



**FARKLI KÜLTÜR ORTAMLARINDA AROMATİK  
BİLEŞİKLERİN BAKTERİYEL LAKKAZ ÜRETİMİ  
ÜZERİNE OLAN ETKİSİNİN GEN VE PROTEİN  
SEVİYESİNDE ARAŞTIRILMASI**

**Selinay Merve KILIÇ**

**Danışman: Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU**  
**Yüksek Lisans Tezi**  
**Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı**  
**2024**  
(Her hakkı saklıdır.)

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

**FARKLI KÜLTÜR ORTAMLARINDA AROMATİK BİLEŞİKLERİN BAKTERİYEL  
LAKKAZ ÜRETİMİ ÜZERİNE OLAN ETKİSİNİN GEN VE PROTEİN  
SEVİYESİNDE ARAŞTIRILMASI**

(Investigation of the Effect of Aromatic Compounds on Bacterial Laccase Production in  
Different Culture Media at the Gene and Protein Levels)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Selinay Merve KILIÇ

Danışman: Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

Erzurum  
Temmuz, 2024

T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

TEZ KABUL VE ONAY TUTANAĞI

FARKLI KÜLTÜR ORTAMLARINDA AROMATİK BİLEŞİKLERİN BAKTERİYEL  
LAKKAZ ÜRETİMİ ÜZERİNE OLAN ETKİSİNİN GEN VE PROTEİN SEVİYESİNDE  
ARAŞTIRILMASI

Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU danışmanlığında, Selinay Merve KILIÇ tarafından hazırlanan bu çalışma, 03/07/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından *Moleküler Biyoloji ve Genetik* Anabilim Dalı *Biyoteknoloji* Bilim Dalı'nda *Yüksek Lisans* tezi olarak *oybirliği / oy çokluğu (3/0)* ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof.Dr. Kenan KARAGÖZ <i>Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi</i>	Aslı ıslak imzalıdır
Danışman:	Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı ıslak imzalıdır
Jüri Üyesi:	Doç.Dr. Mustafa Özkan BALTACI <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı ıslak imzalıdır

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

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

**Prof.Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN**

**Enstitü Müdürü**

Aslı ıslak imzalıdır

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) tarafından Temel Araştırma Projesi kapsamında desteklenmiştir.  
Proje No: FBA-2023-12211

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

## ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek lisans Tezi olarak Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU danışmanlığında sunulan “Farklı Kültür Ortamlarında Metal İyonları ve Aromatik Bileşiklerin Bakteriyel Lakkazın Üretimi Üzerine Olan Etkisinin Gen ve Protein Seviyesinde Araştırılması” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	%5	30
Kuramsal Temeller	%0	30
Materyal ve Metot	%12	35
Araştırma Bulguları ve Tartışma	%6	20
Sonuçlar	%0	20
Tezin Geneli	%9	25

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

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

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Selinay Merve KILIÇ	Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU
<b>3.7.2023</b>	<b>3.7.2023</b>
İmza: Aslı ıslak imzalıdır	İmza: Aslı ıslak imzalıdır

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

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

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

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Araştırma Projeleri kapsamında Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü tarafından FBA-2023-12211 numaralı "Farklı Kültür Ortamlarında Metal İyonları ve Aromatik Bileşiklerin Bakteriyel Lakkaz Üretimine Etkisinin Gen ve Protein Seviyesinde Araştırılması" başlıklı proje ile desteklenmiştir. Bu çalışmaya sağladığı finansal destekten dolayı Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca ilgisini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve bilgi ve deneyimleriyle her zaman yanımda olan, fikirleriyle beni yönlendiren değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU'na saygı ve şükranlarımı sunarım.

Yüksek Lisans öğrenimim süresince tez çalışmalarımı gerçekleştirdiğim Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Araştırma Laboratuvarı için birçok imkânı oluşturan Sayın Prof. Dr. Orhan Erdoğan'a teşekkürlerimi iletirim.

Çalışmalarım esnasında sorularımı asla geri çevirmeyen ve yardımını ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Sayın Doç. Dr. Mustafa Özkan BALTACI'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmalarım sırasında tıkanıdığım yerde yardımını ve desteğini vermekten kaçınmayan değerli arkadaşım Bahri AVCI'ya,

Laboratuvarda ve laboratuvar dışında her zaman yanımda olan, her konuda yardımcım ve destekçim olan, çalışma ve öğrenme aşkıyla herkese ilham ve idol olan yardımsever sevgili ve değerli arkadaşım Rahime ALTINTAS'a,

Maddi manevi anlamda her zaman yanımda hissettiğim, en zor anlarımda beni asla yalnız bırakmayan ve her konuda her zaman tam destekçim olan kıymetli aile üyelerim annem Nuray KILIÇ, babam Muharrem KILIÇ, canım kardeşim Işıl Evrim KILIÇ ve eşim Serkan Tuğrul KILIÇ'a sonsuz minnettarlarımı sunmaktan keyif duyarım.

Selinay Merve KILIÇ

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

## FARKLI KÜLTÜR ORTAMLARINDA AROMATİK BİLEŞİKLERİN BAKTERİYEL LAKKAZ ÜRETİMİ ÜZERİNE OLAN ETKİSİNİN GEN VE PROTEİN SEVİYESİNDE ARAŞTIRILMASI

Selinay Merve KILIÇ

Danışman: Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

**Amaç:** Multi-bakır oksidazlar olarak da bilinen lakkazlar, fenolik-aromatik organik bileşikler ile lignoselüloz yapılı maddeleri okside etme yeteneğine sahiptirler. Endüstriyel ve biyoteknolojik kullanımları geniş ve yaygın olan bu enzimlerin bakteriyel kaynaklı çalışmaları sınırlı olmakla birlikte gelişmeye açıktır. Farklı fermentasyon koşullarında ve çeşitli çevresel şartlara yanıt olarak lakkaz üretiminin ve lakkaz gen ifadesinin artabileceği literatürde belirtilmektedir. Bu tez çalışması kapsamında amaç; termofilik *Bacillus licheniformis* SO7 suşu kullanılarak lakkaz üretimini artırmaya yönelik besiyeri ortamı optimizasyonu ve ortama eklenen farklı aromatik bileşiklerin lakkaz enziminin protein seviyesine ve gen ifadesine etkisinin belirlenmesidir.

**Yöntem:** *B. licheniformis* SO7 (GenBank NO: MG076977) suşu kullanılarak lakkaz enzimi üretimini artırmaya yönelik farklı substrat kaynakları (ABTS, Guaiakol, Ferulik asit, Vanilik asit, Kafeik asit, Nikotinik asit ve Siringik asit), farklı karbon kaynakları (Glikoz, Sükroz, Fruktoz, Gliserol, Laktoz ve Maltoz), farklı azot kaynakları (Fish Pepton, Bacteriological Pepton, Amonyum Sülfat, Üre, Maya Ekstraktı ve Malt Ekstraktı), farklı metal iyonları ( $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{ZnCl}_2$  ve  $\text{MnCl}_2$ ), gıda ve tarım atıkları (Mısır koçanı, Ceviz kabuğu, Havuç kabuğu, Turp kabuğu, Patates kabuğu ve Kara Lahana kabuğu) kullanılarak, farklı pH (5,6,7,8 ve 9) ve farklı sıcaklık (45°C, 55°C ve 65°C) değerleri ile farklı inkübasyon sürelerinde (12, 24, 36, 48, 60 ve 72 saat) klasik optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Oluşturulan optimum koşullar ile aromatik substratların ortamdaki varlıklarının lakkaz üretimini ne yönde etkilediği gen ekspresyon seviyesinde qPCR, protein seviyesinde SDS-PAGE ile incelenmiştir.

**Bulgular:** Elde edilen kültür optimizasyon sonuçlarına göre *B. licheniformis* SO7 suşu ile en yüksek lakkaz aktivitesinin belirlendiği koşullar; pH: 8, 55°C, 50 g/L Maltoz, 1 g/L Fish Pepton, 2,5 mM Siringik asit, 1 mM  $\text{ZnCl}_2$  ve 36. inkübasyon süresinden oluşan besi ortamı ile Havuç kabuğu atığı içeren kültür ortamları olarak belirlenmiştir. Optimum koşulların sabit tutulmasıyla yedi farklı substratı içeren yedi ayrı kültür ile havuç kabuğu içeren atık kültür ortamlarının lakkaz gen ifade seviyeleri incelendiğinde Siringik asit içeren ortamın en yüksek gen ifadesine sahip olan besi ortamı olduğu belirlenmiştir. Protein seviyeleri tüm ortamlar için incelendiğinde birbirleri arasında jeldeki protein bant kalınlığı bakımından anlamlı bir fark görülemez.

**Sonuç:** Bu tez kapsamında; bakteriyel lakkaz üretimi için en uygun ortam ve koşullar araştırılmış ve ortama eklenen aromatik substratların lakkaz enzimi gen ifadesi seviyesinde nasıl etkilediği araştırılmıştır. Elde edilen gen ekspresyon sonuçlarına göre; kültür ortamına Siringik asit eklendiğinde hem lakkaz enzim aktivitesinin hem de gen ifadesinin arttığı gösterilmiş ve bakteriyel lakkaz üretimi için kültür ortamına aromatik organik bileşiklerin eklenmesinin lakkaz enzimi üretimini pozitif yönde indüklediği belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Bakteriyel lakkaz, *Bacillus licheniformis*, qPCR, ekspresyon profili, enzim aktivitesi

Temmuz 2024, 67 sayfa

## ABSTRACT

### MASTER THESIS

# INVESTIGATION OF THE EFFECT AROMATIC COMPOUNDS ON BACTERIAL LACCASE PRODUCTION IN DIFFERENT CULTURE MEDIA AT THE GENE AND PROTEIN LEVELS

Selinay Merve KILIÇ

Supervisor: Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

**Purpose:** Laccases, also known as multi-copper oxidases, could oxidize phenolic-aromatic organic compounds and lignocellulose-structured materials. Although the studies on these enzymes, which have wide and widespread industrial and biotechnological uses, are limited in terms of bacterial origin, they are open to development. It is stated in the literature that laccase production and laccase gene expression can increase in response to different fermentation conditions and various environmental conditions. The aim of this thesis is to optimize the nutrient medium to increase laccase production using the thermophilic *B. licheniformis* SO7 strain and to determine the effect of different aromatic compounds added to the medium on the protein level and gene expression of the laccase enzyme.

**Method:** *B. licheniformis* SO7 (GenBank NO: MG076977) strain was used to increase the production of laccase enzyme using different substrate sources (ABTS, Guaiacol, Ferulic acid, Vanillic acid, Caffeic acid, Nicotinic acid and Syringic acid), different carbon sources (Glucose, Sucrose, Fructose, Glycerol, Lactose and Maltose), different nitrogen sources (Fish Peptone, Bacteriological Peptone, Ammonium Sulfate, Urea, Yeast Extract and Malt Extract), different metal ions (CuSO<sub>4</sub>, ZnCl<sub>2</sub> and MnCl<sub>2</sub>), food and agricultural wastes (Corn cob, Walnut shell, Carrot peel, Radish peel, Potato peel and Purple Cabbage peel), different incubation periods with different pH (5, 6, 7, 8 and 9) and different temperature (45°C, 55°C and 65°C) values. Classical optimization studies were carried out at different times (12, 24, 36, 48, 60 and 72 hours). The optimum conditions and the effects of the presence of aromatic substrates in the medium on laccase production were investigated by qPCR at the gene expression level, SDS-PAGE at the protein level.

**Findings:** According to the culture optimization results obtained, the conditions in which the highest laccase activity was determined with *B. licheniformis* SO7 strain were determined as pH: 8, 55°C, 50 g/L Maltose, 1 g/L Fish Peptone, 2.5 mM Syringic acid, 1 mM ZnCl<sub>2</sub> and 36 incubation time and culture media containing carrot peel waste. When the protein gene expression levels of seven different cultures containing seven different substrates and culture media containing carrot peel waste were examined by keeping the optimum conditions constant, it was determined that the medium containing Syringic acid was the medium with the highest gene expression. When the protein levels were examined for all media, no significant difference was observed between them in terms of protein band thickness in the gel.

**Results:** Within the scope of this thesis; the most suitable medium and conditions for bacterial laccase production were investigated and how aromatic substrates added to the medium affected the laccase enzyme at the level of gene expression was investigated. According to the gene expression results obtained; It was shown that when Syringic acid was added to the culture medium, both laccase enzyme activity and gene expression increased, and it was determined that the addition of aromatic organic compounds to the culture medium for bacterial laccase production positively induced the production of laccase enzyme.

**Keywords:** Bacterial laccase, *Bacillus licheniformis*, qPCR, expression profile, enzyme activity

July 2024, 67 pages

## İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	v
TABLolar DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	ix
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ.....	x
GİRİŞ.....	1
Enzimler .....	1
Enzimlerin Yapısı.....	2
Enzimlerin Endüstride ve Biyoteknolojide Kullanımı .....	3
Lakkaz Enzimi .....	4
Lakkaz enziminin kullanım alanları.....	7
Termofilik Bakteriler .....	10
Bakteriyel Lakkazlar .....	11
Besiyeri Optimizasyonu .....	13
KURAMSAL TEMELLER.....	15
Tezin Amacı.....	17
MATERYAL VE METOT.....	19
Materyal .....	19
Kullanılan organizma .....	19
Kullanılan araç-gereç ve cihazlar.....	19
Kullanılan kimyasallar .....	20
Kullanılan çözelti ve besiyerlerinin hazırlanması .....	21
Yöntem.....	24
Lakkaz enzimi üreten bakteri izolatlarının ABTS ve CuSO <sub>4</sub> içeren katı ve sıvı besiyerlerinde belirlenmesi .....	24
Lakkaz enzimi üretimi için yapılan klasik optimizasyon (OFAT) çalışmaları .....	25
Substrat Optimizasyonu .....	25
Karbon kaynağı optimizasyonu.....	25
Azot kaynağı optimizasyonu.....	25
Metal iyonu optimizasyonu.....	26

pH optimizasyonu .....	26
Sıcaklık optimizasyonu .....	26
Süre optimizasyonu .....	26
Lowry yöntemi ile protein tayini .....	27
Tatal RNA izolasyon ön işlem basamakları.....	28
cDNA sentezi işlem basamakları .....	28
Real-Time PCR işlem basamakları .....	32
İstatistiksel Analiz.....	33
ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA .....	35
Katı Besiyerinde Lakkaz Üreten Bakterilerin Belirlenmesi ve Seçilmesi .....	35
Klasik optimizasyon (OFAT) ile optimum kültür koşullarının belirlenmesi.....	35
Optimum koşullar altında aromatik bileşiklerin lakkaz enzimine etkisinin gen seviyesinde araştırılması .....	44
Lakkaz Enziminin Protein Seviyesinde Belirlenmesi .....	45
SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....	47
KAYNAKLAR.....	48
ÖZGEÇMİŞ.....	55

## TABLÖLAR DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> Enzimlerin Sınıflandırılması .....	2
<b>Tablo 2.</b> Enzimlerin Çeşitli Endüstrilerde Kullanımı .....	3
<b>Tablo 3.</b> Kullanılan Araç-Gereç ve Cihazlar .....	19
<b>Tablo 4.</b> Kullanılan Kimyasallar .....	20
<b>Tablo 5.</b> Lakkaz Enzim Aktivite Ölçümü Küvet İçeriği .....	27
<b>Tablo 6.</b> cDNA Sentezi İçin PCR Reaksiyon Basamakları .....	29
<b>Tablo 7.</b> Real-Time PCR Analizi İçin Dizaynı Yapılan Primer Dizileri .....	32
<b>Tablo 8.</b> Real Time PCR reaksiyon döngü basamakları .....	32

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Enzim ve substrat arasındaki anahtar-kilit ilişkisi .....	2
Şekil 2. Fungal lakkazın T1 ve TNC bölgeleri.....	5
Şekil 3. <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> fungusunun kataliz mekanizması.....	6
Şekil 4. <i>B. subtilis</i> CotA lakkazının yapısı ve bakır merkezleri.....	12
Şekil 5. NCBI veritabanı .....	29
Şekil 6. CotA geninin nükleotid dizisi .....	30
Şekil 7. Primer 3 veritabanı.....	30
Şekil 8. Dizayn edilecek primer bilgisinin yer aldığı kısım .....	31
Şekil 9. Dizayn edilen primerler .....	31
Şekil 10. Primer homoloji kontrolünün yapıldığı blast sayfası.....	32
Şekil 11. Lakkaz aktivitesi veren <i>B. licheniformis</i> suşlarının petri görüntüleri .....	35
Şekil 12. Yedi farklı substrat içeren besi ortamlarının lakkaz aktivite ölçümleri .....	36
Şekil 13. Beş farklı konsantrasyonda siringik asit içeren besi ortamlarının lakkaz aktivite ölçümleri.....	37
Şekil 14. Altı farklı karbon kaynağı içeren besi ortamlarının lakkaz aktivite ölçümleri .....	38
Şekil 15. Beş farklı konsantrasyonda maltoz içeren besi ortamlarının lakkaz aktivite ölçümleri.....	38
Şekil 16. Altı farklı azot kaynağı içeren besi ortamlarının lakkaz aktivite ölçümleri.....	39
Şekil 17. Beş farklı konsantrasyonda Fish pepton içeren besi ortamlarının lakkaz aktivite ölçümleri.....	40
Şekil 18. Üç farklı iyon içeren besi ortamlarının lakkaz aktivite ölçümleri.....	41
Şekil 19. Beş farklı pH değerindeki besi ortamlarının lakkaz aktivite ölçümleri .....	41
Şekil 20. Üç farklı sıcaklık derecesindeki besi ortamlarının lakkaz aktivite ölçümleri .....	42
Şekil 21. Farklı saatlerdeki lakkaz aktivite ölçümleri .....	43
Şekil 22. Farklı gıda ve tarım atıkları içeren besi ortamlarının lakkaz aktivite ölçümleri .....	43
Şekil 23. Göreceli CotA ekspresyon seviyeleri.....	44
Şekil 24. Sekiz farklı kültür ortamından alınan örneklerin SDS-PAGE görüntüsü .....	45
Şekil 25. <i>B. licheniformis</i> SO7 Lakkaz enzimin Doğal PAGE görüntüsü .....	46

## KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

$\mu$ l	: Mikro Litre
aa	: Amino Asit
ABTS	: 2,2-Azino-bis(3-etilbenzotiyezolin-6-sülfonik asit)
dk	: Dakika
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
g	: Gram
kDa	: Kilo Dalton
L	: Litre
M	: Molar
mg	: Mili Gram
ml	: Mililitre
mM	: Mili Molar
nm	: Nanometre
OD	: Optik Dansite
RNA	: Ribonükleik Asit
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poli Akrilamid Jel Elektroforezi
sn	: Saniye

## GİRİŞ

Geçmiş yıllardan günümüze kadar canlılar ve ürünleri, ihtiyaca yönelik bir çözüm yolu olarak kullanılmışlardır. Milattan önceki zamanlardan itibaren ekmek, peynir, bira ve şarap yapımında mikroorganizmaların kullanılması, tarım alanında verimi artırmak için çeşitli hibridizasyon işlemlerinin gerçekleştirilmesi gibi örnekler aslında ilk biyoteknolojik uygulamalardır. Canlı organizmaların veya ürünlerinin kaynak olarak kullanılmasıyla insanlık ihtiyacı ve yararına yeni ürün, teknik ve hizmetlerin geliştirilmesi biyoteknolojinin konusudur. Biyoteknoloji; biyoloji, tıp, genetik, ziraat, kimya ve mühendislik gibi birçok farklı bilim dalını bünyesinde barındıran multidisipliner bir alandır. Günümüzde biyoteknoloji genetik manipülasyonları, canlı organizmalardan enzim ve protein saflaştırılmasını, rekombinant protein üretimi, aşı ve ilaç üretimi gibi uygulamaları kapsamaktadır. Biyoteknoloji ile doğanın bizlere sunmuş olduğu çözümler daha da geliştirilebilir, verimli hale getirilebilir ve doğa ile uyumlu bir işleyiş gerçekleştirilebilir (Ünver ve Kurnaz, 2020).

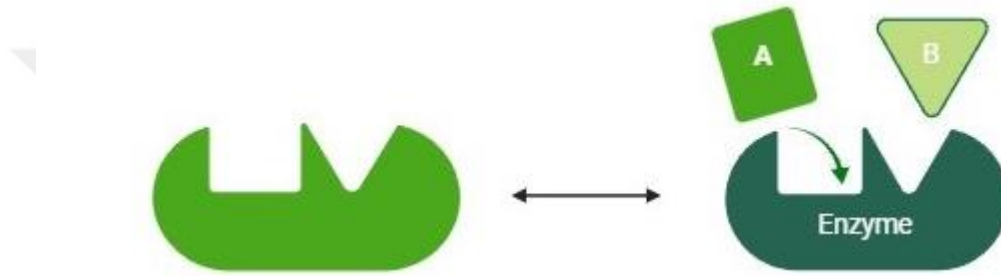
### Enzimler

Doğada canlı yaşamının devamlılığı iyi organize edilmiş kimyasal tepkimelere bağlıdır. Fakat çoğu kimyasal tepkimenin kendi kendine gerçekleşmesi oldukça uzun zaman alabilmektedir. Bunun önüne geçebilmek için doğa, enzim olarak bildiğimiz biyolojik katalizörleri tasarlamıştır. Enzimlerin katalitik gücü, insanlardan virüslere kadar tüm canlılık süreçlerindeki faaliyetleri kolaylaştırmaktadır. Enzimler, basit moleküllerden karmaşık molekül sentezinin yapıldığı veya tam tersi olarak karmaşık molekülleri yapıtaşlarına kadar yıkma reaksiyonlarında katalizör olma işlevlerine sahiptir. Çoğu enzim, canlı organizmalardan izole edildikten sonra da katalitik aktivitelerini korur; bu durumun fark edilmesiyle birlikte insanlık enzimleri pek çok alanda kullanmaya başlamıştır. Antik metinlerde peynir, ekmek ve alkollü içecek üretimi ile etlerin yumuşatılmasında enzimlerin kullanıldığı bilgisinin yer alması, enzimlerin antik dönemlerden itibaren çeşitli alanlarda kullanıldığının kanıtıdır. Enzimler, antik zamanlardan bu yana bilinip kullanılmasına rağmen “enzim” terimi olarak ilk kez Heidelberg Üniversitesi’nde fizyoloji profesörü olan Wilhelm Friedrich Kühne tarafından 1877 yılında kullanılmıştır. (Singhania *et al.*2015; Copeland, 2023).

## Enzimlerin Yapısı

Enzimler, herhangi bir değişikliğe uğramadan canlı hücrelerde meydana gelen reaksiyonların hızını artıran biyolojik katalizörlerdir. Her enzim oldukça spesifiktir ve belirli ürün veya ürünleri üretmek için belirli substrat veya substratlarla reaksiyon verir (Palmer and Bonnen, 2007).

Enzimlerin çoğu protein yapılıdır (katalitik RNA'yı içeren ribozimler hariç). Protein yapılı enzimler üç boyutlu bir yapıya sahiptir. Bu üç boyutlu yapı, amino asitlerin birbiri ardına eklenerek sentezlenen birincil yapının kendi üzerine katlanmasıyla oluşur. Enzimlerin substratların bağlandığı bölgesine aktif bölge adı verilir ve enzimin aktif bölgesi ile substrat arasında bir anahtar-kilit ilişkisi vardır (Şekil 1.).



**Şekil 1.** Enzim ve substrat arasındaki anahtar-kilit ilişkisi

Bazı enzimlerin yapısında protein olmayan ve katalitik aktivite için gerekli olan iyonlar veya vitaminler gibi yardımcı maddeler bulunur. İnorganik yapılu iyonlara kofaktör, organik yapılu vitaminlere ise koenzim adı verilir. Bu şekildeki enzimlere holoenzim; enzimin protein kısmına ise apoenzim denmektedir. Holoenzim yapıdaki enzimler, kofaktör ve koenzim bağlı olmadığı zamanlarda inaktiftir (Robinson, 2015).

Gerçekleştirdikleri reaksiyonlara göre enzimler yedi ana gruba ayrılmaktadırlar (Tablo 1). Enzimler dört rakamdan oluşan bir numara ile adlandırılırlar. Rakamlar sırası ile numara sınıfı, numara alt sınıfı, numara grubu ve kendine özgü sıra numarasını tanımlamaktadır (Nelson and Cox, 2005).

**Tablo 1.** Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzim sınıfı	Gerçekleştirdiği Reaksiyon
Oksidoredüktazlar (EC 1)	İndirgenme-yükseltgenme reaksiyonları
Transferazlar (EC 2)	Fonksiyonel grup transferi
Hidrolazlar (EC 3)	Hidroliz reaksiyonları
Liyazlar (EC 4)	Oksidasyon ve hidroliz dışındaki yollarla bağların yıkılması ve tekrar oluşması
İzomerazlar (EC 5)	İzomerizasyon reaksiyonları
Ligazlar (EC 6)	Yüksek enerjili bağların hidrolizi ile moleküllerin birbirine bağlanması
Translokazlar (EC 7)	Molekül veya iyonların bir yerden bir yere hareketini veya geçişini sağlayan enzim grubu

## Enzimlerin Endüstride ve Biyoteknolojide Kullanımı

Enzimler, daha hafif reaksiyon koşullarında aktif olarak çalışabilmeleri, oldukça yüksek substrat seçiciliğine ve daha düşük çevresel ve fizyolojik toksisiteye sahip olmaları gibi birçok avantajlarından dolayı biyoteknolojik ve endüstriyel ölçekteki kataliz için tercih edilen ve araştırılan yüksek verimli biyokatalizörlerdir. Endüstriyel alanda kimyasal kataliz ve sentez reaksiyonlarda enzimlerin kullanılması, maliyeti de azaltmaktadır (Chapman et. al, 2018).

Enzimler, klasik kimyasal ve/veya fiziksel reaksiyonların ulaşamayacağı kadar yüksek spesifiklikteki katalizleri gerçekleştirme potansiyeline sahiptirler. Atık suların temizlenmesinde (biyoremediasyon) enzimler kullanılarak kimyasal süreçlerde oluşabilen toksik yan ürünlerin önüne geçilmektedir. Sulardaki atık maddelerin uzaklaştırılmasının yanı sıra enzimler, su ve toprağın kirliliğinin giderilip giderilmediğini belirlemek ve toprak sağlığını/verimini ölçmek için biyoindikatör olarak rol alırlar (Rao et al.2014).

Endüstriyel enzimler genelde gıda ve kozmetik endüstrisi, tekstil endüstrisinde kot ağartma ve dekolorizasyon (renksizleştirme, boyaların giderilmesi), biyoetanol üretimi, hayvan yemi üretimi, kimyasal proseslerde; organik molekül, polimer sentezi, ilaç endüstrisinde; antibiyotik sentezi, genetik mühendisliği uygulamaları ve endüstriyel biyokatalizör olmak üzere çeşitli uygulama alanlarına sahiptirler (Schäfer et al.2007; Singhanian et al.2015). Bazı enzimlerin endüstriyel kullanımları Tablo 2’de gösterilmiştir.

**Tablo 2.** Enzimlerin Çeşitli Endüstrilerde Kullanımı (Kirk et al. 2002)

Endüstri	Enzim sınıfı	Kullanım alanı
Deterjan	Proteaz, amilaz, lipaz, selülaz, mannanaz	Leke çıkarımı
Nişasta ve yakıt	Amilaz, amiloglukozidaz, glukoz izomeraz	Nişasta sıvılaştırılması ve sakkarifikasyon, glukoz-fruktoz dönüşümü
Gıda (süt ve süt ürünler dahil)	Proteaz, lipaz, laktaz, pektinaz	Süt tozu, bebek mamaları, peynir aroması, laktozun uzaklaştırılması, meyve bazlı ürünler
Fırıncılık	Amilaz, lipaz, proteaz, fosfolipaz, glukoz oksidaz	Ekmek hamurunun yumuşatılması ve hacminin artırılması, bisküvi ve kurabiye üretimi
Hayvan yemi	Fitaz, ksilanaz, beta-glukanaz	Fitat (fitik asit) sindirilebilirliği

**Tablo 2.** (devamı)

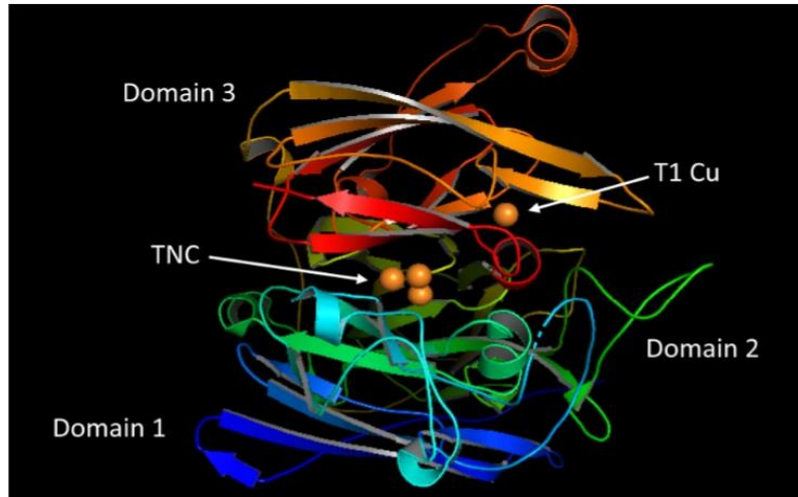
Alkollü-alkolsüz içecek	Pektinaz, amilaz, lakkaz, asetolaktat dekarboksilaz	Depektinizasyon, ezme, meyve suyu berraklaştırma, biralardan olgunlaştırılması
Tekstil	Selülaz, amilaz, katalaz, lakkaz	Kot ve pamuklu kumaşların yumuşatılması, ağartma işlemleri
Kâğıt	Lipaz, proteaz, amilaz, ksilanaz, selülaz	Kontaminasyon kontrolü, biyofilm tabakasının uzaklaştırılması, mürekkep giderme, nişasta kaplama, transesterifikasyon
Organik sentez	Lipaz, açilaz, nitrilaz	Kiral alkol ve amidlerin çözünmesi, semisentetik penisilin sentezi, enantiyosaf karboksilik asit sentezi
Deri	Proteaz, lipaz	Kılların uzaklaştırılması, yüzey iyileştirilmesi

### Lakkaz Enzimi

Lakkazlar (benzendiol: oksijen oksidoredüktaz, EC 1.10.3.2); fenoller, aminofenoller, polifenoller, poliaminler, metoksi fenoller, aril diaminler gibi aromatik ve lignin yapısındaki organik bileşikler ile bazı inorganik bileşikler radikal katalizli bir reaksiyon mekanizmasıyla oksitlemek için moleküler oksijeni kullanan, multi-bakırlı ekstraselüler enzimlerdir (Hakulinen and Rouvinen, 2015). Oksidoredüktaz sınıfı enzimlerin fenoloksidaz alt grubunda yer almaktadırlar (Ba and Kumar, 2017). Yoshida tarafından 1883 yılında bir Japon lake ağacı olan *Rhus vernicifera*'nın cila sızıntısında enzim keşfedildikten sonra ismi lakkaz olarak adlandırılmıştır. 1985 yılına kadar Bertrand tarafından metal içeren bir oksidaz olarak tanımlanmıştır (Polaina and MacCabe, 2007). Multi-bakır oksidazlar içerdikleri bakır-oksin benzeri alan sayısına göre 2, 3 ve 6 alanlı (domain) olarak sınıflandırılırlar. Lakkazlar genelde buldukları mantarlar, bitkiler, böcekler ve bakterilerdeki tanılamalara göre yaklaşık 500 amino asit (aa) içeren 3 domain içerir. Geçtiğimiz 10 yılda yaklaşık 200 aa içeren 2 domainli bakteriyel lakkazlar da keşfedilmiştir (Janusz *et al.* 2020).

Lakkaz enzim reaksiyonunda gerçekleşen oksidatif bağlanma sonucunda hümik maddeler (biyokütle kalıntılarının uzun süreli ayrışması ve dönüşümü sırasında doğal olarak oluşan renkli ve dirençli organik maddeler), melaninler, tanenler, alkoloitler gibi organik bileşiklerin sentezlenmesi mümkündür. Aynı reaksiyon mekanizması, tarımsal ve endüstriyel kimyasalların toprağa karışmasını sağlayan organik dönüşümünde de rol oynar. Lakkaz enzimi çeşitli bitkilerde (çınar ve kayısı ağacı, maş fasulyesi, mango öz suyu ve biberiye vb.), böceklerde, likenlerde, bazı süngerlerde, bakterilerde ve altmışın üzerinde fungus türünde bulunur. Aynı zamanda toprak içerisinde de lakkaz aktivitesi belirlenmiştir (Gianfreda et. al, 1999; Sharma *et al.*2018). Türe bağlı olarak lakkazlar, karasal ekosistemlerde karbon dönüşümünde ve bazı organizmaların morfogenezine katkıda bulunan çeşitli biyosentetik süreçlerde yer almaktadırlar (Jeon *et al.*2012).

Holoenzim yapısında olan lakkaz enzimi, genellikle monomer başına dört Cu (bakır) atomu içeren, üç redoks bölgesine (tip 1, 2 ve 3 Cu) sahip bir dimerik veya tetramerik glikoproteindir. Bu dört Cu atomu, karakteristik elektronik paramanyetik rezonans (EPR) sinyallerinde birbirlerinden farklılık gösterir. Bu Cu atomlarından ikisi, güçlü anyon bağlanmasıyla aktive edilen bir EPR sinyali ile güçlü bir şekilde bağlanmış Tip 3 bölgesine aittir. Tip 2 ve Tip 3 Cu merkezi yan yana bulunur ve trinükleer bakır (TNC) küme olarak adlandırılmaktadırlar (Gianfreda *et al.*1999). Bu merkezler Şekil 2.'de gösterilmektedir.

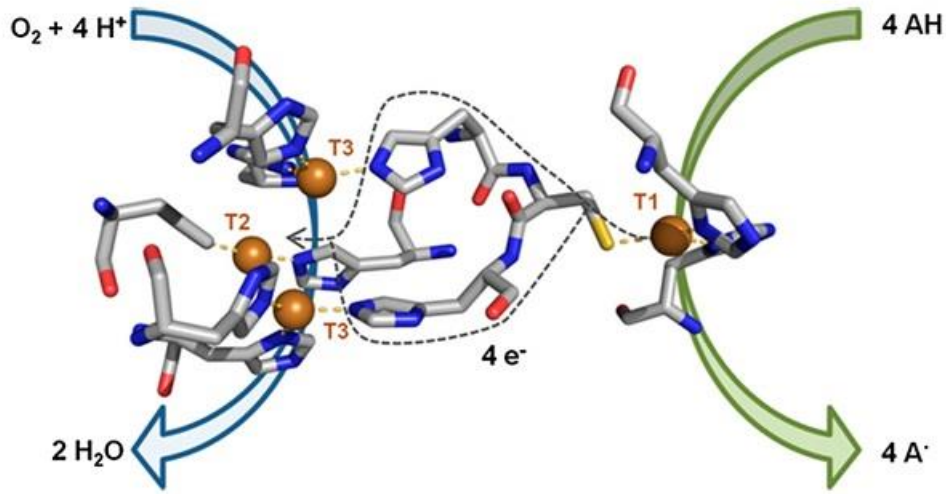


**Şekil 2.** Fungal lakkazın T1 ve TNC bölgeleri (Ali *et al.* 2023)

Lakkaz katalizi; substratın indirgenmesiyle T1 Cu'nun indirgenmesi, T1 Cu'dan T2 ve T3 Cu'ya elektron transferi ve T2 ve T3 Cu'da oksijenin suya indirgenmesi şeklinde üç basamakta gerçekleşmektedir. T1 bölgesi, substratın bağlandığı ilk bölgedir. T1 aynı zamanda enzimin mavi renginden de sorumludur. Substrat bağlama cebi T1 bölgesinin yanında bulunur ve ikinci ile üçüncü domain rezidülerinden oluşur. Genelde T1 Cu, iki histidin ve bir sistein amino asidine bağlıdır. Fakat yapılan son kristalografik çalışmalarda bu aa'ların yanına bir de

metiyonin ile tamamlayıcı bir aksel bağ varlığı bakteriyel ve bitki lakkazlarında gösterilmiştir. Lakkaz enziminin substrat spesifikliğı ortamın pH'ına göre değişiklik gösterebilir. Örneğin, oksidasyonu esnasında proton değişimine gerek duymayan substratların enzimatik reaksiyonu düşük pH'larda daha verimli gerçekleşir. Lakkazlar halojenürler, azitler ve bazı metaller tarafından inhibisyona uğrayabilirler (Gianfreda *et al.* 1999; Dey and Dutta, 2022; Ali *et al.* 2023).

T1 bölgesine gelen substratın tek elektronlu oksidasyonu gerçekleşirken, T3 bölgesinde oksijen dört elektron alarak suya ( $H_2O$ ) indirgenir (Şekil 3.) (Pardo and Camero, 2015).



**Şekil 3.** *Pycnoporus cinnabarinus* fungusunun kataliz mekanizması (Pardo and Camero, 2015)

Lakkazlar birçok enzime kıyasla oldukça geniş bir substrat yelpazesine sahiptir, fakat bazı yüksek redoks potansiyeline sahip bileşiklerin katalizini gerçekleştiremezler. Bunun sebebi; oksidasyon mekanizmasının substratın redoks potansiyeli ile enzimin T1 Cu bölgesinin redoks potansiyel farkına dayanmasıdır. Bazı durumlarda enzimin aktif bölgesine substratların büyük gelmesi veya konformasyonel olarak uymaması da söz konusudur. Diğer enzimlerden farklı olarak, lakkaz enzimin substratı olmayan bileşikleri redoks mediyatörleri olarak bilinen düşük molekül ağırlıklı bazı organik bileşikler ile katalizlemesi mümkündür. Redoks mediyatörleri, lakkaz tarafından oksidasyona uğrayarak ve sonra substratı okside ederek adeta enzim ile substrat arasında bir elektron mekiğı görevi görürler. Lakkazın iyi bilinen mediyatör bileşikleri ABTS (2'2-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit), HBT (1-hidroksibenzotriazol), TEMPO (2,2,6,6-tetrametil-1-piperidin-1-oksil), viyolürük asit, asetosiringon (4'-hidroksi-3',5'-dimetioksiasetofenon), asetovanilon (4'-hidroksi-3'-metoksiasetofenon) ve p-kumarik asit (trans-4-hidroksisülfonik asit)'tir (Rodriguez-Couto, 2018).

## **Lakkaz enziminin kullanım alanları**

Biyoteknolojik ve endüstriyel prosesler, çeşitli mikroorganizmaların ve enzimlerin kullanımlarını içermektedir. Lakkazlar, çoğu biyoteknolojik uygulamalarda çok işlevli bir enzim olarak kullanılabilirler (Chaudhary *et al.* 2022). Bu enzim grubu gıda katkı maddeleri ve içecek endüstrisinde üretim süreçlerinde, tıbbi kullanımlar için ve biyoyakıt eldesinde bir ön işlem maddesi olmak üzere çok çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır. Lakkazlar ayrıca nanobiyoteknolojide takılabilir sensörler ve biyoyakıt hücreleri için de kapsamlı bir şekilde araştırılmaktadırlar. Buna ek olarak, karmaşık ksenobiyotikleri dönüştürme yetenekleri onları yararlı enzimatik biyoremediasyon biyokatalizörleri haline getirmektedir. Geniş substrat özgüllüğü ve ikinci substrat olarak atmosferik oksijenin kullanılması; organik bileşiklerin, biyosensörlerin ve immunoassay testlerinin sentezinde lakkazların uygulanması için temel oluşturmaktadır (Chauhan *et al.* 2017; Chaudhary *et al.* 2022).

Lakkaz enziminin; gıda, kozmetik, tekstil, kâğıt, biyoyakıt üretimi, mobilya, dekolorizasyon, biyoremediasyon, nanobiyoteknoloji, biyosensör ve tıp gibi çok çeşitli ve geniş bir kullanım potansiyeli vardır (Alcade *et al.*2017). Oksidoredüktazlar, geleneksel kimyasal işlemlere alternatif katalizör olma potansiyelleri sebebiyle çevresel ve biyoteknolojik alanlardaki birçok araştırmacının dikkatini çekmektedir. Farmasötik, kimya ve medikal endüstrilerde kullanılan ve üretilen biyoaktif bileşiklerin kimyasal yollarla sentezlenmesi oldukça maliyetli ve fazla zaman gerektiren zor bir işlemdir. Ayrıca, normal kimyasal katalizli reaksiyonlar, istenilen ürünlerin düşük verimde elde edilmesine ve genellikle istenmeyen yan ürünlerin oluşumuna yol açabilir. Enzimlerin kullanılmasıyla biyoaktif organik bileşikler, kimyasal sentezlere göre daha kısa sürede ve daha düşük maliyetle kolay bir şekilde sentezlenebilirler. Bu amaçla lakkazlar, biyoaktif bileşiklerin sentezlenmesinde kullanılmaktadırlar. Geniş bir substrat çeşitliliğinin yanı sıra ılıman koşullarda da rahatlıkla işlev görmesi, yan ürün olarak çevreye zararlı ürün oluşturmaması, lakkaz enzimini biyoaktif organik bileşiklerin sentezlenmesi için iyi bir yeşil biyokatalizör yapmaktadır (Kudanga *et al.*2016; Su *et al.*2017). Aynı zamanda lakkazlar, atık suların temizlenmesinde ve lignoselülozdan biyoyakıt eldesinde de son zamanlarda potansiyel kullanımı daha da artan bir biyokatalizör haline gelmiştir (Tyagi *et al.*2010; Suman and Malhotra, 2021).

Lakkazların iyi bilinen uygulama alanlarından bazıları aşağıda özetlenmiştir:

### ***Lakkazların gıda endüstrisinde biyoteknolojik kullanımları***

Lakkazlar, fırıncılık, meyve suyu işleme gibi gıda ve içecek endüstrisinde çeşitli alanlarda kilit rol oynamaktadır. Örneğin, biraların uzun süre depolanması; fenollerin sülfidril

(-SH) gruplarıyla yer değiştirmesi sebebiyle çözülemeyen bazı safsızlıkların ortaya çıkmasına neden olabilir ve bu da biranın stabilitesinin ve saklama ömrünün azalmasına yol açar. Bu sorunu çözmeye, kalan oksijen moleküllerini uzaklaştırmak ve biranın saklama ömrünü uzatmak için lakkazlar eklenebilir. Bazen bazı polifenoller lakkazların etkisiyle belirli kompleksler oluşturabilir fakat daha sonra ayırma ve filtreleme işlemleriyle uzaklaştırılabilirler (Couto and Herrera, 2006; Patel *et al.* 2019). şarap stabilizasyonu, lakkaz enzimlerinin bir diğer önemli uygulamasıdır. şarap üretimi boyunca ardışık presleme aşamaları, şarapların rengini yoğunlaştırabilen veya lezzetini değiştirebilen polifenollerin ve bazı fenolik bileşiklerin oluşmasına yol açar (Minussi *et al.* 2007; Patel *et al.* 2019). Bu nedenle, belirli fenoller ve polifenoller ortadan kaldırmak için lakkazlar kullanılır. Lakkazların gıda katkı maddesi olarak kullanılmadığını ve bu sebeple immobilize formda kullanılmasına izin verildiğini belirtmek gerekmektedir. Lakkazlar biyopolimerleri çapraz bağlayabilmekte ve böylece ekmeğın hacmini, dokusunun iyileştirilmesini, tazeliğini ve lezzetini artırmak için kullanılabilirler. Ayrıca, lakkazların hamura eklenmesi, hamurun gluten yapılarını güçlendirebilir (Patel *et al.* 2019). Meyve suları, meyve suyunun rengini ve tadını verme özelliğine sahip fenolik bileşikler ve oksidatif ürünler içerir. Bu fenolik maddelerin polimerizasyonu ve oksidasyonu hem renk hem de kokunun değişmesine yol açabilir. Yüksek polifenol konsantrasyonları aynı zamanda meyve suyunun enzimatik olarak koyulaşmasına sebep olur ve bu, istenmeyen bir durumdur (Ribeiro *et al.* 2010). Bu sebeple, meyve sularını stabilize etmek için lakkazlar kullanılır. Lakkazlar, renk stabilitesini iyileştirmek için fenollerin ve enzim-substrat komplekslerinin ortadan kaldırılması yoluyla çalışır (de Souza Bezerra *et al.* 2015).

### ***Lakkazların tekstil ve kâğıt endüstrisinde biyoteknolojik kullanımları***

Lakkaz enzimleri, tekstil atıklarının rengini gidermenin (dekolorizasyon) yanı sıra tekstil ürünlerini beyazlatmak, kumaş yüzeylerini değiştirmek ve boyaları sentezlemek için kullanılmaktadırlar. Bu nedenle, çeşitli kimyasalları, enerji ve suyu tüketen tekstil prosesleri lakkaz bazlı işlemlerle değiştirilebilir. Lakkaz bazlı prosesler, enzimin endüstride kullanılmakta olan sentetik boyaları da içeren çeşitli kimyasal yapıdaki boyaları parçalama yetenekleri nedeniyle cazip bir alternatif olarak görölmektedir (Couto and Herrera, 2006; Singh and Arya, 2019). Kâğıt endüstrisinde lakkazlar, peroksidazlara (lignin, manganez ve çeşitli peroksidazlar) tercih edilmektedir. Bunu sebebi; lakkazların peroksidazın aksine hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) yerine moleküler oksijeni kullanıyor olmasıdır. Çeşitli mantarların lakkazları ve saf ve sentetik kökenli redoks araçları ile keten hamurlarının enzimatik ağartılmasına ilişkin çalışmalar bulunmaktadır. Kâğıt üretimi için keten lifine fenolün bazı fungal ve bakteriyel lakkaz kaynaklı

aşılmasının yapılması dahil olmak üzere çeşitli başka lakkaz uygulamaları da mevcuttur (Chaudhary *et al.* 2022).

### ***Lakkazların biyoyakıt endüstrisinde biyoteknolojik kullanımları***

Lakkazlar, ligninin biyolojik olarak parçalanmasında önemli bir rol oynamaktadırlar. Bundan dolayı, biyoyakıtların geliştirilmesinde bir ajan ve ardışık enzimatik süreçlerde maya inhibitörlerinin (çoğunlukla fenoller) büyümesinin önlenmesi için biyokatalizör olarak potansiyel kullanımları bulunmaktadır. Lakkaz enzimi biyoyakıtların geliştirilmesinde enzim delignifikasyonu açısından ve enzimatik işlemlerden fenolik inhibitörleri çıkarmak için biyoteknolojik bir yöntem olarak araştırılmaktadır (Jeon *et al.* 2010).

### ***Lakkazların biyoremediasyonda biyoteknolojik kullanımları***

Çevredeki kirleticilerin enzimatik teknolojiler kullanılarak biyoremediasyonu araştırmacılar tarafından daha iyi bir seçenek olarak önerilmiştir. Ayrıca, lakkazlar, manganez peroksidazlar ve çok yönlü peroksidazlar gibi mikrobiyal oksidatif enzimler, çevresel kirleticilerin giderilmesi için büyük bir potansiyel sergilemiştir (Falade *et al.* 2018). Bununla birlikte lakkazlar, elektron alıcısı olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi kullanan peroksidazların aksine atmosferik oksijeni kullanarak dirençli bileşikler oksitleme yetenekleri sebebiyle en umut verici enzim olarak görülmektedir. Lakkazların atık sularındaki kirliliğin giderilmesinde oksidasyon ile detoksifikasyon sonucunda serbest radikallerin oluşumuna yol açtığı bilinmektedir. Bu serbest radikaller, polimerizasyon ve çökelme ile toksik maddeleri toksik olmayan formlarına dönüştürürler (Sutaoney *et al.* 2022). Son yıllarda modern tarım uygulamalarının artmasıyla pestisitlerin kullanımı ve dolayısıyla topraktaki zararlı etkileri de artmıştır. Bitkilerde biyolojik olarak biriken pestisitler hayvanlara ve insanlara da geçerek insan sağlığını ciddi oranda tehdit etmektedir. Lakkazlar, toprakta biriken pestisitlerin bozunmasında ve zararsız hale getirilmesinde rol almaktadırlar (Bilal *et al.* 2019). Son zamanda yapılan çalışmalar, mikrobiyal lakkazların çevrede oluşan çeşitli mikro kirleticilerin oksidasyonundaki etkinliğini doğrulamıştır (Unuofin *et al.* 2021).

### ***Lakkazların biyosensör üretiminde biyoteknolojik kullanımları***

Biyosensörlerin yapımında enzimler, canlı mikroorganizmalar, antijenler, antikolar, nükleik asitler vb. gibi çok sayıda biyolojik bileşen kullanılabilir. Bu biyolojik bileşenler arasında mikroorganizmalar ve enzimler biyosensör yapımı için ağırlıklı olarak kullanılmaktadırlar (Karim and Fakhrudin, 2012; Sohrabi *et al.* 2021). Enzimatik biyosensörlerin kullanımı, daha hafif koşullar altında spesifik substratlar üzerinde etkili olma gibi özellikleri nedeniyle önemli ölçüde artmıştır. Bunlar, farklı enzim bazlı biyosensörlerin

geliştirilmesinin temelini oluşturmuştur. Örneğin; fenol algılama için kullanılan biyosensörler esas olarak lakkaz, tirozinaz, lignin peroksidaz ve at turpu peroksidaz gibi oksidoredüktif enzimleri içerir (Forzato *et al.* 2020). Tirozinaz düşük stabilite ve ürün inhibisyonu sınırlamalarına sahiptir. Lignin peroksidaz, reaksiyonu tamamlamak için ek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gerektirir. Bu da biyosensör platformunu karmaşık hale getirmektedir. Buna karşılık lakkazlar; fenolik bileşiklere karşı geniş substrat özgüllüğü, yardımcı faktörler olmadan reaksiyonu katalize etme yeteneği ve serbest haldeki atmosferik moleküler oksijeni kullanma gibi avantajları sayesinde fenoller için mükemmel bir biyosensör adayı olarak öne çıkmaktadır. Bu sebeple son zamanlarda yapılan çalışmalarda lakkaz biyosensörlerinde artış ve gelişme gözlenmektedir (Kadam *et al.* 2022).

### ***Lakkazların ilaç endüstrisinde biyoteknolojik kullanımları***

Lakkazlar, çeşitli antibiyotiklerin, antimikrobiyal ve kanser ilaçlarının sentezinde aktif rol alırlar. Penisilin ve sefalosporin gibi antibiyotik ilaçların sentezlendiği doğal bileşikler, lakkaz enziminin substratlarıdır (Pezzella *et al.* 2015). Yapılan son çalışmalarda, yüzeylere antimikrobiyal ve antioksidan özelliklerin kazandırılması amacıyla lakkaz aracılı sistemler üzerinde durulmaktadır. Bu lakkaz aracılı sistemler; fenolik bileşiklerin lignoselülozik lif ve kitosan üzerinde biyo-graftlenmesini ve lakkaz katalizli iyodiyasyon olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Özellikle kitosan bazlı antimikrobiyal pansuman yapımında lakkaz aracılı sistemler kullanılmaktadır (Mohit *et al.* 2020). Lakkazların oksidasyonu ile organik ve biyoaktif bileşiklerin sentezinde yeşil biyokatalizör olma potansiyeli, farmasötik ve kimya endüstrisinde kullanılmalarının önemli bir sebebidir ve farklı uygulamalar için gelecek vaat etmektedirler (Martínková *et al.* 2022).

### **Termofilik Bakteriler**

45°C ve üzeri sıcaklıklarda gelişim gösteren bakterilere termofilik bakteriler denmektedir. İlk olarak 1879 yılında Miquel tarafından Seine Nehri'nden 72°C'de izole edilmişler ve o zamandan bu yana jeotermal veya farklı sıcak su kaynaklarından izole edilen farklı termofilik bakteri türleri bildirilmiştir. Termofilik bakteriler üç grupta incelenir; orta termofil grubu (50-60°C), ekstrem termofil grubu (65-80°C) ve hipertermofil grubu (80-110°C). Bazı hipertermofillerin 110°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda da gelişebildiği bilinmektedir (Öztaş Gülmüş ve Görmez, 2020).

Termofilik bakterilerin ve bu bakterilerden izole edilen çeşitli enzimlerin kullanımı, endüstriyel ve biyoteknolojik uygunlukları sebebiyle yapılan son çalışmalarda giderek artmaktadır. Sıcak su kaynakları gibi ekstrem doğa koşullarında yaşayan termofilik bakteriler,

zorlu endüstriyel kataliz koşullarına dayanıklı ve kararlı biyokatalizörler üretirler. Bu durum, araştırmacıların ilgisini çekmekte ve termofilik bakterilerin farklı kaynaklardan izolasyonu ve araştırılması devam etmektedir (Sahoo *et al.*2020).

*Proteobacteria*, *Flavobacterium*, *Thermus*, *Meoithermus*, *Thermotogales*, *Aquificales* ve *Bacillus* cinsleri çoğunlukla termofilik türü bakterileri bünyelerinde barındırmaktadırlar (Çelikoğlu, 2015; Ercan-Akkaya, 2015).

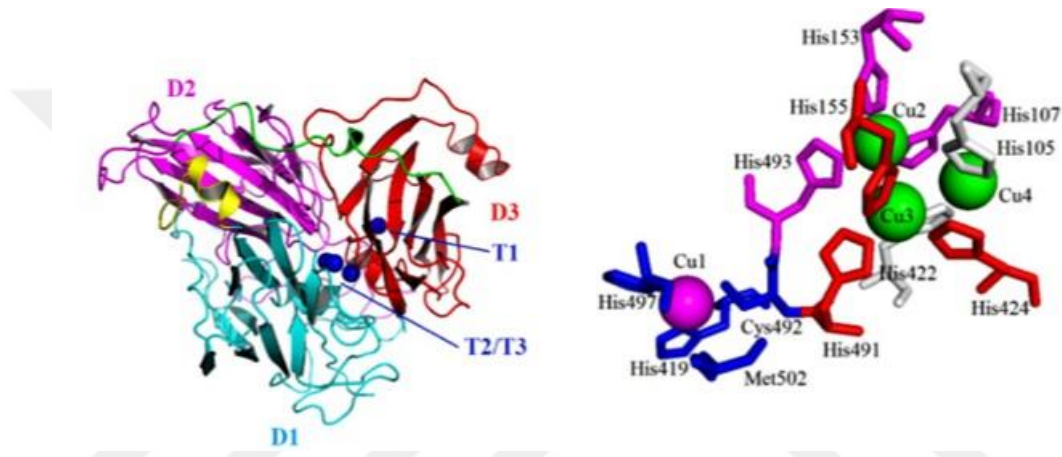
*Bacillus* cinsi bakteriler, morfolojileri çubuk şekilli, hücre farklılaşmasında birçok özelliğe sahip ve vejetatif hücrelerde aktif olabilen Gram (+) pozitif bakterilerdir. *Bacillus* türleri her hücre için oval yapıda bir spor oluşturma yeteneğine sahiptir. Sporlar, bakterilerin zorlu çevresel koşullarda örneğin; aşırı sıcak, yüksek pH, ve tuzlu ortamlarda hayatta kalmasını sağlamaktadır. Toprakta ve sıcak su kaynaklarında yaşayabilirler (Mongkolthhanaruk, 2012; Jeżewska-Fraćkowiak *et al.*2018). *Bacillus* cinsi ilk olarak Cohn tarafından 1872 yılında *Firmicutes* şubesinde *Bacillaceae* ailesine ait *Bacillus subtilis* türü ile tanımlanmıştır. *Bacillus* cinsi; bakteri ailemi içerisinde 93 tanısı yapılmış tür ile en fazla tanılanmış cinstir. *Bacillus* türleri; farklı ve zor koşulları bulunan doğal çevrelerde yaşayabilme, dayanıklı ve halofilik enzimler üretebilme, bitkiler için yararlı rizobakteriler olarak ve bitki ile hayvan probiyotikleri olarak kullanılabilme gibi çok çeşitli ve faydalı özellikler sebebiyle endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamalar için potansiyel göstermekte ve bu anlamda kullanımları giderek artmaktadır (Xue *et al.*2021).

*Bacillus licheniformis* Gram (+) ve spor oluşturan bir bakteridir. *B. licheniformis*; su ürünleri, gıda, tarım, biyomedikal ve ilaç endüstrileri için çeşitli biyomolekül ve biyokatalizör oluşturabilmeleri nedeniyle endüstriyel ve biyoteknolojik potansiyel taşımakta ve kullanılmaktadırlar. Spor oluşturabildikleri için zorlu koşullara dayanıklılıkları; güncel çalışmalar için araştırmacıların ilgisini çekmektedir. *B. licheniformis* hücre içi ve dışı termodirençli farklı enzimler üretebilir. Selülaz, kitinaz, glukozidaz, glukanaz, lipaz, penisilinaz, proteaz ve lakkaz gibi endüstriyel kullanıma sahip enzimler bu enzimlerden bir kaçıdır (Muras *et al.*2021).

## **Bakteriyel Lakkazlar**

Lakkazlar ilk olarak bitkilerde keşfedilmiş ve daha çok mantarlarda çalışılmış olsalar da son yıllarda prokaryotik lakkazların varlığına ilişkin çalışmalar hız kazanmıştır. Prokaryotik lakkazlar ilk defa bir pirinç rizosferi olan *Azospirillum sp.*'den izole edilmiştir. Prokaryotik lakkazların iyi bilinen üreticileri;  $\alpha$ - ve  $\gamma$ -*proteobacteria*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Geobacterial*, *Staphylococcus*, *Lysinibacillus*, *Aquisalibacillus*, *Pseudomonas*, *Delfia*, *Enterobacter*,

*Ptorobacterium*, *Alteromonas*, *Fimicutes*, *Cyonabacteria*, *Aquificae*, *Deinococcus-Thermus* şubelerine ait Gram (+) ve Gram (-) toprak ve su bakterileri ile *Archaea* alemine ait canlılardır. Lakkaz varlığı *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *S. lavendulae*, *S. griseus*, *E. coli*, *P. syringae*, *T. thermophilus*, *S. meliloti*, *O. boryana*, *H. volcanii*, *M. mediterranea* türlerinde ve ekstrem koşullarda yaşayan bakterilerde bildirilmiştir. Prokaryotik lakkazlarda indükleyici substratların varlığına ve fizyolojik rolüne göre lakkazın lokalizasyonu türler arasında değişiklik gösterebilmektedir. Bazı türlerde intraselüler (hücre içi) olurken bazı türlerde ise ekstraselüler (hücre dışı) yapıda olmaktadır. En iyi bilinen bakteriyel lakkaz, *Bacillus* türlerinin endosporunun dış katmanında lokalize olan CotA proteindir (Hullo *et al.*2001; Guan *et al.*2018; Janusz *et al.*2020). Bakteriyel *B. subtilis* lakkazının yapısı Şekil 4.'te gösterilmektedir.



**Şekil 4.** *B. subtilis* CotA lakkazının yapısı ve bakır merkezleri (Guan *et al.* 2018)

Genel olarak bakteriyel lakkazlarda elektron transferinden ve substrat oksidasyonundan sorumlu olan T1 Cu merkezi, 610 nm'de yüksek bir absorpsiyon ve güçlü ERP sinyallerine sahiptir. T2 Cu bölgesinde de ERP sinyallerine rastlanır fakat iki bakır atomuna sahip T3 Cu bölgesinde ERP sinyallerine rastlanmaz. T3, iki bakır atomundan oluşur ve yaklaşık 330 nm'de absorpsiyon göstermektedir. Bakteriyel lakkazların çoğunlukla 50-70 kDa molekül ağırlığında olduğu bildirilmekle birlikte, 17-92 kDa arasında da olabilmektedirler (Guan *et al.*2018).

Lakkazlar, ağırlıklı olarak yüksek redoks potansiyelleri nedeniyle funguslardan üretilirler ve endüstriyel işlemlerde uygulama için yaygın olarak kullanılırlar. Fungal lakkazların; genellikle yüksek fermentasyon süresi, düşük lakkaz verimi, sadece mezofilik ve asidik reaksiyon koşullarında uygulanabilmeleri gibi nedenler ticari kullanımlarını sınırlandırmaktadır. Bununla birlikte, endüstriyel işlemlerin çoğu, daha yüksek sıcaklık, pH ve yüksek tuz konsantrasyonu gibi ekstrem koşullarda gerçekleştirilir ve fungus lakkazları bu ortamlarda genelde çalışamazlar (Du *et al.*2015). Çeşitli inhibitör ajanlarına karşı büyük bir stabiliteye sahip olmaları, geniş bir sıcaklık ve pH aralığında çalışma gibi fungus lakkazlarına kıyasla endüstriyel bakış açısından birçok dikkat çekici özelliklerinden dolayı, son yıllarda

bakteriyel lakkazların kullanımı ve uygulaması hızla artmaktadır (Guan *et al.*2015). Ayrıca, bakteriyel lakkazların, endüstriyel uygulamalarda düşük maliyetli kullanımları, geniş substrat özgüllüğü, kısa sürede enzim üretimi ve uygun manipülasyon ile uygun konakçıda klonlama ve ekspresyon kolaylığı gibi bazı ek avantajları da bulunmaktadır (Fernandes *et al.*2014; Prins *et al.*2015).

### **Besiyeri Optimizasyonu**

Deney tasarımı, yapılan deneyin sonuçlarının analizinden sonra etkisi görülen parametrelerin seçilerek ilgilenilen cevap üzerine olan etkilerini tespit edebilmek için kontrollü olarak değiştirildiği bir süreci içermektedir. Bu süreç ile bağımlı değişkenlerin bağımsız değişken üzerindeki etkileri belirlenebilmektedir. Birçok farklı deney tasarım yöntemi bulunmaktadır ve bu yöntemler genelde biyolojik çalışmalarda daha sık kullanılmaktadır. Klasik deney tasarım yöntemlerinden biri olan bir zamanda bir faktör (one factor at a time, OFAT) yöntemi, pek çok ürünün geliştirilmesinde ve optimizasyonunda kullanılmıştır. Bu yöntemde uygulanacak faktörlerden biri belli bir aralıkta değiştirilirken diğer değişkenler sabit kalmaktadır. Klasik yöntemlerin yerine deney sayısını azaltmak ve elde edilecek veri miktarını da aza indirmek için geliştirilen bilgisayar yazılımı destekli istatistiksel deney tasarım modelleri de bulunmaktadır. Plackett-Burman deney tasarım metodu bunlardan biridir ve en basit istatistiksel tasarım metodudur. Değişken parametreler arasında iki seviyeli faktörlerin belirlenmesiyle tasarım işlemi gerçekleştirilir ve geliştirilen formülü ile sonuçlar elde edilir (Akkuş ve Karabudak, 2020).

Optimizasyon, bir süreç veya sistemin en uygun koşullara getirilmesi için yapılan çalışmalar olarak tanımlanmaktadır. Optimizasyon çalışmaları, kaynakların en etkili ve verimli bir şekilde kullanılmasını amaçlamaktadır. Üretim optimizasyonu; bir üretim yöntemi veya sürecinin en verimli şekilde gerçekleşmesi için yapılan çalışmalardır. Bu sayede üretim sürecinin kısaltılması, üretimin daha ekonomik hale getirilmesi ve verimliliğinin artırılması gibi hedefler gerçekleştirilmektedir (Okudan ve Şen, 2023).

Kültür koşullarının optimizasyonunun yapılması biyolojik süreçlerin araştırılması için büyük önem taşımaktadır. Sıcaklık, besin kaynakları (karbon, azot, iz elementler vb.) ve pH gibi bakteri büyümesi için gerekli parametrelerin optimum hale getirilmesi besiyeri optimizasyonu olarak tanımlanır. Uygun besi ortamlarının oluşturulması, bakterilerin üremesi ve gelişmesini sağlarken uygun koşullar altında biyomolekül ve biyokatalizör üretilmesine de olanak tanır. Besiyeri optimizasyonu ile çalışılan bakteri için en uygun koşullar sağlanırken bakteriden izolasyonu yapılması istenen biyomolekül veya biyokatalizör için de en verimli ve ekonomik şartlar altında üretim gerçekleştirilebilmektedir (Li *et al.*2019).

Bakteriyel enzim üretiminin artırılması için uygun besi ortamının seçilmesi ve bu ortam koşullarının optimizasyonu büyük önem taşımaktadır. Uygun substratların seçiminin yanında pH, sıcaklık, inkübasyon süresi ve diğer içeriklerin de optimize edilmesi istenilen enzimin üretimini artırmakla beraber en verimli ve ekonomik koşulların oluşturulmasını da sağlamaktadır (Yazıcı ve Şahin, 2020).

Lakkaz enzimi geninin; farklı biyokimyasal şartlara, indükleyicilere ve besinlere karşı indüksiyon tepkisi enzim kaynağı ve suşa özgü olarak farklılık gösterebilir. Farklı fermentasyon koşullarında ve çeşitli çevresel şartlara yanıt olarak lakkaz geni transkripsiyonu ve dolayısıyla lakkaz üretim verimi de değişebilir. Yapılan çalışmalarda, genellikle metal iyonları, aromatik bileşikler, karbon ve azot kaynakları ile bunların farklı konsantrasyonları gibi çeşitli çevresel sinyallere göre lakkazın transkripsiyon seviyesinde değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (Piscitelli *et al.*2011; Janusz *et al.*2013). Aromatik bileşikler; lakkaz üretimini artırdıkları ve aynı zamanda izoform profillerini de değiştirdiği için lakkaz indükleyicileri olarak kabul edilirler. Lignolitik mantarlar tarafından üretilen lakkaz üretimi, lignin ve lignoselüloz bileşikler varlığında uyarılabilmektedir.  $Mn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  ve  $Zn^{2+}$  gibi metal iyonlarının varlığında lakkaz üretiminin arttığı yapılan bazı çalışmalarda gösterilmiştir. Lakkazların bu metal iyonlarının varlığında aşırı ifadesinin mekanizması anlaşılammış olsa da bu sürecin toksik strese karşı savunmayı içerdiği ve lakkazların bu metallerin emilimini engelleyen pigmentlerin sentezinde yer aldığı görülmektedir (Bertrand *et al.*2017). Lakkaz gen ekspresyon seviyelerindeki değişikliklerin de muhtemelen organizmanın yaşam döngüsü sırasındaki işlevleriyle ilişkili olabileceği ileri sürülmektedir (Solè *et al.*2012).

## KURAMSAL TEMELLER

Keşfinden bu yana; çevresel kirlilik yaratmaması ve reaksiyonu esnasında atmosferik oksijeni kullanarak farklı bir aracı moleküle gerek duymaması gibi özellikleri sebebiyle, lakkaz enzimine hem araştırmacıların ilgisi sürekli canlı kalmış hem de endüstriyel ve biyoteknolojik süreçlerde kullanımı artan bir biyokatalizör haline gelmiştir. Lakkaz enzimi, genelde mantarlarda çalışılmış, mantarlardan üretilmiş ve izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Fakat mantarlardan üretilen lakkazlar, bakteriyel kaynaklı lakkazlara göre zorlu koşullara karşı daha dayanıksız görünmektedirler. Bu durum, bakteriyel lakkaz üretimi çalışmalarının artmasına sebep olmuştur (Shraddha *et al.*2011). Lakkazların oldukça geniş bir kullanım alanına sahip olması sebebiyle, lakkazlarla ilgili çalışmalar -özellikle üretim koşullarının optimizasyonu- günden güne artmaktadır.

Niladevi ve arkadaşları; filamentöz bir bakteri olan *Streptomyces psammoticus* MTCC 7334 suşundan lakkaz üretimi için RSM (yanıt yüzey metodu) ile optimizasyon çalışmaları yapmışlardır. Deney tasarımı için Plackett-Burman yöntemini kullanmışlar ve sıcaklık, süre, çalkalama hızı, maya ekstraktı ve MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O gibi parametreleri değişken olarak kullanmışlardır. İstatiksel olarak elde edilen ve en iyi aktiviteyi veren kültür koşullarının; 34°C'de, 2,2 g/L maya ekstraktı, 1 g/L MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 180 rpm çalkalama hızında ve 38. inkübasyon saatinde olduğu belirtilmiştir (Niladevi *et al.*2009).

Nakade ve arkadaşları; lakkaz ürettiği bilinen *Polyporus brumalis* mantarı suşunun lakkaz üretimini artırmak için üretim ortamına 0,25 mM CuSO<sub>4</sub> eklendikten sonra enzim üretiminin ve aktivitesinin arttığını gözlemlemiş ve CuSO<sub>4</sub>'ın; lakkaz genlerinden pbLacI genini ortama eklendikten 60 dk sonra indükleyerek transkripsiyonunu ve gen ifadesini artırdığını göstermişlerdir (Nakade *et. al.*, 2013).

Yang ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada; Çin Shennongjia doğal bölgesinden izole edilen beyaz çürükçül mantar *Trametes velutina* 5930 suşunun lakkaz üretim potansiyeli araştırılmıştır. Standart kültür koşulları altında lakkaz üretiminin az olduğu gözlenmiş ve kültür ortamına Cu<sup>2+</sup> ve Fe<sup>2+</sup> iyonları ile aromatik fenolik bileşikler olan tannik asit, sinamik asit, siringik asit, gallik asit ve guaiakol eklenmiş ve en yüksek lakkaz aktivitesi veren ortamın siringik asit içeren besi ortamı olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda ortama eklenen Cu<sup>2+</sup> ve Fe<sup>2+</sup> iyonları ile siringik asitin lakkaz genini indükleyerek transkripsiyonu ve gen ifadesini artırdığı da yapılan çalışmada gösterilmiştir (Yang *et al.*2013).

Shondi ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada; *B. tequilensis* SN4 suşundan 90°C'ye kadar dayanıklı ve pH: 8-9'da aktif kalabilen bir termofilik lakkaz enzimi üretilmiş ve aktivitesi gösterilmiştir. Sıvı kültür koşullarına eklenen 650 µl MnSO<sub>4</sub>, 350 µl FeSO<sub>4</sub> ve %3,5 etanolün lakkazın üretim verimini oldukça artırdığı belirtilmiştir. Optimize edilen koşullar altında lakkaz aktivitesinin yaklaşık 764 kat arttığı ve kâğıt hamurunun yumuşatılmasında kullanıldığında işlem veriminin de yükseldiği gösterilmiştir (Sondhi *et al.* 2015).

Yang ve arkadaşları; bir mantar türü olan *Cerrena sp.* HYB07 suşu ile çalışmışlar ve lakkazın sekiz geninin (lac1-8) kültür ortamına eklenen metal iyonları, aromatik bileşikler ve karbon-azot kaynakları gibi parametrelerin ifadesini nasıl etkilediğini qPCR ile incelemişlerdir. Mantar suşunu uygun ortamda büyüttükten sonra optimizasyon yapmışlar ve ortama eklenen Cu<sup>2+</sup> iyonlarının lac7 genini indüklediğini belirtmişlerdir. Zn<sup>2+</sup> ve Cu<sup>2+</sup> iyonlarının ortama beraber eklendiği zaman lakkaz üretimini ve aktivitesini artırdığını da gözlemlemişlerdir. Gliserol ve inorganik azot kaynaklarının lac7 geninin ifadesini ve fungal büyümeyi azalttığını göstermişlerdir (Yang *et al.* 2016).

Jafari ve arkadaşları; halofilik bir bakteri olan *Choromohalobacter salexigens* suşundan lakkaz enzimi üretimi için kültür koşullarının optimizasyonunu OFAT ve RSM yöntemlerini kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Oluşturulan 10 farklı kültür ortamı içinde en yüksek lakkaz aktivitesini veren ortamın CuSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, üre ve glikoz içerdiğini belirtmişlerdir. Üretilen lakkaz enzimi ile badem kabuğunda delignifikasyon çalışması yapmışlar ve verimli sonuçlar elde etmişlerdir (Jafari *et al.* 2017).

Kaur ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada; orman toprağı, kanalizasyon ve endüstriyel atık gibi ortamlardan elde edilen bakteri izolatları ile lakkaz enzimi varlığı ve aktivitesi taraması yapılarak potansiyel lakkaz üretici bakteri suşları aranmıştır. Hazırlanan fosfat içeren katı besi ortamlarında lakkaz aktivitesi görülemediğinden, fosfat içermeyen farklı bir katı besiyeri oluşturulduğunda lakkaz aktivitesi görülmüştür. *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Bhargaveaea* ve *Rheinheimera* türlerine ait yedi farklı izolatın lakkaz aktivitesi yönünden optimizasyonu araştırılmış ve sonuçta ortama eklenen fosfatın ve triptonun lakkaz üretimini durdurduğu, %0,1 glikoz eklendiğinde ise lakkaz üretiminin arttığı belirtilmiştir (Kaur *et al.* 2017).

Rezaie ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada; halofilik bir bakteri olan *Aquiasalibacillus elongatus* izolatı ile lakkaz üretimi optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Kültür ortamına eklenen 1,7 g/L glikoz, 0,8 g/L CuSO<sub>4</sub>, 15 g/L üre ve 0,8 g CaCl<sub>2</sub>'ün lakkaz aktivitesini artırdığı gösterilmiştir. Lakkaz enzimi afinite kromatografisi ile saflaştırıldıktan

sonra fıstık kabuğu delignifikasyonunda kullanılmış ve yüksek oranda verimli reaksiyon gerçekleştirdiği gözlenmiştir (Rezaie *et al.* 2017).

El-Bendary ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada; *B. amyloliquefaciens* suşundan spor lakkaz üretimi için optimizasyon gerçekleştirilmiştir. LB sıvı besiyerine eklenen %1-2 glikoz, %0,1 maya ekstraktı, 0,1 mM FeCl<sub>3</sub> ve 0,001 MnCl<sub>2</sub>'nin lakkaz üretimini artırdığı gösterilmiştir. Optimum spor lakkaz üretimi yedi günlük inkübasyon sürecinde ve pH: 8,30 ile %2'lik inokülasyon seviyelerinde gerçekleştirilmiştir (El-Bendary *et al.* 2020).

Gogotya ve arkadaşları; çürümüş odunlardan izolasyonu ve identifikasyonu yapılan *Stephomyces sp.* LAO izolatıyla lakkaz üretim çalışması yapmışlardır. İzolatın lakkaz aktivitesi gösterdikten sonra kültür koşulları optimize edilmiş ve % 0,04 ferulik asit, 0,2 g/L çam ağacı kabuğu, 1 g/L üre, 1 g/L laktoz içeren pH: 5 ortamında 16 saatlik inkübasyon süresinden sonra en yüksek lakkaz aktivitesini gösterdiği bildirilmiştir. Lakkaz enziminin yüksek sıcaklık ve pH aralığı ile organik çözücü varlığında dayanıklı olduğu da gösterilmiştir (Gogotya *et al.* 2021).

Ali ve arkadaşları; çürümüş odunlardan izole ettikleri *Serretia proteamaculans* AORB19  $\gamma$ -proteobakteriyel suşundan lakkaz üretimi için OFAT yöntemini kullanarak optimizasyon çalışmaları yapmışlardır. Sıvı kültürde 2 g/L maya ekstraktı, %5 aseton ve Li<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> ve Mn<sup>2+</sup> iyonları içeren ortamda pH: 9 ve 30°C'de sağlanan koşulların en yüksek lakkaz aktivitesini verdiğini göstermişlerdir. Optimize edilen kültür koşullarının, başlangıç lakkaz aktivitesine göre yaklaşık altı kat arttığı bildirilmiştir. Üretilen lakkaz ile delignifikasyon çalışmaları yapılmış ve verimli sonuçlar elde edilmiştir (Ali *et al.* 2022).

Ensani ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada; İran Guilan eyaleti ormanlarından *Trametes versicolor* (L:Fr.) Pilat izole edilerek tanılanmış ve lakkaz üretimi için araştırılmıştır. Bu çürükçül mantar suşunda lakkaz üretimini artırmak için sıvı kültür ortamına meşe, kavak ve çam talaşı gibi bitkisel kaynaklı lignin içeriğine sahip olan atık maddeler ve farklı konsantrasyonlarda CuSO<sub>4</sub> eklenmiştir. En yüksek lakkaz üretimine sahip ortamın meşe talaşı ve 3,5 mM CuSO<sub>4</sub> içerdiği belirtilmiştir (Ensani *et al.* 2023).

## **Tezin Amacı**

Lakkaz enzimleri gıda, ilaç, kimya, tekstil, kâğıt endüstrilerinde ve biyoyakıt, biyosensör üretimi ile biyoremediasyon çalışmaları gibi biyoteknolojik uygulamalarda sıklıkla kullanılan bir enzim haline gelmiştir. Substrat oksidasyonu sırasında su dışında herhangi bir zararlı veya toksik yan ürün oluşturmaması sebebiyle; çevresel ve endüstriyel çalışmalar için yüksek potansiyelli yeşil bir biyokatalizör olarak lakkaz diğer enzimlere kıyasla en gözde adaydır. İlk olarak bitkilerde tanımlanan ve izolasyonu yapılan lakkaz enzimi genelde

mantarlarda daha çok çalışılmış ve mantar kaynaklı olarak saflaştırılıp kullanılmıştır. Bakteriyel kaynaklı lakkazların fungal lakkazlara göre yüksek sıcaklık ve pH, halofilik ortamlar gibi ekstrem koşullarda daha dayanıklı oldukları yapılan son çalışmalarda vurgulanmaktadır. Bunun gibi sebeplerden dolayı bakteriyel lakkazlara olan ilginin artmasıyla birlikte bakteriyel lakkazların üretimi ve izolasyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda artmıştır. Bakteriyel lakkaz üretimini artırmak için kültür koşullarının optimizasyonu, besi ortamlarına indükleyici olarak metal iyonları ve farklı aromatik organik bileşiklerin eklendiği çalışmalar ile verimli sonuçlar alınmıştır.

Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında; çalışma grubumuz tarafından Nevşehir-Kozaklı Kaplıcası termal kaynağından izolasyonu ve identifikasyonu önceden yapılan *B. licheniformis* SO7 suşu kullanılarak lakkaz aktivitesini ve dolayısıyla üretimini artırmak için en uygun besi ortamının seçilmesi için optimizasyon çalışmalarının yapılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, kültür ortamlarına temel besi maddelerinin ve iz elementlerin yanı sıra aromatik organik bileşiklerin eklenmesi, lignin içerdiği bilinen gıda ve tarım atıklarını içeren farklı kültürlerin de oluşturulmasıyla en uygun ve verimli lakkaz üretim koşullarının belirlenmesi, elde edilen koşullarda lakkaz enzimi üretiminin gen ve protein seviyesinde incelenmesi hedeflenmiştir.

## MATERYAL VE METOT

### Materyal

#### Kullanılan organizma

Yapılan tez çalışmasında kullanılan mikroorganizmalar, Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU danışmanlığında Sultan ÖLMEZ (Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü) tarafından izolasyonu, identifikasyonu ve karakterizasyonu yapılan bakteri suşları arasından seçilmiştir (Ölmez, 2017).

#### Kullanılan araç-gereç ve cihazlar

Tez çalışması sırasında kullanılan araç-gereç ve cihazlar Tablo 3'te gösterilmiştir.

**Tablo 3.** Kullanılan Araç-Gereç ve Cihazlar

Araç-Gereç ve Cihazlar	Marka-Model
Otoklav	Hmc Hiramaya
Etüv	Thermo
Steril Kabin	Telstar Bio-II-A
Çalkalamalı İnkübatör	Zhiceng, Biobase
Çeker Ocak	TÜV-SÜD
Saf Su Cihazı	Mp Minipure
Buzdolabı (+4, -20)	Vestel
Hassas Terazi	Ohaus Pioneer
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Heidoph
Isı Bloku	Lab-Line
Kar Makinesi	Angelantoni
Agaroz Jel Elektroforez Cihazı	Thermo-EC
SDS-PAGE Elektroforez Cihazı	Bio-Rad
Jel Görüntüleme Cihazı	Quantum Vilber Lourmat
pH Metre	Mettler Toleda
Mikrosantrifüj Cihazı	Hettich
Santrifüj Cihazı	Beckman Coulter
Falkon Tüpler	Eppendorf
Kuvars Küvetler	Merck
Mikropipet Takımı	Thermo Scientific
Parafilm	Isolab
PCR Cihazı	Thermo-Cyclers
qPCR Cihazı	

## Kullanılan kimyasallar

Tez çalışması sırasında kullanılan kimyasalların listesi Tablo 4.'te gösterilmiştir.

**Tablo 4.** Kullanılan Kimyasallar

Kimyasallar	Marka
TSA	Condalab
TSB	Neogen
Magnezyum Sülfat (MgSO <sub>4</sub> )	Merck
Demir Sülfat (FeSO <sub>4</sub> )	Merck
Monopotasyum Fosfat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck
Kalsiyum Klorür (CaCl <sub>2</sub> )	Merck
Sodyum Klorür (NaCl)	Sigma-Aldrich
Glikoz	Merck
Fruktoz	Sigma
Sükroz	Fluka
Maltoz	Merck
Gliserol	Sigma-Aldrich
Laktoz	Oxoid
2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik Asit (ABTS)	Sigma
Guaiakol	Sigma
Kafeik Asit	Sigma
Vanilik Asit	Sigma
Nikotinik Asit	Sigma
Ferulik Asit	BLDpharm
Siringik Asit	Apollo Scientific
Amonyum Sülfat ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Merck
Bacteriological Pepton	Conda Pronadisa
Fish Pepton	Himedia
Malt Ekstraktı	Merck
Maya Ekstraktı	Chemsolute
Üre	Sigma-Aldrich
Bakır Sülfat (CuSO <sub>4</sub> )	Merck
Çinko Klorür (ZnCl <sub>2</sub> )	Merck
Mangan (II) Klorür (ZnCl <sub>2</sub> )	Merck
Hidroklorik Asit (HCl)	Sigma-Aldrich
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Sigma-Aldrich
Etilendiamintetraasetikasit (EDTA)	Sigma-Aldrich
Trizol	Invitrogen
β-merkaptoetanol	Merck
Etil Alkol	Honeywell
RNA İzolasyon Kiti	Eco-Tech
cDNA Sentez Kiti	Bio-Rad
SYBR Green Master Mix	BioLab
Coomassie Brilliant Blue G-250	Sigma
N,N,N',N'-tetrametilendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Sigma-Aldrich

## **Kullanılan çözelti ve besiyerlerinin hazırlanması**

### ***Kullanılan besiyerlerinin hazırlanması***

**Trypticasein Soy Agar (TSA) Besiyerinin Hazırlanması:** 15 g/L agar, 15 g/L pankreatik kazein, 5 g/L sodyum klorür, 5 g/L papaik soya içeren hazır besiyerinden 40 g tartılmış, 1 L distile su içerisinde çözülmüş ve 1 atm basınçta 121°C'de otoklavda 15 dk steril edilmiştir.

**Tryptone Soy Broth (TSB) Besiyerinin Hazırlanması:** 17 g/L kazein, 3 g/L soya, 5 g/L sodyum klorür, 2,5 g/L dipotasyum hidrojen fosfat ve 5 g/L glukoz monohidrat içeren hazır besiyerinden 30 g tartılmış, 1 L distile su içerisinde çözülmüş ve 1 atm basınçta 121°C'de otoklavda 15 dk steril edilmiştir.

**CuSO<sub>4</sub> ve ABTS İçeren TSA Besiyerinin Hazırlanması:** 1 mM CuSO<sub>4</sub> ve 1 mM ABTS, hazırlanan TSA besiyerine eklenmiş ve 1 atm basınçta 121°C'de otoklavda 15 dk steril edilmiştir.

**CuSO<sub>4</sub> ve ABTS İçeren TSB Besiyerinin Hazırlanması:** 1 mM CuSO<sub>4</sub> ve 1 mM ABTS, hazırlanan TSB besiyerine eklenmiş ve 1 atm basınçta 121°C'de otoklavda 15 dk steril edilmiştir.

**Minimal Tuz Besiyerlerinin Hazırlanması:** Besiyeri optimizasyonunda kullanılmak üzere 6 farklı içeriğe ve konsantrasyona sahip minimal tuz besiyeri (MTB) aşağıdaki gibi hazırlanmış ve 1 atm basınçta 121°C'de otoklavda 15 dk steril edilmiştir.

- 1. MTB
  - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 7,8 g/
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 6,8 g/L
  - MgSO<sub>4</sub>: 0,2 g/L
  - FeSO<sub>4</sub>: 0,05 g/L
  - CaCl: 0,05 g/L
  - NaCl: 0,08 g/L
- 2. MTB
  - MgSO<sub>4</sub>: 4 mM
  - MnCl<sub>2</sub>: 0,03 mM
  - FeSO<sub>4</sub>: 0,06 mM
  - (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>: 0,06 mM
  - NaCl: 6,8 mM
  - KCl: 5,4 mM

CaCl<sub>2</sub>: 1 mM

- 3. MTB

MgSO<sub>4</sub>: 0,8 mM

MnCl<sub>2</sub>: 0,02 mM

CaCl<sub>2</sub>: 0,5 mM

NH<sub>4</sub>Cl: 10 mM

- 4. MTB

NH<sub>4</sub>Cl: 2 g/L

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 5,5 g/L

MgSO<sub>4</sub>: 2 g/L

MnCl<sub>2</sub>: 0,02 g/L

CaCl<sub>2</sub>: 0,113 g/L

FeSO<sub>4</sub>: 0,16 g/L

- 5. MTB

MgSO<sub>4</sub>: 0,5 g/L

FeSO<sub>4</sub>: 0,04 g/L

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0,5 g/L

CaCl<sub>2</sub>: 0,15 g/L

NaCl: 0,1 g/L

- 6. MTB

MgSO<sub>4</sub>: 0,5 g/L

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0,5 g/L

KCl: 0,5 g/L

FeSO<sub>4</sub>: 0,1 g/L

**Gıda ve Tarım Atıklarından Besiyeri Hazırlanması:** Mısır koçanı, ceviz kabuğu, havuç kabuğu, turp kabuğu, patates kabuğu ve kara lahana kabukları kurutulmuş ve öğütücü ile toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen maddelerden 2 g/L olacak şekilde tartılmış ve distile su ile çözülmüştür. Daha sonra 1 atm basınçta 121°C’de otoklavda 15 dk steril edilmiştir.

***Enzim aktivite tayininde kullanılan çözelti ve tamponlar***

**Sodyum Asetat Tamponunun Hazırlanması (1 mM pH: 5,0):** 0,04 g sodyum asetat tartılmış ve 400 ml distile su içinde çözülmüştür. pH metre ile pH: 5,0’a ayarlanmış ve distile su ile son hacim 500 ml’ye tamamlanmıştır.

**ABTS (Substrat) Çözeltisinin Hazırlanması (0,5 mM):** 0,014 g ABTS tartılmış ve 50 ml 1 mM pH: 5,0 asetat tamponu içinde çözülmüştür.

***Lowry yöntemi ile protein tayininde kullanılan çözeltiler***

**A Reaktifinin Hazırlanması:** %2'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> tartılmış ve 0,1 M NaOH içinde çözülmüştür.

**B Reaktifinin Hazırlanması:** %0,5'lik CuSO<sub>4</sub> tartılmış ve NaK-tartarat tamponu içinde çözülmüştür.

**C Reaktifinin Hazırlanması:** A ve B reaktifleri 1/1 oranında karıştırılmış ve C reaktifi hazırlanmıştır.

**D Reaktifinin Hazırlanması:** 1 M Folin ayracı distile su ile hazırlanmıştır.

**Standart Serum Albumin Çözeltisinin Hazırlanması (1 mg/ml):** 1 mg standart serum albümin tartılmış ve 1 ml distile su içinde çözülmüştür.

***SDS-PAGE tayininde kullanılan çözelti ve tamponlar***

**Tris-HCl Tamponunun Hazırlanması (1 M, pH: 8,8):** 27,23 g Tris tartılmış ve 90 ml distile su içinde çözülmüştür. pH: 8,8'e ayarlanmış ve son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

**Tris-HCl Tamponunun Hazırlanması (1 M, pH: 6,8):** 6 g Tris tartılmış ve 90 ml distile su içinde çözülmüştür. pH: 6,8'e ayarlanmış ve son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

**%30'luk Akrilamid-Bisakrilamid Çözeltisinin Hazırlanması:** 6 g akrilamid ve 0,16 g bisakrilamid tartılmış ve 13,84 ml distile su içinde çözülmüştür.

**%10'luk SDS Çözeltisinin Hazırlanması:** 1 g SDS tartılmış ve 4,5 ml distile su içinde çözülmüştür. Son hacim distile su ile 10 ml'ye tamamlanmıştır.

**%10'lu PER Çözeltisinin Hazırlanması:** 1 g amonyum per sülfat tartılmış ve 4,5 ml distile su içinde çözülmüştür. Son hacim distile su ile 10 ml'ye tamamlanmıştır.

**Numune Tamponunun Hazırlanması:** 1 ml gliserin, 1 ml %10 SDS, 0,65 ml 1 M pH: 8,8 Tris-HCl ve 0,03 %1 brom timol mavisi üzerine distile su eklenmiş ve son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır. Kullanmadan hemen önce hazırlanmış tampon üzerine 500 µl β-merkaptotanol eklenmiştir.

**Yürütme Tamponunun Hazırlanması (10X SDS-PAGE):** 14,4 g glisin ve 3 g Tris tartılmış, üzerine 10 ml %10'luk SDS eklenmiştir. Son hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

**Ayrırma Jelinin Hazırlanması:** 4,4 %30 akrilamid ve %0,8 bisakrilamid, 5 ml 1 M pH: 8,8 Tris-HCl, 0,2 ml %10 SDS, 0,1 ml %1,5 PER, 0,13 ml %5 TEMED ve 3,15 ml distile su ile hazırlanmıştır.

**Yığma Jelinin Hazırlanması:** 0,44 ml %30 akrilamid ve %0,8 bisakrilamid, 0,41 ml 1M pH: 6,8 Tris-HCl, 0,03 ml %10 SDS, 0,1 ml %1,5 PER, 0,03 ml %5 TEMED ve 2,450 ml distile su ile hazırlanmıştır.

### ***Coomassie blue boyama için kullanılan çözelti ve tamponlar***

**Sabitleştirme Çözeltisinin Hazırlanması:** 50 ml izo-propanol, 10 g TCA ve 40 ml distile su ile hazırlanmıştır.

**Boyama Çözeltisinin Hazırlanması:** 0,1 g Coomassie Blue G-250 tartılmış ve üzerine 50 ml etanol, 10 ml asetik asit ve 40 ml distile su eklenerek hazırlanmıştır.

**Yıkama Çözeltisi:** 50 ml etanol, 10 ml asetik asit ve 40 ml distile su ile hazırlanmıştır.

## **Yöntem**

### **Lakkaz enzimi üreten bakteri izolatlarının ABTS ve CuSO<sub>4</sub> içeren katı ve sıvı besiyerlerinde belirlenmesi**

Çalışma grubumuz tarafından daha önceden izolasyonu ve identifikasyonu yapılmış olan termofilik *B. licheniformis* suşlarının TSA katı kültür ortamına çizgi ekimi yapılmış ve 55°C etüvde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bir gece büyüyen bakterilerden steril öze yardımıyla saf koloniler alınmış ve ABTS ve CuSO<sub>4</sub> içeren TSA katı kültür ortamına çizgi ekimi yapılmıştır. 55°C etüvde 24-48 saat inkübasyondan sonra yeşil-kahverengi zon oluşturan bakterilerin lakkaz enzim aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir (Yadav *et al.*2016). Yeşil-kahverengi zon çapı fazla olarak gözlenen bakteri suşları (*B. licheniformis* SO7, SO12, EÇ3, SO17 ve EH2) ABTS ve CuSO<sub>4</sub> içeren TSB sıvı kültüre inoküle edilmiş ve 24 saat sonunda lakkaz enzim aktivitesi ölçülmüştür. En yüksek enzim aktivitesini veren *B. licheniformis* SO7 suşu ile çalışmalara devam edilmiştir.

*B. licheniformis* SO7 suşunun TSA katı besiyerine çizgi ekimi yapılmış ve 24 saat 55°C etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda büyüyen bakteri kolonilerinden saf olan bir koloni seçilmiş ve steril öze yardımıyla TSB sıvı besiyerine ekimi gerçekleştirilerek 24 saat 55°C çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Sıvı besiyerinde büyüyen bakterilerin

hücre yoğunluğu spektrofotometrede 600 nm'de ölçülmüş ve değer 1/OD formülüne göre hesaplanmıştır. Yapılan hesaba göre uygun miktarda bakteri üretim besiyeri ve atıklardan oluşturulan besiyerlerine inoküle edilmiştir.

### **Lakkaz enzimi üretimi için yapılan klasik optimizasyon (OFAT) çalışmaları**

Lakkaz enzim üretimini artırmak ve en uygun koşulları araştırmak için klasik optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Optimizasyon çalışmalarına *B. licheniformis* türünün iyi üreme gösterdiği altı farklı minimal tuz besiyeri arasından seçim yapılarak başlanmıştır (Spizizen and Prestidge, 1969; Clark *et al.*1972; Kedia *et al.*2010; Öztat, 2013). 50 ml olacak şekilde erlenlere altı farklı sıvı minimal tuz besiyeri hazırlanmış ve 55°C çalkalayıcı inkübatörde 24 saatte bir lakkaz enzim aktivitesi ölçülmüştür. En yüksek aktiviteyi veren besiyeri seçilmiş ve bir sonraki parametreye geçilmiştir.

### **Substrat Optimizasyonu**

Minimal tuz besiyeri seçildikten sonra lakkaz enzim üretimini indüklemek amacıyla 1 mM olacak şekilde yedi farklı substrat (ABTS, Guaiakol, Vanilik asit, Ferulik asit, Kafeik asit, Siringik asit ve Nikotik asit) içeren besiyeri hazırlanmış ve 55°C çalkalayıcı inkübatörde 12 saatte bir enzim aktivitesi ölçülmüş ve en yüksek aktiviteyi veren substrat seçilmiştir. Seçilen substratın en iyi konsantrasyonunu belirlemek için 5 farklı konsantrasyonda (0.5, 1, 1.5, 2 ve 2.5 mM) besiyeri hazırlanmış ve 55°C çalkalayıcı inkübatörde 12 saatte bir enzim aktivitesi ölçülmüş ve en yüksek aktiviteyi veren substrat konsantrasyonu seçilerek bir sonraki parametreye geçilmiştir.

### **Karbon kaynağı optimizasyonu**

Optimum substrat ve konsantrasyonu belirlendikten sonra optimum karbon kaynağını belirlemek için 20 g/L olacak şekilde altı farklı karbon kaynağı (Glikoz, Fruktoz, Sükroz, Maltoz, Laktoz ve Gliserol) içeren besiyeri hazırlanmış ve 55°C çalkalayıcı inkübatörde 12 saatte bir enzim aktivitesi ölçülmüş ve en yüksek aktiviteyi veren karbon kaynağı belirlenmiştir. Seçilen karbon kaynağının en iyi konsantrasyonunu belirlemek için 5 farklı konsantrasyonda (10 g/L, 20 g/L, 30 g/L, 40 g/L ve 50 g/L) besiyeri hazırlanmış ve 55°C çalkalayıcı inkübatörde 12 saatte bir enzim aktivitesi ölçülmüş ve en yüksek aktiviteyi veren karbon kaynağı konsantrasyonu seçilerek bir sonraki parametreye geçilmiştir.

### **Azot kaynağı optimizasyonu**

Optimum karbon kaynağı ve konsantrasyonu belirlendikten sonra optimum azot kaynağını belirlemek için 2 g/L olacak şekilde altı farklı azot kaynağı (Amonyum sülfat,

Bacteriological Pepton, Fish Pepton, Malt Ekstaktı, Maya Ekstaktı ve Üre) içeren besiyeri hazırlanmış ve 55°C çalkalayıcı inkübatörde 12 saatte bir enzim aktivitesi ölçülmüş ve en yüksek aktiviteyi veren azot kaynağı seçilmiştir. Seçilen azot kaynağının en iyi konsantrasyonunu belirlemek için beş farklı konsantrasyonda (1 g/L, 2 g/L, 3 g/L, 4 g/L ve 5 g/L) besiyeri hazırlanmış ve 55°C çalkalayıcı inkübatörde 12 saatte bir enzim aktivitesi ölçülmüş ve en iyi aktiviteyi veren azot kaynağı konsantrasyonu seçilerek bir sonraki parametreye geçilmiştir.

### **Metal iyonu optimizasyonu**

Optimum azot kaynağı ve konsantrasyonu belirlendikten sonra optimum metal iyonunu belirlemek için 1 mM olacak şekilde üç farklı metal iyonu (CuSO<sub>4</sub>, ZnCl<sub>2</sub> ve MnCl<sub>2</sub>) içeren besiyeri hazırlanmış ve 55°C çalkalayıcı inkübatörde 12 saatte bir enzim aktivitesi ölçülmüş ve en yüksek aktiviteyi veren iyon seçilerek bir sonraki parametreye geçilmiştir.

### **pH optimizasyonu**

Optimum metal iyon belirlendikten sonra optimum pH'ı belirlemek için beş farklı pH değerinde (5, 6, 7, 8, ve 9) besiyeri hazırlanmış ve 55°C çalkalayıcı inkübatörde 12 saatte bir enzim aktivitesi ölçülmüş ve en yüksek aktiviteyi veren pH değeri seçilerek bir sonraki parametreye geçilmiştir.

### **Sıcaklık optimizasyonu**

Optimum pH değeri belirlendikten sonra optimum sıcaklık değerini belirlemek için üç besiyeri hazırlanmış, 45°C, 55°C ve 65°C'lerdeki çalkalayıcı inkübatörlerde 12 saatte bir enzim aktivitesi ölçülmüş ve en yüksek aktiviteyi veren sıcaklık derecesi seçilerek bir sonraki parametreye geçilmiştir.

### **Süre optimizasyonu**

Optimum sıcaklık değeri belirlendikten sonra optimum süreyi belirlemek için hazırlanan besiyeri 55°C çalkalayıcı inkübatörde 12 saatte bir enzim aktivitesi, aktivite düşene kadar ölçülmüş ve en yüksek aktiviteyi veren inkübasyon saati seçilmiştir.

### ***Gıda ve tarım atıkları kullanılarak besiyeri hazırlanması***

Lignoselüloz yapıdaki bileşikleri içerdiği bilinen gıda ve tarım atıkları (Mısır koçanı, Ceviz kabuğu, Havuç kabuğu, Turp kabuğu, Patates kabuğu ve Kara Lahana kabuğu) kullanılarak atık besiyerleri hazırlanmıştır. Atık kabuklar öncelikle kurutulmuş ve öğütücü yardımıyla toz haline getirilmiştir. Toz haline gelen atıklar 2 g/L (Kumar *et al.*2022) olacak şekilde tartılmış ve 100

ml erlenlere distile su ile hazırlanmış ve 55°C çalkalayıcı inkübatörde 12, 24, 26 ve 48. saatlerde enzim aktivitesi ölçülmüştür.

### **Lakkaz enzim aktivite tayini**

Lakkaz enzim aktivitesi ABTS'nin substrat olarak kullanıldığı yonteme göre belirlenmiştir (Heinfling *et al.* 1998). Katı ABTS 1 mM pH: 5 sodyum asetat tamponuyla çözülerek kullanılmış ve tüpler 55°C'de 15 dk inkübe edildikten sonra 420 nm'de spektrofotometrede ölçüm yapılmıştır. Küvet içeriği Tablo 6'te detaylı olarak verilmiştir.

**Tablo 5.** Lakkaz Enzim Aktivite Ölçümü Küvet İçeriği

Çözelti	Kontrol Tüpü (µl)	Ölçüm Tüpü (µl)
Substrat 0,5 mM (1mM sodyum asetat tamponu ile hazırlanmıştır)	1000	900
Enzim	-	100

Bir ünite enzim aktivitesi, 1 dakikada 1 µmol ABTS'nin oksidasyonunu gerçekleştiren enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Lakkaz enzim aktivitesi, aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Baltierra-Trejo *et al.*2015).

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

UL = Enzim aktivitesi (µmol dk<sup>-1</sup>)

ΔA = Absorbans değışikliğı (420 nm)

t = İnkübasyon süresi (dk)

V<sub>t</sub> = Toplam hacim (ml)

ε = Molar ekstinksiyon katsayısı [ε<sub>420</sub> = 36 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>(ABTS)]

d = Ölçüm küveti ışık yolu (1 cm)

V<sub>o</sub> = Enzim hacmi (ml)

D<sub>f</sub> = Dilüsyon faktörü

### **Lowry yöntemi ile protein tayini**

Tez çalışması sırasında kantitatif protein tayini için Lowry yöntemi (Lowry *et al.*1951) kullanılmıştır. Protein miktarlarını belirlemek amacıyla standart grafik hazırlanmıştır. 1 mg/ml BSA çözeltisinden 10-100 µl tüplere konmuş ve total hacimleri 100 µl olacak şekilde distile su ile tamamlanmıştır. Tüplere C reaktifinden 200 µl eklenmiş ve 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra D reaktifinden 20 µl eklenerek vortekslenmiş ve karanlık

ortamda 45 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 620 nm’de ölçüm yapılmış ve standart grafik elde edilen sonuçlara göre hazırlanmıştır. Protein tayini yapılacak örneklerden 50 µl üzerine 200 µl C reaktifi konulmuş ve aynı şekilde oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra üzerine 20 µl D reaktifi konularak vortekslendikten sonra karanlık ortamda 45 dk inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda 620 nm’de ölçümü yapılmıştır. Oluşturulan standart grafik kullanılarak örneklerin protein miktarları belirlenmiştir.

### ***Optimize edilen kültür koşullarında ve atık besiyerinde lakkaz gen ifadesinin real-time PCR ile araştırılması***

Tez çalışmasında kullanılan yedi farklı substrat; klasik optimizasyon çalışmalarının sonunda belirlenen besiyeri koşulları sabit tutularak hazırlanan yedi farklı besiyerine eklenmiş ve bu üretim ortamlarında bulunan farklı substratların etkisinin gen seviyesinde incelenmesi için Real-Time PCR uygulanmıştır. Yedi farklı besiyerine ek olarak en yüksek enzim aktivitesini veren atık besiyeri de Real-Time PCR için kullanılmış ve aynı gen için sekiz farklı üretim ortamı araştırılmıştır.

### **Tatal RNA izolasyon ön işlem basamakları**

Total RNA izolasyonu için EcoTech RNA Isolation Kit kullanılmıştır. Sekiz farklı besiyerinden 3'er ml homojenat alınmış ve 8000 rpm’de 7 dk santrifüj işlemi yapılmıştır. Sonrasında süpernatant uzaklaştırılarak pellet üzerine örnek başına besiyerinden alınan her 1 ml homojenat için 480 µl EDTA ve 120 µl lizozim eklenerek 37°C’de 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra her bir örnek için 400 µl Trizol ve 4 µl β-merkaptoetanol eklenmiş ve yaklaşık 4 dk vortekslendikten sonra 13000 rpm’de 3 dk santrifüj gerçekleştirilmiştir. Daha sonra süpernatant farklı steril tüplere alınmış ve alınan süpernatant miktarı kadar etanol tüplere eklenmiştir. Bu işlemden sonrası kit protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Prosedür sonunda elde edilen izolat, saflık ve konsantrasyon kontrolü için NanoDrop cihazında spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve cDNA sentezinde kullanılmak üzere -80°C’ye kaldırılmıştır.

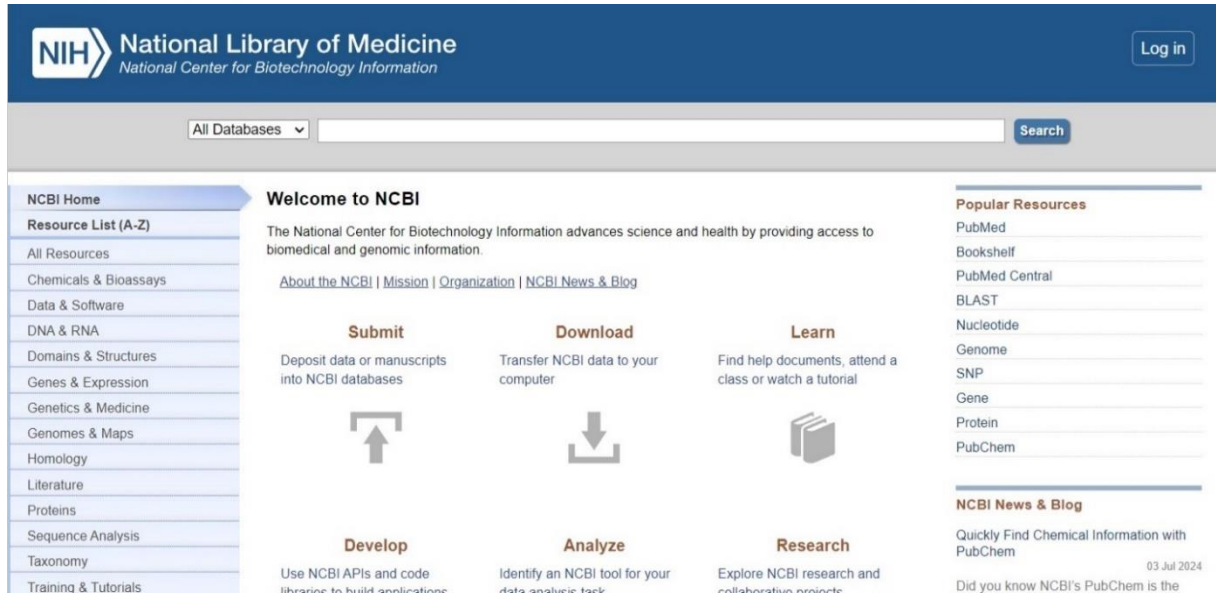
### **cDNA sentezi işlem basamakları**

cDNA sentezi için BioRad cDNA Synthesis Kit kullanılmıştır. Sekiz farklı RNA örneğinin konsantrasyonları birbirleri arasında eşitlenmiş ve her örnekten ne kadar alınacağı hesaplanmıştır. İşlem basamakları ve PCR reaksiyon basamakları (Tablo 7.) kit prosedürüne göre uygulanmıştır. Thermo-Cycler PCR cihazındaki işlem sonunda elde edilen cDNA örnekleri qPCR analizinde kullanılmak üzere -20°C’ye kaldırılmıştır.

**Tablo 6.** cDNA Sentezi İçin PCR Reaksiyon Basamakları

Sıcaklık	Süre
25°C	5 dk
46°C	20 dk
95°C	1 dk
4°C	∞

**Primer Dizaynı:** Real-Time PCR’da gen ekspresyon analizi için 16S housekeeping geni ve CotA geni kullanılmıştır. Primerlerin tasarımı National Center for Biotechnology (NCBI) (Şekil 5.) veritabanında bulunan ilgili bakterinin genom dizisi kullanılarak yapılmıştır. İlgili genlerin belirlenmesi için kullanılan veritabanından organizma (*Bacillus licheniformis*) seçimi yapılmıştır.



**Şekil 5.** NCBI veritabanı

Organizma seçildikten sonra sekans bilgisine ulaşılmış (Şekil 6.) ve oradan ilgili gen bölgesinin primer tasarımı için gereken nükleotid dizisi seçilerek Primer 3 veritabanına (Şekil 7.) yüklenmiştir.

FASTA -

Send to -

## Bacillus licheniformis strain ANSB821 CotA gene, complete cds

GenBank: MK050971.1

[GenBank](#) [Graphics](#)

```
>MK050971.1 Bacillus licheniformis strain ANSB821 CotA gene, complete cds
ATGAAACTTGAAAAATTCGTTGACGGCTCCCATCCGCAAGTGTCTCAACCCCAAGCAAAAGCAAGG
AAATGACCTATTGAAGTACACGAAAGAAATTCAGCAGCAGCTTCCCGCGATCGCCCGCACTCG
GCTGTTGGATATAACGGAGTTATCCCGGCCCTACCTTCGAAGTGCAGAAACACGAAAAAGTCCGAGTC
AAGTGGTAAATAAGCTTCCGGATCGCCATTTTCCCGCTCGACATACGCTTACAGATGACGGCCATC
ACGAACATGAAGTGAAGACGGTGTTCATTTGCACGGAGGCTGTACGCTGCTGACAGCAGCGGATATCC
TGAGCTTGTACACAAAAGACTTCCATCGAAAAGGCCCTTCTTTGAAAAGGAGGTGTATGAATATCCG
AATGAGCAGGATGCTACAGCTCTTTGGTATCATGACCATGCAATGGCCATCACAAAGGCTGAATGTATATG
CGGGCTTGTGGTTTATATTTTATTCGCGACAGGGAAGAGCGTTTATTGAACCTTCCGGAAGGGAGAATA
TGAAATCCCGCTTTGATTCAGGATAAATCATTTCATGAAGATGGTTCATTTGTTTATCCGCGGACGCT
GACAAACCTTCCCGGATCTCCGGAACCGTCCGATTGTTCCGGCTTTTTCGGGTGATACATTTTGTCA
ACGGCAAGGTATGGCTTTCGCTGAACTGGAACCCGAAAAATACCGTTTTCGGATACGAAAGCCCTCAA
TACGAAATCTTTGAGCTGATTTTGATCATGACATCACATGTCTCAAAATCGGCACGGACGGCGGCTT
CTGACGATCCGGTCAAATGAACTGGTGTGATCGCGCGGCTGAAAGGTGCGATATCATGTTGATTT
TTTACGAGCAGAAAGGAAAAACCGTGAACCTGAAAAACCGGATCGGCTGCGGCGGACAAAGCAGATCC
CGATGATGATCGCACATCATGCAATTCGCACTCAAAAACCTTGAAGCAAAAAGATACAAGTTCATTG
CCGAAATATGAGAAAGCGCCATTTTACCGGACACAAAGTCAATGCTTCAAGAAATCTGTATTGG
GCGGCGCTTGAACAAATGGAAGACTGTTCTGCTTTAAACAACAAAGTGGCATGAACCGGATCAAC
CGAAACACCGCACTCGGCAGCAGTGTGATCTGATCATCAATGCGGAAAGGGGATCATCCGATC
CATTTACATCTGTTCAATTTATGATCTCCGACACCGCCGTTTATGATCGAGCGGATACGGAAGAAC
GAGAATCTTTTGTACCGTCCGGCAGTTCCTCCGGCACCAATGAAAAGGGGCTGAAAAGCACCGTCAA
AGTACCCCGGCTCAGTGACGCGCATTATCGCCACTTTCGCGCTACAGCGGCGAGATGTTTGGCAC
TGCCACATCTTGAGCACGAAGATTACGATATGATGCGCCCTTGAAGTACAGATGTTGCTCATCAAT
AA
```

Change region shown

Customize view

Analyze this sequence

Run BLAST

Pick Primers

More about the gene B14\_RS18385

B14\_RS18385 gene

Also Known As: B14\_RS18385, B14\_03678

Related information

Protein

Taxonomy

Gene

Recent activity

Turn Off Clear

Bacillus licheniformis strain ANSB821 CotA gene, complete cds Nucleotide

bacillus licheniformis cota (44)

## Şekil 6. CotA geninin nükleotid dizisi

Primer3web version 4.1.0 - Pick primers from a DNA sequence. [disclaimer](#) [code](#)  
[cautions](#)

Select the Task for primer selection

Template masking before primer design (available species)

Select species  Nucleotides to mask in 5' direction   
Primer failure rate cutoff  Nucleotides to mask in 3' direction

Paste source sequence below (5'→3', string of ACGTInacgtin -- other letters treated as N -- numbers and blanks ignored). FASTA format ok. Please N-out undesirable sequence (vector, ALUs, LINEs, etc.) or use a [Mispriming Library](#) (repeat library)

CGAAACACCGCACTCGGCAGCAGTGTGATCATCAATGCGGAAAGGGGATCCATCCGATC  
CATTTACATCTGTTCAATTTATGATTCGCGACACGGCCGTTTGAATCGAGCGGTATCGGAAAAAG  
GAGAACTTGTTTTACCGTCCGGCAGTTCCTCCGGACCGAATGAAAAGGGCTGAAAGCACCGTCAA  
AGTACCCCGGCTCAGTGACGCGCATTATCGCCACTTTCGCGCTACAGCGGCGAGATGTTTGGCAC  
TGCCACATCTTGAGCACGAAGATTACGATATGATGCGCCCTTGAAGTACAGATGTTGCTCATCAAT  
AA

Pick left primer, or use left primer below  Pick hybridization probe (internal oligo), or use oligo below  Pick right primer, or use right primer below (5' to 3' on opposite strand)

Sequence Id  A string to identify your output.  
Targets  E.g. 50,2 requires primers to surround the 2 bases at positions 50 and 51. Or mark the [source sequence](#) with [ and ]; e.g. ...ATCT[CCCC]TCAT. means that primers must flank the central CCCC.  
Overlap Junction List  E.g. 27 requires one primer to overlap the junction between positions 27 and 28. Or mark the [source sequence](#) with -; e.g. ...ATCTAC-TGTCAT. means that primers must overlap the junction between the C and T.

## Şekil 7. Primer 3 veritabanı

Primer 3 programına ilgili genin nükleotid dizisi FASTA formatında yüklendikten sonra Şekil 8.'de gösterilen "General Primer Picking Conditions" kısmına dizayn edilecek primere ait bilgiler (örneğin; primerin bağlanma sıcaklığı, %GC oranı, primer nükleotid sayısı vb.) yazılmış ve "Pick Primers" butonuna basılarak istenilen genlere ait primerlerin tasarımı gerçekleştirilmiştir.

## General Primer Picking Conditions

Upload the settings from a file  Dosya seçilmedi

[Primer Size](#) Min  Opt  Max   
[Primer Tm](#) Min  Opt  Max  [Max Tm Difference](#)  [Table of thermodynamic parameters](#)    
[Product Tm](#) Min  Opt  Max   
[Primer GC%](#) Min  Opt  Max

[Product Size Ranges](#)

[Number To Return](#)  [Max 3' Stability](#)

[Max Library Mismatching](#)  [Pair Max Library Mismatching](#)

Thermodynamic Secondary Structure Alignments	Old Secondary Structure Alignments
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Use Thermodynamic Oligo Alignment</a>	
<a href="#">TH: Max Self Complementarity</a> <input type="text" value="45.0"/>	<a href="#">Max Self Complementarity</a> <input type="text" value="8.00"/>
<a href="#">TH: Max 3' Self Complementarity</a> <input type="text" value="35.0"/>	<a href="#">Max 3' Self Complementarity</a> <input type="text" value="3.00"/>
<a href="#">TH: Max Pair Complementarity</a> <input type="text" value="45.0"/>	<a href="#">Max Pair Complementarity</a> <input type="text" value="8.00"/>
<a href="#">TH: Max 3' Pair Complementarity</a> <input type="text" value="35.0"/>	<a href="#">Max 3' Pair Complementarity</a> <input type="text" value="3.00"/>
<a href="#">TH: Max Primer Hairpin</a> <input type="text" value="24.0"/>	

Thermodynamic Template Alignments	Old Template Alignments
<input type="checkbox"/> <a href="#">Use Thermodynamic Template Alignment</a>	
<a href="#">TH: Max Template Mismatching</a> <input type="text" value="40.00"/>	<a href="#">Max Template Mismatching</a> <input type="text" value="12.00"/>
<a href="#">TH: Pair Max Template Mismatching</a> <input type="text" value="70.00"/>	<a href="#">Pair Max Template Mismatching</a> <input type="text" value="24.00"/>

Şekil 8. Dizayn edilecek primer bilgisinin yer aldığı kısım

### PRIMER PICKING RESULTS FOR

Template masking not selected

No mismatching library specified

Using 1-based sequence positions

OLIGO	start	len	tm	gc%	any_th	3'_th	hairpin	seq
LEFT PRIMER	756	20	59.11	50.00	0.00	0.00	0.00	ACTGAACGCCTCCAATACGA
RIGHT PRIMER	988	20	59.04	55.00	0.00	0.00	0.00	CAGTATCGGGATCTGCGTCT

SEQUENCE SIZE: 1542  
INCLUDED REGION SIZE: 1542

PRODUCT SIZE: 233, PAIR ANY\_TH COMPL: 12.49, PAIR 3'\_TH COMPL: 10.40

```

1 ATGAACTTGAAAAATTCGTTGACCGGCTCCCCATTCCGCAAGTGCTTCAACCCCAAAGC

61 AAAAGCAAGGAAATGACCTATTATGAAGTCACCATGAAAGAATTTACAGCAGCAGCTTCAC

121 CGCGATCTGCCCGGACTCGGCTGTTTGGATATAACGGAGTTTATCCCGGCCCTACCTTC

181 GAAGTGCAGAAACACGAAAAAGTCGAGTCAAGTGGTTAAATAAGCTTCCGGATCGCCAT

241 TTTCTCCCGTCGACCATACGCTTACGATGACGGCCATCACGAACATGAAGTGAAGACG

301 GTCGTTTCATTTGCACGGAGGCTGTACGCCTGCTGACAGCGACGGATATCCTGAGGCTTGG

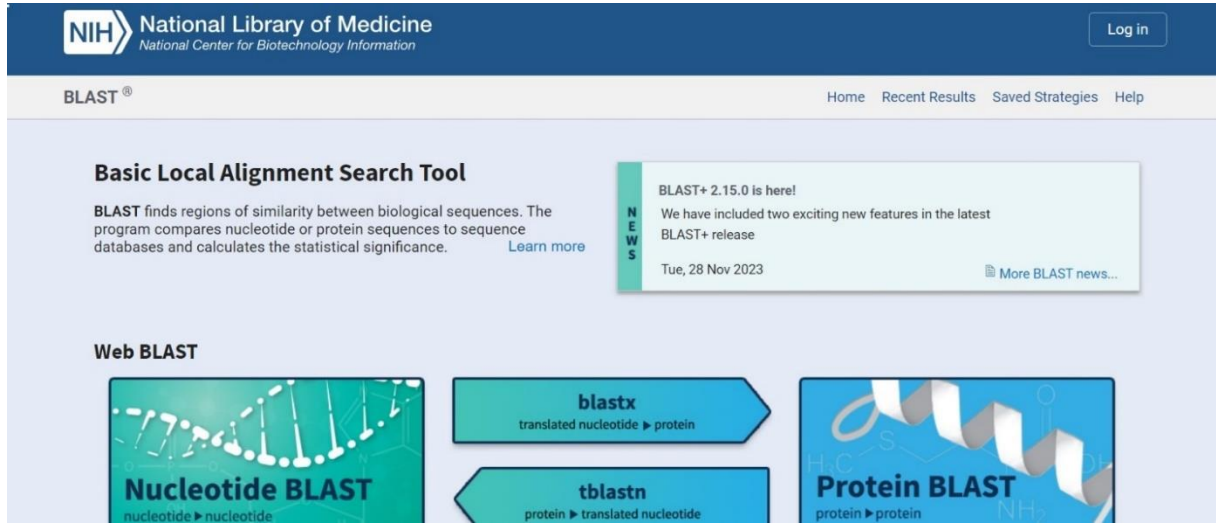
361 TACACAAAAGACTTCCATGCAAAAGGCCCTTTCTTTGAAAGGGAGGTGTATGAATATCCG

421 AATGAGCAGGATGCTACAGCTCTTTGGTATCATGACCATGCAATGGCCATCACAAGGCTG

```

Şekil 9. Dizayn edilen primerler

Primerlerin dizaynı yapıldıktan sonra NCBI veritabanı kullanılarak BLAST programından primerlerin başka genlerle homoloji gösterip göstermediğinin kontrolü yapılmıştır.



Şekil 10. Primer homoloji kontrolünün yapıldığı blast sayfası

Kontrolden sonra en uygun primer seçilmiştir. Kullanılan primer dizileri Tablo 5.'te verilmiştir.

Tablo 7. Real-Time PCR Analizi İçin Dizaynı Yapılan Primer Dizileri

16S 27 Forward	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
16S 1492 Reverse	GGTACCTTGTTACGACTT
CotA Forward	CATTTTAGTCAACGGCAAGGT
CotA Reverse	GCCGATTTGATGACATGTGAT

### Real-Time PCR işlem basamakları

Real-Time PCR için BioLab Sybr Green Master Mix Kit kullanılmıştır. İşlem basamakları ve Real-Time PCR reaksiyon döngüsü (Tablo 8.) kit protokolüne göre uygulanmıştır. Real-Time PCR işlemi sonunda elde edilen veri ve grafikler CT değerine göre grafiği çizilerek yorumlanmıştır.

Tablo 8. Real Time PCR reaksiyon döngü basamakları

Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
95C	60 sn	1
95C	15 sn	
60C	30 sn	40-45
60-95C	∞	1

### ***Optimize Edilen kültür koşullarında ve atık besiyerinde lakkaz protein seviyesinin SDS-PAGE ile incelenmesi***

Besiyerinde üretilen lakkaz enziminin protein seviyesinde belirlenmesi için SDS-PAGE (Laemmli, 1970) yapılmıştır. Elektroforez plakaları alkol ve distile su ile temizlenmiş ve aralarında jel için uygun boşluk kalacak biçimde sabitlenmiştir. Öncelikle ayırma jeli hazırlanmış ve cam plakalara mikro pipet ile eklenmiştir. Daha sonra jelin üst yüzeyinin pürüzsüz ve düz bir şekilde polimerleşmesi için 1 ml izo-propanol eklenmiştir. Ayırma jelinin polimerleşmesi esnasında yığma jeli hazırlanmıştır. Ayırma jelinin düzgün bir şekilde polimerleştiği gözlemlendikten sonra izo-propanol bir kâğıt peçete ile jel üzerinden alınmış ve hazırlanan ayırma jeli yığma jelinin üzerine eklenmiştir. Hemen sonrasında yığma jeline kuyucukların oluşması için tarak dikkatli bir şekilde eklenmiş ve polimerizasyon için +4°C buzdolabında bekletilmiştir.

Hazırlanan besiyerlerinden (homojenat) 30 µl alınmış ve üzerine 10 µl numune tamponu eklenmiştir. Hazırlanan örnekler 10 sn vortekslendikten sonra protein denatürasyonu için 90°C'de 7 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda örneklerden 20 µl, standart protein marker'dan 1,5 µl kuyucuklara yüklenmiştir. Tank, 1X SDS-PAGE yürütme tamponu ile doldurulmuş ve jel kasetleri yerleştirilmiştir. Örnekler ayırma jeline geçene kadar 250 voltta 1-2 dk, sonrasında ise 120 voltta 105 dk yürütülmüştür. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel Coomassie Blue boyama yöntemi ile boyanmıştır. Jel ilk önce 45 dk sabitleştirme çözeltisi ile çalkalanmış ve süre sonunda bir kez distile su ile yıkanmıştır. Daha sonra boyama çözeltisi içerisinde jel bir gece boyu (16 saat) çalkalamaya bırakılmıştır. Ertesi gün jel iki saat yıkama çözeltisi içerisinde bırakılmış ve ardından boya iyice uzaklaşana kadar distile su içerisinde çalkalanmaya bırakılmıştır.

Doğal PAGE işlemi SDS-PAGE'ten farklı olarak protein denatürasyonunu içermemektedir. İşlem basamakları SDS-PAGE ile aynı olmakla birlikte yalnızca 90°C'de denatürasyonu ve numune tamponu içerisinde β-merkaptoetanol eklenmesi içermemekte ve tampon içinde SDS içermemektedir. Örnekler jel içerisinde aynı şekilde yürütüldükten sonra jel boya çözeltisi ile değil, aktivite ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi ile muamele edilerek çalkalanmaya bırakılmıştır (Ali *et al.*2022).

### **İstatistiksel Analiz**

Tez çalışması sırasında tüm deneyler üç kez tekrarlanarak yapılmıştır. Birbirlerinden bağımsız gerçekleştirilen her üç deney tekrarlarının ortalaması ( $\pm$ ) ve standart sapması (SD) ifade edilmiştir. Elde edilen sonuçların değerlendirilmesi için varyansa analizi ANOVA testi kullanılmıştır. Verilerin değerlendirilmesi için GraphPad Prism® (version 9.0, GraphPad

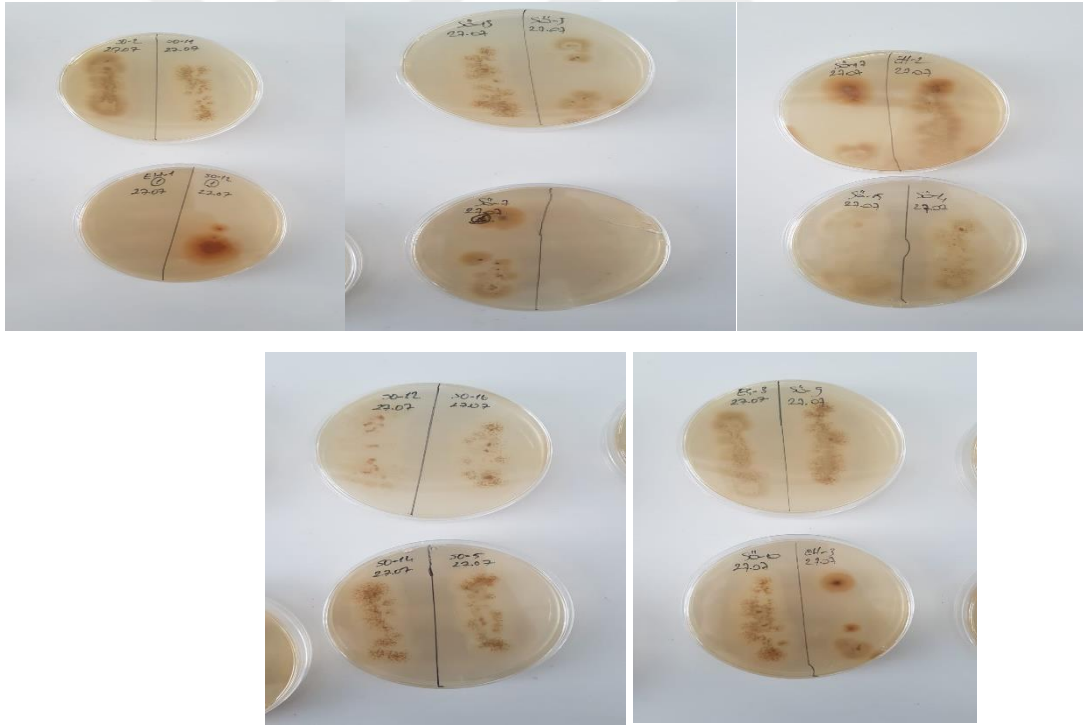
Software, San Diego, CA) istatistik programı kullanılmıştır. İstatiksel anlamda önemli değişiklikler (\*) sembolü ile gösterilmiştir. Sembol ifadeleri şu şekildedir: \*P < 0,05 (anlamlı), \*\*P < 0,01 (çok anlamlı), \*\*\*P < 0,001 ve \*\*\*\*P < 0,0001 (yüksek derecede anlamlı).



## ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

### Katı Besiyerinde Lakkaz Üreten Bakterilerin Belirlenmesi ve Seçilmesi

Çalışma grubumuz tarafından önceden izolasyon ve identifikasyonu yapılan *B. licheniformis* bakteri suşları içinden EH1-5 ve SO1-17 olmak üzere toplam 22 izolat ABTS ve CuSO<sub>4</sub> içeren katı besiyerlerine çizgi ekim ile ekilmiştir. Ekilen petrilerin 55°C’de 24-48 saat inkübasyonundan sonra kahverengi-yeşil zon oluşturan bakterilerin lakkaz aktivitesine sahip olduğu gözlenmiş ve seçilen SO7-12-17 ve EH2-3 izolatları arasından en yüksek lakkaz aktivitesine sahip suşu belirlemek için bakterilerin ABTS ve CuSO<sub>4</sub> içeren sıvı besiyerine inokülasyonu yapılmıştır. 55°C çalkalayıcı inkübatörde 24 saatlik inkübasyondan sonra enzim aktivitesi spektrometrik olarak ölçülmüş ve en yüksek lakkaz aktivitesine sahip suşun *B. licheniformis* SO7 olduğu belirlenmiş ve seçilmiştir.



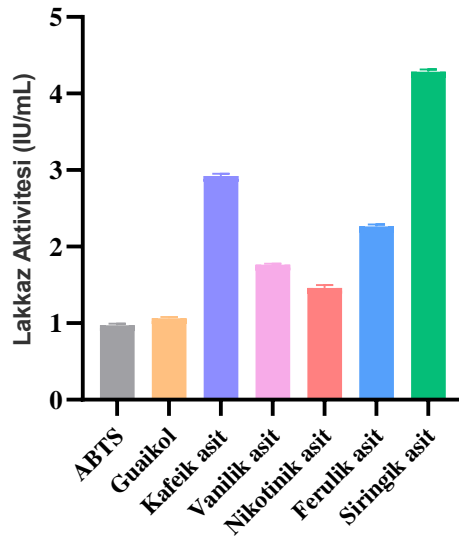
Şekil 11. Lakkaz aktivitesi veren *B. licheniformis* suşlarının petri görüntüleri

### Klasik optimizasyon (OFAT) ile optimum kültür koşullarının belirlenmesi

Çalışmada kullanılacak *B. licheniformis* SO7 suşu belirlendikten sonra katı ortamdan sıvı ön kültür ortamına ekimi gerçekleştirilmiş ve 55°C’de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Klasik optimizasyon çalışmalarına öncelikle minimal tuz besiyeri belirlenerek başlanmıştır. Bu doğrultuda altı farklı minimal tuz besiyeri içeriği hazırlanmış ve

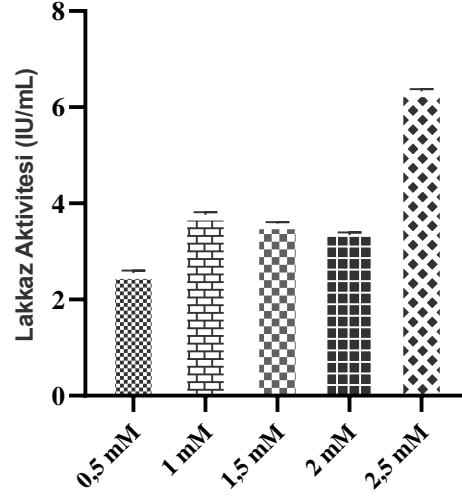
sıvı kültürde büyütülen *B. licheniformis* SO7 suşunun uygun miktarda inokülasyonu gerçekleştirilmiştir. 24, 48, 72 ve 96. inkübasyon saatlerinde lakkaz enzimi aktivitesi ölçülmüş ve en yüksek enzim aktivitesini veren minimal tuz besiyeri 5. Besiyeri (0,5 g/L MgSO<sub>4</sub>, 0,04 g/L FeSO<sub>4</sub>, 0,5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,15 g/L CaCl<sub>2</sub>, 0,1 g/L NaCl içerikli besiyeri) olarak belirlenmiş ve optimizasyon çalışmalarına bu besiyeri kullanılarak devam edilmiştir.

Uygun minimal tuz besiyeri belirlendikten sonra 1 mM'lık yedi farklı substrat ile yedi farklı besiyeri hazırlanmış ve 55°C çalkalamalı inkübatörde 12-72 inkübasyon süresi boyunca 12 saate bir olmak üzere lakkaz enzim aktivitesi ölçülmüştür. En yüksek lakkaz aktivitesi veren sıvı kültürün siringik asit içeren kültür olduğu belirlenmiştir.



**Şekil 12.** Yedi farklı substrat içeren besi ortamlarının lakkaz aktivite ölçümleri

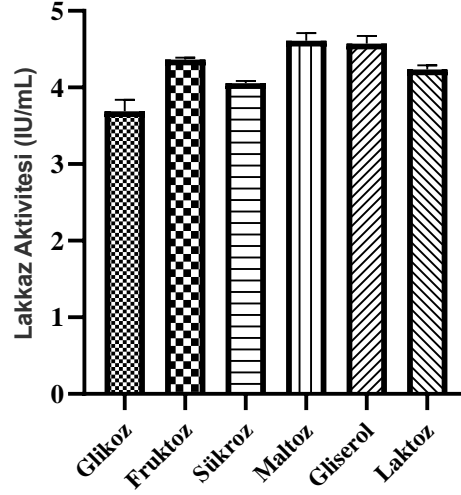
En yüksek lakkaz aktivitesini veren substrat belirlendikten sonra en iyi konsantrasyonu belirlemek için 5 farklı konsantrasyonda (0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 mM) siringik asit içeren besiyeri hazırlanmış ve 55°C çalkalamalı inkübatörde 12-72 saat inkübasyon süresi boyunca 12 saate bir olmak üzere lakkaz enzim aktivitesi ölçülmüştür. En yüksek aktiviteyi veren konsantrasyonun 2,5 mM Siringik asit içeren besiyeri olduğu belirlenmiş ve bir sonraki parametreye geçilmiştir.



**Şekil 13.** Beş farklı konsantrasyonda siringik asit içeren besi ortamlarının lakkaz aktivite ölçümleri

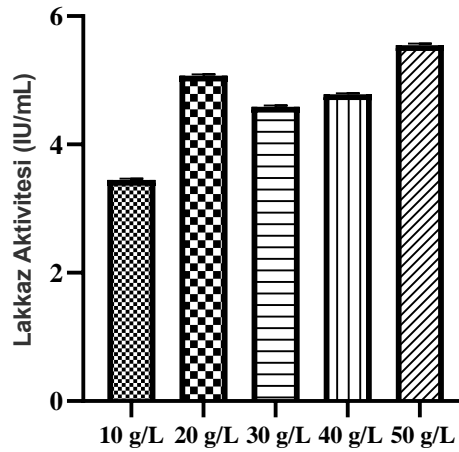
Literatürde yapılan benzer bir çalışmada; *β-proteobacteria* sınıfına ait bir tür olan *Burkholderia sp.* ISTR5 suşu delignifikasyon için araştırılmış ve bakteri büyümesi için hazırlanan minimal tuz besiyerlerine lakkaz substratları olan Siringik asit, P-kumarik asit, Ferulik asit, Vanilin, Vanilik asit, Guaiakol, 4-hidroksibenzoik asit, Gallik asit, Benzoik asit, Siringaldehit, Veratril alkol ve Katekol gibi organik bileşiklerin eklendiği on iki farklı besiyeri hazırlanmış ve izolatların inokülasyonundan sonra delignifikasyon açısından incelenmiştir. En fazla bakteri büyümesinin ve lignin bozunumunun gerçekleştiği ortamlar sırasıyla %80,7 siringik asit, %84,1 ferulik asit, %85,9 p-kumarik asit ve %83,2 benzoik asit içeren ortam olmuştur. Delignifikasyonu gerçekleştiren enzimlerin analizi de yapılmış ve lakkaz ile lignin peroksidaz enzimlerinin baskın olduğu gözlemlenmiştir (Morya *et al.* 2019).

Optimum substrat ve konsantrasyonu belirlendikten sonra optimum karbon kaynağını belirlemek için 20 g/L olmak üzere altı farklı karbon kaynağı; hazırlanan altı farklı besiyerine eklenmiş ve 55°C çalkalayıcı inkübatörde 12-72 saat inkübasyon süresi boyunca 12 saatte bir enzim aktivitesi ölçülmüş ve en yüksek aktiviteyi veren ortamın maltoz içeren sıvı kültür olduğu belirlenmiştir.



**Şekil 14.** Altı farklı karbon kaynağı içeren besi ortamlarının lakkaz aktivite ölçümleri

En yüksek lakkaz aktivitesini veren karbon kaynağı belirlendikten sonra en iyi konsantrasyonu belirlemek için beş farklı konsantrasyonda (10 g/L, 20 g/L, 30 g/L, 40 g/L ve 50 g/L) maltoz içeren beş besiyeri hazırlanmış ve 55°C çalkalayıcı inkübatörde 12-72 saat inkübasyon süresi boyunca 12 saatte bir enzim aktivitesi ölçülmüş ve en yüksek aktiviteyi veren konsantrasyonun 50 g/L maltoz içeren sıvı kültür olduğu belirlenmiş ve bir sonraki parametreye geçilmiştir.

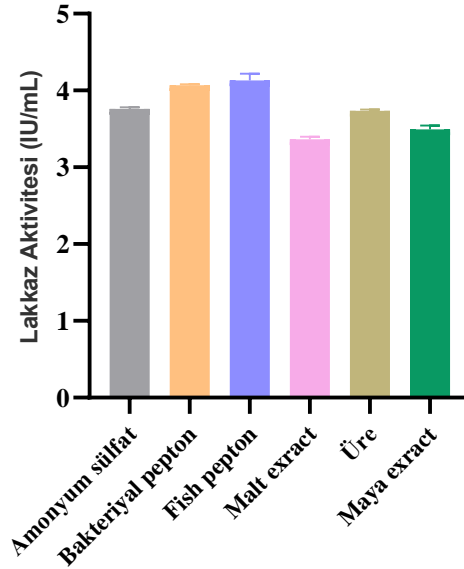


**Şekil 15.** Beş farklı konsantrasyonda maltoz içeren besi ortamlarının lakkaz aktivite ölçümleri

Literatürde bakteriyel lakkaz üretimi için kültür koşullarının optimizasyonunu içeren benzer çalışmalar bulunmaktadır. Kaira ve arkadaşları; Hindistan'ın Himalaya buzullarından izole ettikleri *Serretia marcescens* suşunun lakkaz aktivitesini araştırmışlar ve aktiviteyi artırmaya yönelik optimizasyon çalışmaları yapmışlardır. Sekiz farklı karbon kaynağı (Fruktoz, Maltoz, Sükröz, Ksiloz, Galaktoz, Selüloz ve Nişasta) kullanılarak yapılan karbon kaynağı denemesinde en yüksek aktiviteyi veren kültür ortamının ksiloz içeren kültür olduğunu

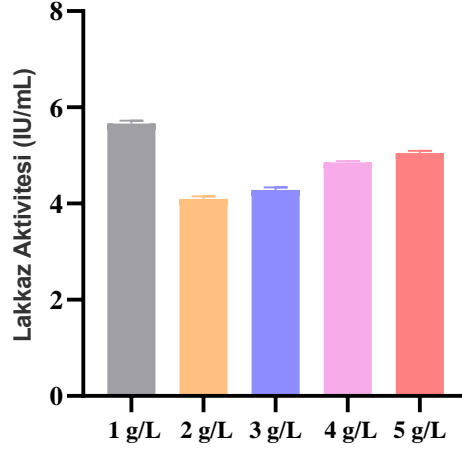
belirlemiştirlerdir (Kaira *et al.*2015). Bir başka çalışmada çürüten odunlardan izolasyonu yapılan *Streptomyces sp.* LAO suşunun en yüksek lakkaz aktivitesi verdiği besi ortamının laktoz içeren besi ortamı olduğu gösterilmiştir (Gogotya *et al.*2021). Literatürde bulunan benzer bir çalışmada ise halofilik bakteri türü *Aquiasalibacillus elongatus* ile yapılan lakkaz üretimi optimizasyonunda en yüksek aktiviteyi veren ortamın glikoz içeren ortam olduğu bildirilmiştir (Rezaie *et al.*2017). Buradan da görüldüğü üzere bakteri türleri arasında lakkaz aktivitesini yükselten karbon kaynakları birbirinden farklılık gösterebilmektedir.

Optimum karbon kaynağı ve konsantrasyonu belirlendikten sonra optimum azot kaynağını belirlemek için 2 g/L olacak şekilde altı farklı azot kaynağı içeren altı farklı besiyeri hazırlanmış ve 55°C çalkalayıcı inkübatörde 12-72 saat inkübasyon süresi boyunca 12 saatte bir enzim aktivitesi ölçülmüş ve en yüksek aktiviteye sahip kültür ortamının Fish Pepton içeren kültür olduğu belirlenmiştir.



**Şekil 16.** Altı farklı azot kaynağı içeren besi ortamlarının lakkaz aktivite ölçümleri

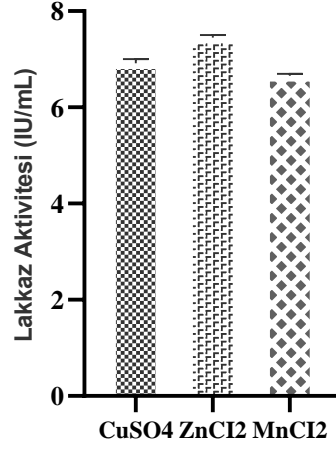
En yüksek lakkaz aktivitesi veren azot kaynağı belirlendikten sonra en iyi konsantrasyonu belirlemek için beş farklı konsantrasyonda (1 g/L, 2 g/L, 3 g/L, 4 g/L ve 5 g/L) Fish pepton içeren beş farklı besiyeri hazırlanmış ve 55°C çalkalayıcı inkübatörde 12-72 saat inkübasyon süresi boyunca 12 saatte bir enzim aktivitesi ölçülmüş ve en yüksek aktiviteyi veren konsantrasyonun 1 g/L Fish pepton içeren kültür ortamı olduğu belirlenmiş ve bir sonraki parametreye geçilmiştir.



**Şekil 17.** Beş farklı konsantrasyonda Fish pepton içeren besi ortamlarının lakkaz aktivite ölçümleri

Mutanda ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışma; *B. ligniniphilus* suşundan klonlanan lakkaz geninin rekombinant *E. coli* BL21 suşunda lakkaz üretimi için kültür optimizasyonunu içermektedir. Optimizasyon için OFAT, RSM ve Plackett-Burman metodları kullanılmış ve en yüksek aktiviteye sahip ortamın birleşik azot (inorganik ve organik azot kaynaklarının kompozisyonu) içerdiği belirlenmiştir (Mutanda *et al.*2023). Literatürde bulunan benzer bir çalışma; dört farklı bakteri suşu (*Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Enterobacter aerogenes* ve *Enterobacter cloacae*) içeren izolatların dekolorizasyonda kullanmak üzere lakkaz üretim optimizasyonu yapıldığını göstermektedir. En yüksek lakkaz aktivitesi veren ortamın %0,1 pepton içeren ortam olduğu belirtilmiştir (Kumar and Chandra, 2018). Ali ve arkadaşları çürümüş odunlardan *Serratia proteamaculans* türü izole etmişler ve lakkaz üretimi için klasik optimizasyon gerçekleştirmişlerdir. En iyi lakkaz aktivitesi veren sıvı kültürün 2 g/L maya ekstraktı içeren ortam olduğunu göstermişlerdir (Ali *et al.*2020). Literatürde bulunan lakkaz üretim optimizasyon çalışmalarında türe ve suşa göre azot kaynağı ve konsantrasyonunun değişiklik gösterebildiği gözlenmektedir.

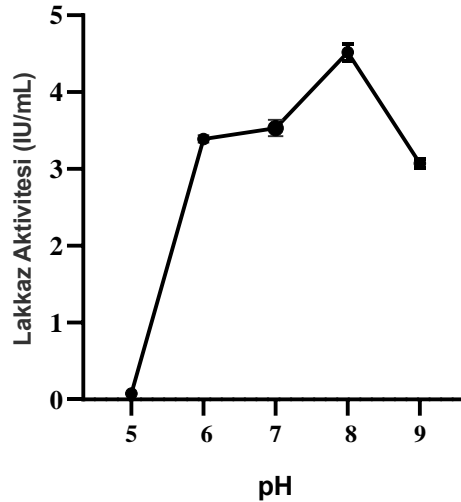
Optimum azot kaynağı ve konsantrasyonu belirlendikten sonra optimum metal iyonunu belirlemek için 1 mM'lık  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$  ve  $\text{MnCl}_2$  içeren üç farklı besiyeri hazırlanmış ve 55°C çalkalayıcı inkübatörde 12-72 saat inkübasyon süresi boyunca 12 saatte bir enzim aktivitesi ölçülmüş ve en yüksek aktiviteyi veren ortamın  $\text{ZnSO}_4$  içeren kültür olduğu belirlenmiş ve bir sonraki parametreye geçilmiştir.



**Şekil 18.** Üç farklı iyon içeren besi ortamlarının lakkaz aktivite ölçümleri

Literatüre bakıldığında; lakkazların üretimi için yapılan besiyeri optimizasyonunda genelde ortama bakırın iyon veya sülfatlı bileşik halinde eklendiği görülmektedir (Kumar et. al, 2015; Wang *et al.*2020; Jiang *et al.*2021). Lakkazların multi-bakır oksidaz yapısında bir enzim olması ve bakırın ko-faktör olarak işlev görmesi; bunun en büyük sebeplerinden birisidir. Mantarlarla yapılan bir çalışmada (Yang *et al.*2016) çinko iyonlarının ortama eklemesiyle birlikte lakkaz üretiminin ve aktivitesinin arttığı gösterilmiştir. Yine türe ve suşa özgü olarak farklı iyonların ortama eklenmesiyle lakkaz üretimi ve aktivitesinde değişiklikler gözlemlenebilmektedir.

Optimum metal iyonunun belirlenmesinden sonra optimum pH değerinin belirlenmesi için beş farklı besiyeri hazırlanmış ve sırasıyla pH'ları 5, 6, 7, 8, ve 9'a ayarlanarak 55°C çalkalayıcı inkübatörde 12-72 saat inkübasyon süresi boyunca 12 saatte bir enzim aktiviteleri ölçülmüş ve en yüksek aktiviteyi gösteren pH değerine sahip kültür ortamının pH: 8 olduğu belirlenerek bir sonraki parametreye geçilmiştir.

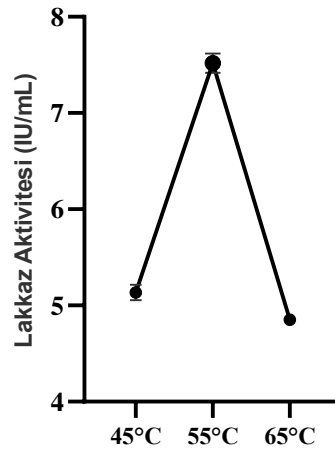


**Şekil 19.** Beş farklı pH değerindeki besi ortamlarının lakkaz aktivite ölçümleri

Literatürde bulunan benzer çalışmalarda; izole edilen kaynağa, türe ve suşa bağlı olarak lakkaz enzimi aktivitesinin optimum koşulları genelde pH:5-9 aralığında değişmektedir (Sondhi *et al.*2015; El-Bendary *et al.*2020; Gogotya *et al.*2021; Ali *et al.*2022). pH aralıkları, çalışılan bakteri suşunun geliştirdiği en uygun pH değerleriyle de paralellik göstermektedir.

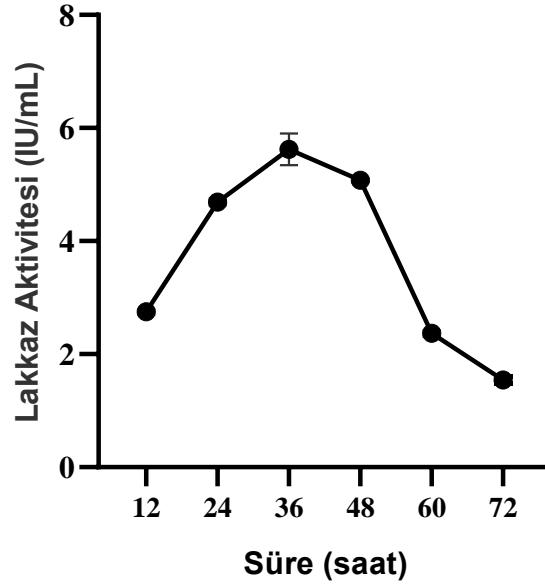
Optimum pH değeri belirlendikten sonra optimum sıcaklık değerini belirlemek için üç farklı besiyeri hazırlanmış ve üç farklı sıcaklığa sahip (45°C, 55°C ve 65°C) çalkalamalı inkübatörde 12-72 saat inkübasyon süresi boyunca 12 saatte bir enzim aktivitesi ölçülmüş ve en yüksek aktiviteye sahip kültürün 55°C çalkalamalı inkübatördeki kültür ortamı olduğu belirlenerek son parametreye geçilmiştir.

Çalıştığımız *B. licheniformis* SO7 suşunun termofilik bir bakteridir ve bakterimizin normal geliştiği sıcaklık 55°C'dir. Buna bağlı olarak ürettiği lakkaz enziminin de optimum sıcaklık değerinin de aynı sıcaklıkta ölçüldüğü yorumuna varılmıştır.



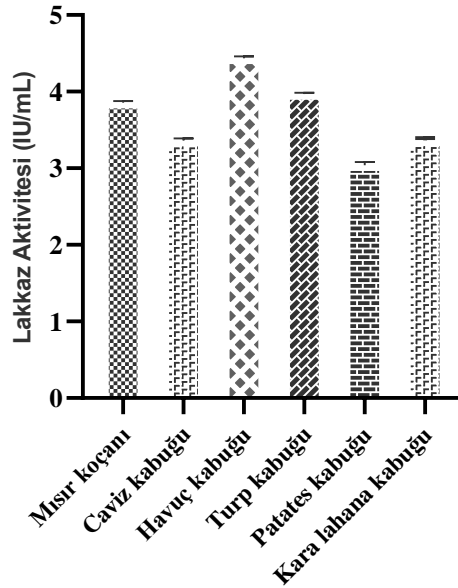
**Şekil 20.** Üç farklı sıcaklık derecesindeki besi ortamlarının lakkaz aktivite ölçümleri

Optimum sıcaklık derecesi belirlendikten sonra optimum inkübasyon süresinin belirlenmesi için tüm optimum koşulların sağlandığı bir besiyeri hazırlanmış ve 55°C çalkalamalı inkübatörde 12-72 saat inkübasyon süresi boyunca enzim aktivitesi ölçülmüş ve en yüksek aktiviteye sahip saatin 36. inkübasyon saati olduğu belirlenmiştir.



**Şekil 21.** Farklı saatlerdeki lakkaz aktivite ölçümleri

Lignoselülozik bileşik içerdiği bilinen altı farklı gıda ve tarım atıkları kullanılarak altı farklı besiyeri hazırlanmıştır. 55°C çalkalamalı inkübatörde 12-72 saat inkübasyon süresi sonunda 12 saatte bir enzim aktivitesi ölçülmüş ve en yüksek lakkaz aktivitesine sahip besi ortamının Havuç kabuğu içeren besi ortamı olduğu belirlenmiştir.



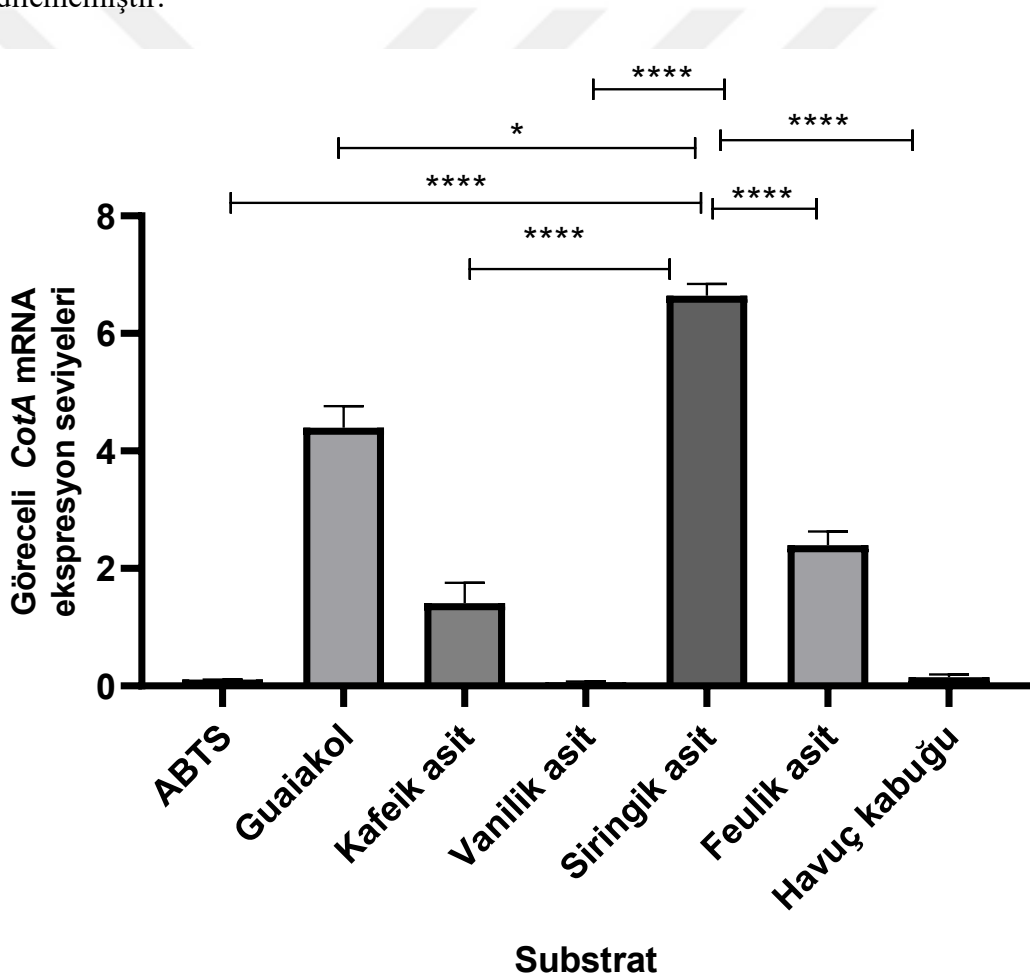
**Şekil 22.** Farklı gıda ve tarım atıkları içeren besi ortamlarının lakkaz aktivite ölçümleri

Oluşturulan optimum kültür koşullarını içeren besiyeri; çalışmada kullanılan yedi substratın lakkaz üretimine etkisinin gen ve protein seviyesinde kendi arasında karşılaştırılması için yedi farklı substratı içerecek şekilde yedi ayrı kültür halinde hazırlanmış ve Real-Time PCR ve SDS-PAGE analizlerinde bu yedi farklı substrat içeren besiyerleri ile havuç kabuğunu içeren atık besiyeri homojenatları kullanılmıştır.

## Optimum koşullar altında aromatik bileşiklerin lakkaz enzimine etkisinin gen seviyesinde araştırılması

Elde edilen optimum şartlara göre hazırlanan kültürlerden total RNA izolasyonu yapılarak lakkaz geni (CotA) için cDNA kütüphanesi oluşturulmuştur. Sentezlenen cDNA'lar Real-Time PCR analizi için kullanılmıştır. Elde edilen verilere göre; en yüksek lakkaz aktivitesine sahip olan Siringik asit içeren kültür ortamında lakkaz gen ekspresyonunun diğer substratların bulunduğu kültürler göre daha yüksek seviyededir. Lakkaz aktivite ölçüm sonuçları ile gen ekspresyon sonuçları birlikte değerlendirildiğinde; sonuçların birbirlerini destekler nitelikte oldukları gözlenmiştir.

Havuç kabuğu atığının bulunduğu besi ortamında lakkaz aktivitesine rastlanmasına karşın gen ekspresyonuna bakıldığında; aktivite ölçüm sonuçlarıyla örtüşen anlamlı bir sonuç elde edilememiştir.



**Şekil 23.** Göreceli CotA ekspresyon seviyeleri (\*P < 0,05 (anlamlı), \*\*P < 0,01 (çok anlamlı), \*\*\*P < 0,001 ve \*\*\*\*P < 0,0001 (yüksek derecede anlamlı))

Ma ve arkadaşları; *Burkholderia cepacia* BNS suşundan Bc\_LacL genini E. coli'de klonlayıp Real-Time PCR ile kültür ortamlarına eklenenindükleyici etkisi olan metal iyonu ve farklı aromatik bileşiklerin farklı inkübasyon sürelerinde lakkaz gen ifadesini ne yönde

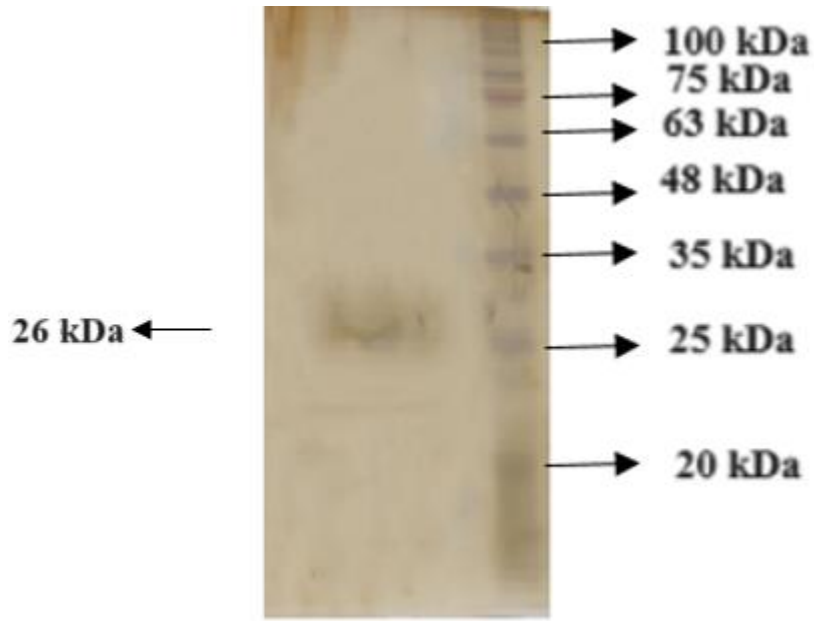
etkilediğini araştırmışlar ve enzim aktivite sonuçları ile karşılaştırmışlardır (Ma *et al.*2019). Elde ettikleri verilere göre; bakır iyonları ile guaiakol bulunan ortamlarda hem gen ifadesinin hem de lakkaz enzim aktivitesinin arttığını bildirmişlerdir. Yang ve arkadaşlarının funguslarla yaptığı başka bir çalışmada ise; *Cerrena sp.* HYBO7 suşunun üreme ortamına eklenen metal iyonları ve aromatik bileşiklerin lakkaz üretimine olan etkisini incelemişler ve çinko iyonları ile guaiakolün lakkaz gen ifadesini artırdığını göstermişlerdir (Yang *et al.* 2016). Literatürdeki benzer çalışmalara bakıldığında; bakır ve çinko gibi metal iyonları ile aromatik organik bileşiklerin lakkaz gen ifadesini pozitif yönde etkilediği görülmektedir. Mikroorganizma türüne ve suşuna bağlı olarak eklenen metal iyonları ile aromatik bileşiklerin farklı kültür koşullarının da etkisiyle pozitif veya negatif yönde etkileri olabileceği literatürdeki çalışmalarla ve elde ettiğimiz tez sonuçları ile desteklenmektedir.

### Lakkaz Enziminin Protein Seviyesinde Belirlenmesi

Optimize edilen kültür ortamlarına eklenen aromatik organik bileşiklerin lakkaz üretimine protein seviyesinde nasıl bir etkisinin olduğu SDS-PAGE ile incelenmiştir. Farklı substratları ve Havuç kabuğunu içeren besiyerlerinden alınan örnekler jelde yürütülmüş ve farklı molekül ağırlıklarında protein bantları görülmüştür. Lakkaz enziminin moleküler ağırlığını belirlemek ve kontrol etmek için Doğal PAGE gerçekleştirilmiş ve lakkaz enziminin sadece Siringik asit içeren ortamda yeşil-kahverengi zon benzeri bant verdiği gözlenmiş, diğer besi ortamlarında lakkaza ait bant veya zon görülememiştir (Şekil 17. ve 18).



**Şekil 24.** Sekiz farklı kültür ortamından alınan örneklerin SDS-PAGE görüntüsü (M; standart protein markeri, 1; ABTS, 2; Guaiakol, 3; Kafeik asit, 4; Vanilik asit, 5; Nikotinik asit, 6; Ferulik asit, 7; Siringik asit ve 8; Havuç kabuğu içeren kültür ortamı)



**Şekil 25.** *B. licheniformis* SO7 Lakkaz enzimin Doğal PAGE görüntüsü

Literatürde bulunan bir çalışmaya bakıldığında, lakkaz üretimi için saflaştırılan *Serratia protamaculans* türünün kültür optimizasyonu yapılmış ve protein seviyeleri SDS-PAGE ve Doğal PAGE ile araştırılmıştır. Jelde görülen farklı protein bantlarından hangisinin lakkaz enzimi olduğunun anlaşılması için Doğal PAGE yapılmış ve jelin alt kısımlarında ~20 kDa bandına denk gelen yeşil bir bant gözlemlenmiştir (Ali *et al.* 2022). SDS-PAGE sonuçlarımızda gözlemlediğimiz üzere her bir kültür ortamı için dört farklı bant gözlemlenmiş ve lakkaz enziminin hangi bant olduğunun anlaşılması için Doğal PAGE yapılmış ve jelin alt kısmında kalan ~26 kDa'ya denk gelen bant görüntülerinin lakkaz enzimine ait olduğu anlaşılmıştır. Doğal PAGE jelinde yalnızca en yüksek lakkaz aktivitesini veren Siringik asit içeren besi ortamının olduğu yerde bant/zon oluşması; aktivite ve protein analiz sonuçlarımızın tutarlı olduğunu göstermekle birlikte; SDS-PAGE jel görüntüsündeki lakkaz enzimine ait olduğunu düşünülen bantlar arasında anlamlı bir bant kalınlık farkı gözlenememiştir.

## SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yapılan bu tez çalışmasında termofilik *B. licheniformis* SO7 suşu kullanılarak bakteriyel lakkaz enziminin üretim koşulları optimize edilerek iyileştirilmiş ve ortama katılan aromatik organik substratların lakkaz üretimini nasıl indüklediği gen ve protein seviyesinde araştırılmıştır. Optimize edilen koşullar; 55°C, pH: 8, 50 g/L maltoz, 1 g/L Fish pepton, 1 mM ZnCl<sub>2</sub> ve 2,5 mM Siringik asit ve 36. inkübasyon süresi olarak belirlenmiş ve en yüksek lakkaz aktivitesi ve gen ekspresyon seviyesi bu koşullar altında gözlenmiştir. SDS-PAGE ile protein seviyesinde nasıl bir değişim olduğu optimize edilen koşullar altında tüm substratlar için araştırılmış ve yalnızca Siringik asit substratını içeren ortamın Doğal PAGE jelinde bant/zon oluşturduğu gözlemlenerek bu ortamdaki yüksek lakkaz aktivitesi sonuçları desteklenmiştir. Fakat SDS-PAGE jel görüntüsünde lakkaz enzimine ait bant kalınlıkları arasında anlamlı bir fark gözlenememiştir. Lignin ve lignin içerikli organik maddeleri de katalizleyebilen lakkaz enziminin bu içerikteki atık besiyerlerindeki üretim potansiyeli incelenmiş ve en yüksek lakkaz aktivitesini veren ortamın Havuç kabuğu içeren ortam olduğu belirlenmiştir. Havuç kabuğu içeren ortamda diğer atık ortamlarına kıyasla daha yüksek lakkaz aktivitesi ölçülmesine rağmen protein ve gen ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir artış gözlenememiştir. Elde edilen bu sonuçlara göre; bakteriyel lakkaz üretim ortamı için ortama indükleyici olarak aromatik organik bileşiklerin katılması verimi artırdığı gibi üretim süresini de azaltarak maliyet ve zaman bakımından ekonomik bir yaklaşım olmaktadır. Lignin içeren gıda ve tarım atıklarının kullanılmasıyla da lakkaz enziminin verimli üretim potansiyeli bulunmaktadır ve atıkların lakkaz enzimi üretiminde ve aktivitesinin artırılmasında kullanılmasının daha fazla ve farklı çalışmalarla araştırılmaya ve incelenmeye ihtiyacı vardır. Özellikle günümüzde endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamalar açısından oldukça önemli bir enzim ve çevre uygulamaları için potansiyel bir yeşil biyokatalizör olması sebebiyle lakkaz enziminin verimli ve ekonomik koşullar altında üretilmesi, araştırmacıların işini kolaylaştırmakta ve daha fazla alanda uygulanabilirliğinin artması yönünden ilgi çekici olmaktadır. Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlara göre; lakkaz enzimi üretim ortamına bakır dışındaki metal iyonlarının ve substratı olan aromatik organik bileşiklerin lakka enzimi üretimi için iyi birer indükleyici olma potansiyelleri gösterilmiştir.

## KAYNAKLAR

- Akkuş, M. S., & Karabudak, S. (2020). Biyoproses Çalışmalarında Deneysel Tasarım Yönteminin Uygulanması. *İleri Mühendislik Çalışmaları ve Teknolojileri Dergisi*, 1(2), 188-197.
- Alcalde M., Mate D. M., (2017). Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. *Microbial Biotechnology* 10(6), 1457–1467.
- Ali N.S., Huang F., Qin W. and Yang T.C. (2022). Identification and Characterization of a New *Serratia proteamaculans* Strain That Naturally Produces Significant Amount of Extracellular Laccase. *Front. Microbiol.* 13:878360.
- Ali, M.; Bhardwaj, P.; Ishqi, H.M.; Shahid, M.; Islam, A., (2023). Laccase Engineering: Redox Potential Is Not the Only Activity-Determining Feature in the Metalloproteins. *Molecules*, 28, 6209.
- Ba S, Vinoth Kumar V. (2017). Recent developments in the use of tyrosinase and laccase in environmental applications. *Crit Rev Biotechnol.* Nov;37(7):819-832.
- Baltierra-Trejo E, Márquez-Benavides L, Sánchez-Yáñez JM. (2015). Inconsistencies and ambiguities in calculating enzyme activity: The case of laccase. *J Microbiol Methods.* Dec;119:126-31.
- Bertrand B, Martínez-Morales F, Trejo-Hernández MR. (2017). Upgrading Laccase Production and Biochemical Properties: Strategies and Challenges. *Biotechnol Prog.* Jul;33(4):1015-1034.
- Bilal M, Iqbal HMN, Barceló D. (2019). Persistence of pesticides-based contaminants in the environment and their effective degradation using laccase-assisted biocatalytic systems. *Sci Total Environ.* Dec 10; 695:133896.
- Chapman, J., Ismail, A. E., & Dinu, C. Z. (2018). Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks. *Catalysts*, 8(6), 238.
- Chaudhary, S., Singh, A., Varma, A., & Porwal, S. (2022). Recent Advancements in Biotechnological Applications of Laccase as a Multifunctional Enzyme. *Journal of Pure & Applied Microbiology*, 16(3).
- Chauhan, P. S., Goradia, B., & Saxena, A. (2017). Bacterial laccase: recent update on production, properties and industrial applications. *3 Biotech*, 7(5), 323.
- Clark VL, Peterson DE, Bernlohr RW. (1972). Changes in free amino acid production and intracellular amino acid pools of *Bacillus licheniformis* as a function of culture age and growth media. *J Bacteriol.* Nov;112(2):715-25.
- Copeland, R. A. (2023). *Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis.* John Wiley & Sons.
- Couto, S. R., & Herrera, J. L. T. (2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnology advances*, 24(5), 500-513.
- Çelikoğlu, E. (2015). Balıkesir ve Kütahya bölgesindeki bazı termal kaynakların prokaryotik çeşitliliğinin incelenmesi (Master's thesis, Anadolu University (Turkey)).

- de Souza Bezerra, T. M., Bassan, J. C., de Oliveira Santos, V. T., Ferraz, A., & Monti, R. (2015). Covalent immobilization of laccase in green coconut fiber and use in clarification of apple juice. *Process Biochemistry*, 50(3), 417-423.
- Dey B, Dutta T. Laccases: Thriving the domain of bio-electrocatalysis. *Bioelectrochemistry*. 2022 Aug;146:108144.
- Du W., Sun C., Liang J., Han Y., Yu J., Liang Z. (2015). Improvement of laccase production and its characterization by mutagenesis. *J Food Biochem*, 39, 101–108.
- El-Bendary, M. A., Ezzat, S. M., Ewais, E. A., & Al-Zalama, M. A. (2020). Optimization of spore laccase production by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from wastewater and its potential in green biodecolorization of synthetic textile dyes. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 51(1), 16–27.
- Ensani M, Mojerlou S, Zamani SM. (2023). Enhanced laccase activity in *Trametes versicolor* (L.: Fr.) Pilát by host substrate and copper. *Braz J Microbiol. Sep*;54(3):1565-1572.
- Ercan-Akkaya, S. (2015). Sıcak Su Kaynaklarından Termofilik Bakteri Türlerinin İzolasyonu Ve İdentifikasyonu (Doctoral dissertation, Anadolu University (Turkey)).
- Falade, A. O., Mabinya, L. V., Okoh, A. I., & Nwodo, U. U. (2018). Ligninolytic enzymes: Versatile biocatalysts for the elimination of endocrine-disrupting chemicals in wastewater. *MicrobiologyOpen*, 7(6), e00722.
- Fernandes T. A. R., Silveira W. B., Passos F. M. L., Zucchi T. D. (2014). Laccases from actinobacteria—what we have and what to expect. *Post Mikrobiol*, 4, 285–296.
- Forzato, C., Vida, V., & Berti, F. (2020). Biosensors and sensing systems for rapid analysis of phenolic compounds from plants: A comprehensive review. *Biosensors*, 10(9), 105.
- Gianfreda, L., Xu, F., & Bollag, J. M. (1999). Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation journal*, 3(1), 1-26.
- Gogotya, A., Nnolim, N. E., Digban, T. O., Okoh, A. I., & Nwodo, U. U. (2021). Characterization of a thermostable and solvent-tolerant laccase produced by *Streptomyces* sp. LAO. *Biotechnology Letters*, 43, 1429-1442.
- Guan Z. B., Shui Y., Song C. M., Zhang N., Cai Y. J., Liao X. R. (2015). Efficient secretory production of CotA-laccase and its application in the decolorization and detoxification of industrial textile wastewater. *Environ Sci Pollut Res*, 22, 9515–9523.
- Guan ZB, Luo Q, Wang HR, Chen Y, Liao XR. (2018). Bacterial laccases: promising biological green tools for industrial applications. *Cell Mol Life Sci. Oct*;75(19):3569-3592.
- Hakulinen, N., Rouvinen, J. (2015). Three-dimensional structures of laccases. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 857–868.
- Heinfling, A., A.T. Martinez, M.J., Martinez, M., Bergbauer, U. (1998). Szewzyk, Purification and characterization of peroxidases from the dye-decolorizing fungus *Bjerkandera adusta*, *FEMS Microbiol. Lett.* 165, 43e50.
- Hullo MF, Moszer I, Danchin A, Martin-Verstraete I. (2001). CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase. *J Bacteriol. Sep*;183(18):5426-30. doi: 10.1128/JB.183.18.5426-5430.2001.
- Jafari N, Rezaei S, Rezaie R, Dilmaghani H, Khoshayand MR, Faramarzi MA. (2017). Improved production and characterization of a highly stable laccase from the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens* for the efficient delignification of almond shell bio-waste. *Int J Biol Macromol. Dec*;105(Pt 1):489-498.

- Janusz G, Pawlik A, Świdarska-Burek U, Polak J, Sulej J, Jarosz-Wilkolazka A, Paszczyński A. (2020). Laccase Properties, Physiological Functions, and Evolution. *Int J Mol Sci.* Jan 31;21(3):966.
- Janusz, G., Kucharzyk, K. H., Pawlik, A., Staszczak, M., and Paszczyński, A. J. (2013). Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: gene expression and regulation. *Enzyme Microb. Technol.* 52,1–12.
- Jeon JR, Baldrian P, Murugesan K, Chang YS. (2012). Laccase-catalysed oxidations of naturally occurring phenols: from in vivo biosynthetic pathways to green synthetic applications. *Microb Biotechnol.* May;5(3):318-32.
- Jeon, J. R., Kim, E. J., Murugesan, K., Park, H. K., Kim, Y. M., Kwon, J. H., ... & Chang, Y. S. (2010). Laccase-catalysed polymeric dye synthesis from plant-derived phenols for potential application in hair dyeing: Enzymatic colourations driven by homo- or heteropolymer synthesis. *Microbial biotechnology*, 3(3), 324-335.
- Jeżewska-Fraćkowiak J, Seroczyńska K, Banaszczuk J, Jedrzejczak G, Żylicz-Stachula A, Skowron PM. (2018). The promises and risks of probiotic *Bacillus* species. *Acta Biochim Pol.* Dec 6;65(4):509-519.
- Jiang, Y. P., Cai, J. L., Pei, J. J., Li, Q., & Zhao, L. G. (2021). Cloning, overexpression, and characterization of a thermostable, organic solvent-tolerant laccase from *Bacillus pumilus* ARA and its application to dye decolorization. *ACS omega*, 6(14), 9741-9749.
- Kadam, A. A., Saratale, G. D., Ghodake, G. S., Saratale, R. G., Shahzad, A., Magotra, V. K., ... & Sung, J. S. (2022). Recent advances in the development of laccase-based biosensors via nano-immobilization techniques. *Chemosensors*, 10(2), 58.
- Kaira, G. S., Dhakar, K., & Pandey, A. (2015). A psychrotolerant strain of *Serratia marcescens* (MTCC 4822) produces laccase at wide temperature and pH range. *Amb Express*, 5, 1-8.
- Karim, F., & Fakhrudin, A. N. M. (2012). Recent advances in the development of biosensor for phenol: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 11, 261-274.
- Kaur K, Singh G, Gupta V, Capalash N, Sharma P. (2017). Impact of phosphate and other medium components on physiological regulation of bacterial laccase production. *Biotechnol Prog.* Mar;33(2):541-548.
- Kirk, O., Borchert, T. V., & Fuglsang, C. C. (2002). Industrial enzyme applications. *Current opinion in biotechnology*, 13(4), 345-351.
- Kudanga, T., Nemadziva, B., & Le Roes-Hill, M. (2016). Laccase catalysis for the synthesis of bioactive compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(1), 13–33.
- Kumar S, Jain KK, Bhardwaj KN, Chakraborty S, Kuhad RC. (2015). Multiple Genes in a Single Host: Cost-Effective Production of Bacterial Laccase (*cotA*), Pectate Lyase (*pel*), and Endoxylanase (*xyl*) by Simultaneous Expression and Cloning in Single Vector in *E. coli*. *PLoS One.* Dec 7;10(12):e0144379.
- Kumar V, Chandra R. (2018). Characterisation of manganese peroxidase and laccase producing bacteria capable for degradation of sucrose glutamic acid-Maillard reaction products at different nutritional and environmental conditions. *World J Microbiol Biotechnol.* Feb 2;34(2):32.
- Kumar VV, Venkataraman S, Kumar PS, George J, Rajendran DS, Shaji A, Lawrence N, Saikia K, Rathankumar AK. (2022). Laccase production by *Pleurotus ostreatus* using cassava waste and its application in remediation of phenolic and polycyclic aromatic

- hydrocarbon-contaminated lignocellulosic biorefinery wastewater. *Environ Pollut. Sep* 15;309:119729.
- Laemmli, D.K., (1970). Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680.
- Li H, van den Driesche S, Bunge F, Yang B, Vellekoop MJ. (2019). Optimization of on-chip bacterial culture conditions using the Box-Behnken design response surface methodology for faster drug susceptibility screening. *Talanta*. Mar 1;194:627-633.
- Lowry Oh, Rosebrough Nj, Farr Al, Randall Rj. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. Nov;193(1):265-75.
- Ma, Y., Li, L., Tian, H., Lu, M., Megharaj, M., & He, W. (2019). Transcriptional analysis of the laccase-like gene from *Burkholderia cepacia* BNS and expression in *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology*, 103, 747-760.
- Martínková L, Křístková B, Křen V. (2022). Laccases and Tyrosinases in Organic Synthesis. *Int J Mol Sci*. Mar 22;23(7):3462.
- Minussi, R. C., Rossi, M., Bologna, L., Rotilio, D., Pastore, G. M., & Durán, N. (2007). Phenols removal in musts: strategy for wine stabilization by laccase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 45(3-4), 102-107.
- Mohit E, Tabarzad M, Faramarzi MA. (2020). Biomedical and Pharmaceutical-Related Applications of Laccases. *Curr Protein Pept Sci*. 21(1):78-98.
- Mongkolthanaruk W. (2012). Classification of *Bacillus* beneficial substances related to plants, humans and animals. *J Microbiol Biotechnol*. Dec;22(12):1597-604.
- Morya R, Kumar M, Singh SS, Thakur IS. (2019). Genomic analysis of *Burkholderia* sp. ISTR5 for biofunneling of lignin-derived compounds. *Biotechnol Biofuels*. Nov 27;12:277.
- Muras A, Romero M, Mayer C, Otero A. (2021). Biotechnological applications of *Bacillus licheniformis*. *Crit Rev Biotechnol*. Jun;41(4):609-627.
- Mutanda I, Zahoor, Sethupathy S, Xu Q, Zhu B, Shah SWA, Zhuang Z, Zhu D. (2023). Optimization of heterologous production of *Bacillus ligninophilus* L1 laccase in *Escherichia coli* through statistical design of experiments. *Microbiol Res*. Sep;274:127416.
- Nakade K, Nakagawa Y, Yano A, Konno N, Sato T, Sakamoto Y. (2013). Effective induction of *pbla1* laccase by copper ion in *Polyporus brumalis* ibrc05015. *Fungal Biol*. Jan;117(1):52-61.
- Niladevi KN, Sukumaran RK, Jacob N, Anisha GS, Prema P. (2009). Optimization of laccase production from a novel strain-*Streptomyces psammoticus* using response surface methodology. *Microbiol Res*. 164(1):105-13.
- Okudan, A., & Şen, B. (2023). OPTİMİZASYON NEDİR VE TÜRLERİ NELERDİR?. *Mühendis ve Makine*, 43-46.
- Oztas Gulmus E, Gormez A. (2020). Identification and Characterization of Novel Thermophilic Bacteria from Hot Springs, Erzurum, Turkey. *Curr Microbiol*. Jun;77(6):979-987.
- Ölmez, S., 2017, Nevşehir Kozaklı kaplıcalarından izole edilen termofilik bakterilerin izolasyonu, identifikasyonu, *Bacillus licheniformis* SO7'den  $\alpha$ -amilaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum.

- Öztaş, K., 2023, Kağıt ve Tekstil Endüstrisi Fabrikaları Arıtım Çamurundan İzole Edilen Bakterilerin Lakkaz Aktiviteleri Üzerine Optimizasyon Çalışmaları, Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir.
- Palmer, T., & Bonner, P. L. (2007). *Enzymes: biochemistry, biotechnology, clinical chemistry*. Elsevier.
- Pardo I, Camarero S. (2015). Laccase engineering by rational and evolutionary design. *Cell Mol Life Sci. Mar*;72(5):897-910.
- Patel, N., Shahane, S., Majumdar, R., & Mishra, U. (2019). Mode of action, properties, production, and application of laccase: a review. *Recent patents on biotechnology*, 13(1), 19-32.
- Pezzella C, Guarino L, Piscitelli A. (2015). How to enjoy laccases. *Cell Mol Life Sci. Mar*;72(5):923-40.
- Piscitelli A., Giardina P., Lettera V., Pezzella C., Sannia G., Faraco V. (2011). Induction and Transcriptional Regulation of Laccases in Fungi. *Current Genomics*, 12, 104-122.
- Polaina, J., & MacCabe, A. P. (2007). *Industrial enzymes* (pp. 531-547). Netherlands: Springer.
- Prins A., Kleinsmidt L., Khan N., Kirby B., Kudanga T., Vollmer J., Pleiss J., Burton S., Le Roes-Hill M. (2015). The effect of mutations near the T1 copper site on the biochemical characteristics of the small laccase from *Streptomyces coelicolor*. *Enzym. Microb. Technol. A3* (2).
- Rao, M. A., Scelza, R., Acevedo, F., Diez, M. C., & Gianfreda, L. (2014). Enzymes as useful tools for environmental purposes. *Chemosphere*, 107, 145-162.
- Rezaie R, Rezaei S, Jafari N, Forootanfar H, Khoshayand MR, Faramarzi MA. (2017). Delignification and detoxification of peanut shell bio-waste using an extremely halophilic laccase from an *Aquasalibacillus elongatus* isolate. *Extremophiles. Nov*;21(6):993-1004.
- Ribeiro, D. S., Henrique, S. M., Oliveira, L. S., Macedo, G. A., & Fleuri, L. F. (2010). Enzymes in juice processing: a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(4), 635-641.
- Robinson PK. (2015). *Enzymes: principles and biotechnological applications*. *Essays Biochem.* 59:1-41.
- Rodríguez-Couto, S. (2018). Solid-State Fermentation for Laccases Production and Their Applications. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, 211–234.
- Sahoo K, Sahoo RK, Gaur M, Subudhi E. (2020). Cellulolytic thermophilic microorganisms in white biotechnology: a review. *Folia Microbiol (Praha)*. Feb;65(1):25-43.
- Schäfer, T., Borchert, T. W., Nielsen, V. S., Skagerlind, P., Gibson, K., Wenger, K., ... & Xu, H. (2007). *Industrial enzymes. White biotechnology*, 59-131.
- Sharma A, Jain KK, Jain A, Kidwai M, Kuhad RC. (2018). Bifunctional in vivo role of laccase exploited in multiple biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol. Dec*;102(24):10327-10343.
- Shekher, R., Sehgal, S., Kamthania, M., & Kumar, A. (2011). *Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. Enzyme research*, 2011.
- Shraddha, Shekher R, Sehgal S, Kamthania M, Kumar A. *Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. Enzyme Res.* 2011;2011:217861.

- Singh, G., & Arya, S. K. (2019). Utility of laccase in pulp and paper industry: A progressive step towards the green technology. *International journal of biological macromolecules*, 134, 1070-1084.
- Singhania, R. R., Patel, A. K., Thomas, L., Goswami, M., Giri, B. S., & Pandey, A. (2015). Industrial enzymes. In *Industrial biorefineries & white biotechnology* (pp. 473-497). Elsevier.
- Sohrabi, H., Hemmati, A., Majidi, M. R., Eyvazi, S., Jahanban-Esfahlan, A., Baradaran, B., ... & de la Guardia, M. (2021). Recent advances on portable sensing and biosensing assays applied for detection of main chemical and biological pollutant agents in water samples: A critical review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 143, 116344.
- Solé, M., Müller, I., Pecyna, M. J., Fetzer, I., Harms, H., and Schlosser, D. (2012). Differential regulation by organic compounds and heavy metals of multiple laccase genes in the aquatic hyphomycete *Clavariopsis aquatica*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78, 4732–4739.
- Sondhi S, Sharma P, George N, Chauhan PS, Puri N, Gupta N. (2015). An extracellular thermo-alkali-stable laccase from *Bacillus tequilensis* SN4, with a potential to biobleach softwood pulp. *3 Biotech. Apr*;5(2):175-185.
- Spizizen J, Prestidge L. (1969). Conditions for competence in the *Bacillus licheniformis* transformation system. *J Bacteriol.* Jul;99(1):70-7.
- Su J., Fu J., Wang Q., Silva C., & Cavaco-Paulo A. (2017). Laccase: a green catalyst for the biosynthesis of polyphenols. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(2), 294–307.
- Suman S. K., Malhotra M., (2021). Laccase-mediated delignification and detoxification of lignocellulosic biomass: removing obstacles in energy generation. *Environmental Science and Pollution Research*.
- Sutaoney P, Pandya S, Gajarwar D, Joshi V, Ghosh P. (2022). Feasibility and potential of laccase-based enzyme in wastewater treatment through sustainable approach: A review. *Environ Sci Pollut Res Int.* Dec;29(57):86499-86527.
- Tyagi R. D., Majeau J. A., Brar S. K., (2010). Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresource Technology*, 101, 2331–2350.
- Unuofin, J. O., Falade, A. O., & Aladekoyi, O. J. (2021). Applications of microbial laccases in bioremediation of environmental pollutants: Potential issues, challenges, and prospects. *Bioremediation for Environmental Sustainability*, 519-540.
- Ünver, S. S., & Kurnaz, I. A. (2020). *Biyoteknoloji Çağına Hoş Geldiniz!.* Aba Organizasyon Eğitim Danışmanlık Yayıncılık ve Pazarlama Aş.
- Wang J, Yu S, Li X, Feng F, Lu L. (2020). High-level expression of *Bacillus amyloliquefaciens* laccase and construction of its chimeric variant with improved stability by domain substitution. *Bioprocess Biosyst Eng.* Mar;43(3):403-411.
- Xue L, Tang L, Zhao J, Fang Z, Liu H, Qiao J, Zhang G. (2021). *Bacillus salipaludis* sp. nov., isolated from saline-alkaline soil. *Arch Microbiol.* Jul;203(5):2211-2217.
- Yadav AN, Sachan SG, Verma P, Kaushik R, Saxena AK. (2016). Cold active hydrolytic enzymes production by psychrotrophic Bacilli isolated from three sub-glacial lakes of NW Indian Himalayas. *J Basic Microbiol.* Mar;56(3):294-307.
- Yang J, Wang G, Ng TB, Lin J and Ye X (2016). Laccase Production and Differential Transcription of Laccase Genes in *Cerrena* sp. in Response to Metal Ions, Aromatic Compounds, and Nutrients. *Front. Microbiol.* 6:1558

- Yang Y, Wei F, Zhuo R, Fan F, Liu H, Zhang C, Ma L, Jiang M, Zhang X. (2013). Enhancing the laccase production and laccase gene expression in the white-rot fungus *Trametes velutina* 5930 with great potential for biotechnological applications by different metal ions and aromatic compounds. *PLoS One*. Nov 11;8(11):e79307.
- Yazıcı, S. Ö., & Şahin, S. (2020). İnülinaz Üretimi İçin Fermantasyon Parametrelerinin İstatistiksel Yaklaşımla Optimizasyonu. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 11(1), 353-364.
- Zhou W, Guan ZB, Chen Y, Zhang F, Cai YJ, Xu CW, Chen XS, Liao XR. (2017). Production of spore laccase from *Bacillus pumilus* W3 and its application in dye decolorization after immobilization. *Water Sci Technol*. Jul;76(1-2):147-154.



## ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
<b>Adı Soyadı:</b>	Selinay Merve Kılıç
<b>Doğum tarihi:</b>	
<b>Doğum Yeri:</b>	
<b>Uyruğu:</b>	
<b>Adres:</b>	
<b>Tel:</b>	
<b>E-mail:</b>	
Eğitim	
<b>Lise:</b>	Selçuk Anadolu Kız Mesleki ve Teknik Lisesi
<b>Lisans:</b>	Erzurum Teknik Üniversitesi
<b>Yüksek lisans:</b>	Atatürk Üniversitesi
Yabancı Dil Bilgisi	
<b>İngilizce:</b>	İyi