

**İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***PYCNOPORUS SANGUINEUS* KAYNAKLI REKOMBİNANT LAKKAZ  
PSLCC2 KULLANIMI İLE TEKSTİL BOYALARINDA RENK GİDERİMİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Koray MALCI**

**Moleküler Biyoloji-Genetik ve Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

**Moleküler Biyoloji-Genetik ve Biyoteknoloji Programı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ayten YAZGAN KARATAŞ**

**HAZİRAN 2017**



**İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***PYCNOPORUS SANGUINEUS* KAYNAKLI REKOMBİNANT LAKKAZ  
PSLCC2 KULLANIMI İLE TEKSTİL BOYALARINDA RENK GİDERİMİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Koray MALCI  
(521141132)**

**Moleküler Biyoloji-Genetik ve Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

**Moleküler Biyoloji-Genetik ve Biyoteknoloji Programı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ayten YAZGAN KARATAŞ**

**HAZİRAN 2017**



İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 521141132 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Koray MALCI, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “*PYCNOPORUS SANGUINEUS* KAYNAKLI REKOMBİNANT LAKKAZ PSLCC2 KULLANIMI İLE TEKSTİL BOYALARINDA RENK GİDERİMİ” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

**Tez Danışmanı :** Prof. Dr. Ayten YAZGAN KARATAŞ .....  
~~İstanbul Teknik Üniversitesi~~

**Teslim Tarihi** : 5 Mayıs 2017



## ÖNSÖZ

Bu tez çalışması İstanbul Teknik Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

Çalışmam esnasında benden yardımını esirgemeyen ve her türlü deneyim ve birikimini benimle paylaşan tez danışmanım Prof.Dr Ayten YAZGAN KARATAŞ'a ve deneysel uygulamalar için hem teorik hem de pratik anlamda bana yardımcı olan, değerli tecrübelerini paylaşan Dr. Günseli KURT GÜR ve Dr. Orkun PINAR'a verdiği desteklerden dolayı teşekkür ederim.

Bunun yanında, tez çalışmamın kapsamında gerçekleştirdiğim Ames testinde kullanılan bakteriyel suşlarını veren Prof. Dr. Fikretin ŞAHİN'e (Yeditepe Üniversitesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü) , renk giderimi çalışmalarında kullanılan tekstil boya larını veren Setaş Kimya Sanayi A.Ş.'ye tez çalışmam için yaptıkları katkılardan ötürü teşekkür ederim.

Bu zamana kadar hem eğitim hayatımda hem de şahsi hayatımda bana destek olan, yanımda duran ve elde ettiğim başarıların gizli kahramanları olan annem ve babam, Şükran – Mustafa MALCI'ya, kardeşlerim Berkay ve Oktay MALCI'ya ve en değerli arkadaşım Nisa DURMAZER'e bana verdikleri motivasyondan ve desteklerden ötürü minnettar olduğumu belirtmek isterim.

Haziran 2017

Koray MALCI



## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖNSÖZ .....	v
İÇİNDEKİLER .....	vii
KISALTMALAR .....	ix
SEMBOLLER .....	xi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xv
ÖZET .....	xvii
SUMMARY .....	xix
<b>1. GİRİŞ – ..</b> .....	<b>1</b>
1.1 Endüstriyel Enzimler.....	1
1.2 Lakkaz .....	2
1.2.1 Yapısal özellikler.....	3
1.2.2 Metal içeriği .....	3
1.2.3 Redoks potansiyeli (E <sup>0</sup> ).....	4
1.2.4 3 Boyutlu (3D) yapı.....	5
1.2.5 Reaksiyon mekanizması .....	8
1.2.6 Lakkaz substratları ve inhibitörleri.....	10
1.2.7 Biyolojik fonksiyonlar.....	10
1.2.8 Lakkaz Üreticisi Bir Tür: <i>Pycnoporus sanguineus</i> .....	11
1.2.9 Lakkaz-mediatör sistem (LMS).....	12
1.2.10 Endüstriyel uygulamalar.....	15
1.2.10.1 Gıda endüstrisi .....	16
1.2.10.2 Kağıt endüstrisi.....	17
1.2.10.3 Tekstil endüstrisi.....	17
1.2.10.4 Diğer uygulamalar .....	19
1.2.11 Lakkaz ekspresyonu .....	20
1.2.12 Rekombinant lakkaz üretimi .....	21
1.3 <i>Pichia Pastoris</i> .....	22
1.4 Çalışmanın amacı .....	23
<b>2. MATERYAL METOT .....</b>	<b>26</b>
2.1 Materyal .....	26
2.1.1 Suşlar ve plazmitler .....	26
2.1.2 Besiyerleri .....	27
2.1.3 Tampon çözeltiler ve solüsyonlar.....	27
2.1.4 Kimyasallar ve enzimler.....	27
2.1.5 Laboratuvar ekipmanları .....	27
2.2 Metot .....	28
2.2.1 pPICZ B ekspresyon vektörünün <i>P. pastoris</i> 'e transformasyonu .....	28
2.2.2 Transformant kolonilerin ürettiği lakkazların aktivitelerinin belirlenmesi .....	29

2.2.3 Rekombinant lakkaz PsLcc2 enziminin üretilmesi .....	30
2.2.4 Üretilen Rekombinant lakkaz PsLcc2'nin toplanması .....	30
2.2.5 Renk giderme analizleri.....	31
2.2.6 Ames testi .....	34
<b>3. SONUÇLAR ve TARTIŞMA .....</b>	<b>37</b>
3.1 Lakkaz Üretebilen Rekombinant <i>P.pastoris</i> Kolonilerin Belirlenmesi .....	37
3.2 Rekombinant Lakkaz PsLcc2 Enziminin Geniş Ölçekli Üretimi.....	40
3.3 <i>Pichia pastoris</i> ile Üretilen Rekombinant Lakkaz Enzimlerinin Kısmi Olarak Saflaştırılması.....	41
3.4 Rekombinant Lakkaz PsLcc2 Enziminin Renk Giderme Performansının Belirlenmesi .....	43
3.4.1 Boya Renk Giderimi Reaksiyon Hacminin Belirlenmesi.....	43
3.4.2 Lakkaz-ABTS Sisteminin Dekolorizasyon Performansı.....	45
3.4.3 Doğal Mediatörler ile Kurulan LMS'nin Dekolorizasyon Performansı 59	
3.4.3.1 Rekombinant Lakkaz PsLcc2-Sringaldehit Sisteminin Dekolorizasyon Performansı .....	59
3.4.3.2 Rekombinant Lakkaz PsLcc2-p-Kumarik Asit Sisteminin Dekolorizasyon Performansı .....	62
3.4.3.3 Dekolorizasyon Çalışmalarının Kendi Aralarında Kıyaslanması.....	65
3.5 Dekolorizasyon Çözeltilerinin Ames Testi ile Toksisitelerinin Belirlenmesi.....	67
<b>4. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>73</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>77</b>
<b>EKLER .....</b>	<b>84</b>

## KISALTMALAR

<b>ABTS</b>	: 2,2'-azin-bis 3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit
<b>Cys</b>	: Sistin Amino Asidi
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>EPR</b>	: Elektron Paramanyetik Rezonans
<b>ER</b>	: Endoplazmik Retikulum
<b>GRAS</b>	: Generally Recognized As Safe (Genel Olarak Güvenli Kabul Edilen)
<b>His</b>	: Histidin Amino Asidi
<b>LMS</b>	: Lakkaz Mediator Sistemi
<b>MaL</b>	: <i>Melanocarpus albomyces</i> lakkaz
<b>MCO</b>	: Multi Copper Oxidase (Çoklu Bakır Oksidaz)
<b>MYE</b>	: Metal Yanıt Elemanları
<b>NCBI</b>	: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
<b>OD</b>	: Optik Yoğunluk
<b>PAH</b>	: Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar
<b>TNC</b>	: Trinuclear Cluster (Üçlü Çekirdek Kümesi)
<b>TvL</b>	: <i>Trametes versicolor</i> lakkaz
<b>UV</b>	: Ultra Viyole
<b>ZYE</b>	: Zenobiyotik Yanıt Elemanları



## SEMBOLLER

<b>Å</b>	: Angström
<b>C</b>	: Karbon
<b>Cu</b>	: Bakır
<b>Fe</b>	: Demir
<b>g</b>	: Gram
<b>H</b>	: Hidrojen
<b>K</b>	: Potasyum
<b>kDA</b>	: Kilo Dalton
<b>K<sub>m</sub></b>	: V <sub>max</sub> Değerine Denk Gelen Substrat Konsantrasyonunun Yarısı
<b>M</b>	: Molar
<b>Mn</b>	: Mangan
<b>N</b>	: Nitrojen - Azot
<b>O</b>	: Oksijen
<b>s</b>	: Saniye
<b>U</b>	: Birim
<b>V</b>	: Volt
<b>V<sub>max</sub></b>	: Maksimum Enzimatik Reaksiyon Hızı



## ÇİZELGE LİSTESİ

### Sayfa

<b>Çizelge 1.1:</b> Farklı organizmalara ait lakkaz enzimlerinin E0 değerleri. ....	<b>5</b>
<b>Çizelge 1.2:</b> Lakkaz enzimi üreten bazı organizmalar ve bu genlerin NCBI veri tabanındaki kayıt numaraları. ....	<b>20</b>
<b>Çizelge 2.1:</b> Dekolorizasyon analizlerinde hazırlanan 3 farklı reaksiyon ortamının içerikleri .....	<b>32</b>
<b>Çizelge 2.2:</b> Boya çeşitlerine göre maksimum absorbans değerlerinin ölçüldüğü dalga boyları. ....	<b>32</b>
<b>Çizelge 3.1:</b> Mediatör bulunan reaksiyon ortamlarının sadece enzim bulunan reaksiyonlara göre dekolorizasyon artış oranları .....	<b>67</b>



## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

- Şekil 1.1:** *Melanocarpus albomyces* lakkaz (MaL) enziminin 3 boyutlu yapısı... ..... 6
- Şekil 1.2:** *Melanocarpus albomyces* lakkaz (MaL) enziminin sahip olduğu 4 bakır atomunun ve T1, T2, T3 bölgelerinin geometrik yapıları..... 8
- Şekil 1.3:** Lakkaz-mediatör-substrat redoks döngüsü..... 13
- Şekil 1.4:** Lakkaz-ABTS sistemindeki iki adımlı ABTS dönüşümü ve oluşan yüksek potansiyelli ara ürünlerin moleküler yapıları..... 14
- Şekil 2.1:** pPICZ B vektörünün fonksiyonel elemanlarını içeren genetik haritası. ... 27
- Şekil 3.1:** Transformant Kolonilerin ABTS İçeren Minimal Metanol Besiyerindeki Lakkaz Üretimlerinin Tespit Edilmesi. A: İnkübasyon Öncesi Kolonilerin Görünümü, B: 24 Saat Sonundaki Görünüm, C: 72 Saat Sonundaki Görünüm ..... 38
- Şekil 3.2:** 2 Numaralı Petrinin 3. Gün Sonundaki (72 saat) Yakın Görünümü ..... 39
- Şekil 3.3:** Farklı hacimlerde gerçekleştirilen lakkaz+ABTS sisteminin malaşit yeşili üzerinde boya giderme performansı. A: 2 mL hacim, B: 4 mL hacim, C:10 mL hacim ..... 44
- Şekil 3.4:** 10 mL hacimde gerçekleştirilen dekolorizasyon çalışması 24.saat sonundaki örneklerin görüntüsü..... 45
- Şekil 3.5:** Asit Siyah boyası üzerinde enzim (lakkaz) ve enzim-ABTS sisteminin 48 saat içerisindeki dekolorizasyon performansının belirlenmesi. .... 47
- Şekil 3.6:** Reaktif Siyah boyası üzerinde enzim (lakkaz) ve enzim-ABTS sisteminin 48 saat içerisindeki dekolorizasyon performansının belirlenmesi. .... 48
- Şekil 3.7:** Kristal Viyole boyası üzerinde enzim (lakkaz) ve enzim-ABTS sisteminin 48 saat içerisindeki dekolorizasyon performansının belirlenmesi. .... 49
- Şekil 3.8:** Malaşit Yeşili boyası üzerinde enzim (lakkaz) ve enzim-ABTS sisteminin 48 saat içerisindeki dekolorizasyon performansının belirlenmesi. .... 50
- Şekil 3.9:** Bismarck Kahverengi boyası üzerinde enzim (lakkaz) ve enzim-ABTS sisteminin 48 saat içerisindeki dekolorizasyon performansının belirlenmesi..... 51
- Şekil 3.10:** Bazik Fuksin boyası üzerinde enzim (lakkaz) ve enzim-ABTS sisteminin 48 saat içerisindeki dekolorizasyon performansının belirlenmesi. .... 52
- Şekil 3.11:** Kongo Kırmızısı boyası üzerinde enzim (lakkaz) ve enzim-ABTS sisteminin 48 saat içerisindeki dekolorizasyon performansının belirlenmesi..... 53
- Şekil 3.12:** Dekolorizasyon Çalışmalarında Kullanılan 12 Kuyucuktan Oluşan Plate Şablonu. .... 54
- Şekil 3.13:** Asit Siyah Boyasının Dekolorizasyon Çalışması Görüntüleri.. .... 54
- Şekil 3.14:** Bazik Fuksin Boyasının Dekolorizasyon Çalışması Görüntüleri..... 55
- Şekil 3.15:**Bismarck Kahverengi Boyasının Dekolorizasyon Çalışması Görüntüleri..... 56

<b>Şekil 3.16:</b> Lakkaz-Sringaldehit Sistemi ile Yapılan Dekoorizasyon Çalışmasının 7 Boya için 48 saat Sonundaki Sonuçları.....	<b>60</b>
<b>Şekil 3.17:</b> Reaktif Siyah ve Malaşit Yeşili Boyalarının Dekolorizasyon Çalışması Görüntüleri.....	<b>61</b>
<b>Şekil 3.18:</b> Lakkaz-p-Kumarik Asit Sistemi ile Yapılan Dekoorizasyon Çalışmasının 7 Boya için 48 saat Sonundaki Sonuçları.....	<b>63</b>
<b>Şekil 3.19:</b> Kristal Viyole ve Malaşit Yeşili Boyalarının Dekolorizasyon Çalışması Görüntüleri.....	<b>64</b>
<b>Şekil 3.20:</b> Distile Su, 4-NPD ve Kristal Viyole Solüsyonları Bulunan Kontrol Petri Kabı.....	<b>69</b>
<b>Şekil 3.21:</b> Pslcc2 ile muamele edilmiş ve muamele edilmemiş boya solusyonlarının bulunduğu petriler (asit siyahı, reaktif siyah, malaşit yeşili, kristal viyole)..	<b>70</b>
<b>Şekil 3.22:</b> Pslcc2 ile muamele edilmiş ve muamele edilmemiş boya solusyonlarının bulunduğu petriler (bazik fuksin, Bismarck kahverengi ve Kongo kırmızısı)..	<b>71</b>

# **PYCNOPORUS SANGUINEUS KAYNAKLI REKOMBİNANT LAKKAZ PSLCC2 KULLANIMI İLE TEKSTİL BOYALARINDA RENK GİDERİMİ**

## **ÖZET**

Endüstriyel enzimler günümüzde pek çok sektörde yaygın şekilde kullanılan biyolojik katalizörlerdir. Gıda ve içecek endüstrisi, tekstil sektörü, deterjan ve kimya endüstrisi, deri sanayi, kozmetik ve medikal ürün sektörlerinde enzimler yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisinin keşfi ve genetik biliminin ilerlemesiyle enzimlerin, endüstriyel ölçekte üretilmesinin önü açılmış ve oldukça geniş skalada enzim üretimi mümkün hale gelmiştir.

Lakkaz enzimi (EC 1.10.3.2) oksidoredüktaz sınıfına dahil bir enzim çeşididir. Sahip olduğu bazı özelliklerden dolayı günümüzde pek çok sektörde kullanılmaktadır. Lakkaz üreten çeşitli türlerin var olması farklı fonksiyonlara sahip lakkazların var olmasına ve substrat çeşitliliğinin geniş olmasına sebep olmuştur. Ayrıca bu nedenden ötürü optimum sıcaklık ve pH koşulları da oldukça çeşitlilik göstermektedir. Lakkazın substrat çeşitliliğini ve aktivitesini arttıran mediatörler ile birlikte kullanılabilir oluşu lakkazın performansını arttıran bir diğer husustur. Lakkazların en yaygın kullanıldığı alanlar tekstil, kağıt, gıda ve boya sektörleridir. Ayrıca bazı çevreye zararlı ve toksik özellik gösteren kirleticilerin biyoremediasyonunda da kullanıldığı bilinmektedir.

Yapılan bu çalışmada *Pycnoporus sanguineus* kaynaklı rekombinant lakkaz PsLcc2 enziminin boya giderim kapasitesi araştırılmıştır. Ayrıca dekolorizasyona uğrayan boyalar üzerinde toksisite analizleri yapılmıştır. Lakkaz enzimi kodlayan *Pycnoporus sanguineus* MUCL 38531 suşuna ait *PsLcc2* geni, endüstriyel üretim için oldukça elverişli bir maya türü olan *Pichia pastoris* 'te aktararak heterotok enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. *P. pastoris* konakçısında üretilen rekombinant lakkaz PsLcc2 enzimi ile renk giderimi çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Renk giderimi (dekolorizasyon) çalışmalarında Azo ve Triarilmetan sınıfı boya grubuna ait)7 farklı boya kullanılmıştır. Dekolorizasyon çalışmalarında lakkaz enzimi tek başına kullanıldığı gibi üç farklı mediatörle birlikte lakkaz-mediatör sistemi kurularak da çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda sentetik mediatör olarak ABTS (2,2'-azin-bis 3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit), doğal mediatörler olarak sringaldehit ve p-kumarik asit kullanılmıştır. Renk giderim çalışmalarının analizleri spektrofotometrik yöntemle gerçekleştirilmiş olup ardından Ames testi kullanılarak mutajenik aktivite analizleri gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın sonucunda rekombinant lakkaz *PsLcc2* enzimi ile beraber kullanılan mediatörlerin söz konusu yedi boya üzerindeki renk giderim verimini bir hayli arttırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca boya çeşidine göre her mediatörün farklı etki gösterdiği, kullanım amacına ve kullanım alanına göre spesifik lakkaz-mediatör sistemlerinin oluşturulması gerektiği tespit edilmiştir. Yapılan mutajenik aktivite analizleri sonucunda rekombinant lakkaz *PsLcc2*-mediatör sistemi tarafından dekolorizasyona uğrayan boyaların herhangi bir mutajenik etki göstermediği gösterilmiştir. Kısaca, uygun mediatör varlığında rekombinant lakkaz *PsLcc2*

enziminin, mutajenik bir ara ürün oluşturmadan, Azo grubu ve Triarilmetan grubu tekstil boylarını renk giderimindebaşarı ile kullanılabilircek güvenli kuvvetli bir lakkaz olduğu anlaşılmıştır.



# DECOLORIZATION OF TEXTILE DYES USING RECOMBINANT LACCASE PSLCC2 FROM *PYCNOPORUS SANGUINEUS*

## SUMMARY

Enzymes as biological catalysts are widely used in many industries ranging from processes in the food and beverage industries, the textile industry, the detergent and chemical industries, the leather industry, the cosmetic and medical industries. The discovery of recombinant DNA technology and the advancement of genetic engineering have opened the way for the production of enzymes on an industrial scale and it has become possible to produce enzymes on a very large scale.

Laccases (EC 1.10.3.2) are multioxidoreductases belonging to the multicopper containing oxidases. The presence of various types of laccase-producing species has led to the existence of laccases with the different functions and the widespread substrate diversity. Also due to this reason their optimum temperature and pH conditions are quite variable. The use of the laccases with mediators that increase their substrate diversity and activity is another aspect that increase the potential use of laccases in various industrial and biotechnological applications. Preferably, laccases are promisingly used for bioremediation of the pollutants which are harmful and toxic to some environment

In this study a laccase gene *PsLcc2* isolated from the white-rot fungus *Pycnoporus sanguineus* MUCL 38531 has been expressed in the *Pichia pastoris* which is a yeast strain that is very suitable for heterologous protein productions. The decolorization potential of the resultant recombinant laccase was then investigated for synthetic textile dyes. Seven chemically different dyes classified as Azo and triarylmethane dyes were tested in the decolorization studies. Its decolorization efficiencies were analysed in the presence of three different mediators. ABTS (2,2'-azine-bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) was used as a synthetic mediator and syringaldehyde and p-coumaric acid were used as natural mediators. Mutagenicity of these dyes before and after laccase treatment were also investigated by employing Ames test.

As results, it was found that mediators significantly increase the decolorization efficiency of recombinant laccase PsLcc2. Furthermore, in addition to the decolorization of these textile dyes, no mutagenicity was observed after the recombinant PsLcc2 laccase treatment. Briefly, the recombinant laccase PsLcc2 is a promising candidate for decolorization and detoxification of Azo and Triarylmethane dyes.



# 1. GİRİŞ

## 1.1 Endüstriyel Enzimler

İnsanoğlunun enzimleri kullanması medeniyetin ilk zamanlarına kadar uzanmaktadır. Belirli yiyecek ve içeceklerin üretilmesinde, giysi amacıyla kullanılan derilerin işlenmesinde ilk toplumların enzimlerin avantajlarından faydalandığı bilinmektedir. [1] Ancak, enzimlerin doğasının ve çalışma mekanizmalarının anlaşılması için yapılan çalışmalar 19. yüzyıl sonları ve 20. yüzyıl başlarında hız kazanmıştır [1]. Günümüzde ise değerli farmasötiklerin ve kimyasalların üretiminde, biyoyakıt sektöründe, gıda ve içecek endüstrisinde, deterjan, tekstil ve deri gibi pek çok endüstriyel alanda enzimler kullanılmaktadır [2]. Enzimler, sahip oldukları kiral ve pozisyonel özgünlük ve uygun çalışma koşulları sayesinde hedeflenen belirli ürünlerin üretilmesinde çeşitli endüstrilerde yaygın şekilde biyokatalizör olarak kullanılmaya başlanmıştır [2].

Endüstriyel enzimlerin kullanım alanları, enzimin sahip olduğu spesifik özelliklere göre değişkenlik göstermektedir. Örnek olarak biyoyakıt endüstrisinde kullanılan selüloz enzimi selülozu parçalarken selülozik etanol açığa çıkartmaktadır [3]. Deterjan endüstrisinde kullanılan proteaz, lipaz ve amilaz enzimleri, sırasıyla proteinlerin, yağların ve nişastanın bulaşıklardan ve çamaşırlardan arındırılması amacıyla deterjan ürünlerine ilave edilmektedir [4]. Peynir üretiminde kullanılan rennin ve kimozen enzimleri sütün kesilmesinde ve peynir oluşumunda görev alırlar. [5] Pektin yapısını parçalamada kullanılan pektinaz enzimi ise meyve suyu endüstrisinde oldukça yaygın kullanılan bir enzimdir [6].

Endüstride kullanılan enzimlerden bazıları oldukça spesifik amaçlar için kullanılsa da bazı enzimler, sahip oldukları özelliklerden dolayı birden fazla endüstriyel alanda kullanılmaktadır. Deterjan endüstrisinde kullanılan ve proteinlerin parçalanmasından sorumlu olan proteaz enzimi aynı zamanda deri işleminde kılların gideriminde, kozmetik sektöründe tüy dökücü kremlerin üretiminde veya kontak lenslerin korunması amacıyla kişisel bakım ürünlerinde de kullanılmaktadır [4,7]. Benzer

şekilde, farklı uygulamalar ve alanlarda kullanılan bir enzim çeşidi de lakkazdır. Bir oksidoredüktaz çeşidi olan lakkaz enzimi, deterjan üretiminde beyazlatıcı ajan olarak, içecek üretiminde istenmeyen fenolik bileşiklerin uzaklaştırılmasında, diş beyazlatıcısı olarak kişisel bakım ürünlerinde kullanılmaktadır [8]. Ayrıca çevre ıslahında zararlı kirleticilerin biyoremediasyonunda da lakkaz enzimi kullanılmaktadır [8].

## 1.2 Lakkaz

Lakkaz enzimi (EC 1.10.3.2) çoklu bakır atomu içeren bir oksidoredüktaz çeşidi enzimdir. Bu özelliğinden dolayı sitokrom-c oksidaz, L-askorbat oksidaz, seruloplazmin, bilirubin oksidaz gibi üyelerin de yer aldığı mavi oksidazlar gurubunun bir üyesidir. Lakkaz enzimi sahip olduğu dört adet bakır atomlarının sayesinde oldukça geniş bir skaladaki aromatik bileşiklerin oksidasyonunu katalizler. Meydana gelen bu reaksiyonda enzim, hidrojen vericisi olarak davranırken aynı zamanda da hidrojen peroksit oluşumu gözlenmeksizin moleküler oksijenin de suya indirgenmesi gerçekleşir [9,10].

Lakkaz enzimi ilk olarak bir Japon ağacı olan *Rhus venicifera* bitkisinin öz suyundan elde edilmiştir [11]. Ardından, yapılan çalışmalar sonucu pek çok mantar türünün de bu enzime sahip olduğu tespit edilmiştir. *Agaricus bisporus*, *Podospora anserina*, *Rhizoctonia praticola*, *Trametes or Polyporus versicolor*, *Pholiota aegerita*, *Pleurotus ostreatus*, *Coriolus hirsitus*, ve *Neurospora crassa* gibi organizmalar, lakkaz üzerine yoğunlukla çalışılan türlerden olmuştur [12]. Bunun yanında lakkaz enziminin başka bitkilerde, böceklerde ve bakterilerde de bulunduğu bilinmektedir [13]. Bir cila ağacı üyesi olan Anacardiaceae ailesinin bütün türlerinde lakkaz enziminin varlığı tespit edilse de bitkilerdeki lakkaz varlığı mantarlara göre oldukça kısıtlıdır [15]. Yapılan çalışmalar bazı böceklerin de lakkaz benzeri enzimlere sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır [16]. Lakkaz bulunduran prokaryotik organizmalar arasında ilk keşfedilen tür ise *Axospirillum lipoferum* organizmasıdır [17]. Gelişen sekanslama teknolojisi sayesinde yapılan metagenomik çalışmalar sonucu Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerde lakkaz enzimi ihtiva eden türler olduğu tespit edilmiştir [18].

Lakkaz enziminin aktif bölgesinde bulunan bakır, oksijen ve hidratlı elektron gibi elemanlar, enzimin kendine özgü bir elektron transfer ve kataliz mekanizmasına

sahip olmasını sağlamıştır [12]. Lakkaz, sahip olduğu geniş substrat özgüllüğü, yüksek katalitik sabitleri, oksijenin ikinci substrat olarak kullanımı gibi özellikleri sayesinde, gıda endüstrisinden çevre ıslahı uygulamalarına kadar pek çok farklı uygulamada kullanım alanı bulmuştur [14].

### 1.2.1 Yapısal özellikler

Lakkaz da diğer mavi oksidaz enzimleri gibi glikoprotein yapısındadır. Heksozamin, glukoz, mannoz, galaktoz, fukoz, ve arabinoz gibi moleküllerin de bulunabildiği glikoprotein yapısında %10 ile %45 arasında karbonhidrat kompozisyonu oluşabilmektedir [19,20]. Lakkazın moleküler ağırlığı ise organizmanın kaynağına göre oldukça değişkenlik göstermektedir. *Trametes versicolor*'un sahip olduğu dört farklı lakkaz izoformu 66, 64, 45, 43 kDa ağırlıklarına sahipken, *Podospora antiserina* 390 kDa moleküler ağırlığa sahip lakkaz enzimi içerir. *Rhus vernicifera* 140 kDa, *Coriolus hirsitus* 55 kDa moleküler ağırlığa sahip lakkaz enzimi içermektedir [12].

Genetik sekans hizalaması temelinde gerçekleştirilen filogenetik analizlere göre farklı lakkaz enzimlerinin bakır bağlayıcı domainlerinin oldukça iyi korunduğu tespit edilmiştir. Bu bölgelerin dışında kalan yerler ise türden türe oldukça değişkenlik göstermektedir [21]. Mantar türlerindeki lakkazların filogenetik analizleri sonucu monofiletik bir dalın varlığı tespit edilmiştir. Ayrıca lakkaz enziminin evrimsel olarak çok eski zamanlarda da var olduğu tespit edilmiştir. Enzimin aktivitesinde oldukça önemli olan bakır bağlayıcı bölgelerin korunması da ilk evrimsel değişimlere kadar uzanmaktadır. Bu yapısal korunum, lakkaz enzimlerinin reaksiyon mekanizmasındaki bakır oksidasyonu ve oksijen indirgenmesinin de neden bütün türlerde ortak olduğunu da açıklamaktadır [22].

### 1.2.2 Metal içeriği

Lakkaz enzimi her monomerinde dört adet bakır atomu içerir. Bunun dışında başka bir ko-faktörü yoktur. Bu bakır atomları T1, T2 ve T3 olarak isimlendirilmiş 3 redoks bölgesine bağlı şekilde bulunurlar. Ayrıca bu bakır atomları sahip oldukları paramanyetik ve spektroskopik özelliklere göre Tip I, Tip II ve Tip III olarak sınıflara ayrılmışlardır [23].

Cu1 olarak isimlendirilen bakır atomu paramanyetik ve mavi renklidir. Tip 1 olarak sınıflandırılır ve T1 bölgesinde işlev gösterir. Bu bakır atomu enzimin mavi-yeşil renge sahip olmasına sebep olur. Cu1, sistein ile kovalent bağ oluşturur ve Elektron Paramanyetik Rezonans (EPR) oluşumuna sebep olur. Cu1 ve T1 su gibi çözücülerin içinde işlev gösterebilmektedir. Cu1, kobalt ve cıva gibi metallerle yer değiştirme özelliğine sahip olsa da bu durum enzimin aktivitesini olumsuz yönde etkilemektedir [23,24]. Cu2 bakırı Tip II sınıfına dahil edilmiştir ve T2 bölgesinde işlevseldir. Cu2 de paramanyetik özellik gösterse de renksiz yapıdadır. EPR değeri, Cu1 atomuna göre daha zayıftır. Cu3 ve Cu4 atomları ise dimanyetik spin çifti oluştururlar. Tip III sınıfında olan bu bakırlar T3 bölgesinde aktivite gösterirler. Tip I ve Tip II bakır atomları mononükleer yapı oluştururken Cu3 ve Cu4 bakır atomları hidroksil köprüsüyle oluşan anti-ferromanyetik, binükleer bölge oluşturmaktadır. Bu özelliklerin sonucu olarak da EPR oluşumu gözlenmemektedir [23,24].

T3 bölgesi oksitlenmiş formda 330 nm'de UV spektrumunda bir pik oluşumundan sorumlu olsa da aktif bölgenin indirgenmesi ile bu pik kaybolmaya başlar. T2 ve T3 bölgeleri moleküler oksijenin indirgeniği bir trinükleer küme oluşturmaktadır. T1 bölgesinde ise indirgenen substratın oksidasyonu gerçekleşir. Alınan elektronlar T2 ve T3 trinükleer merkeze aktarılır [24].

### 1.2.3 Redoks Potansiyeli ( $E^0$ )

İndirgenmiş substrattan elektron alımı için gerekli enerji olarak nitelendirilen redoks potansiyeli ( $E^0$ ) lakkaz enzimi için önemli bir parametredir. Lakkaz enzimi için  $E^0$  belirlemesinde  $K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$  gibi molekül çiftleri kullanılmaktadır. T1 bölgesinin sahip olduğu redoks potansiyeli lakkazın kaynak organizmasına göre oldukça değişkenlik göstermektedir. Buna benzer bir durum T1'in EPR değeri için de gözlenmektedir. Genelde mantar türlerinde lakkazların  $E^0$  değerleri bitkisel ve bakteri kaynaklı lakkazlara göre bir hayli yüksektir. Çizelge 1.1'de farklı organizmalara ait lakkaz enzimlerinin redoks potansiyelleri verilmiştir [24,25].

Enzim performansı ile doğrudan ilişkili olan reaksiyon gücü için redoks potansiyelinin önemi yüksektir. Yapılan çalışmalarda indirgenmiş substrat ile Cu1 (T1) arasındaki  $E^0$  farkının oksidasyon seviyesini belirlediği tespit edilmiştir. Oksidasyon seviyesinin yüksek olduğu durum genellikle substratın  $E^0$  değerinin düşük, Cu1 (T1) için  $E^0$  değerinin yüksek olduğu koşullarda gözlenmektedir. Farklı

türler arasındaki lakkaz enzimlerinin  $E^0$  değerinin değişkenlik göstermesi, bu değeri belirleyen parametreler üzerine yapılan çalışmaları arttırmıştır. Bu çalışmalar neticesinde, T1 bölgesindeki fenilalanin ve lösin gibi hidrofobik aminoasit kalıntılarının varlığının  $E^0$  değerini yükselttiği gözlenmiştir. Bunun yanı sıra Cu1 atomunun yakınında bulunan pentapeptit segmentinin varlığı da  $E^0$  değeri üstünde etkilidir [24,25,26].

**Çizelge 1.1:** Farklı organizmalara ait lakkaz enzimlerinin  $E^0$  değerleri

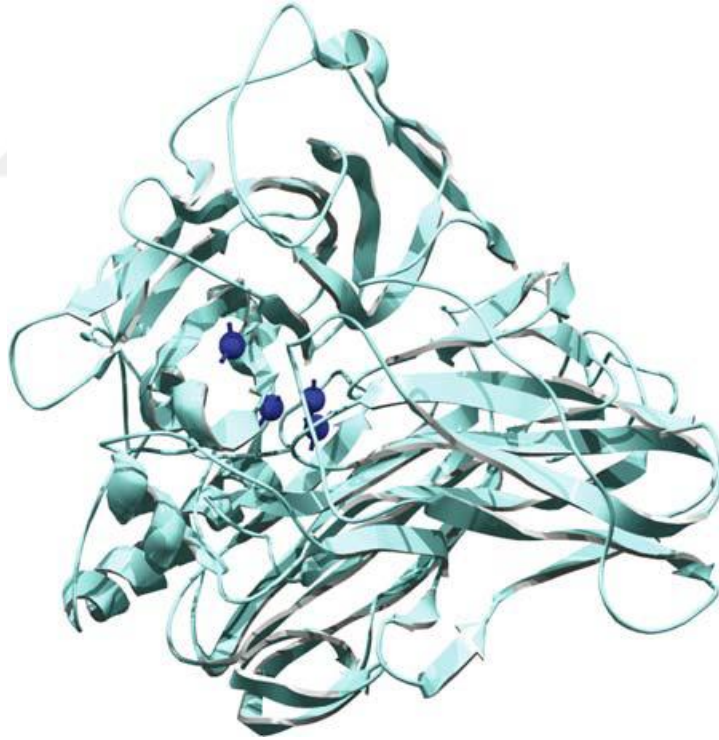
Tür	Organizma	T1 $E^0$ değeri (V)	Potansiyel a.a kalıntısı	Kaynak
<i>Trametes versicolor</i>	Basidiomycetes	+0.79	Fenilalanin	24
<i>Trametes villosa</i>	Basidiomycetes	+0.79	Fenilalanin	22
<i>Neurospora crassa</i>	Actinomycetes	+0.78	Lösin	26
<i>Rhizoctonia solani</i>	Deuteromycetes	+0.71	Lösin	22
<i>Coprinus cinereus</i>	Basidiomycetes	+0.55	Lösin	22
<i>Scytalidium thermophilum</i>	Basidiomycetes	+0.51	Lösin	22
<i>Myceliophthora thermophila</i>	Actinomycetes	+0.47	Lösin	24
<i>Rhus vernicifera</i>	Bitki	+0.43	Metionin	9
<i>Zucchini (Cuburbita pepo)</i>	Bitki	+0.34	Metionin	22

#### 1.2.4 3 boyutlu (3D) yapı

Günümüzde, farklı organizmaların sahip olduğu lakkaz enzimlerinin üç boyutlu yapılarının aydınlatılmasına yönelik yapılan çalışmalar, özellikle son 15 yıl içerisinde oldukça hız kazanmış durumdadır. Nitekim RCSB, PDB (Yapısal Biyoinformatik Araştırma İşbirliği, Protein Veri Bankası) veri tabanında prokaryotik lakkaz enzimlerinden bitkisel lakkazlara kadar pek çok farklı organizmaya ait lakkaz enziminin üç boyutlu yapıları mevcut durumdadır [27]. Farklı organizmalara ait lakkaz enzimlerinin yapılarında homoloji gözlense de birincil yapı farklılığından

kaynaklanan farklar da mevcuttur. Bu değişiklikler özellikle üç boyutlu döngülerde (loop) ve substrat bağlanma oyuklarında meydana gelmektedir [28].

Hakulinen ve ekibi tarafından 2002 yılında yapılan çalışmada bir mantar türü olan *Melanocarpus albomyces* organizmasına ait lakkaz enziminin yüksek çözünürlüklü (2.4 Å) kristal yapısı açığa çıkarılmıştır. *Melanocarpus albomyces* lakkaz (MaL) enzimi kubredoksin proteinine benzer yapıda, 3 domainden meydana gelmiş monomerik yapıda bir proteindir. MaL yapısında bulunan domain 3, mononükleer T1 bölgesini içermektedir. T2 ve T3 bölgeleriyle oluşan trinükleer küme, domain 3 ile domain 1 arasında yer almaktadır. Bu bölgede bulunan aminoasit kalıntıları bakır atomlarının reaksiyon esnasında koordinasyonunu sağlamaktadır. Domain 2 ise substrat bağlanma bölgesinin oluşumundan sorumludur. MaL, yüksek seviyede glikozillenmiş yapıda bulunmaktadır (5 ile 9 arası glikozilasyon bölgesi oluşabilmektedir) ve 3 adet disülfid bağı, yapının stabilitesini oluşturmaktadır. Şekil 1.1, MaL enziminin üç boyutlu yapısını göstermektedir [29].

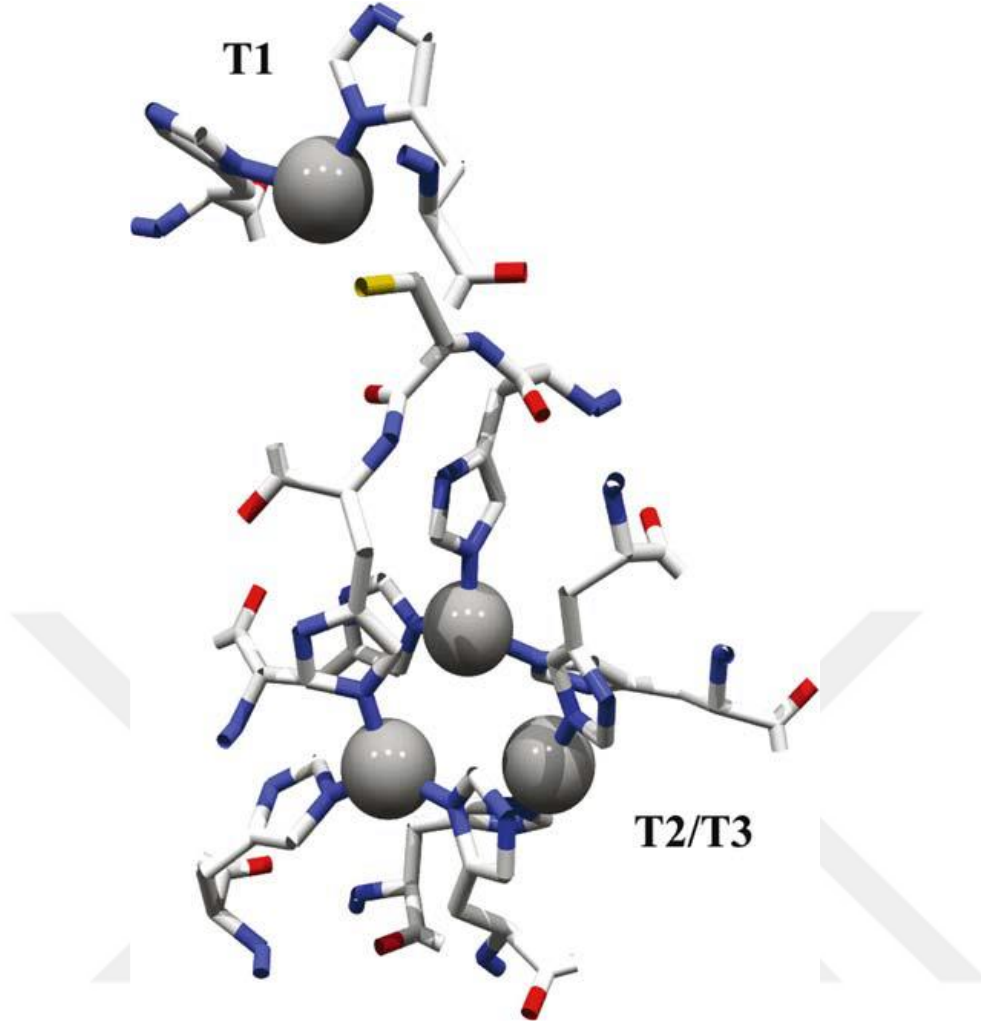


**Şekil 1.1:** *Melanocarpus albomyces* lakkaz (MaL) enziminin 3 boyutlu yapısı. Şekil üzerindeki koyu mavi kürecikler bakır atomlarını temsil etmektedir [29].

Piontek ve ekibi tarafından yapılan bir başka çalışmada ise lakkaz enzimi üzerine en fazla çalışmanın yapıldığı organizmalardan biri olan *Trametes versicolor*'un lakkaz enziminin (TvL) 3 boyutlu yapısı aydınlatılmıştır. TvL yapısı dikkate alındığında

MaL yapısıyla oldukça benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Gerek bakır atomlarının konformasyonu gerekse glikozilasyon karakteristikleri oldukça benzerlik gösteren iki enzim arasındaki en önemli fark MaL üzerinde mevcut olan 3 adet disülfid bağının TvL’ de iki adet olarak tespit edilmesi olmuştur [24,26,29].

MaL yapısında bulunan T1 bölgesindeki bakır atomu (Cu1) trigonal olarak iki histidin ve bir sistein amino asidi tarafından koordine edilmektedir. Ayrıca mavi oksidazlar arasında yüksek seviyede korunmuş olduğu gözlenen bu tripeptit (His-Cys-His), Cu1 atomunun trinükleer kümeye bağlanmasını da sağlamaktadır. T1 ile trinükleer kümenin (T2/T3) uzaklığının 12 Å kadar olduğu tespit edilmiştir. MaL yapısında Cu1 (T1) ile 3.7 Å uzaklıkta bulunan eksensel ligand (axial ligand), lösin aminoasidi olarak tespit edilmiştir. Enzimin yapısı ve organizasyon enerjisi üzerinde etkileri bulunan eksensel ligand, TvL için fenilalanin olarak tespit edilmiştir ve Cu1 ile 3.6 Å uzaklıkta olduğu belirlenmiştir. T2/T3 trinükleer kümesinin geometrik yapısı askorbat oksidaz enzimlerindeki geometriye oldukça fazla bir benzerlik göstermektedir ve neredeyse düzgün bir üçgen yapısı sergilemektedir. T3 bölgesinde Cu3 ve Cu4 atomları histidin aminoasidinin azot atomuna göre simetrik bir konformasyonda bulunmaktadır. T2 bölgesinin Cu2 bakır atomu ise iki histidin aminoasidi ve bir klorit iyonu arasında konumlanmıştır. Ancak Cu2 atomu, T3 bölgesini oluşturan Cu3 ve Cu4 atomlarına göre daha kararsız bir pozisyona sahiptir. Bu nedenle enzimin bakır yoksunu formlarının oluşmasının altında T2’nin sahip olduğu bu özellik bulunmaktadır. Hem TvL hem de MaL üzerinde biri geniş biri dar olmak üzere T2 ve T3 bölgelerine açılan kanallar mevcuttur [29,30]. Şekil 1.2’de MaL üzerinde bulunan bakır atomlarının pozisyonları verilmiştir.



**Şekil 1.2:** *Melanocarpus albomyces* lakkaz (MaL) enziminin sahip olduğu 4 bakır atomunun ve T1, T2, T3 bölgelerinin geometrik yapıları [29].

Filogenetik analizler ve 3 boyutlu kristal yapı çalışmaları incelendiği zaman, lakkaz enzimleri arasında aktif bölgenin ve çevresinin evrimsel olarak oldukça iyi korunduğu ortaya çıkmaktadır. T1 bakır atomu ile trinükleer küme arasındaki elektron transfer sisteminden sorumlu olan His-Cys-His tripeptidi, ve bu sistem için gerekli olan oksijen geçişini sağlayan kanalların varlığı korunmuş yapının ortaya çıkardığı en önemli özelliklerden olmaktadır. Ayrıca bu yapı, lakkaz enzimleri arasındaki bakır oksidasyonu ve oksijen indirgenmesi esasına dayanan ortak reaksiyon mekanizmasını da aydınlatmaktadır [24,29].

### 1.2.5 Reaksiyon mekanizması

Enzim bünyesinde bulunan T1 bölgesinin  $\text{Cu}^{2+}$  bakır atomu vasıtasıyla, indirgenmiş substrat üzerinde oksidasyon gerçekleşerek 1 elektron eksilmesi meydana gelir.

Bunun sonucu olarak katyonik serbest radikaller oluşur. Bu yapılar devamında lakkaz tarafından katalizlenen enzimatik oksidasyona uğrayabilecekleri gibi (fenol bileşiklerinin kuinona dönüşümü gibi) hidrasyon veya polimerizasyon gibi enzimatik olmayan proseslere de dahil olabilirler [31]. Lakkaz enziminde olduğu gibi çoklu bakır içeren oksidazlarda da (multicopper oxidases – MCO) oksidasyon adımı T1 bölgesindeki mavi bakır atomu (Cu1) tarafından gerçekleştirilir. Bu oksidasyon mekanizması oldukça iyi çalışılmış durumdadır. Oksidasyon sonucu açığa çıkan elektronlar sistein ve histidin aminoasitleri aracılığıyla trinükleer kümeye (trinuclear cluster – TNC) transfer edilirler. Bu aminoasitler, substrattan T1'e intermoleküler (moleküller arası) elektron taşınmasını ve T1'den TNC'ye intramoleküler (molekül içi) elektron taşınması olaylarını kontrol etmektedir [32]. Bu reaksiyon sırasında gerçekleşen elektron transfer seviyesinin tespitinde Marcus modeli olarak isimlendirilen denklemden yararlanılmaktadır. Bu eşitlik denklem 1.1'de verilmiştir.

$$k_{ET} = K_A S \sqrt{\frac{4\pi^3}{h^2 \lambda k_B T}} |H_{DA}|^2 \exp\left(\frac{-(\Delta G^\circ + \lambda)^2}{4\lambda k_B T}\right) \quad (1.1)$$

Denklemden belirtilen  $k_{ET}$  değeri elektron transfer seviyesinin sabitidir.  $K_A$  elektron donör-alıcı kompleksi için eşitlik sabitidir,  $S$  elektron taşınmasına elverişli kompleks oluşumunda asimetriyi açıklayan sterik bir terimdir,  $\lambda$  organizasyon enerjisidir,  $H_{DA}$  donör ve alıcı arasındaki elektronik bağlantı matris elemanıdır  $\Delta G^\circ$  ise elektron transferindeki serbest enerji farkıdır. Burada  $k_{ET}$  değerini moleküller arası elektron transferi açısından en fazla etkileyen parametreler  $\lambda$  ve  $\Delta G^\circ$  değerleridir [33].

Moleküler oksijenin suya indirgenmesi için 4 tane indirgenmiş substratın oksidasyonu gereklidir. Bu da 4 oksidasyon sonucu oluşacak olan 4 elektron anlamına gelmektedir. Bu nedenle lakkazın bu 4 farklı oksidasyon sonucu oluşan elektronları depo eden bir batarya olarak çalıştığı düşünülmektedir. T1 bölgesinde gerçekleşen oksidasyon reaksiyonu sonucu oluşan elektronlar oksijenin bulunduğu TNC'ye (T2/T3) aktarılır ve indirgenme sonucu meydana gelen su molekülü de yine TNC'den uzaklaşır [32,24].

Genel olarak lakkaz enzimi ‘iki bölge ping-pong bi-bi’ reaksiyon mekanizmasına sahiptir. Yani yeni substrat bağlanmadan önce eski substratın oluşturduğu ürünün ayrılması gerekmektedir [24].

### 1.2.6 Lakkaz substratları ve inhibitörleri

Lakkazın substratı öncelikle fenolik bileşikler olsa da substrat skalası oldukça geniştir. Ancak bu substrat çeşitliliği türden türe değişiklik göstermektedir. Orto ve para difenoller, aminofenoller, metoksi fenoller, benzenioller, polifenoller, poliaminler, hidroksiindoller ve bazı aril diaminler lakkazın aktivite gösterdiği substrat çeşitlerindedir. Bu substrat çeşitliliği, tirozinaz enzimi ile büyük oranda benzerlik gösterse de lakkaz enziminin tirozin üzerinde bir aktivitesi bulunmamaktadır.  $Mn^{2+}$  ve  $Fe(EDTA)^{2-}$  gibi metal yapılarının da lakkaz tarafından oksitlendiği bilinmektedir. Lakkaz enzimlerinin substrata olan özgülüğü oldukça değişkenlik gösterir.  $K_m$  değeri 1 ile 100 mM arasında değişkenlik gösterir. Ancak oksijene olan ilgisi oldukça yüksektir ve  $K_m$  değeri  $10^{-5}$  M civarındadır.  $V_{max}$  değeri ise substrat çeşidine göre 50 ile 300  $M\text{sg}^{-1}$  arasında değişkenlik gösterir [35,36].

Azid, siyanür, tiyosiyanür, florür ve hidroksit gibi maddeler lakkaz inhibitörleri olarak bilinmektedir. Bu yapılar Tip II ve Tip III bakır atomuna bağlanarak elektron transferinin kesilmesi ve aktivitenin inhibisyonuna neden olurlar. Yağ asitleri,  $Hg^{2+}$  gibi metal iyonları, sülfhidril reaktifleri, hidroksiglisin, kojik asit, desferal ve katyonik kuaterner amonyum deterjanları da lakkaz inhibitörleri arasındadır. Bu inhibitörler ise amino asit kalıntılarının modifikasyonlarına, konformasyonel değişikliklere veya bakır atomu şelasyonuna sebep olurlar. Konformasyonel değişiklikler, şelatlama ajanlarına oldukça hassas olan bakır atomlarının oksitlenme seviyelerine bağlılık göstermektedir [36,37].

### 1.2.7 Biyolojik fonksiyonlar

Lakkazın farklı organizmalarda çeşitli fizyolojik rolleri bulunmaktadır. Bitkisel yaralanmaya karşı cevap oluşumunda, meyve organlarının oluşumunda, hücre duvarı yapılanmasında, mantarlar için patojenik faktörlerin oluşumunda, sporlanma ve spor pigmentasyonunda lakkaz enzimlerinin rol oynadığı bilinmektedir. Lakkazın üzerinde en fazla çalışılan fonksiyonları ise bitki hücre duvarı için lignin

oluşumundaki etkisi ve odunda üzerindeki beyaz çürüklüğün oluşumundaki lignin polimerizasyonu olmuştur [24].

Lignin, bitkisel hücre duvarlarının yapısal bir bileşenidir. Hidroliz olmayan çeşitli C-C ve C-O bağlarıyla birleşmiş fenil propanoid birimlerinin oluşturduğu kompleks polifenolik biyopolimer, ligninin heterojenik yapısını oluşturmaktadır. Ağaç çürükçülleri arasında yer alan basidomisitlerin yapısında da lignin depolimerizasyonu yapan lakkaz enzimlerine rastlanmaktadır. Bitkilerde yer alan lakkazların genel fonksiyonunun ise lignin sentezi sisteminin bir üyesi olarak belirlenmiştir. Bu fonksiyonel farkın esas sebebi lakkazın lignin üzerindeki aktivitesinin çeşitliliğinden kaynaklanmaktadır. Bu çeşitliliği sağlayan esas faktör ise mediatör olarak adlandırılan lakkazın substrat skalasını ve ilgisini regüle eden bileşenlerin varlığı ve çeşididir. Böylece enzimatik polimerizasyon veya depolimerizasyon gerçekleşmesi mümkün olmaktadır. Lignin parçalanmasının mantar misellerine zararlı etkisi olan reaktifleri ortaya çıkardığı bilinmektedir. Bu nedenle hif yapısı oluşturmak için polimerizasyonu sağlamak amacıyla da lakkaz enzimlerinin kullanıldığı düşünülmektedir [24].

### **1.2.8 Lakkaz Üreticisi Bir Tür: *Pycnoporus sanguineus***

*Pycnoporus sanguineus* Basidiomycetes sınıfına dahil, yavaş büyüme gösteren, dış görünümü kırmızı-turuncu renkleri arasında gözlenen ve beyaz çürükçüllerden (White rot) olan bir mantar türüdür. İlk olarak Guana Adası'nda keşfedilmiştir. Genellikle tropik iklime sahip bölgelerde ölü ağaç gövdelerinde gelişme gösterir. Bitkilere patojenik etkiler göstermektedir. Zararlı, toksik bir mantar türüdür ve yenilemez [74].

*Pycnoporus sanguineus* yapısında bulunan cinnabarin isimli antibiyotik maddenin gram-pozitif ve gram-negatif bakteriler üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Bu nedenle Afrika ve Amerika'da bulunan yerliler tarafından çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir [75]. *P. sanguineus*'un ürettiği invertaz, tirozinaz,  $\alpha$ -amilaz,  $\beta$ -glukosidaz ve lakkaz gibi enzimler endüstriyel açıdan değerli enzimler arasındadır. Beyaz çürükçül mantarlar arasında en çok çalışılan türler *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* gibi organizmalar olsa da *P. sanguineus*'la ilgili lakkaz üretimi çalışmaları da mevcuttur. Uzan ve ekibinin 2010 yılında yaptığı

bir çalışmada 3 farklı *P. sanguineus* suşunun polisiklik boyaların giderimini sağladığı ve fenolik olmayan bileşiklerin parçalanmasında etkili olduğu belirtilmiştir [74]. Lu ve ekibi tarafından 2009 yılında yapılan başka bir çalışmada ise *P. sanguineus* kaynaklı rekombinant lakkaz enziminin azo, trifenilmetan, antrakınon ve indigo boyaların gideriminde oldukça verimli çalıştığı tespit edilmiştir [76].

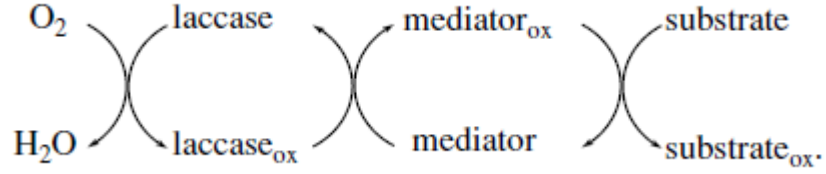
### 1.2.9 Lakkaz-Mediatör Sistem (LMS)

1990 yılında yapılan bir çalışma sonucu 2,2'-azin-bis 3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit (ABTS) diamonyum tuzunun lakkazın substratları arasında bir arabulucu olarak çalıştığı ve substrat genişliğini önemli ölçüde arttırdığı tespit edilmiştir. Böylece lakkaz fonksiyonunun sadece lignin oluşumu veya parçalanması ile sınırlı kalmayıp çok daha geniş uygulamalar için kullanılabilecek kadar geniş olduğu anlaşılmıştır. Yapılan bu çalışmada fenolik olmayan veratril alkol ve 1-(3,4-dimetoksifenil)-2-(2-metoksifenoksi)propan-1,3-diol gibi bileşiklerin lakkaz tarafından okside edildiği gösterilmiştir [38].

ABTS ( $C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$ ), 548,7 g/mol moleküler ağırlığa sahip, suda çözünebilen yeşilimsi renkli bir bileşiktir. Lakkaz da dahil olmak üzere belli bazı enzimlerin reaksiyon kinetiklerini ölçmek için ve ELİSA (bir moleküler teşhis yöntemi) uygulamalarında enzim bağlanmasını kontrol etme amacıyla kullanılmaktadır. ABTS'nin moleküler oksijen ve hidrojen peroksit gibi yapılar için bir elektron donörü olarak davranır ve indirgeme potansiyeli oldukça yüksektir. Yapısında bulunan sülfat grupları deprotonize olduğu zaman dianyon olarak bulunur ve mediatör olarak işlev görür. ABTS'nin maksimum absorbans değeri ise 420 nm dalga boyundaki ışık altındadır [39,40].

İyi bir mediatörün, lakkaz için aynı zamanda uygun bir substrat olması gerekmektedir. Oksitlenmiş ve indirgenmiş formlarının kararlı olması gerekmektedir ve enzimatik aktiviteye olumsuz bir etkisinin bulunmaması gerekmektedir. Lakkaz mediatörleri, düşük moleküler ağırlıklı substratlar olarak düşünülebilir. Bu bileşikler, yüksek potansiyelli kararlı ara ürünler oluştururlar. Bu ara ürünler, reaksiyon sırasında lakkazın tek başına oksitleyemediği bileşiklerin oksitlenmesini sağlayarak enzimatik olmayan oksidasyon sağlarlar. Bu işlem sonunda, ara ürün tekrar indirgenmiş formuna döner ve substratın oksitlenmesi sağlanır. Şekil 1.3 üzerinde

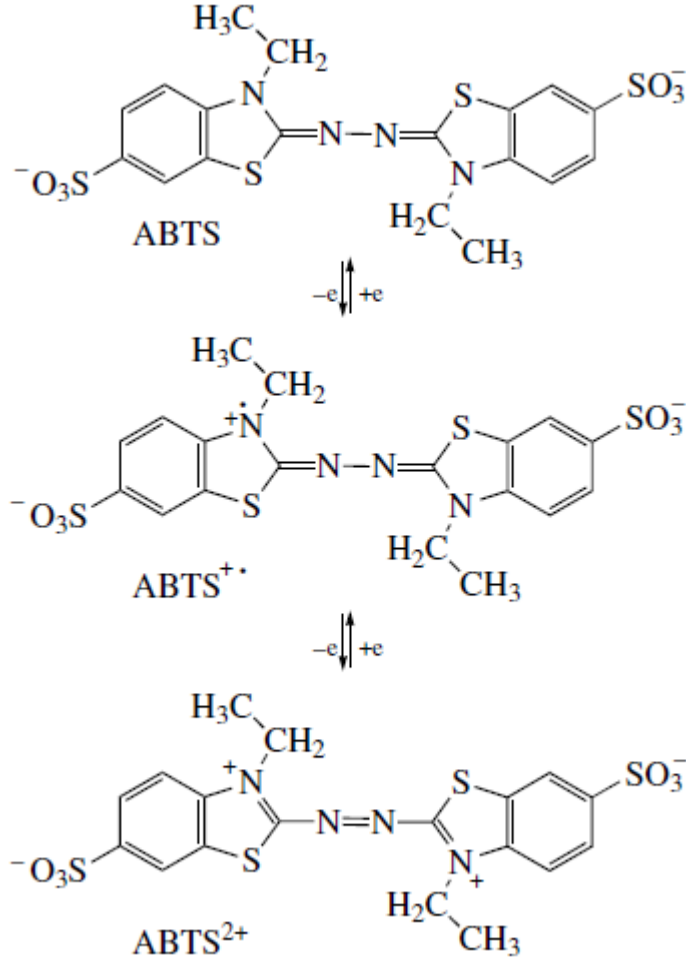
lakkaz-mediatör-substrat arasındaki döngünün şematik gösterimi görülmektedir. İdeal bir lakkaz-mediatör sisteminde, mediatör yan reaksiyonların oluşumuna neden olmadan tekrar tekrar döngüye girebilecek yeterlikte olmaktadır.



**Şekil 1.3:** Lakkaz-mediatör-substrat redoks döngüsü. “ox” olarak adlandırılmış elemanlar, bileşiklerin oksitlenmiş formunu temsil etmektedir [41].

Mediatörlerin sahip olduğu bu özelliklerden dolayı, reaksiyon ortamında nispeten düşük konsantrasyonlarda verimli sonuçlar alınmaktadır. Ancak organik olmayan, sentetik mediatörlerin maliyetlerinin istenilen seviyede olmayışı ve her mediatörün substrat aralığının belirli olması, mediatörlerin endüstriyel uygulamalardaki dezavantajları arasında yer almaktadır [41,42].

ABTS, lakkaz ile en iyi çalışan sentetik redoks mediatörlerinin başında gelmektedir. Fenolik olmayan lignin yapıların parçalanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. ABTS üzerinde yapılan elektrokimyasal çalışmalar, lakkaz-ABTS döngüsünde ABTS'nin oksidasyonunun iki aşamalı olarak gerçekleştiği tespit edilmiştir. İlk aşamada  $ABTS^+ \cdot$  katyonik radikali oluşmaktadır. İkinci aşamada ise  $ABTS^{2+}$  dikatyon yapısı oluşmaktadır. İkinci aşama birinci adıma kıyasla daha yavaş meydana geldiği için yavaş adım, dikatyon oluşumu olarak belirlenmiştir. Ag/AgCl referans elektrodu kullanarak yapılan elektrokimyasal analizlerde birinci adımdaki  $ABTS/ABTS^+ \cdot$  değişimi için redoks potansiyeli 0.472 V, ikinci adımdaki  $ABTS^+ \cdot /ABTS^{2+}$  değişimindeki redoks potansiyeli ise 0.885 V olarak ölçülmüştür. Birinci adım sonucu oluşan  $ABTS^+ \cdot$  yapısı yalnızca lignin fenolik gruplara etki ettiği için fenolik olmayan yapılar üzerindeki aktivitenin gözlenmesi için  $ABTS^{2+}$  yapısının oluşması gerekmektedir. Şekil 1.4'de lakkaz-ABTS sisteminde ABTS'nin iki adımlı oksidasyon döngüsü gösterilmektedir [42].



**Şekil 1.4:** Lakkaz-ABTS sistemindeki iki adımlı ABTS dönüşümü ve oluşan yüksek potansiyelli ara ürünlerin moleküler yapıları [42].

Maliyet probleminin getirdiği yük sebebiyle sentetik lakkaz mediatörlerinin dışında, endüstriyel uygulamalarda kullanılabilen doğal lakkaz mediatörleri üzerine yapılan çalışmalar da mevcuttur. Siringaldehit ve p-kumarik asit gibi doğal lakkaz mediatörlerinin de ABTS gibi lakkazın substrat skalasını arttırdığı tespit edilmiştir [43].

Siringaldehit doğada oldukça yaygın olarak eser miktarda bulunan organik bir bileşiktir. Böceklerin birbiri ile haberleşmede kullandıkları kimyasal iletişim sisteminin bir parçası olduğu bilinmektedir. Kimyasal yapısında bulunan fonksiyonel gruplardan ötürü aromatik, aldehit ve fenol olarak farklı sınıflandırmalara dahil edilmektedir. Suda ve alkolde çözünebilmektedir. Lakkaz enzimi ile doğal mediatör olarak çalışan siringaldehit, hem fenolik hem de fenolik olmayan substratlar üzerinde

lakkazın verimini arttırmaktadır. Luong ve ekibi tarafından 2016'da yapılan bir çalışmada 31 farklı fenolik ve fenolik olmayan eser miktardaki organik kirleticiler üzerinde lakkaz-siringaldehit sisteminin oldukça verimli çalıştığı tespit edilmiştir. Diğer organik mediatörlere kıyasla siringaldehitin daha ucuz olması, sahip olduğu başka avantajdır [44,45].

Lakkaz-mediatör sistemlerinde kullanılan bir diğer organik bileşik ise p-Kumarik asittir. Kumarik asit, sinnamik asidin hidroksi gurubu barından bir türevidir. Hidroksi gurubunun bulunduğu konuma göre p-Kumarik asit, o-Kumarik asit ve m-Kumarik asit olacak şekilde 3 farklı izoformu mevcuttur. Doğada en yaygın bulunan formu ise p-Kumarik asit formudur. p-Kumarik asit, dietil eter ve etanolde çok iyi çözünse de suda da kısmen çözünebilmektedir. Doğada lignin yapısına sahip bitkilerde ve doğal balın yapısında bulunmaktadır. p-Kumarik asit, polisiklik aromatik hidrokarbonların parçalanmasında ve fenolik bileşiklerin parçalanmasında oldukça etkili bir mediatördür. Camarero ve ekibi tarafından 2008 yılında lakkaz mediatör sistemleri üzerine yapılan bir çalışmada, lakkaz ile p-kumarik asit sisteminin polisiklik aromatik hidrokarbonların oksidasyonunda, lignin ve lipidlerin uzaklaştırılmasında oldukça verimli çalıştığı tespit edilmiştir [46,47].

Bu mediatörler dışında kullanılan sentetik ve doğal birçok lakkaz mediatörü mevcuttur. Sentetik olarak 1-hidroksibenzotriazol (HBT), violürik asit (VIO), ve N-hidroksiasetanilit (NHA), doğal olarak da ferülik asit (FA), sinapik asit, hidroksi-sinamik asit gibi yapılar lakkaz mediatörü olarak kullanılan bileşenlere örnektir. Lakkaz-mediatör sistemi içerisinde kullanılacak madde, kullanım amacına, substrat çeşidine ve uygulama alanına göre değişkenlik göstermektedir [46].

### **1.2.10 Endüstriyel uygulamalar**

Oksidasyon reaksiyonları pek çok endüstriyel uygulamada gerekli olan adımlardan biridir. Geleneksel yollarla yapılan oksidasyon işlemleri istenmeyen ürün veya yan reaksiyon oluşumuna sebep olabilmektedir. Bu durum da üretim verimini düşürmekte veya çevresel sorunlara yol açabilmektedir. Bu nedenlerden ötürü çevre dostu ve spesifik çalışabilme özelliğine sahip enzimatik reaksiyonlara dayanan biyoteknolojik yöntemlerin kullanımını günden güne artış göstermektedir. Reaksiyon özgüllüğü, doğal ve çevre dostu oluşu, uygun çalışma koşulları gibi sebepler, fiziksel

ve kimyasal yöntemlerin yerine enzimlerin kullanılmasının ana sebeplerindendir. Lakkaz da sahip olduğu avantajlardan dolayı oldukça çeşitlilik gösteren endüstriyel uygulamalarda kullanılmaktadır. Gıda endüstrisi, kağıt sanayi ve tekstil endüstrisi, lakkazların kullanıldığı ana sektörler olmakla beraber, kozmetik, medikal alanlarda veya çevresel ıslah çalışmalarında da lakkaz enziminin kullanımına rastlamak mümkündür [48].

### **1.2.10.1 Gıda endüstrisi**

Lakkazın gıda endüstrisindeki uygulamalarından birisi meşrubatlardaki renk, koku ve tat gibi özelliklerin istenilen nitelikte olabilmesi için fenolik bileşiklerin parçalanması üzerinedir. Çünkü içeceklerin içerisinde bulunan fenolik bileşikler, içeceğin rengine, tadına ve berraklığına olumsuz olarak etki edebilmektedirler. Bu amaç doğrultusunda kullanılan lakkaz enzimleri genellikle immobilize (sabitlenmiş) formda kullanılmaktadır. Bu sayede hem lakkazın stabilitesi artmakta ve tekrar tekrar kullanıma uygun hale gelmekte hem de gıdanın içerisinde lakkaz kalıntılarının bulunmasının önüne geçilmektedir. Bu sayede gıda katkı maddesi olarak kullanmaya uygun olarak onaylanmamış lakkaz kullanımının önündeki bu engel aşılmıştır. Silika jel, glüteraldehit ve kitosan gibi malzemeler lakkaz immobilizesi için kullanılan materyallerdendir [49].

Hamur ve ekmek üretimi, lakkazın gıda sektöründe kullanıldığı bir başka uygulama alanıdır. Ekmeğin yapısında bulunan glüten yapısı, ekmeğin dokusu, hacmi, ve tadı üzerinde oldukça etkilidir. Hamur üretiminde lakkazın kullanılması, oksitleyici etki ile glüten yapısının sağlamlaşmasında ve ekmeğin istenilen özelliklere sahip olmasında etkili olur. Lakkaz ilavesi ile üretilen hamurun stabilitesi ve yapışkanlığı azalır ve daha rahat işlenebilir hale gelir. Bu sayede ekmeğin tadında, dokusunda iyileşmeler oluşur, hacim artışı gözlenir [48,49].

Lakkaz, fenol ve aromatik amin grupları içeren aromatik bileşiklerin parçalanmasında etkili olduğu için, çeşitli gıda üretim adımlarının ardından atık olarak oluşan bu ürünlerin biyoremediasyonunda da kullanılmaktadır. Şeker pancarı melasının fermentasyonu sonucu oluşan taninlerin parçalanmasında veya sıvı yağ üretimindeki atık fenolik bileşiklerin parçalanmasında lakkaz enziminin oldukça verimli çalıştığı bilinmektedir [48,49].

### **1.2.10.2 Kağıt endüstrisi**

Kağıt üretiminde genel olarak okaliptüs, bambu gibi bitkiler ve tarım atıkları kullanılmaktadır. Bu hammaddeler kağıdın çeşidine ve kalitesine göre değişkenlik göstermektedir. Kağıt üretiminde kullanılan bitkilerin yapısında bulunan lignin ve selüloz yapıları bitkiye direnç ve sağlamlık sağlayan yapılardır. Kağıt üretimi için lignin polimerlerinin uzaklaştırılması ve selülozik yapının kullanılması esastır. Geleneksel üretimde kullanılan kimyasal ve fiziksel adımlar selülozik yapıya zarar vermektedir. Kağıt üretiminde lakkaz kullanımı aromatik ve alifatik C-C bağlarını hedef alarak lignin polimerlerini etkili biçimde parçalamaktadır ve selüloz yapısına da zarar vermemektedir.

Kağıt üretiminin iki temel adımı kağıt hamuru oluşumu ve ağartmadır. Kağıt hamurunun oluşumu için lignin yapının parçalanması gerekmektedir. Bu amaçla beyaz çürükçül mantarların lakkaz enzimi fonksiyonuna benzer şekilde, lakkaz enzimleri odunsu gövdelerdeki lignin yapıları parçalayarak kağıt hamuru oluşumuna olanak sağlamaktadırlar. Ağartma adımında ise geleneksel kimyasal yöntemde klorlama işlemi uygulanmaktadır. Ancak bu yöntem çevresel sorunlara sebep olmaktadır. Lakkaz-mediatör sistemi kullanılarak biyo-ağartma yapılması mümkündür. LMS ile oksidatif reaksiyon gerçekleştirilerek kağıt hamurunda kalan lignin atıkları da parçalanarak boya giderimi sağlanmış olur [50,51].

### **1.2.10.3 Tekstil endüstrisi**

Lakkazın en yaygın kullanıldığı sektörlerden birisi de tekstil endüstrisidir. Tekstil endüstrisinde yaygın olarak endüstriyel boyalar kullanılmaktadır. Lakkaz ise bu boyaaların dönüşümü, parçalanması ve sentezi gibi çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Kimyasal boya giderme yöntemlerinin çevresel riskleri sebebiyle lakkazın tekstil sektöründe kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır [52].

Tekstil endüstrisinde, yıllık olarak milyonlarca tonluk boya, boya öncülü ya da pigment kullanılmaktadır. Bu da her yıl milyar dolarlarca maliyetin tekstil boyaaları için gerekli olduğu anlamına gelmektedir. 19. yüzyılın sonlarına dek tekstil için kullanılan boyalar doğal kaynaklardan elde edilmekteydi. Muavine isimli sentetik boyanın sentezlenmesi ile tekstil endüstrisi dahil pek çok alanda sentetik boyaaların kullanımı yaygınlaştı. Geniş ölçekte üretim kolaylıkları, geniş renk skalası,

yıkanmaya karşı dayanıklılık göstermeleri ve maliyetin daha düşük olması sentetik boyaların kullanımının yaygınlaşmasının altında yatan nedenlerdendir [53]. Ancak sentetik boyaların üretimi sırasında kullanılan güçlü asit ve baz gibi kimyasallar hem çevre üzerinde hem de çalışanların sağlığı üzerinde olumsuz etkiler göstermektedir. Ayrıca sentetik boya üretiminde meydana gelen atıkların giderimi de ayrı bir maliyet ihtiyacı oluşturmaktadır. Bu nedenlerden ötürü 2006 yılında Avrupa Komisyonu tarafından benzer zararlı kimyasalların kullanımına ilişkin kısıtlamalar getirilmiştir. Bundan dolayı tekstil boyalarının üretiminde çevre dostu ve zararsız üretim metotlarına geçiş yapılmaktadır. Bu amaç doğrultusunda enzimatik biyokataliz ile tekstil boyalarının biyosentezi gerçekleştirilmektedir. Lakkaz enzimi, çevre dostu tekstil boyalarının biyosentezi için kullanılan enzimlerden biridir. Boya öncüllerini polimerizasyon reaksiyonu ile polimerleştirerek renkli ürünler açığa çıkartmak için lakkaz enzimlerinden faydalanılmaktadır [54]. Bunun dışında pamuklu tekstil ürünlerinin boyanması amacıyla oksitleyici ajan olarak da lakkaz enziminin kullanımına rastlanmaktadır. Bu uygulamada boya öncülleri lakkaz tarafından katalizlenen reaksiyonlarla pamuk liflerine bağlı yapılar oluşturularak pamuklu ürünlerin renklendirilmesi sağlanmaktadır. Söz konusu reaksiyon çerçevesinde renksiz yapıda olan 2,5-diaminobenzen-sülfonik asit ve 1-hidroksifenol (katekol) bileşikleri lakkaz vasıtasıyla bağlanarak renkli ürünler açığa çıkarmaktadır. Ayrıca indol bileşiği hammadde olarak kullanılarak indigo boyaları bir grup enzim vasıtasıyla sentezlenmektedir. Lakkaz da bu uygulamada kullanılan enzimlerden birisidir [54]. Enzimatik reaksiyonlar kullanılarak yapılan boya sentezinin kimyasallar yöntemlere göre daha uygun koşullar gerektirmesi (pH ihtiyacı gibi), çevre dostu oluşu ve maliyetinin daha düşük olması, enzimatik üretiminin yaygınlaşmasının sebeplerindendir [50].

Tekstil boyalarının üretimi ve kullanımı sırasında yaklaşık %10-15 arası bir miktar atık olarak oluşmaktadır. Bu atık boyalardan özellikle azo boyalar çok az miktarlarda bile suda renkli çözeltiler oluşturabilmektedir ve çevreye, doğaya zararlı toksik ve mutajenik etkiler göstermektedir. Bu atık boyaların doğada bulunan çeşitli bakteriler, mantarlar ve algler tarafından parçalandığı tespit edilmiştir. Bunlar arasından beyaz çürükçül mantarların bu maddeleri parçalamada en verimli olanlar olduğu tespit edilmiştir. Beyaz çürükçül mantarların lignin parçalayıcı özellik gösteren lakkaz enzimlerinin azo boyaların parçalanmasında da etkili olduğu

bilinmektedir [55]. Endüstriyel atık boya ların zararlı etkilerinin giderilmesine yönelik kullanılan LMS ile toksik olan ve suda çözünebi len yapı ların suda çözüne meyecek formlara dönüştürülmesi (fenolik yapı ların aril-oksi radikallerine dönü şümü gibi), homopolimerizasyon veya humik asit gibi toksik olmayan maddelerle kopolimerizasyona uğratılması, bu maddelerin absorpsiyon, filtrasyon veya çökelme gibi yöntemlerle ayrıştırılmasını kolaylaştırarak atık ıslahını sağlamaktadır [50]. Bu yöntemin, geleneksel fizikokimyasal yöntemlere göre daha kolay, ucuz ve çevre dostu oldu ğu için giderek yaygın hale gelece ği öngörülmektedir. Bu kapsamda Hintli bir firma olan Zytex tarafından geliştirilen ve LMS'ye dayanan bir ürün olan Zylite, atık boya ların giderimi için hali hazırda kullanımda olan ürünlere örnek teşkil etmektedir [48].

Tekstil boya larının ağartılması, lakkazın tekstil endüstrisinde kullanım alanlarından bir diğ eridir. Özellikle kot üretiminde kullanılan indigo boya ların biyolojik olarak ağartılması, normalde bu işlem için kullanılan hipoklorit gibi kimyasalların kullanımına önemli bir alternatif oluşturmaktadır. Böylece hem çevre dostu hem de daha kolay bir uygulama ile ağartma işlemi gerçekleştirmek mümkün hale gelmektedir. Bu amaçla, Danimarkalı Novozyme enzim firması, DeniLite® isimli, lakkaz vasıtasıyla biyo-ağartma yapan bir ürün geliştirmiştir [50, 56].

#### **1.2.10.4 Diğ er Uygulamalar**

Çeşitli endüstriyel uygulamalar sonucu oluş an atıklar, atık suyu ile topra ğa karışabilmektedir. Bu atıklar içerisinde yer alan polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) ve zenobiyotikler, doğ al ortama oldukça zararlı olabilmektedir. Lakkazın bu bileşikleri parçalama özelliğ inden dolayı, kirli toprakların ıslahı ve toprak biyoremediasyonu da lakkazın bir diğ er uygulama alanıdır.

Lakkazın medikal ve kozmetik ürünlerin üretiminde kullanımına yönelik çalışmaların yapıldığı bilinmektedir. Lakkazın kataliz mekanizması sonucu oluş an yeni ürünler medikal uygulamalarda kullanılabilir. Örneğ in; iyodidi hammadde olarak kullanan lakkaz, yaygın kullanılan bir dezenfektan olan iyodin üretimini sağlamaktadır. Bunun dışında saç boya larında ve cilt rengi beyazlatıcısı gibi çeşitli kozmetik ürünlere de lakkaz kullanımına rastlamak mümkündür [50,56].

### 1.2.11 Lakkaz ekspresyonu

Doğada prokaryotik olarak bakterilerin ve ökaryotik olarak mantarların, bitkilerin de yer aldığı pek çok organizmada lakkaz enzimi ifadesi gerçekleşmektedir. Korunmuş bölgelerin dışında, enzimin ekspresyonundan sorumlu genlerin boyutları ve üretilen enzimin moleküler ağırlığı türden türe değişkenlik göstermektedir. Çizelge 1.2, lakkaz enzimi üreten bazı organizmaların NCBI (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi) veri tabanındaki lakkaz genlerinin kayıt numaralarını ve ekspresyonunu sağladıkları enzimlerin boyutlarını göstermektedir.

**Çizelge 1.2:** Lakkaz enzimi üreten bazı organizmalar ve bu genlerin NCBI veri tabanındaki kayıt numaraları.

Organizma	Lakkaz Geni Kayıt Numarası	Enzim a.a uzunluğu	Enzim moleküler ağırlığı (kDa)	Kaynak
<i>Trametes versicolor</i>	laccase I U44430	519	67	57
<i>Myceliophthora thermophila</i>	Lcc1, AR023901	623	80	58
<i>Bacillus subtilis</i>	Cot A, U51115	513	65	59
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	FJ513077	518	68	60
<i>Trametes villosa</i>	Lcc1, AY249052	520	63	61
<i>Marasmius quercophilus</i>	Lac1, AF414807	517	62	62
<i>Melanocarpus albomyces</i>	Lac1, AJ571698	623	80	63
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Poxa1b, AJ005017	533	62	64
<i>Coriolus versicolor</i>	CVLG1	526	54	65

Lakkaz ekspresyonunu sağlayan genlerin regülasyonunda rol oynayan çevresel ve hücreler faktörler organizmalar arası değişkenlik göstermekle beraber bir kısmı ortaktır. Kültür yerinin içeriği, besin miktarı, hücrelerin hacmi ve büyüme durumu, lakkaz üretimini etkileyen faktörlerdendir. Mantar türleri arasında metaller, aromatik bileşikler, nitrojen ve karbon kaynakları lakkaz ekspresyonunu etkileyen ortak faktörlerdendir [64]. *T. versicolor*, *C. subvermispora*, *P. ostreatus*, *P. sajor-caju* ve

*Trametes pubescens* gibi organizmalarda bakır varlığı, lakkaz ekspresyonunda oldukça etkilidir. Bunun dışında kadmiyum, gümüş, mangan gibi metaller de ekspresyon seviyesini etkilemektedir. Lakkaz geninin promotor bölgesinde bulunan metal-yanıt elemanları (MYE) metallerin gen ifadesine olan etkisiyle ilişkilidir. Bazı lakkaz geni promotorlarında ise bakır elementleriyle ilişkili gen ifadesini etkileyen elemanlar vardır [64]. Bazı lakkaz üretici türler ise fenolik ve aromatik bileşikler ile lakkaz üretimini indükleyebilmektedirler. *T. Versicolor* , *P. sajor caju* , *P. Ostreatus* gibi türlerde lakkaz geni promotorunda zenobiyotik-yanıt elemanları (ZYE) bulunmaktadır [64]. Nitrojen konsantrasyonunun etkisi lakkaz genlerine göre değişkenlik göstermektedir. *P. sajor caju* türünde lakkazın 4 farklı izoformu bulunmaktadır. Bunlardan ikisinin ekspresyonu artan nitrojen ile artış gösterse de diğer ikisi nitrojen miktarından etkilenmemektedir. Bazı basidomisit türlerinde yüksek glikoz seviyesinin lakkaz üretimini kısıtladığı bilinmektedir. Karbon katabolit baskılayıcı (CreA) bölgenin varlığının lakkaz ifadesindeki kısıtlamaya sebep olduğu bilinmektedir [64].

### **1.2.12 Rekombinant lakkaz üretimi**

Doğal lakkaz üreticilerini endüstriyel lakkaz eldesi için kullanmak lakkaz üretiminin verimsiz olmasına neden olmaktadır. Çünkü yüksek lakkaz içeriğine sahip mantar türlerinde bile geniş ölçekli üretim için yeterli enzim üretilmemektedir. Üretim miktarını arttırmak için genelde zararlı ve toksik indükleyici ajanlar kullanmak gerekmektedir. Bazı lakkaz üretici doğal organizmalar geniş ölçekli üretim için nispeten daha verimli olsa da üretilen enzimin özellikleri (verimli çalışma pH'sı, sıcaklık aralığı stabilitesi gibi) istenilen değerlerde olmamaktadır. Bu nedenlerden ötürü, doğal lakkaz üretici organizmalar kullanarak gerçekleştirilen lakkaz üretimi hem zaman alıcı hem de maliyetli olabilmektedir [66].

Geniş ölçekli enzim-protein üretimindeki bu sorunların üstesinden gelebilmek için rekombinant DNA teknolojisi önemli bir alternatif sunmaktadır. Bu yöntemde, kaynak organizmadan alınan bir gen geniş ölçekli üretim için elverişli olan başka bir organizmaya klonlanmaktadır. Böylece endüstriyel üretime daha uygun olan hedef organizmalarda istenilen ürünün daha verimli üretimi mümkün hale gelmektedir. Bu şekilde üretilen ürünlere ise rekombinant enzim denilmektedir. Ürün hedef organizmada üretildikten sonra ayırma ve saflaştırma adımları uygulanarak enzim

eldesi gerçekleştirilmiş olur. Enzimin hücre dışına sentezlenmesi ise hücrelerin parçalanması işlemine gerek kalmayacağı için bu adımları daha da kolaylaştıracaktır [67].

Rekombinant enzim üretilmesi için gerekli heterolog ekspresyonun gerçekleştirileceği hedef organizmanın seçimi oldukça önemlidir. Endüstriyel üretimde, kontrol edilebilir olmaları ve uygun çevresel şartlarda kolayca büyümeleri sebebiyle mikroorganizmalar yaygın olarak kullanılmaktadır. Bakteriler, üretimi hedeflenen ürünün heterolog ekspresyonu için kolay ve hızlı bir üretici olsa da ökaryotik proteinlerin üretimi için pek uygun olmamaktadır. Ökaryotik organizmalarda bulunan ve proteinlerin post-translasyonel modifikasyonlarından ve katlanmalarından sorumlu olan endoplazmik retikulum (ER), golgi aygıtı ve protein paketleme-taşıma sisteminin prokaryotlarda olmaması, spesifik katlanma ve modifikasyonlar gerektiren proteinlerin üretimi için büyük bir dezavantaj oluşturmaktadır. Bu sorunların üstesinden gelebilmek için ökaryotik proteinlerin heterolog ekspresyonu için mayaların kullanımı ön plana çıkmaktadır. Ökaryotik mayalarda bulunan hücre dışı protein salgılanması için gerekli sinyal sekanslar, O- ve N- bağlı glikozilasyon mekanizmaları, disülfid bağların oluşumu, fosforilasyon, açılasyon, metilasyon gibi translasyon sonrası modifikasyonların var oluşu, üretimi hedeflenen proteinin spesifik özelliklere sahip olması için mayaları ideal konakçı organizma konumuna getirmiştir. *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* ve *Yarrowia lipolytica* gibi mayalar, endüstriyel üretimde yaygın olarak kullanılan türlerdendir [67,68].

### **1.3 *Pichia pastoris***

*Pichia pastoris* tek karbonlu metan, metanol gibi bileşikleri karbon kaynağı olarak kullanabilen metotrofik bir tek hücreli maya türüdür. *P. pastoris* endüstriyel uygulamalarda ve akademik araştırmalarda oldukça yaygın kullanılan bir organizmadır. *P. pastoris*'in kolay ve verimli büyüme özelliği ve düşük maliyetlerdeki kültür ortamı ihtiyacı, bu organizmayı oldukça kullanışlı hale getirmiştir. Metanol ile indüklenebilen promotorlar içeren iki alkol oksidaz (Aox1 and Aox2) genine sahiptir. Bu genler, metanolün karbon kaynağı olarak kullanılmasına olanak sağlarlar. Bu nedenle ekspresyonu istenen proteinler genellikle metanol ile indüklenebilen Aox promotorları ile kontrol edilirler [69]. Bunun dışında

üretimi gerçekleştirilecek proteinler hücre dışına salgılsın diye sinyal sekansına sahip olmalıdırlar. Bu amaç doğrultusunda ekmek mayası olarak da bilinen *Saccharomyces cerevisiae*  $\alpha$ -mating (çiftleşme) sekansı kullanılmaktadır. Bu özelliklere sahip plazmitler (metanol indüklenmesi ve hücre dışı üretim gibi), ticari olarak pazarda mevcuttur (pPICZa, pPICZb gibi) [70].

*P. pastoris* sahip olduğu bazı avantajlardan ötürü bakteriyal ekspresyon sistemlerine göre ve diğer mayalara göre ön plana çıkmaktadır. Öncelikle moleküler biyolojide model organizmalardan biri olan *Saccharomyces cerevisiae* ile oldukça benzer metabolik özelliklere sahip olması, uzun yıllardır üzerinde çok çalışılan bu model organizma sayesinde *P. Pastoris*'in de pek çok özelliğinin daha kolay bilinmesine ve anlaşılmasına neden olmuştur [71]. Bunun dışında, hücre içi post-translasyonel modifikasyonların varlığı, üretilen proteinin aktivitesinin ve spesifik özelliklerinin yüksek oranda doğru ve istenilen seviyelerde olmasını sağlamaktadır. Verimli büyüme kapasitesine ve hacim başına yüksek titreye sahip protein üretimine sahiptir. Büyüme koşulları ve kültür içindeki besin ihtiyaçları iyi bilinmektedir. Hücre dışına ürün üretebilme yeteneği, ürünün saflaştırma maliyetinin ve adımlarının azalmasına olanak vermektedir. Küçük ölçekli üretimden büyük ölçekli üretime kadar oldukça geniş bir skalada verimli olarak üretim yapabilmektedir. Özelleştirilmiş ve üzerinde tasarımlar yapılmış suşları mevcuttur, bu sayede amaca yönelik spesifik kullanımları mümkün olmaktadır. ABD'de bulunan FDA (gıda-ilaç yönetmeliği) tarafından güvenli kabul edilen (GRAS-generally recognized as safe) bir mikroorganizmadır [72,73].

#### **1.4 Çalışmanın Amacı**

Enzim teknolojisi endüstriyel alanda giderek yaygınlaşan ve geleneksel fizikokimyasal metotların yerini almaya başlayan bir teknolojidir. Enzimlerin spesifik olarak çalışması, tekrar kullanılabilirliği, çevre dostu ve sağlık açısından zararsız olmaları, maliyet ve teçhizat ihtiyacını azaltmaları gibi özelliklerden dolayı gıda, deterjan, kiyasal madde sentezi, tekstil, deri ve kozmetik gibi pek çok sektörde oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Lakkaz enzimi de çeşitli endüstriyel uygulamalarda başarı ile kullanılabilen enzimlere verilebilecek bir örnek teşkil etmektedir.

Yapılan bu çalışmada rekombiant olarak üretilen *S. sanguineus* kaynaklı bir lakkaz enziminin çeşitli tekstil boyaları üzerindeki renk giderme performansının tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda doğal bir lakkaz üreticisi olan beyaz çürükçül mantar grubunun bir üyesi olan *Pycnoporus sanguineus* organizmasından izole edilen lakkaz kodlayan *PsLcc2* geni ökaryotik protein üretiminde geniş çaplı üretim için oldukça kullanışlı ve GRAS bir tür olan *Pichia pastoris*'de ifade edilmiş ve elde edilen rekombinant PsLcc2 enzimi kullanılarak tekstil boyası olarak yaygınca kullanılan yedi farklı boya üzerinde renk giderme (dekolorizasyon) çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Dekolorizasyon çalışmasının ardından bu renk giderimi sonucunda mutajenik bir ara ürün oluşma ihtimali, Ames testi uygulanarak araştırılmıştır.



## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1 Materyal

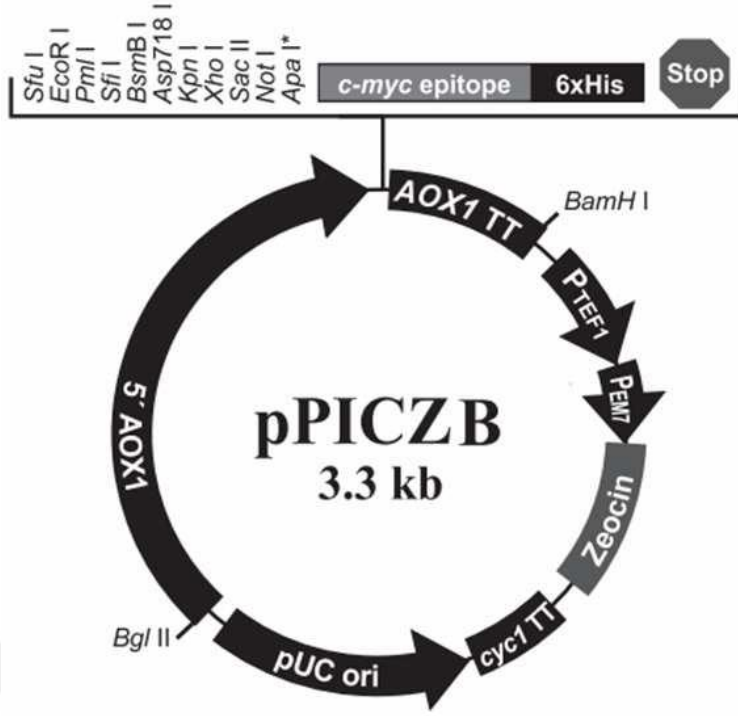
Çalışma sırasında kullanılan materyal ve malzemeler aşağıda listelenmiştir.

#### 2.1.1 Kullanılan Suşlar ve Plazmitler

Metotrofik bir maya türü olan *Pichia pastoris*'in doğal bir suşu olan X33 suşu, yapılan bu çalışmada lakkaz üretici konakçı organizma olarak kullanılmıştır, Invitrogen'den temin edilmiştir. Bu organizma YPD besiyerinde 28-30 C<sup>0</sup>arasındaki bir sıcaklıkta büyümeye elverişlidir ve büyük ölçekli üretim için uygundur.

AMES testi kapsamında kullanılmak üzere ATCC 29631 (TA 1538) olarak kodlanmış *Salmonella typhimurium* suşları kullanılmıştır. Bu hücreler Yeditepe Üniversitesi, Genetik ve Biyomühendislik Fakültesi'nden temin edilmiştir. TA 1538 suşu his D3052 ve rfa mutasyonlarına sahiptir. Yani histidin üretiminden sorumlu gen üzerinde bir bazlık delesyon ile oluşan çerçeve kayması sonucu histidin üretebilme özelliğini yitirmiştir ve lipopolisakkarit üretimi ile ilgili olan rfa mutasyonu ise hücrenin geçirgenliğinin artmasına sebep olmuştur. Bu bakteriler LB besiyerinde ve 37 C<sup>0</sup> sıcaklıkta büyümeye elverişlidir.

*P. pastoris*'de rekombinant lakkaz enzimi üretimi için grubumuzda Günseli Kurt Gür'ün doktora çalışması kapsamında oluşturulmuş (2010), *Pycnoporus sanguineus* MUCL 38531 suşuna ait lakkaz enzimi kodlayan *Psicc2*genini içeren pPICZ B ekspresyon vektörü kullanılmıştır. Invitrogen'den temin edilen bu plazmit içerisinde, pozitif varyantların seçilimi için Zeocin™ antibiyotik direnç geni mevcuttur. Zeocin *Streptomyces*'den izole edilen ve bakteri, mantar, maya, bitki ve memeli hücrelerinde hücre ölümüne yol açan bir antibiyotiktir. Vektörde bulunan *Aox1* promotörü sayesinde de metanol indüklemesi yapılabilmektedir. Vektörün uzunluğu 3328 bp'dir. Şekil 2.1 üzerinde pPICZ B vektörünün yapısı ve genetik parçaları görülmektedir.



**Şekil 2.1:** pPICZ B vektörünün fonksiyonel elemanlarını içeren genetik haritası [93]

### 2.1.2 Besiyerleri

Çalışmada kullanılan besiyeri içerikleri ve hazırlanışı Ek 1’de (E.1) belirtilmiştir.

### 2.1.3 Tampon çözeltiler ve solüsyonlar

Çalışmada kullanılan tampon çözelti ve solüsyon içerikleri ve hazırlanışı Ek 2’de (E.2) belirtilmiştir.

### 2.1.4 Kimyasallar ve enzimler

Çalışmada kullanılan kimyasallar ve temin edildikleri kaynaklar Ek 3’de (E.3) belirtilmiştir.

### 2.1.5 Laboratuvar ekipmanları

Çalışmada esnasında kullanılan laboratuvar ekipmanları Ek 4’de (E.4) belirtilmiştir.

## 2.2 Metot

Yapılan çalışmada genel olarak, sırasıyla; *P. sanguineus Pslcc2* lakkaz geni içeren pPICZ B ekspresyon vektörünün *P. pastoris*'e transformasyonu, en iyi lakkaz üretici koloninin seçilmesi ve uygun kültür koşullarında büyütülerek enzimin eldesi, enzimlerin yedi farklı boya üzerindeki renk giderimi özelliklerinin belirlenmesi ve son olarak Ames Testi ile boya giderimi reaksiyonu sonunda mutajenik aktivite analizleri gerçekleştirilmiştir.

### 2.2.1 pPICZ B ekspresyon vektörünün *P. pastoris*'e transformasyonu

*Pycnoporus sanguineus* MUCL 38531 suşundan izole edilmiş lakkaz *Pslcc2* geni içeren pPICZ B ekspresyon vektörü *P. pastoris*'e transforme edilmeden önce *PmeI* endonükleaz enzimi ile 5' AOX1 bölgesinden kesilerek lineer hale getirilmiştir. Böylece konakçı genomunda 5' AOX1 bölgesinden entegre olması sağlanmıştır. Ardından lineer vektör, "EasyComp™ Transformation Kit (Invitrogen)" isimli üründeki transformasyon protokolüne göre kompetent hale getirilmiş *P. pastoris* X33 hücrelerine aktarılmıştır.

Kompetan *Pichia pastoris* X-33 hücrelerini hazırlanması için, öncelikle hücreler 30 C<sup>0</sup> sıcaklıkta bir gece YPD besiyerinde 250 rpm çalkalamalı şekilde inkübasyona bırakılmıştır. Hücre yoğunluğu OD<sub>600</sub>'de 1'e yakın bir değere ulaştığı zaman oda sıcaklığında 5000 g 5 dk santrifüj ile hücreler çöktürülmüştür. Hücreleri barındıran pellet, 10 mL Solüsyon 1 isimli (etilen glikol, DMSO ve sorbitol içeren kompetan hücre hazırlanması için özel geliştirilmiş çözelti) çözelti ile karıştırılarak homojen dağılması sağlanmıştır. Ardından yine oda sıcaklığında, 5000 g ve 5 dk santrifüj yapılmıştır. Oluşan pellet 1 mL Solüsyon 1 içerisinde karıştırılmış ve kompetent hücreler elde edilmiştir. Ardından 5 µL'lik kompetent hücre solüsyonları, 1,5 mL steril tüplere dağıtılmış ve -80 C<sup>0</sup> de saklanmıştır.

Transformasyon esnasında, transformasyon için hazırlanmış Solüsyon 2 (PEG içeren bir solüsyon) ve Solüsyon 3 (yıkama adımları ve plate için için tuz içeren bir çözelti) kullanılmıştır. Öncelikle bir tüp kompetent hücre içerisine 3 µg lineer hale getirilen vektör eklenmiştir. Vektör/hücre karışımı 1 mL Solüsyon 2 ile vorteks yapılarak karıştırılmıştır. Oluşan solüsyon, transformasyon için 1 saat 30 C<sup>0</sup> de çalkalamalı karıştırıcıda inkübasyona bırakılmıştır. Her 15 dakikada çözelti vorteks edilerek

kariştirilmiş ve homojen kalması sağlanmıştır. Ardından tüp 42 C<sup>0</sup> de 10 dk inkübe edilerek ısı şoku oluşması sağlanmıştır. Bu aşamadan sonra tüpteki solüsyon 2 farklı mikrosantrifüj tüpüne dağıtılmış ve her birinin üstüne 1 mL YPD besiyeri eklenmiştir. Tekrar 1 saat 30 C<sup>0</sup> de inkübasyona bırakılarak, Zeocine direnç geninin ekspresyonu için zaman verilmiştir. Daha sonra, hücreler oda sıcaklığında 3000 g ve 5 dk santrifüjle ktrlmştir. 0,5 mL Solüsyon 3, tüpteki solüsyonlara eklenmiş, ardından iki tüpteki solüsyon tek bir tüpte birleştirilmiş ve oda sıcaklığında 3000 g ve 5 dk santrifüj yapılmıştır. Sonra kmş olan hücreler 100-150 µl Solüsyon 3 ile tekrar kariştirilmiştir. Elde edilen solüsyon 100 µg/mL zeocine içeren YPDS besiyeri bulunduran petri kabı üzerine yayılmıştır. Transforme olan hücreleri barındıran bu petri kabı, 4 gün 30 C<sup>0</sup> de inkübasyona bırakılmıştır.

Bu aşamada oluşan her bir koloni 0.2 mM ABTS (lakkaz substratı olarak kullanıldı) içeren minimal metanol besiyeri içeren petri kabı üzerinde 3 gün 30 C<sup>0</sup> de inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonucunda, ABTS nin oksidasyonu ile yeşil-mavi bir renk oluşumuna sebep olan lakkaz üreten koloniler belirlenmiştir.

### **2.2.2 Transformant kolonilerin ürettiği lakkazların aktivitelerinin belirlenmesi**

Transformant koloniler arasından en iyi lakkaz üretici koloniyi belirlemek için bütün koloniler için bir seçilim yapılmıştır. Bu amaç doğrultusunda her koloni %1 metanol içeren 5 mL minimal metanol besiyeri içerisinde 28 C<sup>0</sup> de ve 250 rpm çalkalamalı şekilde 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. Metanolün buharlaşması sebebiyle her gün metanol ilavesi yapılmıştır. Inkübasyon sonunda 10000 g ve 15 dakika santrifüj yapılmışve hücrelerin çökmesi sağlanmıştır. Böylece hücre dışına salgılanan lakkaz enzimlerini içeren süpernatant elde edilmiştir.

Bu işlemin ardından her koloniden elde edilen süpernatant için lakkaz aktivite analizi gerçekleştirilmiştir. Bu amaç için Shimadzu UV cihazı kullanılarak sepktofotometrik ölçüm yapılarak lakkazın aktivitesi belirlenmiştir. 1200 µL reaksiyon hacminde gerçekleştirilen analizde, substrat olarak 2.5 mM konsantrasyonunda ABTS kullanılmıştır. Tampon zelti olarak pH 3.0 lk sitrat çözeltisi kullanılmış ve 420 nm dalga boyunda ölçümler gerçekleştirilmiştir. 1 birimlik lakkaz aktivitesi dakikada 1.0 µmol ABTS oksidasyonuna göre tespit edilmiştir. Bu işlem için litredeki aktiviyeyi belirlemek amacıyla aşağıda verilen denklem 2.1 kullanılmıştır.

$$\frac{U}{L} = [ \left( \frac{A}{t} \right) / \epsilon \cdot d ] \cdot (1 \times 10^6 \mu\text{mol/mol}) \cdot \left( \frac{V}{v} \right) \quad (2.1)$$

Denklemden belirtilen,  $A=420$  nm dalga boyundaki absorbans değışimi,  $\epsilon$ =substratın sönümlenme katsayısını,  $d$ =ışığın cm cinsinden aldığı yol,  $V$ =toplam reaksiyon hacmi,  $v$ =reaksiyondaki örnek(enzim) hacmini temsil etmektedir. Bu eşitlik sonucunda enzimin litredeki aktivitesi belirlenmektedir.

Bu analize göre en yüksek enzim aktivitesini gösteren koloni seçilmiş ve YPD besiyerinde inkübe edilerek çoğaltıldıktan sonra ileriki çalışmaların yapılması için  $80\text{ C}^0$  de stoklanmıştır.

### 2.2.3 Rekombinant lakkaz PsLcc2 enziminin üretilmesi

PsLcc2 üretimi konusunda en verimli *P.pastoris* kolonisi seçildikten sonra, PsLcc2 kullanılarak boya giderme işlemlerinin gerçekleştirilmesi için daha büyük ölçekli lakkaz üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda ilk olarak, hücreler 250 mL hacimli flask içerisinde 25 mL BMGY besiyerinde bir gece  $28\text{ C}^0$  de 250 rpm çalkalamalı şekilde inkübasyona bırakılmıştır. Hücre yoğunluğu yaklaşık olarak  $OD_{600} = 6.0$  seviyesine ulaştığı zaman önceden hazırlanmış 10 adet 100 mL BMMY besiyeri içeren 500 mL hacimli flasklar içerisine her flaskta  $OD_{600} 1.0$  yoğunlukta hücre olacak şekilde hücreler transfer edilmiştir. Ardından 8 gün boyunca  $28\text{ C}^0$  de ve 250 rpm çalkalamalı olarak hücreler inkübasyona bırakılmıştır. Her 24 saatte 1 mL metanol ilavesi yapılarak, buharlaşma sonucu uçan metanolün yerine metanol takviyesi yapılmıştır.

### 2.2.4 Üretilen Rekombinant lakkaz PsLcc2'nin toplanması

*PsLcc2* ekspresyonu sonunda üretilen lakkazın yüksek konsantrasyonda elde edilmesi için amonyum-sülfat çöktürmesi ve ultrafiltrasyon adımları uygulanmıştır. Bu amaç doğrultusunda ilk olarak lakkaz üretimi gerçekleştirilen flasklardaki solüsyonlar 15 dk boyunca 10000 g altında santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda hücreler çökerek pellet oluşturmuş ve enzim içeren süpernatant, amonyum sülfat çöktürmesi yapılması için toplanmıştır.

Amonyum sülfat tuzu süpernatant karıştırılırken azar azar eklenmiş ve her ekleme sonunda çözelti homojen hale gelene kadar beklenmiştir. %90 doygunlukta amonyum sülfat çözeltisi oluşturulduktan sonra 15 dk boyunca 10000 g altında santrifüj yapılarak çöktürülen PsLcc2 pellet halinde toplanmıştır. Ultrafiltrasyon

işlemeden önce lakkazın aktivite kaybına uğramaması için PsLcc2 enzimini içeren pelletler  $-80\text{ C}^0$  de saklanmıştır.

Ultrafiltrasyon işlemi boya giderme analizleri gerçekleştirilmeden önce uygulanmıştır. Böylece enzimlerin  $-80\text{ C}^0$  de aktiviteleri azalmadan saklanması sağlanmıştır. Ultrafiltrasyon için, boya giderme analizlerinin de yapıldığı pH değeri olan pH 4.0 değerine sahip sitrat tampon çözeltisi kullanılmıştır. Pellet halinde bulunan enzimler buz üzerinde,  $4\text{ C}^0$  5 mL sitrat çözeltisi kullanılarak çözülmüştür. Ardından ultrasantrifüj tüplerine aktarılan enzim içeren solüsyon 5000 g altında 15 dk santrifüj edilmiştir. Bu işlem sonunda filtreden geçen atık sıvı uzaklaştırılarak toplam hacim yine 5 mL olacak şekilde sitrat çözeltisi eklenmiş ve tekrar santrifüj işlemi uygulanmıştır. Toplamda 4 kere santrifüj sonunda ultrafiltrasyon işlemi tamamlanmıştır. Elde edilen solüsyon, boya giderme analizlerinde kullanılmak üzere  $4\text{ C}^0$  veya  $-20\text{ C}^0$  de saklanmıştır.

### **2.2.5 Renk giderme analizleri**

Ultrafiltrasyon işlemi sonunda elde edilen PsLcc2 ile yedi farklı boya üzerinde (asit siyah, reaktif siyah, malaşit yeşili, kristal viyole, Birmarck Kahverengi, Kongo Kırmızısı ve Bazik Fuksin) boya giderme analizleri yapılmıştır. Kullanılan boyaların literatürdeki diğer isimleri, kod numaraları ve boya solüsyonlarının hazırlanışı Ek E.2'de belirtilmiştir.

Boya renk giderme (dekolorizasyon) analizlerinde standart protokolde reaksiyon ortamında  $50\text{ }\mu\text{M}$  boya,  $100\text{ }\mu\text{M}$  mediatör,  $0.1\text{ U/mL}$  aktiviteye sahip PsLcc2 miktarı bulunmaktadır. Reaksiyon,  $0.1\text{ M}$ , pH 4.0 sitrat tampon çözeltisi içerisinde  $30\text{ C}^0$  de ve  $150\text{ rpm}$  çalkalamalı olarak gerçekleşmiştir. Her reaksiyon ortamı için iki farklı solüsyon hazırlanmış ve duplike olarak çalışılmıştır. İki örnekten alınan sonuçlara göre standart sapmalar hesaplanmıştır. Ayrıca boyanın kendi davranışı incelemek için negatif kontrol (enzim içermeyen solüsyon) ve reaksiyon sonucunun standardizasyonu için de blank (boya içermeyen solüsyon) hazırlanmıştır. Çizelge 2.1'de standart dekolorizasyon protokolündeki her reaksiyon ortamının içeriği belirtilmiştir.

**Çizelge 2.1:** Dekolorizasyon analizlerinde hazırlanan 3 farklı reaksiyon ortamının içerikleri.

	<b>Örnek</b>	<b>Negatif Kontrol</b>	<b>Blank</b>
Mediatör	100µM	100µM	100µM
Enzim	0.1 U/ml	-	0.1 U/ml
Tampon Çözelti	100mM	100mM	100mM
Boya	50 µM	50 µM	-
Toplam Hacim	2mL	2mL	2mL

Reaksiyon ortamındaki değişim spektrofotometrik olarak Bio-rad Benchmark Microplate Reader cihazı kullanılarak, her boya için boyanın maksimum absorbans verdiği dalga boyunda ölçülmüştür. Çizelge 2.2’de her boya için maksimum absorbans değerini veren dalga boyları belirtilmiştir.

**Çizelge 2.2:** Boya çeşitlerine göre maksimum absorbans değerlerinin ölçüldüğü dalga boyları.

<b>Boya Çeşidi</b>	<b>Ölçüm Yapılan Dalga Boyu (λ)</b>
Asit Siyah	570 nm
Reaktif Siyah	595 nm
Malaşit Yeşili	615 nm
Kristal Viyole	590 nm
Bismarck Kahverengi	457 nm
Bazik Fuksin	542 nm
Kongo Kırmızısı	497 nm

Bütün boyalar üzerinde dekolorizasyon çalışması yapılmadan önce en uygun reaksiyon hacminin belirlenmesi için malaşit yeşili, örnek boya olarak kullanılarak 100 µL, 2 mL, 4 mL ve 10 mL reaksiyon hacimlerinde dekolorizasyon çalışması yapılmıştır. Sonuçların birbiri ile tutarlı olduğu tespit edildikten sonra diğer çalışmalarda reaksiyonlar 2 mL hacimde 12 kuyucuklu mikropate kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Her boya için 3 farklı mediatör kullanılmıştır. Sentetik mediatör olarak ABTS, doğal mediatörler olarak sringaldehit ve kumarik asit kullanılmıştır. Ayrıca mediatör kullanılmadan sadece enzim kullanılarak da boya giderme analizleri gerçekleştirilmiştir.

Kongo kırmızısı hariç bütün reaksiyonlar pH=4.0 tampon kullanılarak yapılmıştır. Kongo kırmızısı için pH=6.0 tampon çözeltisi kullanılmıştır. Reaksiyonlar başladıktan sonra ilk ölçüm 15. dakikada alınmış, daha sonra 5 saat boyunca saat başı ölçüm alınmıştır. 5 saat sonrasında 24. saat ve 48. saat ölçümleri alınmıştır.

Standart protokol dışında iki boya belirlenerek (malaşit yeşili ve reaktif siyah), farklı boya konsantrasyonunda ve farklı enzim konsantrasyonunda da analizler gerçekleştirilmiştir. Boya konsantrasyonu olarak 50 µM'a ek olarak 25 µM ve 100 µM kullanılmıştır. Enzim miktarı ise 0.2 U/mL aktiviteye denk gelecek miktarda kullanılmıştır. Böylece standart protokoldeki boya miktarının yarısı ve iki katı ile, enzim miktarının 2 katı da kullanılarak dekolorizasyon analizleri gerçekleştirilmiştir.

Yapılan spektrofotometrik ölçümler sonucunda, reaksiyon ortamındaki değerlerden blank solüsyonlarında ölçülen değerler çıkartıldı ve enzim ile mediatör arasında oluşan absorbans değişimleri ihmal edilerek analiz sonuçları normalize edilmiştir. Bu değerler kullanılarak aşağıda belirtilen denklem 2.2 ile dekolorizasyon yüzdeleri hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Dekolorizasyon} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (2.2)$$

Denklemden belirtilen  $A_0$  maksimum dalga boyundaki başlangıçtaki (reaksiyona enzim eklendikten hemen sonraki ölçüm) ölçüm sonucu okunan değer,  $A_1$  ise  $t$  anında yapılan ölçüm sonucu okunan değerdir.

### 2.2.6 Ames testi

Dekolorizasyon çalışması sonucunda mutajenik ara ürün oluşma ihtimalini test etmek amacıyla Ames/*Salmonella* mikrozom test sistemi kullanılmıştır. Bu testte ATCC 29631 (TA 1538) mutant hücre hattı kullanılmıştır.

**Histidin Gereksinimi:** İlk olarak, mutant hücreler histidin oksotropu oldukları için bu mutasyonu koruyup koruyamadıklarını belirlemek amacıyla histidinli ve histidinsiz ortamlarda hücrelerin büyümleri gözlenmiştir. Öncelikle, hücreler Nutrient agar üzerinde büyütüldükten sonra Nutrient broth içerisinde gece boyunca büyümeye

bırakılmış ve OD<sub>600</sub> 1.0 değeri elde edilince HBA (histidine biyotin agar) ve histidin içermeyen ama biyotin içeren minimal glukoz agar üzerine öze yarımıyla ekim yapılmıştır. Hücreler 37 C<sup>0</sup> de 48 saat boyunca büyümeye bırakılmış ve sonuçlar incelenmiştir.

**rfa mutasyonun kontrolü:** Mutant hücrelerin hücre duvarındaki geçirgenliğin var olduğunun tespit edilebilmesi için rfa mutasyonu kontrol edilmiştir. Bu amaç için 1 mg/mL yoğunluktaki kristal viyole solüsyonu emdirilmiş Whatman diskler, histidine ve biyotinli besiyeri içeren petri kabına yerleştirilmiştir. Hücreler 37 C<sup>0</sup> de 48 saat boyunca büyümeye bırakılmış ve disklerin etrafında hücrelerin büyümediği bir inhibisyon zonunun oluşumu incelenmiştir.

Yapılacak test için gerekli olan bu iki mutasyonun korunduğu incelendikten sonra dekolorizasyon analizleri sonuçlarından elde edilen solüsyonlar üzerinde çalışmalara geçilmiştir. Bu amaçla hücreler 37 C<sup>0</sup> de Nutrient broth içerisinde gecelik kültüre bırakılmıştır. OD<sub>600</sub> 1.0 değerindeki yoğunluğa erişen hücreler kullanılmıştır. Çalışmada MGA besiyeri alt agar olarak kullanıldı. Hücrelerin petri üzerinde düzgün ve homojen dağılması amacıyla üst agar (top agar) kullanılmıştır. Isıtılarak eritilen üst agar, 50 C<sup>0</sup> su banyosunda tutularak uygulamadan önce donması engellenmiştir. Gecelik hücre kültüründen 100 µL hücre ile üst agarla 1/10 oranında karışım oluşturacak miktardaki histidin/biyotin solüsyonu (HB solüsyonu), 50C<sup>0</sup> deki üst agar ile karıştırılmıştır (toplam üst agar hacmi 3 mL olarak ayarlandı). Karışım vorteks ile homojen hale getirilmiş ve seri şekilde MGA plaklarının üzerine dökülmüştür. Sekiz şeklinde petri kabı çalkalanarak üst agarın homojen dağılması sağlandı.

MGA plakları üzerine dökülen, hücreleri de içeren üst agar kuruduktan sonra steril hale getirilmiş Whatman disklerine 25 µL lik örnekler emdirilmiştir. Negatif kontrol olarak su kullanılırken, pozitif mutajen madde olarak TA 1538 suşu için 4-Nitro-o-Fenilendiamine (NPD) çözeltisi kullanılmıştır. Petriler 37 C<sup>0</sup> de 48 saat boyunca büyümeye bırakılmıştır.

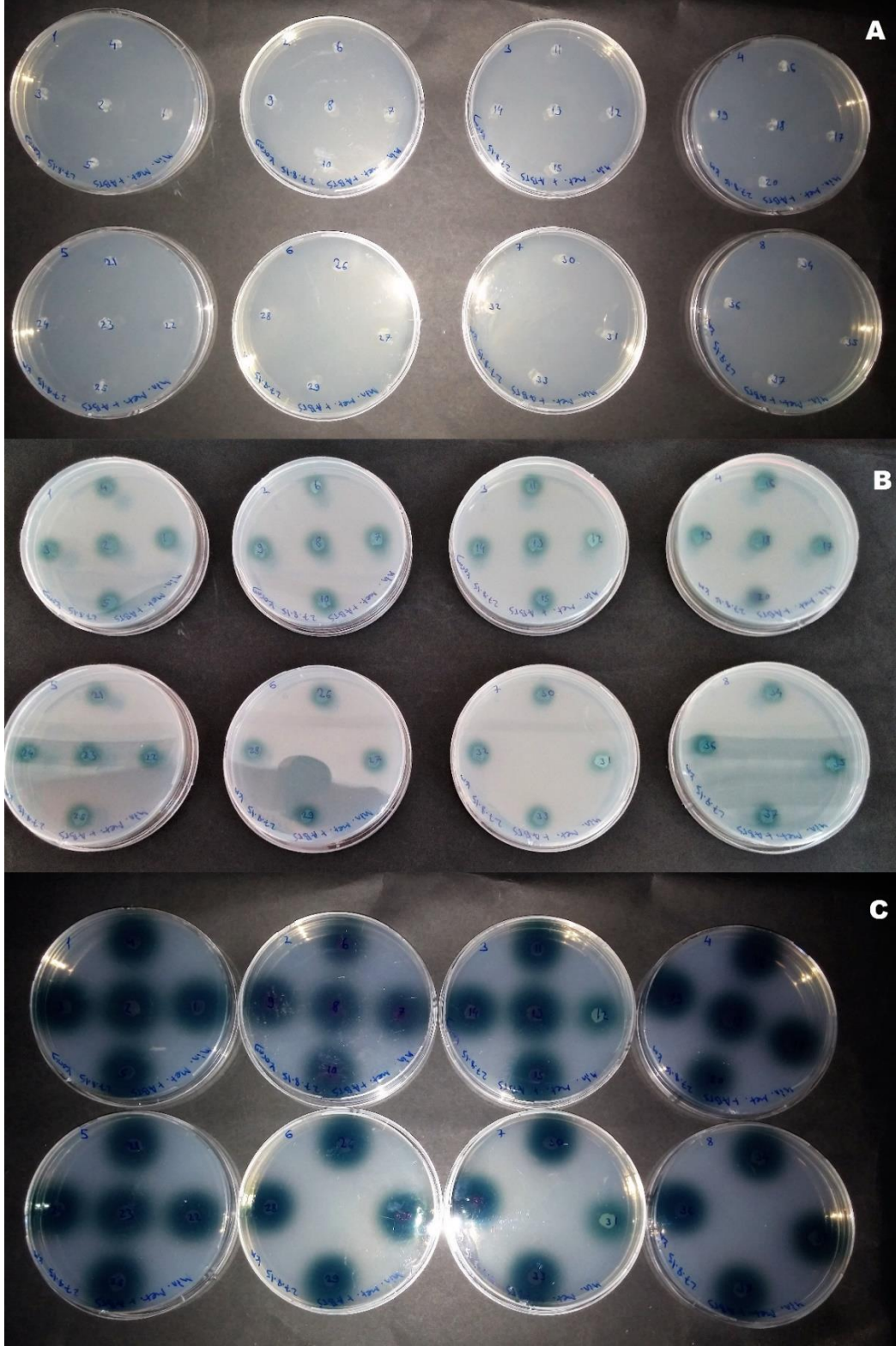


### 3. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

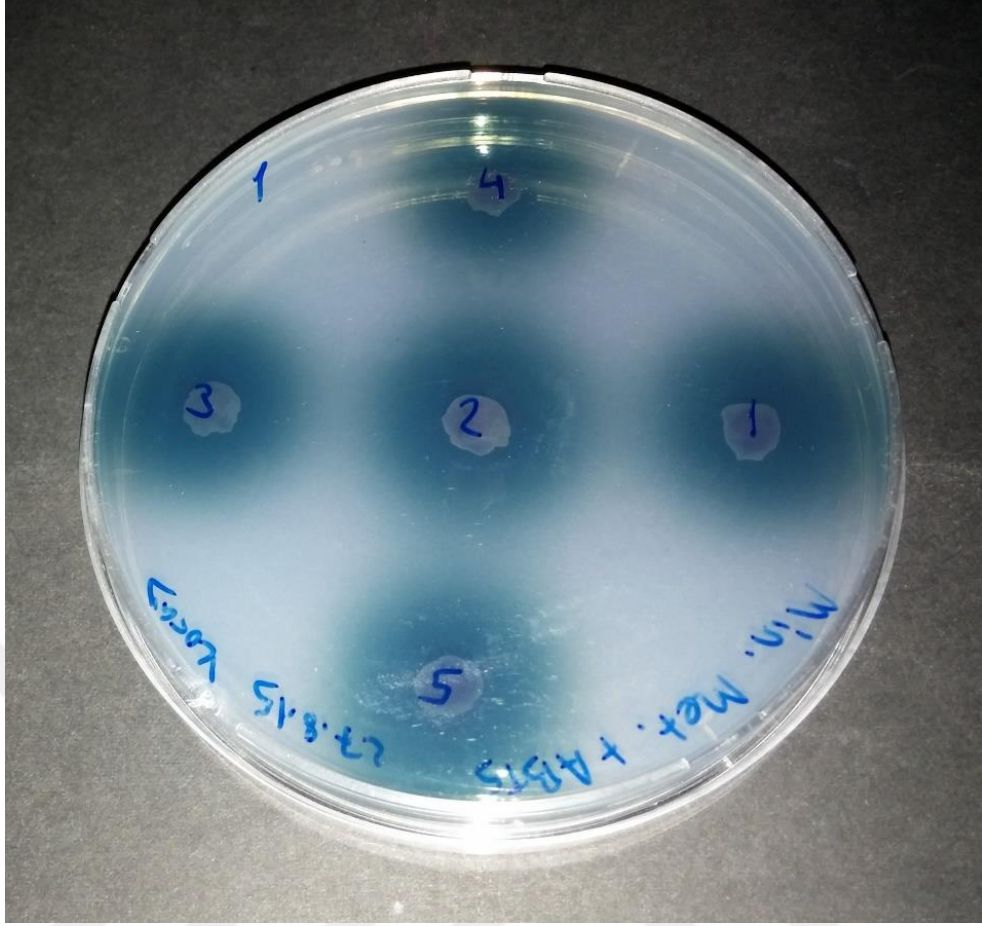
#### 3.1 PsLcc2 Üretebilen Rekombinant *P.pastoris* Kolonilerin Belirlenmesi

*Pycnopus sanguinues* MUCL 38531 organizmasına ait lakkaz enzimi kodlayan PsLcc2 geni içeren pPICZ B vektörü, *P.pastoris* X33 suşuna "EasyComp™ Transformation Kit" kullanılarak kimyasal transformasyon ile aktarıldıktan sonra Zeocine antibiyotiği içeren besiyerindeki koloni oluşumları gözlenmiştir. pPICZ B vektöründe Zeocine direnç geni bulunduğu için antibiyotik seçilimi yapılan besiyerinde sadece antibiyotik direnç geni ekspresyonu yapabilen koloniler büyüme gösterebilecektir. Transformasyon sonucunda 37 adet transformant koloni oluşumu tespit edilmiştir.

Oluşan 37 transformant koloninin hedef genimiz olan *PsLcc2*'yi ekspres edip edemediğini belirlemek için her bir transformant büyütüldükten sonra içerisinde lakkaz substratı olan 0.2 mM ABTS'nin de bulunduğu minimal metanol besiyerinde ekilmiş ve 30 C<sup>0</sup> de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Böylece lakkaz ekspresyonu için gerekli olan koşulları sağlayan minimal metanol besiyerinde hücre dışına lakkaz salgılanması halinde, ABTS ile lakkazın reaksiyona girmesi sonucunda mavi-yeşil renkli bir zon oluşumu gözlenecektir. Bu renk oluşumunun nedeni ise lakkaz enziminin oksidasyonu sonucu oluşan ABTS radikalleridir [77]. Bu çalışmaya ait sonuçlar Şekil 3.1 ve Şekil 3.2'de verilmektedir.



**Şekil 3.1:** Transformant Kolonilerin ABTS İçeren Minimal Metanol Besiyerindeki Lakkaz Üretimlerinin Tespit Edilmesi. **A:** İnkübasyon Öncesi Kolonilerin Görünümü, **B:** 24 Saat Sonundaki Görünüm, **C:** 72 Saat Sonundaki Görünüm



**Şekil 3.2:** 2 Numaralı Petrinin 3. Gün Sonundaki (72 saat) Yakın Görünümü

Şekil 3.1 üzerinde de görüldüğü gibi transformasyon sonucu oluşan 37 koloninin hepsinde de lakkaz ekspresyonu gerçekleştiği tespit edilmiştir. Oluşan yeşil zonun genişliğinin artması da devam eden lakkaz üretimini göstermektedir.

Bütün transformantların lakkaz enzimi ifadesini gerçekleştirdiği tespit edildikten sonra hangi transformantın en yüksek lakkaz aktivitesi gösterdiğini belirlemek için her koloni sıvı minimal metanol besiyerinde inkübasyona bırakılarak hücre dışındaki sıvılardan örnekler alınmıştır. Hücrelerin çöktürülmesi sonucu alınan süpernatant örneklerinin yine ABTS kullanılarak enzimatik aktivite analizine göre birbirlerine kıyasla aktiviteleri tespit edilmiştir. 37 pozitif transformant koloniden alınan hücre dışı örneklerin gösterdiği aktiviteler 50.4 U/L ile 302 U/L arasında değişkenlik göstermiştir. Yapılan aktivite testine göre 2. petride bulunan 5 numaralı koloninin 302 U/L değeri ile en yüksek aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle dekolizasyon çalışmalarında 5 numaralı koloniden üretilen enzimler kullanılmıştır. Bu amaçla 5 numaralı koloni sıvı YPD besiyerinde üretilerek  $-80\text{ C}^0$  de stoklanmıştır.

### 3.2 Rekombinant Lakkaz PsLcc2 Enziminin Geniş Ölçekli Üretimi

Mikrobiyal kaynaklı protein üretiminin verimli olabilmesi için kültür koşullarındaki bazı değişkenlerin önemi oldukça fazladır. Sıcaklık, kültür ortamının kompozisyonu (karbon kaynağı, gerekli mineraller varsa kofaktör ihtiyacı vs.), pH değeri, hücre yoğunluğu ve kültür süresi gibi parametreler üretilecek proteinin verimini ve miktarını etkileyen değişkenlerdir. [78,79] Rekombinant lakkaz üretimi yapılırken bu parametreler göz önünde bulundurularak hücrelerin kültürü yapılmıştır ve üretim sonucunda lakkaz enzimlerinin kısmi saflaştırılması yapılmıştır.

Rekombinant lakkaz üretiminin optimum koşullarda gerçekleşmesi için, 2010 yılında Günseli Kurt Gür tarafından yapılan lakkaz üretimi için gerekli optimum üretim koşullarının tespit edilme çalışmaları (pH değeri, alanin miktarı, sıcaklık değeri, kültür süresi, CuSO<sub>4</sub> miktarı vb. gibi) dikkate alınarak üretim yapılmıştır. Bu kapsamda, 500 mL hacimli 10 adet flask kullanılmış, her flaska 100 mL BMMY sıvı besiyeri eklenmiş ve toplamda 1 litrelik üretim yapılmıştır. Hücreler bu besiyerinde 8 gün boyunca 28 C<sup>0</sup> sıcaklıkta ve 250 rpm çalkalamalı olarak kültüre edilmiştir.

Lakkaz üretimi için kullanılan BMMY besiyerinde pH 6.0 değerindeki potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılmıştır. Asidik ortamlarda yapılan lakkaz üretiminin enzim aktivitesi üzerinde olumsuz etki gösterdiği tespit edildiğinden dolayı nötral değere yakın bir tampon çözelti ile besiyeri pH seviyesi ayarlanmıştır [80]. Ayrıca O'Callaghan ve ekibi tarafından 2002 yılında yapılan bir çalışmada *T.versicolor* organizması kaynak olarak kullanılarak yine *P.pastoris* üzerinden rekombinant lakkaz üretimi gerçekleştirilmiştir ve bu çalışmada kültür ortamına alanin ilave edilmesinin üretilen asidik ürünlerin nötralizasyonunu sağlayarak lakkaz aktivitesinin korunmasında yardımcı olduğu tespit edilmiştir [78]. Bu nedenle BMMY besiyerine, optimum etki gösterdiği yoğunluk olarak tespit edilen % 0.3 oranında alanin ilavesi yapılmıştır.

Oksijen varlığı, optimum üretim koşulları için gerekli olan parametrelerden bir diğeridir [79]. Bu gereksinimi karşılamak amacıyla kullanılan flaskların %20'si kültür ortamını içerirken geriye kalan hava içerisindeki oksijen ise gerekli oksijeni temin etmek için kullanılmıştır. Oksijenin solüsyon içerisinde etkili ve homojen dağılması için 250 rpm hızla çalkalama yapılmıştır. Öte yandan, endüstriyel üretimde

kullanılan biyoreaktörlerde oksijen beslemesi sağlayan kanallar bulunmaktadır. Böylece oksijen ihtiyacı daha kontrolü ve stabil şekilde sağlanmaktadır [79].

*P.pastoris* metanolü karbon kaynağı olarak kullanabilen bir maya türüdür. Bunun yanında sahip olduğu Aox promotörü da metanol ile indüklenabilen bir promotördür [81]. *Pslcc2* genini içeren pPICZ B vektöründe de metanol indüklemesi yapılmaya uygun olması için Aox1 promotörü mevcuttur. Bu sebeplerden ötürü, başta metanol indüklemesi yapmak için ve karbon kaynağı olarak da kullanabildiği için önceki çalışmalarda en uygun konsantrasyon olarak belirlenen %1 oranında metanol, BMMY besiyerine ilave edilmiştir. Metanolün çabuk buharlaşmasının ortaya çıkaracağı olumsuz etkiyi yok etmek için 24 saatte bir metanol ilavesi yapılarak %1 oranındaki metanol varlığı korunmuştur.

Enzim üretiminde nitrojen kaynağı olarak mikolojik pepton kullanılmıştır. Collins ve Dobson tarafından *T.versicolor* üzerinde yapılan bir çalışmada, nitrojen varlığının hücrelerin büyümesine olan etkisinin yanı sıra, enzim üretimi üzerinde de önemli bir parametre olduğu ve nitrojen miktarının lakkaz translasyonundan sorumlu olan mRNA miktarı üzerinde olumlu etkiler gösterdiği tespit edilmiştir [82]. Bu nedenle %20 g/L konsantrasyonunda nitrojen varlığını sağlamak amacıyla BMMY içerisine pepton ilavesi yapılmıştır.

Lakkaz enzimi kofaktör olarak Cu (bakır) atomu içermektedir [23]. Bu nedenle, enzimin bakır ihtiyacını karşılayabilmek için BMMY içerisinde optimum konsantrasyon olduğu tespit edilen 2 mM'lık CuSO<sub>4</sub> konsantrasyonu oluşturacak şekilde CuSO<sub>4</sub> ilavesi yapılmıştır.

### **3.3 *Pichia pastoris* ile Üretilen Rekombinant Lakkaz Enzimlerinin Kısmi Olarak Saflaştırılması**

8. gün sonunda rekombinant lakkaz üretimi durdurulduktan sonra her flaskadaki solüsyonlar 2 L hacmindeki büyük bir flaskta toplanarak % 90'luk amonyum sülfat, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çöktürmesi yapılmıştır. Bu işlem +4 C<sup>0</sup> de ve manyetik karıştırıcı kullanarak gerçekleştirildi ve %90 doygunluğa ulaşana kadar en fazla %10'luk artışla amonyum sülfat eklemesi yapıldı. Böylece homojen bir çözelti oluşması sağlandı. Amonyum sülfat çöktürmesi salting-in, salting-out prensibine dayanan ve solüsyon içinde proteinlerin çökelti oluşturmasına imkan sağlayan bir saflaştırma adıımıdır

[83]. Proteinlerin bulunduğu bir solüsyon içerisinde amonyum sülfat benzeri tuzların eklenmesi, suyun yüzey gerilme kuvvetini arttırdığı için proteinlerin katlanmasına etki etmektedir. Tuz konsantrasyonunun artması, su ile proteinlerin fonksiyonel amino asitleri arasındaki hidrofobik kuvvetin artmasına neden olarak entropinin düşmesine ve proteinlerin katlanmasına olanak vermektedir. Böylece solüsyon içerisinde denature halde bulunan proteinler katlanma yaparak çökelme oluşturmaya uygun bir yapıya kavuşurlar [84]. Bu prensipten yararlanmak için yapılan amonyum sülfat çöktürmesi ile solüsyon içerisindeki proteinler santrifüj adımı sonunda sıvıdan ayrılarak katı bir çökelek oluşturmuş, ardından süpernatant uzaklaştırılarak, lakkaz enzimlerini içeren çökelti halindeki yapı  $-80\text{ C}^0$  de muhafaza edilmiştir. Böylece tuz yoğunluğunun sağladığı katlanma nedeniyle proteinin stabilitesinin korunması da amaçlanmıştır [83].

Amonyum sülfat çöktürmesi yapıldıktan sonra dekolorizasyon aşamasına geçmeden önce enzimin bulunduğu ortamdaki tuzları uzaklaştırmak için ultrafiltrasyon uygulanmıştır. Bu aşamada Milipore Amicon Ultra® ultrafiltrasyon tüpü ve santrifüj cihazı kullanılmıştır. Öncelikle pH=4.0 sitrat tampon çözeltisi kullanılarak amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen katı çökelek, solüsyon haline getirilmiştir. Ardından 15 dk 5000 g altında santrifüj yapılarak tuzların uzaklaşması sağlanmıştır. Bu adım 4 kez tekrarlanmış ve filtreden geçen sıvıdan örnek alınarak enzimatik aktivite olup olmadığı test edilmiştir. Yapılan test sonunda tuzları bulduran atık sıvıda herhangi bir enzimatik aktiviteye rastlanmamıştır. Bu durum filtrasyonun enzim kaybına yol açmadığını teyit etmektedir. Ultrafiltrasyon tekniği, tuz uzaklaştırmada kullanılan bir diğer teknik olan diyaliz yöntemiyle benzerlik göstermektedir. Kullanılan filtre, tuz gibi küçük yapıli moleküllerin geçişine izin verirken, protein gibi makromoleküllerin geçişini engeller [94]. Böylece santrifüj sonucu tuzlar filtreden geçerek atık olarak uzaklaştırılan sıvıda kalırken, filtre üzerindeki sıvıda konsantrasyonu yüksek, tuz oranı azaltılmış enzim solüsyonu kalacaktır. Bu sayede enzimin dinamik yapısı üzerinde olumsuz etki göstererek, enzim aktivitesini inhibe edici özellik gösteren tuzların enzimin bulunduğu solüsyon içerisinde uzaklaştırılması sağlanmıştır [85].

Amonyum sülfat çöktürmesi ve ultrafiltrasyon adımları tamamlandıktan sonra enzim aktivitesi tekrar belirlenmiştir. Bu adımlarla yapılan saflaştırma sonucu oluşan enzim solüsyonunun aktivitesi yaklaşık olarak 82000 U/L olarak belirlenmiştir. Bu değer,

direk olarak süpernatant içerisinde alınan örneğin aktivitesine göre (302 U/L) oldukça yüksek gözükmektedir. Bu durum, yapılan saflaştırma adımları sonucunda litredeki enzimatik aktivitede yaklaşık olarak 27 katlık bir artış olduğunu göstermektedir. Böylece hem daha az miktarda enzim solüsyonu kullanarak dekolorizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş hem de daha yüksek aktivite sayesinde daha iyi sonuçlar elde edilmiştir.

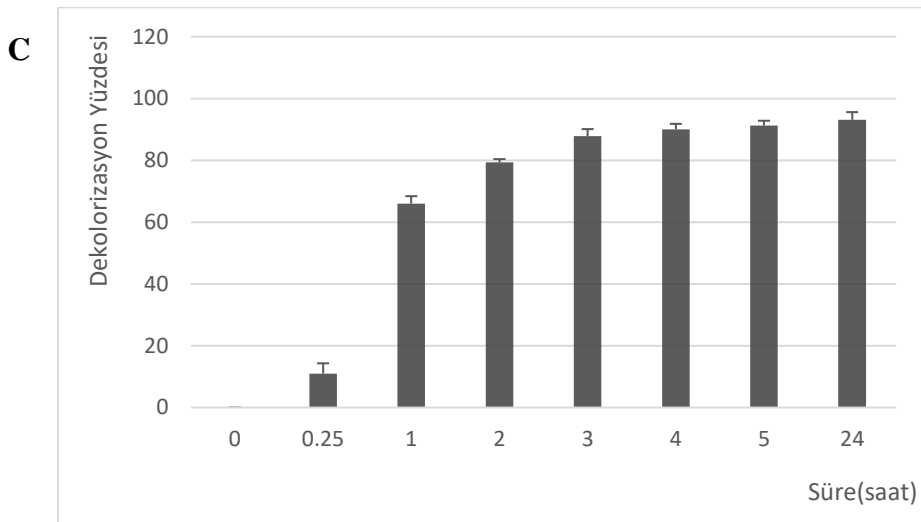
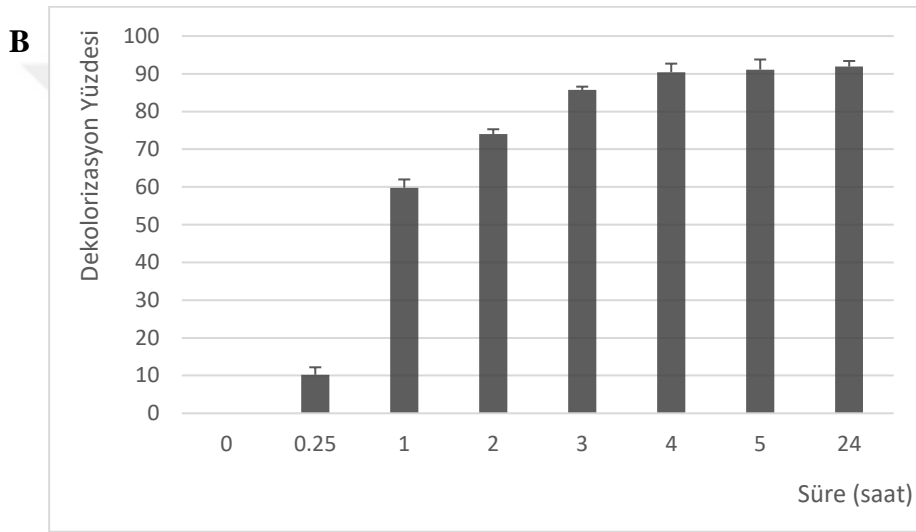
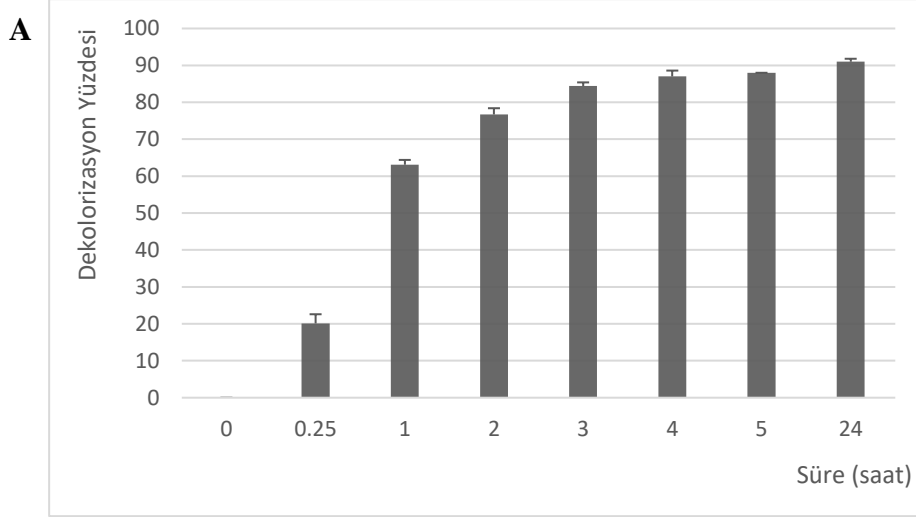
### **3.4 Rekombinant Lakkaz PsLcc2 Enziminin Renk Giderme Performansının Belirlenmesi**

Dekolorizasyon çalışmaları genel olarak 3 farklı LMS (lakkaz mediatör sistemi) ve tek başına enzim kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bunun dışında farklı enzim konsantrasyonu, farklı boya miktarı ve farklı hacimler üzerinde de çalışmalar yapılmıştır. Boya giderme reaksiyonları 2 gün (48 saat) boyunca devam ettirilmiş ve her reaksiyondan önce enzim aktivitesi ölçülmüş ve reaksiyon ortamındaki enzim aktivitesi 0.1 U/mL olacak şekilde enzim miktarı düzenlenmiştir.

#### **3.4.1 Boya Renk Giderimi Reaksiyon Hacminin Belirlenmesi**

Dekolorizasyon çalışmalarına geçildiği zaman boya renk giderme analizlerinin ne kadar hacimde gerçekleştirileceğini belirlemek amacıyla 2 mL, 4mL ve 10 mL hacimlerinde lakkaz enzimi ve mediatör olarak da ABTS kullanılarak malaşit yeşili boyası üzerindeki dekolorizasyon performansı test edilmiştir. Yapılan çalışma neticesinde 3 hacim için de sonuçlar birbirine yakın çıkmıştır. 2 mL hacimde %91, 4 mL hacimde %91.9 ve 10 mL hacimde %93.1 oranında boya giderimi tespit edilmiştir (Şekil 3.3). Sonuçların tutarlı olmasından dolayı diğer boyalar ve mediatörler ile yapılan çalışmalar 2 mL hacimde gerçekleştirilmiştir.

Bütün dekolorizasyon çalışmalarında ilk 5 saatte saat başı örnek alınmış olup diğer ölçümler 24.saatte ve 48.saatte alınmıştır (hacim belirleme çalışmasında 24 saat ölçüm yapılmıştır).



**Şekil 3.3:** (A): 2 mL hacimde, (B): 4 mL hacimde, (C) :10 mL hacimde gerçekleştirilen, rekombinant lakkaz PsLcc2 ve ABTS varlığında Malaşit Yeşili üzerinde boya giderim analizleri

Farklı hacimlerde yapılan bu boya renk giderme çalışması göstermiştir ki; reaksiyon kompozisyonu değişmediği sürece (bütün hacimlerde aynı oranlar korunmuştur) dekolorizasyon performansının reaksiyon hacmi ile ilişkisi bulunmamaktadır. 10 mL reaksiyon hacmi ile gerçekleştirilen çalışmalarla ilgili görüntüler Şekil 3.4’de yer almaktadır.



**Şekil 3.4:** 10 mL hacimde gerçekleştirilen, rekombinant lakkaz PsLcc2 ve ABTS varlığında Malaşit Yeşili üzerinde boya giderim analizleri ve 24.saat sonundaki örneklerin görüntüsü.

S2: PsLcc2 ve ABTS ve Malaşit Yeşili bulunan reaksiyon ortamı, B2: PsLcc2 ve ABTS bulunan reaksiyon ortamı, N2: Sadece Malaşit Yeşili ve ABTS bulunan reaksiyon ortamı

### **3.4.2 Rekombinant Lakkaz PsLcc2-ABTS Sisteminin Dekolorizasyon Performansı**

ABTS, lakkaz enziminin sentetik mediatörlerinden biridir. ABTS ile oluşturulan bir Lakkaz-mediatör sistemlerinde (LMS), ABTS'nin temel işlevi lakkazın substrat aralığını ve kataliz performansını arttırmasıdır. Bunun yanında, ABTS de lakkazın bir substratı olduğu için, ABTS üzerinde de oksidasyon meydana gelir ve bu oksidasyon sonucu oluşan radikal ara ürünler reaksiyon ortamının yeşil renge dönüşmesine neden olur [42].

Lakkaz-mediatör sistemlerinde genel olarak, mediatör olarak kullanılan madde bir ara ürün gibi çalışır. Lakkazın tek başına oksidasyon gerçekleştiremediği substratların oksitlenmesini sağlar. Bunun için öncelikle mediatör lakkaz tarafından oksidasyona uğrar, ardından oksidasyona uğrayan mediatör indirgenirken ortamda

bulunan substratın oksidayona uğramasını sağlar. Böylece lakkaz enzimi dolaylı olarak ortamdaki substratın oksidasyonunu sağlar. Bu amaç için moleküler oksijen kullanılır. Lakkaz-ABTS sisteminde de öncelikle ABTS oksitlenir, ardından ortamda bulunan substrat ABTS sayesinde oksidayona uğrar [42].

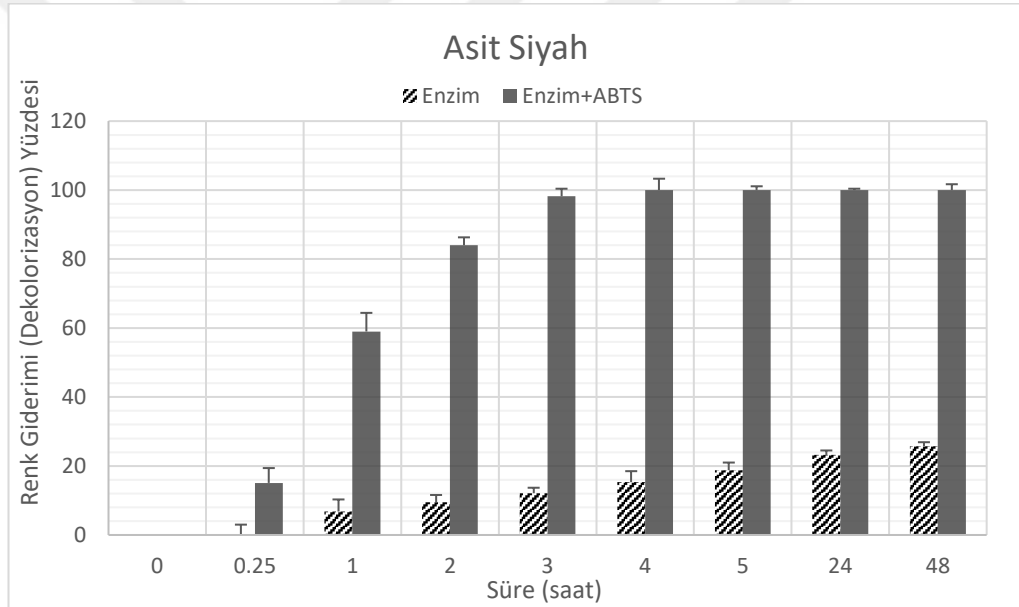
Yapılan dekolorizasyon çalışmasında 7 farklı boya kullanılmıştır. Kullanılan bu boyalar 2 grup altında sınıflandırılabilir: azo boyalar (tek azo yapısına sahip ve çift azo yapısına sahip) ve triarilmetan boyları.

Azo boyalar moleküler yapısında  $R-N=N-R'$  yapısına sahip olan boyalardır. Tekli azo yapısına sahip boyalarda (single azo dye) bir tane azo bağı bulunurken çift azo yapısına sahip boyalarda (double azo dye) iki tane azo bağı bulunmaktadır [86]. Azo boyalar başta tekstil endüstrisi olmak üzere pek çok alanda boyar madde olarak kullanılmaktadır. Tekstil sektöründe doğal ve sentetik kumaş ipliklerin boyanmasında ve farklı azo boyalarının sentezinde kullanılmaktadırlar [87]. Ancak yapılan toksisite çalışmalarında azo boyaların özellikle hidrofilik özellik gösteren üyelerinin bakteri, alg ve balık gibi suda yaşayan canlılar üzerinde sitotoksik ve genotoksik bir etki göstererek ölümcül derecede zararlı olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında bu atıkların bulunduğu sularla beslenen canlılar üzerinde de benzer özellikler gösterdiği tespit edilmiştir [86]. Yapılan dekolorizasyon çalışmasında kullanılan asit siyah (C.I. Acid Black 194) tekli azo yapısında, reaktif siyah (C.I. Reactive Black 5 – 20505), Bismarck kahverengi (C.I. Basic Brown 1 – 21000) ve Kongo kırmızısı (C.I. Direct Red 28 – 22120) çift azo yapısına sahip boyalardandır [95].

Çalışmada kullanılan diğer boya grubu olan triarilmetan sınıfındaki boyalar trifenilmetan olarak da isimlendirilen, moleküler yapısında metan yapısına bağlı 3 fenil grubu içermektedir. Triarilmetan grubu boyalar da endüstriyel olarak oldukça yaygın kullanılan bir boya çeşididir. Tekstil endüstrisinde pamuk, ipek ve yün boyanmasında kullanılmaktadırlar. Bunun dışında kağıt, deri mum gibi ürünlerin boyanmasında ve kozmetik sektöründe de kullanılmaktadırlar [88]. Yapılan toksisite çalışmalarında triarilmetan sınıfı boyalardan suda çözünen üyelerinin özellikle fotosentez yapabilen organizmalar üzerinde fototoksik özellik gösterdiği tespit edilmiştir. Bunun dışında bazı türler üzerinde de toksik ve kanserojen etkiye sahip olduğu belirtilmiştir [89]. Çalışmada triarilmetan sınıfından üç boya kullanılmıştır.

Bu boyalar: Malaşit Yeşili (C.I. Basic Green 4 – 42000), Kristal Viyole (C.I. Basic Violet 3 – 42555) ve Bazık Fuksindir (C.I. Basic Violet 14 – 42510). [95]

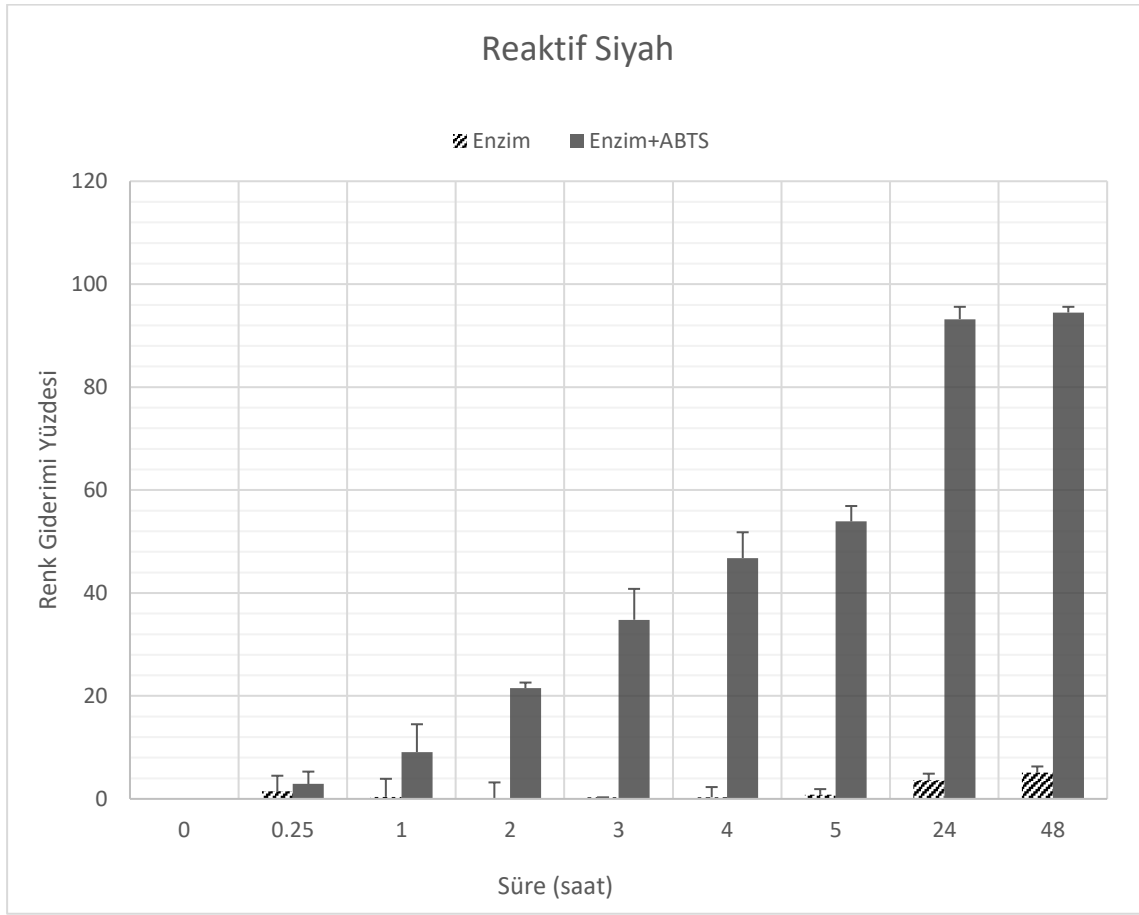
Dekolorizasyon çalışmasında bütün boyaların bulunduğu ortamın pH'sı rekombinant lakkaz PsLcc2 enziminin optimum çalıştığı pH değeri olan 4.2 değerine yakın olacak şekilde pH 4.0 olarak oluşturulmuştur [90]. Ancak Kongo Kırmızısı pH değişimlerine duyarlı olduğu ve pH 4.0'de mavi renge dönüştüğü için Kongo Kırmızı ile yapılan çalışmalarda pH 6.0 değerine sahip tampon çözelti kullanılmıştır. Bunun dışında lakkaz-ABTS sisteminin yanında mediatör kullanmadan lakkazın tek başına söz konusu boyalar üzerindeki etkileri de gözlenmiştir. Lakkaz-ABTS ve lakkaz kullanılarak gerçekleştirilen dekolorizasyon sonuçları Şekil 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 3.10 ve 3.11 üzerinde verilmiştir.



**Şekil 3.5:** Asit Siyah boyası üzerinde Rekombinant Lakkaz PsLcc2 -ABTS sisteminin 48 saat içerisindeki dekolorizasyon performansının belirlenmesi

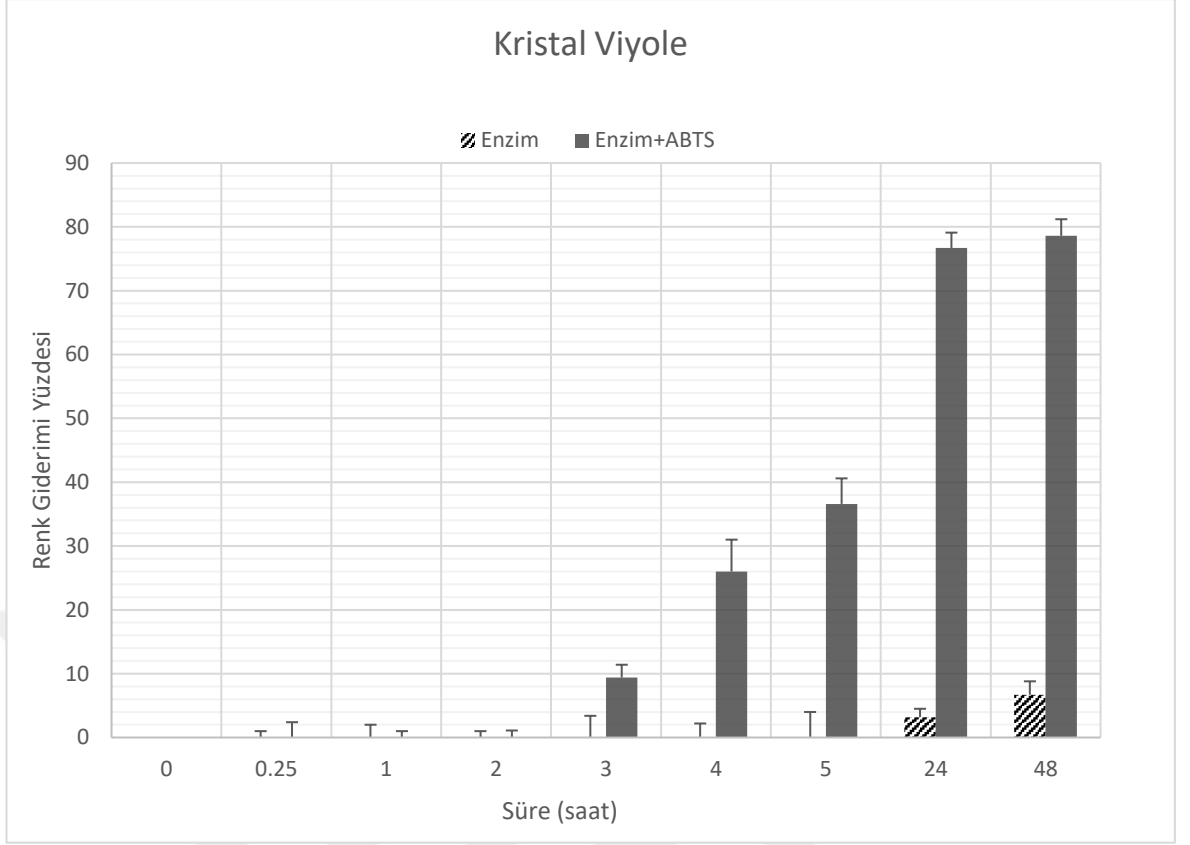
Şekil 3.5'de verilen grafikte görüldüğü gibi Rekombinant Lakkaz PsLcc2-ABTS sistemi asit siyah üzerinde 4. saatin sonundan itibaren %100 dekolorizasyon sağlamıştır. Enzimin tek başına 48 saat sonundaki dekolorizasyon yüzdesi %25.7 olarak ölçülmüştür. Bu değer diğer boyaların performansı ile kıyaslandığında iyi bir sonuç olarak görülmektedir. Asit siyah boyası üzerindeki lakkaz-ABTS performansı değerlendirildiği zaman ilk üç saat içerisinde boya gideriminin %98.2'ye ulaştığı

tespit edilmiştir. Yani dekolorizasyonun büyük kısmının ilk 3 saat içerisinde tamamlanmaktadır.



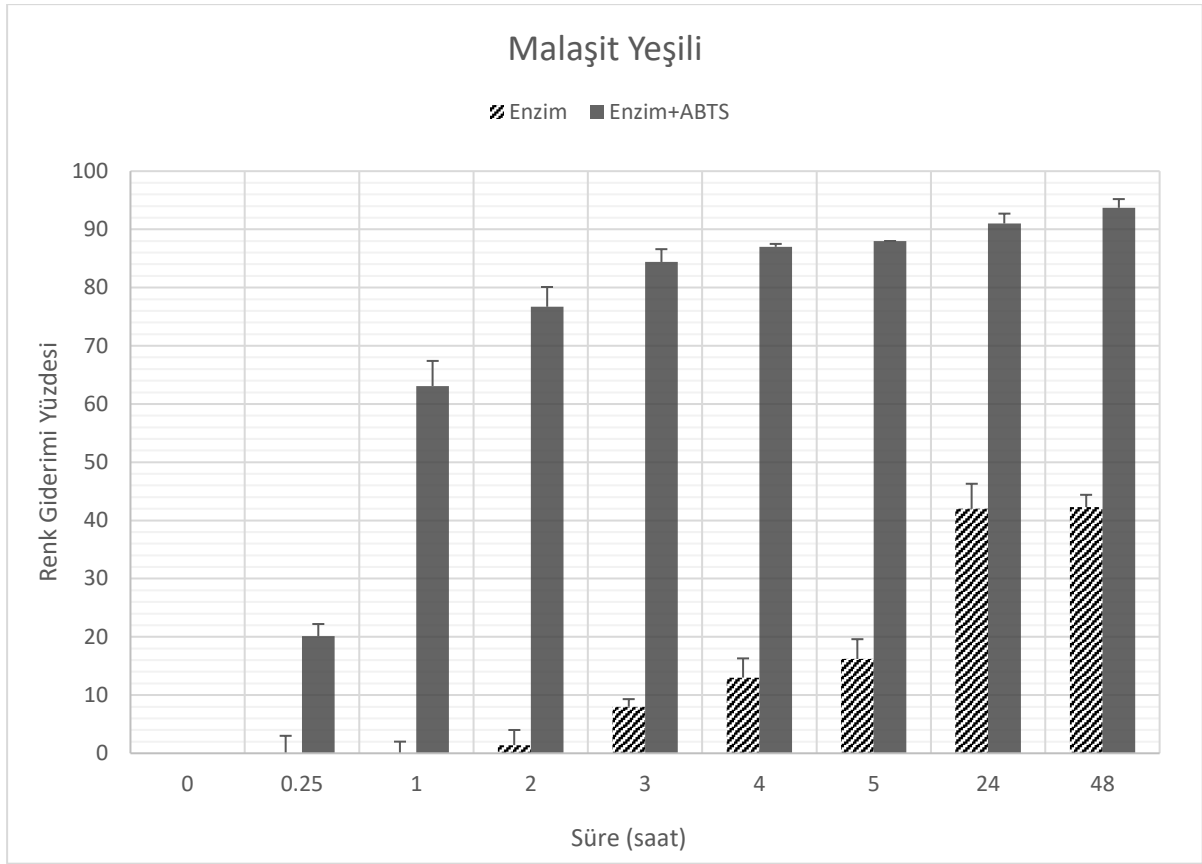
**Şekil 3.6:** Reaktif Siyah boyası üzerinde Rekombinant Lakkaz PsLcc2 -ABTS sisteminin 48 saat içerisindeki dekolorizasyon performansının belirlenmesi

Rekombinant Lakkaz PsLcc2 -ABTS sisteminin reaktif siyah üzerindeki performansı değerlendirildiği zaman 48 saat sonunda % 94.5 oranında boya giderimi sağlandığı görülmektedir. İlk 5 saat içerisinde %54, 24 saat sonunda ise %93.2 dekolorizasyon sağlanmıştır. İlk 24 saatten sonra boya giderimi yüzdesinde önemli bir artış olmamıştır. Mediatörün bulunmadığı reaksiyon ortamı değerlendirildiği zaman 48 saat sonunda dekolorizasyon yüzdesinin %10'un altında kaldığı gözlenmektedir. Bu sonuçlara bakıldığı zaman reaktif siyah üzerinde ABTS'nin Rekombinant Lakkaz PsLcc2 performansını önemli ölçüde arttırdığı gözlenmektedir.



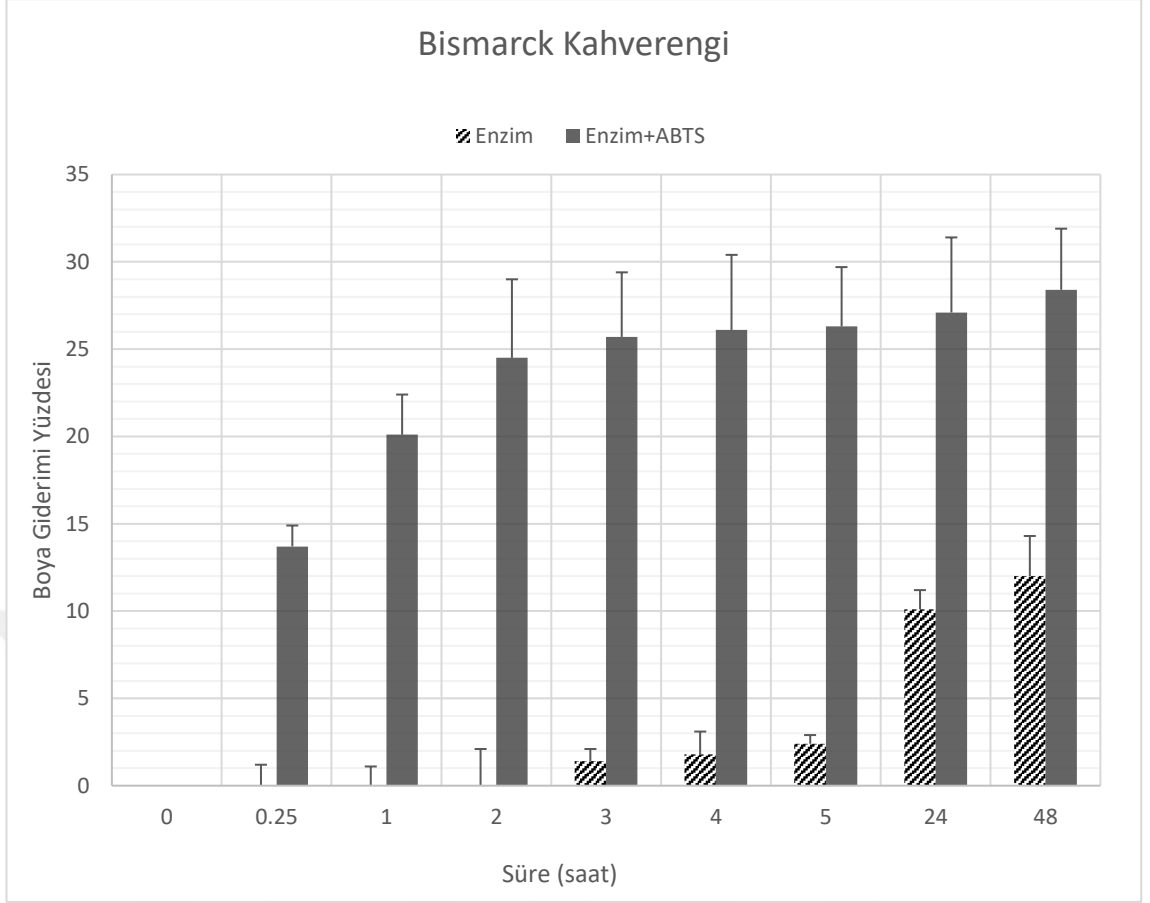
**Şekil 3.7:** Kristal Viyole boyası üzerinde Rekombinant Lakkaz PsLcc2 -ABTS sisteminin 48 saat içerisindeki dekolorizasyon performansının belirlenmesi

Kristal viyole üzerindeki lakkazın etkisi incelendiğinde yine Rekombinant Lakkaz PsLcc2-ABTS sisteminin tek başına lakkaz kullanıldığı reaksiyona göre oldukça yüksek bir verime sahip olduğu görülmektedir. PsLcc2-ABTS sisteminde 48 saat sonunda %78.6 oranında boya giderimi tespit edilirken sadece lakkaz kullanılan ortamda boya giderme yüzdesi %10'un altında (%6.7) olmuştur. 5 saat sonundaki Rekombinant Lakkaz PsLcc2 -ABTS sisteminin performansı incelendiğinde %36.6 oranında bir dekolorizasyon performansı gözükmemektedir. 24 saat sonunda ise bu oran %76.7'ye çıkmıştır. Bu durum incelendiğinde dekolorizasyon işleminin önemli ölçüde 24 saat sonunda tamamlandığı ve boya giderme sürecinin nispeten daha yavaş ilerlediği gözlenmektedir.



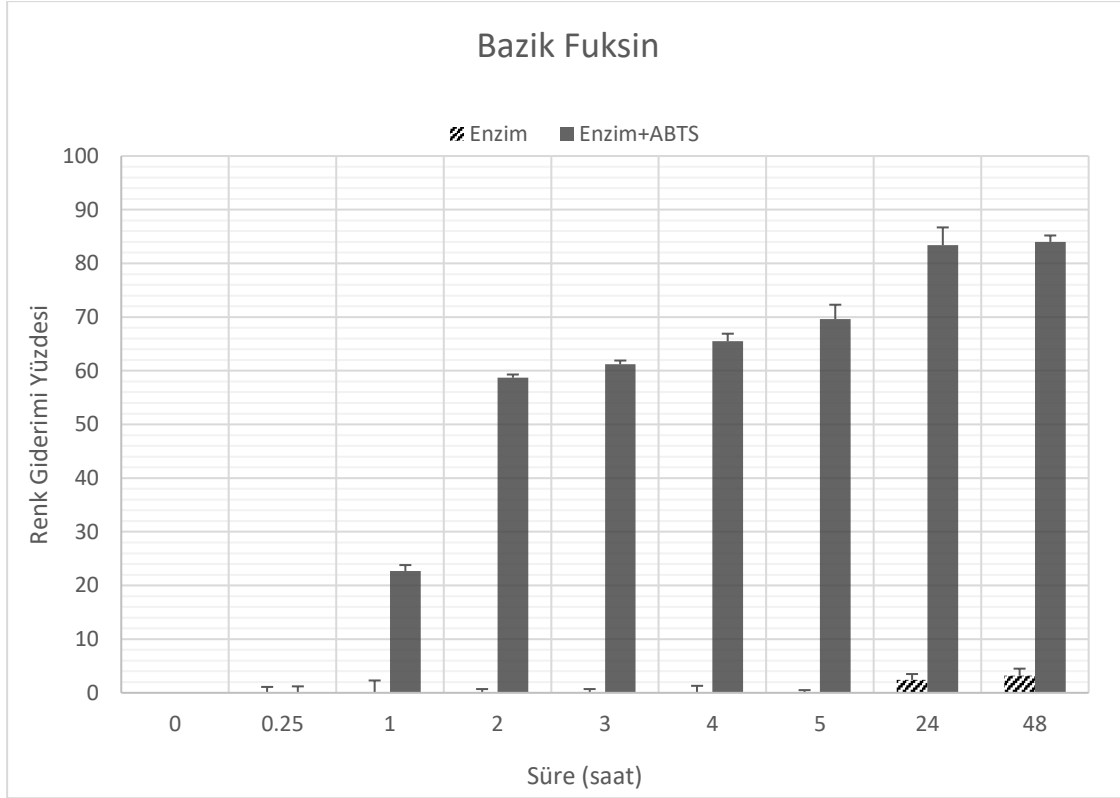
**Şekil 3.8:** Malaşit Yeşili boyası üzerinde Rekombinant Lakkaz PsLcc2 -ABTS sisteminin 48 saat içerisindeki dekolorizasyon performansının belirlenmesi

Rekombinant Lakkaz PsLcc2 'nin Malaşit Yeşili üzerindeki etkisi incelendiği zaman tek başına PsLcc2 enzimi kullanarak oluşturulan reaksiyonun nispeten daha iyi bir performans ortaya koyduğu görülmektedir. Mediatörsüz Rekombinant Lakkaz PsLcc2 enziminin dekolorizasyon yüzdesi 48 saat sonunda %42.3 olarak belirlenmiştir. 24 saat sonundaki değer ile 48 saat sonundaki boya giderme oranının yakın olması esas dekolorizasyon veriminin ilk 24 saatte gerçekleştiğini göstermektedir. PsLcc2 enziminin mediatörsüz olarak nispeten daha iyi sonuç vermesine rağmen Rekombinant Lakkaz PsLcc2 -ABTS sistemi ile 48 saat sonunda %93.7 oranında bir verim sağlanmıştır. Burada da kullanılan ABTS mediatörü lakkazın Malaşit Yeşili üzerindeki boya giderme verimini arttırmıştır. Ancak burada mediatör sisteminde ilk 5 saat sonunda dekolorizasyonun büyük ölçüde tamamlandığı dikkat çekmektedir. Renk giderme işleminin %88'i ilk 5 saat sonunda gerçekleşmiştir.



**Şekil 3.9:** Bismarck Kahverengi boyası üzerinde Rekombinant Lakkaz PsLcc2 - ABTS sisteminin 48 saat içerisindeki dekolorizasyon performansının belirlenmesi

Bismarck Kahverengi üzerindeki Rekombinant Lakkaz PsLcc2 performansı incelendiğinde diğer 6 boyaya kıyasla en düşük verimin bu boyada alındığı gözlenmektedir. Tek başına Rekombinant Lakkaz PsLcc2 kullanıldığı reaksiyon ortamında dekolorizasyon yüzdesi %10 değerinin üzerinde ulaşmış olsa da Rekombinant Lakkaz PsLcc2-ABTS sisteminin dekolorizasyon yüzdesi sadece %28.4 olmuştur. Bu oran diğer boyalar üzerindeki Rekombinant Lakkaz PsLcc2-ABTS sisteminin performansı göz önüne alındığında oldukça düşük kalmaktadır. Bazı boyalarda da olduğu gibi Rekombinant Lakkaz PsLcc2-ABTS sisteminde dekolorizasyonun büyük kısmının ilk 5 saatte tamamlandığı gözlenmektedir.



**Şekil 3.10:** Bazik Fuksin boyası üzerinde Rekombinant Lakkaz PsLcc2-ABTS sisteminin 48 saat içerisindeki dekolorizasyon performansının belirlenmesi

Rekombinant olarak üretilen PsLcc2 enziminin Bazik Fuksin üzerindeki dekolorizasyon performansı incelendiğinde Rekombinant Lakkaz PsLcc2-ABTS sistemi ile tek başına enzimin kullanıldığı system arasında oldukça büyük bir fark olduğu gözlenmektedir. Tek başına Rekombinant Lakkaz PsLcc2 enziminin performansı incelendiği zaman 48 saat sonunda sadece %3.7'lik bir boya giderme verimin gözlenmektedir. Ancak ABTS mediatörü kullanıldığı durumda bu oran 48 saat sonunda %84'e çıkmaktadır. Sadece PsLcc2 kullanıldığı durumda ilk 5 saat içerisinde kayda değer miktarda boya giderimi gözlenmezken Rekombinant Lakkaz PsLcc2-ABTS sisteminde boya gideriminin büyük bölümü 24 saat içerisinde tamamlanmıştır.

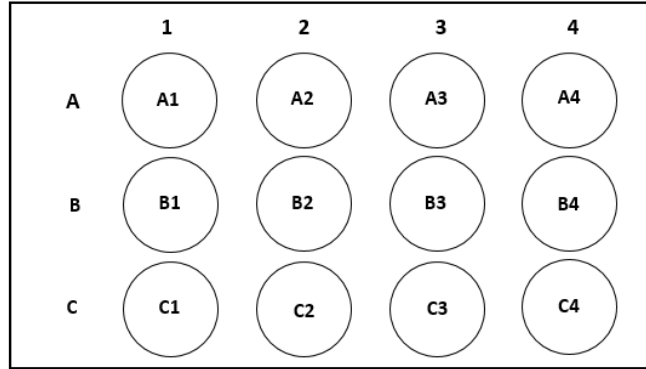


**Şekil 3.11:** Kongo Kırmızısı boyası üzerinde Rekombinant Lakkaz PsLcc2-ABTS sisteminin pH=6.0 değerinde ve 48 saat içerisindeki dekolorizasyon performansının belirlenmesi

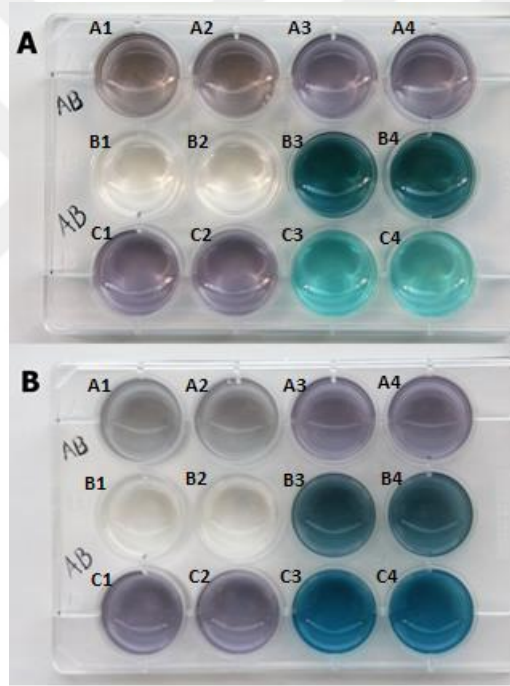
Kongo Kırmızısı üzerinde yapılan dekolorizasyon çalışması pH=6.0 ortamında yapıldığı için önemli bir belirteç özelliğine sahiptir. Sadece Rekombinant Lakkaz PsLcc2'nin kullanıldığı reaksiyon değerlendirildiği zaman ilk 5 saat içerisinde neredeyse hiç dekolorizasyon oluşmadığı gözlenmiştir. 48 saat sonunda ise sadece %3.5 oranında dekolorizasyona ulaşılmıştır. Ancak Rekombinant Lakkaz PsLcc2-ABTS sistemi göz önünde bulundurulduğunda 48 saat sonunda %90.2 oranında boya giderimi söz konusudur. Bu örnekte de ABTS mediatörü PsLcc2'in performansı üzerinde önemli ölçüde artış sağlamıştır. pH derecesi söz konusu Rekombinant Lakkaz PsLcc2 enzimi için optimum değerde olmasa da ABTS ile birlikte oluşturulan LMS'nin oldukça verimli olduğu gözlenmiştir.

Rekombinant Lakkaz PsLcc2-ABTS sistemi kullanılarak yapılan dekolorizasyon çalışmaları her boyanın maksimum absorbans değerini verdiği dalga boyunda yapılan spektrofotometrik ölçümler ile analiz edilmiştir. Bu ölçümler sonucu elde edilen absorbans değişimleri hesaplanarak yüzde değişim belirlenmiştir. Bunun yanı sıra boyalar üzerinde görsel olarak da renk değişimleri oluşmuştur. Şekiller (Şekil 3.13-3.14-3.15) üzerinde bazı örnek boyaların renk değişimleri ile ilgili sonuçlar gözlenmektedir. Ayrıca çalışmada kullanılan 12 kuyucuklu plate şablonu da Şekil 3.12'de verilmiştir. Görsellerdeki kuyucukların konumları bu şablona göre

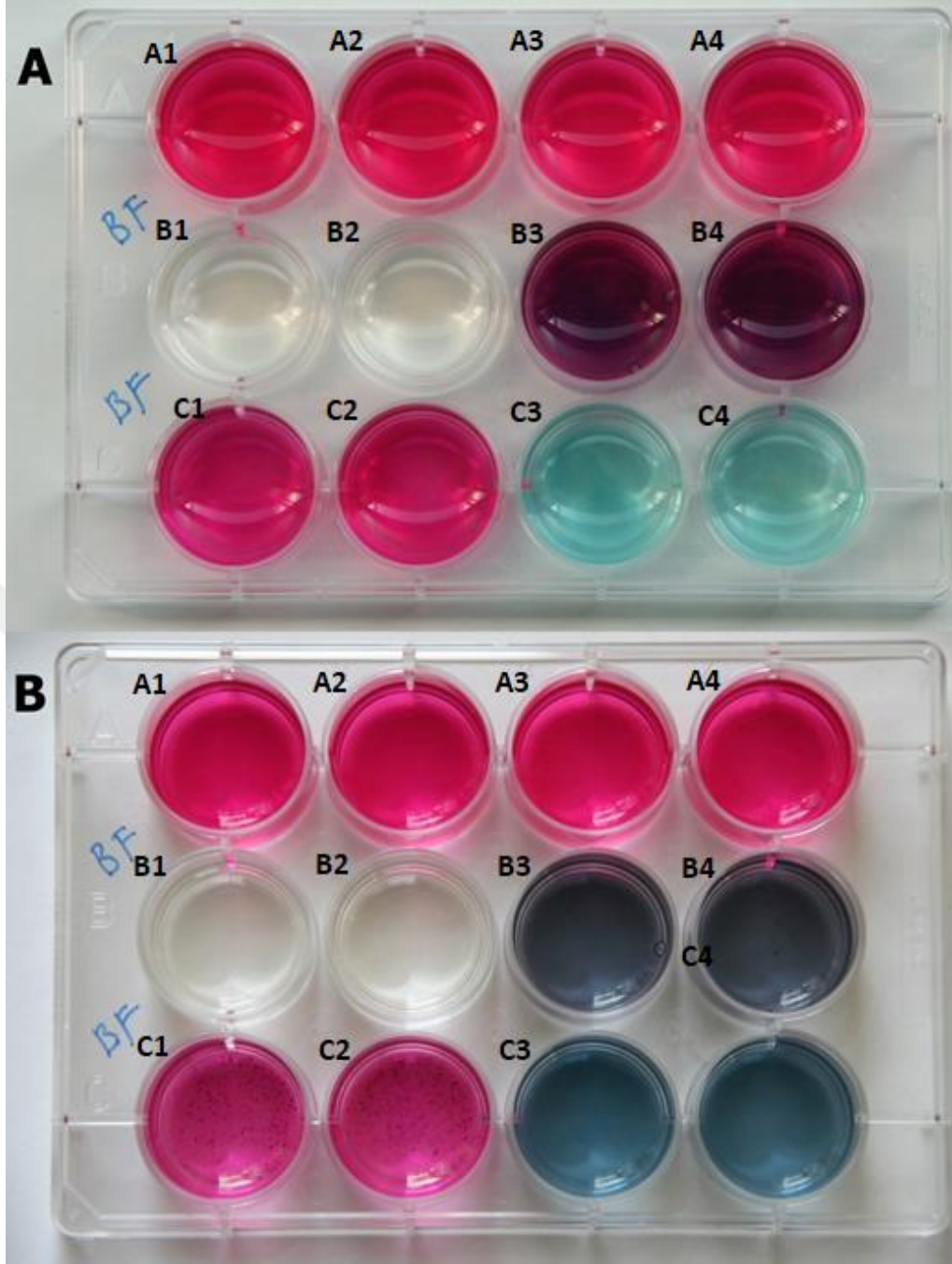
belirtilmiştir. Görseller Canon EOS Digital Rebel XT cihazı kullanılarak Sigma DC 18-200 mm mercek ile çekilmiştir.



Şekil 3.12: Dekolorizasyon Çalışmalarında Kullanılan 12 Kuyucuktan Oluşan Plate Şablonu

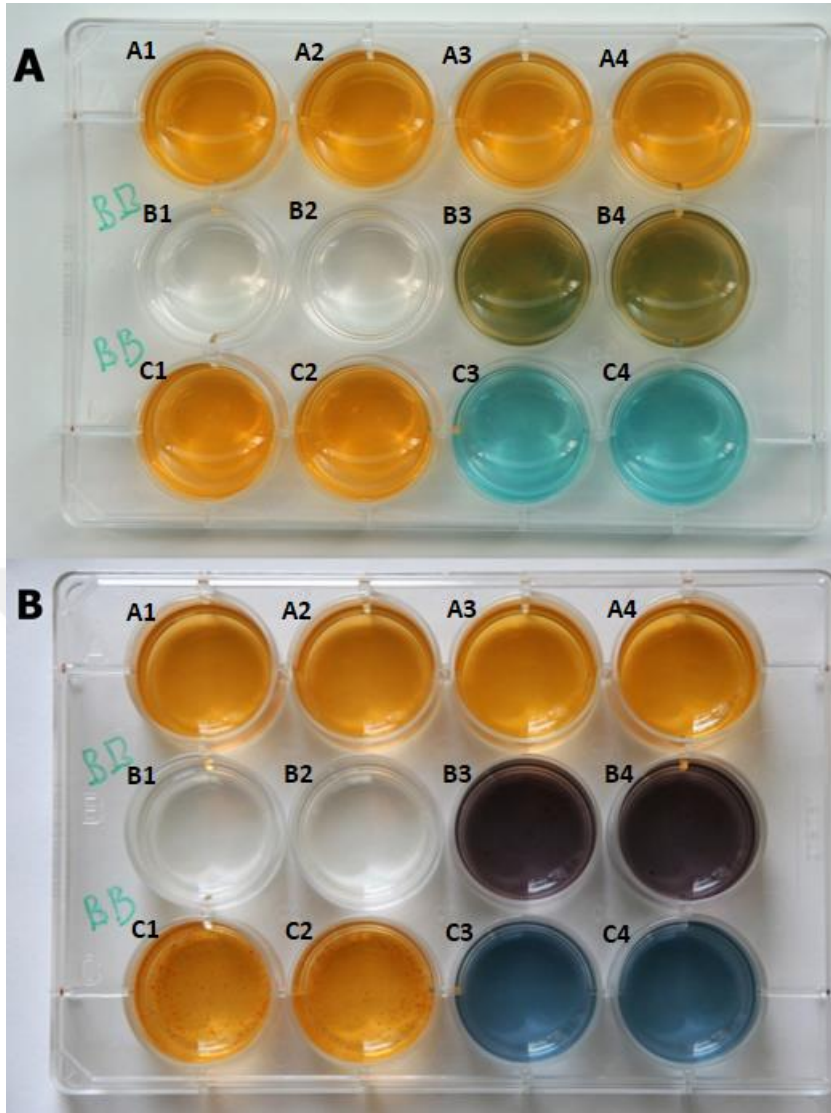


Şekil 3.13: Asit Siyah boyasının dekolorizasyonu çalışması görüntüleri. Plaka üzerindeki kuyucuklardan A1,A2 sadece enzimin bulunduğu reaksiyon ortamıdır (PsLcc2, asit siyah, tampon çözelti); A3,A4 kuyucukları sadece enzim için hazırlanan reaksiyonun negatif kontrolüdür (boya ve tampon çözelti); B1,B2 sadece enzim için hazırlanan reaksiyonun blank kuyucuklarıdır (PsLcc2 ve tampon çözelti); B3, B4 kuyucukları lakkaz-ABTS sistemi reaksiyonu için hazırlanmış solüsyonları içermektedir (PsLcc2, ABTS, boya, tampon çözelti); C1, C2 kuyucukları lakkaz-ABTS sistemi için negatif kontrolüdür (boya, ABTS ve tampon çözelti) ; C3,C4 kuyucukları PsLcc2ABTS sistemi için blank çözeltileridir (PsLcc2, ABTS ve tampon çözelti). **A:** Dekolorizasyon başladıktan 1 saat sonraki görüntüdür. **B:** Dekolorizasyon başladıktan 48 saat sonraki görüntüdür.



**Şekil 3.14** Bazik Fuksin boyasının dekolorizasyon çalışması görüntüleri. Plaka üzerindeki kuyucuklardan A1,A2 sadece enzimin bulunduğu reaksiyon ortamıdır (PsLcc2, Bazik Fuksin, tampon çözelti); A3,A4 kuyucukları sadece enzim için hazırlanan reaksiyonun negative kontrolüdür (boya ve tampon çözelti); B1,B2 sadece enzim için hazırlanan reaksiyonun blank kuyucuklarıdır (PsLcc2 ve tampon çözelti); B3, B4 kuyucukları lakkaz-ABTS sistemi reaksiyonu için hazırlanmış solüsyonları içermektedir (PsLcc2 ABTS, boya, tampon çözelti); C1, C2 kuyucukları lakkaz-ABTS sistemi için negatif kontroldür (boya, ABTS ve tampon çözelti) ; C3,C4 kuyucukları lakkaz-ABTS sistemi için blank çözeltileridir PsLcc2, ABTS ve tampon çözelti). **A:** Dekolorizasyon başladıktan 1 saat sonraki

görüntüdür. **B:** Dekolorizasyon başladıktan 48 saat sonraki görüntüdür.



**Şekil 3.15:** Bismarck Kahverengi boyasının dekolorizasyon çalışması görüntüleri. Plaka üzerindeki kuyucuklardan A1,A2 sadece enzimin bulunduğu reaksiyon ortamıdır (PsLcc2, Bismarck Kahverengi, tampon çözelti); A3,A4 kuyucukları sadece enzim için hazırlanan reaksiyonun negatif kontrolüdür (boya ve tampon çözelti); B1,B2 sadece enzim için hazırlanan reaksiyonun blank kuyucuklarıdır (PsLcc2 ve tampon çözelti); B3, B4 kuyucukları lakkaz-ABTS sistemi reaksiyonu için hazırlanmış solüsyonları içermektedir (PsLcc2, ABTS, boya, tampon çözelti); C1, C2 kuyucukları lakkaz-ABTS sistemi için negatif kontrolüdür (boya, ABTS ve tampon çözelti) ; C3,C4 kuyucukları lakkaz-ABTS sistemi için blank çözeltileridir (PsLcc2, ABTS ve tampon çözelti). **A:** Dekolorizasyon başladıktan 1 saat sonraki görüntüdür. **B:** Dekolorizasyon başladıktan 48 saat sonraki görüntüdür.

Söz konusu 7 boya üzerinde Rekombinant Lakkaz PsLcc2-ABTS sistemi kullanılarak ve sadece PsLcc2 enzimi kullanılarak yapılan dekolorizasyon çalışmaları sonucu elde edilen spektrofotometrik analiz sonuçları ve reaksiyonlar

sonucu elde edilen görseller göz önünde bulundurulduğu zaman, Rekombinant Lakkaz PsLcc2 ve Rekombinant PsLcc2-ABTS sisteminin performansı hakkında oldukça açıklayıcı bilgiler açığa çıkmaktadır.

Dekolorizasyon yapılan boyalar içinde PsLcc2-ABTS sistemi göz önüne alındığı zaman en yüksek verim Asit Siyah boyasında gözlenmiştir. En düşük verim ise Bismarck Kahverengi boyasında oluşmuştur. Bu iki boya ele alındığında her iki boyanın da azo boyalar sınıfında olduğu bilinmektedir. Bu durum PsLcc2-ABTS sisteminin performansının tamamen substrata özgü olarak değiştiğini, en azından triarilmetan ve azo boyalar arasında boyaların bulunduğu sınıfın bir önemi olmadığını göstermektedir.

Mediatörlü ve mediatörsüz olarak kurulan reaksiyonlar dikkate alındığı zaman denenen tüm boyalar için ABTS'nin, lakkazın verimini arttırmıştır. Bazı boyalarda tek başına enzimin aktivitesi çok düşük olmasına rağmen (Reaktif Siyah, Kristal Viyoloe, Bazik Fuksin) ABTS varlığında dekolorizasyonun önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir. Bu durum da PsLcc2 enzimi için mediatörün enzim performansının yükselmesinde oldukça önemli bir etken olduğunu göstermektedir. Ayrıca Rekombinant Lakkaz PsLcc2'nin tek başına aktivitesinin düşük olduğu boyalar değerlendirildiği zaman azo boyalar ve triarilmetan sınıfı boyalar arasında aktivite bakımından anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır.

PsLcc2-ABTS sisteminin performansına bakıldığında, Asit Siyah boyasının %100 dekolorizasyon verimine ulaşmıştır. Görsellere dikkat edildiği zaman renk yoğunluğunun en az olduğu boyanın da Asit Siyah olduğu göze çarpmaktadır. Boyaların moleküler ağırlıkları incelendiği zaman Asit siyahın moleküler ağırlığının diğerlerine kıyasla ortalama bir değerde olduğu tespit edilmektedir. Ancak boyanın özelliğinden dolayı su içerisinde tamamen çözündüğü halde diğer boyalara kıyasla oldukça açık bir renk vermektedir. Spektrometrik ölçümlerde de bu boyanın absorbans değeri diğerlerine göre oldukça düşük çıkmıştır. Bu veriler, PsLcc2-ABTS sisteminin bu boyayı oldukça kısa bir sürede (4. saat sonunda) %100 verimle parçalamasının nedenlerinden biri olabilir.

Görsel olarak dekolorizasyon görüntüleri incelendiği zaman PsLcc2-ABTS sistemi ile yapılan çalışmalarda PsLcc2 ile ABTS'nin etkileşime girmesinden dolayı yeşil bir

renk oluştuğu gözlenmektedir. Oluşan bu yeşil renk boyanın bulunmadığı blank ortamlarında 1.saat sonundaki görüntülerde oldukça açık şekilde görölmektedir. İlerleyen süre içerisinde gözlenen renk önce koyu yeşile sonra daha da koyu bir renge dönüşmüştür. Bu dönüşüm de 48.saat sonundaki görsellerde görölmektedir. Verimli alışan boyaların görüntüsüne bakıldığı zaman (Asit Siyah %100, Bazik Fuksin %84) PsLcc2-ABTS sisteminin bulunduğu kuyucuklar ile blank solüsyonlarının bulunduğu kuyucuklar arasındaki renk benzerliğinin oldukça fazla olduğu görölmektedir. Yani dekolorizasyon reaksiyonu devam ettikçe boya bulunmayan blank ortamında bulunan renge benzer bir renk oluşumu gözlenmiştir. Bu durum boyanın ortamdaki uzaklaştırıldığını düşündüğümüzde oldukça tutarlı gözölmektedir. Ancak PsLcc2-ABTS sisteminin en kötü çalıştığı boya olan Bismarck Kahverengi üzerindeki dekolorizasyon sonuçlarına bakıldığı zaman PsLcc2-ABTS sisteminin bulunduğu kuyucuk ile blank solüsyonu bulunan kuyucuklar arasındaki renk farkı bariz şekilde görölmektedir. Boya giderim yüzdesi düşük olduğu için boyanın bulunduğu B3 ve B4 kuyucuklarında daha koyu bir renk oluştuğu göze çarpmaktadır. Ayrıca enzimin tek başına nispeten daha verimli çalıştığı boya olan Asit Siyah boyasının A1 ve A2 kuyucuklarına bakıldığında mediatörsüz ortamda da boyanın renginin PsLcc2 vasıtasıyla açıldığı gözlenmektedir. Ancak negatif örneklerde bir değişim gözökmemektedir. Dekolorizasyon sonucu Rekombinant Lakkaz PsLcc2-ABTS sisteminin oluşturduğu renkli solüsyon düşünöldüğu zaman bazı uygulamalar için bunun bir dezavantaj olabileceği göze çarpmaktadır.

Boya renk giderme çalışmaları sırasında boyanın geçen süre içerisinde davranışını gözlemlemek, tampon çözelti ve varsa mediatör ile etkileşime girip girmediğini tespit etmek için enzim bulunmayan negatif kontroller oluşturulmuştur. Boya ve tampon çözelti olan kuyucuklarda geçen zaman içerisinde negative kontrollerde anlamlı bir absorbans farkı tespit edilmemiştir. Ancak Bismarck Kahverengi ve Bazik Fuksin boyalarının görsellerinde de gözöktüğu gibi bazı boyaların negatif kontrollerinde mediatörden kaynaklanan ökeltiiler oluşmuştur. Bu solüsyonlarda anlamlı bir absorbans farkı oluşsa da PsLcc2-ABTS sisteminin bulunduğu solüsyonlar ile kıyaslandığında oldukça önemsiz ve sonuca etki etmeyecek bir fark olduğu tespit edilmiştir. Negatif kontrollerin sonuçlarına bakıldığı zaman da boyalar üzerindeki dekolorizasyon olayının PsLcc2 ve ABTS sayesinde oluştuğu ispatlanmaktadır.

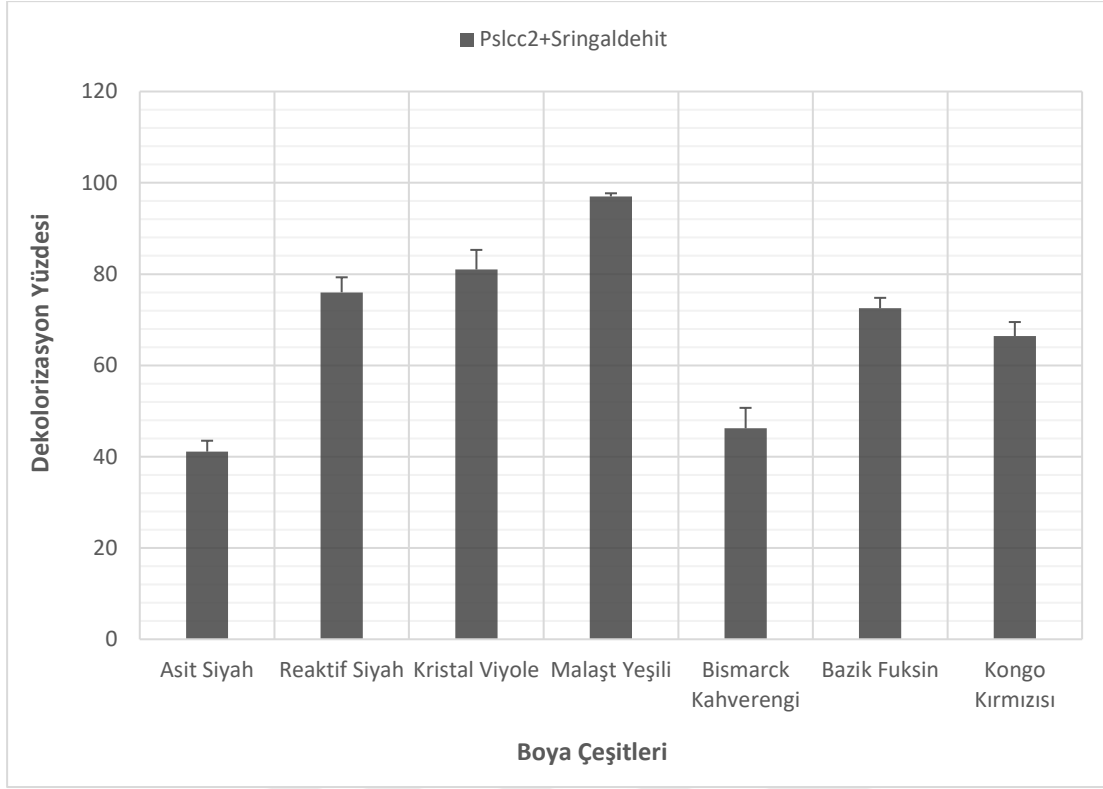
Yapılan bu çalışmalar dikkate alındığı zaman ilk 5 saat içerisinde yüksek verim elde edilen boyalarda, 48 saatin sonunda ilk 5 saatte nispeten düşük verim elde edilen boyalara kıyasla daha iyi sonuçlar alındığı gözlenmiştir. Enzimlerin aktivitesinin stabiliteye bağlı olduğu ve enzimlerin stabilitesi azaldıkça enzim aktivitesinde de azalmalar olabileceği bilinmektedir [91]. Bu nedenle, geçen zaman içerisinde Recombinant Lakkaz PsLcc2'nin stabilitesindeki azalmaların, verimine etkide bulunmuş olabileceği düşünülmektedir.

### **3.4.3 Doğal Mediatörler ile Kurulan LMS'nin Dekolorizasyon Performansı**

Dekolorizasyon çalışmaları kapsamında Rekombinant Lakkaz PsLcc2-ABTS sistemi dışında Rekombinant Lakkaz PsLcc2-sringaldehit ve Rekombinant Lakkaz PsLcc2-p-Kumarik asit LMS'leri de kurulmuştur. Sringaldehitin ve Kumarik Asitin doğal mediatörler olması ve ABTS gibi renkli ürün oluşturmaması bu mediatörlerin denenmesindeki nedenlerdendir. Yapılan çalışmalarda ABTS çalışmalarındaki aynı protokol izlenmiş, yine negatif ve blank solüsyonları hazırlanarak kontrollü bir çalışma yürütülmüştür.

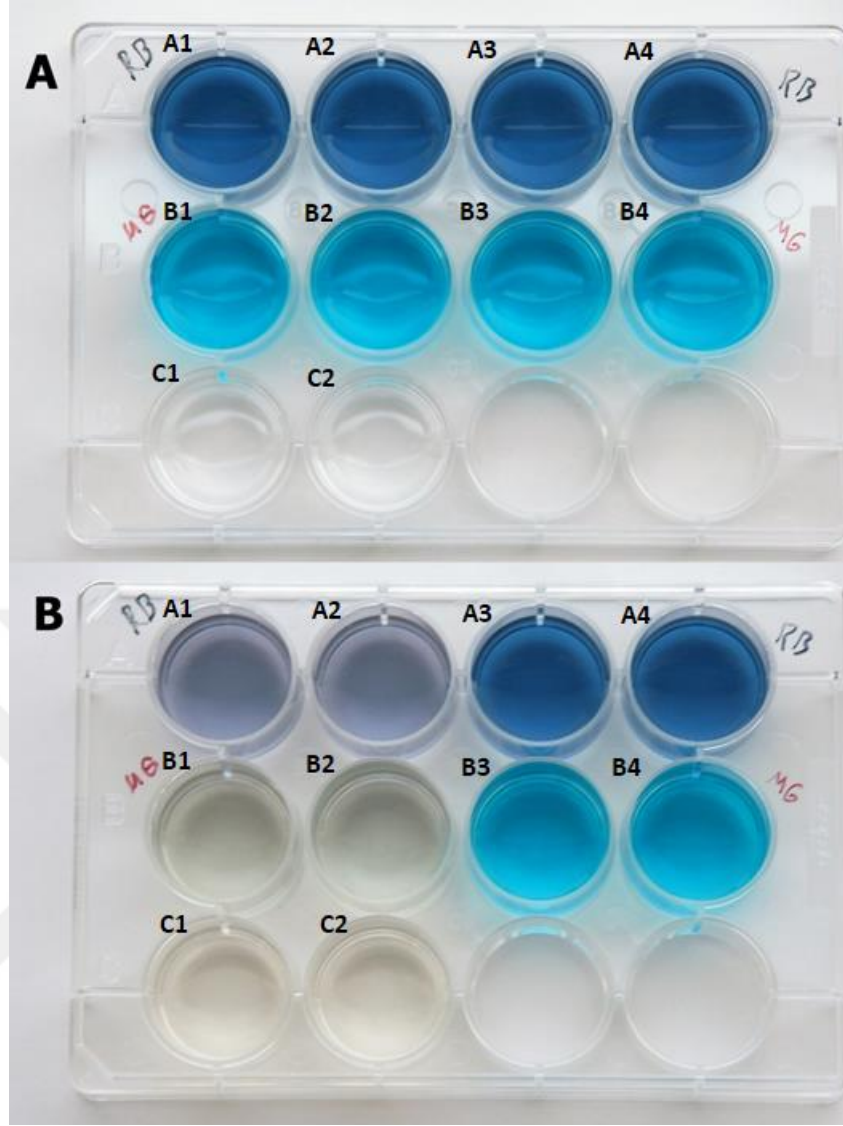
#### **3.4.3.1 Rekombinant Lakkaz PsLcc2-Sringaldehit Sisteminin Dekolorizasyon Performansı**

PsLcc2-sringaldehit sistemi için de ABTS de olduğu gibi yedi boya üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalardan Kongo Kırmızısı pH 6.0 değerindeki ortamda yapılırken diğer boyalar pH 4.0 ortamında yapılmıştır. Dekolorizasyon verimi spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve boya renk giderimine ait reaksiyon görüntüleri çekilmiştir. Aşağıdaki şekillerde 48 saat sonundaki dekolorizasyon verim analizlerinin sonuçlarının yer aldığı grafik (Şekil 3.16) ve reaksiyon görüntüleri (Şekil 3.17) mevcuttur.



**Şekil 3.16:** Rekombinant Lakkaz PsLcc2-Sringaldehit sistemi ile yapılan dekolorizasyon çalışmasının 7 Boya için 48 saat sonundaki sonuçları

PsLcc2-Sringaldehit sistemi ile yapılan çalışmanın spektrofotometrik analiz sonuçları değerlendirildiği zaman Malaşit Yeşil, Kristal Viyole ve Bismarck Kahverengi boyalarında PsLcc2-ABTS sistemindeki sonuçlara göre daha iyi bir performans elde edildiği görülmektedir. Malaşit Yeşili ABTS etkisi ile %91 dekolorizasyonu uğramışken sringaldehit ile bu oran %97'ye çıkmıştır. Kristal Violede %76.7 değerinden %81.2 seviyesine, Bismarck Kahverengide ise %27.1 dekolorizasyon oranından %46.2 oranına çıkmıştır. Bu boyaların dışında kalan diğer 4 boyada ise dekolorizasyon yüzdesinde azalmalar görülmektedir. PsLcc2-ABTS sistemi ile %100 boya giderimi gerçekleştirilen Asit Siyah boyasında %46.1 oranında bir dekolorizasyon verimi elde edilmiştir. Renk yoğunluğunun düşük olmasına rağmen PsLcc2-Sringaldehit sistemi bu boya üzerinde verimli çalışmamıştır. Kongo Kırmızısında %90.2 olan boya giderme verimi bu mediatörle %66.4'e, Bazik Fuksinde %83.4'den %72.5'e ve Reaktif Siyahta %93.2'den %76'ya düşmüştür. Rekombinant Lakkaz PsLcc2-Sringaldehit sisteminde dekolorizasyon sonucu renkli bir ürün oluşumu gözlenmediği için boya giderimi daha net gözlenebilmiştir. Bununla ilgili reaksiyon görüntüleri Şekil 3.17 üzerinde gösterilmiştir.



**Şekil 3.17:** Reaktif Siyah ve Malaşit Yeşili boyalarının dekolorizasyon çalışması görüntüleri. Plaka üzerindeki kuyucuklardan A1,A2 Reaktif Siyah ve enzim-Sringaldehit sisteminin bulunduğu reaksiyon ortamıdır (PsLcc2, reaktif siyah, malaşit yeşili, tampon çözelti); A3,A4 kuyucukları Reaktif Siyah, Sringaldehit ve tampon çözelti içeren negatif kontroldür (boya, mediatör ve tampon çözelti); B1,B2 Malaşit Yeşili ve enzim-Sringaldehit sisteminin (PsLcc2, mediatör, boya ve tampon çözelti); B3, B4 kuyucukları Malaşit Yeşili, mediatör ve tampon çözelti içeren negatif kontrol solüsyonlarını içermektedir (boya, mediatör, tampon çözelti); C1, C2 kuyucukları ise enzim, sSringaldehit ve tampon çözelti içeren blank solüsyonlarıdır (PsLcc2, mediatör ve tampon çözelti). **A:** Dekolorizasyon başladıktan 1 saat sonraki görüntüdür. **B:** Dekolorizasyon başladıktan 48 saat sonraki görüntüdür.

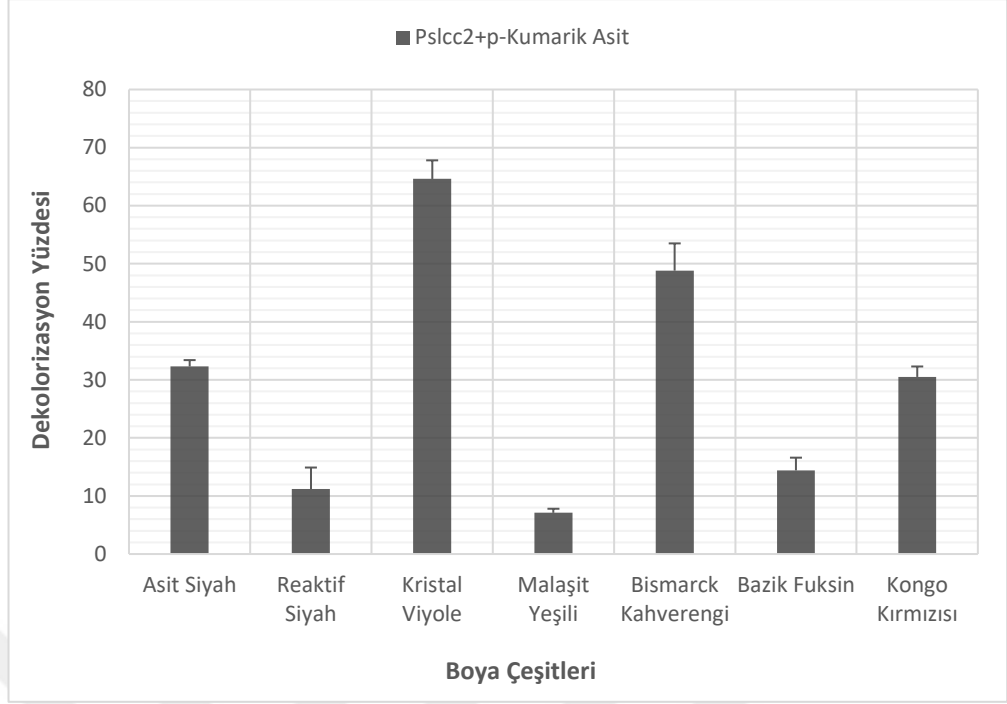
Plate görseli incelendiği zaman C1 ve C2 kuyucuklarında bulunan blank solüsyonlarının PsLcc2-ABTS sisteminin aksine herhangi bir renk oluşumu göstermediği tespit edilmektedir. A satırında bulunan reaktif siyah boyası incelendiği

zaman negatif kontrolde herhangi bir renk değişimi gözlenmezken Rekombinant Lakkaz PsLcc2-Sringaldehit sisteminin bulunduğu A1 ve A2 solüsyonlarında %76 dekolorizasyon yüzdesinden kaynaklanan bir renk açılması gözlenmektedir. B satırında bulunan Malaşit Yeşili boyası incelendiğinde yine negatif kontrolde bir renk değişimi gözlenmezken B1 ve B2 solüsyonlarında %97'lik bir dekolorizasyon veriminden kaynaklanan bir renk değişimi gözlenmektedir ve neredeyse blank gibi tamamen saydam hale dönüştüğü tespit edilmektedir. ABTS'nin aksine diğer boyalarda da negatif kontrol için hazırlanan hiçbir solüsyonda çökeltme oluşumu gözlenmemiştir.

PsLcc2-ABTS ve PsLcc2-Sringaldehit sistemleri karşılaştırıldığı zaman; farklı boyalarda farklı verimler elde edildiğinden dolayı (bazıları ABTS ile verimli sonuç verirken bazıları Sringaldehit ile daha verimli sonuçlar vermiştir) boya çeşidine göre mediatör kullanımının gerekli olduğu sonucuna ulaşılabilir. Yani PsLcc2 için kullanılan substrata göre oluşturulacak LMS belirlenmelidir. Ayrıca PsLcc2-ABTS sisteminin renkli bir ürün oluşturması ama PsLcc2-Sringaldehit sisteminin renksiz ürünler oluşturması da dikkat edilmesi gereken bir diğer husustur. Kullanım alanına ve amacına göre renksiz solüsyon oluşumu tercih sebebi olabilecektir.

#### **3.4.3.2 Rekombinant Lakkaz PsLcc2-p-Kumarik Asit Sisteminin Dekolorizasyon Performansı**

ABTS ve Sringaldehit ile yapılan dekolorizasyon çalışmalarının ardından üçüncü bir mediatör olarak Sringaldehit gibi yaygın kullanılan ve doğal bir mediatör olan p-Kumarik asit ile boya giderme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Daha önce yapılan dekolorizasyon çalışmaları ile aynı protokol uygulanarak yedi boya üzerinde renk giderme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Spektrofotometrik ölçümler ile yapılan dekolorizasyon analizi sonuçları ile reaksiyon görselleri aşağıdaki şekillerde (şekil 3.18 ve şekil 3.19) sunulmuştur.



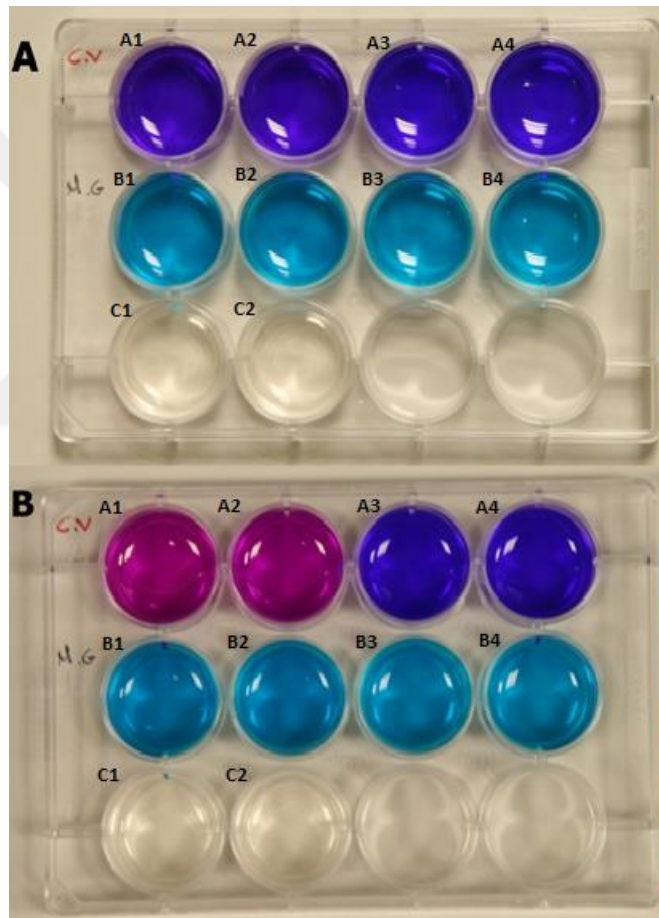
**Şekil 3.18:** Rekombinant Lakkaz PsLcc2-p-Kumarik Asit sistemi ile yapılan dekoorizasyon çalışmasının 7 boya için 48 saat sonundaki sonuçları

p-Kumarik Asit ile yapılan dekolozizasyon çalışmasının sonuçları değerlendirildiği zaman en yüksek dekolozizasyon oranına Kristal Viyole boyasıyla ulaşıldığı gözlenmektedir (%64.8). Bu oran ABTS ile ulaşılan maksimum verim olan %100 dekolozizasyon oranı ve Sringaldehit ile ulaşılan maksimum oran olan %97 değerleri düşünüldeği zaman oldukça düşük kalmaktadır. Ayrıca Rekombinant Lakkaz PsLcc2-ABTS sisteminde 7 boyanın 6 tanesi ve PsLcc2-Sringaldehit sisteminde 7 boyadan 5 tanesi %50'den fazla dekolozizasyona uğrarken PsLcc2-p-Kumarik Asit ile yapılan bu çalışmada sadece 1 boya %50'den fazla dekolozizasyona uğramıştır. Bu veriler ışığında PsLcc2-p-Kumarik asit sisteminin üç mediatör arasındaki söz konusu 7 boya için en verimsiz sistem olduğu tespit edilmiştir.

7 boya üzerindeki sonuçlara bakıldığında en verimsiz mediatör p-Kumarik Asit olarak gözükse de Bismarck Kahverengi boyası ele alındığı zaman %48.8 oranı ile en yüksek dekolozizasyon veriminin p-Kumarik Asit mediatörü ile sağlandığı görülmektedir. Bunun dışında asit siyah için de p-Kumarik Asit mediatörünün Sringaldehite göre daha fazla boya renk giderimi sağlandığı görülmektedir.

PsLcc2-ABTS ve PsLcc2-Sringaldehit sistemlerinin oldukça verimli çalıştığı ve 48 saat sonunda iki sistemin de %90'ın üzerinde dekolorizasyon başarısı sağladığı bir boya olan Malaşit Yeşili için p-Kumarik Asit oldukça yetersiz kalmıştır ve 7 boya içerisindeki en düşük dekolorizasyon verimi Malaşit Yeşilinde gözlenmiştir.

p-Kumarik Asit sisteminin ortaya koyduğu sonuçlar da mediatör kullanımının substrat çeşidine göre spesifik olarak belirlenmesi gerektiğini göstermiştir. Şekil 3.19 üzerinde en verimli dekolorizasyon gözlenen boya olan Kristal Viyole ve en verimsiz dekolorizasyon gözlenen boya olan Malaşit Yeşili boyalarının reaksiyon görüntüleri verilmiştir.



**Şekil 3.19:** Kristal Viyole ve Malaşit Yeşili boyalarının dekolorizasyon çalışması görüntüleri. Plaka üzerindeki kuyucuklardan A1,A2 Kristal Viyole ve enzim-p-Kumarik Asit sisteminin bulunduğu reaksiyon ortamıdır (PsLcc2, Kristal Viyole, Malaşit Yeşili, tampon çözelti); A3,A4 kuyucukları Kristal Viyole, p-Kumarik Asit ve tampon çözelti içeren negatif kontroldür (boya, mediatör ve tampon çözelti); B1,B2 Malaşit Yeşili ve enzim-p-Kumarik Asit sisteminin (enzim, mediatör, boya ve tampon çözelti); B3, B4 kuyucukları Malaşit Yeşili, mediatör ve tampon çözelti içeren negatif kontrol solüsyonlarını içermektedir (boya, mediatör ve tampon çözelti).

mediatör, tampon çözelti); C1, C2 kuyucukları ise enzim, p-Kumarik Asit ve tampon çözelti içeren blank solüsyonlarıdır (enzim, mediatör ve tampon çözelti). **A:** Dekolorizasyon başladıktan 1 saat sonraki görüntüdür. **B:** Dekolorizasyon başladıktan 48 saat sonraki görüntüdür.

Şekil 3.19 incelendiği zaman A1 ve A2 kuyucuklarında bulunan *PsLcc2*-p-kumarik asit sisteminin kristal viyole üzerindeki dekolorizasyon verimi açık şekilde görülmektedir. A3 ve A4 kuyucuklarındaki negatif kontrol üzerinde herhangi bir renk değişimi gözlenmezken A1 ve A2 kuyularındaki solüsyonların renklerinde açılma olduğu gözlenmektedir. B sırasındaki malaşit yeşili boyası incelendiğinde ise herhangi bir renk değişimi oluşmadığı açık şekilde gözükmektedir. %7.1 oranında ölçülen dekolorizasyon yüzdesinin malaşit yeşili üzerinde renk değişimi oluşturmaya yeterli olmadığı görülmektedir. Bu çalışmada kullanılan p-kumarik asit mediatörü de srinaldehit gibi *PsLcc2* ile oluşturduğu etkileşim sonucu renksiz bir solüsyon oluşturmaktadır. Bu açıdan ABTS'ye göre avantajlı gibi görünse de kristal viyole dışında verimli çalıştığı boya tespit edilememiştir.

#### **3.4.3.3 Dekolorizasyon Çalışmalarının Kendi Aralarında Kıyaslanması**

Dekolorizasyonun gerçekleştiği reaksiyon ortamları düşünüldüğünde sadece enzimin kullanıldığı ve enzim ile beraber mediatör olarak da 3 farklı mediatörün (ABTS, Srinaldehit, p-Kumarik asit) kullanıldığı toplam 4 farklı reaksiyon ortamı oluşturulmuştur. Mediatörler, enzimin dekolorizasyon verimini ciddi ölçüde arttırsa da her boya çeşidi için gösterdikleri etki farklı olmuştur.

Asit Siyahı boyası için lakkaz enzimi tek başına 48 saatlik reaksiyon sonunda %25.7 oranında dekolorizasyon verimi sağlarken ABTS mediatörü ile %100'lük bir verim sağlanmıştır. Srinaldehit kullanılarak dekolorizasyon verimi %41.1, p-Kumarik asitle ise %32.3 olarak belirlenmiştir. Buna göre ABTS ile 3.89 kat, Srinaldehit ile 1.6 kat ve p-Kumarik asit ile 1.26 kat dekolorizasyon veriminde artış sağlandığı gözlenmiştir.

Reaktif Siyah boyasında *PsLcc2* tek başına %5.1 dekolorizasyon performansı gösterirken bu oran ABTS mediatörü ile %94.5'e, Srinaldehit mediatörü ile %76'ya ve p-Kumarik asit mediatörü ile %11.2'ye yükselmiştir. Bu sonuçlar incelendiğinde ABTS ile 18.5 kat, Srinaldehit ile 14.9 kat ve p-Kumarik asit ile 2.2 kat dekolorizasyon yüzdelinde artış olduğu gözlenmiştir.

Kristal Viyole boyası için PsLcc2 mediatörsüz ortamda %6.7 renk giderimi sağlarken ABTS mediatörü ile birlikte %78.6 oranında, Sringaldehit ile birlikte %81 oranında ve p-Kumarik asit ile birlikte %64.6 dekolorizasyon sağlamıştır. Bu sonuçlara göre ABTS ile 11.7 kat, Sringaldehit ile 12.1 kat ve p-Kumarik asit ile 9.6 kat dekolorizasyon veriminde artış sağlandığı gözlenmektedir.

Malaşit Yeşili ele alındığında ise tek başına PsLcc2 %42.3 oranında dekolorizasyon sağlarken ABTS mediatörü ile birlikte %93.7 oranında renk giderimi sağlanmıştır. Bu oran sringaldehit ile birlikte %97 olarak kumarik asit ile birlikte %7.1 olarak ölçülmüştür. Buna göre ABTS mediatörü 2.2 kat, sringaldehit mediatörü 2.3 kat artışa sebep olmuştur. Kumarik asit ise 6 kat (0.17 kat artış) dekolorizasyon veriminde azalışa sebep olmuştur.

Bismarck Kahverengi için PsLcc2 tek başına %12 oranında bir dekolorizasyon sağlarken ABTS mediatörü ile birlikte %28.4, Sringaldehit ile birlikte 46.2, p-Kumarik asit ile %48.8 oranlarında bir renk giderimi performansı göstermiştir. Bu değerlere göre ABTS kullanıldığında 2.4 kat, Sringaldehit kullanıldığında 3.85 kat ve p-Kumarik asit kullanıldığında ise 4.1 kat renk giderme veriminde artış sağlanmıştır.

PsLcc2 tek başına kullanıldığında Bazik Fuksin boyası üzerinde %3.2 oranında dekolorizasyon sağlarken ABTS mediatörü ile birlikte %84, Sringaldehit ile %72.5 oranında ve p-Kumarik asit ile %14.4 verim sağlanmıştır. Buna göre ABTS ile 26 kat, Sringaldehit ile 22.6 kat ve p-Kumarik asit ile 4.5 kat dekolorizasyon veriminde artış sağlandığı gözlenmektedir.

Kongo Kırmızısı için tek başına PsLcc2 dekolorizasyon verimi %3.5 olarak ölçülürken ABTS mediatörü ile birlikte bu oran %90.2'ye yükselmiştir. Sringaldehit ile %66.4 oranında, p-Kumarik asitle ise %30.5 oranında renk giderimi sağlanmıştır. Bu oranlar göz önünde bulundurulduğunda ABTS 25.7 kat, Sringaldehit 19 kat ve p-Kumarik asit 8.7 kat dekolorizasyon veriminde artışa sebep olmuştur. Bu sonuçlar incelendiği zaman mediatörün her boya üzerinde farklı etkilere neden olduğu anlaşılmaklade birlikte Çizelge 3.1'de görüleceği gibi mediatör kullanımı, PsLcc2 dekolorizasyon performansını bir hayli artırmıştır.

**Çizelge 3.1:** Mediatör bulunan reaksiyon ortamlarının sadece enzim bulunan reaksiyonlara göre dekolorizasyon artış oranları

Boya	Dekolorizasyon Yüzdelerindeki Artış		
	ABTS	Sringaldehit	Kumarik Asit
Asit Siyahı	3.89 kat	1.6 kat	1.26 kat
Reaktif Siyah	18.5 kat	14.9 kat	2.2 kat
Kristal Viyole	11.7 kat	12.1 kat	9.6 kat
Malaşit Yeşili	2.2 kat	2.3 kat	0.17 kat
Bismarck Kahverengi	2.4 kat	3.85 kat	4.1 kat
Bazik Fuksin	26 kat	22.6 kat	4.5 kat
Kongo Kırmızısı	25.7 kat	19 kat	8.7 kat

Dekolorizasyon verimleri kendi aralarında kıyaslandığı zaman yüzde olarak en fazla artışın Bismarck kahverengi boyasında ABTS mediatörü kullanılarak elde edildiği görülmektedir. En az artış ise Asit Siyah boyasında p-Kumarik asit mediatörü ile elde edilmiştir. Bunun yanında p-Kumarik Asit, Malaşit Yeşili üzerinde renk giderimi verimini azaltıcı bir etki göstermiştir. Sadece enzimin gösterdiği dekolorizasyon performansı dikkate alındığında p-Kumarik asit %83.2 oranında bir azalmaya sebep olmuştur. Bunun haricinde diğer bütün reaksiyonlarda her mediatör dekolorizasyon yüzdesinde artışa sebep olmuştur.

### **3.5 Dekolorizasyon Çözeltilerinin Ames Testi ile Mutajenite ve Toksisitelerinin Belirlenmesi**

Boyalar üzerindeki dekolorizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra bu boyaların mutajenik özelliklerinde nasıl değişimler oluştuğunu belirlemek amacıyla Ames Testi testi uygulanmıştır. Bu çalışma kapsamında boya üzerinde değişim olmayan negatif kontrolde bulunan solüsyonlardan ve PsLcc2-ABTS sistemi tarafından dekolorizasyona uğrayan solüsyonlardan örnekler alınarak karşılaştırma yapılmıştır.

Mutajenite testinde özel olarak geliştirilmiş histidin oksotrofinine sahip mutant suş olan ATCC 29631 (TA 1538) olarak kodlanmış hücreler kullanılmıştır. Bu hücrelerin sahip olduğu Rfa mutasyonundan dolayı normalde hücre içine girmeyecek büyüklükteki Kristal Viyole gibi moleküller, hücre duvarındaki lipopolisakkarit tabakanın eksilmesinden dolayı hücre içine girebilmektedir. Eğer hücre içine giren madde mutajen bir etkiye sahipse hücrede mutasyon oluşmasına sebep olarak histidin oksotrofininin ortadan kalkmasına sebep olmaktadır. Bu özelliğin test edilmesi amacıyla 1 mg/mL konsantrasyonundaki Kristal Viyole boyası kullanılmıştır. Bunun yanında mutajen olmayan bir madde olarak steril distile su kullanılmıştır. Ayrıca TA 1538 için mutajen olduğu bilinen 4- Nitro-o-Fenilendiamine (4-NPD) pozitif mutajen madde olarak kullanılmıştır. Bu mutant hücreler histidine üretme yeteneklerini, sahip oldukları mutasyondan dolayı kaybettikleri için ortamda mutajen madde varlığında bu özelliği geri kazanma olasılıklarında bir artış olmaktadır. Yani mutajen madde etrafında histidine üretebilen hücrelerde artış oluşmaktadır.

Test sırasında kontrol olarak kullanılan petri kabına toksik madde olarak Kristal Viyole, mutajen madde olarak 4-NPD, zararsız madde olarak su konulmuştur. Bunun yanında, dekolorizasyon sonucu elde edilen negatif kontrollerdeki boyalar ve PsLcc2 ile reaksiyona giren ortamdan alınan örnek solüsyonlar başka petri kaplarında kullanılmıştır. Bu örnekler Whatman disklerine emdirilerek hücre bulunan besiyerine konulmuşlardır.

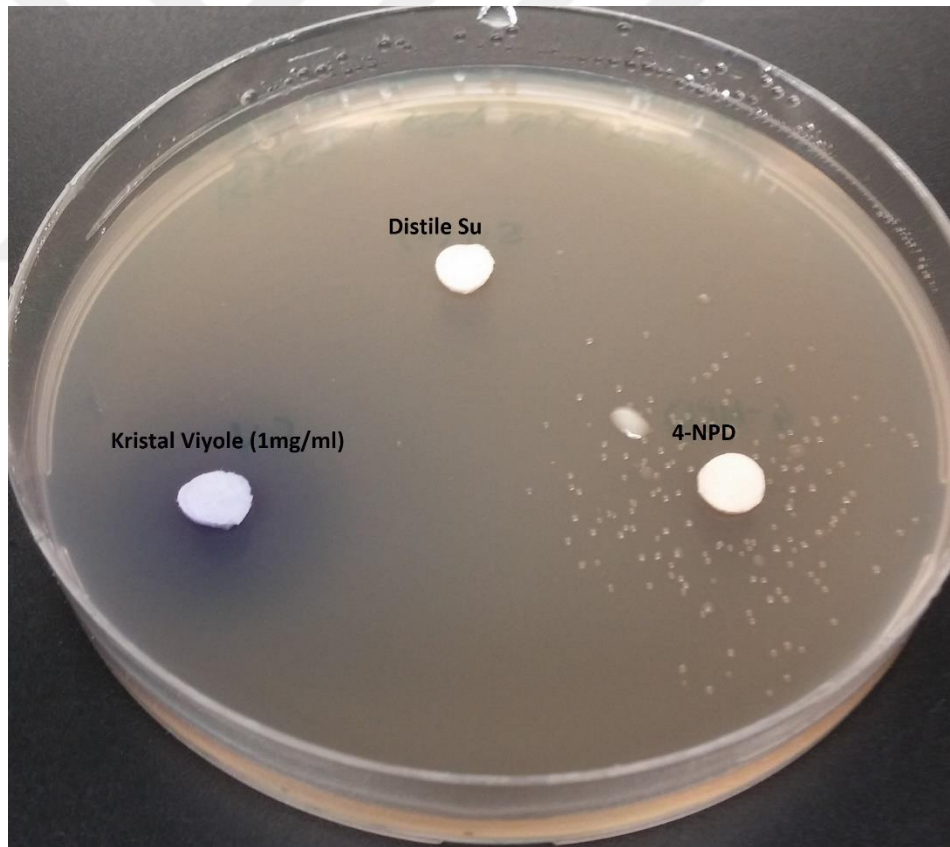
Yapılan mutajenite/toksisite testi sonucunda toksik madde olarak kullanılan Kristal Viyole etrafında hücrelerin büyümediği bir zon oluşumu gözlenmiştir. Bu durum ortama konulan boyaların hücre içine girerek genetik mutasyonlar oluşturabileceğini göstermiştir.

Kontrol olarak kullanılan petri kabında pozitif mutajen madde olan 4-NPD etrafında yüksek miktarda koloni oluşumu gözlenirken negatif kontrol olarak kullanılan distile su etrafında spontan koloniler dışında koloni miktarında anlamlı bir artış olmadığı gözlenmiştir (Şekil 3.20).

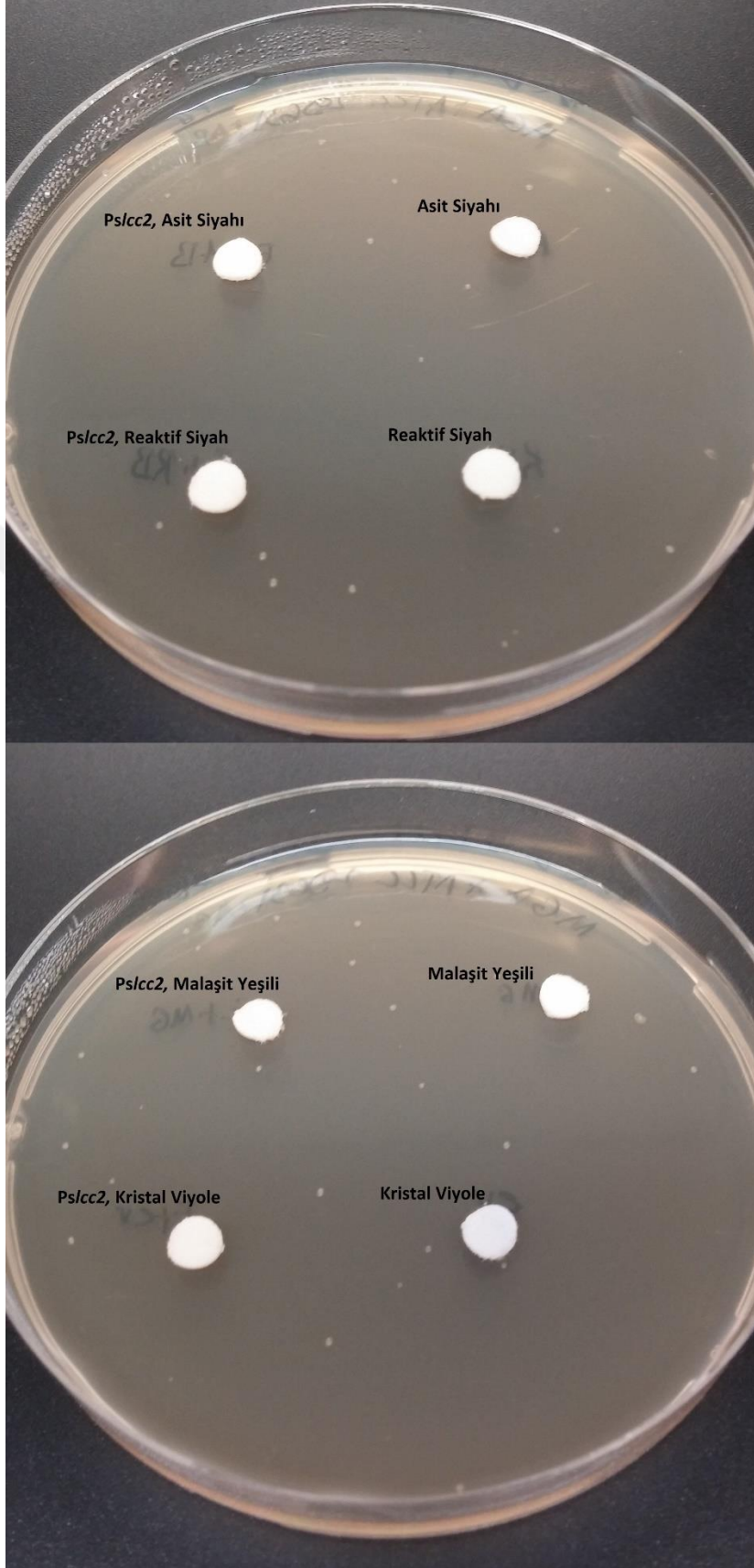
PsLcc2 ile muamele edilmiş boyalar incelendiğinde dekolorizasyon sonucu oluşan solüsyonların etrafında da spontan koloniler dışında koloni oluşumu gözlenmemiştir (Şekil 3.21 – 3.22). Bu sonuç göz önünde bulundurulduğunda bu solüsyonların

distile su gibi davrandığı ve herhangi bir mutajen etki göstermedikleri belirlenmiştir. Sonuç olarak PsLcc2 ile gerçekleştirilen dekolorizasyon çalışmaları sonucunda renk giderimi sağlanırken mutajen özellik gösteren bir yan ürün oluşumu meydana gelmemektedir.

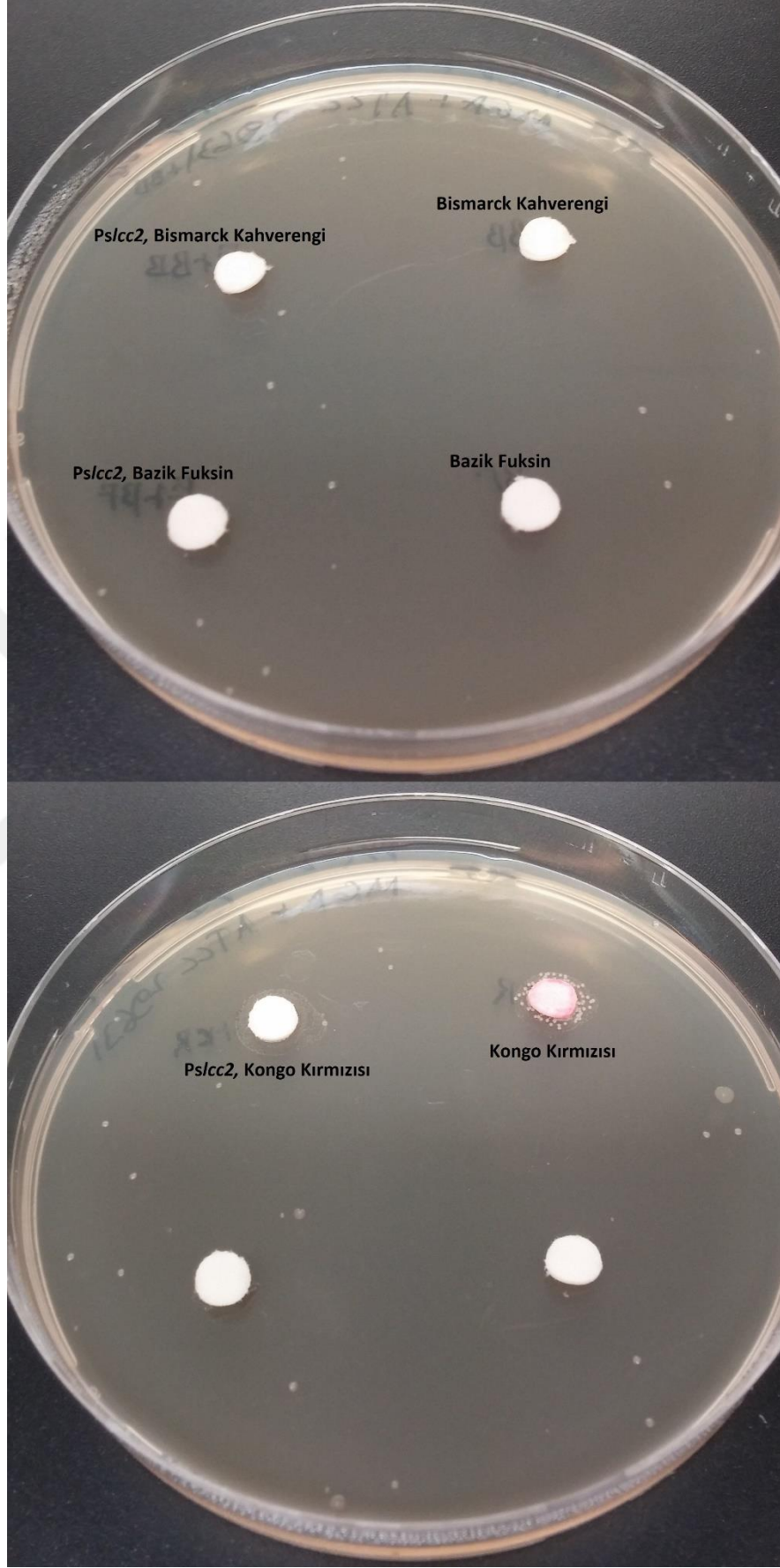
Buna ek olarak enzim ile muamele edilmeyen boyalardan Kongo Kırmızısı dışındaki boyaların etrafında da koloni artışı gözlenmemiştir (Şekil 3.21 – 3.22). Bu sonuç değerlendirildiğinde Kongo Kırmızısı dışındaki boyaların da mutajenik bir etki göstermediği belirlenmiştir. Ancak Kongo Kırmızı etrafında belirgin şekilde koloni miktarında artış gözlenmiştir (Şekil 3.22). Bu durum göz önünde bulundurulduğunda normalde mutajenik bir etkiye sahip olan Kongo kırmızısı boyasının PsLcc2 ile muamelesi sonucunda mutajenik aktivitesini kaybettiği zararsız bir ürüne dönüştüğü görülmüştür.



Şekil 3.20: Distile Su, 4-NPD ve Kristal Viyole solüsyonları bulunan Ames testi kontrol petri kabı



Şekil 3.21: PsLcc2 ile muamele edilmiş ve muamele edilmemiş boya solusyonlarının bulunduğu Ames testi petri kapları



**Şekil 3.21:** PsLcc2 ile muamele edilmiş ve muamele edilmemiş boya solusyonlarının bulunduğu petriler (bazik fuksin, Bismarck kahverengi ve Kongo kırmızısı)



#### 4. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmada *Pycnopus sanguineus* kaynaklı Rekombinant Lakkaz PsLcc2 enziminin boya renk giderim kapasitesi belirlenmiştir. Bu amaçla PsLcc2 enziminin *P. pastoris*'de heterolok üretimi gerçekleştirilmiş ve sonrasında yedi farklı tekstil boyası üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu kapsamda üretilen Rekombinant Lakkaz PsLcc2 enzimi ile birlikte biri sentetik (ABTS) ikisi doğal (Sringaldehit ve p-Kumarik Asit) olmak üzere üç farklı mediatör kullanılarak lakkaz-mediatör sistemi oluşturulmuştur.

Yapılan boya giderme çalışmaları sonucunda söz konusu 7 boya için kullanılan mediatörlerin PsLcc2 enziminin aktivitesini ve boya giderme verimini önemli ölçüde arttırdığı tespit edilmiştir. Kullanılan boyalar iki farklı boya sınıfına dahil olsalar da boyaların dahil oldukları grupların boya giderme üzerinde bir etkisi olmadığı, dekolorizasyon veriminin tamamen substrat özelinde değişkenlik gösterdiği gözlenmiştir. Bunun yanında her mediatörün etkisi substrat olarak kullanılan boya çeşidine göre oldukça değişkenlik göstermiştir. 48 saat süresince uygulanan dekolorizasyon çalışması sonucunda PsLcc2-ABTS sistemi ile maksimum verim Asit Siyah boyasında %100 boya giderme oranı olarak ölçülmüştür. PsLcc2-Sringaldehit sisteminin en verimli çalıştığı boya Malaşit Yeşili olmuştur ve dekolorizasyon yüzdesi %97 olarak tespit edilmiştir. PsLcc2-p-Kumarik Asit sisteminde ise en fazla boya giderimi gözlenen boya %64.6 oranıyla Kristal Viyole olmuştur. Üç LMS kendi içerisinde karşılaştırıldığı zaman genel olarak p-Kumarik Asit mediatörünün diğer iki mediatöre göre daha verimsiz kaldığı gözlenmiştir. Ayrıca PsLcc2-ABTS sisteminin dekolorizasyon sonucu oluşturduğu renkli solüsyon da bu sistemin bazı uygulamalar için bir dezavantaja sahip olabileceğini göstermiştir.

Mediatörlü ve mediatörsüz rekasiyonlardaki renk giderimi verimindeki artış miktarları göz önünde bulundurulduğunda ise ABTS mediatörü ile Bazik Fuksin ve Kongo Kırmızısı boyalarında en fazla artışın sağlandığı gözlenmektedir. . Mediatörsüz ortamda Bazik Fuksin boyası %3.2 oranında dekolorizasyona uğrarken ABTS ile 26 kat dekolorizasyon veriminde artış oluşmuş ve bu oran %84'e çıkmıştır.

Kongo Kırmızısı ise mediatörsüz ortamda %3.5 oranında dekolorizasyona uğrarken ABTS ile 25.7 kat artış sağlanarak dekolorizasyon verimi %90.3'e yükselmiştir. Bunun yanında Malaşit Yeşili üzerinde p-Kumarik Asitin mediatör olarak kullanıldığı reaksiyondaki i dekolorizasyon yüzdesinde mediatörsüz ortama göre azalma olduğu gözlenmiştir. Sadece PsLcc2 kullanılarak %42.3 oranında dekolorizasyon sağlanırken p-Kumarik Asit ile yaklaşık 6 kat azalma olmuş ve bu oran %7.1'e düşmüştür.

Dekolorizasyon çalışmalarının ardından boyaların mutajenite analizleri yapılarak mutajenik özelliklerinin yok edilip edilemediği ve/veya dekolorizasyon sonucu mutajenik yan ürünlerin oluşup oluşmadığı incelenmiştir. Bu amaç doğrultusunda özel geliştirilmiş TA 1538 suşu kullanılmıştır. Yapılan Ames testi çalışmaları sonucunda dekolorizasyona uğrayan boyaların sahip oldukları mutajenik etkinin ortadan kalktığı tespit edilmiştir. Bunun yanında PsLcc2 ile yapılan dekolorizasyon sonucunda mutajen yan ürünlerin oluşmadığı belirlenmiştir.

Tüm bu çalışma sonuçları, hem sağladığı yüksek boya renk giderim verimi ile hem de mutajenik etki gösteren yapıların ortamdaki uzaklaştırma kapasitesi ile, Rekombinant Lakkaz PsLcc2 tekstil atık sularının temizlenmesinde güvenle kullanılabilir umut vaat eden potansiyel bir lakkaz olduğunu ortaya çıkarmıştır. İlerleyen dönemlerde, Rekombinant Lakkaz PsLcc2'nin diğer potansiyel endüstriyel uygulama alanlarının belirlenmesine yönelik çalışmaların gerçekleştirilmesi düşünülmektedir. Bu amaçla, farklı substratlar üzerinde denemeler yapıp farklı lakkaz-mediatör sistemleri oluşturulacaktır. Ayrıca 48 saat sürecinde enzim stabilitesinin ve aktivitesinin etkilenmiş olabileceği düşünüldüğünde enzim immobilizasyonu gibi enzim aktivitesini korumaya yönelik metotlar uygulanarak da yapılan çalışmanın kapsamının genişletilebileceği önerilmektedir.

## KAYNAKLAR

- 1- Polaina J., MacCabe A., (2007), *Industrial Enzymes Structure, Function and Applications*, Hollanda: Springer doi:10.1007/1-4020-5377-0.
- 2- Schmid, A.; Dordick, J. S.; Hauer, B.; Kiener, A.; Wubbolts, M.; Witholt, (2001) B. *Industrial Biocatalysis Today and Tomorrow*, Nature. 409 (6817): 258–268. doi:10.1038/35051736.
- 3- Sun Y, Cheng J (May 2002). "Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review". *Bioresource Technology*. 83 (1): 1–11. doi:10.1016/S0960-8524(01)00212-7. PMID 12058826.
- 4- Kirk O, Borchert TV, Fuglsang CC (August 2002). "Industrial enzyme applications". *Current Opinion in Biotechnology*. 13 (4): 345–351. doi:10.1016/S0958-1669(02)00328-2.
- 5- "Chymosin – GMO Database". GMO Compass. European Union. 10 July 2010. 20 Nisan 2017’de alıntılanmıştır.
- 6- Briggs DE (1998). *Malts and Malting* (1st ed.). London: Blackie Academic. ISBN 978-0412298004.
- 7- Begley CG, Paragina S, Sporn A (March 1990). "An analysis of contact lens enzyme cleaners". *Journal of the American Optometric Association*. 61 (3): 190–4. PMID 2186082.
- 8- Xu F., (2005), Applications of oxidoreductases: Recent progress, *Industrial Biotechnology*, 1 (1): 38-50 doi:10.1089/ind.2005.1.38.
- 9- Yaropolov, A.I., Skorobogat'Ko, O.V., (1996), Laccase: properties, catalytic mechanism, and applicability, *Applied biochemistry and biotechnology*, 49: 257. doi:10.1007/BF02783061.
- 10- Giardina, P, Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S., and Sannia, G., (2009). Laccases. A Never-Ending Story. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Vol. 67, no.3, pp. 369 385.
- 11- De Vries, O. M. H., Kooistra, W. H. C. F., and Wessels, J. G. H. (1986), *J. General Microbiology* 132, 2817-2826.
- 12- Yaropolov, A. I.; Skorobogat'ko, O. V.; Vartanov, S. S.; Varfolomeyev, S. D., (1994) Laccase: Properties, catalytic mechanism, and applicability. *Applied Biochemistry & Biotechnology* 49(3): 257-280.
- 13- Gianfreda, L., Xu, F. and Bollag, J. (1999) Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal* 3, 1–25
- 14- Widsten, P., and Kandelbauer, A., 2008. Laccase applications in the forest products industry: A Review. *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 42, no. 4, pp. 293–307.

- 15- Huttermann, A., Mai, C. and Kharazipour, A. (2001) Modification of lignin for the production of new compounded materials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 387–394.
- 16- Parkinson, N.M., Conyers, C.M., Keen, J.N., MacNicoll, A.D., Smith, I. and Weaver, R.J. (2003) cDNAs encoding large venom proteins from the parasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca* identified by random sequence analysis. *Comp. Biochem. Physiol. C-Toxicol. Pharmacol.* 134, 513–520.
- 17- Alexandre, G. and Zhulin, I.B. (2000) Laccases are widespread in bacteria. *Trends Biotechnol.* 18, 41–42.
- 18- Claus, H. (2004) Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron* 35, 93–96
- 19- Bigny, R., Gaillard, J., and Douce, R. (1986), *Biochemistry Journal* 237,2, 583-588.
- 20- Zonazi, N., Romette, J.-L., and Thomas, D. (1987), *Applied Biochemistry and Biotechnology* 15,3, 213-225.
- 21- Valderrama, B., Oliver, P., Medrano-Soto, A. and Vazquez-Duhalt, R. (2003) Evolutionary and structural diversity of fungal laccases. *Antonie Van Leeuwenhoek* 84, 289–299.
- 22- Kumar, S.V.S., Phale, P.S., Durani, S. and Wangikar, P.P. (2003) Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. *Biotechnology Bioengineering* 83, 386–394.
- 23- Davies, G.J.a.D. (2002) Laccase. *Handbook of Metalloproteins.* (ed A.Messerschmidt, et al.), pp. 1359–1368. John Wiley and Sons, LTD, New York.
- 24- Alcalde M., (2007) Laccases: Biological Functions, Molecular Structure and Industrial Applications, *Industrial Enzymes*, 1,1, 461-476, doi: 10.1007/1-4020-5377-0\_26.
- 25- Xu, F., Berka, R.M., Wahleithner, J.A., Nelson, B.A., Shuster, J.R., Brown, S.H., Palmer, A.E. and Solomon, E.I. (1998) Site-directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profile. *Biochemistry Journal* 334, 63–70.
- 26- Piontek, K., Antorini, M. and Choinowski, T. (2002) Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-angstrom resolution containing a full complement of coppers. *Journal of Biology and Chemistry* 277, 37663–37669.
- 27- RCSB PDB (Protein Data Bank), Text Search for: laccase, <http://www.rcsb.org/pdb/results/results.do?tabtoshow=Current&qrid=34F8F14>
- 28- Morozova, O. V., Shumakovich, G. P., Gorbacheva, M. A., Shleev, S. V., and Yaropolov, A. I., (2007) Blue Laccases, *Biochemistry (Moscow)*, Vol. 72, no. 10, pp. 1136-1150.
- 29- Hakulinen, N., Kiiskinen, L.L., Kruus, K., Saloheimo, M., Paananen, A., Koivula, A. and Rouvinen, J. (2002) Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site. *Nature Struct. Biol.* 9, 601–605.

- 30- Kiiskinen, L.L. and Saloheimo, M. (2004) Molecular cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a laccase gene from the ascomycete *Melanocarpus albomyces*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, pp. 137–144.
- 31- Torres, E., Bustos-Jaimes, I. and Le Borgne, S. (2003) Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Appl. Catal. B-Environ.* 46, 1–15.
- 32- Solomon E, Lowery MD. Electronic Structure Contributions to Function in Bioinorganic Chemistry. *Science.* 1993;259(80-):1575–1581.
- 33- Marcus RA, Sutin N. Electron transfers in chemistry and biology. *Biochim Biophys Acta.* 1985;811:265–322.
- 34- Davies, G.J.a.D. (2002) Laccase. *Handbook of Metalloproteins.* (ed A.Messerschmidt, et al.), pp. 1359–1368. John Wiley and Sons, LTD, New York.
- 35- Thurston, C.F. (1994) The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140, pp. 19–26.
- 36- Gupta N., Leea F.S., Farinas E. T., (2010), Laboratory evolution of laccase for substrate specificity, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62 (3-4), 230-234.
- 37- Couto S.R., Herrera L.T. (2006), Inhibitors of Laccases: A Review, *Current Enzyme Inhibition* 2(4):343-352.
- 38- Bourbonnais, R. and Paice, M.G., *FEBS Lett.*, 1990, vol. 267, no. 1, pp. 99–102
- 39- Bourbonnais, Robert; Leech, Dónal; Paice, Michael G. (1998), "Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* , 1379 (3): 381–390, doi:10.1016/S0304-4165(97)00117-7.
- 40- Jump up Shin, Kwang-Soo; Lee, Yeo-Jin (2000), "Purification and Characterization of a New Member of the Laccase Family from the White-Rot Basidiomycete *Coriolus hirsutus*", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 384 (1): 109–115, doi:10.1006/abbi.2000.2083.
- 41- Bourbonnais, R., Leech, D., and Paice, M.G., *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, vol. 1379, no. 3, pp. 381–390.
- 42- Fabbrini, M., Galli, C., and Gentili, P., *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2002, vol. 16, no. 5, pp. 231–240.
- 43- Morozova O., (2007) *Laccase-mediator systems and their applications: A review*, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 43 (5), 583–597.
- 44- Luong N. Nguyen, Jason P. van de Merwe, Faisal I., (2016) Laccase – syringaldehyde (SA) – mediated degradation of trace organic contaminants (TrOCs) in an enzymatic membrane reactor (EMR): Removal efficiency and effluent toxicity, *Bioresource Technology*, 1-29.
- 45- Meyer H.J. and Norris D.M., Vanillin and Syringaldehyde as Attractants for *Scolytus multistriatus* (Coleoptera: Scolytidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 17 July 1967, Volume 60, Number 4, pages 858-859.

- 46- Camarero S., Canas A., (2008), p-Hydroxycinnamic Acids as Natural Mediators for Laccase Oxidation of Recalcitrant Compounds, *Environ. Sci. Technol.* 42, 6703–6709.
- 47- Yao, Chun-Suo; Lin, Mao; Liu, Xin; Wang, Ying-Hong (2005). "Stilbene derivatives from *Gnetum cleistostachyum*". *Journal of Asian Natural Products Research.* 7 (2): 131–7.
- 48- Couto, S.R., and Herrera, J.L.T., 2006. Industrial and Biotechnological Applications of Laccases, *Biotechnology Advances*, 24, 500–513.
- 49- Minussi, R. C., Pastore, G. M., and Duran, N., 2002. Potential applications of laccase in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 13, 205–216.
- 50- Arora, D.S., and Sharma, R.K., 2010. Ligninolytic Fungal Laccases and Their Biotechnological Applications. *Appl Biochem Biotechnol.*, Vol. 160, no. 6, pp. 1760-1788.
- 51- Widsten, P., and Kandelbauer, A., 2008. Laccase applications in the forest products industry: A Review. *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 42, no. 4, pp. 293–307.
- 52- Sengupta, S., and Singh, B. R., 2003. Natural, “Green” Dyes for the Textile Industry, Technical Report, The Toxics Use Reduction Institute University of Massachusetts Lowell, USA, 2003.
- 53- Enaud, E., Trovaslet, M., Bruyneel, F., Billottet, L., Karaaslan, R., Sener, 2010. A Novel Azoanthraquinone Dye Made Through Innovative Enzymatic Process. *Dyes and Pigments*, 85, 99-108.
- 54- Han, G.H., Shin, H.J., and Kima, S.W., 2008. Optimization of Bio-indigo Production by Recombinant *E. coli* Harboring *fmo* Gene. *Enzyme and Microbial Technology*, 42, 617–623.
- 55- Husain, Q., 2006. Potential Applications of the Oxidoreductive Enzymes in The Ecolorization and Detoxification of Textile and Other Synthetic Dyes from Polluted Water: A Review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 26, 201–221.
- 56- Couto, S.R., and Herrera, J.L.T., 2006. Laccases in the Textile Industry, *Biotechnology and Molecular Biology Review*, Vol. 1, no. 4, pp. 117-122.
- 57- Ong, E., Pollock, W., and Smith, M., 1997. Cloning and sequence analysis of two laccase complementary DNAs from the lignolytic basidiomycete *Trametes versicolor*. *Gene*, 196, 113–119.
- 58- Berka, R.M., Schneider, P., Golightly, E.J., Brown, S.H., Madden, M., Brown, K.M., Halkier, T., Mondorf, K., and Xu, F., 1997. Characterization of the Gene Encoding an Extracellular Laccase of *Myceliophthora thermophila* and Analysis of the Enzyme Expressed in *Aspergillus oryzae*, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 63, no. 8, pp. 3151–3157.
- 59- Martins, L. O., Soares, C. M., Pereira, M. M., Teixeira, M., Costa, T., Jones, G. H., and Henriques, A. O., 2002. Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *J. Biol. Chem.* 277, 18849–18859.

- 60- Dantán-González, E., Vite-Vallejo, O., Martínez-Anaya, C., Méndez-Sánchez, M., González, M. C., Palomares, L. A., and Folch-Mallol, J., 2008. Production of Two Novel Laccase Isoforms by a Thermotolerant Strain of *Pycnoporus sanguineus* Isolated From An Oil-Polluted Tropical Habitat, *International Microbiology*, 11, 163-169.
- 61- Yaver, D.S., Xu, F., Golightly, E. J., Brown, K. M., Brown, S. H., Rey, M. W., Schneider, P., Halkier, T., Mondorf, K., and Dalbége, H., 1996. Purification, Characterization, Molecular Cloning and Expression of two laccase genes from the white rot Basidiomycete *Trametes villosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 834-841.
- 62- Dedeyan, B., Klonowska, A., Tagger, S., Tron, T., Iacazio, G., Gil, G., and Le Petit, J., 2000. Biochemical and Molecular Characterization of a Laccase from *Marasmius quercophilus*, *Applied And Environmental Microbiology*, March, 925–929.
- 63- Kiiskinen, L. L., and Saloheimo, M., 2004. Molecular Cloning and Expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a Laccase Gene from the Ascomycete *Melanocarpus albomyces*, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 70, no. 1, pp. 137–144.
- 64- Giardina, P., Palmieri, G., Scaloni, A., Fontanella, B., Faraco, V., Cennamo, G., and Sannia, G., 1999. Protein and Gene Structure of A Blue Laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochem. J.*, 341, 655-663.
- 65- Mikuni, J, and Morohoshi, N., 1997. Cloning and sequencing of a second laccase gene from the white-rot fungus *Coriolus versicolor*. *FEMS Microbiol Lett*, 155, 79–84.
- 66- Rodgers, C. J., Blanford, C.F., Giddens, S.R., Skamnioti, P., Armstrong, F.A. and Gurr, S.J., 2010. Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes, *Trends in Biotechnology*, Vol.28, no.2, pp.63-72.
- 67- Freigassner, M., Pichler, H., and Glieder, A., 2009. Tuning microbial hosts for membrane protein production. *Microbial Cell Factories*, 8, 69-91.
- 68- Idiris, A., Tohda, H., Kumagai, H., and Takegawa, K., 2010. Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production, *Appl Microbiol Biotechnol*, 86, 403–417.
- 69- Cereghino, J.L., and Cregg, J.M., 2000. Heterologous Protein Expression in the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 45-66.
- 70- Daly R, Hearn MT (2005). "Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production". *J. Mol. Recognit.* 18 (2): 119–38. doi:10.1002/jmr.687.
- 71- De Schutter K.; Lin Y.-C.; Tiels P; et al. (2009). "Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*". *Nature Biotechnology*. 27 (6): 561–566 .
- 72- Cregg JM, Tolstorukov I, Kusari A, Sunga J, Madden K, Chappell T (2009). "Expression in the yeast *Pichia pastoris*". *Meth. Enzymol. Methods in Enzymology*. 463: 169–89. doi:10.1016/S0076-6879(09)63013-5.

- 73- Brondyk WH (2009). "Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein". *Meth. Enzymol. Methods in Enzymology*. 463: 131–47. doi:10.1016/S0076-6879(09)63011-1.
- 74- Uzan, E., Nousiainen, P., Balland, V., Sipila, J., Piumi, F., Navarro, D., Asther, M., Record, E., and Lomascolo, A., 2010. High redox potential laccases from the ligninolytic fungi *Pycnoporus coccineus* and *Pycnoporus sanguineus* suitable for white biotechnology from gene cloning to enzyme characterization and applications. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 2199-2213.
- 75- Smânia Jr, A., Marques, C. J. S., Smânia, E. F. A., Zanetti, C. R., Carobrez, S. G., Tramonte, R. and Loguercio-Leite, C., 2003. Toxicity and Antiviral Activity of Cinnabarin Obtained from *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. *Phyther. Res.*, 17, 1069–1072.
- 76- Lu, C., Wang, H., Luo, Y., and Guo, L., 2010. An efficient system for predelignification of gramineous biofuel feedstock in vitro: Application of a laccase from *Pycnoporus sanguineus* H275. *Process Biochem.*
- 77- More S., Renuka P. S., (2011), Isolation, Purification, and Characterization of Fungal Laccase from *Pleurotus* sp., *Enzyme Research*, 2011(7), doi:10.4061/2011/248735.
- 78- O'Callaghan, J., O'Brien, M. M., McClean, K., and Dobson, A. D. V., 2002. Optimisation of the expression of a *Trametes versicolor* laccase gene in *Pichia pastoris*. *Journal of Industrial Microbiol. and Biotech*, 29, 55-59.
- 79- White C., (1999), Fermentation Timeline, *Brew Your Own*, 99(1).
- 80- Majeau, J-A., Brar, S.K., and Tyagi, R.D., 2010. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants, *Bioresource Technology*, 101, 2331–2350.
- 81- Loosera V., Bruhlmann B., (2015), Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review, *Biotechnology Advances*, 33(6), 1177–1193.
- 82- Collins, PJ and Dobson, ADW, 1997. Regulation of Laccase Gene Transcription in *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(9): 497-499.
- 83- Wingfield P. T., (2001), Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate, *Curr Protoc Protein Sci.*, doi: 10.1002/0471140864.psa03fs13.
- 84- Timasheff SN, Arakawa T. membrane protein purification Stabilization of protein structure by solvents. In: Creighton TE, editor. *Protein Structure: A Practical Approach*. 2nd. Oxford: IRL Press at Oxford University Press; 1997. pp. 349–364.
- 85- Warren J.C., Cheatum S.G., (1966), Effect of Neutral Salts on Enzyme Activity and Structure, *Biochemistry*, 5(5), 1702–1707.
- 86- Puvaneswari, Muthukrishnan J., Gunasekaran P., (2006), Toxicity assessment and microbial degradation of azo dyes, *Indian J Exp Biol*. 44(8):618-26.
- 87- Paprocki A., Heldiane S., Paulo S., (2010), Ozonation of azo dye acid black 1 under the suppression effect by chloride ion, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21(3) <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532010000300009>.
- 88- Ogugbue C.J., Sawidis T., (2011), Bioremediation and Detoxification of Synthetic Wastewater Containing Triarylmethane Dyes by *Aeromonas*

- hydrophila Isolated from Industrial Effluent, *Biotechnology Research International*, <http://dx.doi.org/10.4061/2011/967925>.
- 89- Kandela I.K., Bartlett J.A., Indig G.L., (2002), Effect of molecular structure on the selective phototoxicity of triarylmethane dyes towards tumor cells, *Photochem Photobiol Sci*, 1(5): 309-14.
- 90- Garcia T.A., Santiago M.F., Ulhoa C.J., (2006), Properties of laccases produced by *Pycnoporus sanguineus* induced by 2,5-xylidine. *Biotechnol Lett*. 28(9):633-6.
- 91- Bisswanger H., (2014), Enzyme assays, *Perspectives in Science*, 1(6);41–55.
- 92- Gür G., (2010), *Cloning of the Laccase cDNA's From Pycnoporus sanguineus MUCL 38531, Expression in Pichia pastoris and Characterization of Recombinant Laccases* (Doktora tezi). İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- 93- Url1: <[http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/ppicz\\_man.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/ppicz_man.pdf)>, erişim tarihi: 28.03.2017.
- 94- Url2:<[http://www.merckmillipore.com/TR/tr/product/Amicon-Ultra-15-Centrifugal-Filter-Units,MM\\_NF-C7715?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com.tr%2F&bd=1#overview](http://www.merckmillipore.com/TR/tr/product/Amicon-Ultra-15-Centrifugal-Filter-Units,MM_NF-C7715?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com.tr%2F&bd=1#overview)> erişim tarihi: 07.04.2017.
- 95- Url3:< <http://www.worlddyevariety.com>> erişim tarihi: 02.03.2016.



## **EKLER**

- Ek E.1** : Besiyeri İçerikleri ve Hazırlanışı
- Ek E.2** : Tampon Çözeltiler ve Solüsyonlar
- Ek E.3** : Kimyasallar
- Ek E.4** : Laboratuvar Ekipmanları



## **EK E.1: Besiyeri İçerikleri ve Hazırlanışı**

### **2xYT Besiyeri (1000mL)**

Tripton 16 g  
Maya Ekstresi 10 g  
NaCl 5 g  
Agar 15 g  
Distile Su (toplam hacim 1000 mL olana kadar)  
15 dk 121 C<sup>0</sup> otoklav yapılarak hazırlandı.

### **Maya Ekstresi, Pepton, Dekstroz Besiyeri (YPD) (1000 mL)**

Maya Ekstresi 1 %  
Pepton 2 %  
Dekstroz (D-glukoz) 2 %  
10 g maya ekstresi ve 20 g pepton 900 mL su içerisinde çözüldükten sonra 15 dk 121 C<sup>0</sup>'de otoklav yapılır. Ardından 100 mL filtre sterilizasyonu yapılmış %20'lik dekstroz çözeltisi ilave edilir.

### **Zeocine ilaveli Maya Ekstresi, Pepton, Dekstroz, Sorbitol Besiyeri (YPDS) (1000 mL)**

Maya Ekstresi 1 %  
Pepton 2 %  
Dekstroz (D-glukoz) 2 %  
Sorbitol 1 M  
Zeocin™ 100 µg/ml  
10 g maya ekstresi, 20 g pepton ve 182.2 g sorbitol, 900 mL su içerisinde çözüldükten sonra katı besiyeri oluşturmak için 20 g agar eklenir ve 15 dk 121 C<sup>0</sup>'de otoklav yapılır. Ardından 100 mL filtre sterilizasyonu yapılmış %20'lik dekstroz çözeltisi ilave edilir ve 1.0 mL 100 mg/mL Zeocine eklenir.

### **Minimal Dekstroz Besiyeri (1000 mL)**

YNB (yeast nitrogen base) 1.34 %  
Biyotin 4 x 10<sup>-5</sup> %  
Dekstroz 2 %  
13.4 g YNB 900 mL su içerisinde çözüldükten sonra 15 g agar eklenir ve 15 dk 121 C<sup>0</sup>'de otoklav yapılır. Ardından 100 mL filtre sterilizasyonu yapılmış %20'lik dekstroz çözeltisi ve 2 mL filtre sterilizasyonu yapılmış 500x biyotin ilave edilir.

### **Minimal Metanol Besiyeri (1000 mL)**

YNB (yeast nitrogen base) 1.34 %  
Biyotin 4 x 10<sup>-5</sup> %  
Metanol 0.5 %  
13.4 g YNB 993 mL su içerisinde çözüldükten sonra 15 g agar eklenir ve 15 dk 121 C<sup>0</sup>'de otoklav yapılır. Ardından 5 mL filtre sterilizasyonu yapılmış metanol ve 2 mL filtre sterilizasyonu yapılmış 500x biyotin ilave edilir.

### **Tamponlanmış Kompleks Gliserol Besiyeri, BMGY (1000 mL)**

YNB (yeast nitrogen base) 1.34 %  
Maya Ekstresi 1 %

Pepton 2 %

100 mM potasyum fosfat tampon çözeltisi, pH 6.0

Biyotin  $4 \times 10^{-5}$  %

Glycerol 1 %

10 g maya ekstresi, 20 g pepton, 13.4 g YNB 890 mL distile su içerisinde çözüldükten sonra 15 dk 121 C<sup>0</sup>'de otoklav yapılır. Ardından steril 1 M, pH=6.0 potasyum fosfat tampon çözeltisi, 2 mL filtre sterilizasyonu yapılmış 500x biyotin ve 10 mL gliserol ilave edilir.

#### **Tamponlanmış Kompleks Metanol Besiyeri, BMMY (1000 mL)**

YNB (yeast nitrogen base) 1.34 %

Maya Ekstresi 1 %

Pepton 2 %

100 mM potasyum fosfat tampon çözeltisi, pH 6.0

Biyotin  $4 \times 10^{-5}$  %

Metanol 0.5 %

Alanin 0.3 %

2mM CuSO<sub>4</sub>

10 g maya ekstresi, 20 g pepton, 13.4 g YNB 890 mL distile su içerisinde çözüldükten sonra 15 dk 121 C<sup>0</sup>'de otoklav yapılır. Ardından steril 1 M, pH=6.0 potasyum fosfat tampon çözeltisi, 2 mL filtre sterilizasyonu yapılmış 500x biyotin ve 5 mL metanol ilave edilir.

#### **Üst Agar (Top Agar) (100 mL)**

Agar 0.6 g

NaCl 0.5 g

0.6 agar ve NaCl 0.5 g 100 mL distile su içerisine ilave edildikten sonra 15 dk 121 C<sup>0</sup>'de otoklav yapılır.

#### **Minimal Glukoz Agar, MGA plakları (1000 mL)**

Agar 15g

50 x VB tuz çözeltisi 20 mL

Glukoz çözeltisi (% 20'lik) 100 mL

15 g agar ve 20 mL 50x VB tuz çözeltisi 880 mL su içerisine ilave edilir ve 15 dk 121 C<sup>0</sup>'de otoklav yapılır. Ardından %20'lik steril glukoz çözeltisi ilave edilir.

#### **Histidin/Biyotin Agar (HB Agar) (1000 mL)**

Agar 15 g

50 x VB tuzları 20 ml

% 20'lik glukoz çözeltisi 100 ml

Steril histidin HCl H<sub>2</sub>O (% 0.5) 10 ml

Steril 0.5 mM Biyotin 6 ml

15 g agar 864 mL distile su içerisine ilave edildikten sonra 50x VB tuzundan 20 mL eklenir ve 15 dk 121 C<sup>0</sup>'de otoklav yapılır. Ardından 100 mL steril 20%'lik glukoz çözeltisi, steril 10 mL 0.5%'lik histidin çözeltisi ve steril 6 mL 0.5 mM biyotin çözeltisi ilave edilir.

#### **Nutrient broth (1000 mL)**

Nutrient Broth 25 g

Distile su 1000 mL

25 g Nutrient Broth 100 mL distile su içerisine eklendikten sonra 15 dk 121 C<sup>0</sup>'de otoklav yapılır.

**Nutrient Agar (1000 mL)**

Nutrient Broth 25 g

Agar 15 g

Distile su 1000 mL

25 g Nutrient Broth ve 15 g agar 100 mL distile su içerisine eklendikten sonra 15 dk 121 C<sup>0</sup>'de otoklav yapılır.



## **EK E.2: Tampon Çözeltiler ve Solüsyonlar**

### **1 M Potasyum Fosfat Tampon Çözeltisi, pH 6.0:**

132 ml 1 M  $K_2HPO_4$  ve 868 ml 1 M  $KH_2PO_4$  çözeltileri karıştırılır ve  $pH = 6.0 \pm 0.1$  olduğu kontrol edilir. Ardından 15 dk 121  $C^0$ 'de otoklav yapılır.

### **100 mM Sitrat Tampon Çözeltisi, pH 3.0 (1000 ml):**

820 ml 0.1M sitrik asit mono-hidrat ve 180 ml 0.1M trisodyum sitrat di-hidrat çözeltileri karıştırılır ve  $pH = 3.0 \pm 0.1$  olduğu kontrol edilir. Ardından 15 dk 121  $C^0$ 'de otoklav yapılır.

### **100 mM Sitrat Tampon Çözeltisi, pH 4.0 (1000 ml):**

590 ml 0.1M sitrik asit mono-hidrat ve 410 ml 0.1M trisodyum sitrat di-hidrat çözeltileri karıştırılır ve  $pH = 4.0 \pm 0.1$  olduğu kontrol edilir. Ardından 15 dk 121  $C^0$ 'de otoklav yapılır.

### **100 mM Sitrat Tampon Çözeltisi, pH 6.0 (1000 ml):**

115 ml 0.1M sitrik asit mono-hidrat ve 885 ml 0.1M trisodyum sitrat di-hidrat çözeltileri karıştırılır ve  $pH = 6.0 \pm 0.1$  olduğu kontrol edilir. Ardından 15 dk 121  $C^0$ 'de otoklav yapılır.

### **Vogel-Bonner Minimal Medium Tuzları, 50x VB (1000 ml)**

Magnezyum sülfat (  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  ) 10 g

Sitrik asit monohidrat 100 g

Potasyum fosfat, dibazik (susuz) ( $K_2HPO_4$ ) 500 g

Sodyum amonyum fosfat ( $Na_2HPO_4 \cdot 4H_2O$ ) 175 g

Belirtilen miktarlardaki maddeler 1000 mL distile suda çözüldükten sonra 15 dk 121  $C^0$ 'de otoklav yapılır. Otoklav yapılmadan önce maddelerin çözülmüş olduğuna dikkat edilmelidir.

### **0.5 mM Histidin / Biyotin Çözeltisi:**

D- biyotin (F.W. 247.3 ) 30.9 mg

L-Histidin-HCl (F. W. 191.7 ) 24.0 mg

Distile su 250 ml

30.9 mg biyotin sıcak distile suda çözüldükten sonra 24.0 mg histidine ilave edilir.

0.22  $\mu m$  filtre kullanılarak çözelti steril hale getirilir.

### **Kristal viyole çözeltisi (% 0.1 lik)**

0.1 g kristal viyolo 100 mL distile su içerisinde çözünerek hazırlanır.

### **4- Nitro-o-Fenilendiamine (NPD) çözeltisi**

0.02 g NPD 10 mL DMSO içerisinde çözünerek hazırlanır ve filtre ile steril hale getirilir.

### **Sodyum Azid Çözeltisi**

0.01 g Sodyum Azid, 10 mL distile su içerisinde çözünerek hazırlanır ve filtre ile steril hale getirilir.

**Reaktif Siyah (reactive black 5) Boyası**

Reaktif Siyah 5 mg

Distile Su 10 mL

5 mg boya 10 mL distile su içerisinde çözünerek hazırlanır.

**Asit Siyah (acid black 194) Boyası**

Asit Siyah 5 mg

Distile Su 10 mL

5 mg boya 10 mL distile su içerisinde çözünerek hazırlanır.

**Malaşit Yeşili (malachite green, basic green 4) Boyası**

Malaşit Yeşili 5 mg

Distile Su 10 mL

5 mg boya 10 mL distile su içerisinde çözünerek hazırlanır.

**Kristal Viyole (crystal violet, basic violet 3) Boyası**

Kristal Viyole 5 mg

Distile Su 10 mL

5 mg boya 10 mL distile su içerisinde çözünerek hazırlanır.

**Kongo Kırmızısı (Congo red, direct red 28) Boyası**

Kongo Kırmızısı 5 mg

Distile Su 10 mL

5 mg boya 10 mL distile su içerisinde çözünerek hazırlanır.

**Bismarck Kahverengi (Bismarck brown, basic brown 1) Boyası**

Bismarck Kahverengi 5 mg

Distile Su 10 mL

5 mg boya 10 mL distile su içerisinde çözünerek hazırlanır.

**Bazik Fuksin (basic fuchsin, basic violet 14) Boyası**

Bazik Fuksin 5 mg

Distile Su 10 mL

5 mg boya 10 mL distile su içerisinde çözünerek hazırlanır.

### **EK E.3: Kimyasallar ve Enzimler**

#### **Kimyasallar**

ABTS  
Asetik Asit  
Asit Siyah  
Agar  
Amonyum Sülfat  
Bakır Sülfat pentahidrat  
Bazik Fuksin  
Bismarck Kahverengi  
D-biyotin  
Dekstroz  
di Potasyum hidrojen  
Di- Potasyum hidrojen fosfat  
Disodyum hidrojen fosfat  
Ferulik asit  
Gliserol  
Glisin  
Hidroklorik Asit  
Kongo Kırmızı  
Kristal Viyole  
L- alanin  
Malaşit Yeşili  
Metanol  
Peptone  
Potasyum di hidrojen fosfat  
Reaktif Siyah  
Sodyum Asetat  
Sodyum azid  
Sodyum klorit (NaCl)  
Sodyum dihidrojen fosfat  
Sodyum dodesil sülfat  
Sodyum hidrojen fosfat  
Sodyum hidroksit  
Sorbitol  
Tris aminometan  
Tripton  
Maya Ekstresi  
YNB Yeast nitrogen base  
Zeocin

#### **Enzimler**

*PmeI* Endonükleaz Enzimi

#### **Tedarikçi**

Sigma-Aldrich (Germany)  
Merck (Germany)  
Setaş Kim. San. A.Ş (Türkiye)  
Sigma  
Riedel-deHaen (Germany)  
Merck  
Sigma&Aldrich  
Sigma&Aldrich  
Fluka  
Riedel-de Haën  
Riedel-de Haën  
Merck  
Riedel-de Haen  
Sigma-Aldrich  
Fluka  
Merck  
Merck  
Sigma&Aldrich  
Setaş Kim. San. A.Ş (Türkiye)  
Merck  
Setaş Kim. San. A.Ş (Türkiye)  
Riedel-deHaen  
Bio-Chemika  
Riedel-de Haën, Fluka  
Setaş Kim. San. A.Ş (Türkiye)  
J.T.Baker (USA).  
Merck  
Riedel-de Haën  
Riedel-de Haen  
Sigma-Aldrich  
Merck  
Riedel-de Haen  
Sigma  
Merck  
Sigma  
Sigma  
Sigma  
Invitrogen

#### **Tedarikçi**

Fermantas

#### **Ek E.4:** Laboratuvar Ekipmanları

**Buz makinesi:** AF 10, Scotsman (İngiltere)

**Dengeler:** Precisa XB620C SCS (Almanya), Precisa 125 A SCS (Almanya)

**Derin Dondurucu ve Buzdolapları:** -80°C Heto Ultrafreeze 4410, - 80 °C New Brunswick Scientific U410 Premium (İngiltere), Heto Polar Bear 4410 ultra freezer, JOUAN, 2021 D refrigerator, Arcelik, -20°C Arçelik 209lt,+4°C Arçelik

**Inkübatorler:** Nüve EN400, Nüve EN500

**Laminer Akışlı Kabin:** Biolab FASTER BH-EN2003 (İtalya)

**Manyetik Karıştırıcı ve Isıtıcı :** AGE 10.0164, VELP Scientifica srl.

**Mikropipetler:** Gilson pipetman 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl, Volumate Mettler Toledo 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl, Eppendorf research 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl

**Mikro-plate Okuyucu:** Bio-rad Benchmark Microplate Reader

**Orbital Çalkalayıcı İnkübator:** Shell lab 1575R-2E (ABD), Certomat S II, Product#

886 252 4, B. Braun Biotech International GmbH, Thermo Electron Corporation 430 (ABD)

**Otoklav:** Nüve OT 4060 Steam Sterilizer (Türkiye), Tuttnauer 2540 ML, (İsviçre), Tuttnauer 3870 ELVC (İsviçre)

**pH metre:** MP 220, Mettler Toledo International Inc. Wissenschaftlich-Technische Werstätten

**Profesyonel Dijital Fotoğraf Makinesi:** Canon EOS Dijital Rebel XT, Sigma DC 18-200 mm mercek

**Santrifüj rotoru:** F241.5P, JA-30.50 Ti Beckman Coulter (Almanya)

**Santrifüj:** Beckman Coulter, Microfuge 18 (Almanya), Avanti J-30I Beckman Coulter (Almanya), Allegra™ 25R Centrifuge, Beckman Coulter (Almanya)

**Su banyosu:** Memmert wb-22

**Su Saflaştırma Cihazı:** USF Elga UHQ-PS-MK3, Elga Labwater

**UV-Visible Spektrofotometre:** Perkin Elmer Inst. Lambda 25 (ABD), Shimadzu UV-Pharmaspec 1700 (Japonya)

**Termo-karıştırıcı:** Eppendorf thermomixer comfort (1.5ml)

**Vortex:** Heidolph Raax top (Almanya)

## ÖZGEÇMİŞ



**Ad-Soyad** : Koray MALCI  
**Doğum Tarihi ve Yeri** : 13.04.1991 –  
**Antakya/HATAY**  
**E-posta** : koraymalci@gmail.com

### ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lise:** 2009, Konya Meram Fen Lisesi, Fen Bilimleri
- **Lisans:** 2014, İstanbul Teknik Üniversitesi – İTÜ, Moleküler Biyoloji ve Genetik

### MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 2015 güz döneminde Boğaziçi Üniversitesi'nde bitki genetiği üzerinde çalışmalar yaptı
- 2016 yılında Done Genetik ve Biyoinformatik Ar&Ge şirketinde laboratuvar ve proje uzmanı olarak görev yaptı
- 2017 başından beri Geen Biyoteknoloji Ar&Ge şirketinde proje koordinatörü olarak görevine devam etmektedir.

