 2023).



### 2.12.1. Moleküller Arası Etkileşimler

Ortak moleküller arası kuvvetler arasında hidrojen bağları, iyonik bağlar, van der Waals kuvvetleri,  $\pi$ - $\pi$  istiflenmesi, hidrofobik etkileşimler ve elektrostatik etkileşimler bulunur (Şekil 2.11). Hidrojen atomları ile oksijen, nitrojen ve sülfür gibi bazı elektronegatif atomlar arasında hidrojen bağları oluşur. Hidrofobik etkileşim; hidrofobik grupların sudan kaçınmak için yakın bir şekilde bir araya toplanması olgusunu ifade eder.  $\pi$ -kasyon etkileşimi, bir kasyon ile konjuge  $\pi$  elektron bulutu arasındaki güçlü, kovalent olmayan bir etkileşimdir. Negatif yüklü peptitler veya amino asitler metal iyonları ile kolayca etkileşime girdiğinde iyonik etkileşimler oluşur. Reseptörlerin ve ligandların afinitesini değerlendirmek için, bu kuvvetlerin çok önemli olduğu düşünülmektedir (Bai et al., 2023).



**Şekil 2.11** Moleküller arası etkileşimler. A: hidrojen bağı; B: hidrofobik etkileşim; C:  $\pi$ -kasyon etkileşimi; D:  $\pi$ - $\pi$  yığın etkileşimi; ve E: tuz köprüsü (iyonik bağ) (Bai et al., 2023; Yu et al., 2023).

### 2.12.2. Moleküler Kenetleme Metodolojileri

Yerleştirme simülasyonlarının hedeflerine bağlı olarak ligand ve reseptörlerin çeşitli moleküler yerleştirme prosedürleri vardır (Chen et al., 2020):

- i. Rijit kenetleme
- ii. Esnek kenetleme
- iii. Yarı esnek kenetleme

Rijit kenetleme hesaplama sürecinde ligandların ve reseptörlerin konformasyonu değişmez, sadece iki molekülün uzaysal konumu ve duruşu değişir (Ewing et al., 2001). Esnek yerleştirme hesaplamasında hem ligand hem de reseptörün konformasyonları değişebilir (Feng et al., 2011). Yarı esnek yerleştirme hesaplamasında reseptörün konformasyonu değişmez ve sadece ligandın konformasyonu, bazı kritik olmayan parçaların bağ açısı ve uzunluğunun sabitlenmesi gibi belirli bir aralıkta değişebilir. Bu kenetlenme yöntemi, modelin hem hesaplanabilmesi hem de tahmin edilebilmesi nedeniyle küçük moleküller ve proteinler, enzimler ve nükleik asitler gibi biyomakromoleküller arasındaki kenetlenme simülasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır (Kitchen et al., 2004).

### 2.12.3. Moleküler Kenetleme Aşamaları

Bu çalışma kapsamında AutoDock Tools yazılımı kullanıldığı için; moleküler kenetleme aşamaları bu programa yönelik hazırlanmıştır. AutoDock, farklı konformasyonlara sahip ligandları hesaplamak için Lamarck genetik algoritmasını kullanan, ücretsiz kenetleme yazılımıdır (Lazarova, 2008). Moleküler kenetleme işleminin basamakları aşağıda ve Şekil 2.12'de verilmiştir:

*1.adım:* Moleküllerin Veritabanlarından Alınması

Kenetleme işlemine geçmeden önce ligandların ve reseptörlerin moleküler yapılarının belirlenmesi gerekir. Protein yapıları genellikle 120.000'den fazla benzersiz protein yapısının belirlendiği Protein Veri Bankası (PDB) web sitesinden (<https://www.rcsb.org/>), PDB formatında elde edilir (Astrakas et al., 2011).

Bildirilen bir protein yapısının olmaması durumunda protein modelini oluşturmak için çevrimiçi sunucu SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) uygulanabilir (Zhao et al., 2023).

Ligand yapıları için PubChem Compound Database (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Kim et al., 2016), ZINC (<https://zinc12.docking.org/>) (Irwin and Shoichet, 2005) ve DrugBank (<https://go.drugbank.com/>) (Wishart et al., 2018) gibi veritabanları kullanılabilir. İndirilen dosyaların MOL, SMILES, SDF gibi formatlarını kenetleme işlemi için gerekli olan PDB dosya formatına dönüştürülebilmesi amacıyla Open Babel programı (<https://openbabel.org/docs/dev/Installation/install.html>) (O'Boyle et al., 2011) kullanılmaktadır. Çünkü AutoDock yazılımı yalnızca PDB formatındaki dosyaları tanıyabilmektedir (Rauf et al., 2015).

### *2.adım: Molekül Yapılarının Hazırlanması*

PDB metin dosyası olarak indirilen proteinin tüm heteroatomları silinir ve protein iki zincirli ise, her iki zinciri de benzer olduğundan ve ligandlar iki zincirden birine bağlanacağından ikinci zincirin silinmesi gerekir (Rauf et al., 2015). Bu aşamalar için Biovia Discovery Studio Visualizer 2021 programı (<https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>) kullanılabilir.

### *3.adım: Protein ve Ligand için PDBQT Formatının Hazırlanması*

Protein ve ligandın PDBQT formatları, AutoDock Tools yazılımı kullanılarak hazırlanır (<http://mgltools.scripps.edu/downloads>) (Rauf et al., 2015).

### *Protein İçin PDBQT Dosyasının Hazırlanması*

Önceki adımda oluşturulan protein PDB dosyasını açmak için AutoDock Tools yazılımının kullanılması gerekir. Polar hidrojen atomları düzenlenir. Yükleri düzenlemek için Kollman yükleri seçilir (Rauf et al., 2015).

Kenetleme programı, hedeflenen protein bölgesine ligandı yerleştirir. Bunu gerçekleştirirken 3 boyutlu yapıları kullanır. Kenetleme sonucunda oluşan enerji terimlerini sıralar (Gürşün, 2018). Bağlanma yeri bilgisi eksik ise 'Kör Yerleştirme' yöntemi uygulanır. Bu yöntem, hedef yapının tamamını aramak ve uygun bir ligand bağlanma bölgesi bulmak için yerleştirme tekniklerini kullanır. AutoDock Tools yazılımında protein, makromolekül olarak seçilir. Tüm protein, bağlanma bölgesini belirlemek için kör yerleştirme yöntemi kullanılarak üç boyutlu bir kutucuk olan "grid kutusu" içine alınır. Kenetleme yapılacak alanın kartezyen koordinatları bu grid kutusu tarafından sağlanır. Protein, PDBQT formatında kaydedilir (Rauf et al., 2015).

#### Ligand için PDBQT Dosyasının Hazırlanması

Ligand seçilir ve kök (root) tespiti için burulma ağacına (torsion tree) tıklanır. Burulma sayısını seçmek için bir kez daha burulma ağacına tıklanır. PDBQT olarak ligand çıktısı kaydedilir (Rauf et al., 2015).

#### 4.adım: Konfigürasyon Dosyasının Hazırlanması

Kenetleme aşamasından önce protein ve hesaplama yapılacak ligand dosyası bilgileri, hedef alınan ve kenetleme alanının kartezyen koordinatları ve kenetleme bölgesinin genişliği gibi özelliklerden oluşan bir konfigürasyon dosyası oluşturmak gerekir (Rauf et al., 2015).

#### 5.adım: Kenetleme İşlemi

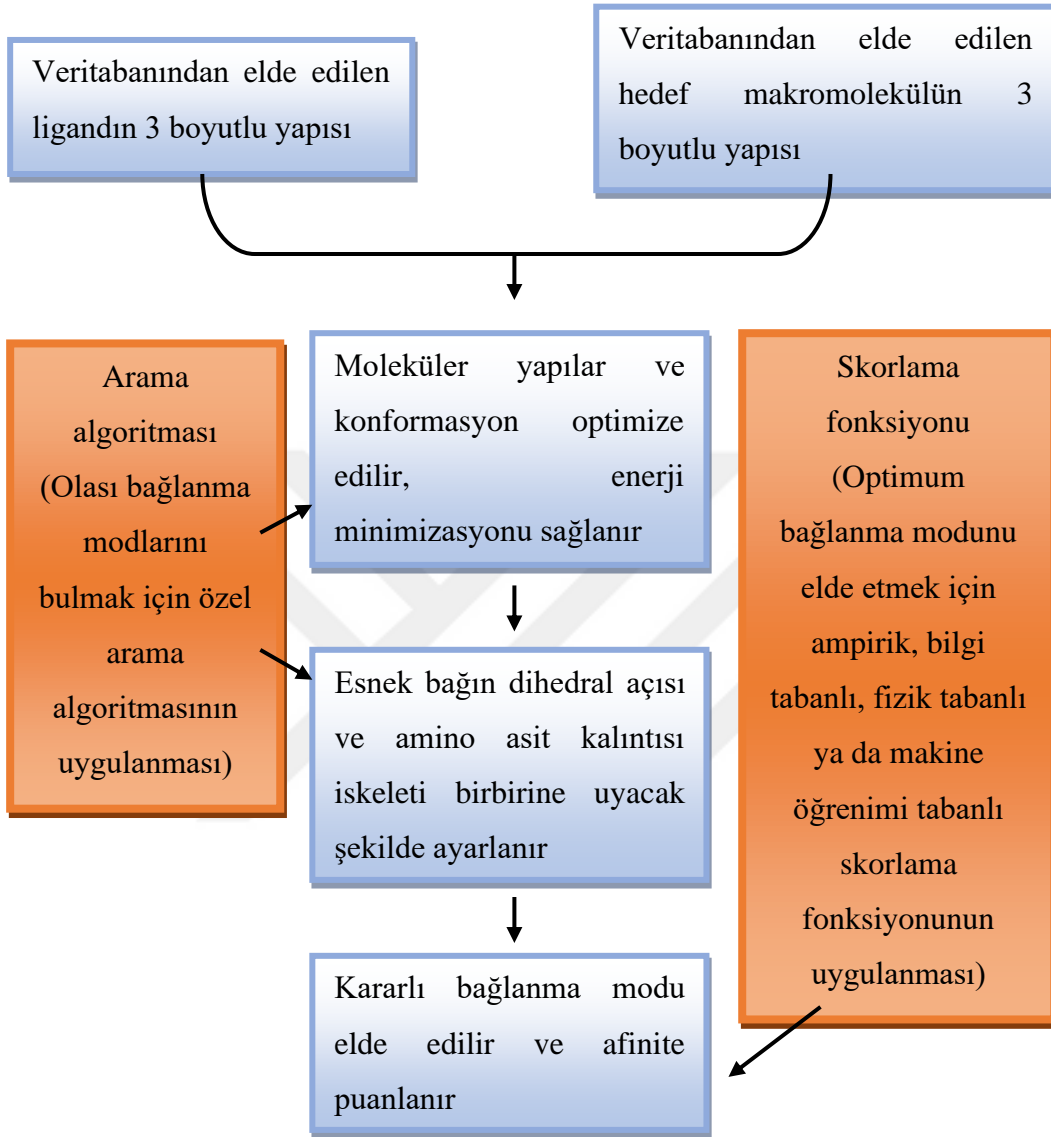
Hazırlanan girdi dosyaları ile bilgisayara sırasıyla aşağıdaki komutlar verilir; daha sonra yönetici olarak çalıştırılır ve kenetleme işlemi başlatılır (Rauf et al., 2015).

*cd. kopyalanan dosya dizini yapıştırılır*

vina.exe (boşluk) - - config (boşluk) conf.txt (boşluk) - - log (boşluk) log.txt

vina\_split.exe (boşluk) - - input (boşluk) sonuc.pdbqt

Son aşamada, moleküler görselleştirme programları kullanılarak protein üzerindeki ligandın farklı konformasyonları hakkında bilgi edinilir.



Şekil 2.12 Moleküler kenetleme işlemi (Fan et al., 2019).

#### 2.12.4. Arama Algoritmaları

Moleküllerin çözücü tarafından erişilebilir yüzey alanlarının eşleşmesi, ligand ile reseptör aktif bölgesi arasındaki eşleşmeyi sağlar. Ligand ve/veya reseptörün esnek olduğu durumlarda, ligand ile reseptörün eşleşmesi için arama alanı olarak adlandırılan çeşitli konformasyonlar bulunur (Lengauer and Rarey, 1996; Koehl and Levitt, 1999; Sarı, 2018). Protein-ligand etkileşiminde ortaya çıkan kompleks yapı, en düşük bağlanma serbest enerjisine sahip olmalıdır (Olsson

et al., 2008). Bununla birlikte, düşük serbest enerji konformasyonuna sahip ligand-reseptör komplekslerini hızlı bir şekilde bulmak için etkili arama tekniklerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Düşük serbest enerji konformasyonuna sahip ligand-reseptör komplekslerini hızlı bir şekilde bulmak için kenetleme yazılımları farklı stratejiler kullanır ve konformasyonel arama yöntemleri genellikle ikiye ayrılır (Chen et al., 2020):

- i. Kapsamlı arama
- ii. Sezgisel arama

Kapsamlı arama algoritmaları; net çözümler ve kurallar bulunmadığında problemin çeşitli olası durumlarını tek tek saymak ve değerlendirme ilkeleri ile gereksinimleri karşılayan koşulları, problemin aday çözümleri olarak seçmektir. Bununla birlikte sezgisel arama; enerji skoruna bağlı olarak ligand konformasyonunu optimize etmeden ve seçmeden önce, kenetleme sistemindeki ligand moleküllerinin öteleme ve dönme işlemlerini rastgele kodlar ve en düşük enerjiye sahip ligand molekülü konformasyonunu bulur (Hogues et al., 2018; Chen et al., 2020). Şu anda, moleküler kenetlenmedeki temsili sezgisel arama algoritmaları Monte Carlo algoritması (Metropolis et al., 1953), genetik algoritma (Holland, 1975) ve sürü zekası algoritması (Hinchey et al., 2007) olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır.

### 2.12.5. Skorlama Fonksiyonları

Bir moleküler kenetleme programının arama algoritması tarafından üretilen karmaşık konformasyonları puanlaması ve yerel yapılara yakın yapıları seçmesi için hassas bir puanlama işlevi gereklidir (Chen et al., 2020). Araştırmacılar, farklı varsayımlar veya algoritmalar üzerine formüle edilmiş çeşitli skorlama fonksiyonları geliştirmişlerdir (Huang et al., 2010; Li et al., 2018; Su et al., 2018).

Skorlama fonksiyonları dört kategoriye ayrılabilir:

- i. Fizik tabanlı skorlama fonksiyonları
- ii. Bilgi tabanlı skorlama fonksiyonları

- iii. Ampirik skorlama fonksiyonları
- iv. Makine öğrenimi skorlama fonksiyonları (Liu and Wang, 2015; Yang et al., 2022).

Van der Waals etkileşimleri (Lennard-Jones potansiyeli), elektrostatik etkileşimler (coulombic potansiyeli) ve desolvasyon enerjileri gibi moleküler fizik terimleri fizik tabanlı puanlama fonksiyonlarının temelini oluşturur. Bilgi tabanlı skorlama fonksiyonları, Ters Boltzmann istatistiksel prensibine dayanır. Çok çeşitli protein-ligand komplekslerinin üç boyutlu yapılarından istenilen ikili potansiyelleri çıkarmakta olup, doğrudan fiziksel bir yorumdan yoksundur. Ampirik puanlama fonksiyonları; Van der Waals, elektrostatik, hidrojen bağı, hidrofobik, desolvasyon, entropi vb. puanlama terimlerine dayalı olarak protein ligand komplekslerinin bağlanma afinitesini hesaplar. Varsayılan matematiksel fonksiyonel forma sahip klasik skorlama fonksiyonlarından farklı olarak, makine öğrenimi tabanlı skorlama fonksiyonları; Destek Vektör Makinesi (SVM) (Cortes and Vapnik, 1995), Rastgele Orman (RF) (Liaw and Wiener, 2002), eXtreme Gradient Boosting (XGB) (Chen and Guestrin, 2016), Derin Sinir Ağı (DNN), Evrimsel Sinir Ağı (CNN) ve Grafik Sinir Ağı (GNN) gibi çeşitli makine öğrenme algoritmalarını kullanır. Karmaşık etkileşimler, önceden belirlenmiş bir fonksiyonel forma ihtiyaç duyulmadan makine öğrenimi puanlama fonksiyonları ile dolaylı olarak yakalanabilir (Ain et al., 2015; Li et al., 2021).

#### **2.12.6. Moleküler Kenetleme Yazılımları**

Ücretsiz kenetleme yazılımları DOCK, AutoDock, AutoDOCKVina, 3D-DOCK, LeDock, rDock, UCSF DOCK, Surflex ve HEX'dir. Ticari yazılımlar ise Glide, FlexX, GOLD, Surflex-Dock, MOE Dock, MCDOCK, ICM-Dock ve LigandFit vb.dir (Pagadala et al., 2017). Bu programların farklılık göstermesinin nedeni, kenetleme pozu belirlemede kullanılan algoritma ve skorlama fonksiyonlarının farklı olmasıdır (Gürşün, 2018). Bazı moleküler kenetleme yazılımları Çizelge 2.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2 Moleküler kenetleme yazılımları (Fan et al., 2019; Bai et al., 2023).

PROGRAM	ARAMA ALGORİT-MASI	SKORLAMA FONKSİYONU	HIZI	PROSEEDÜR	UYGULAMA ALANLARI
<b>FlexX</b> (Kramer and Rarey, 1999)	Parçalama algoritması	Serbest enerjiye ilişkin yarı ampirik hesaplama	Hızlı	Yarı esnek	Küçük molekül veritabanlarının sanal olarak taranması için kullanılabilir.
<b>Gold</b> (Verdonk et al., 2003)	Genetik algoritması	Serbest enerjiye ilişkin yarı ampirik hesaplama	Hızlı	Esnek	Doğruluğu ve güvenilirliği yüksek düzeyde değerlendirilmiştir.
<b>Glide</b> (Halgren et al., 2004)	Kapsamlı sistematik algoritma	Serbest enerjiye ilişkin yarı ampirik hesaplama	Orta	Esnek	Arama aralığını daraltmak için etki alanı bilgisini kullanır. Ekstra hassasiyet, standart hassasiyet ve yüksek sanal ekran modlarına sahiptir. Doğru bağlama modlarını güvenilir bir şekilde tanımlar.
<b>AutoDock</b> (Morris et al., 2009)	Lamarckian genetik algoritması	Serbest enerjiye ilişkin yarı ampirik hesaplama	Orta	Yarı esnek	Substratlar veya ilaç adayları gibi küçük moleküllerin bilinen 3 boyutlu yapıya sahip bir reseptöre nasıl bağlanacağını tahmin etmek için tasarlanmıştır.

<b>ZDOCK</b> (Chen et al., 2003)	Geometrik tamamlayıcılık ve moleküler dinamik	Moleküler kuvvet alanı	Orta	Rijit	İkili şekil tamamlayıcılığını desolvasyon ve elektrostatik ile birleştiren, ZDOCK sunucusunu geliştiren yeni bir puanlama fonksiyonu önerilmektedir.
<b>RDOCK</b> (Li et al., 2003)	Genetik algoritması  Monte Carlo  Tek yönlü minimizasyon	Moleküler kuvvet alanı	Orta	Rijit	İyileştirme ve puanlama için CHARMM tabanlı prosedür.
<b>LeDOCK</b> (Zhao and Caflich, 2013)	Simüle edilmiş tavlama  Genetik Algoritma	Moleküler kuvvet alanı	Hızlı	Esnek	Hızlı olması ve yüksek doğruluk sergilemesi nedeniyle sanal ekran görevi için önerilmektedir. Zayıf yönü, yerleştirme pozlarının sayısını değiştirememektir.
<b>Dock</b> (Lang et al., 2009)	Parçalama algoritması	Moleküler kuvvet alanı	Hızlı	Esnek	Esnek proteinler ve ligandlar arasındaki yerleştirmede kullanılır.
<b>AutoDock Vina</b> (Trott and Olson, 2010)	Genetik algoritma	Serbest enerjiye ilişkin yarı ampirik hesaplama	Hızlı	Yarı esnek	AutoDock Vina yinelenen bir yerel arama global iyileştiricisi kullanır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Gereçler

Sentetik boya ların ağartılmasında, beyaz çürükçül basidiomisetler dışındaki filamentli askomisetler, askomisetik mayalar ve mitosporik fungusların da gösterilmesine rağmen; bu funguslar önemli ölçüde daha az ilgi görmüştür (Zheng et al., 1999; Forgacs et al., 2004). Çalışmamız kapsamında; Toker (2018) tarafından Çakalburnu Lagünü ile bağlantılı İnciraltı Sahili'nden izole edilen, deniz orijinli bir askomiset olan *Phoma* sp. K21 ile çalışılmıştır.

#### 3.1.1. *In silico* Renk Giderimi (Dekolorizasyon) Çalışmasında Kullanılan Yazılımlar

##### *Yazılım 1.* AutoDock 4.2

*Phoma* sp.'nin fungal lakkazının çalışmada kullanılacak boyalar ile kenetleme çalışması, Autodock 4.2 (Morris et al., 1998) kullanılarak yapılmıştır.

##### *Yazılım 2.* UCSF Chimera

UCSF Chimera, moleküler görüntüleme ve modelleme programıdır. "UCSF Computer Graphics Laboratory" tarafından hazırlanmıştır. Biyohesaplama bilgilerini ve görsel bilgi kaynaklarını WHO tarafından geliştirmektedir (Yang et al., 2012). Bu çalışmada ligandların enerji minimizasyonu için UCSF Chimera programı kullanılmıştır.

##### *Yazılım 3.* Biovia Discovery Studio Visualizer

Moleküler kenetleme sonucunda elde edilen en uygun bağlanma modları Autodock 4.2 (Morris et al., 1998) ile belirlenmiş, Biovia Discovery Studio Visualizer 2021 programı (Dassault Systèmes Biovia Inc., 2020) kullanılarak, enzim ile boyalar arasındaki etkileşimleri içeren görseller elde edilmiştir.

### 3.1.2. Kullanılan Besiyerleri

Bu tez çalışmasında; izolat aktivasyonu, lakkaz aktivite ölçümü ve dekolorizasyon deneylerinde kullanılan besiyerleri aşağıda verilmiştir:

#### *Besiyeri 1. Malt Ekstrakt Pepton Agar ve Broth (Merck, 105391)*

Malt ekstrakt	30 g/L
Pepton	3 g/L
Agar	15 g/L
Distile su/Deniz suyu	1 L

Malt Ekstrakt Pepton katı ve sıvı besiyeri içeriği hazırlandıktan sonra hem % 50 distile su ve % 50 deniz suyu eklenerek; hem de %100 distile su eklenerek ayrı olarak hazırlanmış ve manyetik karıştırıcıda tamamen çözündürülmüştür. Besiyerleri otoklavda 121°C sıcaklıkta 15 dakika süreyle steril edilmiştir. Malt Ekstrakt Agar, izolatın katı kültür üretimi ve aktivasyonu için kullanılmıştır. Malt Ekstrakt Pepton Broth, lakkaz üretimi ve aktivite ölçümünde kullanılmıştır (Bonugli-Santos et al., 2012).

#### *Besiyeri 2. Glukoz-Maya Ekstraktlı Agar ve Broth*

Glukoz	20,0 g/L
Maya ekstraktı	0,01 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 g/L
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	0,001 g/L
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,01 g/L
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,001 g/L
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,001 g/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5 g/L
Agar	15 g/L
Distile su/Deniz suyu	1 L

Hazırlanan besiyerine hem % 50 distile su ve % 50 deniz suyu eklenerek; hem de %100 distile su eklenerek ayrı olarak hazırlanmış ve manyetik karıştırıcıda tamamen çözüldürülmüştür. Lakkaz aktivitesi için sıvı besiyerleri 250 ml'lik dört adet erlende hazırlanmıştır. İlk erlen, indükleyici içermezken; ikinci erlene 1 mM ferulik asit, üçüncü erlene 1 mM CuSO<sub>4</sub> ve dördüncü erlene 1 mM ferulik asit + CuSO<sub>4</sub> ilave edilmiştir. Besiyerleri otoklavda 121°C sıcaklıkta 15 dakika süreyle steril edilmiştir. Katı ve sıvı ortamlar; izolatın katı kültür üretimi, aktivasyonu ve lakkaz aktivitesi için kullanılmıştır (Ali et al., 2020).

### Besiyeri 3. Muz Kabuklu Czapek-Dox Broth

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 g/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g/L
Maya ekstraktı	0,2 g/L
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01 g/L
NaNO <sub>3</sub>	3,0 g/L
KCl	0,01 g/L
Muz kabuğu	40 g/L
Distile su/Deniz suyu	1 L

Lakkaz indükleyicisi olarak 50 µM'lik konsantrasyonda CuSO<sub>4</sub> eklenmiştir. Karbon kaynağı olarak 70°C'de kurutulan, havan ve tokmak yardımıyla toz haline getirilen muz kabukları, ortama 40 gL<sup>-1</sup>'de eklenmiştir (Naranjo et al., 2007, Elisashvili et al., 2008, Libardi et al., 2012). Besiyerleri hem % 50 distile su ve % 50 deniz suyu eklenerek; hem de %100 distile su eklenerek ayrı olarak hazırlanmış ve otoklavda 121°C sıcaklıkta 15 dakika süreyle steril edilmiştir. Muz Kabuklu Czapek-Dox Broth ortamı *Phoma* sp. K21'in lakkaz üretimi için kullanılmıştır.

#### Besiyeri 4. Pirinç Kepekli Czapek-Dox Broth

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 g/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g/L
Maya ekstraktı	0,2 g/L
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01 g/L
NaNO <sub>3</sub>	3,0 g/L
KCl	0,01 g/L
Pirinç Kepeği	5 g/L
Distile su/Deniz suyu	1 L

Lakkaz indükleyicisi olarak 50 µM'lik konsantrasyonda CuSO<sub>4</sub> eklenmiştir. (Naranjo et al., 2007, Elisashvili et al., 2008, Libardi et al., 2012). Besiyerleri hem % 50 distile su ve % 50 deniz suyu eklenerek; hem de %100 distile su eklenerek ayrı olarak hazırlanmış ve otoklavda 121°C sıcaklıkta 15 dakika süreyle steril edilmiştir. Pirinç Kepekli Czapek-Dox Broth ortamı *Phoma* sp. K21'in lakkaz üretimi için kullanılmıştır.

#### 3.1.3. Tampon ve Çözeltiler

*Çözelti 1.* 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit (ABTS) (Sigma, A1888-1G): Lakkaz aktivitesi ölçümü için substrat stok solüsyonu 5mM ABTS olarak hazırlanmıştır. 10ml uygun tampon çözeltisine 0,0274 g ABTS tartılarak çözüldürülmüş ve lakkaz aktivitesi ölçümünde kullanılmıştır.

*Çözelti 2:* Guaiacol (Sigma, G5502-100G): Ticari olarak sıvı solüsyon 30µl guaiacol, kalitatif lakkaz aktivitesi için 100ml katı besiyerine kullanılırken; 2mM guaiacol, 10 ml uygun tampon çözeltisi ile karıştırılarak lakkaz aktivite ölçümünde kullanılmıştır.

*Çözelti 3:* Siringaldizin (Sigma, S7896-1G): % 0,1 siringaldizin, uygun katı besiyerlerine eklenerek kalitatif lakkaz taramasında kullanılmıştır.

*Çözelti 4:* Tannik Asit (Balmumcu, BM.0773.1000): %0,5 tannik asit uygun katı besiyerlerine eklenerek kalitatif lakkaz taramasında kullanılmıştır.

*Çözelti 5:* Glisin-HCl Tamponu (0,1M pH: 3)

Glisin	0,1876 g
HCl	0,828 ml

Glisin tartılarak 25 ml distile su üzerine eklenmiş, HCl tartılarak 100 ml distile suya eklenmiştir. Glisin çözeltisine 5 ml HCl eklenip pH 3 olarak ayarlanmış ve son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır. Lakkaz aktivitesi ölçümünde kullanılmıştır.

*Çözelti 6:* Sitrat-Fosfat Tamponu (0,1M pH:5)

Sodyum fosfat dibazik dihidrat	0,9075 g
Sitrik asit	0,48025 g
HCl	0,828 ml

Sodyum fosfat dibazik dihidrat ve sitrik asit tartılarak 50 ml distile suya eklenmiş, HCl tartılarak 100 ml distile suya eklenmiştir. Sodyum fosfat dibazik dihidrat ve sitrik asit çözeltisi üzerine 3 ml HCl eklenerek pH 5 olarak ayarlanmış ve son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır. Lakkaz aktivitesi ölçümünde kullanılmıştır (Libardi et al., 2012).

**Çözelti 7: Sodyum Asetat Tamponu (0,01 M, pH:5)**

Sodyum asetat	0,13608 g
Asetik asit	0,06005 g

Her biri ayrı ayrı tartılarak 25 ml distile suya eklenmiş ve tamamen çözündürülmüştür. Asetik asit çözeltisinden 1,05 ml sodyum asetat çözeltisine eklenerek pH 5'e ayarlanmıştır. Son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır. Lakkaz aktivitesi ölçümünde kullanılmıştır.

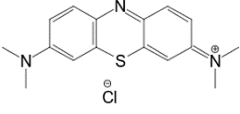
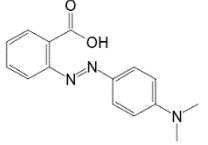
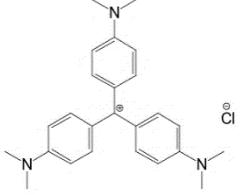
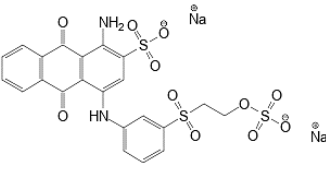
**Çözelti 8: Boya Stok Solüsyonları**

0,1 g tartılan boyalar, 10 ml kendileri için uygun çözümleriyle stok solüsyonları hazırlanmış ve solüsyonlardan 1 ml alınarak, 100 ml'lik besiyerlerine eklenmiştir. Renk giderimi deneylerinde kullanılmıştır.

**3.1.4. *In vitro* Renk Giderimi (Dekolorizasyon) Deneylerinde Kullanılan Boyalar**

Bu tez çalışmasında kullanılan boyaların kimyasal sınıflandırmaları, yapıları, moleküler ağırlıkları ve markaları Çizelge 3.1'de gösterilmektedir. 0,22 µm gözenekli steril şırınga filtresi ile boyalar steril edildikten sonra uygun besiyerlerine ilave edilmiştir.

**Çizelge 3.1** Dekolorizasyon deneylerinde kullanılan boyalar (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, <https://spectrabase.com/>).

BOYA VE PUBCHEM CID	KİMYASAL SINIFLANDIRMA	KİMYASAL YAPI	MOLEKÜLER AĞIRLIK	MARKA -KOD
Metilen Mavisi,609 9	Azo		319.9 g/mol	Matheson Coleman and Bell
Metil Kırmızısı, 10303	Azo		269.30 g/mol	Riedel-De Haen, 13020
Kristal Viyole, 11057	Trifenilmetan		407.99 g/mol	Fluka, 61135
Remazol Brilliant Blue R, 17409	Antrakinon		625.971161 g/mol	Sigma, R8001

### 3.1.5. Cihaz ve Aletler

- Spektrofotometre (Varian)
- Santrifüj (Hettich ROTINA 35R)
- Otoklav (Hirayama)
- İnkübatörler (Sanyo, Jsr, Binder)
- Çalkamalı inkübatör (Innova 4340)
- Otomatik pipetler (Brand)
- Hassas terazi (Denver Instrument)
- pH ölçüm cihazı (WTW)
- Etüvler (Sanyo, JSR, Binder)
- Vorteks (VWR, International)
- Mikroküvet 0.5-2ml (Biosigma)
- Buzdolabı (BOSCH)
- Mikroskop (Olympus)

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. *In silico* Renk Giderimi (Dekolorizasyon) Çalışması

*Phoma* sp. K21 izolatının fungal lakkazının çalışmada kullanılacak boyalar ile kenetleme çalışması, AutoDock 4.2 (Morris et al., 1998) kullanılarak yapılmıştır.

#### 3.2.1.1. Proteinin Hazırlanması

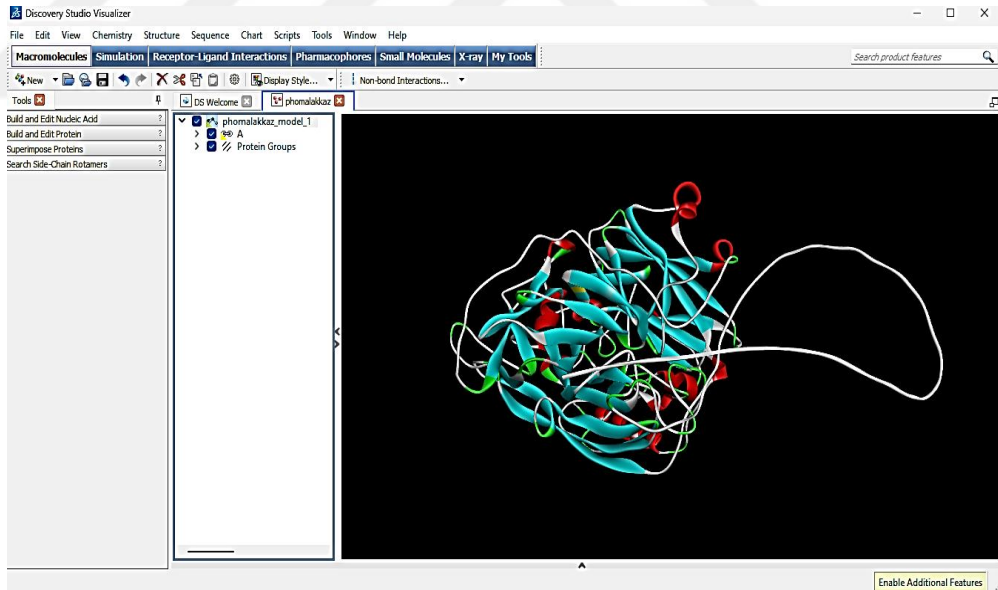
*Phoma* sp. 'ye ait lakkazın kristal yapısı (Uniprot ID: B3TLA6) Uniprot web sitesinden (<https://www.uniprot.org/>) pdb formatında temin edilmiştir (Şekil 3.1). B3TLA6'ya ait pdb dosyası, Biovia Discovery Studio Visualizer 2021 programına aktarılıp, A zinciri kullanılarak hazırlanmış ve pdb formatında kaydedilmiştir (Şekil 3.2). Daha sonra AutoDock Tools programına aktarılmıştır (ADT ver.1.5.7). Su molekülleri protein yapısından uzaklaştırılmış, kayıp atomların onarımı yapılmış, polar hidrojen atomları eklenmiş, elektrik yüklerinin dağılımı düzenlenmiştir (Şekil 3.3). Düzenlenen protein; programda makromolekül olarak seçilip, pdbqt formatına dönüştürülüp kaydedilmiştir (Özgen ve Nihan, 2022) (Şekil 3.4).

```

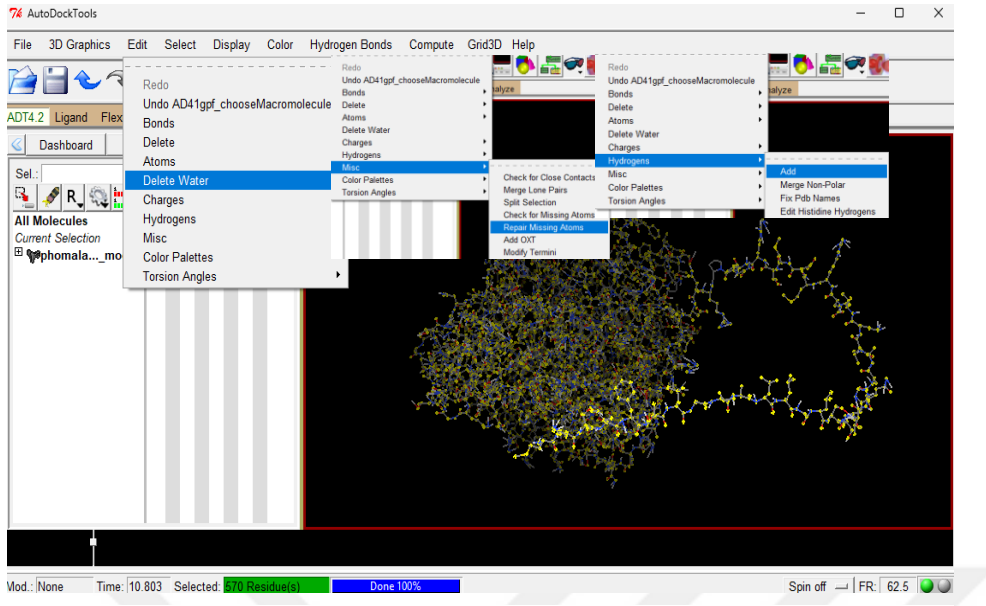
phomalakkaz.pdb
Dosya Düzenle Görünüm
01-JUN-22
HEADER
TITLE ALPHAFOLD MONOMER V2.0 PREDICTION FOR LACCASE (B3TLA6)
COMPND MOL_ID: 1;
COMPND 2 MOLECULE: LACCASE;
COMPND 3 CHAIN: A
SOURCE MOL_ID: 1;
SOURCE 2 ORGANISM_SCIENTIFIC: PHOMA SP. UHH 5-1-03;
SOURCE 3 ORGANISM_TAXID: 500325
REMARK 1
REMARK 1 REFERENCE 1
REMARK 1 AUTH 1 JOHN JUMPER, RICHARD EVANS, ALEXANDER PRITZEL, TIM GREEN,
REMARK 1 AUTH 2 MICHAEL FIGURNOV, OLAF RONNEBERGER, KATHRYN TUNYASUVUNAKOOL,
REMARK 1 AUTH 3 RUSS BATES, AUGUSTIN ZIDEK, ANNA POTAPENKO, ALEX BRIDGLAND,
REMARK 1 AUTH 4 CLEMENS MEYER, SIMON A A KOHL, ANDREW J BALLARD,
REMARK 1 AUTH 5 ANDREW COWIE, BERNARDINO ROMERA-PAREDES, STANISLAV NIKOLOV,
REMARK 1 AUTH 6 RISHUB JAIN, JONAS ADLER, TREVOR BACK, STIG PETERSEN,
REMARK 1 AUTH 7 DAVID REIMAN, ELLEN CLANCY, MICHAL ZIELINSKI,
REMARK 1 AUTH 8 MARTIN STEINEGGER, MICHALINA PACHOLSKA, TAMAS BERGHAMMER,
REMARK 1 AUTH 9 DAVID SILVER, ORIOL VINYALS, ANDREW W SENIOR,
REMARK 1 AUTH10 KORAY KAVUKCUOGLU, PUSHMEET KOHLI, DEMIS HASSABIS
REMARK 1 TITL HIGHLY ACCURATE PROTEIN STRUCTURE PREDICTION WITH ALPHAFOLD
REMARK 1 DEF METHOD
St 1, Süt 1 %100 Unix (LF) UTF-8

```

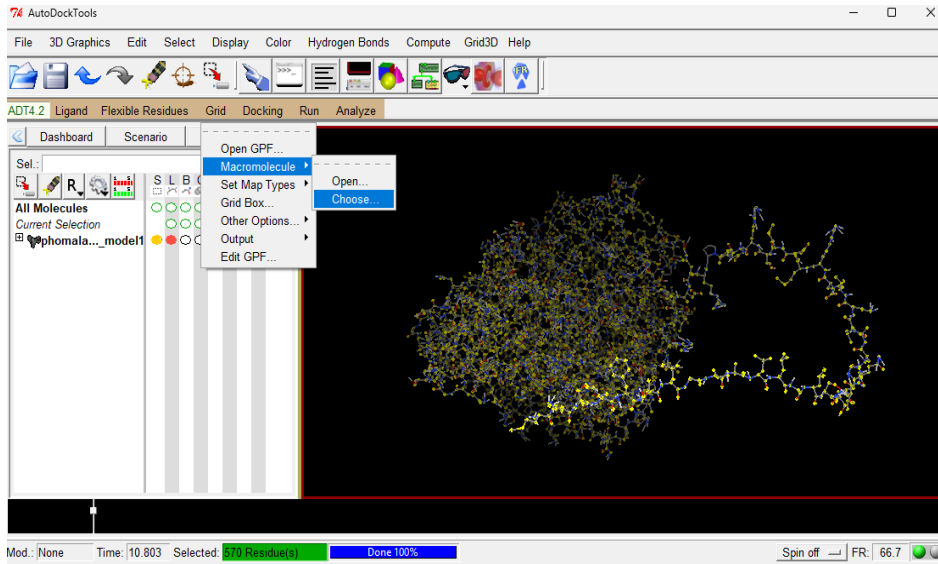
Şekil 3.1 *Phoma sp.* lakkazı B3TLA6'ya ait PDB dosyası



Şekil 3.2 Biovia Discovery Studio Visualizer programında heteroatomların yokluğunu ve proteinin A zincirini gösteren ekran görüntüsü




**Şekil 3.3** AutoDock Tools programında sırasıyla; su moleküllerinin protein yapısından uzaklaştırılması, kayıp atomların onarımı yapılması, polar hidrojen atomlarının eklenmesi



**Şekil 3.4** AutoDock Tools programında düzenlenen proteinin, makromolekül olarak seçilmesi ve PDBQT formatında kaydedilmesi

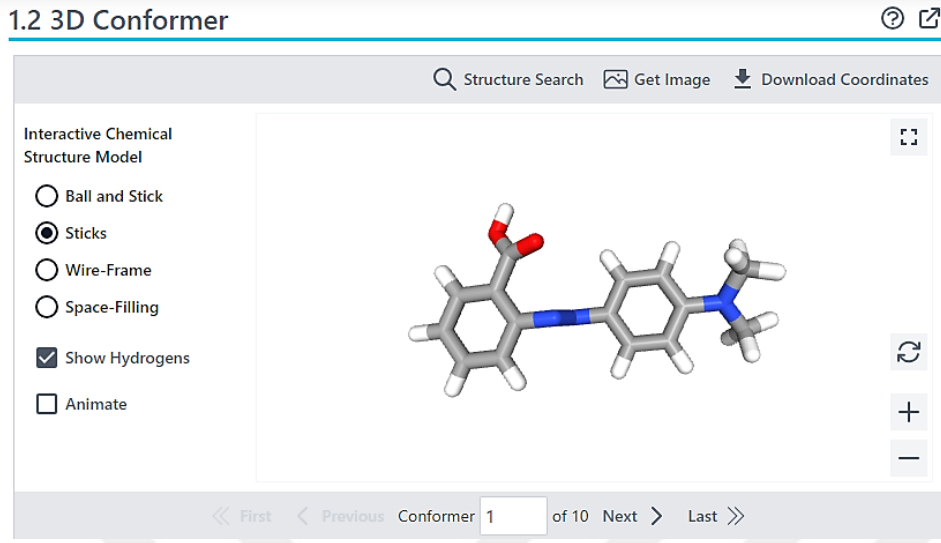
### 3.2.1.2. Ligandların Hazırlanması

Ligandların (boyaların) kimyasal yapısı; PubChem Compound Database (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Kim et al., 2016) veritabanından uzaysal veri dosyası (SDF) formatında eklenmiştir (Şekil 3.5, Şekil 3.6). Kenetleme öncesinde pdb formatına dönüşüm için Openbabel programı (O'Boyle et al., 2011) kullanılmıştır. UCSF Chimera programına ligandların 3 boyutlu yapıları, aktarılarak enerji minimizasyonları gerçekleştirilmiş ve pdb formatında kaydedilmiştir (Şekil 3.7). Son aşamada Autodock Tools (ADT ver.1.5.7) kullanılarak ligandların hareketsiz bağları, hareketli bağ olarak ayarlanmış ve pdbqt formatında kaydedilmiştir (Şekil 3.8).

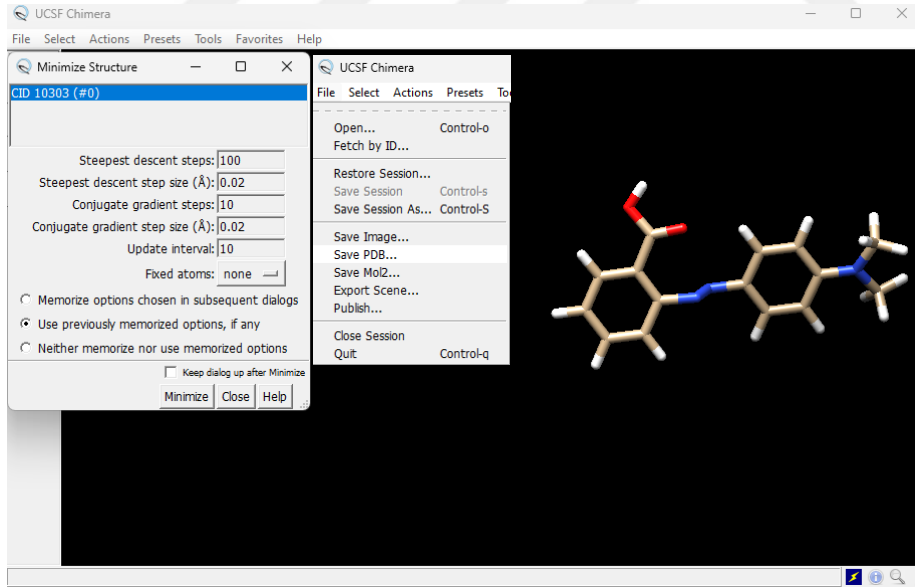


The image shows a screenshot of the PubChem website. The search bar contains the text 'methyl red'. Below the search bar, the results are displayed under the heading 'BEST MATCH'. The first result is 'Methyl red; 493-52-7; O-METHYL RED; C.I. Acid Red 2; Acid Red 2; 2-Carboxy-4'-(dimethylamino)azobenzene; 4-Dimethylamino-2'-carboxylazobenzene; p-(Dimethylamino)azobenzene-o-carboxylic acid; ...'. The chemical structure is shown as a ball-and-stick model. Below the structure, the following information is provided: Compound CID: 10303, MF: C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>, MW: 269.3g/mol, IUPAC Name: 2-[[4-(dimethylamino)phenyl]diazenyl]benzoic acid, Isomeric SMILES: CN(C)C1=CC=C(C1)N=NC2=CC=CC(=O)O, InChIKey: CEQFOVLGLXCDCX-UHFFFAOYSA-N, InChI: InChI=1S/C15H15N3O2/c1-18(2)12-9-7-11(8-10-12)16-17-14-6-4-3-5-13(14)15(19)20/h3-10H,1-2H3,(H,19,20), Create Date: 2005-03-26. At the bottom of the result box, there are links for 'Summary', 'Similar Structures Search', and 'Related Records'.

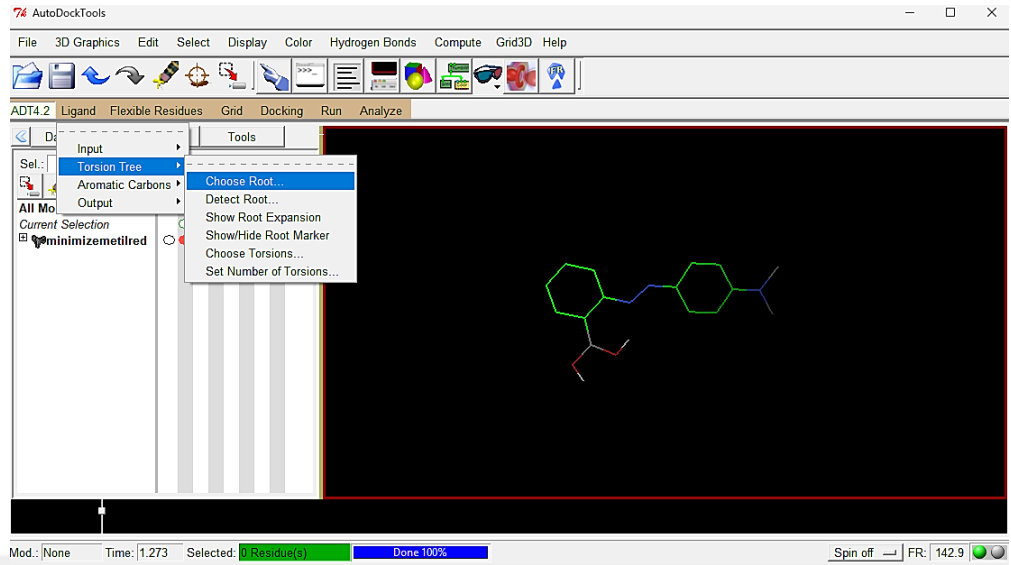
Şekil 3.5 İlgilenilen ligandın PubChem anasayfasında gösterimi.



Şekil 3.6 3D SDF Dosyasının 3D Konformasyonda gösterimi.



Şekil 3.7 UCSF Chimera programında ilgilenilen ligandın enerji minimizasyonunun gerçekleştirilmesi ve PDB formatında kaydedilmesi.

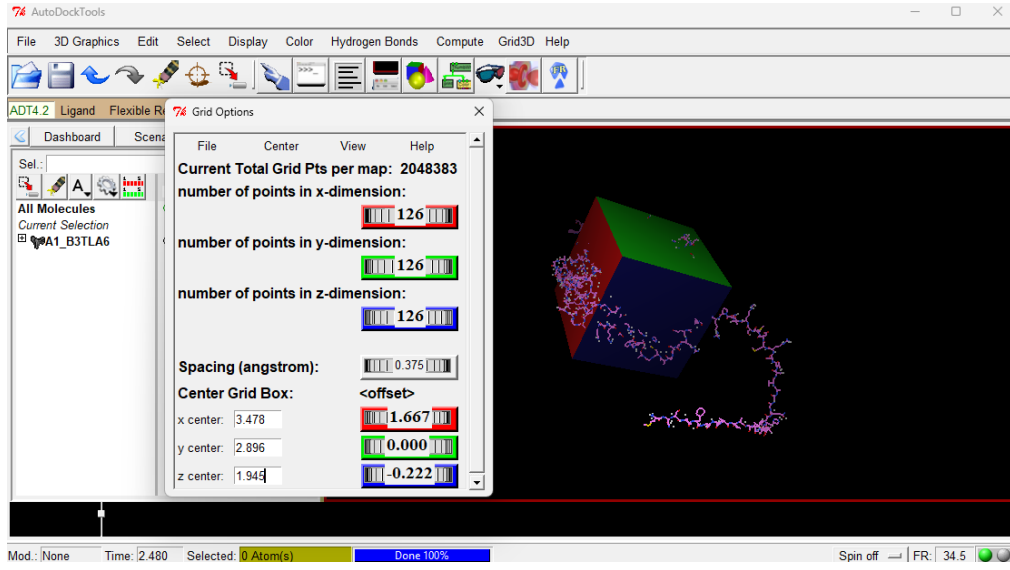


**Şekil 3.8** Autodock Tools (ADT ver.1.5.7) programında, kök (root) tespiti için burulma ağacının (torsion tree) uygulanması ve ligand çıktısının PDBQT formatında kaydedilmesi.

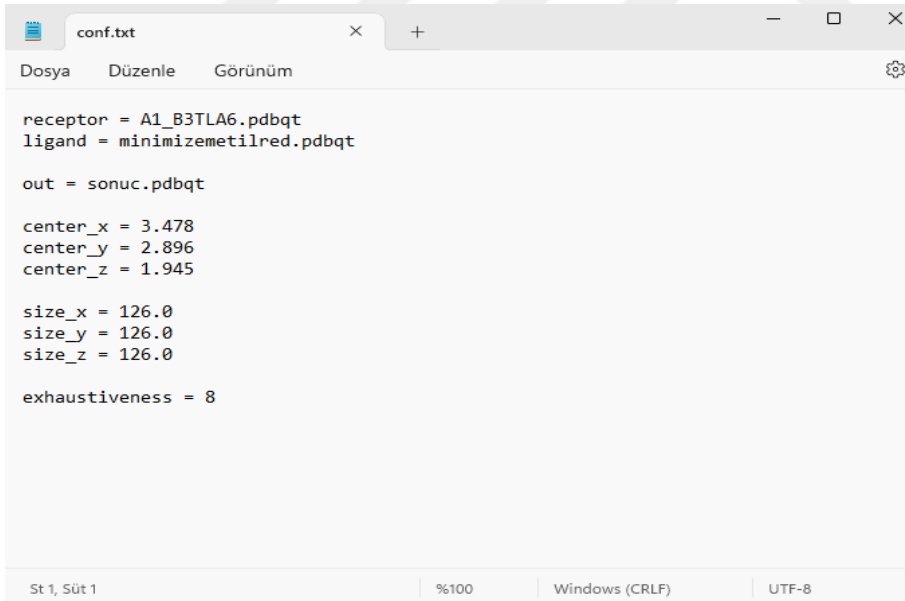
### 3.2.1.3. Grid Kutusunun Ayarlanması ve Konfigürasyon Dosyasının Oluşturulması

AutoDock Tools programında; bağlanma bölgesini belirlemek için kör yerleştirme yöntemi kullanılarak, tüm protein 3 boyutlu bir grid kutusu içine alınmıştır (Şekil 3.9). Bu kutucuk kenetleme yapılacak alanın kartezyen koordinatlarını vermektedir.

Daha sonra ligandların ve proteinlerin pdbqt dosyalarını içeren bir konfigürasyon dosyası hazırlanmıştır. Bu dosya protein ve hesaplama yapılacak ligand dosyası bilgileri, hedef alınan ve kenetlenecek alanın kartezyen koordinatları ve kenetleme bölgesinin genişliği gibi parametreler içermektedir. (Şekil 3.10). (Gürşün, 2018).



Şekil 3.9 Kenetleme işlemi için proteinin üzerindeki grid kutusunun ayarlanması.



Şekil 3.10 Kenetleme için konfigürasyon dosyası.

### 3.2.1.4. *Phoma* sp. Lakkazı ile Ligandların (Boya) Moleküler Kenetleme İşlemi

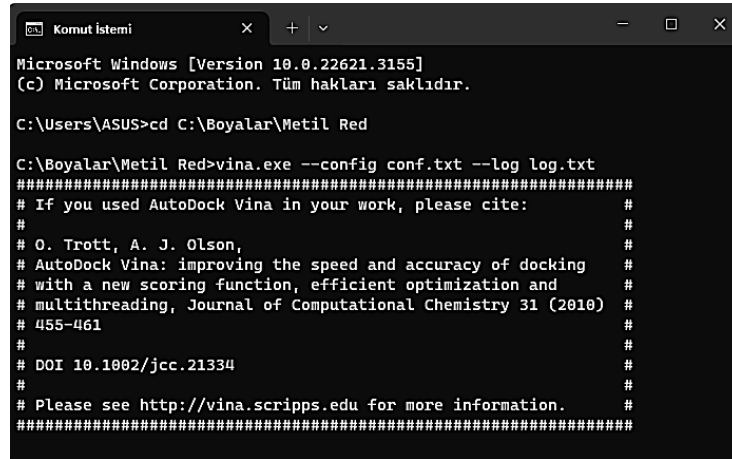
Aşağıdaki işlemler ile Vina programı çalışmaya başlamış ve log dosyası kaydedilmiştir (Gürşün, 2018). Son komut, kenetleme sonuçlarının her bir ligand için ayrı olarak kaydedilmesi içindir (Şekil 3.11, Şekil 3.12, Şekil 3.13).

Hazırlanan girdi dosyaları ile bilgisayara sırasıyla şu komutlar verilmiştir (Rauf et al., 2015):

`cd (boşluk) kopyalanan dosya dizini yapılandırılır`

`vina.exe (boşluk) - - config (boşluk) conf.txt (boşluk) - - log (boşluk) log.txt`

`vina_split.exe (boşluk) - - input (boşluk) sonuc.pdbqt`



```

Komut İstemi
Microsoft Windows [Version 10.0.22621.3155]
(c) Microsoft Corporation. Tüm hakları saklıdır.

C:\Users\ASUS>cd C:\Boyalarda\Metil Red

C:\Boyalarda\Metil Red>vina.exe --config conf.txt --log log.txt
#####
# If you used AutoDock Vina in your work, please cite: #
# #
# O. Trott, A. J. Olson, #
# AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking #
# with a new scoring function, efficient optimization and #
# multithreading, Journal of Computational Chemistry 31 (2010) #
# 455-461 #
# #
# DOI 10.1002/jcc.21334 #
# #
# Please see http://vina.scripps.edu for more information. #
#####

```

Şekil 3.11 Kenetleme komutları.

```

Komut İstemi
WARNING: The search space volume > 27000 Angstrom^3 (See FAQ)
Detected 8 CPUs
Reading input ... done.
Setting up the scoring function ... done.
Analyzing the binding site ... done.
Using random seed: -1149877208
Performing search ...
0% 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100%
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
*****
done.
Refining results ... done.

mode | affinity | dist from best mode
| (kcal/mol) | rmsd l.b. | rmsd u.b.
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1      -5.4      0.000      0.000
2      -5.0      39.818     42.035
3      -5.0      31.096     34.443
4      -4.8      35.220     36.579
5      -4.7      28.636     30.460
6      -4.7      25.302     28.076
7      -4.6      29.150     30.238
8      -4.5      25.336     26.992
9      -4.4      33.151     35.605

Writing output ... done.

C:\Boyalan\Metil Red>vina_split.exe --input sonuc.pdbqt
Prefix for ligands will be sonuc_ligand_
Prefix for flexible side chains will be sonuc_flex_

```

Şekil 3.12 Kenetleme sonuçlarının gösterimi.

A1_B3TLA6.pdbqt	17.02.2024 19:17	PDBQT Dosyası	456 KB
conf.txt	17.02.2024 19:27	Metin Belgesi	1 KB
log.txt	17.02.2024 20:00	Metin Belgesi	2 KB
metilred.pdb	17.02.2024 19:27	PDB Dosyası	6 KB
minimizemetilred.pdb	17.02.2024 19:33	PDB Dosyası	4 KB
minimizemetilred.pdbqt	17.02.2024 19:40	PDBQT Dosyası	3 KB
sonuc.pdbqt	17.02.2024 20:00	PDBQT Dosyası	22 KB
sonuc_ligand_1.pdbqt	17.02.2024 20:07	PDBQT Dosyası	3 KB
sonuc_ligand_2.pdbqt	17.02.2024 20:07	PDBQT Dosyası	3 KB
sonuc_ligand_3.pdbqt	17.02.2024 20:07	PDBQT Dosyası	3 KB
sonuc_ligand_4.pdbqt	17.02.2024 20:07	PDBQT Dosyası	3 KB
sonuc_ligand_5.pdbqt	17.02.2024 20:07	PDBQT Dosyası	3 KB
sonuc_ligand_6.pdbqt	17.02.2024 20:07	PDBQT Dosyası	3 KB
sonuc_ligand_7.pdbqt	17.02.2024 20:07	PDBQT Dosyası	3 KB
sonuc_ligand_8.pdbqt	17.02.2024 20:07	PDBQT Dosyası	3 KB
sonuc_ligand_9.pdbqt	17.02.2024 20:07	PDBQT Dosyası	3 KB
vina.exe	11.05.2011 12:37	Uygulama	764 KB
vina_split.exe	11.05.2011 12:37	Uygulama	318 KB

Şekil 3.13 Son komut ile kenetleme sonuçlarının her bir bağlanma modu için ayrı olarak kaydedilmiş dosyaları.

### 3.2.1.5. Moleküler Görselleştirme Programının Kullanılması

Lakkaz üzerindeki farklı boyaların konformasyonları hakkında bilgi almak için Biovia Discovery Studio Visualizer 2021 programı kullanılmıştır. Son komut ile kenetleme sonuçlarının her bir boya için ayrı olarak kaydedilmiş dosyaları, Biovia Discovery Studio Visualizer programına aktarılmış, enzim ve boya etkileşimleri görselleştirilmiştir. 'In silico Renk Giderimi (Dekolorizasyon) Sonuçları' kısmında (Bkz 4.1) her bir boya için elde edilen görseller verilmiştir.

### 3.2.2. *Phoma* sp. K21 Üretimi ve İlk Aktivasyonu

*In silico* dekolorizasyon sonuçlarını doğrulamak amacıyla gerçekleştirilen *in vitro* dekolorizasyon deneylerine izolat aktivasyonu ile başlanmıştır. *Phoma* sp. K21 izolatı; %50 deniz suyu, %50 distile su içeren ve sadece %100 distile su içeren Malt Ekstrakt Pepton Agar besiyerlerinde 10 gün; %50 deniz suyu, %50 distile su ve sadece %100 distile su içeren Glukoz-Maya Ekstraktlı Agar besiyerinde 20 gün olmak üzere 27°C'de inkübe edilmiştir.

### 3.2.3. Lakkaz Üretimi İçin Farklı Besiyerlerinin Araştırılması

*Phoma* sp. K21 izolatının en yüksek verimdeki boya gideriminin elde edilebilmesi için denenen farklı sıvı besiyerleri Çizelge 3.2'de gösterilmektedir.

**Çizelge 3.2** Lakkaz Aktivitesi İçin Sıvı Üretim Besiyerleri.

1. Malt Ekstrakt Pepton Broth (%50 Deniz sulu)
2. Malt Ekstrakt Pepton Broth (%100 Distile sulu)
3. Muz Kabuklu Czapek Dox Broth (%50 Deniz sulu)
4. Muz Kabuklu Czapek Dox Broth (%100 Distile sulu)
5. Pirinç Kepekli Czapek Dox Broth (%50 Deniz sulu)

- 
6. Pirinç Kepekli Czapek Dox Broth (%100 Distile sulu)
  7. Glukoz-Maya Ekstraktlı Broth (%50 Deniz sulu, indükleyicisiz)
  8. Glukoz-Maya Ekstraktlı Broth (%50 Deniz sulu + 1mM Ferulik asit ilaveli)
  9. Glukoz-Maya Ekstraktlı Broth (%50 Deniz sulu + 1mM CuSO<sub>4</sub> ilaveli)
  10. Glukoz-Maya Ekstraktlı Broth (%50 Deniz sulu + 1mM Ferulik asit + 1mM CuSO<sub>4</sub> ilaveli)
- 

### 3.2.4. Lakkaz Aktivitesi Deneyleri

#### 3.2.4.1. İnokulasyonun Hazırlanması

Malt Ekstrakt Pepton Agar besiyerinde 27°C'de 10 günlük inkübasyon ve Glukoz-Maya Ekstraktlı Agar besiyerinde 27°C'de 20 günlük inkübasyon ardından 1 cm çapında 5 adet agar disk, 250 ml'lik erlenler içerisinde bulunan 100 ml'lik sıvı üretim besiyerlerine inokule edilmiştir. Sıvı ortamlı erlenler 120 rpm 30°C'de çalkalamalı inkübatöre bırakılmıştır (Toker vd., 2021).

#### 3.2.4.2. Kalitatif Lakkaz Aktivitesi Deneyi

Lakkazın kalitatif taranması için; deniz suyu içeren ve içermeyen Malt Ekstrakt Pepton Agar ve Glukoz-Maya Ekstrakt Agar besiyerlerine, tannik asit ve siringaldizin olmak üzere iki farklı lakkaz indikatörü ilave edilmiştir. Siringaldizin (4-hidroksi-3,5 dimetoksi benzaldehit azin), Harkin ve Obst'a (1973) göre hızlı ve basit lakkaz enzimi tespiti için iyi bir substrattır. Etanol (alkol veya dimetil sülfoksit karışımı) içindeki seyreltilmiş siringaldizin çözeltisi, lakkaz enzimi ile muamele edildikten sonra rengi sarıdan koyu mora değişir. Renk değişikliği, siringaldizinin iki kat fenol dehidrojenasyonu ve serbest radikallerin molekül içi eşleşmesinden elde edilir ve bu da oldukça renkli tetrametoksiazo-bis metilen kinon kompleksi ile sonuçlanır. Diğer substratların aksine, siringaldizin renk üretmek için lakkaz enzimi ile kolayca birleşir ve renk gelişimi tüm pH aralıklarında hızlı bir şekilde gerçekleşir. Bununla birlikte, renk solması 3-7 pH aralığının dışında hızlı bir şekilde gerçekleşir. Lakkazlar için geleneksel tarama reaktiflerinden biri tannik asittir.

Tannik asit ile pozitif reaksiyon, koyu kahverengi bölge ile tespit edilmektedir (Harkin and Obst, 1973).

*Phoma* sp. K21 izolatu, kalitatif lakkaz taramasında %0,5 tannik asit (Debnath et al., 2021) ve %0,1 siringaldizin (Patel and Bhaskaran, 2020) içeren besiyerlerinde 10 gün 27°C'de inkübe edilmiştir (Debnath et al., 2021).

### 3.2.4.3. Kantitatif Lakkaz Aktivitesi Deneyi

30°C'de çalkalamalı inkübatöre bırakılan sıvı üretim besiyerlerinin günlük lakkaz aktivite ölçümü yapılmıştır. Enzim aktivitesi ölçümü için sıvı ortamlardan steril eppendorflara 1,5 ml alınmış ve 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj işlemiyle hücreler çöktürülmüştür. Süpernatant, enzim olarak ölçüm için alınmıştır.

Lakkaz aktivitesi deneylerinde iki yöntem kullanılmıştır (Çizelge 3.3). Birinci yöntemde 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit (ABTS)'nin 420 nm'de oksidasyonunun ölçümü ile lakkaz aktivitesi saptanmıştır ( $\epsilon = 3,6 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ) (Revankar and Lele, 2006; Niladevi and Prema, 2008; Koçyigit et al., 2012). *Phoma* sp. K21 izolatının enzim aktivitesi için reaksiyon karışımında; 0,2 ml 5 mM ABTS substrattan alınmış; 0,1 mM Glisin-HC l(pH:3) tamponun'dan ise 0,6 ml; kültür süpernatantından da 0,4 ml eklenip toplam hacim 1,2 ml'ye tamamlanmıştır (Toker, 2018). Lakkaz aktivitesi ölçümü için diğer bir reaksiyon karışımı şu şekilde oluşturulmuştur: Substrat; 0,2 ml 5 mM ABTS; Tampon: 0,1 mM Sitrata-Fosfat tamponu (pH:5)'dan 0,6 ml; kültür süpernatantı 0,4 ml (Libardi et al., 2012).

Hesaplama aşamasına geçilmiştir:

$$\text{Lakkaz (U L}^{-1}\text{)} = \frac{[\Delta A_{420} \times \text{total hacim} \times \text{dilasyon faktörü} \times 10^6]}{[\epsilon_{\text{ABTS}} \times \text{Örneğin hacmi}]}$$

$$[\epsilon_{\text{ABTS}} \times \text{Örneğin hacmi}]$$

$\Delta A_{420}$  = Absorbans değişimi ([Son absorbansı - başlangıç absorbansı]/  
Zaman)

$$\epsilon_{ABTS} = 3,6 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$$

Toplam hacim = Reaksiyon karışımının toplam hacmi (ml)

Örnek hacmi = Kullanılan enzimin hacmi (ml)

İkinci yöntemde lakkaz aktivitesi; guaiacol'un 450 nm'de oksidasyonunun ölçülmesi ile saptanmıştır. *Phoma* sp. K21 izolatı için lakkaz aktivitesi reaksiyon karışımı şunları içermektedir: 1,0 ml enzim, 3,0 ml sodyum asetat tamponu (10mM pH:5) ve 1,0 ml guaiacol (2mM). Karışım 30°C'de 15 dakika inkübe edildikten sonra 450 nm'de absorbansını ölçmek için bir UV spektrofotometresi kullanılmıştır. 450 nm'de guaiacol sönme katsayısı ( $12,100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) kullanılarak lakkaz aktivitesi U/L cinsinden hesaplanmıştır. Bir birim enzim aktivitesi, optimal koşullar altında dakikada 1  $\mu\text{mol}$  guaiacolu oksitlemek için gereken enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Desai et al., 2011; Kalra et al., 2013).

Hesaplama:

$$E.A = (A * V) / (t * e * v)$$

E.A= Enzim Aktivitesi (U/ml)

A=Absorbans

V= Reaksiyon karışımının toplam hacmi (ml)

t= İnkübasyon süresi (dak)

e=Sönme Katsayısı ( $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

v= Kullanılan enzimin hacmi (ml).

Çizelge 3.3 Kantitatif lakkaz aktivitesi deneyinde kullanılan yöntemler.

<i>Deneme 1</i>				
	<b>BESİYERİ</b>	<b>SUBSTRAT</b>	<b>TAMPON</b>	<b>SÜPERNATANT</b>
	Malt Ekstrakt Pepton Broth	5 mM ABTS  0,2 ml	0,1 mM, ph:3  Glisin-HCl  0,6 ml	0,4 ml
<i>Deneme 2</i>				
	<b>BESİYERİ</b>	<b>SUBSTRAT</b>	<b>TAMPON</b>	<b>SÜPERNATANT</b>
	Muz Kabuklu Czapek Dox Broth  Pirinç Kepekli Czapek Dox Broth	5 mM ABTS  0,2 ml	0,1 mM, ph:5  Sitrat-Fosfat  0,6 ml	0,4 ml
<i>Deneme 3</i>				
	<b>BESİYERİ</b>	<b>SUBSTRAT</b>	<b>TAMPON</b>	<b>SÜPERNATANT</b>
	Glukoz-Maya Ekstraktlı Broth	2mM Guaiacol  1,0 ml	10mM pH:5 sodyum asetat  3,0 ml	1,0 ml

### 3.2.5. *In vitro* Renk Giderimi (Dekolorizasyon) Deneyleri

En yüksek lakkaz aktivitesinin ölçüldüğü gün, 100 mg/L konsantrasyonundaki boyalar, erlenlere eklenmiş ve 24 saat aralıklarla absorbans değerlerindeki düşüş spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. 24 saat aralıklarla 1,5 ml'lik örnekler alınmış, 10.000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant, renk gideriminin spektrofotometrik ölçümünde kullanılmıştır. Elde edilen absorbans değerleri ile dekolozizasyon hesaplaması yapılmıştır (Bonugli-Santos et al., 2012; Toker, 2018).

Dekolorizasyon (%) =  $\frac{ABS_{baş} - ABS_{final}}{ABS_{baş}} \times 100$

ABSbaş

ABSbaş = Renk giderimi öncesi ölçülen absorbansın değeri

ABSfinal = Renk giderimi sonrası ölçülen absorbansın değeri

### 3.2.6. Fitotoksisite Deneyi

Boya giderimi ürünlerinin, ticari olarak temin edilen Maş fasulyesi (*Phaseolus aureus*) tohumları üzerindeki biyotoksisitesini değerlendirmek için fitotoksisite testi yapılmıştır. Mikrobiyal kontaminasyonu önlemek için tohumlar %10 (v/v) sodyum hipoklorit ile 20 dakika sterilize edilmiştir. 3 defa steril saf su ile yıkama yapılmış olup her yıkamada tohumlar 10 dakika bekletilmiştir. Nemlendirilmiş filtre kağıdı ile petri plakalarına 10'ar adet sterilize edilen tohum yerleştirilmiş ve 27°C'de 3 gün karanlıkta inkübe edilmiştir. Tohumlar, günde 2 mL çeşme suyu ile seyreltilmiş (%10) degradasyon ürünleri ile sulanarak filizlenmeye bırakılmıştır. Deney, kontrol gruplarını da içermekte olup; sulama işlemi aynı koşullarda sadece çeşme suyu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 27°C'de 24 saat inkübasyondan sonra her deney grubundaki çimlenen tohumların sayısı sayılarak çimlenme yüzdeleri hesaplanmıştır. Sayımı yapılan petripler tekrar inkübasyona kaldırılmış, 3 gün sonunda kök ve embriyonik gövde uzaması sonuçları ölçülmüştür (Swami, 2012, Verma et al., 2020, Kumar et al., 2021).

## 4. BULGULAR

### 4.1. *In silico* Renk Giderimi (Dekolorizasyon) Sonuçları

AutoDock Vina programı kullanılarak *Phoma* sp.'nin lakkaz enziminin; *metilen mavisi*, *metil kırmızısı*, *remazol brilliant blue R* ve *kristal viyole* ligandları ile kenetleme hesaplaması yapılmıştır ve genetik algoritma ile gerçekleştirilmiştir. Bağlanma afinitesine bağlı olarak AutoDock 4.2 ile her ligandın 9 farklı konformasyonu oluşturulmuştur. En yüksek skora sahip ligandlar AutoDock 4.2 ile belirlenmiş ve Biovia Discovery Studio Visualizer 2021 programı ile görselleri elde edilmiştir. *In silico* ve *in vitro* dekolozasyon sonuçlarının karşılaştırılması Çizelge 4.1'de verilmiştir.

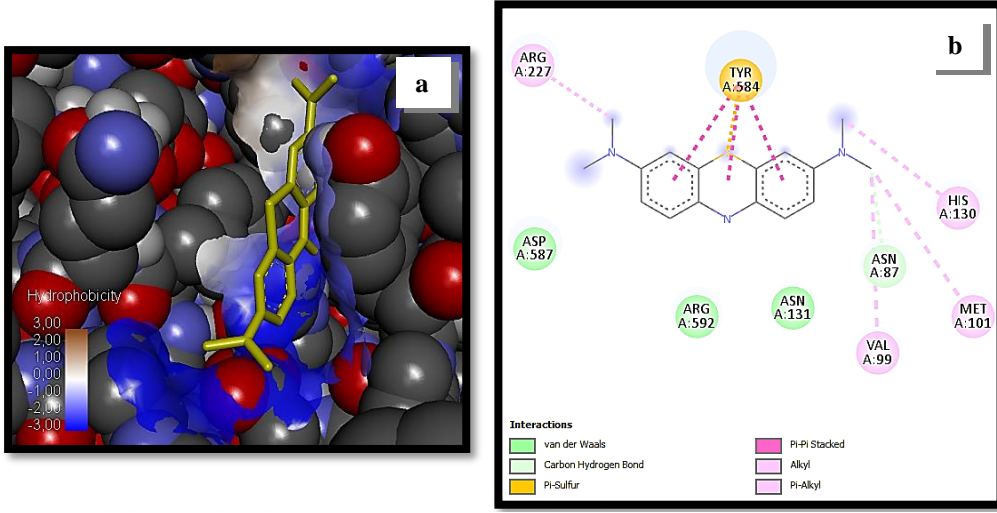
#### 4.1.1. Metilen Mavisi ile Yapılan Kenetleme Çalışması

AutoDock Vina programı, metilen mavisi boyasının bağlanma enerjisini **-6.1 kcal/mol** olarak hesaplamıştır (Şekil 4.1). Şekil 4.2b'de açık pembe ile gösterilen ARG227, HIS130, MET101, VAL99 rezidüleri ile ligand arasında oluşan  $\pi$ -alkil etkileşimleri görülmektedir. En açık yeşil daire ile gösterilen, karbon hidrojen bağı yapan amino asit ASN87'dir. Sarı daire ile gösterilen  $\pi$ -sülfür etkileşimi yapan aminoasit TYR584'tür.

mode	affinity (kcal/mol)	dist from best mode	
		rmsd l.b.	rmsd u.b.
1	-6.1	0.000	0.000
2	-6.1	0.131	7.554
3	-5.8	44.006	46.291
4	-5.8	43.995	45.955
5	-5.8	1.463	2.110
6	-5.4	2.547	7.560
7	-5.3	22.352	26.932
8	-5.2	21.778	23.747
9	-5.2	22.025	26.222

Writing output ... done.

Şekil 4.1 Metilen mavisinin kenetlenme sonucu.



Şekil 4.2 Metilen mavisi ile *Phoma* sp. lakkazının yerleşimi ve etkileşimi a) Metilen mavisinin, *Phoma* sp. lakkazı içindeki yerleşimi b) Metilen mavisi ile *Phoma* sp. lakkazı arasındaki etkileşimler.

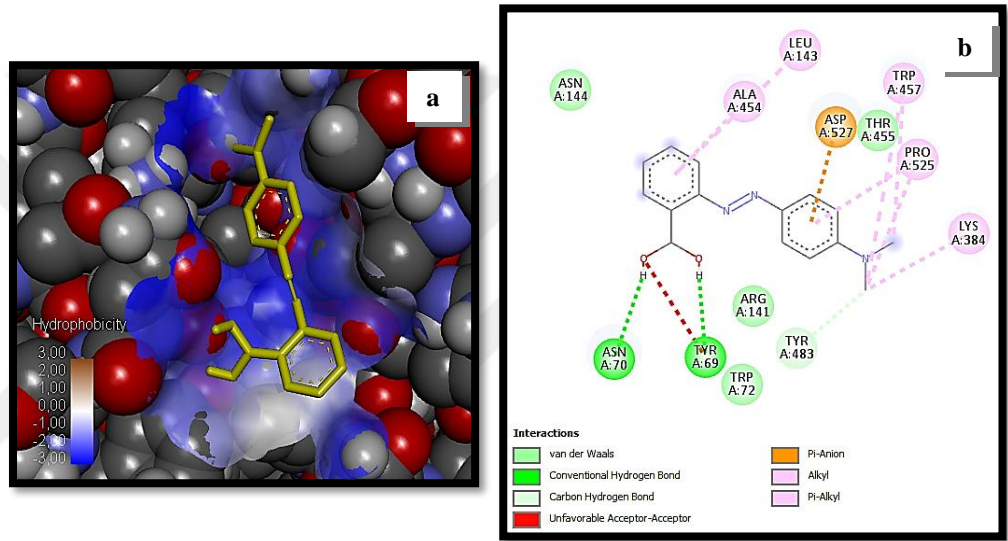
#### 4.1.2. Metil Kırmızısı ile Yapılan Kenetleme Çalışması

Metil kırmızı boyasının bağlanma enerjisi, AutoDock Vina programı tarafından **-5.4 kcal/mol** olarak hesaplanmış ve en düşük bağlanma afinitesini göstermiştir (Şekil 4.3). Metil kırmızısı boyasının lakkaz enzimiyle etkileşimlerinden biri Şekil 4.4b’de görüldüğü gibi açık pembe LEU143, ALA454, TRP457, PRO525, LYS384 rezidüleri ile ligand arasında oluşan  $\pi$ -alkil etkileşimleridir. En açık yeşil daire ile gösterilen, karbon hidrojen bağı yapan amino asit TYR483 olup; koyu yeşil daireler ile gösterilen konvensiyonel hidrojen bağı yapan rezidüler ise ASN70 ve TYR69’dur. Turuncu daire ile gösterilen ASP527 ise  $\pi$ -anyon etkileşimidir.

mode	affinity (kcal/mol)	dist from best mode rmsd l.b.   rmsd u.b.
1	-5.4	0.000   0.000
2	-5.0	39.818   42.035
3	-5.0	31.096   34.443
4	-4.8	35.220   36.579
5	-4.7	28.636   30.460
6	-4.7	25.302   28.076
7	-4.6	29.150   30.238
8	-4.5	25.336   26.992
9	-4.4	33.151   35.605

Writing output ... done.

Şekil 4.3 Metil kırmızısının kenetlenme sonucu.



Şekil 4.4 Metil kırmızısı ile *Phoma* sp. lakkazının yerleşimi ve etkileşimi a) Metil kırmızısının, *Phoma* sp. lakkazı içindeki yerleşimi b) Metil kırmızısı ile *Phoma* sp. lakkazı arasındaki etkileşimler.

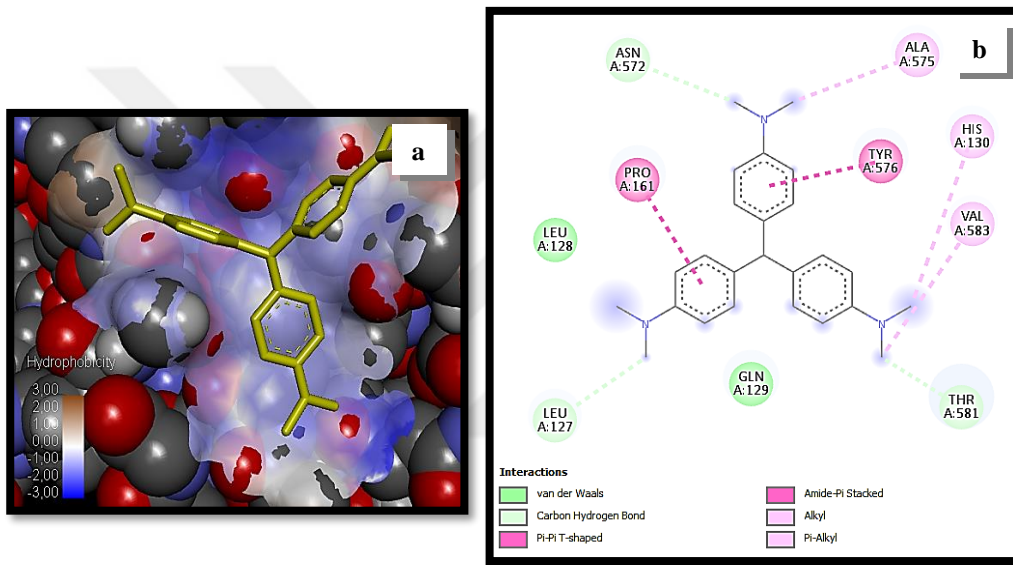
#### 4.1.3. Kristal Viyole ile Yapılan Kenetleme Çalışması

AutoDock Vina programı ile kristal viyole boyasının bağlanma enerjisi **-5.9 kcal/mol** olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.5). Kristal viyolenin lakkaz enzimiyle etkileşimlerinden biri Şekil 4.6b'de görüldüğü gibi açık pembe daireler ile gösterilen ALA575, HIS130, VAL583 rezidüleri ile ligand arasında oluşan  $\pi$ -alkil etkileşimleridir. En açık yeşil daireler ile gösterilen, karbon hidrojen bağı yapan amino asitler THR581, ASN572 ve LEU127'dir. Koyu pembe daire gösterilen  $\pi$ - $\pi$  T shaped etkileşimine sahip rezidüler ise PRO161 ve TYR576'dır.

mode	affinity	dist from best mode	
	(kcal/mol)	rmsd l.b.	rmsd u.b.
1	-5.9	0.000	0.000
2	-5.2	1.424	6.514
3	-5.1	25.682	29.253
4	-5.0	25.728	28.304
5	-5.0	3.286	6.214
6	-5.0	3.349	6.819
7	-4.9	42.191	46.063
8	-4.8	3.543	9.334
9	-4.7	25.209	28.732

Writing output ... done.

Şekil 4.5 Kristal viyolenin kenetlenme sonucu.



Şekil 4.6 Kristal viyole ile *Phoma* sp. lakkazının yerleşimi ve etkileşimi a) Kristal viyolenin *Phoma* sp. lakkazı içindeki yerleşimi b) Kristal viyole ile *Phoma* sp. lakkazı arasındaki etkileşimler.

#### 4.1.4. RBBR ile Yapılan Kenetleme Çalışması

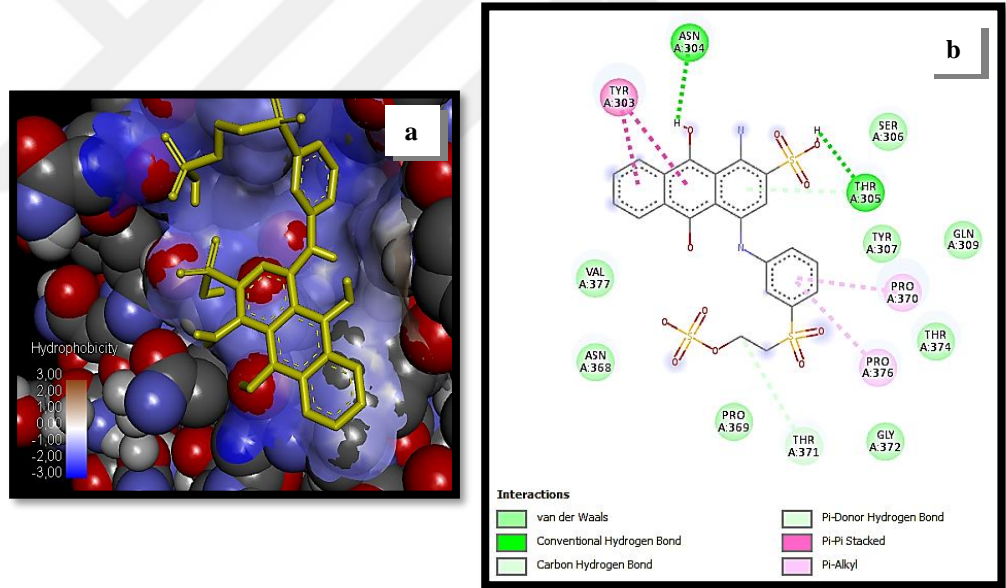
RBBR boyasının bağlanma enerjisi AutoDock Vina programı tarafından **-7.0 kcal/mol** değerinde hesaplanmış ve en yüksek bağlanma afinitesini göstermiştir (Şekil 4.7). RBBR'nin lakkaz enzimiyle etkileşimlerinden biri Şekil 4.8b'de görüldüğü gibi açık pembe PRO370, PRO376 rezidüleri ile ligand arasında oluşan

$\pi$ -alkil etkileşimleridir. Soluk yeşil daire ile gösterilen,  $\pi$ -donör hidrojen bağı yapan amino asit THR371'dir. Koyu yeşil daireler ile gösterilen, konvensiyonel hidrojen bağı etkileşimine sahip olan rezidüler ASN304 ve THR305'dir. Koyu pembe daire gösterilen  $\pi$ - $\pi$  yığın etkileşimine sahip rezidü ise TYR303'tür.

mode	affinity	dist from best mode	
	(kcal/mol)	rmsd l.b.	rmsd u.b.
1	-7.0	0.000	0.000
2	-6.3	2.166	3.072
3	-6.2	39.529	43.078
4	-6.0	2.945	4.458
5	-5.9	40.783	43.162
6	-5.9	37.324	40.821
7	-5.8	37.605	41.129
8	-5.8	50.926	53.925
9	-5.6	40.528	43.501

Writing output ... done.

Şekil 4.7 RBBR'nin kenetlenme sonucu.



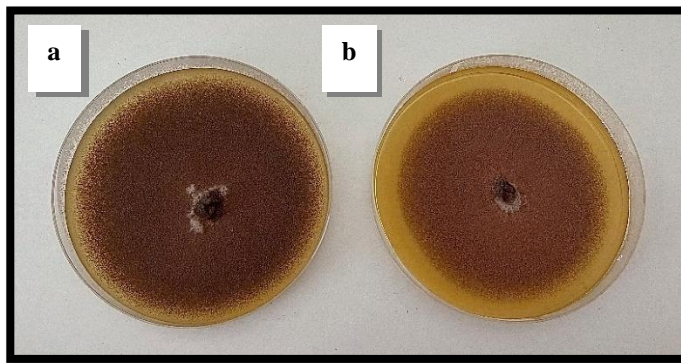
Şekil 4.8 RBBR ile *Phoma* sp. lakkazının yerleşimi ve etkileşimi a) RBBR'nin *Phoma* sp. lakkazı içindeki yerleşimi b) RBBR ile *Phoma* sp. lakkazı arasındaki etkileşimler.

**Çizelge 4.1** *Phoma* sp. lakkazı ile boyaların *in vitro* ve *in silico* dekolorizasyon sonuçlarının karşılaştırılması.

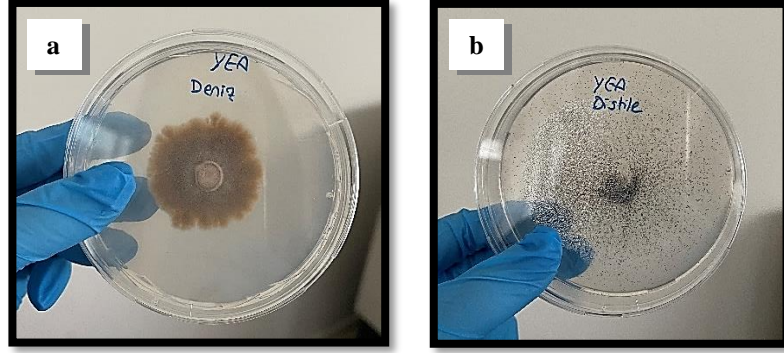
BOYA	IN SILICO SONUÇ (Kenetlenme Skoru)	IN VITRO SONUÇ (Dekolorizasyon yüzdesi)
Remazol Brilliant Blue R	-7.0 kcal/mol	% 64
Metilen Mavisi	-6.1 kcal/mol	% 60
Kristal Viyole	-5.9 kcal/mol	% 34
Metil Kırmızısı	-5.4 kcal/mol	% 16

#### 4.2. *Phoma* sp. K21 Üretimi Sonuçları

%50 deniz suyu, %50 distile su ve sadece %100 distile su içeren Malt Ekstrakt Pepton Agar besiyerlerinde 10 gün 27°C'de; %50 deniz suyu, %50 distile su ve sadece %100 distile su içeren Glukoz-Maya Ekstraktlı Agar besiyerlerinde 20 gün 27°C'de inkübe edilen izolatın, deniz suyu içeren Malt Ekstrakt Pepton Agar besiyerinde daha kısa sürede daha yoğun üreme gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.9). Deniz suyu içermeyen ortamlarda ise üremenin daha az olduğu saptanmıştır (Şekil 4.10).



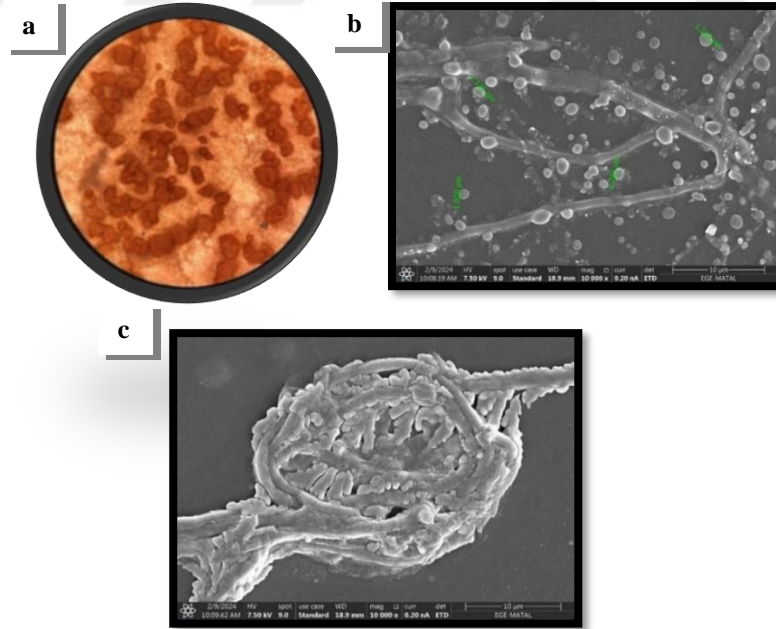
**Şekil 4.9** Fungal izolatın deniz suyu ve distile su içeren Malt Ekstrakt Pepton Agar besiyerlerindeki gelişimi a) %50 deniz suyu, %50 distile su içeren Malt Ekstrakt Pepton Agar besiyerindeki 10 günlük inkübasyon b) %100 distile su içeren Malt Ekstrakt Pepton Agar besiyerindeki 10 günlük inkübasyon.



**Şekil 4.10** Fungal izolatin deniz suyu ve distile su içeren Glukoz-Maya Ekstraktlı Agar besiyerlerindeki gelişimi a) %50 deniz suyu, %50 distile su içeren Glukoz-Maya Ekstraktlı Agar besiyerindeki 20 günlük inkübasyon b) %100 distile su içeren Glukoz-Maya Ekstraktlı Agar besiyerindeki 20 günlük inkübasyon.

#### 4.3. *Phoma* sp. K21 İzolatının Mikroskop Görüntüleri

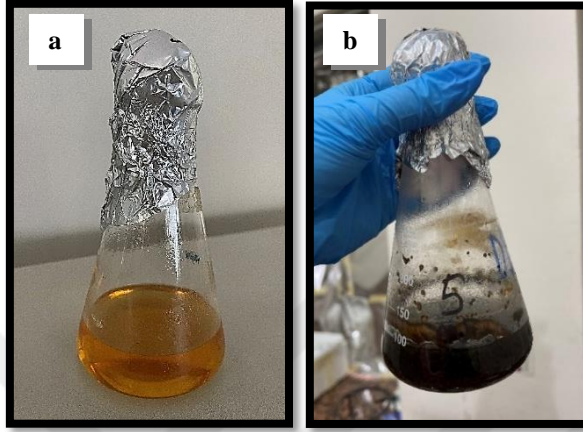
*Phoma* sp. K21 izolatu %50 deniz suyu, %50 distile su içeren Malt Ekstrakt Pepton Agar ortamında 10 gün süreyle inkübe edilmiş, ışık mikroskobu ve taramalı elektron mikroskobundaki görüntüleri Şekil 4.11’de verilmiştir.



**Şekil 4.11** Fungal izolatin mikroskop görüntüleri a) *Phoma* sp. K21 izolatinın ışık mikroskobundaki görüntüsü b) *Phoma* sp. K21 izolatinın taramalı elektron mikroskobundaki görüntüsü c) *Phoma* sp. K21 izolatinın taramalı elektron mikroskobundaki pknidyum yapısı görüntüsü.

#### 4.4. Lakkaz Üretimi Sonuçları

Çizelge 4.1’de verilen lakkaz aktivitesi için denenen farklı sıvı üretim besiyerleri arasında, en yüksek lakkaz aktivitesi %50 deniz suyu, %50 distile su içeren Malt Ekstrakt Pepton Sıvı besiyerinde saptanmıştır (Şekil 4.12).



**Şekil 4.12** Deniz suyu içeren steril ve organizma inoküle edilmiş Malt Ekstrakt Pepton sıvı besiyeri a) Organizma içermeyen, %50 deniz suyu, %50 distile su içeren Malt Ekstrakt Pepton sıvı besiyeri b) %50 deniz suyu, %50 distile su içeren Malt Ekstrakt Pepton sıvı besiyerindeki *Phoma* sp. K21 izolatının 10 günlük inkübasyonu.

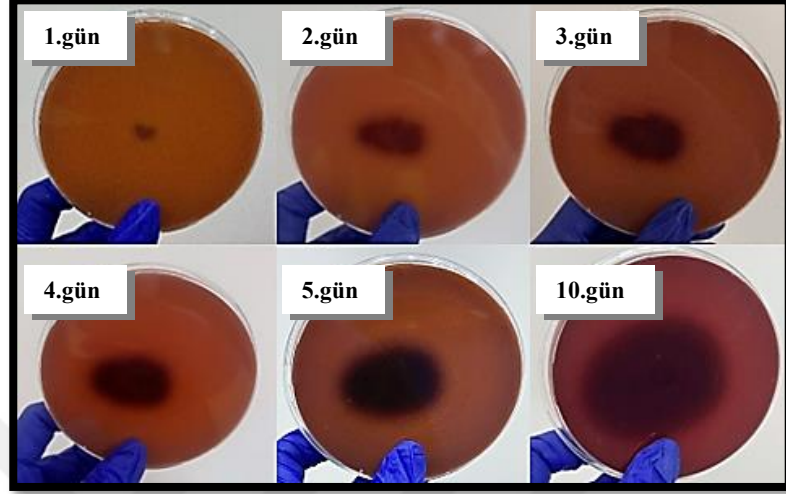
#### 4.5. Lakkaz Aktivitesi Deneyleri Sonuçları

##### 4.5.1. Kalitatif Lakkaz Aktivitesi Sonuçları

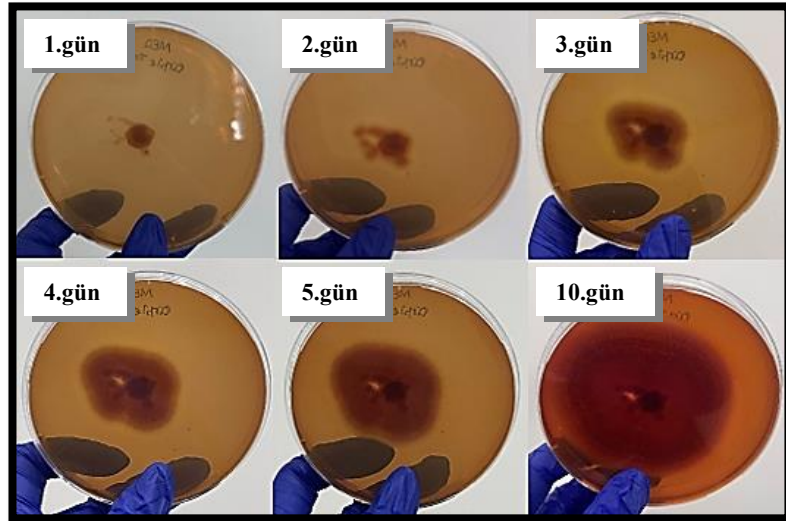
Lakkazın kalitatif taranması için deniz suyu içeren ve içermeyen Malt Ekstrakt Pepton Agar besiyerlerine lakkaz indikatörü olarak %0,5 tannik asit ve %0,1 siringaldizin ilave edilmiştir. Petriler, 10 gün 27°C’de inkübe edilmiştir (Patel and Bhaskaran, 2020; Debnath et al., 2021).

Deniz suyu içeren besiyerinde tannik asit varlığında *Phoma* sp. K21 izolatının etrafında kahverengi zon gözlemlenmiştir (Şekil 4.13); deniz suyu içermeyen besiyerinde herhangi bir zon gözlenmemiştir (Şekil 4.14). Deniz suyu içeren ve içermeyen besiyerlerinde siringaldizin varlığında herhangi bir zon gözlemlenmemiş olup, indikatör içermeyen besiyerlerindeki büyüme şekli

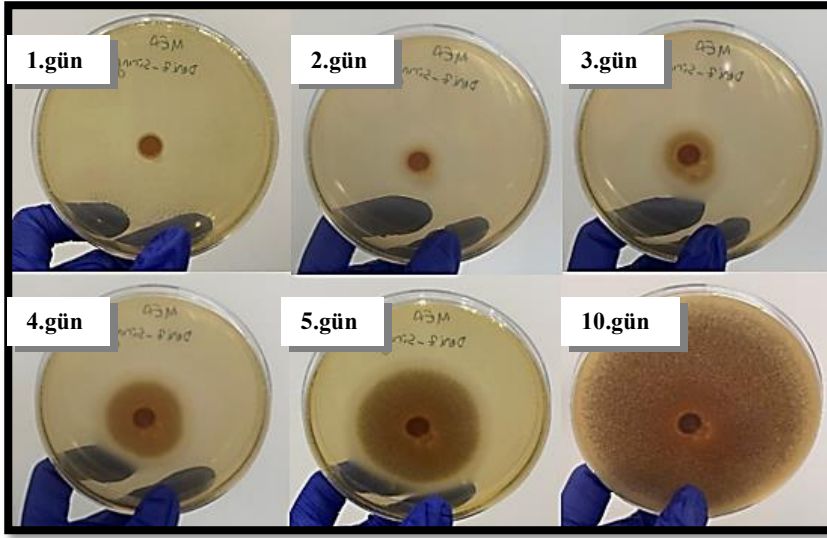
gözenmiştir (Şekil 4.15, Şekil 4.16). *Phoma* sp. K21 izolatı; tannik asit ile pozitif reaksiyon verirken; siringaldizin ile negatif reaksiyon vermiştir.



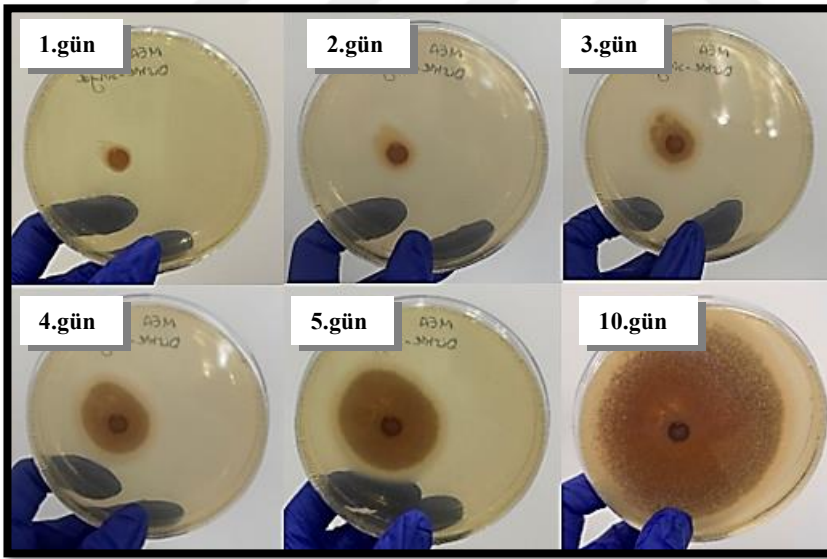
Şekil 4.13 *Phoma* sp. K21 izolatının % 50 deniz suyu, % 50 distile su içeren; % 0,5 tannik asitli Malt Ekstrakt Pepton Agar besiyerindeki 10 gün 27°C inkübasyon görüntüsü.



Şekil 4.14 *Phoma* sp. K21 izolatının %100 distile su içeren; % 0,5 tannik asitli Malt Ekstrakt Pepton Agar besiyerindeki 10 gün 27°C inkübasyon görüntüsü.



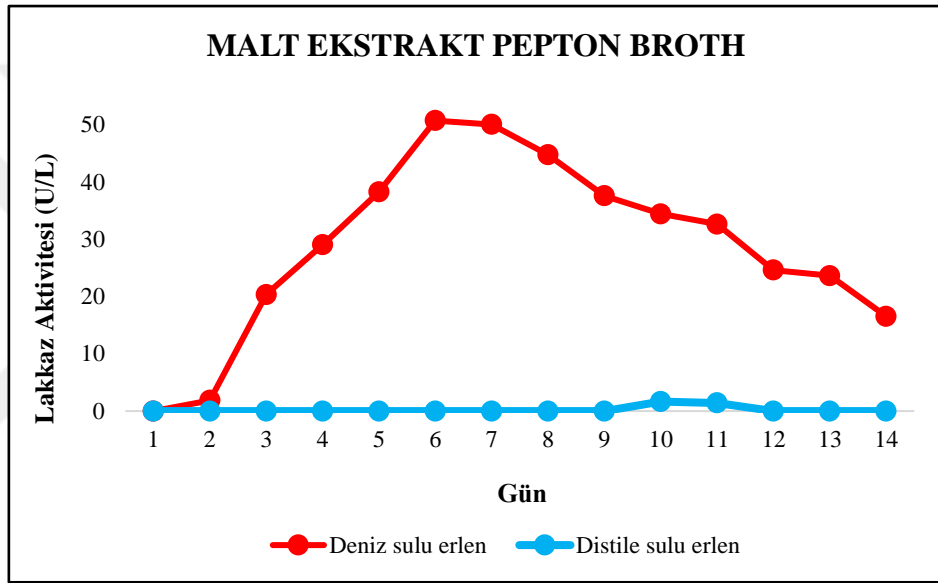
**Şekil 4.15** *Phoma* sp. K21 izolatının % 50 deniz suyu, % 50 distile su içeren; % 0,1 siringaldizinli Malt Ekstrakt Pepton Agar besiyerindeki 10 gün 27°C inkübasyon görüntüsü.



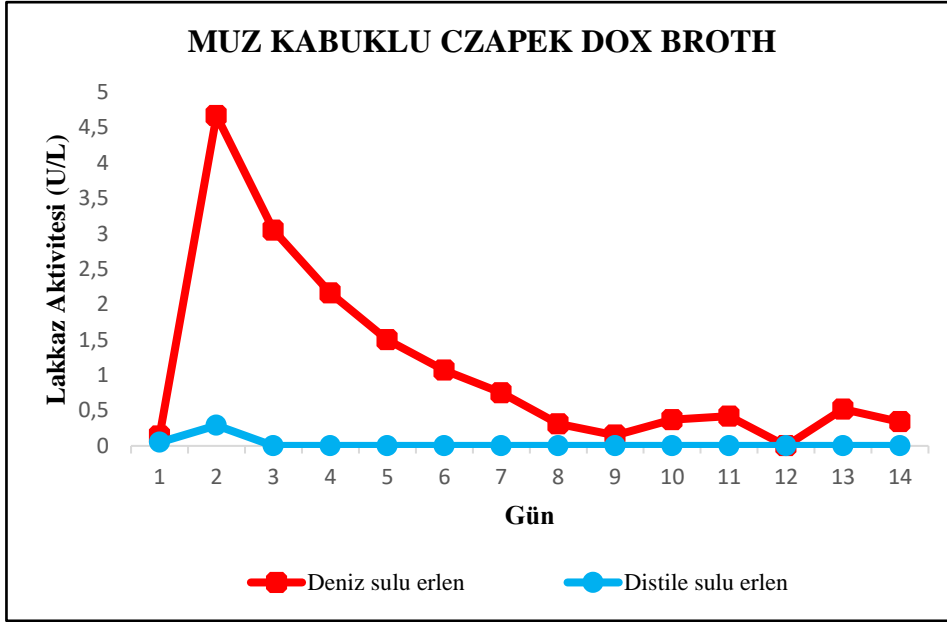
**Şekil 4.16** *Phoma* sp. K21 izolatının % 100 distile su içeren; % 0,1 siringaldizinli Malt Ekstrakt Pepton Agar besiyerindeki 10 gün 27°C inkübasyon görüntüsü.

#### 4.5.2. Kantitatif Lakkaz Aktivitesi Sonuçları

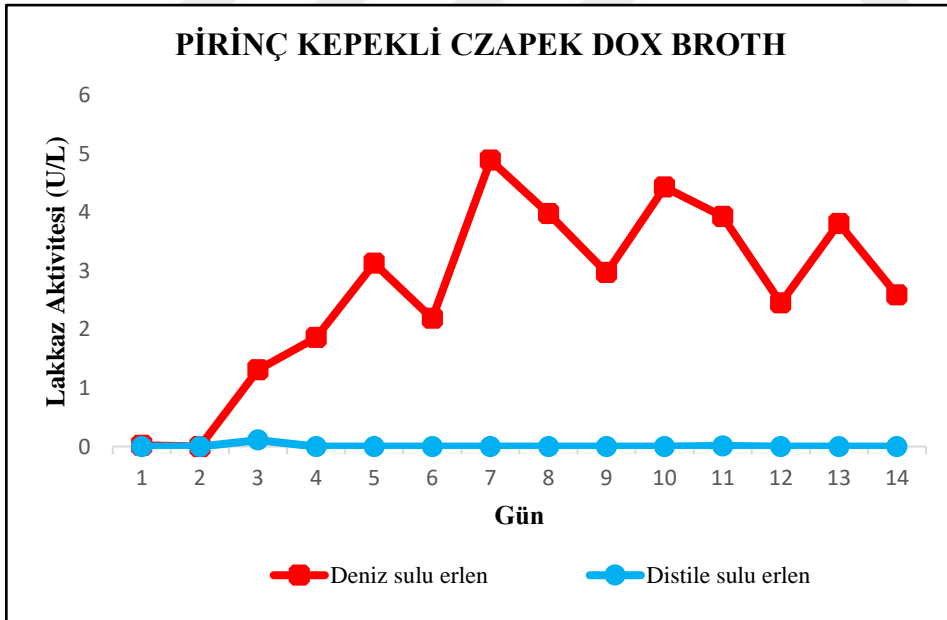
Deniz orijinli fungal izolat *Phoma* sp. K21'in lakkaz aktivitesi; farklı sıvı besiyerlerinde, deniz suyu içeren ve deniz suyu içermeyen gruplar olmak üzere, farklı tamponlarda ölçülmüştür (Şekil 4.17, Şekil 4.18, Şekil 4.19). Elde edilen sonuçlara göre en yüksek lakkaz aktivitesi (50,74 U/L) %50 deniz suyu, %50 distile su içeren Malt Ekstrakt Pepton sıvı besiyerinde 6.günde gözlenirken (Şekil 4.17); Glukoz-Maya Ekstraktlı sıvı besiyerinin kullanıldığı hiçbir deney grubunda lakkaz aktivitesi saptanmamıştır.



Şekil 4.17 *Phoma* sp. K21 izolatının Malt Ekstrakt Pepton Broth besiyerindeki; 14 gün boyunca glisin-HCl tamponu (pH=3) ile ölçülen lakkaz aktivitesi.



Şekil 4.18 *Phoma* sp. K21'in muz kabuklu Czapek Dox besiyerindeki, 14 gün boyunca sitrat-fosfat tamponu (pH=5) ile ölçülen lakkaz aktivitesi.



Şekil 4.19 *Phoma* sp. K21'in pirinç kepekli Czapek Dox besiyerindeki, 14 gün boyunca sitrat-fosfat tamponu (pH=5) ile ölçülen lakkaz aktivitesi.

#### 4.6. *In vitro* Renk Giderimi (Dekolorizasyon) Sonuçları

*Phoma* sp. K21 izolatı ile 100 mg/L konsantrasyonunda metilen mavisi, metil kırmızısı, kristal viyole ve remazol brilliant blue R boyalarının renk giderimi; % 50 deniz suyu, %50 distile su içeren Malt Ekstrakt Pepton sıvı besiyeri kullanılarak araştırılmıştır.

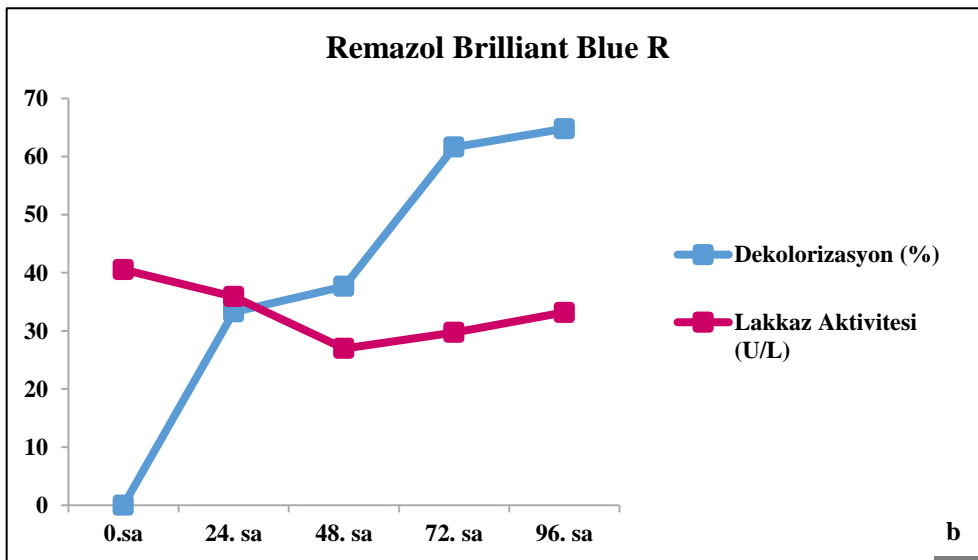
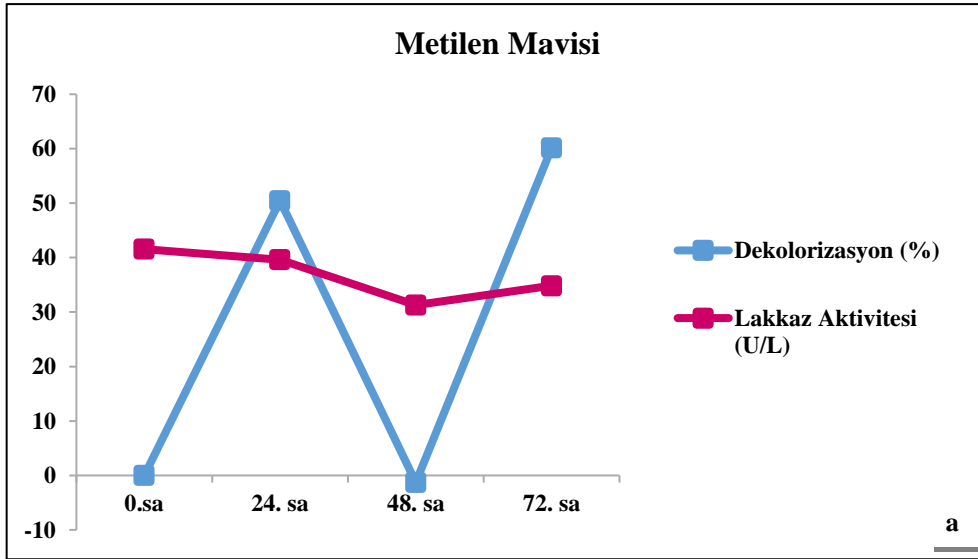
Çalışmada kullanılan boyaların 0., 24., 48., 72., 96., ve 120. saat renk giderme oranları ile eş zamanlı olarak lakkaz aktiviteleri ölçülmüştür. Bu sonuçlar doğrultusunda boyanın eklendiği anda enzim aktivitesi yükselmiş, metilen mavisi boyasında 72. saatte; kristal viyole ve RBBR boyalarında 96. saatte ve metil kırmızısı boyasında 120. saatte enzim aktivitesi artmış ve dekolozizasyon oranları da buna paralel olarak artmıştır (Şekil 4.20, Şekil 4.21).

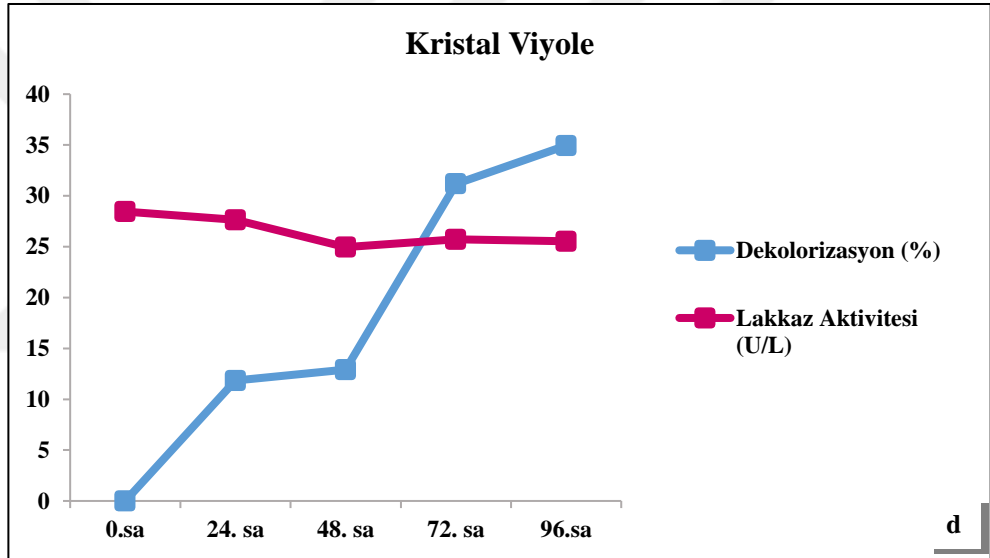
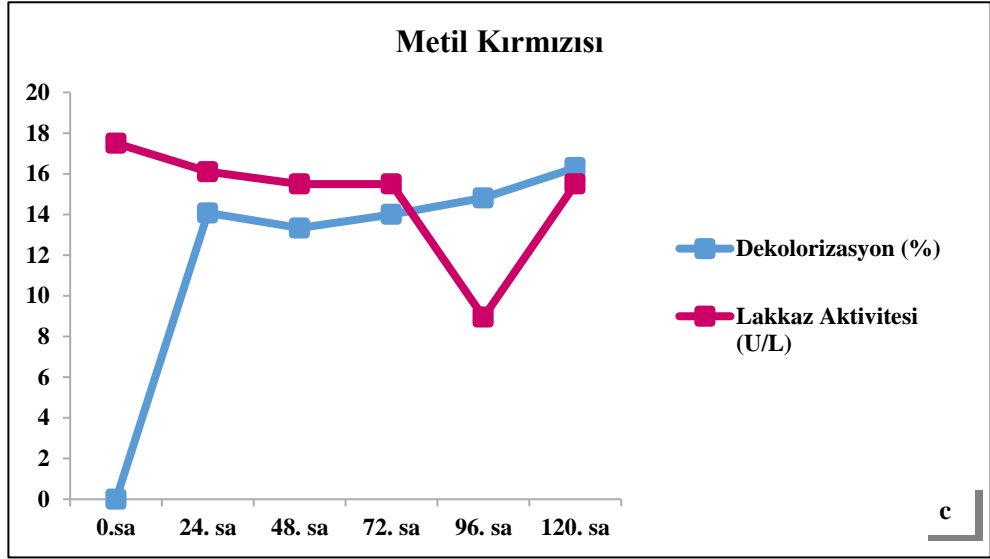
Metilen mavisi boyası ile gerçekleştirilen renk giderme deneyinde ilk 24 saatteki renk giderme miktarı % 50 olarak belirlenmiştir. 72 saat sonunda dekolozizasyon oranı % 60 değerine yükselmiştir. Lakkaz aktivitesinin boya eklendiğinde 41,5 U/L olduğu; 24. ve 48. saatte sırasıyla 39,6 U/L ve 31,29 U/L değerlerine düştüğü saptanmıştır. 72. saatte ise artış görülmüş ve aktivite 34,82 U/L olarak belirlenmiştir.

Remazol Brilliant Blue R boyası ile yapılan denemede 24 saat sonunda renk giderimi miktarı % 33 olarak hesaplanmış; 96. saatte % 64 oranına yükselmiştir. Lakkaz aktivitesinin ise boya eklendiğinde 40,5 U/L olduğu; 24. ve 48. saatte azaldığı görülmüş ve değerlerin sırasıyla 35,8 U/L ve 26,9 U/L olduğu saptanmıştır. 96. saatte aktivite yükselmiş ve 33,1 U/L olarak görülmüştür.

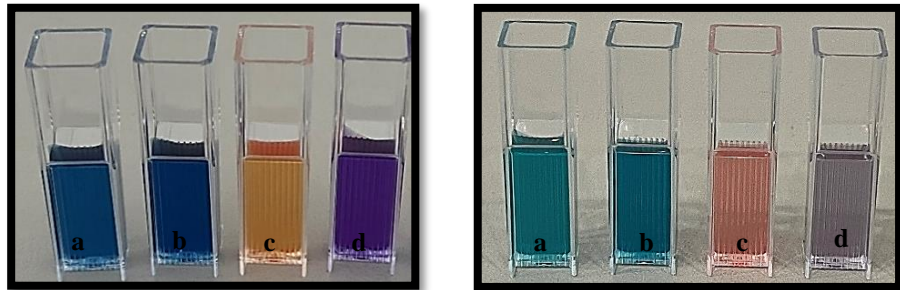
Metil kırmızısının renk giderimi denemesinin ilk 24 saatinde % 14 renk giderimi hesaplanmıştır. 120 saat sonunda ise aynı boya ile inkübe edilen kültürlerin renk giderim miktarı % 16 olarak saptanmıştır. Lakkaz aktivitesinin ise boya eklendiği an 17,5 U/L olup; 24. ve 48. saatte düştüğü, sırasıyla 16,1 U/L ve 15,5 U/L değerlerine ulaştığı görülmüştür. 120. saatteki lakkaz aktivitesinin ise 15,5 U/L'ye sabitlendiği saptanmıştır.

Kristal viyole ile gerçekleştirilen renk giderme denemesinde 24 saatte renk giderme miktarı % 11 olarak saptanmış; 96. saatte % 34 oranına yükselmiştir. Lakkaz aktivitesinin ise boya eklendiği anda 28,4 U/L olduğu; 24. ve 48. saatte sırasıyla 27,6 U/L ve 24,9 U/L değerlerine düştüğü saptanmıştır. 96. saatteki ölçümde artış görülmüş ve aktivite 25,5 U/L olarak belirlenmiştir.



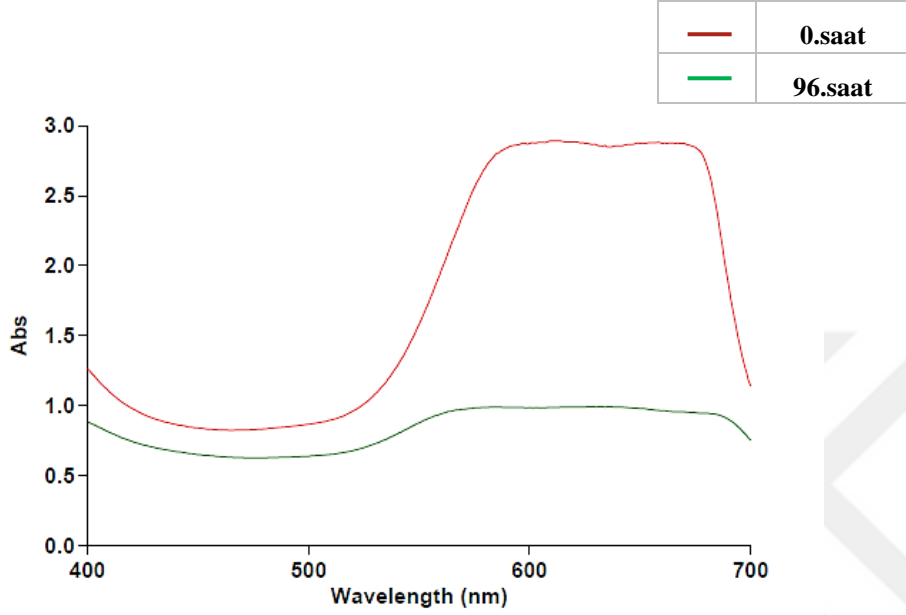


Şekil 4.20 Boyaların 0., 24., 48., 72., 96. ve 120. saatteki lakkaz aktiviteleri ve dekolorizasyon oranları a) Metilen mavisi b) Remazol brilliant blue R (RBBR) c) Metil kırmızısı d) Kristal viyole.

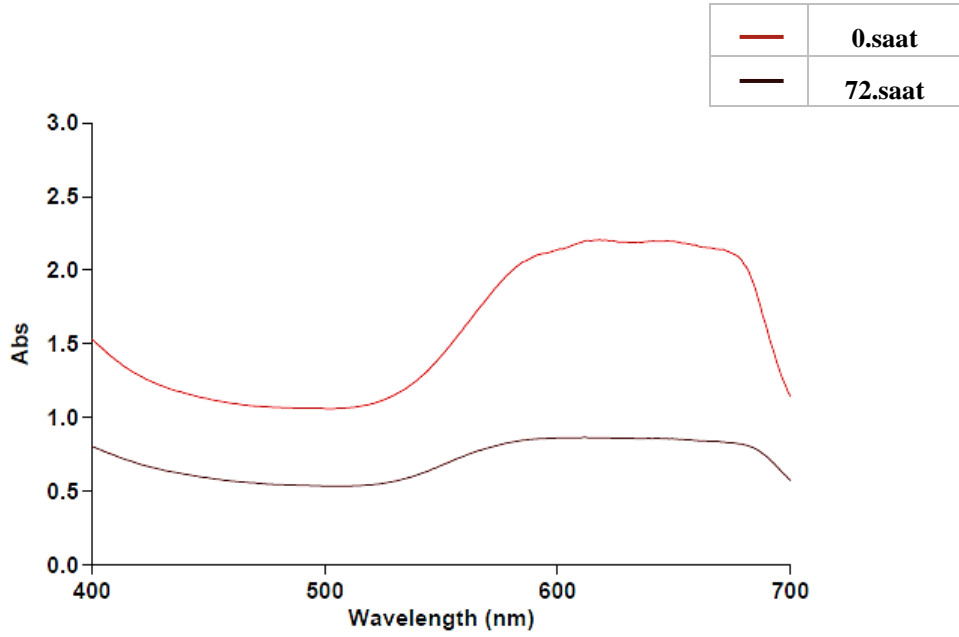


Şekil 4.21 Renk giderimi öncesi ve 120.saat sonundaki renk giderimi a) Metilen mavisi b) Remazol brilliant blue R (RBBR) c) Metil kırmızısı d) Kristal viyole.

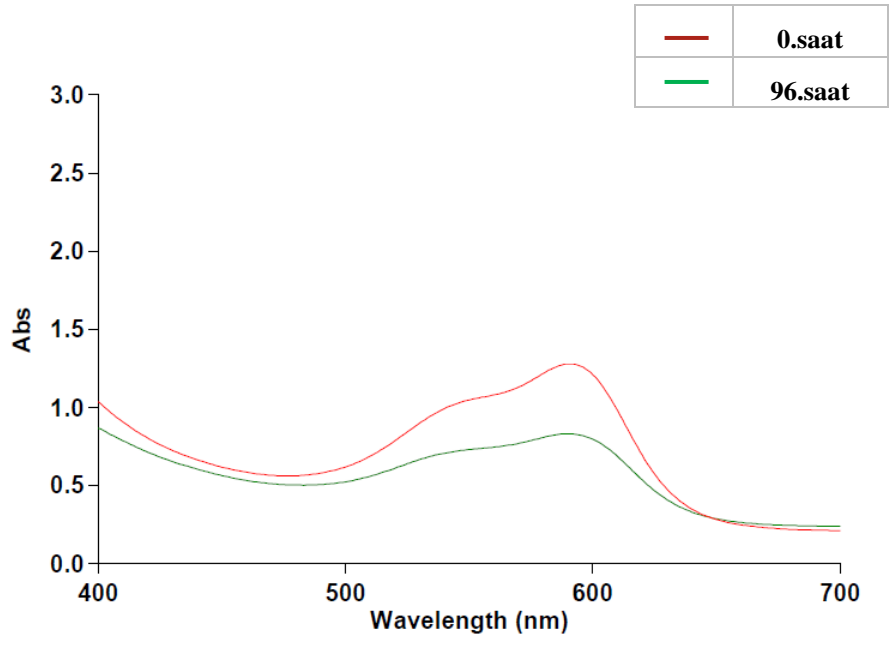
120 saat aralığında en yüksek dekolorizasyona uğrayan boyar madde remazol brilliant blue R (% 64) ve devamında ise metilen mavisi (% 60) olarak belirlenmiştir. Bunları kristal viyole (% 34) ile takip etmiş ve metil kırmızısı boyası için daha düşük sonuç (% 16) elde edilmiştir (Şekil 4.22, 4.23,. 4.24, 4.25, 4.26).



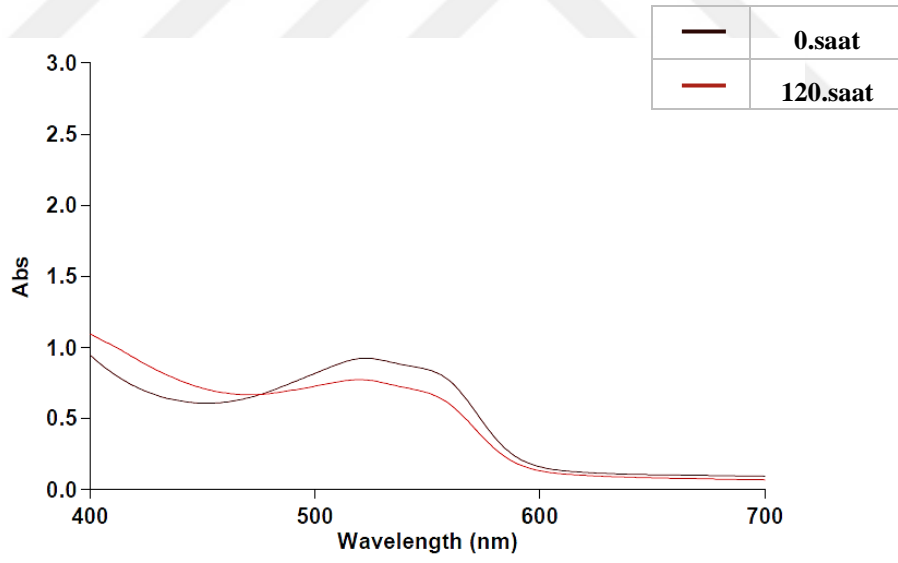
Şekil 4.22 Spektrofotometrik tarama sonucunda remazol brilliant blue R'nin absorpsiyon grafiği.



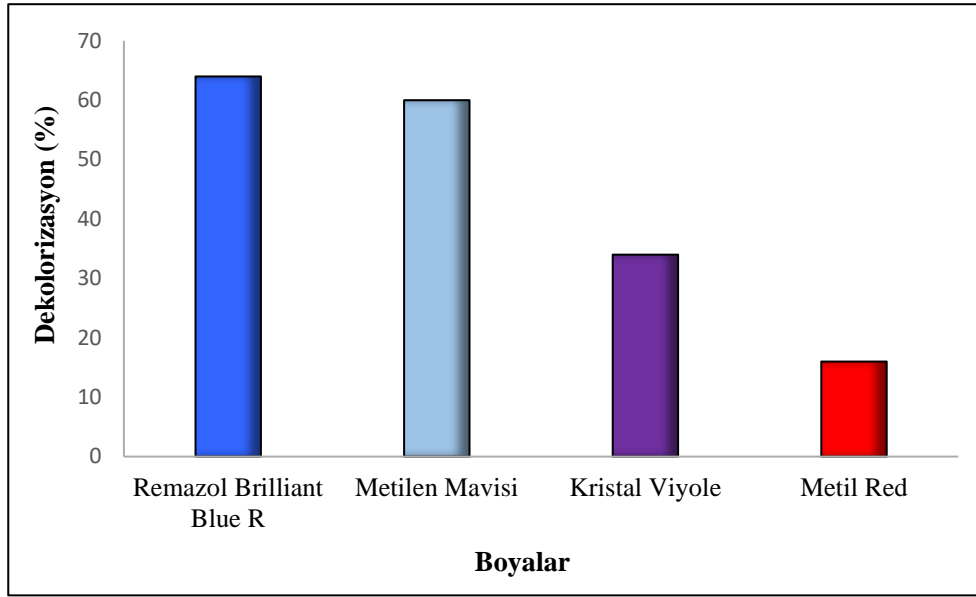
Şekil 4.23 Spektrofotometrik tarama sonucunda metilen mavisinin absorpsiyon grafiği.



Şekil 4.24 Spektrofotometrik tarama sonucunda kristal viyolenin absorbands grafiği.



Şekil 4.25 Spektrofotometrik tarama sonucunda metil kırmızısının absorbands grafiği.

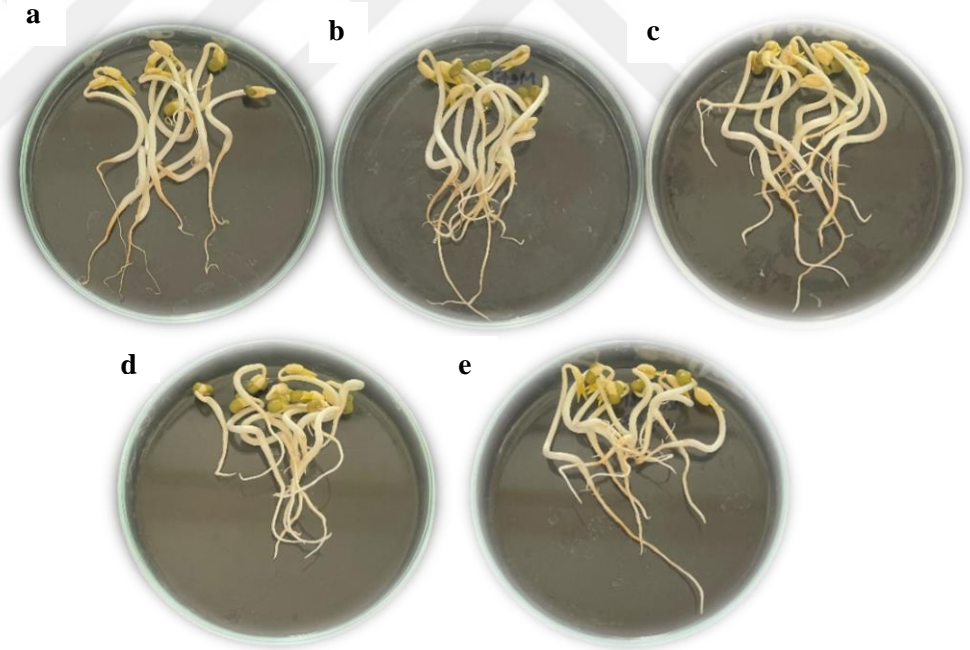
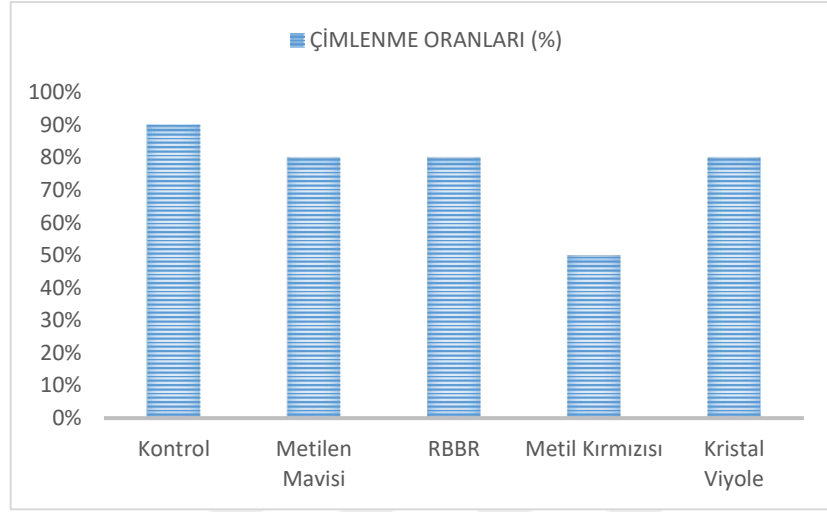


Şekil 4.26 120. saat sonunda boyaların renk giderme oranları.

#### 4.7. Fitotoksisite Deneyi Sonuçları

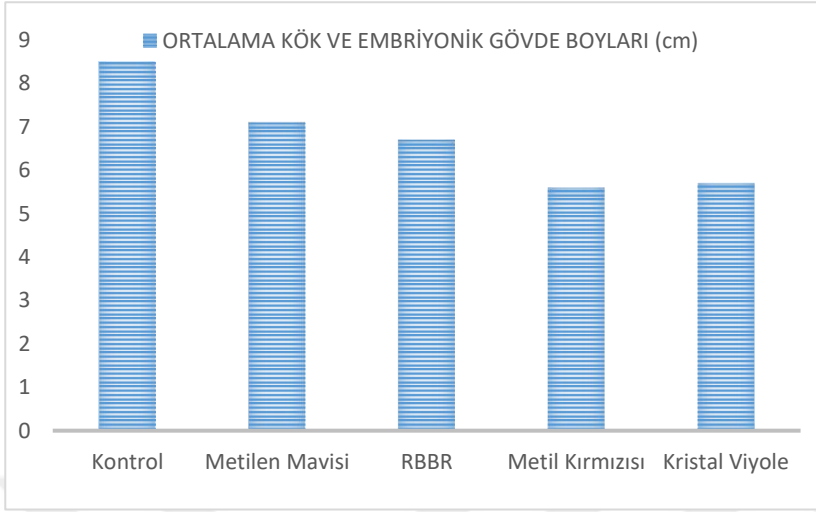
Deniz orijinli fungus *Phoma* sp. K21'in boya giderimi ürünlerinin, Maş fasulyesi (*Phaseolus aureus*) tohumları üzerindeki biyotoksisitesini değerlendirmek için gerçekleştirilen fitotoksisite testinin sonuçları şu şekildedir: 27°C'de 3 gün inkübe edilen tohumların 24. saatte ölçülerek kaydedilen çimlenme yüzdeleri kontrol grubunda % 90, metilen mavisi, RBBR ve kristal viyole deney gruplarında % 80 iken; metil kırmızısı deney grubunda % 50 oranını göstermiştir (Çizelge 4.2). 3 gün sonunda ölçülen kök ve embriyonik gövde boyları kontrol grubunda ortalama 8,5 cm; metilen mavisi grubunda ortalama 7,1 cm; RBBR grubunda ortalama 6,7 cm; metil kırmızısı grubunda ortalama 5,6 cm ve kristal viyole grubunda ortalama 5,7 cm olarak belirlenmiştir (Şekil 4.27) (Çizelge 4.3). Fitotoksisite deneyinin sonuçlarına göre *Phoma* sp. K21'in boya giderimi ürünlerinin, Maş fasulyesi tohumlarının büyümesi üzerinde herhangi bir inhibasyona sebep olmadığı saptanmıştır.

**Çizelge 4.2** 27°C'de 24 saat inkübasyon sonunda elde edilen çimlenme oranları (%).



**Şekil 4.27** Sadece çeşme suyu (kontrol) ve çeşme suyu ile seyreltilmiş *Phoma* sp. K21'in boya giderimi ürünleri ile sulanan, 27°C'de 3 gün inkübasyon sonunda elde edilen Maş fasulyesi (*Phaseolus aureus*) tohumları görüntüleri a) Kontrol b) Metilen mavisi c) RBBR d) Metil kırmızısı e) Kristal viyole.

**Çizelge 4.3** 27°C'de 3 gün inkübasyon sonunda elde edilen ortalama kök ve embriyonik gövde boyları (cm).



## 5. TARTIŞMA

Sanayileşmenin hızlı gelişimi, endüstriyel kirliliğin çevreye deşarjının artmasına sebep olmuştur. Endüstriyel amaçlarına hizmet ettikten sonra sentetik boyalar, çevresel su kaynaklarına atılmaktadır. Boyalar düşük konsantrasyonlarda bile çevreye zarar vermektedir. Tekstil boyaları, hem su kütlelerine estetik açıdan zarar verir, hem de ışığın sudan geçmesini engeller. Bu nedenle fotosentez oranında ve çözünmüş oksijen seviyelerinde azalmaya yol açmaktadır. Ayrıca tekstil boyaları toksik, mutajenik ve kanserojeniktir (Lellis et al., 2019). Çevresel kirleticiler olarak kalıcı ve biyomagnifikasyon sağlayarak tüm besin zincirlerini geçmektedirler (Sandhya, 2010), öyle ki daha yüksek trofik seviyelerdeki organizmalar avlarına kıyasla daha yüksek kirlilik seviyeleri göstermektedir (Newman, 2009).

Toksik ve kanserojen kimyasallar içeren bu atık suyun arıtılması, çevre ve halk sağlığına yönelik riskin kontrol edilmesi için önem arz etmektedir. Atık su; biyolojik ajanlar, kimyasal (ozonlama, fenton reaktifleri, kimyasal çökeltme, iyon değişimi, fotokataliz, ultrason ve güneş enerjili işlemler) veya fiziksel (sedimentasyon, membran filtrasyonu, koagülasyon ve flokülasyon, ultrafiltrasyon, nanofiltrasyon, adsorpsiyon ve ters osmoz gibi) çeşitli teknikler kullanılarak arıtılır (Ye et al., 2019; Saratale et al., 2021). Daha önceki araştırmalara göre; birçok atık su arıtma yöntemi, yüksek bakım maliyetleri, yüksek sermaye veya işletme giderleri, yüksek çamur çıkışı ve düşük verimlilik gibi dezavantajları nedeniyle ekonomik olarak uygulanabilir değildir (Singh and Arora, 2011; Cai et al., 2017).

Günümüzde atık sulardan çevresel tehdit oluşturan renk ve toksisitenin giderilmesi için azoreduktazlar, lakkazlar ve peroksidazlar (Imran et al., 2015) gibi mikroorganizmalar tarafından hücre dışı salgılanan enzimlerin (Doble and Kumar, 2005) kullanılması, tekstil atıklarının arıtılması için en ekonomik kaynak olarak önerilmektedir (Paździor et al., 2017). Ayrıca, enzim aracılı biyokataliz ile kimyasal süreçlere kıyasla daha az tehlikeli yan ürünler üretilmektedir (Srinivasulu et al., 2022).

Farklı deniz orijinli fungus türleri için biyoteknolojik işlemlerde kullanılacak çok çeşitli hidrolitik ve oksidatif enzimler rapor edilmiştir. Deniz orijinli funguslar, ucuz substratlar üzerinde gelişme ve farklı fizyolojik özelliklere sahip enzimler oluşturma yetenekleri nedeniyle endüstriyel uygulamalarda yer almaktadır. Bunlar arasında lignolitik enzimler, endüstriyel ve çevresel alanlar gibi çeşitli potansiyel kullanım alanlarına sahiptir. Deniz kaynaklı fungal enzimlerin araştırılmasıyla ilgili çalışmalar, karadaki benzerlerinden farklı yeni enzimlerin keşfedilmesine yol açabilir ve böylelikle mikrobiyal grubun çeşitliliği ve ekolojisi hakkındaki anlayışımızı artırabilir (Bonugli-Santos, 2015).

Tekstil boyaları da dahil olmak üzere birçok fungusun kalıcı kirleticileri parçalayabildiği bilinmektedir (Haritash and Kaushik, 2009). Deniz orijinli funguslar yüksek tuz ve pH seviyelerine uyumlu oldukları için atık suyun renginin giderilmesinde önemli bir biyolojik avantaja sahiptir çünkü birçok tekstil prosesi tuzlu ve alkali koşullarda atık su üretebilir. Mantar hücreleri, boyaların rengini gidermek için oksidatif reaksiyonlar kullanır ve bu da zararlı olmayan bileşiklerin üretilmesiyle sonuçlanabilir (Ciullini et al., 2008). Raghukumar ve arkadaşları (1996, 2004, 2008) ve D'Souza ve arkadaşları (2006), tekstil atıklarının kongo kırmızısı, brilliant green ve RBBR gibi sentetik boyaların deniz orijinli mantarlar tarafından önemli ölçüde renksizleştirildiğini göstermiştir.

Filamentli fungusların ürettiği hücre dışı enzimler arasında lignolitik sistem, biyoremediasyon için oldukça önemlidir (Arun et al., 2008). Lakkaz, renk biyoremediasyonu için en yaygın kullanılan enzimdir (Ardila et al., 2021). Lakkaz, funguslarda ve diğer organizmalarda bulunan, fenolik kimyasalların oksidasyonunu artıran ve geniş bir substrat spesifikliğine sahip olan, dirençli aromatik boyalar da dahil olmak üzere birçok tekstil boyasını degrede edebilme potansiyeline sahip, çoklu bakır oksidazdır. Çalışmamız kapsamında da deniz orijinli fungus *Phoma* sp. K21 izolatının lakkaz enzimi kullanılarak sentetik boyaları giderme deneyleri yapılmıştır. Toker (2018) tarafından *Phoma* sp. K21 izolatının izolasyonunun gerçekleştirildiği bölge, Çakalburnu Lagünü ile bağlantılı İnciraltı Sahili'dir. İzolasyonun gerçekleştirildiği bölgenin mevsimsel olarak tuzluluk gibi özelliklerinin değişebilmesi nedeniyle, izole edilen *Phoma* sp. K21'in, değişken

çevre koşullarına adaptasyon sağladığı söylenebilmektedir (Toker, 2018; Yucel-Gier et al., 2018).

Bu tez çalışmasında *Phoma* sp. K21 izolatu %50 deniz suyu içeren ve %100 distile su içeren ayrı katı besiyerlerinde ve sıvı besiyerlerinde üretilmiştir. İzolatu enzim aktivitesi ve renk giderimi deneyleri ise % 50 deniz suyu ve % 100 distile su içeren ayrı sıvı ortamlarda belirlenmiştir. Deniz suyu içeren ve içermeyen katı besiyerindeki fungal koloni büyümeleri karşılaştırıldığında büyüme farklılıkları görülmüş ve büyüme için deniz suyuna ihtiyaç duyduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar, deniz ve belirli bir tuzluluk oranına sahip bir lagün sisteminden izole edilen fungusun deniz orijinli fungus olarak kabul edilmesini mümkün kılmaktadır (Toker, 2018).

Endüstriyel uygulamalar için, gelişmiş stabilitelere ve farklı substrat spesifikliklerine sahip yeni lakkazların bulunması çok önemlidir. Lakkaz üretimi için tarama, enzim aktivitesi ölçümlerinin gözlemlenmesi altında sıvı kültürlerde (Szklarz et al., 1989; Pelaez et al., 1995; Luterek et al., 1997) veya görsel algılamaya izin veren renkli indikatör bileşikleri içeren katı ortamlarda (Nishida et al., 1989; De Jong et al., 1992; Barbosa et al., 1996) yapılmıştır. Tarama reaktifleri olarak tannik asit, gallik asit (Harkin and Obst, 1973), guaiacol ve siringaldizin (Nishida et al., 1989; De Jong et al., 1992) gibi sentetik fenolik reaktifler veya Remazol Brilliant Blue R (RBBR) ve Poly R-478 (Barbosa et al., 1996; D'souza et al., 1999; Raghukumar et al., 1996) gibi polimerik boyalar kullanılmaktadır. Çalışmamızda kalitatif lakkaz taraması için deniz suyu içeren ve içermeyen Malt Ekstrakt Pepton Agar ortamı ve iki farklı lakkaz indikatörü olarak tannik asit ve siringaldizin kullanılmıştır. İzolatu aynı besiyerinde farklı indikatörlere gösterdiği reaksiyonlar değişkenlik göstermiştir. Deniz suyu içeren besiyerinde tannik asit varlığında *Phoma* sp. K21 izolatının etrafında kahverengi zon gözlemlenmiş olup, deniz suyu içermeyen besiyerinde herhangi bir zon gözlenmemiştir. Siringaldizin varlığında deniz suyu içeren ve içermeyen besiyerlerinde herhangi bir zon gözlemlenmemiştir. *Phoma* sp. K21 izolatu; tannik asit ile pozitif reaksiyon verirken; siringaldizin ile negatif reaksiyon vermiştir.

Lakkaz gibi hücre dışı lignolitik enzimler üretme yetenekleri nedeniyle sentetik boyaları parçalamada en etkili mikroorganizmalar olduğu bilinen beyaz çürükçül mantarların aksine *Phoma*, lignolitik enzimler ürettiği daha az bilinen Ascomycota'ya ait bir fungus cinsidir (Cragg et al., 2015; Wesenberg et al., 2003; Daâssi et al., 2013; Lakshmi et al., 2017). *Phoma* cinsi; toprakta, suda ve çevrede bulunan türleri içermektedir. Önceki çalışmalarda; *Phoma betae*, *Phoma herbarum* gibi farklı *Phoma* türlerinin fungal lakkazlarının renk giderme özellikleri *in vitro* olarak incelenmiş ve sentetik boya gibi ksenobiyotiklerin parçalanması açısından biyoteknolojik umut verici türler oldukları vurgulanmıştır (Ali et al., 2020, Debnath et al., 2021).

*Phoma* sp. ile lakkaz üretimi, domates suyu gibi doğal substratlar için başarıyla optimize edilmiştir. Junghanns ve arkadaşları (2008) tarafından Almanya'da yapılan çalışmada; suda yaşayan askomisetik funguslar *Phoma* sp. UHH 5-1-03 ve *Coniothyrium* sp. Kl-S5'in lakkaz üretimini optimize etmek için, kompleks bitki bazlı, önemli miktarlarda pektin de dahil olmak üzere çok çeşitli organik bileşik içeren bir ortam olan domates suyu ve iki elisitör madde olarak Remazol Brilliant Blue R (RBBR) ve CuSO<sub>4</sub> ile kombinasyon halinde çalışılmıştır. Her iki suş için de domates suyu ve RBBR'nin lakkaz üretimi üzerinde kayda değer bir sinerjistik etkisi gözlemlenmiştir. 250 µM CuSO<sub>4</sub> konsantrasyonu, *Coniothyrium* sp. kültürlerinde en yüksek lakkaz aktivitelerine yol açarken; *Phoma* sp. için 50 µM CuSO<sub>4</sub> en iyi etkiyi göstermiştir. Sonuç olarak bu çalışma; askomisetlerde lakkaz üretimi için elisitörleri düşük maliyetli kompleks bir substratla birleştiren uygulanabilir bir alternatif sunmaktadır.

Ali ve arkadaşları (2020) tarafından Mısır'da yapılan çalışmada; *Phoma betae* lakkazı, hem batık hem de katı hal fermantasyonları kullanılarak üretilmiş, ayrıca lakkaz üretimi için ferulik asit, vertil alkol ve CuSO<sub>4</sub> indükleyicileri tek başına ve karışım halinde kullanılmıştır. Çalışma sonucunda; bu indükleyicilerin kombinasyon halinde eklendiklerinde maksimum sonuçlarla lakkaz aktivitesini arttırdığı gözlenmiştir. Lakkaz aktivitesi için optimum sıcaklığın 30°C olduğu bulunmuştur. Yüksek enzim aktivitesinin optimum pH 8'de gerçekleştiği; aşırı asidik ve alkali ortamlarda düşük aktivitelerin elde edildiği gözlenmiştir. Metal iyonlarının ve inhibitörlerin lakkaz aktivitesi üzerindeki etkisi araştırıldığında; Ni<sup>2+</sup>

ve  $K^{1+}$ 'nin lakkaz aktivitesini indüklerken;  $Na^{1+}$ ,  $Ag^{1+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , EDTA ve SDS bileşenlerinin farklı oranlarda lakkaz aktivitesini azalttığı görülmüştür.

Çalışmamızda boya renk gideriminde potansiyeli bulunan ve denizden elde edilen bir fungusun lakkaz aktivitesi değerlendirilmiştir. Bu çalışmada *Phoma* sp. K21 izolatının lakkaz aktivitesi kantitatif olarak saptanmıştır. *Phoma* sp. K21 izolatının en yüksek lakkaz aktivitesi; %50 deniz suyu, %50 distile su içeren Malt Ekstrakt Pepton sıvı ortamında 6. günde 50,74 U/L olarak belirlenmiştir. Muz kabuklu ve pirinç kepekli Czapek Dox sıvı ortamlarında ise daha düşük lakkaz aktivitesi ölçülmüştür. İndükleyici olarak ayrı ayrı ve birlikte olmak üzere 1 mM ferulik asit ve 1 mM  $CuSO_4$  eklen Glukoz-Maya Ekstraktlı sıvı besiyerinde lakkaz aktivitesi saptanmamıştır.

Libardi ve arkadaşları (2012) tarafından yapılan çalışmada; Brezilya'da önemli bir tarımsal atık olan muz kabukları alternatif karbon kaynağı olarak kullanılmış, *Phoma* sp. ve *Pleurotus ostreatus* tarafından lakkaz üretiminin araştırılması hedeflenmiştir. Çalışma sonucunda; *Phoma* sp. ve *P. ostreatus* için sırasıyla 752 ve  $1.117 UL^{-1}$  lakkaz üretimi elde edilmiştir. Meyve kabukları lakkaz sentezini uyarabilir çünkü fungus büyümesini destekleyen çözünür şekerler ve polisakkaritler içerirler. Bir başka hipotez de meyve kabuklarında bulunan mikro elementlerin veya aromatik kimyasalların büyüme ortamına salınmasıdır. Schlosser ve arkadaşları (1997) ile Moldes ve arkadaşlarına (2004) göre; lakkazların uyarılma mekanizması, lakkaz ekspresyonuna katkıda bulunan az miktarda çözünebilir fenolik bileşiğin ortamda salınmasıdır. Çalışmamızda kullanılan bir diğer sıvı besiyeri olan, lakkaz indükleyicisi olarak 50  $\mu M$ 'lik nihai konsantrasyonda  $CuSO_4$  içeren Muz Kabuklu Czapek-Dox ortamında lakkaz aktivitesi 4,67 U/L olarak belirlenmiştir. Bu durum *Phoma* cinsleri arasında birbirinden uzakta yer alan türler olduğunu düşündürmektedir. Bununla birlikte bu tarz çalışmalar, farklı coğrafi bölgelerden elde edilen hammaddelerin farklı sonuçlar oluşturabileceğini göstermektedir.

Debnath ve arkadaşları (2021) tarafından Hindistan'da yapılan çalışma; tarımsal endüstriyel atıklar olarak pirinç samanı ve *Shorea robusta* talaşının ortak substrat olarak kullanılmasının, batık fermantasyon ve katı hal fermantasyonu uygulanarak *Phoma herbarum* KU4 izolatından artan lakkaz üretimi üzerindeki etkilerini açıklamaktadır. Karakterizasyon çalışmaları; lakkazın görünür moleküler kütlelerinin 298 kDa, optimum pH'nın 5,0 ve optimum sıcaklığın 50°C olduğunu göstermiştir. *P. herbarum* KU4 izolatından lakkaz üretimini arttırmak için; pirinç samanı ve *S. robusta* talaşının birleşik etkisinin test edildiği bu çalışmada, daha önce bildirilen *Phoma* sp. türleri arasındaki en yüksek lakkaz üretimi gözlenmiştir. Ayrıca; sıvı ortama tannik asitin eklenmesi, lakkaz üretimini belirgin şekilde yükseltmiştir. Çalışma sonucunda; tarımsal kalıntıların kombinasyonu kullanılarak *P. herbarum* KU4 izolatından, daha ekonomik ve aynı zamanda çevresel atıkları azaltan gelişmiş lakkaz üretimi olanakları ortaya konulmuştur.

$C_{16}H_{18}ClN_3S$  kimyasal formülüne sahip heterosiklik bir molekül ve azo boya kategorisinde olan metilen mavisi boyası, en görünür ışığı yaklaşık 665 nm'de emer. İlaç ve tekstil endüstrilerinde renklendirici olarak kullanılmasının yanı sıra plastik, tabakhane, kozmetik, kağıt, gıda ve tıbbi endüstrilerde de geniş bir uygulama alanına sahiptir ve ayrıca mikroorganizmaların sınıflandırılması için bir boyama maddesi olarak da kullanılmaktadır (Sun et al., 2018; Kishor et al., 2021b). Bununla birlikte insan sağlığı ve çevre üzerinde zararlı bir etkiye sahip olan antagonistik doğası nedeniyle büyük ilgi görmektedir. Enzimatik prosedürler, fotodegradasyon reaksiyonları, elektrokimyasal ekstraksiyon, membran filtrasyonu, fiziksel adsorpsiyon ve kimyasal koagülasyon dahil olmak üzere atık sulardan metilen mavisi giderimi için çeşitli stratejiler üzerinde çalışılmıştır (Rafatullah et al., 2010; Muhamad et al., 2021; Hamad and Idrus, 2022).

Metil kırmızısı, azo boyanın bozunmasını araştırmak için model molekül olarak yaygın şekilde kullanılan, yalnızca bir  $-N=N-$  renk grubuna ve  $C_{15}H_{15}N_3O_2$  kimyasal formülüne sahip bir azo boyadır (Panniello et al., 2012; Olukanni et al., 2019). Günümüzde metil kırmızısının biyodegradasyonunda uygun maliyetli, çevre dostu ve teknolojik gelişme açısından sürdürülebilir biyolojik yöntemler daha fazla ilgi görmektedir (Vatandoostarani et al., 2017). Metil kırmızısının parçalanması için etkili bir mikrobiyal suşun tanımlanması çok sayıda araştırmaya konu olmuş

ve ilgili mekanizmaların bazıları tanımlanmıştır. Literatürde, azo bağı simetrik olarak kırıldığında metil kırmızısının karşılık gelen aromatik aminlere indirgelediği gösterilmiştir (Pandey et al., 2007; Bafana et al., 2009). Bununla birlikte, ortaya çıkan aromatik aminler daha mutajenik ve nörotoksiktir ve bozunmaya daha az duyarlıdır (Gadaleta et al., 2016). Buna karşın mikroorganizmalardan bazıları azo bağını asimetrik olarak kırmaktadır. Ancak metil kırmızısının mikroorganizmalar tarafından asimetrik kırılmasına ilişkin raporlar nadirdir (Hu et al., 2021). Bu nedenle metil kırmızısını toksik olmayan maddelere indirgeyebilecek mikroorganizmaların bulunması önem arz etmektedir.

Trifenilmetan boya kristal viyole,  $C_{25}H_{30}ClN_3$  kimyasal formülüne sahip olan katyonik bir boyadır. Tekstil ve kağıt boya endüstrilerinin yanı sıra lacivert ve siyah matbaa mürekkeplerinde, tükenmez kalemlerde ve inkjet yazıcılarda, gübre, antifriz, deterjan ve deri gibi çeşitli ürünleri renklendirmek için kullanılmakla birlikte, bakterileri sınıflandırmak için özellikle Gram boyamada histolojik bir boya olarak da kullanılmaktadır (Zahoor, 2012; Thairu et al., 2014). Ancak kristal viyole, çoğu boyaya benzer şekilde biyolojik olarak parçalanamaması, çeşitli ortamlarda kalıcı olması ve mikrobiyal metabolizasyonun zayıf olması nedeniyle dirençli sınıflandırmaya sahip toksik bir kanserojendir (Chen et al., 2007; Chakraborty et al., 2011). Ayrıca kristal viyole, su kütlelerinde istenmeyen renklenmelere neden olur, bu da fotosentetik aktiviteler için düşük ışık nüfuzuna neden olarak balıklardaki tümörlerin büyümesi gibi sudaki yaşamı etkiler (Mohanty et al., 2006; Ali and Muhammad, 2008). Sonuç olarak, hem insanların hem de suda yaşayan organizmaların hayatta kalması için deşarjdan önce kristal viyolenin atık sudan uzaklaştırılmasının uygulanması gerekmektedir (Kyi et al., 2020).

Remazol Brilliant Blue R (RBBR), tekstil endüstrisinde yaygın olan,  $C_{22}H_{16}N_2Na_2O_{11}S_3$  kimyasal formülüne sahip antrakinin bir boyadır. Sentetik bir boya olan RBBR, kumaşlarda canlı ve dayanıklı mavi renk üretme yeteneğinden dolayı seçilmektedir. Ancak RBBR; sucul ekosistemler için toksik olan, cilt hastalıklarına neden olabilen, kanserojen ve mutajenik özelliklere sahip olabilen reaktif boyalar kategorisinde yer almaktadır. RBBR gibi boya atıklarının arıtılmasının amacı; atık sudaki boyalardan kurtulmak veya miktarını azaltmak, aynı zamanda çevreyi ve insanları korumaktır (Kurnia et al., 2024).

Birçok çalışma; tekstil boyalarının *Candida oleophila* (Lucas et al., 2006), *Aspergillus ochraceus* (Humnabadkar et al., 2008), *Penicillium ochrocloron* (Shedbalkar and Jadhav, 2011), *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Alternaria alternata*, *Clostridium* sp., *Pseudomonas putida* ve *Butyrivibrio* gibi bakteri, mantar ve mayalar, tarafından renksizleştirildiğini bildirmiştir (Senan and Abraham, 2004; Saroj et al., 2015). Çalışmamızda boyaların dekolorizasyon sonuçları ele alındığında 120. saat sonunda deniz orijinli fungus *Phoma* sp. K21 lakkazının Remazol Brilliant Blue R boyasını % 64, metilen mavisi boyasını % 60, kristal viyole boyasını % 34 ve metil kırmızısı boyasını % 16 oranında giderdiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar, deniz orijinli fungus *Phoma* sp. K21'in boya parçalayıcı mikroorganizmaların kullanımı yoluyla atık sulardan sentetik boyaların etkili ve uygun maliyetli bir şekilde giderilmesi için uygun bir seçenek olabileceğini göstermektedir. Boya dekolorizasyonunda besin maddeleri ve fiziksel parametreler önemli bir etkilere sahiptir ve lakkaz içeren mekanizma, boya yapısına bağlı olarak farklılık gösterebilir (D'Souza et al., 2006).

Farklı boyaların kullanıldığı Debnath ve arkadaşları (2021) tarafından yapılan; *Phoma herbarum* KU4 izolatu tarafından yüksek lakkaz verimi elde etmeyi, termofilik ve alkaliye dayanıklı enzimin kısmi saflaştırılması, karakterizasyonu ve bu lakkazın çeşitli tekstil boyalarının renk gideriminde potansiyel uygulamasının araştırıldığı çalışmada 24 saatlik inkübasyonun ardından *P. herbarum* KU4 lakkazının; nötr kırmızı %42, metil menekşe %75, metil yeşili %65 ve indigo karminin %58 olmak üzere, test edilen tüm boyaların %50'sinden fazlasının rengini giderdiği görülmüştür. Böylelikle *P. herbarum* lakkazının; boya içeren endüstriyel atık suların arıtılmasında kullanılabilecek potansiyel bir boya renk giderici olduğu sonucuna varılmıştır. Ali ve arkadaşları (2020) tarafından yapılan; *Phoma betae* tarafından lakkaz üretilmesini, saflaştırılmasını, karakterize edilmesini ve bu lakkazın hem serbest hem de immobilize halde Eriochrome Cyanine R, Merantine Brilliant Yellow 8G, Rhodamine 123, Solvent Orange 20 ve Solvent Yellow 47 sentetik boyalarının renk gideriminde uygulanmasını amaçlayan çalışmada, inkübasyon süresinin arttıkça serbest ve hareketsiz lakkaz kullanılarak renk giderme yüzdesinin arttığı gösterilmiştir. Immobilize lakkaz durumunda, serbest olana göre daha yüksek renk giderme yüzdeleriyle test edilen tüm boyaların rengini giderebildiği görülmüştür. Böylelikle *Phoma betae*'nin gelecekte sentetik boya gibi

kzenobiyotiklerin bozunması göz önüne alındığında biyoteknolojik açıdan umut verici bir tür olduğu vurgulanmıştır.

Çevre temizleme teknolojisini geliştirmek amacıyla, atıkların biyolojik olarak iyileştirilmesi için, biyoinformatik ile ilgili araçların rolleri önemli bir araştırma konusudur. Hesaplmalı teknikler, boya giderimi için hedefin hızlı ve titiz bir şekilde taranmasını sağlar. Çalışmamız kapsamında biyoremediasyon alanında uygulanan biyoinformatik bir araç olan moleküler kenetleme yöntemi kullanılmıştır. Kenetleme çalışmalarının laboratuvar deneyleriyle entegrasyonu, biyoremediasyon alanındaki en yeni yaklaşımlardandır. Moleküler kenetleme yöntemi, enzim-boya bağlanma etkileşimlerini inceleyerek enzim tarafından kirleticinin bozunma olasılığını tahmin eder. Moleküler etkileşimlerin bağlanma afinitesi, enzimlerin farklı boya- renklerle sanal kataliz potansiyelini sunmaktadır. Moleküler kenetleme gibi biyoinformatik araçların, en iyi renk gidericileri seçmek için farklı mikroorganizmaların taranması için uygulanabileceği; çeşitli boya- mikroorganizma kültürleri tarafından incelenen renk giderme yüzdesinin yoğun birincil taramasının zamanını ve maliyetini azaltarak uygulanabileceği gösterilmiştir (Srinivasan et al., 2019).

Boyaların lakkaz aracılı giderimi için *in vitro* ve *in silico* yönteminin birleşik çalışmasına yönelik raporlar yakın zamanda gerçekleştirilmiş ve *in vitro* sonuçların *in silico* sonuçlarla iyi bir uyum içinde olduğu bildirilmiştir (Kumar et al., 2016; Srinivasan et al., 2019). Kumar ve arkadaşları (2016) tarafından yapılan çalışmada; tekstil boyası atık sularındaki azo boya- renkleri de- grede etmek için biyoremediasyona potansiyel adaylar olabilecek, güçlü boya renk giderme kabiliyetine sahip yeni bakteri izolatlarını tanımlanması hedeflenmiştir. Reactive Yellow F3R, Remazol Red RR, Reactive Red F3B, Joyfix Red RB boya- renkleri ile *Aeromonas hydrophila* strain SK16 ve *Lysinibacillus sphaericus* strain SK13 organizmalarının lakkaz ve azoredüktaz enzimlerinin kenetleme çalışması yapılmıştır. Elde edilen kenetleme sonuçlarına göre; Joyfix Red RB boyasının, boya ile bağlanmadan sorumlu olan *Aeromonas hydrophila*'nın lakkaz enzimi ile (-5.5 kcal/mol) etkileşime girip maksimum renk gidermeye neden olduğu; Reactive Red F3B boyasının en çok *L. sphaericus*'un azoredüktaz enzimi ile (-5.7 kcal/mol) etkileşime girdiği; *A. hydrophila* ile Remazol Red RR (-0.1 kcal/mol) ve *L. sphaericus* ile Reactive

Yellow F3R (-) hariç her iki türün de çalışılan tüm azo boyalarla iyi etkileşime sahip olduğu gösterilmiştir. *In silico* çalışmayı doğrulamak amacıyla yapılan *in vitro* dekolorizasyon deneylerinin sonuçlarına göre; *Aeromonas hydrophila*'nın lakkaz enziminin, Joyfix Red RB boyasını % 88 oranında giderdiği ve bu renk giderme yüzdesinin; skor açısından *in silico* analiz ile uyumlu olduğu görülmüştür. Diğer boyaların da renk giderme yüzdeleri açısından *in silico* verilerle uyum sağladığı belirtilmiştir.

Benzer şekilde Srinivasan ve arkadaşları (2019) tarafından; *Aeromonas hydrophila* ve *Lysinibacillus sphaericus* organizmalarının lakkaz ve azoredüktaz enzimleri ile Joyfix Yellow MR, Remazol Red RGB, Reactive Red F3B, Joyfix Red RB, Remazol Blue RGB, Turkuaz CL-5B boyalarının kenetleme çalışması yapılmıştır. Elde edilen *in silico* sonuçlara göre azoredüktazın; bu bakteriler için lakkaza kıyasla, gelişmiş bağlanma afiniteleri gösterdiği; Turkuaz CL-B dışındaki tüm boyaların, her iki bakteri kültüründe de yüksek oranda giderildiği belirlenmiştir. *In vitro* çalışmalarda elde edilen dekolorizasyon yüzdelerinin, *in silico* sonuçlarla uyum sağladığı görülmüştür.

Çalışmamızda *Phoma* sp. K21 suşunun lakkaz enziminin, sentetik boyaları deneysel olarak giderme potansiyeli ile *in silico* yöntem kullanılarak giderme potansiyelini karşılaştırmak için; boyaların modellenmiş lakkaz enzimiyle moleküler kenetleme uygulaması gerçekleştirilmiştir. Elde edilen moleküler kenetleme sonuçlarına göre *Phoma* sp.'nin lakkaz enzimi; metilen mavisi boyası ile -6.1 kcal/mol bağlanma enerjisiyle; metil kırmızısı ile -5.4 kcal/mol; RBBR ile -7.0 kcal/mol ve kristal viyole ile -5.9 kcal/mol bağlanma enerjisiyle kenetlenmiştir. Etkileşimleri destekleyen amino asitler ve kenetlenme puanları arasındaki farklılıklar, dolaylı olarak renk giderme hızının bir göstergesini sağlar ve farklı boyalar arasında incelenen enzim için renk giderme yüzdesindeki değişimi vurgular. *In vitro* renk giderimi deneylerinde elde edilen sonuçlara göre; *Phoma* sp. K21 lakkazının endüstriyel boyaları giderme oranları (120 saat sonunda); metilen mavisi için %60, metil kırmızısı için %16, remazol brilliant blue R (RBBR) için %64 ve kristal viyole için %34 olarak saptanmıştır. *In silico* sonuçların *in vitro* sonuçlar ile uyum içinde olduğu görülmektedir. Metil kırmızısının minimum renk giderme yüzdesi ile desteklenen en düşük kenetlenme puanına sahip olması ve

RBBR boyasının maksimum renk giderme yüzdesi ile desteklenen en yüksek kenetlenme puanına sahip olması nedeniyle moleküler kenetleme çalışmasının; boyaların lakkaza bağlanmasına ilişkin doğru tahminler verdiği görülmektedir.

Bu çalışmadan önce, atık sulardaki boyaların biyoremediasyonunda kullanılmak üzere; *in silico* olarak *Phoma* sp. türlerinin lakkazları ile boyaların moleküler kenetlemesine ilişkin herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Enzim aracılı boya gideriminde moleküler kenetleme yönteminin uygulandığı çeşitli çalışmalar Çizelge 5.1’de verilmiştir.



**Çizelge 5.1** Moleküler kenetleme yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen dekolorizasyon çalışmaları.

Boya	Enzim	Organizma	Kenetleme Programı	Kaynak
Procion blue, green, red Reactive yellow 86, Amido black, Kongo kırmızısı, Lissamine green, RBBR, Rose Bengal	Lakkaz	<i>Bacillus safensis</i> DSKK5	GOLD	(Singh et al., 2014)
Reactive Yellow F3R, Joyfix Yellow 53R, Remazol Red RR, Drimaren Black CL-S, Disperse Red F3BS	Lakkaz ve azoredüktaz	<i>Aeromonas hydrophila</i> SK16 ve <i>Lysinibacillus sphaericus</i> SK13	BioSolveIT-FlexX	(Srinivasan et al., 2017)
Drimaren Red CL-5B	Lakkaz ve azoredüktaz	<i>Aeromonas hydrophila</i> MTCC 1739 ve <i>Lysinibacillus sphaericus</i> MTCC 9523	BioSolveIT-FlexX	(Srinivasan and Sadasivam, 2018)
Malakit yeşili, Metil turuncusu, Rubine GFL, Red HE3B	Lakkaz ve katalaz	<i>Bacillus subtilis</i> SK1	Autodock Vina	(Kadam et al., 2018)
Reactive Red F3B, Remazol Red RGB, Joyfix Red RB, Joyfix Yellow MR, Remazol Blue RGB, Turquoise CL-5B	Lakkaz ve azoredüktaz	<i>Aeromonas hydrophila</i> ve <i>Lysinibacillus sphaericus</i>	BioSolveIT-FlexX	(Srinivasan et al., 2019)
Reactive blue160, Congo red, Bromophenol blue, Disperse blue 1, Malachite green	Lakkaz	<i>Trametes hirsuta</i>	Autodock Vina	(Dasgupta et al., 2020)
Reactive Red, Reactive Brown, Reactive Black	Azoredüktaz	<i>Bacillus subtilis</i>	ArgusLab	(Krithika et al., 2021)
Pigment red, Fuchsin base, Sudan IV	Lakkaz	<i>Bacillus subtilis subsp.subtilis str. 168</i>	Autodock Vina	(Pande et al., 2022)
Kongo red, metil turuncusu, Rhodamine B	Lakkaz, Lignin peroksidaz ve Manganez Peroksidaz	<i>Schizophyllum commune</i>	Molegro Virtual Docker	(Sorhie et al., 2022)

Reactive black 5, Acid blue 113, Acid orange 7	Lakkaz	<i>Trametes hirsuta D7</i>	AutoDock Vina	(Alam et al., 2023)
Malaşit yeşili	Lakkaz	<i>Ganoderma lucidum</i> MTCC-1039	AutoDock Vina	(Chamoli et al., 2023)
Amido black, Acid black 210, Chrome brown EB, Acid brown, Acid green, Acid red, Acid yellow, Acid blue, Acid violet, Acid orange çeşitleri olmak üzere 33 deri boyası	Lakkaz	<i>Bacillus licheniformis</i> NS2324	AutoDock Vina	(Chopra et al., 2023)

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde çevresel kirlilik tehdidi ile mücadele etmek için endüstriyel atık sulardan toksik ve kanserojen olabilen boyaları uzaklaştırabilen ve parçalayabilen biyolojik olarak uyumlu ve sürdürülebilir arıtma yöntemleri ön plandadır. Fungal lakkazların geniş bir yelpazedeki tekstil boyalarını kısa sürede renk giderme verimliliği dikkat çekicidir ve fungal lakkazın biyoyileştirici özelliklerinden verimli bir şekilde yararlanmak için daha fazla çalışma yapılması beklenmektedir. Bu tez çalışmasından önce atık sulardaki boyaların biyoremediasyonunda kullanılmak üzere *in silico* olarak *Phoma* sp. türlerinin lakkazları ile boyaların moleküler kenetlemesine ilişkin bir rapor bulunmadığı için, çalışmamızda sunulan sonuçlar deniz orijinli fungus *Phoma* sp. K21 lakkazının biyoteknoloji açısından potansiyelini vurgulamakta ve atık sulardaki boyaların parçalanması gibi kirlilik sorunlarına yönelik potansiyel uygulamalarına ilişkin anlayışımızı geliştirmektedir.

Biyoinformatik; deneysel laboratuvar prosedürleriyle birleştirildiğinde maliyet ve zaman tasarrufu sağlayarak, kirleticiler için uygun organizmaları ve enzimleri belirleyip kısıtlamaların üstesinden gelebilir. Moleküler düzeydeki etkileşimler nedeniyle, çalışılacak suşlara ait enzim yapıları tasarlanarak daha kesin sonuçların elde edilebileceği belirtilmelidir. Daha ileri hesaplamalı modelleme çalışmaları kesin sonuçları doğrulayacaktır. Biyoremediasyon teknolojilerinin geliştirilmesi, ekonomik büyümeyi çevreyle uyumlu bir şekilde teşvik edebilir ve yaşam kalitesini güvence altına alabilir. Daha verimli ve daha hızlı biyoremediasyon teknikleri geliştirmek için bu alanda yapılacak olan gelecekteki araştırmalar, mikrobiyal sistemler ve bunların enzimlerini anlamamıza katkıda bulunacaktır. Moleküler kenetleme yöntemi sadece boya parçalanması çalışmalarının değil; aynı zamanda zararsız sentetik boyalar tasarlamasının da bir aracı olabilir.

Moleküler kenetleme yönteminin basit ve hızlı işlem prosedürleri nedeniyle, bu alandaki raporların sayısı son 20 yılda artmış görünmektedir. Bilgisayar destekli ilaç tasarımı alanındaki önemli tekniklerden biri moleküler yerleştirmedir. Bu yöntem genomik, proteomik, metabolomik ve diğer omik teknolojilerindeki hızlı gelişimi ve farklı araştırma alanlarıyla entegrasyonu ile çeşitli organizmalardaki

biyoaktif maddeleri ve hastalıkları tedavi etmek için etki mekanizmalarını keşfetmeye yardımcı olacaktır.



**KAYNAKLAR DİZİNİ**

- Abdel-Hamid, A. M., Solbiati, J. O., Cann, I. K. O.,** 2013, Advances in Applied Microbiology, *Academic Press*, 82(1):1-28pp.
- Abdullayeva, F.,** 2022, Lakkaz üretici mayaların izolasyonu ve tanılanması, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, 85s.
- Agrawal, K., Chaturvedi, V., Verma, P.,** 2018, Fungal laccase discovered but yet undiscovered, *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1): 1-12pp.
- Ahlawat, S., Singh, D., Viridi, J. S., Sharma, K. K.,** 2019, Molecular modeling and MD-simulation studies: Fast and reliable tool to study the role of low-redox bacterial laccases in the decolorization of various commercial dyes, *Environmental Pollution*, 253: 1056-1065pp.
- Ahmadi Khozani, M., Emtiazi, G., Aghaei, S. S., Ghasemi, S. M., Zolfaghari, M. R.,** 2021, Application of fungal laccase for heavy metals precipitation using tannin as a natural mediator, *International Journal of Environmental Science and Technology*, 18(8): 2335-2344pp.
- Ain, Q. U., Aleksandrova, A., Roessler, F. D., Ballester, P. J.,** 2015, Machine-learning scoring functions to improve structure-based binding affinity prediction and virtual screening, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 5(6): 405-424pp.
- Akpınar, M. and Ozturk Urek, R.,** 2017, Induction of fungal laccase production under solid state bioprocessing of new agroindustrial waste and its application on dye decolorization, *3 Biotech*, 7: 1-10pp.
- Alam, R., Mahmood, R. A., Islam, S., Ardiati, F. C., Solihat, N. N., Alam, M. B., Kim, S.,** 2023, Understanding the biodegradation pathways of azo dyes by immobilized white-rot fungus, *Trametes hirsuta* D7, using UPLC-PDA-FTICR MS supported by in silico simulations and toxicity assessment, *Chemosphere*, 313: 137505pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Ali, E. A. M., Abd Ellatif, S., Abdel Razik, E.,** 2020, Production, purification, characterization and immobilization of laccase from *Phoma betae* and its application in synthetic dyes decolorization, *Egyptian Journal of Botany*, 60(1): 301-312pp.
- Ali, H. and Muhammad, S. K.,** 2008, Biosorption of crystal violet from water on leaf biomass of *Calotropis procera*, *J. Environ. Sci. Technol*, 1(3): 143-150pp.
- Ali, K. A. and Qayyum, H.,** 2007, Potential of plant polyphenol oxidases in the decolorization and removal of textile and non-textile dyes, *Journal of Environmental Sciences*, 19(4): 396-402pp.
- Al-Tohamy, R., Ali, S. S., Li, F., Okasha, K. M., Mahmoud, Y. A. G., Elsamahy, T., Sun, J.,** 2022, A critical review on the treatment of dye-containing wastewater: Ecotoxicological and health concerns of textile dyes and possible remediation approaches for environmental safety, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 231: 113160pp.
- Altuntaş, V. ve Murat, G. Ö. K.,** 2020, Protein–protein etkileşimi tespit yöntemleri, veri tabanları ve veri güvenilirliği, *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (19): 722-733ss.
- Ardila-Leal, L. D., Poutou-Piñales, R. A., Pedroza-Rodríguez, A. M., Quevedo-Hidalgo, B. E.,** 2021, A brief history of colour, the environmental impact of synthetic dyes and removal by using laccases, *Molecules*, 26(13): 3813pp.
- Arora, D. S. and Gill, P. K.,** 2001, Effects of various media and supplements on laccase production by some white rot fungi, *Bioresource Technology*, 77(1): 89-91pp.
- Arregui, L., Ayala, M., Gómez-Gil, X., Gutiérrez-Soto, G., Hernández-Luna, C. E., Herrera De Los Santos, M., Valdez-Cruz, N. A.,** 2019, Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation, *Microbial cell factories*, 18: 1-33pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Arun, A., Raja, P. P., Arthi, R., Ananthi, M., Kumar, K. S., Eyini, M.,** 2008, Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) biodegradation by basidiomycetes fungi, *Pseudomonas* isolate, and their cocultures: comparative in vivo and in silico approach, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 151: 132-142pp.
- Astrakas, L., Gousias, C., Tzaphlidou, M.,** 2011, Electric field effects on chignolin conformation. *Journal of Applied Physics*, 109(9): 094702pp.
- Atanasov, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E. M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Stuppner, H.,** 2015, Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review, *Biotechnology advances*, 33(8): 1582-1614pp.
- Atiwesh, G., Parrish, C. C., Banoub, J., Le, T. A. T.,** 2022, Lignin degradation by microorganisms: A review, *Biotechnology Progress*, 38(2): e3226.
- Aveskamp, M. M., De Gruyter, J., Crous, P. W.,** 2008, Biology and recent developments in the systematics of *Phoma*, a complex genus of major quarantine significance, *Fungal diversity*, 31: 1-18pp.
- Ayeronfe, F., Kassim, A., Ishak, N., Aripin, A., Hung, P., Abdulkareem, M.,** 2018, A review on microbial degradation of lignin, *Advanced Science Letters*, 24(6): 4407-4413pp.
- Aykut Özcan, V.,** 2010, Beyaz çürükçül mantarlardan lakkaz üretiminin araştırılması ve indüksiyonu, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, 94s.
- Bafana, A., Jain, M., Agrawal, G., Chakrabarti, T.,** 2009, Bacterial reduction in genotoxicity of Direct Red 28 dye, *Chemosphere*, 74(10): 1404-1406pp.
- Bai, G., Pan, Y., Zhang, Y., Li, Y., Wang, J., Wang, Y., Cao, J.,** 2023, Research advances of molecular docking and molecular dynamic simulation in recognizing interaction between muscle proteins and exogenous additives, *Food Chemistry*, 429: 136836pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Baldrian, P.**, 2006, Fungal laccases – occurrence and properties, *FEMS Microbiology Reviews*, 30: 215–242pp.
- Barapatre, A., Aadil, K. R., Jha, H.**, 2017, Biodegradation of malachite green by the ligninolytic fungus *Aspergillus flavus*, *CLEAN–Soil, Air, Water*, 45(4): 1600045pp.
- Barathikannan, K., Ramasamy, K. P., Manohar, C. S., Meena, R. M.**, 2017, Diversity and decolorization potential of fungi isolated from the coral reef regions off Kavaratti, India, *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 46(03):497-503pp.
- Barbosa, A. M., Dekker, R. F. H., Hardy, G. S.**, 1996, Veratryl alcohol as an inducer of laccase by an ascomycete, *Botryosphaeria* sp., when screened on the polymeric dye Poly R-478, *Letters in Applied Microbiology*, 23(2): 93-96pp.
- Baughman, G. L. and Weber, E. J.**, 1994, Transformation of dyes and related compounds in anoxic sediment: kinetics and products, *Environmental science & technology*, 28(2): 267-276pp.
- Belgacem, M. N., Blayo, A., Gandini, A.**, 2003, Organosolv lignin as a filler in inks, varnishes and paints, *Industrial Crops and Products*, 18(2): 145-153pp.
- Ben Ayed, A., Akrou, I., Albert, Q., Greff, S., Simmler, C., Armengaud, J., Record, E.**, 2022, Biotransformation of the fluoroquinolone, levofloxacin, by the white-rot fungus *Coriolopsis gallica*, *Journal of Fungi*, 8(9): 965pp.
- Berradi, M., Hsissou, R., Khudhair, M., Assouag, M., Cherkaoui, O., El Bachiri, A., El Harfi, A.**, 2019, Textile finishing dyes and their impact on aquatic environs, *Heliyon*, 5(11): e02711.
- Betts, W. B. and Dart, R. K.**, 1988, The degradation of lignin-related compounds by *Aspergillus flavus*, *Microbiology*, 134(9): 2413-2420pp.
- Bisschops, I. and Spanjers, H.**, 2003, Literature review on textile wastewater characterization, *Environmental technology*, 24(11): 1399-1411pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Boerema, G. H. (Ed.)**, 2004, *Phoma* identification manual: differentiation of specific and infra-specific taxa in culture, CABI, 480pp.
- Bonugli-Santos, R. C., dos Santos Vasconcelos, M. R., Passarini, M. R., Vieira, G. A., Lopes, V. C., Mainardi, P. H., Sette, L. D.**, 2015, Marine-derived fungi: diversity of enzymes and biotechnological applications, *Frontiers in microbiology*, 6: 269pp.
- Bonugli-Santos, R. C., Durrant, L. R., Sette, L. D.**, 2012, The production of ligninolytic enzymes by marine-derived basidiomycetes and their biotechnological potential in the biodegradation of recalcitrant pollutants and the treatment of textile effluents, *Water, Air, & Soil Pollution*, 223: 2333-2345pp.
- Cai, Z., Sun, Y., Liu, W., Pan, F., Sun, P., Fu, J.**, 2017, An overview of nanomaterials applied for removing dyes from wastewater, *Environmental Science and Pollution Research*, 24: 15882-15904pp.
- Carbajo, J. M., Junca, H., Terrón, M. C., González, T., Yagüe, S., Zapico, E., González, A. E.**, 2002, Tannic acid induces transcription of laccase gene *gclcc1* in the white-rot fungus *Coriolopsis gallica*, *Canadian journal of microbiology*, 48(12): 1041-1047pp.
- Carmen, Z. and Daniela, S.**, 2012, Textile organic dyes-characteristics, polluting effects and separation/elimination procedures from industrial effluents-a critical overview, 3: 55-86pp.
- Chakraborty, S., Chowdhury, S., Saha, P. D.**, 2011, Adsorption of crystal violet from aqueous solution onto NaOH-modified rice husk, *Carbohydrate Polymers*, 86(4): 1533-1541pp.
- Chamoli, S., Singh, A., Kapoor, R. K., Singh, S., Singh, R. K., Saini, J. K.**, 2023, Purification and characterization of laccase from *Ganoderma lucidum* and its application in decolorization of malachite green dye, *Bioresource technology reports*, 21: 101368pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Chen, C. C., Liao, H. J., Cheng, C. Y., Yen, C. Y., Chung, Y. C.,** 2007, Biodegradation of crystal violet by *Pseudomonas putida*, *Biotechnology letters*, 29: 391-396pp.
- Chen, G., Seukep, A. J., Guo, M.,** 2020, Recent advances in molecular docking for the research and discovery of potential marine drugs, *Marine drugs*, 18(11): 545pp.
- Chen, R., Li, L., Weng, Z.,** 2003, ZDOCK: an initial-stage protein-docking algorithm, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 52(1): 80-87pp.
- Chen, T. and Guestrin, C.,** 2016, Xgboost: A scalable tree boosting system, *In Proceedings of the 22nd acm sigkdd international conference on knowledge discovery and data mining*, 785-794pp.
- Chopra, N. K., Singhal, D., Saini, R., Sondhi, S.,** 2023, Structure analysis and molecular docking studies of laccase from “*Bacillus licheniformis* NS2324”, *Sustainable Chemistry for the Environment*, 1: 100004pp.
- Ciullini, I., Tilli, S., Scozzafava, A., Briganti, F.,** 2008, Fungal laccase, cellobiose dehydrogenase, and chemical mediators: combined actions for the decolorization of different classes of textile dyes, *Bioresource Technology*, 99(15): 7003-7010pp.
- Civzele, A., Stipniece-Jekimova, A. A., Mezule, L.,** 2023, Fungal ligninolytic enzymes and their application in biomass lignin pretreatment, *Journal of Fungi*, 9(7): 780pp.
- Collins, P. J., and Dobson, A.,** 1997, Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*, *Applied and Environmental Microbiology*, 63(9): 3444-3450pp.
- Cookson, L. J.,** 1995, Reliability of poly B-411, a polymeric anthraquinone-based dye, in determining the rot type caused by wood-inhabiting fungi, *Applied and environmental microbiology*, 61(2): 801-803pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Cortes, C. and Vapnik, V.**, 1995, Support-vector networks, *Machine learning*, 20: 273-297pp.
- Cragg, S. M., Beckham, G. T., Bruce, N. C., Bugg, T. D., Distel, D. L., Dupree, P., Zimmer, M.**, 2015, Lignocellulose degradation mechanisms across the Tree of Life, *Current opinion in chemical biology*, 29: 108-119pp.
- D'souza, T. M., Merritt, C. S., & Reddy, C. A.**, 1999, Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*, *Applied and environmental microbiology*, 65(12): 5307-5313pp.
- Daâssi, D., Mechichi, T., Nasri, M., Rodriguez-Couto, S.**, 2013, Decolorization of the metal textile dye Lanaset Grey G by immobilized white-rot fungi, *Journal of Environmental Management*, 129: 324-332pp.
- Dasgupta, D., Vishwakarma, S. R., Gupta, P. P.**, 2020, *In-silico* molecular modelling and docking studies of selected textile dyes and laccase to investigate the dye degradation mechanism of the enzyme, *Journal of Advanced Scientific Research*, 11(02): 152-158pp.
- Dashora, K., Gattupalli, M., Tripathi, G. D., Javed, Z., Singh, S., Tuohy, M., Gupta, V. K.**, 2023, Fungal assisted valorisation of polymeric lignin: mechanism, enzymes and perspectives, *Catalysts*, 13(1): 149pp.
- Dassault Systèmes BIOVIA.**, 2020, Discovery Studio Modeling Environment, Release 2020, San Diego: Dassault Systèmes.
- De Gannes, V., Eudoxie, G., Hickey, W. J.**, 2013, Insights into fungal communities in composts revealed by 454-pyrosequencing: implications for human health and safety, *Frontiers in microbiology*, 4: 164pp.
- De Jong, E., De Vries, F. P., Field, J. A., van der Zwan, R. P., de Bont, J. A.**, 1992, Isolation and screening of basidiomycetes with high peroxidative activity, *Mycological Research*, 96(12): 1098-1104pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Debnath, R., Mistry, P., Roy, P., Roy, B., Saha, T.,** 2021, Partial purification and characterization of a thermophilic and alkali-stable laccase of *Phoma herbarum* isolate KU4 with dye-decolorization efficiency, *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 51(9): 901-918pp.
- Demiralp, B., Büyük, İ., Aras, S., Duman, D. C.,** 2015, Lakkaz enziminin endüstriyel ve biyoteknoloji alanında kullanımı, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 72(4): 351-368ss.
- Deobald, L. A. and Crawford, D. L.,** 1997, Lignocellulose biodegradation, *Isolation and Characterization of Streptomyces Strains Antagonistic to Phytopathogenic Fungi and Analysis of Antibiotics Potentially Involved in Disease Control*, 1050: 59pp.
- Desai, S. S., Tennali, G. B., Channur, N., Anup, A. C., Deshpande, G., Murtuza, B. A.,** 2011, Isolation of laccase producing fungi and partial characterization of laccase, *Biotechnol. Bioinf. Bioeng*, 1(4): 543-549pp.
- Doble, M. and Kumar, A.,** 2005, Biotreatment of industrial effluents, Elsevier, 51(2):507-508pp.
- Dos Santos, A. B., Cervantes, F. J., Van Lier, J. B.,** 2007, Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: perspectives for anaerobic biotechnology, *Bioresource technology*, 98(12): 2369-2385pp.
- D'Souza, D. T., Tiwari, R., Sah, A. K., Raghukumar, C.,** 2006, Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes, *Enzyme and microbial technology*, 38(3-4): 504-511pp.
- Ducros, V., Brzozowski, A. M., Wilson, K. S., Brown, S. H., Østergaard, P., Schneider, P., Davies, G. J.,** 1998, Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 Å resolution, *Nature structural biology*, 5(4): 310-316pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Edens, W. A., Goins, T. Q., Dooley, D., Henson, J. M.,** 1999, Purification and characterization of a secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Applied and Environmental Microbiology*, 65(7): 3071-3074pp.
- Elisashvili, V., Penninckx, M., Kachlishvili, E., Tsiklauri, N., Metreveli, E., Kharziani, T., Kvesitadze, G.,** 2008, *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition, *Bioresource technology*, 99(3): 457-462pp.
- Ewing, T. J., Makino, S., Skillman, A. G., Kuntz, I. D.,** 2001, DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases, *Journal of computer-aided molecular design*, 15: 411-428pp.
- Fan, J., Fu, A., Zhang, L.,** 2019, Progress in molecular docking, *Quantitative Biology*, 7: 83-89pp.
- Feng, L. X., Jing, C. J., Tang, K. L., Tao, L., Cao, Z. W., Wu, W. Y., Guo, D. A.,** 2011, Clarifying the signal network of salvianolic acid B using proteomic assay and bioinformatic analysis, *Proteomics*, 11(8): 1473-1485pp.
- Fischer, E.,** 1894, Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 27(3): 2985-2993pp.
- Forgacs, E., Cserhádi, T., Oros, G.,** 2004, Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review, *Environment international*, 30(7): 953-971pp.
- Fulekar, M. H. and Jaya, S.,** 2008, Bioinformatics for bioremediation, *Innovative Romanian Food Biotechnology*, (3).
- Gadaleta, D., Manganelli, S., Manganaro, A., Porta, N., Benfenati, E.,** 2016, A knowledge-based expert rule system for predicting mutagenicity (Ames test) of aromatic amines and azo compounds, *Toxicology*, 370: 20-30pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Galhaup, C., Goller, S., Peterbauer, C. K., Strauss, J., Haltrich, D.,** 2002a, Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions, *Microbiology*, 148(7): 2159-2169pp.
- Galhaup, C., Wagner, H., Hinterstoisser, B., Haltrich, D.,** 2002b, Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*, *Enzyme and Microbial Technology*, 30(4): 529-536pp.
- Ghattavi, S. and Homaei, A.,** 2023, Marine enzymes: Classification and application in various industries, *International Journal of Biological Macromolecules*, 230: 123136pp.
- Gonçalves, M. F., Esteves, A. C., Alves, A.,** 2022, Marine fungi: Opportunities and challenges, *Encyclopedia*, 2(1): 559-577pp.
- Goodell, B., Zhu, Y., Kim, S., Kafle, K., Eastwood, D., Daniel, G., O'Neill, H.,** 2017, Modification of the nanostructure of lignocellulose cell walls via a non-enzymatic lignocellulose deconstruction system in brown rot wood-decay fungi, *Biotechnology for biofuels*, 10: 1-15pp.
- Goodsell, D. S., Morris, G. M., Olson, A. J.,** 1996, Automated docking of flexible ligands: applications of AutoDock, *Journal of molecular recognition*, 9(1): 1-5pp.
- Gray, H. B., Malmström, B. G., Williams, R. J. P.,** 2000, Copper coordination in blue proteins, *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 5: 551-559pp.
- Gürşün, H.,** 2018, Moleküler Modelleme Yöntemleri İle Bazı Fitokimyasalların Opioid Reseptörüyle Bağlanma Aktivitelerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, 190s.
- Halgren, T. A., Murphy, R. B., Friesner, R. A., Beard, H. S., Frye, L. L., Pollard, W. T., Banks, J. L.,** 2004, Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening, *Journal of medicinal chemistry*, 47(7): 1750-1759pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Hamad, H. N. and Idrus, S.,** 2022, Recent developments in the application of bio-waste-derived adsorbents for the removal of methylene blue from wastewater: a review, *Polymers*, 14(4): 783pp.
- Haritash, A. K. and Kaushik, C. P.,** 2009, Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review, *Journal of hazardous materials*, 169(1-3): 1-15pp.
- Harkin, J. M. and Obst, J. R.,** 1973, Syringaldazine, an effective reagent for detecting laccase and peroxidase in fungi, *Experientia*, 29: 381-387pp.
- Hassaan, M. A., El Nemr, A., Hassaan, A.,** 2017, Health and environmental impacts of dyes: mini review, *American Journal of Environmental Science and Engineering*, 1(3): 64-67pp.
- Hatakeyama, H. and Hatakeyama, T.,** 2010, Lignin structure, properties, and applications, *Biopolymers: lignin, proteins, bioactive nanocomposites*, 1-63pp.
- Higuchi, T.,** 1998, The discovery of lignin, In *Discoveries In Plant Biology*, 2: 233-269pp.
- Hinchey, M. G., Sterritt, R., Rouff, C.,** 2007, Swarms and swarm intelligence, *Computer*, 40(4): 111-113pp.
- Hogues, H., Gaudreault, F., Corbeil, C. R., Deprez, C., Sulea, T., Purisima, E. O.,** 2018, ProPOSE: Direct exhaustive protein–protein docking with side chain flexibility, *Journal of chemical theory and computation*, 14(9): 4938-4947pp.
- Holland, J.,** 1975, Adaptation in natural and artificial systems, univ. of mich. press, Ann Arbor, 7: 390-401pp.
- Hu, C. Y., Cheng, H. Y., Yao, X. M., Li, L. Z., Liu, H. W., Guo, W. Q., Fu, J. L.,** 2021, Biodegradation and decolourization of methyl red by *Aspergillus versicolor* LH1, *Preparative biochemistry & biotechnology*, 51(7): 642-649pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Huang, C., Peng, Z., Li, J., Li, X., Jiang, X., Dong, Y.,** 2022, Unlocking the role of lignin for preparing the lignin-based wood adhesive: A review, *Industrial Crops and Products*, 187: 115388pp.
- Huang, S. Y., Grinter, S. Z., Zou, X.,** 2010, Scoring functions and their evaluation methods for protein–ligand docking: recent advances and future directions, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12(40): 12899-12908pp.
- Huber, M. and Lerch, K.,** 1987, The influence of copper on the induction of tyrosinase and laccase in *Neurospora crassa*, *FEBS letters*, 219(2): 335-338pp.
- Humnabadkar, R. P., Saratale, G. D., Govindwar, S. P.,** 2008, Decolorization of purple 2R by *Aspergillus ochraceus* (NCIM-1146), *Asian J Microbiol Biotechnol Environ Sci*, 10(3): 693-697pp.
- Imran, M., Crowley, D. E., Khalid, A., Hussain, S., Mumtaz, M. W., Arshad, M.,** 2015, Microbial biotechnology for decolorization of textile wastewaters, *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 14: 73-92pp.
- Irinyi, L. M., Kövics, G., Rai, M. K., Karaffa, E. M.,** 2006, Studies of evolutionary relationships of *Phoma* species based on phylogenetic markers, 99-113pp.
- Irwin, J. J. and Shoichet, B. K.,** 2005, ZINC– a free database of commercially available compounds for virtual screening, *Journal of chemical information and modeling*, 45(1): 177-182pp.
- Jahangiri, E., Thomas, I., Schulze, A., Seiwert, B., Cabana, H., Schlosser, D.,** 2018, Characterisation of electron beam irradiation-immobilised laccase for application in wastewater treatment, *Science of the total environment*, 624: 309-322pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Janusz, G., Pawlik, A., Świdarska-Burek, U., Polak, J., Sulej, J., Jarosz-Wilkolazka, A., Paszczyński, A.,** 2020, Laccase properties, physiological functions, and evolution, *International journal of molecular sciences*, 21(3): 966pp.
- Jeyabalan, J., Veluchamy, A., Kumar, A., Chandrasekar, R., Narayanasamy, S.,** 2023, A review on the laccase assisted decolourization of dyes: Recent trends and research progress, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 151: 105081pp.
- Jun, L. Y., Yon, L. S., Mubarak, N. M., Bing, C. H., Pan, S., Danquah, M. K., Khalid, M.,** 2019, An overview of immobilized enzyme technologies for dye and phenolic removal from wastewater, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7(2): 102961.
- Junghanns, C., Parra, R., Keshavarz, T., Schlosser, D.,** 2008, Towards higher laccase activities produced by aquatic ascomycetous fungi through combination of elicitors and an alternative substrate, *Engineering in Life Sciences*, 8(3): 277-285pp.
- Kaal, E. E., de Jong, E. D., Field, J. A.,** 1993, Stimulation of ligninolytic peroxidase activity by nitrogen nutrients in the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55, *Applied and Environmental Microbiology*, 59(12): 4031-4036pp.
- Kadam, R. L., Kim, Y., Gaikwad, S., Chang, M., Tarte, N. H., Han, S.,** 2020, Catalytic decolorization of Rhodamine B, Congo red, and crystal violet dyes, with a novel Niobium Oxide anchored Molybdenum (Nb–O–Mo), *Catalysts*, 10(5): 491pp.
- Kadam, S. K., Tamboli, A. S., Sambhare, S. B., Jeon, B. H., Govindwar, S. P.,** 2018, Enzymatic analysis, structural study and molecular docking of laccase and catalase from *B. subtilis* SK1 after textile dye exposure, *Ecological informatics*, 48: 269-280pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Kahraman, S. S. and Gurdal, I. H.**, 2002, Effect of synthetic and natural culture media on laccase production by white rot fungi, *Bioresource Technology*, 82(3): 215-217pp.
- Kalra, K., Chauhan, R., Shavez, M., Sachdeva, S.**, 2013, Isolation of laccase producing *Trichoderma* spp. and effect of pH and temperature on its activity, *Int. J. Chem. Environ., Technol*, 5(5): 2229-2235pp.
- Kamimura, N., Sakamoto, S., Mitsuda, N., Masai, E., Kajita, S.**, 2019, Advances in microbial lignin degradation and its applications, *Current Opinion in Biotechnology*, 56: 179-186pp.
- Kılçık, F.**, 2021, Çevre Etiği Çerçevesinde Sucul Ekosistemler ve Biyolojik İzleme, *Tabula Rasa: Felsefe ve Teoloji*, 36: 53-60pp.
- Kim, S., Thiessen, P. A., Bolton, E. E., Chen, J., Fu, G., Gindulyte, A., Bryant, S. H.**, 2016, PubChem substance and compound databases, *Nucleic acids research*, 44(D1): D1202-D1213.
- Kishor, R., Purchase, D., Saratale, G. D., Saratale, R. G., Ferreira, L. F. R., Bilal, M., Bharagava, R. N.**, 2021a, Ecotoxicological and health concerns of persistent coloring pollutants of textile industry wastewater and treatment approaches for environmental safety, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(2): 105012pp.
- Kishor, R., Saratale, G. D., Saratale, R. G., Ferreira, L. F. R., Bilal, M., Iqbal, H. M., Bharagava, R. N.**, 2021b, Efficient degradation and detoxification of methylene blue dye by a newly isolated ligninolytic enzyme producing bacterium *Bacillus albus* MW407057, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 206: 111947pp.
- Kitchen, D. B., Decornez, H., Furr, J. R., Bajorath, J.**, 2004, Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications, *Nature reviews Drug discovery*, 3(11): 935-949pp.
- Klein, S.**, 2010, The use of biorelevant dissolution media to forecast the in vivo performance of a drug, *The AAPS journal*, 12(3): 397-406pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- KMS Lakshmi, PS Soumya, A Shaji, P Nambisan**, 2017, Lenzites elegans KSG32: a novel white rot fungus for synthetic dye decolourization, *J. Bacteriol. Mycol. Open Access* 2017; 5(3):311-317pp.
- Koçyiğit, A. ve Toker, S. K.**, 2021, Deniz Orjinli Fungus Kaynakları ve Lakkaz Üretimi, *Mantar Dergisi*, 12(2): 240-246ss.
- Kocyigit, A., Pazarbasi, M. B., Yasa, I., Ozdemir, G., Karaboz, I.**, 2012, Production of laccase from *Trametes trogii* TEM H2: a newly isolated white-rot fungus by air sampling, *Journal of basic microbiology*, 52(6): 661-669pp.
- Koehl, P. and Levitt, M.**, 1999, A brighter future for protein structure prediction, *nature structural biology*, 6(2): 108-111pp.
- Koshland Jr. and Daniel E.**, 1958, Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 44(2): 98-104pp.
- Kramer, B., Rarey, M., Lengauer, T.**, 1999, Evaluation of the FLEXX incremental construction algorithm for protein–ligand docking, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 37(2): 228-241pp.
- Krithika, A., Gayathri, K. V., Kumar, D. T., Doss, C. G. P.**, 2021, Mixed azo dyes degradation by an intracellular azoreductase enzyme from alkaliphilic *Bacillus subtilis*: a molecular docking study, *Archives of Microbiology*, 203: 3033-3044pp.
- Kuddus, M. (Ed.)**, 2021, Microbial extremozymes: novel sources and industrial applications, Academic Press.
- Kuhad, R. C. and Singh, A.**, 1993, Lignocellulose biotechnology: current and future prospects, *Critical Reviews in Biotechnology*, 13(2): 151-172pp.
- Kuila, A., and Sharma, V.**, 2017, Lignocellulosic Biomass Production and Industrial Applications, John Wiley & Sons.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Kumar, S. S., Shantkriti, S., Muruganandham, T., Muruges, E., Rane, N., Govindwar, S. P.**, 2016, Bioinformatics aided microbial approach for bioremediation of wastewater containing textile dyes, *Ecological Informatics*, 31: 112-121pp.
- Kumar, V., Shahi, S. K., Ferreira, L. F. R., Bilal, M., Biswas, J. K., Bulgariu, L.**, 2021, Detection and characterization of refractory organic and inorganic pollutants discharged in biomethanated distillery effluent and their phytotoxicity, cytotoxicity, and genotoxicity assessment using *Phaseolus aureus* L. and *Allium cepa* L., *Environmental Research*, 201: 111551pp.
- Kumawat, C., Kumar, A., Parshad, J., Sharma, S. S., Patra, A., Dogra, P., Kumawat, G. L.**, 2022, Microbial diversity and adaptation under salt-affected soils: a review, *Sustainability*, 14(15): 9280pp.
- Kunamneni, A., Camarero, S., García-Burgos, C., Plou, F. J., Ballesteros, A., Alcalde, M.**, 2008, Engineering and applications of fungal laccases for organic synthesis, *Microbial cell factories*, 7: 1-17pp.
- Kuramochi, J. and Sakakibara, Y.**, 2005, Intensive in vitro experiments of implementing and executing finite automata in test tube, In *International Workshop on DNA-Based Computers*, 193-202pp.
- Kurnia, M., Suprpto, S., Ni'mah, Y. L.**, 2024, Bio-adsorbent for Remazol Brilliant Blue R (RBBR) dye, *South African Journal of Chemical Engineering*, 47(1): 111-122pp.
- Kyi, P. P., Quansah, J. O., Lee, C. G., Moon, J. K., Park, S. J.**, 2020, The removal of crystal violet from textile wastewater using palm kernel shell-derived biochar, *Applied Sciences*, 10(7): 2251pp.
- Lang, P. T., Brozell, S. R., Mukherjee, S., Pettersen, E. F., Meng, E. C., Thomas, V., Kuntz, I. D.**, 2009, DOCK 6: Combining techniques to model RNA–small molecule complexes, *Rna*, 15(6): 1219-1230pp.
- Lazarova, M.**, 2008, Virtual screening—models, methods and software systems, In *International Scientific Conference Computer Science*, 55: 60pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Le Strat, Y., Ruiz, N., Fleurence, J., Pouchus, Y. F., Déléris, P., Dumay, J.,** 2022, Marine fungal abilities to enzymatically degrade algal polysaccharides, proteins and lipids: A review, *Journal of Applied Phycology*, 34(3): 1131-1162pp.
- Lebo Jr, Stuart E., Jerry D. Gargulak, Timothy J. McNally,** 2002, "Lignin." *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, 3.
- Legerská, B., Chmelová, D., Ondrejovič, M.,** 2016, Degradation of synthetic dyes by laccases—a mini-review, *Nova Biotechnol. Chim*, 15(1): 90-106pp.
- Lellis, B., Fávaro-Polonio, C. Z., Pamphile, J. A., Polonio, J. C.,** 2019, Effects of textile dyes on health and the environment and bioremediation potential of living organisms, *Biotechnology Research and Innovation*, 3(2): 275-290pp.
- Lengauer, T., Rarey, M.,** 1996, Computational methods for biomolecular docking, *Current opinion in structural biology*, 6(3): 402-406pp.
- Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y., Rombauts, S.,** 2002, PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences, *Nucleic acids research*, 30(1): 325-327pp.
- Li, H., Sze, K. H., Lu, G., Ballester, P. J.,** 2021, Machine-learning scoring functions for structure-based virtual screening, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 11(1): e1478.
- Li, L., Chen, R., Weng, Z.,** 2003, RDOCK: refinement of rigid-body protein docking predictions, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 53(3): 693-707pp.
- Li, Y., Su, M., Liu, Z., Li, J., Liu, J., Han, L., Wang, R.,** 2018, Assessing protein–ligand interaction scoring functions with the CASF-2013 benchmark, *Nature protocols*, 13(4): 666-680pp.
- Liaw, A. and Wiener, M.,** 2002, Classification and regression by randomForest. *R news*, 2(3): 18-22pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Libardi Junior, N., Gern, R. M. M., Furlan, S. A., Schlosser, D.,** 2012, Laccase production by the aquatic ascomycete *Phoma* sp. UHH 5-1-03 and the white rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 during submerged cultivation on banana peels and enzyme applicability for the removal of endocrine-disrupting chemicals, *Applied biochemistry and biotechnology*, 167: 1144-1156pp.
- Lipinski, C. and Hopkins, A.,** 2004, Navigating chemical space for biology and medicine, *Nature*, 432(7019): 855-861pp.
- Liu, J. and Wang, R.,** 2015, Classification of current scoring functions, *Journal of chemical information and modeling*, 55(3): 475-482pp.
- Lourenço, A. and Pereira, H.,** 2018, Compositional variability of lignin in biomass, *Lignin-trends and applications*, 65-98pp.
- Lu, Y., Lu, Y. C., Hu, H. Q., Xie, F. J., Wei, X. Y., Fan, X.,** 2017, Structural characterization of lignin and its degradation products with spectroscopic methods, *Journal of Spectroscopy*, 2017(1): 8951658pp.
- Lucas, M. S., Amaral, C., Sampaio, A., Peres, J. A., Dias, A. A.,** 2006, Biodegradation of the diazo dye Reactive Black 5 by a wild isolate of *Candida oleophila*, *Enzyme and Microbial Technology*, 39(1): 51-55pp.
- Luterek, J., Gianfreda, L., Wojtaś-Wasilewska, M., Rogalski, J. M., Jaszek, M. B., Malarczyk, E., Leonowicz, A.,** 1997, Screening of the wood-rotting fungi for laccase production: induction by ferulic acid, partial purification, and immobilization of laccase from the high laccase-producing strain, *Cerrena unicolor*, *Acta Microbiologica Polonica*, 46(3): 297-311pp.
- Lydia, N. J., Atchayadana, U., Mubina, J.,** 2021, Marine endophytic fungi isolated from Gulf of Mannar—A source for new generation of pharmaceutical drugs and biosynthesis of silver nanoparticles and its antibacterial efficacy, In *Fungi Bio-Prospects in Sustainable Agriculture, Environment and Nano-technology*, Academic Press, 175-185pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Magalhães, F. F., Pereira, A. F., Cristóvão, R. O., Barros, R. A., Faria, J. L., Silva, C. G., Tavares, A. P.,** 2024, Recent Developments and Challenges in the Application of Fungal Laccase for the Biodegradation of Textile Dye Pollutants, *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, 21(6): 609-632pp.
- Mainardi, P. H., Feitosa, V. A., de Paiva, L. B. B., Bonugli-Santos, R. C., Squina, F. M., Pessoa Jr, A., Sette, L. D.,** 2018, Laccase production in bioreactor scale under saline condition by the marine-derived basidiomycete *Peniophora* sp. CBMAI 1063, *Fungal biology*, 122(5): 302-309pp.
- Malherbe, S. and Cloete, T. E.,** 2002, Lignocellulose biodegradation: fundamentals and applications, *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 1: 105-114pp.
- Metropolis, N., Rosenbluth, A. W., Rosenbluth, M. N., Teller, A. H., Teller, E.,** 1953, Equation of state calculations by fast computing machines, *The journal of chemical physics*, 21(6): 1087-1092pp.
- Mikolasch, A. and Schauer, F.,** 2009, Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials, *Applied microbiology and biotechnology*, 82(4): 605-624pp.
- Mohanty, K., Naidu, J. T., Meikap, B. C., Biswas, M. N.,** 2006, Removal of crystal violet from wastewater by activated carbons prepared from rice husk, *Industrial & engineering chemistry research*, 45(14): 5165-5171pp.
- Mojsov, K., Andronikov, D., Janevski, A., Kuzelov, A., Gaber, S.,** 2016, The application of enzymes for the removal of dyes from textile effluents, *Advanced technologies*, 5(1): 36-41pp.
- Moldes, D., Lorenzo, M., Sanromán, M. A.,** 2004, Different proportions of laccase isoenzymes produced by submerged cultures of *Trametes versicolor* grown on lignocellulosic wastes, *Biotechnology letters*, 26: 327-330pp.
- Montel, E., Bridge, P. D., Sutton, B. C.,** 1991, An integrated approach to *Phoma* systematics, *Mycopathologia*, 115: 89-103pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., Olson, A. J.,** 1998, Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function, *Journal of computational chemistry*, 19(14): 1639-1662pp.
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., Olson, A. J.,** 2009, AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility, *Journal of computational chemistry*, 30(16): 2785-2791pp.
- Muhamad Ng, S. N., Idrus, S., Ahsan, A., Tuan Mohd Marzuki, T. N., Mahat, S. B.,** 2021, Treatment of wastewater from a food and beverage industry using conventional wastewater treatment integrated with membrane bioreactor system: A pilot-scale case study, *Membranes*, 11(6): 456pp.
- Muhammad Nasir Iqbal, H. and Asgher, M.,** 2013, Decolorization applicability of sol-gel matrix immobilized manganese peroxidase produced from an indigenous white rot fungal strain *Ganoderma lucidum*, *BMC biotechnology*, 13: 1-7pp.
- Naranjo, L., Urbina, H., Sisto, A. D., Leon, V.,** 2007, Isolation of autochthonous non-white rot fungi with potential for enzymatic upgrading of Venezuelan extra-heavy crude oil, *Biocatalysis and Biotransformation*, 25(2-4): 341-349pp.
- Newman, M. C.,** 2009, *Fundamentals of ecotoxicology* (3rd ed.), CRC press.
- Nigam, P. S. N. and Pandey, A.,** Eds., 2009, *Biotechnology for agro-industrial residues utilisation: utilisation of agro-residues*, Springer Science & Business Media.
- Niladevi, K. N. and Prema, P.,** 2008, Effect of inducers and process parameters on laccase production by *Streptomyces psammoticus* and its application in dye decolourization, *Bioresource technology*, 99(11): 4583-4589pp.
- Niladevi, K. N.,** 2009, Ligninolytic enzymes, *Biotechnology for agro-industrial residues utilisation: utilisation of agro-residues*, 397-414pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Nishida, T.**, 1989, Lignin Biodegradation by Wood-Rotting Fungi, *JAPAN TAPPI JOURNAL*, 43(11): 1071-1084pp.
- O'Boyle, N. M., Banck, M., James, C. A., Morley, C., Vandermeersch, T., Hutchison, G. R.**, 2011, Open Babel: An open chemical toolbox, *Journal of cheminformatics*, 3: 1-14pp.
- Olsson, T. S., Williams, M. A., Pitt, W. R., Ladbury, J. E.**, 2008, The thermodynamics of protein–ligand interaction and solvation: insights for ligand design, *Journal of molecular biology*, 384(4): 1002-1017pp.
- Olukanni, O., Awotula, A., Osuntoki, A., Govindwar, S.**, 2019, Influence of redox mediators and media on methyl red decolorization and its biodegradation by *Providencia rettgeri*, *SN Applied Sciences*, 1: 1-8pp.
- Özgen, A. ve Ünlü, N.**, 2022, Moleküler Kenetleme (Docking) Yöntemi ile Bakteriyel Bir Sinyal Kompleksi ve Peonidin Molekülü Etkileşiminin İncelenmesi, *Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 34(2): 201-206ss.
- Pagadala, N. S., Syed, K., Tuszynski, J.**, 2017, Software for molecular docking: a review, *Biophysical reviews*, 9: 91-102pp.
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B., Sannia, G.**, 2000, Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*, *Applied and environmental microbiology*, 66(3): 920-924pp.
- Panda, O. P., Nanda, S. S., Yi, D. K., Pal, D., Mukherjee, S.**, 2021, Protein and Enzymes Isolated from Plant Sources and Their Utilization in Pharmaceutical Field, *Bioactive Natural Products for Pharmaceutical Applications*, 793-818pp.
- Pande, V., Joshi, T., Pandey, S. C., Sati, D., Mathpal, S., Pande, V., Samant, M.**, 2022, Molecular docking and molecular dynamics simulation approaches for evaluation of laccase-mediated biodegradation of various industrial dyes, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 40(23): 12461-12471pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Pandey, A., Singh, P., Iyengar, L.,** 2007, Bacterial decolorization and degradation of azo dyes, *International biodeterioration & biodegradation*, 59(2): 73-84pp.
- Pang, K. L., Overy, D. P., Jones, E. G., da Luz Calado, M., Burgaud, G., Walker, A. K., Bills, G. F.,** 2016, 'Marine fungi' and 'marine-derived fungi' in natural product chemistry research: toward a new consensual definition, *Fungal Biology Reviews*, 30(4): 163-175pp.
- Panniello, A., Curri, M. L., Diso, D., Licciulli, A., Locaputo, V., Agostiano, A., Mascolo, G.,** 2012, Nanocrystalline TiO<sub>2</sub> based films onto fibers for photocatalytic degradation of organic dye in aqueous solution, *Applied Catalysis B: Environmental*, 121: 190-197pp.
- Patel, R. J. and Bhaskaran, L.,** 2020, Orange peel as an inducer for Laccase production in a novel fungal strain *Peyronellaea pinodella* BL-3/4 and optimization of its cultural parameters by single parameter approach, *Indian J Sci Technol*, 13: 1656-1667pp.
- Paul, M., Pandey, N. K., Banerjee, A., Shrotri, G. K., Tomer, P., Gazara, R. K., Ghosh, D.,** 2023, An insight into omics analysis and metabolic pathway engineering of lignin-degrading enzymes for enhanced lignin valorization, *Bioresource Technology*, 379: 129045pp.
- Paździor, K., Wrębiak, J., Klepacz-Smólka, A., Gmurek, M., Bilińska, L., Kos, L., Ledakowicz, S.,** 2017, Influence of ozonation and biodegradation on toxicity of industrial textile wastewater, *Journal of Environmental Management*, 195: 166-173pp.
- Peixoto, R. S., Rosado, A. S., TAKETANI, R. G.,** 2008, Bioprospecção da diversidade microbiana cultivável e não cultivável, *Microbiologia Ambiental*, 2: 83-106pp.
- Pelaez, F., Martinez, M. J., Martinez, A. T.,** 1995, Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation, *Mycological research*, 99(1): 37-42pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Phillips, E.**, 2022, Lignocellulose-Degrading Microbes Give Plants New Life, *American Soc Microbil.*(Mar. 25, 2022).
- Polak, J. and Jarosz-Wilkolazka, A.**, 2012, Structure/Redox potential relationship of simple organic compounds as potential precursors of dyes for laccase-mediated transformation, *Biotechnology progress*, 28(1): 93-102pp.
- Pradeep, N. V., Anupama, S., Navya, K., Shalini, H. N., Idris, M., Hampannavar, U. S.**, 2015, Biological removal of phenol from wastewaters: a mini review, *Applied Water Science*, 5: 105-112pp.
- Rafatullah, M., Sulaiman, O., Hashim, R., Ahmad, A.**, 2010, Adsorption of methylene blue on low-cost adsorbents: a review. *Journal of hazardous materials*, 177(1-3): 70-80pp.
- Raghukumar, C., Chandramohan, D., Michel, F. C., Redd, C. A.**, 1996, Degradation of lignin and decolorization of paper mill bleach plant effluent (BPE) by marine fungi, *Biotechnology Letters*, 18: 105-106pp.
- Raghukumar, C., D'Souza-Ticlo, D., Verma, A.**, 2008, Treatment of colored effluents with lignin-degrading enzymes: an emerging role of marine-derived fungi, *Critical Reviews in Microbiology*, 34(3-4): 189-206pp.
- Raghukumar, C., Mohandass, C., Kamat, S., Shailaja, M. S.**, 2004, Simultaneous detoxification and decolorization of molasses spent wash by the immobilized white-rot fungus *Flavodon flavus* isolated from a marine habitat, *Enzyme and Microbial Technology*, 35(2-3): 197-202pp.
- Raghukumar, S.**, 2017, Fungi in coastal and oceanic marine ecosystems, Springer, 378, New York, NY, USA.
- Rambey, R., Simbolon, F. M., Siregar, E. B. M.**, 2020, February, Growth and productivity of oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus*) on media rice straw mixed with sawdust, In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 454(1): 012082pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Rauf, M. A., Zubair, S., Azhar, A.,** 2015, Ligand docking and binding site analysis with pymol and autodock/vina, *International Journal of Basic and Applied Sciences*, 4(2): 168pp.
- Relman, D. A.,** 1998, Detection and identification of previously unrecognized microbial pathogens, *Emerging infectious diseases*, 4(3): 382pp.
- Revankar, M. S. and Lele, S. S.,** 2006, Enhanced production of laccase using a new isolate of white rot fungus WR-1, *Process Biochemistry*, 41(3): 581-588pp.
- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R., Nigam, P.,** 2001, Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative, *Bioresource technology*, 77(3): 247-255pp.
- Ruiz-Dueñas, F. J., Martínez, Á. T.,** 2009, Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this, *Microbial biotechnology*, 2(2): 164-177pp.
- SACCARDO, P. A.,** 1880, Conspectus generum fungorum *Italiae inferiorum*, *Michelia*, 2: 1-38pp.
- Sandhya, S.,** 2010, Biodegradation of azo dyes under anaerobic condition: role of azoreductase, *Biodegradation of azo dyes*, 39-57pp.
- Saratale, R. G., Sun, Q., Munagapati, V. S., Saratale, G. D., Park, J., Kim, D. S.,** 2021, The use of eggshell membrane for the treatment of dye-containing wastewater: Batch, kinetics and reusability studies, *Chemosphere*, 281: 130777pp.
- Saravanan, A., Kumar, P. S., Vo, D. V. N., Jeevanantham, S., Karishma, S., Yaashikaa, P. R.,** 2021, A review on catalytic-enzyme degradation of toxic environmental pollutants: Microbial enzymes, *Journal of Hazardous Materials*, 419: 126451pp.
- Sarı, Suat,** 2018, Arilalkil Azol Yapısında Yeni Oksim Ester Türevleri Üzerinde Çalışmalar: Sentez, Biyolojik Aktivite ve Moleküler Modelleme, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, 321s.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Saroj, S., Dubey, S., Agarwal, P., Prasad, R., Singh, R. P.,** 2015, Evaluation of the efficacy of a fungal consortium for degradation of azo dyes and simulated textile dye effluents, *Sustainable Water Resources Management*, 1: 233-243pp.
- Schlosser, D., Grey, R., Fritsche, W.,** 1997, Patterns of ligninolytic enzymes in *Trametes versicolor*. Distribution of extra-and intracellular enzyme activities during cultivation on glucose, wheat straw and beech wood, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47: 412-418pp.
- Schoenherr, S., Ebrahimi, M., Czermak, P.,** 2018, Lignin degradation processes and the purification of valuable products, *Lignin-Trends and Applications*, 5: 9-8pp.
- Senan, R. C. and Abraham, T. E.,** 2004, Bioremediation of textile azo dyes by aerobic bacterial consortium aerobic degradation of selected azo dyes by bacterial consortium, *Biodegradation*, 15: 275-280pp.
- Sharma, A., Gupta, G., Ahmad, T., Mansoor, S., Kaur, B.,** 2021, Enzyme engineering: current trends and future perspectives, *Food Reviews International*, 37(2): 121-154pp.
- Sharma, B., Dangi, A. K., Shukla, P.,** 2018, Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: a review, *Journal of environmental management*, 210: 10-22pp.
- Shearer, C. A., Descals, E., Kohlmeyer, B., Kohlmeyer, J., Marvanová, L., Padgett, D., Voglymayr, H.,** 2007, Fungal biodiversity in aquatic habitats, *Biodiversity and Conservation*, 16: 49-67pp.
- Shedbalkar, U. and Jadhav, J. P.,** 2011, Detoxification of malachite green and textile industrial effluent by *Penicillium ochrochloron*, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 16: 196-204pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Shleev, S. V., Morozova, O. V., Nikitina, O. V., Gorshina, E. S., Rusinova, T. V., Serezhenkov, V. A., Yaropolov, A. I.**, 2004, Comparison of physico-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes, *Biochimie*, 86(9-10): 693-703pp.
- Shraddha., Shekher, R., Seghal, S., Kamthania, M., Kumar, A.**, 2011, Laccase: Microbial Sources, Production, Purification, and Potential Biotechnological Applications, *Enzyme Research*, 1-11pp.
- Singh, D., Sharma, K. K., Jacob, S., Gakhar, S. K.**, 2014, Molecular docking of laccase protein from *Bacillus safensis* DSKK5 isolated from earthworm gut: a novel method to study dye decolorization potential, *Water, Air, & Soil Pollution*, 225: 1-12pp.
- Singh, K. and Arora, S.**, 2011, Removal of synthetic textile dyes from wastewaters: a critical review on present treatment Technologies, *Critical reviews in environmental science and technology*, 41(9): 807-878pp.
- Smirnov, S. A., Koroleva, O. V., Gavrilova, V. P., Belova, A. B., Klyachko, N. L.**, 2001, Laccases from basidiomycetes: Physicochemical characteristics and substrate specificity towards methoxyphenolic compounds, *Biochemistry (Moscow)*, 66: 774-779pp.
- Smith, H.**, 2001, Discovery of the anthrax toxin: the beginning of studies of virulence determinants regulated in vivo, *International journal of medical microbiology*, 291(6-7): 411-417pp.
- Sorhie, V., Chang, C., Bharali, P., Bupesh, G., Saravanan, K. M., Bhaskar, M.**, 2022, Understanding enzyme-linked biodegradation by molecular docking of *Schizophyllum commune*'s laccase, lignin peroxidase and manganese peroxidase with commercial dyes, *Neuroquantology*, 20(6): 7946pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Srinivasan, C., Dsouza, T. M., Boominathan, K., Reddy, C. A.,** 1995, Demonstration of laccase in the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767, *Applied and Environmental Microbiology*, 61(12): 4274-4277pp.
- Srinivasan, S. and Sadasivam, S. K.,** 2018, Exploring docking and aerobic-microaerophilic biodegradation of textile azo dye by bacterial systems, *Journal of water process engineering*, 22: 180-191pp.
- Srinivasan, S., Sadasivam, S. K., Gunalan, S., Shanmugam, G., Kothandan, G.,** 2019, Application of docking and active site analysis for enzyme linked biodegradation of textile dyes, *Environmental Pollution*, 248: 599-608pp.
- Srinivasan, S., Shanmugam, G., Surwase, S. V., Jadhav, J. P., Sadasivam, S. K.,** 2017, *In silico* analysis of bacterial systems for textile azo dye decolorization and affirmation with wetlab studies, *CLEAN–Soil, Air, Water*, 45(9): 1600734.
- Srinivasulu, M., Chandra, M. S., Maddela, N. R., Golla, N., Ramesh, B.,** 2022, Recent trends in bioremediation of pollutants by enzymatic approaches, In *Cost Effective Technologies for Solid Waste and Wastewater Treatment*, 115-134pp.
- Su, M., Yang, Q., Du, Y., Feng, G., Liu, Z., Li, Y., Wang, R.,** 2018, Comparative assessment of scoring functions: the CASF-2016 update, *Journal of chemical information and modeling*, 59(2): 895-913pp.
- Sun, Q., Saratale, R. G., Saratale, G. D., Kim, D. S.,** 2018, Pristine and modified radix *Angelicae dahuricae* (Baizhi) residue for the adsorption of methylene blue from aqueous solution: A comparative study, *Journal of Molecular Liquids*, 265: 36-45pp.
- Swami, N. K.,** 2012, Paper mill effluent: decolorisation and detoxification studies using chemical and microbial methods, *Jaypee Institute of Information Technology*, 174pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Szklarz, G. D., Antibus, R. K., Sinsabaugh, R. L., Linkins, A. E.,** 1989, Production of phenol oxidases and peroxidases by wood-rotting fungi, *Mycologia*, 81(2): 234-240pp.
- Tao, X., Huang, Y., Wang, C., Chen, F., Yang, L., Ling, L., Chen, X.,** 2020, Recent developments in molecular docking technology applied in food science: a review, *International Journal of Food Science & Technology*, 55(1): 33-45pp.
- Tavares, A. P., Cristóvão, R. O., Gamelas, J. A., Loureiro, J. M., Boaventura, R. A., Macedo, E. A.,** 2009, Sequential decolorization of reactive textile dyes by laccase mediator system, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 84(3): 442-446pp.
- Thairu, Y., Nasir, I. A., Usman, Y.,** 2014, Laboratory perspective of gram staining and its significance in investigations of infectious diseases, *Sub-Saharan African Journal of Medicine*, 1(4): 168-174pp.
- Tkaczyk, A., Mitrowska, K., Posyniak, A.,** 2020, Synthetic organic dyes as contaminants of the aquatic environment and their implications for ecosystems: A review, *Science of the total environment*, 717: 137222pp.
- Toker, S. K.,** 2018, Sucul çevrelerden lignolitik enzim üretici mikroorganizmaların izolasyonu, tanılanması ve endüstriyel atıkların parçalanması için ortam optimizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, 152s.
- Toker, S. K., Evlat, H., Koçyiğit, A.,** 2021, Screening of newly isolated marine-derived fungi for their laccase production and decolorization of different dye types, *Regional Studies in Marine Science*, 45: 101837pp.
- Trott, O. and Olson, A. J.,** 2010, AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, *Journal of computational chemistry*, 31(2): 455-461pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Trupkin, S., Levin, L., Forchiassin, F., Viale, A.,** 2003, Optimization of a culture medium for ligninolytic enzyme production and synthetic dye decolorization using response surface methodology, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(12): 682-690pp.
- Vatandoostarani, S., Lotfabad, T. B., Heidarinasab, A., & Yaghmaei, S.,** 2017, Degradation of azo dye methyl red by *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 125: 62-72pp.
- Velmurugan, N. and Lee, Y. S.,** 2012, 21 Enzymes from marine fungi: current research and future prospects, *Marine Fungi: and Fungal-like Organisms*, 441pp.
- Verdonk, M. L., Cole, J. C., Hartshorn, M. J., Murray, C. W., Taylor, R. D.,** 2003, Improved protein–ligand docking using GOLD, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 52(4): 609-623pp.
- Verma, M., Ekka, A., Mohapatra, T., Ghosh, P.,** 2020, Optimization of kraft lignin decolorization and degradation by bacterial strain *Bacillus velezensis* using response surface methodology, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(5): 104270pp.
- Vivona, S., Gardy, J. L., Ramachandran, S., Brinkman, F. S., Raghava, G. P. S., Flower, D. R., Filippini, F.,** 2008, Computer-aided biotechnology: from immuno-informatics to reverse vaccinology, *Trends in biotechnology*, 26(4): 190-200pp.
- Wang, Y., Liu, T., Xie, J., Cheng, M., Sun, L., Zhang, S., Zhang, N.,** 2022, A review on application of molecular simulation technology in food molecules interaction, *Current Research in Food Science*, 5: 1873-1881pp.
- Weng, C., Peng, X., Han, Y.,** 2021, Depolymerization and conversion of lignin to value-added bioproducts by microbial and enzymatic catalysis, *Biotechnology for Biofuels*, 14: 1-22pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Wesenberg, D., Kyriakides, I., Agathos, S. N.,** 2003, White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents, *Biotechnology advances*, 22(1-2): 161-187pp.
- Wishart, D. S., Feunang, Y. D., Guo, A. C., Lo, E. J., Marcu, A., Grant, J. R., Wilson, M.,** 2018, DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018, *Nucleic acids research*, 46(D1): D1074-D1082pp.
- Wishart, D. S., Knox, C., Guo, A. C., Shrivastava, S., Hassanali, M., Stothard, P., Woolsey, J.,** 2006, DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration, *Nucleic acids research*, 34: D668-D672pp.
- Wong, D. W.,** 2009, Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes, *Applied biochemistry and biotechnology*, 157: 174-209pp.
- Yang, C., Chen, E. A., Zhang, Y.,** 2022, Protein–ligand docking in the machine-learning era, *Molecules*, 27(14): 4568pp.
- Yang, Z., Lasker, K., Schneidman-Duhovny, D., Webb, B., Huang, C. C., Pettersen, E. F., Ferrin, T. E.,** 2012, UCSF Chimera, MODELLER, and IMP: an integrated modeling system, *Journal of structural biology*, 179(3): 269-278pp.
- Ye, S., Yan, M., Tan, X., Liang, J., Zeng, G., Wu, H., Wang, H.,** 2019, Facile assembled biochar-based nanocomposite with improved graphitization for efficient photocatalytic activity driven by visible light, *Applied Catalysis B: Environmental*, 250: 78-88pp.
- Yu, Y., Xu, S., He, R., Liang, G.,** 2023, Application of molecular simulation methods in food science: status and prospects, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(6): 2684-2703pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Yucel-Gier, G., Kacar, A., Gonul, L.T., Pazi, I Kucuksezgin, F., Erarslanoglu, N., and Toker, S.K.,** 2018, Evaluation of the relationship of picoplankton and viruses to environmental variables in a lagoon system(Çakalburnu Lagoon, Turkey), *Chemistry and Ecology*, 34(3): 211-228pp.
- Zahoor, M.,** 2012, Removal of crystal violet from water by adsorbent prepared from Turkish coffee residue, *Tenside Surfactants Detergents*, 49(2): 107-113pp.
- Zhang, J., Jiang, L., Chen, X., Lv, K., Basiony, M., Zhu, G., Liu, X.,** 2021, Recent advances in biotechnology for marine enzymes and molecules, *Current Opinion in Biotechnology*, 69: 308-315pp.
- Zhao, B., Zhang, Y., Sun, B., Wang, S., Zang, M., Wang, H., Wu, Q.,** 2023, Insights into the trace Sr<sup>2+</sup> impact on the gel properties and spatial structure of mutton myofibrillar proteins, *Food Research International*, 164: 112298pp.
- Zhao, H. and Caflisch, A.,** 2013, Discovery of ZAP70 inhibitors by high-throughput docking into a conformation of its kinase domain generated by molecular dynamics, *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 23(20): 5721-5726pp.
- Zheng, Z., Levin, R. E., Pinkham, J. L., Shetty, K.,** 1999, Decolorization of polymeric dyes by a novel *Penicillium isolate*, *Process Biochemistry*,34(1): 31-37pp.

**TEŞEKKÜR**

Yüksek lisans sürecimde bilgi birikimini, tecrübelerini ve manevi desteğini benden esirgemeyen, bana yeni bakış açıları kazandıran danışman hocam Doç. Dr. Ali KOÇYİĞİT'e; deneylerimde ve tez yazım aşamalarımnda bana hep destek olan, bana yol gösteren Arş. Gör. Sultan Kübra TOKER'e; yüksek lisans eğitimim boyunca beni her koşulda her zaman destekleyen, güçlendiren, maddi-manevi destekte bulunan canım aileme ve arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



Selin HAKGÖNÜL

## ÖZGEÇMİŞ

2022 yılında Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nü birincilikle bitirdi. Fen Fakültesi ikinciliği derecesine sahip oldu. Mezun olduğu yıl Ege Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı'na başladı. Şu anda özel sektörde Biyolog olarak görev yapmaktadır.

