

**T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİMDALI**

***Bacillus subtilis*'TEN LAKKAZ ENZİM İZOLASYONU,  
ÜRETİCİ GENİN KLONLANMASI, EKSPRESYONU,  
REKOMBİNANT ENZİMİN KARAKTERİZASYONU VE  
BOYA GİDERİMİNDE ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

**DOKTORA TEZİ**

**ORKİDEH HAJIPOUR**

**DENİZLİ, HAZİRAN - 2020**

T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



*Bacillus subtilis*'TEN LAKKAZ ENZİM İZOLASYONU,  
ÜRETİCİ GENİN KLONLANMASI, EKSPRESYONU,  
REKOMBİNANT ENZİMİN KARAKTERİZASYONU VE  
BOYA GİDERİMİNDE ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

ORKİDEH HAJIPOUR

DENİZLİ, HAZİRAN - 2020

**Bu tez çalışması pamukkale üniversitesi bilimsel araştırma projeleri tarafından 2016FEBE043 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.**



**ORKIDEH HAJIPOUR**

## ÖZET

***Bacillus subtilis*'TEN LAKKAZ ENZİM İZOLASYONU, ÜRETİCİ GENİN KLONLANMASI, EKSPRESYONU, REKOMBİNANT ENZİMİN KARAKTERİZASYONU VE BOYA GİDERİMİNDE ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**  
**DOKTORA TEZİ**  
**ORKIDEH HAJIPOUR**  
**PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**  
**(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. NAZİME MERCAN DOĞAN)**  
**(EŞ DANIŞMAN: PROF. DR. SADIK DİNÇER)**  
**DENİZLİ, HAZİRAN - 2020**

Bakteriyel lakkaz yüksek sıcaklık ve pH'larda stabildir. Lakkaz'ın birçok biyoteknolojik ve endüstriyel uygulamaları vardır. Bu çalışmanın amacı lakkaz pozitif yerel bir izolat olan *Bacillus subtilis* OH 67'nin lakkaz enzimini klonlamak, eksprese etmek, saflaştırmak, boya giderici kapasitesi araştırmak ve karakterize etmektir.

Lakkaz pozitif suş (*Bacillus subtilis* OH 67) İstanbul-Türkiye'den izole edilmiştir. Bakteri DNA'sı PCR ve klonlama için kullanılmıştır. PCR ürünü (855bp), uygun ekspresyon vektörüne (pET22 b) aktarıldıktan sonra konak hücrelerinde (*E. coli* BL21 (DE3)) transforme edilmiştir. DNA kodlayan lakkaz gen dizisi birçok bakteri türü ile karşılaştırılmış ve *Bacillus subtilis* ile %99 ve diğer bakteri türleri ile %87- %99 arasında benzerlik göstermiştir.

Rekombinant lakkaz aktivitesi Guaiacol oksidasyonu ile araştırılmıştır. SDS-PAGE uygulaması sonucu enzimin moleküler ağırlığı 34 kDa olmuştur. Optimum pH ve sıcaklık sırasıyla 6,6 ve 50°C olmuştur. Rekombinant lakkaz 40 °C ve 60 °C'de %91 ve %90 aktivite göstermiştir. Enzimin Km ve Vmax değerleri 110,7721 µM ve 19,3 µmol/min/mg olmuştur. Lakkazın boya giderim potansiyeli 16 farklı boya üzerinde incelenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları saflaştırılmış lakkazın CuSO<sub>4</sub>'ün varlığında endüstriyel ve kimyasal boyaların gideriminde güçlü bir şekilde etkili olduğunu göstermiştir. Lakkaz aktivitesi FeSO<sub>4</sub> (5mM) 'ın ilavesiyle artmıştır. Rekombinant lakkaz 1mM'lık EDTA, MgCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> ve ZnCl<sub>2</sub> tarafından orta derecede inhibe edilmiştir. Ayrıca 5 mM konsantrasyondaki SDS, HgCl<sub>2</sub>, üre, 2-merkaptoetanol, Tween-80 lakkaz aktivitesini %50'nin altına düşürmüştür.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre *E. coli*'de rekombinant lakkaz enzimin üretimi endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamalar için umut verici bir aday olduğunu ortaya koymuştur. Enzim yüksek sıcaklıklarda aktivitesini korumuştur. Sonuç olarak, enzim modifikasyona değer ve gelecekte endüstrinin farklı alanlarında kullanılabilir.

**ANAHTAR KELİMELER:** *Bacillus subtilis* OH 67, rekombinant lakkaz, karakterizasyon, *E. coli*'de ekspresyonu.

## ABSTRACT

### ISOLATION, CLONING, CHARACTERIZATION, AND INVESTIGATION OF DYE DECOLORIZATION ACTIVITY OF LACCASE ENZYME FROM *Bacillus subtilis*.

PH.D THESIS

ORKIDEH HAJIPOUR

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF. DR. NAZİME MERCAN DOĞAN)

(CO-SUPERVISOR: PROF. DR. SADIK DİNÇER)

DENİZLİ, JUNE 2020

Bacterial laccases are very stable at high temperature and pH values. Laccase has many biotechnological and industrial applications. This research was aimed to clone, express, purify, characterize, and decolorization activity of the laccase from a local isolate *Bacillus subtilis* OH 67.

The laccase positive strain (*Bacillus subtilis* OH 67) was isolated from Istanbul-Turkey. PCR product (Laccase gene) was transformed to *E. coli* BL21 (DE3) after ligation to pET22b vector. DNA sequence of laccase gene has a 99% similarity with *Bacillus subtilis*, but the other strains identity was among 87%-99%.

The molecular weight of recombinant laccase was assigned as 34 kDa. Optimum pH and temperature of recombinant laccase was 6,6 and 50oC. Recombinant laccase exhibited 91% and 90% activity at 40°C and 60°C. The Km and Vmax values of the enzyme were obtained as 110,7721 µM and 19,3 µmol/min/mg. The recombinant laccase strongly decolorized 16 types of industrial and chemical dyes. Laccase activity was increased by addition of FeSo4 (5mM). Recombinant laccase was moderately inhibited by EDTA, MgCl2, CuCl2, NiCl2, MnCl2, CaCl2, and ZnCl2. Moreover, the recombinant laccase activity was found to be less than 50% in the presence of SDS, HgCl2, Urea, 2-Mercaptoethanol, Tween-80 at a concentration of 5mM.

In conclusion, the production of recombinant laccase enzyme in *E. coli* proved to be a promising candidate for industrial and biotechnological applications. The enzyme maintained its activity at high temperatures. As a result, the enzyme is worthy of modification and can be used in different area of industry in the future.

**KEYWORDS:** *Bacillus subtilis* OH 67, recombinant laccase, characterization, expression in *E. coli*

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
TABLO LİSTESİ.....	ix
SEMBOL LİSTESİ.....	x
ÖNSÖZ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Çalışmanın Amacı.....	3
2. TEZ KONUSU VE LİTERATÜR TARAMASI.....	4
3. YÖNTEM.....	9
3.1 Materyal.....	9
3.1.1 Çalışmada kullanılan kimyasallar boyalar ve kitler.....	9
3.1.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	10
3.1.3 Kullanılan Bakteri Suşları ve Vektör.....	10
3.2 Metod.....	10
3.2.1 Lakkaz Pozitif Bakteri Suşunun İzolasyonu.....	10
3.2.2 İzole Edilen Bakteri Suşunun Tanımlanması ve Stoklanması.....	11
3.2.3 Vektör Seçimi ve Primer Dizaynı.....	11
3.2.4 <i>Bacillus subtilis</i> Strain OH 67'ten DNA İzolasyonu.....	12
3.2.5 Genomik DNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi.....	13
3.2.6 DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	14
3.2.7 Lakkaz Geninin Amplifikasyonu için Primer Dizaynı.....	14
3.2.8 Lakkaz Geninin PCR İle Çoğaltılması.....	14
3.2.9 Lakkaz Genine Ait PCR Ürününün Saflaştırılması.....	15
3.2.10 Lakkaz Geni ve pET22b Vektörünün Restriksiyon Enzimleriyle Kesilmesi.....	16
3.2.11 Lakkaz Geni ve pET22b Vektörünün Ligasyonu.....	16
3.2.12 Kompetent Hücrelerin Hazırlanması.....	17
3.2.13 Rekombinant Vektörün <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Plyss Bakterisine Transformasyonu.....	17
3.2.14 Colony-PCR ile Transformasyonun Doğrulanması.....	18
3.2.15 Katı Besiyerinde Lakkaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	18
3.2.16 Rekombinant Lakkaz Enziminin His-Select Nickel Affinity Gel ile Saflaştırılması.....	18
3.2.17 Klonlanan Lakkaz Enzimin SDS-PAGE yöntem ile Moleküler Ağırlığının Saptanması.....	20
3.2.18 Ayrıştırma Jelinin Hazırlanması.....	21
3.2.19 Yükleme Jelinin Hazırlanması (%5'lik).....	21
3.2.20 Örneğin ve Standartın Hazırlanması.....	21

3.2.21	SDS-PAGE Jeline Yüklmesi ve Yürütülmesi .....	21
3.2.22	SDS-PAGE Jelinin Boyanması ve Görüntülenmesi .....	21
3.2.23	Zimogram Analizi .....	22
3.2.24	Klonlanan Lakkaz Enzimine Ait Zimogram Analizi .....	22
3.2.25	Klonlanan Lakkaz Enziminin Kinetik Karakterizasyonu .....	22
3.2.26	Klonlanan Lakkaz Enzimin Optimum pH Belirlenmesi .....	23
3.2.27	Klonlanan Lakkaz Enzimine Ait Optimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi .....	23
3.2.28	Klonlanan Lakkaz Enzimin Termal Stabilitesinin Belirlenmesi .....	23
3.2.29	Klonlanan Lakkaz Enziminin pH Stabilitesinin Belirlenmesi .....	23
3.2.30	Klonlanan Lakkaz Enzim Aktivitesine Deterjan, Enzim İnhibitörü ve Metal İyonların Etkisi .....	24
3.2.31	Klonlanan Lakkaz Enzimin Dekolorizasyon Etkisinin .....	24
3.2.32	Klonlanan Lakkazın Biyoinformatik Analizi .....	24
<b>4.</b>	<b>BULGULAR .....</b>	<b>26</b>
4.1	Lakkaz Geni İçeren Bakteri İzolasyonu ve Tanımlanması .....	26
4.2	<i>Bacillus subtilis</i> Strain OH 67'ten Kromozomal DNA İzolasyonu ...	29
4.3	Lakkaz Geninin PCR ile Çoğaltılması .....	29
4.4	PCR Ürünün Saflaştırılması .....	32
4.5	Lakkaz Geni ve pET22b Vektörün Kesimi .....	32
4.6	PCR Ürünü ve pET22b Vektörünün Ligasyonu .....	32
4.7	Rekombinant Vektörün (pET22b+Lakkaz) <i>E. coli</i> BL21(DE3)'e Transformasyonu .....	33
4.8	BL21(DE3)'den pET22b Vektörünün İzolasyonu ve PCR Analizi ..	34
4.9	Rekombinant Lakkaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi .....	35
4.10	Rekombinant Lakkazın SDS-PAGE ve zimogram analizi .....	35
4.11	Rekombinant Lakkaz Enzim Karakterizasyonu .....	36
4.12	Rekombinant Lakkaz Enziminin Kinetik Değerinin Saptanması .....	36
4.13	lakkaz enzimine optimum pH'nın belirlenmesi .....	38
4.14	Rekombinant Lakkazın Optimum Sıcaklığının belirlenmesi .....	39
4.15	Klonlanan Lakkazın Termal Stabilitesinin Belirlenmesi .....	40
4.16	Klonlanan Lakkazın pH Stabilitesi .....	41
4.17	İnhibitör ve Divalent Katyonların Lakkaz Aktivitesi Üzerine Etkisi ..	42
4.18	Klonlanan Lakkazın Dekolorizasyon Etkisinin Belirlenmesi .....	43
4.19	Klonlanmış Lakkazın Biyoinformatik Analizi .....	53
4.20	Klonlanan Protein'in Aminoasit Dizisinin Belirlenmesi .....	55
4.21	Lakkaz Genine Ait BLAST ve Filogenetik Analizi .....	55
<b>5.</b>	<b>TARTIŞMA .....</b>	<b>56</b>
<b>5.</b>	<b>SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>66</b>
<b>6.</b>	<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>67</b>
<b>8.</b>	<b>EKLER .....</b>	<b>79</b>
8.1	SDS-PAGE Elektroföze İçin Kullanılan Çözeltiler .....	79
8.1.2	Solüsyon A (akrilamid/ bisakrilamid Çözeltisi) .....	79
8.1.3	Solüsyon B .....	79
8.1.4	Solüsyon C .....	79
8.1.5	%10'luk SDS .....	79
8.1.6	%10'luk Amonyum Persülfat (APS) .....	79
8.1.7	TEMED (N, N, N', N'-tetramethylene-ethylenediamine) .....	79
8.1.8	Örnek Yükleme Tamponu .....	80
8.1.9	Yürütme Tamponu .....	80



8.1.10	Coomassie Brilliant Blue R-250 Boyama Çözeltisi .....	80
8.1.11	Yıkama Tamponu .....	80
8.2	Zimogram Analizi İçin Kullanılan Çözeltisi .....	81
8.2.1	%1 Triton X-100 .....	81
8.2.2	Zimogram Analizi İçin Kullanılan 0,1 M Sodyum-asetat Tamponu	81
8.2.3	Zimogram Analizi İçin Kullanılan Guaiacol Çözeltisi .....	81
8.3	Enzimin pH Aktivitesi ve pH Stabilitesini Belirlemek İçin Kullanılan Tamponlar .....	81
8.3.1	Sitrat Tamponu .....	81
8.3.2	Tris-Maleat Tamponu .....	82
8.3.3	Karbonat-Bikarbonat Tamponu .....	83
<b>9.</b>	<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>84</b>

# ŞEKİL LİSTESİ

## Sayfa

Şekil 1.1: Lakkaz enzimine ait katalitik mekanizma.....	2
Şekil 1.2: Lakkaz enzimin yapısı.....	3
Şekil 2. 1: Lakkazın bakır merkezleri .....	4
Şekil 2. 2: Lakkaz enzim vasıtasıyla melanin oluşumu .....	5
Şekil 3.1: pET22b vektörü.....	12
Şekil 3.2 His-Select Nickel Affinite Gel ile rekombinant lakkaz enziminin saflaştırılması .....	20
Şekil 4.1. Catechol içeren LB-agar besiyerinde lakkaz pozitif bakteri suşu ....	25
Şekil 4.2. Catechol içeren LB sıvı besiyerinde lakkaz pozitif bakteri suşu .....	26
Şekil 4.3. Lakkaz enzimi içeren bakteri izolatu Syringaldazin bulunan ortamda aktivite göstererek pembe rengi oluşturmuştur .....	26
Şekil 4.4. Lakkaz pozitif suşun 16S rDNA sekansı .. .	27
Şekil 4.5. 16S rDNA sekansının NCBI sitesinde BLAST analizi .....	27
Şekil 4.6. Lakkaz pozitif suşun filogenetik analizi .....	28
Şekil 4.7. <i>Bacillus subtilis</i> 'den izole edilen DNA'nın agaroz jel elektroforez görünümü.....	28
Şekil 4.8. Lakkaz genine ait PCR ürünü.....	29
Şekil 4.9. Lakkaz genine ait PCR ürünü .....	29
Şekil 4.9. Lakkaz genine ait PCR ürünü .....	30
Şekil 4.11. Lakkaz genine ait optimize edilmiş PCR ürünü .....	30
Şekil 4.12. Saflaştırma sonunda elde edilen DNA görüntüsü.....	31
Şekil 4.13. Hind III ve NcoI ile kesim sonrasında yapılan jel elektroforez görüntüsü.....	32
Şekil 4.14. A) pET22b+lakkaz içeren E. coli BL21(DE3) kolonileri. B) kontrol (pET22b vektörü içermeyen E. coli BL21(DE3) .....	33
Şekil 4.15. Transformasyon sonrası PCR analiz sonucu.....	33
Şekil 4.16. Rekombinant lakkaz enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	34
Şekil 4.17. Rekombinant Lakkazın SDS-PAGE ve Zimogram analiz sonucu ..	35
Şekil 4.18. Lakkaz Enzimine ait Michaelis-Menten grafiği .....	36
Şekil 4.19. Lakkaz enzimine ait Lineweaver-Burk eğrisi .....	37
Şekil 4.20. Farklı pH'larda rekombinant lakkaz enzim aktivitesinin değişimi. 38	
Şekil 4.21. Rekombinant lakkaz enziminin farklı sıcaklıklarda aktivitesi.....	39
Şekil 4.22. Rekombinant lakkaz enziminin termal stabilitesi .....	40
Şekil 4.23. Rekombinant lakkaz enziminin pH stabilitesi .....	41
Şekil 4.24. Rekombinant Lakkaz enziminin aktivitesine inhibitör ve divalent katyonların etkisi.....	42
Şekil 4.25. Rekombinant lakkaz enzimin bazı boyalar üzerinde etkisi.....	43
Şekil 4.26. Rekombinant lakkaz enziminin Fenol kırmızısı üzerine etkisi.....	43
Şekil 4.27. Rekombinant lakkaz enziminin bazı endüstride kullanılan boyalar üzerinde etkisi .....	44
Şekil 4.28. Rekombinant lakkaz enziminin Remazol siyahı üzerine etkisi .....	44
Şekil 4.29. Klonlanan lakkaz enzimin Kongo kırmızısı üzerine etkisi.....	45
Şekil 4.30. Klonlanan lakkaz enzimin Bromkresol purple üzerine etkisi .....	45
Şekil 4.31. Klonlanan lakkaz enzimin Metilen mavisi üzerine etkisi.....	46
Şekil 4.32. Klonlanan lakkaz enzimin Fenol kırmızısı üzerine etkisi.....	46

Şekil 4.33. Klonlanan lakkaz enzimin Kristal viyole üzerine etkisi .....	47
Şekil 4.34. Klonlanan lakkaz enzimin Metilen mavisi üzerine etkisi .....	47
Şekil 4.35. Klonlanan lakkaz enzimin Brom fenol mavisi üzerine etkisi .....	48
Şekil 4.36 Klonlanan lakkaz enzimin Remazol kırmızısı 106 üzerine etkisi....	48
Şekil 4.37. Klonlanan lakkazın Remazol brilliant turuncusu üzerine etkisi. ....	49
Şekil 4.38. Klonlanan lakkaz enzimin Brilliant mavisi üzerine etkisi .....	49
Şekil 4.39. Klonlanan lakkaz enzimin Bromo fenol mavisi üzerine etkisi .....	50
Şekil 4.40. Klonlanan lakkaz enzimin Remazol violet üzerinde etkisi.....	50
Şekil 4.41. Klonlanan lakkaz enzimin Turkuaz mavisi HF6 üzerine etkisi.....	51
Şekil 4.42. Klonlanan lakkaz enzimin Remazol siyahı RB üzerine etkisi.....	51
Şekil 4.43. Klonlanan lakkaz enzimin Remazol BR mavisi üzerine etkisi.....	52
Şekil 4.44. Klonlanan lakkaz enzimin Reaktif kırmızısı üzerine etkisi. ....	52
Şekil 4.45. Lakkaz genine ait PCR ürünü .....	53
Şekil 4.46. Lakkaz geni (855 bp)'ne ait DNA dizisi .....	53
Şekil 4.47. PelB ve Lakkaz proteine ait aminoasit dizisi.....	54
Şekil 4.48. Lakkaz genine ait Blast analizi .....	55
Şekil 4.49. Lakkaz genine ait filogenetik analizi. ....	55

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

Tablo 3.1. Optimum PCR koşulları .....	15
Tablo 3.2. PCR sıcaklık, döngü ve döngü zamanı .....	15
Tablo 3.3 Lakkaz geni ve pET22b vektörünün restriksiyon enzimleri ile kesim şartları.....	16
Tablo 3.4 Lakkaz geninin ve pET22b vektörünün T4 DNA ligaz enzimiyle ligasyonu .....	17
Tablo 3.5 SDS-PAGE Elektroforezi için Kullanılan Çözeltiler.....	20
Tablo 8.1 SDS-PAGE Elektroforezi için Kullanılan Çözeltiler .....	80
Tablo 8.2 Sitrik Asit Tampon Çözeltisi Oranları .....	82
Tablo 8.3 Tris-Maleat Tampon Çözeltisi .....	83
Tablo 8.4 Karbonat-Bikarbonat Tampon Çözeltisi .....	83

## SEMBOL LİSTESİ

<b>µM</b>	:	Mikromolar
<b>AMPS</b>	:	Amonyum persülfat
<b>atm</b>	:	Atmosfer
<b>ATP</b>	:	Adenozin Trifosfat
<b>bis</b>	:	N,N'-metilen-bis-akrilamid
<b>bp</b>	:	base pair
<b>CBB</b>	:	Coomassie Brilliant Blue
<b>Da</b>	:	Dalton
<b>EDTA</b>	:	Etilendiaminotetra-asetik asit
<b>Kb</b>	:	Kilobaz
<b>kDa</b>	:	Kilodalton
<b>LB</b>	:	Luria Broth
<b>M</b>	:	molar
<b>mL</b>	:	mililitre
<b>mM</b>	:	Milimolar
<b>nm</b>	:	Nanometre
<b>nmol/s</b>	:	Nanomol/saniye
<b>OD</b>	:	Optik Dansite
<b>PAGE</b>	:	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
<b>PSMF</b>	:	Fenilmetilsulfonilflorit
<b>rpm</b>	:	Dakikada devir sayısı
<b>sp.</b>	:	Species (tür, tekil)
<b>spp.</b>	:	Species (tür, çoğul)
<b>SDS</b>	:	Sodyum dodesil sülfat
<b>TCA</b>	:	Trikloroasetik asit
<b>Tris</b>	:	2-Amino-2-Hidroksimetilpropan-1,3-diol
<b>TEMED</b>	:	N,N,N',N'-Tetrametil etilendiamin
<b>UV</b>	:	Ultraviyole
<b>U/mg</b>	:	Unite/miligram
<b>U/mL</b>	:	Unite/ mililitre

## ÖNSÖZ

2015-2020 yılları arasında Pamukkale Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Prof. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN'ın tez danışmanlığı ve Prof. Dr. Sadık DİNÇER'in eş danışmanlığı altında yürütülen bu çalışma, DOKTORA tezi olarak hazırlanmıştır.

Danışmanlığımı yaptıkları süre boyunca benden ilgi, bilgi, tecrübe ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, önerileri ile beni yönlendiren ve bilimsel bakış açısı kazanmam konusunda üzerimde büyük emeği bulunan birinci danışman hocam Prof. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN ve ikinci danışman hocam Prof. Dr. Sadık DİNÇER'e,

Çalışmalarım boyunca bilimsel desteklerinden dolayı Tez İzleme Komitesi üyeleri Prof.Dr. Şevki ARSLAN'a ve Doç. Dr. Ömer ŞİMŞEK'e,

Laboratuvarını benimle paylaşan Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ ve Prof. Dr. Hasan BASRİ İLA'ya,

Desteklerini esirgemeyen Ebrahim VALIPOUR'a,

Aynı ortamda çalışmaktan her zaman mutluluk duyduğum ve her durumda desteğini hiç esirgemeyen iyilik dolu yüreğe sahip eşim Dr. Öğr. Üyesi. Mostafa NORİZADEHTAZEHKAND'a

Her türlü konuda yardım aldığım tüm Bakteriyoloji Laboratuvarı öğrencileri ve Öğr. Gör. Naime Nur BOZBEYOĞLU'na

Bu uzun ve yorucu dönemde her anımda maddi manevi destek olan benim koruyucu meleklerim babam Ahmed HAJIPOUR'a ve annem Sareh ASHOURİ'ye, en içten teşekkürlerimi sunarım.

# 1. GİRİŞ

Dünyada canlı popülasyonunun hızlı artışına paralel olarak günlük ihtiyaçlar da hızla artmakta ve bu da çözümlenmesi gereken çevresel sorunlara yol açmaktadır. Başta deterjan sanayi olmak üzere kâğıt, gıda, kozmetik, eczacılık ve sağlık gibi birçok sektörde ya madde sentezi veya istenilmeyen ürünlerin ortadan kaldırılması gibi süreçlerde enzimlere gereksinim duyulmaktadır. Bu nedenle yüksek kalitede ve miktarda enzim üretimi söz konusudur. Günümüzde çok sayıda mikrobiyal kaynaklı enzimlerin patenti alınmış olup sayısız firma tarafından ticari olarak satılmaktadır. Üretim teknolojilerinden enzimatik aktiviteye kadar birçok özellik açısından bakteriyel kaynaklı enzimlerin sahip oldukları avantajlar, çeşitli bakterilerden enzim üretimini ve bunların farklı alanlarda kullanımını gündeme getirmiştir. Katalitik aktivite özellikleri nedeniyle enzimler, günümüzde endüstrinin farklı alanlarında kullanım potansiyeline sahiptir. Çevreden kolay bir şekilde temizlenmesi nedeniyle çevre dostudur ve standardize edilebilmesi de enzimlerin hemen hemen her alanda kullanılabilmesini kolaylaştırmaktadır (Karam ve Nicell 1997, Duran ve Esposito 2000).

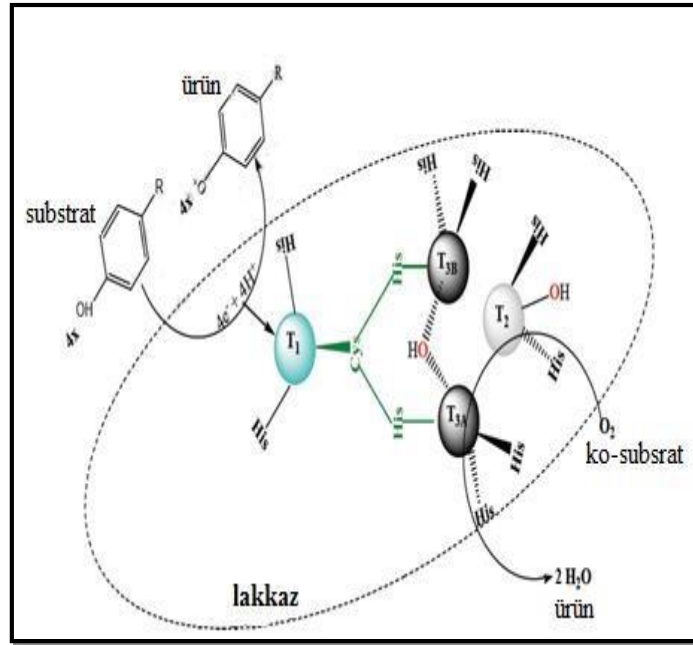
Mikrobiyal enzimlerin endüstriyel ölçekte biyokatalizör olarak kullanımı, beyaz biyoteknoloji ya da diğer adıyla yeşil (sürdürülebilir) kimyanın temelini atmış ve günümüzde biyolojik temelli bir ekonomi doğmuştur. Sanayide yüksek sıcaklık, yüksek basınç, yüksek tuz konsantrasyonları, asidik veya alkali şartlar, oksidatif koşullar gibi sert koşulların varlığı bilim insanlarını bu şartlara daha dirençli enzim geliştirmeye yönlendirmiştir. Endüstriyel biyoteknolojideki yenilikçi yaklaşımlar ve biyolojik temelli çözüme yönelik geliştirilen stratejiler nedeniyle yeni ve güçlü katalitik özelliklere sahip enzim arayışı halen tüm dünyada güncelliğini korumaktadır.

Genel olarak Oksidoredüktaz olarak bilinen lakkaz (benzenediol veya oksijen oksidoredüktaz) enzimi bakır içerir ve oksijenin suya indirgenmesiyle beraber farklı fenolik ve fenolik olmayan aromatik bileşenlerin oksidasyonunu katalize eder (Giardina ve diğ. 2010, Singh ve diğ. 2011). Lakkaz enzimi tip I, tip II ve tip III olmak üzere 4 adet bakır içerir. Spektral özelliklerine ve elektroparamanyetik rezonans

(EPR)'a bağı aktif merkezi oluşturan bakır iyonlarına göre sınıflanırlar (Solomon ve diğ. 1996).

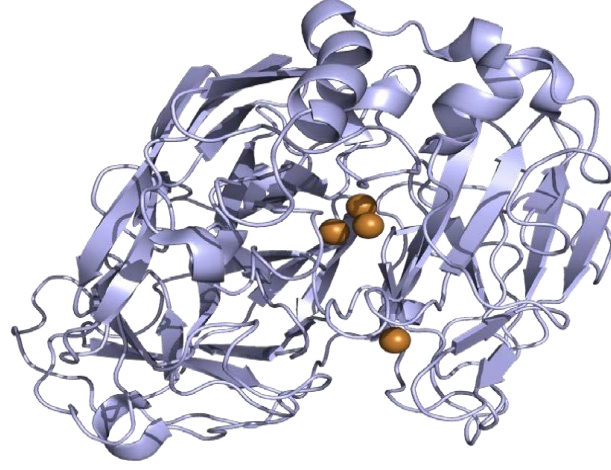
Tip I bakır (T1) içeren lakkaz enzim çözeltileri mavi renk oluşturlar. Bu tip çözeltiler 600 nanometrelik optik absorpsiyona sahiptir ve spesifik elektroparamanyetik rezonans spektrumu ile karakterize edilirler. Lakkazlarda T1 merkezi, sistein sülfidril ile histidin imidazol içeren trigonal yapıdadır (Enguita ve diğ. 2003, Garavaglia ve diğ. 2004). Tip II bakır (T2), renksiz bölgedir ve çok zayıf elektroparamanyetik rezonans spektrumuna sahiptir (Solomon ve diğ. 1992, Quintanar ve diğ. 2005). Tip III bakır içeren lakkaz enziminin T3 bölgesi hidroksil bağla anti-ferromanyetik çift bakır iyonları içerir ve bakır merkezi çift çekirdeklidir. Bu tip bakır elektroparamanyetik rezonans spektrumu ile ayırt edilemez ve histidin aminoasidinde ligand olarak görev yapar (Messerschmidt ve Huber 1990, Solomon ve diğ. 1996).

Lakkaz enzimin katalitik reaksiyonu üç aşamada gerçekleşir. T1 bakır substrat varlığında indirgenir. T1 bakırdan ayrılan bir elektron T2 ile T3 bakırların var olduğu bölgeye transfer olur. Daha sonra T2 ve T3 bölgesindeki oksijen (O<sub>2</sub>), suya (H<sub>2</sub>O) indirgenir ( Gianfreda ve diğ. 1999). Lakkaz enziminin katalitik mekanizması ve yapısı Şekil 1.1 ve 1.2'de verilmiştir.



Şekil 1.1: Lakkaz enzimine ait katalitik mekanizma (Baldrian 2006).





**Şekil 1.2:** Lakkaz enzimin yapısı (<http://armstrong.chem.ox.ac.uk/laccase.html> )

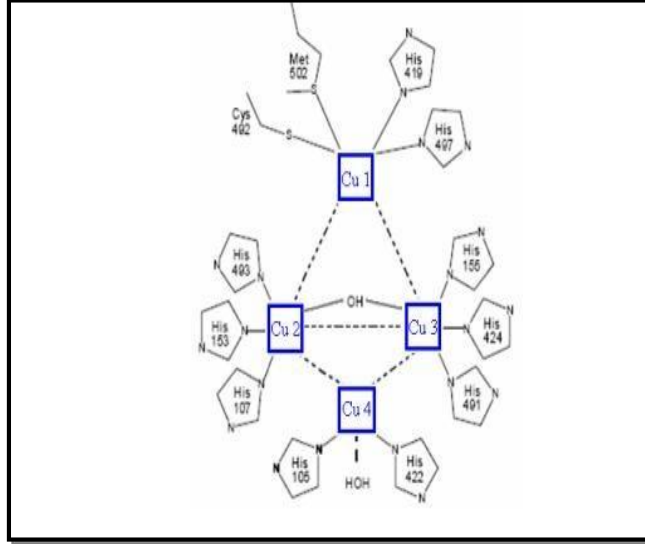
### 1.1 Çalışmanın Amacı

Günümüzde doğadan daha aktif ve yüksek stabiliteye sahip yeni lakkaz enzimi üreticisi mikroorganizma izole edilmeye çalışılmaktadır. Bakteri kökenli enzimlerin en önemli özelliği, stabilitenin yüksek olması, geniş pH ve sıcaklık aralığında aktivite gösterebilmesidir. Bu nedenle de bakteriyel enzimlerin kullanım potansiyeli daha fazladır. Özellikle fazla miktarda üretilmesi ve saflık değerinin artırılması için bakteriyel enzimlerin klonlanarak üretilmesi ve saflaştırılması önemli bir avantaj sağlayacaktır. Bu nedenle yapılan bu çalışmada, yerel bir bakteri izolatu olan lakkaz pozitif *Bacillus subtilis* OH 67 suşunun lakkaz geni *E. coli*'ye klonlanmış ve rekombinant enzim saflaştırılmıştır. Saflaştırılan rekombinant lakkaz enziminin karakterizasyonu yapılarak, sıcaklık, pH, metal iyonlar, deterjan gibi inhibitörlerin enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. Ayrıca saf rekombinant enzimin sentetik boyar maddelerin giderimindeki etkinliği tespit edilmiştir.

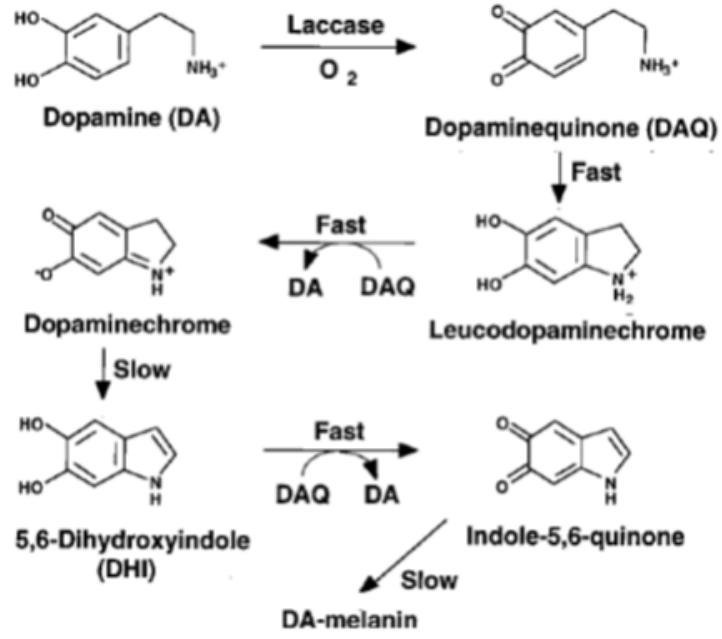
## 2. TEZ KONUSU VE LİTERATÜR TARAMASI

Lakkaz enzimi ilk kez 1883 yılında Japon vernik ağacından (*Rhus vernicifera*) izole edilmiştir (Call ve Mucke 1997, Gianfreda ve diğ. 1999, Özçırak 2012). Lakkaz enzimi bazı böceklerde, bitkilerde, bakterilerde ve mantarlarda bulunmaktadır (Claus 2003, Claus 2004, Özçırak 2012, Sharma ve diğ. 2007).

Lakkaz (E.C.1.10.3.2. p-difenol oksidaz) enzimi, fenolik bileşiklerin ve aromatik aminlerin oksidasyonunu sağlayan ve yapısında monomerik ve multimerik bakır olan oksidoredüktaz enzimlerden biridir (Şekil 2.1) (Brijwani ve diğ. 2010, Desai ve Nityanand 2011). Difenolü o-kinona çevirir ve o-kinon oksijen varlığında enzimatik olmayan reaksiyonlarla melanine dönüşür (Şekil 2.2) (Williamson 1997).



Şekil 2.1: Lakkazın bakır merkezleri (Enguita, 2003)



**Şekil 2.2:** Lakkaz enzim vasıtasıyla melanin oluşumu( Williamson 1997)

Lakkaz enzimi, bazı mikroorganizmalarda melanin sentezine neden olur ve mikroorganizmaların çevresel faktörlerden korunmasını sağlar. Fenolik bileşenleri ve protein yapısındaki aromatik grupları oksitleme özelliğinden dolayı biyoteknolojide geniş kullanım potansiyeli vardır (Nosanchuk ve Casadevall 2003). Ayrıca, detoksifikasyon ve dekolorizasyon özelliğinden dolayı, şarap ve meyve suyu endüstrisinde fenolik bileşenlerin uzaklaştırılmasında, tekstilde boyaların transferi işlemlerinde ve enzimatik dönüşümlerde de sıklıkla kullanılmaktadır (Brijwani ve diğ. 2010, Desai ve Nityanand 2011, Leonowicz ve diğ. 2001, Kunamneni ve diğ. 2008). Kâğıt sanayiinde kâğıt hamurunun delignifikasyonu işleminde biyolojik iyileştirme ajanıdır. Etanol üretiminde, biyosensör, biyo-yakıt gibi birçok endüstriyel alanda da kullanımı mevcuttur.

Atık sularda bulunan fenolik bileşen ve benzeri kirleticilerin ortamdaki uzaklaştırılması için yüksek miktarda lakkaz uygulaması ve buna bağlı olarak da büyük hacimlerde bu enzimin üretimi gerekir. Hiç kuşkusuz ham enzim kullanımının maliyeti yüksektir (Tuncer 2010). Lakkaz enzimi, selülozik yapıdaki liflerde var olan mum, yağ, protein, pektin ve renkli pigmentler gibi renklendiricilerin ortamdaki uzaklaştırılmasını sağlamakla birlikte baskı, boyama ve bitim gibi işlemlerde de kullanılmaktadır. Tekstil endüstrisinde kumaşların beyazlaştırılması klasik olarak

bazik ve asidik ortamda yüksek sıcaklık ve farklı yükseltgen maddeler yardımıyla yapılmaktadır. Kumaşın ağartılması için uygulanan oksidasyon işleminde liflere yüksek oranda verilen beyazlaştırıcı maddeler zararlı atıklar oluşturur. Örneğin, lakkaz enzimi kısa sürede pamuklu kumaşların beyazlaşmasını sağlamakla birlikte sonraki aşamadaki ağartma işleminde kullanılmış olan hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) konsantrasyonunun önemli derecede düşmesine sebep olmaktadır (Tzanov ve diğ. 2003, Basto ve diğ. 2007). Son zamanlarda da fenol ve bileşenlerin gideriminde peroksidaz enzimlerin yerine fenol oksidazların (lakkaz ve benzeri enzimler) kullanılması tercih edilmektedir. Çünkü  $H_2O_2$  kullanılan işlemlerde ayrıca peroksidaz enziminin kullanılması maliyet arttıracaktır. Peroksidazların aksine fenol oksidazlar, oksidasyon ajanı olarak  $H_2O_2$  yerine  $O_2$  kullanırlar. Dolayısıyla fenol oksidaz grubu enzimlerin kullanılması, ilave enzim kullanımından kaynaklanan yüksek maliyet sorunu ortadan kaldırmış olacaktır (Atlow ve diğ. 1984).

Endüstriyel alanlarda ve fabrikalarda kullanılan sular, doğaya ve çevreye kirli su olarak atılmakta ve yeraltı sularına sızarak içilebilir su kaynakları kirletilmektedir. Özellikle tekstil ürünlerin işlenmesi sonrasında, boya ve metal içerikli atık sularda yüksek miktarda fenol ve fenol benzeri kirleticiler bulunur (Farzaneh 2010). Sanayi kuruluşlarındaki su arıtım tesislerinin kurulması zorunlu olmasına rağmen çoğu tesis yüksek maliyetten dolayı atık su arıtımı yapmamaktadır. Birçoğu da fiziksel ve kimyasal yöntemlerle arıtım yapmaktadır. Diğer taraftan, yüksek maliyetlerle yurtdışından ithal edilen mikroorganizmalarla biyolojik arıtım yapan az sayıda da olsa tesisler de mevcuttur (Karacakaya ve diğ. 2009). Çevre dostu olması nedeniyle mikroorganizmalardan elde edilen lakkaz kullanılarak biyolojik temelli uygulamaların geliştirilmesi, tekstilde kimyasal yapıdaki boyar maddelerin parçalanarak temizlenmesi ve ortamdan uzaklaştırılması uygun bir çözüm yolu olacaktır (Arık ve diğ. 2008). Örneğin, *Myceliophthora thermophila*'dan izole edilen lakkaz enzimin tekstil sanayinde boyar maddelerin temizlenmesinde etkisi araştırılmış ve lakkazın boyar maddelerin temizlenmesinde etkili olduğu bildirilmiştir (Göksel 2005, Kunamneni ve diğ. 2008). Türkiye'de tekstil önemli sektörlerden biridir. İstanbul, İzmir, Bursa, Denizli, Gaziantep ve Kahramanmaraş gibi illerde yoğun bir şekilde tekstil üretimi yapılmaktadır. Türkiye, 1990 yılında 1,42 milyon dolar tekstil ürünü ihraç etmiştir. 2004 yılında bu rakam 5 milyar dolara çıkmıştır. Tekstil sektöründeki ihracat miktarı 2014 yılında 8,9 milyar dolar, 2017'de 8,098 milyar dolar ve 2018'de

ise 8,461 milyar dolar ile Türkiye ekonomisinde önemli bir yer edinmiştir. Bugün Türkiye’de 7,500’den fazla tekstil imalatçısı bulunmaktadır. Lakkaz ticari tekstil uygulamalarında geleneksel pamuk beyazlatma işleminde kullanılır. Lakkaz katalizi tekstil boya ağartma boyalı pamuklu kumaşın bitiminde faydalı olabilir. Boyaların çevreye zararlı olduklarından dolayı bu enzimin kumaşları beyazlatmak için kullanılması tavsiye edilir (Türkiye Cumhuriyeti-Ekonomi Bakanlığı 2012, Mojsov 2014, Vantamuri ve Kaliwal 2016, Couto 2015, Pezzella ve diğ. 2016, Dünya Ticaret Örgütü (World Trade Organization) 2003).

Zeytincilik ve zeytinyağı üretimi de Türkiye’de ekonomik öneme sahip bir diğer sektördür. Dünya piyasasındaki zeytinin %97’si Türkiye, İtalya, İspanya, Yunanistan ve Tunus tarafından karşılanır. Sofralık zeytin ve zeytinyağı üretiminde, fenolik bileşenler içeren ve karasu olarak isimlendirilen atık sular, yer altı su kaynaklarında ve toprakta ciddi boyutlarda kirliliğe sebep olmaktadır (Kaplan ve Hesenov 2008, Ardıç 2009, Öztürk ve diğ. 2009, Mert ve diğ. 2008). Zeytin karasuyunda 7,9 g/L fenol bulunmaktadır (Mert ve diğ. 2008). Zeytinyağı üretimi sırasında yan ürün olarak oluşan karasu, lakkaz enzimi ile bertaraf edilebilir (Kaplan ve Hesenov 2008). Zeytinyağı üretiminin ekstraksiyon işleminde, yaklaşık olarak %20 yağ, %30 katı atık ve %50 siyah atık su oluşur. Zeytin değirmeni atık su (OMW=Zeytinyağı atıksu arıtımında yeni teknikler) olarak adlandırılır. Katı kalıntının çoğu yakıt olarak kullanılır, ancak OMW Akdeniz ülkeleri için çevresel bir sorundur. OMW'nin parçalanmasındaki önemli bir adım, renkli polimerik fenoliklerin (renklenme) daha sonra mineralleştirilebilecek monomerlere parçalanmasıdır (Minussi ve diğ. 2007, Tsioulpas ve diğ. 2002).

Klorofenol sınıfına ait pestisitler, en çok tercih edilen zirai ilaçlardan biridir. Bu gruptaki pestisitlerin suda çözünürlükleri yüksektir ve bu tür toksik kimyasallar toprakta ve nehirlerde fazla miktarda görülürler (Miyazaki ve diğ. 2002). Pestisitler tüm canlılarda protein sentezi ve lipid biyosentezini olumsuz yönde etkilediği de bilinmektedir (Guerra 2001). Sucul ortamlarda da oldukça yüksek toksisiteye sahiptir (Guerra 2001, Torres-Duarte ve diğ. 2009). Pestisitler ve herbisitler, modern tarımda yaygın olarak kullanılır ve çeşitli tarımsal mahsullerin etkili bir şekilde üretilmesini destekler. Bir fenilurea herbisit türü olan izoproturon, çoğunlukla ilkbahar ve kış buğdayındaki çavdar, ipeksi bentgrass ve birçok geniş yapraklı tür gibi yabancı otların

büyümesini kontrol etmek için kullanılır. Kanserojen bir metabolit üreten Isoproturon çevreyi özellikle de suda yaşayan omurgasızları, yosunları ve mikroorganizmaları olumsuz yönde etkiler. Yarı ömrü tropik iklimlerde yaklaşık 15 gün, orta iklimlerde 40 gündür. Yaygın kullanımını nedeniyle izoproturon nehirlerde, akarsularda, deniz sularında ve yer altı sularında kirletici olarak tespit edilmiştir (Zeng ve diğ. 2017, Imran ve diğ. 2012, Jolivalt ve diğ. 2000). Lakkaz enzimi pestisit ve herbisitleri parçalama yeteneğine sahip olduğundan dolayı bu enzim bu zararlı kimyasalların ortadan kaldırılması için de kullanılabilir (Jin ve diğ. 2016, Zeng ve diğ. 2016).

Bazı antikanser ilaç üretiminde katalizör olarak lakkaz kullanımı da bilinmektedir (Rodríguez ve Herrera 2006, Özçırak 2012). Örneğin HuH7 Hepatocarcinoma hücrelerinde antikanser etki gösterdiği ve bazı kanser türleriyle mücadelede de kullanılabileceği rapor edilmiştir (Aswini ve diğ. 2016).

Bilindiği gibi lakkaz enziminin ticari üretimi *Trametes versicolor* mantarından yapılmakta ve ticari olarak satılmaktadır (Sigma-Aldrich). *Trametes versicolor* mantarı hızlı ve kolay üretilmekte ve bu nedenle de lakkaz enzimiyle ilgili yoğun araştırmalar bu organizmayla yapılmaktadır. Diğer taraftan bakteriyel enzimler, dayanıklı ve uyumlu olmalarının yanı sıra ekonomik üretimlerinden dolayı mantar, bitki ve hayvansal enzimlere göre daha fazla tercih edilirler. Bu gün piyasadaki lakkazların çoğu mantarlardan elde edilmiştir. Hâlbuki bakteriyel lakkazlar mantarlardan elde edilen lakkaza kıyasla daha geniş pH aralığına sahiptir ve daha yüksek sıcaklıklara dayanıklıdır (Stoilova ve diğ. 2010, Mukhopadhyay ve diğ. 2013, Sharma ve diğ. 2007). Bakteriyel lakkazların birçoğu CotA türü lakkazlardır. CotA proteini *Bacillus subtilis* türü bakterilerde görülür ve protein bakterinin dış kaplama tabakasında yer alır. Cot A türü lakkazların termostabilitesi çok yüksektir ve bu protein hidrojen peroksit ve UV'ye karşı spor oluşumundan da sorumludur (Enguita ve diğ. 2004).

### 3. YÖNTEM

#### 3.1 Materyal

##### 3.1.1 Çalışmada kullanılan kimyasallar, boyalar ve kitler

Agaroz (Sigma, A9539); Akrilamid (Sigma, A8887); Bis-akrilamid (Sigma, 146072); Bromfenol mavisi (Sigma, B6131); Amonyum persülfat (APS, Sigma, A3678); Asetik asit (Sigma, 27225); Dimetil sülfoksit (DMSO, Sigma, D2650); Etidyum bromür (EtBr, Bio Basic; D0197); Etil asetat (EA, Sigma, 27227); Etilendiamintetraasetik asit (EDTA, Sigma, 5134); Gliserol (Sigma, G2289); Glisin (Bio Basic, DR0235); Sodyum dodesil sülfat (SDS, Sigma, L4390); Sodyum klorit (NaCl, Sigma, 13423); Tetrametiletildiamin (TEMED, Sigma, T8133); Tris (Bio Basic; DB0194); Triton X-100 (Bio Basic, DB0198); 2-Merkaptoetanol (2-ME, Merck, 8,05740); 2-Propanol (Sigma, 24137), Guaiacol (2-Methoxyphenol, Sigma,135011), Syringaldazine (4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde azine, Sigma, 14414-32-5) ve Catechol (1,2-Dihydroxybenzene, Sigma, 135011), Fenol kırmızısı, Metil mavisi, Brom mavisi, Kongo kırmızısı, Coomassie brilliant mavisi, Kristal viyole, Brom krezol moru, Turkuaz mavisi HF6, Reaktif Kırmızısı 123, Remazol siyahı RB, Remazol brilliant mavisi R, Remazol brillant kırmızısı BB, Remazol viyole 5R ve Remazol brillant turuncusu 3R, Bakteri DNA'sının izolasyonu için "DNA izolasyon kiti" (RTA, 09028050), Agaroz jelden DNA izolasyonu kiti (Promega, A9281), DNA marker (Vivantis, NL1421), 6X Loading dye (Fermentas, R0611), dNTP (Deoksinükleozid trifosfat; Promega, U1511) ve Taq DNA polimeraz (Promega, M3001), DNA kesme enzimleri (NcoI R6513, HindIII R6041 Promega), DNA ligaz (Promega M1801), antibiyotik Ampisilin (Becton Dickson, USA 230705), kullanılmıştır. Elektroforez işleminden sonra DNA'nın UV altında görünebilir hale gelmesi için Etidyum Bromür 0,5 µg/mL konsantrasyonunda kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan diğer kimyasallar yüksek derece saflığa sahiptir.

### 3.1.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Hassas Terazı (GEC AVERY-ingiliz), Santrifüj ve Soğutmalı santrifüj (Sigma-Aldrich, USA), Otoklav (Hirayama, Hiclave HV japonya), Su banyosu (Nüve, Türkiye), Spektrofotometre (Thermo FİSHER Scientific, USA), Thermal Cyclers (Ependorf, Almanya), Manyetik Karıştırıcı (izmir teknik kimya, TÜRKİYE), Vorteks (Velp. Scientifica, İtalya), Elektroforez Sistemi (Thermo FİSHER Scientific, USA), Güvenlik Kabini (LaborMed, TÜRKİYE) ve Jel Görüntüleme Sistemi (Vilber lormate, Kuzey İrlanda) kullanılmıştır.

### 3.1.3 Kullanılan Bakteri Suşları ve Vektör

Bu çalışmada konakçı hücresi olarak Promega firmasına ait *E. coli* BL21 DE3 bakterisi ve vektör olarak da pET22b (Novagen) vektörü kullanılmıştır.

## 3.2 Metod

### 3.2.1 Lakkaz Pozitif Bakteri Suşunun İzolasyonu

İstanbul ve Adana'nın farklı bölgelerinden aseptik koşullara uyularak alınan toprak örnekleri bakteri izolasyonu için +4 °C'de muhafaza edilmiştir. İzolasyon için 5 gram toprak 100 mL distile suda homojen bir şekilde dağılması sağlandıktan sonra 80°C'de 10 dakika bekletilmiştir. Daha sonra 500 µL örnek alınarak LB sıvı besiyerine eklenmiş ve 37 °C'de 200 rpm'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Gecelik taze kültürden seri dilüsyonlar yapılarak syringaldazine veya catechol içeren katı besiyerine ekilmiştir. Etrafında siyah veya siyah-kahverengi ya da pembe rengi oluşan koloniler lakkaz pozitif olarak seçilmiştir (Kohashi ve diğ. 2004, Sambasiva ve diğ. 2012, Dalfard ve diğ. 2006).



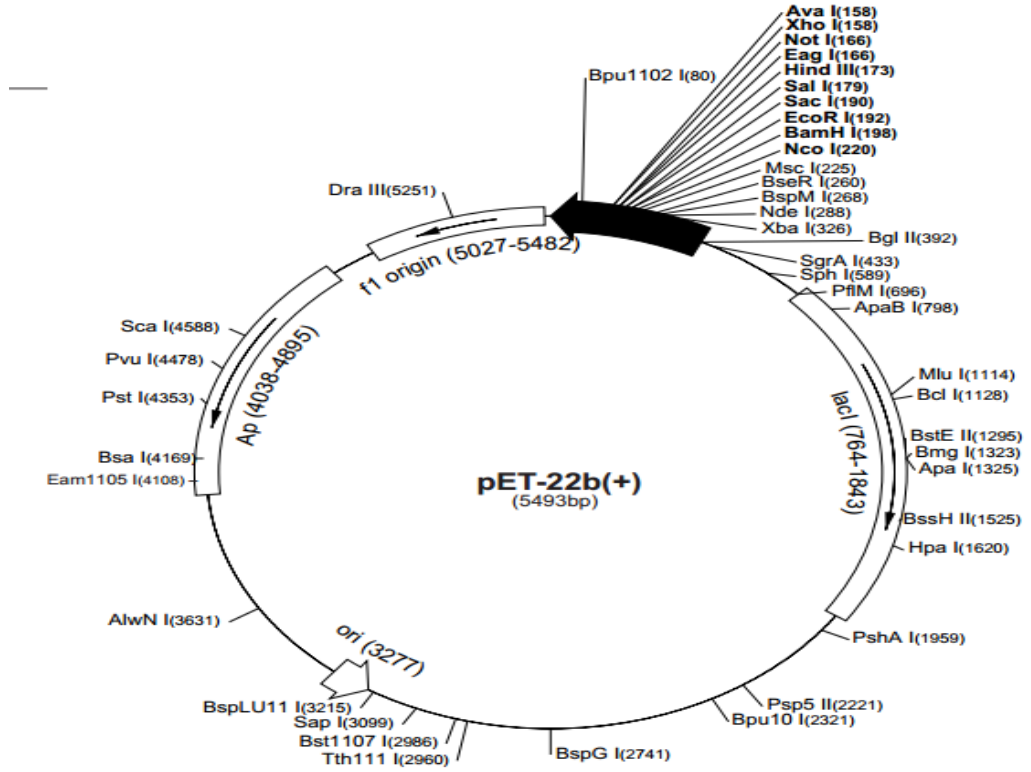
### 3.2.2 İzole Edilen Bakteri Suşunun Tanımlanması ve Stoklanması

Gram boyama ve mikroskopik incelemeler sonunda endospor içeren izolat *Bacillus* sp. olarak stoklanmıştır. Sentegen firmasında yapılan 16S rDNA sekansı NCBI’da bulunan bakterilerin 16 S rDNA dizileri ile karşılaştırılarak BLAST edilmiş ve izolatın *Bacillus subtilis* (OH 67) olarak tür tayini yapılmıştır. İzolata ait sekans, NCBI ve Clostral W sitelerinde değerlendirilerek filogenetik ağacı da çizilmiştir (Hajipour ve Dinçer 2015).

Bakteri, nutrient agar (8,0 g/L, et özütü 10,0 g/L, pepton 10,0 g/L, tripton 10 g/L, agar 20,0 g/L ve NaCl 0,5 g/L) besiyerinde +4°C’de ve steril %15’lik gliserol içerisinde -80 °C’de saklanmıştır (Dalfard 2006, Sambasiva 2012).

### 3.2.3 Vektör Seçimi ve Primer Dizaynı

NCBI sitesinde BLAST karşılaştırmasından sonra *Bacillus subtilis strain* OH 67 bakterisine %97’den fazla homoloji gösteren bakterilerin lakkaz genine ait sekans oligo 7 programı kullanarak çift primerler tasarlanmıştır. Bu çalışmada ekspresyon vektörü olarak pET22b vektörü kullanılmıştır. Kullanılan vektöre ait bilgiler, primerlerin sekansı ve kullanılan restriksiyon enzim ve pET22b bölgeleri aşağıda Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1: pET22b vektörü

### 3.2.4 *Bacillus subtilis* OH 67'ten DNA İzolasyonu

*Bacillus subtilis* OH 67 bakterisine ait genomik DNA, RTA firmasına ait kit ile izole edilmiştir. DNA izolasyonu üretici firmanın talimatına göre yapılmıştır. İzolasyon aşamaları maddeler halinde aşağıda verilmiştir.

1) LB sıvı besiyerinde hazırlanan bir gecelik bakteri kültüründen 2 mL alınıp ve 4000 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra supernatant atılmış ve hücre pelleti analiz için -20°C'de muhafaza edilmiştir.

2) Santrifüj işleminden sonra taze hazırlanan Lizozim çözeltisinden [20 mg/mL Lizozim + (10 mM Tris, 1 mM EDTA; pH: 8,0, 1mM DTT)] 200 µL alınıp pellete eklenmiş ve vorteksenerek 30 dakika 37°C'de inkübe edilmiştir.

3) İnkübasyondan sonra 10,000 g'de 1 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürülmüş ve süpernetant uzaklaştırdıktan sonra 200 µL solüsyon BL ve 20 µL Proteinaz K ilave edilmiştir.

4) Sonra solüsyon B'den 250 µL çözelti üzerine eklenip ve 30 saniye vorteksenmiş ve 15 dakika 65°C'de inkübe edilmiştir.

5) İnkübasyondan sonra tüplere 200 µL %96'lık etanol ilave edilerek 20 saniye boyunca karıştırılmıştır.

6) Hazırlanan karışım, kit ile verilen toplama tüpüne yerleştirildikten sonra spin kolona aktarılmıştır.

7) Daha sonra tüpler 10,000 g'de 1 dakika boyunca santrifüj edilip ve alt kısımdan kalan toplama tüpü atılarak kolon yeni bir toplama tüpün içerisine yerleştirilmiştir.

8) Kolonların üzerine solüsyon W1'den 700 µL eklenip 10,000 g'de bir dakika santrifüj edilmiştir. Toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırılarak kolon temiz toplama tüpe konulmuştur.

9) Daha sonra 700 µL Solüsyon W2 kolona ilave edildikten sonra 10,000 g hızında bir dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Toplama tüpündeki sıvı atıldıktan sonra kolon tekrar aynı tüpün içine yerleştirilmiş ve 10000 g'de 30 saniye boyunca santrifüj edilmiştir.

10) Kolonlar 1,5 mL'lik steril tüpün içerisine transfer edilerek 5 dakika 70°C'de ısıtılmış ve 200 µL Solüsyon E kolonlara ilave edilmiştir.

11) Oda sıcaklığında 3 dakika bekletilen tüpler 10000 g'de bir dakika santrifüj edilmiştir.

12) Kolonlar atılıp tüp içindeki genomik DNA -20°C'de stoklanmıştır.

### **3.2.5 Genomik DNA'nın Agaroz Jel Elektrofrez**

%1'lik agaroz jel hazırlamak için 0,5 gram agaroz 50 mL 0,5X yoğunluğundaki TBE (Tris Boric acide-EDTA) tamponunda hazırlanmış ve elektrofrez kasetine dökülmüştür. Jel donduktan sonra tanka yerleştirilmiş ve elektrofrez tankı TBE tamponuyla doldurulmuştur. 1 µL jel yükleme boyası ve 6 µL DNA karıştırılarak hazırlanan örnekler kuyucuklara yüklenmiştir. Elektrofrez işlemi bir saat 90 volt'ta yapılmıştır ve jel etidiyüm bromür çözeltisi ile boyanmıştır. DNA, Vilber Lourmate marka jel görüntüleme cihazıyla görüntülenmiştir.

### 3.2.6 DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi

*Bacillus subtilis*'in DNA'sı steril su ile 50 kat seyreltilmiş ve spektrofotometrede 260 nm'de absorbans değeri ölçülmüştür. Absorbans değeri, çift zincirli DNA için 50 µg/mL'ye takabül etmektedir. Aşağıdaki formül yardımıyla DNA konsantrasyonu hesaplanmıştır. Protein kirliliğini de kontrol etmek için 280 nm dalga boyu kullanılmıştır (Sambrook ve Russell 2001).

$$\text{DNA } (\mu\text{g/mL}) = 260 \text{ nm'deki absorbans} \times \text{Seyreltme Faktörü} \times 50$$

### 3.2.7 Lakkaz Geninin (*phyC*) Amplifikasyonu için Primer Dizaynı

*B. subtilis*'e ait Lakkaz geninin dizisi incelenerek *phyC* geninine ait uygun primer oligo 7 programını kullanarak dizayn edilmiştir ve primer dizileri Rafigen firması tarafından sentezlenmiştir. Ayrıca PCR ürününün pET22b vektörlere ligasyonunu sağlamak için amplifiye olan gende yapışkan uç oluşturmak amacıyla Primer F'nin ucuna *NcoI* (5'-GGATCC-3'), Primer R'nin ucuna *Hind III* endonükleazına ait tanıma dizileri (5'-TTCGAA-3') ilave edilmiştir. Sentezlenen primer dizisi aşağıda gösterilmiştir.

Forward Primer:

5-ATACATCCATGGATACATATCACCCATTCA GTCTTACCA-3

Revers Primer:

5ATTTTTAAGCTTTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGCCTCCTCATTC  
CGATAAAGGAC-3

### 3.2.8 Lakkaz Geninin PCR İle Çoğaltılması

*Bacillus subtilis*'ten izole edilen kalıp DNA üzerinden lakkaz genine ait primerler kullanılarak lakkaz geni PCR ile çoğaltılmıştır. PCR optimizasyonu için çeşitli reaksiyonlar ve farklı sıcaklıklar (48-62°C primer yapışma sıcaklığı) denenmiştir. Optimum primer yapışma sıcaklığı 58°C olup reaksiyon steril şartlarda, kabin içerisinde ve buz üzerinde yapılmıştır. Lakkaz genin amplifikasyonu için yapılan PCR ile ilgili optimum koşullar Tablo 3.1 ve 3.2'te verilmiştir.

Tablo 3.1. Optimum PCR koşulları

10x Taq buffer	5 $\mu$ L
dNTP	4 $\mu$ L
Forward Primer (10 $\mu$ M)	2,5 $\mu$ L
Revers primer (10 $\mu$ M)	2,5 $\mu$ L
DNA	0,8 $\mu$ g (0,6 $\mu$ L)
Taq DNA Polimeraz	1,25 Unit (0,5 $\mu$ L)
Su	29,5 $\mu$ L
Final hacim	50 $\mu$ L

Tablo 3.2. PCR sıcaklık, döngü ve döngü zamanı

94 °C	5 Dakika	1 Döngü
94 °C	45 Saniye	35 Döngü
48-62°C	50 Saniye	
72 °C	50 Saniye	
72 °C	5 Dakika	1 Döngü

### 3.2.9 Lakkaz Genine Ait PCR Ürününün Saflaştırılması

Lakkaz genine ait PCR ürünü, Promega firmasına ait kit yardımıyla üretici firmanın talimatına göre yapılmıştır. Elde edilen DNA'lar agaroz jelde yürütülmüş ve DNA bandının bulunduğu yerdeki jel 2 mL'lik tüp içerisine yerleştirilmiştir. Üzerine 400  $\mu$ L Membran Binding tamponu ilave edilerek bir dakika oda koşullarında inkübe edilmiştir. Daha sonra örnekler bir dakika 14,000 rpm hızında santrifüj edilmiş ve alttaki sıvı uzaklaştırılmıştır. SV kolonu yeni başka tüp içerisine aktararak üzerine 750  $\mu$ L membran yıkama tamponu eklenmiştir. 14,000 rpm'de bir dakika santrifüj işleminden sonra alttaki sıvı uzaklaştırılmış ve kolon tekrar temiz tüp içerisine aktarılmıştır. Kolonların üzerine 500  $\mu$ L membran yıkama tamponu eklenerek bir önceki aşama tekrarlanmıştır. Son olarak DNA'ları çöktürmek amacıyla tüplere 50  $\mu$ L steril su ilave edilmiş ve örnekler 3 dakika oda koşullarında inkübasyona bırakılmıştır.

Süre sonunda tüpler bir dakika 14,000 rpm’de santrifüj edilerek kolonlar atılmış ve alt kısımda çöken DNA -20°C’ de stoklanmıştır.

### **3.2.10 Lakkaz Geni ve pET22b Vektörünün Restriksiyon Enzimleriyle Kesilmesi**

Restriksiyon enzimleri olarak NcoI ve Hind III kullanılmıştır. Saflaştırılan lakkaz geni ve pET22b vektörü son hacim 50 µL olacak şekilde NcoI ve Hind III enzimleri ile ayrı ayrı kesilmiştir (Tablo 3.3).

Tablo 3.3 Lakkaz geni ve pET22b vektörünün restriksiyon enzimleri ile kesim şartları

Lakkaz geni ve pET22b vektörü	10 µg
10X tamponu	5 µL
NcoI ve Hind III enzimleri (10 U/µL)	2 µL
Su	Final hacim 50 µL

Reaksiyon karışımı 37 °C’de 6 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra kesim enzimlerin deaktivasyonu için 65 °C’de 20 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda kesilen lakkaz geni ve pET22b vektörü %2’lik agaroz gelde yürütülmüş ve jelden saflaştırılmıştır.

### **3.2.11 Lakkaz Geni ve pET22b Vektörünün Ligasyonu**

Restriksiyon enzimleriyle kesilen lakkaz geninin ve pET22b vektörünün, T4 DNA Ligaz enzimi ile ligasyonu sağlanmıştır. Reaksiyon, Tablo 3.4’de verilen koşullarda hazırlanmış ve 10°C’de 12 saat inkübasyona bırakılarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.4 Lakkaz geninin ve pET22b vektörünün T4 DNA ligaz enzimiyle ligasyonu

Lakkaz geni	3 µL
pET22b	1 µL
10X T4 DNA ligaz tampon	1 µL
T4 DNA Ligaz (5 U/µL)	3 µL
Su	2 µL

### 3.2.12 Kompetent Hücrelerin Hazırlanması

Kompetent hücreler (*E. coli* BL21 (DE3) plysS) Kalsiyum Klorür ( $\text{CaCl}_2$ ) yöntemiyle hazırlanmıştır (Sambrook,2001). Bunun için 10 mL LB'ye *E. coli* BL21 (DE3) plysS bakteri ekimi yapılmış ve çalkalayıcı inkübatörde 37 °C'de 12 saat inkübasyona bırakılmıştır. Aktif bakteri kültüründen 500 µL alınarak 50 mL taze hazırlanmış LB besiyerine inoküle edilmiştir. Kültürün 600 nm'deki optik yoğunluğu 0,4-0,6 arasında bir değer olana dek inkübatörde 37 °C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra kültür 50 mL'lık steril falkonlara aktarılmış ve 4 °C'de 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek bakteri hücreleri çöktürülmüştür. Süpernatant atılarak pelet üzerine 10 mL 0,1 molar  $\text{CaCl}_2$  eklenmiş ve 30 dakika buz üstünde bekletilmiştir. Süre sonunda örnekler 4 °C'de 5000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenmiş ve üst faz atılmıştır. Tüplere 2 mL 0,1 molar  $\text{CaCl}_2$  eklenerek hazırlanan kompetent hücreler transformasyon için kullanılmak üzere -80 °C'de stoklanmıştır.

### 3.2.13 Rekombinant Vektörün *E. coli* BL21 (DE3) Plyss Bakterisine Transformasyonu

200 µL olacak şekilde -80 °C'de stoklanmış kompetent hücreler, 10 µL rekombinant vektör (pET22b+Lakkaz) ile muamele edildikten sonra 15 dakika buz üstünde bekletilmiştir. Vektörün hücre içine geçebilmesi için hücreler iki dakika 42 °C'de su banyosunda bekletilmiştir. Tüpler beş dakika boyunca buzda bekletildikten sonra hücrelerin tamamı 1500 µL LB kültürüne ilave edilmiştir. 37 °C'de 2 saat inkübe edilen hücrelerden 200 µL alınmış ve 25 µg/mL ampisilin içeren LB agar besiyerine

ekilmiştir. Ekimleri yapılan petri kapları 24 saat 37 °C’de inkübe edilmiştir (Puyet ve diğ.1987).

#### **3.2.14 Koloni-PCR ile Transformasyonun Doğrulanması**

Transformasyonun gerçekleştiğini onaylamak amacıyla katı besiyerinde gelişen koloniler steril şartlarda özeye alınmış ve 50 µL su ile karıştırılarak 90 °C’de 5 dakika ısıtılmıştır. Daha sonra 6000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz rekombinant DNA kaynağı olarak PCR için kullanılmıştır. PCR için, daha önce bahsedilen PCR koşulları ve lakkaz genine ait primerler kullanılmıştır.

#### **3.2.15 Katı Besiyerinde Lakkaz Aktivitesinin Belirlenmesi**

Koloni-PCR ile belirlenen pozitif bakteriler 0,1mM IPTG, ampisilin (25 µg/mL), katekol (2mM) ve CuSO<sub>4</sub> (0,036mM) içeren LB-Agar besiyerine ekilmiş ve petripler 48 saat 37°C koşullarında inkübe edilmiştir. Gelişen kolonilerin etrafında oluşan kahverengi zon Lakkaz enzim varlığını gösterdiğinden bu koloniler lakkaz pozitif bakteriler olarak kabul edilmiştir.

#### **3.2.16 Rekombinant Lakkaz Enziminin His-Select Nickel Affinity Gel ile Saflaştırılması**

Kahverengi kolonilerden rastgele bazıları seçilerek 25 µg/mL konsantrasyonunda hazırlanan ampisilinli LB sıvı besiyerine ekilmiş ve 37°C’de inkübe edilmiştir. Lakkaz pozitif bakteri kültürüne ait OD<sub>600nm</sub> yaklaşık 0,8 olduğunda son konsantrasyonu 0,1 mM olacak şekilde IPTG ilave edilmiştir. Kültür 120 rpm’de önce 30 °C ve sonra da 25°C’de 4’er saat inkübe edilmiştir. Ardından 25 °C’de 16 saat sabit şekilde inkübasyona bırakılan kültür 5 dakika 5000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra üst sıvı uzaklaştırılmış ve bakteriler 30 saniye 1000 g’de iki kez sonikatör vasıtasıyla patlatılmıştır. Bakterilerin patlamasıyla hücre dışına çıkan enzim Sigma firmasına ait His-Select Nickel Affinity Gel kullanılarak üretici firmanın talimatına göre saflaştırılmıştır.



1-Mikrosantrifuj tüpüne 500  L affinite jel eklenmiş ve jelden alkol  uzaklaŐtırmak için 1000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilerek üst faz atılmıştır.

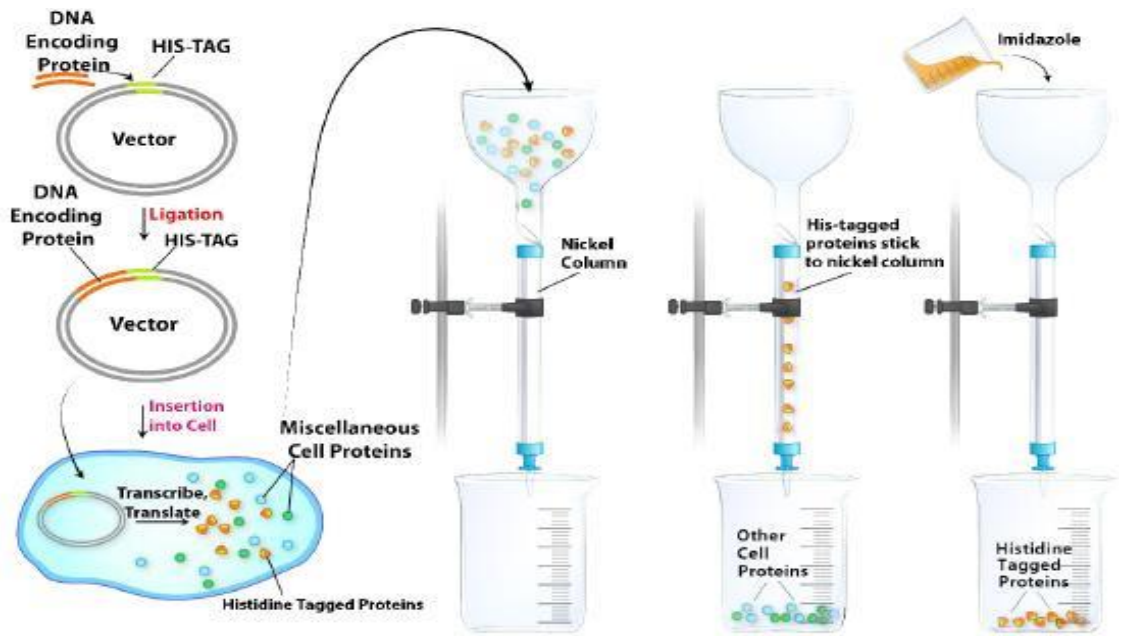
2- Daha sonra jelin üzerine 500  l equilibration tamponu eklenmiştir.

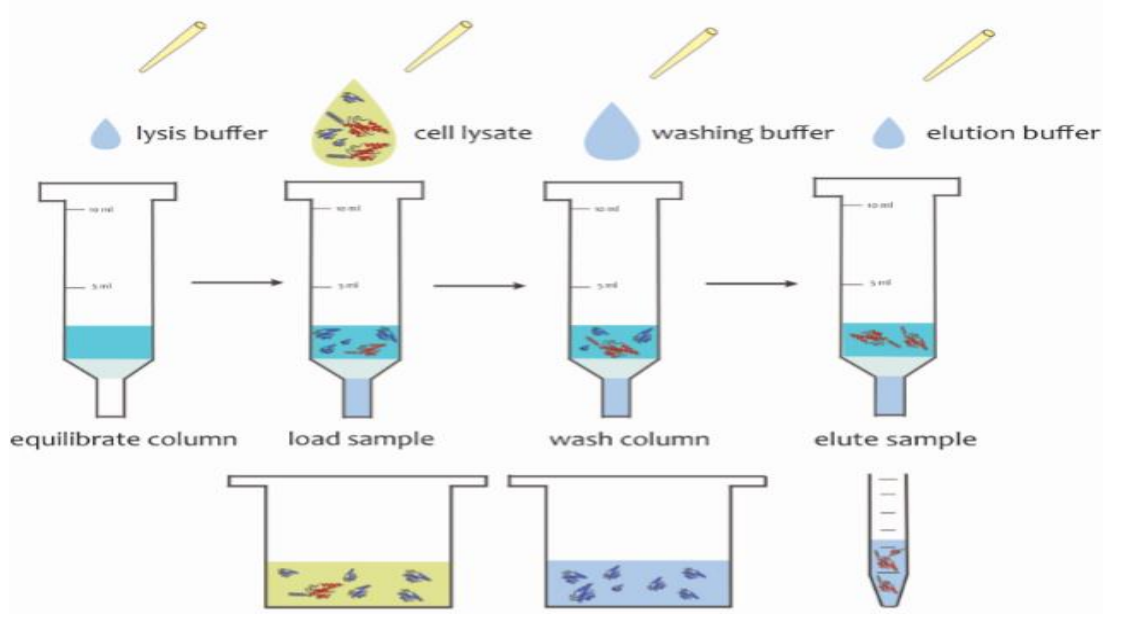
3- Sonikat rle lize edilen bakteri (500  L) jel üzerine ilave edilmiş ve 4000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildikten sonra süpernatant atılmıştır.

4- Peletin  zerine 500  L yıkama tamponu ilave edilmiş ve 4000 rpm'de 30 saniye santrifüj santrifüj edildikten sonra süpernatant atılmıştır.

5- Daha sonra üzerine 500  L imidazol içeren elution tamponu eklenmiş ve 4000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra supernatant enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

Lakkaz enziminin saflaŐtırması ile ilgili aŐamalar aŐađdaki Şekilde gösterilmiştir.





**Şekil 3.2** His-Select Nickel Affinite Gel ile rekombinant lakkaz enziminin saflaştırılması (<https://www.pinterest.com>).

### 3.2.17 Klonlanan Lakkaz Enzimin SDS-PAGE Yöntem ile Moleküler Ağırlığının Saptanması

Lakkaz enzimine ait moleküler ağırlığı saptamak amacıyla %10'luk SDS-PAGE kullanılmıştır (Bollag ve diğ. 1996). Elektroforez işlemi 40 mA' da 80 dakikada uygulanmıştır. Elektroforezden sonra jel 2 saat commassi mavisi ile hazırlanan boya içinde bekletilmiştir. Ardından jel asetik asit ve metanol ile hazırlanan çözelti içinde 10 saat bekletilerek boyanın fazlalığı jelden uzaklaştırılmıştır.

Tablo 3.5 SDS-PAGE Elektroforezi için Kullanılan Çözeltiler

Jel içeriği	Ayrıştırma jeli	Yükleme Jeli
Solüsyon A (mL)	8	1,5
Solüsyon B (mL)	5	0
Solüsyon C (mL)	0	2,25
Distile su (mL)	7	5,25
APS ( $\mu$ L)	100	30
TEMED ( $\mu$ L)	10	7,5

### **3.2.18 Ayrıştırma Jelinin Hazırlanması**

Ayrırma jelini hazırlamak için A çözeltisinden 8 mL, B çözeltisinden 5 mL, 7 mL distile su, 100 µL APS (%10) ve 10 µL TEMED kullanılmıştır ve jel cam plakalara doldurulmuştur. Jelin polimerizasyonunun gerçekleşmesi için oda sıcaklığında 50 dakika bekletilmiştir.

### **3.2.19 Yükleme Jelinin Hazırlanması (%5'lik)**

Yükleme Jeli hazırlamak için A çözeltisinden 1,5 mL, C çözeltisinden 2,25 mL 5,25 mL distile su, 30 µL Amonyum persülfat ve 10 µL TEMED karıştırılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözelti ayırma jelinin üzerine ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 20 dakika polimerizasyon gerçekleşene kadar bekletilmiştir (Bollag ve diğ. 1996).

### **3.2.20 Örneğin ve Standartın Hazırlanması**

30 µL enzim kaynağı ve 20 µL örnek yükleme tamponu tüp içinde karıştırılmıştır ve tüpler 5 dakika 100°C'de inkübe edilmiştir.

### **3.2.21 Enzim Örneklerinin SDS-PAGE Jeline Yüklenmesi ve Yürütülmesi**

Protein marker ve örnekler jele yüklenmiş ve ayrışma jeline kadar 10 mA'de, daha sonra da asıl ayrışma için 15 mA'de elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.22 SDS-PAGE Jelinin Boyanması ve Görüntülenmesi**

Elektroforez tamamlandıktan sonra, jel bloğu standtan çıkarılarak oda sıcaklığında 2 saat süreyle %1 Coomassie pirlanta mavisi R-250, %45 metanol ve %10 asetik asit içeren boya çözeltisiyle inkübe edilmiştir. Daha sonra jel, bağlanmayan

çözünmüş boyanın geri alınması için %10 asetik asit içeren %10 metanol çözeltisi ile yıkanarak saklanmıştır. Jelin şeffaflaştırılması için %10 gliserol içeren gliserollü su (10 mL gliserol ve 90 mL su) içinde 3 saat bekletilmiştir ve sonra fotoğraf makinası ile jel görüntülenmiştir.

### 3.2.23 Klonlanan Lakkaz Enzimine Ait Zimogram Analizi

Zimogram analizinde PAGE yöntemi kullanılmış ve çözeltilere SDS ve 2-merkaptotanol ilave edilmemiştir. Elektroforez işleminden sonra jel, %2'lik Guaiacol ve 2 mM konsantrasyon içeren bakır sülfat çözeltisinde 6 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminden sonra kahverengi bant oluşup oluşmadığı kontrol edilmiştir. Oluşan kahverengi bantlar lakkaz enzim varlığını göstermiştir.

### 3.2.24 Klonlanan Lakkaz Enziminin Kinetik Karakterizasyonu

Enzimin maksimum hızı (substratı ürüne dönüştürme hızı) olan  $V_{max}$  ve Michaelis-Menten sabiti olan  $K_m$  değerlerinin belirlenmesi için substrat olarak 10 ile 1000 mikromolar yoğunluğunda Guaiacol kullanılmıştır. Spektrofotometrik ölçümler, Guaiacol'ün ( $\epsilon = 21,600 / M / cm$ ) maksimum absorbans verdiği 465 nm'de yapılmıştır. Hazırlanan her bir konsantrasyon için lakkazın ilk hızı ilk 10 dakika süresince izlenmiştir. Absorbans-zaman eğrisinin eğiminden ilk hızları ( $\Delta OD/dakika$ ) olarak belirlenmiştir. İlk hız değeri Lineweaver-Burk grafiğinde ( $1/V$ 'ye karşı  $1/[S]$ ) uygulanarak  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerleri belirlenmiştir (Lineweaver ve Burk 1934).

$$IU/mL \sim \mu mol / min / mL)$$

$$= \frac{\text{absorption} / \text{min} \cdot \text{assay volume (mL)} \cdot \text{dilution factor} \cdot 1000}{\epsilon_{nm} (l \cdot \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}) \cdot 1 \text{ cm} \cdot \text{enzyme volume (mL)}}$$

### 3.2.25 Klonlanan Lakkaz Enzimin Optimum pH Değerinin Belirlenmesi

Klonlanan lakkaz enziminin optimum pH'sını belirlemek amacıyla içerisinde 2 mM Guaiacol ile 0,5 mM  $\text{CuSO}_4$  olan farklı pH'larda (pH 3,4-10,7) substrat

hazırlanmıştır. Enzim aktivitesi relatif aktivite olarak araştırılmıştır. 10µL Enzim ve 190µLsubstrat karışımı 2 saat 37 °C’de inkübe edilmiş ve enzim aktivitesi 465 nm’de spektrofotometrede ölçülmüştür.

### **3.2.26 Klonlanan Lakkaz Enzimine Ait Optimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi**

Klonlanan lakkaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100°C’lik sıcaklıklar kullanılmıştır. Bunun için enzim, substrat (2 mM’da optimum aktivitenin gerçekleştiği pH değerinde) ve CuSO<sub>4</sub> karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım 2 saat farklı sıcaklıklarda inkübe edildikten sonra enzim aktivitesi 465 nm’de ölçülmüştür.

### **3.2.27 Klonlanan Lakkaz Enzimin Termal Stabilitesinin Belirlenmesi**

Klonlanan lakkaz enzimine ait termal stabilitenin belirlenmesi için enzim 4-100°C aralığındaki sıcaklıklarda bir saat ön inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra enzim, substrat (2 mM’da optimum aktivitenin gerçekleştiği pH değerinde) ve CuSO<sub>4</sub> vortekslenmiş ve optimum aktivitenin görüldüğü sıcaklıkta (50 °C) iki saat inkübe edilmiştir. Enzim aktivitesi 465 nm’de ölçülmüştür.

### **3.2.28 Klonlanan Lakkaz Enziminin pH Stabilitesinin Belirlenmesi**

Klonlanan lakkaz enziminin pH stabilitesinin belirlenmesi için rekombinant enzim farklı pH değerindeki (3,0; 3,4; 3,8; 4,2; 4,6; 5; 5,4; 5,8; 6,2; 7,0; 7,6; 8,0; 9,0; 9,6 10,0; 10,4; 10,7) çözeltiler ile resüspanse edilmiştir. Oda sıcaklığında 1 saat ön inkübasyon işleminden sonra enzim etanol presipitasyon tekniği kullanılarak çöktürülmüştür. Enzim, optimum aktivite gösterdiği pH değerindeki çözelti (substrat çözeltisi+ CuSO<sub>4</sub>) ile muamele edildikten sonra karışım 2 saat 50°C’de inkübe edilmiş ve enzim aktivitesi 465nm’de ölçülmüştür (Fu ve diğ. 2008).

### **3.2.29 Klonlanan Lakkaz Enzim Aktivitesine Deterjan, Enzim İnhibitörü ve Metal İyonların Etkisi**

İnhibitör, deterjan ve metal iyonların lakkaz üzerine etkisini incelemek için enzim inhibitörü olarak EDTA, metal iyonları olarak MgCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>2</sub> ve ZnCl<sub>2</sub> deterjan olarak da Triton X-100, SDS, Tween 20, Tween 80, β-mercaptoethanol ve Üre kullanılmıştır. İki farklı konsantrasyonlarda (1 ve 5 mM) hazırlanana çözelti enzimle muamele edilmiş ve 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır (Quan ve diğ. 2002, De Angelis ve diğ. 2003). Ön inkübasyondan sonra enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değerindeki substrat çözeltisi ile muamele edilmiş ve karışım 50 °C'de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Enzim aktivitesi 465 nm'de ölçülmüştür.

### **3.2.30 Klonlanan Lakkaz Enzimin Dekolorizasyon Etkisinin Belirlenmesi**

Enzimin dekolozasyon etkisinin belirlenmesi için Kongo red (561nm), Bromo crosele purple (590 nm), Methylene blue (665 nm), Phenol red (560 nm), Crystal violet (570 nm), Methyl red (437 nm), Bromo phenol blue (590 nm) ve ayrıca endüstride kullanılan bazı boyalar Reactive Red 123, Remazol brilliant blue R, Remazol violet 5R, Remazol brilliant orange 3R, *Turquoise* blue Hf6 (613 nm), Remazol black RB (595 nm), Remazol brilliant Red BB (590 nm), Coomassie brilliant blue (595 nm), Crystal violet (570 nm) gibi boyalar kullanılmıştır. Bunun için 0,1 M sitrat fosfat buffer (pH 6,0), boya (25 ppm) ve CuSO<sub>4</sub> (0,1 mM) saf lakkaz (100 U) ile muamele edilmiştir. Reaksiyonun gerçekleşmesi için karışım 40 rpm'de 50°C'de 6 saat inkübe edilmiştir. Lakkaz enzimi içermeyen karışım kontrol olarak kullanılmıştır.

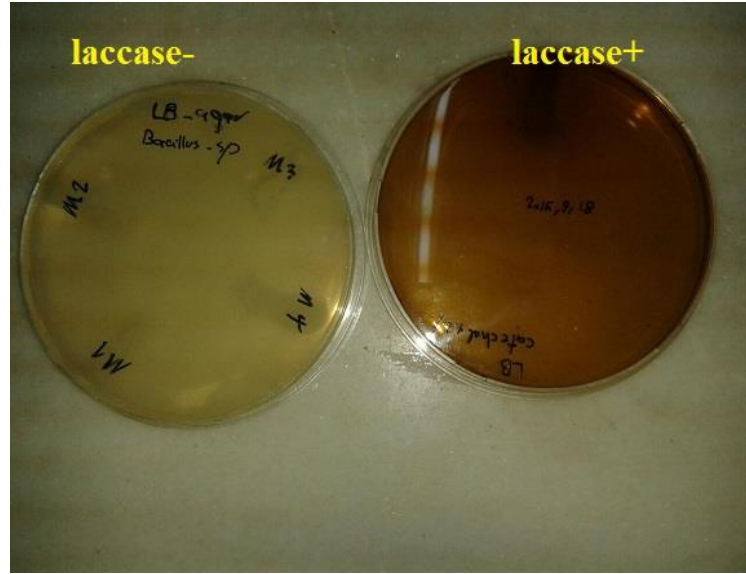
### **3.2.31 Klonlanan Lakkazın Biyoinformatik Analizi**

NCBI ve Expasy programları kullanarak lakkaz genine ait amino asit dizisi, protein ağırlığı, sinyal peptid dizisi incelenmiş ve lakkaz genine ait filogenetik ağaç çizilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1 Lakkaz Geni İçeren Bakteri İzolasyonu ve Tanımlanması

İstanbul ve Adana'nın farklı bölgelerinden alınan toprak örneklerinden 5 g tartılarak 100 mL distile su içeresinde homojen bir şekilde dağıtılmış ve 80°C'de 10 dakika ısıtılmıştır. Isı şokuna maruz bırakılan toprak örneklerinden 500 µL alınıp LB sıvı besiyerine eklenmiş ve 37°C'de 200 rpm'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra gecelik taze kültürlerden syringaldazin veya catechol içeren katı besiyerine ekimler yapılmıştır (şekil 4.1-4.3). 37°C'de 24 saat inkübasyondan sonra catechol içeren besiyerinde etrafında siyah veya siyah-kahverengi ya da syringaldazin içeren besiyerinde pembe rengi oluşan koloniler lakkaz pozitif olarak seçilerek stoklanmıştır. Lakkaz pozitif bakterinin 16S rDNA dizi analizi yapılmış ve sekans NCBI sitesinde BLAST analizi sonunda *Bacillus subtilis strain OH 67* olarak tanımlanmıştır. Ayrıca *Bacillus subtilis* bakterisinin 16S rDNA sekansı NCBI'da MK659939 kod numarasıyla kaydedilmiştir (şekil 4.1-4.6).



şekil 4.1. Catechol içeren LB-agar besiyerinde üreyen lakkaz pozitif bakteri suşu



**Şekil 4.2.** Catechol içeren LB sıvı besiyerinde üreyen lakkaz pozitif bakteri suşu



**Şekil 4.3.** Lakkaz enzimi içeren bakteri izolatu Syringaldazin bulunan ortamda aktivite göstererek pembe rengi oluşturmuştur (Pembe rengin varlığı lakkaz enzimini doğrulamaktadır).



NCBI Resources How To

Nucleotide Nucleotide

Advanced

FASTA

## Bacillus subtilis strain OH67 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MK659939.1

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

```
>MK659939.1 Bacillus subtilis strain OH67 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
AAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAAC
CTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATGCTTTGTAACCGCATGGTT
CAAATATAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTACAGATGGACCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTA
ACGGCTCACAAAGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCG
CGTGAGTGATGAAGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCAATAGGG
CGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG
TGGCAAGCGTTGTCGGAAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGC
CCCCGGCTCAACCGGGGAGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAAGAGGAGAGTGAATTCGA
CGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAC
GACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACCGCGTAAACGATG
AGTGCTAAGTGTAGGGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAG
TACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAAT
TCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGCTTGACATCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTT
CGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGCTGCTAGCTGCTGCTGAGATGTGGGTTAAGTCCCAC
AACGAGGCCAACCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTACAGTTGGGCACTTAAGTGACTGCCGGTGACAAA
CCGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATG
GACAGAAACAAAGGGCAGCGAAACCGCCAGGTTAAGCAATCCACAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCA
GTCTGCAACCCGACTCCGTGAGCTGGAACCTATGAATCACGGAACAGCTTCCCCCGTGAAACGTTCC
CCGGGCTTG
```

Şekil 4.4. Lakkaz pozitif suşun 16S rDNA sekansı (GenBank: MK659939.1).

NCBI Blast:Nucleotide Sequence

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

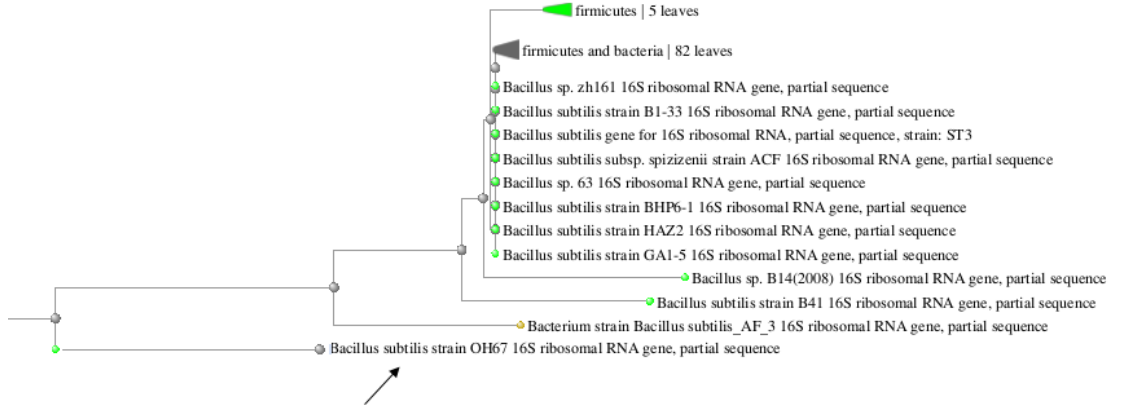
Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<a href="#">Bacillus subtilis strain LZ013-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2394	2394	100%	0.0	98.88%	<a href="#">MK368723.1</a>
<a href="#">Bacterium strain Bacillus subtilis AF_3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2394	2394	100%	0.0	98.88%	<a href="#">MH027600.1</a>
<a href="#">Bacillus subtilis subsp. subtilis partial 16S rRNA gene isolate 713</a>	2394	2394	100%	0.0	98.88%	<a href="#">HG796191.1</a>
<a href="#">Bacillus subtilis strain DP8R2A110 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2392	2392	100%	0.0	98.88%	<a href="#">MH972180.1</a>
<a href="#">Bacillus subtilis strain HAL016 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2392	2392	100%	0.0	98.88%	<a href="#">MK779051.1</a>
<a href="#">Bacillus subtilis strain a22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2392	2392	100%	0.0	98.88%	<a href="#">MK726116.1</a>
<a href="#">Bacterium strain Y7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2392	2392	100%	0.0	98.88%	<a href="#">MK722406.1</a>
<a href="#">Bacillus subtilis strain 810SS1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2392	2392	100%	0.0	98.88%	<a href="#">MK713698.1</a>
<a href="#">Bacillus subtilis strain c04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2392	2392	100%	0.0	98.88%	<a href="#">MK256680.1</a>
<a href="#">Bacillus sp. (in: Bacteria) strain LCB14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2392	2392	100%	0.0	98.88%	<a href="#">MK038941.1</a>
<a href="#">Bacillus subtilis strain C9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2392	2392	100%	0.0	98.88%	<a href="#">MK156772.1</a>
<a href="#">Bacillus subtilis strain NMK17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2392	2392	100%	0.0	98.88%	<a href="#">MG793200.1</a>
<a href="#">Bacillus sp. TE3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2392	2392	100%	0.0	98.88%	<a href="#">MK462260.1</a>
<a href="#">Bacillus subtilis strain HR02 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2392	2392	100%	0.0	98.88%	<a href="#">MK283755.1</a>
<a href="#">Bacillus sp. (in: Bacteria) strain Firmi-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2392	2392	100%	0.0	98.88%	<a href="#">MH683101.1</a>
<a href="#">Bacillus sp. (in: Bacteria) strain Firmi-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2392	2392	100%	0.0	98.88%	<a href="#">MH683092.1</a>

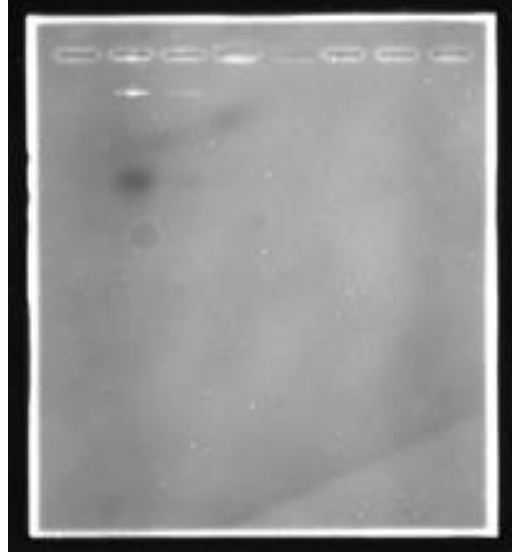
Şekil 4.5. 16S rDNA sekansının NCBI sitesinde BLAST analizi.



Şekil 4.6. Lakkaz pozitif suşun filogenetik analizi

## 4.2 *Bacillus subtilis*'ten Kromozomal DNA İzolasyonu

Bakterinin kromozomal DNA'sının izolasyonu üretici firmanın talimatına göre gerçekleştirilmiştir. İzole edilen DNA 3 µL kuyulara yüklenmiş ve agaroz jelde yürütülmüştür. Etidyum bromür ile boyanan jelde DNA bandının varlığı gözlenmiştir (Şekil 4.7).

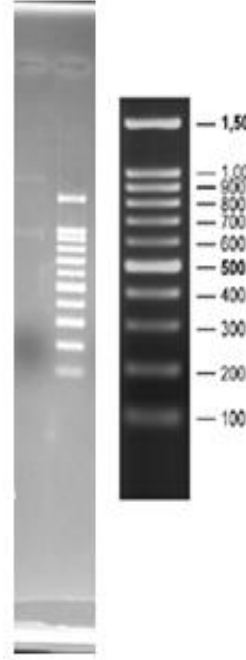


Şekil 4.7. *Bacillus subtilis* 'den izole edilen DNA'nın agaroz jel elektroforez görünümü.

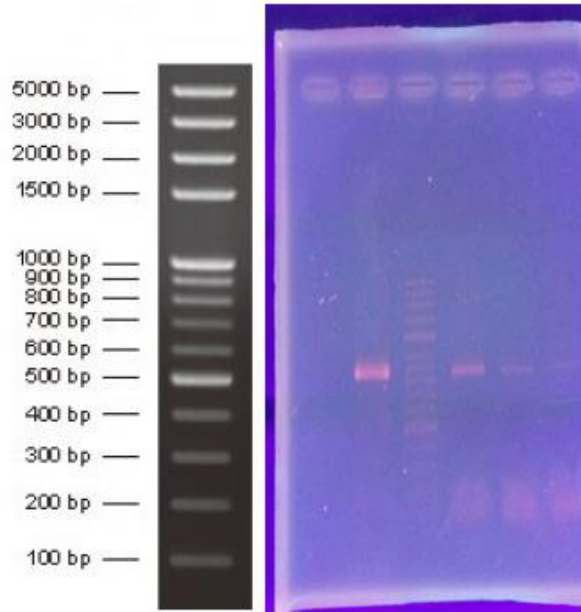
## 4.3 Lakkaz Geninin PCR ile Çoğaltılması

*Bacillus subtilis*'ten elde edilen kromozomal DNA, PCR ile çoğaltılmış ve %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Çalışmamızda PCR şartları optimize edilmiş ve ilgili sonuçlar Şekil 4.8-4.11'de verilmiştir. Yapılan çalışma sonunda lakkaz geni

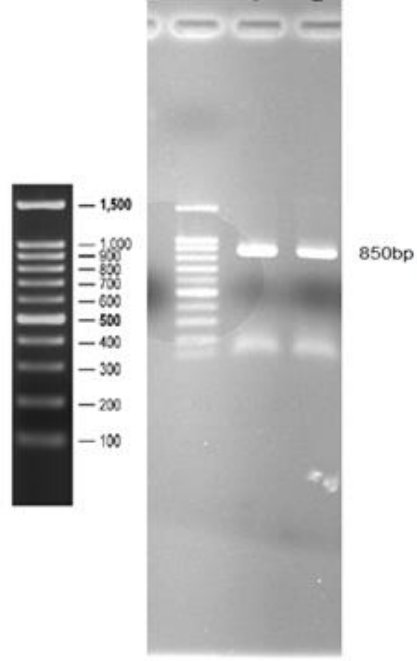
içeren 850 çift baz uzunluğundaki DNA fragmanı görüntülenmiş ve PCR ürünü doğrulanmıştır (Şekil 4.10 ve 4.11).



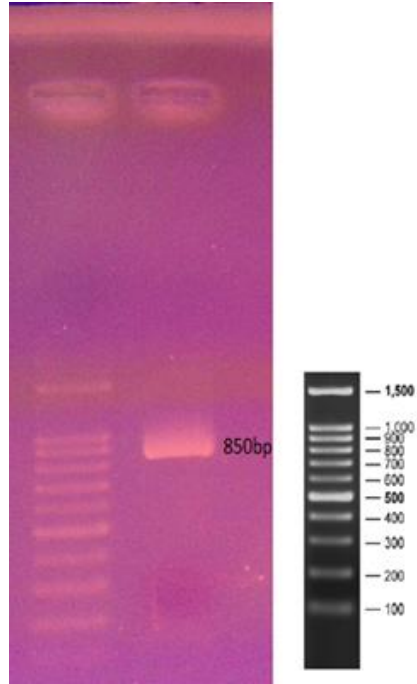
**Şekil 4.8.** Lakkaz genine ait PCR ürünü (PCR optimum sıcaklık 58°C ve primer yapışma sıcaklığı 48°C).



**Şekil 4.9.** Lakkaz genine ait PCR ürünü (Primer yapışma sıcaklığı 54°C olup Vitascientific marka DNA marker kullanılmıştır.)



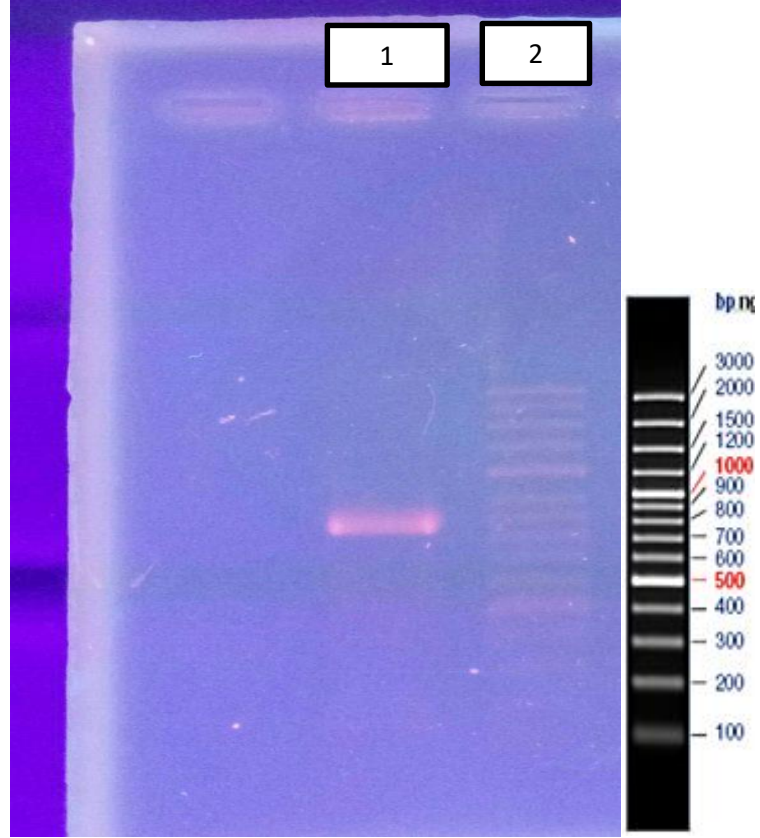
**Şekil 4.10.** Lakkaz genine ait PCR ürünü (Primer yapışma sıcaklığı 58°C'dir, Cleaver scientific marka DNA marker kullanılmıştır.)



**Şekil 4.11.** Lakkaz genine ait optimize edilmiş PCR ürünü (Primer yapışma sıcaklığı 58°C, Cleaver scientific marka DNA marker kullanılmıştır.)

#### 4.4 PCR Ürünün Saflaştırılması

Elde edilen PCR ürünü, DNA saflaştırma kiti ile saflaştırılmış ve saf DNA %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Elektroforez sonunda PCR ürününün saf lakkaz geni olduğu doğrulanmıştır (Şekil 4.12).



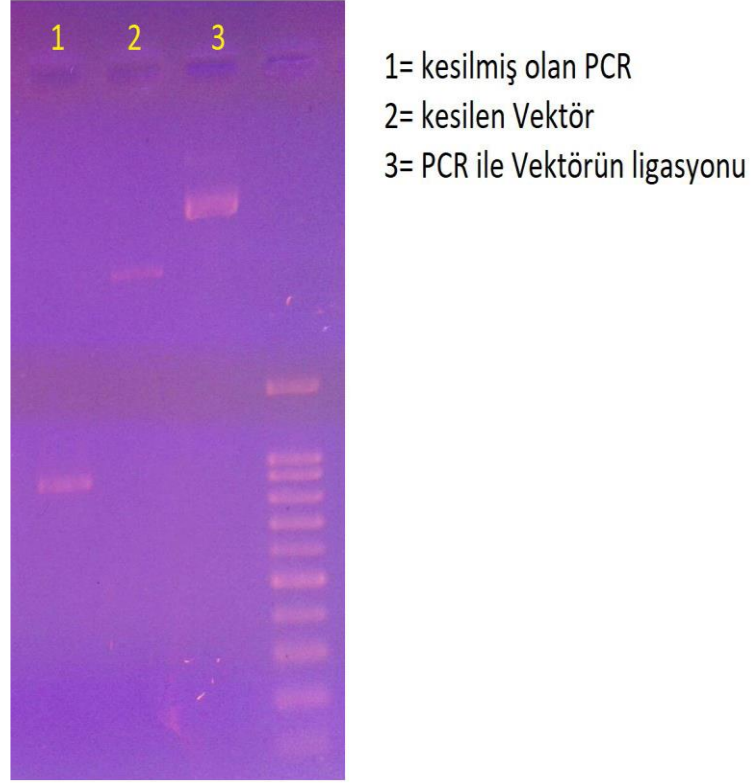
**Şekil 4.12.** Saflaştırma sonunda elde edilen DNA görüntüsü (1: Lakkaz geni, 2: DNA Marker, Vitascientific)

#### 4.5 Lakkaz Geni ve pET22b Vektörün Kesimi

Çalışmamızda lakkaz genin klonlanması için ekspresyon vektörü olarak pET22b vektörü kullanılmıştır. pET22b vektöründe ribozom bağlanma bölgesinden (rbs) sonra 6 tane histidin kodlayan kodon bulunur. PCR ile çoğaltılan lakkaz geni ve pET22b vektörü 5'-ucundan Hind III ve 3'-ucundan ise NcoI ile kesilmiştir. Kesim işleminin gerçekleşip gerçekleşmediği elektroforez ile kontrol edilerek doğrulanmıştır (Şekil 4.13).

#### 4.6 PCR Ürünü ve pET22b Vektörünün Ligasyonu

NcoI ve Hind III ile kesilen PCR ürünü ve pET22b vektöründen elde edilen DNA'ların T4 DNA Ligaz enzimi ile ligasyonu yapılmıştır. Ligasyon sonunda elde edilen rekombinant vektörün agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.13'te verilmiştir.

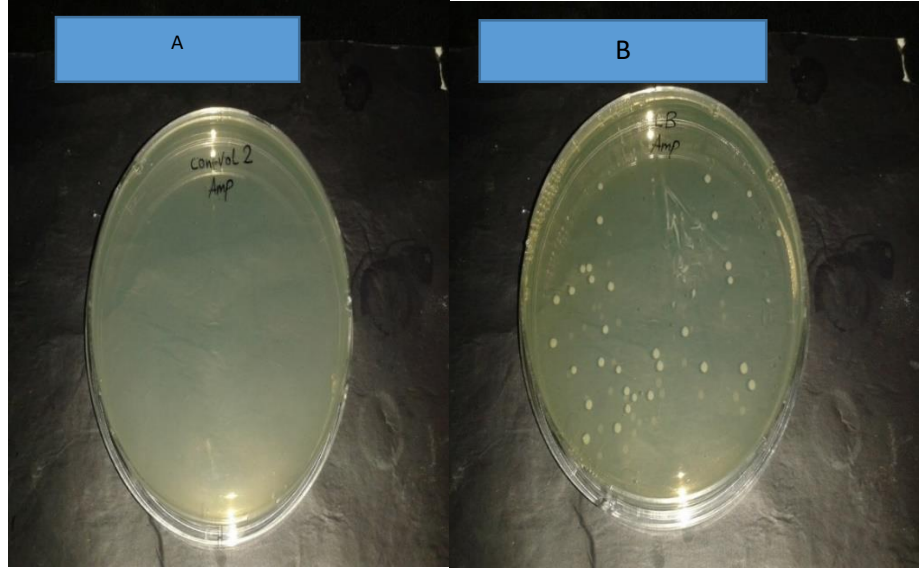


**Şekil 4.13.** Hind III ve NcoI ile kesim sonrasında yapılan jel elektroforez görüntüsü (1: Kesilen Lakkaz geni, 2: Kesilen pET22b vektörü, 3: Ligasyonu yapılan pET22b vektörü)

#### 4.7 Rekombinant Vektörün (pET22b+Lakkaz) *E. coli* BL21(DE3)'e Transformasyonu

Bu çalışmada konakçı hücre olarak *E. coli* BL21(DE3) bakterisi kullanılmıştır. Çalışmanın ilk aşamasında bakteri hücresi CaCl<sub>2</sub> ile kompeten hale getirilmiştir. Rekombinant vektörün bakteri hücrelerine transformasyonu için Isı şoku metodu kullanılmıştır. Transformasyon işleminden sonra hücre kültürünün ampisilin içeren besiyerine ekimi yapılmıştır. Rekombinant vektör (pET22b+lakkaz geni) taşıyan *E. coli* hücrelerinin antibiyotik içeren katı besiyerinde geliştikleri gözlenmiştir (Şekil 4.14).

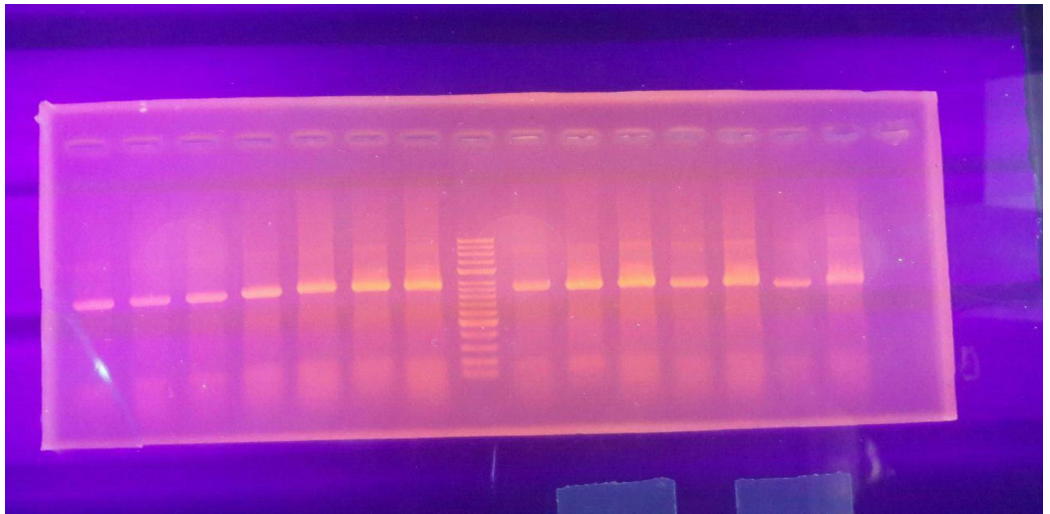




**Şekil 4.14.** A) pET22b+lakkaz içeren *E. coli* BL21(DE3) kolonileri. B) kontrol (pET22b vektörü içermeyen *E. coli* BL21(DE3)).

#### 4.8 *E. coli* BL21(DE3)'den pET22b Vektörünün İzolasyonu ve PCR Analizi

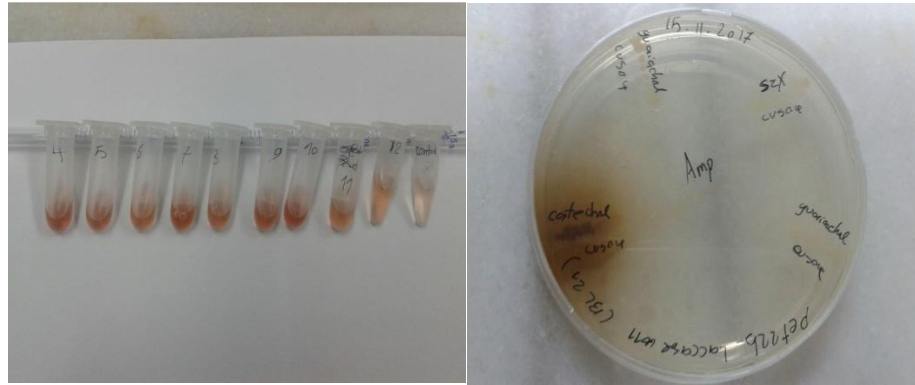
Ampicillin içeren LB agar besiyerinde üremiş olan bakteri kolonilerinden izole edilen pET22b Lakkaz genine ait iki primer (forward ve reverse) kullanılarak optimum koşullarda PCR uygulanmıştır. PCR işleminden sonra elde edilen DNA'lar %1'lik jel elektroforezinde yürütülerek UV altında görüntülenmiştir. Şekil 4.15'te verilen jelde gözlenen 850 bp'lik bandın varlığı, transformasyonun gerçekleştiğini ve *E. coli* hücrelerinin Lakkaz geni içerdiklerini doğrulamıştır.



**Şekil 4.15.** Transformasyon sonrası PCR analiz sonucu (Lakkaz geni 850 bp).

#### 4.9 Rekombinant Lakkaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Lakkaz geni içerdği doğrulanan bakterilerden bazıları seçilmiş ve ampisilinli sıvı besiyerisine ekilmiştir. 150 rpm’de 37 °C’de inkübe edilen bir gecelik kültürün 1mL alınarak taze besiyerine ekilmiş ve 150 rpm’de 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. Kültürün OD<sub>600nm</sub>:0,5-0,6 aralığına ulaştığında, kültür ortamına 0,1 mM IPTG ilave edilerek bakterilerin lakkaz üretimi tetiklenmiştir. IPTG ilavesinden sonra 100 rpm’de 30°C’de 6 saat ve oda sıcaklığında ise 4 saat sabit olacak şekilde inkübasyona devam edilmiştir. Yüksek sıcaklık ve rpm’de bakterilerin lakkaz enzim üretimi fazla olduğu için ortamda inklüzyon cisimcikleri oluştuğundan enzim aktivitesi gözlenmemiştir. Bu nedenle bakteri kültür ortamı düşük sıcaklık ve rpm’de inkübe edilmiştir. Bakterilerin hücre duvarları sonikasyonla patlatılmış ve elde edilen sıvı 2 mM guaicol ile muamele edilmiştir. Ortam renginin kahverengiye dönmesi Lakkaz enzim aktivitesinin varlığını göstermiştir. Diğer taraftan seçilen bakteriler 2 mM guaicol ve ampisilin içeren katı besiyerine de ekilmiş ve agarlı yüzeyde gelişen kolonilerin üzerine IPTG ilave edilmiştir. Yaklaşık 4 saatlik inkübasyon bırakılan kolonilerin etrafındaki kahverengi zon oluşumu ortamda aktif lakkazın varlığını doğrulamıştır (Şekil 4.16).



A

B

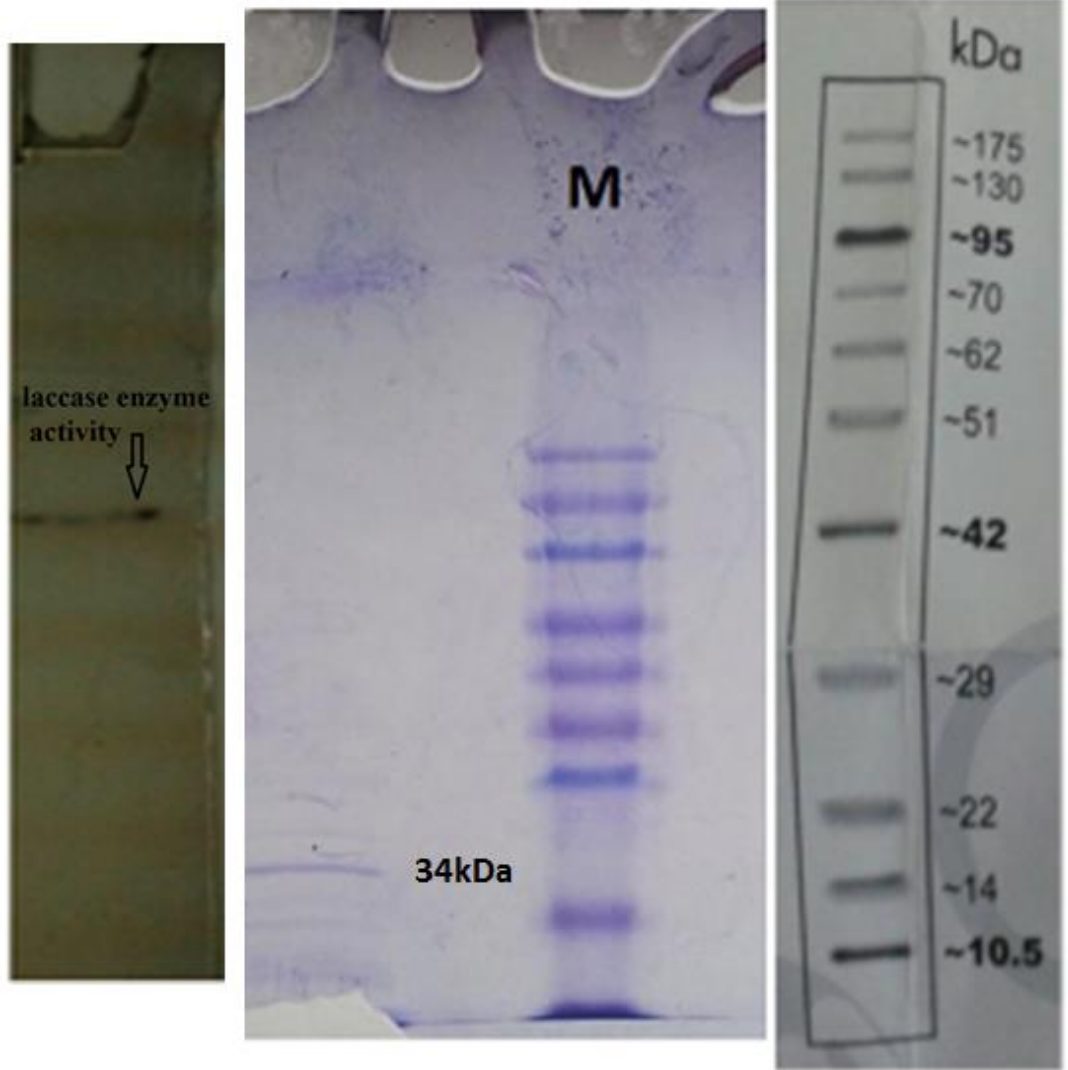
**Şekil 4.16.** Rekombinant lakkaz enzim aktivitesinin belirlenmesi A: Sıvı B: Katı besiyerinde oluşan kahverenginin oluşumu

#### 4.10 Rekombinant Lakkazın SDS-PAGE ve zimogram analizi

Lakkaz enziminin moleküler ağırlığının saptanması amacıyla HIS-Select® Nickel Affinite Gel ile lakkaz enzimi saflaştırılmış ve saf enzimin SDS-PAGE (%10) ve zimogram analizi yapılmıştır. Jelde gözlenen protein bandının moleküler ağırlığının



34 kDa olduğu görülmüştür. Çalışmamızda ayrıca jelde gözlenen protein bandının lakkaz enzim bandı olup olmadığını anlamak için zimogram analizi yapılmıştır. Bunun için jel guaicol ile muamele edilmiş ve oluşan kahverengi bantlar ilgili protein bandının lakkaz enzim aktivitesine sahip olduğunu doğrulamıştır. Saflaştırılan lakkaz enzimin SDS-PAGE ve Zimogram analizi Şekil 4.17’de verilmiştir.



**Şekil 4.17.** Rekombinant Lakkazın SDS-PAGE ve Zimogram analiz sonucu

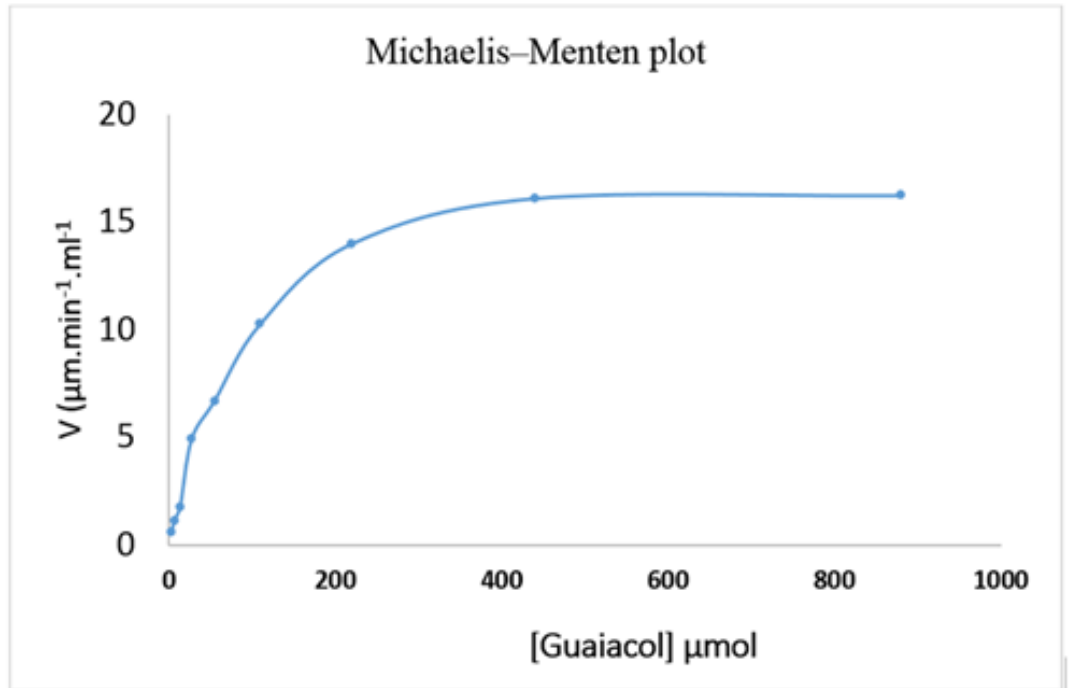
#### **4.11 Rekombinant Lakkaz Enzim Karakterizasyonu**

Enzim aktivitesi, Guaiacol’n ( $\epsilon = 21,600 / M / \text{cm}$ ) maksimum absorbans verdiği 465 nm’de spektrofotometrede llerek belirlenmiştir.

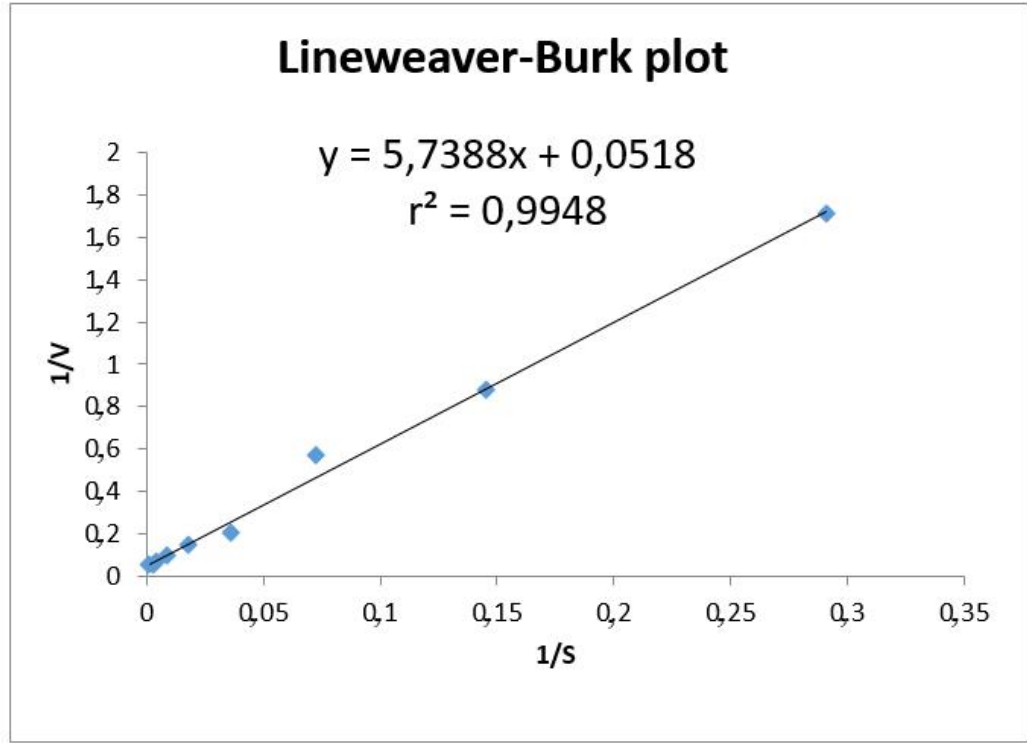
#### 4.12 Rekombinant Lakkaz Enziminin Kinetik Değerinin Saptanması

Enzim kinetiği farklı enzimlerin kataliz ettiği reaksiyon hızına da etki gösteren farklı etkenlerle ilgilidir. Enzim-substrat kompleksi oluştuğunda enzim substrata etki ederek ürünün ortaya çıkmasına sebep olur. Farklı enzim reaksiyonlarıyla ilgili olan ilk araştırmalar Michaelis-Menten tarafından gerçekleşmiştir. Bu alışmalar bugün kinetik çalışmaları olarak bilinmektedir. Michaelis-Menten tarafından belirlenen kinetiğe gore enzim miktarı sabit miktarda tutulur ve reaksiyon hızı substrat miktarına bağlı olarak tespit edilir.

Enzimlerin maksimum hızı ( $V_{max}$ ) ve Michaelis-Menten sabitinin ( $K_m$ ) belirlenmesi için yapılan kinetik çalışmada 3 unit saf lakkaz enzimi kullanılmıştır. Lakkaz protein konsantrasyonlarında aktivite değişimleri incelenerek  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri tespit edilmiştir. Buna gore  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla  $110,7721 \mu M$  ve  $19,30502 \mu mol/min/mg$  olarak belirlenmiştir (şekil 4.18 ve 4.19).



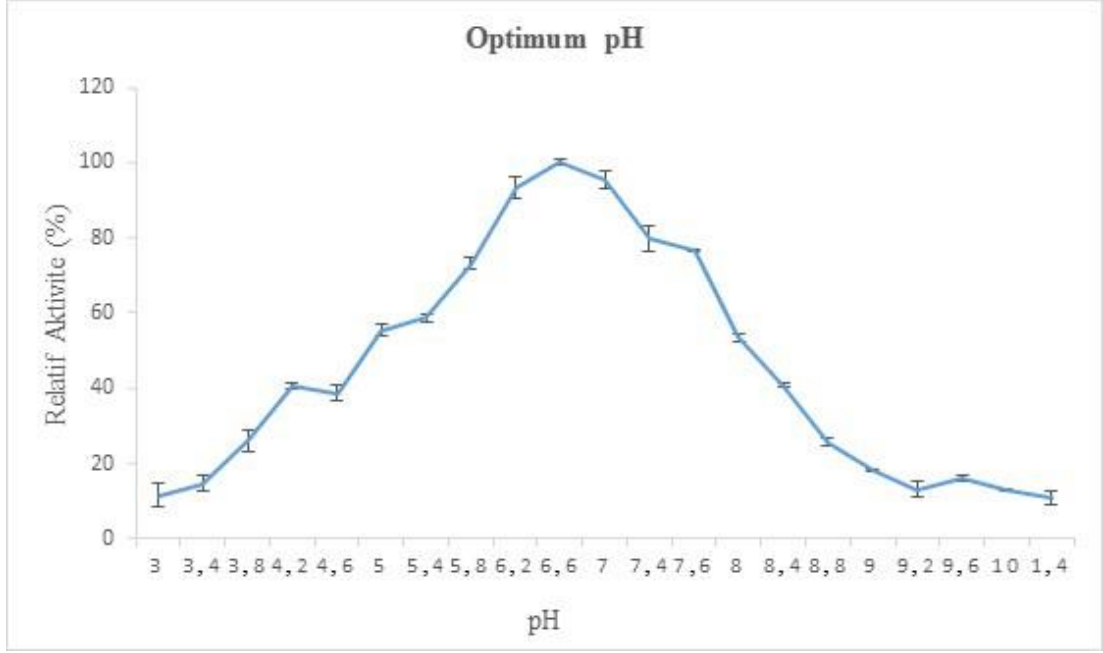
şekil 4.18. Lakkaz Enzimine ait Michaelis-Menten grafiği.



Şekil 4.19. Lakkaz enzimine ait Lineweaver-Burk eğrisi.

#### 4.13 Farklı pH'ların lakkaz enzimine etkisi ve optimum pH'nın belirlenmesi

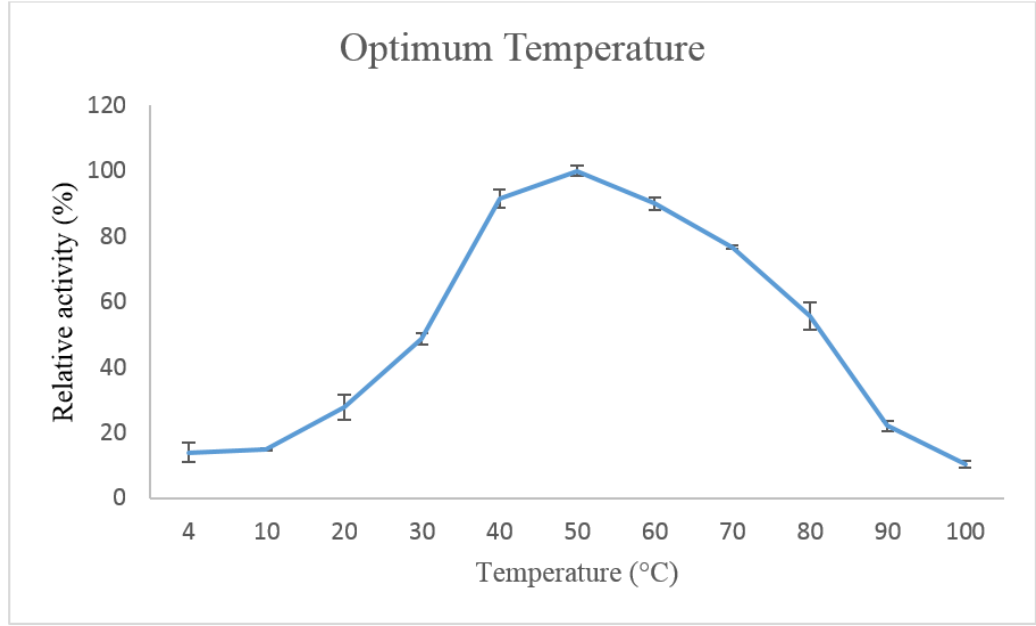
*E. coli* BL21 (DE3) bakterisine klonlanan lakkazın optimum aktivite gösterdiği pH değerinin belirlenmesi için 2 mM konsantrasyonunda hazırlanan substrat (Guaiacol); Sitrat (pH 3,0-5,8), Tris-Malat (pH 6,2-8,4) ve Karbonat-Bikarbonat (9,2-10,7) tamponları ile 37°C'de 2 saat inkübe edilmiş ve relatif aktivite değeri hesaplanmıştır. Şekil 4.20'de görüldüğü üzere, yüksek asidik ve alkali şartlarda enzim aktivitesi oldukça düşüktür. Lakkaz enzimi pH 3'te %11, pH 3,4'de %14, pH 3,8'de %26, pH 4,2 ve pH 4,6'da %38, pH 5'te %55, pH 5,4'de %58, pH 5,8'de %73, pH 6,2'de %93, pH 7'de %95, pH 7,4'de %79, pH 7,6'de %76, pH 8'de %53, pH 8,4'de %40, pH 8,8'de %25, pH 9'de %18, pH 9,2'de %13, pH 9,6'de %16, pH 10'de %13 ve pH 10,4'de %10'luk bir aktivite göstermiştir. Lakkaz enzimi en yüksek aktiviteyi pH 6,6'da göstermiş olup enzimin optimum pH değerinin 6,6 olduğu görülmüştür.



**Şekil 4.20.** Farklı pH’larda rekombinant lakkaz enzim aktivitesinin değişimi

#### 4.14 Rekombinant Lakkazın Optimum Sıcaklığının belirlenmesi

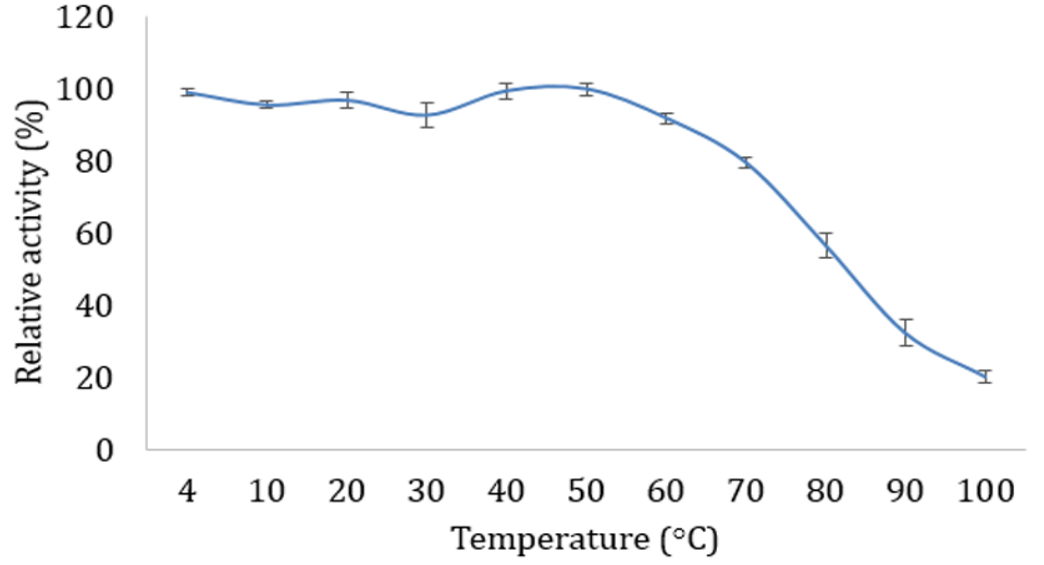
Enzim aktivitesi relatif aktivite olarak değerlendirilmiştir. Rekombinant lakkaz enzimin optimum sıcaklığını belirlemek için 4-100°C’deki sıcaklık aralığı kullanılmıştır. Saflaştırılan enzimden 10 µL alınıp üzerine 190 µL substrat (Guaiacol (2 mM) ile CuSO<sub>4</sub> (0,5mM)) ilave edilmiştir. Karışım enzimin optimum aktivite gösterdiği pH (6,6)’da hazırlanmış ve farklı sıcaklıklarda iki saat inkübe edilmiştir. Rekombinant lakkaz enziminin farklı sıcaklıklardaki aktivite değişim grafiği Şekil 4.21’de verilmiştir. Genel olarak yüksek sıcaklıklarda enzim aktivitesinin yüksek olduğu görülmüştür. Lakkaz enzimi 4°C’de % 13, 10°C’de % 14, 20°C’de % 27, 30°C’de % 48, 40°C’de % 91, 60°C’de % 90, 70°C’de % 76, 80°C’de % 55, 90°C’de % 22 ve 100°C’de % 10 oranında aktivite göstermiştir. Rekombinant lakkaz enzimi maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık 50°C’de (% 100) olmuştur.



**Şekil 4.21.** Rekombinant lakkaz enziminin farklı sıcaklıklarda aktivitesi

#### **4.15 Klonlanan Lakkazın Termal Stabilitesinin Belirlenmesi**

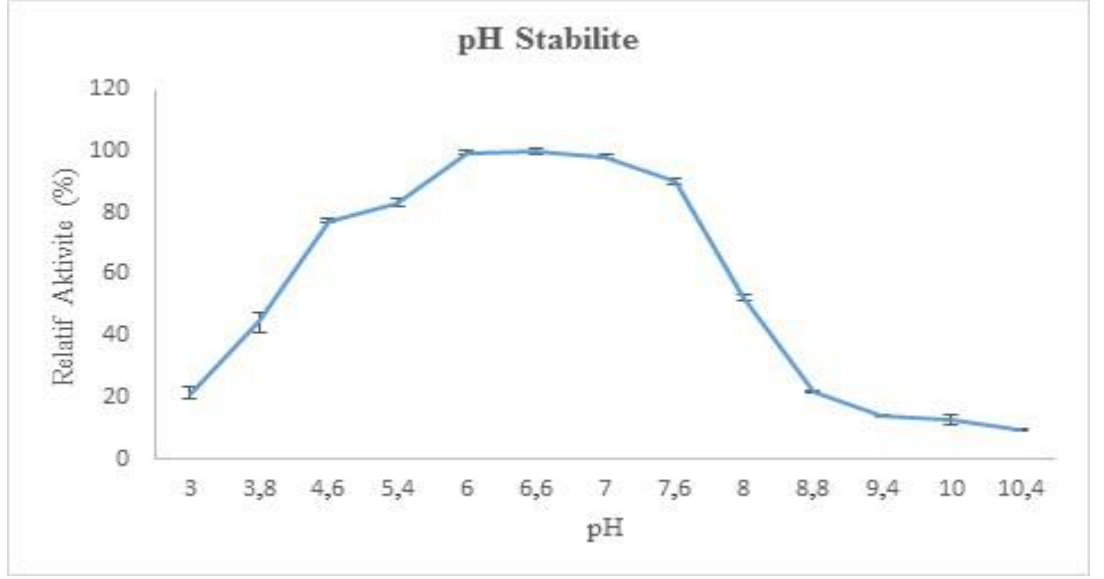
°CKlonlanan lakkazın sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi için rekombinant enzim 4-100°C aralığında bir saat ön inkübasyona konulmuştur ve optimum pH (pH 6,6) ve optimum aktiviteye sahip olduğu sıcaklık (50°C)'da analizler yapılmıştır. Enzim bir saat 40°C'de %100 (kontrol), 10°C'de %97, 20°C'de %98, 30°C'de %96, 40°C'de %100, 50°C'de %100, 60°C'de %91, 70°C'de %79, 80°C'de %56, 90°C'de %32 ve 100°C'de %20 aktivite göstermiştir. Rekombinant lakkaz enzimi 0-60°C aralığında hemen hemen aktivitenin tamamını korumuştur. 60°C'den sonra sıcaklık artışına bağlı olarak aktivite azalmıştır. 100°C sıcaklıkta dahi %20 oranında aktivite göstermesi, enzimin aşırı sıcaklıklarda da stabilitesini korumaya devam ettiğini ve enzim stabilitesinin yüksek olduğunu göstermiştir. Son olarak 80°C'de enzim aktivitesinin %56'sının korunması, rekombinant enzimin endüstride kullanım potansiyelinin olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. Rekombinant lakkaz enziminin termal stabilitesi

#### 4.16 Klonlanan Lakkazın pH Stabilitesi

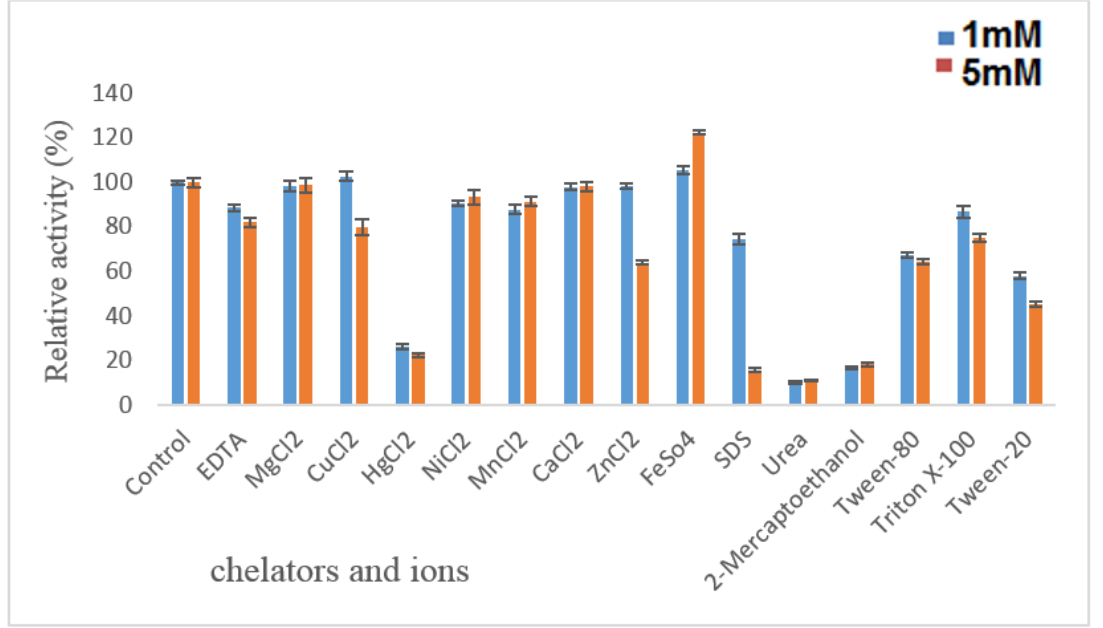
Klonlanan lakkazın pH stabilitesi belirlemek amacıyla rekombinant enzim çözeltisi oda sıcaklığında pH=3-10,4 aralığında bir saat inkübe edilmiştir. Substrat, optimum pH (6,6) ve sıcaklıkta (50°C) hazırlanmış ve analizler yapılmıştır. Şekil 4. 23'te görüldüğü gibi, enzim pH=3'te %21, pH=3,8'de %53, pH=4,6 %77, pH=5,4 %83, pH=6'de %99, pH= 6,6'da %100, pH=7'de %98, pH=7,6'da %90, pH=8'de %52, pH=8,8'de %21, pH=9,4'de %14, pH=10'da %12 ve pH=10,4'de ise %9 aktivite göstermiştir. Elde edilen sonuçlara göre, pH 6-7,6 aralığında enzim %99'luk bir aktivite göstermiştir. Enzim pH 8-10,4 aralığında ortalama %21 aktivite gösterirken pH 3-5,4 aralığında ortalama %58 aktivite göstermiştir. Buna göre, enzim bazik ortamlara nazaran asidik ortamlarda daha stabildir.



**Şekil 4.23.** Rekombinant lakkaz enziminin pH stabilitesi

#### 4.17 İnhibitör ve Divalent Katyonların Klonlanan Lakkaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Farklı inhibitör, deterjan ve metal iyonların lakkaz aktivitesi üzerine etkisinin araştırılmasında bir enzim inhibitörü olarak EDTA, metal iyonları olarak da  $MgCl_2$ ,  $CuCl_2$ ,  $CoCl_2$ ,  $HgCl_2$ ,  $NiCl_2$ ,  $MnCl_2$ ,  $FeCl_2$  ve  $ZnCl_2$ ,  $CaCl_2$ , deterjan olarak triton X-100, SDS, Tween 20, Tween 80 ve 2-Merkaptoetanol ile üre kullanılmıştır. İnhibitör, deterjan ve metal iyonları 1 ve 5 mM konsantrasyonlarda kullanılmıştır. Enzim aktivitesine inhibitor ve divalent katyonların etkisi Şekil 4.24'te verilmiştir. Enzim ve EDTA karışımının son yoğunluğu 1 mM olduğunda, enzim aktivitesi %88,7 iken konsantrasyon 5mM olduğunda aktivitede artış (%82,2) olmuştur. Farklı deterjanlar, kimyasallar ve iyon varlığında enzim aktivitesi sırasıyla;  $MgCl_2$ 'de %98,5 ve %98,8,  $CuCl_2$ 'de %102,6 ve %80,  $HgCl_2$ 'de %26,5 ve %22,5,  $NiCl_2$ 'de %90,5 ve %93,5,  $MnCl_2$ 'de %87,2 ve %91,5,  $FeSO_4$ 'de %105,6 ve %122,4,  $ZnCl_2$ 'de %1,24 ve %0,78,  $CaCl_2$ 'de %1,25 ve %1,26, SDS'de %74,5 ve %15,8, üre'de %10,3 ve %11,2, 2-Merkaptoetanol'de %16,9 ve %18,3, Tween-80'da %67,3 ve %64,5, TritonX100'de %87 ve %75, Tween20'de %58 ve %45'tir. Elde edilen sonuçlara göre; üre,  $HgCl_2$  ve 2-Merkaptoetanol enzim aktivitesine negatif etki gösterirken,  $FeSO_4$  ilavesi enzim aktivitesine pozitif yönde etkilemiştir.



**Şekil 4.24.** Rekombinant Lakkaz enziminin aktivitesine inhibitör ve divalent katyonların etkisi (ajanlar 1 mM (mavi) ve 5 mM (turuncu) konsantrasyonlarda kullanılmıştır).

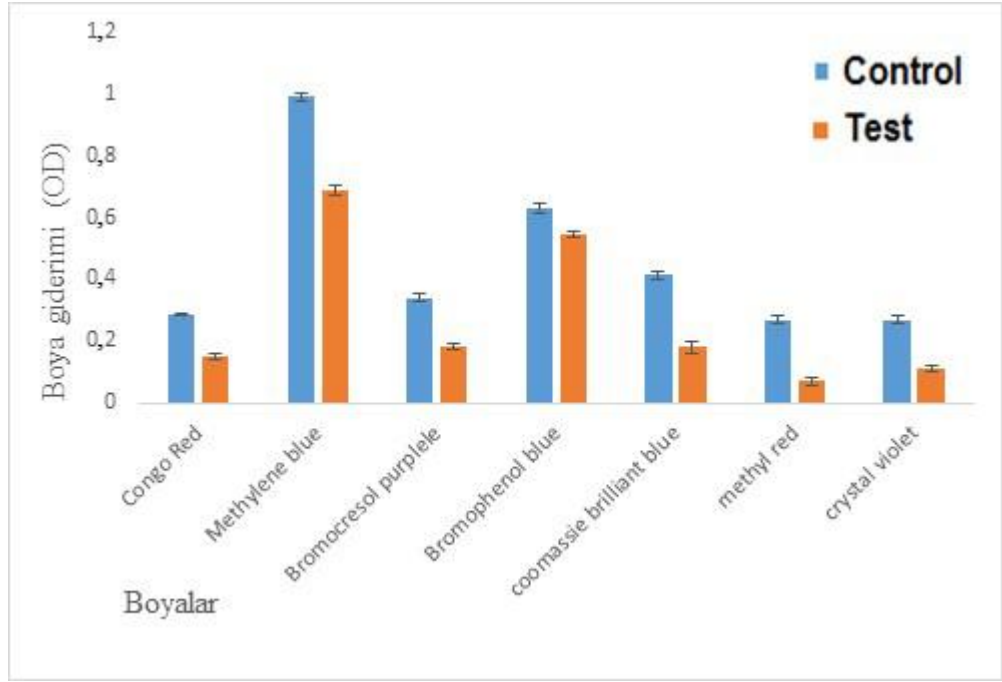
#### 4.18 Klonlanan Lakkazın Dekolorizasyon Etkisinin Belirlenmesi

Lakkaz enzimin dekolorezasyon etkisini belirlemek için çalışmamızda, endüstride renklendirici olarak kullanılan boyalar ve araştırma laboratuvarlarında kullanılan boyalar kullanılmıştır. 0,1 M sitrat fosfat tamponu (pH 6,6), boya (25 ppm), CuSO<sub>4</sub> (0,1mM) ve saf lakkaz enzimi (100 U) karışımı 50 °C’de 6 saat hafif çalkalama koşulları altında (40 rpm) inkübe edilmiştir. Lakkaz enzimi içermeyen karışım kontrol olarak kullanılmıştır. İnkübasyon sonrasında her boya kendi dalga boyunda spektrofotometrede okunmuştur.

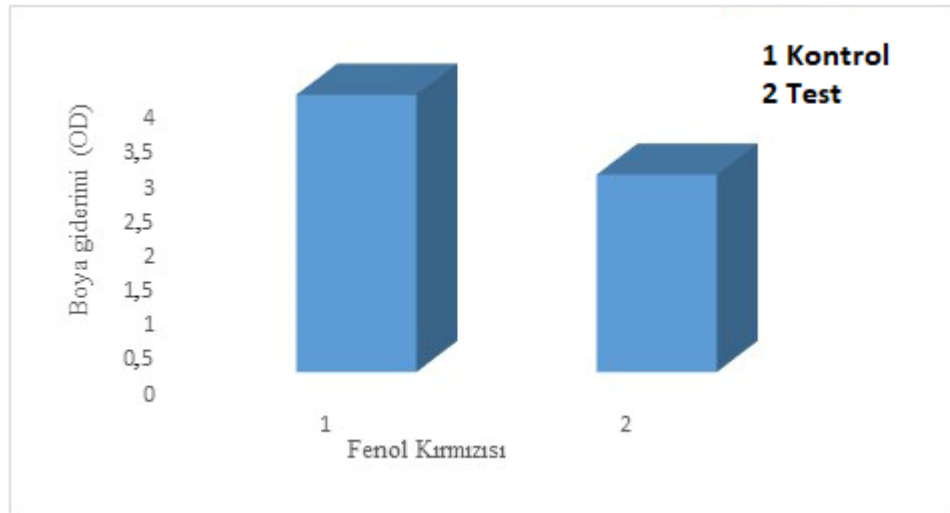
Her boya için sırayla kontrol ve test gruplarından elde edilen OD değerleri şu şekilde olmuştur: Kongo kırmızısı 0,285 ve 0,15, Metilen mavisi 0,989 ve 0,685, Brom krezol moru 0,341 ve 0,181, Bromfenol mavisi 0,629 ve 0,544, Metil kırmızısı 0,268 ve 0,07, Kristal viyole 0,269 ve 0,114, Fenol kırmızısı 3,993 ve 2,843, Turkuaz mavisi 0,905 ve 0,633, Remazol Kırmızısı 0,52 ve 0,28, Remazol brilliant turuncu 0,35 ve 0,185, Brilliant mavisi için 0,41 ve 0,185, Remazol viyole için 0,706 ve 0,42, Remazol brilliant mavisi-R için 1,105 ve 0,604 ve Reaktif kırmızısı için de 0,47 ve 0,28, Remazol siyah için 2,3 ve 1,2 ve Coomasi brilliant mavisi 0,413 ve 0,18 olarak



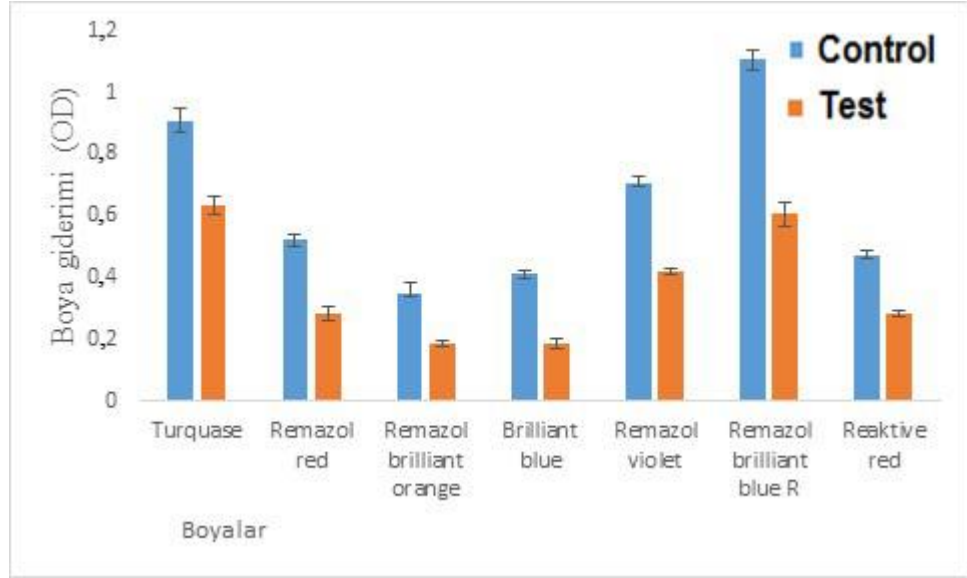
elde edilmiştir. Şekil 4.25-4.44'te verilen grafik ve resimlerden de anlaşılacağı üzere lakkaz enzimi tüm boyaların gidermesinde etkili olmuştur.



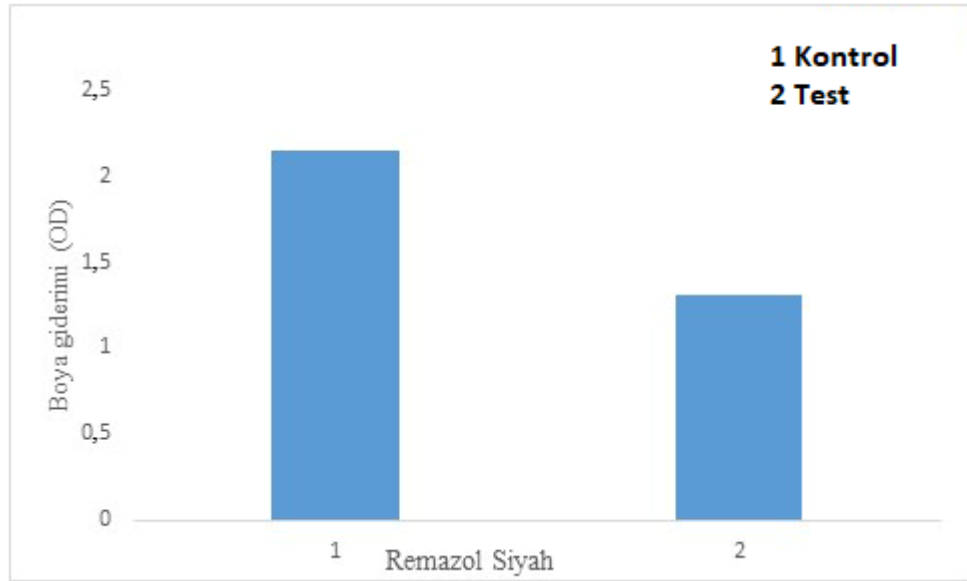
Şekil 4.25. Rekombinant lakkaz enzimin bazı boyalar üzerinde etkisi (kontrol grup mavi ile test grubu ise turuncu renk ile gösterilmiştir).



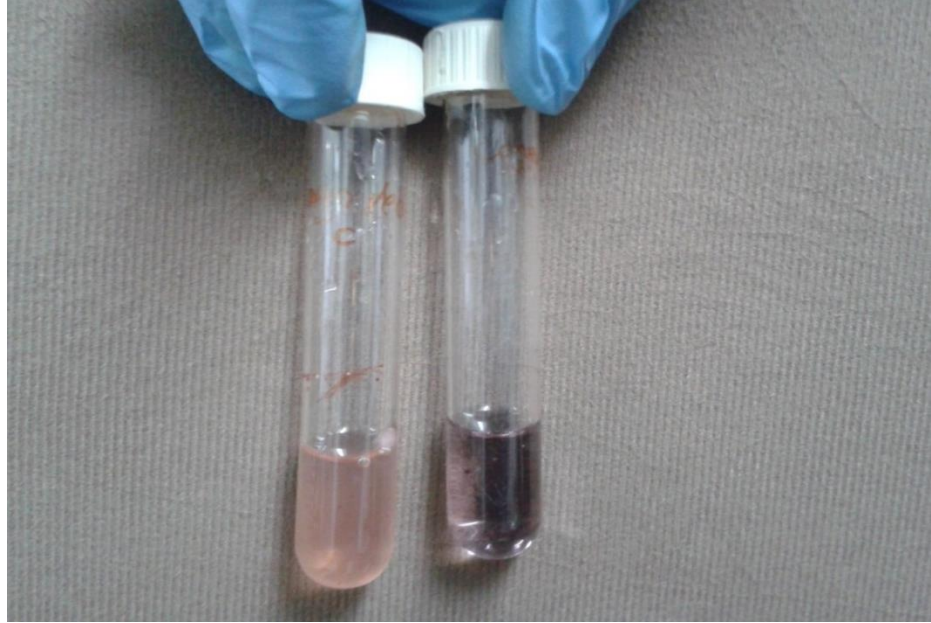
Şekil 4.26. Rekombinant lakkaz enziminin Fenol kırmızısı üzerine etkisi (1: kontrol, 2: test).



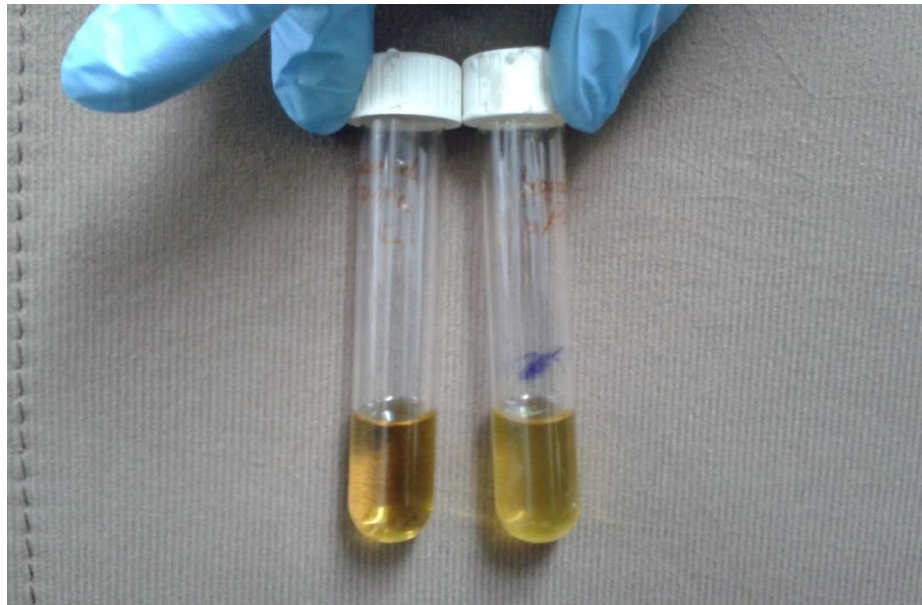
**Şekil 4.27.** Rekombinant lakkaz enziminin bazı endüstride kullanılan boyalar üzerinde etkisi (kontrol grup sarıyla test grubu ise yeşil renkle gösterilmiştir).



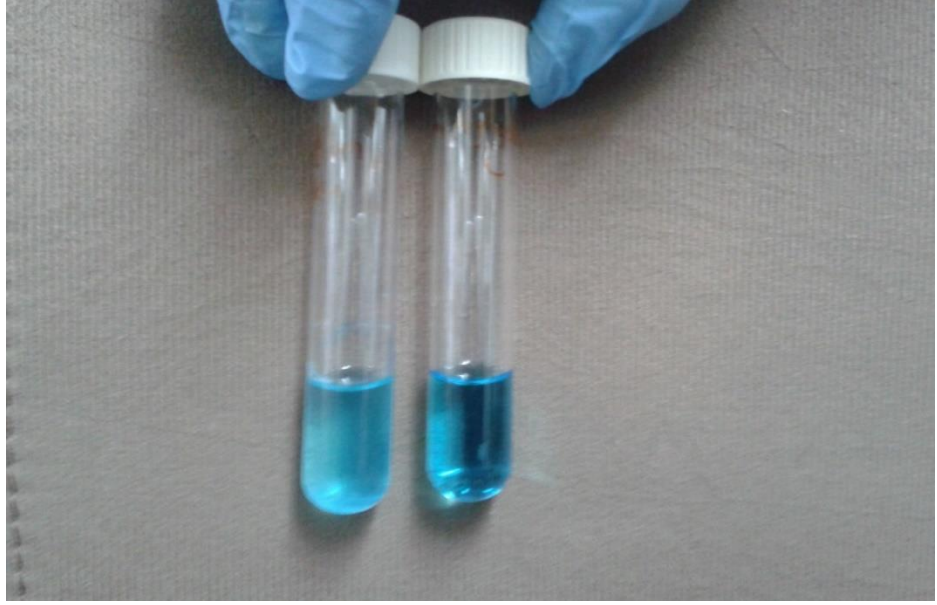
**Şekil 4.28.** Rekombinant lakkaz enziminin Remazol siyahı üzerine etkisi. (1=kontrol ve 2= test).



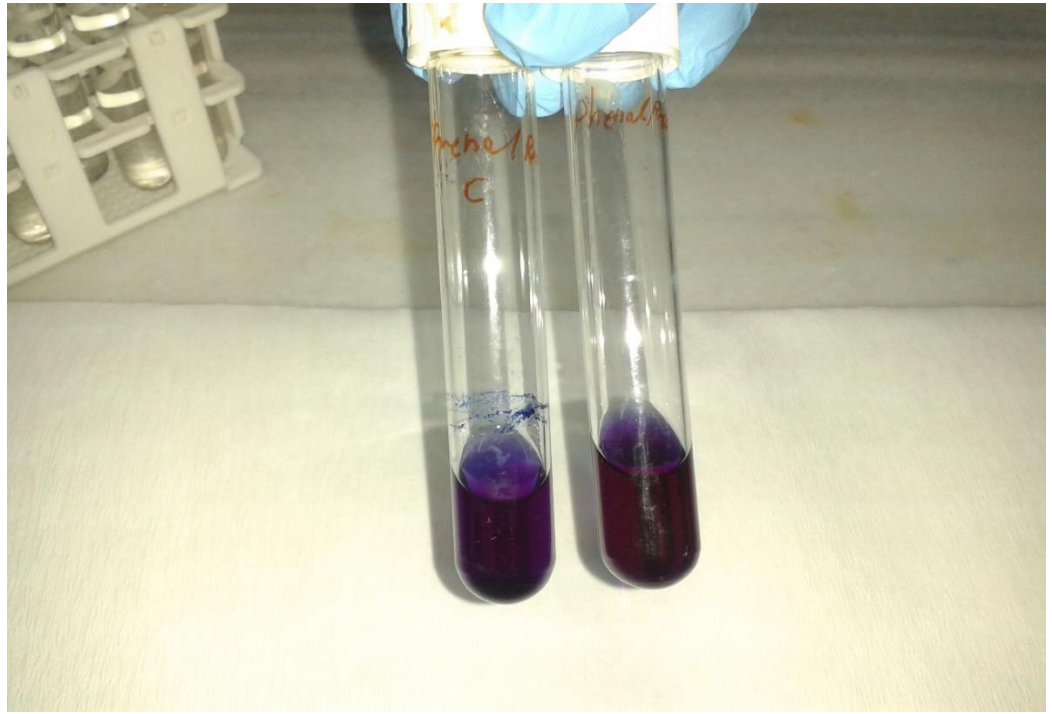
**Şekil 4.29.** Klonlanan lakkaz enzimin Kongo kırmızısı üzerine etkisi.



**Şekil 4.30.** Klonlanan lakkaz enzimin Bromkresol purple üzerine etkisi.



**Şekil 4.31.** Klonlanan lakkaz enzimin Metilen mavisi üzerine etkisi.



**Şekil 4.32.** Klonlanan lakkaz enzimin Fenol kırmızısı üzerine etkisi.



**Şekil 4.33.** Klonlanan lakkaz enzimin Kristal viyole üzerine etkisi.

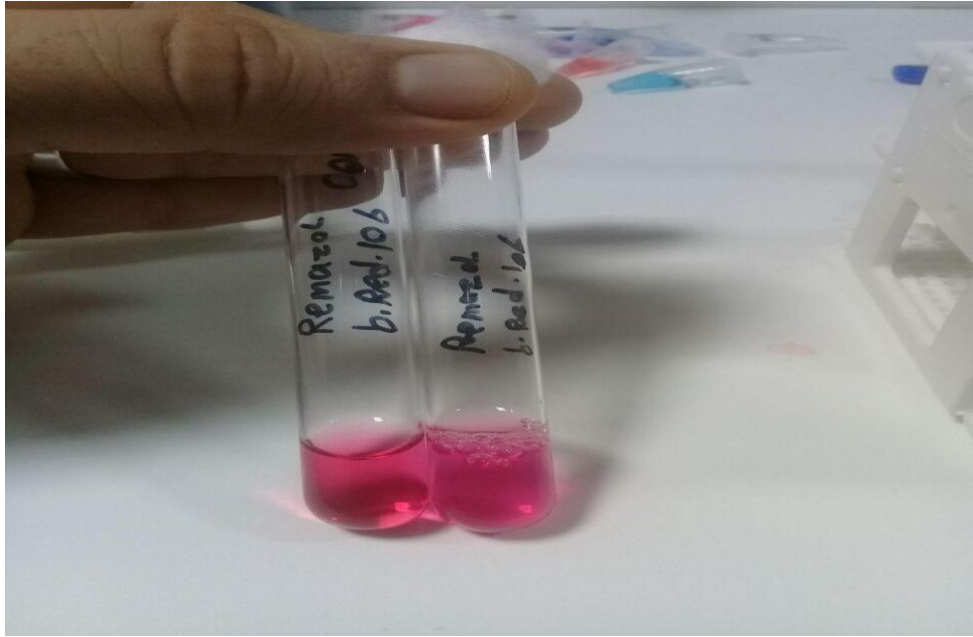


**Şekil 4.34.** Klonlanan lakkaz enzimin Metilen mavisi üzerine etkisi.





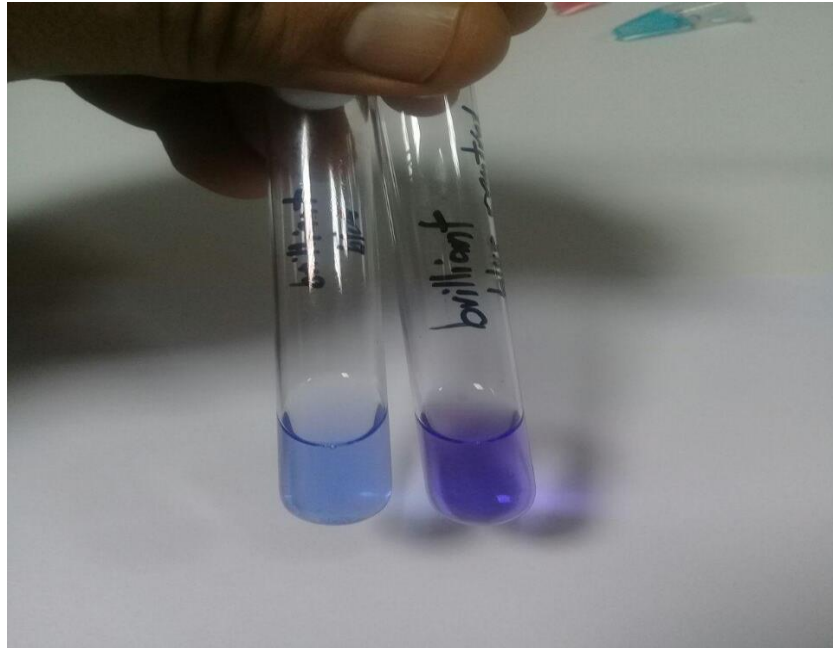
**Şekil 4.35.** Klonlanan lakkaz enzimin Brom fenol mavisi üzerine etkisi.



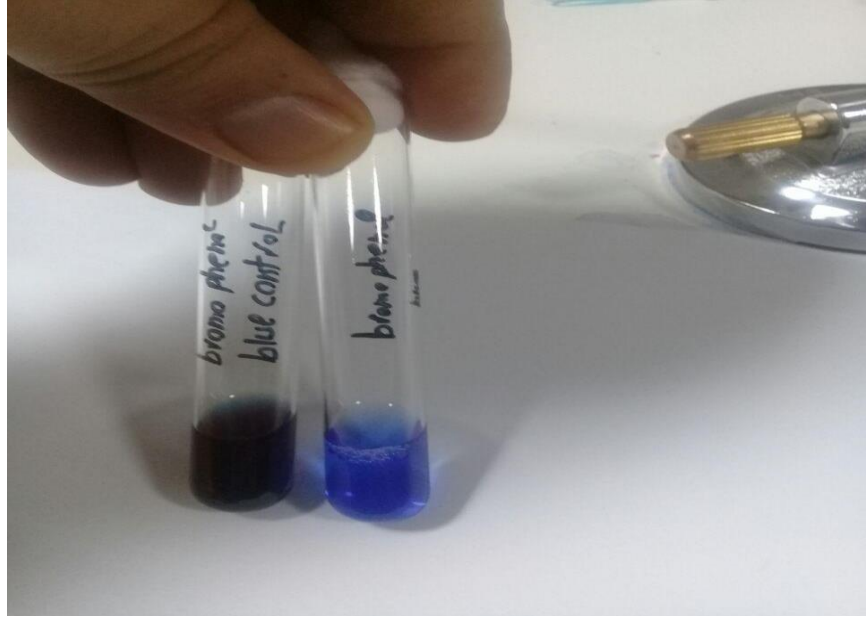
**Şekil 4.36.** Klonlanan lakkaz enzimin Remazol kırmızısı 106 üzerine etkisi.



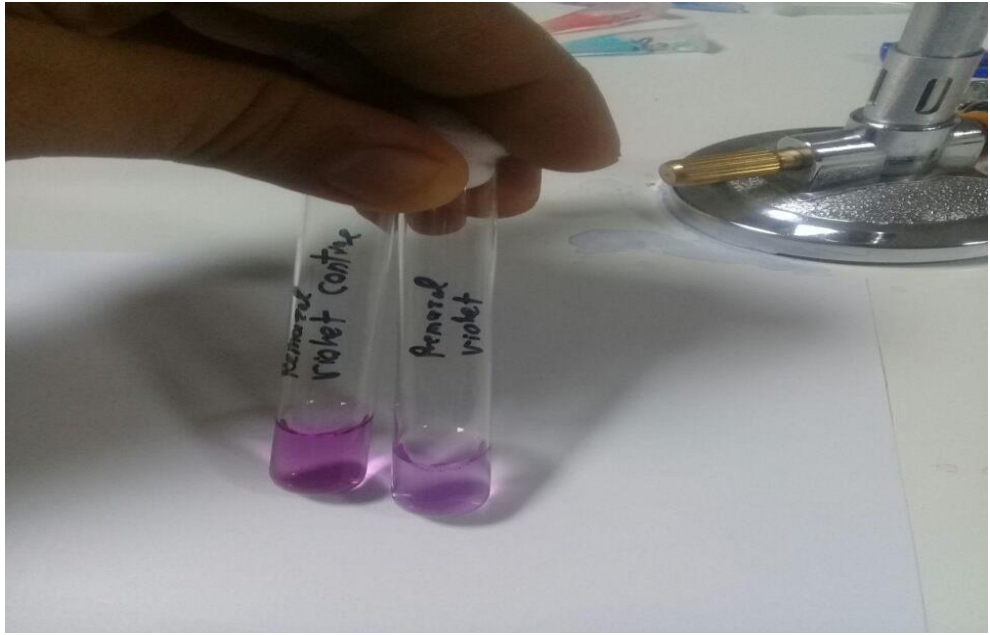
Şekil 4.37. Klonlanan lakkaz enzimin Remazol brilliant turuncusu üzerine etkisi.



Şekil 4.38. Klonlanan lakkaz enzimin Brilliant mavisi üzerine etkisi.



Şekil 4.39. Klonlanan lakkaz enzimin Bromo fenol mavisi üzerine etkisi.



Şekil 4.40. Klonlanan lakkaz enzimin Remazol violet üzerinde etkisi.

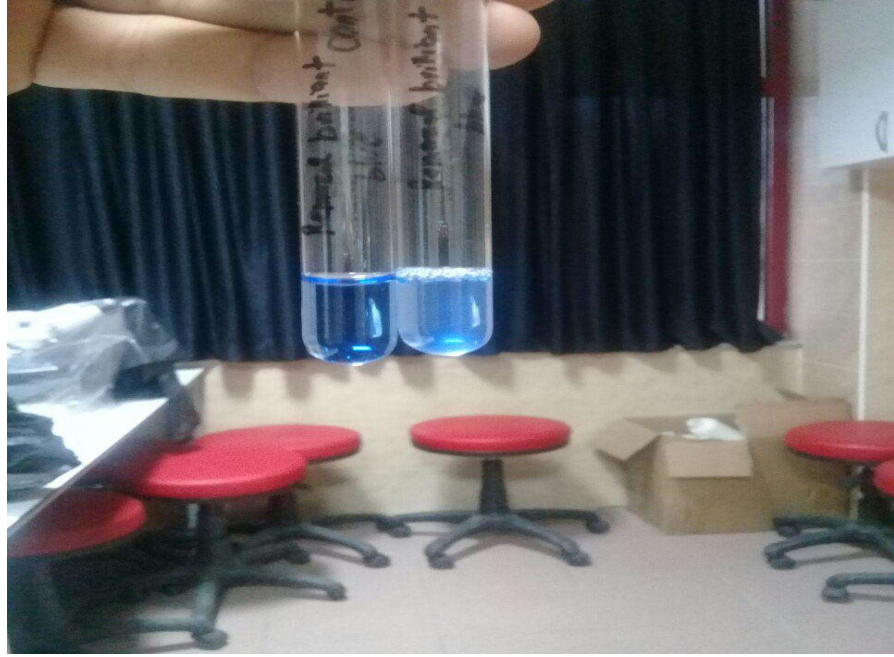




Şekil 4.41. Klonlanan lakkaz enzimin Turkuaz mavisi HF6 üzerine etkisi.



Şekil 4.42. Klonlanan lakkaz enzimin Remazol siyahı RB üzerine etkisi.



Şekil 4.43. Klonlanan lakkaz enzimin Remazol BR mavisi üzerine etkisi.



Şekil 4.44. Klonlanan lakkaz enzimin Reaktif kırmızısı üzerine etkisi.

#### 4.19 Klonlanmış Lakkazın Biyoinformatik Analizi

Klonlanan lakkaz geni ve bu gene ait protein dizisini elde edebilmemiz için lakkaz genin PCR ürünü Triogen Biyoteknoloji firmasında çift yönlü sekanslama yapılmıştır. Sekanslama sonucunda elde edilen dizi NCBI'da alignment yapılmış ve lakkaz genin sekansı belirlenmiştir. Şekil 4.45'te gösterilen lakkaz genine ait PCR ürününün 875 çift baz uzunluğunda olduğu görülmektedir. Dizide primer bölgesinin

altı çizilmiştir. Yeşil renkli nükleotidler restriksiyon enzimlerin kesim bölgesini göstermektedir. Kırmızı ile boyanan bölge ise stop kodonunu işaret etmektedir. Ayrıca sarı ile işaretlenen bölge 6 tane histidin aminoasidini göstermektedir. Bu bölge enzimin saflaştırılmasında büyük rol oynamaktadır.

```
>seq_27545 875 bp
ATACATCCATGGATACATATACCCATTCAAGTCTTACCACACCCCTCGACACTCATGATACAAGACTGGGCTCAAACGAATCAAACAACA
GAGAGGTCATTGCGCGATTACGACAAAAACGGCGGTGTGACGCAAAAGCCTTTTGAATCGTTAAATACAGGATTGCACGTTTCATGACA
AAGATGCAGATGATAGTTAAAAATCGTGAATATATTGCCGATATGTTTAACTGATTTGCAGTCTTGGGTATTGCTGATCAGACACATG
ATAATCGCGTTTCAGAAAGTGACGACAGAGGGATAGGGGAAAAGGCGCCCGTGAGTATCACACGGCTCTAAAAGCAACGGACGGGATCATA
CAAATGAAAAAATGATTTTTAGCATTATGCTTTGCTGATTGTGTGCCTCTTTTCTTATGATCCGGTTAAGTCGCTTGTCCGGAGTCG
CCCATGCCGGGTGAAAGGCACTGTCAAACAGATTGGCAGAGAAATGGTGAAGCAATGGACTGAGAAGGAAAGTTCAAATCCCTCAGATA
TTTACGCTGTTATTGGCCGCTATCAGCGGAGCATGCTATACGGTAGACGACCGCGTCATGGATGCTGTCCGCGCATTGCCGTTTCAG
CAGACCTTGCCGCAATCAGACGGCAAGGCACAATATCAGCTTGATCTGAAAGAGCTGAACGGCTTATACTGATCGACAGCGGTTTGG
CAACTGAACAAATTTCTGTACGCGGTTATGCACGAAAGCGAGCCGCTCTTTTCTATTCTCATCGCGCGATCAGGGGAAAACCTGGAC
GGATGATGTCCTTTATCGGAATGAAGGAGGCACACCACCACCACCCTGAAAGCTTAAAAAT
```

**Şekil 4.45.** Lakkaz genine ait PCR ürünü.

Lakkaz genini klonlamak için iki farklı primer kullanılmıştır. Genin her iki ucunda kesim bölgeleri ve genin sonunda ise histidin içeren bölge ilave edilerek lakkaz geni orijinalinden daha uzun bir şekilde PCR ile çoğaltılabilmektedir. İlave gen bölgeleri çıkarıldığında *Bacillus subtilis*’den elde edilen lakkaz geninin uzunluğunun 849 baz çifti olduğu anlaşılmaktadır (Şekil 4.46). Lakkaz genine ait dizi NCBI’de MK685357 kodu ile kayıt altına alınmıştır.

NCBI Resources How To

Nucleotide Nucleotide Advanced

FASTA

**Synthetic construct laccase gene, complete cds**

GenBank: MK685357.1

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

>MK685357.1 Synthetic construct laccase gene, complete cds  
ATGGATACATATACCCATTCAAGTCTTACCACACCCCTCGACACTCATGATACAAGACTGGGCTCAAACGA  
ATCAAAAACACAGAGAGGTTCATGCGGATTTACGACAAAAACGGCGGTGTGACGCAAAAGCCTTTTGA  
ATCGTTAAATACAGGATTGCACGTTTCATGACAAGATGCAGATGATAGTTAAAAATCGTGAATATATTGCC  
GATATGTTTAACTGATTTGCAGTCTTGGGTATTGCTGATCAGACACATGATAATCGCGTTTCAGAAAG  
TGACGACAGGGATAGGGGAAAAGGCGCCCGTGAGTATCACACGGCTCTAAAAGCAACGGACGGGATCTA  
TACAAATGAAAAAATGATTTTTAGCATTATGCTTTGCTGATTGTGTGCCTCTTTTCTTATGATCCG  
GTTAAGTCGCTTGTCCGAGTCGCCATGCCGGGTGAAAGGCACTGTCAAACAGATTGGCAGAGAAATGG  
TGAAGCAATGGACTGAGAAGGAAAGTTCAAATCCCTCAGATATTTACGCTGTTATTGGCCCGTCTATCAG  
CGGAGCATGCTATACGGTAGACGACCGCGTCATGGATGCTGTCCGCGCATTGCCGTTTCAGCAGACCTT  
GCCGCCAATCAGACGGCAAGGCACAATATCAGCTTGATCTGAAAGAGCTGAACGGCTTATACTGATCG  
ACAGCGGTTTGGCAACTGAACAAATTTCTGTACGCGGTTATGCACGAAAGCGAGCCGCTCTTTTCTA  
TTCTCATCGCGCGATCAGGGGAAAACCTGGACGGATGATGTCCTTTATCGGAATGAAGGAGGCACACCAC  
CACCACCACCTGA

**Şekil 4.46.** Lakkaz geni (855 bp)’ne ait DNA dizisi. (GenBank: MK685357.1).

#### 4.20 Klonlanan Protein'in Aminoasit Dizisinin Belirlenmesi

Klonlanan gene ait aminoasitlerin dizisini elde etmek için expasy.org sitesinde analizler yapılmıştır. Ayrıca [www.sciencegateway.org](http://www.sciencegateway.org) linkinde yer alan program yardımıyla protein sekansı ve proteinin moleküler ağırlığı hesaplanmıştır. Klonlanan gene ait proteinin toplam 306 aminoasit içerdiği ve moleküler ağırlığının yaklaşık 34 kD olduğu saptanmıştır. Çalışmada kullandığımız pET22b vektörü PelB geni içermektedir. Bu dizi, klonlanan proteinin bakteride periplazmik bölgeye geçişini ve oradan da dışarıya salgılanmasını sağlamaktadır. 306 aminoasitten 22 aminoasidi pET22b vektöründe PelB gen bölgesine ve 284 aminoasit ise lakkaz proteinine aittir. Lakkaz enzimin SDS-PAGE sonucu ile biyoinformatik sonucununun uyuşması analizlerin doğru bir şekilde yapıldığını göstermektedir. Aşağıda her iki sekansa ait aminoasit dizi gösterilmiştir (Şekil 4.47).

>PelB 22 AA (2.2 kDa)

MKYLLPTAEAGLLLLLLAAPQIA

>OH 284 AA (31.7 kDa)

---

```
>seq_27593 284 bp
MDTYHPFSLTTPSTLMIQDWAQTNQNNREVIAGFTTKNGGVSQKPFESLNTGLHVHDKDADVVKNREYIADMFNLDLQSWVFADQTHDNR
VQKVTQRDRGKGGAREYHTALKATDGIYTNKENVFLALCFADCVPLFFYDPVKSLVGVVAHAGWKGTVKQIGREHVKQWTEKEGNSPDIYA
VIGPSISGACYTVDDRVM DAVRALPVSADLAANQTAKAQYQLDLKELNGLILIDSGLATEQISVSGLCTESEPSLFYSHRRDQGKTGRMM
SFIGMKEAHHHHHH
```

Şekil 4.47. PelB ve Lakkaz proteine ait aminoasit dizisi.

#### 4.21 Lakkaz Genine Ait BLAST ve Filogenetik Analizi

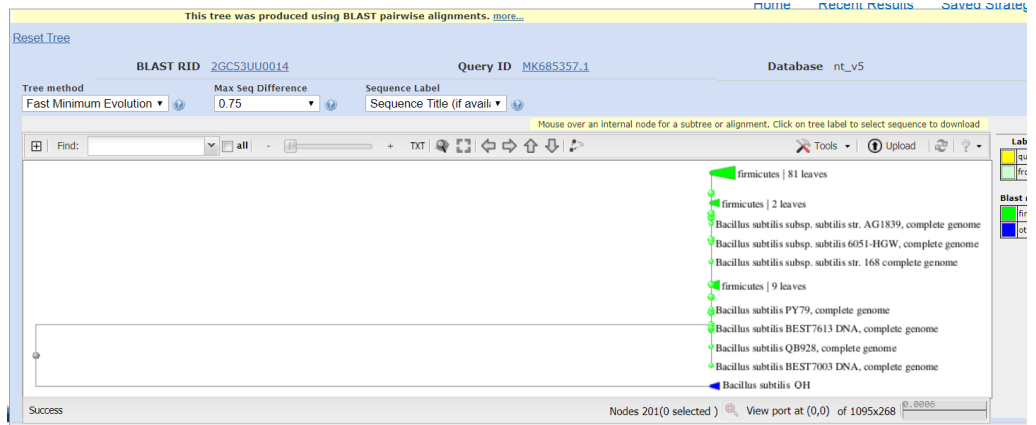
Lakkaz genine ait dizi NCBI ve mega5 programında incelenmiş ve BLAST analizi yapılarak Mega-5 programında filogenetik ağacı çizilmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar Şekil 4.48 ve 4.49'da gösterilmiştir. Filogenetik analizi, klonlanan lakkaz ile *Bacillus* cinsine ait farklı türlere ait lakkazların arasında benzerlikler olduğunu göstermiştir.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus subtilis subsp. subtilis partial 16S rRNA gene, isolate 713</a>	2338	2338	92%	0.0	99%	<a href="#">gil571026435 HG796191.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus licheniformis strain RT2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2338	2338	92%	0.0	99%	<a href="#">gil156255920 EF644413.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bacterium strain Bacillus subtilis_AF_3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2336	2336	92%	0.0	99%	<a href="#">gil1354701106 MH027600.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus subtilis strain Md1-44 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2336	2336	92%	0.0	99%	<a href="#">gil1226884889 MF581450.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus subtilis strain CW14, complete genome</a>	2336	23361	92%	0.0	99%	<a href="#">gil1199813658 CP016767.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus subtilis strain TN12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2336	2336	92%	0.0	99%	<a href="#">gil1198039055 MF033108.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus sp. strain JDMASP42 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2336	2336	92%	0.0	99%	<a href="#">gil1189442144 KJ817953.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus subtilis strain RS-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2336	2336	92%	0.0	99%	<a href="#">gil1182510684 KY952894.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus sp. strain TIM 58 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2336	2336	92%	0.0	99%	<a href="#">gil1043244302 KJ556324.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus subtilis strain FA26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2336	2336	92%	0.0	99%	<a href="#">gil1081433778 KY003098.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus subtilis strain 51 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2336	2336	92%	0.0	99%	<a href="#">gil1133558286 KJ216383.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus subtilis strain CN2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2336	2336	92%	0.0	99%	<a href="#">gil1027507359 KJ921590.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus subtilis strain NIST B 580 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2336	2336	92%	0.0	99%	<a href="#">gil1007355906 KT884827.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus sp. ADMK52 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2336	2336	92%	0.0	99%	<a href="#">gil1005399366 KU851008.1</a>

Şekil 4.48. Lakkaz genine ait Blast analizi.



Şekil 4.49. Lakkaz genine ait filogenetik analizi.

## 5. TARTIŞMA

Biyoteknolojik ve endüstriyel öneme sahip olan lakkaz enzimi, ilk kez bitkilerde gösterilmiş olmasına rağmen, bitkilerden enzimin saflaştırılması zor ve pahalı olduğu için günümüzde mantarlar başta olmak üzere çok sayıda mikroorganizmadan saflaştırılmaktadır (Desai 2017, Mayer ve Richard 2000, Ranocha ve diğ.1999). Örneğin, *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* ve *Deuteromycetes* iyi bilinen lakkaz üreticileridir ve günümüzde lakkazın büyük çoğunluğu bu canlılardan karakterize edilmektedir (Sharma ve diğ. 2007). Bakteriler hem hızlı çoğalmakta hem de basit üretim koşullarına sahiptir. Bu nedenle enzim gibi birçok bakteriyel ürünün ekstraksiyonu ve saflaştırılması hem ekonomik hem de çok daha kolaydır. Bu nedenle bakteriler enzim üretimi için daha avantajlıdır. Bu amaçla çok sayıda bakteri lakkaz üreticisi (*Azospirillum lipoferum*, *Streptomyces lavendulae*, *Streptomyces cyaneus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* WD23, *Bacillus licheniformis*) olarak araştırılmıştır. Bazı bakteriyel lakkazlar yüksek sıcaklıklarda, yüksek pH'da ve ayrıca yüksek klorür konsantrasyonlarında yüksek derecede aktif ve çok daha stabil olabilir (Bugg ve diğ. 2011, Dwivedi ve diğ. 2011, Reiss ve diğ. 2011, Peter ve diğ. 2014, Demissie ve Kumar 2014, Naz ve diğ. 2015). Ayrıca bakteriyel lakkazlar, geniş substrat özgüllüğü, kısa sürede enzim üretimi ve uygun manipülasyon ile konakçıda klonlama ve eksprese etme kolaylığı gibi endüstriyel uygulamalarda düşük maliyet için istenen bazı ek avantajlara da sahiptir (Fernandes ve diğ. 2014, Prins ve diğ. 2015). Bakteriyel lakkaz ayrıca, kağıt hamuru yapımında zift giderimi ve biyo-beyazlatma, tekstil boyalarının / atık sularının temizlenmesi ve biyosensör uygulamalarında da kullanılmaktadır (Mathews ve diğ. 2016). Dolayısıyla çeşitli mikroorganizmalardan bakteriyel lakkazlar saflaştırılmakta, uygun bir konakçıya klonlanmaktadır (Sharma ve diğ. 2007, Narayanan ve diğ. 2015, Chandra ve Chowdhary 2015).

İlk bakteriyel lakkaz *Azospirillum lipoferum* 'dan izole edilmiştir (Givaudan ve diğ. 1993). Günümüzde *Bacillus*, *Geobacillus*, *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Stenotrophomonas*, *Entorobacter*, *Azospirillum*, *Lysinibacillus*, *Aquisalibacillus* ve *Proteobacterium* gibi çok sayıda Gram pozitif ve Gram negatif cins ve türde lakkaz varlığı gösterilmiştir (Desai 2017, Rezaei ve diğ. 2017, Neifar ve diğ. 2016; Prins ve diğ. 2015, Muthukumarasamy ve diğ. 2015, Narayanan ve diğ. 2015; Dhiman ve



Shirkot 2015; Sondhi ve diğ. 2014; Verma ve Shirkot 2014; Demissie ve Kumar 2014, Margot ve diğ. 2013, Lu ve diğ. 2012, Wang ve diğ. 2011, Singh ve diğ. 2010, Galai ve diğ. 2009, Diamantidis ve diğ. 2000).

Rekombinant protein ekspresyonu, belirli bir proteinin kısa sürede daha yüksek üretimini kolaylaştırdığı ve üretim maliyetini düşürdüğü için, bakteriyel lakkaz geni de son yıllarda konakçı olarak *E. coli*'ye klonlanmaktadır (Ghasemi ve diğ. 2014, Mathews ve diğ. 2016, Kalyani ve diğ. 2016). Örneğin *Bacillus vallismortis* lakkaz geni *E. coli* BL21 (DE3)'ye klonlanmış ve rekombinant enzim verimi 3420 UL<sup>-1</sup> olarak tespit edilmiştir (Sun ve diğ. 2017). Benzer şekilde lac1338 geni *E. coli*'ye aktarılmış ve rekombinant enzimin ekspresyon şartları optimize edilerek verimin 2,13 kat arttığı ve enzim aktivitesinin de 22,8 Umg<sup>-1</sup>'ye ulaştığı bildirilmiştir (Xia ve diğ. 2016).

Yukarıda verilen bilgiler ışığında, bu çalışmada daha yüksek bir lakkaz üreticisi olarak yerel bir izolatın izolasyonu ve enzimin karakterizasyonu hedeflenmiştir. Bu amaçla önce lakkaz üreticisi yerel bir izolat için lakkaz geni içeren bir bakteri (İstanbul, Türkiye) izole edilerek *Bacillus subtilis strain OH 67* olarak teşhis ve tanımlanmıştır. Daha sonra da bakterinin lakkaz gen bölgesi konak hücreye aktarılmış ve rekombinant enzim saflaştırılarak karakterize edilmiştir.

Rekombinant lakkaz üretiminde pET22b vektörü kullanılmıştır. pET22b vektöründe Pektat liyaz B enzimine ait gen, N terminal bölgesinde 2 kDa ağırlığında 22 aminoasitlik gen dizisi (ki bu bölge klonlanan gen bölgesi ile birleşerek proteinin periplasmik bölgeye geçişini sağlar), PelB (MKYLLPTAEAGLLLLLAAPQIA) ve ampisilin'e direnç geni içerir.

Lakkaz geni içeren *Bacillus subtilis*, Xiao ve arkadaşlarının önerdiği metot ile İstanbul'dan izole edilmiştir (Wang ve diğ. 2017). Syringaldazine, guaiacol ve catechol lakkaz enzimin substratlarıdır. *Bacillus subtilis strain OH 67* bakterisine ait lakkaz geni *E. coli* BL21 (DE3)'e klonlanmış ve elde edilen enzimin karakterizasyonu yapılmıştır. Klonlanan rekombinant lakkaz genin sekans analizi yapılmış ve NCBI gen bankasında kayıtlı lakkaz genleri ile karşılaştırılmıştır. Biyoinformatik değerlendirme sonucu klonlanan lakkaz geni ile *Bacillus subtilis strain OH 67* bakterisine ait kayıtlı bazı lakkaz genler arasında %99 oranında benzerlik olduğu ortaya çıkmıştır.

SDS-PAGE analizi sonucu enzimin moleküler ağırlığının 34 kDa olduğu saptanmıştır. Enzim toplam 297 amino asit içermektedir ki bu amino asitlerden 22'si

N ucunda bulunan Pel B ve 6 tanesi C ucunda bulunan histidinle ilgilidir. Örneğin, Narayanan ve diğ. 2015, kısmen saflaştırılan lakkazın moleküler ağırlıklarını, pirinç kepeğinde 52 kDa ve buğday kepeğinde ise 55 kDa olarak rapor etmişlerdir. Fungal lakkazların moleküler ağırlığı 43 kDa (Shrestha ve diğ. 2016) ve 64,8 kDa (Judewicz ve diğ. 1998) olarak bildirilmiştir. *Cerrena unicolor* lakkazının izozimi olan LacIId'nin moleküler ağırlığı 59 kDa'dur (D'Souza-Ticlo ve diğ. 2009). *Trametes versicolor*'un lakkazı ise 97 kDa'dur (Han ve diğ. 2005). Cordi ve diğ. (2007)'a göre *Termetes* fungusunun lakkazının moleküler ağırlığı 66 kDa'dur. Lakkazın moleküler ağırlığında görülen bu varyasyon, türlerin farklı ekolojik kökenlerine veya farklı kültür koşullarına bağlanabilir. Özellikle, besi ortamındaki indükleyicilerin varlığı lakkaz izozimlerinin ortama salgılanmasında önemli bir rol oynamaktadır (Eggert ve diğ. 1996).

Enzim aktivitesi ve kinetiği üzerine sıcaklık ve pH'nın da etkisi vardır. Optimal sıcaklık, pH, enzim aktivitesi gibi özellikler bir türden diğerine büyük oranda çeşitlilik göstermektedir. Özellikle çalışma koşulları, substrat çeşitliliği, mikroorganizma tipi ve türü gibi faktörler enzimlerin kinetik özelliğinde de farklılıklara yol açacaktır. Örneğin, *Bacillus tequilensis* SN4'ün Km ve Vmax değeri ABTS için 80  $\mu\text{M}$  ve  $291 \pm 2,7 \text{ s}^{-1}$ , dimetoksi fenol için 680  $\mu\text{M}$  ve  $11 \text{ s}^{-1}$  ve guaiacol için ise 3,289  $\mu\text{M}$  ve  $63 \text{ s}^{-1}$ 'dir (Sondhi ve diğ. 2014). *Bacillus* sp. WT suşu ise ABTS'de 132,7  $\mu\text{M}$  Km ve 309  $\text{s}^{-1}$  Vmax değerine ulaşmıştır (Siroosi ve diğ. 2016). Benzer şekilde, Cordi ve diğ. (2007) substrat olarak syringaldazine kullanmışlar ve enzimin pH: 3-8 aralığında aktif olduğu rapor edilmiştir. Diğer taraftan, Martins ve diğ. (2002) *Bacillus subtilis* lakkazının Km ve Vmax değerlerini 106  $\mu\text{M}$  ve 22  $\mu\text{mol/dak.mg}$  olarak rapor etmişlerdir. *Ganoderma lucidum*-CDBT1'ye ait lakkaz enzimi ise pH 5 ve 30°C sıcaklıkta optimum aktivite göstermiştir. Enzimin Km değeri 110  $\mu\text{M}$  ve Vmax değeri ise 36  $\mu\text{mol/dak/mg}$ 'dır (Shrestha ve diğ. 2016). *Bacillus pumilus* LMCO lakkaz geni site-spesifik mutagenesis ile modifiye edilmiş; elde edilen mutant L9'un Km değeri 1,39 mM olup enzim aktivitesi guaiacol için 2,5 kat artış göstermiştir (Ihssen ve diğ. 2017). Martins ve arkadaşları bir çalışmada *Bacillus subtilis* bakterisinden elde edilen lakkazın kinetik analizini yapmışlardır ve Km' nin 106  $\mu\text{M}$  ve Vmax'ın ise 22  $\mu\text{mol/dak.mg}$  olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmadaki izole edilen lakkaz bizim çalışmada klonlanılan lakkaz ile benzerlik göstermektedir (Martins ve diğ. 2002).



Çalışmamızda substrat olarak guaiacol kullanılmış olup *Bacillus subtilis*'e ait rekombinant lakkaz enzimimizin Km değeri 110,7721  $\mu$ M ve 19,3  $\mu$ mol/min/mg'dır. Literatürdeki bakteriyel lakkazlar ile izolatımızın Km ve Vmax değerlerinin birbirinden farklı olması bakteri türü, çalışma koşulları ve kullanılan substratların farklı olmasından kaynaklandığı açıkça görülmektedir. Zira lakkaz enzimine ait 3 farklı substrat mevcuttur ve farklı araştırmacılar farklı substratlar tercih etmişlerdir. Yapılmış olan bu araştırmanın kinetik analizinde substrat olarak guaiacol ve metot olarak Lineweaver-Burk yöntemi kullanılmıştır.

*Trametes versicolor* lakkazı pH:3 ve 50°C'de optimum aktivite gösterirken (Han ve diğ. 2005), *Stereum ostrea*'nın optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 6 ve 40°C'dir (Valeriano ve diğ. 2009). Diğer taraftan *Bacillus subtilis* WD23 suşundan izole edilen lakkaz yüksek sıcaklıkta aktivite göstermiştir (Hublik ve Schinner 2000). *Bacillus subtilis* X1 bakterisine ait lakkaz 50°C ve 60°C'de stabilken (Guan ve diğ. 2014) *Bacillus subtilis* MTCC 2414 lakkazının optimum sıcaklık ve pH'sı 70°C ve pH:9,0'dur (Narayanan ve diğ. 2015).

Bu çalışmada klonlanan lakkazın optimum aktivite gösterdiği pH ve sıcaklık 6,6 ile 50°C olarak saptanmıştır. Rekombinant lakkazın asidik ortamlarda stabilitesini koruyabilmesi bu enzimin endüstride kullanılabilirliğini göstermektedir. Zira endüstride oluşan atık sular asidik pH'lara sahiplerdir. Lakkaz enzimi farklı organizmalar tarafından üretilmektedir. Bu nedenle farklı lakkazlar farklı koşullarda aktivite gösterirler. Yapılan bir çalışmada lakkazın optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri 7 ve 67°C olduğu saptanmıştır (Nguyen ve diğ. 2013). Bu çalışmalardaki lakkaz ile bizim ürettiğimiz lakkaz arasında benzerlik olmadığı görülmektedir. Bu çalışmada üretilen rekombinant lakkaz yüksek sıcaklıklarda aktivite göstermiştir. *Bacillus subtilis* wD23 suşundan izole edilen lakkaz da bizim çalışmadaki lakkaz gibi yüksek sıcaklıkta aktivite göstermiştir (Hublik ve Schinner 2000). *Halobacillus halophilus* bakterisinden elde edilen lakkaz 77°C'da aktivitesinin %100'ünü koruduğu saptanmıştır (Nguyen. ve diğ.2013). Bu çalışmanın aksine çalışmamızdan elde edilen lakkazda sıcaklık artışına göre az da olsa aktivite kaybı olmuştur. Başka bir çalışmada *Bacillus subtilis* X1 bakterisine ait lakkaz enzimi 50°C ve 60°C'lık sıcaklıklarda stabil olduğu saptanmıştır (Guan ve diğ. 2014). Benzer başka bir çalışmada ise *Bacillus subtilis* VTCC-DVN-12-01 bakterisinin lakkaz enzimi 50°C'de stabil olduğu rapor edilmiştir (Nguyen ve diğ. 2013). Bu iki çalışmadaki lakkaz enzimi

bizim lakkaz ile benzer aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. *Pleurotus ostreatus* suşuna ait lakkaz enzimi 5,8 pH'sında stabil olduğu ve bizim lakkaz ile benzer değerlere sahip olduğu araştırmacılar tarafından saptanmıştır (Hublik ve Schinner 2000). Sıcaklık stabilite çalışmaları eksik olduğundan dolayı enzimin sıcaklık bakımından tartışılması mümkün değildir.

*Ganoderma lucidum*-CDBT1'ye ait lakkaz enzimi pH 5 ve 30°C sıcaklıkta optimum aktivite göstermiştir. Enzimin moleküler ağırlığı 43 kDa olup Km değeri 110 µM ve Vmax değeri ise 36 µmol/dak/mg'dır (Shrestha ve diğ. 2016). Çalışmamızdan elde edilen lakkazın 60°C sıcaklığında stabil olduğu ama bu sıcaklıktan sonra aktivitesini kaybettiği gözlemlenmiştir. pH stabilite araştırması ise enzimin pH 8'de %7 aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur. Mantarlardan elde edilen lakkaz ile *Bacillus subtilis* bakterisine ait lakkazı karşılaştırdığımızda *Bacillus subtilis*'e ait lakkazın geniş sıcaklık ve pH'larda daha stabil olduğunu görmekteyiz.

Desai tarafından yapılmış olan bir çalışmada *Enterobacter* SB1 bakterisinden lakkaz enzimi izole edilmiş ve bu bakteriye ait olan enzimin karakterizasyonu yapılmıştır. *Enterobacter* SB1 bakterisinden elde edilen lakkaz pH 9 ve 30°C'deki sıcaklıkta optimum aktivite göstermiştir. *Bacillus subtilis* bakterisinin aksine *Enterobacter*'lerden elde edilen lakkaz bazik pH'arda aktivite göstermiştir (Desai 2017). *Coriopsis polyzona* MUCL 38443 mantarına ait lakkaz geni *Pichia pastoris*'e klonlanmış ve klonlanan gene ait enzimin karakterizasyonu yapılmıştır. Klonlanan lakkaz enzimi pH 3 ve 70 °C'de optimum aktivite göstermiştir. Enzim 20-70 °C'de 30 dakika stabil iken 70-90 °C aralığında 30 dakikadan sonra aktivitesi hızla düşmüş ve sıfıra yaklaştığı rapor edilmiştir. 1 mM SDS ile 5 dakika muamele edilen enzim aktivitesinin %84'sini korumuştur. Klonlanan enzimin moleküler ağırlığı 54 kDa, Vmax ve Km değerleri ise sırasıyla 0,137 mM ve 288,6 µmoldür. Rekombinant lakkaz düşük sıcaklıklarda aktifken, yüksek sıcaklıklarda stabil olmadığı ortaya çıkmıştır. İnhibitör ve divalentlarla muamele edilen lakkazın muamele süresinin az olduğundan dolayı bu enzim SDS varlığında aktivitesini koruyabildiği düşünülmektedir (Pınar ve diğ. 2017).

İnorganik mineraller, metaller ve deterjanlar gibi inhibitörler, enzim üretimini ya indüklerler ya da bastırırlar. Bu nedenle enzim aktivitesinde önemli rol oynarlar. Örneğin bir bakır oksidaz olan lakkaz enzimi için CuSO<sub>4</sub>, lakkaz üretiminde güçlü bir

indükleyicidir (Gnanamani ve diğ. 2006). *B. subtilis* MTCC 2414 (Narayanan ve diğ. 2015), *Pseudomonas* sp. LBC1 (Telke ve diğ. 2012) ve *Enterobacter* spp. (Desai 2017) bakterilerinde CuSO<sub>4</sub> ilavesinin lakkaz aktivitesini arttırdığı kanıtlanmıştır. Benzer şekilde Ca<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> ve Mn<sup>2+</sup> gibi inorganik minerallerin 5 mM gibi yüksek miktarlarda enzim aktivitesini hızlandırdığı bilinmektedir (Muthukumarasamy ve diğ. 2015, Sondhi ve diğ. 2014). Bakırın aksine Mg<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup> ve Zn<sup>2+</sup> gibi inorganik metallerin lakkazın protein yapısını değiştirerek enzimatik aktiviteyi inhibe ettiği de rapor edilmiştir (Muthukumarasamy ve diğ. 2015, Sondhi ve diğ. 2014). Çalışmamızda EDTA, MgCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, Triton X-100, SDS, Tween 20, Tween 80, β-merkaptolanol ve ürenin enzim aktivitesi üzerine olan etkisi 1 ve 5 mM konsantrasyonlarda incelenmiştir. Genel olarak inhibitör konsantrasyonu 5 mM iken FeSO<sub>4</sub> dışında tüm metal iyonları lakkaz aktivitesinde bir azalmaya neden olmuştur. Üre, HgCl<sub>2</sub> ve 2-Merkaptoetanol enzim aktivitesini aşırı seviyede inhibe ederken, FeSO<sub>4</sub> ilavesi her iki konsantrasyonda da lakkaz enzim aktivitesini arttırmıştır. Enzim aktivitesine SDS'nin pozitif yönde, Tween-80 ve Tween-20'nin herhangi bir etkisinin olmadığı bildirilen makalelerin (Dalfard ve diğ. 2006, Sondhi ve diğ. 2014) aksine bizim çalışmamızda tüm deterjanlar enzim aktivitesini ciddi derecede düşürmüştür. Çalışma sonuçlarımız Kalyani ve diğ. (2012)'ni destekler nitelikte iken Vantamuri ve Kaliwal (2016)'nın aksine EDTA ilavesi bizim lakkaz enzimimizin aktivitesinde düşüşe sebep olmuştur. Vivekanandan ve diğ. (2014)'nin sonuçları dikkate alındığında *Aspergillus nidulans*'ın lakkazı farklı iyonlarla muamele edildiğinde aktivitesindeki düşüş miktarı, yerel izolattan saflaştırılan rekombinant lakkazdan daha fazla olmuştur. Farklı bir çalışmada *Marasmius* sp. BBKAV79 mantarından izole edilen lakkaz enziminin 75 kDa ağırlığında, pH 5,5 ve 40°C'de de optimum aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Lakkaz enzimi pH 8'de sadece aktivitesinin %30'sunu korumuştur. Enzim 37°C'de aktivitesinin sadece %70'ini korurken 55°C'de aktivitenin %50'ye düştüğü görülmüştür. Enzim aktivitesi farklı koşullarda önemli derecede azalma göstermiştir. Ayrıca *Marasmius* sp. mantarına ait lakkaz enzimi 20 mM konsantrasyonundaki farklı metal ve deterjanlar ile muamele edilmiştir. Buna göre; EDTA ilavesi %10 oranında aktivite artışına sebep olurken SDS, FeSO<sub>4</sub>, AgNO<sub>3</sub>, MnSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, HgCl<sub>2</sub> ve ZnSO<sub>4</sub>'un varlığında lakkaz enzimi sırasıyla %33, %58, %4, %89, %83, %4 ve %93 oranında aktivitesini koruyabilmiştir. Enzimin K<sub>m</sub> ve V<sub>max</sub> değeri 3,03 mM ve 5 µmol olarak rapor edilmiştir (Vantamuri ve Kaliwal 2016).

*Marasmius* sp. BBKAV79 mantarı ile kendi izolatomuz olan *Bacillus subtilis*'den elde edilen lakkazı karşılaştırdığımızda saflaştırdığımız lakkazın pH ve sıcaklığa stabil olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca farklı inhibitör ve deterjanların lakkazın üzerinde etkisinin az olduğu belirlenmiştir. Vantamuri ve Kaliwal (2016)'nın aksine EDTA ilavesi bizim lakkaz enzimimizin aktivitesinde düşüşe sebep olmuştur.

Vivekanandan ve diğ. (2014), *Aspergillus nidulans*'den izole ettikleri lakkazın moleküler ağırlığının 66 kDa olduğunu açıklamışlardır. Bu çalışmadan elde edilen lakkaz pH 6 ve 30 °C sıcaklığında optimum aktivite göstermiştir. pH'nın artmasıyla birlikte aktivite önemli derecede düşmüştür. pH 8'de aktivite de %50'lık bir azalma saptanmıştır. Ayrıca enzim 30 dakika boyunca 2 mM metal (Cu, Ca, K, Mg, Fe, Zn, Co, Ni, Hg ve Pb) ile muamele edilmiştir. Cu, K, Mg ve Fe %68, %6, %19 ve %39 oranında enzim aktivitesinin artmasına sebep olurken Ca, Zn, Co, Ni, Hg ve Pb varlığında aktivite %5, %21, %75, %81 ve %80 oranında düşmüştür. Bunların yanı sıra enzime ait Km ve Vmax değerleri 0,052 mM ve 2,86 mM olarak saptanmıştır. *Aspergillus nidulans*'e ait lakkaz düşük sıcaklıklarda aktivite göstermiştir ve farklı iyonlarla muamele edildiğinde aktivitesindeki düşüş miktarı bizim elde ettiğimiz lakkazdan daha fazla olmuştur (Vivekanandan ve diğ. 2014).

Kalyani ve diğ. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada *Coltricia perennis* lakkazı izole edilmiş ve enzimin moleküler ağırlığı 66 kDa olduğu bildirilmiştir. Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık 75°C ve optimum aktivite gösterdiği pH ise 4'tür. Enzim 1 mM konsantrasyonda SDS ve EDTA ile muamele edilmiş ve enzim aktivitesi sırasıyla %85 ve %98'e düşmüştür. Diğer taraftan *Bacillus subtilis* WD23 bakterisinin lakkaz enziminin optimum pH'sı 6,8 ve optimum sıcaklığı ise 60°C'dir. Ayrıca enzim 80°C ve pH 9'da stabildir (Wang ve diğ. 2010). Wang ve arkadaşlarının sonuçları bizim saflaştırdığımız lakkaz enziminden elde edilen bulguları destekler niteliktedir. Bizim çalışmamızın aksine *Coprinus comatus*'e ait lakkaz enzimi pH 5 ve 30 °C'de optimum aktivite göstermiştir (Vantamuri ve diğ. 2015 ). Bu sonucun bakteri tür farklılığından kaynaklandığı düşünülmüştür.

Benny ve diğ. (1998) tarafından yapılan bir araştırmada *Chaetomium thermophilum* mantarına ait lakkaz enzimi değerlendirilmiştir. Bu araştırmadan elde edilen lakkazın moleküler ağırlığı 77 KDa , optimum pH ve optimum sıcaklık ise 6 ve 45 °C olarak belirlenmiştir. Ayrıca enzim bir saat 70°C'de aktivitesini korumuştur.

Enzim aktivitesi pH 8'de %68'e düşmüştür ve pH 9 ile pH 4'de ise aktivitesini tamamen kaybetmiştir. Enzimin Vmax ve Km değeri ise 0,40 mM ve 2,5 µM olarak rapor edilmiştir. Enzim yüksek sıcaklıkta aktivitesini korumasına rağmen geniş pH'larda aktivitesini koruyamamıştır (Chefetz ve diğ. 1998).

*Phytophthora capsici*'ye ait lakkaz geni, *Pichia pastoris*'e klonlanmış ve rekombinant lakkazın moleküler ağırlığı 68 kDa olduğu bulunmuştur. Klonlanan enzimin optimum pH'sı ve optimum sıcaklığı 4,0 ve 30°C'dir (Zhen Feng ve Peiqian 2014). Soden ve diğ. (2002), *Pleurotus sajor* mantarına ait lakkaz enzimi rekombinant DNA teknolojisi ile üretmişler ve enzimin moleküler ağırlığının 59 KDa olduğunu bildirmişlerdir. *Pleurotus sajor* mantarından klonlanan enzimin guaicol varlığında optimum aktivite gösterdiği pH=7 ve optimum aktivite gösterdiği sıcaklık ise 35°C'dir. Enzim, pH=6'da aktivitesinin sadece %50'lik ve pH=8'de ise %10'luk kısmını koruyabilmiştir. Daha asidik pH'larda aktivite önemli derecede düşerken bazik pH'larda aktivite neredeyse sıfıra yaklaşmıştır. Enzimin termal stabilitesi incelendiğinde, 45°C'de 1 saat bekletilen enzimin aktivitesi %25'e düşerken, 60°C sıcaklıkta aktivitesini tamamen kaybettiği bildirilmiştir. Enzim inhibitörü olarak 1 ve 5 mM EDTA varlığında enzimin aktivitesi çok az miktarda düşmüştür; diğer bir deyişle EDTA varlığında aktivitenin yaklaşık %90'luk kısmı korunmuştur. Mantarlara ait lakkaz enzimlerinin moleküler ağırlıkları bakteriyel lakkaz enziminkinden büyüktür ancak moleküler ağırlığın büyüklüğünün enzimin stabilitesine etkisi yoktur (Soden ve diğ. 2002).

Boyar maddelerin degradasyonu ve dekolizasyonu, yeraltı su kaynakları başta olmak üzere dünyadaki çözümlenmesi gereken önemli çevresel bir problemdir. Substrat özgüllüğünün geniş olması ve moleküler oksijeni kullanmak suretiyle çeşitli fenolik bileşiklerin oksidasyonunu katalizleyebilen lakkaz enzimi, atık sulardan renk giderimi için yüksek potansiyele sahip bir enzimdir (Gienfreda ve diğ. 1999, Saparrat ve diğ. 2007). Ortam şartları (alkalite veya asitlik), sıcaklık veya enzim için uygun substrat varlığı dekolizasyonu etkiler. Örneğin Guijarro ve diğ. (2009) da *Streptomyces ipomoea* CECT 3341'den elde edilen rekombinant lakkaz ile azo-type dye Orange-II, acetosyringone mediatörü olmaksızın dekolize edilemediğini de bildirmiştir. Benzer şekilde Lu ve diğ. (2012) tarafından acetosyringone varlığında, *Bacillus licheniformis* LS04 spor lakkazı ile boyanın %80'i dekolize edilirken,

*Enterobacter* spp. lakkazı ile ABTS varlığında Reaktif Red 152 %40 oranında dekolorize edilmiştir (Desai 2017). Benzer şekilde *B. subtilis* 'in termoaktif lakkazı ile reaktif sarısı dışında azo ve anthraquinone Sudan turuncusu G (SOG) boyası başarılı bir şekilde dekolorize edilmiştir (Pereira ve diğ. 2008). Rekombinant *Bacillus licheniformis* suşunun alkalın lakkazı, karmin ve reaktif siyahı kısa sürede tümüyle parçalamıştır (Lu ve diğ. 2013). Çalışmanın son aşamasında, *Bacillus subtilis* 'ten saflaştırdığımız rekombinant lakkaz enzimi sentetik boyaların dekolorizasyon araştırılmıştır. Kongo kırmızısı, metilen mavisi, bromokresol purple, bromfenol mavisi, metil kırmızısı, kristal viyole, fenol kırmızısı, turkuaz mavisi, remazol kırmızısı, remazol brilliant orange, brilliant mavisi, remazol violet ve reaktif kırmızısı kullanılmıştır. Genel olarak lakkaz enziminin kullanılan tüm boyaları etkili bir şekilde giderdiği görülmüştür.

Wang ve diğ. (2011), *Bacillus subtilis* WD23 suşundan saflaştırdıkları lakkazın Remazol brilliant mavisi R (RBBR), Alizarin kırmızısı, Kongo kırmızısı, metil turuncusu ve metil viyole gibi bazı boyaların gideriminde etkili olduğunu rapor etmişlerdir (Wang ve diğ.2011).

*Bacillus licheniformis* bakterisinin lakkaz geni *E. coli*'ye klonlanmış ve SDS-PAGE ile enzimin moleküler ağırlığının 65 KDa olduğu bulunmuştur. Araştırmacılar enzimin optimum aktivite gösterdiği pH'nın 7 ve sıcaklığın ise 85°C olduğunu rapor etmişlerdir. Ancak 70°C ve 80°C'de 1 saat bekletildiğinde enzim aktivitesi %43 ve %8'e düşmüştür. *Bacillus licheniformis* bakterisine ait lakkazın optimum pH'sının 85°C olmasına rağmen 70°C'de stabil olmaması dikkati çekmiştir (Koschorreck ve diğ. 2008). Rekombinant enzimin kısa sürede yüksek aktivite gösterip hemen kaybettiğini göstermektedir. Bizim elde ettiğimiz rekombinant lakkaz enzimi 2 saat boyunca aktivitesinin tamamını korumuştur ki bu da saflaştırdığımız enzimin üstün niteliğini göstermektedir. Benzer şekilde bir başka çalışmada *Hypsizygus ulmarius*'e ait lakkaz geni *E. coli*'ye klonlanmış ve enzimin moleküler ağırlığı 63 kDa olarak belirlenmiştir. Rekombinant lakkaz enzimi için optimum pH 6 ve optimum sıcaklık ise 40°C'dir. Enzim 50°C'de aktivitesinin %45'sini korurken sıcaklık 60°C olduğunda sadece %20'sini koruyabilmiştir. Farklı iyonların rekombinant lakkaz üzerine etkisi incelenmiş; Mn ve Cu'ın enzim aktivitesinde artışa sebep olurken Fe, Na ve Co'ın enzim aktivitesini önemli derecede düşürdüğünü rapor etmişlerdir (Ravikumar ve

diğ.2013). Sunulan doktora tez çalışmasında yerel izolattan elde ettiğimiz rekombinant lakkaz enzimi ile literatürdeki rekombinant lakkaz enzimleri genel olarak kıyaslandığında, sıcaklık stabilitesi, inhibitörlere direnci, sıcaklık artışına bağlı olarak aktivitesinin büyük bölümünü uzun süre koruyabilmesi, çok farklı boyar maddeleri giderebilme gibi özellikleri açısından üstün nitelikli olduğu düşünüyoruz. Nitekim tuza tolerant bir bakteri olan *Halobacillus halophilus* lakkaz enzimi pH=7 ve 67°C’de optimum aktivite göstermekle birlikte pH=5’te inaktif olmuştur ve 30-40 °C sıcaklıklarında çok az aktivite gösterebilmiştir. Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık yüksek olmasına rağmen normal koşullarda inaktif olması bu enzimin insanlar tarafından kullanımının pratik olmayacağı göstermektedir (Bhuvaneshwari ve diğ. 2015).

Yapılan bir araştırmada lakkaz enzimin dekolorizasyon etkisi dispersed mavi 3, asit mavi 74, reaktif mavi 19, asit kırmızı 27 ve reaktif siyah 5 üzerinde çalışılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda Lakkazın boya giderimide etkili olduğu ve enzim artışı ile bu etkinin daha da yükseldiği ortaya çıkmıştır (Champagne ve diğ. 2010). *Funalia trogi*’ye ait Lakkaz enzimin dekolorizasyonu araştırmacılar tarafından incelenmiştir. Yapılmış olan bu çalışmada Lakaz enziminin dekolorizasyon etkisi farklı pH’larda ve farklı enzim konsantrasyonlarında, iki farklı boya üzerinde (Reaktif siyah 5 ve Reaktif mavi 171) denenmiştir. Bu araştırmada 2,5, 3, 3,5 ve 4 pH’larında lakkaz sırasıyla %44, %34, %31 ve %20 kadar boya giserimine sebep olmuştur. Bu çalışmada lakkaz enzimin asidik ortamda daha fazla dekolorizasyon etkisi olduğu ve bu etkinin bazik ortamda düştüğü gösterilmiştir. Ayrıca enzimin miktarı arttıkça Lakkaz dekolorizasyonuda da artış ortaya çıkmıştır (Yeşilada ve diğ. 2014). Benzer şekilde çalışmamızda da Lakkaz enzimi asidik ortamda optimum aktivite göstermiştir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sunulan bu çalışmada yerel bir izolat olan *Bacillus subtilis* OH 67 türüne ait lakkaz enzimi başarılı bir şekilde klonlanmış ve enzimin karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Rekombinant lakkazın moleküler ağırlığı 34 kDa, Km ve Vmax değerleri ise sırasıyla 1,1077 mM ve 19,3 µmol/ min/mg'dır. Enzim geniş bir pH ve sıcaklık aralığında aktivite göstermiştir. Optimum pH'sı 6,6 ve optimum sıcaklığı 50°C'dir. 40 °C ve 60 °C'de %91 ve %90 aktivite göstermesi önemlidir. 80°C'de enzim aktivitesinin %56'sı ve 100°C'de de aktivitenin %20 oranında devam ettiği görülmüştür. Aşırı sıcaklarda dahi aktivitenin tamamen kaybolmaması enzimin modifikasyonla iyileştirilmeye değer ve ilerde endüstrinin farklı alanlarında kullanım potansiyelinin olduğunu göstermiştir. Ayrıca rekombinant enzimin asidik pH'da stabil olması da endüstrideki atık suların temizlenmesinde kullanılabileceğini düşündürmüştür. Fe ilavesi klonlanan enzim aktivitesini olumlu yönde arttırmıştır. Bu da rekombinant enzimin demir işletmeciliğinde ilerde kullanılmak üzere geliştirilmeye değer olduğunu göstermiştir. Son olarak farklı boyar maddelerin gideriminde etkinliğe sahip olması da dikkat çekicidir. Ancak enzimin modifikasyonlar yapılarak iyileştirilmesi gerekmektedir. Örneğin, enzimin daha verimli olabilmesi için site direct mutation çalışmalarından faydalanılarak enzim genindeki aktif bölgede bir kaç aminoasitte değişiklik yapıp enzimin daha verimli olması sağlanabilir.

Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre; rekombinant enzimin zeytin karasuları, fenolik kirliliklerin temizlenmesi, atık sularda boya giderimi veya maden işletmeciliği gibi endüstrinin farklı alanlarında kullanılma potansiyelinin detaylı olarak araştırılmasının uygun olacağı düşünülmüştür.



## 7. KAYNAKLAR

- Aminfarzaneh, H., “Siyanobakterilerde bitki büyüme düzenleyicilerin biyokütle üretimi ve pestisit giderimi üzerine etkisi ”, Doktora Tezi , Ankara Üniversitesi Açık Erişim Sistemi, (2010).
- Ardıç, İ., Ters ozmos zeytin karasuyu arıtma tesisi , Çevre Yönetim Merkezi Makine Taşıma Teknolojileri İnş. Tarım. End. San. Tic. Ltd. Şti , ( 2009).
- Arık, B., Körlü, A.E., Duran, K., "Lakkaz enzimlerinin tekstilde kullanımları alanları", *Tekstil teknol. elektronik derg*, (2), 17-22, (2008).
- Aswini, L., Mukherjee, S., and Arunagirinathan, N., "Molecular characterization and anticancer activity of laccase from fusant strain of *pleurotus ostreatus* against huh7 hepatocarcinoma cell line", *İJIRD*, 5(10), 79-84, (2016).
- Atlow, S.C., Banadonna-Apora, L., and Klibanov, A.M., "Dephenolization of industrial wastewaters catalysed by polyphenol oxidase", *Biotechnol Bioeng*, 26 (26), 599-603, (1984).
- Bae, H.D., Yanke, L.J., Cheng, K.J., Selinger, L.B., "A novel staining method for detecting phytase activity", *J. Microbiol*, 39 (1), 17-22, (1999).
- Basto, C., Tzanov, T., and Cavaco-Paulo, A., “Combined ultrasound-laccase assisted bleaching of cotton”, *Ultrason Sonochem.*, 14(3), 350-354, (2007).
- Benny, Ch., Yona, Ch., and Yitzhak, H., “Purification and characterization of laccase from chaetomium thermophilium and its role in humification”, *Appl Environ Microbiol*, 64(9), 3175–31799, (1998).
- Bhuvaneshwari, J., Preethikaharshini, R., Amsaveni, V. and Kalaiselvi, M., “Isolation, optimization and production of laccase from *Halobacillus halophilus*”, *IJBANS*, 2 (2), 41-47,(2015).
- Bollag, D.M., Rozychki, M.D., Edelstein, S.J., Protein Methods (2nd Edt ).Viley.Liss Press,USA.414s, (1996).

Brijwani, K., Rigdon, A. and Vadlani, P.V., "Fungal laccases: production, function, and applications in food processing", *Enzyme Res*,10, (2010).

Bugg, T.D., Ahmad, M., Hardiman, E.M., and Singh, R., "The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation", *Cur. Opi. Biotechnol*,22(3),394-400,(2011).

Call, H.P., and Mucke, I., "History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (lignozym(R)-process)", *J. Biotechnol*, 53(2), 163-202, (1997).

Champagne, P.P., Ramsay, J.A., "Dye decolorization and detoxification by laccase immobilized on porous glass beads", *Bioresour. Technol*, 101(7), 2230–2235,(2010).

Chefetz, B., Chen, Y. and Hadar, Y., "Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification", *J Appl Environ Microbiol*, 64( 9) , 3175–3179,(1998).

Claus, H., "Laccases and their occurrence in prokaryotes", *Arch Microbiol*, 179 (3), 145-50, (2003).

Claus, H., "Laccases: Structure, Reactions, Distribution", *Micron*, 35 (1-2), 93-96, (2004).

Couto, S.R., *Fungal Biomolecules: Sources, Applications and recent developments, fungal laccase in the textile industry*, 5. Bölüm,(2015).

Dalfard, A.B., Khajeh, K., and Souidi, M.R., "Isolation and biochemical characterization of laccase and tyrosinase activities in a novel melanogenic soil bacterium", *Enzyme Microb. Technol.*, 39 (7), 1409– 416, (2006).

De Angelis, M., Gallo, G., Corbo, M.R., Mcsweeney, P.L., Faccia, M., Giovine, M., and Gobbetti, M., "Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of a phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* cb1", *Int J Food Microbiol*, 87(3):259-70, (2003).

Demissie, A.G. and Kumar, A., “ Isolation of novel bacterial isolate form soil for production of extra-cellular laccase enzyme”, *Int. J. Emr. Tech. Adv. Engg*,4(11), 404-407, ( 2014).

Desai, S.S. and Nityanand, C., “Microbial laccases and their applications”, A Review, *Asian J. Biotechnol.*, 3(2), 98-124, (2011).

Desai,S.A., "Isolation and characterization of laccase producing bacteria from contaminated sites" *J. Biosci. Biotechnol. Discov.*, 8(3), 567-573, (2017).

Dittmer, N.T., Suderman, R.J., Jiang, H., Zhu, Y.C., Gorman, M.J., Kramer, K.J., et al., “Characterization of cdnas encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the *tobacco hornworm, manduca sexta*, and the *malaria mosquito, anopheles gambiae*”, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34(1), 29-41, (2004).

Duran, N., and Esposito, E., “Potential applications of oxidative enzymesand phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment”, A Review, *Appl Catal B*, 28(2), 83–99, (2000).

Dwivedi, U.N., Singh, P., Pandey, V.P., and Kumar, A., “Structure–function relationship among bacterial, fungal and plant laccases”, *J. Mole. Cat. B. Enz.*, 68 (2), 117–128, ( 2011).

Enguita , F. J ., Marçal , D., Martins , L. O., Grenha , R., Henriques , A. O., Lindley , P. F., and Carrondo , M. A., " Substrate and dioxygen binding to the endospore coat laccase from *bacillus subtilis*", *J. Biol. Chem.*, 279(22), 23472-6, (2004).

Enguita , F.J., Martins , L.O., Henriques , A.O., and Carrondo , M.A., “Crystal structure of a bacterial endospore coat component. a laccase with enhanced thermostability properties”, *J. Biol. Chem.*, 278(21), 19416-25, (2003).

Feng,B.Z., and Li,P., “Cloning, characterization and expression of a novel laccase gene pclac2 from *phytophthora capsici*”, *Braz. J. Microbiol.*, 45(1), 351-7, (2014).

Fu, S., Sun, J., Qian, L., and Li, Z., “*Bacillus* phytases: present scenario and future perspectives”, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 151(1), 1-8, (2008).

Garavaglia , S., Cambria , M.T., “Miglio , M., Ragusa , S., Iacobazzi , V., Palmieri , F., et. al., “The structure of rigidoporus lignosus laccase containing a full complement of copper ions, reveals an asymmetrical arrangement for the t3 copper pair”. *J. Mol. Biol.*, 342(5), 1519-31, (2004).

Gemci , HF., " Türkiye’de Tekstil Piyasasi Ve Dünyadaki Yeri” Yüksek Lisans Tezi, Kadir Has Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü İşletme Ana Bilim Dalı, İstanbul, (2007).

Gianfreda, L., Xu, F. and Bollag, J.M., “Laccases a useful group of oxidoreductive enzymes”. *Bioremediat. J.*, 3(1), 1-26, (1999).

Giardina , P., Faraco , V., Pezzella , C ., Piscitelli , A., Vanhulle , S., and Sannia , G., “Laccases: a never ending story”, *Cell Mol. Life Sci.*, 67(3), 369–385, (2010).

Göksel, N., “Kanalizasyon şebekesine verilecek endüstriyel atık suların ön arıtımı ve evsel atık suların arıtımında kullanılan prosesler/teknolojiler ile bu proseslerin seçim kriterleri denizli ve adana organize sanayi bölgesi merkezi atık su arıtma tesisi örnekleri” Çevre Mühendisliği Bölümü Endüstriyel Atık Su İzleme Ve Kontrolü Eğitim Semineri GAP İdaresi, Ankara (2005).

Guan, Z.B., Zhang, N., Song, C.H.M., Zhou, W., Zhou, L.X., et al., “Molecular cloning, characterization, and dye-decolorizing ability of a temperature and pH-stable laccase from *Bacillus subtilis* x1”, *Appl Biochem Biotechnol* , 172( 3), 1147–1157,(2014).

Guerra , R., “Ecotoxicological and chemical evaluation of phenolic compounds in industrial effluents”, *Chemosphere*, 44 (8), 1737-1747, (2001).

Hajipour, Orkideh, and Dinçer, Sadık., “Cloning and expression of phytase from *Bacillus* sp. ”, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova University Institute Of Natural And Applied Sciences Department Of Biotechnology, Adana, (2015).

Hans Lineweaver, H., and Burk, D., “The determination of enzyme dissociation constants” *J. Am. Chem. Soc.*, 56(3), 658-666, (1934).

Hublik, G., and Schinner, F., "Characterization and immobilization of the laccase from *pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants", *Enzyme Microb Technol*,27(3-5),330-336,(2000).

Imran, M., Asad, M.J., Hadri ,S.H., and Mehmood, S., "Production and industrial applications of laccase enzyme", *J. Mol. Cell Biol*,10(1), 1-11,( 2012).

Jolival, C., Brenon, S., Caminade, E., Mougin, C., and Pontie, M ., "Immobilization of laccase from *trametes versicolor* on a modified pvdf microfiltration membrane: characterization of the grafted support and application in removing a phenylurea pesticide in wastewater", *J. Membr. Sci.*, 180(1), 103–113, (2000).

Kalyani, D., Dhiman, S.S., Kim, H., Jeya, M., Kim,I.W., and Lee, J.K., "Characterization of a novel laccase from the isolated *coltricia perennis* and its application to detoxification of biomass", *Process Biochem*, 47( 4), 671-678, (2012).

Kaplan , F., ve Hesenov , A., "Zeytin Kara Suyundaki Toksik Fenolik Bileşiklerin Farkli Karbon Elektrotlar Kullanılarak Elektro-Fenton Yöntemi İle Parçalanmaları", *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Cilt:17-670 (2008).

Karacakaya, P., Kilic, N.K., Duygu, E., and Donmez, G., "Stimulation of reactive dye removal by *Cyanobacteria* in media containing triacontrol hormonej", *J Hazard Mater*, 172(2-3) , 1635-1639, (2009).

Karam, J. and Nicell, J.A., "Potential applications of enzymes in waste treatment", *J Chem Technol Biotechnol*, 69(2),141 – 153, (1997).

Kırıl Mert, B., Kestioğlu, K., ve Yalılı Kılıç, M., "Zeytinyağı endüstrisi atıksularının kimyasal arıtmasonrası evsel atıksularla birlikte arıtılabilirliğinin respirometrik yöntemle araştırılması", *Ekoloji Çevre Dergisi*,17(66), 39-46, (2008).

Kohashi, P.Y., Kumagai, T., Matoba, Y., Yamamoto, A., Maruyama, M., and Sugiyama M., "An efficient method for the overexpression and purification of active tyrosinase from *streptomyces*", *Castaneoglobisporu*, 34(2), 202-207, (2004).

Koschorreck. K., Richter, SM., Ene, A.B., Roduner, E., Schmid, R.D., and Urlacher,V.B., "Cloning and characterization of a new laccase from *Bacillus*

*licheniformis* catalyzing dimerization of phenolic acids”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 79(2), 217–224, (2008).

Kunamneni , A., Plou , F.J., and Ballesteros , A., “ Laccases and their applications”, *a patent review alcalde mrecent pat biotechnol*, 2(1), 10-24, (2008).

Leonowicz ,A., Cho ,N.S., Luterek ,J., and Wilkolazka ,A., Wojtas-Wasilewska,M., Matuszewska, A., Hofrichter ,M., Wesenberg ,D., Rogalski ,J.J., “Fungal laccase: properties and activity on lignin”, *Basic Microbiol*, 41(3-4),185-227,(2001).

Martins, L.O., Soares, C.M., Pereira,M.M., Teixeira, M., Costa, T., and Jones, G.H., “Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *bacillus subtilis* endospore coat”., *J Biol Chem*, 277(21), 18849-59, (2002).

Mayer, A.M., and Staples, R.C., “Laccase: new functions for an old enzyme”, *Phytochem.*, 60(6), 551-565,( 2000).

Messerschmidt, A., and Huber, R., “The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin. modelling and structural”, *Eur. J. Biochem.*, 187(2), 341-52, (1990).

Minussi, R.C., Miranda, M.A., Silva, J.A., Ferreira, C.V., Aoyama, H., Marangoni, S., ve Diğ., “Purification, characterization and application of laccase from *trametes versicolor* for colour and phenolic removal of olive mill wastewater in the presence of 1hydroxybenzotriazole”, *Afr. J. Biotechnol*, 6 (10), 1248-1254, (2007).

Miyazaki, A., Amano, T., Saito, H., and Nakano, Y., “Acute toxicity of chlorophenols to earthworms using a simple paper contact method and comparison with toxicities to fresh water organisms”, *Chemosphere*, 47(1), 65-69, (2002).

Mojsov, K.D., “Biotechnological applications of laccase in the textile industry”, *Advanced Technologies*, 3(1), 76-79, (2014).

Mukhopadhyay, A., Dasgupta, A.K., and Chakrabarti, K., “Thermostability, pH stability and dye degrading activity of a bacterial laccase are enhanced in the presence of cu<sub>2</sub>o nanoparticles”, *Bioresour. Technol.*, 127, 25–36, (2013).

Narayanan, P.M., Murugan, S., Eva, A.S., Devina, S.U., and Kalidass, S., "Application of immobilized laccase from *Bacillus subtilis* mtcc 2414 on decolourization of synthetic dyes", *Res. J. Microbiol*, 10(9),421-432,(2015).

Naz, S., Devatare, S., Satapathy, S., and Gupta, S., "Study of lignolytic bacteria isolation and characterization from dhamdha agro field of bhilaidurg region", *Int. J. Res. Engg. Tech.*, 04(02), 258-262, ( 2015).

Nguyen, Th.Th., Quyen, Th.D., and Le, H.Th., "Cloning and enhancing production of a detergent- and organic-solvent-resistantn attokinase from *Bacillus subtilis* vtcc-dvn-12-01 by using an eight-protease-gene-deficient *Bacillus subtilis* wb800". *Microb Cell Fact.*, 10(12), 79, (2013).

Nosanchuk , J.D., and Casadevall , A., "The contribution of melanin to microbial pathogenesis", *Cell Microbiol*, 5(4), 203-23,(2003).

Özçırak, Ş., "Beyaz Çürükçül Funguddan Mangan Peroksidaz Ve Lakkaz Enzim Üretimlerinin İncelenmesi" Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, (2012).

Öztürk, F., Yalçın, M., ve Dıraman, H., "An overview on the olive oil economy of turkey", *EJFT*, 12(2), 35-51, (2009).

Peter, J.K., Priyam, V., Masih, H., and Kuma, Y., " Production optimization and partial purification of laccases from bacterial consortium", *Int. J. Eng. Res. Tech.*, 03(06), 458-465, (2014).

Pezzella, C., Giacobbe,S., Giacobelli,V.G., Guarino,L., and Kylic,S., " Green routes towards industrial textile dyeing: a laccase based approach" *J. Mol. Catal. B Enzym*, 134, 274-279, (2016).

Pinar, O., Tamerler, C., and Yazgan Karataş, A., "Heterologous expression and characterization of a high redox potential laccase from *Coriopsis polyzona* mucl 38443", *Turk J. Biol.*, 41, 278-291, (2017).

Puyet, A., Sandoval, H., López, P., Aguilar, A., Martín, J.F., and Espinosa, M., “A simple medium for rapid regeneration of *Bacillus subtilis* protoplasts transformed with plasmid dna”, *FEMS Microbiol, Lett*, 40(1), 1-5, (1987).

Quan, C.S., Fan, S.D., Zhang, L.H., Wang, Y.J., and Ohta, Y., “Purification and properties of a phytase from *Candida krusei* wz-001”, *J Biosci Bioeng*, 94(5), 419-25, (2002).

Quintanar, L., Yoon, J., Aznar, C.P., Palmer, A.E., Andersson, K.K., Britt, R.D., et al., “Spectroscopic and electronic structure studies of the trinuclear Cu cluster active site of the multicopper oxidase laccase: nature of its coordination unsaturation”, *J. Am. Chem. Soc*, 127(40), 13832–13845, (2005).

Ranocha, P., McDougall, G., Hawkins, S., Raja, S., Borderies, G., Stewart, D., Cabanes, M.M., Boudet, A.M., and Goffner, D., “Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases—a divergent gene family—in poplar”, *Eur. J. Biochem*, 259(1-2), 485-495, (1999).

Ravikumar, G., Kalaiselvi, M., Gomathi, D., Devaki, K. and Uma, C., “Cloning, expression in *E. coli* and the enzymatic properties of laccase from *Hypsizygus ulmarius*”, *World J Pharm Pharm Sci*, 3, 493-505, (2013).

Reiss, R., Ihssen, J. and Thony, M.L., “*Bacillus pumilus* laccase: A heat stable enzyme with a wide substrate spectrum”, *BMC Biotechnol*, 11(9), 9-19, (2011).

Rodríguez Couto, S. and Toca Herrera, J.L., “Industrial and biotechnological applications of laccases”, *Biotechnol Adv*, 24(5), 500-13, (2006).

Sambasiva, R., Tripathy, N.K., Mahalaxmi, Y. ve Prakasham, R.S., “Laccase- and peroxidase-free tyrosinase production by isolated microbial strain”, *Microb. Biotechnol.*, 22(2), 207-214, (2012).

Sambrook, J., Fritsch, E.F. ve Maniatis, T., *Molecular cloning. a laboratory manual*, New York Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3rd Ed (2001).

Sharma, P., Goel, R. and Caplash, N., “Bacterial laccases”, *World Jmicrobiol Biotechnol*, 23, 823-832, (2007).



Shrestha, P., Joshi, B., Joshi, J., Malla, R. and Sreerama, L., “Isolation and physicochemical characterization of laccase from *ganoderma lucidum*-cdbt1 isolated from its native habitat in nepal”, *Biomed Res Int*, 10,(2016).

Singh, G., Bhalla, A., Kaur, P., Capalash, N. and Sharma, P., “Laccase from prokaryotes: a new source for an old enzyme”. *Rev Environ Sci Biotechnol*, 10(4), 309–326, (2011).

Soden, D.M., Callaghan, J.O. and Dobson, A. D. W., , “Molecular cloning of a laccase isozyme gene from *pleurotus sajor-caju* and expression in the heterologous *pichia pastoris* host”, *Microbiology*, 148, 4003–4014, (2002).

Solomon, E. I., Sundaram, U. M. and Machonkin, T. E., “ Multicopper oxidases and oxygenases”, *Chem. Rev*, 96(7), 2563–2605, (1996).

Solomon, E.I., Baldwin, M.J. and Lowery, M.D., “Electronic structures of active sites in copper proteins: contributions to reactivity”, *Chem. Rev*, 92,(4) 521- 542, (1992).

Stoilova, I., Krastanov, A. and Stanchev, V., “ Properties of crude laccase from *trametes versicolor* produced by solid-substrate fermentation”, *Adv Biosci Biotechnol*, 1(3), 208-215, (2010).

Temizkan, G. ve Arda, N., *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji Ve Genetik Mühendisliği Araştırma Ve Uygulama Merkezi, 345 (2008).

Torres-Duarte, C., Roman, R., Tinoco, R. and Vazquez-Duhalt, R., “Halogenated pesticide transformation by a laccase-mediator system”, *Chemosphere*, 77(5), 687-92, (2009).

Tsioulpas, A., Dimou, D., Iconomou, D. and Aggelis, G., “Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains of *pleurotus* spp. in respect to their phenol oxidase (laccase) activity”, *Bioresour. Technol.*, 84(3), 251–257, (2002).

Türkiye Cumhuriyeti-Ekonomi Bakanlığı, "Proje Ve İş Geliştirme Birimi Sanayi Bölgesi İAOSB Haber Dergisi" (2012).

Tzanov, T., Basto, C., Gübitz, G.M. and Artur Cavaco-Paulo, A., “Laccases to improve the whiteness in a conventional bleaching of cotton”, *Macromol. Mater. Eng.*, 288(10), 807 – 810, (2003).

Vantamuri, A. B., and Kaliwal, B. B., “Purification and characterization of laccase from *marasmius* species bbkav79 and effective decolorization of selected textile dyes”, *3 Biotech*, 6(2),189, (2016).

Vantamuri, A.B., Adhoni, S.A., Dadakhalandar Nadaf, P., Shivanand Payamalle, Sh., Sanjotha, K.G. and Manawadi, S.İ., “Isolation and characterization of laccase producing fungi from different environmental samples ” *Int. J. Recent Sci. Res.*, 6(10), 6853-6857, (2015).

Vivekanandan, K.E., Sivaraj,S. and Kumaresan, S., “Characterization and purification of laccase enzyme from *Aspergillus nidulans* casvk3 from vellar estuary south east coast of india”, *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 3(10) 213-227, (2014).

Wang, T.N. and Zhao, M.A ., “Simple strategy for extracellular production of cota laccase in *escherichia coli* and decolorization of simulated textile effluent by recombinant laccase”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 101(2),685-696,(2017).

Wang, Ch.L., Zhao, M., Li, D.B., Cui, D.Z., Lu, L. and Wei, XD., “ Isolation and characterization of a novel *Bacillus subtilis* WD23 exhibiting laccase activity from forest soil” , *Afr. J. Biotechnol.*, 9(34), 5496-5502, 23, ( 2010) .

Wang, C.H.L., Zhao, M., Lu, L., Wei, X.D. and Li, T.L., “Characterization of spore laccase from *Bacillus subtilis* WD23 and its use in dye decolorization”, *Afr. J. Biotechnol.*, 10(11), 2186-2192, 14, ( 2011).

Williamson, P.R., “Laccase and melanin in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*”, *Front Biosci.*, 1(2), 99-107, (1997).

WTO (World Trade Organization) , [Http://Www.Wto.Org](http://Www.Wto.Org)(2003).

Yeşilada, Ö., Birhanli, E., Ercan, S. and Özmen, N., “Reactive dye decolorization activity of crude laccase enzyme from repeated-batch culture of *funalia trogii*”, *Turk J. Biol.*, 38(1), 103-110, (2014).

Zeng, S.H., Qin, X. and Xia, L., “Degradation of the herbicide isoproturon by laccase-mediator systems”, *Biochem. Eng. J.*, 119, 92–100, (2017).

# **EKLER**

## **8. EKLER**

### **8.1 SDS-PAGE Elektroforezi İçin Kullanılan özeltiler**

#### **8.1.2 Solüsyon A (akrilamid/ bisakrilamid çözeltisi)**

29, 2 g akrilamid ile 0,8 g bisakrilamid distile suda çözölmüş ve son hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır (Temizkan ve diğ. 2008).

#### **8.1.3 Solüsyon B**

75 mL Tris-HCl (2M; pH 8,8) ile 4 mL SDS (%10'luk) karıştırılmıştır ve 21 mL distile su ilavesi ile 100 mL'ye tamamlanmıştır (Bollag ve diğ. 1996).

#### **8.1.4 Solüsyon C**

50 mL Tris-HCl (1M; pH 6, 8) ile 4 mL SDS (%10'luk) karıştırılmıştır ve 46 mL distile su ilave ederek son hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır (Bollag ve diğ. 1996).

#### **8.1.5 %10'luk SDS**

10 gram SDS 50 mL distile suda çözölmüştür ve son hacim 100 mL'ye tamamlanır.

#### **8.1.6 %10'luk Amonyum Persülfat (APS)**

SDS-PAGE jelin hazırlanması aşamasında jel polimerizasyonunu başlatmak amacıyla APS kullanılmıştır. Bunun için 0, 1 gram Amonyum Persülfat 1 mL distile suda özölmüştür (Temizkan ve diğ. 2008).

#### **8.1.7 TEMED (N, N, N', N'-tetramethylene-ethylenediamine)**

SDS-PAGE jelinin polimerizasyonunu gerçekleştirmek amacıyla katalizör olarak kullanılmıştır.

Tablo 8.1 SDS-PAGE Elektroforezi için Kullanılan Çözeltiler

Jel içeriği	Ayrıştırma jeli	Yükleme Jeli
Solüsyon A (mL)	8	1,5
Solüsyon B (mL)	5	0
Solüsyon C (mL)	0	2,25
Distile su (mL)	7	5,25
APS ( $\mu$ L)	100	30
TEMED ( $\mu$ L)	10	7,5

### 8.1.8 Örnek Yükleme Tamponu

75 mg Tris 5 mL suda çözüldükten sonra HCl ile pH 6, 8'e ayarlanmıştır. Ardından 1 mL gliserol, 5 mg bromfenol mavisi, 200 mg SDS ve 85  $\mu$ L 2- $\beta$ -merkaptotanol ilave edilerek son hacim distile su ile 10 mL'ye tamamlanmış ve çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır (Bae ve diğ. 1999).

### 8.1.9 Yürütme Tamponu

3 gram Tris, 14,4 gram glisin ve 1 gram SDS bir litre saf suda çözülmüştür ve hazırlanan tampon 4°C'de saklanmıştır (Temizkan ve diğ. 2008).

### 8.1.10 Coomassie Brilliant Blue R-250 Boyama Çözeltisi

Coomassie Brilliant Blue (1 gram), metanol (500 ml)'de çözülmüş ve asetik asit (100 mL) ilave edildikten sonra distile su ile son hacim 1 litreye tamamlanmıştır (Temizkan ve diğ. 2008). Hazırlanan tampon SDS-PAGE jelindeki proteinleri boyamak için kullanılmıştır.

### 8.1.11 Yıkama Tamponu

Metanol (100 mL), asetik asit (100 mL) ve distile su (800 mL) ile hazırlanan tampon SDS-PAGE jelindeki fazla boyanın uzaklaştırılması için kullanılmıştır (Temizkan ve diğ. 2008).

## **8.2 Zimogram Analizi İçin Kullanılan Çözeltileri**

### **8.2.1 %1 Triton X-100**

1 mL Triton X-100, 99 mL suda çözünerek hazırlanmıştır (Bae ve diğ. 1999).

### **8.2.2 Zimogram Analizi İçin Kullanılan 0,1 M Sodyum-asetat Tamponu (pH 6,6)**

2,72 gram Na-asetat 200 mL distile suda çözüldükten sonra asetik asit kullanarak pH'sı 6,6'ya ayarlanmıştır (Bae ve diğ. 1999).

### **8.2.3 Zimogram Analizi İçin Kullanılan Guaiacol Çözeltileri**

0,21 gram Guaiacol (2mM), 0,0515 gram CuSO<sub>4</sub> (1,5 mM) 25,0 mL suda çözünerek hazırlanmıştır.

## **8.3 Enzimin pH Aktivitesi ve pH Stabilitesini Belirlemek İçin Kullanılan Tamponlar**

### **8.3.1 Sitrat Tamponu**

Lakkazın pH 3,0-5,8 aralığındaki aktivitesini belirlemek için kullanılmıştır. Tamponun hazırlanmasında 0,1 M sitrik asit, 0,1 M sodyum sitrat distile su ile arzu edilen pH değerindeki tamponu hazırlamak için Tablo 2,6'de verilen oranlarda karıştırılarak hazırlanmıştır (Temizkan ve diğ. 2008).

Tablo 8.2 Sitrik Asit Tampon Çözeltisi Oranları

<b>pH</b>	<b>0,1 M sitrik Asit (mL)</b>	<b>0,1 M sodyum sitrat (mL)</b>
3,0	46,5	3,5
3,4	40,0	10,0
3,8	35,0	15,0
4,2	31,5	18,5
4,6	25,5	24,5
5,0	20,5	29,5
5,4	16,0	34,0
5,8	11,8	38,2

### 8.3.2 Tris-Maleat Tamponu

Lakkaz enzimin 6,2-7,4 pH aralığındaki aktivitesini belirlemek için hazırlanmıştır. Bunun için 0,2 M Tris-Maleat; 3,63 gram Tris (24,2 g/L), 3,48 gram Maleik asit (23,2 g/L) distile suda 150 mL'ye tamamlanmıştır. 0,2 M NaOH (8 g/L); 0,8 gram NaOH, 100 mL distile suda çözünerek hazırlanmıştır. Hazırlanmış olan çözeltilerden istenilen pH değerine sahip tamponlar Tablo 2.7'de verilen miktarlarda hazırlanmıştır (Temizkan ve diğ. 2008).

Tablo 8.3 Tris-Maleat Tampon Çözeltisi

<b>pH</b>	<b>0,2 M Tris-maleat (mL)</b>	<b>0,3 M NaOH (mL)</b>
6,2	25	15,75
6,6	25	21,25
7,0	25	24
7,4	25	27



### 8.3.3 Karbonat-Bikarbonat Tamponu

Lakkaz enzimin 9,2-10,7 pH aralığındaki aktivitesini belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Tampon hazırlamak için 0,2 M sodyum karbonat çözeltisi ile 0,2 M sodyum bikarbonat çözeltisi distile suda gereken pH değerini hazırlamak için Tablo 2.8'te verildiği gibi kullanılmıştır (Temizkan ve diğ. 2008).

#### 8.4 Karbonat-Bikarbonat Tampon Çözeltisi

pH	0,2 M Sodyum karbonat mL	0,2 M Sodyum bikarbonat mL
9,2	0,4	4,6
9,6	1,6	3,4
10	2,75	2,25
10,4	3,85	1,15
10,7	4,5	0,5

## 9. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : ORKIDEH HAJIPOUR

Doğum Yeri ve Tarihi : IRAN-23/4/1988

Lisans Üniversite : TONEKABON AZAD ÜNİVERSİTESİ

Y. Lisans Üniversite (varsa) : ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

Elektronik posta : orkideh.hajipoor88@yahoo.com

İletişim Adresi : Güney mahallesi Bahar sokak Likman park A blok 5. kat 89 No Zonguldak Türkiye

### Yayın Listesi

**Hajipour, O.**, Mercan Doğan, N., Dinçer, S., Norizadeh Tazehkand, M. “Cloning, expression, and characterization of Novel laccase enzyme from native *Bacillus subtilis* strain OH67”. Molecular Biology. February 17, 2020, (yayına kabul edildi).

**Hajipour, O.**, Mercan Doğan., N., Dinçer, S., Norizadeh Tazehkand, M. “Dye decolorization and characterization of recombinant Novel laccase”. Revista Industria Textila. 21.01. 2020 (yayına kabul edildi).

Norizadeh Tazehkand, M., **Hajipour, O.** “ In silico Design a vaccine Candidate against *Corynebacterium diphtheriae*”. International Journal of Molecular and Clinical Microbiology 9 (1), 1082-1089 (2019).

**Hajipour, O.**, Dinçer, S. “*Bacillus* Fitazının Klonlanması”. Ç.Ü Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, 35-5 (2018).

Norizadeh Tazehkand, M., **Hajipour, O.** “Antibacterial Effect Of Brilliant Blue Food Dye”. International Journal Of Molecular And Clinical Microbiology, 7, 2, 890 - 895 (2017).

Norizadeh Tazehkand, M., Topaktas, M., **Hajipour, O.**, Valipour, E., Yilmaz, MB. “The Effects of 4-MEI on the Inhibition of Cell Proliferation, DNA Breaking and DNA Fragmentation”. Bratisl Med J; 117 (7), 371 – 375, (2016).

Norizadeh Tazehkand, M., Topaktas, M., Yilmaz, MB., **Hajipour, O.**, Valipour, E. “Delineating the Antigenotoxic and Anticytotoxic Potentials of 4-Methylimidazole against Ethyl methanesulfonate Toxicity in Bone Marrow Cell of Swiss Albino Mice”. Bratislava Medical Journal, 117 (5), 290 – 294.( 2016).

Norizadeh Tazehkand, M., Moridikia, F., Moridikia, A., **Hajipour, O.**, Valipour , E., Topaktas , M., Yilmaz, M.B . “Investigation of anticarcinogenic and antioxidant effects of 4-Methylimidazole”. Journal of Biosciences,( 2016).

Norizadeh Tazehkand, M., , Topaktas, M., **Hajipour, O.** “*In vitro* investigation of genotoxic and cytotoxic effects of mirtazapine in human peripheral blood lymphocyte”. Journal of Gorgan University of Medical Sciences. 103, 17, 2, (2015).

Norizadeh Tazehkand, M .,Topaktas, M., **Hajipour, O.**, Valipour, E. “The cytotoxic effect of mirtazapine on mitotic index, nucleus division index and proliferation index in human peripheral blood lymphocyte”. 2015 Medical Journal of Mashhad University of Medical Sciences. 58, 4, 197-203. (2015).

### **Konferans listesi**

Mostafa Norizadeh Tazehkand, **Orkideh Hajipour**, Mehmet Bertan Yılmaz, “Genetoxic and Cytotoxic effect of Salgam ”. Iran – Tehran. Razi Conference Center, February 6-9, 2019.

**Orkideh Hajipour**, Nazime Mercan Doğan, Sadık Dinçer, Mostafa Norizadeh Tazehkand, “ Decolorization of recombinant laccase from *Bacillus subtilis* ” . 20th National and 8th International Congress on Biology of Iran,2018.

**Orkideh Hajipour**, Nazime Mercan Doğan, Sadık Dinçer, Mostafa Norizadeh Tazehkand, “Enzymatic Decolorization of Textile Dyes by Laccase from *Bacillus subtilis* ” . International Symposium of Ecology, Kastamonu- Turkey 2018.

**Orkideh Hajipour**, Nazime Mercan Doğan, Sadık Dinçer, Mostafa Norizadeh Tazehkand, “Preliminary Research on Dye Decolorization by Recombinant Laccase

from *Bacillus subtilis* ” · International Symposium of Ecology, Kastamonu- Turkey 2018.

**Orkideh Hajipour**, Sadik Dincer, Ebrahim Valipour, Mostafa Norizadeh Tazehkand, “Cloning and expression of phytase gene in *Escherichia Coli* B121DE3 from native isolate *Bacillus subtilis*”. 3<sup>rd</sup> International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey (MBAOT), 2014, İzmir Institute of Technology.