



**ÜÇLÜ FAZ SİSTEMİ İLE *Bacillus licheniformis*
SO₈'DEN LAKKAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE
BOYAR MADDE DEKOLORİZASYONUNDA
KULLANILMASI**

Semih YILDIRGAN

**Danışman: Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU
Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı
2022
(Her hakkı saklıdır.)**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI

**ÜÇLÜ FAZ SİSTEMİ İLE *Bacillus licheniformis* SO8'DEN LAKKAZ
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BOYAR MADDE
DEKOLORİZASYONUNDA KULLANILMASI**

(Purification of Laccase from *Bacillus Licheniformis* SO8 with Three-Phase Partitioning,
Characterization, and Usage in Dye Decolorization)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Semih YILDIRGAN

Danışman: Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

Erzurum
Eylül, 2022

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Semih YILDIRGAN tarafından hazırlanan “*Üçlü Faz Sistemi İle Bacillus licheniformis SO8’den Lakkaz enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Boyar Madde Dekolorizasyonunda Kullanılması*” başlıklı çalışması 12/09/2022 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, Biyoteknoloji Bilim Dalında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL
Atatürk Üniversitesi

Aslı ıslak imzalıdır

Danışman: Prof.Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU
Atatürk Üniversitesi

Aslı ıslak imzalıdır

Jüri Üyesi: Doç.Dr. Yeliz DEMİR
Ardahan Üniversitesi

Aslı ıslak imzalıdır

Enstitü Yönetim Kurulunun
.../.../.... tarih ve sayılı
kararı.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği’nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Enstitü Müdürü

Aslı ıslak imzalıdır

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

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU danışmanlığında sunulan “Üçlü Faz Sistemi İle *Bacillus licheniformis* SO8’den Lakkaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Boyar Madde Dekolorizasyonunda Kullanılması” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	4	30
Kuramsal Temeller	10	30
Materyal ve Yöntem	33	35
Bulgular	15	20
Tartışma	6	20
Tezin Geneli	16	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5’den büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Semih YILDIRGAN	Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU
14.09.2022	14.09.2022
İmza: Aslı ıslak imzalıdır	İmza:Aslı ıslak imzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayımlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve..... sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih vesayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel çalışmaları Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Biyoloji Araştırma Laboratuvarı ve Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Genetik Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Öncelikle tez çalışmam boyunca her konuda yardımını, desteğini, sabrını, bilgi ve tecrübesini benden esirgemeyen çok değerli hocam Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU'na,

Çalışmalarımı en iyi şekilde ilerletebilmem için laboratuvarında birçok imkan oluşturan Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e,

Tez çalışmamda bana yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Mesut TAŞKIN, Sayın Doç. Dr. Hakan ÖZKAN'a,

Tez çalışmam boyunca laboratuvar çalışmalarında; cihazlar, deney yöntemlerinde yol gösteren, yardımlarını hiç bir zaman esirgemeyen, güler yüz ve samimi yaklaşımlarıyla yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Esra ALÇİÇEK'e,

Tez çalışmamda her zaman yardımını gördüğüm tüm hocalarım ve arkadaşlarıma,

Tüm hayatım boyunca maddi ve manevi destek ve fedakârlıklarını her zaman hissettiğim aileme teşekkürü borç bilirim.

Semih YILDIRGAN

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÜÇLÜ FAZ SİSTEMİ İLE *Bacillus licheniformis* SO8'DEN LAKKAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BOYAR MADDE DEKOLORİZASYONUNDA KULLANILMASI

Semih YILDIRGAN

Danışman: Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

Amaç: Lakkazlar, nispeten geniş aralıktaki aromatik bileşiklerin, organik kirleticilerin ve inorganik substratların oksidasyonunu katalizleyebilme özellikleri nedeniyle çeşitli çevresel ve endüstriyel uygulamalarda oldukça büyük bir potansiyel göstermekte ve yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında; termofilik *Bacillus licheniformis* SO8'den lakkaz enziminin hızlı, basit, genellikle tek adımda gerçekleştirilen bir biyo-ayırma tekniği olan üç fazlı ayırma yöntemi (TPP) ile saflaştırılması, biyokimyasal karakterizasyonu ve enzimin biyoteknolojik açıdan uygulanabilirliğinin araştırılması hedeflenmiştir.

Yöntem: *B. licheniformis* SO8 (GenBank No: MG076978) suşundan lakkaz enzimi TPP yöntemi kullanılarak saflaştırılmış, saflaştırılan lakkaz enziminin biyokimyasal karakterizasyon çalışmaları kapsamında optimum sıcaklık ve pH, stabil sıcaklık ve pH, substrat spesifitesi, enzime bazı metal iyonlarının, organik çözücülerin, yüzey aktif maddelerin ve inhibitörlerin etkisi incelenmiştir. Ayrıca, lakkazın çeşitli sentetik boyarmaddelerin renk giderimindeki etkileri araştırılmıştır.

Bulgular: Lakkaz enziminin TPP yöntemiyle saflaştırılması sırasında ilk olarak tuz, organik çözen ve pH optimizasyonu yapıldı ve pH 9,0'da, 1,0:1,0 (ham enzim çözeltisi:t-bütanol oranı) ve %70 doygun amonyum sülfat kullanılarak enzim, %102,07 verimle 5,65 kat saflaştırıldı. Enzimin molekül kütlesi SDS-PAGE ile ~38,7 kDa olarak hesaplandı. Lakkaz enzimi için optimum pH 9,0 ve optimum sıcaklık 70°C olarak belirlendi. Enzimin 20-90°C sıcaklık aralığında tüm sıcaklık değerlerinde, 1 saatlik inkübasyon süresinin sonunda %65 oranında aktivitesini koruduğu tespit edildi. %1 ve %5'lik konsantrasyonlardaki yüzey aktif maddelerin varlığında enzimin yüksek oranda stabil kaldığı, Fe²⁺ ve Mn²⁺ metalleri varlığında ise enzimin aktivitesinin arttığı belirlendi. *B. licheniformis* SO8 lakkaz enziminin ABTS substratı için K_m, V_{max}, K_{cat} ve K_{cat}/K_m değerleri sırasıyla 110 µM, 19,6 µmol.L⁻¹.dk⁻¹, 0,048 s⁻¹ ve 0,44 s⁻¹.mM⁻¹ olarak hesaplandı. Son olarak lakkaz enziminin bazı sentetik boyalarının renk giderimi üzerine etkisini incelemek için Asit siyah 1, Kongo kırmızı, Metilen mavisi, Turuncu, Asit kırmızı 27, Reaktif siyah 5 boyaları kullanıldı ve en yüksek boya gideriminin Asit Kırmızı 27 boyası üzerinde ~%38 oranında olduğu tespit edildi.

Sonuç: Lakkazların çevre ve endüstriyel biyoteknolojideki artan uygulamaları göz önüne alındığında, farklı fizikokimyasal ve katalitik özelliklere sahip lakkaz üreten yeni suşları keşfetmek oldukça önemlidir. Ekstraselüler lakkaz üreten *B. licheniformis* SO8'den saflaştırılan enzimin alkali pH ve yüksek sıcaklık koşullarında uzun bir süre aktivesini koruduğu tespit edildi. Bu durum, saflaştırılmış lakkazı çeşitli endüstriyel işlemler için uygun hale getirmektedir. Ayrıca lakkazın renk giderme özelliği, metal iyonlarına karşı önemli bir stabiliteye sahip olması endüstriyel atık suların renksizleştirilmesinde ve atık su arıtımında olası uygulamaya sahip olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Lakkaz, *Bacillus licheniformis*, TPP, enzimatik karakterizasyon, dekolorizasyon.

Eylül 2022, 78 sayfa

ABSTRACT

MASTER THESIS

PURIFICATION OF LACCASE FROM *Bacillus licheniformis* SO8 WITH THREE PHASE PARTITIONING, CHARACTERIZATION, AND USAGE IN DYE DECOLORIZATION

Semih YILDIRGAN

Supervisor: Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

Purpose: Laccases show great potential and are widely used in various environmental and industrial applications due to their ability to catalyze the oxidation of a relatively wide range of aromatic compounds, organic pollutants and inorganic substrates. In this thesis study; Purification of laccase enzyme from thermophilic *Bacillus licheniformis* SO8 by three-phase separation method (TPP), which is a fast, simple, usually one-step bioseparation technique, biochemical characterization and investigation of the biotechnological applicability of the enzyme.

Method: Within the scope of biochemical characterization studies of laccase enzyme purified from *B. licheniformis* SO8 (GenBank No: MG076978) strain using TPP method, optimum temperature and pH, stable temperature and pH, substrate specificity, some metal ions, organic solvents, surfactants and The effect of inhibitors was studied. In addition, the effects of laccase on the decolorization of various synthetic dyestuffs were investigated.

Finding: During the purification of the laccase enzyme by TPP method, salt, organic solvent and pH optimization were performed first, and the enzyme was synthesized using 1.0:1.0 (raw enzyme solution:t-butanol ratio) and 70% saturated ammonium sulfate at pH 9.0. It was purified 5.65-fold in 102.07% yield. The molecular mass of the enzyme was calculated as ~38.7 kDa by SDS-PAGE. The optimum pH was determined as 9.0 and the optimum temperature for the laccase enzyme was determined as 70°C. It was determined that the enzyme remained active at the rate of 65% at the end of the 1-hour incubation period at all temperature values in the temperature range of 20-90°C. It was determined that the enzyme remained highly stable in the presence of 1% and 5% concentrations of surfactants, and increased its activity in the presence of Fe²⁺ and Mn²⁺ metals. The K_m, V_{max}, K_{cat} and K_{cat}/K_m values for the ABTS substrate of the *B. licheniformis* SO8 laccase enzyme were 110 µM, 19.6 µmol.L⁻¹.dk⁻¹, 0,048 s⁻¹ and 0,44 s⁻¹.mM⁻¹, respectively. Finally, Acid black 1, Congo red, Methylene blue, Orange, Acid red 27, Reactive black 5 dyes were used to examine the effect of laccase enzyme on the color removal of some synthetic dyes and it was determined that the highest dye removal was on Acid Red 27 dye with ~38%.

Results: Considering the increasing applications of laccases in the environment and industrial biotechnology, it is very important to discover new laccase-producing strains with different physicochemical and catalytic properties. It was determined that the enzyme purified from *B. licheniformis* SO8, which produces extracellular laccase, remained active for a long time under alkaline pH and high temperature conditions. This makes purified laccase suitable for a variety of industrial processes. In addition, the decolorization property of laccase and its significant stability against metal ions indicate that it may have possible application in the decolorization of industrial wastewater and wastewater treatment.

Keyword: Laccase, *Bacillus licheniformis*, TPP, enzymatic characterization, decolorization.

September 2022, 78 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
GİRİŞ.....	1
Lakkaz Enzimi	2
Lakkazların Biyokimyasal Özellikleri ve Katalitik Mekanizmaları	5
Lakkaz Substrat ve İnhibitörleri.....	7
Lakkaz Aracılı Sistemler (Lakkaz Mediatör Sistemler -LMS).....	7
Lakkaz Enziminin Biyoteknolojide ve Endüstride Kullanım Alanları	9
Termofilik Bakteriler	11
<i>Bacillus licheniformis</i>	11
<i>Bacillus licheniformis</i> Filolojisi	12
Üçlü Faz Ayırma Yöntemi (TPP-Three Phase Purification)	13
KURAMSAL TEMELLER.....	15
Çalışmanın Amacı.....	18
MATERYAL VE METOT.....	20
Materyal	20
Kullanılan Organizma	20
Kullanılan Kimyasallar	20
Kullanılan Aletler ve Cihazlar	21
Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	21
Tez kapsamında yapılan deneylerde kullanılan besiyerlerinin hazırlanışı.....	21
Enzim aktivite tayini için kullanılan çözelti ve tamponlar.....	22
Protein analizi için kullanılan çözelti ve tamponlar	22
Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) için kullanılan çözelti ve tamponlar	22
Gümüş boyamada kullanılan yöntem ve kullanılan çözeltiler	23

Yöntem.....	23
Lakkaz enzimi üreten bakteri izolatlarının ABTS içerikli sıvı besiyerinde belirlenmesi	23
Lakkaz enzimi üretimi.....	23
Lakkaz enzimi aktivite tayini	24
Bradford yöntemi ile protein tayini.....	25
Lakkaz Enziminin Saflaştırılması	25
Lakkaz Enziminin Üçlü Faz Ayırma (TPP) Yöntemi İle Saflaştırılması.....	25
SDS-PAGE ile Lakkaz Enziminin Molekül Kütlesinin Belirlenmesi ve Saflığının Kontrolü	26
Lakkaz Enziminin Biyokimyasal Karakterizasyon Çalışmaları	27
<i>B. licheniformis</i> SO8'den saflaştırılan lakkaz enziminin aktivitesi ve stabilitesi üzerine pH'ın etkisinin belirlenmesi.....	27
<i>B. licheniformis</i> SO8'den saflaştırılan lakkaz enziminin aktivitesi ve stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisinin belirlenmesi.....	27
Bazı Metal İyonlarının <i>B. licheniformis</i> SO8'den saflaştırılan lakkaz enziminin aktivitesine etkisinin belirlenmesi.....	28
Yüzey aktif maddelerin ve bazı kimyasalların <i>B. licheniformis</i> SO8'den saflaştırılan lakkaz enziminin aktivitesine etkisinin belirlenmesi	28
<i>B. licheniformis</i> SO8'den saflaştırılan lakkaz enziminin substratlara spesifitesinin belirlenmesi	28
<i>B. licheniformis</i> SO8'den saflaştırılan lakkaz enziminin K_m , V_{max} , K_{cat} ve K_{cat}/K_m parametrelerinin hesaplanması.....	28
Lakkaz Enziminin Bazı Boyaların Renk Giderimi Üzerine Etkilerinin Araştırılması	29
İstatistiksel Analiz.....	29
ARAŞTIRMA BULGULARI	30
Lakkaz Enzimi Üreten Bakteri İzolatlarının ABTS İçerikli Sıvı Besiyerinde Belirlenmesi	30
Lakkaz Enzimi Üretimi ve Saflaştırılması	30
Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....	30
Lakkaz Enziminin Üçlü Faz Ayırma (TPP) Sistemi İle Saflaştırılması.....	31
<i>B. licheniformis</i> SO8 lakkaz enziminin TPP yöntemiyle saflaştırma sonuçları.....	34
Lakkaz Enziminin SDS-PAGE Yöntemi İle Saflık Kontrolü ve Molekül Kütlesinin Tayini	34
Lakkaz Enziminin Biyokimyasal Karakterizasyon Çalışma Sonuçları	35

<i>B. licheniformis</i> SO8'den saflaştırılan lakkaz enziminin optimum ve stabil pH'sının belirlenmesine yönelik sonuçlar.....	35
<i>B. licheniformis</i> SO8'den saflaştırılan lakkaz enziminin optimum ve stabil sıcaklığının belirlenmesine yönelik sonuçlar.....	37
Bazı Metal İyonlarının <i>B. licheniformis</i> SO8'den saflaştırılan lakkaz enziminin aktivitesine etkisinin belirlenmesine yönelik sonuçlar	38
Yüzey aktif maddelerin ve bazı kimyasalların <i>B. licheniformis</i> SO8'den saflaştırılan lakkaz enziminin aktivitesine etkisinin belirlenmesine yönelik sonuçlar	40
<i>B. licheniformis</i> SO8'den saflaştırılan lakkaz enziminin substratlara spesifitesinin belirlenmesine yönelik sonuçlar.....	41
<i>B. licheniformis</i> SO8'den saflaştırılan lakkaz enziminin kinetik parametrelerinin belirlenmesine yönelik sonuçlar.....	42
Lakkaz Enziminin Boyar Maddelerin Renksizleştirilmesi için Kullanımı	42
TARTIşMA ve SONUÇLAR	46
KAYNAKLAR.....	52
ÖZGEÇMİş.....	65

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. <i>Bacillus licheniformis</i> Filolojisi (Şabahat 2019)	12
Tablo 2. Lakkaz Enzimi Aktivite Ölçümü Küvet İçeriği.....	24
Tablo 3. <i>B. licheniformis</i> SO8'den Saflaştırılan Lakkaz Enziminin Saflaştırma Tablosu.....	34
Tablo 4. Bazı Yüzey Aktif Maddeler ve İnhibitörlerin Lakkaz Enzimi Üzerine Etkisi	41
Tablo 5. Doğal Substratların Lakkaz Enziminin Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	41



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Çürükçül beyaz mantar olan <i>Trametes versicolor</i> ’ dan izole edilen edilen lakkazın üç boyutlu yapısı	4
Şekil 2. Yüksek OSP(Occluded Surface Packing) değerleri ile kalıntıların yerlerini gösteren(sarı), <i>Bacillus Subtilis</i> CotA protein yapısının kurdela modeli. Bakır atomları ise kırmızı küreler olarak gösterilmişti	5
Şekil 3. <i>Bacillus subtilis</i> bakterisinin lakkaz enzim bakır merkezleri (CotA).	6
Şekil 4. Fungal lakkazların katalitik mekanizması.....	7
Şekil 5. Substratlar için lakkaz katalizörlüğünde redoks döngülerinin şematik gösterimi	9
Şekil 6. <i>B. licheniformis</i> kromozomunun halkasal yapısı (ATCC 14580).....	12
Şekil 7. TPP yönteminin şematik gösterimi	14
Şekil 8. Protein tayininde kullanılan standart grafik	31
Şekil 9. TPP prosesinde farklı amonyum sülfat konsantrasyonunun (%20, 30, 40, 50, 60, 70, 80) lakkaz enziminin saflaştırma katsayısına ve verimine etkisi.....	32
Şekil 10. TPP prosesinin %70 amonyum sülfat konsantrasyonu varlığında farklı <i>t</i> -bütanol oranlarının (Homojenat: <i>t</i> -bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) lakkazın saflaştırma katsayısına ve verimine etkisi.....	33
Şekil 11. Lakkaz enziminin saflaştırılmasında TPP sistemine pH’nın etkisi.....	34
Şekil 12. Log M_K-R_f grafiği.....	35
Şekil 13. <i>B. licheniformis</i> SO8’den TPP yöntemiyle saflaştırılan lakkaz enziminin SDS-PAGE görüntüsü. a) Homojenat b) Alt faz c) Ara faz M: Marker.....	35
Şekil 14. pH’ın <i>B. licheniformis</i> SO8 lakkaz enziminin aktivitesi üzerine etkisi.....	36
Şekil 15. pH’ın <i>B. licheniformis</i> SO8 lakkaz enziminin stabilitesi üzerine etkisi.	37
Şekil 16. Sıcaklığın <i>B. licheniformis</i> SO8 lakkaz enziminin aktivitesi üzerine etkisi.	37
Şekil 17. Sıcaklığın <i>B. licheniformis</i> SO8 lakkaz enziminin stabilitesi üzerine etkisi.....	38
Şekil 18. <i>B. licheniformis</i> SO8 lakkaz enzimi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi (1 mM)..	39
Şekil 19. <i>B. licheniformis</i> SO8 lakkaz enzimi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi (5 mM)..	39
Şekil 20. <i>B. licheniformis</i> SO8 lakkaz enzimi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi (10 mM)	40
Şekil 21. ABTS substratı için K_m ve V_{max} bulunmasına yönelik Lineweaver-Burk grafiği	42
Şekil 22. Boyarmaddeler için kullanılan standart grafikler (Erol 2018)	43
Şekil 23. pH 5,0’de 120 dakikalık inkübasyon sırasında 6 farklı boyanın renk giderimi.....	44
Şekil 24. pH 7,0’de 120 dakikalık inkübasyon sırasında 6 farklı boyanın renk giderimi.....	44
Şekil 25. pH 9,0’da 120 dakikalık inkübasyon sırasında 6 farklı boyanın renk giderimi.....	45

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat Derece
µl	: Mikrolitre
A	: Absorbans
AA	: Akrilamid
ABTS	: 2,2-Azino-bis(3-etilbenzotiyezolin-6-sülfonik asit)
APS	: Amonyum Persülfat
Bis – AA	: Bis Akrilamid
Dk	: Dakika
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EtOH	: Etanol
g	: Gram
kDa	: Kilodalton
L	: Litre
M	: Molar
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
OD	: Optik Dansite
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez : Poliakrilamid Jel Elektroforez

GİRİŞ

Enzimler, canlı organizmalarda biyokimyasal reaksiyonların %100 ürün verimi ile gerçekleşmesini sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Biyokatalizörler olarak da bilinen enzimler, hücrelerden ekstrakte edilebilirler ve daha sonra çok çeşitli ticari açıdan önemli süreçleri katalize etmek için kullanılabilirler (Keha ve Küfrevioğlu 2012; Robinson 2015).

Enzimler bu yetenekleri sayesinde günlük hayatta birçok alanda kullanılmaktadır. Enzimler, deterjan sanayi başta olmak üzere çeşitli kimyasal ürünlerin gamında yer alan mamüllerde, şeker eldesini, bira, şarap gibi alkollü içeceklerin üretimini, süt ve peynir ürünlerinin yapımını, su arıtmını içine alan çevre, kozmetik, gıda, kâğıt, sağlık ve eczacılık gibi çeşitli sektörlerde madde sentezi veya istenmeyen ürünlerin yok edilmesi gibi proseslerde kullanılmaktadırlar (Ha and Bhagavan 2011).

Ticari enzimlerin son yıllarda üretim hacmi ve ürün sayısı artmıştır. Giderek artan ihtiyaçlar doğrultusunda yeni enzimlere duyulan ihtiyaç küresel enzim pazarını ortaya çıkarmıştır. Farklı habitatlarda bu amaçlar için enzim kaynağı olarak kullanılacak birçok organizma bulunmaktadır. Ancak bu organizmalara ulaşım ve onları işleme, endüstride kullanabilir hale getirim maliyetleri hesaplandığında anlamlı bir tablo karşımıza çıkmaz. Bununla birlikte, çoğu enzim genellikle endüstriyel kullanıma uygun değildir. Yönlendirilmiş evrim gibi biyomühendislik uygulama süreçleri ile ekonomik ve kolay sonuç verebilecek şekilde kullanıma uygun hale getirilebilirler (Fidan et al. 2012).

Dünyadaki nüfus artışı, teknolojik ve sosyal gelişmeler gereksinimleri aynı oranda artırmaktadır. Artan ihtiyaçların giderimi için kurulan fabrikalar ve doğaya bıraktıkları atıklar, hammadde ve doğal ürünlerin azalması ile birlikte organik maddelerin kullanımının azalması ve dolayısıyla zararlı kimyasalların çevreye salınımı doğal yaşamın tehdit edilmesine yol açmaktadır. Bununla birlikte küresel ısınma, yer altı sularının kirliliği gibi etmenler tarımsal ürünlerin zarar görmesi gibi olumsuz durumlara sebep olmakta ve her geçen yıl bu tahribat katlanarak devam etmektedir (Şaşmaz 2009). Dolayısıyla kentleşme ve sanayileşme, çevrenin ciddi şekilde kirlenmesine yol açarak ekosistemler üzerinde zararlı etkilere neden olmaktadır. Biyoteknologlar ise, küresel kirliliğin etkisini düzeltmek için yenilikçi araçlar ve kirleticiler olmayan süreçleri araştırmakta ve geliştirmektedirler. (Arregui et al. 2019). Dev ekonomilere sahip ülkeler dünyanın sürdürülebilir kaynaklarla yönetilmesi konusunda aralarında diyaloglar geliştirip çeşitli yükümlülükler barındıran anlaşmalara imza atmışlardır. Bu amaçlarla üretilen

ve kullanılan enzimler çeşitlilik göstermektedir. Biyoteknolojideki inovatif yaklaşımlar ve biyoloji temelli çözümlere yönelik geliştirilen stratejiler güçlü katalitik özelliklere sahip enzim arayışını tüm dünyada devam ettirmektedir (Tülek 2020).

Fenolik/fenolik olmayan bileşikler ve oldukça inatçı çevre kirleticilerini oksitleme kabiliyetine sahip olması nedeniyle lakkazlar, son zamanlarda araştırmacıların dikkatini çekmiş ve bu enzimlerin biyoremediasyonda etkin bir şekilde kullanımlarını arttırmıştır (Patel et al. 2014). Spesifik olarak geniş spektrumlu biyokatalizörler olan lakkazlar, endüstriyel atık sularda bulunan çeşitli bileşikler parçalamak için kullanılmıştır (Arregui et al. 2019). Üretiminin ucuz olmamasına rağmen özellikle insan ve hayvan sağlığını olumsuz yönde etkileyen kimyasalların biyodegradasyonunda aktif görev alması nedeniyle lakkazların kullanımı tüm dünya tarafından kabul gören bir yöntem olmuştur. Lakkazı bu kadar önemli kılan, yıkıma dirençli lignin gibi kirleticileri kolaylıkla okside edebilmesi ve düşük substrat spesifitesine sahip olmasıdır. Lakkazlar moleküler oksijeni kullanarak substratların monoelektronik oksidasyonunu katalizler. Katalizinin basit gereksinimleri (hava ile çalışırlar ve tek yan ürün olarak su üretirler), stabilitesi ve inhibisyonun olmaması (peroksidaz için H_2O_2 ile gözlemlendiği gibi) bu çevre dostu enzimlere olan ilgiyi son yıllarda önemli ölçüde artırmıştır (Riva 2006; Saparrat et al. 2007; Majeau et al. 2010; Arregui et al. 2019).

Lakkazlar, ham enzim ekstraktları veya serbest enzimler kullanılarak çeşitli kirleticilerin biyotransformasyonunda yüksek potansiyel göstermiştir. Bununla birlikte, büyük ölçekte biyoremediasyon ve su arıtımı uygulamaları, protein stabilitesini ve geri kazanımı etkileyen kirlenmiş ortamın karmaşık bileşimini çözmekte başarılıdır. Bu nedenle, karmaşık koşullar altında kullanılabilen yeni lakkazları belirlemek, geliştirmek ve bunların kontamine suların arıtılmasında veya diğer endüstriyel alanlarda yüksek verimli uygulamalarını sağlamak için yeni stratejiler ve süreçler geliştirilmelidir (Arregui et al. 2019).

Lakkaz Enzimi

Çoklu bakır içeren oksidaz (Multibakır oksidaz-MCO'lar) enzim ailesinin bir üyesi olan lakkazlar (Benzendiol: oksijen redüktazlar, EC 1.10.3.2) p-difenol oksidazlar olarak da bilinirler. İlk kez 1883'te Yoshida tarafından lake ağacı *Rhus vernicifera*'dan izole edilmiş ve daha sonraları böceklerde ve prokaryotlarda da tipik lakkaz özelliklerine sahip proteinler tanımlanmıştır (Riva 2006; Giardina et al. 2010).

Lakkazlar çoklu bakır bölgeleri ihtiva eden oksidoredüktaz enzim grubundandır. Aktif bölgelerinde genellikle dört bakır atomu içerirler ve bu dört bakır atomunu içeren trinükleer bakır kümesi ve T1 (Tip 1) bölgesi halinde düzenlenirler. Substratın oksidasyonu Tip 2 ve Tip

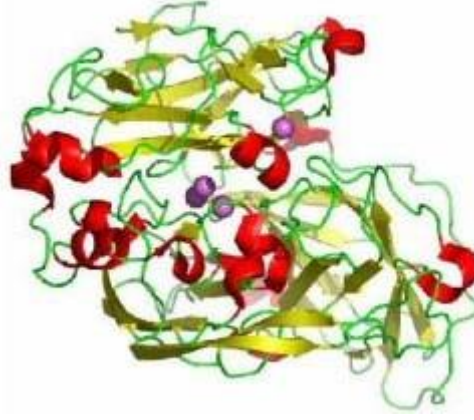
3 bakır atomu ile gerçekleşir. Tip 1'den Tip 2' ye iç elektron transferi gerçekleştiğinde Tip 3 bakırlar oksijenin suya indirgenmesini bu bölgelerde gerçekleştirirler (Gür 2011).

Lakkazlar doğada geniş çapta bulunmaktadır ve mantarlarda, bitkilerde, böceklerde, daha sonraki zamanlarda ise bakterilerde ve arkeada tanımlanmışlardır. Bitki ve özellikle fungal lakkazlarının fizyolojik işlevleri kapsamlı bir şekilde incelenmiş olup, bundan dolayı da biyoteknolojik uygulamalarda çoğunlukla fungal lakkazlar tercih edilmiştir (Kim 2015, Baldrian 2006). Bununla birlikte, bakteriyel lakkazlar ucuz ortamlarda kısa sürede üretilibilmeleri, geniş substrat spesifitesi, daha geniş optimum pH aralığı, daha yüksek termostabilite ve alkali ortamlara daha fazla tolerans gibi özellikleri ile fungal lakkazlara göre çeşitli avantajlara sahiptirler (Guan et al. 2018).

Çok bakırlı lakkazlar, yapısal ve filogenetik açıdan 11 aileye ayrılırlar: (Reiss, Renate, et al. 2013)

- Bitki lakkazları
- Böcek lakkazları
- Mantar ferrokksidazlar
- Ascomycete lakkazlar
- Fungal pigment MCO'ları (Çoklu bakır oksidazlar)
- Basidiomycete lakkazlar
- Bakteriyel bilirubin oksidazlar
- Mantar ve bitki AO'ları
- Bakteriyel CopA proteinleri (Bakır direnç proteinleri)
- SLAC homologları (Küçük lakkaz ailesi)
- Bakteriyel CueO proteinleri (Bakır akışı)

Fungal kaynaklı lakkazların etki ettikleri pH aralığı 3,0-7,0 arasında bulunurken, bitkisel kaynaklı lakkazlar pH 9,0 değerine kadar aktivite gösterirler. Bu farklılıklar zıt dengelere bağlı şekilde gerçekleşir. Fungal kaynaklı lakkazlar Tip1 bölgelerindeki indirgen substrat vasıtası ile bu bölgedeki bakır iyonunun arasında redoks potansiyeli üretir; bitkisel kaynaklı lakkazlarda ise hidroksit anyonu Tip2 ve Tip3 bölgesinde bulunan bakıra bağlanır (Gianfreda et al. 1999).

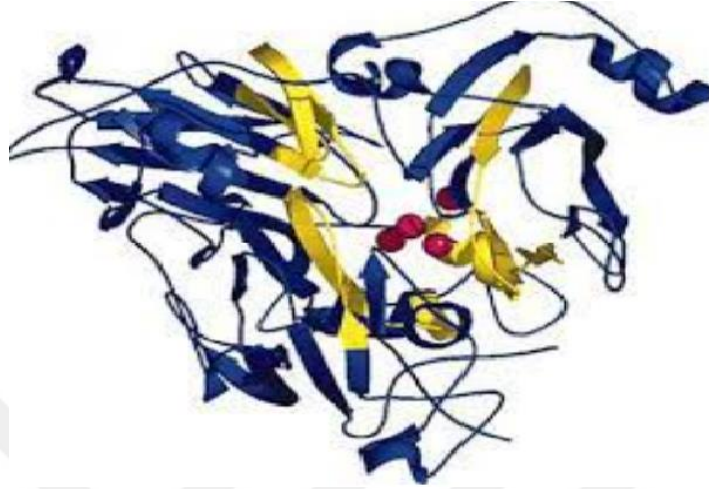


Şekil 1. Çürükçül beyaz mantar olan *Trametes versicolor*' dan izole edilen lakkazın üç boyutlu yapısı (Blackwood et al. (2007).

Prokaryotik lakkazların iyi bilinen üreticileri arasında gram-pozitif ve gram-negatif toprak ve filum α - ve γ - proteobakteriler, *Firmicutes*, siyanobakteri, *Aquificae* ve *Deinococcus-Thermus* ve ayrıca Arkebakteriler bulunur (Janusz et al. 2020). Ekstrem şartlarda yaşayan türlerde dahil olmak üzere, *Bacillus pumilus* (Reiss et al. 2011; Burbank et al. 2010), *B. subtilis* (Hullo et al. 2001), *B. licheniformis* (Koschorreck et al. 2008), *Streptomyces lavendulae* (Suzuki et al. 2003), *S. griseus* (Endo et al. 2003), *Escherichia coli* (Alexandre, and Zhulin 2000), *P. syringae* (Solano et al. 2001), *Thermus thermophilus* (Miyazaki 2005), *Sinorhizobium meliloti* (Castro-Sowinski et al. 2002), *Oscillatoria boryana* (Palanisami, et al. 2010), *Haloferax volcanii* (Uthandi et al. 2010) ve *Marinomonas mediterranea* (Sanchez-Amat and Solano 1997)'da lakkazın varlığı bildirilmiştir. Prokaryotik lakkazların molekül kütleleri genellikle 32 ila 180 kDa arasında değişmekte ve monomerik, trimerik veya tetramerik yapıda olabilmektedirler. Bakteriyel çoklu bakır içeren oksidazların glikozilasyonu kapsamlı bir şekilde araştırılmamıştır ve bakteriyel lakkazların karbohidrat içeriği ile ilgili sadece birkaç araştırma bulunmaktadır (Uthandi et al. 2010; Pawlik et al. 2016). Bakteriyel lakkazlar, düşük redoks potansiyelli enzimlerdir (Fernandes et al. 2010). Fungus lakkazlarına kıyasla, bakteriyel lakkazlar yüksek pH değerlerinde aktiftirler ve yüksek sıcaklıklarda çok daha kararlıdır. Örneğin, birkaç *Streptomyces* lakkazı ABTS ve DMP substratları için sırasıyla pH 8,5 ve 9,0 gibi yüksek alkali şartlarda optimum pH gösterirken (Machczynski et al. 2004; Niladevi et al. 2008; Gunne et al. 2012); *Pyrobaculum aerophilum* (Fernandes et al. 2010) ve *T. Thermophilus* (Miyazaki 2005) lakkazlarının sırasıyla 85°C ve 92°C gibi yüksek sıcaklıklarda optimum sıcaklık değerine sahip olduğu bildirilmiştir. Bu olağanüstü biyokimyasal özellikleri, prokaryotik lakkazların olası biyoteknolojik uygulamalarda kullanılmak üzere sağlam bir katalizör kaynağı olarak potansiyelini göstermektedir.

Lakkazların Biyokimyasal Özellikleri ve Katalitik Mekanizmaları

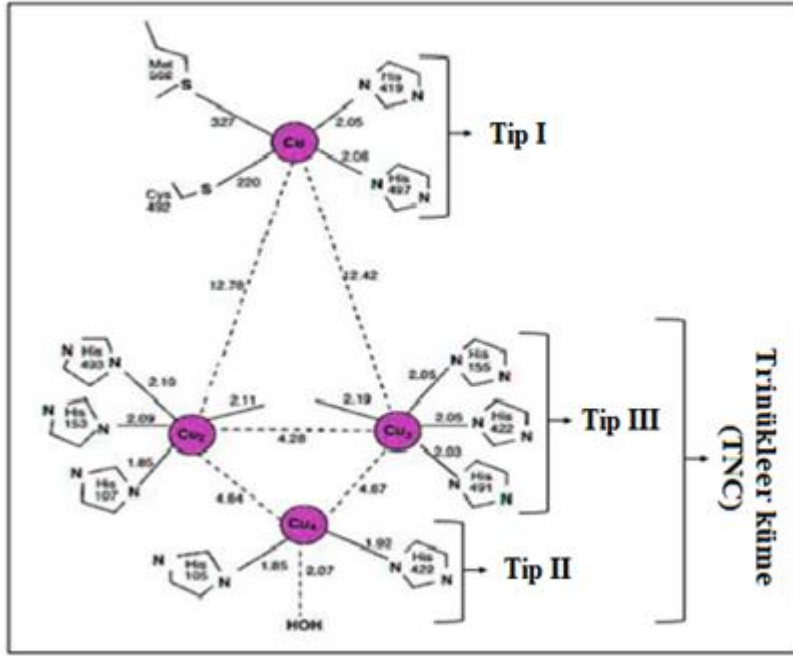
Lakkaz enziminin X ışını yapı tayini ve kristalizasyonu 1998’de Dukros ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir (Ducros et al. 1998).



Şekil 2. Yüksek OSP(Occluded Surface Packing) değerleri ile kalıntıların yerlerini gösteren(sarı), *Bacillus Subtilis* CotA protein yapısının kurdela modeli. Bakır atomları ise kırmızı küreler olarak gösterilmiştir. (Enguita et al.2003)

Lakkaz enziminin yapısının karakterizasyon çalışmalarında, Tip2 ve Tip3 bölgelerindeki totalde üç bakır atomunun, substratı indirgeyerek ortaya çıkan elektronları su oluşturmak için moleküler oksijene aktardığı bildirilmiştir. Lakkazlar moleküler oksijeni suya indirger ve bu sayede fenolik veya fenolik olmayan bileşiklerin oksitlenmesini sağlar (Gianfreda et al. 1999).

Lakkazlar yapılarında dört farklı bakır atomu bulundurlar. Bu bakırların elektroparamanyetik (EPR) açısından özellikleri farklılık gösterir. Tip1 ve Tip2 bakır bölgelerinde birer bakır atomu bulunur ve elektron adsorbsiyonları güçlüdür. Tip 3 bölgelerinde ise iki adet bakır atomunu ihtiva ederler ve bölgeye güçlü şekilde bağlıdırlar. Ayrıca EPR sinyalleri bölgeye güçlü bir anyonun bağlantısı ile artar. Tip1 bakır bölgesinde iki histidine ek olarak bir sistein kısmı bulunur. Lakkazın tipik mavi renginden, bakır-sistein kovalent bağlarının sebep olduğu elektronik adsorbsiyon sorumludur. Yüksek redoks potansiyeli sebebiyle bu bölgelerde substratların oksidasyonu gerçekleşir. Tip 2-3 bakır merkezleri bütün olarak değerlendirildiği için bu bölge trinükleer küme adıyla anılır (Ercan 2014, Enguita, et al. 2003; Claus, 2004).



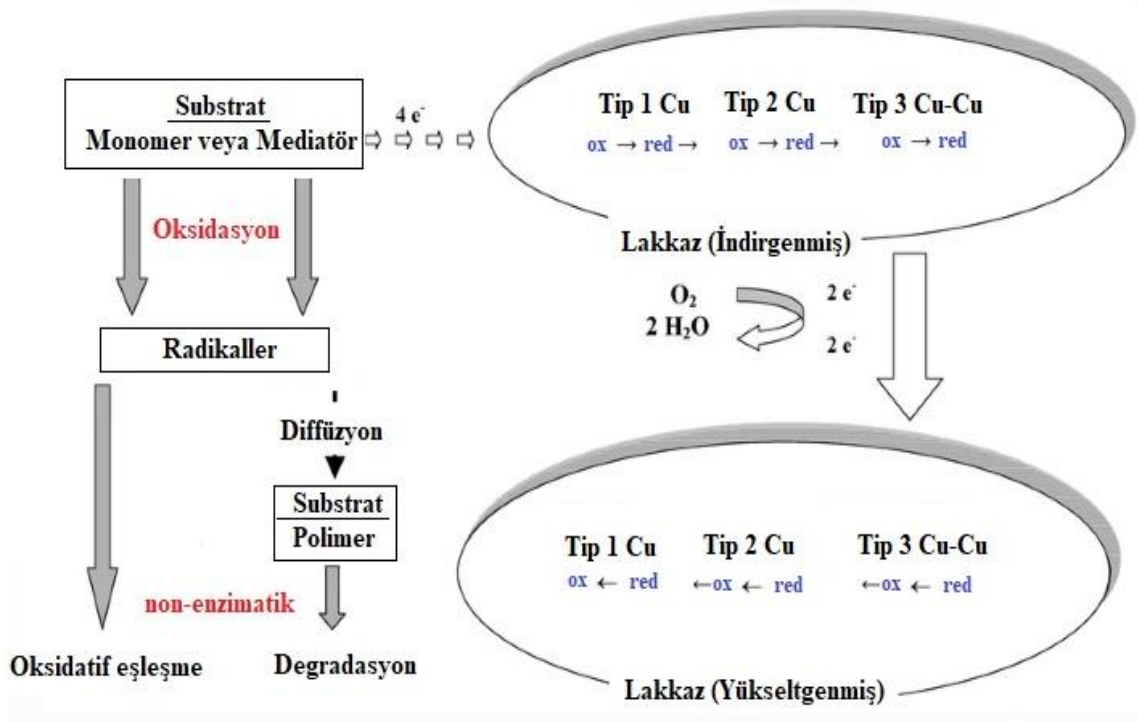
Tip1: 610 nm' de adsorbsiyon

Tip 2: Mavi olmayan bakır merkezi

Tip 3: 310 nm' de absorbsiyon

Şekil 3. *Bacillus subtilis* bakterisinin lakkaz enzim bakır merkezleri (CotA). (Tülek 2020)

Lakkaz enziminin katalitik reaksiyon mekanizmasının; Tip 1 bakırın indirgeyici substratlar ile indirgenmesi, Tip 1 bakırdan trinükleer kümeye (Tip 2 ve Tip 3 bakır) elektronların transferi, trinükleer kümede moleküler oksijenin indirgenmesi ve suyun serbest bırakılması olmak üzere üç ana basamaktan oluştuğu düşünülmektedir (Kunamneni et al. 2008). Lakkazlar, birer elektron transferiyle dört basamakta Tip 1 bakır tarafından substrat moleküllerinin oksidasyonunu katalizler. Oksidasyon sonucunda serbest radikaller oluşur ve bu radikaller lakkazın katalizlediği oksidasyon veya non-enzimatik reaksiyonlara (polimerizasyon ya da hidrasyon) katılırlar. İndirgenen lakkazın yeniden oksidasyonu, trinükleer küme tarafından iki basamakta gerçekleşen reaksiyonla dört elektronun moleküler oksijene transfer edilmesi ile gerçekleşir. Dolayısıyla Tip 2 ve Tip 3 bakır merkezleri, moleküler oksijenin indirgenerek suyun serbest kaldığı bölgelerdir (Şekil 3).



Şekil 4. Fungal lakkazların katalitik mekanizması (Claus 2003)

Lakkaz enziminin yapısında yaklaşık %30 oranında karbohidrat bulunur. Bu karbohidratlar; heksozamin, glukoz, galaktoz, arabinoz, mannoz ve früktozdur ve lakkazın kaynağına göre değişiklik göstermektedir. Lakkazlar ihtiva ettikleri karbohidrat çeşidine göre farklı moleküler kütlelere sahiptirler.(Claus 2003)

Lakkaz Substrat ve İnhibitörleri

Lakkazlar substrat spesifitesi oldukça düşük enzimlerdir ve bu durum çok sayıda maddeyi oksitleme yeteneği kazandırır. Bunlardan bazıları; hidroquinon, p -fenilendiamin, metoksi grubuyla yer değiştirmiş olan fenoller, amino grubu ihtiva eden fenoller, polifenoller, benzentiyoller, polifenoller, arildiaminler, katekol, guaiakol, ABTS, bazı organik ve inorganik metallerdir (Polaina and MacCabe et al. 2007).

Lakkazlar üzerinde inhiye özelliğine sahip bazı kimyasallar bulundurmaktadır. Bunlar; halidler, azidler, siyanür, tiyosiyanür ve flordur. Tip 2-3 bölgesindeki anyonik gruplar ise iç elektron transfer sistemini bozup enzimi inhiye edebilir (Baldrian 2006).

Lakkaz Aracılı Sistemler (Lakkaz Mediatör Sistemler -LMS)

Lakkazların fenolik olmayan bileşikleri fenolik bileşikler gibi okside etmesi bazı aracı sistemler (moleküller/mediatörler) vasıtası ile gerçekleşir. 1990 yılında ABTS'ye ait amonyum tuzlarının lakkaza farklı substratları okside edebilme yeteneği kazandırmasının keşfi ile bu enzimler üzerindeki çalışmalar farklı bir boyut kazanmıştır (Morozova et al. 2007)

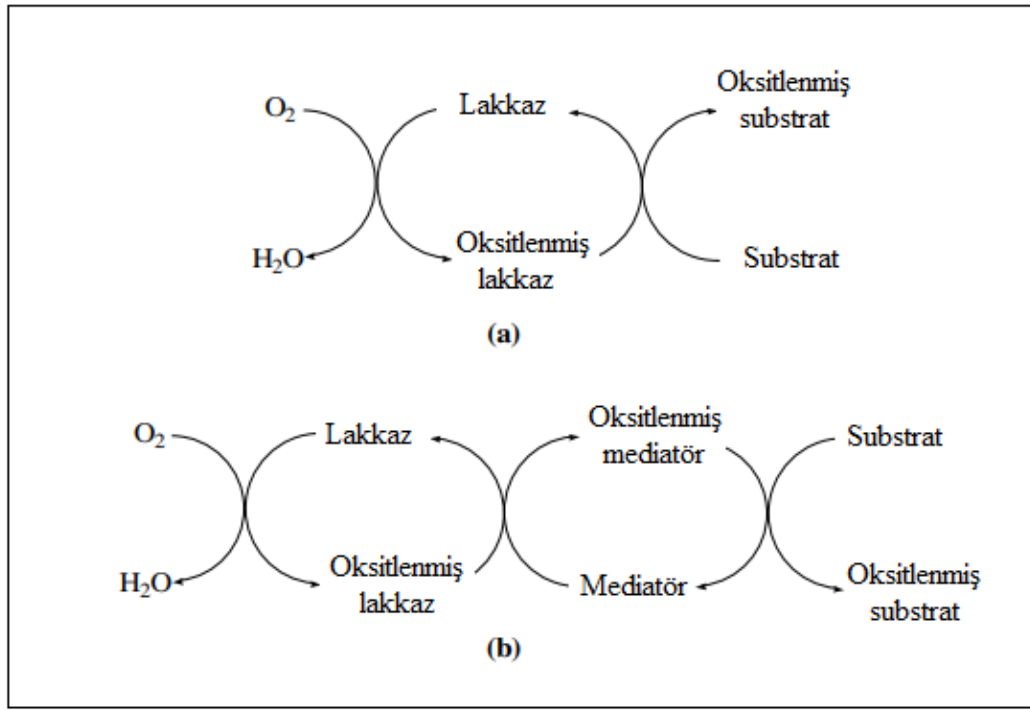
Kullanılabilir en uygun redoks aracı molekülün mükemmel bir lakkaz substratı olması gerekir. İndirgenmiş ve okside edilmiş formları stabil olmalı, fakat enzimatik reaksiyonlarla inhibe olmamalıdır. Son yıllarda LMS'ler sayesinde lakkazların substrat aralığı genişletilmiştir. Aromatik metil gruplarının, benzil alkollerin, polisiklik aromatik hidrokarbonların (PAH'ler) oksidasyonuna ve tekstil boyalarının ağartılmasına başarıyla uygulanmıştır (Kunamneni et al. 2008). Örneğin, LMS olarak remazo blue ve ABTS ile beraber kullanılan *T. Hirsuta* lakkazının, veratril alkol gibi yüksek derecede redoks potansiyeline sahip bileşikler parçaladığı bildirilmiştir (Morozova et al. 2007).

Kağıt hamurunun beyazlatılması ya da ksenobiyotiklerin uzaklaştırılması gibi birçok reaksiyonda kullanılan aracı moleküller lakkazın substratlarındandır. Bu moleküller T1 bölgesinde okside edilebilir. Bu mekanizmalarda aracı moleküller, lignin gibi molekül ağırlığı yüksek substratların okside edilmesine izin veren difüzlenebilen elektron taşıyıcısı şeklinde işlev görür. Lakkaz molekülleri vasıtası ile elde edilmiş olan elektronlar su oluşumu için oksijene aktarılır (Birhanlı 2008).

Aracılı moleküllerin çalışması lakkazın iki hedefi birden gerçekleştirmesi açısından avantajlı olur:

- I. Polimerlerin oksidasyonunu sterik engel problemini aşarak sağlamak (polimer ve enzimlerin direkt birbirlerini etkilememesi zorunludur.)
- II. Substratların aralığını genişletmek: Lakkazların redoks potansiyelinden daha yüksek redoks potansiyeline aracı molekül sahip olmamalıdır.

Substratın sahip olduğundan daha yüksek serbest difüzlenebilme potansiyeli genellikle daha önemlidir. Aracı molekülün sinerjik etkileri ile lakkazın gerçekleştirebildiği oksidasyon geliştirilebilir. Kimyasal araçlar ise çok daha fazla toksiktirler, pahalı ve stabil değildirler; bu durumda bu araçların kullanımı ekonomik yönden avantajlı olmaz. Bunun haricinde bazı durumlarda enzimi inhibe edecek yan ürün oluşumuna neden olmaktadır. Bunun üstesinden gelebilmek adına lakkazın yönlendirilen evrimi ya da tirozin gibi aracı moleküllerin arayışında bulunmak şeklinde yaklaşımlar geliştirilmektedir (Alcalde et al. 2007).



Şekil 5. Substratlar için lakkaz katalizörlüğünde redoks döngülerinin şematik gösterimi Mediatorlerin (a) yokluğunda veya (b) varlığında oksidasyon (Kunamneni et al. 2008)

Lakkaz Enziminin Biyoteknolojide ve Endüstride Kullanım Alanları

Lakkazlar; tekstil ve petrokimya endüstrilerinden gelen endüstriyel atıkların/inatçı biyokimyasalların detoksifikasyonu, kağıt hamuru ve kağıt endüstrilerinde, biyolojik ağartma, yeni hibrit moleküllerin ve biyomateryallerin sentezi, etanol üretimi, kirlenmiş toprakların biyoremediasyonu, biyosensörler, yiyecek ve içecek endüstrisi gibi çok sayıda endüstriyel uygulamaya sahiptir. Lakkazlar ayrıca kanser önleyici ilaçların üretiminde katalizör olarak ve hatta kozmetiklerde içerik olarak kullanılmaktadırlar. Son zamanlarda, lakkazların kullanımı nanobiyoteknolojiye de uygulanmıştır. Spesifik, enerji tasarrufu sağlayan ve biyolojik olarak parçalanabilen lakkaz bazlı biyokatalizörler, yüksek verimli, sürdürülebilir ve çevre dostu endüstrilerin geliştirilmesinde oldukça uygundur (Kunamneni et al. 2008; Kumar et al. 2012).

Biyolojik moleküllerin polimer yapılarında çapraz bağlanmayı sağlaması sebebiyle hamur kalitesinin artırımı için lakkaz kullanılmaktadır. Polimer yapıdaki çapraz bağlanma hamurun uzamasında azalmaya ve hamur direncinin artmasına sebep olur (Labat et al. 2001; Selinheimo et al. 2006). Kağıdın beyazlatılması ve kağıt hamurundan ligninin uzaklaştırılması işlemlerinde kullanılan ve çevre kirliliğine sebep olan klor yerine çevre dostu lakkaz tercih edilmektedir (Kuhad et al. 1997).

Odun liflerinin modifiyesinde de lakkaz enzimleri kullanılır. Sunta ve benzeri malzemelerde odun liflerinin birbirlerine enzimatik olarak yapıştırılması işleminde lakkaz kullanımı oldukça uygundur (Chandra and Ragauskas 2002; Kenealy et al. 2003)

Günümüzde en önemli sorunların başında çevre kirliliği bulunmaktadır. Kozmetikler, ilaçlar, birçok kimyasal ürün ve çeşitli endüstriyel boya atıklarının çevreyi ve çeşitli organizmaları olumsuz biçimde etkileyebilecek şekilde bulunması ciddi sorunları ortaya çıkarmaktadır. Bu moleküller sinir, üreme ve hormon sistemlerini ciddi şekilde etkileyebilir hatta kansere dahi sebep olabilir (Bilal et al. 2019). Bu sebeple ortadan kaldırılmaları gerekmektedir. Lakkaz enzimleri katalizledikleri reaksiyonlar nedeniyle biyolojik arıtmalarda büyük potansiyele sahiptir. Kirleticilerin parçalanması için indirgenme reaksiyonlarını katalizler ve farmasotik kirleticilerin biyolojik olarak bozunmasını sağlarlar (Petrie et al. 2013).

Lakkazlar, tekstil boyarmaddelerin dekolorizasyonunda güçlü bir potansiyele sahiptirler. Tekstil ürünlerinin renklendirilmesinde oluşan atıkların yaklaşık %10-15'i çevreye bırakılmakta ve bu maddeler çevrede bozulmadan kalarak toksik, mutajenik ve kanserojenik etkiye sebep olabilmektedirler. Sentetik boyalar tekstil endüstrisinin yanı sıra kağıt, kozmetik ve ilaç endüstrilerinde giderek artan bir kullanıma sahiptir. Kimyasal olarak antrakinin, azo, heterosiklik, tri-enilmetan boyaları olarak sınıflandırılan bu bileşikler ciddi çevre kirliliğine neden olmaktadır. Renk giderimi için kullanılan oksidasyon, kimyasal, adsorbsiyon, koagülasyon-flokülasyon ve elektrokimyasal yöntemler gibi klasik yöntemlere alternatif olarak, günümüzde potansiyel avantajları nedeni ile enzimatik yöntemler tercih edilmektedir. Enzimatik katalizle biyoremediasyonunda kullanılan enzimlerden birisi olan lakkazlar, oksidatif reaksiyonlar sayesinde, aromatik aminler gibi fenolik kontaminantları zararsız/daha az zararlı ürünlere detoksifiye edebilirler (Kumar et al. 2012; Erol 2018).

Lignoselülozik malzemeler biyoetanölün üretiminde kullanılırlar. Lakkazlar bu karmaşık molekülleri parçalamada ve biyoetanölün üretilmesi sürecinde işlev görmektedirler (Karasu et al. 2015). Fenolik bileşikler uzaklaştırmaları sebebiyle biyoyakıtların üretimlerinde de önemlidirler.

Fosil yakıtlar ve petrol ürünlerindeki PAH'lar lakkaz enzimleri sayesinde parçalanabilmektedirler. (Nyanhongo et al. 2006). Ayrıca TNT benzeri patlayıcıların metabolitlerini indirgeyerek toprak matrislerine bağlar ve savaş kalıntılarını detoksifikasyona uğratabilirler (Durán and Esposito et al. 2000).

Lakkaz sentetik kimya üretim alanında da kullanılabilir. Lakkaz kullanarak fenolik yapıda renklendirici üretildiği rapor edilmiştir (Mustafa et al. 2005).

Kozmetik alanlarda da yer bulan lakkazlar, saç rengini açmak için kullanılan hidrojen peroksit yerine kullanılabilir. Lakkaz ihtiva eden boyalar geleneksel boyalara oranla daha kolay uygulanırlar (Xu 1999; Lang et al. 1999). Lakkazlar cilt rengini açmak için dahi kullanılmaktadırlar (Golz-Berner et al. 2004).

Termofilik Bakteriler

Termofilik mikroorganizmalar 1879 yılında ilk kez Miquel tarafından çöp, toprak akarsu çamurları, kirler ve drenajlarda, 72 °C 'de çoğalabilen mikroorganizmalar olarak tespit edilmiştir (Güven et al. 2011). Daha sonra Stetter tarafından 1982 yılında sıcak su kaynaklarından termofillerin izole edilebileceği ortaya konulmuştur (Aytaç et al.2012).

Yaşadığımız biyosferde birçok mikroorganizma bulunmaktadır ve bu organizmaların birçoğu hala keşfedilememiştir. Mikroorganizmaların değişken çevrede canlılık faaliyetlerini uygun şekilde sürdürebilmeleri için uyum sağlamaları gereken en önemli etkenlerden biri sıcaklıktır (Akhmaloka et al. 2006).

Termofilik mikroorganizmalar 45°C'den daha yüksek sıcaklıklarda gelişebilen organizmalardır. Termofiller denizel ve karasal volkanik alanlarda, hidrotermal menferlerde, deniz sedimentlerinde, kaplıca gibi çeşitli su kaynaklarında yaşayabilirler (Maugeri et al. 2011). Termofillerin yüksek sıcaklık değerine adaptasyonlarını sağlayan en önemli etken yapılarındaki termostabil niteliğe sahip enzimleridir. (Lopez-Garcia 1999). Termofillerin bu sıcaklıklara uyum sağlayarak hayatta kalmalarının sebebi hücre membranlarında bulunan doymuş yağ asitlerindendir. Bu yağ asitleri oluşturdukları hidrofobik ortamın hücreyi sert ve sıkı tutması mikroorganizmanın yüksek sıcaklıklarda hayatta kalmasını sağlar. Aynı zamanda, termofiller hidrofobik etkileşimler ve disülfid köprüsü sayesinde yüksek sıcaklıklara uyum sağlayabilirler. DNA'larındaki pozitif sarmalları oluşturan, DNA'nın geri dönüşümünü gerçekleştirerek erime noktasını mikroorganizmanın optimum gelişim sıcaklığına çıkarabilen DNA Giraz'a sahiptirler (Yıldırım et al. 2014).

Termofilik mikroorganizmaların hücre bileşenleri ve hücre elemanları (membran) ekstrem derecelerdeki alkali şartlar ve asidik koşullar gibi denatüre edici ortam ve deproteolizlere dayanıklıdır. Bu mikroorganizmalar; GTP, ATP, FAD ve NAD⁺ gibi yüksek sıcaklıklara maruz kaldıklarında denatüre olacak molekülleri kullanacakları zaman üretirler (Güven et al.2011).

Bacillus licheniformis

Bacillus licheniformis, termofilik ve gram pozitif bir bakteridir. İdeal gelişim sıcaklığı yaklaşık 50°C olmasına rağmen daha yüksek sıcaklıklarda da canlı kalabilmektedir. *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* bakteri grubunda yer alır. *Bacillus* cinsine bağlı bakteriler çoğunlukla aerobik ya da fakültatif anaerobik, endospor pozitif, gram, bacil ya da kokobasil hücre morfolojisinde, ekstrem koşullara ve kimyasallara büyük ölçüde uyum sağlayan mikroorganizmalardır. *Bacillus* cinsi bakterilerin koloni renkleri çeşitlilik göstermekte olup çok

farklı renklerde kolonize olabilmektedirler. Renkleri krem, beyaz, sarı, siyah, turuncu hatta pembe dahi olabilmektedir (Rey et al. 2004).

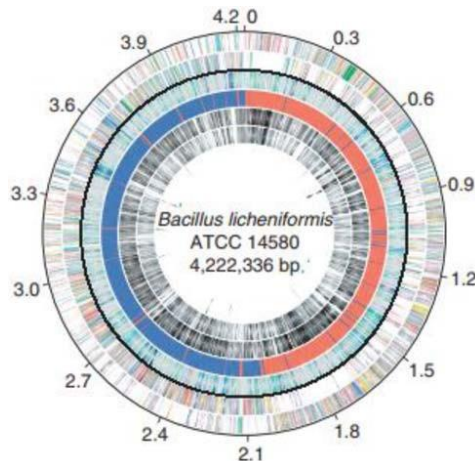
Bacillus cinsindeki bakterilerin ekstrasellüler enzim üretmeleri sebebiyle endüstriyel alandaki kullanımları yaygındır. Bu cins bakteriler toprak, buzul, bitki artıkları, sıcak ve soğuk sular, toprak ve bitkiler hatta çöllerden bile izole edilebilirler (Maugeri et al. 2001). *Bacillus* cinsi bakterilerden elde edilen enzimler, enzim sektörünün neredeyse yarısını karşılamakta ve eczacılık, tıp ve tarım sektörlerinde yaygın bir biçimde kullanılmaktadırlar (Yavuz et al.2003).

***Bacillus licheniformis* Filolojisi**

Tablo 1. *Bacillus licheniformis* Filolojisi (Şabihat 2019)

Domain	Bakteri
Şube	Firmicutes
Sınıf	Bacilli
Takım	Bacillales
Familya	Bacillaceae
Cins	<i>Bacillus</i>
Tür	<i>Bacillus licheniformis</i>

B. licheniformis bakterilerinin 4208 adet proteinin kod genine sahiptir. 422336 nükleotid uzunluğundaki halkasal yapıda kromozom ihtiva eder. 7 adet tRNA operonu ve 72 adet tRNA geni bulunmaktadır. *Bacillus subtilis* ve *Bacillus halodurans* bakterilerinin kromozomlarıyla büyük ölçüde benzerlik sergilerler. Yapıları %80 oranında *B. Subtilis* bakterisiyle aynı ortologları ihtiva eder ancak hücre dışı enzimlerin, birtakım sekonder metabolitlerin taşıma ve miktarları hatta yerleri açısından farklıdırlar. Kromozom yapısı halkasal şekildedir (Şekil 6.) (Rey et al. 2004).



Şekil 6. *B. licheniformis* kromozomunun halkasal yapısı (ATCC 14580) (Rey et al. 2004).

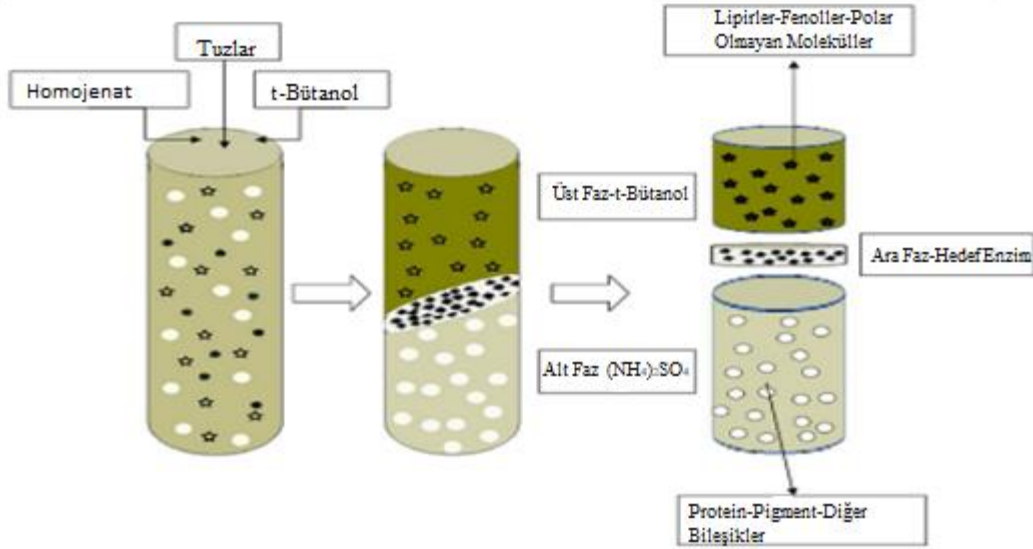
Üçlü Faz Ayırma Yöntemi (TPP-Three Phase Purification)

Endüstriyel alanda yaygın bir uygulama alanına sahip olan enzimlerin izolasyon ve saflaştırma maliyetleri kullanımlarını kısıtlamaktadır. Alt akım işlemleri (downstream proses), endüstriyel enzimlerin toplam üretim maliyetlerinin %80'ini oluşturmaktadır. Etkili bir saflaştırma prosesi de, üretimin en önemli adımlarından birisidir. (Kumar et al. 2011)

Son yıllarda bu alandaki genel eğilim; enzimlerin saflaştırılması için verimli, ekonomik ve ölçeklenebilir bir yaklaşım geliştirmek üzerine olmuştur (Ketnawa et al. 2014). Enzimlerin izolasyonu ve saflaştırılması için çeşitli geleneksel saflaştırma yöntemleri uygulanmaktadır. Bunlar, amonyum sülfat çöktürmesinin ardından boyut-dışlama/jel filtrasyon ve iyon değişim kromatografisini, hidrofobik etkileşim kromatografisini, afinite kromatografisini veya bu yöntemlerin bazı kombinasyonlarını içermektedir (Ketnawa et al. 2017). Bu geleneksel yöntemler, genellikle maliyetli prosedürler olan birkaç ardışık adımı içerir ve bunlar aracılığıyla, hedef ürünün önemli ölçüde kaybı gerçekleşebilir (Dobrev et al. 2019). Ayrıca, birçok uygulama içinde (özellikle endüstriyel enzimoloji), yüksek saflıktaki proteinlerin/enzimlerin kullanılması gerekli değildir. Bu gibi durumlarda, kromatografik olmayan protein saflaştırma yöntemleri çekici bir alternatif oluşturur (Przybycien et al. 2004; Mondal et al. 2006). TPP, endüstriyel üretim için ölçeklendirme zorluklarının yanı sıra zorlu ve pahalı adımlar içeren geleneksel kromatografi temelli saflaştırma tekniklerine alternatif, uygun maliyetli bir biyo-ayırma yöntemidir. Bu tekniğin temel prensibi, salting-out, ko-solvent çöktürme, izoionik çöktürme, kozmotropik çöktürme ve ozmolitik gibi işlemleri toplu bir şekilde içermesidir (Gagaoua 2016; Chew 2018). TPP protein saflaştırma işlemi aynı anda üst akım (upstream proses) ve alt akım (downstream proses) işlemlerinde uygulanabilen, tek basamaklı kısmi bir saflaştırma yöntemi olarak da kullanılabilen, enzimlerin derişikleştirilmesi ve saflaştırılmasında önemli bir alternatif yöntem olarak bildirilmiştir (Kumar et al. 2012, Liu et al. 2015).

TPP yönteminde, süspansiyona ya da ham ekstrakta yeterli miktarlarda tuz (sülfat tuzları, genellikle amonyum sülfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), bir organik çözücü (C4 alkoller, genellikle tert-bütanol) ardışık olarak eklenir. Belli bir süre inkübasyonun ardından üçlü faz oluşumu gözlenir. Santrifüj edildikten sonra fazlar belirginleşir ve üst kısımda t-bütanol fazı (organik faz/üst faz), proteince zengin olan ara faz/interfaz ve alt kısımda sulu faz/alt faz olarak adlandırılan üç faz belirgin şekilde ortaya çıkar. TPP enzimleri/proteinleri seçici olarak bir fazda yoğunlaştırır ve diğer kirleticileri başka bir fazda uzaklaştırır. Lipitler, pigmentler, enzim inhibitörleri ve polar olmayan bileşikler ihtiva eden kısım üst organik fazda zenginleşir. Sakkaritler gibi bir takım polar bileşikler ise alt kısımda sulu faz olarak yoğunlaşır (Pike and Dennison et al. 1989). Sonuç

olarak ara fazda hedef biyomolekül seçici olarak çökerken, istenmeyen moleküller sulu ve organik fazlarda kalır (Dennison and Lovrien 1997) (Şekil 7). Çöken proteinlerin interfazdaki seçiciliği, amonyum sülfat konsantrasyonu, ham/tert-bütanol oranı, pH ve sıcaklık gibi deney koşulları optimize edilerek geliştirilebilir.



Şekil 7. TPP yönteminin şematik gösterimi (Ketnawa *et al.* 2017).

TPP yöntemi birçok avantaj sağlar. TPP yönteminin, sağladığı avantajlardan en önemlisi genelde oda sıcaklığında, kısa sürede gerçekleşen basit bir işlem olmasıdır. Ayrıca proste kullanılan kimyasallar ucuzdurlar ve yeniden kullanılabilirler. TPP yöntemi kolayca ölçeklenebilmekte ve büyük hacme sahip ekstraktlarda da kolayca çalışabilmektedir. Saflaştırılmış proteini seyrelten kromatografik yöntemlere karşın, TPP proteinleri saflaştırırken aynı zamanda konsantre hale de getirir. Direkt ham ekstrakta uygulanabilir ve koşulları ılımlıdır, proteinler denatüre olmaz (Dennison and Lovrien 1997; Rachana and Jose 2014).

KURAMSAL TEMELLER

1883 yılında Yoshida tarafından keşfedilen lakkaz, şimdiye kadar tanımlanan ilk enzimlerden biridir. Lakkaz enzimi oldukça geniş çeşitlilikteki substratları oksitleyebilme özelliklerinin olması son zamanlarda bu enzimlerin farklı endüstriyel alanlarda kullanılmalarına yol açmıştır. Fenolik bileşiklerle reaksiyona girdiği bilinen lakkaz enzimlerinin enzimatik degradasyonu ve biyoremediyasyon çalışmalarının vazgeçilmezi olduğu bilinmektedir. Lakkazların yoğun miktarda mantarlar vasıtası ile üretilmelerine karşın bakterilerin modifikasyonlara açık olması ve istenen özelliklere sahip lakkazların elde edilebilmesinden dolayı son dönemdeki gelişmeler ile bakteri temelli lakkazlara olan rağbet artmıştır. Bakteriyel lakkazlar yüksek pH ve sıcaklıklarda stabildirler. Literatürde lakkazların çeşitli biyoteknolojik ve endüstriyel uygulamaları çokça mevcuttur. Yıllar geçtikçe lakkaz enziminin etkinliğinin farkedildiği ve çalışmalarda geniş yer bulmaya başladığı görülmektedir. Lakkaz enzimini üreten en etkili kaynağı, en uygun yöntemi, yeniden üretilebilir ve pahalı olmayan izolasyon yöntemlerini bulmak ve enzim üretim koşullarını optimize etmek için çalışmalar devam etmektedir.

Gedikli et al.(2011) yaptıkları bir çalışmada, *Trametes versicolor* ATCC 200801'in buğday kepeği ihtiva eden potato dekstroz broth besiyerinde geliştirilmesiyle elde edilen aktivitesi oldukça yüksek lakkaz enzimini kullanarak piyasada satılan bir kot boyasında renk giderimi çalışmış ve optimum koşulları sağlamışlardır. Yapılan deneyler sonucunda ideal pH'nın 4,0 başlangıç boya konsantrasyonunun 75 mg/L, sıcaklığın 55 °C, inkübasyon süresinin ise 120 dakika olduğunu belirlemişlerdir. Belirlenen optimum koşullarda % 68,02 oranında renk giderimi elde etmişlerdir. Bununla birlikte, tekstil atık sularında bulunabilecek çok çeşitli metal iyonları ve boyamada kullanılan kimyasal reaksiyonun gerçekleştiği ortama ilave edilmiş ve renk giderimine etkilerini araştırmışlardır. Elde ettikleri verileri değerlendirdiklerinde ise belirlenen optimum koşullarda denenmiş olan kirleticilerin renk giderimini olumsuz yönde etkilemediğini görmüşlerdir. Maksimum inhibe edici etkinin görüldüğü 10 mM Tween-80 varlığında dahi % 54,68 düzeyinde bir renk giderimi elde etmişlerdir.

Lu et al. (2012) yaptıkları çalışmada, topraktan izole ettikleri *Bacillus licheniformis* LS04 suşunu kullanarak lakkaz enzimini izole etmişlerdir. Katalize edici substratların geniş bir pH aralığına sahip olduğunu göstermişlerdir. Yüksek sıcaklık ve alkali pH'larında enzimin stabil kaldığını görmüşler ve pH 9,0'da 10 günlük inkübasyon sonrası lakkaz aktivitesinde

herhangi bir azalma tesbit etmemişlerdir. Bununla birlikte 80 °C'de 10 saatin ardından aktivitenin %16 seviyesinde hala varolduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca spor lakkazı 1M NaCl ve %30 oranında organik maddelere toleranslı olduğunu göstermişlerdir. Reaktif mavi 19, reaktif siyah 5 ve indigo karmin boyalarını medyatör yokluğunda spor lakkazı vasıtası ile renksizleştirmeyi başarmışlardır. pH 6,6 ve 9,0'da 1 saat içinde %80 den fazla renk giderimi ile asetosirin yokluğunda renk giderimi verimli şekilde desteklenmiştir. Bu olağanüstü özellikler, yeni spor lakkazının endüstriyel uygulamalardaki kullanımı için yüksek potansiyelde olduğunu göstermişlerdir.

Qiao et al. (2017) yaptıkları çalışmada, siyah likörde lakkaz aktivitesi sergileyen yeni bir bakteri suşunu izole etmişler ve *Bacillus subtilis* cjp3 olarak tanımlamışlardır. Lakkazın geniş bir pH aralığı ile birlikte yüksek sıcaklık koşulları altında stabiliteyi koruduğunu göstermişlerdir. Bu bağlamda izole ettikleri lakkaz enziminin 10 saatlik inkübasyondan sonra pH 9,0'da aktivitesinde neredeyse hiç kayıp gözlememişlerdir. Reaktif mavi 19, reaktif siyah 5 ve indigo karmin boyalarının bir ABTS aracısının mevcudiyetinde saflaştırılmış lakkaz tarafından verimli bir şekilde renk gideriminde kullanılabileceğini göstermişlerdir. Test edilen boyaların pH 9,0'da 4 saat içinde %86'dan fazla oranda renk giderimini sağladığını gözlemlemişlerdir. Lakkazın 20-80 °C gibi geniş bir sıcaklık aralığında oldukça iyi bir aktiviteye sahip olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu özelliklerin, sentetik boyalar içeren atık suların arıtılmasında CotA-lakkazın potansiyel kullanımını uygun kıldığını göstermişlerdir.

Mehandia et al. (2019) yaptıkları çalışmada yeni bir bakteri suşu olan *Alcaligenes faecalis* XF1 suşunu Hindistan ormanlarından izole etmişlerdir. İzole ettikleri bu suş ile lakkazı standart yöntemlerle üretmişler ve lakkaz üretimi için 0,2 mM CuSO₄ içeren sıvı besiyeri kullanmışlardır. Daha sonra 4 günlük inkübasyon süresinin sonunda maksimum üretimi (110 U/mL) elde etmişlerdir. Lakkazı üç fazlı ayırma tekniğini (TPP) kullanarak 1637,8 U/mg spesifik aktiviteyle saflaştırmayı başarmışlardır. Saflaştırılmış lakkazın optimum aktivitesini pH 8,0 ve 80°C sıcaklıkta olduğunu belirlemişlerdir. Saflaştırılan lakkazın molekül ağırlığı SDS-PAGE ile 71 kDa olarak hesaplamışlardır. 2,6-DMP oksidasyonu için kinetik parametreleri K_m, V_{max} ve K_{cat} değerlerini sırasıyla 480 mM, 110 U/mL ve 1375 s⁻¹ olarak belirlemişlerdir. Cu²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, SDS ve NaCl tarafından önemli ölçüde enzim aktivitesinin arttığını; sistein, EDTA ve sodyum azid gibi geleneksel inhibitörlerin varlığında ise düşük seviyede inhibe olduğunu belirlemişlerdir. Lakkazın yüksek sıcaklık, pH, ağır metaller, halojenürler ve deterjanlar altında gösterdiği önemli kararlılığı nedeniyle, bu özellikleri gerektiren çeşitli biyoteknolojik ve endüstriyel uygulamalar için uygun olduğu görüşünü belirlemişlerdir. Tüm bu özelliklerin yanında renk giderim yeteneğini araştırmışlar, renk

giderme sıralamasını ve oranlarını Indigo karmin > Malakit yeşili > Kristal menekşe > Kongo kırmızısı için sırasıyla %70, %48, %36 ve %31 olarak tespit etmişlerdir.

Li et al. (2019) yaptıkları çalışmada *E. coli* 'den elde ettikleri lakkaz ile oksidasyon için optimal substrat, sıcaklık ve pH'nın sırasıyla (ABTS), 80 °C ve 5,5 olduğunu göstermişlerdir. Lakkazın geniş bir aralıkta yüksek termostabilite ve pH stabilitesi (pH 3,0, 7,0 ve 9,0) sergilediğini göstermişlerdir. Ek olarak, metal iyonlarının çoğunun, lakkaz aktivitesini önemli ölçüde engellemediğini göstermişlerdir. Lakkazın, yüksek konsantrasyondaki NaCl'ye karşı büyük tolerans gösterdiğini ve kontrole kıyasla başlangıç aktivitesinin %50,8'ini 500 mM NaCl içeren reaksiyon sisteminde koruduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, lakkazın yüksek sıcaklıkta (60 °C) ve geniş bir pH aralığında (pH 5,5, 7,0 ve 9,0) azo, antrakinonik ve trifenilmetan boyalar dahil olmak üzere farklı tipteki boyaların renklerinin giderilmesinde yüksek verimlilik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Lakkazın bu benzersiz özellikleri ile boya atıklarının arıtılması ve diğer endüstriyel proseslerdeki uygulamalar için potansiyel bir aday olabileceğini göstermişlerdir.

Hajipour et al. (2020) yaptıkları çalışmada *Bacillus subtilis* 'den izole edilen lakkazın boya giderim kapasitesini araştırıp lakkazı karakterize etmeyi amaçlamışlardır. Lakkazın boya giderim kapasitesi 16 farklı boyanın kullanımı ile gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda saflaştırılan lakkazın CuSO₄ varlığında endüstriyel boyaların giderimi için kullanılabilecek güçlü bir enzim olduğunu göstermişlerdir. Lakkaz aktivitesinin FeSO₄ ilavesi ile arttığını, lakkazın MgCl₂, EDTA, CuCl₂, MnCl₂, CaCl₂, ZnCl₂ ve NiCl₂ varlığında ortalama bir değerde inhibe olduğunu görmüşlerdir. Ayrıca SDS, üre, HgCl₂, 2-merkaptotanol ve Tween-80 kimyasallarının lakkaz aktivitesinin %50 oranından daha fazla düşüşüne sebep olduğunu kaydetmişlerdir. Bu çalışma sonucunda izole edip karakterize ettikleri lakkaz enziminin biyoteknolojik ve endüstriyel kullanım için umut vaat edici bir enzim olduğunu ve farklı alanlarda kullanıma uygun olduğunu rapor etmişlerdir.

Sharma et al. (2020) yaptıkları çalışmada ksilanaz ve lakkaz gibi enzimlerin tek başına ya da birlikte biyo-ağartıcı ajanlar olarak uygulanmak için mükemmel bir potansiyele sahip olduğunu göstermişlerdir. Bu enzimlerin aktif, yenilenebilir, kirletici olmayan, hafif, oldukça spesifik ve uygun maliyetli olduğunu göstermişlerdir. Çok bakırlı oksidoredüktazlar olan lakkazın, bir elektron oksidasyonunu gerçekleştirerek ağartmayı sağladığını göstermişlerdir. Ksilanaz ve Lakkaz'ın tek başına orijinal biyo-ağartma sonucu, daha ekonomik olması ve daha fazla stabilite sunması dışında, "Ksilanaz ve Lakkaz" kokteyli ile biyo-ağartma için zemin kazandığını ortaya koymuşlardır. Bu çalışmada Diksha ve arkadaşları genel olarak daha temiz ve daha yeşil bir çevre için zararlı ağartma kimyasallarının kullanımını azaltmak veya

değiştirmek için biyolojik sistemlere (biyo-ağartıcı enzimler) ışık tuttuklarını bildirmişlerdir.

Peng et al. (2021) yaptıkları çalışmada termostabil ve organik solvent toleransa sahip *Bacillus pumilus*’dan lakkaz elde etmişlerdir. Çeşitli endüstriyel sentetik boya ları potansiyel şekilde renk giderme kapasitesine sahip heterolog lakkaz ları karakterize etmişlerdir. 85 °C sıcaklık ve 3,5 pH’ya sahip koşullarda optimum olan lakkaz ın, 55-75 °C ve 5,0-8,0 pH koşullarında stabil kaldığını göstermişlerdir. Kinetik çalışmalarında substrat olarak ABTS kullanmışlar ve K_m , V_{max} değ erlerinin sırası ile 0,33 mM ve 32,4 U/mg olduğunu belirlemişlerdir. Metanol (%2, v/v) ve Etanol (%1, v/v)’ün enzim aktivitesini uyardığını tespit etmişlerdir. Rekombinant lakkaz ın, %10 (v/v) metanol içindeki başlangıç aktivitesinin %95’ inden daha fazlasını muhafaza ettiğini görmüşlerdir. Bununla birlikte, lakkaz enzimini kullanarak yüksek verimde sentetik boya ların giderimini sağlamışlardır.

Birge et al. (2022) yaptıkları çalışmada; Ağrı, Diyadin (Türkiye) sıcak su kaynağından izole ettikleri termofilik bakteri suşlarının lakkaz üretim potansiyellerini araştırmışlardır. İzole ettikleri suşlar arasından en yüksek oranda lakkaz üreten bakteri suşunu belirlemişler ve bu suşu konvesiyonel ve moleküler (16S rRNA sekanslama) tanı lama yöntemiyle *Enterococcus faecium* A2 (Genbank No: MH424896) olarak tanı lamışlardır. *E. faecium* A2 kaynaklı lakkaz enzimini TPP yöntemiyle %110 verimle 4,9 kat saflaştırmayı başarmışlardır. Saflaştırdıkları lakkaz enziminin moleköl ağırlığını yaklaşık olarak 50,11 kDa olarak hesaplamış ve enzimin optimum pH ve optimum sıcaklığını sırasıyla 6,0 ve 80 °C olarak belirlemişlerdir. İzole edilen lakkaz ın geniş pH (3,0 – 9,0) aralığında stabil kaldığını ve farklı sıcaklıklarda (20 - 80 °C) 1 saatlik inkübasyon sonucunda aktivitesinin %90 oranında koruduğunu kaydetmişlerdir. Bununla birlikte izole edilen lakkaz enziminin yarılanma süresinin 80 °C de 24 saat olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca bu enzimin, yüzey aktif maddelerin mevcudiyetinde oldukça kararlı kalmış olduğunu ve organik çözücüler ve Cr^{2+} , Cu^{2+} ve Ag^+ metal iyonlarının mevcudiyetinde aktivitesini arttırdığını kaydetmişlerdir. Son olarak izole edilen lakkaz enziminin ABTS substratı varlığında K_m , V_{max} , K_{cat} ve K_m/K_{cat} değ erlerini sırasıyla; 0,68 mM, 5,29 $\mu mol mL^{-1} dk^{-1}$, 110,2 s^{-1} ve 162,1 $s^{-1} mM^{-1}$ olarak hesaplamışlardır.

Çalışmanın Amacı

Saflaştırma ve ekstraksiyon maliyetleri, enzimlerin toplam üretim maliyetinin oldukça büyük bir yüzdesini oluşturmaktadır. Özellikle enzimler çevresel ve endüstriyel uygulamalarda kullanılacaksa yüksek verimle ve ucuz maliyetle elde edilebilir olmalıdırlar. Son yıllarda enzimlerin saflaştırılması için verimli, ekonomik ve ölçeklendirilebilir bir yaklaşımla ayırma stratejilerinin geliştirilmesine yönelik önemli çabalar gösterilmektedir. Bu amaç doğrultusunda, kullanılan klasik enzim saflaştırma yöntemlerinin yanında üçlü faz ayırma tekniğı (TPP) gibi

ham ekstraktta direkt uygulanabilen, hızlı, verimli ve ucuz alternatif yöntemler enzimleri saflaştırmak için geliştirilmiştir. Benzer şekilde çok sayıda biyoteknolojik uygulamada giderek artan lakkaz kullanımına paralel olarak artan talebe karşın, büyük ölçekli ekstraksiyon ve saflaştırma işlemleri bu enzimin endüstriyel üretiminde büyük bir sorun haline gelmiştir.

Son zamanlara kadar lakkaz enzimlerinin izole edildiği ve tanımlandığı organizmaların büyük bir çoğunluğunu funguslar ve bitkiler oluşturmuştur. Bakteri genomu üzerinde yapılan analizler, bakterilerde lakkaz benzeri genlerin yaygın olduğunu göstermekle birlikte, bakteriyel lakkazlar ile ilgili hala sınırlı sayıda çalışma bulunmakta ve biyoteknolojik/endüstriyel uygulamaları hakkında fazla bir şey bilinmemektedir. Aynı zamanda, aktivite ve stabilitesini uzun bir süre boyunca korumak, ekstrem şartların (pH, sıcaklık, kimyasal içerik vb.) hakim olduğu endüstriyel uygulamalarda lakkaz seçiminde dikkate alınan önemli başka bir noktadır. Bu şekilde, yüksek sıcaklık ve geniş pH aralığında dayanıklı ekstremofilik mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin, çok daha etkin kullanım potansiyeline sahip olabileceği açıktır. Bu nedenle, yeni bakteriyel lakkazların tanımlanması, izolasyonu, karakterizasyonu ve önemli uygulamalarının araştırılması, endüstriyel proseslerde kullanımlarını geliştirmek için oldukça yardımcı olacaktır.

Bu tez kapsamında, sıcak su örneklerinden (Nevşehir-Kozaklı kaplıcaları) daha önce izolasyon ve identifikasyonu gerçekleştirilmiş olan termotolerant özellikteki *Bacillus licheniformis* SO8 bakterisinden lakkaz enziminin TPP yöntemi ile kısmi olarak saflaştırılması, biyokimyasal karakterizasyonu ve enzimin bazı boyarmaddelerin dekolorizasyonundaki etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Kullanılan Organizma

Tez çalışmasında Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU danışmanlığında Sultan ÖLMEZ (Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü) tarafından izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirilen *Bacillus licheniformis* SO8 bakterisi kullanılmıştır. (Ölmez 2017).

Kullanılan Kimyasallar

N,N,N'',N''Tetrametilendiamin,	
(TEMED) paranitrofenol palmitat (p-NPP)	: Sigma-Aldrich
Standart serum albümin	: Sigma-Aldrich
ABTS	: Sigma-Aldrich
Sodyum hidroksit	: Merck
Glisin	: Merck
Etanol	: Sigma-Aldrich
Gliserin	: Sigma-Aldrich
Sodyum dodesil sülfat	: Sigma-Aldrich
Amonyum persülfat	: Sigma-Aldrich
Coomassie brilliant blue G-250	: Sigma-Aldrich
β -merkaptoetanol	: Sigma-Aldrich
İzopropanol	: Sigma
Hidroklorik Asit	: Merck

Kullanılan Aletler ve Cihazlar

Otoklav	: Hirayama HV-50L
Isı kontrollü çalkalamalı inkübatör	: Edmund Bühler GmbH KS-15 Agaroz jel
elektroforezi	: Thermo EC 135-90 (yatay)
Jel Görüntüleme	: Vilber Lourmat-ECX-20-M
Steril Kabin	: Telstar Bio-II-A
Soğutmalı santrifüj	: Hermle Z 323 K(Germany)
Spektrofotometre	: Beckman Coulter DU 730
pH metre	: Schott pH-Meter CG840
Elektroforez Tankı	: Bio Rad (dikey)
Karıştırıcı (Shaker)	: GFL 3025, Zhicheng ZHWY-200-D
Karıştırıcı (Vorteks)	: Fisonswhirli-mixer, WiseMix VM-10
Karıştırıcı (Dikey)	: Hybaid Midi Dual 14
Hassas teraziler	: Gecavery (UK), Denver Instrument
Otomatik pipetler	: Eppendorf
Çalkalayıcı	: Midi Dual 14
Magnetik karıştırıcı	: Chiltern Hotplate Magnetic Stirrer HSBI
Saf su cihazı	: Barnstead Easy Pure UV/U
Buzdolapları	: Arçelik, Bosch, Vestel Derin dondurucu
Derin dondurucu	: Sanyo Ultra Low (-86°C)

Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Tez kapsamında yapılan deneylerde kullanılan besiyerlerinin hazırlanışı

Tryptic Soy Broth (TSB) Sıvı Besiyeri: 1 litre distile su içinde 30 g TSB olacak şekilde hazırlanan besiyerine uygun derişimlerde CuSO_4 ve 1 mM ABTS eklendi ve otoklav cihazında 1 atm basınç ve 121 °C sıcaklıkta 15 dk sterilize edildi.

Tryptic Soy Agar (TSA) Katı Besiyeri: 5g/L soya pepton, 15 g/L tripton, 5 g/L sodyum klorid, 12 g/L agar içerikli hazır besiyerinden (LabM) tartılıp 1000 mL didistile suda çözüldü ve 1 atm basınç 121°C 15 dakika sterilize edildi.

Oxoid CM 0001 Nutrient Broth Sıvı Besiyeri: 1 litre distile su içinde 37 g NB eklenerek hazırlanan çözeltiye uygun derişimlere sahip 1 mM ABTS ve CuSO_4 eklendi ardından otoklav cihazında 1 atm basınç ve 121 °C’ de sterilize edildi.

Lakkaz Üretimi İçin Hazırlanan Özel Besiyeri: 1 litre distile su içinde, 2 g Amonyum

sülfat ((NH₄)₂SO₄), 1,5 g Monopotasyum fosfat (KH₂PO₄), 1 g Magnezyum sülfat (MgSO₄), 0,3 g Kalsiyum klorür (CaCl₂), 0,03 g Demir sülfat (FeSO₄), 5 g Tannik asit eklenerek hazırlanan çözeltiye uygun derişimlere sahip 1 mM ABTS ve CuSO₄ eklendi. Ardından otoklav cihazında 1 atm basınç ve 121 °C’ de sterilize edildi.

Enzim aktivite tayini için kullanılan çözelti ve tamponlar

Sodyum Fosfat Tamponu (100 mM pH 6,0): 6,9 g sodyum asetat tartılarak, 400 mL distile su içinde çözüldü. pH değeri 6,0’ e ayarlandı ve son hacim distile su ile 500 mL’ye tamamlandı.

ABTS (Substrat) Çözeltisi (0,5 mM): 0,014 g ABTS tartılarak, toplam hacim 50 mL olacak şekilde distile suda çözüldü.

Protein analizi için kullanılan çözelti ve tamponlar

Coommassie Brilliant Blue çözeltisi: 100 mg Coommassie Brilliant Blue G-250 reaktifi 50 mL etanolde çözülerek, 100 mL fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin hacmi saf su ile 1000 mL’ye tamamlandı ve karanlık ortamda saklandı.

Standart serum albumin çözeltisi (1 mg/mL): 1 mg standart serum albümin, 1 mL distile suda çözüldü.

Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) için kullanılan çözelti ve tamponlar

SDS PAGE için Ayırma Jeli: 4,4 mL %30 akrilamid, %0,8 bisakrilamid, 5 mL 1M Tris-HCl (pH: 8,8), 0,2 mL %10’luk SDS, 0,1 mL %1,5’lik PER, 0,13 mL %5’lik TEMED ve 3,15 mL distile su ile hazırlandı.

SDS PAGE İçin Yığma Jeli: 0,44 mL %30 akrilamid, %0,8 bisakrilamid, 0,41 mL 1 M Tris-HCl (pH: 6,8), 0,03 mL %10’luk SDS, 0,1 mL %1,5’lik PER, 0,03 mL %5’lik TEMED ve 2,450 mL saf su ile hazırlandı.

Numune Tamponu: 0,65 mL 1,0 M Tris-HCl pH: 8,8, 1mL % 10 SDS, 1mL Gliserin, 0,03 mL %1’lik Brom Timol Mavisi eklenerek son hacim 10 mL’ye tamamlandı ve kullanılmadan önce üzerine 500 µl β-merkaptetoetanol eklendi.

Yürütme tamponu (10X SDS-PAGE) : 3 g Tris, 14,4 g glisin ve 10 mL %10’luk SDS karıştırıldı ve hacim 1 L’ye tamamlandı.

1 M Tris-HCl pH:8,8: 27,23 g Tris, 90 mL saf suda çözüldü ve pH:8,8 olacak şekilde ayarlandı, son hacim 150 mL’ye tamamlandı.

1 M Tris-HCl pH:6,8: 6 g Tris 90 mL saf suda çözüldü ve pH:6,8'e ayarlandı. Son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

%30 Akrilamid Bisakrilamid: 6 g akrilamid ve 0,16 g bisakrilamid, 13,84 mL saf suda çözülerek hazırlandı.

%10'luk SDS: 1 g SDS alınıp, 4,5 mL suda çözüldü ve son hacim 10 mL'ye tamamlandı.

%10'luk PER: 1 g amonyum persülfat alınıp, 4,5 mL saf suda çözüldü ve son hacim 10 mL'ye tamamlandı.

Gümüş boyamada kullanılan yöntem ve kullanılan çözeltiler

Gümüş Boyama Tespit Çözeltisi: 60 mL distile su, 10 mL asetik asit ve 30 mL %90'luk etanol ile karıştırıldı.

Gümüş Boyama Redüksiyon Çözeltisi: 45 mL etanol, 4,8 g sodyum asetat ve 80 mL distile su karıştırıldı, CH₃COOH ile pH 6,0'a ayarlandı. Üzerine 150 mg sodyumtiyosülfat ve 3 mL gluteraldehit eklendi.

Gümüş Boyama Gümüş Nitrat Çözeltisi: 150 mL saf su, 150 mg AgNO₃ ve 30 µL formaldehit karıştırılarak boyamadan hemen önce hazırlandı.

Gümüş Boyama Yıkama 1 Çözeltisi: 270 mL saf su, 3,75 g Na₂CO₃ ve 120 µL formaldehit karıştırılarak hazırlandı.

Gümüş Boyama Yıkama 2 Çözeltisi: 1 mL gliserin ve 12,5 mL asetik asitten oluşan karışımın hacmi saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.

Yöntem

Lakkaz enzimi üreten bakteri izolatlarının ABTS içerikli sıvı besiyerinde belirlenmesi

Stokta (-86°C) muhafaza edilen bakteri izolatlarından (EA1-10, SO1-15) toplam 25 adet bakteri suşu stoktan alınarak önceden TSA agar besiyerlerine, steril öze vasıtasıyla 3-4 faz ekim yöntemi ile aktarıldı ve 55°C'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda bakteriler, lakkaz sıvı besi yerlerine inoküle edildi. Besiyerleri 55°C'de 7 gün boyunca bekletildi. İnkübasyon süresince her 24 saatte bir aktivite tayini yapıldı. Aktivite tayini sonrası en yüksek aktiviteyi veren bakteri belirlendi.

Lakkaz enzimi üretimi

Lakkaz üreten bakteri izolatlarından ABTS'li lakkaz sıvı besiyerinde, en iyi aktiviteyi

gösteren bakteri *Bacillus licheniformis* SO8 suşu seçilerek bundan sonra uygulanacak işlemlerde bu izolat kullanıldı.

B. licheniformis SO8 suşu TSA katı besiyerine inoküle edildi ve 55°C’de 24 saat süre ile etüvde inkübasyona bırakıldı. Ardından bu suş TSB sıvı besiyerine alındı. Sıvı besiyerine alınan suş 55°C’lik çalkalamalı inkübatörde 24 saat üremeye bırakıldı. Sıvı besiyerinde büyümüş olan bakterilerin hücre miktarını mililitre cinsinden hesaplamak için 300 µl kültür 2700 µl su ile seyreltilip spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda ölçümü yapıldı. Ulaşılan değer seyreltme oranı olan 10 ile çarpıldı, ardından 3/zX10 formülü kullanılıp, elde edilen sonuca göre ön kültürden 100 mL’lik bölüm, yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlanan lakkaz sıvı besiyerine inoküle edildi.

Lakkaz enzimi aktivite tayini

Lakkaz enzimi aktivitesi ABTS’nin substrat olarak kullanıldığı yöntemeye uygun şekilde belirlendi. Bu amaç doğrultusunda tabloda verilen tüp içeriği 55°C’de 5 dakika inkübe edildikten sonra, 420 nm’de spektrofotometre cihazında ölçümü yapıldı.

Tablo 2. Lakkaz Enzimi Aktivite Ölçümü Küvet İçeriği

Çözelti	Kontrol Tüpü (µL)	Ölçüm Tüpü (µL)
100 mM Sodyum fosfat tamponu pH 6,0	1500	1000
Substrat 0,5 mM ABTS	1000	1000
Enzim	-	500

Bir ünite (U) enzim aktivitesi, 1 dakikada 1 µmol ABTS’nin oksidasyonu için gerekli enzim miktarı olarak tanımlandı. Lakkaz aktivitesi aşağıdaki formülle hesaplandı (Baltierra-Trejo et al. 2015).

$$U L^{-1} = \frac{(\Delta A)(V_t)(D_f)10^3}{(t)(\epsilon)(d)(V_o)}$$

U = Enzim aktivitesi (µmol dk⁻¹)

ΔA = Absorbans değişikliği (420 nm)

t = Inkübasyon süresi (dk)

V_t = Toplam hacim (mL)

ε = Molar ekstinksiyon katsayısı [ε₄₂₀ = 36 mM⁻¹.cm⁻¹(ABTS)]

d = Ölçüm küveti ışık yolu (1 cm)

V_0 = Enzim hacmi (mL)

D_f = Dilüsyon faktörü

Bradford yöntemi ile protein tayini

Tez kapsamında kantitatif protein tayini için, Bradford yöntemi (Bradford 1976) kullanıldı. Öncelikle protein miktarını belirlemek amacıyla standart grafik hazırlandı. 1 mg/mL BSA çözeltisinden 10-100 µL tüplere konuldu ve toplam hacim 100 µL'ye distile su ile tamamlanıp üzerlerine boya olarak Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisinden 4900 µL eklendi. 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilerek 595 nm dalga boyundaki absorbans ölçümü yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre standart grafik oluşturuldu. Protein tayini yapılan örnekler için de aynı şekilde 100 µL enzim çözeltisi üzerine 4900 µL boya çözeltisi eklendi ve 10 dakika sonra 595 nm dalga boyunda absorbans değerine bakıldı. Standart grafik kullanılarak protein miktarları belirlendi.

Lakkaz Enziminin Saflaştırılması

Fermantasyon sıvısında lakkaz enzimi ile birlikte bulunan bakteri hücreleri +4°C'de 6000 rpm' de 25 dk santrifüjleme işlemi yapılarak uzaklaştırıldı. Elde edilen homojenat, TPP için enzim kaynağı olarak kullanıldı.

Lakkaz Enziminin Üçlü Faz Ayırma (TPP) Yöntemi İle Saflaştırılması

Lakkaz enziminin kısmi olarak saflaştırılmasını sağlayan TPP yönteminde, organik çözücü olarak *t*-bütanol ve tuz olarak amonyum sülfat kullanıldı. İlk olarak saflaştırmada en iyi verime ulaşabilmek amacıyla en uygun amonyum sülfat yüzdesi ve *t*-bütanol oranı optimize edildi. Bunun için ise aşağıdaki formüle göre hazırlanmış 7 farklı tuz oranı (%20, %30, %40, %50, %60, %70, %80) ve 4 farklı alkol oranı uygulanarak (Ham enzim ekstraktı:*t*- bütanol; (1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) denemeler yapıldı. Her bir denemede 1 saat oda sıcaklığında inkübasyon ve ardından 5500 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı. Oluşan üç fazdan üstte bulunan organik faz pastör pipetiyle alındı; alt ve ara fazda ise aktivite ve protein tayini gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar kullanılıp saflaştırma katsayısına karşı, % verim grafikleri oluşturuldu ardından en uygun tuz yüzdesi /organik çözücü miktarı belirlendi.

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

V : Enzim çözeltisinin hacmi

S₁: 1'in kesri olarak çözeltide bulunan amonyum sülfat doygunluğu

S₂: 1'in kesri olarak istenen amonyum sülfat doygunluğu

TPP işleminde uygun organik çözücü oranı ve tuz yüzdesi belirlenip ardından bu değerlere göre farklı pH koşullarında işlemler tekrarlandı. Bunun için 2 mL %70 oranında tuz eklenmiş olan ham enzim ekstraktının pH değeri farklı dokuz değerde ayarlandı (pH:2,0-11,0). Ham enzim ekstraktına, 1,0:1,0 oranında *t*-bütanol eklendikten sonra tüpler 30 saniye vortekslendi ve oda sıcaklığında 1 saat beklemeye bırakılıp süre sonunda oluşan fazlar ayrıştırılarak aktivite ve protein tayini yapıldı. Elde edilen sonuçların saflaştırma katsayısına karşı % verim grafikleri elde edildi. TPP işlemi için en uygun pH değeri elde edilen grafikler incelenerek belirlendi.

Lakkaz enzimi spesifik olarak en ideal (%70 amonyum sülfat yüzdesi, 1,0:1,0 *t*-bütanol oranı ve pH 9,0) saflaştırıldı. Bu işleme göre ilk olarak 2 mL ham enzim ekstraktı bir tüpe alındı. Üzerine %70 oranında yukarıda verilmiş olan denklem kullanılarak hesaplanan miktarda (0,873 g) amonyum sülfat eklenip yavaşça vortekslendi. Karışımın pH'sı 9,0'a ayarlandıktan sonra üzerine, 1 mL *t*-bütanol eklendi ve 30 sn yavaşça vortekslendi. Ardından karışım, oda sıcaklığında 1 saat beklemeye bırakıldı. Süre sonunda üst kısımda bulunan organik faz, pastör pipetiyle uzaklaştırıldı. Lakkaz enziminin saflaştırıldığı ara faz ise ayrıştırılarak karakterizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere, +4°C 'de saklandı (Alçiçek 2017).

SDS-PAGE ile Lakkaz Enziminin Molekül Kütlesinin Belirlenmesi ve Saflığının Kontrolü

Lakkaz enziminin TPP vasıtası ile saflaştırılması sonucunda enzimin molekül kütlesi ve saflık kontrolü için SDS-PAGE yapıldı (Laemmli 1970). Elektroforez plakaları alkol ve su ile yıkandı. Yıkanan plakaları aralarında jele uygun boşluk kalacak biçimde sabitlendi. İlk olarak ayırma jeli hazırlandı ve cam plakalara dikkatli bir şekilde pipetlendi. Daha sonra jelin düz ve pürüzsüz bir şekilde polimerleşmesi amacıyla üzerine 1 mL izo-propanol eklendi. Ayırma jelinin polimerleşme süresi içerisinde yığma jeli hazırlandı. Ayırma jelinin polimerleşme durumu incelendikten sonra izo-propanol peçete yardımıyla jel üzerinden alındı ve üzerine hazırlanmış olan yığma jeli eklenerek jelin üzerine tarak dikkatli bir şekilde yerleştirilip polimerize olması için +4°C de bekletildi.

TPP yöntemi ile ayrıştırılan örnekler (alt faz, ara faz ve homojenat) örneklerden 30'ar µl alınarak üzerine 10'ar µl numune tamponu eklendi. Hazırlanan örnekler kısa süreli vortekslendikten sonra 90°C'de 5 dk bekletilerek proteinlerin denatürasyonu sağlandı. Daha sonra örneklerden 20'şer µl ve standart olarak seçilen protein markerdan 1,5 µl kuyulara yüklendi. Tank 1X SDS-PAGE yürütme tamponu ile doldurularak jel kasetleri yerleştirildi.

Bantlar ayırma jeline geçene kadar 250 voltta 5-10 dk daha sonra 120 voltta 90 dk yürütüldü. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel gümüş boyama yöntemiyle boyandı. Bunun için çıkarılan jel önce tespit çözeltisiyle ardından sırasıyla redüksiyon çözeltisi, boyama çözeltisi ve yıkama çözeltileri ile muamele edilerek görüntülendi. SDS-PAGE sonrası elde edilen jel üzerinde standart proteinlerin ve enzimin jel üzerinde yürüdükleri mesafeler ölçülerek R_f değerleri hesaplandı. Standart proteinlerin Log M_K değerlerine karşı R_f değerleriyle bir grafik çizildi. Çizilen bu grafik kullanılarak lakkaz enziminin molekül kütlesi hesaplandı.

Lakkaz Enziminin Biyokimyasal Karakterizasyon Çalışmaları

***B. licheniformis* SO8'den saflaştırılan lakkaz enziminin aktivitesi ve stabilitesi üzerine pH'ın etkisinin belirlenmesi**

Saflaştırılan lakkaz enziminin optimum pH değerini belirlemek için 0,5 mL enzim ile 100 mM farklı pH değerlerindeki Glisin-HCl (pH 2,0-3,0), sodyum asetat (pH 4,0-5,0), fosfat tamponu (pH 6,0-7,0), Tris-HCl (pH 8,0-9,0), Glisin-NaOH (pH 10,0-12,0) tampon çözeltileri kullanıldı ve aktivite tayini yapıldı. Aktivitenin en yüksek olduğu pH değeri 100 olarak kabul edildi ve diğer pH değerleri ona göre bağlı aktivite (%) cinsinden hesaplandı (Sharma *et al.* 2017).

Lakkaz enziminin pH stabilitesinin belirlenmesi için 0,5 mL enzim, 100 mM 1 mL farklı pH değerlerindeki tampon çözeltiler içerisinde (Glisin-HCl tamponu pH 2,0-3,0-asetat tamponu pH 4,0-5,0-fosfat tamponu pH 6,0-7,0-Tris-HCl pH 8,0-9,0-Glisin-NaOH tamponu pH 10,0-12,0) oda sıcaklığında 30 dk ve 1 saat inkübe edildi (Zaliha *et al.* 2006). İnkübasyon sonrasında enzim aktivite protokolü (55°C'de 5 dk) uygulanarak aktivite tayini yapıldı. İnkübasyon öncesi lakkaz aktivite miktarı 100 olarak kabul edildi ve inkübasyon sonrası elde edilen değerler kalan aktivite yüzdesi (%) olarak hesaplandı (Venugopal and Saramma 2007).

***B. licheniformis* SO8'den saflaştırılan lakkaz enziminin aktivitesi ve stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisinin belirlenmesi**

Saflaştırılan lakkaz enziminin aktif olduğu optimum sıcaklık değerini bulmak için 1,5 mL tampon (pH:5,0 50mM) içerisinde 500 µL enzim ve 1 mL substrat (ABTS) çözeltisi karıştırılarak farklı sıcaklıklarda (20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 90°C) 5 dk süreyle inkübe edildi. Süre sonunda her sıcaklık değeri için 3 tekrar olacak şekilde aktivite tayini yapıldı. Aktivitenin en yüksek olduğu sıcaklık değeri 100 olarak kabul edildi. Diğer sıcaklık değerleri optimum sıcaklığa göre bağlı aktivite (%) cinsinden hesaplandı (Sharma *et al.* 2017).

Saflaştırılan lakkaz enziminin sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi için ise enzim örneği 20°C'den 90°C'ye kadar olan sıcaklıklarda farklı sürelerde (30dk, 60dk, 90dk, 120dk)

inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda lakkaz aktivite tayin metodu kullanılarak enzim aktivitesi hesaplandı. İnkübasyon öncesi aktivite miktarı 100 olarak kabul edilerek farklı sıcaklık değerlerindeki kalan aktivite yüzdesi (%) hesaplandı (Mehandia et al. 2020).

Bazı Metal İyonlarının *B. licheniformis* SO8'den saflaştırılan lakkaz enziminin aktivitesine etkisinin belirlenmesi

Bazı metal iyonlarının *B. licheniformis* SO8'den saflaştırılan lakkaz enzim aktivitesine etkisinin belirlenmesi için; Mg^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Li^+ , K^+ metal iyonlarının klorlu ve sülfatlı tuzları kullanıldı. Hazırlanan 20 mM'lık stok metal iyonu çözeltileri kullanılarak son konsantrasyon 1, 5 ve 10 mM olacak şekilde her bir metal iyonu içerisinde 0,5 mL saflaştırılmış lakkaz enzimi eklenerek 30 dakika inkübe edildi ve ardından aktivite tayini yapıldı. Metal iyonları ihtiva etmeyen enzim çözeltisinin aktivite miktarı 100 olarak kabul edilip metal iyonu içeren örneklerin aktivitesi ise kalan aktivite olarak hesaplandı (Erol 2018; Mehandia et al. . 2020).

Yüzey aktif maddelerin ve bazı kimyasalların *B. licheniformis* SO8'den saflaştırılan lakkaz enziminin aktivitesine etkisinin belirlenmesi

Triton x-100 (%1, %5 ve %10), Tween-20 (%1, %5 ve %10), Tween-80 (%1, %5 ve %10), SDS (5, 10 ve 20 mM) gibi yüzey aktif maddeler ve NaF (5, 10 ve 20 mM) ve EDTA (5, 10 ve 20 mM) gibi bazı kimyasal maddelerin saflaştırılan lakkaz enziminin aktivitesi üzerine etkileri araştırıldı. Bu amaç doğrultusunda 0,5 mL enzim çözeltisi, 1 mL belirlenen konsantrasyonlarda hazırlanan reaktif çözeltileri ile 30 dakika boyunca oda sıcaklığında ön inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında aktivite tayini yapıldı. Reaktif içermeyen enzim çözeltisinin aktivite miktarı 100 olarak kabul edilerek reaktif içeren örneklerin aktivitesi kalan aktivite olarak hesaplandı.

***B. licheniformis* SO8'den saflaştırılan lakkaz enziminin substratlara spesifitesinin belirlenmesi**

B. licheniformis SO8'den saflaştırılmış lakkazın substrat özgülüğü çeşitli fenolik olmayan (ABTS) ve fenolik (Guaiakol, Tannik asit ve L-Tirozin) lakkaz enziminin substratları kullanılarak test edildi. Substratların (ABTS; sodyum fosfat tamponu 100 mM pH 6,0; Guaiakol, Tannik asit, 50 mM Tris-HCl pH 7,0; L-Tirozin; 50 mM Tris-HCl pH 7,0) çözeltileri hazırlandı ve aktivite tayini yapıldı. Aktivitesi en yüksek substratın aktivitesi 100 olarak kabul edilip diğer substratların ona göre bağlı aktivitesi (%) olarak hesaplandı.

***B. licheniformis* SO8'den saflaştırılan lakkaz enziminin K_m , V_{max} , K_{cat} ve K_{cat}/K_m**

parametrelerinin hesaplanması

B. licheniformis SO8'den saflaştırılmış lakkaz enziminin K_m , V_{max} ve K_{cat} değerlerini belirlemek amacıyla 0,5 mL enzim çözeltisi, 1 mL sodyum asetat (50 mM, pH:5,0) tamponunda 50–1000 μ M aralığında farklı konsantrasyonda hazırlanmış ABTS çözeltilerinin 1 mL'si ile karıştırılarak aktivite tayini yapıldı. Elde edilen değerlerle Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Çizilen grafikten yararlanılarak K_m , V_{max} , K_{cat} ve katalitik etkinlik (K_{cat}/K_m) değerleri hesaplandı (Laemmli 1970; Rao *et al.* 2008).

Lakkaz Enziminin Bazı Boyaların Renk Giderimi Üzerine Etkilerinin Araştırılması

Boyaların renk giderimi, bakteriyel lakkazların en umut verici biyoteknolojik uygulamasıdır Mehandia *et al.* (2019). Saflaştırılan lakkaz enziminin bazı sentetik boyaların renklerinin giderimi üzerine (dekolorizasyon) etkisini araştırmak için; asit siyah 1 (620 nm), metilen mavisi (660 nm), kongo kırmızı (350 nm), orange (622 nm), reaktif siyah 5 (597 nm), asit kırmızı 27 (520 nm) olmak üzere altı farklı boya kullanıldı. Hazırlanan stok boya çözeltisinin her birinden (son konsantrasyonda 50 mg/mL olacak şekilde) 0,5 mL alındı ve 1 mL mediatör çözeltisine (0,5 mM ABTS) eklendi. Reaksiyon, lakkaz (0,5 mL) ilavesiyle başlatıldı ve 55 °C'de 15, 30, 60 ve 120 dakika süreyle farklı başlangıç pH değerlerinde (pH 5,0, pH 7,0, ve pH 9,0) inkübe edildi. Kalan boya konsantrasyonları; ilgili optimal dalga boylarında spektrofotometrik olarak ölçülüp, (Erol 2018) tarafından aynı boya çözeltileri için hazırlanan standart grafiklerden yararlanılarak analiz edildi. Boyaların renklerinin yüzde giderimi; (%) Dekolorizasyon = $[(C_i - C_t)/C_i] \times 100$ formülüne göre hesaplandı. (C_i boyanın başlangıç konsantrasyonunu, C_t belirlenen süre sonundaki kalan boya konsantrasyonu) (Rodriguez *et al.* 2002).

İstatistiksel Analiz

Tüm deneyler üç kopya halinde yapıldı ($n = 3$). Üç bağımsız deney için ortalamalar, standart sapmalar ve değerler, ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak ifade edildi. GraphPad Prism ® yazılımı (versiyon 9.0, GraphPad Software, San Diego, CA) istatistik programı kullanılmıştır.

ARAŞTIRMA BULGULARI

Lakkaz Enzimi Üreten Bakteri İzolatlarının ABTS İçerikli Sıvı Besiyerinde Belirlenmesi

Stokta (-86°C) muhafaza edilen bakteri izolatlarından (EA1-10, SO1-15) toplamda 25 adet bakteri suşunun ABTS içerikli besi yeri içerisindeki lakkaz üretim potansiyelleri araştırıldı ve en yüksek aktiviteyi veren suşun SO8 kodlu bakteri olduğu tespit edildi.

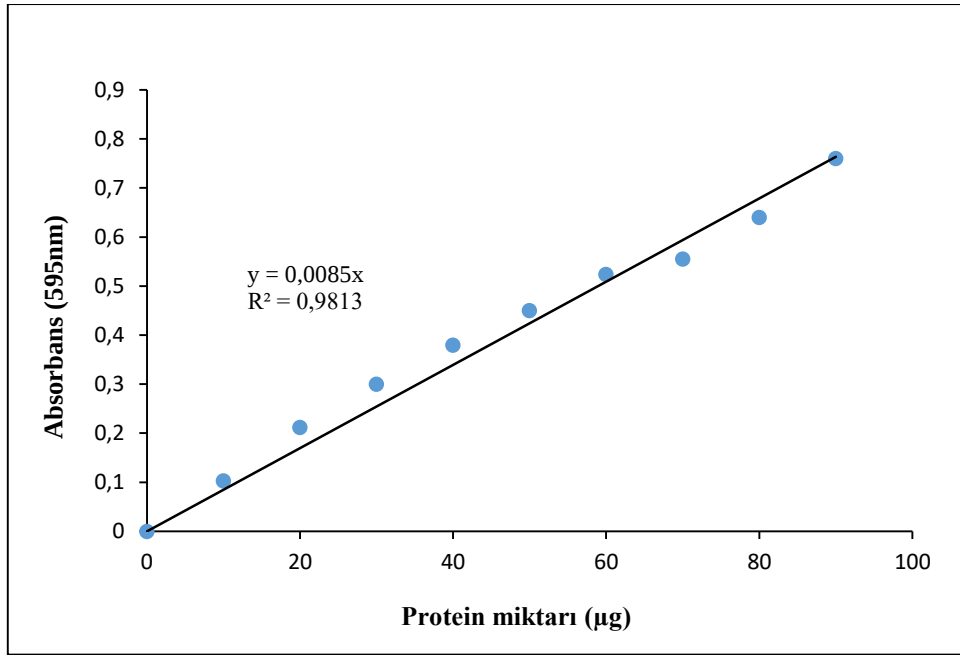
Tez çalışması için seçilen *B. licheniformis* SO8 (MG076978) termofilik, gram pozitif, aerob, endospor, oksidaz ve katalaz reaksiyonları pozitif, optimum büyüme gösterdiği tuz konsantrasyonu, pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla % 2- 10, 3,0-9,0, ve 35-85°C olarak belirlendi (Ölmez 2017).

Lakkaz Enzimi Üretimi ve Saflaştırılması

Lakkaz üreten bakteri izolatlarından TSB besiyerinde, en iyi aktivite veren bakteri sonraki aşamalarda kullanılmak üzere *B. licheniformis* SO8 suşu seçildi. *B. licheniformis* SO8 suşu stoktan alınarak TSA katı besiyerine inoküle edilip 55°C’de 24 saat süreyle etüvde inkübasyona bırakıldı. Stoktan canlandırılan bu suş TSB sıvı besiyerine alınıp 55°C’lik çalkalamalı inkübatörde 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Hazırlanmış olan ön kültürden 1 mL alınarak 100 mL’lik bakır ve ABTS içerikli lakkaz sıvı besiyerine inoküle edildi.

Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

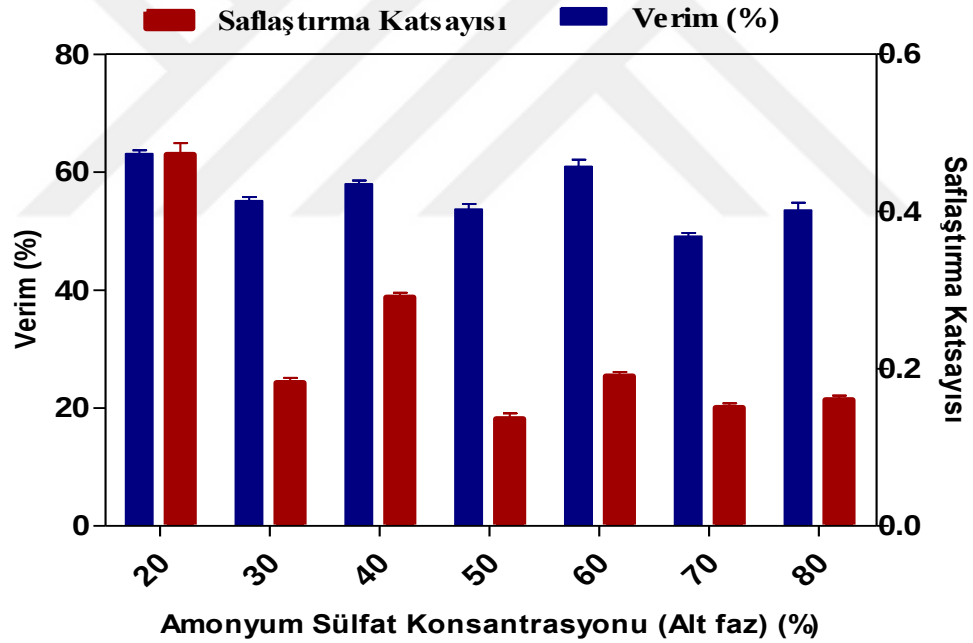
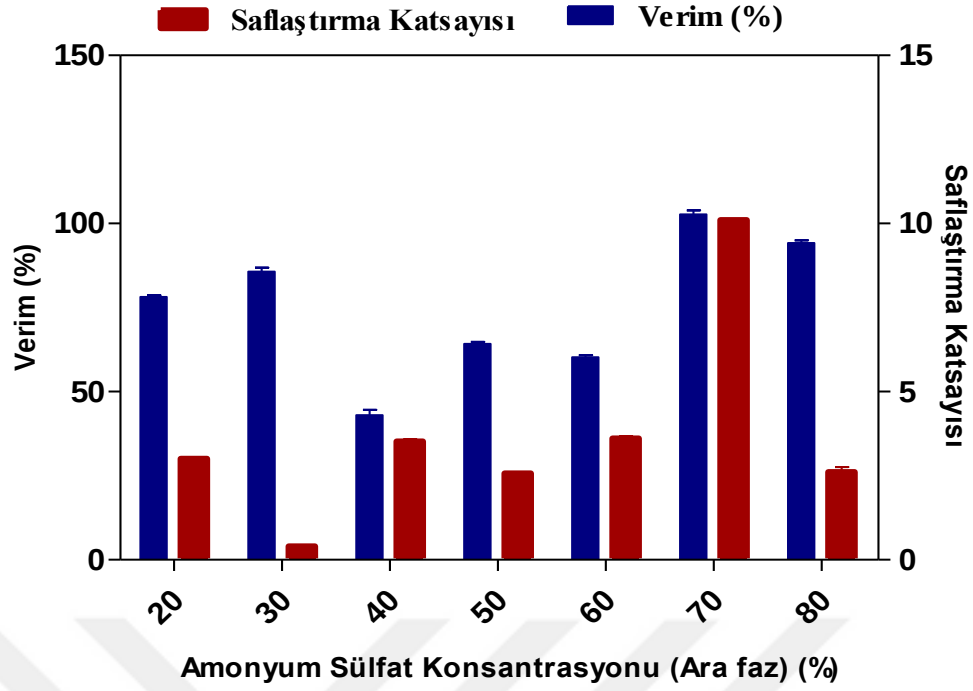
B. licheniformis SO8’den elde edilen homojenat ve TPP ile saflaştırılan lakkaz enzimini kantitatif protein tayini Bradford yöntemiyle yapıldı. Bunun için ilk olarak standart grafik çizildi ve enzim çözeltilerindeki protein miktarı standart grafik kullanılarak belirlendi. Elde edilen standart grafik Şekil 8’de gösterildi.



Şekil 8. Protein tayininde kullanılan standart grafik

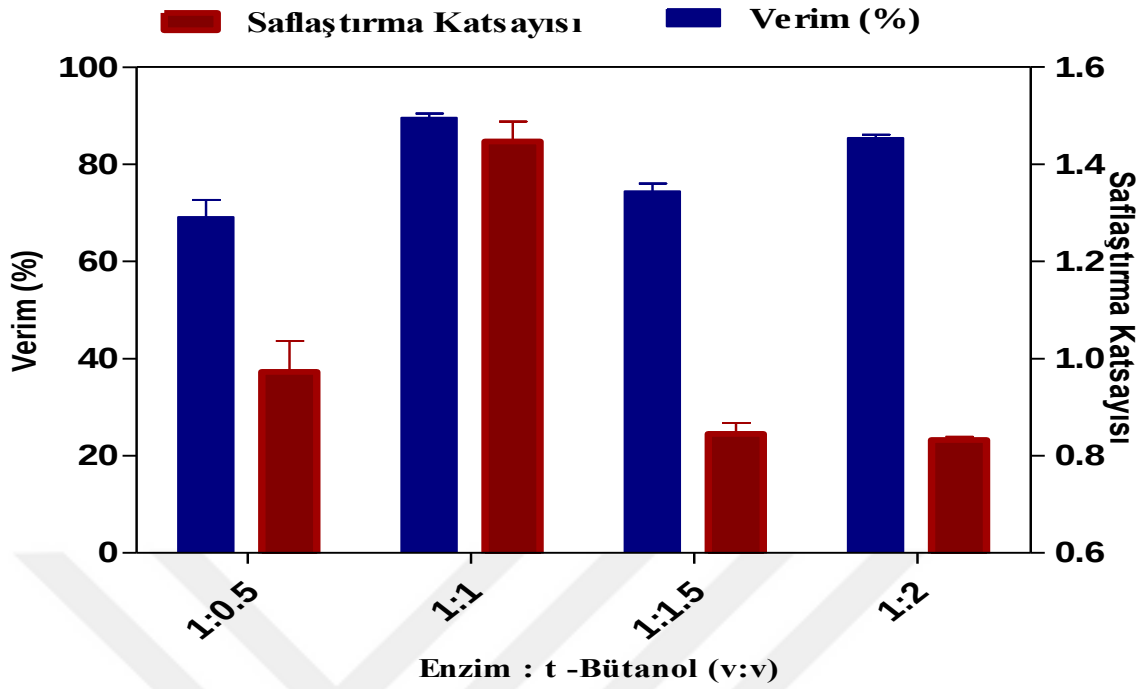
Lakkaz Enziminin Üçlü Faz Ayırma (TPP) Sistemi İle Saflaştırılması

B. licheniformis bakterisinin SO8 suşundan lakkazın TPP işlemiyle saflaştırılmasında enzimin saflaştığı en uygun aralığı bulmak amacıyla en iyi TPP sistemini belirlemek için $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yüzdesi, ham ekstrakt/t-bütanol oranı ve pH'yı içeren çeşitli proses parametrelerinin optimizasyon çalışmaları yapıldı. Bu tez çalışması kapsamında; *B. licheniformis* SO8 suşunun en iyi aktivite gösterdiği 72. saate kadar büyütüldükten sonra 24°C'de 6000 rpm'de 25 dakika santrifüj edildi. Elde edilen homojenattan 2 mL alınarak %20 ile %80 aralığındaki farklı tuz oranları hesaplanarak homojenatın üzerine eklendi. Vortekslendikten sonra her tuz oranı için 1,0:0,5; 1,0:1,0; 1,0:1,5; 1,0:2,0 oranlarında homojenat: t-bütanol oranı hesaplanarak t-bütanol eklendi. Tekrar vortekslendikten sonra oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı. 1 saatin ardından üç faz ayrımı gözlemlendi. Pastör pipeti yardımı ile üst faz ayrıldıktan sonra orta faz ve alt faz ayrı tüplere alınarak protein ve enzim aktivitesi tayini yapıldı. % verim ve saflaştırma katsayısı hesaplanarak Şekil 9'daki grafik çizildi. Çizilen grafik incelendiğinde lakkaz enzimi için en yüksek verimin ve saflaştırma katsayısının %70 amonyum sülfat konsantrasyonunda elde edildiği görülmektedir.



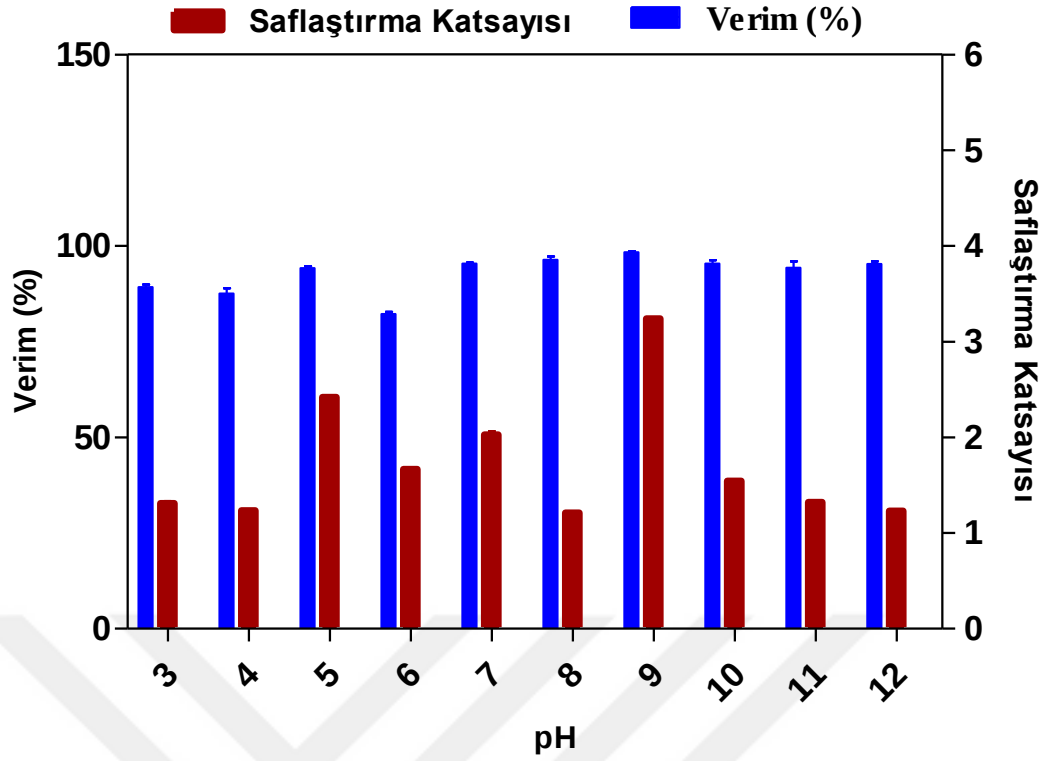
Şekil 9. TPP prosesinde farklı amonyum sülfat konsantrasyonunun (%20, 30, 40, 50, 60, 70, 80) lakkaz enziminin saflaştırma katsayısına ve verimine etkisi.

TPP prosesinde tuz konsantrasyonu belirlendikten sonra %70 amonyum sülfat eklenen örnekler farklı alkol oranlarında denendi ve sonuçlar grafiğe aktarıldı (Şekil 10). Elde edilen grafik incelendiğinde, lakkaz enzimi için en yüksek verimin ve saflaştırma katsayısının 1,0:1,0 homojenat:t-bütanol oranında elde edildiği görüldü. Bundan sonraki saflaştırma işlemine bu oranlarla devam edildi.



Şekil 10. TPP prosesinin %70 amonyum sülfat konsantrasyonu varlığında farklı *t*-bütanol oranlarının (Homojenat:*t*-bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) lakkazın saflaştırma katsayısına ve verimine etkisi.

TPP'yi etkileyen önemli parametrelerden birisi olan ortamın pH'sını optimize etmek amacıyla belirlenen en uygun organik çözücü oranı ve tuz yüzdesi belirlendikten sonra bu değerlere göre farklı pH değerlerinde işlemler tekrarlandı. Elde edilen sonuçlar Şekil 11'de gösterildi. En yüksek verimin ve saflaştırma katsayısının pH 9,0' da olduğu görüldü.



Şekil 11. Lakkaz enziminin saflaştırılmasında TPP sistemine pH'nın etkisi.

B. licheniformis SO8 lakkaz enziminin TPP yöntemiyle saflaştırma sonuçları

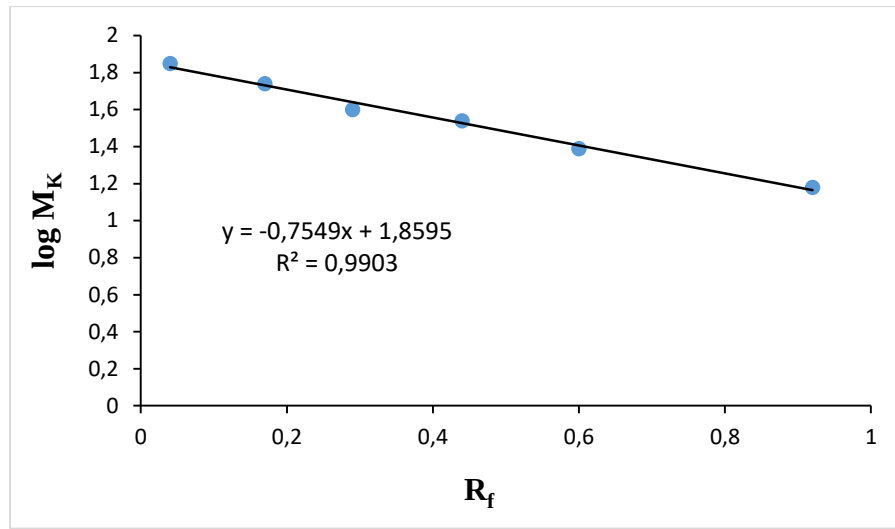
B. licheniformis SO8'den lakkaz enzimi TPP optimizasyonu ile belirlenen parametreler kullanılarak %70 (w/v) amonyum sülfat doygunluğu, 1,0:1,0 (v/v) homojenat:t-bütanol oranı ve pH 9,0'da 5,65 kat ve %102,07 verimle ara fazda kısmi olarak saflaştırıldı.

Tablo 3. *B. licheniformis* SO8'den Saflaştırılan Lakkaz Eziminin Saflaştırma Tablosu

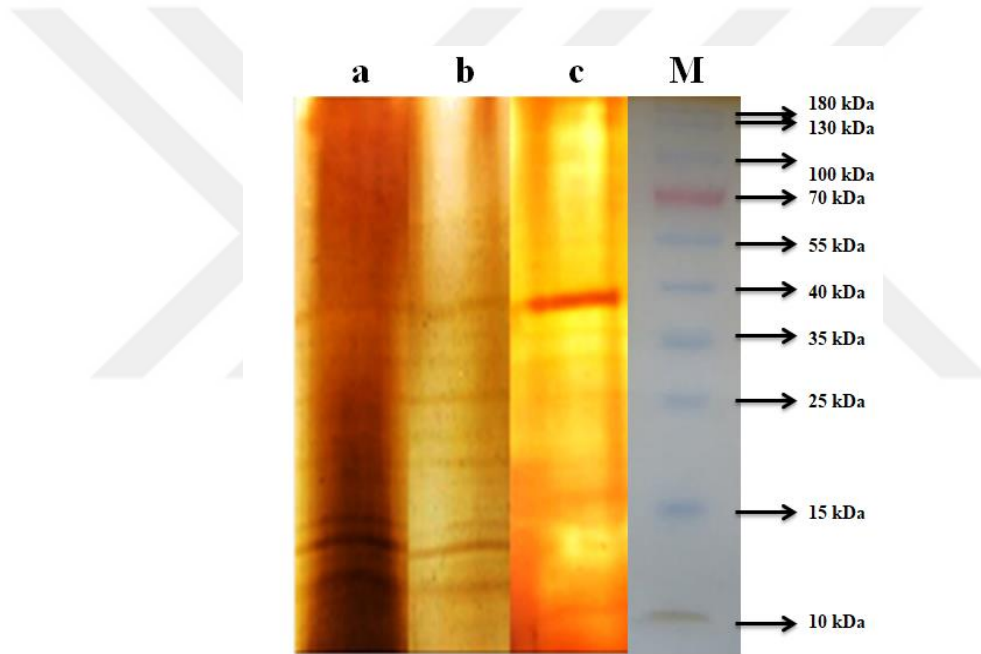
Basamak	Total Hacim (mL)	Aktive (EU/mL)	Protein (mg/mL)	Total Aktivite (EU/mL)	Total Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	% Verim	Saflaştırma Katsayısı
Ham ekstrakt	2	36,223	0,260	72,446	0,520	139,32	100	1
TPP Ara faz	2	36,974	0,047	73,948	0,094	786,68	102,07	5,65
TPP Alt faz	2	15,540	0,128	31,08	0,256	121,4	42,9	0,87

Lakkaz Enziminin SDS-PAGE Yöntemi İle Saflık Kontrolü ve Molekül Kütlesinin Tayini

B. licheniformis SO8 suşundan saflaştırılan lakkaz enziminin molekül kütlesi SDS-PAGE ile belirlendi. Elde edilen bantları gösteren SDS-PAGE fotoğrafı Şekil 12'de gösterildi. Standart proteinlerin ve enzimin jelde yürüdükleri mesafeler ölçüldü ve R_f değerleri hesaplanarak Log M_K - R_f grafiği elde edildi. Şekil 12.' de gösterilen grafikten yararlanılarak *B. licheniformis* SO8 lakkaz enziminin molekül kütlesi ~38,7 kDa olarak hesaplandı.



Şekil 12. Log M_K-R_f grafiği



Şekil 13. *B. licheniformis* SO8'den TPP yöntemiyle saflaştırılan lakkaz enziminin SDS-PAGE görüntüsü. a) Homojenat b) Alt faz c) Ara faz M: Marker

TPP yöntemiyle *B. licheniformis* SO8'den saflaştırılan lakkaz enziminin ara fazda kaldığı SDS-PAGE ile doğrulandı.

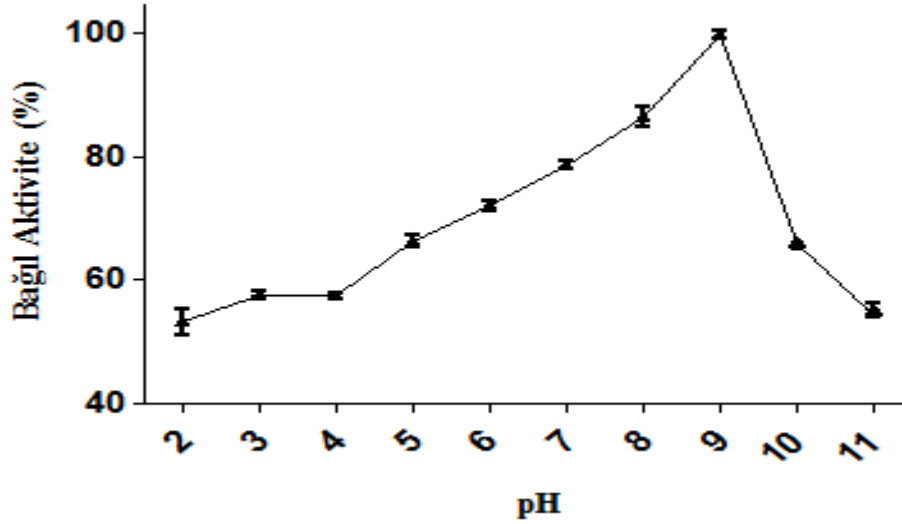
Lakkaz Enziminin Biyokimyasal Karakterizasyon Çalışma Sonuçları

***B. licheniformis* SO8'den saflaştırılan lakkaz enziminin optimum ve stabil pH'sının belirlenmesine yönelik sonuçlar**

Optimum pH

B. licheniformis SO8 lakkaz enziminin materyal metot bölümünde anlatıldığı gibi farklı tamponlarla hazırlanan 10 farklı pH değeri için aktivite değerleri belirlendi ve elde edilen

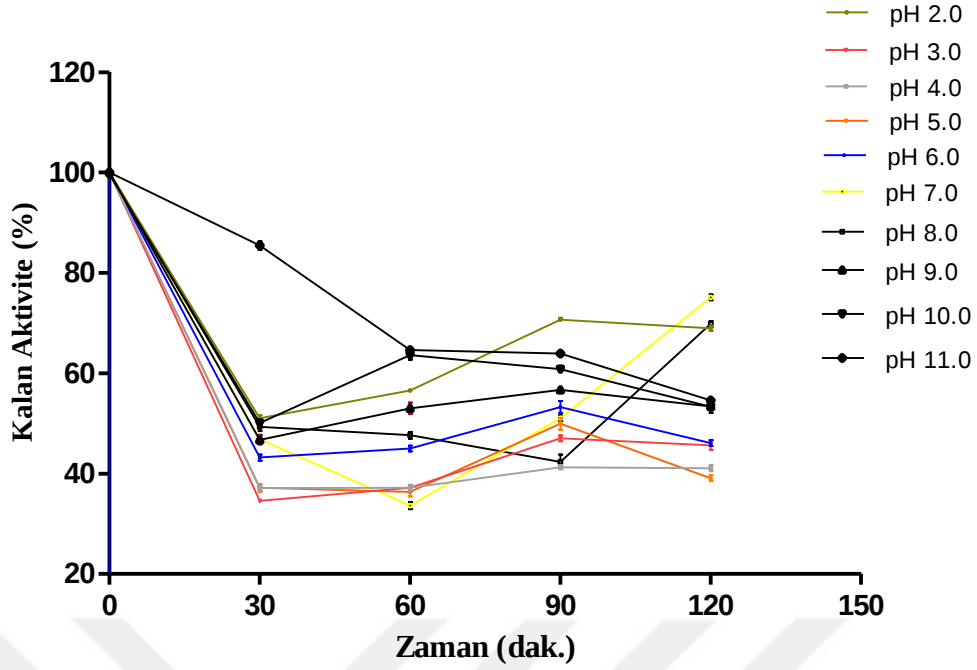
verilere göre grafik çizildi (Şekil 14). Grafik incelendiğinde lakkaz enziminin pH 9,0'da maksimum aktivite değerine sahip olduğu görüldü. *B. licheniformis* SO8 lakkazı, geniş bir pH aralığında (pH 2,0-11,0) %50'nin üzerinde aktivite göstermekle birlikte düşük pH değerlerinde daha düşük aktiviteye sahip olduğu yüksek pH değerlerinde ise daha yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlendi.



Şekil 14. pH'ın *B. licheniformis* SO8 lakkaz enziminin aktivitesi üzerine etkisi.

Stabil pH

Lakkaz enziminin asidik ve bazik ortamlardaki stabilitesini belirlemek için 120 dakika boyunca pH 2,0 ve pH 11,0 aralığındaki değerlerde aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Elde edilen verilere göre grafik oluşturuldu ve Şekil 15.'de gösterildi. 120 dakikanın sonunda çalışılan tüm pH değerlerinde *B. licheniformis* SO8 lakkazının aktivitesinin %35'in üzerinde korunduğu; 30.dakikada aktivitenin pH 9,0'da % 75 oranına sahip olduğu gözlemlendi.

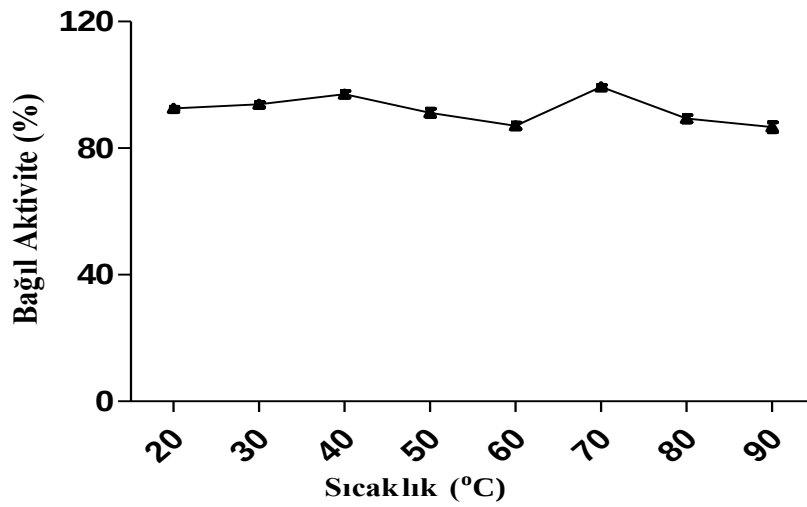


Şekil 15. pH'nın *B. licheniformis* SO8 lakkaz enziminin stabilitesi üzerine etkisi.

B. licheniformis SO8'den saflaştırılan lakkaz enziminin optimum ve stabil sıcaklığının belirlenmesine yönelik sonuçlar

Optimum sıcaklık

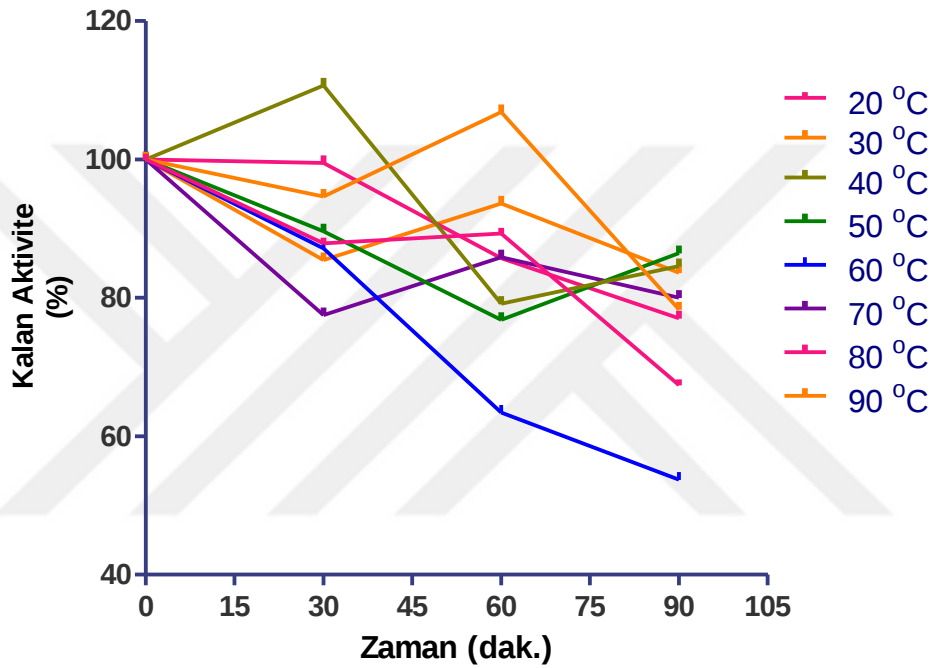
B. licheniformis SO8 lakkaz enziminin sıcaklık profili ve kararlılığını belirlemek amacıyla 20°C'den 90°C'ye kadar olan sıcaklıklarda çalışıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 16.'da gösterildi. Bu çalışma sonucunda alınan deney sonuçlarına göre çizilen grafik incelendiğinde optimum sıcaklık lakkaz enzimi için 70°C olarak belirlendi.



Şekil 16. Sıcaklığın *B. licheniformis* SO8 lakkaz enziminin aktivitesi üzerine etkisi.

Sıcaklık stabilitesi

Lakkaz enziminin 20°C ve 90°C aralığındaki sıcaklıklarda periyodik aralıklarla 120 dk boyunca aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Elde edilen veriler Şekil 17.'de gösterildi. Lakkazın çalışılan sıcaklık aralığında 2 saat inkübasyon süresinde genellikle aktivitesini önemli derecede koruduğu gözlemlendi. Bu sonuç oldukça önemlidir çünkü özellikle tekstil atık suları çok yüksek sıcaklıklarda olabilmektedir. Soğutma prosesleri için hem zaman hem maliyet gerekmektedir. Yüksek sıcaklıklarda aktivitesini koruyabilen lakkaz enziminin birçok yönden avantaj sağlayacağı düşünülmektedir.

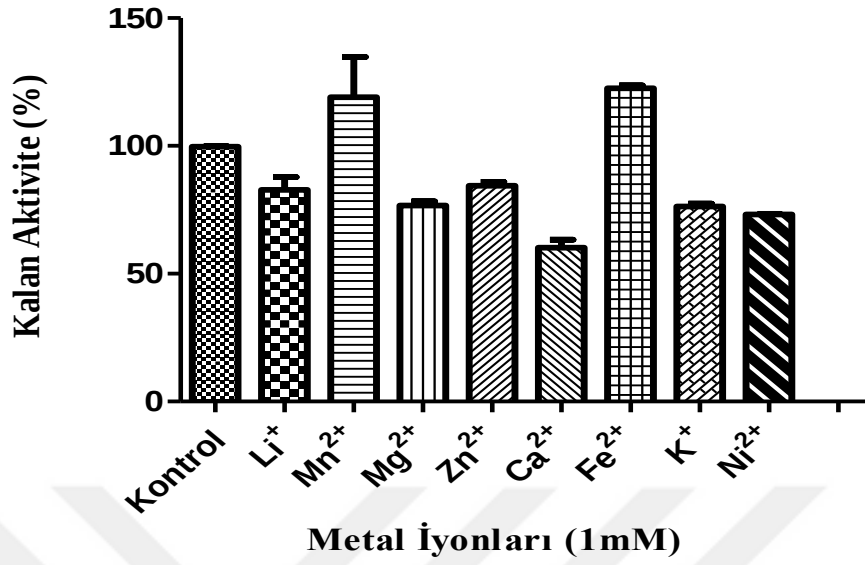


Şekil 17. Sıcaklığın *B. licheniformis* SO8 lakkaz enziminin stabilitesi üzerine etkisi.

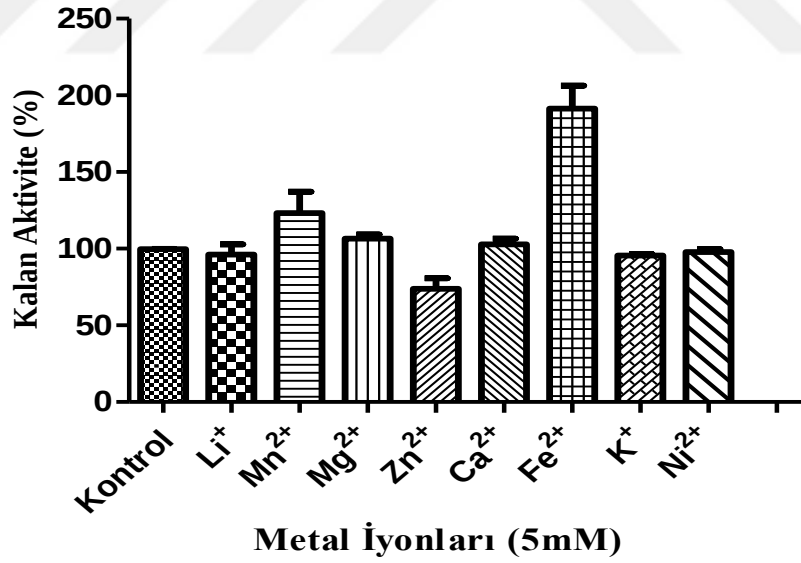
Bazı Metal İyonlarının *B. licheniformis* SO8'den saflaştırılan lakkaz enziminin aktivitesine etkisinin belirlenmesine yönelik sonuçlar

Bacillus licheniformis SO8 lakkaz enzimi aktivitesi üzerine çeşitli metal iyonlarının etkisini incelenmek amacıyla 1 mM, 5 mM ve 10 mM'lık konsantrasyonlardaki Li^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , K^+ , Zn^{2+} metal iyonları kullanıldı ve bu iyonların varlığında lakkaz aktivitesi spektrofotometrik olarak belirlendi. Elde edilen sonuçlar Şekil 18-20.'de verildi. 1, 5 ve 10 mM'lık konsantrasyonlarda Ca^{2+} ve Zn^{2+} (sırasıyla %36,5 ve %16,4 inhibisyon oranlarında) iyonları dışında diğer metal iyonlarının mevcudiyetinde enzimin aktivitesini yüksek oranda koruduğu; özellikle Fe^{2+} ve Mn^{2+} 'nin enzim aktivitesinde artışa neden olduğu gözlemlendi. Benzer şekilde 1 mM'lık konsantrasyonda da Fe^{2+} ve Mn^{2+} 'nin varlığında enzimin aktivitesinde

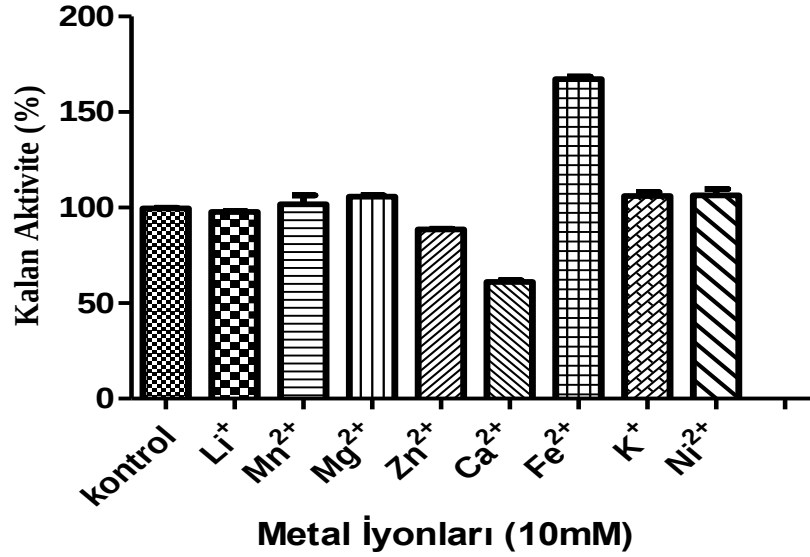
artış olduğu, diğer metal iyonlarının varlığında ise %60'ın üzerinde aktivitesini koruduğu tespit edildi.



Şekil 18. *B. licheniformis* SO8 lakkaz enzimi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi (1 mM)



Şekil 19. *B. licheniformis* SO8 lakkaz enzimi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi (5 mM)



Şekil 20. *B. licheniformis* SO8 lakkaz enzimi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi (10 mM)

Yüzey aktif maddelerin ve bazı kimyasalların *B. licheniformis* SO8'den saflaştırılan lakkaz enziminin aktivitesine etkisinin belirlenmesine yönelik sonuçlar

B. licheniformis SO8 lakkaz enzimi aktivitesi üzerine yüzey aktif maddelerin ve bazı kimyasalların etkilerini araştırmak için %1, %5 ve %10'luk konsantrasyonlarda Triton X-100, Tween-80 ve Tween-20; 5, 10 ve 20 mM'luk konsantrasyonlarda SDS, NaF ve EDTA, kullanıldı. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.'de verildi. Tween-80 ve Triton X-100'ün en yüksek inhibisyon etkilerini %20'lik konsantrasyonda %59 oranında enzimi inhibe ederek gösterdiği tespit edildi. %1'lik ve 5 mM'lik konsantrasyonlarda Triton x-100 ve NaF en yüksek inhibasyona uğratan moleküllerdi %5'lik ve 10 mM'lik konsantrasyonlarda enzimin aktivitesinde azalma en çok Triton x-100, NaF ve EDTA varlığında sırasıyla %62, %23 ve %19 olarak görüldü. 5 mM ve %1'lik konsantrasyon oranlarında ise enzimin kullanılan tüm yüzey aktif maddeler ve kimyasalların varlığında stabil kaldığı; EDTA, Tween-20 ve Tween-80 ile de aktivitesinin arttığı gözlemlendi.

Tablo 4. Bazı Yüzey Aktif Maddeler ve İnhibitörlerin Lakkaz Enzimi Üzerine Etkisi

Yüzey Aktif Maddeler	Konsantrasyon (%)	Kalan Aktivite (%)
Triton x-100	1	82,26 ± 2,652
	5	41,72 ± 5,855
	10	19,92 ± 0,489
Tween-20	1	100,3 ± 1,495
	5	98,39 ± 7,159
	10	40,79 ± 0,233
Tween-80	1	119,9 ± 18,87
	5	103,2 ± 11,36
	10	41,72 ± 3,527
İnhibitörler	Konsantrasyon (mM)	Kalan Aktivite (%)
SDS	5	100,8 ± 3,604
	10	92,83 ± 4,404
	20	58,97 ± 8,414
NaF	5	90,54 ± 3,871
	10	79,93 ± 0,998
	20	60,61 ± 8,159
EDTA	5	114,1 ± 13,40
	10	82,97 ± 1,710
	20	49,65 ± 1,456

B. licheniformis SO8'den saflaştırılan lakkaz enziminin substratlara spesifitesinin belirlenmesine yönelik sonuçlar

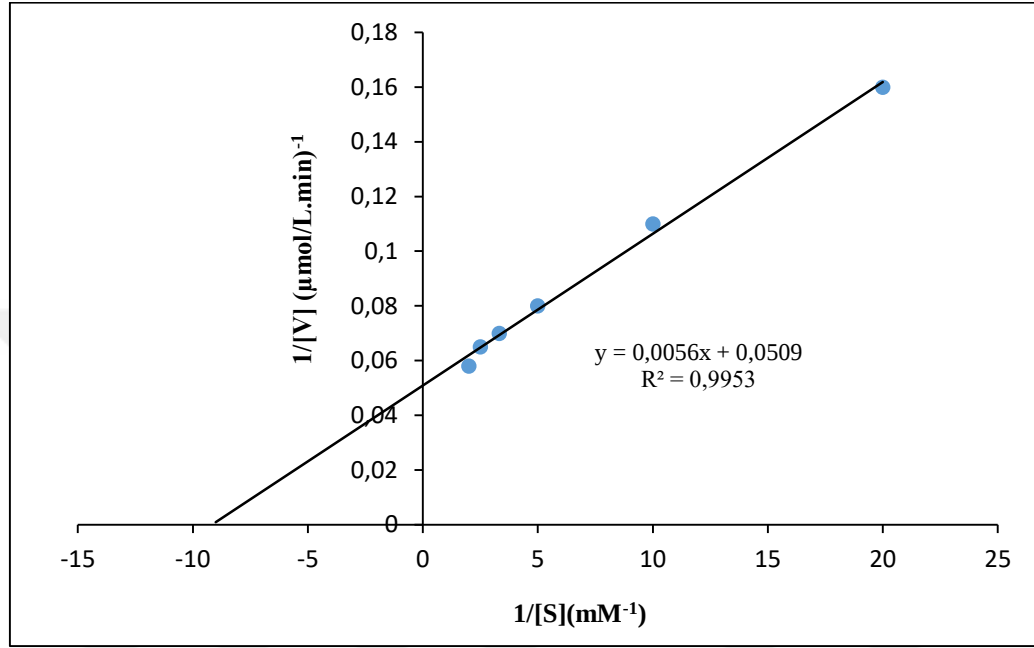
B. licheniformis SO8'den saflaştırılmış lakkazın substrat özgülüğü çeşitli fenolik ve fenolik olmayan substratlar kullanılarak test edildi. Yapılan deneyler sonucunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde lakkaz enziminin ABTS substratı için en yüksek aktiviteyi verdiği görüldü.

Tablo 5. Doğal Substratların Lakkaz Enziminin Aktivitesi Üzerine Etkisi

Doğal subsratlar	Ph	λ(nm)	Bağlı Aktivite (%)
ABTS	6,0	420	100,0 ± 0,001
Guaiakol	8,0	470	60,20 ± 2,427
Tannik asit	7,0	250	52,97 ± 1,784
L-tirozin	7,0	280	9,200 ± 0,642

***B. licheniformis* SO8'den saflaştırılan lakkaz enziminin kinetik parametrelerinin belirlenmesine yönelik sonuçlar**

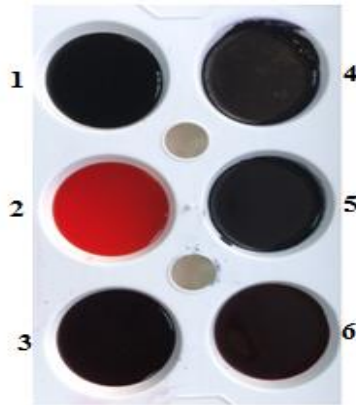
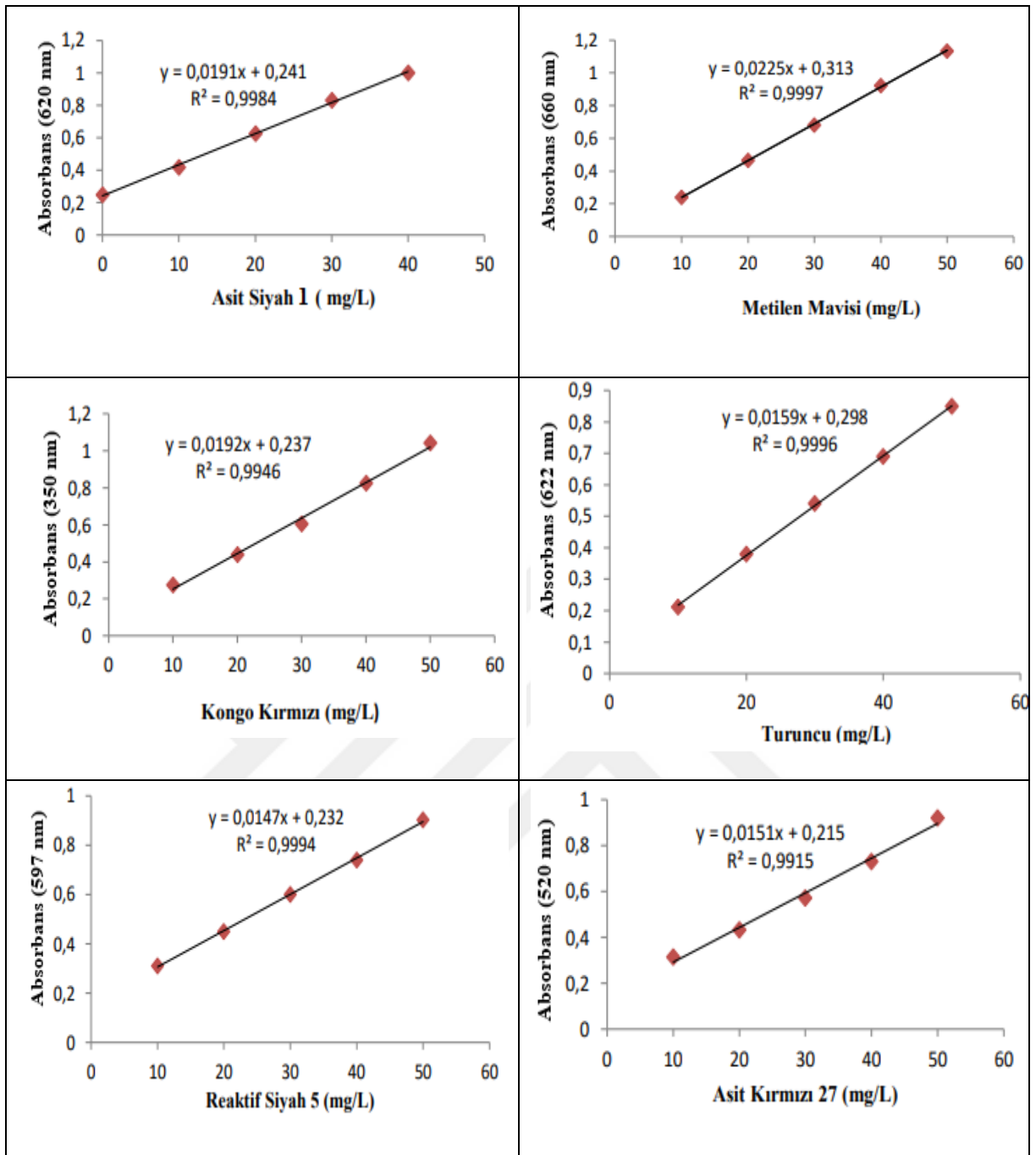
B. licheniformis SO8'den saflaştırılan lakkazın K_m ve V_{max} değerleri (ABTS substratı için) Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak belirlendi. Bu grafikten yararlanılarak K_m değeri 110 μM , V_{max} değeri 19,6 $\mu mol.L^{-1}.dk^{-1}$, K_{cat} değeri 0,048 s^{-1} ve K_{cat}/K_m değeri 0,44 $s^{-1}.mM^{-1}$ olarak hesaplandı (Şekil 21).



Şekil 21. ABTS substratı için K_m ve V_{max} bulunmasına yönelik Lineweaver-Burk grafiği

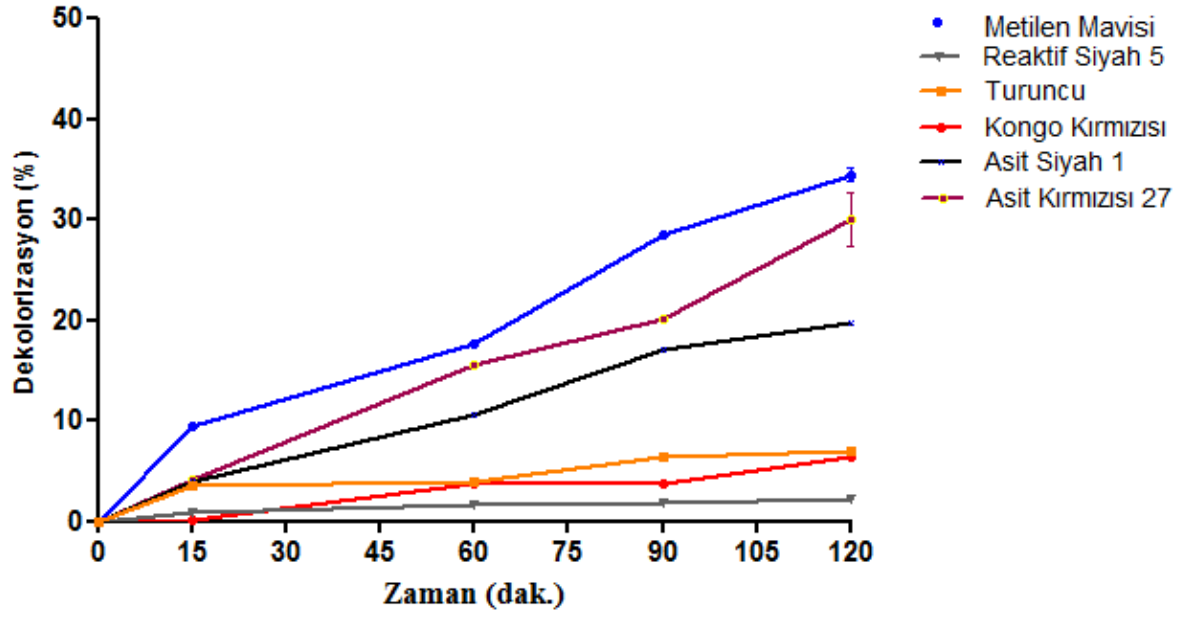
Lakkaz Enziminin Boyar Maddelerin Renksizleştirilmesi için Kullanımı

B. licheniformis SO8 lakkaz enziminin bazı boyar maddelerin renk giderimindeki etkisini görebilmek için; asit siyah 1, metilen mavisi, kongo kırmızı, turuncu, reaktif siyah 5 ve asit kırmızı 27 olmak üzere altı boya çözeltisi kullanıldı. Bu amaç doğrultusunda, daha önceden hazırlanan standart grafiklerden (Şekil 22.) yararlanılarak boya giderim oranları hesaplanıp elde edilen sonuçlar Şekil 23-25.'de verildi. Renk giderme işlemi, redoks aracı olarak ABTS'nin varlığında incelendi. Boyaların başlangıç görünimleri Şekil 23.'da gösterildi. Saflaştırılmış lakkazın, test edilen tüm boyaları tüm koşullar altında %5-%38 arasında değişen verimle renksizleştirdiği görüldü.

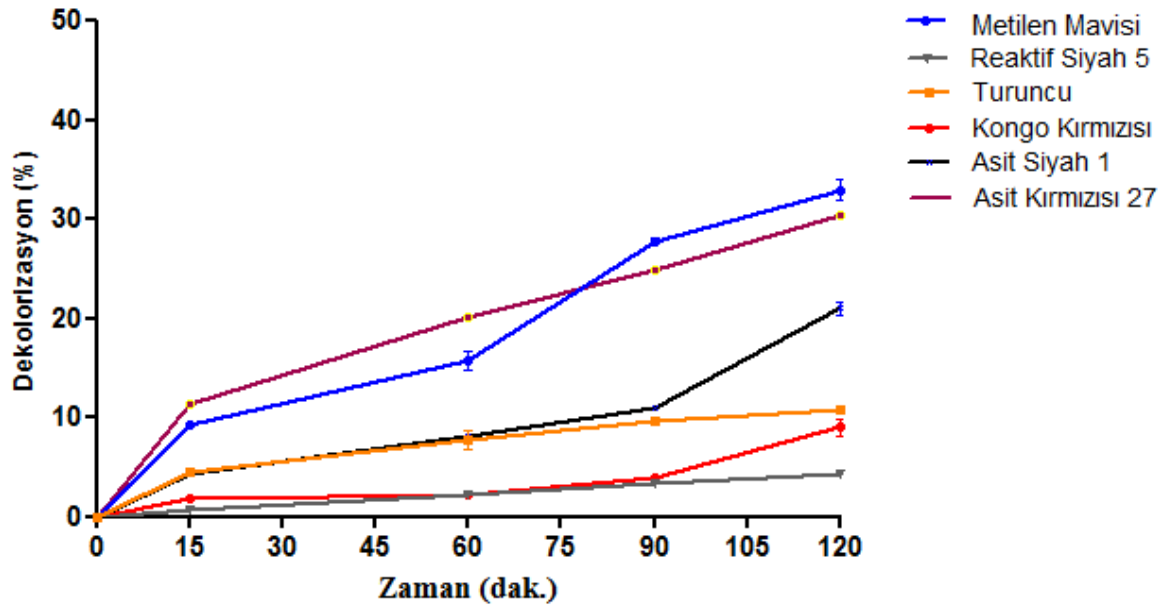


- 1-Reaktif Siyah 5
- 2-Turuncu
- 3-Asit Kırmızı 27
- 4-Kongo Kırmızı
- 5-Asit Siyah 1
- 6-Metilen Mavisi

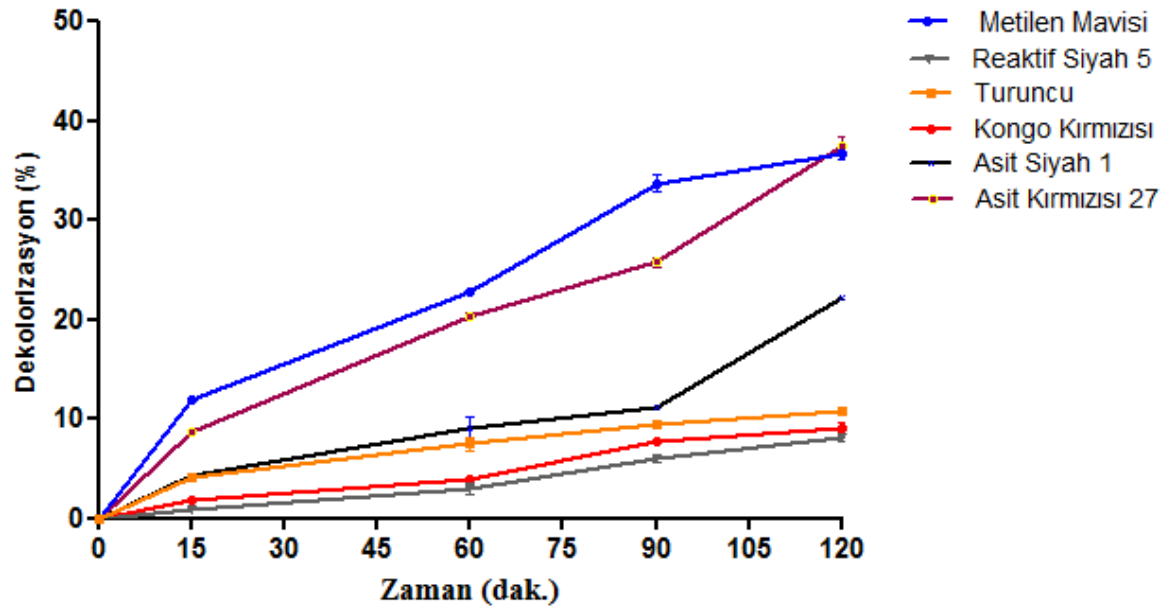
Şekil 22. Boyarmaddeler için kullanılan standart grafikler (Erol 2018)



Şekil 23. pH 5,0'de 120 dakikalık inkübasyon sırasında 6 farklı boyanın renk giderimi



Şekil 24. pH 7,0'de 120 dakikalık inkübasyon sırasında 6 farklı boyanın renk giderimi



Şekil 25. pH 9,0'da 120 dakikalık inkübasyon sırasında 6 farklı boyanın renk giderimi

TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Dünyada modern biyoteknoloji uygulamalarıyla birlikte daha az kimyasal atık açığa çıkaran, doğa dostu ve olumsuz sonuçların ortadan kaldırılmaya çalışıldığı maliyeti düşük, verimi yüksek proseslerin giderek yaygınlaştığı bir zaman dilimine girilmektedir. Gerek ticari uygulamalarda gerekse günümüz dünyasında önemli bir yere sahip olan ve giderek çözülmesi gereken ciddi bir sorun haline gelen kirlenen ekosistemin eski haline döndürülme çabalarında kullanılan enzimlerden birisi olan lakkazlar üretiminin tüm zorluklarına rağmen vazgeçilmez güçlü bir seçenek olmaya devam etmektedir.

Lakkazlar, geniş aralıktaki substratlar üzerine etki edebilme özelliğine sahiptir ve tekstil boyalarının renksizleştirilmesi, çevresel kirleticilerin detoksifikasyonu ve kağıt endüstrisinde kağıt hamurunun biyolojik olarak ağartılması gibi biyoremediasyon uygulamalarında yaygın bir kullanım alanı bulmaktadır. Bu uygulamalar, doğadan kaynaklanan ve yeterli miktarda üretilmesi gereken her özel amaca uygun lakkaz gerektirmektedir. Bununla birlikte, büyük ölçekli lakkaz uygulamasının sınırlamalarından birisi, uygun bir maliyetle yüksek derecede aktif enzimin büyük hacimlerini üretme kapasitesinin olmamasıdır. Lakkaz üretimi için ucuz kaynakların kullanımı son zamanlarda araştırılmaktadır (Chauhan et al. 2017; Mehandia et al. 2020).

Endüstriyel alandaki geniş uygulama alanlarıyla dikkat çeken lakkazların ticari olarak kullanılabilirliğini kısıtlayan etkenlerden biriside enzimin büyük ölçekli saflaştırılmasındaki işlemlerden kaynaklanmaktadır. Ayırma ve saflaştırma için alternatif yöntemlerin geliştirilerek sağlam ve ucuz ticari lakkaz ürününün elde edilmesi, bu enzimlerin kullanımını kısıtlayan başlıca engellerden birisinin aşılabileceği anlamına gelmektedir (Kumar et al. 2012).. Lakkazların saflaştırılmasında kullanılan ve pahalı, zaman alıcı, çok adımlı protokollere sahip olan amonyum sülfat çöktürme veya ultrafiltrasyon ardından kromatografik yöntemler gibi mevcut geleneksel uygulamalara alternatif olarak geliştirilen TPP yöntemi, proteinlerin çökmesi için çok sayıda teknikte yer alan prensiplerin toplu işleyişini kullanan nispeten yeni bir biyo-ayırma tekniğidir (Dennison and Lovrein 1997; Forootanfar, 2011; Kumar et al. 2012)). Ekonomik ve verimi yüksek olan TPP yöntemi, proteinlerin çok hızlı bir şekilde büyük ölçekli üretimini optimize etmektedir. Bu yöntem makromoleküllerin geri kazanılması ve saflaştırılmasında, tek bir adım olarak veya başka yöntemler ile birleştirildiğinde giderek daha fazla uygulanmaktadır (Yang et al. 2017). TPP, günümüzde protein geri kazanımı için birkaç

endüstriyel alanda proses ölçeğinde kullanılmaktadır (Kumar et al. 2012).

Bu tez çalışması kapsamında; ekstrem koşullara dayanıklı lakkaz enzimi elde etmek amacı doğrultusunda; daha önce izolasyon ve identifikasyonu gerçekleştirilmiş olan termotolerant bakteriler arasında en yüksek aktiviteye sahip olan *Bacillus licheniformis* SO8 bakterisi seçildi ve bu bakteriden lakkaz enzimi TPP yöntemi ile saflaştırıldı. *Bacillus licheniformis* SO8 lakkaz enziminin biyokimyasal karakterizasyonu yapıldı ve biyoteknolojik uygulanabilirliği araştırıldı.

Lakkaz üreten bakteri belirlendikten sonra lakkaz üretim verimini yükseltme amacıyla farklı besiyerleri araştırılmıştır. Bu amaçla literatürde var olan besiyerleri modifiye edilerek en verimli lakkaz üretimini sağlayacak besiyeri içerisine farklı konsantrasyonlara sahip CuSO_4 , 0,5 mM ABTS eklendi. Sonuçta özel besiyerinde 10 mM CuSO_4 varlığında 3 gün boyunca 55°C’de en iyi aktivite değeri gözlemlendi.

B. licheniformis SO8’den lakkaz enziminin TPP yöntemiyle saflaştırılması amacıyla ilk olarak tuz, organik çözügen ve pH optimizasyonu yapıldı. Lakkaz enzimi pH 9,0’da, 1,0:1,0 (ham enzim çözeltisi:t-bütanol oranı) ve %70 doymuş amonyum sülfat kullanılarak 5,65 kat ve %102,07 verimle saflaştırıldı. Literatürde çoğunlukla TPP ile etkili enzim ayrımı için 1,0:1,0 veya 1,0:2,0 (v/v) sulu faz-t-bütanol oranı bildirilmiştir (Rawdkuen 2010). t-bütanol miktarı arttıkça, organik fazda daha fazla su alınır, böylece sulu fazın tuz konsantrasyonu artar ve sonuçta arayüzde protein çökmesine neden olur (Rajeeva and Lele 2011). Lakkazların TPP yöntemiyle saflaştırmaya uygunluğu ve elde edilen başarılı sonuçlar literatürde verilmiştir (Rajeeva and Lele 2011). Örneğin; lakkaz enziminin *Pleurotus ostreatus* laccase’den %184 verim ve 7,22 kat (Kumar et al. 2011), *Ganoderma* sp. WR-1’den 13,2 kat %60 verimle (Rajeeva et al. 2011), *Enterococcus faecium* A2’den %64,59 verim ve 0,95 kat (Birge et al. 2022) saflaştırıldığı bildirilmiştir. Literatür ile karşılaştırıldığında *B. licheniformis* SO8 suşundan saflaştırılan lakkazın TPP ile yüksek verimle elde edildiği görülmektedir.

B. licheniformis SO8’den saflaştırılan lakkaz molekül kütlesi ~38,7 kDa olarak belirlendi. Literatürde; *B. tequilensis* SN4 lakkazının molekül kütlesinin 32 kDa (Sondhi 2014), *E. faecium* A2 lakkazının molekül kütlesinin 50.11 kDa (Birge et al. 2022) ve *A. gonensis* P39 lakkazının 160 kDa molekül kütlesine (Yanmış et al. 2015) sahip olduğu bildirilmiştir. Aynı zamanda SDS-PAGE ile enzimin TPP yöntemiyle saflaştırılması sonucu alt fazda kaldığı görüldü. Böylece; ham enzim ekstraktı ve TPP sisteminin farklı fraksiyonlarının SDS-PAGE ile analizi, tek aşamalı TPP’nin kontamine edici proteinlerin veya diğer moleküllerin alt ve üst fazlarda etkili bir şekilde uzaklaştırılmasını sağladığını, lakkazın esas olarak ara fazda konsantre edildiğini doğruladı.

B. licheniformis SO8 lakkaz enziminin optimum pH'sı 9,0 olarak tespit edildi ve bu sonuç enzimin alkali olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda enzimin pH 2,0-11,0 arasındaki geniş bir pH aralığında %50'nin üzerinde aktivite gösterdiği belirlendi. Saflaştırılan lakkaz enziminin yüksek pH değerlerinde stabil kaldığı ve çalışılan tüm pH değerlerinde 120. dakikanın sonunda aktivitesini %35'in üzerinde koruduğu görüldü. Yüksek pH'larda aktivite gösteren ve kararlı kalabilen lakkazlar endüstriyel açıdan oldukça fazla talep edilmektedir. Örneğin; alkali organik sentez reaksiyonlarında, deterjanlarda, doğal ve sentetik boyaların oksidasyonu ve fenol içeren biyopolimerlerin doğrudan oksidasyonu gibi çeşitli uygulamalarda nötr veya alkali pH'da aktif olan lakkazlar tercih edilir (Rodriguez Couto 2006,;Dube et al. 2008; Liu 2011). *B. licheniformis* SO8 lakkazında da görüldüğü gibi bakteriyel lakkazların daha geniş pH aralığında aktif ve daha stabil olabileceği bildirilmiştir (Singh 2007). Bununla birlikte, genellikle alkali-toleranslı bakteriyel lakkazların çoğu *Bacillus* kaynaklıdır (Ruijsenaars and Hartmans 2004, Lu 2012).

B. licheniformis SO8'den saflaştırılan lakkaz enziminin sıcaklık profili incelendi ve optimum sıcaklık 70°C olarak tespit edildi. Aynı zamanda enzimin, 20°C ila 90°C sıcaklık aralığında %85 üzerinde aktiviteye sahip olduğu görüldü. Literatür çalışmalarına bakıldığında; benzer şekilde Dubé et al. (2008) *S. coelicolor*'dan saflaştırdıkları lakkaz enziminin optimum sıcaklığını 70°C, Mehandia et al. (2020) *Alcaligenes faecalis*'den saflaştırdıkları lakkazın optimum sıcaklığını 80°C, Safary et al. (2016), rekombinant *Bacillus* lakkazının maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığı 50°C olarak belirlemişlerdir. *B. licheniformis* SO8 lakkaz enziminin 20°C ile 90°C aralığında stabil sıcaklığına bakıldığında; 60°C sıcaklık değeri dışında diğer çalışılan tüm sıcaklıklarda 90 dk inkübasyon sonunda aktivitesinin %70'inden fazlasını koruduğu tespit edildi. Suziki ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, *S. lavendulae* bakterisinden elde edilen termostabil lakkaz enzimi 70°C'de 20 dk inkübe edilmiş ve enzimin başlangıçtaki aktivitesinin korunduğunu gözlemlemişlerdir. 100 dk'nın sonunda ise enzimin aktivitesinin %50'sini kaybettiğini görmüşlerdir (Suzuki et al. 2003). *B. licheniformis* lakkazı 80°C'de 1 saat inkübasyondan sonra aktivitesinin yaklaşık 92%'sini (Koschorreck 2008); termostabil fungal *C. Cladosporioides* lakkazı ise, 80°C'de 5 dakika sonra aktivitesinin 52%'sini (Halaburgi 2011) kaybederek daha düşük bir termostabilite göstermiştir. Tuza tolerant bir bakteri olan *Halobacillus halophilus*'den elde edilen lakkaz enziminin 67°C'de maksimum aktivite gösterdiği bununla birlikte 30-40°C sıcaklıklarında çok az aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık yüksek olmasına rağmen düşük sıcaklıklarda aktivitesinin düşük olması bu enzimin kullanımının pratik olmayacağını göstermektedir (Bhuvaneshwari ve diğ. 2015). Literatürdeki diğer çalışmalar ile karşılaştırıldığında *B. licheniformis* SO8 lakkaz enziminin sıcaklığına toleransının fazla olduğu

ve geniş bir sıcaklık aralığında kararlılık gösterdiği görülmektedir.

Endüstriyel proseslerde çeşitli metal iyonlarının yüksek konsantrasyonda kullanımları pek çok lakkazı etkisiz hale getirir; özellikle fungus lakkazlarının çalışmasını sınırlar ve aktivitelerini kaybetmelerine neden olabilir (Baldrian 2006). Bu nedenle, belirtilen koşullar altında kullanılacak yeni lakkazların araştırılması bu alanda önemli bir hedeftir ve bu iyonlara karşı dayanıklı enzimler yine bu alanda önemli bir avantaj sağlar (Sondhi 2014). Düşük konsantrasyonlarda (1 ve 5 mM) Fe^{2+} ve Mn^{2+} iyonlarının lakkaz enziminin aktivitesini artırdığı, diğer metal iyonlarının varlığında ise enzimin aktivitesini yüksek oranda koruduğu tespit edildi. 10 mM'lık konsantrasyonda ise Ca^{2+} ve Zn^{2+} iyonlarının varlığında enzimin aktivitesini sırayla %61 ve %88 oranlarında koruduğu, Fe^{2+} varlığında ise enzimin aktivitesini %67 oranında artırdığı, diğer metal iyonlarının varlığında ise kararlı kaldığı görüldü. *B. licheniformis* SO8 lakkazının pratik uygulamaları için avantajlı olacak şekilde yaygın çevresel metal iyonlarına karşı toleranslı olduğu ve bu özelliği ile biyoremediasyon gibi endüstriyel uygulamalar için büyük bir potansiyele sahip olduğu görülmektedir.

B. licheniformis SO8 lakkaz enziminin aktivitesi üzerine bazı yüzey aktif maddelerin (Triton X-100, Tween-80 ve Tween-20) ve kimyasalların (SDS, NaF ve EDTA) etkileri araştırıldı. Düşük konsantrasyonda (5mM ve %1) kullanılan tüm yüzey aktif maddeler ve kimyasalların varlığında enzimin kararlılık gösterdiği, EDTA ve Tween-80 ile de aktivitesinin arttığı; 10 mM ve %5'lik konsantrasyonlarda Triton X-100'ün varlığında enzimin %60 oranında inhibe olduğu, diğer kullanılan kimyasalların varlığında ise kararlılığını yüksek oranda koruduğu; 20 mM ve %10'luk konsantrasyonlarda ise enzimin aktivitesini %19-60 oranında koruduğu tespit edildi. İyonik sürfaktanların çoğu durumda lakkaz aktivitesini inhibe ettiği (Zhang 2013) bazı lakkazlarında aktivitesinin sürfaktanlar tarafından uyarıldığı bildirilmiştir (Diamantidis 2000, Sondhi 2014, Lu 2013). Benzer şekilde non-iyonik yüzey aktif madde Triton X-100 ile lakkaz aktivitesinin uyarıldığı (Ji 2009, Gu 2014) veya Triton X-100, Tween-20, and Tween-80 varlığında stabilitesini yüksek oranda koruyan lakkazlarda (Sondhi 2014) bildirilmiştir. Sürfaktanların varlığında *B. licheniformis* SO8 lakkazının stabilitesini yüksek oranlarda koruması, tekstil endüstrisinden çıkan atıklardaki boyaların giderilmesi gibi endüstriyel atıkların arıtılmasında daha kullanışlı olmasını sağlayabilir. Bildirilen lakkazların çoğunun, bazı istisnaları dışında (Lu 2013; Zhang 2013) EDTA tarafından güçlü bir şekilde inhibisyona uğramadığı bildirilmiştir (Lu et al., 2013). Enzim üzerinde inhibisyon etkisinin olmaması, EDTA'nın lakkazdaki yapısal bakır atomlarına olası düşük erişilebilirliği ile açıklanmıştır (Safary 2016). Florür iyonları lakkazların genellikle güçlü inhibitörleridir (Dube 2008). Bununla birlikte mevcut görüşlere göre, lakkazın sodyum florür tarafından inhibisyon

mekanizmaları pH'ya bağımlıdır. *B. licheniformis* SO8 lakkazına benzer şekilde; *Streptomyces viridochromogenes* rekombinant lakkaz enziminin, NaF'ye karşı kararlılık gösterdiği ve alkalın pH'da aktif olduğu görülmüştür (Trubitsina 2015).

B. licheniformis SO8'den saflaştırılan lakkaz enziminin çeşitli fenolik ve fenolik olmayan substratlara olan spesifitesini belirlemek amacıyla ABTS, guaiakol, tannik asit ve L-tirozin substratları kullanıldı. Lakkaz enziminin ABTS substratı için en yüksek aktiviteyi gösterdiği tespit edildi. Enzimin diğer substratlara spesifitesi sırasıyla guaiakol (%60), tannik asit (%52) ve L-tirozin (%9) olarak belirlendi. *B. licheniformis* SO8 lakkazının, ABTS 'yi oksitleme yeteneği ve tirozine de düşük spesifite göstermesi literatürdeki çalışmalarla uyumlu bir şekilde gerçek bir lakkaz özelliğine sahip olduğunu göstermektedir (Sondhi et al. 2015).

B. licheniformis SO8 bakterisinden elde ettiğimiz lakkaz enzimi kullanılarak kinetik çalışmalar gerçekleştirildi. Lakkaz enziminin ABTS substratı için elde edilen K_m değeri 110 μM , $V_{\max}$ değeri 19,6 $\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{dk}^{-1}$, K_{cat} değeri 0,048 s^{-1} ve K_{cat}/K_m değeri 0,44 $\text{s}^{-1}.\text{mM}^{-1}$ olarak belirlendi. *Bacillus* sp. HR03 (K_m değeri 0,535 mM) (Mohammadian 2010), *Bacillus tequilensis* SN4 (K_m değeri 1,404 $\pm$ 0.08 mM) (Sondhi 2014), *Alcaligenes faecalis* (K_m değeri 500 μM) (Mehandia et al. 2020) ve *Thioalkalivibrio* sp. (K_m değeri 4,6 $\pm$ 1.1 mM) (Ausec 2015) gibi lakkazlarla karşılaştırıldığında *B. licheniformis* SO8 lakkazının ABTS substratı için daha yüksek afinitiyeye sahip olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, lakkazların oksidasyon etkinliğinin ve substrat afinitesinin; fenolik halkanın substitüsyonuna, doğasına ve kullanılan substratın tipine önemli ölçüde bağlı olduğu bilinmektedir (Mohammadian et al. 2010).

Sentetik boyalar tekstil, kağıt, kozmetik ve ilaç endüstrilerinde giderek artan bir kullanım alanına sahiptirler. Kimyasal olarak antrakınon, azo, heterosiklik, tri-enilmetan boyları olarak sınıflandırılan bu bileşikler ciddi çevre kirliliğine neden olmaktadır. Çoğu toksik, mutajenik, kanserojen ve bozulmaya karşı dayanıklıdır (Asgher 2008, Kumar et al. 2012). Enzimatik katalizle biyoremediasyonunda kullanılan enzimlerden birisi olan lakkazlar, oksidatif reaksiyonlar sayesinde, aromatik aminler gibi fenolik kontaminantları zararsız veya daha az zararlı ürünlere detoksifiye edebilirler (Kumar et al. 2012). Boyar maddelerin dekolorizasyonu bakteriyel lakkazların en umut verici biyoteknolojik uygulamalarından birisidir. Bazı azo ve antrakınonik boyalar gibi büyük boyutlu veya yüksek redoks potansiyeline sahip çok sayıda substrat, doğrudan lakkaz ile oksitlenemez. Bu substratlar, lakkaz ile aralarında mediatör adı verilen bir "elektron mekiği" gerektirir. ABTS, enzim etkisini artıran bir lakkaz substrat mediatörü olarak görev yaptığı belirlenen ilk sentetik mediatördür. ABTS'nin lakkazın boya renklerinin giderilmesindeki performansını artırıcı etkisi bilinmektedir ve son yıllarda da bu alanda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Guan 2018, Jeon and park

2020). *B. licheniformis* SO8 lakkazı ile dekolorizasyon prosesi, enzimin oksidatif etkisini arttırmak için 0,5 mM ABTS varlığında gerçekleştirildi. Çalışılan tüm koşullar (55 °C'de 15, 30, 60 ve 120 dakika süreyle pH 5,0- pH 7,0- pH 9,0 gibi farklı pH değerlerinde) altında saflaştırılan *B. licheniformis* SO8 lakkazı ile test edilen azo boyaların renk gideriminin yaklaşık olarak %1-40'luk oranlarında olduğu belirlendi. pH 9,0'da 120 dakika sonundalakkaz enziminin asit kırmızısı 27'i %37,467, metilen mavisini % 36,68 ve asit siyah 1 boyar maddesini ise %22,3 oranı ile en iyi renk giderimini sağladığı görüldü. Reaktif siyah 5, Kongo kırmızısı ve Turuncu boyalarının üzerinde ise çok fazla etki göstermediği belirlendi. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, en yüksek boya gideriminin pH 9,0'da da asit kırmızı 27 boyası için %37,467 oranında olduğu tespit edildi. İnkübasyon süresi arttıkça boyaların renklerinin yüzde gideriminin de daha fazla olduğu görüldü.

Sonuç olarak bu tez çalışması kapsamında, *Bacillus licheniformis* SO8 suşunun yüksek oranda lakkaz aktivitesine sahip olduğu belirlendi. *Bacillus licheniformis* SO8'dan lakkaz enzimi pH 9,0'da, 1,0:1,0 (ham enzim çözeltisi:t-bütanol oranı) ve %70 doymuş amonyum sülfat kullanılarak uygulanan TPP yöntemi ile %102,07 verimle 5,65 kat saflaştırıldı. Saflaştırılan lakkaz enziminin pH 2,0-11,0 ve 20-90°C sıcaklık aralığında aktif ve stabil olduğu tespit edildi. Ayrıca enzimin çeşitli metal iyonlarının (Li^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , K^+ , Zn^{2+}), bazı kimyasalların/inhibitörlerin (NaF ve EDTA) ve yüzey aktif maddelerin (SDS, Triton X-100, Tween-20, Tween-80) varlığında aktivitesini artırdığı veya büyük oranda koruduğu görülmüştür. Her bir endüstriyel işlem kullanılan biyo-katalizörün tipik spesifik özelliklerini gerektirdiğinden enzimlerin karakterizasyonu, uygun biyoteknolojik uygulamalarının tanımlanması için çok önemlidir. Bu nedenle yeni kaynaklardan lakkazların tanımlanması ve karakterizasyonu mevcut biyoteknolojik uygulamaları geliştirebilir. Bu nedenle, *Bacillus licheniformis* SO8 lakkaz enziminin; geniş bir sıcaklık ve pH aralığındaki aktivitesi ve kararlılığı, çeşitli metal iyonları, inhibitör ve yüzey aktif maddeler varlığındaki nispeten yüksek kararlılığı ve dekolorizasyonda kullanılabilme potansiyeli bu enzimi biyoremediasyon başta olmak üzere pekçok endüstriyel uygulamalar için uygun bir aday haline getirmektedir.

KAYNAKLAR

- Ahn, M.Y., Dec, J., Kim, J.E., Bollag, J.M., 2002. Treatment of 2,4-dichlorophenol polluted soil with free and immobilized laccase. *J Environ Qual*, 2002; 31: 1509-15.
- Aksu, Z. ve Çağatay, S.S., 2006. Investigation of biosorption of Gemazol Turquoise Blue-G reactive dye by dried *Rhizopus arrhizus* in batch and continuous systems. *Sep. Purif. Technology*, 48, 1, 24-35p.
- Akhmaloka, A., 2006, Ribotyping Identification of *Thermophiles* from Gedongsongo hot spring
- Alcalde, M., 2007. Laccases: Biological functions, molecular structure and industrial applications, industrial enzymes structure, function and applications. J. Poliana, AP. MacCabe (Eds), Springer, Netherlands, 461-70.
- Alçıçek, Esra, 2017, Van Gölü'nden alınan sıcak su örneklerinden termofilik bakterilerin izolasyonu, identifikasyonu, *Bacillus licheniformis* EA10'dan proteaz enziminin üçlü faz ayırma sistemi (TPP) ile saflaştırılması ve karakterizasyonu, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum.
- Alexandre, G., Zhulin, I.B., 2000. Laccases are widespread in bacteria. *Trends Biotechnol*, 18, 41-42.
- Altıntaş, B., 2011. Tekstil boyalarının lakkaz enzimi kullanılarak atık sulardan giderilmesi. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Arık, B., Körlü, A.E., ve Duran, K., 2008. Lakkaz Enzimlerinin Tekstilde Kullanım Alanları. *Ege Üniversitesi, Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi* 2: 17-22.
- Arregui L., Marcela Ayala, Ximena Gómez-Gil, Guadalupe Gutiérrez-Soto, Carlos Eduardo Hernández-Luna, Mayra Herrera de los Santos, Laura Levin, Arturo Rojo-Domínguez, Daniel Romero-Martínez, Mario C. N. Saparrat, Mauricio A. Trujillo-Roldán and Norma A., Valdez-Cruz Rregui et al. 2019. Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation *Microb Cell Fact*, 18-200.
- Arias, M.E., Arenas, M., Rodríguez, J., Soliveri, J., Ball, A.S. and Hernández, M., 2003. Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Appl. Environ. Microbiol*, 69:1953–1958.
- Asgher M., Bhatti H.N., Ashraf M., Legge R.L., 2008. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. *Biodegradation* 19(6):771–783.
- Ausec L., Crnigoj M., Snajder M., Ulrih N.P., Mandic-Mulec I., 2015. Characterization of a novel high-pH-tolerant laccase-like multicopper oxidase and its sequence diversity in *Thioalkalivibrio* sp. *Appl Microbiol Biotechnol* 99(23):9987–9999.
- Aytaç, F., 2012. β -Galaktozidazın Çeşitli Taşıyıcılarda immobilizasyonu ve bazı özelliklerinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Bains, J., Capalash, N. and Sharma, P., 2003. Laccase from a nonmelanogenic, alkalotolerant α -proteobacterium JB isolated from industrial waste water drained soil. *Biotechnol. Lett*, 25:1155–1159.
- Baldrian, P., 2006. Fungal laccases currence and properties, *Fems Microbiol Rev.*, 30: 215-242p.
- Barredo, J.L., 2005. Microbial Enzymes ve Biotransformations. Humana Pres, Totowa, New Jersey.

- Baser, İ., İnanıcı, Y., 1990. Boyarmadde Kimyası, Marmara Üniversitesi Yayınları 7-10. Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., 2014. Biyokimya. Palme Yayıncılık, 241-247p, Ankara.
- Bhuvaneshwari, J., Preethikaharshini, R., Amsaveni, V. and Kalaiselvi, M., 2015. Isolation, optimization and production of laccase from *Halobacillus halophilus*, IJBSANS, 2 (2), 41-47.
- Bilal M., Adeel M., Rasheed T., Zhao Y., Iqbal H. M. N., 2019. Emerging contaminants of high concern and their enzyme-assisted biodegradation – A review, Environment International, 124, 336–353.
- Birge A., Alcicek E. A., Baltaci M. Ö., Sisecioglu M., Adiguzel A. , 2022. Purification and biochemical characterization of a new thermostable laccase from *Enterococcus faecium* A2 by a three-phase partitioning method and investigation of its decolorization potentia, Archives of Microbiology, 204:533.
- Birhanlı, E., 2008. Tekrarlı Kesikli İşlemlerle Lakkaz Üretimi. İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi.
- Blackwood, C.B., Waldrop, M.P., Zak, D.R., Sinsabaugh, R.L., 2007. Molecular analysis of fungal communities and laccase genes in decomposing litter reveals differences among forest types but no impact of nitrogen deposition, Environ. Microb., 9: 1306-1316.
- Block, H., Maertens, B., Spriestersbach, A., Brinker, N., Kubicek, J., Fabis, R., Labahn, J., Schaafer, F. 2009. Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC): A Review. Methods in Enzymology, 463, 439-442.
- Bozoğlu C., 2014. Ağrı Diyadin Kaplıcasından İzole Edilen Termofilik *Brevibacillus Sp.* (Z1) Bakterisinden Lakkaz Enziminin Saflaştırılıp, Karakterize Edilmesi ve Endüstride Kullanılabilirliğinin Araştırılması. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72, 248.
- Burbank, M.; Paszczynski, A.J., 2012, Protection of *Bacillus pumilus* spores by catalases. Appl. Environ. Microbiol., 78, 6413–6422.
- Camarero, S., Garcia, O., Vidal, T., Colom, J., Del Rio, J.C., 2004. Gutierrez A et al. Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system. Enzyme Microb Technol, 35: 113–20.
- Cantarelli C., Brenna, O., Giovanelli, G., Rossi, M., 1989. Beverage stabilization through enzymatic removal of phenolics. Food Biotechnol, 3: 203-13.
- Castro-Sowinski, S.; Martinez-Drets, G.; Okon, Y., 2002. Laccase activity in melanin-producing strains of *Sinorhizobium meliloti*. FEMS Microbiol. Lett., 209, 119–125.
- Chandra, R.P., Ragauskas, A.J., 2002. Evaluating laccase-facilitated coupling of phenolic acids to high-yield kraft pulps. Enzyme Microb Technol, 30: 855–61.
- Chauhan PS, Goradia B, Saxena A., 2017. Bacterial laccase: recent update on production, properties and industrial applications. 3 Biotech. Oct;7(5):323.
- Chefetz, B., Kerem, Z., Chen, Y., and Hadar, Y., 1997. Isolation and Partial Characterization of Laccase from A Thermophilic Composted Municipal Solid Waste. PII: S0038-0717(97)00199-5.

- Chefetz, B., Chen, Y. and Hadar, Y., 1998. Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification", *J Appl Environ Microbiol*, 64(9), 3175–3179.
- Cheng-Yu, C., Yu-Chun, H., Chien-Mei, W., Menghsiao, M., Wen-Hsiung, L., Chao-Hsun, Y., 2013. Properties of the newly isolated extracellular thermo-alkali-stable laccase from thermophilic actinomycetes, *Thermobifida fusca* and its application in dye intermediates oxidation Chenet *al.* *AMB Express*, 3.
- Claus, H., 2003. Laccases and their occurrence in prokaryotes, *Arch. Microbiol.*, 179 145–150.
- Colacino, F., and Crichton, R.R., 1997. Enzyme thermostabilization: the state of the rt. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 14: 211-277.
- Chew, K.W., T.C. Ling, P.L., 2018. Recent developments and applications of three-phase partitioning for the recovery of proteins, *Sep. Purif. Rev.*, 1–13.
- Collins, P.J., Kotterman, M.J.J., Field, J.A., 1996. Dobson ADW. Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by laccases from *Trametes versicolor*. *Appl Environ Microbiol*, 62: 4563–7.
- Couto, S. R., & Herrera, J. L. T., 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnology advances*, 24(5), 500-513.
- Çabuk A., Gedikli S., Aytar P., Buruk Y., Apohan E., Yeşilada Ö., Burnak N., 2014. *Trametes versicolor* ile lakkaz üretimi ve renk giderimi: Taguchi ve Box-Behnken Yöntemlerinin uygulaması. *Türk Biyokimya Dergisi*, *Türk J Bioch.* 39(3): 298-306.
- Çamur, A.E., 2010. *Trametes versicolor* tarafından sentezlenen biyopolimere tutuklu lakkaz enziminin bazı endüstriyel uygulamalarının araştırılması. Hacettepe Üniversitesi, Doktora Tezi.
- Çanakçı, S., Gönen, 2003. Kestanbol ve Diyardin kaplıcılarında termofilik bakteriler izolasyonu, moleküler yöntemlerle karakterizasyonu ve tanımlanması. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Karadeniz Teknik Üniversitesi., 57, 58.
- Daniel, R.M., and Cowan, D.A.C., 2000. Biomolecular stability and life at high temperatures.
- D'Annibale, A., Ricci, M., Quarantino, D., Federic, F., Fenice, M., 2004. *Panus tigrinus* efficiently removes phenols, color and organic load from olive-mill wastewater. *Res Microbiol*, 155: 596–603.
- Das, R., and Gerstein, M., 2000. The stability of thermophilic proteins: a study based on comprehensive genome comparison. *Funct. Integr. Genomics*, 1: 76-88.
- Dennison, C., Lovrien, R., 1997. Three phase partitioning: concentration and purification of proteins. *Protein expression and purification*, 11(2), 149-161.
- Diamantidis, G., Effosse, A., Potier, P., Bally, R., 2000. Purification and characterization of the first bacterial laccase in the rhizospheric bacterium *Azospirillum lipoferum*. *Soil Biol. Biochem*, 32: 919–927.
- Dobrev, V., Borian, Zhekov, and Georgi Dobrev, 2019, .Use of Aqueous Two-Phase and Three-Phase Partitioning Systems for Purification of Lipase Obtained in Solid-State Fermentation by *Rhizopus arrhizus*. *The Open Biotechnology Journal*, 13.
- Dias, A.A., Bezerra, R.M., Pereira, A.N., 2004. Activity and elution profile of laccase during biological decolorization and depolymerization of olive mill wastewater. *Biores Technol*, 92: 7-13.

- Dizge, G., 2007, *M. Trametes versicolor* beyaz curukcul fungusundan lakkaz enziminin saflaştırılması ve kısmi nitelendirilmesi, GYTE Muhendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, 50,52.
- Dube E., Shareck F., Hurtubise Y., Daneault C., Beauregard M., 2008. Homologous cloning, expression, and characterisation of a laccase from *Streptomyces coelicolor* and enzymatic decolourisation of an indigo dye. *Appl Microbiol Biotechnol* 79(4):597–603.
- Ducros, V., Brzozowski, A.M., Wilson, K.S., Brown, S.H., Ostegaard, P., Schneider, P., Yaver, D.S., Pedersen, A.H. and Davies, G.J., 1998. Crystal structure of the type- 2-cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 angstrom resolution. *Nat. Struct. Biol.* 5, 310-6p.
- Durán, N., Esposito, E., 2000. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Appl Cat B: Environ*, 28: 83–99.
- Eduardo Baltierra-Trejo, Liliana Márquez-Benavides, Juan Manuel, Sánchez-Yáñez. 2015. Inconsistencies and ambiguities in calculating enzyme activity: The case of laccase. *Journal of Microbiological Methods* 119, 126–131
- Eichlerova, I., Snajdr, J., ve Baldrian, P., 2012. Laccase Activity in Soils: Considerations for The Measurement of Enzyme Activity.
- Endo, K.; Hayashi, Y.; Hibi, T.; Hosono, K.; Beppu, T., Ueda, K., 2003. Enzymological characterization of EpoA, a laccase-like phenol oxidase produced by *Streptomyces griseus*. *J. Biochem.*, 133.
- Enguita, F.J.; Martins, L.O.; Henrique, A.O.; Carrondo, M.A., 2003. Crystal structure of a bacterial endospore coat component: a laccase with enhanced thermostability properties, *J. Biol. Chem.*, 21
- Erol, A., 2018, *Enterococcus faecium* A2'den Lakkaz enziminin üçlü faz ayırma sistemi ile saflaştırılması, karakterizasyonu ve biyoteknolojik uygulanabilirliğinin araştırılması. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum.
- Felby, C., Pedersen, L.S., Nielsen, B.R., 1997. Enhanced auto adhesion of wood fibers using phenol oxidases. *Holzforschung*, 51: 281–86.
- Fernandes, A.T.; Damas, J.M.; Todorovic, S.; Huber, R.; Baratto, M.C.; Pogni, R.; Soares, C.M.; Martins, L.O., 2010. The multicopper oxidase from the archaeon *Pyrobaculum aerophilum* shows nitrous oxide reductase activity. *Febs. J.*, 277, 3176–3189
- Fidan, S., Korcan, S.E., Ciğerci, İ.H., ve Erdoğan, S.F., 2012. Bazı Metallerin *Pleurotus* Türlerinin Boya Dekolorizasyonu ve Lakkaz, Mnp Enzim Aktiviteleri Üzerine Olan Etkisi. *Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Dergisi. AKÜ FEBİD* 12, 2012, 33-41.
- Freire, R.S., Durán, N., Kubota, L.T., 2001. Effects of fungal laccase immobilization procedures for the development of a biosensor for phenol compounds. *Talanta*, 54: 681–86.
- Galhaup, C., Goller, S., Peterbauer, C.K., Strauss, J. Haltrich, D., 2002. Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiology*, 148: 2159–2169.
- Gagaoua M., K. Hafid, 2016. Three phase partitioning system, an emerging nonchromatographic tool for proteolytic enzymes recovery and purification, *Biosensors Journal* 5 (1), 100134.

- Gedikli, S., Aytar, P., Çabuk, A., Ünal, A., Kolankaya, N., 2010. Lakkaz Enzimi ile Kot Boyar Maddesinin Dekolorizasyonu. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi C* 1: 59-70.
- Gedikli, 2011. Thermostable laccase from *Trametes troglia* and its ability in modification of kraft lignin *J. Microbiol. Biotechnol.* 25(8), 1361–1370.
- Gianfreda, L., Xu, F., Bollag, J., 1999. Laccase: A useful group of oxidoreductive enzymes, CRC Pres LLC,
- Giardina P, Faraco V, Pezzella C, Piscitelli A, Vanhulle S, Sannia G., 2010. Laccases: a never-ending story. *Cell Mol Life Sci.*;67:69–385.
- Golz-Berner, K., Walzel, B., Zastrow, L., Doucet, O., 2004. Cosmetic and dermatological preparation containing copperbinding proteins for skin lightening. *Int Pat Appl*, 64: 2788-93.
- Gu C.J., Zheng .F, Long L.K., Wang J., Ding S.J., 2014. Engineering the expression and characterization of two novel laccase isoenzymes from *Coprinus comatus* in *Pichia pastoris* by fusing an additional ten amino acids tag at N-terminus. *PLoS ONE*, 9,4.
- Guan Z.B., Luo Q., Wang H.R., Chen Y., Liao X.R., 2018. Bacterial laccases: promising biological green tools for industrial applications. *Cell Mol Life Sci* 75(19):3569–3592.
- Guan, Z., Zhang, N., Song, C., Zhou, W., Zhou, L., Zhau, H., Xu, C., Cai, Y., ve Liao, X., 2013. Molecular Cloning, Characterization and Dye Decolorizing Ability of A Temperature and pH Stable Laccase from *Bacillus subtilis*X1. *Appl Biochem Biotechnol.*172,3.
- Gunne, M.; Urlacher, V.B., 2012. Characterization of the alkaline laccase Ssl1 from *Streptomyces svaceus* with unusual properties discovered by genome mining. *PLoS ONE*, 7, e52360.
- Güven, R., 2011. Termofilik Bakteriler ve Biyoteknolojik Açıdan Önemli Bazı Enzimleri, *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 09, 1, 1-10.
- Gür, G. K., 2011 . *Pycnoporus Sanguineus*’ tan Lakkaz Cdna’larının Klonlanması, *Pichia Pastoris*’ te Ekspresyonu Ve Rekombinant Lakkazların Karakterizasyonu . Doctoral dissertation, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Ha, C., E., Bhagavan, N., 2011. Essentials of medical biochemistry: with clinical cases: Academic Press
- Halaburgi V.M., Sharma S., Sinha M., Singh T.P., Karegoudar T.B., 2011. Purification and characterization of a thermostable laccase from the ascomycetes *Cladosporium cladosporioides* and its applications. *Process Biochem* 46(5):1146–1152.
- Hakulinen, N., Kiiskinen, L.L., Kruus, K., Saloheimo, M., Paananen, A., Koivula, A., and Rouvinenn, J., 2002. Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site., *Nature Struct Biol.*, 9:601-5.
- Heinfling, A., A.T. Martinez, M.J., Martinez, M., Bergbauer, U., 1998. Szewzyk, Purification and characterization of peroxidases from the dye-decolorizing fungus *Bjerkandera adusta*, *FEMS Microbiol. Lett.* 165, 43e50.
- Horikoshi, K., 2011. Extremophiles Handbook, Springer.
- Huiping Liu , Yu Cheng , Bing Du , Chaofan Tong , Shuli Liang , Shuangyan Han , Suiping Zheng , Ying Lin, 2015. Overexpression of a novel thermostable and chloride-tolerant laccase from *Thermus thermophilus* SG0.5JP17-16 in *Pichia pastoris* and its application in synthetic dye decolorization, 10.

- Hullo, M.F.; Moszer, I.; Danchin, A.; Martin-Verstraete, I., 2001, CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase. *J. Bacteriol.*, 183, 5426–5430.
- Huttermann, A., Mai, C., Kharazipour, A., 2001. Modification of lignin for the production of new compounded materials. *Appl Microbiol Biotechnol*, 55: 387–94.
- Forootanfar H., Faramarzi M.A., Shahverdi A.R., Yazdi M.T, 2011. Purification and biochemical characterization of extracellular laccase from the ascomycete *Paraconiothyrium variabile*, *Bioresour. Technol.* 102 1808–1814.
- Imran, M., Asad, M.J., Hadri, S.H., ve Mehmood, S., 2012. Production and Industrial Applications of Laccase Enzyme. *Journal of cell Molecular Biology* 10 (1): 1-11.
- Jaenicke, R., Bohm, G., 1998. The stability of proteins in extreme environments. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8: 738-748.
- Janusz G., Anna Pawlik, Urszula Swiderska-Burek , Jolanta Polak, Justyna Sulej , Anna Jarosz-Wilkolazka and Andrzej Paszczynski., 2020, Laccase Properties, Physiological Functions, and Evolution. *Int. J. Mol. Sci.*, 21, 966.
- Jaiswal, N.N., Pandey, V.P., Pandey, U., Dwivedi, U.N. 2014. Purification of a thermostable alkaline laccase from papaya (*Caricapapaya*) using affinity chromatography. *International Journal of Biological Macromolecules* 72 326–332.
- Jeon S.J., Park J.H., 2020. Refolding, characterization, and dye decolorization ability of a highly thermostable laccase from *Geobacillus* sp. JS12. *Protein Expr Purif.*
- Ji G.L., Zhang H.B., Huang F., Huang X.R., 2009. Effects of nonionic surfactant Triton X-100 on the laccase-catalyzed conversion of bisphenol A. *J Environ Sci* 21(11):1486–1490.
- Jordaan, J., Pletschke, B.I., Leukes, W.D., 2004. Purification and partial characterization of a thermostable laccase from an unidentified Basidiomycete. *Enzyme and Microbial Technology* 34 635-641.
- Juang, R.S., Tseng, R.L., Wu, F.C., Lin, S.J., 1996. Use of chitin and chitosan in lobster shell wastes for colour removal from aqueous solutions. *J Environ Sci Health Part A Environ Sci Eng.* 31: 325–38.
- Kalaylı, E., Beyatlı, Y., 2003. *Bacillus* cinsi bakterilerin antimikrobiyal aktiviteleri, PHB üretimleri ve plazmid DNA'ları. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, Cilt:1, Sayı:12, Sayfa: 24-35.
- Karasu, S., Durak, M. Z., Toker, Ö. S., 2015. Gıda biyoteknolojisi ve biyoproseslerinde yeni gelişmeler, *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi* , 2 (5), 161-164.
- Keha, E. ve Küfrevioğlu. Ö.İ., 2012. *Biyokimya. Aktif yayınları*, 97-125, Erzurum.
- Kenealy, W., Klungness, J., Tshabalala, M., Horn, E., Akhtar, M., Gleisner, R., 2003. Modification of lignocellulosic materials by laccase. *TAPPI Fall Techn Conf, Engineering, Pulping & PCE&I Chicago, IL.*
- Ketnawa S, Rungraeng N, Rawdkuen S., 2017. Phase partitioning for enzyme separation: An overview and recent applications. *Int Food Res J*; 24(1): 1-24
- Kim HW, Lee SY, Park H, Jeon SJ , 2015. Expression, refolding, and characterization of a small laccase from *Thermus thermophilus* HJ6. *Protein Expr Purif* 114:37–43.
- Kocaer, F.O. ve Alkan, U., 2002. Boyarmadde Dçeren Tekstil Atıksularının Arıtım Alternatifleri, *Uludağ Üniversitesi Muhendislik-Mimarlık Fakultesi Dergisi*, cilt 7, sayı 1, 47-55s.

- Koschorreck, K., Richter, S.M., Swierczek, A., Beifuss, U., Schmid, R.D., Urlacher, V.B., 2008. Comparative characterization of four laccases from *Trametes versicolor* concerning phenolic C-C coupling and oxidation of PAHs. *Arch Biochem Biophys*; 3(1):213–219.
- Koschorreck, K.; Richter, S.M.; Ene, A.B.; Roduner, E.; Schmid, R.D.; Urlacher, V.B., 2008, Cloning and characterization of a new laccase from *Bacillus licheniformis* catalyzing dimerization of phenolic acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 79, 217–224.
- Kuhad, R.C., Singh, A., Eriksson, K.E.L., 1997. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell Wall. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 57: 47–125.
- Kumar VV, Sathyaselvabala V, Kirupha SD, Murugesan A, VidyadeviT, Sivanesan S., 2011. Application of response surface methodology to optimize three phase partitioning for purification of laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Sep Sci Technol* 46(12):1922–1930
- Kumar V.V., Sathyaselvabala V, Premkumar MP, Vidyadevi T, Sivanesan S., 2012. Biochemical characterization of three phase partitioned laccase and its application in decolorization and degradation of synthetic dyes. *J Mol Catal B: Enzym* 74:63–72.
- Kumar, H.D., Swati, S., 2001. *Modern Concepts of Microbiology*. Second Revised, Vikas Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi.
- Kumar, K.V., Ramamurthi, V., Sivanesan, S., 2006. Biosorption of malachite green, a cationic dye onto *Pithophora* sp. a fresh water algae, *Dyes Pigments*. 69:74- 79.
- Kumar, V.V., Sathyaselvabala, V., Kirupha, S.D., Murugesan, A., Vidyadevi, T. & Sivanesan S., 2011. Application of response surface methodology to optimize three phase partitioning for purification of laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Sep. Sci. Technol.* 46, 1922–1930. DOI: 10.1080/01496395.2011.583306
- Kunamneni, A., Francisco J Plou, Antonio Ballesteros, Miguel Alcalde, 2008, Laccases and their applications: A patent review *Recent Pat Biotechnol* .;2(1):10-24 doi: 10.2174/187220808783330965.
- Labat, E., Morel, M.H., Rouau, X., 2001. Effect of laccase and manganese peroxidase on wheat gluten and pentonans during mixing. *Food Hydrocoll*, 15: 47- 52.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680.
- Lang, G., Cotteret, J., 1999. Hair dye composition containing a laccase. *Int Pat Appl*, 53: 357-63.
- Liu Y.H., Ye M., Lu Y., Zhang X., Li G., 2011. Improving the decolorization for textile dyes of a metagenome-derived alkaline laccase by directed evolution. *Appl Microbiol Biotechnol* 91(3):667–675.
- Liu, Y., Yan M., Huang, J., 2015. Three-Phase Partitioning for Purification of Laccase Produced by *Coriolopsis troglodytes* under Solid Fermentation. *American Journal of Food Technology* 10 (3): 127-134.
- Lopez-Garcia, P., 1999. DNA supercoiling and temprature adaptation: a clue to early diversification of life. *J. Mol. Evol*, 49: 439-452.
- Lu, L., Zhao, M., Wang, T. N., Zhao, L. Y., Du, M. H., Li, T. L., & Li, D. B., 2012. Characterization and dye decolorization ability of an alkaline resistant and organic solvents tolerant laccase from *Bacillus licheniformis* LS04. *Bioresource Technology*, 115, 35-40.

- Machczynski, M.C.; Vijgenboom, E.; Samyn, B.; Canters, G.W., 2004. Characterization of SLAC: A small laccase from *Streptomyces coelicolor* with unprecedented activity. *Protein Sci.*, 13, 2388–2397.
- Majeau, J.A., Brar, S.K., Tyagi, R.D., 2010. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresour. Technol.* 101, 2331–2350.
- Marguet, E., Forterre, P., 1994. DNA stability at temperature typical for hyperthermophiles. *Nuc. Acid. Res.*, 22: 1681-1686.
- Martele, Y., Callewaerta, K., Naessens, K., Van, D.P., Baetsb, R., Schacht, E., 2003. Controlled patterning of biomolecules on solid surfaces. *Mater Sci Eng Biomim Mater Sens Syst*, 23: 341–45.
- Maugeri, T.L., Gugliandolo, C., Caccamo, D., Stackebrandt, E., 2001. A polyphasic taxonomic study of thermophilic bacilli from shallow, marine vents. *Systematic and applied microbiology*. 24(4): p. 572-587.
- Mayer, A.M., ve Staples, R.C., 2002. Laccase: New Functions for an Old Enzyme. *Phytochemistry* 6, , 551-565.
- McKay, G., 1979. Waste colour removal from textile effluents. *Am Dyest Report*, 68: 29-36.
- Ming-Qiang, Ai., Fang-Fang, W., Feng H., 2015. Purification and Characterization of a
- Mehandia S., Sharmaa S.C., Arya S. K., 2019. Isolation and characterization of an alkali and thermostable laccase from a novel *Alcaligenes faecalis* and its application in decolorization of synthetic dyes, *Biotechnology Reports* 25, e00413
- Minussi, R.C., Pastore, G.M., Durán, N., 2002. Potential applications of laccase in the food industry. *Trends Food Sci Technol*, 13: 205–16.
- Mishra, G., Tripathy, M., 1993. A critical review of the treatments for decolourization of textile effluent. *Colourage*, 1993; 40: 35–8.
- Miyazaki, K., 2005. A hyperthermophilic laccase from *Thermus thermophilus* HB27. *Extremophiles*, 415–425
- Mohammadian M., F.-R. Mehrnoosh, N. Mollania, B.-D. Arastoo, K. Khajeh, 2010, Enhanced expression of a recombinant bacterial laccase at low temperature and microaerobic conditions: purification and biochemical characterization, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37. 863.
- Mondal K, Gupta MN, Roy I., 2006. Affinity-based strategies for protein purification. *Anal Chem* 78:3499–3504
- Morozova, O.V., Shumakovich, G.P., Shleev, S.V. and Yaropolov, Y.I., 2007, Laccase mediator systems and their applications, *Applied Biochemistry and Microbiology*, vol:43, 5:523-35.
- Mustafa, R., Muniglia, L., Rovel, B., 2005. Girardin M. Phenolic colorants obtained by enzymatic synthesis using a fungal laccase in a hydroorganic biphasic system. *Food Res Int*, 38: 995-1000.
- Naveen P., Shraddha Shahane, Shivam, Ria Majumdar, Umesh Mishra, 2019. Mode of action, properties, production, and application of laccase: A Review Recent Pat Biotechnol, 19-32.
- Niladevi, K.; Sheejadevi, P.; Prema, P., 2008, Strategies for enhancing laccase yield from *Streptomyces psammotus* and its role in mediator-based decolorization of azo dyes. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 151, 9–19.

- Niladevi, K.N., Jacop, N., Prema, P., 2008. Evidence for A Halotolerant-Alkaline Laccase in *Streptomyces psammoticus*: Purification and Characterization. *Bioresource Technology*, 43 654-660.
- Nyanhongo, G.S., Gomes, J., Gübitz, G.M., Zvauya, R., Read, J., Steiner, W., 2002. Decolorization of Textile Dyes by Laccase from A Newly Isolated Strain on *Trametes modesta*. *Water Research* 36, 1449-1456.
- Nyanhongo, G.S., Rodríguez, C.S., Gübitz, G.M., 2006. Coupling of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) metabolites onto humic monomers by a new laccase from *Trametes modesta*. *Chemosphere*, 64(3): 359-70.
- Ossola, M., Galante, Y.M., 2004. Scouring of flax rove with the aid of enzymes. *Enzyme Microbial Technol*, 34: 177–86.
- Ölmez, S., 2017, Nevşehir Kozaklı kaplıcalarından izole edilen termofilik bakterilerin izolasyonu, identifikasyonu, *Bacillus licheniformis* SO7'den α -amilaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum.
- Palanisami, S.; Saha, S.K.; Lakshmanan, U., 2010, Laccase and polyphenol oxidase activities of marine cyanobacteria: A study with Poly R-478 decolourization. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 26, 63–69.
- Patel H., Gupte S., Gahlout M., Gupte A., 2014, Purification and characterization of an extracellular laccase from solid-state culture of *Pleurotus ostreatus* HP-1, 3 *Biotech*, 4 (1), 77-84.
- Pawlik, A.; Wojcik, M.; Rulka, K.; Motyl-Gorzel, K.; Osinska-Jaroszuk, M.; Wielbo, J.; Marek-Kozaczuk, M.; Skorupska, A.; Rogalski, J.; Janusz, G., 2016, Purification and characterization of laccase from *Sinorhizobium meliloti* and analysis of the lacc gene. *Int. J. Biol. Macromol.*, 92, 138–147
- Pazarlıoğlu, N.K., Sarıışık, M., Telefoncu, A., 2005. Laccase: production by *Trametes versicolor* and application to denim washing. *Process Biochem*, 40: 1673–78.
- Peter K. Robinson., 2015. *Enzymes: principles and biotechnological applications*. Essays in Biochemistry volume 59
- Petrie B., McAdam E. J., Scrimshaw M. D., Lester J. N., Cartmell E., 2013, Fate of drugs during wastewater treatment, *TrAC – Trends in Analytical Chemistry*, 49, 145–159.
- Pike, R. N., and Dennison, C., 1989. Protein fractionation by groups exposed to the outside, in unfolded vs folded three phase partitioning (TPP) in aqueous/t-butanol mixtures. conformation. In general, if proteins are wanted to be Biotech. *Bioeng.* 33, 221–228
- Pointing, S.B., 2001. Feasibility of bioremediation by whiterot fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*, 57: 20–33.
- Polaina, J., MacCabe, A.P., 2007. *Industrial enzymes: structure, function and applications*, Kluwer Academic Publishers Group, 654p.
- Poots, V.J.P., McKay, J.J., 1976. The removal of acid dye from effluent using natural adsorbents- Peat. *Water Res*, 10: 1061–66.
- Przybycien TM, Pujar NS, Steele LM., 2004. Alternative bioseparation operations: life beyond packed-bed chromatography. *Curr Opin Biotechnol* 15:469–478
- Qiao, W., Chu, J., Ding, S., Song, X., & Yu, L. 2017. Characterization of a thermo-alkali-stable laccase from *Bacillus subtilis* cjp3 and its application in dyes decolorization. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 52(8), 710-717.

- Querol, E., Perez-Pons, J.A. and Mozo-Villarians, A., 1996. Analysis of protein conformational characteristics related to thermostability. *Protein Eng*, 9: 265-271.
- Rachana, C., Jose, V., 2014. Three phase partitioning-a novel protein purification method. *Int. J. ChemTech Res*, 6(7), 3467-3472.
- Rajeeva S., Lele S.S., 2011. Three-phase partitioning for concentration and purification of laccase produced by submerged cultures of *Ganoderma* sp. WR-1. *Biochem Eng J*.
- Rawdkuen, S., Chaiwut, P., Pintathong, P. ve Benjakul, S., 2010. Calotropis procera lateksten proteazın üç fazlı bölünmesi. *Biyokimya Mühendisliği Dergisi*, 50 (3), 145-149.
- Reinhammar, B., 1984, "Laccase", In copper proteins and copper enzymes, Lontie, R.; Ed. CRC Press, Boca Raton, 3 1–35.
- Reiss, R.; Ihssen, J.; Thöny-Meyer L., 2011. *Bacillus pumilus* laccase: A heat stable enzyme with a wide substrate spectrum. *BMC Biotechnol.*, 11, 9. 88.
- Reiss, R., Ihssen J., Richter M., Eichhorn E., Schilling B., Thöny-Meyer L. 2013. Laccase versus laccase-like multi-copper oxidase: a comparative study of similar enzymes with diverse substrate spectra. *PLoS One*. 3;8(6):e65633.
- Rey, M.W., Ramaiya, P., Nelson, B.A., Brody-Karpin, S.D., Zaretsky, E.J., Tang, M., Lopez de Leon, A., Xiang, H., Gusti, V., Clausen, I.G., Olsen, P.B., Rasmussen, M.D., Andersen J.T., Jorgensen, P.L., Larsen, T.S., Sorokin, A., Bolotin, A., Lapidus, A., Galleron, N., Ehrlich, S.D., Berka, R.M., 2004. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome Biol*. 5(10):R77.
- Rey, Michael W., et al., 2004. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome biology* 5.10 : 1-12
- Riu, J., Schönsee, I., Barcelo, D., 1998. Determination of sulfonated azo dyes in groundwater and industrial effluents by automated solid-phase extraction followed by capillary electrophoresis/mass spectrometry. *J. Mass Spectrom*, 33: 653–63.
- Riva S., 2016. Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends Biotechnol.*, 24:219–26.
- Riva, S. 2006. Laccases: blue enzymes for green chemistry, *Trends Biotechnol.*, 24:5 219–226.
- Roberts, S.A., Wildner, G.F., Grass, G., Weichsel, A., Ambrus, A., Rensing, C. Montfort, W.R., 2003. A labile regulatory copper ion lies near the T1 copper site in the multicopper oxidase CueO. *J Biol Chem*, 278: 31958–31963
- Rodriguez-Couto, S., Gundin, M., Lorenzo, M., Sanroman, M.A., 2002. Screening of Supports and Inducers for Laccase Production by *Trametes Versicolor* in Semi Solid State Conditions. *Process Biochemistry* 38, 249-255.
- Ruijsenaars, H.J., ve Hartmans, S., 2004. A Cloned *Bacillus halodurans* Multicopper Oxidase Exhibiting Alkaline Laccase Activity. *Appl Microbiol Biotechnol*, 65:177– 182.
- Saito, T., Hong, P., Kato, K., Okazaki, M., Inagaki, H., Maeda, S., ve Yokogawa, Y., 2003. Purification and Characterization of An Extracellular Laccase of A Fungus (Family Chaetomiaceae) Isolated from Soil. *Enzyme and Microbial Technology* 33, 520- 526.
- Safary A., Moniri R., Hamzeh-Mivehroud M., Dastmalchi S., 2016. A strategy for soluble overexpression and biochemical characterization of halo-thermotolerant *Bacillus laccase* in modified *E. coli*. *J Biotechnol* 227:56–63.

- Sanchez-Amat, A.; Solano, F. 1997. A pluripotent polyphenol oxidase from the melanogenic marine *Alteromonas* sp shares catalytic capabilities of tyrosinases and laccases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 240, 787–792.
- Sondhi, S., Sharma, P., Saini, S., Puri, N., & Gupta, N., 2014. *Bacillus tequilensis* SN4'ten hücre dışı, termo-alkali-kararlı, metal toleranslı bir lakkazın saflaştırılması ve karakterizasyonu. *PloS bir* , 9 (5), e96951.
- Saparrat, M.C.N., Mocchiutti, P., Liggieri, C.S., Aulicino, M.B., Caffini, N.O., Balatti, P.A., Martinez, M.J., 2007. Ligninolytic Enzyme Ability and Potential Biotechnology Applications of the White-rot Fungus *Grammothele subargentea* LPSC. No: 436 Strain, *Proces Biochemistry* 43: 368-375.
- Scandurra, R., Consalvi, V., Chiaraluce, R., Politi, L. and Engel, P.C., 1998. Protein thermostability in extremophiles. *Biochimie*, 80: 933-941.
- Selinheimo, E., Kruus, K., Buchert, J., Hopia, A., Autio, K., 2006. Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheological properties of wheat doughs. *J Cereal Sci*, 43: 152–59.
- Setti, L., Giuliani, S., Spinozzi, G., Pifferi, P.G., 1999. Laccase catalyzed oxidative coupling of 3-methyl 2-benzothiazolinone hydrazone and methoxyphenols. *Enzyme Microb Technol*, 25: 285–89.
- Si, J.Q., 1993. Use of laccases in baking. *Int Pat Appl* WO9428728.
- Singh G., Capalash N., Goel R., Sharma P., 2007. A pH-stable laccase from alkali-tolerant gamma-proteobacterium JB: purification, characterization and indigo carmine degradation. *Enzyme Microb Technol* 41(6–7):794–799.
- Sharma D., Chaudhary R., Kaur J., Arya S. K., 2020, Greener approach for pulp and paper industry by xylanase and laccase, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 25 k101604
- Solano, F.; Lucas-Elío, P.; López-Serrano, D.; Fernández, E; Sanchez-Amat, 2001. A. Dimethoxyphenol oxidase activity of different microbial blue multicopper proteins. *FEMS Microbiol. Lett.*, 204, 175–181.
- Sondhi, S., Sharma1, P., Saini, S., Puri, N., Gupta, N., 2008. Purification and characterization of an extracellular, thermo-alkali-stable, metal tolerant laccase from *Bacillus tequilensis* SN4. *Plos one*
- Spadaro, J.T., Lorne, I., Renganathan, V., 1994. Hydroxyl radical mediated degradation of azo dyes: evidence for benzene generation. *Environ Sci Technol*, 28: 1389–93.
- Sunantha Ketnawa , Soottawat Benjakul , Oscar Martínez-Alvarez , Saroat Rawdkuen, 2014. Three-phase partitioning and proteins hydrolysis patterns of alkaline proteases derived from fish viscera. / *Separation and Purification Technology* 132, 174-181.
- Suzuki, T., Endo, K., Ito, M., Tsujibo, H., Miyamoto, K., Inamori Y., 2003. A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: Purification, characterization, nucleotide sequence, and expression. *Biosci Biotechnol Biochem*, 67: 2167-2175
- Suzuki, T., Endo, K., Ito, M., Tsujibo, H.; Miyamoto, K., Inamori, Y. A., 2003. Thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: Purification, characterization, nucleotide sequence, and expression. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67, 2167–2175.
- Şabahat, S., 2019. Termofilik *Bacillus licheniformis* bakterisinden fitaz enzim üretimi. Kafkas Üniversitesi, Yüksek lisans tezi

- Şaşmaz, S., 2009. Lakkaz ve lakkaz aracılı sistemler kullanılarak boyarmadde dekolorizasyonu, Fen Bilimleri Enstitüsü, Osmangazi Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi.
- Telke, A.A., Ghodake, G.S., Kalyanid, C., Dhanve, R.S., Govindwar, S.P., 2011. Biochemical Characteristics of A Textile Dye Degrading Extracellular Laccase from A *Bacillus* sp. *ADR*. *Bioresource Technology*. 102, 1752-1756.
- Thompson, M.J., Eisenberg, D., 1999. Transproteomic evidence of a loop-deletion mechanism for enhancing protein thermostability. *J. Mol. Biol*, 290: 595-604.
- Tolner, B., Poolman, B. and Konings, W.N., 1997. Adaptation of microorganisms and their transport systems to high temperatures, *Comp. Biochem. Physiol*, 118: 423-428.
- Trubitsina, L.I., Tishchenko, S.V., Gabdulkhakov, A.G., Lisov, A.V., Zakharova, M.V., Leontievsky, A.A., 2015. Structural and functional characterization of two-domain laccase from *Streptomyces viridochromogenes*. *Biochimie* 112 (2015) 151e159.
- Tuncer, M., 2010. Lakkaz, Kısım 2: Potansiyel Endüstriyel ve Biyoteknolojik Uygulamaları. Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 22: 65-103.
- Ueda, M., Shintani, K., Anjyui, A.N., Nakazawa, M., Kusuda, M., Nakatani, F., Kawaguchi, T., Tsujiyama, S., Kawanishi, M., Yagi, T., Miyatake, K., 2012. A Protein from *Pleurotus eryngii* var. *tuoliensis* C. J. Mou with strong removal activity against the natural steroid hormone, estriol: Purification, characterization and identification as a laccase. *Enzyme and Microbial Technology* 51, 402-407.
- Uthandi, S.; Saad, B. 2010. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76, 733–743.
- Uthandi, S.; Saad, B.; Humbard, M.A.; Maupin-Furlow, J.A., 2010. LccA, an archaeal laccase secreted as a highly stable glycoprotein into the extracellular medium by *Haloferax volcanii*. *Appl. Environ. Microbiol*, 76, 733–743.
- Venugopal, M., & Saramma, A., 2007. An alkaline protease from *Bacillus circulans* BM15, newly isolated from a mangrove station: characterization and application in laundry detergent formulations. *Indian journal of microbiology*, 47(4), 298.
- Vogt, G., Argos, P., 1997. Protein thermal stability: hydrogen bonds or internal packing. *Folding design*, 2: 40-46.
- Wang, C.H.L., Zhao, M., Lu, L., Wei, X.D. and Li, T.L., 2011. Characterization of spore laccase from *Bacillus subtilis* WD23 and its use in dye decolorization”, *Afr. J. Biotechnol.*, 10(11), 2186-2192, 14 .
- Wang, G., Xie, T., Liu, Z., Liu, Q., 2015. Structural insight into the oxidation of sinapic acid by CotA laccase. *Journal of Structural Biology* journal homepage: www.elsevier.com/locate/yjsbi Vieille, C., Burdette, D.S. and Zeikus, J.G., *Thermozymes*. *Biotechnol. Ann. Rev*, 2: 1-83.
- Wang, S., Chen, Q., Zhu, M., Xue, F., Li, W., Zhao, T., Li, G., Zhang, G., 2018. An extracellular yellow laccase from white rot fungus *Trametes* sp. F1635 and its mediator systems for dye decolorization. *Biochimie* 148 46e54
- Wiley J., 2002. *Colour chemistry*. New York-VCH Publishers, 92-100.
- Wiseman A., 1987. *Handbook of Enzymes Biotechnology*. Second Ed. Chapter 3. The Application of Enzymes in Industry,; 274-373.
- Xu, F., 1997. Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. *J. Biol. Chem*, 272: 924–928.

- Xu, F., 1999. Recent progress in laccase study: properties, enzymology, production and applications. In: Flickinger MC, Drew SW, eds. The encyclopedia of bioprocessing technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation. JohnWiley & Sons. New York, 1545-54.
- Yanmıs, D., Adıgüzel, A., Nadaroğlu, H., Güllüce, M., Demir, N., 2015. Purification and Characterization of Laccase from Thermophilic *Anoxybacillus Gonensis* P39 and its Application of Removal Textile Dyes. Romanian Biotechnological Letters, Vol. 21, No. 3, 11485
- Yarapolov, A.I., Skorobogatko, O.V., Vartanov, S.S. Varfolomeyev, S.D., 1994. Laccase properties, catalytic mechanism and applicability, Applied Biochemistry and Biotechnology, 49, 257-279.
- Yavuz, E., 2003. Genotypic characterization of extracellular enzyme producing thermophilic bacteria in Balçova Geothermal Region. İzmir Institute of Technology.
- Yang J., Li W., Bun Ng T., Deng X, Lin J., Ye X., 2017. Laccases: production, expression regulation, and applications in pharmaceutical biodegradation, Front. Microbiol.
- Yeşilada, Ö., Bırhanlı, E., Ercan, S. and Özmen, N., 2014, Reactive dye decolorization activity of crude laccase enzyme from repeated-batch culture of *funalia troglia*”, Turk J. Biol., 38(1), 103-110 .
- Yıldırım, V., 2014. *Aeribacillus pallidus* C10’den Alkalın Proteaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulanabilirliği, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Yoshida, H., J. Chem. Soc. 43 (1883) 472–486.
- Zaliha, R. N., Rahman, R. A., Baharum, S. N., Salleh, A. B., & Basri, M., 2006. S5 lipase: an organic solvent tolerant enzyme. Journal of Microbiology, 44(6), 583-590.
- Zhang, M., Wu, F., Wei, Z., Xiao, Y., Gong, W. 2006. Characterization and Decolorization Ability of A Laccase from *Panus rudis*. Enzyme and Microbial Technology 39,, Zollinger, H., , 92-97
- Zhang C., Zhang S., Diao H.W., 2013. Purification and characterization of a temperature- and pH-stable laccase from the spores of *Bacillus vallismortis* fmb-103 and its application in the degradation of malachite green. J Agric Food Chem 61(23):5468–5473.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Semih YILDIRGAN
Doğum Tarihi:	
Doğum Yeri:	
Uyruğu:	
Adres:	
Tel:	
Email:	
Eğitim	
Lise:	Mecidiye Anadolu Lisesi
Lisans:	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi
Yüksek Lisans:	Atatürk Üniversitesi

