



**ATIK KESTANE KABUĞU ORTAMINDA  
*Pallidibacillus pasinlerensis* SH27 SUĐU TARAFINDAN  
ÜRETİLEN PEROKSİDAZ ENZİMİ  
KATALİZÖRLÜĞÜNDE Ca/Zn BİMETALİK  
NANOPARTİKÜLLERİNİN ÜRETİMİ VE AZO BOYA  
GİDERİMİNDE KULLANIMI**

**İlknur DURUK**

**Danışman: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı**

**2025**

(Her hakkı saklıdır.)

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

**ATIK KESTANE KABUĞU ORTAMINDA *Pallidibacillus pasinlerensis* SH27 SUŞU  
TARAFINDAN ÜRETİLEN PEROKSİDAZ ENZİMİ KATALİZÖRLÜĞÜNDE Ca/Zn  
BİMETALİK NANOPARTİKÜLLERİNİN ÜRETİMİ VE AZO BOYA  
GİDERİMİNDE KULLANIMI**

(Production of Ca/Zn Bimetallic Nanoparticles Catalyzed by Peroxidase Enzyme Produced by  
*Pallidibacillus pasinlerensis* SH27 Strain in Waste Chestnut Shell Medium and Their use in  
Azo dye Removal)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İlknur DURUK

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Erzurum  
Temmuz, 2025



## FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Graduate School of Natural and Applied Sciences

T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü  
TEZ KABUL VE ONAY TUTANAĞI

*Atık Kestane Kabuğu Ortamında Pallidibacillus pasinlerensis SH27 Suşu Tarafından Üretilen Peroksidaz Enzimi Katalizörlüğünde Ca/Zn Bimetalik Nanopartiküllerinin Üretimi ve Azo Boya Gideriminde Kullanımı*

Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL danışmanlığında, İlknur DURUK tarafından hazırlanan bu çalışma, 27/06/2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik Bilim Dalı'nda Yüksek lisans tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (2/1/1)** ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU Atatürk Üniversitesi	Aslı ıslak imzalıdır
Danışman:	Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL Atatürk Üniversitesi	Aslı ıslak imzalıdır
Jüri Üyesi:	Dr. Öğr. Üyesi Berna GENÇ Gümüşhane 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.

Aslı ıslak imzalıdır  
**Prof.Dr. Alper NUHOĞLU**  
Enstitü Müdürü

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Graduate School of Natural and Applied Sciences

T.C.

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ****ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU**

Yüksek Lisans Tezi olarak Prof.Dr Ahmet ADIGÜZEL danışmanlığında sunulan “*Atık Kestane Kabuğu Ortamında Pallidibacillus pasinlerensis SH27 Suşu Tarafından Üretilen Peroksidaz Enzimi Katalizörlüğünde Ca/Zn Bimetalik Nanopartiküllerinin Üretimi Ve Azo Boya Gideriminde Kullanımı*” 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	8	30
Kuramsal Temeller	3	30
Materyal ve Metot	25	35
Araştırma Bulguları ve Tartışma	2	20
Sonuçlar ve Öneriler	0	20
Tezin Geneli	13	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.

Sunulan bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ettiğimizi beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
İlknur DURUK	Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL
27.6.2025	27.6.2025
İmza: Aslı ıslak imzalıdır	İmza: Aslı ıslak imzalıdır

\* Tez ile ilgili YÖKTEZ'de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

## TEŞEKKÜR

Sadece akademik değil, insani yönüyle ve yönlendirici tavrıyla her zaman daha iyisini yapmam için teşvik eden değerli danışmanım Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e teşekkür etmek, sadece bir akademik zorunluluk değil bilhassa içten gelen bir vefa borcudur. Akademik ve teknik desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU'na ve Dr. Aynur BABAGİL hocalarıma, laboratuvar arkadaşlarıma ve çalışmanın farklı aşamalarında katkı sağlayan Doç. Dr. Mustafa Özkan BALTACI'ya, Dr. Öğr. Üyesi Berna GENÇ ve Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Akif ÖMEROĞLU'na ve Arş. Gör. Şeyda ALBAYRAK'a teşekkür ederim.

Bu çalışmanın tamamlanmasında bana her zaman inanan, destekleyen ve sevgiyle yol gösteren babam Suat AYDIN, annem Sibel AYDIN ve kardeşlerim Muhammed AYDIN, Nazlıcan AYDIN ile Alperen AYDIN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Kıymetli evladımın bakımını sevgiyle üstlenen değerli kayınvalidem Seminay DURUK'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ama asıl teşekkür, hayatın sadece güzel anlarında değil, uykusuz gecelerinde, ertelenmiş planlarında ve paylaşılmış yüklerinde de yanımda olan sevgili eşim Muhammed DURUK'a

Ve henüz kelimeleri bilmese de varlığıyla bana güç veren en küçük yol arkadaşşıma, yeni doğan yavrum Seyit Hamza DURUK'a ithaf ediyorum.

İlknur DURUK

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### ATIK KESTANE KABUĞU ORTAMINDA *Pallidibacillus pasinlerensis* SH27 SUŞU TARAFINDAN ÜRETİLEN PEROKSİDAZ ENZİMİ KATALİZÖRLÜĞÜNDE Ca/Zn BİMETALİK NANOPARTİKÜLLERİNİN ÜRETİMİ VE AZO BOYA GİDERİMİNDE KULLANIMI

İlknur DURUK

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

**Amaç:** Tez çalışmamızda Erzurum Pasinler ilçesinden alınan kaplıca su örneklerinden izolasyonu yapılan bakteri suşlarının lignin peroksidaz enzimi üretebilme kapasiteleri tarandı. Lignin peroksidaz üreten suşlar kestane kabuğu içeren sıvı besiyerinde büyütülüp lignin peroksidaz enziminin saflaştırılması yapıldı. Saflaştırılan lignin peroksidaz enzimi ile CaO/ZnO bimetalik nanopartikül sentezi yapıldı. Fotokatalitik aktiviteye sahip CaO/ZnO-NP'leri aracılığıyla Allura Red (E129) boyasının gideriminin gerçekleştirilmesi amaçlandı.

**Yöntem:** Guaiacol içeren besiyeri ortamında lignin peroksidaz üretme kapasitesindeki suşlar tarandı ve en büyük zona sahip besiyerindeki bakteri izolatu ile devam edildi. Belirlenen izolatu besin kaynağı olarak atık kestane kabuğu içeren fermentasyon ortamında lignin peroksidaz enzim üretim optimizasyonu gerçekleştirildi. Besiyerinde üretilen enzim üçlü faz ayırma (TPP) yöntemi ile saflaştırılıp, CaO/ZnO-NP'lerinin green sentezinde kullanıldı. Elde edilen fotokatalitik özelliğe sahip CaO/ZnO-NP'leri aracılığıyla Allura-Red (E129) azo boya giderimi yapıldı.

**Bulgular:** Su örneklerinden toplam 10 izolat elde edildi ve bunlardan sadece ikisinde lignin peroksidaz enzim aktivitesi gözlemlendi. Lignin peroksidaz aktivitesi en iyi olan SH27 kodlu izolat için yapılan konvansiyonel ve moleküler analizler sonucunda *Pallidibacillus pasinlerensis* bakterisine %99,8 oranında benzediği belirlendi. Seçilen suş için besiyerinde karbon kaynağı olarak kullanılan atık kestane kabukları üzerinde miktar testleri yapıldı ve 30 g/L olarak belirlendi. Enzim üreten mikroorganizma, pH toleransına göre pH 9'da da en iyi üretimi verdi. Optimum sıcaklık 50 °C olarak belirlendi. Enzimin saflaştırma aşamasında %157,59 aktivite geri kazanımına sahip %40 amonyum sülfat doygunluğu ve homojenat:t-butanol (2:2) olarak tasarlanan enzim çözeltisi seçildi. CaO/ZnO-NP'lerinin yeşil sentezi gerçekleştirildi. Boya giderme aşamasında 0,5 g/L nanopartikül miktarı, 30 °C sıcaklık, 50 mg/L boya konsantrasyonu, pH 7, 30 dk'lık işlem süresi belirlendi ve %54,25 boya giderimi sağlandı.

**Sonuçlar:** *Pallidibacillus pasinlerensis* bakterisi ile kirlilik azaltma konusunda herhangi bir araştırma henüz gerçekleştirilmediğinden, *P. pasinlerensis*'in biyomediasyon potansiyelini belirlemek için gelecekte yapılacak çalışmalara yönelik bir fırsat sunmakta ve bakterinin potansiyelini açığa çıkarmasından dolayı özgün ve yenilikçidir. Ayrıca kestane kabuğu lifleri, doğal bir kaynak olması ve düşük maliyetli olması nedeniyle iyi bir alternatiftir. Kestane kabuğu lifleri biyolojik olarak parçalanabilir ve çevre dostu bir malzeme olduğundan, bu yöntem sürdürülebilir bir yaklaşımı da destekler.

**Anahtar Kelimeler:** lignin peroksidaz enzimi, üçlü faz ayırma sistemi, atık, kestane kabuğu *Pallidibacillus pasinlerensis*, CaO/ZnO-NP, azo boya, allura red, fotokatalitik

Temmuz 2025, 73 sayfa

## ABSTRACT

### MASTER THESIS

#### PRODUCTION OF Ca/Zn BIMETALLIC NANOPARTICLES CATALYZED BY PEROXIDASE ENZYME PRODUCED BY *Pallidibacillus pasinlerensis* SH27 STRAIN IN WASTE CHESTNUT SHELL MEDIUM AND THEIR USE IN AZO DYE REMOVAL

Ilknur DURUK

Supervisor: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

**Purpose:** In our thesis study, the lignin peroxidase production capacities of bacterial isolates isolated from hot spring water samples taken from the Pasinler district of Erzurum were screened. Lignin peroxidase producing strains were grown in a medium containing chestnut shell and the lignin peroxidase enzyme was purified. Green synthesis of CaO/ZnO-NP was performed with the purified lignin peroxidase enzyme. The removal of Allura Red (E129) dye is aimed by means of CaO/ZnO-NP, which is a photocatalytic nanomaterial.

**Method:** Strains with lignin peroxidase production capacity were screened in the medium containing guaiacol and continued with the bacterial isolate in the medium with the largest zone. Lignin peroxidase enzyme production optimization was performed in the fermentation medium containing waste chestnut shell as a nutrient source for the determined isolate. The enzyme produced in the medium was purified with the triple phase separation system (TPP) and used in the green synthesis of CaO/ZnO-NP. Allura-Red (E129) azo dye removal was performed by means of the obtained CaO/ZnO-NP with photocatalytic properties.

**Findings:** A total of 10 isolates were obtained from water samples and lignin peroxidase enzyme activity was found in only two of them. As a result of conventional and molecular analyzes performed for the isolate coded SH27 with the best lignin peroxidase activity, it was determined that it was 99.8% like *Pallidibacillus pasinlerensis* bacteria. Quantitative tests were performed on waste chestnut shells used as a carbon source in the medium for the selected strain and it was determined as 30 g/L. The enzyme-producing microorganism gave the best production at pH 9 according to its pH tolerance. The optimum temperature was determined as 50 °C. In the purification stage of the enzyme, an enzyme solution designed as 40% ammonium sulfate saturation and homogenate:t-butanol (2:2) with 157.59% activity recovery was selected. Green synthesis of CaO/ZnO-NP was performed. In the dye removal step, 0.5 g/L nanoparticle amount, 30 °C temperature, 50 mg/L dye concentration, pH 7, 30 min process time were determined, and 54.25% dye removal was achieved.

**Conclusions:** Since no research has been conducted yet on pollution reduction with *Pallidibacillus pasinlerensis* bacteria, it offers an opportunity for future studies to determine the biomediation potential of *P. pasinlerensis* and is original and innovative because it reveals the potential of the bacteria. In addition, chestnut shell fibers are a good alternative because they are a natural resource and are at a low cost. Since chestnut shell fibers are biodegradable and environmentally friendly material, this method also supports a sustainable approach.

**Keywords:** Lignin peroxidase enzyme, triple phase separation system, waste, chestnut shell *Pallidibacillus pasinlerensis*, CaO/ZnO-NP, azo dye, allura red, photocatalytic

June 2025, 73 pages

## İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	v
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	x
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ .....	xii
GİRİŞ.....	1
KURAMSAL TEMELLER.....	4
Termofilik Bakteriler .....	4
Pallidibacillus pasinlerensis .....	4
Enzim .....	4
Lignin parçalayıcı enzimler.....	5
<i>Castanea sativa</i> (Anadolu Kestanesi) .....	8
Ligninin Kimyasal ve Fiziksel Yönleri.....	8
Biyolojik ön işlem .....	9
Fiziksel ön işlem.....	9
Kimyasal ön işlem.....	9
Allura Red (E129).....	10
Üçlü Faz Ayırma Sistemi (TPP) .....	11
Kalsiyum Katkılanmış Çinko Oksit Nanopartikülü .....	11
Fotokatalitik Boya Giderimi .....	12
MATERYAL VE METOD .....	14
Materyal .....	14
Tez çalışmasında kullanılan cihazlar.....	14
Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar.....	14
Çalışmada kullanılan çözeltiler .....	15
Çalışmada kullanılan besiyerlerinin hazırlanması.....	16
Enzim aktivite tayini için kullanılan çözelti ve tamponlar.....	16
Protein analizi için kullanılan çözelti ve tamponlar .....	16

Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler .....	16
Metod .....	17
Bakteri izolasyonu için örnek toplanması .....	17
Bakterilerin izolasyonu .....	17
İzolatların lignin peroksidaz üretme yeteneklerinin belirlenmesi .....	18
Seçilen izolatın konvensiyonel analizi .....	18
Morfolojik özelliklerinin belirlenmesi .....	18
Biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi .....	19
Seçilen izolatın moleküler tanısı .....	19
16S rRNA PCR İşlemi .....	20
PCR döngüsü .....	21
Kompetent hücrelerin hazırlanma işlemi .....	21
Ligasyon işlemi .....	22
Transformasyon işlemi .....	22
Koloni seçimi ve sıvı kültür işlemleri .....	22
Koloni PCR işlemi .....	23
Plazmit izolasyonu, kontrolü ve konsantrasyonların ölçme işlemi .....	23
DNA dizi analiz sonuçlarının değerlendirilmesi .....	23
Kestane kabuklarının ön muamelesi .....	24
Lignin peroksidaz enzim aktivite ölçümü .....	24
Lignin peroksidaz enzim üretimi için bakteri büyüme parametrelerinin optimizasyonu .....	24
Protein tayini ve standart grafik .....	25
Lignin peroksidaz enziminin üçlü faz ayırma (TPP) sistemi ile saflaştırılması .....	25
SDS-PAGE .....	27
CaO/ZnO bimetalik NP sentezi .....	28
CaO/ZnO Bi metalik NP'lerin karakterizasyonu .....	28
Fotokatalitik boya giderimi .....	28
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....	30
Kestanenin Toplanması ve Ön Muamele .....	30
İzolasyonu Gerçekleştirilen Suşun Lignin Peroksidaz Enzim Üretim Yeteneği .....	30
Lignin Peroksidaz Enzim Aktivitesi Gösteren Suşun Morfolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi .....	30
İzolatın Moleküler Tanılanması .....	31
İzolatın 16S rRNA gen bölgelerinin çoğaltılması .....	31

16S rRNA gen bölgesinin klonlanması.....	32
16S rRNA sekans analizi.....	32
Lignin Peroksidaz Enzim Üretimi İçin Besiyeri Optimizasyonları .....	33
Kestane kabuğu miktar optimizasyonu .....	33
pH optimizasyonu .....	34
Sıcaklık.....	34
Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....	35
TPP ile Lignin Peroksidaz Enzim Saflaştırma Optimizasyonları .....	35
SDS-PAGE Analiz Sonuçları.....	39
Boya Gideriminde Kullanılan Standart Grafik .....	40
Allura Red Boya Giderimi Optimizasyonları .....	40
Süre.....	40
pH.....	41
Sıcaklık.....	42
Boya konsantrasyonu .....	42
Nanopartikül miktarı .....	43
Allura red boya giderimi .....	43
CaO/ZnO NP'lerinin Karakterizasyonu.....	44
Taramalı elektron mikroskobu (SEM) .....	44
Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR).....	45
X-ışını kırınımı (XRD).....	46
SONUÇ VE ÖNERİLER .....	49
KAYNAKÇA .....	53
ÖZGEÇMİŞ.....	59

## TABLÖLAR DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> Enzim EC Numaraları ve Enzim Tanımlamaları.....	5
<b>Tablo 2.</b> Lignin Parçalayıcı Enzimler .....	6
<b>Tablo 3.</b> Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar .....	14
<b>Tablo 4.</b> Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasallar .....	14
<b>Tablo 5.</b> 16S rRNA PCR Reaksiyon Karışımı.....	20
<b>Tablo 6.</b> Koloni PCR reaksiyon karışımı.....	23
<b>Tablo 7.</b> Lignin Peroksidaz Enzim Aktivitesi Ölçüm Reaksiyon Karışımı .....	24
<b>Tablo 8.</b> TPP İle Enzim Saflaştırırken Kullanılan Amonyum Sülfat ve t-butanol Oranları ....	26
<b>Tablo 9.</b> Konvensiyonel Analiz Sonucu SH-27 Bakterisinin Özellikleri .....	31
<b>Tablo 10.</b> XRD “d” Aralıkları ve Olası Düzlemler.....	47

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Lignin alt birimleri .....	9
Şekil 2. Fotokatalitik boya giderim mekanizması .....	13
Şekil 3. Saflaştırılan enzimin diyalizi .....	27
Şekil 4. Kestane ve ön muameleli kestane kabuğu .....	30
Şekil 5. Lignin peroksidaz enzim üretim potansiyelinin taranması .....	30
Şekil 6. SH-27 kodlu bakterinin morfolojisi .....	31
Şekil 7. SH27 bakterisinin 16S rRNA PCR sonuçlarının UV ışığı altındaki bant görüntüsü ..	32
Şekil 8. 16S rRNA bölgesinin klonlanmasında bakterilerin mavi-beyaz seçilimi .....	32
Şekil 9. SH27 İzolatının gen verisi dizilerine dayanarak oluşturulan filogenetik ağaç .....	33
Şekil 10. Lignin peroksidaz enzim üretimi için kestane kabuğu miktar optimizasyonu.....	34
Şekil 11. Lignin peroksidaz enzim üretimi için pH optimizasyonu .....	34
Şekil 12. Lignin peroksidaz enzim üretimi için sıcaklık optimizasyonu .....	35
Şekil 13. Protein miktar tayininde kullanılan standart grafik.....	35
Şekil 14. TPP ile enzim saflaştırma sırasında oluşan fazların görüntüsü.....	36
Şekil 15. TPP’de %20 amonyum sülfat varlığında % verim ve % saflaştırma katsayısı değerleri .....	36
Şekil 16. TPP’de %30 amonyum sülfat varlığında % verim ve % saflaştırma katsayısı değerleri .....	37
Şekil 17. TPP’de %40 amonyum sülfat varlığında % verim ve % saflaştırma katsayısı değerleri .....	37
Şekil 18. TPP’de %50 amonyum sülfat varlığında % verim ve % saflaştırma katsayısı değerleri .....	38
Şekil 19. TPP’de %60 amonyum sülfat varlığında % verim ve % saflaştırma katsayısı değerleri .....	38
Şekil 20. TPP’de %70 amonyum sülfat varlığında % verim ve % saflaştırma katsayısı değerleri .....	39
Şekil 21. TPP’de %80 amonyum sülfat varlığında % verim ve % saflaştırma katsayısı değerleri .....	39
Şekil 22. TPP yöntemiyle saflaştırılan lignin peroksidaz enziminin SDS-PAGE görüntüsü ..	40
Şekil 23. Boya gideriminde kullanılan Allura red boyasının kalibrasyon eğrisi .....	40
Şekil 24. Allura red boyasının zamana karşı fotokatalitik olarak % boya giderimi.....	41

<b>Şekil 25.</b> Allura red boyasının pH'ya karşı fotokatalitik olarak % boya giderimi.....	41
<b>Şekil 26.</b> Allura red boyasının sıcaklığa karşı fotokatalitik olarak % boya giderimi.....	42
<b>Şekil 27.</b> Allura red boyasının boya konsantrasyonuna karşı fotokatalitik olarak % boya giderimi .....	42
<b>Şekil 28.</b> Allura red boyasının nanopartikül miktarına karşı fotokatalitik olarak % boya giderimi .....	43
<b>Şekil 29.</b> Allura red boya giderimi .....	43
<b>Şekil 30.</b> CaO/ZnO NP'lerinin SEM görüntüsü.....	44
<b>Şekil 31.</b> CaO/ZnO-NPs/Allura Red SEM görüntüsü.....	45
<b>Şekil 32.</b> CaO/ZnO-NP ve CaO/ZnO-NP/Allura red FT-IR görüntüleri .....	46
<b>Şekil 33.</b> CaO/ZnO NP ve CaO/ZnO-NP/Allura red XRD görüntüleri .....	47



## KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

<b>°C</b>	: Santigrat Derece
<b>AR</b>	: Allura Red
<b>BOİ</b>	: Biyolojik Oksijen İhtiyacı
<b>CB</b>	: İletim Bandı
<b>CSS</b>	: Kestane Kabukları
<b>kDa</b>	: Kilodalton
<b>KOİ</b>	: Kimyasal Oksijen İhtiyacı
<b>LB</b>	: Luria-Bertani
<b>LiP</b>	: Lignin Peroksidaz
<b>MCS</b>	: Çoklu Klonlama Bölgesi
<b>MnP</b>	: Manganez Peroksidazlar
<b>NP</b>	: Nanopartikül
<b>PCR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>SDS-PAGE</b>	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez
<b>TOİ</b>	: Toplam Oksijen İhtiyacı
<b>TPP</b>	: Üçlü Faz Ayırma Sistemi
<b>TSA</b>	: Tryptic Soy Agar
<b>TSB</b>	: Tryptic Soy Broth
<b>VB</b>	: Değerlik Bandı
<b>VP</b>	: Çok Yönlü Peroksidaz

## GİRİŞ

Nano ifadesi Yunanca kökenli "nanos" kelimesinden türemekte olup, bir yönde sıralanmış üç atomun uzunluğuna karşılık gelen metrenin milyarda birini belirtmektedir. (Thakkar vd., 2010). Nanoteknoloji adının aksine dünya çapında endüstrileri büyük ölçüde çarpıcı bir değişime uğratmıştır. Richard Feynman nanoteknoloji fikrini ilk olarak 29 Aralık 1959 tarihinde Caltech'te bir Amerikan Fizik Derneği toplantısında "Alta Çok Yer Var" başlıklı sunumunda tanıtılmıştır. Feynman'ın bu ifadesinden ilham alarak K. Eric Drexler "nano teknoloji" terimini açıklamıştır (Bera ve Belhaj., 2016). Nanoteknoloji, biyoloji, kimya, fizik malzeme bilimi ve tüm mühendislik disiplinlerini de içerisine alan iç içe geçmiş interdisipliner bilim dalıdır. Nanoteknoloji bilimi, malzemeleri atom ve moleküller düzeyde izlediği hedef doğrultusunda düzenlemeyi içerir. Nanopartiküller sentezlenebilir veya doğada saf olarak da bulunabilirler. Nanoteknoloji, hedefe ilaç teslimatı, tanılama, kataliz, ekolojik iyileştirme ve biyomedikal alan gibi çeşitli alanlarda uygulamalar için birçok nanomalzemenin pazarlanmasına yol açarak devasa bir şekilde büyümüştür (Kanaoujiya vd., 2023).

Nanoboyutta materyallerin davranışındaki nitel farklılıkların, iki temel nedeni vardır. Birincisi, atom altı fizik bu boyutta etkilidir ve yeni fizik-kimya kanunlarına neden olur. İkincisi, nano boyut göz önüne alındığında bu yapılar büyük yüzey/hacim oranına sahiptir. Fiziksel olarak boyut küçültülmesine ilave olarak kimyasal olarak yeni bağlar ve kimyasal özellikler kazanılır. Mükemmel özellikteki malzemeler ve işlevsel sistemler düzenlemek için bu özelliklerin kontrollü ve manipülasyonu için kullanılır ve tüm bu süreçler nanometre boyutunda gerçekleşir. Örneğin, bir metal katalizör parçacığının etkinliği daha küçük boyutlara inildikçe artar. Büyük boyutta altın hiçbir tepkime vermezken nanoboyutta çok saldırgandır ve katalitiktir. Nanoölçekli malzemelerin özellikleri, bileşimi ve yapısıyla kalmaz boyut gözardı edilemeyecek etkidir (Hosokawa vd., 2012; Kumar vd., 2014).

Nanomalzemeler farklı metodlarla sentezlenebilir. Bu metodlar alt-yukarı ve üst-aşağı olmak üzere iki sınıfa ayrılır. "Üst-aşağı yaklaşım" olarak bilinen top-down yaklaşımı kütleli bir başlangıç malzemesini daha küçük nano ölçekli parçalara bölerken "alt-yukarı" olarak bilinen bottom-up yaklaşımı ise atom veya moleküller kullanılarak alt-yukarı bir yöntem kullanılarak nanopartikül oluştururlar (Jain vd.,202). Nanoteknolojide kullanılan nanopartiküllerin üretim metodu oldukça önemlidir. Zararlı kimyasallar kullanılmadan, herhangi bir zararlı yan ürün ortaya çıkarmadan ve uygun ortam sıcaklığı ile basınç şartlarında

metal nanopartiküllerin üretimi için biyolojik sistemlerin kullanılması zorunluluğu ortaya çıkmıştır (Gopalkrishnan vd., 2012). Bottom-up bir yöntem olan yeşil sentez ekolojik uygulamaları harekete geçirmek için başlıca itici güç olarak ortaya çıkmıştır. Tarihsel olarak, öncelik ürün verimine ve ürünün temiz olarak elde edilmiş olmasına yapılmış, çevresel etkileri gözardı edilmiştir. Ancak, ekolojik kirlilik oluşumu, toksisite ve atık giderimi konusunda farkındalık arttıkça ekolojik kimyasal süreçler geliştirilmiştir. Bu süreçler, zararı olabildiğince indirmeyi nispeten daha zararsız çözümler kullanmayı ve çözücü kullanımını azaltmayı veya tamamen çözücü kullanımını ortadan kaldırmayı amaçlamaktadır (Jain vd., 2024). Çevre dostu yeşil nanoteknoloji, nanomalzemelerin üretim ve uygulamasının olumsuz etkilerini minimize etmek, nanoteknoloji riskini azaltmak için mükemmel bir çare olarak görünmektedir. Bu bağlamda, nanopartiküllerin biyosentezi için bitkiler, bakteriler ve mantarlar gibi canlılar veya metabolik ürünleri kullanılmıştır. Herhangi bir girift süreç izlenmeden doğrudan kullanılabilmesi, biyolojik olarak aktif maddeler ihtiva etmeleri nedeniyle kolay bulunabilir olmaları, düşük maliyetli üretim sağlamaları, uzun vadeli bir yaklaşım sunmaları, daha kolay süreçlere sahip olmaları ve daha kolay aşağı işlem süreçleri vadetmeleri sebebiyle, oldukça verimli bir sistem olarak dikkat çekmektedir (AlWhaibi ve Mohammad., 2015).

Çevre kirliliği, çağımızda insan sağlığını ve ekosistemleri tehdit teşkil eden en önemli sorunlardandır. Bu sorunun çözümlenmesi için yenilikçi ve sürdürülebilir teknikler geliştirilmesini gerekli kılmaktadır. Bu kapsamda, çevre dostu çözümler üretmek amacıyla ucuz girdiler kullanılarak bakteri üretimi ve bakterilerden enzim saflaştırma süreçleri büyük önem arz etmektedir. Biyoremediasyon, kirleticileri zararsız veya daha az zararlı bir forma dönüştürmek için kullanılan biyolojik bir yöntemdir (Garg ve Roy., 2022). Bakterilerin bol miktarda bulunmaları, basit kültür yöntemi ve ekstrem ortamlara yüksek düzeyde uyum sağlamaları gibi özellikleri bakteri sisteminin canlı nano fabrika olarak kullanılması için muazzam bir potansiyel ortaya koymuştur. Bakterilerin bu yetenekleri ve farklı aktiviteleri sayesinde biyoremediasyon, çeşitli kimyasal atıkların çevreden elemine edilmesi, hareketsiz bırakılması veya arıtılmasında yaygın olarak faydalanılmaktadır (Karimi-Maleh vd., 2020; Salem ve Fouda.,2021; Wang vd., 2021).

Yeşil nanoteknoloji yaklaşımlarıyla sentezlenen nanomalzemeler arasında belki de en umut verici olanı, bu nano yapıların muazzam bir şekilde erişebildiği özelliklerden dolayı fonksiyonel malzemeler olarak yaygın olarak kullanılan metal nanoparçacıklardır. Canlı bakteriyel nano fabrikalarda, bakteriler metal iyonlarını temel metal nano formuna dönüşümünü biyolojik sistemlerini kullanarak sağlar. Bakteriyel nano fabrikalar metal nanopartikül sentezi için hücre dışı ve hücre içi iki farklı yöntem kullanır. Hücre içi sentezde, iyonlar bakteri

hücrelerinde nanopartikül sentezlenirken, hücre dışı sentezde metal iyonları hücre yüzeyine adsorbe edilir veya bakteriden izole edilen indirgeyici ajan yani enzim vasıtasıyla indirgenir ve nanopartikül üretilir (Salem ve Fouda., 2021). Bu bağlamda enzimler vasıtasıyla nanopartikül üretimi canlı hücreler içinde olabilirken enzimlerin hücre dışında da işlevselliğini koruma özelliğinden faydalanarak bakteriyel hücrelerden izole edilerek hücre dışında da üretimi sağlanabilir. Ancak, hücre dışı iş yükü azlığı ve hızı nedeniyle daha çok tercih edilir (Jain vd., 2024). İndirgeme basamağıyla başlayan green sentez çekirdeklenme ve büyüme fazı ile devam eder. Sonlandırma basamağıyla istenilen özellikteki nanopartiküller elde edilip kapatma ajanıyla stabiliteleri sağlanıp reaksiyon durdurulur. Bu basamak daha fazla büyümeyi ve çekirdeklenmenin önüne geçer. Nanopartiküller, diğer alternatiflerine oranla belirgin optik, yüzey, manyetik ve yapısal özelliklerinden ötürü çeşitli alanlardaki kullanımları merak uyandırmaktadır. Bilhassa çinko oksit nanopartikülleri geniş bant aralığı ki bu nanopartikülün ışığı absorbe etme iletkenlik özelliklerine doğrudan etkide bulunur ve 3,36 eV ve 60 meV gibi dikkate değer eksiton yani elektronun iletim bandında bir başka deyişle yüksek enerjili durumda uyarıldığında pozitif yüklü bir hole (delik) bırakır. Bu bağlamda ZnO nanopartikülü eksiton bağlanma enerjisi ile öne çıkmaktadır. Çeşitli yöntemlerle hazırlanan ZnO ve onun katkılı varyantları, antimikrobiyal madde, QLED (Quantum Dot LED)'ler, güneş pili, UV radyasyonu sönmüleyip azaltması, farklı fazları oluşturduğu heterojen kataliz, elektrik mukavemeti, kozmetik sektöründe renklendirme, yarı iletken cihazlar ve sensörler sadece kataliz ve elektronların elektriksel yüklerini değil, spin (dönme) özelliklerini de kullanan spintronik gibi uygulamalarında içine alan çok işlevli bir malzeme olarak merak uyandırmaktadır (Ishak vd., 2019; Jeevanandam vd., 2022).

## KURAMSAL TEMELLER

### Termofilik Bakteriler

Mikroorganizmalar kutuplarda buzullardan tutunda aktif volkanlara kadar çeşitli ortamlarda bulunur (Martinez-Alonso vd., 2019). Termofilik bakteriler yüksek sıcaklıklarda yaşayabilen organizmalar olup yaşam alanları arasında çöller, termal kaplıcalar, derin kara ve okyanus dipleri gibi jeotermal alanlar bulunmaktadır (Abdollahi vd., 2021).

Termofilik bakteriler yüksek sıcaklıklarda büyüme gösterirler. Büyüme sıcaklıklarına göre üç gruba ayrılırlar; orta termofiller (50–64 °C), aşırı termofiller (65–79 °C) ve hipertermofiller (>80 °C). Termofilik mikroorganizmalar, özellikle endüstriyel proseslerle yani beyaz biyoteknoloji alanında büyük ilgi görmüştür. Beyaz biyoteknoloji, organizmaların ve enzimlerin endüstriyel işleme ve malzeme, kimyasal ve enerji üretimi için kullanımı olarak tanımlanabilir. Termofil bakterilerin selülozu parçalayarak fermente edilebilir şekerler üretmeye yardımcı olan bir dizi termostabil enzim ürettiği bildirilmiştir (Lynd., 2005). Termostabil enzimler, daha uzun kullanım ömrüne sahiptir ve sıcaklıktaki ani değişikliklere tolerans sağlarlar. Bu enzimler sadece sıcaklık olarak stabil olmalarıyla değil, aynı zamanda düşük pH, yüksek tuzluluk gibi koşullar altında da aktivitelerini koruyabilmelerinden ötürü çeşitli endüstriyel işlemlerde rahatlıkla kullanılabilir (Gaur vd., 2021).

### *Pallidibacillus pasinlerensis*

*Bacillus pasinlerensis* olarak tanılanıp şu an ismi *Pallidibacillus pasinlerensis* olarak değiştirilen bakteri, 2020 yılında Erzurum'un Pasinler ilçesindeki kaplıcadan alınan su örneklerinden izolasyonu sağlanmıştır. Yapılan fenotipik ve filogenetik araştırmalar sonucunda izolatan *Bacillus* cinsine ait yeni bir tür olduğu ortaya konulmuştur. *Pallidibacillus pasinlerensis*, gram pozitif, oksidaz ve katalaz pozitif, oksijenli ortamda büyüyen, hareketli, basil şekilli, 0,4–0,6×2,0–5,0 µm boyutunda ve endospor oluşturan termofilik bir bakteridir. Optimum büyüme koşulları ise %2 NaCl varlığında, pH 7 ve 55 °C sıcaklık olarak bildirilmiştir (Baltacı vd., 2020).

### Enzim

Enzim tabiri ilk kez 1877 yılında Wilhelm Kühne vasıtasıyla mayanın şekerden alkol üretme yeteneğini belirtirken kullanılmıştır. Yunanca içinde anlamına gelen “en” ve maya anlamına gelen “zume” sözcüklerinden gelmektedir (Robinson., 2015). Enzim canlı

organizmalarca sentezlenen, kimyasal reaksiyonları katalize eden, çok sayıda aminoasidin bir araya gelmesiyle oluşan ve %100 ürün verimi sağlayan girift molekül yapılarıdır (Nelson ve Cox., 2008).

Enzimler tarafından yürütülen reaksiyonların özelliklerine göre enzimlerin daha ileri seviyede incelenmesine fırsat vermek için Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB), enzimler için bir isimlendirme geliştirmekle görevli Enzim Komisyonu isminde bir Uluslararası Komisyon kurdu. Enzim Komisyonu (EC) sayı sistemi enzimleri Tablo 1 gösterildiği üzere 1961'de 6 ana bölüme ayırdı: oksidoredüktazlar (EC1), transferazlar (EC2), hidrolazlar (EC3), liyazlar (EC4), izomerazlar (EC5) ve ligazlar (EC6). Bu altı kategori, Ağustos 2018'de yeni bir sınıf olan translokazlar (EC7) eklenene kadar uzun yıllar değişmedi (Tao vd., 2020).

**Tablo 1.** Enzim EC Numaraları ve Enzim Tanımlamaları

EC Numarası	İsim	Reaksiyon Türü
EC 1	Oksidoredüktazlar	Redoks reaksiyonları (elektron/hidrojen transferi)
EC 2	Transferazlar	Fonksiyonel grup transferi
EC 3	Hidrolazlar	Su ile bağ kırma (hidroliz)
EC 4	Liyazlar	Çift bağ oluşumu veya kırılması (su, CO <sub>2</sub> , NH <sub>3</sub> kaybı)
EC 5	İzomerazlar	İzomerizasyon (geometrik, stereo veya yapısal)
EC 6	Ligazlar	Yeni bağ oluşumu (ATP kullanımıyla)
EC 7	Translokazlar	Molekülleri (iyon, protein, şeker vb.) zar boyunca taşıyıcı; genellikle enerji (ATP) gerektirir.

### Lignin parçalayıcı enzimler

Ligninolitik enzimler olarak adlandırılan lignin parçalayan enzimler lignin polimerinin kimyasal bağlarına saldıran ve bozunmasına neden olan serbest radikaller olarak adlandırılan son derece reaktif ara maddeler üreten ligninin zorlu yapısına girebilen ve monomerleşmesine sebep olabilen reaktif araçlar üreterek doğadaki organik selülozik atıkların parçalanmasında ve nötralizasyonunda anahtar rol oynar. Ancak lignin parçalayıcı enzimlerin ticari kullanımı zaman alıcı ölçeklendirme prosedürleri endüstriyel ortamlardaki istikrarsızlık ve yüksek üretim maliyetleri nedeniyle sınırlıdır. Lignini depolimerize etmek için dört enzimatik aktivite bildirilmiştir. En yaygın ligninolitik enzimler Tablo 2'de gösterildiği üzere oksidoredüktaz sınıfına dahil olan diaril propan oksijenaz olarak da bilinen lignin peroksidaz (EC 1.11.1.14), p-difenol: oksijen oksidoredüktaz olarak bilinen lakkaz (EC 1.10.3.2), mangan (II): hydrogenperoxide oxidoreductase olarak bilinen mangan peroksidaz (EC 1.11.1.13) ve hem lignin peroksidaz hem mangan peroksidaz olarak bilinen çok yönlü peroksidaz (EC 1.11.1.16) enzimleridir (Kumar ve Chandra., 2020).

**Tablo 2.** Lignin Parçalayıcı Enzimler

Enzim Adı	EC Numarası	Sınıfı (EC)	Katalizlediği Reaksiyon
Lignin peroksidaz (LiP)	EC 1.11.1.14	Oksidoredüktaz (EC 1)	Lignin polimerindeki aromatik halkaları okside eder; fenolik olmayan yapılarda da etkilidir.
Manganez peroksidaz (MnP)	EC 1.11.1.13	Oksidoredüktaz (EC 1)	$Mn^{2+} \rightarrow Mn^{3+}$ oksidasyonu ile dolaylı olarak lignin bozunması sağlar.
Çok yönlü peroksidaz (VP)	EC 1.11.1.16	Oksidoredüktaz (EC 1)	Hem LiP hem MnP özellikleri gösterir; çok çeşitli lignin yapılarını parçalayabilir.
Lakkaz	EC 1.10.3.2	Oksidoredüktaz (EC 1)	Fenolik bileşikler okside eder, $O_2$ 'yi suya indirger; genellikle redoks medyatörleriyle birlikte çalışır.

### ***Lignin peroksidaz (EC 1.11.1.14)***

İki kalsiyum iyonu ve porfirin halkasına bağlı demir ihtiva eden moleküler kütlesi 40-68 arasında olan, dört farklı karbonhidrat, 370 su molekülü, 343 amino asit rezidüsünden meydana gelen monomerik yapılu glikozlanmış enzimlerdir. Lignin peroksidaz enzimi (LiP) sarmal büyük ve küçük olmak üzere iki adet sekiz heliks, iki anti-paralel beta-tabaka ve hem grubunun her iki tarafında hidrojen bağlarıyla proteine bağlanan 40 rezidü içeren iki alan bulundurur (Choinowski vd.,1999). Bazı bakterilerin lignin degrede edici enzim üretme kapasitesine sahip olduğu ve ligninolitik özellikler gösterdiği bildirilmiştir (Grgas ve vd., 2023). Lignin peroksidazlar (LiP'ler),  $H_2O_2$  'nin varlığıyla harekete geçer ve lignine reaksiyon ara basamağında oluşan ara reaktifler vasıtasıyla saldırır, burada lignin bileşiklerini  $H_2O_2$  'den tek elektron koparılması vasıtasıyla oksitler ve pozitif yüklü radikal olan katyonlar oluşturur (Pollegioni vd., 2015). LiP, lignin yapıtaşlarını, lignin bileşiklerini ve çevre kirleticilerini oksitleyebilir. Lignin peroksidaz esnekliği sayesinde odun, bitki atıkları ve lignin türevi kirleticiler gibi lignin bakımından zengin malzemeleri parçalayabilir. LiP'nin oksidasyon yeteneği lignin parçalanmasının dışında tekstil renklerini parçalamak için de kullanılabilir (Gianfreda vd., 2006; Wei ve Xianghua., 2009).

### ***Lakkaz (EC 1.10.3.2)***

Lakkaz, doğada en eski ve en yaygın olarak bulunan enzimlerden biri olarak günümüze kadar çeşitli araştırmaların başlıca konusu olmuştur. 19. yüzyıldan beri, birçok bilim insanı lakkaz enziminin çeşitli fenolik olan ve fenolik olmayan bileşiklerinin yanısıra birçok çevre kirleticisinin oksidasyonunu katalize edebilme ve çoğu oksidazdan farklı olarak, zararlı yan ürün olarak toksik hidrojen peroksit üretmemeleri onları biyoremediasyon alanında yeteneğini keşfettiğinden beri bu enzimi araştırmaya dikkat vermiştir (Movahedpour vd., 2022; Rochefort

vd., 2008). Lakkazlar, biyokimyasal özellikler ve moleküler yapıları açısından heterojendir. Genel olarak toplam ağırlıklarının %10-45'i karbonhidrat olan, moleküler ağırlığı 50-130 kDa olan glikoproteinlerdir (Singh ve Gupta., 2020).

#### ***Manganez peroksidaz (EC 1.11.1.13)***

Manganez peroksidazlar (MnP) yaklaşık 40–50 kDa moleküler ağırlığa sahip lignin yapılarına saldırmak için reaktif  $Mn^{3+}$  iyonları aracılığıyla katalitik döngüler kullanan hem içeren enzimlerdir (De Gonzalo vd., 2016).

MnP, tek elektronlu  $Mn^{2+}$  oksidasyon reaksiyonunu katalizleyebilen tek hem peroksidazdır. Özellikle oksalat ve malat ile kompleks oluşturarak  $Mn^{3+}$  enzimden ayrılır ve karboksilik asitler.  $Mn^{3+}$  enzimden ayrılır ve karboksilik asitle  $Mn^{3+}$  şelatlayıcı kompleks, fenolik bileşiklerin yayılabilir bir oksidanı olarak işlev görür ve çeşitli bozunma ürünleri veren bir fenoksi radikal ara ürünü verir.  $Mn^{3+}$  formu, fenolik bileşikleri 2,6-dimetoksifenol, guaiakol, 4-metoksifenol ve fenolik lignin kalıntılarını okside ederken sadece fenolik substratlar üzerinde etkinlik gösterir (Hammel ve Cullen., 2008).

#### ***Çok yönlü peroksidaz (EC 1.11.1.16)***

Çok yönlü peroksidaz olarak isimlendirilen bir ligninolitik peroksidaz olan VP (Çok yönlü peroksidaz), demir ihtiva eden bir metaloenzimdir. Bu enzimin en öne çıkan özelliği, lignin peroksidazın yüksek redoks kapasitesine sahip bileşikleri okside etme yeteneğini manganez peroksidazın  $Mn^{2+}$  yi  $Mn^{3+}$  ye okside etme yeteneğiyle birleştiren hibrit moleküler yapısıyla ilişkili çok yönlülüğüdür (Hoque vd., 2023).

İlk VP'nin 1996 yılında *Pleurotus eryngii*'den izole edildiğinden yeni bir enzim olarak sayılabilir. Çok yönlü peroksidaz, hibrit yapısından kaynaklı geniş bir substrat özgüllüğü sergilemektedir. Substratları katma değerli ürünlere oksitlemedeki sıra dışı yeteneğiyle son dönemlerde biyoteknolojide alanında oldukça değer gören yeni bir peroksidaz olarak ortaya çıkmıştır (Rai vd., 2020).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, VP'nin bitkisel uçucu terebentin'in ve yağların ana bileşeni olan  $\alpha$ -pinenin enzimatik katalizinden elde edilen ürünler olan böcek öldürücü, ilaç ve tat ve koku endüstrisi gibi geniş spektrumlu pratiklere sahip oldukça değerli bileşikler olan verbenol, verbenon, mirtenol, terpineol elde edilebildiği keşfedilmiştir (Allenspach ve Steuer., 2021).

## ***Castanea sativa* (Anadolu Kestanesi)**

Kestane ağaçları dünyanın birçok bölgesinde yetiştirilir, meyveleri ve yan ürünleri sıklıkla kullanılır. Dünya çapında üretimi son on yıllarda artarak 2016'da yaklaşık 2,3 milyon tona ulaştı ve bu üretimin yaklaşık %83'ünü Çin karşıladı. Kestane üretimi 2018 yılında ise en yüksek verime yaklaşık 2,4 milyon ton ulaşmış olup toplam 612.877 hektarlık bir alanı kapsamaktadır (Einarsson vd., 2021; Pinto vd., 2021).

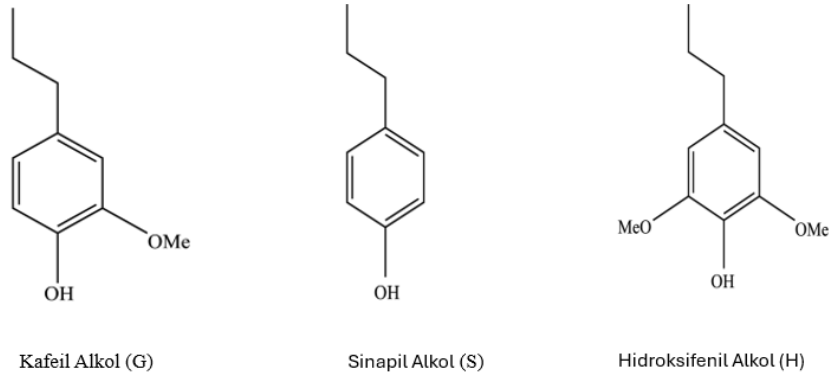
Kestane üç bölüme ayrılır; meyve, kabuk ve yenilebilir etli kısmı çevreleyen dikenlerden meydana gelmektedir. Kestane işleme sırasında yüksek miktarda yan ürün oluşur. Bunlar yapraklar, kabuklar ve dikenlerdir. Bu yan ürünleri farklı alanlardaki potansiyel uygulamaları için farklı çalışmalar yapılmıştır (Pinto vd., 2020).

Kestane ayıklama işlemi esnasında ortaya çıkan bol miktarda ve detaylıca araştırılmamış bir yan ürün olan *C. sativa* kabukları (CSS), toplam meyve ağırlığının takriben %20'sini oluşturur (De Vasconcelos vd., 2010). Kestane kabuğu yüksek miktarda karbonhidrat (56,5–74,1 g/100 g kuru ağırlık) ve nem oranı (21,3–38,6 g/100 g) içerir. Kaydadeğer miktarda protein (2,8–3,1 g/100 g) ve düşük yağ seviyeleri (0,2–0,5 g/100 g) bulunur. Karbonhidrat içeriği, esas olarak selüloz, hemiselüloz ve ligninden oluşan anlamlı düzeyde olmasıyla ilişkilidir. Kestane kabukları, katma değeri olmayan bir lignoselülozik biyokütledir ve enerji üretimi için yakıt olarak yeniden kullanılır (Morana vd., 2010). İnsan tüketimi meyveyle kısıtlı olsa da kabukların metabolize edilememesi veya lezzetsizliği sebebiyle kestane yan ürünleri üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda antioksidan, antikarsinojenik ve kalp koruyucu özelliklere sahip biyoaktif bileşikler, fenolik bileşikler, özellikle fenolik asitler ve tanenler açısından oldukça zengindir. E vitamini ve amino asitlerin de baskın esansiyel olanlar arginin ve lösin olmak üzere bulunduğu bildirilmiştir (Braga vd., 2015; Squillaci vd., 2018).

## **Ligninin Kimyasal ve Fiziksel Yönleri**

Lignoselülozun hücre duvarında, selülozun, hemiselülozun ve ligninin başlıca unsurları dayanıklı bir üç boyutlu form oluşturur (Şekil 1). Sağlamca düzenlenmiş hücre duvarı öğeleri karbonhidratın enzimler tarafından şekere dönüşümünü büyük ölçüde engeller (Petridis ve Smith., 2018). Düzensiz ve dallanmış aromatik yapıları bir polimer olan lignin, önemli ölçüde ikincil bitki hücre duvarında dağılmıştır. Başlıca metoksi grubu içeren sinapil alkol ( $C_{19}H_{18}O_3$ ) (S), kafeil alkol ( $C_{19}H_{18}O_3$ ) (G) ve hidroksifenil ( $C_{19}H_{20}O_4$ ) (H) alt birimi daha az metil grubu içermesiyle diğer gruplara göre daha basit olan ana alt birimlerden oluşur. Dallanmış G lignin alt birimleri şeker dönüşümünde tipik olarak doğrusal S tipi lignin biriminden daha fazla engelleyicidir. Bu ana monomerlerin yanı sıra, trisin, hidroksi-sinamaldehyitler, dihidroksi-

sinnamil alkoller gibi diğerk doğalk olarak oluşank hidroksi-fenilpropanoid bileşikleri de farklı derecelerde polimere dahil edilmiş halde bulunur (Dos Santos vd., 2019).



**Şekil 1.** Lignin alt birimleri

### **Biyolojik ön işleml**

Uygun koşullar altında mikroorganizmalar veya enzimler kullanılarak yapılan biyolojik ön işleml ligninolitik enzim sisteminden yararlanılarak yapılan çoğuk biyolojik ön işleml, lakkazları yüksek redoks potansiyeline sahip peroksidazları ve oksidazları içerir (Sankaran vd., 2020).

### **Fiziksel ön işleml**

Tipik fiziksel ön işleml, genellikle kimyasal veya biyokimyasal işlemlen önce gerçekleştirilen kurutarak öğütme ve ufalama, ısıl işleml ve ultrasonik işlemleri içerir. Bu fiziksel boyuttaki müdahaleyle beraber biyokütle yüzey alanı artarken parçacıkların boyutunun ve kristalliğinin azalır (Liu vd., 2020).

### **Kimyasal ön işleml**

#### ***Asit ön işleml***

Korozyon ve asitin yeniden kazanımı riskinden ötürü konsantre asit yerine seyreltilmiş sülfürik asit ( $H_2SO_4$ ) ve hidroklorik asit (HCl) formları, lignoselülozik biyokütle ön işlemlerinde kullanılan en yaygın iki inorganik asittir (Bhatia vd., 2020). Seyreltik asit, glikozit bağlarını parçalayarak hemiselülozları etkin bir şekilde hidrolize eder ve oligomerleri ve karbonhidratları serbest bırakmak vasıtasıyla lignin ve selülozu kısmi olarak çözer (Woiciechowski vd., 2020). Asit ön işleml esnasında, lignin temel olarak asit katalizli bozunma uğrayarak küçük çözümler parçalar ve yoğunlaşmaya bağlı olarak çözümlmeyen kalıntı katı maddeler oluşturur. Ön işleml hidrolizatı çözümler kısmı esas olarak ligninden türetilen oligomerik, dimerik ve monomerik fenolik bileşikleri içerir (He vd., 2020). Ana reaksiyon asidoliz adı verilen lignindeki en bol bağ olan  $\beta$ -aril eter bağlarının asit katalizli kopmasıdır.

Asidik ön işlem görmüş biyokütlerde lignin konsantrasyonunun bu yöntemle azaltılması zor olsa da lignin yapısı asidik reaksiyon koşullar altında önemli değişiklikler geçirir. Asidoliz sırasında iki fenilpropanoid öge arasında bir oksijen atomu vasıtasıyla kurulan bir bağ olan  $\beta$ -O-4 bağlarını parçalayarak lignin yapıları önemli ölçüde değiştirir (Imai vd., 2011).

### ***Alkali ön işlem***

Alkali ön işlem esnasında temel lignin reaksiyonu eter bağlarının alkali katalizli kopmasıdır. Fenolik  $\alpha$ -eterler alkaliye duyarlıdır ve kinon yapısının karbonil grubunun yerine bir metilen grubu ( $-\text{CH}_2$ ) almasıyla oluşan reaktif kinon metid ara maddesi oluşturularak kopmaya hazır hale gelir. Alkali ön işlem, lignin ve hemiselülozu çapraz bağlayan moleküller arası ester bağlarının bazik hidrolizi vasıtasıyla önceden işlenmiş substratların gözenekliliğini artırmak için kullanılır (Huang vd., 2022; Sheng vd., 2021). Tipik bir alkali reaktifi olarak NaOH şişmeye neden olur ve iç yüzey alanlarını artırır, polimerizasyon ve kristalinize olmasını engeller ve lignini biyokütleden ayırırıp ligninin kimyasal yapılarını tekrar şekillendirir. Bu yapısal değişiklikler ligninin fonksiyonel gruplarındaki, moleküler ligninindeki, bileşimindeki ve birimler arası bağlantılarındaki yapısal değişiklikler yoluyla enzimatik hidrolizi etkiler (Yan vd., 2020).

### **Allura Red (E129)**

E129 olarak bilinen Allura Red (AR) aromatik halka yapısı aracılığıyla özellikle hidroksi ve metoksi olmak üzere oksokrom gruplarına bağlı bir azo grubu ile karakterize edilen bir boya sınıfı olan azo boyasıdır (Şenol vd., 2024). Endüstrilerden çevreye bırakılan arıtılmamış atık suyun çoğu yaklaşık %20 oranında boya içerir ve yüksek düzeyde kirliliğe neden olur (Gita vd., 2017). AR'nin yoğun kullanımından dolayı yeraltı sularına kıyasla yüzey sularında oldukça yüksek konsantrasyonlarda tespit edilmiştir. AR çoğunlukla endüstriyel atık su, belediye atık suyu ve çöp sahası sızıntıları aracılığıyla su sahalarına giriş yapar. Bu da çevremiz için potansiyel riskler teşkil eder (Şenol vd., 2024).

Azo boyalar geleneksel yöntemlerle parçalanmaya karşı dirençli olmalarının yanısıra sularda birikerek nitrat, nitrit ve fosfatların kontrollü salınımıyla ötrofikasyona neden olurlar. Bu boylarla kirlenmiş sularda pH dalgalanması, biyolojik oksijen ihtiyacı (BOİ), kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ), toplam oksijen ihtiyacı (TOİ) ve toplam toprak tortusu (TSS) gibi unsurlarda artış da bildirilmiştir. Bu boyalar su ortamında büyük miktarlarda birikmekte ve bitkiler tarafından etkili bir şekilde su alınmamakta bu da oksijen seviyesinin düşmesine, su bitkilerinin ve hayvanlarının ölmesine, suyun renginin, kokusunun ve kalitesinin değişmesine neden olduğu bildirilmiştir (Berradi vd., 2019; Ni vd., 2007; Palamthodi vd., 2011). Bu nedenle,

bu boyaların çevreden uzaklaştırılması için daha yeni ve daha etkin teknoloji olan nanoteknolojiye ihtiyaç giderek artmaktadır. Nano boyutlu malzemeler küçük boyutları, yüksek en-boy oranı gibi özelliklerinden faydalanarak zararlı organik ve inorganik kimyasalları çevreden uzaklaştırmak için oldukça kullanışlı görünmektedir (Brar vd., 2010; Karimi-Maleh vd., 2021).

### **Üçlü Faz Ayırma Sistemi (TPP)**

Üçlü faz ayırma sistemi (three-phase partitioning-TPP) ilk olarak Lovrien ve arkadaşları tarafından 1987'de açıklanan bir biyomolekülün down stream proses yani son çıktılarının kullanıma uygun hale getirilmesi için kısmi saflaştırma adımlarını içeren saflaştırma tekniğidir. Üç faz ayırma (TPP) üretim süreçlerinde kullanılmak üzere proteinleri saflaştırmak ve yoğunlaştırmak için basit ve hızlı bir yöntemi ifade eder (Panadare ve Radhod., 2017). TPP, enzim stabilitesi ve katalitik aktivitesini arttıran geniş uygulama alanına sahip biyolojik ayırma yöntemi olarak hızla gelişmektedir. Üç faz ayırma sistemi, %0,2 ila %1 kadar düşük protein ham maddelerinden bile proteinleri 100X'e kadar konsantre etmek için kullanılır (Yan vd., 2018).

TPP de üç faz oluşturmak için suyla karışabilir alifatik alkol içeren iyi tamponlanmış sulu tuzlar kullanır. Etanol, metanol, *t*-butanol, 1-propanol gibi alkoller suyla homojen bir çözelti oluşturabilmelerine karşın bunların hiçbiri kosmotropik yani su molekülleri arasındaki yapıyı güçlendirerek daha düzenli hale getiren tuz olan amonyum sülfatın (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sulu çözeltileriyle karışamaz. Alkolün üste çıkarken tuzlu suyun altta kaldığı iki sıvı faz oluşur. Sulu çözeltide bulunan proteinler daha sonra iki faz arasında üçüncü bir faz oluşturarak üç fazlı bir çözelti oluştururlar. Sonuçta protein, amonyum sülfat ve *t*-butanolden oluşan üç bileşenli sistem oluşur (Rachana., 2014). Üst faz; organik çözücünün bol olduğu fazdır ve pigmentler, lipidler ve diğer polar olmayan maddeler bu fazda bulunur. Alt faz; tuz bakımından zengin faz olup proteinler, polisakkaritler gibi polar bileşikler içerir. Ara faz ise çöken proteinleri içerir.

### **Kalsiyum Katkılanmış Çinko Oksit Nanopartikülü**

ZnO'nun uygun elementlerle dopinglenmesi yani küçük miktarlarda diğer elementlerden katılması ayarlanabilir bir bant aralığı, optimum şeffaflık, iyileştirilmiş fotoluminesans emisyon yoğunluğu ve daha iyi elektriksel iletkenlik yeteneklerinden faydalanmak için en çok aranan stratejilerden biridir (Chattopadhyay vd., 2019). ZnO NP'lerine kalsiyum gibi ikinci grup elementlerin katkılanmasının malzemenin yapısal ve optik özelliklerini değiştirmenin yararlı bir yolu olduğu düşünülmektedir. Ca katkılanmış ZnO nanopartiküllerinin yeşil sentezi ZnO'daki yapısal kusurları azaltan ve fotokatalitik aktivitesini artıran özel avantajlara sahiptir.

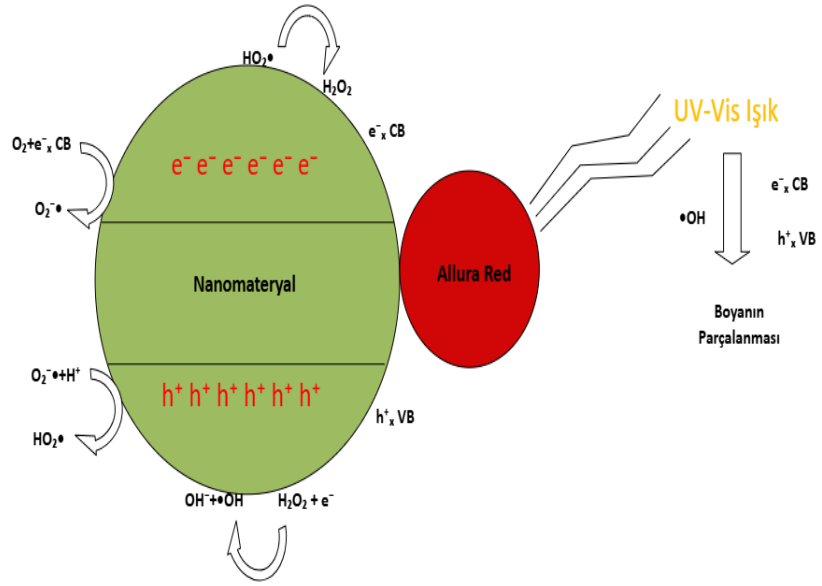
Ca katkılanması ışık emilimini görünür bölgeye kaydırmasından dolayı bu nanomalzemelerin su örneklerindeki boyaların giderilmesinde oldukça verimli olabileceği anlamına gelir (Kaningini vd., 2022). Katkı maddesi olarak kalsiyumun ZnO NP'lerinde bazı ilginç özellikler kattığı görülmüştür. Ca katkılı ZnO nanopartiküllerinin sudan Cr, Cd ve Ni gibi ağır metalleri etkili bir şekilde uzaklaştırabildiği gösterilmiştir (Ghiloufi vd., 2016). Ca katkılı ZnO filmlerinin CO<sub>2</sub> algılama özelliği gösterdiğini göstermiştir (Ghosh vd., 2019). Kalsiyum katkılı ZnO nanopartikülleri tarafından da fotokatalitik aktivite gösterilmiştir (Slama vd., 2016).

### **Fotokatalitik Boya Giderimi**

Işık enerjisini kullanarak bir reaksiyonun hızlandırılmasına fotokataliz denir. Kullanılan nanopartiküle ise fotokatalist denir. Fotokataliz ışığı emerek yüzeyinden reaktifliği yüksek maddeler üretir ve bu yolla boyayı parçalar.

Fotokatalitik boyaların parçalanması, boyaların ışık vasıtasıyla kimyasal reaksiyonları yöneten madde olan fotokatalist adsorpsiyonuna ve fotokatalist yüzeyinde oluşan yüklerin etkin bir şekilde ayrılmasına bağlıdır. Şekil 2'de tasvir edildiği üzere fotokatalist ışığa maruz kaldığında, fotokatalist yüzeyinde elektronlar (e<sup>-</sup>) iletim bandındaki serbest elektronlar ve valans bandında oluşan hole adımla pozitif yüklü boşluklar (h<sup>+</sup>) fotokimyasal olarak üretilir. Elektronlar, fotokatalistin değerlik bandı (VB) ile iletim bandı (CB) arasındaki enerji farkı nedeniyle değerlik bandından iletim bandına uyarılır bu da değerlik bandında pozitif yüklü delikler (h<sup>+</sup>) oluşturur. Fotokatalistte oluşan bu artı ve eksi yükler birbirinden uzaklaşmaya çalışır ve yüzeye çıkarlar hızlı yüzeye ulaşamama halinde oluşacak rekombinasyonların dolayısıyla reaksiyonun bitmesinin önüne geçilir. Fotokatalist yüzeyinde redoks reaksiyonları gerçekleşir ve çok güçlü oksitleyici radikaller oluşur. Moleküler oksijen (O<sub>2</sub>), uyarılmış elektronlar tarafından oksidatif stres oluşturan süperoksit radikali (•O<sub>2</sub><sup>-</sup>) oluşturacak şekilde indirgenir. Hidroksil iyonları (OH<sup>-</sup>), elektron uyarımı sonrası meydana gelen delikler (h<sup>+</sup>) tarafından oksitlenerek çok güçlü oksidan olan hidroksil radikali (•OH) oluşturur.

Birincil oluşan aktif türler (e<sup>-</sup> ve h<sup>+</sup>) redüksiyon ve oksidasyon vasıtasıyla tepkimeler başlatılır. Hidroksil radikali ve süperoksit anyon radikali ikincil aktif türler olan •OH ve •O<sub>2</sub><sup>-</sup> gibi reaktif oksijen türleri oluşturur ve bu saldırgan radikaller zararsız, toksik olmayan son ürünlere boyaları parçalar (Abo-Dief., 2022).



**Şekil 2.** Fotokatalitik boya giderim mekanizması

$e^-$  CB: Elektron, iletim bandında (CB) bulunan negatif yüklü bir parçacıktır.

$h^+$  VB: Delik (hole), değerlik bandında (VB) bulunan pozitif yüklü taşıyıcıdır.

## MATERYAL VE METOD

### Materyal

#### Tez çalışmasında kullanılan cihazlar

**Tablo 3.** Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar

Cihaz	Marka
Buzdolabı (+4/-20 °C)	Vestel
Çalkalamalı İnkübatör	Zhicheng
Çeker Ocak	Fume Hood Mikrotest
Dondurucu (-86 °C)	Glacier Ultralow Freezer
Etüv	Redline by-Binder
Hassas Terazı	Ohaus Pioneer
İnkübatör	Thermo Scientific Heratherm
Manyetik Karıştırıcı	Heidolph
Mikropipet Takımı	Thermo Scientific ve Eppendorf
Otoklav	Hmc Hiramaya
pH metre	Mettler Toledo FiveEasy Plus
Saf Su Cihazı	Mp Minipure
Santrifüj	Hettich Zentrifugen Mikro 220R
Spektrofotometre	Beckman Coulter DU 730
Steril Kabin	Telstar Bio-II-A
Su Banyosu	Memmert
Jel Görüntüleme sistemi	Vilber Lourmat-Quantum
Mikro dalga Fırın	Beko
PCR cihazı	Thermo – MultiscanGo
Vortex	Fisons WhirliMixer

#### Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar

**Tablo 4.** Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasallar

Kimyasal	Üretici Firma
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Riedel-de Haën
Etanol	İso-Lab Chemicals
İzopropanol	İso-Lab Chemicals
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma

**Tablo 4.** (devamı)

Hidrojen klorür (HCl)	Sigma
Isopropyl $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG)	Sigma
Sodyum potasyum tartarat	Sigma
Bakır (II) klorid	Sigma
Agaroz	Sigma
Tryptone Soya Agar	Oxoid
Tryptone Soya Broth	Oxoid
DNA Purification Kit	Promega
Amonyum Sülfat	Merck
Coomassie Brilliant Blue G-250	Fluka
TEMED	Sigma-Aldrich
Standart serum albümin	Sigma-Aldrich
Glisin	Merck
Sodyum dodesil sülfat	Sigma-Aldrich
Amonyum persülfat	Sigma-Aldrich
$\beta$ -merkaptotanol	Sigma-Aldrich
İzopropanol	Sigma

#### **Çalışmada kullanılan çözeltiler**

**%0,9'luk NaCl:** 0,9 g NaCl tartılıp, 100 mL saf suda çözdürüldü.

**%70'lik EtOH:** 70 mL EtOH, 30 mL distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

**1X TAE Tamponu:** 100 mL 10X TAE alınıp hacmi 1000 mL'ye tamamlandı.

**50 mM EDTA:** EDTA'dan 1,46 g tartılarak 100 mL suda çözüldü ve pH'sı 8'e ayarlandı.

**CaCl<sub>2</sub> Solüsyon:** 1,11 g CaCl<sub>2</sub>, 100 mM'lık 100 ml saf su içerisinde çözümlenerek otoklavlandı ve soğutucu ayarı +4 °C'ye ayarlanarak saklandı.

**IPTG Solüsyon:** 23,8 mg/mL'lik miktarda distile su ile hazırlanan çözelti steril edilerek -20 °C'de saklandı.

**5M NaOH çözeltisi:** 2 g NaOH tartılarak, 8 mL distile suda çözdürüldü

**X-Gal Solüsyonu:** 40 mg/mL olacak miktarda hazırlanarak, 20 °C'de kullanılmaya kadar muhafaza edildi.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Tamponu:** 18 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alınıp son hacim 100 mL ye tamamlandı.

### **Çalışmada kullanılan besiyerlerinin hazırlanması**

**Stok Besiyeri:** 30 g TSB besiyeri, 1000 mL distile su ve 250 mL gliserol manyetik karıştırıcı yardımıyla çözdürülerek stok tüplerine paylaştırıldı ve 121°C'de 1 atmosfer basınçta 15 dk süre ile otoklavlandı.

**Guaiacollü Besi Yeri:** 3,27 g BHB, 0,1g yeast extract, 1 mL gualikol, 15 g agar 1000 mL saf su içerisinde manyetik karıştırıcıda çözdürülür ve 121°C'de 1 atmosfer basınçta 15 dk otoklavlandı.

**Tryptone Soya Agar (TSA):** 40 g besiyeri 1000 mL distile suda manyetik karıştırıcı yardımıyla çözdürülerek, 121 °C'de 1 atm basınçta otoklavlandı ve steril petrilere döküldü.

**Tryptone Soya Broth (TSB):** 30 g besiyeri 1000 mL distile suda manyetik karıştırıcı yardımıyla çözdürülerek 121 °C sıcaklıkta 1 atmosfer basınçta 15 dk süre ile otoklavlandı.

### **Enzim aktivite tayini için kullanılan çözelti ve tamponlar**

**33 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> çözeltisi:** 4,491g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> kimyasalı tartıldı.800 mL saf su eklendi. pH 6 ya ayarlanıp 1000 mL ye tamamlandı.

**15 mM Guaiacol:**1,65 mL guaiacol kimyasalı KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> çözeltisine eklendi.

**10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:**102 µL %30 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kimyasalı KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> çözeltisine eklendi.

### **Protein analizi için kullanılan çözelti ve tamponlar**

**Coommassie Brilliant Blue çözeltisi:**100 mg Coommassie Brilliant Blue G-250 reaktifi 50 mL etanolde çözdürülerek 100 mL fosforik asit ilavesi yapıldı. Çözeltinin hacmi saf su ile 1000 mL'ye tamamlanıp karanlık ve serin yerde muhafaza edildi.

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

### **Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler**

**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 Yiğme 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-merkaptoetanol 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.

**Jelin Boyanması:** Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel dikkatlice cam plakalar arasından çıkarıldı ve Coomassie Blue R-250 boyama çözeltisi ile oda sıcaklığında çalkalayıcıda 2 saat boyunca boyandı. Bu işlemden sonra jele bağlanmış fazla boyanın uzaklaştırılması için birkaç kez distile su ile yıkandı.

## **Metod**

### **Bakteri izolasyonu için örnek toplanması**

Çalışmada kullanılan su örnekleri, Erzurum Pasinler kaplıcasından aseptik koşullar altında toplanarak laboratuvara getirildi. Alınan su örnekleri çalışmanın sonuna kadar +4 °C de muhafazası sağlandı (Baltacı vd., 2020).

### **Bakterilerin izolasyonu**

Çalışmada kullanılacak olan termofilik suşumuz Erzurum Pasinler Kaplıcası'ndan alınan su örneklerinden izole edildi. Su örnekleri aseptik koşullar altında laboratuvara getirildi ve izolasyona kadar +4 °C'de muhafaza edildi. Su örnekleri laboratuvara ulaştığında tripton soya broth (TSB) besiyerine ön zenginleştirme amacıyla inoküle edildi ve çalkalamalı inkübatörde 55 °C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra bu örneklerden %0,85 fizyolojik su ile seri dilüsyon ( $10^{-1}$ - $10^{-6}$ ) hazırlandı. TSA besiyeri 15 g/L kazein peptonu, 5 g/L soya unu peptonu, 5 g/L NaCl ve 15 g/L agar içeren besiyerine her dilüsyondan 100 µL yayma

ekim yapıldı. Yapılan ekimler 48 saat boyunca 55°C'de inkübe edildi. Bakteriler büyüdüktan sonra farklı şekillerde koloniler seçildi. Bu koloniler daha sonra mikroorganizmaların saf kolonilerinin eldesi amacıyla streak plate yöntemi kullanılarak üç ila dört aşamada TSA plakalarına yayıldı ve 24 saat boyunca 55°C'de bekletildi. İnkübasyondan sonra elde edilen saf koloniler tespit edildi ve çalışılana kadar -86°C'de saklandı (Baltacı vd., 2020).

### **İzolatların lignin peroksidaz üretme yeteneklerinin belirlenmesi**

İzole edilen bakterilerin lignin peroksidaz enzim üretme potansiyelini belirlemek için, (4,55 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,53 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g/L MgSO<sub>4</sub>, 5,0 g/L NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0,5 g/L Maya ekstraktı, %0,1 Guaiacol, 30 g/L Agar, pH 7 olacak şekilde hazırlandı (Falade vd., 2017). İzole edilen suşlar lignin monomeri olan guaiacollü besiyerine ekildi ve inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra petri plaklarına lügol çözeltisi dökülerek zon oluşumu potansiyellerine bakıldı. Zon oluşumu mikroorganizmaların lignin monomeri olan guaiacollü parçaladığı dolayısıyla lignin peroksidaz enzim etkinliğinin bulunduğu bir kanıttır.

### **Seçilen izolatın konvensiyonel analizi**

Seçilen SH-27 kodlu test suşunun basit ve gelenekselleşmiş testlerle biyolojik ve fizyolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla fenotipik ve biyokimyasal özelliklerine bakıldı.

### **Morfolojik özelliklerinin belirlenmesi**

#### ***Gram boyama***

Bakteri kültürü steril bir öze yardımıyla temiz bir lam üzerine yayıldı ve 1 dk boyunca bazik kimyaya sahip kristal viyole ile muamele edildi. Kristal viyole ile muamele sonucunda negatif yüklü hücre duvarları boyanır ve Gram (+) ve Gram (-) bakteriler mor renk alırlar. Sonrasında distile su yardımıyla boya yıkanarak uzaklaştırıldı. Daha sonra lugol eklenip 1 dk boyunca inkübe edildi. Bu inkübasyon sırasında iyot-boya kompleksi oluşur ve bu kompleksin bakterinin peptidoglikan tabakasının varlığı veya yokluğuna göre Gram (+) mor renkte kalırken bir sonraki basamak olan %96'lık etanol muamelesi ile Gram (-) bu boya-iyot kompleksini kaybeder. Yıkama işleminden sonra saf su ile yıkanan preparat, bir karşıt boya olan safranin ile 20 sn muamele edildi. Bu aşamada ise Gram (-) bakteriler pembe/kırmızı renge boyar. Gram (+) bakteriler mevcutta mor renkte oldukları için safranin boyamasından etkilenmezler. Bu işlemin ardından yıkama işlemine tabi tutulan preparat kurutulup, immersiyon objektifinde incelendi. Mikroskopta görülen hücreler içerisinde mor renkler Gram pozitif, pembe-kırmızı renkler ise Gram negatif değerlendirildi (Adıgüzel vd., 2008).

## **Biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi**

### ***Katalaz testi***

Seçilen suştan 1 öze dolusu alınarak cam lam üzerine bırakıldı. Bakteriler üzerine birkaç damla %5'lik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> damlatılarak homojen hale getirildi. Ardından oksijen kabarcığı yani köpürme gözlemlendi. Kabarcık oluşumu varsa katalaz pozitif (+) yoksa katalaz negatif (-) olarak değerlendirildi.

### ***Oksidaz testi***

Bakterilerin enerji üretiminde ciddi rol oynayan sitokrom c proteini, taşıyıp taşımadığı oksidaz testi ile kontrol edilmektedir. Sitokrom c proteini, mitokondride bulunur ve solunum zincirinde görevlidir. Oksidaz testi için %1'lik tetrametil-p-fenilendiamin dihidroklorür reaktifini içeren hazır kit kullanıldı. Şayet sitokrom C oksidaz enzimi varsa p-fenilendiamin dihidroklorür reaktifini indirgeniş vaziyetten oksitlenmiş vaziyete çevrilecektir ve bu da renk oluşumuna neden olacaktır. Kite dahil olan diskin üzerine bir miktar bakteri bırakıldı. Oksidaz pozitif (+) bakterilerde mavi ve mor renk oluşumu gözlenirken, oksidaz (-) bakterilerde herhangi bir renk oluşumu gözlenmedi. Bu test 1 dk'dan daha kısa süren bir testtir. Dolayısıyla bir dakikadan sonra renk oluşumları geçersiz sayıldı.

## **Seçilen izolatın moleküler tanısı**

### ***Genomik DNA izolasyonu***

DNA izolasyonu Promega wizardR genomic DNA purification kit (A2360) protokolü ile gerçekleştirildi.

### ***İzolasyon aşamaları***

- TSB besiyerinde büyüttüğümüz suş alınarak santrifüj ile çöktürüldü. Santrifüj işlemi sonucunda tüpün dibine çöken hücreler 480 µL, pH'ı 8 olan 50 mM EDTA eklenerek çözdürüldü.
- 120 µL ve 10 mg/mL hücre duvarını parçalayan lizozim enzimi eklenerek karıştırıldı. Enzimin en iyi çalıştığı 37 °C sıcaklıkta 60 dk inkübasyona bırakıldı. Böylece bakterinin hücre duvar yapısını oluşturan β-(1,4)-glikozidik bağları kırılmış oldu.
- İnkübasyon sonrası 13000 devir/dk'da 120 sn santrifüj yapılarak süpernatant ortamdan uzaklaştırıldı. Daha sonra 600 µL hücrelerden DNA-RNA yı serbest bırakan nüklei lizis solüsyonu eklendi.

- Oluşan karışım 80 °C sıcaklıkta 5 dk inkübasyona tabi tutulup nükleaz enziminin denatürasyonu sağlandı. Daha sonra üzerine 3 µL RNA yı ortamdan uzaklaştıran RNaseA eklenerek 37 °C’de yarım saat inkübe edildi.
- Etüvden çıkarılan karışımı oda sıcaklığına gelene kadar bekletildi. Oda sıcaklığına geldikten sonra 200 µL proteinleri çöktürmek amacıyla kullanılan protein presipitasyon solüsyonu eklendi. 20 sn kadar vortexleme işlemi gerçekleştirildi.
- Elde edilen karışım 5 dk buzda bekletildikten sonra 30 sn boyunca 13000 rpm’de santrifüj edildi. Süpernatant, DNA’nın bu çözücü ortamdan ayrılarak görünmesini sağlayan 600 µL izopropanol içeren yeni ependorflara aktarıldı. Daha sonra ependorflar pellet görülünceye kadar alt üst edildi.
- Pellet oluştuktan sonra 13000 rpm’de 2 dk santrifüjlenip, süpernatantları dökülerek ve kurutma kâğıdı yardımıyla iyice kurutuldu.
- Tüplere DNA’yı protein tuz gibi atıklardan temizleyip saflığını artıran 600 µL %70’lik EtOH eklendikten sonra karıştırıldı ve 13000 rpm’de 2 dk santrifüj edildi.
- Santrifüj işlemi sonunda süpernatant atıldı ve EtOH’un buharlaşım uzaklaşması için 15 dk 37 °C’de inkübasyona bırakıldı.
- Son olarak, tüplere alkolle çöktürülmüş ve kurutulmuş DNA’yı yeniden çözündürmek için kullanılan 100 µL DNA rehidrasyon solüsyonu eklenerek, 65 °C’de 60 dk inkübasyona bırakıldı.
- Süreç bitiminde DNA’mızı taşıyan tüp daha sonra kullanılmak üzere +4 °C’de muhafaza edildi (Adıgüzel., 2008).

### 16S rRNA PCR İşlemi

Bakterilerde 16S rRNA ribozomun küçük alt biriminin bir parçası olduğundan buradaki herhangi bir hasar protein sentezini bozacağından ölümcüldür. Bu sebeple bu bölge evrimsel olarak korunmuştur. Korunaklı bölge olan 16S rRNA bölgesi, dizi analiz çalışmaları için büyük önem taşımaktadır. İzolata ait 16S rRNA gen bölgesi korunmuş olduğundan evrensel primerler kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile çoğaltıldı. PCR karışımı 30 µL reaksiyon ortamında hazırlandı (Tablo 5).

**Tablo 5.** 16S rRNA PCR Reaksiyon Karışımı

14,1 µL ddH <sub>2</sub> O
1,8 µL MgCl <sub>2</sub>
3 µL 10X PCR tamponu
0,6 µL dNTPs
3 µL 27F (ileri 5`-AGA GTT) TGA TCC TGG CTC AG 3')

**Tablo 5.** (devamı)

---

3 µL 1492R primer (geri 5'-GGT TAC CTT GTT 749/84ACG ACT T-3')
5 µM 1,2 µL DMSO
0,3 µL Taq DNA polimeraz
3 µL İzole edilen DNA

---

### **PCR döngüsü**

Ön denatürasyon işlemi için 95 °C'de 120 sn ve 36 döngü, çift sarmallı DNA yapısını açmak için yapılan denatürasyon işleminde 94 °C sıcaklıkta 60 sn, sıcaklığın düşürülerek primerlerin bağlanmasını sağlayan basamak olan bağlanma (annealing) işleminde 53 °C sıcaklıkta 60 sn ve Taq DNA polimeraz enziminin DNA zincirini uzatmaya başladığı basamak olan uzama işleminde 72 °C sıcaklıkta 120 sn olacak şekilde ayarlamalar yapıldı. 36 döngünün sonunda ise son uzama işlemi 72 °C sıcaklıkta 300 sn olacak şekilde programalar yapılarak, 16S rRNA gen bölgesi çoğaltılması sağlandı (Adıgüzel, 2008; Baltacı vd., 2020).

### **16S rRNA PCR elektroforez işlemi**

Agaroz jel elektroforez işlemi ile PCR işleminin çalışıp çalışmadığını çoğaltılan gen bölgesini doğrulamak için gerçekleştirildi. Bu amaçla 1 gram agaroz tartılıp, 100 mL 1X TAE ile karıştırıldı ve tamamen eriyene kadar mikrodalgada bırakıldı. Ardından mikrodalgadan çıkarılan agaroz ve TAE karışımı el yakmayacak kıvama gelinceye kadar soğumaya bırakıldı. İstenilen sıcaklığa geldiğinde jel ünitesinin camı aşağı indirilerek 3,5 µL etidyum bromür eklendi. EtBr eklenen karışım hafifçe karıştırılarak, içinde tarağın takılı olduğu elektroforez kütetine hava kabarcığı olmasın diye yavaşça döküldü. Jel dondurulduktan sonra tarak dikkatlice çıkarıldı ve jelde 1X TAE içeren bir elektroforez kabına yerleştirildi. Ardından ilk kuyucuğa 3 µL markır yüklendi ve diğer kuyucuklara 6X boyası ve PCR ürünü karışımından oluşan numune yüklendi. Elektroforez jel sisteminin pozitif (+) ve negatif (-) kutup noktaları dikkatli bir şekilde uygun bölmelere takıldıktan sonra numuneler 100 volt 75 dk süreyle yürümeye bırakıldı. Yürüme sonucunda DNA'nın istediğimiz boyutta olup olmadığını kontrol etmek amacının yanısıra spesifik olmayan bant ve primer dimerlerinin olup olmadığını saptamak için DNA bantları bir jel görüntüleme sistemi ile görselleştirilip ve bilgisayarda analiz edildi (Baltacı ve Adıgüzel., 2016).

### **Kompetent hücrelerin hazırlanma işlemi**

Klonlama işleminin ilk basamağı olan kompetant hücreler hazırlandı. Kompetent hücreyi hazırlamanın amacı bakteriyi dışarıdan vereceğimiz DNA'yı almaya hazır hale

getirmektedir. Bunun için, LB agar besiyerine genetik olarak modifiye edilmiş *Escherichia coli* JM101 suşu ekildi ve gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda petriden öze ucu ile bir koloni toplandı. LB ortamına inoküle edildi ve ön kültüre alındı. Daha sonra bu kültürden 1 mL alınarak LB ana kültürüne inoküle edildi ve optik yoğunluk yani OD<sub>600</sub> değeri 0,4- 0,6 değerleri arasında kalması için periyodik olarak kontrol edildi (Baltacı vd., 2020). Hücrelerin büyümesi istenilen aralığa geldikten sonra hücreler satrifüj edilip, CaCl<sub>2</sub> eklendi ve hücrelerde geçici açıklıklar oluştu.

### **Ligasyon işlemi**

İzolasyonu yapılan DNA'nın plazmit vektöre aktarılması anlamına gelen ligasyon işlemi gen klonlama işlemlerinde sıklıkla kullanılır.

PCR ile çoğaltılan 16S rRNA gen bölgeleri pGEM®-T Easy (Promega) vektörüne aktarıldı. Bunun için, 5 µL ve 2X Ligasyon buffer 3 µL, Polimer Zincir Reaksiyonu ürünü ile 1 µL vektör, 1 µL T4 DNA ligaz aynı ortamda karıştırılarak elde edilen karışım 16 °C'de 16 saat inkübe edildi (Baltacı vd., 2020).

### **Transformasyon işlemi**

Transformasyon işlemi yani dışarıdan verilen DNA'nın hücre içine alınmasını gerçekleştirebilmek için ısı şok yöntemi uygulandı. Oluşturulan kompetant hücreler ligasyon ürünleri ile bir araya getirildi. Isı şok işlemi için, önce yarım saat buz üstünde tutulmuş ardından 42 °C'ye ayarlanmış olan su küvetinde 120 sn bekletildi. Bu işlem sonucunda bakteri hücre duvarı yapısındaki gözenekler açılarak ligasyon ürününün bakteri hücresine nüfuz etmesi sağlandı. Isı şokundan sonra bakteri, 2 saat boyunca LB besiyeri içinde büyütülüp, bakteriler daha sonra IPTG, X-gal ve ampisilin içeren LB agar plakalarına ekilip 37 °C'de 12-14 saat inkübe edildi (Baltacı vd., 2020).

### **Koloni seçimi ve sıvı kültür işlemleri**

Klonlaması yapılacak olan DNA'nın lacZ geninin içerisinde bulunan MCS yani çoklu klonlama bölgesine yerleşip yerleşmediğini anlamak için mavi-beyaz seçim aşamasına geçildi. Bunun için İnkübasyonun sonrası, petriler mavi renkli kolonilerin oluşumunun gözlemlenmesi için gece boyunca antibiyotiğin jel içinde dengeli yayılımını sağlayıp sabitlemenin yanısıra antibiyotiğin bozulmasının da önüne geçmek için +4 °C sıcaklıkta tutuldu. 16S rRNA geninin transforme olmadığı kolonilerde mavi rengin, 16S rRNA geninin transforme olduğu kolonilerde ise beyaz rengin oluşumu beklendi (Baltacı vd., 2020).

## **Koloni PCR işlemi**

Seçilen beyaz koloniler de yalancı pozitiflik olması ihtimaline karşı ve plazmit içinde hedeflediğimiz genin varlığını doğrulamak adına DNA izolasyonu gerektirmeyen hızlı bir yöntem olan koloni PCR işlemi yapıldı. Bu işlem için kürdan yardımıyla pozitif kabul edilen beyaz koloniler tespit edilerek Tablo 6’da gösterilen reaksiyon karışımı ortamına aktarıldı.

**Tablo 6.** Koloni PCR reaksiyon karışımı

---

19,1 µL dH <sub>2</sub> O,
0,6 µL dNTP karışımı
3 µL tampon (MgCl <sub>2</sub> ile)
1,8 µL MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
2 µL 5 µM SP6 (5`-ATTTAGGTGACACTATAG-3`) primer
2 µL 5 µM T7 (5`-AATACGACTCACTATAG-3`) primer
1,2 µL DMSO
0,3 µL Taq DNA polimeraz
Kalıp DNA olarak kullanılan beyaz renkli bakteri kolonisi

---

### ***Koloni polimeraz zincir reaksiyon programı***

Denatürasyon basamağı 94 °C sıcaklıkta 120 sn, amplifikasyon basamağı 94 °C sıcaklıkta 30 sn, 55 °C sıcaklıkta 30 sn, 72 °C sıcaklıkta 120 sn 35 tekrar olacak şekilde ayarlanıp PCR işlemi gerçekleştirildi. İstenen geni taşıyan koloniler EtBr ile desteklenmiş %1’lik agaroz jele, PCR işlemi sonundaki örnekler yüklenerek görüntüleme cihazı ile analizi gerçekleştirildi. Seçilen beyaz kolonilerin istenilen geni taşıdığı kesinleştikten sonra plazmit izolasyonu için ampisilin içeren LB besiyerine ekildi (Baltacı vd., 2020).

### **Plazmit izolasyonu, kontrolü ve konsantrasyonların ölçme işlemi**

Plazmit izolasyonu için Wizard® Plus SV Minipreps DNA Saflaştırma Sistemi (Promega, A1330) kullanıldı. Plazmit kontrolü için numuneler EcoRI ile kesildi bu işlem genelde restriksiyon analizi adıyla da bilinir. Kesilen DNA parçaları bir agaroz jel içerisinde yürütülerek istenilen bant profili plazmitlerinin konsantrasyonunu >100 ng/mL olarak ayarlamak için Nanodrop cihazı (Thermo Scientific, Multiskan GO, ABD) kullanıldı ve dizi analizi için tüplerden 30 – 50 µL numuneler alınıp sekans analizlerinin sonuçlarını öğrenmek için MacroGen firmasına gönderildi.

### **DNA dizi analiz sonuçlarının değerlendirilmesi**

Şirketin web sitesinden elde edilen sıralama sonuçları BioEdit adlı program yardımı ile analiz edildi ve FASTA formatına dönüştürüldü. Diziler daha sonra yaklaşık 1500 bp’lik bir

dizi elde etmek için ortak bölgeden alignment yani hizalanma yapıldı. Ardından anlamlı sekans verileri; [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch) ve <http://www.ezbiocloud.net/eztaxon/identify> adresleri kullanılarak izolat tanımlandı.

### **Kestane kabuklarının ön muamelesi**

Kestane kabuklarını besiyeri ortamına eklenmeden önce asit ön işlemi uygulanır. Bu uygulamanın sebebi lignoselülozik yapıdaki bağların yıkılmasını sağlayarak yapıdaki monosakkaritleri bakteriler tarafından kullanımını kolaylaştırır. Kestane kabuklarına ön işlem olarak seyreltilmiş sülfürik ( $H_2SO_4$ ) asit kullanıldı (Bhatia vd., 2020). Seyreltik asit, glikozit bağlarını parçalayarak hemiselülozları etkin bir şekilde hidrolize eder ve oligomerleri ve karbonhidratları serbest bırakmak vasıtasıyla lignin ve selülozu kısmi olarak çözer (Woiciechowski vd., 2020).

### **Lignin peroksidaz enzim aktivite ölçümü**

Lignin peroksidaz enzim aktivitesi, guaiacol substratına karşı gösterdiği katalitik etki referans alınarak spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. Ölçümde kullanılan reaksiyon karışımı Tablo.7’de gösterilmiştir.

**Tablo 7.** Lignin Peroksidaz Enzim Aktivitesi Ölçüm Reaksiyon Karışımı

---

0,1 mL enzim,
33 mM $KH_2PO_4$ (pH 6)
15 mM guaiacol
10 mM $H_2O_2$

---

0,1 mL’si enzim olacak şekilde toplam 3,0 mL’lik reaksiyon karışımı hazırlandı. Guaiacol’un hidrojen peroksit varlığında lignin peroksidaz tarafından oksitlenmesi sonucu oluşan kahverengi renkli ürünün absorbans değişimi bir dk boyunca 510 nm dalga boyunda izlendi (Simoes vd., 2008)

### **Lignin peroksidaz enzim üretimi için bakteri büyüme parametrelerinin optimizasyonu**

Lignin peroksidaz enziminin üretim potansiyelini artırmak için kültür ortamı şartlarının optimize edilmesi sağlandı. Ön muamele işlemine tutulan kestane kabukları ve 100 mL steril distile su ile hazırlanan besiyeri ortamına;  $4,55\text{ gL}^{-1}$  dipotasyum fosfat ( $K_2HPO_4$ ),  $0,53\text{ gL}^{-1}$  monopotasyum fosfat ( $KH_2PO_4$ ),  $0,5\text{ gL}^{-1}$  magnezyum sülfat ( $MgSO_4$ ),  $5,0\text{ gL}^{-1}$  amonyum nitrat ( $NH_4NO_3$ ) kimyasalları eklendi ve seçilen izolatın enzim üretimini arttırmak için 24 ve 96 saat aralığında inkübasyon süresi, 5 g/L, 10 g/L, 20 g/L, 30 g/L ve 30 g/L kabuk miktarı, pH 5 ila

pH 10 aralığında pH denemeleri ve 40 °C ila 60 °C aralığında sıcaklık gibi parametrelerin optimizasyon çalışmaları yapıldı (Falade vd., 2017).

### **Protein tayini ve standart grafik**

Protein tayini, 1-100 µg-protein hassasiyetine sahip Bradford yöntemi yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemin esası, Coomasie brilliant blue G-250 boyasının farklı konsantrasyonlardaki proteinlere bağlanarak, farklı renk şiddetinde mavi renkli çözeltiler ortaya koymasından faydalanarak oluşturulmuştur. Mavi rengin oluşmasında proteinin bazik aminoasit bileşimi önemlidir. Boyanın özellikle bazik amino asitlere ve bazı aromatik amino asitlere bağlanma eğilimindedir. Yöntemde boyaya bağlanmış protein 595 nm dalga boyunda maksimum absorbans verir (Bradford, 1976)

Standart grafiğin hazırlanması için;

- (1:1 mL/mg) protein ihtiva eden standart BSA hazırlandı. Bu çözeltiden 10 farklı tüpe sırayla 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL alınarak, distile su ile tüm tüplerin hacmi 0,1mL 'ye tamamlandı.
- Tüpteki karışımlara 4,9 mL renklendirme reaktifi eklendi ve vortekslendi ve 10 dk beklemeye bırakıldı. 595 nm'de 3 mL'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak 0,1 mL saf su ve 4,9 mL renklendirme reaktifinden oluşan karışım kullanıldı. Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri kullanılarak standart grafik elde edildi.
- Protein tayini yapılan numuneler için şekilde 0,1 mL enzim çözeltisi üzerine 4,9 mL boya çözeltisi eklendi ve 10 dk sonra 595 nm'de absorbans değerleri okundu. Elde edilen absorbans değeri ve standart grafiğin eğimi kullanılarak, protein miktarı hesaplandı.

### **Lignin peroksidaz enziminin üçlü faz ayırma (TPP) sistemi ile saflaştırılması**

TPP amonyum sülfat ve organik çözücü olarak t-butanol eklenmesiyle çözeltilerin üç faza ayrılmasını sağlayan hızlı ve etkili bir yöntemdir. Organik olan üst faz t-butanol içerirken orta faz hedef protein/enzim içerir. Alt faz ise genellikle çoğu çözülmüş protein olmak üzere atıkları içerir.

SH27 izolatının lignin peroksidaz enziminin TPP işlemiyle saflaştırılmasında sırasında enzimin saflaştırıldığı en uygun aralığı bulmak amacıyla kimyasal gösterimli amonyum sülfat tuzunun yüzdesi, homojenat:t-butanol oranı parametrelerinin optimizasyon çalışmaları yapıldı.

- SH27 suşunun en iyi aktivite gösterdiği koşullarda büyütüldükten sonra besiyeri santrifüjlendi ve enzimin saflaştırılacağı homojenat elde edildi. Elde edilen homojenattan 2 mL alınarak %20 ile %80 aralığındaki farklı tuz oranları hesaplanarak homojenatın üzerine eklendi (Tablo 8).
- Yedi ayrı tuz oranı ve dört ayrı tuz oranı denemesi yapılacağı için toplamda 28 adet tüp hazırlandı.
- Tüplere belirlenen oranlarda tuzlar tartılarak eklendi. Tüm tüplerde tuzun üzerine 2 mL enzimin içerisinde olduğu çözeltiden eklendi ve 3 dk vorteksledi.
- Vorteksledikten sonra her tuz oranı için 1,0:0,5; 1,0:1,0; 1,0:1,5; 1,0:2,0 oranlarında homojenat:t-butanol oranı hesaplanarak t-butanol eklendi. Tekrar vorteksledikten sonra oda sıcaklığında 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. 1 saatin ardından fazların kesin ayrımı için 5500 rpm'de 7 dk santrifüjlendi.
- Alt faz, ara faz ve üst faz olmak üzere üç faz ayrımı gözlemlendi. Pastör pipeti yardımı ile t-butanolün bulunduğu üst faz ayrıldıktan sonra orta faz ve alt faz ayrı tüplere alınarak protein ve enzim aktivitesi tayini yapıldı. % verim ve saflaştırma katsayısı hesaplanarak grafik çizildi. Amonyum sülfat çöktürmesinde kullanılacak amonyum sülfat miktarının belirlenmesinde aşağıdaki eşitlik kullanıldı.

$$g_{(NH_4)_2SO_4} = \frac{1.77 \times (S_2 - S_1)}{3.54 - S_2}$$

V: Bakteri solüsyonunun toplam hacmi (mL)

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

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

**Tablo 8.** TPP İle Enzim Saflaştırırken Kullanılan Amonyum Sülfat ve t-butanol Oranları

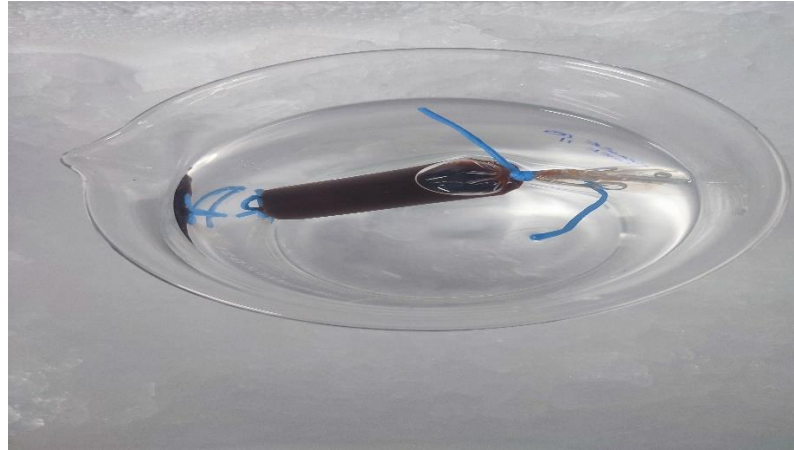
	<b>1:0,5</b> <b>(Homojenat:t- butanol)</b>	<b>1:1</b> <b>(Homojenat:t- butanol)</b>	<b>1:1,5</b> <b>(Homojenat:t- butanol)</b>	<b>1:2</b> <b>(Homojenat:t- butanol)</b>
<b>%20</b>	0,212 gram tuz	0,212 gram tuz	0,212 gram tuz	0,212 gram tuz
<b>Amonyum sülfat</b>	1 mL t-butanol	2 mL t-butanol	3 mL t-butanol	4 mL t-butanol
<b>%30</b>	0,328 gram tuz	0,328 gram tuz	0,328 gram tuz	0,328 gram tuz
<b>Amonyum sülfat</b>	1 mL t-butanol	2 mL t-butanol	3 mL t-butanol	4 mL t-butanol
<b>%40</b>	0,45 gram tuz	0,45 gram tuz	0,45 gram tuz	0,45 gram tuz
<b>Amonyum sülfat</b>	1 mL t-butanol	2 mL t-butanol	3 mL t-butanol	4 mL t-butanol

**Tablo 8.** (devamı)

<b>%50</b>	0,582 gram tuz	0,582 gram tuz	0,582 gram tuz	0,582 gram tuz
<b>Amonyum sülfat</b>	1 mL t-butanol	2 mL t-butanol	3 mL t-butanol	4 mL t-butanol
<b>%60</b>	0,722 gram tuz	0,722 gram tuz	0,722 gram tuz	0,722 gram tuz
<b>Amonyum sülfat</b>	1 mL t-butanol	2 mL t-butanol	3 mL t-butanol	4 mL t-butanol
<b>%70</b>	0,873 gram tuz	0,873 gram tuz	0,873 gram tuz	0,873 gram tuz
<b>Amonyum sülfat</b>	1 mL t-butanol	2 mL t-butanol	3 mL t-butanol	4 mL t-butanol
<b>%80</b>	1,033 gram tuz	1,033 gram tuz	1,033 gram tuz	1,033 gram tuz
<b>Amonyum sülfat</b>	1 mL t-butanol	2 mL t-butanol	3 mL t-butanol	4 mL t-butanol

### *Diyaliz*

TPP ile saflaştırma sırasında kullanılan yüksek tuz konsantrasyonunun ve kullanılan çözügen yani alkolün uzaklaştırılması ve enzimin uygun bir tampon ortamına alınması amacıyla diyaliz yöntemi uygulandı (Şekil 3). Yüksek tuz konsantrasyonları proteinin çevresindeki hidrat kılıfını kendine çekmesiyle beraber proteinlerin salting-out olması yani çözünürlüğünün azalmasına sebep olur bunun önüne geçmek ve numunedeki tuz ve küçük moleküllerin uzaklaştırılması amacıyla SDS-PAGE analizinden önce diyaliz işlemi uygulanmıştır. Saflaştırılan enzim çözeltisi diyaliz torbasına yerleştirilip 100 mM Tris-HCl pH 6,5 olan tamponda 10-12 saat diyaliz edildi.



**Şekil 3.** Saflaştırılan enzimin diyalizi

### **SDS-PAGE**

Saflaştırılan enzimin kontrolü, moleküler kütlesi ve alt birim sayısını belirlemek amacıyla SDS-PAGE yapıldı. SDS-PAGE proteinleri elektrik alanı vasıtasıyla poliakrilamid jel içinde hareket ettirerek moleküler ağırlıklarına göre ayırır. SDS bir deterjandır ve proteinlere bağlanarak onların doğal formlarını bozup proteinlere negatif yük kazandırır. Jele yüklenen tüm

proteinler yapısal olarak bozulduğundan benzer hale gelir. Tek farklılık moleküler kütleleri olur.

### **CaO/ZnO bimetalik NP sentezi**

CaO/ZnO bimetalik nanopartiküllerin (CaO/ZnO-NP'ler) sentezi için saflaştırılmış lignin peroksidaz enzimi, 0,1 M CaCl<sub>2</sub> ve ZnCl<sub>2</sub> stok çözeltisi ile karıştırıldı ve optimum koşullar altında 85 °C'de 4 saat 400 rpm'de karıştırıldı. Sürenin sonunda, reaksiyon ortamının pH'ı 8 ile 11 arasına gelene kadar karıştırılarak çözeltiliye 0,5 M NaOH çözeltisi eklendi. Daha sonra teflon astarlı, kapalı paslanmaz çelik otoklavlara aktarıldı ve 180-200 °C'de 8 saat tutuldu. Oda sıcaklığına soğutulduktan sonra, çöken beyaz katı CaO/ZnO-NP'ler çözeltiden süzüldü. Etanol ile yıkandı ve 60 °C'de vakum altında kurutuldu (Chamaraja vd., 2024).

### **CaO/ZnO Bi metalik NP'lerin karakterizasyonu**

CaO/ZnO-NP'lerin karakterizasyonu Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (DAYTAM) gerçekleştirilmiştir. Nanopartiküllerin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) görüntüleri Zeiss Sigma 300 alan emisyonlu SEM ile kaydedildi. Analiz, CaO/ZnO NP örneklerinin karbon/platin yapıştırıcı sekmeleri kullanılarak pim tipi SEM saplamalarına monte edilmesi ve yüzey iletkenliğini iyileştirmek için analizden önce vakum altında elektrokaplama yoluyla karbonla kaplanmasıyla gerçekleştirildi.

Boya işleminden önce ve sonra CaO/ZnO NP'lerin X-ışını difraktogramı (XRD), Cu-K $\alpha$  radyasyonunda ( $\lambda=1,54 \text{ \AA}$ ) PANalytical Empyran model XRD kullanılarak gerçekleştirildi. Kurutulmuş nanopartiküllerin analizi, ortam havasında  $2\theta \text{ min}^{-1}$ 'de 2° tarama hızında 10 ila 80° arasında sürekli taramalarla gerçekleştirildi.

CaO/ZnO NP'lerin Allura Red boyası ile muamelesinden önce ve sonra FT-IR analizi, zayıflatılmış toplam yansıma (ATR) tekniği ile 4000-400 cm<sup>-1</sup> bölgesinde bir Vertex 80 Model FT-IR Frontier spektrofotometresi kullanılarak kaydedildi.

### **Fotokatalitik boya giderimi**

Green sentez ile elde edilen CaO/ZnO nanopartikülü ile ışık enerjisi kullanılarak boyaların kimyasal olarak parçalanması ve çevresel sulardan ya da atıksulardan uzaklaştırılması için boya giderimi yapıldı. Boya giderimi yapılacak olan reaksiyon ortamının üzerine ışık kaynağı yerleştirildi. Süre, pH, sıcaklık, allura red boya konsantrasyonu ve nanopartikül miktarı denemeleri yapıldı. Boya giderim yüzdeleri aşağıda belirtilen formüle göre yapıldı (Topal vd., 2024).

$$\% \text{ Boya Giderimi} = [(A_0 - A_t) / A_0] \times 100$$

- $A_0$  = İlk absorbans
- $A_t$  = Zaman içindeki absorbans



## ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

### Kestanenin Toplanması ve Ön Muamele

Kestaneler Erzurum yerel marketlerinden satın alındı. Kestane kabuğunu doğal haliyle kompleks karbonhidratlar içerir ve bakteri bunu doğrudan kullanamayacağı için kestane kabuklarını besiyerine karbon kaynağı olarak eklemeyen önce seyreltilmiş sülfürik asit ile muamele edildi. Muamele öncesi ve sonrası halleri Şekil 4'te gösterilmiştir.



Şekil 4. Kestane ve ön muameleli kestane kabuğu

### İzolasyonu Gerçekleştirilen Suşun Lignin Peroksidaz Enzim Üretim Yeteneği

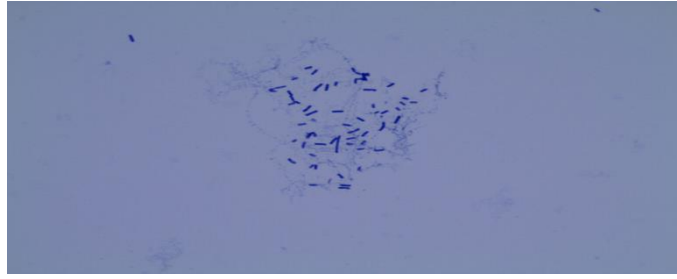
Erzurum Pasinler kaplıcalarından izole edilen 10 bakteri örneğinden yalnızca SH27 kodlu bakterinin lignin peroksidaz enzim üretim potansiyeli iyot ve potasyum iyodür kimyasalını içeren lügol ile enzim aktivitesi olduğu saptandı ve zon belirlenen petri sonucu görsel olarak tespit edildi (Şekil 5).



Şekil 5. Lignin peroksidaz enzim üretim potansiyelinin taranması

### Lignin Peroksidaz Enzim Aktivitesi Gösteren Suşun Morfolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Erzurum Pasinler kaplıcalarından izolasyonu yapılan lignin peroksidaz enzim üretim potansiyeline sahip SH27 kodlu bakterinin mikroskopik olarak incelenmesi sonucunda, Şekil 6'da görüleceği üzere basil formunda ve Gram (+) olduğu saptandı.



**Şekil 6.** SH-27 kodlu bakterinin morfolojisi

İzolasyonu yapılan SH27 kodlu bakterinin tanımlanması, sınıflandırılması ve karakterize edilmesi için standart, hızlı ve ucuz laboratuvar teknikleri kullanılarak Tablo 9’da belirtilen konvensiyonel özellikleri incelendi. Katalaz pozitif, oksidaz pozitif, peroksidaz enzimi üretim açısından pozitif ve endospor oluşturabilen bir bakteri olduğu belirlendi.

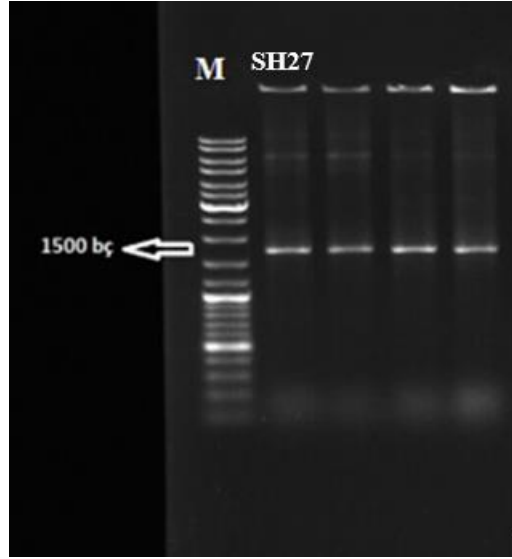
**Tablo 9.** Konvensiyonel Analiz Sonucu SH-27 Bakterisinin Özellikleri

Özellikler	SH-27
Katalaz	+
Endospor	+
Oksidaz	+
Morfoloji	Basil
Gram boyama	+
Peroksidaz	+

### İzolatuın Moleküler Tanılanması

#### İzolatuın 16S rRNA gen bölgelerinin çoğaltılması

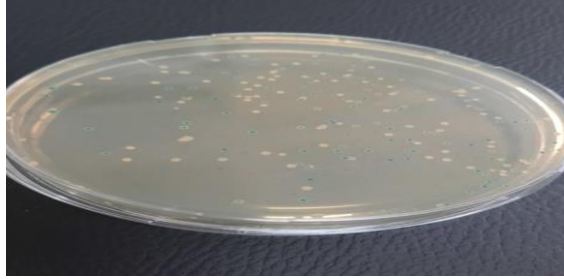
SH27 kodlu bakterimizin 16S rRNA PCR sonucunda 1500 baz çiftlik dizide bant elde edilmiştir (Şekil 7). 1500 baz dizilik bölüm neredeyse 16S rRNA dizisinin tamamını kapsar ve bu bize hem korunan hem değişken bölgelerin uluslararası veri tabanlarındaki referans olarak kabul ettiğimiz dizilerle doğru karşılaştırma ve analiz yapmamıza fırsat tanmaktadır.



**Şekil 7.** SH27 bakterisinin 16S rRNA PCR sonuçlarının UV ışığı altındaki bant görüntüsü

### **16S rRNA gen bölgesinin klonlanması**

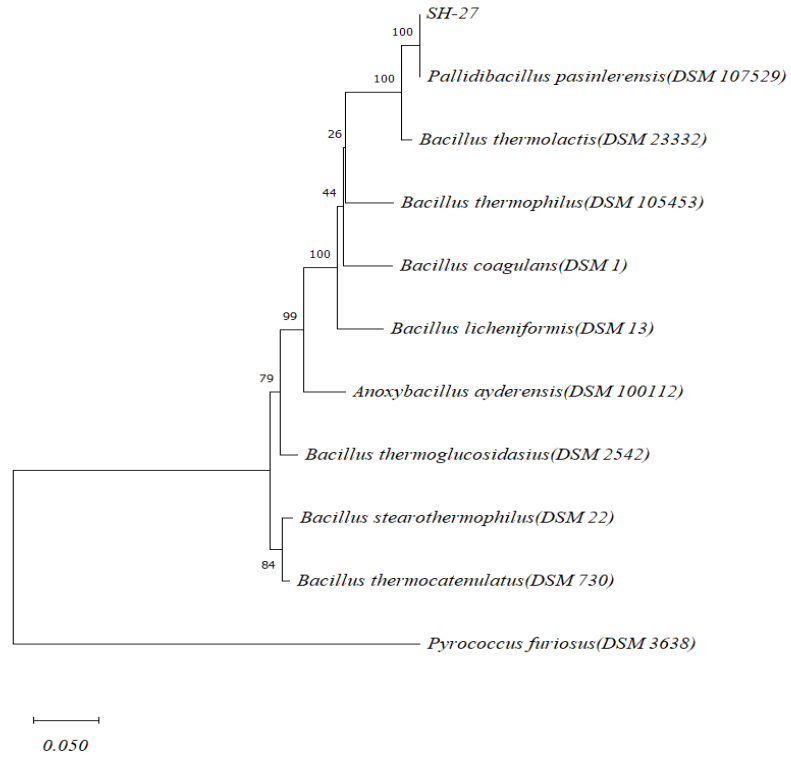
Plazmit içerisine gen transferinin olup olmadığı gözle ayırt edebilme fırsatı sunan mavi-beyaz seçilim yöntemiyle saptanabilir. Burada seçilimi yapılacak olanlar beyaz kolonilerdir. Plazmite transfer ettiğimiz 16S rRNA gen bölgesi plazmitteki LacZ geninin içine insert olmuş ve bu genin yardımıyla parçalanan X-gal substratının parçalanmasıyla oluşan mavi renk oluşumunun önüne geçmiştir. Burada gönderilen gen bölgesinin transfer olduğunu anlaşıldı (Şekil 8).



**Şekil 8.** 16S rRNA bölgesinin klonlanmasında bakterilerin mavi-beyaz seçilimi

### **16S rRNA sekans analizi**

Tanılatmaya gönderdiğimiz dizilerden gelen sekans analizleri sonucunda sekanslanan diziler NCBI GENBANK® veritabanında bulunan diğer diziler ile karşılaştırıldı. Karşılaştırma sonucunda SH27 izolatının diğer bakterilere benzerlik oranı belirlendi ve veriler GENBANK®'a girilerek, SH27 izolatı için accession numarası (PV034375) alındı ve filogenetik ağaç çizildi (Şekil 9).

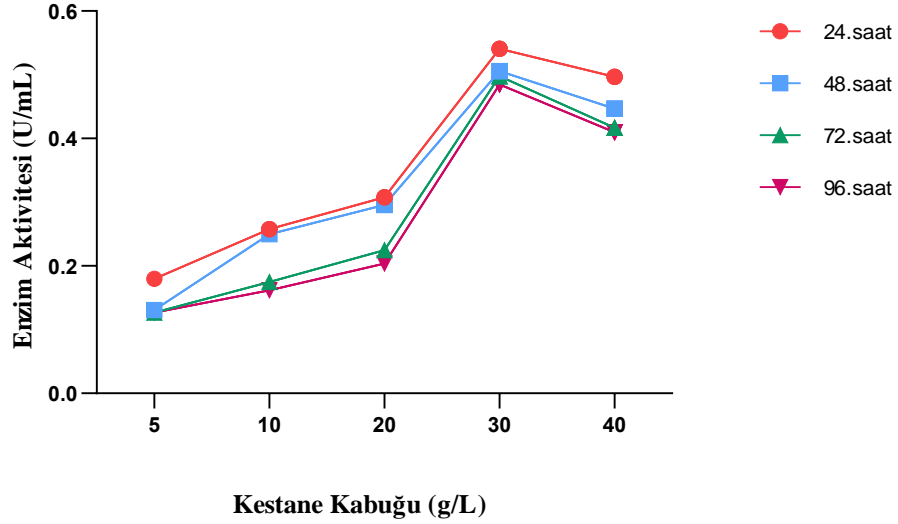


**Şekil 9.** SH27 İzolatının gen verisi dizilerine dayanarak oluşturulan filogenetik ağaç (Ölçek çubuğu 0,050'lik sapmayı ifade eder)

## Lignin Peroksidaz Enzim Üretimi İçin Besiyeri Optimizasyonları

### Kestane kabuğu miktar optimizasyonu

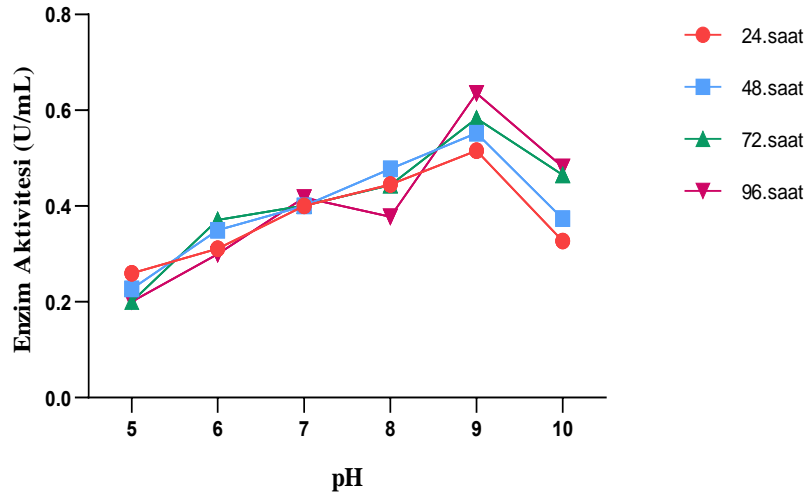
Karbon kaynağı olarak kullanılan atık kestane kabuklarının Şekil 11'de gösterildiği üzere 5 g/L, 10 g/L, 20 g/L, 30 g/L ve 30 g/L miktar denemeleri yapıldı. En iyi lignin peroksidaz enzim üretimi 30 g/L kestane kabuğu miktarında elde edildi ve bakteriler için yeterli besin sağlandı. (Şekil 10). 30 gramın üzerindeki kestane kabuğu miktarlarında enzim aktivitesinin düşmesinin sebebi fazla besin yüklemesi sebebiyle bakteriyel metabolizma inhibe olmuş olabilir veya kestane kabuğundan gelen bileşiklerin ortamı asidik hale getirdiği ve pH düşüşü ile enzim aktivitesinde azalmaya sebep olduğu düşünülmektedir.



**Şekil 10.** Lignin peroksidaz enzim üretimi için kestane kabuğu miktar optimizasyonu

### pH optimizasyonu

Şekil 12’de gösterildiği üzere pH denemeleri pH 5 ile pH 10 aralığında yapıldı. Lignin peroksidaz enzimi enzim-substrat etkileşimini etkileyen hidrojen peroksit adında nötr veya hafif asidik olan elektron alıcısı ile çalışır. Hidrojen peroksit alkali ortamda kararsız olduğu için reaktifliği tetiklenir, daha hızlı parçalanır ve hızlı oksijen salınımı yapar. Şekil 11’e bakıldığında enzim üretim kapasitesinin pH 9’da en iyi olduğu görülmektedir.

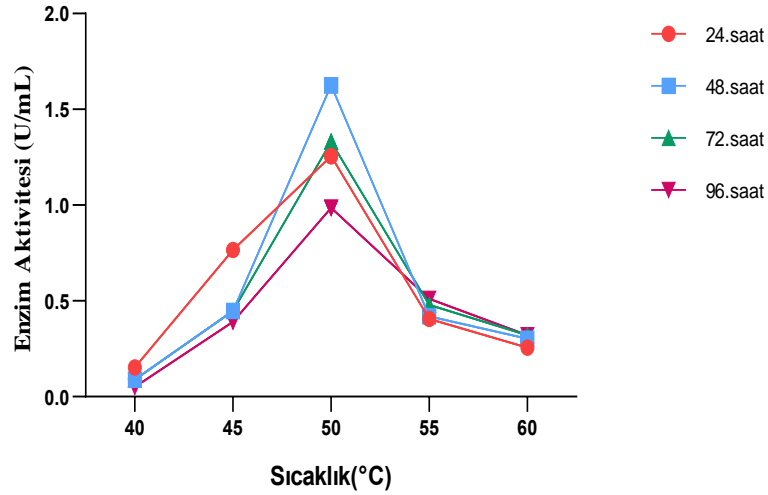


**Şekil 11.** Lignin peroksidaz enzim üretimi için pH optimizasyonu

### Sıcaklık

Sıcaklık arttıkça yani moleküler hareketlilik arttıkça reaksiyon hızının arttığı ve belirli bir seviyeden sonra keskin bir düşüş olduğu Şekil 12’te görülmektedir. Bunun nedeni yüksek

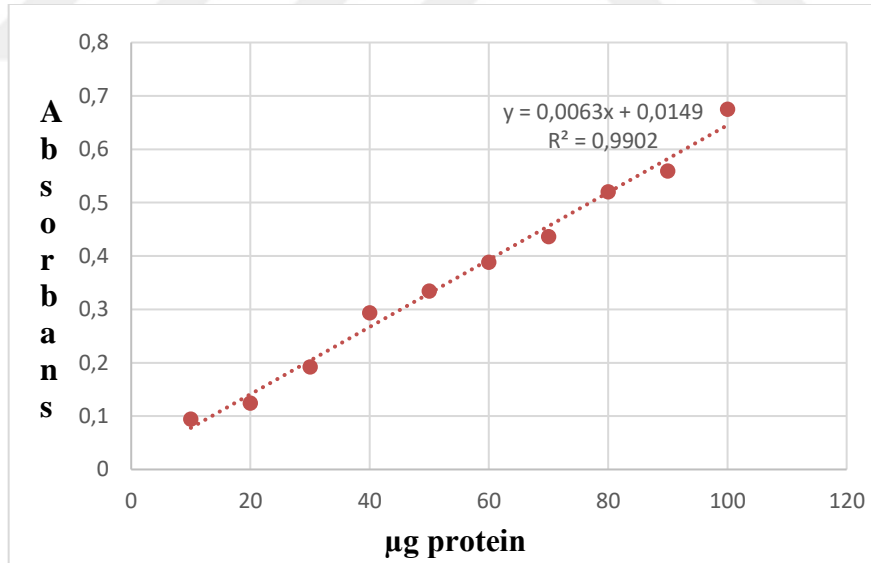
sıcaklıkla beraber meydana gelen enzim konformasyon değişikliği veya denatürasyonudur. Grafığe göre en iyi optimal sıcaklık 50 °C olduğu görülmektedir.



Şekil 12. Lignin peroksidaz enzim üretimi için sıcaklık optimizasyonu

### Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

BSA (Sığır Serum Albumin) gibi konsantrasyonu bilinen bir protein çözeltisinden kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (Şekil 14)

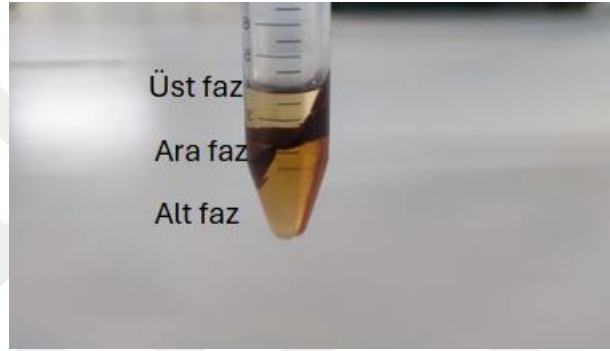


Şekil 13. Protein miktar tayininde kullanılan standart grafik

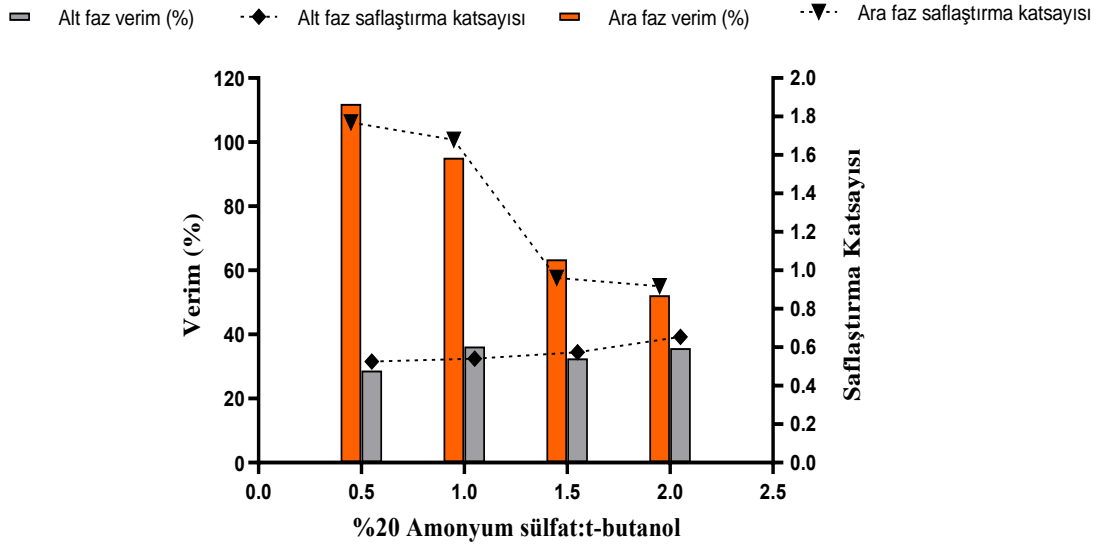
### TPP ile Lignin Peroksidaz Enzim Saflaştırma Optimizasyonları

Şekil 14'te, üç fazlı ayırma işlemi sonucunda oluşan tabakalar görülmektedir. Alt faz ve ara faz için ayrı ayrı enzim aktivitesi ve protein tayini yapıldı. Lignin peroksidaz enziminin TPP ile saflaştırılması sırasında %20 ile %80 arasında değişen amonyum sülfat oranlarında tuz ve organik çözügen (*t*-butanol) optimizasyonu yapıldı. Her amonyum sülfat tuz oranı için 1,0:0,5;

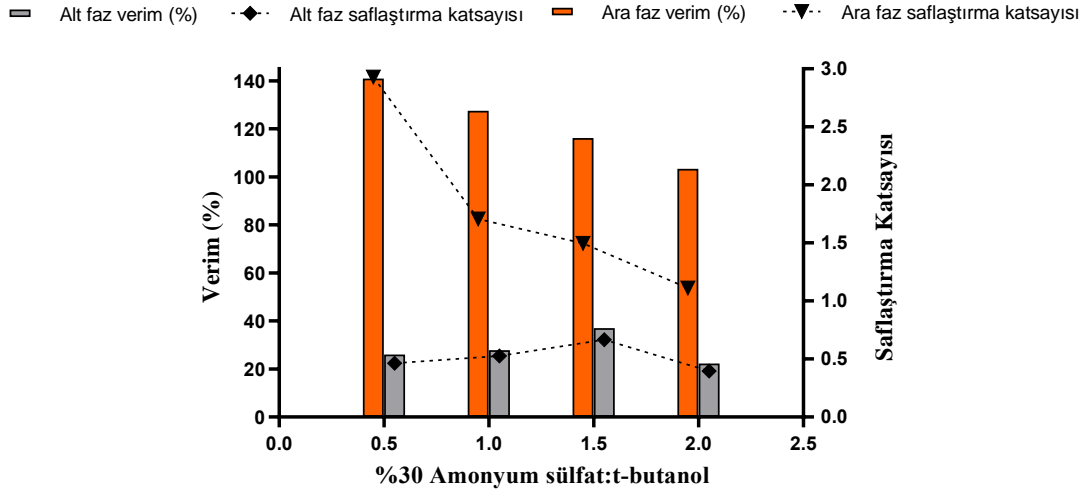
1,0:1,0; 1,0:1,5; 1,0:2,0 oranlarında (homojenat: *t*-butanol) denemeleri yapıldı. Sonuçta % verimin en yüksek olduğu %40 amonyum sülfat doygunluğunda homojenat:*t*-butanol oranı olarak ise (2:2) olarak tasarlanan basamakta %157,59 ve 1,8 saflaştırma katsayısı belirlenmiştir (Şekil 17). TPP yöntemi kullanılarak saflaştırılan lignin peroksidaz enzimi green sentezde kullanılacağı için saflaştırma katsayısından ziyade aktivite geri kazanımını ifade eden % verim değeri yüksek olana öncelik veririz. Çünkü saflaştırılan enzim green sentezde indirgeme ajanı olarak kullanılacaktır. Saflaştırma sonucu elde edilen çözeltilerde saflık önemli bir etken fakat enzimin aktivitesini koruması daha önemlidir. Bu sebeple uygulamada yeterli aktiviteyi koruyabilecek kısmi saflaştırma yeterli olacaktır. Çünkü tez çalışmamız atık sulardaki boya hedefleyen çevreci bir çalışmadır, saflaştırmadan ziyade sürdürülebilir kullanım ön plana çıkmaktadır.



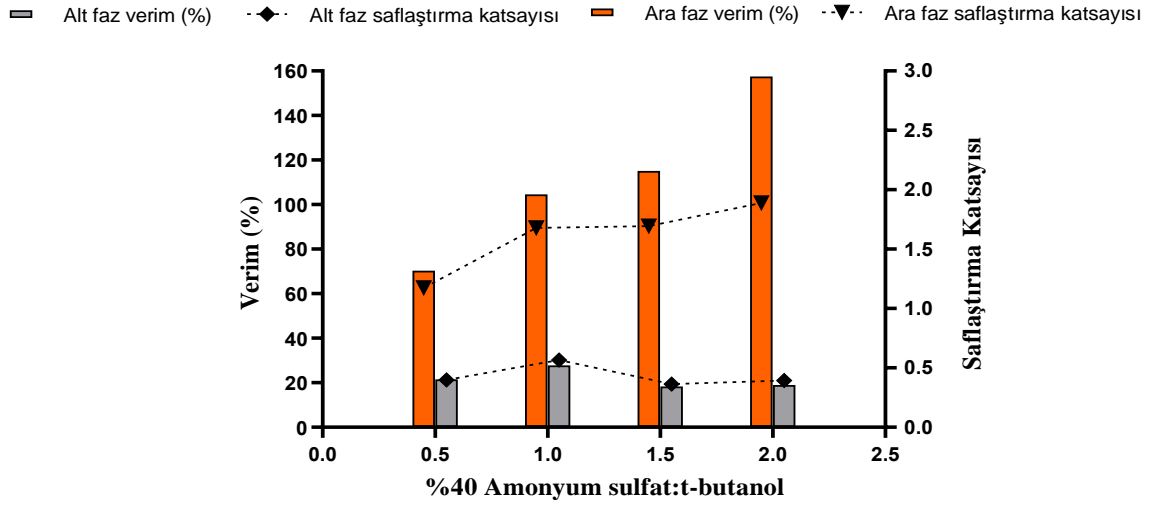
Şekil 14. TPP ile enzim saflaştırma sırasında oluşan fazların görüntüsü



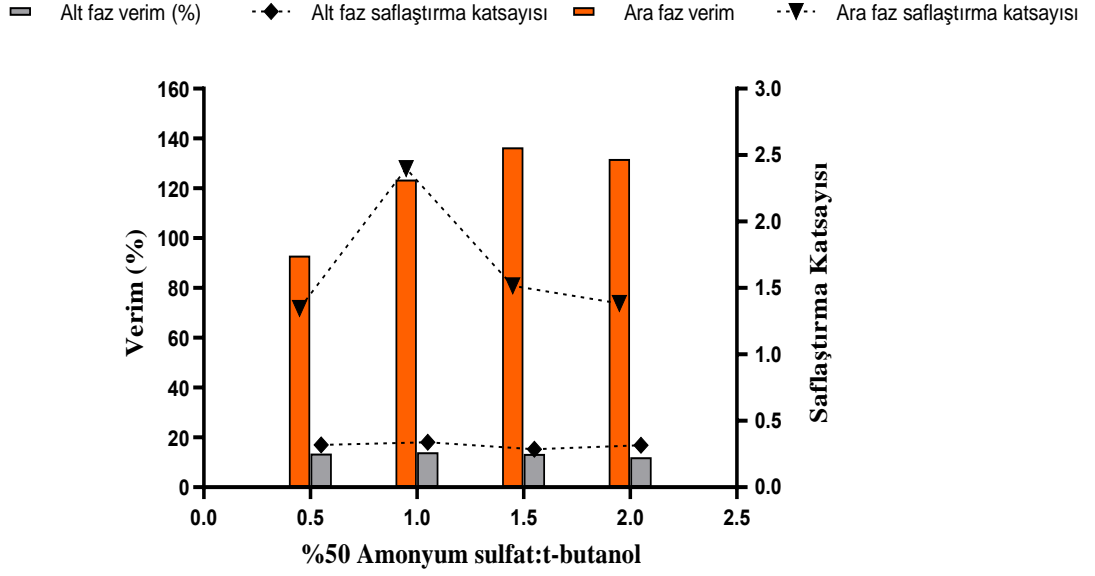
Şekil 15. TPP'de %20 amonyum sülfat varlığında % verim ve % saflaştırma katsayısı değerleri



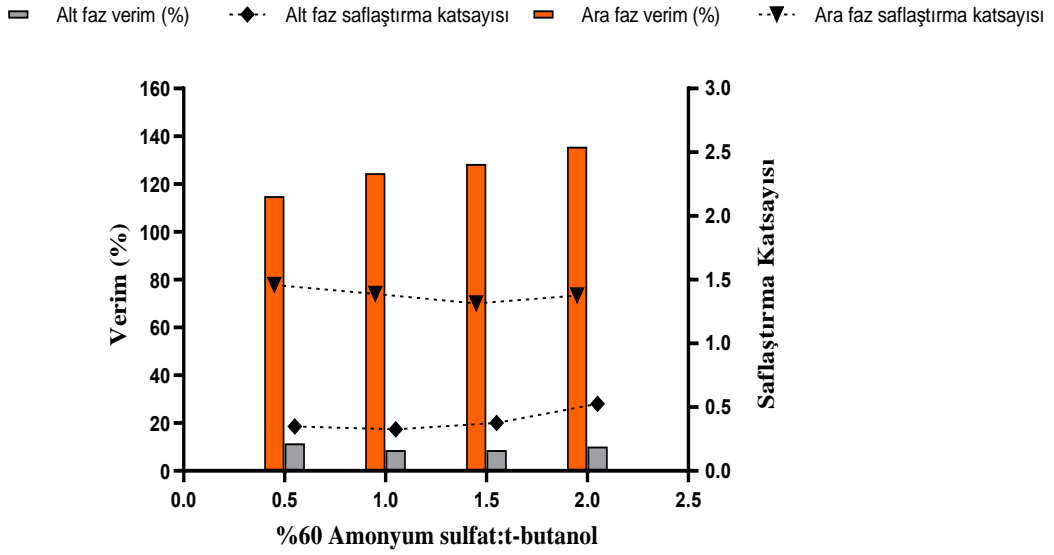
Şekil 16. TPP'de %30 amonyum sülfat varlığında % verim ve % saflaştırma katsayısı değerleri



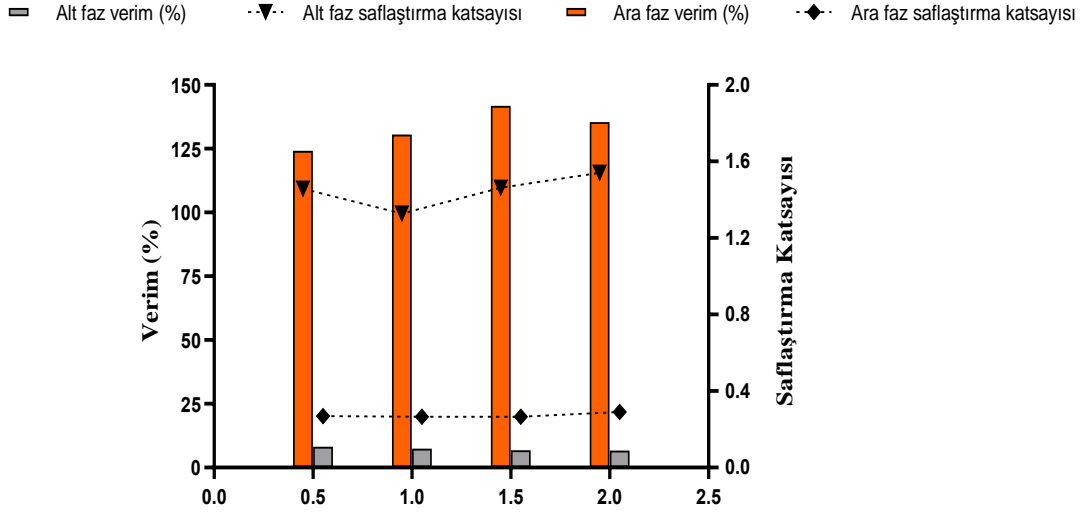
Şekil 17. TPP'de %40 amonyum sülfat varlığında % verim ve % saflaştırma katsayısı değerleri



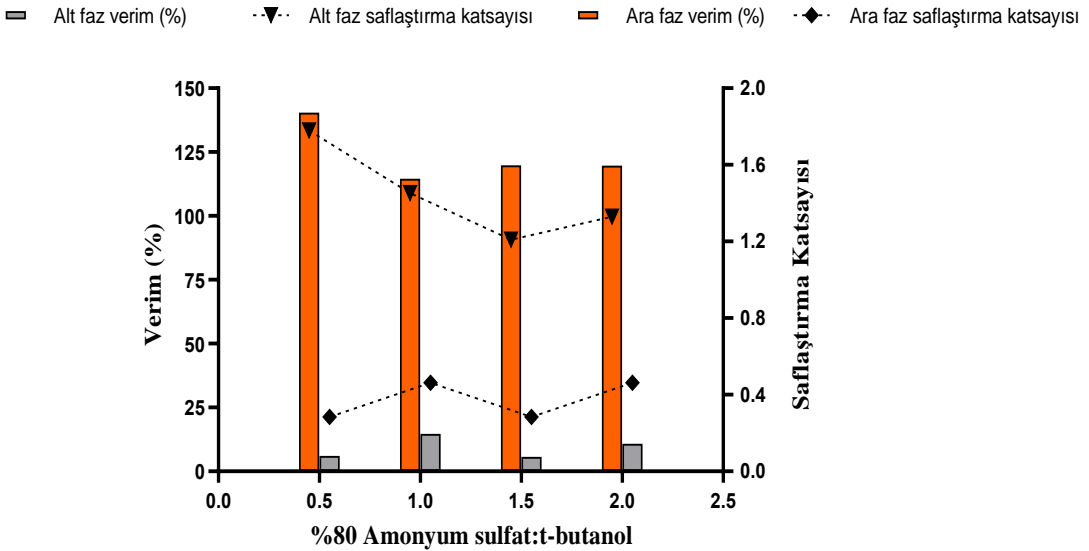
Şekil 18. TPP'de %50 amonyum sülfat varlığında % verim ve % saflaştırma katsayısı değerleri



Şekil 19. TPP'de %60 amonyum sülfat varlığında % verim ve % saflaştırma katsayısı değerleri



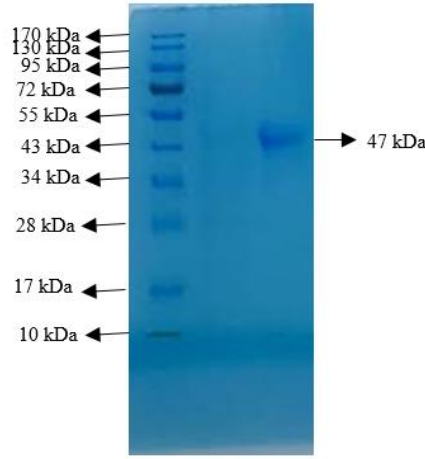
**Şekil 20.** TPP'de %70 amonyum sülfat varlığında % verim ve % saflaştırma katsayısı değerleri



**Şekil 21.** TPP'de %80 amonyum sülfat varlığında % verim ve % saflaştırma katsayısı değerleri

### SDS-PAGE Analiz Sonuçları

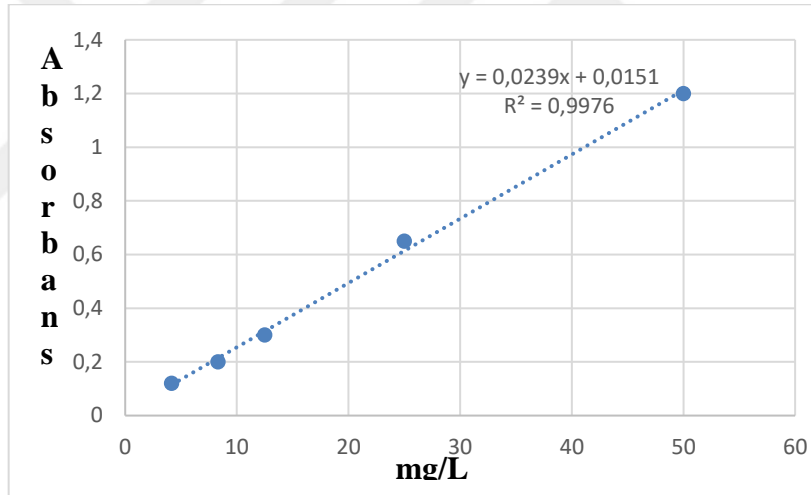
Proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrılmasını sağlayan güçlü bir elektroforetik teknik olan SDS-PAGE, enzim saflaştırma sürecinin etkinliğini değerlendirmenin yanı sıra saflaştırılan enzimin alt birim sayısının belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. SDS-PAGE'de kullanılan marker kDa cinsinden ağırlığı bilinen protein karışımı standart olarak kullanılmıştır. İzole edilen lignin peroksidaz enziminin tek bant verdiği ve bant pozisyonu standart ile karşılaştırıldığında Rf değerine göre yaklaşık enzimin molekül ağırlığının ~47 kDa olduğu belirlendi.



Şekil 22. TPP yöntemiyle saflaştırılan lignin peroksidaz enziminin SDS-PAGE görüntüsü

### Boya Gideriminde Kullanılan Standart Grafik

Ölçülen absorbans değerleri doğrudan konsantrasyonu vermez. Bu ilişkiyi standart çözeltilerle oluşturulan kalibrasyon grafiği sayesinde hesaplanmıştır. Standart grafik, belirli bir konsantrasyon aralığında absorbansın doğrusal olduğunu gösterir (Şekil 23).

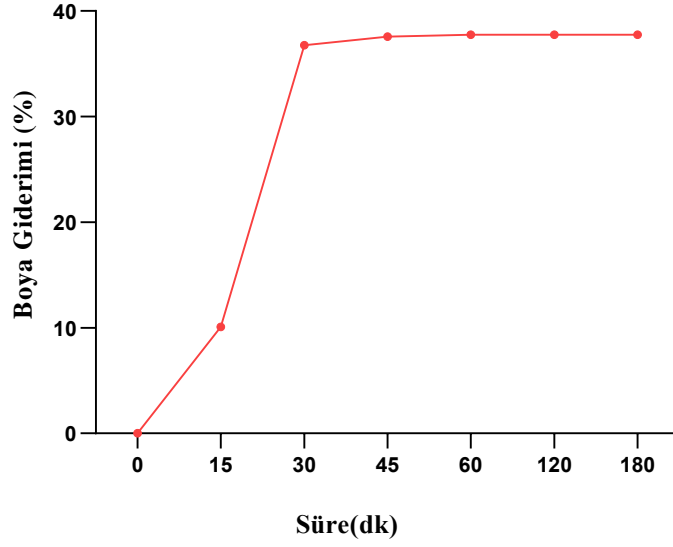


Şekil 23. Boya gideriminde kullanılan Allura red boyasının kalibrasyon eğrisi

### Allura Red Boya Giderimi Optimizasyonları

#### Süre

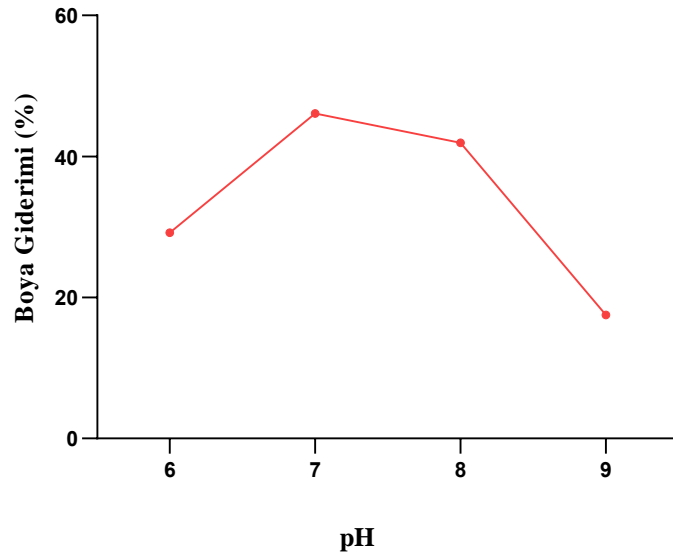
0.dk,15.dk,30.dk,45dk,1.saat,2.saat ve 3.saat olmak üzere 7 farklı sürede reaksiyon ortamından örnekler alındı. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde 30 dk'ya kadar boya giderimi arttığı fakat ilerleyen dakikalarda yaklaşık hep aynı kaldığı belirlendi (Şekil 24). Elde edilen sonuca göre 30.dk boya gideriminde hızlı ve verimli bir zaman aralığıdır. Kısa bir zaman aralığı olması sebebiyle endüstriyel uygulamalar bakımından avantajlıdır.



**Şekil 24.** Allura red boyasının zamana karşı fotokatalitik olarak % boya giderimi

### pH

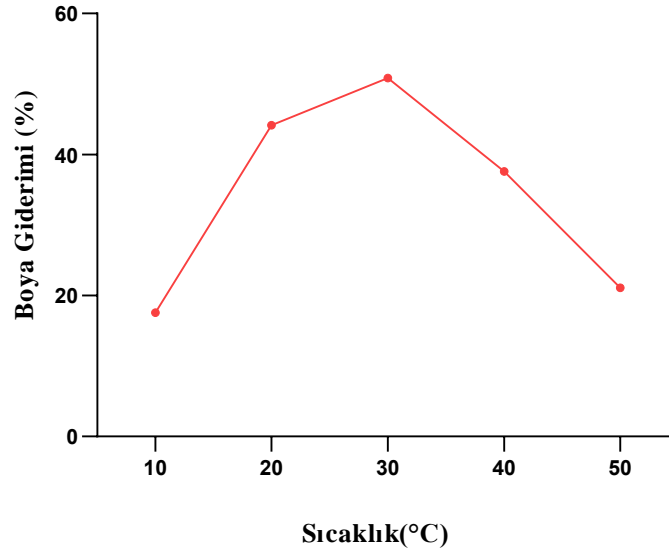
Şekil 25’de gösterildiği üzere optimum boya giderimini sağlamak için pH 6, pH 7, pH 8, pH 9 denemeleri yapılmıştır. pH 7’de optimum seviyeye ulaşmıştır. Yüksek pH’larda nanopartikülün yüzeyi negatif yük kazanacağından boya ile aynı yükte olacak ve boya giderimini olumsuz etkileyebileceği düşünülmektedir. CaO/ZnO NP’leri pH 7’de olumsuz etkileyecek yük kazanmayacaktır. Allura red kimyasal yapı bakımından anyonik yani negatif yapıdadır. Dolayısıyla nanopartikül ile boya molekülleri arasında elektrostatik bir çekim sağlanmış olur ve tutunma daha verimli hale gelir. Ayrıca pH 7 ortamın stabilitesini de korur, çünkü baziklik veya asidik ortam nanopartikülün çözünmesinde veya reaktifliğinin kaybolması ile sonuçlanabilir.



**Şekil 25.** Allura red boyasının pH’ya karşı fotokatalitik olarak % boya giderimi

## Sıcaklık

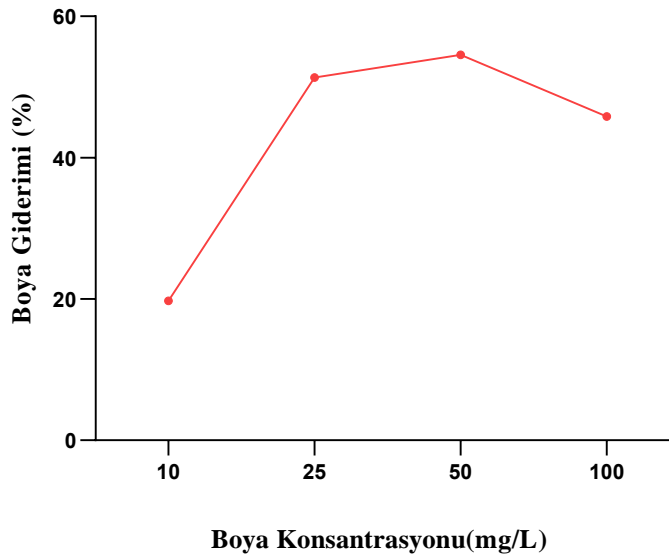
Şekil 26’da gösterildiği üzere 10 °C, 20 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C derecelerinde beş farklı sıcaklık denemeleri yapılmıştır. Fotokatalitik boya gideriminde esas belirleyici ışık olduğu için reaksiyonlar genellikle sıcaklıkla hızlanmaz. Optimum giderimi yakaladığımız 30 °C oda sıcaklığına yakın ve sistemin dengede olduğu bir sıcaklıktır. Burada da enerji tüketimi gerektirmeden maksimum verim sağlanmıştır.



Şekil 26. Allura red boyasının sıcaklığa karşı fotokatalitik olarak % boya giderimi

## Boya konsantrasyonu

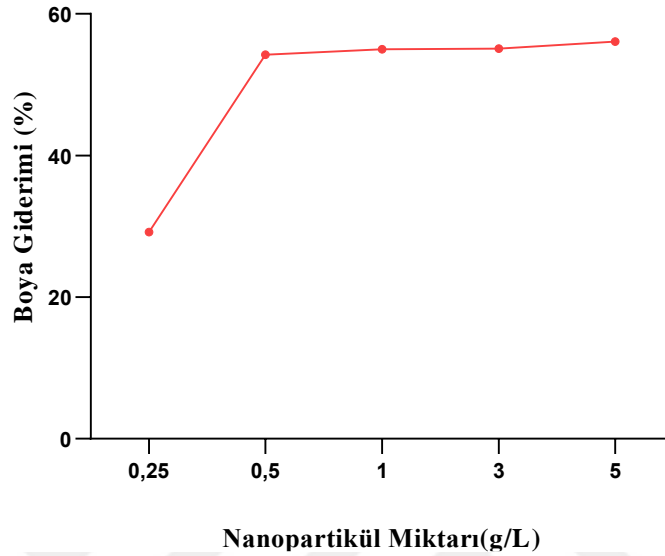
Şekil 27’de görüleceği üzere farklı boya konsantrasyonlarında boya giderim denemeleri yapılmıştır. Allura red boyasının 50 mg/L boya konsantrasyonunda CaO/ZnO nanopartikülü tarafından ışıkla etkili parçalandığı ve maksimum adsorbsiyon sağlandığı görülmüştür.



Şekil 27. Allura red boyasının boya konsantrasyonuna karşı fotokatalitik olarak % boya giderimi

### Nanopartikül miktarı

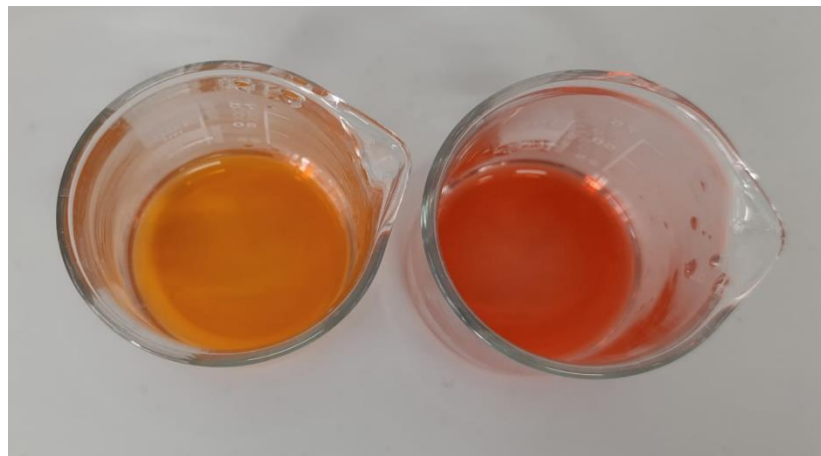
Şekil 28’de gösterildiği üzere nanopartikülün düşük dozlarda yüzey alanı yetersiz kaldığından reaksiyon veriminin düştüğü düşünülebilir. Yüksek dozda ise sabit kalmıştır çünkü doygunluğa ulaşmıştır. 0,5g/L CaO/ZnO nanopartikül miktarında ise ışık absorpsiyonu optimal düzeye ulaşmıştır %54,25 oranında boya giderimi sağlanmıştır.



**Şekil 28.** Allura red boyasının nanopartikül miktarına karşı fotokatalitik olarak % boya giderimi

### Allura red boya giderimi

Maksimum Allura Red boyasının giderimini gerçekleştirmek amacıyla sentezlenen CaO/ZnO NP’ların fotokatalitik aktivitesi test edilmiştir. Belirlenen optimal koşullar olan; Boya çözeltisi 50 mg/L başlangıç konsantrasyonunda hazırlanmış ve üzerine 0,5 g/L nanoparçacık ilave edilmiştir. Karışım, 30 °C sıcaklık ve pH 7 koşullarında 30 dk süreyle ışık kaynağı altında karıştırılmıştır. Başlangıç boya absorbans değeri referans alınarak giderim yüzdesi hesaplandı ve giderim oranı %54,25 bulundu ve böylece nanoparçacığın allura red boyasını ihtiva eden atık su arıtımında etkinliği ortaya konuldu (Şekil 29).



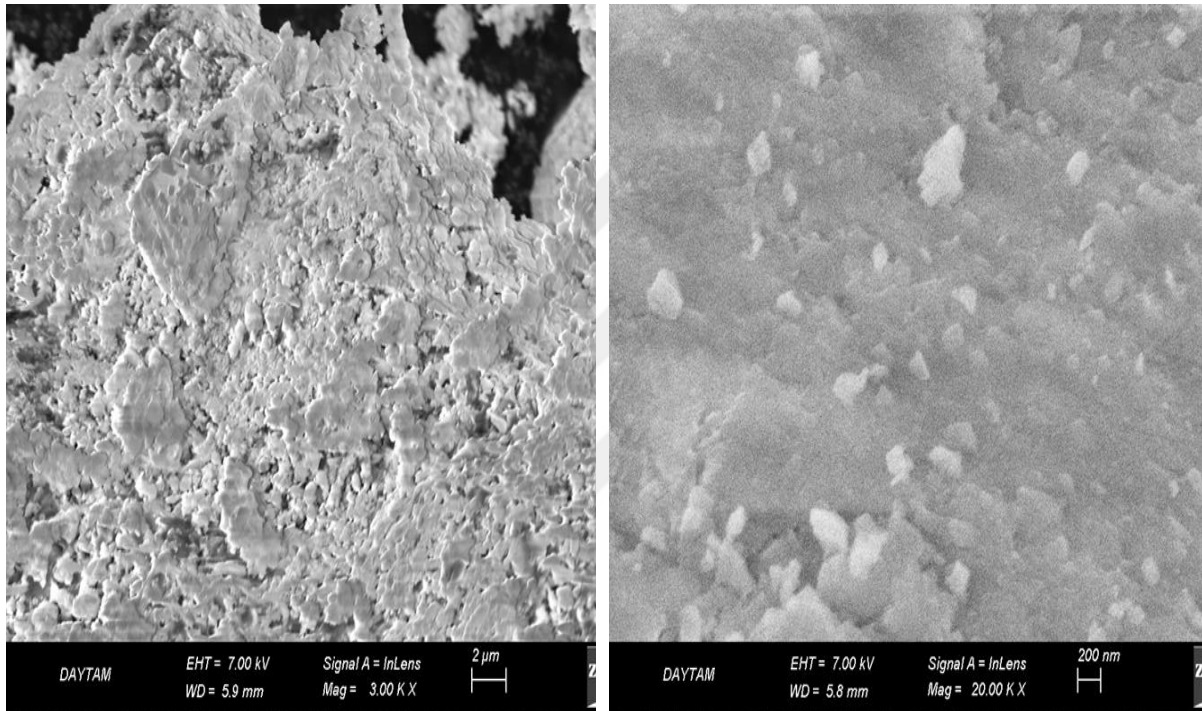
**Şekil 29.** Allura red boya giderimi

## CaO/ZnO NP'lerinin Karakterizasyonu

### Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Malzeme bilimi, nanoteknoloji, biyoloji, kimya ve mühendislik gibi alanlarda sıklıkla kullanılan taramalı elektron mikroskobu numunenin yüzeyini yüksek çözünürlükle görüntülemek için kullanılan güçlü bir mikroskop türüdür. Taramalı elektron mikroskobu ışık yerine elektron demeti kullanarak çok daha yüksek büyütme ve detay vermektedir.

SEM görüntüsünün sonuçlarından CaO/ZnO-NP'lerin oldukça homojen dağılmış, küçük boyutlu, küresel ve yarı amorf nanoparçacıklar olduğu belirlenmiştir (Şekil 30).

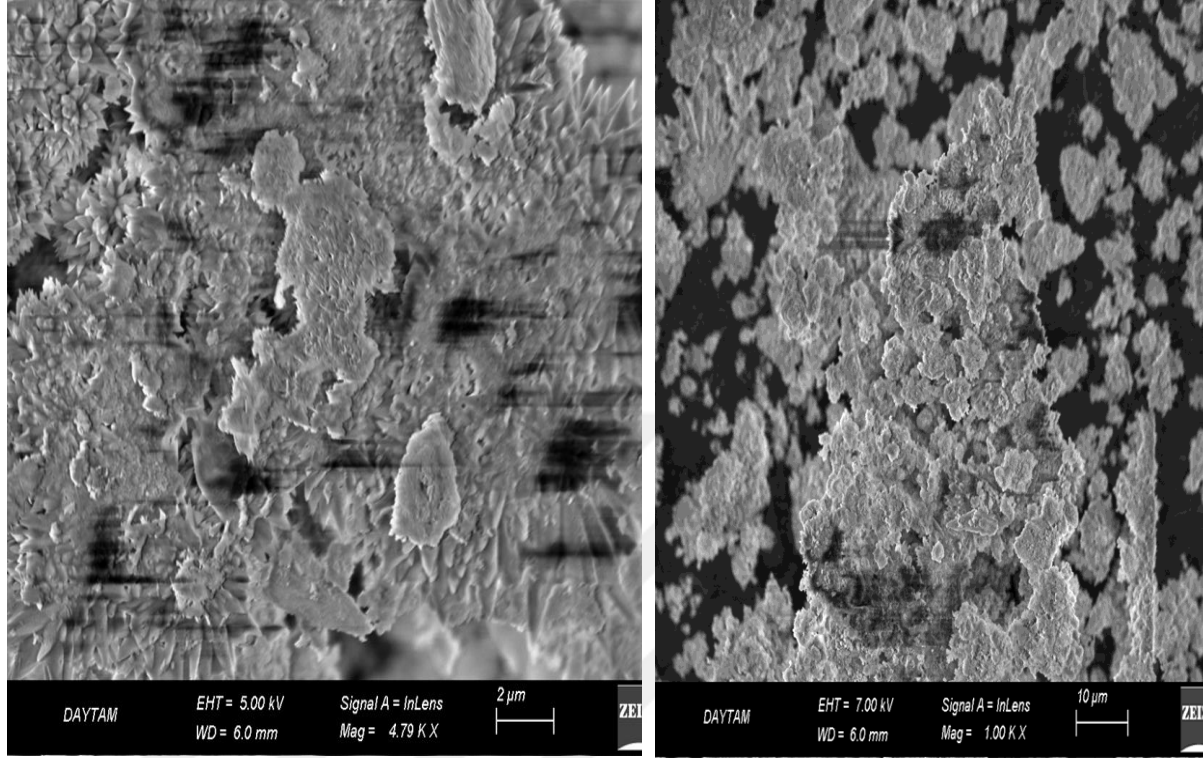


Şekil 30. CaO/ZnO NP'lerinin SEM görüntüsü

Fotokatalitik olarak gerçekleştirilen boya gideriminden sonra CaO/ZnO-NP/Allura red'in SEM görüntüsüne bakıldığında ise, NP'lerin yüzey morfolojisinde belirgin bir değişimin gerçekleştiği belirlenmiştir. SEM görüntüsünden CaO/ZnO-NP'lerin boya veya boya parçalanma ürünleri ile kaplanmış oldukları, pürüzlü ve birikmiş bir tabaka görünümü kazandıkları belirlenmiştir. (Şekil 31). Yapı, daha amorf ve kompakt görünmektedir; bu da fotokatalitik etkileşimin gerçekleştiğini ve sistemin aktif olduğunu göstermektedir.

SEM analizleri, CaO/ZnO NP'lerinin Allura Red boyası ile etkileşimi sonucunda yüzey morfolojisinde belirgin değişiklikler meydana geldiğini göstermektedir. İlk görüntüde parçacıklar düzgün yüzeyli, dağınık ve düşük aglomerasyonlu iken; boya ile muamele sonrası yapılar daha amorf, tabakalı ve birikimli hale gelmiştir. Bu değişim, boyanın yüzeye adsorbe olduğunu ve parçacıklarla etkileşime girerek fotokatalitik bozunma sürecinin başladığını

göstermektedir. Ayrıca boyar madde giderimi sırasında bozunma ürünlerinin yüzeyde biriktiği de düşünülmektedir. Bu sonuçlar, lignin peroksidazla yeşil sentezlenen CaO/ZnO nanoparçacıkların aktif yüzey özellikleri sergilediğini ve fotokatalitik performans açısından işlevsel olduklarını doğrulamaktadır.

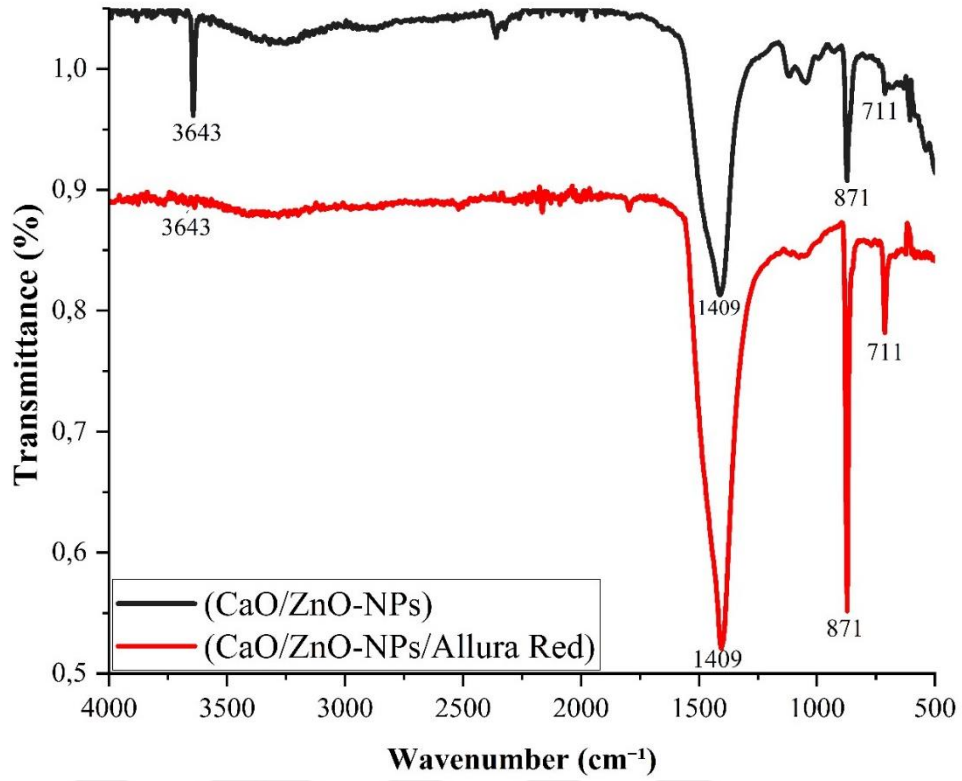


**Şekil 31.** CaO/ZnO-NPs/Allura Red SEM görüntüsü

#### **Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR)**

FT-IR, moleküllerin kızılötesi ışığını nasıl soğurduğunu ölçerek onların fonksiyonel gruplarını tespit eder. Her molekül kendine özgü bir titreşim frekansına sahiptir. FT-IR bu frekansları algılayarak maddenin yapısını ortaya çıkarır (Şekil 32).

711  $\text{cm}^{-1}$  bulunan bant genellikle metal oksit nanoparçacıklarında görülen bir banttır. 711  $\text{cm}^{-1}$  bandında CaO/ZnO NP'lerin ve CaO/ZnO-NP/Allura red örneklerinin her ikisinde de bulunur fakat farklı geçirgenlik değerlerinde gözlemlenmiştir. Bu bağlamda geçirgenlikteki bu değişim boya adsorpsiyonu sonucu Ca-O veya Zn-O bağlarının titreşimlerini artırmış olabileceği düşünülmektedir.



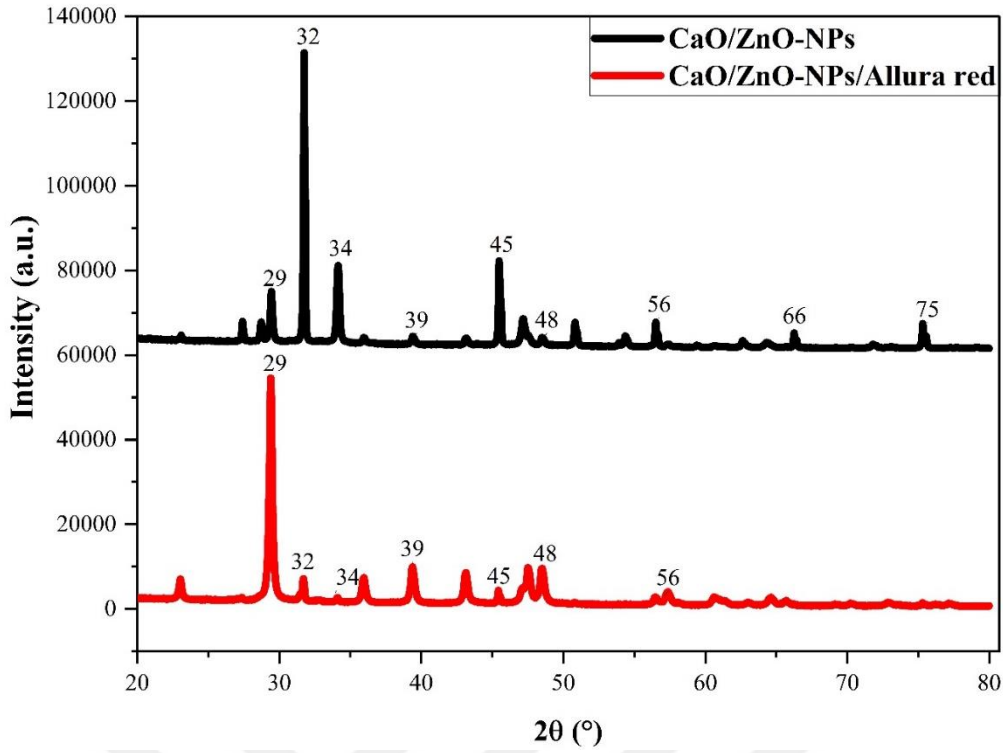
**Şekil 32.** CaO/ZnO-NP ve CaO/ZnO-NP/Allura red FT-IR görüntüleri

3643  $\text{cm}^{-1}$  dalga bandı özellikle serbest  $-\text{OH}$  gruplarının gerilme titreşimine karşılık gelir. Allura red boyası yüzeydeki  $-\text{OH}$  gruplarına bağlanmış olabileceğini düşündürmektedir. Dolayısıyla artık serbest OH titreşimi görülmez çünkü  $-\text{OH}$  serbestliğini yitirmiştir veya yapısal olarak farklılaşmıştır. Sonuçta Allura red ile adsorpsiyonu sonucu bu bandın belirgin şekilde zayıflaması boyar maddenin yüzeydeki hidroksil gruplarıyla etkileşime girdiği düşünülmektedir.

### **X-ışını kırınımı (XRD)**

XRD maddenin kendine özgü kristal yapısını analiz etmek için kullanılan karakterizasyon yöntemidir. Numuneye belirli açılarda X-ışını gönderilir. Atom düzlemlerinden yansıyan X-ışınları kırınım desenleri oluşturur. Bu kırınım desenleri Bragg yasası kullanılarak analiz edilir. Her kristal yapıya özgü bir pik dizilimi elde edilir.

Her kristal yapı düzlemlere sahip düzenli atomik katmanlardan oluşur. Bu düzlemler arasındaki mesafeye “d” aralığı denir. Malzemenin kristal yapısını daha iyi yorumlayabilmek için d aralığı hesaplanmalıdır. Bu aralık Bragg yasası olan  $d = \lambda / 2 \sin \theta$  formülünden elde edilir ( $\lambda$ : 1.5406 Å,  $\theta$ :  $2\theta/2$ )



Şekil 33. CaO/ZnO NP ve CaO/ZnO-NP/Allura red XRD görüntüleri

Tablo 10. XRD “d” Aralıkları ve Olası Düzlemler

2θ (°)	θ (°)	d (Å)	Olası düzlem	Olası faz
29	14.5	3.0 Å	(104)	CaO
32	16.0	2.80 Å	(100)	ZnO
34	17.0	2.63 Å	(002)	ZnO
39	19.5	2.29 Å	(101)/(102)	ZnO/Zn(OH) <sub>2</sub>
45	22.5	2.02 Å	(102)	ZnO
48	24.0	1.89 Å	(103)	ZnO
56	28.0	1.64 Å	(110)	ZnO

ZnO yapısının ana piki genelde  $2\theta \approx 31,7^\circ, 34,4^\circ, 36,2^\circ, 47,5^\circ, 56,6^\circ$  derecelerinde verir ve XRD deseni bununla oldukça uyumlu görünüyor dolayısıyla bu yapının varlığı kuvvetle muhtemeldir. ICDD PDF kart numarası: 36-1451 ile uyumludur.

CaO  $2\theta \approx 29,4^\circ$  pikine karşılık gelir ve bu pik kalsit fazı olması muhtemeldir. ICDD PDF kart numarası: 05-0586 ile uyumludur.

Zn(OH)<sub>2</sub> gibi diğer Zn-türevlerinin varlığı sentez sırasında tam dönüşüm göstermeyen nanopartiküllere ait zayıf pikler bu fazlara ait olabilir.

İki örnek için de piklerin konumları benzer olduğundan kristal yapıların korunduğunun bir göstergesidir. CaO/ZnO-NPs kristal yapıda oldukça belirgin pikler göstermekte bu onun yüksek kristallik ve saf yapı göstergesidir. Allura red ile modifiye edilen örnekte, XRD

piklerinin şiddetlerinde belirgin bir azalma gözlenmiştir. Bu durum, boya molekülünün yüzeye adsorpsiyonu sonucu kristalin düzenliliğin azaldığını ve kısmen amorf yapı oluştuğunu göstermektedir. Allura Red ile modifiye nanopartikül ise daha düşük yoğunluklu piklere sahip bu da boya molekülünün yüzeyde adsorplanarak kristal yapıya müdahale ettiğini gösterir. Sonuçta allura red adsorpsiyonu kristalin düzenini bir miktar bozmuş fakat temel fazlar korunmuş görünüyor.



## SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmamızda lignoselülozik içeriği yüksek bir ortam hazırlanmış ve bu ortamda üreyen *P. pasinlerensis* tarafından lignin peroksidaz enzimi üretimi sağlanmıştır. Elde edilen enzim, üç fazlı ayırma yöntemi ile saflaştırılmış ve bu LiP enzimi, yeşil sentez yaklaşımıyla CaO/ZnO NP üretiminde indirgen ajan olarak kullanılmıştır. Son aşamada, sentezlenen CaO/ZnO NP toksik ve azo grubu içeren Allura red boyasının fotokatalitik giderimi üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Erzurum pasinler kaplıcasından izole edilen izolatların lignin peroksidaz enzim aktivitesinin belirlenmesi amacıyla guaiacol içeren agar ortamı kullanıldı. Mikroorganizma inokulasyonu sonrası inkübasyon süresi tamamlandığında, koloniler etrafında oluşan kahverengi-turuncu renk değişimi, guaiacol'un oksidasyonunu gösterdi. Bu renk değişimi, peroksidaz aktivitesine dair ön bir göstergedir. Spesifik bir doğrulama amacıyla ortama damlatılan lügol sonrası gözlenen beyaz zon oluşumu lignin peroksidaz enziminin varlığına işaret etmiştir. Çalışmamızı destekler şekilde Ma ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada izole edilen X-13 izolatını guaiacol içeren agar ortamında koloniler etrafında renkli zon oluşturmuş daha sonra lügol uygulandığında beyaz alan göstererek lignin peroksidaz etkinliğini doğrulamıştır. Rao ve arkadaşlarının çalışmasında ise izolasyonu sağlanan izolatlardan sadece biri lignin peroksidaz aktiviteleri için pozitif beyaz-zon göstermiştir. Agrawal ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise guaiacol içeren besiyerinde zon gözlenmiş; dolayısıyla lignin peroksidaz aktiviteleri kalitatif olarak değerlendirilmiştir (Agrawal vd., 2017; Ma vd., 2021; Rao vd., 2019).

Çalışmamızda kullandığımız yenilenebilir biyokütle kaynağı olan atık kestane kabuklarının lignin bileşimi kafeil alkol, sinapil alkol, *p*-kumaril alkol ve ilgili metoksillenmiş formlar gibi monomerlerinin çapraz bağlarıyla bağlıdır. Çapraz bağların son derece zor parçalanabilirliği nedeniyle, ligninin parçalanması genellikle güçlü asit, güçlü baz ve yüksek sıcaklık gibi zorlu koşullar altında gerçekleştirilir (Rabemanolontsoa ve Saka., 2016). Ön işlem, bu tür bir hammaddenin karmaşık yapısı ve dirençli doğası nedeniyle lignoselülozik biyokütle işlemenin vazgeçilmez bir adımıdır. Bu çalışmada, lignin içeren atık kestane kabuklarının mikroorganizma gelişimini destekleyecek duruma getirilmesi amacıyla sülfürik asit kullanılarak ön muamele yapılmıştır. Fiziksel ön öğütmenin ardından sülfürik asit ile muamele yapılması lignoselülozik yapıdaki hemiselüloz ve ligninin kısmen parçalanmasını sağlamıştır. Bu sayede besiyerine eklenen atık maddelerin içerdiği kompleks polimerler mikroorganizmalar

tarafından daha kolay kullanılabilir hale gelmiştir. Literatürde de benzer şekilde, %1–5 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> konsantrasyonlarında yapılan ön işlemlerin, özellikle hemiselülozun çözündürülmesinde etkili olduğu gösterilmiştir (Singh vd., 2022; Priyanto vd., 2019). Yapılan bu ön işlem sonucunda, besiyerine eklenen atıkların bakteriler tarafından daha etkili bir şekilde parçalanabildiği gözlemlenmiştir. Bu durum, lignin atıklarının doğrudan kullanımından ziyade kimyasal ön işleme hazırlanmasının, mikrobiyal süreçleri desteklediğini göstermektedir.

Sus ve arkadaşlarının yaptığı lignin peroksidaz enzim üretim çalışmasında *Anoxybacillus rupiensis*den lignin peroksidaz enzim üretimi optimal 4 gr yer fıstığı kabuğu, pH 8.5, sıcaklık 60 °C sonuçlarına ulaşılmıştır (Sus vd., 2024). Ayrıca, Akkaya ve arkadaşlarının yaptığı lignin peroksidaz enzim üretiminde *Caldibacillus thermoamylovorans*'dan lignin peroksidaz enzim üretimi 5 gr ceviz kabuğu miktarı, 60 °C sıcaklık ve pH 8,0 bulunmuştur (Akkaya vd., 2024). Bu bağlamda çalışmamızda bulunan 3 gr kestane kabuğu, pH 9, 50 °C sıcaklık literatürdeki bilgileri desteklemektedir. Çalışmamızda kullandığımız bakterinin toleransı sayesinde yüksek sıcaklık ve nispeten yüksek baz seviyesiyle lignin parçalanmıştır. Bilindiği üzere kestanenin içerdiği bazı bileşikler bakterilerin büyümesinin teşvik ederken tanen gibi bazı bileşikler bakterilerin üzerinde antimikrobiyal etkinlik gösterebilir. Nitekim çalışmamızda özellikle yüksek oranda kabuk kullanılan ortamlarda fermentasyon verimliliğinde düşüş görülmüştür. Bu durum, kestane kabuklarının içerdiği çeşitli bileşikler nedeniyle mikroorganizmalar üzerinde inhibitör etki oluşturduğunu düşündürmektedir. Buna ek olarak eğer üretimi yapılacak bakteri üzerinde bu kestane kabuğu içeriklerinin bir inhibitör etkisi yoksa kestane kabuğu bileşiklerinin fermentasyon ortamında antioksidan görevi görerek stabilite ve kontaminasyonu sağladığı da düşünülebilir.

Bu çalışmada bakteriyel kaynaklı lignin peroksidaz enzimi, kültür süpernatantından TPP saflaştırma adımlarıyla elde edilmiş ve SDS-PAGE analizinde yaklaşık 47 kDa'lık tek bir protein bandı gözlenmiştir. Bu sonuç lignin peroksidaz enzimin temiz bir şekilde saflaştırıldığını ve monomerik bir yapıda olduğunu göstermiştir. Literatüre bakıldığında benzer şekilde *Bacillus* sp. BL5'ten saflaştırılan lignin peroksidaz enzimi 46 kDa'lık bir protein saflaştırılmıştır (Khan vd.,2021). Ayrıca Kumar ve Chandra'nın çalışmasında lignin peroksidazın belirtildiği 40-68 kDa aralıkta olduğu belirtilmiştir (Kumar ve Chandra., 2020). Bu bağlamda çalışmamızda yaptığımız SDS-PAGE analizinde 47 kDa ile literatürle uyumluluk göstermektedir. Literatürde lignin peroksidaz ile nanoparçacık sentezi konusunda sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. LiP'nin nanoparçacık sentezinde indirgeme ajanı olarak kullanılabileceğini rapor etmiştir (Miditana vd., 2020). Bu çalışma, CaO/ZnO NP ile ve boyar madde giderimi

amacıyla lignin peroksidaz kullanımını içermesi açısından özgündür. Bu yönüyle çalışma, biyolojik enzim tabanlı yeşil sentez yaklaşımlarına önemli bir katkı sunmaktadır.

Lignin peroksidaz, indirgeyici madde olarak hareket edebilen sülfidril gruplarına sahip beş sistein kalıntısına sahiptir. Lignin peroksidaz enziminin yüksek redoks potansiyeline sahip olması sayesinde özellikle metal iyonlarının indirgenmesinde etkin rol oynar. Bu bağlamda  $Ca^{2+}$  ve  $Zn^{2+}$  iyonlarının oksidatif ortamda kontrollü bir şekilde indirgenerek çekirdeklenme ve büyüme aşamalarını düzenlediği düşünülmektedir. SEM ve XRD analizlerinde gözlemlenen düzensiz ama nano boyutta parçacık oluşumu, enzim varlığında gerçekleşen kontrollü bir sentezin göstergesidir. Sentezi yapılan CaO/ZnO-NP'lerinin FT-IR spektrumunda 3643,1409,871,711  $cm^{-1}$  bantları gözlenmiştir. Ca-Zn oksit nanopartiküllerde genelde  $\approx 3630-3645$   $cm^{-1}$  civarında geniş OH bantları gözlenir (Zhang vd., 2023). Karbonat içeren CaO/ZnO nanopartiküllerinde, 1400–1450  $cm^{-1}$  arası güçlü bantlar görülür. Ayrıca 870–880  $cm^{-1}$  ile 710–720  $cm^{-1}$  bantları  $CO_3^{2-}$  yapısını destekler. FT-IR spektrumunuz, CaO/ZnO nanopartiküllerinde beklenen -OH içeren yapı ve karbonat yüzey grubunun varlığını açıkça doğrulamaktadır.

CaO/ZnO NP'lerinin morfolojik yapısı, yüksek çözünürlüklü taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelendi. Görsel analizler sonucunda, nanoparçacıkların genel olarak küresel ya da yarı küresel yapıda, ancak belirgin aglomere oluşumlar sergilediği gözlemlenmiştir. Bu durum, biyolojik yollarla yani green sentez yöntemiyle üretilen nanoparçacıklarda sıkça karşılaşılan bir durumdur. Aglomerasyonun kısmen yoğun olduğu bölgeler tespit edilmiş olsa da bu durum parçacıkların fotokatalitik aktivitesi açısından büyük bir dezavantaj oluşturmamaktadır. Nitekim bu aglomere içindeki mikro boşluklar ve yüzey çinkintileri, boyar madde moleküllerinin tutunabileceği aktif bölgeler olarak işlev görebilir.

Sonuç olarak, SEM görüntüleri, yeşil sentezle elde edilen CaO/ZnO-NP'leri nanometrik boyutta, düzensiz fakat fotokatalitik açıdan işlevsel bir morfolojiye sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Bu yapı, özellikle Allura red gibi suda çözünür azo boyaların fotokatalitik giderimi açısından yüksek performans sergileyen bir sistemin varlığını desteklemektedir.

CaO/ZnO-NP/Allura red boyası ile etkileşimi sonrası SEM görüntüleri, yüzeyde belirgin bir morfolojik değişim olduğunu ortaya koymuştur. Nanoparçacıklar, düzlemsel ve amorf yapıdaki boya kalıntıları ile kaplanmış olup, bu durum yüzeyde gerçekleşen adsorpsiyon ve muhtemel parçalanma ürünlerinin birikimini göstermektedir. Önceki saf nanoparçacık görüntüsüyle karşılaştırıldığında, sistemin fotokatalitik etki sonucu boya molekülleriyle yoğun etkileşim kurduğu ve yüzey özelliklerinin değiştiği tespit edilmiştir. Bu gözlemler, lignin peroksidaz destekli yeşil sentezle elde edilen CaO/ZnO-NP'lerin boyar madde gideriminde işlevsel olduğunu ve yüzey aktivitelerinin yüksek olduğunu doğrulamaktadır.

Fotokatalitik deneylerde, Allura red boyasının %54,25'e varan oranda giderildiği gözlenmiştir. pH 7'de maksimum verim alınırken, bu durum literatürde bildirilen nanoparçacık ile görünür ışık altında çalışan sistemlerle benzerlik göstermektedir (Raju ve Mditana, 2019). Bu çalışmada kullanılan katalizör, toksik çözücüler ya da yüksek sıcaklık/enerji gerektirmeyen bir ortamda hazırlanmıştır; bu da prosesi düşük maliyetli ve çevre dostu hale getirmektedir. Tarımsal atıkların yakıt olarak kullanılması veya doğaya bırakılması çevresel kirliliğe neden olurken kestane kabuğu atıklarının enzim üretimi gibi katma değerli süreçlerde kullanılması atık miktarını azaltır ve çevre dostu geri dönüşüm sağlar. Türkiye gibi kestane tüketiminin yaygın olduğu bölgelerde bu atığa ulaşım kolaydır. Bu tür atıkların değerlendirilmesi, yerel kaynakları biyoteknolojik ürünlere dönüştürme potansiyeli sunar. İlerleyen çalışmalarda enzim izolasyonu yerine ham ekstrakt kullanıldığında green sentez olur mu veya ne verimde olabileceğini değerlendirmek faydalı olabilir. Diğer lignin parçalayıcı enzimler olan Mn peroksidaz VP peroksidaz ve lakkaz da green sentezde kullanım potansiyeli araştırma konusu olabilir. Boya gideriminde kullanılan nanopartikülün reaksiyon ortamından çekilip daha sonra kullanılabilirliği test edilmelidir. Tüm bu sıralanan deney basamak denemeleri yapıp ticari potansiyelleri taranması gelecek çalışmalar içinde yön gösterici olabilir.

Bu tez çalışması, kestane kabuğu gibi tarımsal atıkların çevre dostu enzim üretimi ve green sentez yaklaşımıyla işlevsel nanoparçacıklara dönüştürülebileceğini; bu parçacıkların ise toksik boyaların gideriminde etkili bir çözüm sunarak hem doğaya hem bilime sürdürülebilir katkılar sağlayabileceğini açıkça ortaya koymuştur.

## KAYNAKÇA

- Abdollahi, P., Ghane, M., & Babaeekhou, L., (2021). Isolation and characterization of Thermophilic bacteria from Gavmesh Goli hot spring in Sabalan geothermal field, Iran: Thermomonas hydrothermalis and *Bacillus altitudinis* isolates as a potential source of Thermostable Protease. *Geomicrobiology Journal*, 38(1), 87-95.
- Abo-Dief, H. M., Hussein, O. K., Ihsan, A., El-Bahy, S. M., Raslan, A. M., Shahid, M., & Warsi, M. F. (2022). Ternary metal oxide WO<sub>3</sub>. NiO. ZnO nanoparticles and their composite with CNTs for organic dye photocatalytic degradation. *Ceramics International*, 48(15), 22228-22236.
- Adıgüzel, G. (2008). Fermente Türk Sucuğundan izole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerle Karakterizasyonu (Doctoral dissertation, Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum).
- Agrawal, N., Verma, P., Singh, R. S., & Shahi, S. K. (2017). *Ligninolytic enzyme production by white rot fungi Podoscypha elegans strain FTG4. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(5), 2757–2764.
- Akkaya, S. N., Almansour, A., Omeroglu, M. A., Nadaroglu, H., & Adiguzel, A. (2025). Eco-friendly synthesis of silver nanoparticles using lignin peroxidase produced from *Caldibacillus thermoamylovorans* and cultivated on waste walnut shell. *FEMS Microbiology Letters*, 372, fnaf036.
- Allenspach, M., & Steuer, C. (2021).  $\alpha$ -Pinene: A never-ending story. *Phytochemistry*, 190, 112857.
- Al-Whaibi, M. H., & Mohammad, F. (2015). Plant-based synthesis of nanoparticles: A sustainable approach for nanotechnology. *Advances in Plant Biotechnology*, 15(2), 112-125.
- Baltacı, M. O., Ay, H., Akbulut, S., Adiguzel, G., Albayrak, S., Omeroglu, M. A., Ozkan, H., Taskin, M., & Adiguzel, A. (2020). *Bacillus pasinlerensis* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Turkey. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(6), 3865–3871.
- Bera, A., Belhaj, H. (2016). Application of nanotechnology by means of nanoparticles and nanodispersions in oil recovery-A comprehensive review. *Journal of Natural Gas Science and Engineering*, 34, 1284-1309.
- Berradi, M., Hsissou, R., Khudhair, M., Assouag, M., Cherkaoui, O., El Bachiri, A., & El Harfi, A. (2019). Textile finishing dyes and their impact on aquatic enviroins. *Heliyon*, 5(11).
- Bhatia, S. K., Jagtap, S. S., Bedekar, A. A., Bhatia, R. K., Patel, A. K., Pant, D., ... & Yang, Y. H. (2020). Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: Effect of key parameters, technological improvements, and challenges. *Bioresource technology*, 300, 122724.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-54.
- Braga, N., Rodrigues, F., & PP Oliveira, M. B. (2015). Castanea sativa by-products: A review on added value and sustainable application. *Natural Product Research*, 29(1), 1-18.

- Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. (2010). Engineered nanoparticles in wastewater and wastewater sludge—Evidence and impacts. *Waste management*, 30(3), 504-520.
- Chamaraja, N. A., Khan, M. M., Hemalatha, H. N., Rajendraprasad, N., & Prasanna, D. S. (2024). Ca-doped ZnO nanoparticles for MB dye degradation and adsorptive removal of tinidazole. *Environmental Monitoring and Assessment*, 196(8), 710.
- Chattopadhyay, S., Misra, K. P., Agarwala, A., Shahee, A., Jain, S., Halder, N., ... & Mukhopadhyay, A. K. (2019). Dislocations and particle size governed band gap and ferromagnetic ordering in Ni doped ZnO nanoparticles synthesized via co-precipitation. *Ceramics International*, 45(17), 23341-23354.
- Choinowski, T., Blodig, W., Winterhalter, K. H., & Piontek, K. (1999). The crystal structure of lignin peroxidase at 1.70 Å resolution reveals a hydroxy group on the C $\beta$  of tryptophan 171: a novel radical site formed during the redox cycle. *Journal of molecular biology*, 286(3), 809-827.
- De Gonzalo, G., Colpa, D. I., Habib, M. H., & Fraaije, M. W. (2016). Bacterial enzymes involved in lignin degradation. *Journal of biotechnology*, 236, 110-119.
- De Vasconcelos, M. C., Bennett, R. N., Rosa, E. A., & Ferreira-Cardoso, J. V. (2010). Composition of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) and association with health effects: fresh and processed products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(10), 1578-1589.
- Dos Santos, A. C., Ximenes, E., Kim, Y., & Ladisch, M. R. (2019). Lignin–enzyme interactions in the hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Trends in biotechnology*, 37(5), 518-531.
- Einarsson, R., Sanz-Cobena, A., Aguilera, E., Billen, G., Garnier, J., van Grinsven, H. J., & Lassaletta, L. (2021). Crop production and nitrogen use in European cropland and grassland 1961–2019. *Scientific Data*, 8(1), 288.
- Falade, A. O., Eyisi, O. A., Mabinya, L. V., Nwodo, U. U., & Okoh, A. I. (2017). Peroxidase production and ligninolytic potentials of fresh water bacteria *Raoultella ornithinolytica* and *Ensifer adhaerens*. *Biotechnology reports*, 16, 12-17.
- Garg, S., & Roy, A. (2022). Phytoremediation: An alternative approach for removal of dyes. In *Phytoremediation* (pp. 369-386). Academic Press.
- Gaur, D., Jain, P. K., Sisodia, Y. S., & Bajapai, V., (2021). Estimation of Extracellular Lipolytic Enzyme Activity By Thermophilic Bacillus Sp. Isolated From Arid And Semi-Arid Region of Rajasthan, India. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2021, 619-633.
- Ghiloufi, I., El Ghoul, J., Modwi, A., & El Mir, L. (2016). Preparation and characterization of Ca-doped zinc oxide nanoparticles for heavy metal removal from aqueous solution. *MRS Advances*, 1(53), 3607-3612.
- Ghosh, A., Zhang, C., Zhang, H., & Shi, S. (2019). CO<sub>2</sub> sensing behavior of calcium-doped ZnO thin film: a study to address the cross-sensitivity of CO<sub>2</sub> in H<sub>2</sub> and CO environment. *Langmuir*, 35(32), 10267-10275.
- Gianfreda, L., Iamarino, G., Scelza, R., & Rao, M. A. (2006). Oxidative catalysts for the transformation of phenolic pollutants: a brief review. *Biocatalysis and biotransformation*, 24(3), 177-187.
- Gita, S., Hussan, A., & Choudhury, T. G. (2017). Impact of textile dyes waste on aquatic environments and its treatment. *Environ. Ecol*, 35(3C), 2349-2353.
- Gomare, S. S., Jadhav, J. P., & Govindwar, S. P. (2008). Degradation of sulfonated azo dyes

- by the purified lignin peroxidase from *Brevibacillus laterosporus* MTCC 2298. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 13, 136-143.
- Gopalkrishnan, B., Ayyappan, P., Sundaramoorthy, S., & Kumaravel, T. S. (2012). Biosynthesis of metallic nanoparticles using biological systems: A green approach. *Journal of Biotechnology Applications*, 8(1), 78-85.
- Grgas, D., Rukavina, M., Bešlo, D., Štefanac, T., Crnek, V., Šikić, T., ... & Landeka Dragičević, T. (2023). The bacterial degradation of lignin—a review. *Water*, 15(7), 1272.
- Hammel, K. E., & Cullen, D. (2008). Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. *Current opinion in plant biology*, 11(3), 349-355.
- He, J., Huang, C., Lai, C., Huang, C., Li, M., Pu, Y., ... & Yong, Q. (2020). The effect of lignin degradation products on the generation of pseudo-lignin during dilute acid pretreatment. *Industrial Crops and Products*, 146, 112205.
- Hoque, R. A., Yadav, M., Yadava, U., Rai, N., Negi, S., & Yadav, H. S. (2023). Active site determination of novel plant versatile peroxidase extracted from *Citrus sinensis* and bioconversion of  $\beta$ -naphthol. *3 Biotech*, 13(10), 345.
- Hosokawa, M., Nogi, K., Naito, M., & Yokoyama, T. (2012). *Nanoparticle Technology Handbook*, Oxford: Elsevier.
- Huang, C., Jiang, X., Shen, X., Hu, J., Tang, W., Wu, X., ... & Yong, Q. (2022). Lignin-enzyme interaction: A roadblock for efficient enzymatic hydrolysis of lignocellulosics. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 154, 111822.
- Imai, T., Yokoyama, T., & Matsumoto, Y. (2011). Revisiting the mechanism of  $\beta$ -O-4 bond cleavage during acidolysis of lignin IV: dependence of acidolysis reaction on the type of acid. *Journal of wood science*, 57, 219-225.
- Ishak, N. M., Kamarudin, S. K., & Timmiati, S. N. (2019). Green synthesis of metal and metal oxide nanoparticles via plant extracts: an overview. *Materials Research Express*, 6(11), 112004.
- Ishak, N. M., Kamarudin, S. K., & Timmiati, S. N. (2019). Green synthesis of metal and metal oxide nanoparticles via plant extracts: an overview. *Materials Research Express*, 6(11), 112004.
- Jain, K., Takuli, A., Gupta, T. K., & Gupta, D. (2024). Rethinking nanoparticle synthesis: a sustainable approach vs. traditional methods. *Chemistry—An Asian Journal*, 19(21), e202400701.
- Jeevanandam, J., Kiew, S. F., Boakye-Ansah, S., Lau, S. Y., Barhoum, A., Danquah, M. K., & Rodrigues, J. (2022). Green approaches for the synthesis of metal and metal oxide nanoparticles using microbial and plant extracts. *Nanoscale*, 14(7), 2534-2571
- Jeevanandam, J., Kiew, S. F., Boakye-Ansah, S., Lau, S. Y., Barhoum, A., Danquah, M. K., & Rodrigues, J. (2022). Green approaches for the synthesis of metal and metal oxide nanoparticles using microbial and plant extracts. *Nanoscale*, 14(7), 2534-2571.jee
- Kanaoujiya, R., Saroj, S. K., Rajput, V. D., Alimuddin, Srivastava, S., Minkina, T., Igwegbe, C. A., Singh, M., & Kumar, A. (2023). Nanotechnology applications are emerging for humanity. *Emerging Materials*, 6(2), 439-452
- Kaningini, A. G., Azizi, S., Sintwa, N., Mokalane, K., Mohale, K. C., Mudau, F. N., & Maaza, M. (2022). Effect of optimized precursor concentration, temperature, and doping on optical properties of ZnO nanoparticles synthesized via a green route using bush tea (*Athrixia phyllicoides* DC.) leaf extracts. *ACS omega*, 7(36), 31658-31666.

- Karimi-Maleh, H., Yola, M. L., Atar, N., Orooji, Y., Karimi, F., Kumar, P. S., ... & Baghayeri, M. (2021). A novel detection method for organophosphorus insecticide fenamiphos: Molecularly imprinted electrochemical sensor based on core-shell Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@ MOF-74 nanocomposite. *Journal of colloid and interface science*, 592, 174-185.
- Khan, S. I., Zada, N. S., Sahinkaya, M., Colak, D. N., Ahmed, S., Hasan, F., ... & Shah, A. A. (2021). Cloning, expression and biochemical characterization of lignin-degrading DyP-type peroxidase from *Bacillus* sp. Strain BL5. *Enzyme and Microbial Technology*, 151, 109917.
- Kumar, A., & Chandra, R. (2020). Ligninolytic enzymes and its mechanisms for degradation of lignocellulosic waste in environment. *Heliyon*, 6(2)
- Kumar, S., Pant, G., Sharma, V., & Bisht, P. (2014). Nanotechnology in computers. *Int J Inf Comput Technol*, 4, 0974-2239.
- Liu, W., Wu, R., Hu, Y., Ren, Q., Hou, Q., & Ni, Y. (2020). Improving enzymatic hydrolysis of mechanically refined poplar branches with assistance of hydrothermal and Fenton pretreatment. *Bioresource Technology*, 316, 123920.
- Lynd, L. R. (2005). Production of ethanol from lignocellulosic materials using thermophilic bacteria: critical evaluation of potential and review. In *Lignocellulosic materials* (pp. 1-52). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Ma, J., Li, Q., Wu, Y., *et al.* (2021). *Elucidation of ligninolysis mechanism of a newly isolated white-rot basidiomycete Trametes hirsuta X-13*. *Biotechnology for Biofuels*, 14, 189.
- Martinez-Alonso, E., Pena-Perez, S., Serrano, S., Garcia-Lopez, E., Alcazar, A., & Cid, C. (2019). Taxonomic and functional characterization of a microbial community from a volcanic englacial ecosystem in Deception Island, Antarctica. *Scientific reports*, 9(1), 12158.
- Miditana, S. R., Tirukkovalluri, S. R., Alim, S. A., & Raju, I. M. (2019). Photocatalytic degradation of Allura Red by Mn–Ni co-doped nanotitania under visible light irradiation. *International Journal of Innovative Technology and Exploring Engineering*, 8(12), 550–557.
- Morana, A., Maurelli, L., Ionata, E., Rossi, M., & La Cara, F. (2010). Chestnut shell: not only a source of antioxidant compounds. *Journal of Biotechnology*, 150, 325.
- Movahedpour, A., Ahmadi, N., Ghalamfarsa, F., Ghesmati, Z., Khalifeh, M., Maleksabet, A., ... & Savardashtaki, A. (2022).  $\beta$ -Galactosidase: From its source and applications to its recombinant form. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(2), 612-628.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2008 *Lehninger Principles of Biochemistry*, W.H Freeman, Fifth Edition.
- Ni, Z. M., Xia, S. J., Wang, L. G., Xing, F. F., & Pan, G. X. (2007). Treatment of methyl orange by calcined layered double hydroxides in aqueous solution: adsorption property and kinetic studies. *Journal of Colloid and Interface Science*, 316(2), 284-291.
- Ozkan, B. M., & Ahmet, A. (2016). Isolation, identification and molecular characterization of cellulolytic bacteria from rumen samples collected from Erzurum slaughter house, Turkey. *Research Journal of Biotechnology*, 11(2), 32-38.
- Palamthodi, S., Patil, D., & Patil, Y. (2011). Microbial degradation of textile industrial effluents. *African Journal of Biotechnology*, 10(59), 12657-12661.
- Petridis, L., & Smith, J. C. (2018). Molecular-level driving forces in lignocellulosic biomass deconstruction for bioenergy. *Nature Reviews Chemistry*, 2(11), 382-389.

- Pinto, D., Braga, N., Silva, A. M., Costa, P., Delerue-Matos, C., & Rodrigues, F. (2020). Chestnut. Valorization of Fruit Processing By-Products.
- Pinto, D., de la Luz Cádiz-Gurrea, M., Vallverdú-Queralt, A., Delerue-Matos, C., & Rodrigues, F. (2021). Castanea sativa shells: A review on phytochemical composition, bioactivity and waste management approaches for industrial valorization. *Food Research International*, 144, 110364.
- Pollegioni, L., Tonin, F., & Rosini, E. (2015). Lignin-degrading enzymes. *The FEBS journal*, 282(7), 1190-1213.
- Priyanto, S., Intan, A. P., Rianto, B., Kusworo, T. D., Pramudono, B., Untoro, E., & Ratu, P. (2019). The effect of acid concentration (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) on the yield and functional group during lignin isolation of biomass waste pulp and paper industry. *REAKTOR*, 19(4), 162–167.
- Rabemanolontsoa, H., & Saka, S. (2016). Various pretreatments of lignocellulosics. *Bioresource technology*, 199, 83-91.
- Rachana, C. R., & Jose, V. (2014). Three phase partitioning-a novel protein purification method. *International Journal of ChemTech Research*, 6(7), 3467-3472.
- Rai, N., Yadav, M., & Yadav, H. S. (2020). Purification and characterization of versatile peroxidase from citrus sinensis leaf extract and its application in green chemistry. *Analytical Chemistry Letters*, 10(4), 524-536.
- Rao, R. G., Ravichandran, A., Kandalam, G., & Sridhar, M. (2019). *Screening of wild basidiomycetes and evaluation of the biodegradation potential of dyes and lignin by manganese peroxidases*.
- Robinson, P.K., 2015, *Enzymes: principles and biotechnological applications*, Essays in biochemistry, 59, 1-41.
- Rocheffort, D., Kouisni, L., & Gendron, K. (2008). Physical immobilization of laccase on an electrode by means of poly (ethyleneimine) microcapsules. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 617(1), 53-63.
- Sankaran, R., Cruz, R. A. P., Pakalapati, H., Show, P. L., Ling, T. C., Chen, W. H., & Tao, Y. (2020). Recent advances in the pretreatment of microalgal and lignocellulosic biomass: a comprehensive review. *Bioresource technology*, 298, 122476.
- Sheng, Y., Lam, S. S., Wu, Y., Ge, S., Wu, J., Cai, L., ... & Xia, C. (2021). Enzymatic conversion of pretreated lignocellulosic biomass: A review on influence of structural changes of lignin. *Bioresource technology*, 324, 124631.
- Sheng, Y., Lam, S. S., Wu, Y., Ge, S., Wu, J., Cai, L., ... & Xia, C. (2021). Enzymatic conversion of pretreated lignocellulosic biomass: A review on influence of structural changes of lignin. *Bioresource technology*, 324, 124631.
- Simoës, M. P., Madeira, M., & Gazarini, L. C. (2008). Peroxidases and lignification in relation to the intensity of water-deficit stress in white clover (*Trifolium repens* L.). *Environmental and Experimental Botany*, 63(3), 278–284. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.11.005>
- Singh, D., & Gupta, N. (2020). Microbial Laccase: a robust enzyme and its industrial applications. *Biologia*, 75(8), 1183-1193.
- Singh, R., Kumar, A., & Sharma, P. (2022). Dilute acid pretreatment of lignocellulosic biomass: An overview on process optimization and effects on downstream processing. *Bioresource Technology Reports*, 17, 100903.

- Slama, R., El Ghoul, J., Omri, K., Houas, A., El Mir, L., & Launay, F. (2016). Effect of Cd-doping on microstructure and photocatalytic activity of ZnO nanoparticles synthesized by sol gel method. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 27, 7939-7946.
- Squillaci, G., Apone, F., Sena, L. M., Carola, A., Tito, A., Bimonte, M., ... & Morana, A. (2018). Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) industrial wastes as a valued bioresource for the production of active ingredients. *Process Biochemistry*, 64, 228-236.
- Sus, B., Baltaci, M. O., Nadaroglu, H., & Adiguzel, A. (2024). From agro-food waste to nanoparticles: green synthesis of copper nanoparticles with lignin peroxidase enzyme produced by *Anoxybacillus rupiensis* using peanut shells. *Environmental Science and Pollution Research*, 31(39), 52049-52059.
- Şenol, Z. M., El Messaoudi, N., Cığeroğlu, Z., Miyah, Y., Arslanoğlu, H., Bağlam, N., ... & Georgin, J. (2024). Removal of food dyes using biological materials via adsorption: a review. *Food Chemistry*, 139398.
- Tao, Z., Dong, B., Teng, Z., & Zhao, Y. (2020). The classification of enzymes by deep learning. *Ieee Access*, 8, 89802-89811.
- Thakkar, K.N., Mhatre, S.S., Parikh, R.Y., 2010, Biological synthesis of metallic nanoparticles, *Nanomedicine: NBM*, 6, 257-262
- Topal, M. B., Saglam, H. K., Ertugrul, M., Tasgin, E., & Nadaroglu, H. (2024). Na-doped ZnO thin film by USP method for amperometric detection of Alura Red (E129) azo dye. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 35(30), 1962.
- Wei, W. A. N. G., & Xianghua, W. E. N. (2009). Expression of lignin peroxidase H2 from *Phanerochaete chrysosporium* by multi-copy recombinant *Pichia* strain. *Journal of Environmental Sciences*, 21(2), 218-222.
- Woiciechowski, A. L., Neto, C. J. D., de Souza Vandenberghe, L. P., de Carvalho Neto, D. P., Sydney, A. C. N., Letti, L. A. J., ... & Soccol, C. R. (2020). Lignocellulosic biomass: Acid and alkaline pretreatments and their effects on biomass recalcitrance—Conventional processing and recent advances. *Bioresource technology*, 304, 122848.
- Yan, J. K., Wang, Y. Y., Qiu, W. Y., Ma, H., Wang, Z. B., & Wu, J. Y. (2018). Three-phase partitioning as an elegant and versatile platform applied to nonchromatographic bioseparation processes. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(14), 2416-2431.
- Yan, X., Cheng, J. R., Wang, Y. T., & Zhu, M. J. (2020). Enhanced lignin removal and enzymolysis efficiency of grass waste by hydrogen peroxide synergized dilute alkali pretreatment. *Bioresource technology*, 301, 122756.
- Zhang, G., Ma, C., He, Q., Dong, H., Cui, L., Li, L., Li, L., Wang, Y., & Wang, X. (2023). An efficient Pt@MXene platform for the analysis of small-molecule natural products. *iScience*, 26(5), 106622. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.106622>

## ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
<b>Adı Soyadı:</b>	İlknur DURUK
<b>Doğum tarihi:</b>	
<b>Doğum Yeri:</b>	
<b>Uyruğu:</b>	
<b>Adres:</b>	
<b>Tel:</b>	
<b>E-mail:</b>	
Eğitim	
<b>Lise:</b>	Palandöken Anadolu İ.H.L
<b>Lisans:</b>	Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik
<b>Yüksek lisans:</b>	Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	B2
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
Tezden Üretilmiş Yayınlar	