



**EGE ÜNİVERSİTESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**SULU İKİLİ FAZ SİSTEMİ İLE  
*Agaricus bisporus* ATIKLARINDAN  
LAKKAZ GERİ KAZANIMI**

**Ebru GÜLEÇ**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. İhsan YAŞA**

**OBiyoloji Anabilim Dalı**

**Sunuş Tarihi: 27.08.2015**

**Bornova-İZMİR**

**2015**

**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

**SULU İKİLİ FAZ SİSTEMİ İLE  
*Agaricus bisporus* ATIKLARINDAN  
LAKKAZ GERİ KAZANIMI**

**Ebru GÜLEÇ**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. İhsan YAŞA**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Sunuş Tarihi: 27.08.2015**

**Bornova-İZMİR**

**2015**



Ebru GÜLEÇ tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan “Sulu İkili Faz Sistemi ile *Agaricus bisporus* Atıklarından Lakkaz Geri Kazanımı” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 27/08/2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

**Jüri Üyeleri:**

|                     |                    |                      |
|---------------------|--------------------|----------------------|
| <b>Jüri Başkanı</b> | <b>: Prof. Dr.</b> | <b>İhsan YAŞA</b>    |
| <b>Raportör Üye</b> | <b>: Doç. Dr.</b>  | <b>Tansel YALÇIN</b> |
| <b>Üye</b>          | <b>: Doç. Dr.</b>  | <b>Mustafa OSKAY</b> |

**İmza**

.....  
.....  
.....



## EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

### ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi / Doktora Tezi olarak sunduğum “Sulu İkili Faz Sistemi ile *Agaricus bisporus* Atıklarından Lakkaz Geri Kazanımı” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

27 / 08 / 2015



Ebru GÜLEÇ



**ÖZET****SULU İKİLİ FAZ SİSTEMİ İLE *Agaricus bisporus* ATIKLARINDAN  
LAKKAZ GERİ KAZANIMI**

Ebru GÜLEÇ

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İhsan YAŞA

Ağustos, 2015 65 sayfa

Lakkazlar (EC 1.10.3.2, benzendiol: oksijen oksidoredüktaz) fenolik bileşikleri fenoksil radikallere dönüştürebilme yeteneğine sahip olan çoklu-bakır proteinleridir. Lakkazlar 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) (ABTS) mediatörü gibi fenolik olmayan bileşikleri okside edebilme potansiyeline sahiptir. Lakkazlar, ilk defa bitkilerden izole edilmiş ancak mantarlarda ve bazı bakterilerde de bulunmuştur. Fungal lakkazlar, lignin parçalanması, sporulasyon, pigment üretimi, meyve oluşumu ve bitki patogenezi gibi süreçlere aracılık etmektedir. Lakkazların *Agaricus bisporus* atık mantar sapından salgılanan en önemli ligninolitik enzimlerin ilkidir. Bu çalışmada, *Agaricus bisporus*'un atık sap lakkazlarının geri kazanımı için düşük maliyetli sulu ikili faz sisteminin (ATPS) kullanımı araştırılmıştır. Sulu ikili faz sistemi tuz ve poli etilen glikol (PEG) polimerinden oluşmaktadır Sulu ikili faz sisteminde, PEG konsantrasyonu ve moleküler ağırlığı, tuz türü ve sistem pH parametreleri ile birlikte en iyi lakkaz konsantrasyonu belirlenerek enzim geri kazanımı sağlanmıştır.

Çalışmamızda, lakkaz enzim kaynağı olarak *Agaricus bisporus* atık mantar sapı kullanılmıştır. %12.21 kuru madde olan atık mantar sapından elde ettiğimiz ham enzim ekstraktının protein miktarı 3.9 mg/ml ve spesifik aktivitesi 13.713 U/mg olarak saptanmıştır. Sulu ikili faz sistemi ile faz hacim oranı<1.0 olan en yüksek değerlerin alındığı pH 4.60'daki kombinasyon %10 PEG-1000 / %12.5 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / %1 ham enzim ekstraktı karışımıyla, enzimin protein miktarı 0.46 mg/ml aktivitesi 16.144 U/mg , saflaştırma katsayısı 1.20, enzim geri kazanımı

%94.06 ve %86'lık verim ile saflaştırılmıştır. Ultrafiltrasyon sonucu protein miktarı 1.1 mg/ml aktivitesi 24.171 U/mg olduğu görülmüştür. Enzim başlangıç ham enzim ekstraktına göre 1.76 kat saflaştırılmıştır.

**Anahtar sözcükler:** Sulu ikili faz sistem, *Agaricus bisporus*, Lakkaz geri kazanımı.

**ABSTRACT****RECOVERY OF LACCASE FROM *Agaricus bisporus* WASTE BY  
AQUEOUS TWO PHASE SYSTEM**

GULEC, Ebru

Master of Science Thesis, Biology Department

Supervisor: Prof. Dr. YAŞA İhsan

August 2015, 65 pages

The laccases (EC 1.10.3.2, benzenediol: oxygen oxidoreductase) are members of the multi-copper protein family that are capable of oxidation phenolic compounds to phenoxyl radicals. In the presence 2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) (ABTS) mediator, laccases has potential of oxidation of nonphenolic compounds. First time, laccases were isolated from plants but were founded in fungi and some bacteria. Fungal laccases facilitated several processes such as lignin degradation, sporulation, pigment production, fruiting body formation and plant pathogenesis. Laccases are known as the first and main ligninolytic enzymes secreted by *Agaricus bisporus* in spent mushroom stipe. In our work, to recovery of laccase from the residual mushroom stipe of *Agaricus bisporus*, a low cost aqueous two-phase systems (ATPS) were evaluated. ATPS was assembled from a mixture of polymers such as poly ethylene glycol (PEG) and salts. By evaluation of molecular mass, concentration of PEG, type of salt and system pH parameters, the best laccase concentrates in the aqueous two-phase systems (ATPS) were determined.

In this study, PEG 1000 and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ATP System established to be appropriate for the primary recovery of laccase. An extraction of spent mushroom stipe from % 12.21 dry matter, amount of protein 3.9 mg/ml, enzyme activity 13.713 U/ml, ATPS stage comprising volume ratio <1.0, PEG 1000 10% (w/w), Sulphate 12.5% (w/w), system pH of 4.6 and loaded with 1% (w/w) of crude extract from residual mushroom stipe allowed the laccase recovery. The ATPS

resulted in one-single primary recovery stage process produced an overall yield of 86%. Amount of protein 0.46 mg/ml, enzyme activity 16.144 U/ml, purification fold 1.20 and enzyme recovery %94.06 were determined. After ultra filtration, amount of protein and enzyme activity were resulted 1.1 mg/ml and 24.171 U/mg, respectively. According to these results, final enzyme extract were 1.76 fold purified more than crude enzyme extract.

**Keywords:** Aqueous two phase system, *Agaricus bisporus*, recovery of laccase.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmamın tüm aşamalarında bana kıymetli görüş ve katkılarıyla yol gösteren değerli hocam sayın Prof. Dr. İhsan YAŞA'ya, çalışmalarım sırasında destek veren Biyoloji bölümü yüksek lisans öğrencileri Gizem ÇELİK, Mert KEÇECİ, Doğukan GÜL, Doktora öğrencileri Merve DİLMAÇ AYDIN'a ve Nazenin EFTAKHARİ'ye, destek ve cesaretlendirmeleriyle yanımda olan dost ve arkadaşlarıma, beni yetiştiren ve bugünlere gelmemi sağlayan her zaman yanımda olduklarını hissettiğim ışıklar içindeki aileme, çok teşekkür ederim



## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

|                                                                   |       |
|-------------------------------------------------------------------|-------|
| ÖZET .....                                                        | vii   |
| ABSTRACT .....                                                    | ix    |
| TEŞEKKÜR .....                                                    | xi    |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                             | xvi   |
| ÇİZELGELER DİZİNİ.....                                            | xviii |
| 1. GİRİŞ .....                                                    | 1     |
| 2. LİTERATÜR ÖZETİ.....                                           | 3     |
| 2.1 Lakkazın Yapısı ve Fonksiyonel Özellikleri .....              | 3     |
| 2.2 Lakkaz Kaynakları.....                                        | 8     |
| 2.3 Mantar Atıklarının Değerlendirilmesi .....                    | 9     |
| 2.4 Lakkaz Enziminin Kullanım Alanları.....                       | 10    |
| 2.5 Sulu İkili Faz Sistemi (Aqueous Two Phase System; ATPS) ..... | 13    |
| 2.5.1 Faz diyagramları, binodiyal eğri, tie-line hatları .....    | 15    |
| 2.5.2 Dağılma katsayısı (k).....                                  | 19    |
| 2.5.3 Dağılma mekanizması .....                                   | 19    |
| 2.5.4 Protein dağılımını etkileyen parametreler .....             | 21    |
| 2.5.5 Sulu ikili faz sisteminin uygulama alanları .....           | 23    |

## İÇİNDEKİLER (devam)

|                                                                                        | <u>Sayfa</u> |
|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 3. MATERYAL VE METOD.....                                                              | 25           |
| 3.1 Materyal .....                                                                     | 25           |
| 3.2 Kimyasallar .....                                                                  | 25           |
| 3.3 Cihazlar .....                                                                     | 26           |
| 3.4 Çözeltiler.....                                                                    | 27           |
| 3.5 Atık Mantar Saplarının Temizlenmesi ve Liyofilizasyonu.....                        | 28           |
| 3.6 Ham Enzim Ekstraktının Hazırlanması ve Ekstraksiyon Veriminin<br>Belirlenmesi..... | 29           |
| 3.7 Lakkaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....                                             | 29           |
| 3.8 Protein Miktarının Belirlenmesi.....                                               | 30           |
| 3.9 Lakkazın ATPS ile Kısmi Saflaştırılması .....                                      | 31           |
| 3.9.1 Sulu ikili faz sistemi.....                                                      | 31           |
| 3.9.2 Tuz türü ve konsantrasyonu .....                                                 | 31           |
| 3.9.3 PEG molekül kütlesi ve konsantrasyonu .....                                      | 32           |
| 3.9.4 Ham enzim ekstrakt konsantrasyonu .....                                          | 32           |
| 3.9.5 Dağılım parametreleri .....                                                      | 32           |
| 3.9.6 PEG fazından enzimin alınması .....                                              | 34           |

## İÇİNDEKİLER (devam)

### Sayfa

|                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------|----|
| 3.10 Lakkaz aktivitesine bazı parametrelerin etkisi .....     | 34 |
| 3.10.1 pH etkisi.....                                         | 34 |
| 3.10.2 Sıcaklık etkisi.....                                   | 34 |
| 3.10.3 Kararlılık testleri.....                               | 35 |
| 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....                                 | 36 |
| 4.1 Sulu İkili Faz Sistemi .....                              | 38 |
| 4.1.1 Tuz türünün ve oranının belirlenmesi.....               | 39 |
| 4.1.2 PEG molekülünün kütlesi ve oranının belirlenmesi .....  | 43 |
| 4.1.3 Ham Enzim Ekstrakt Konsantrasyonunun Belirlenmesi ..... | 45 |
| 4.1.4 Lakkaz enziminin ultrafiltrasyonu .....                 | 46 |
| 4.2 Lakkaz enziminin karakterizasyonu .....                   | 46 |
| 4.2.1 pH etkisi.....                                          | 46 |
| 4.2.2 Sıcaklık etkisi.....                                    | 47 |
| 4.2.3 Kararlılık testleri sonuçları .....                     | 48 |
| KAYNAKLAR DİZİNİ.....                                         | 53 |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                                | 65 |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

| <u>Şekil</u>                                                                                                                                                                                              | <u>Sayfa</u> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 2.1. <i>Bacillus.subtilis</i> lakkazının bakır merkezleri .....                                                                                                                                           | 4            |
| 2.2. Farklı organizmalar tarafından üretilen çoklu-bakır içeren oksidazların genel katlanmalarını gösteren kurdela modelleri.....                                                                         | 5            |
| 2.3. Yüksek OPS değerleri ile kalıntıların lokasyonlarını gösteren (sarı) <i>Bacillus subtilis</i> CotA protein yapısının kurdela modeli .....                                                            | 6            |
| 2.4. Fungal lakkaz enzimlerinin katalitik mekanizması .....                                                                                                                                               | 7            |
| 2.5. Japon lake ağacı ( <i>Rhus vernicifera</i> ) .....                                                                                                                                                   | 8            |
| 2.6. PEG-Tuz Sulu ikili faz sistemi(ATPS) .....                                                                                                                                                           | 15           |
| 2.7. Faz diyagramı; TCB = Binodal curve, C = Kritik nokta, TB = Tie line, T = Üst faz kompozisyonu, B = Alt faz kompozisyonu, ve X, Y and Z = Sulu ikili faz sisteminde toplam kompozisyon .....          | 16           |
| 2.8. Binodiyal eğri metodları.....                                                                                                                                                                        | 17           |
| 2.9. PEG-Tuz sistemlerinde biyomoleküllerin dağılımı.....                                                                                                                                                 | 22           |
| 4.1. <i>Agaricus bisporus</i> , (a) Kültür odalarında kompostta yetişmiş hali, (b) AMS'lerinin atık mantar kompostundan ayrılmış hali, (c) temizlenip liyofilize edilmiş AMS'lerinin öğütülmüş hali ..... | 36           |
| 4.2. Ham enzim ekstraktlarının, ekstraksiyon verimi ve aktivitesi (U/ml) .....                                                                                                                            | 37           |
| 4.3. Ham enzim ekstraktlarının, ekstraksiyon verimi ve protein miktarı (mg/ml).....                                                                                                                       | 37           |

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

| <u>Şekil</u>                                                                                                                                                                                            | <u>Sayfa</u> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 4.4. Bradford yöntemi ile BSA kullanılarak hazırlanan protein standart grafiği.....                                                                                                                     | 38           |
| 4.5. AMS lakkaz ekstraktından PEG-1000/Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ikili faz sistemi ile lakkaz ayırımında Tuz konsantrasyonunun, enzim geri kazanımı ve saflaştırma katsayısı üzerine etkisi ..... | 42           |
| 4.6. AMS lakkaz ekstraktından PEG-1000/Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ikili faz sistemi ile lakkaz ayırımında PEG konsantrasyonunun geri kazanıma etkisi.....                                          | 44           |
| 4.7. Ham enzim ekstraktının %10 PEG-1000 / %12.5 Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> sulu ikili faz sisteminde enzim geri kazanımına etkisi .....                                                           | 45           |
| 4.8. <i>Agaricus bisporus</i> AMS'dan elde edilen lakkaz aktivitesinin pH değişimi.....                                                                                                                 | 46           |
| 4.9. <i>Agaricus bisporus</i> AMS'dan elde edilen lakkaz aktivitesinin sıcaklık değişimi .....                                                                                                          | 47           |
| 4.10. <i>Agaricus bisporus</i> AMS'dan elde edilen lakkaz aktivitesinin pH 4.0-9.0'larda 10 günlük pH değişimi .....                                                                                    | 49           |
| 4.11. <i>Agaricus bisporus</i> AMS'dan elde edilen lakkaz aktivitesin 20-70°C'lerde 24 saatlik (0,1, 2, 4, 8, 16, 24) sıcaklık değişimi .....                                                           | 50           |
| 4.12. <i>Agaricus bisporus</i> AMS'dan elde edilen lakkaz aktivitesin depo kararlılığında 3 aylık aktivite ölçümü .....                                                                                 | 51           |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

| <u>Çizelge</u>                                                                    | <u>Sayfa</u> |
|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 4.1. Lakkaz enziminin dağılımında faz kombinasyonları ve tuz türünün seçimi ..... | 41           |
| 4.2 Tuz konsantrasyonunun enzim dağılımına etkisi .....                           | 42           |
| 4.3. PEG molekül kütlelerinin belirlenmesi.....                                   | 44           |

## 1. GİRİŞ

Dünya genelinde kültürü yapılan mantar türlerinin sayıca artmasının yanında üretilen mantar miktarında da oransal olarak artışlar görülmektedir. *Agaricus* spp., *Pleurotus* spp., *Lentinus*, *Auricularia*, *Morchella* spp., *Ganoderma lucidum*, *Agrocybe aegerita*, *Volvariella volvacea*, *Flammulina velutipes*, *Tremella fuciformis* gibi birçok türün ticari üretimi geniş ölçüde yapılmaktadır. Ülkemiz mantar üretimi bakımından ilk 20 ülke arasında olup, son 10 yıl içerisinde üretimi yaklaşık %100 oranında artırmayı başarmıştır ve hızlı bir gelişme göstermiştir. Akdeniz, Marmara, İç Anadolu, Ege Bölgelerinde yaygın olarak üretilmektedir. Başlıca yetiştirilen mantar türleri *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* ve *Lentinula odedes*'dir (Şen ve Yalçın., 2010).

Kompost, bitki ve hayvan orijinli atıkların bir araya toplanıp gübre yapmak üzere çürümeye bırakılması ile elde edilen dekompoze olmuş organik maddeler karışımıdır ve kültür mantarı yetiştiriciliğinde kullanılmaktadır. Mantar hasatı sonrasında kalanlar; atık mantar kompostu SMC: Spent Mushroom Compost veya SMS: Spent Mushroom Substrate olarak isimlendirilmektedir (Jordan et al., 2008). SMC; yüksek organik madde, zengin mineral bileşimi, mantar kısımları miselyum mantarın ticari olmayan sap kısımlarını ve bunların dip kısımlarını içermektedir. 1 kg taze mantar hasatından yaklaşık olarak 5 kg SMC oluşmaktadır (Lau et al., 2003; N. Finney et al., 2009a). Atık mantar kompostu mantar üretim tesislerinin bir atığı olup yılda 7000-10000 ton atık mantar kompostunun ortaya çıktığı bildirilmektedir (Çiçek vd., 2012). Atık mantar kompostu gübre veya ekstraselüler enzim kaynağı olarak kullanımı hem çevresel hem ekonomik yönden büyük önem taşımaktadır.

Lakkaz (benzenediol: oksijen oksidoredüktaz; EC 1.10.3.2), oksidoredüktaz sınıfına ait bir enzimdir. Hem fenolik hem de fenolik olmayan ligninle ilişkili bileşikler okside edebildiği gibi biyolojik yıkıma dirençli olan çevre kirleticilerini de oksitleyebilmektedir. Çoklu-bakır içeren bir protein olan lakkaz, radikal-katalizli reaksiyon mekanizması ile aromatik ve aromatik-olmayan farklı bileşiklerin oksidasyonu için moleküler oksijeni kullanmaktadır. Lakkaz enzimlerinin ticari uygulamalarının önündeki en önemli sorun yeterli enzimin

bulunmaması ve redoks-aracılarının fiyatıdır (Tuncer, 2010). Bu problemlerin çözümüne yönelik önemli çalışmalar ise son zamanlarda yapılmaktadır. Bu nedenle, lakkaz enzimlerinin ucuz ve fazla miktarda üretimini sağlayacak olan hammaddenin incelenmesi ile bu enzimlerin çok daha aktif ve kullanılabilir olması için çalışmaların sürdürülmesi gerekmektedir.

Lakkaz enzimlerinin oksidasyon özellikleri onları endüstriyel ve biyoteknolojik süreçlerde kullanılmalarına olanak sağlamaktadır. Endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamaların; kâğıt ve kâğıt hamuru endüstrisi, tekstil ve petrokimya endüstrilerinden kaynaklanan atık suların detoksifikasyonu ve çeşitli biyosensörlerin oluşturulması bazılarındandır. Lakkazlar aynı zamanda kozmetiklerde katkı maddesi olarak da kullanılmaktadırlar. Bu uygulamalardan başka toprak ve çevre kirliliğinin giderilmesinde, herbisidler, pestisidler ve patlayıcılar gibi ksenobiyotik bileşiklerle kirlenmiş topraklardan ve sulardan bu tip kirleticileri uzaklaştırma ve polimerik ürünler oluşturma kapasiteleri nedeniyle, biyoremediasyon ajanları olarak da kullanılabilirler.

Günümüzde endüstriyel biyoteknolojideki gelişmelerle ilaç, gıda ve biyoteknoloji uygulamalarında rekombinat proteinlerin ve enzimlerin üretimi hızla artmakta olup kontamine protein karışımlarının saflaştırılması ürün maliyetlerini %80'lere varan oranlarda arttırdığından ekonomik ayrıştırma tekniklerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bunun yanında; diyaliz, iyonik ve afinite kromatografisi gibi geleneksel saflaştırma yöntemleri birkaç adımdan oluşan uzun işlemler gerektirmekte olup hem zaman hem de ürün kaybına neden olmaktadır. Sulu ikili faz sistemleri; bu yöntemlerdeki işlem basamaklarını tek adıma indirerek çok daha ucuza ve kısa zamanda ürünün elde edilmesine olanak sağlamaktadır.

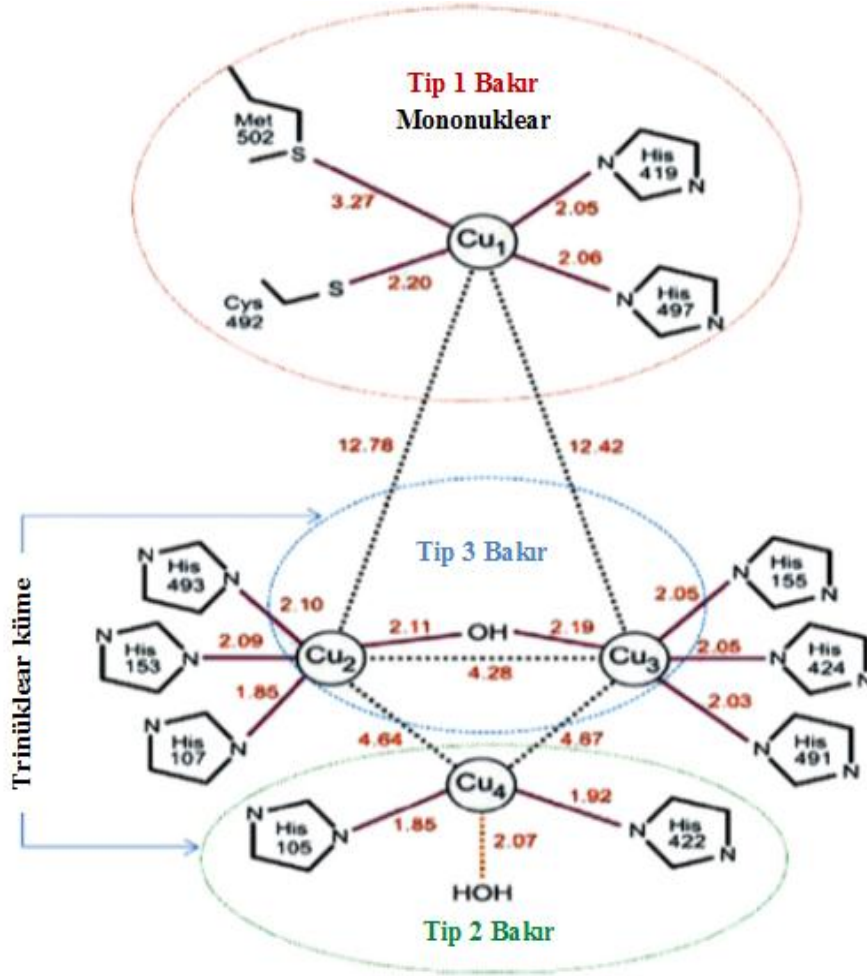
Çalışmamızda; *Agaricus bisporus* atık mantar saplarından, lakkaz enzimini sulu ikili faz sistemiyle saflaştırılarak elde edilmiştir. PEG fazında toplanan enzimi PEG'den ayırmak için ultrafiltrasyon kullanılmıştır. Lakkaz enziminin optimum pH ve sıcaklık değerleri ile pH ve sıcaklık stabilite çalışmaları yapılmıştır.

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

### 2.1 Lakkazın Yapısı ve Fonksiyonel Özellikleri

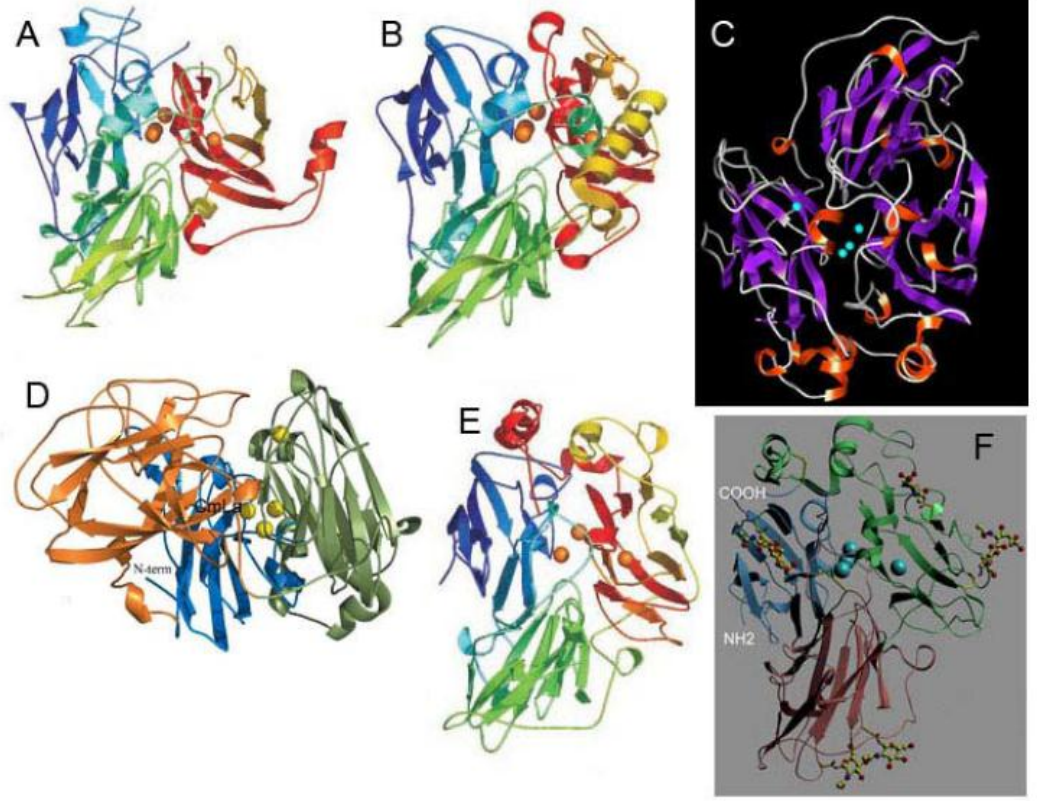
Lakkaz enzimi (E.C. 1.10.3.2; *p*-difenol: oksijen oksidoredüktaz) (Mayer, 1987), bakır içeren enzimlerin bir grubu olan polifenoloksidazlar (PPO) içerisinde yer almaktadır (Thurston, 1994). Lakkazlar, çoklu-bakır içeren mavi proteinler sınıfına dâhildirler ve spektroskopik olarak farklı olan 3 bakır iyonuna (Tip1, Tip2 ve Tip3) sahiptirler (Solomon et al., 1996). Moleküler kütleleri 50-110 kDa aralığındadır. Lakkaz enziminin önemli bir özelliğide proteinin toplam kütlesinin %10-45'ini oluşturan bir karbonhidrat kısmının protein kısmına kovalent olarak bağlanmış olmasıdır. Karbonhidrat kısım enzimin yüksek kararlılık göstermesine katkıda bulunmaktadır (Tuncer, 2010). Lakkaz enzimlerinin yapısal ve fonksiyonel olarak ayrı olan 3 bakır merkezi içeren katalitik merkezleri bulunmaktadır ve katalitik aktiviteleri için her bir lakkaz proteinine en az 4 bakır atomu gerekmektedir. Bu merkezlerden substrat oksidasyonunun gerçekleştiği Tip1 bakır atomunun bulunduğu merkez “mavi bakır” olarak adlandırılan mononükleer merkezdir ve 1 bakır iyonu içermektedir (Enguita et al., 2003). Oksijenin suya indirgendiği, Tip2 ve Tip3 olarak isimlendirilen bölgelerin oluşturduğu trinükleer merkez ise 3 bakır iyonu içermektedir (Şekil 2.1). Bakır merkezlerinde; Tip1, paramanyetik mavi bakır (Cu1); Tip2, paramanyetik mavi olmayan bakır (Cu4); Tip3 diamanyetik spin-eşleşmeli bakır-bakır çifti (Cu2 ve Cu3) bulunmaktadır. Tip1 bakır, korunmuş ligandlar olarak bir sistein ve 2 histidin ile, bir pozisyonda da değişken olan amino asit kalıntısı ile trigonal koordinasyona sahiptir (Tuncer, 2010). Değişken olan bu eksensel amino asit kalıntısı lakkaz kaynağına göre farklılık göstermekte olup aynı zamanda enzim aktivitesinin düzenlendiği mekanizma ile enzimin oksidasyon potansiyelini büyük oranda etkilediği birçok çalışmaya konu olmuştur (Gray et al., 2000; Enguita et al., 2003). Çoklu bakır içeren proteinlerin karakteristik mavi renginden Tip 1 bakır sorumludur ve bu mavi renk bakır-sistein kovalent bağının oluşturduğu elektronik absorpsiyonun sonucudur. Yine Tip1 bakır yüksek redoks potansiyeline (+785 mV) sahip olduğundan substrat oksidasyonu bu bölgede gerçekleşmektedir. Trinükleer küme olarak isimlendirilen Tip2 ve Tip3 bakır merkezleri bir bütün olarak değerlendirilip, moleküler oksijenin indirgendiği ve suyun serbest

bırakıldığı bölgedir. Tip2 bakır atomu 2 histidin ve Tip3 bakır atomu 6 histidin kalıntısı ile koordine edilir. Tip3 bakır atomları arasında güçlü anti-ferromanyetik eşleşme hemen hemen lineer olan hidroksil köprüsüyle olmaktadır (Decher and Terwilliger, 2000; Enguita et al., 2003). Bu özellikler dört ve üç bölgeye sahip olan lakkaz enzimleri için geçerli olup, bunların dışında 2 bölge içeren lakkaz enzimleride bulunmaktadır (Dubé et al., 2008).



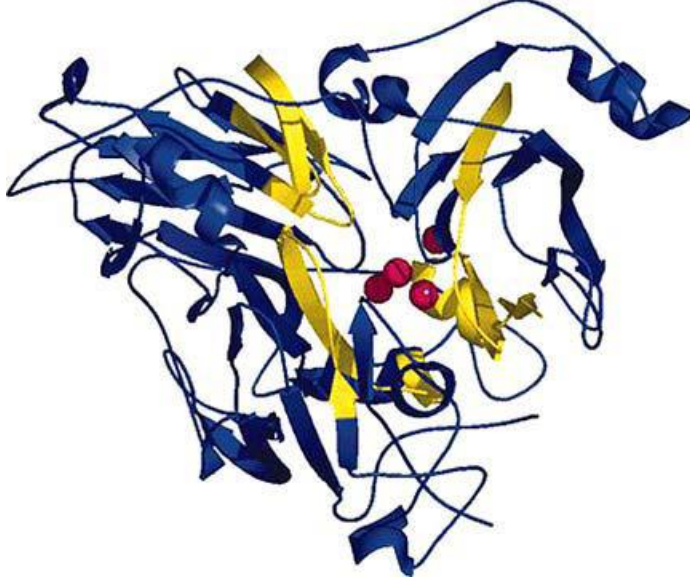
Şekil 2.1. *Bacillus subtilis* lakkazının bakır merkezleri (Dwivedi, 2011).

Bakteriler arasında lakkaz benzeri çoklu bakır içeren oksidazların bulunduğu, genomik analizler ile tespit edilmiştir (Alexandre and Zhulin, 2000). Bunun yanında, yapısal olarak karakterize edilen *L. tigrinus*, *C. maxima*, *C. cinerius*, *T. versicolor* kaynaklı lakkaz enzimleri çok çalışılan fungal kökenlidir (Ducros et al., 1998, 2001; Bertrand et al., 2002; Ferraroni et al., 2005, 2007; Lyashenko et al., 2006) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Farklı organizmalar tarafından üretilen çoklu-bakır içeren oksidazların genel katlanmalarını gösteren kurdela modelleri. A: CotA (*B. subtilis*), B: CueO (*E. coli*), C: LtLa (*L. tigrinus*), D: CmLa (*C. maxima*), E: CcLa (*C. cinerius*) ve F: TvLa (*T. versicolor*).

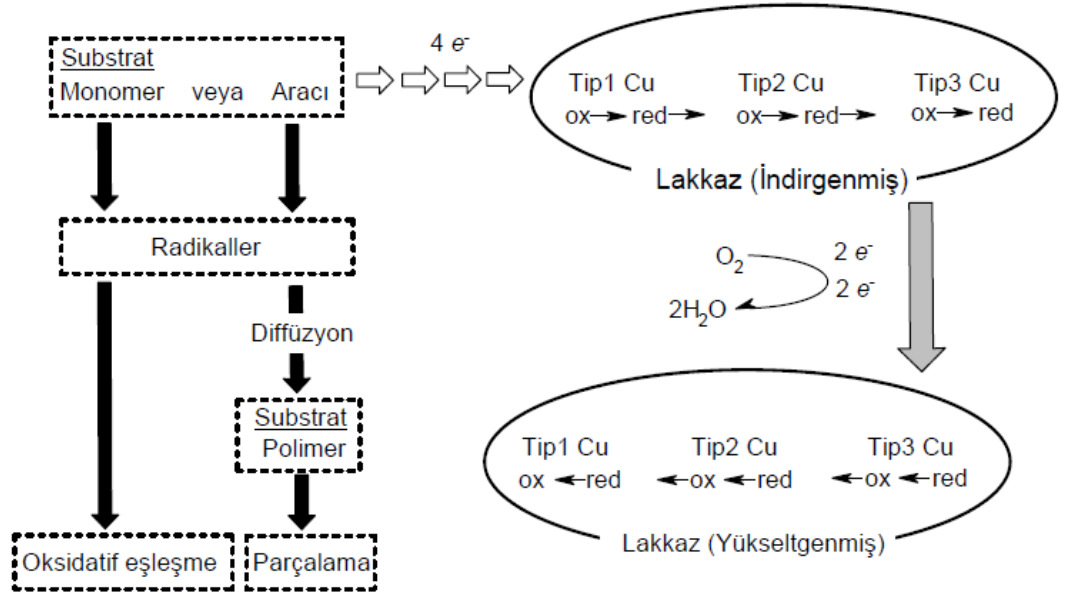
Atomik paketleme, protein yapıların karakterizasyonu için önemli bir ölçüm oluşturmaktadır. Atomik paketlemeyi ifade etmek için farklı metodlar tanımlanmıştır. CotA proteini için OSP (occluded surface packing) değerleri üç aralık göstermiştir. Bu değerler yüksek oranda paketlenmiş bir yapıyı gösterir ki bu kalıntılar 1. ve 2. bölgelerin ara yüzey bölgesinde yerleşerek mononükleer bakır merkezi Tip1'e yakın bulunmaktadır. Birlikte, bakır atomları çevresinde bir cep oluşturarak CotA proteininin genel yapısal paketlenmesinde yer alırlar (Enguita et al., 2003) (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. Yüksek OPS değerleri ile kalıntıların lokasyonlarını gösteren (sarı) *Bacillus subtilis* CotA protein yapısının kurdela modeli. Bakır atomları ise kırmızı küreler olarak gösterilmiştir (Enguita et al., 2003).

Lakkaz, aromatik ve aromatik olmayan farklı bileşiklerin oksidasyonu için radikal-katalizli reaksiyonda moleküler oksijeni kullanmaktadır. Fenolik bileşiklerin oksidasyonunu, kullanılan moleküler oksijenin suya indirgenmesini sağlayarak gerçekleştirmektedir. Lakkazın katalizlediği reaksiyonlarda elektron akseptörü atmosferik oksijendir (Paloheimo et al., 2004). Lakkaz enzimleri çok çeşitli substratları okside edebilirler, fenoller, polifenoller, diaminler, aromatik aminler bu substratlara örnek oluşturmaktadır.

Lakkaz enzimleri, indirgenmiş substrattan aldıkları elektronları, toksik peroksit ara-ürünleri oluşturmaksızın yapılarında bulunan farklı bakır merkezleri ile atmosferik moleküler oksijene aktarmaktadırlar. Bu reaksiyonu Tip1 bakır tarafından katalizlenmekte olup substratın dört monoelektronik oksidasyonu gerçekleştirilmektedir. Elektronlar reaksiyon sonunda, suyun serbest bırakıldığı ve böylece moleküler oksijenin indirgendiği trinuklear kümeye transfer edilmektedirler (Claus, 2003) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Fungal lakkaz enzimlerinin katalitik mekanizması. Lakkaz enzimi, Tip1 bakır aracılığı ile her defasında 1 elektron transferiyle dört-basamakta substrat moleküllerini oksitler. Lakkaz molekülünün yeniden oksidasyonu (yükseltgenmesi) ise diamanyetik Tip3 bakır çifti tarafından iki basamaklı olarak dört elektronun, moleküler oksijene ( $O_2$ ) transferi ile sağlanır. Monomerlerin oksidasyonu sonucunda oluşan reaktif radikaller ise enzimatik-olmayan eşleşme reaksiyonlarına katılırlar. Polimerlerin parçalanması düşük moleküler kütleli aracı (redoks araçları, mediatör) bileşikler tarafından katalizlenir. Bu aracı moleküllerin lakkaz tarafından aktivasyonu gerçekleştirildikten sonra, aktif enzim bölgesinden polimerlerin hedef bölgelerine diffüzlenirler (Claus, 2003; Tuncer, 2010).

Lakkaz enzimleri tarafından oksitlenen substratlar oldukça fazladır. Bunlara; substitüye monofenoller ( $p$ -kumarik asit, salisilik asit),  $o$ -aminofenol,  $o$ -difenoller (kateşol, pirogallol, guaikol, gallik asit, kaffeik asit),  $p$ -pozisyonlu aromatik bileşikler (hidrokuinon,  $p$ -kresol,  $p$ -aminofenol),  $m$ -difenoller (resorsinol, osinol), ABTS [2,2'-azino-bis-(3-etilbenzothiazoline-6-sulfonik asit)], 1-naftol, hidroksiindoller ve şiringaldazin gibi fenolik olmayan bileşikler örnek olarak verilebilir (Mayer, 1987; Cai et al., 1993). Lakkazların redoks potansiyallerinin fenolik olmayan bileşiklerin redoks potansiyellerinden düşük olması, onları oksitleyebilmeleri için elektron transfer araçlarının (medyatör yada redoks aracı substrat) olmasını gerektirir. Bu medyatörler sayesinde fenolik olmayan bileşikleride oksitleyebilmektedirler (Bourbonnais and Paice, 1990; Call and Mücke, 1997). Mediyatörler, substrat ile lakkaz arasında elektron taşıyıcı küçük

moleküllerdir ve enzimatik oksidasyonla kararlı radikallere dönüştürülerek lakkaz enzimlerinin substratı olmayan diğer bileşikleri oksitlemelerini sağlarlar. Lakkaz enzimleri için ilk redoks aracı ABTS olmuştur. Son zamanlarda sentetik redoks araçlarının 1-hidroksibenzotriazol (HBT), violurik asit (VLA), *N*-hidroksiasetanilide (NHA) kullanılmasıyla lakkaz enzimleri tarafından oksitlenen bileşiklerin çeşitliliği de artmıştır. Doğal olarak bulunan redoks araçları ise hem çevre hem de ekonomi için avantajlıdır (Camarero et al., 2005).

## 2.2 Lakkaz Kaynakları

Lakkaz, 19. yüzyıldan bu yana çalışılmakta olup doğada yaygın olarak bulunmaktadır. İsmini ise, 1883 yılında ilk defa H. Yoshida tarafından enzimin tanımlanmasıyla Japon Lake ağacı olan *Rhus vernicifera*'dan almıştır (Thurston, 1994) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Japon lake ağacı (*Rhus vernicifera*) (Bar, M, 2001).

Lakkaz, daha sonraları şeftali, elma, armut, pancar, patates, lahana, tütün, kavak gibi çok sayıda bitkide (Lehman, 1974; De Marco, 1997; Bar, 2001) tespit edilmiştir. Lakkaz enzimi, bitkilerde yaygın olarak bulunmasının yanında mantarlar ve bakterilerde de mevcuttur. 1896 yılında Bertrand ve Laborde tarafından ilk kez lakkazın bir mantar tarafından üretildiğini ortaya konmuştur (Thurston, 1994). Günümüzde mikrobiyal orijinli lakkazların kullanımı daha yaygındır. Bunun sebebi; bitkisel lakkazların belirlenmesi ve saflaştırılmasının zor olması yanında çok sayıda oksidatif enzim içeriyor olmalarıdır (Ranocha, 1999).

Lakkaz enzimlerinin büyük çoğunlukla kaynağını beyaz-çürükçül mantarlar oluşturmaktadır. Bunlara örnek bazı türler arasında; *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Phlebia radiata* ve bizim çalışmamızda kullandığımız *Agaricus bisporus* yer almaktadır (Wood, 1980).

### 2.3 Mantar Atıklarının Değerlendirilmesi

Günümüzde, 100 kadar ülkede ticari ölçekte yenilebilir şapkalı mantar üretilmektedir. Yenilebilir mantarlar içinde 25'i besin olarak kabul edilmiş ve bunlardan 8-10 tanesinin ticari üretimi geniş ölçüde yapılmaktadır (Şen ve Yalçın, 2010). Türkiye Ziraat Odaları Birliği verilerine göre 2010 yılında dünyada 5.1 milyon ton mantar üretilmiş ve Türkiye 19. sırada yer almaktadır (Metin vd., 2012). Bugüne kadar dünyada 25 milyon ton mantar üretilmiş ve Çin 20 milyon ton ile dünya mantar üretiminin %80 'ine ulaşmıştır (Li, 2012). Dünyada ticareti yapılan mantar türlerinin başlıcalarını *Agaricus* spp., *Pleurotus* spp., *Lentinus* ve *Auricularia* oluşturmaktadır. Ülkemizde kültür mantarı yetiştiriciliğinin geçmişi çok kısa olup ilk olarak 1960 yılında Ankara Ziraat Fakültesinde üretimi yapılmıştır. Kültür mantarcılığı son yıllarda ülkemizde hızlı bir gelişme göstermiş ve son 10 yıl içerisinde üretim çok fazla artmıştır. 2012 verilerine göre ülkemizde mantar yetiştiriciliği Akdeniz, Marmara, İç Anadolu, Ege bölgelerinde yaygın olarak üretilmektedir. Diğer bölgelerde ise üretim miktarı çok azdır. Üretimin %73'lük kısmı Akdeniz Bölgesinde olup, üretiminde %72'si Antalya'nın Korkuteli ilçesinde olmaktadır (Türkiye Ziraat Odaları Birliği, 2013).

Mantar hasadından sonra kalan kısım atık mantar kompostu olarak isimlendirilmektedir (Jordan et al., 2008) ve son yıllarda mantar üretiminin artmasına paralel olarak büyük hacimlere ulaşmaktadır. 1 kg taze mantar hasadından yaklaşık olarak 5 kg atık mantar kompostu oluşmaktadır (Lau et al., 2003; N. Finney et al., 2009a). Bir çiftlikten ayda ortalama 24 ton atık mantar kompostu çıkmaktadır (Singh et al., 2011). İrlanda'da yıllık atık mantar kompostu oluşumu 254.000 tondur (Barry et al., 2012) ve bu rakamın Hollanda'da yıllık 800.000 ton olduğu bilinmektedir (Oei and Albert, 2012). İçerik olarak, yüksek organik madde, zengin mineral bileşimi, mantar kısımları miselyum, mantarın ticari olmayan sap kısımlarını ve bunların dip kısımlarını içermektedir. Üretimi

yapılan her mantar türüne göre hazırlanan kompostun farklı olabileceğinden atık mantar kompostlarında içerik olarak mantar türüne göre farklılıklar gösterebilmektedir. Mantar endüstrisi her yıl düzenli olarak artmakta olup buna bağlı olarak atık mantar kompostunun da miktarı artmaktadır. Atık mantar kompostunun kullanımı için yeni uygulamaların keşfi yoluyla atık mantar kompostu ihtiyacının artması bu probleme çözüm getirebilecektir. Zengin organik madde içeriği, kullanıma hazır ve ucuz kaynaklı atık mantar kompostunun biyoteknolojik olarak yeniden kullanım alanlarının bulunması ve optimizasyonu için son yıllarda büyük bir çaba görülmektedir (Phan and Sabaratnam, 2012).

Dünyada atık mantar kompostunun çeşitli değerlendirme çalışmaları bulunmaktadır. Bunlar; lignoselülozik enzim geri kazanımı, biyoremediasyon (polisiklik aromatik hidrokarbonlar'ın biyoremediasyonu) (Lau et al., 2003), fenolik bileşikler (Trejo-Hernandez et al., 2001), biosit ve fungusitler (Law et al., 2003; Ahlawat et al., 2010; Cordova Juarez et al., 2011), ağır metal absorpsiyonu (Chen et al., 2005), boya giderimi (Lim et al., 2013), asidik maden sıvıları (Cheong et al., 2010), alternatif enerji kaynağı olarak ve gübre olarak (karasal ortama yayma, tekrar kompostlaştırma) kullanımı şeklindedir.

Lignoselülozik enzim kazanımında; *Pleurotus ostreatus*'tan  $\alpha$ -amilaz ve selülaz enzimi, *Lentinula edodes*'ten  $\beta$ -glukosidaz enzimi, *Flammulina velutipes*'ten lakkaz enzimi (Ko et al., 2005), *Pleurotus sajor-caju*'dan selülaz,  $\beta$ -glukosidaz ve lakkaz enzimi (Singh et al., 2003) ile *Agaricus bisporus*'tan lakkaz enzimi (Mayola-Deloisa et al., 2009) çalışmaları yapılmıştır.

Çalışmamızda, *Agaricus bisporus* atık mantar kompostundan gözle görülen ve kolaylıkla elle toplanabilen *Agaricus bisporus* atık mantar sap kısımları lakkaz kaynağı olarak kullanımı amaçlanmıştır.

## 2.4 Lakkaz Enziminin Kullanım Alanları

Fungal lakkazların, fenolik bileşiklerin polimerizasyonu, depolimerizasyonu, metilasyonu ve demetilasyonu gibi geniş bir substrat aralığını katalizledikleri bilinmektedir (Leonowicz et al., 1979, 1985). Lakkazlar hem

fenolik hem de fenolik olmayan ligninle ilişkili bileşikleri okside edebildiği ve oldukça zor parçalanabilen çevre kirleticilerini de oksitleyebilmelerinden dolayı son yıllarda oldukça ilgi çekici bir araştırma alanı oluşturmaktadırlar.

Lakkaz enzimlerinin sahip olduğu oksidasyon yeteneği sayesinde bazı endüstriyel ve biyoteknolojik süreçlerde bu enzimlerin oldukça verimli halde kullanılması mümkün olmaktadır.

Lakkazlar; gıda ve içki endüstrisinde renk oluşumlarının belirlenme ve zenginleştirilme aşamalarında kullanılabilir. Meyve suyu, bira ve şaraplardaki koyulaşma ve bulanıklığın oluşmasından sorumlu istenmeyen fenolik bileşiklerin giderimi lakkaz uygulamalarıyla sağlanabilir. Lakkazlar biyopolimerlerin çapraz bağlanma yetenekleri sayesinde fırıncılıkta da kullanılabilir. Selinheimo et al., (2006)' a göre beyaz çürükçül fungus *Trametes hirsuta* lakkazının maksimum hamur direncini artırdığını görülmüştür.

Kağıt hamuru delignifikasyon ve ağartma işlemlerinde klor bazlı kirleticilerin kullanımı çevresel sorunlara sebep olmaktadır (Kuhad et al., 1997). Ambalaj kağıtlarında, lakkaz mediatör sistem (LMS) ile kağıt hamurunun delignifikasyonu ve beyazlatılması teknikleri geliştirilmiştir (Call and Mücke, 1997). Lakkazlar; sunta gibi lignoselüloz temelli kompozit materyallerin üretiminde, ligninleri aktive edip liflerin enzimatik olarak tutunmasını sağlamaktadır. Kompozitlerin yapımı sırasında, toksik sentetik yapıştırıcıları kullanılmaksızın sağlam mekanik özellikli suntaların üretimini mümkün kılmaktadırlar (Felby et al., 1997; Hüttermann et al., 2001).

Tekstil endüstrisinde; ticari boyalar çok çeşitli olup kimyasal yapıları nedeniyle, oksitleyici ajanlara, ışığa, suya vb. etkilere oldukça dayanıklıdır. Yapılan boyalı yaşı işlemler sonucunda fazla miktarda kimyasal madde ve su kullanılmaktadır. Son yıllarda; endüstriyel atıksularda, benzidin ve diğer aromatik bileşikler gibi kanserojenlerden üretildiği bilinen bazı boya ile ilgili pek çok endişe mevcuttur (Baughman and Perenich, 1988). Atık sulardaki boyayı temizleme işlemi ile ilgili şu an mevcut olan teknoloji ise yetersiz kalmakta ve ekonomik bir yöntem olmamaktadır (Cooper, 1995; Stephen, 1995). Lakkazların

boyaların kimyasal yapılarını parçalama yetenekleri sayesinde etkili bir çözüm olduğu düşünülmektedir ve tekstil endüstrisinde lakkaz kullanımı çok hızlı gelişmektedir (Abadulla et al., 2000; Blázquez et al., 2004; Hou et al., 2004). Parshetti ve arkadaşları (2007), *Aspergillus ochraceus* NCIM-1146'nın miselyumu tarafından tekstil boyar maddesi Reactive blue-25 (0.1g/l)'in renksizleştirilmesi ve parçalanmasını çalışmışlardır. Çalışmada, bu boyar maddenin renksizleştirilmesini, biyolojik parçalanmasını ve parçalanma ürünlerinin tanımlanmasını incelemek ve aynı zamanda renksizleştirme işlemi sırasında kültür süzöntüsündeki lakkaz ve lignin peroksidaz gibi hücre dışı enzimleri belirlenmesi amaçlanmıştır. Spektrofotometrik ve görsel incelemeler, renksizleştirmenin fungal adsorpsiyonu takip eden parçalanma sayesinde olduğunu göstermiştir. Ortamda glukozun bulunması ise, daha hızlı bir adsorpsiyon (4 saat) ve renksizleştirme (7 gün) sağladığı belirlenmiştir (Parshetti et al., 2007).

Maximo ve arkadaşları (2003), *Geotrichum* sp. mantarından elde edilen enzimlerin sanayiide kullanılan üç reaktif azo boyar maddesini (Reactive Black 5, Reactive Red 158 ve ReactiveYellow 27) parçalama yeteneğini incelemiştir. Her bir boyar madde *Geotrichum* sp. ile işleme tabi tutulduğunda mantar siyah boyar maddeyi hızlı bir şekilde dönüşüme uğrattırırken, diğer iki boyar madde için iki kat süreye ihtiyaç duyulmuştur. 20 günlük eski kültürler, boyar maddelerin ardışık miktarları (200 ppm) ile reaksiyona sokulduğunda ise toplam dönüşüm süresi üç boyar madde için de yaklaşık 5 güne kadar düşürülmüştür. Çalışmada, siyah boyar maddenin dönüşümünde lignolitik enzimler olan Mn peroksidaz, Mangansız peroksidaz ve lakkazın etkisinin mümkün olduğu, ancak sarı ve kırmızı boyar maddeler için ilave enzimlerin veya faktörlerin gerektiği vurgulanmıştır. Ayrıca *Geotrichum* sp.'nin büyük miktarlarda boyar maddeyi dönüşüme uğratabilme yeteneği sayesinde tekstil atık sularının renksizleştirilmesinde uygulama potansiyeli olabileceği ifade edilmiştir (Maximo et al., 2003).

Lakkazlar, kofaktörleri kullanmaksızın elektron transfer reaksiyonlarını katalizleyebildikleri için çeşitli fenolik bileşikler, oksijen veya azidler belirlemek

için biyosensörler olarak da kullanılmıştır. Aynı zamanda, morfin ve kodeini (Bauer et al., 1999), katekolamini (Lisdat et al., 1997; Ferry and Leech, 2005), bitki flavonoidleri (Jarosz-Wilkolazka et al., 2004) ve elektroimmunoassayleri (Kuznetsov et al., 2001) belirlemek için biyosensörler geliştirilmiştir.

Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH'lar) diğer ksenobiyotiklerle birlikte toprakta önemli bir kontaminasyon kaynağıdır ve bu yüzden parçalanmaları çevre için büyük önem taşımaktadır. Lakkazların katalitik özellikleri böyle bileşikler parçalamada da kullanılabilir.

Kozmetik dünyasında da lakkaz kullanılarak çeşitli uygulamalar yapılmaktadır. Lakkaz temelli saç boyaları, boya formülasyonunda hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) yerine lakkazlar kullanıldığından mevcut olan saç boyalarından daha az tahriş edici ve kullanılması daha kolay olmaktadır (Roure et al., 1992; Aaslyng et al., 1996; Lang and Cotteret, 1999). Cildi parlatmak için kullanılan protein içerikli kozmetik ve dermatolojik preparasyonlar da geliştirilmiştir (Golz-Berner et al., 2004).

## **2.5 Sulu İkili Faz Sistemi (Aqueous Two Phase System; ATPS)**

Günümüzde endüstriyel biyoteknoloji pazarı sanayide hızla büyüyen sektörlerdendir. İlaç, teşhis, gıda ve biyoteknoloji uygulamalarında rekombinant proteinlerin ve enzimlerin üretimi hızla artmaktadır (Walsh, 2000). Kontamine protein karışımlarının saflaştırılması maliyetleri %30-80 oranında arttırması sebebiyle, daha ekonomik protein ayrıştırma tekniklerine ihtiyaç duyulmaktadır (Ghosh, 2003). Aynı zamanda; biyomoleküllerin saflaştırılmasında diyaliz, iyonik ve afinite kromatografisi gibi geleneksel yöntemler ve diğerleri çeşitli aşamalar içermektedirler. Diğer taraftan sıvı-sıvı ekstraksiyon sistemleri, saflaştırma basamaklarını tek bir işlemde birleştirerek alternatif bir saflaştırma tekniği olmaktadır. Düşük maliyetli kimyasalların kullanımı, düşük viskozite ve hızlıca faz ayrımının gerçekleşmesi, ara yüzey geriliminin düşük olmasına bağlı biyomoleküllerin degradasyonunun minimumda kalması, enerji tüketiminin az olması bu sistemin avantajlarını oluşturmaktadır. Ayrıca, sulu ikili faz sistemlerinde ölçek büyütmenin de kolay olması yöntemin bir başka üstünlüğünü

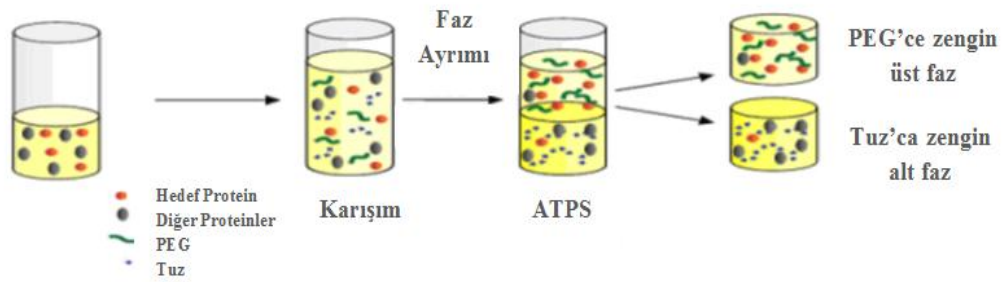
oluşturmaktadır (Aguilar, 2006; Yue et al., 2007; Negrete et al., 2007). Protein saflaştırmada geleneksel yöntemler su-organik çözücü sistemleri içerir ancak proteinler organik çözügenlerde çözünememekte ve denatürasyona uğramaktadırlar. Sıvı-sıvı ikili faz sistemlerinde ise suda çözünür polimer-tuz ya da polimer-polimer karışımları oluşturularak kullanılmaktadır. Faz ayrılması ilk kez Flemenk mikrobiyolog Martinus Willem Beijerinck tarafından 1896 yılında, agar ve nişasta ya da jelatinin karışmasıyla oluşan ikili fazın gözlemlenmesine dayanmaktadır (Albertsson, 1986). Sonrasında, 1947 yılında Dobry ve Boyer-Kawenoki 35 çift çözünür polimer ve çözücülerle ilgili testler yapmışlardır (Mazzola, 2008). Bu sistemler, sulu ikili faz sistemleri olarak adlandırılmış ve 1956 yılında Albertsson tarafından ilk defa biyomoleküllerin geri kazanımında kullanılmıştır ve biyolojik moleküllerin fazlar arasında dağılımının seçimli olarak gerçekleştiği ortaya konmuştur. Sonraki çalışmalarda ise farklı polimer konsantrasyonlarında ve molekül ağırlıklarının etkilerini inceleyip sistemlerin faz diyagramları oluşturulmuştur (Balasubramaniam, 2003).

Proteinler, enzimler, nükleik asitler, virüs, antikor ve hücre organelleri gibi biyolojik maddelerin seçimli olarak ayrılması ve saflaştırılması için biyoteknoloji alanındaki uygulamaları olan sulu ikili faz sistemleri etkin bir yöntemdir (Raja et al., 2011). Bu sistem; polimer-tuz, bir polimer (PEG) ile inorganik tuzlar (fosfat, sülfat, sitrat gibi) ya da polimer-polimer, hidrofilik ve yapısal olarak farklı polimerlerin (Dekstran/PEG gibi) birlikte kullanılmasıdır. Bu ikili gruplar kritik konsantrasyon noktasının üzerine geldiğinde ikili faz oluşmaktadır. PEG-Tuz sistemlerinde fazlardan biri polimerce zengin diğeri de tuzca zengin olup polimer-polimer sistemlerine göre daha düşük maliyet ve viskoziteli olduklarından büyük ölçekli ekstraksiyonlarda kullanılmaktadırlar. Diğer yandan PEG-Dekstran sistemlerinde ise her faz kendisini oluşturan polimerce zengindir ve çoğunlukla küçük ölçekli hücre makromoleküllerinin ve hücrelerin ayırımında kullanılmaktadır (Yue et al., 2007).

Polimer-tuz ve polimer-polimer sistemlerinin her ikisinde biyo-uyumlu olup yüksek oranda su içerdiğinden dolayı biyomoleküller için ılımlı toksik olmayan bir ortam oluşturmakla birlikte, polimerin enzim aktivitesi ve protein yapısını stabilize edici etkileri bulunmaktadır (Yue et al., 2007; Negrete et al., 2007). Sulu

ikili faz sistemlerinde moleküller ortam etkileşimlerine ve kendi genel karakteristik etkilerine bağlı olarak seçimli olarak iki faz arasında dağılmaktadır. Fazlar arasında; makromoleküllerin dağılımı değişken olup herhangi bir modelleme yapılamamıştır, küçük moleküller ise tarafsızca dağılmaktadırlar.

İki adımdan oluşan bir işlem olan sulu ikili faz sisteminin ilk adımı dengeleme diğeri ise faz ayrımının gerçekleşmesi adımıdır. Dengeleme adımı; sistemi oluşturan polimer, tuz ve protein ekstraktının karıştırılmasıyla iki fazın kendiliğinden dengeye gelmesi için dispersiyonun oluşmasıdır ve çoğunlukla hızlı gerçekleşen bir işlemdir. Bu işlem hafif karıştırma ve bekletme ile yapılır. Faz ayrımının gerçekleştiği adımda ise iki fazın belirgin olarak birbirinden ayrılmasıdır ve santrifüj işleminin bulunduğu aşamadır. Santrifüj zamanı ve hızı yapılan çalışmaya göre değişiklik gösterebilmektedir (Şekil 2.6.).



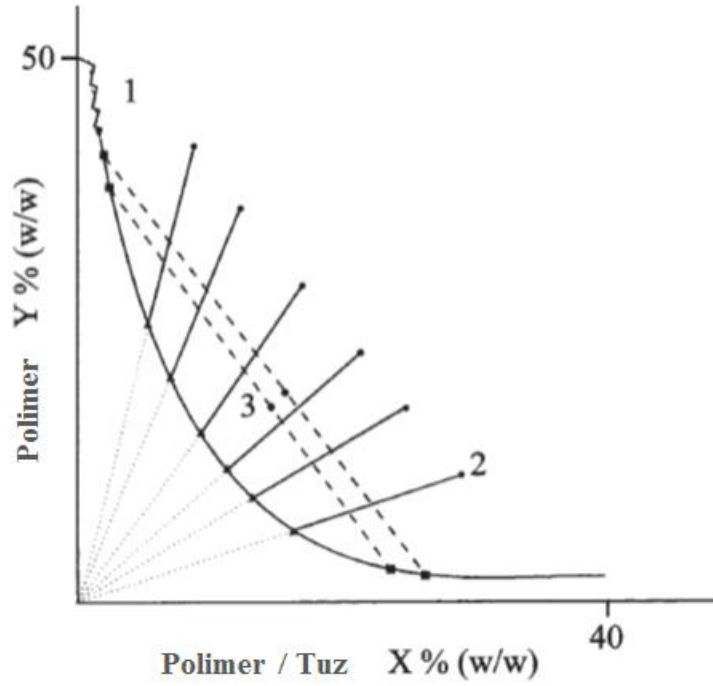
Şekil 2.6. PEG-Tuz Sulu ikili faz sistemi (ATPS) (Ratanapongleka,2010).

### 2.5.1 Faz diyagramları, binodiyal eğri, tie-line hatları

Sulu ikili faz sistemlerinin çalışma alanları faz diyagramlarıdır. İkili faz sistemlerinin oluşmasında; sıcaklık, pH, polimer ve tuz konsantrasyonları ayırıcı özellik taşımaktadır. Faz diyagramları, ikili üst ve alt fazı oluşturmak için gereken faz oluşturu bileşenlerin (Polimer-tuz / polimer-polimer) konsantrasyonu ve faz hacim oranı hakkında bilgi sağlar (Şekil 2.7.). Faz diyagramı, tie-line ve binodiyal eğri olarak isimlendirilmekte olan özel bağlantılı hatlara sahiptir. Faz diyagram bölgesini binodiyal eğri ikiye böler. Şekil 2.7.'de görüldüğü gibi binodiyal eğri TCB eğrinin altında ve eğride tek bir faz oluşturacak olan bölümdür, eğrinin üzerindeki bölgede ise birbiriyle karışmayan iki sıvı faz oluşturacak bileşen



Binodiyal eğrinin oluşturulmasında üç yöntem bulunmaktadır. Bunlar, turbidometrik titrasyon metodu (1), cloud-point metodu (2) ve node determination metodu (3)' dur (Şekil 2.8.).



Şekil 2.8. Binodiyal eğri metodları (Hatti-Kaul, 2000).

Yöntemlerden en hızlı ve yaygın olanı turbidometrik titrasyon metodudur. Bilinen kütle ve toplam kompozisyondaki faz bileşenleri karıştırılarak bulanık sistem serileri hazırlanır ve karışım tek ve açık bir faz oluşuncaya kadar su ya da çözümler ile seyreltilir. Bulanıklıktan berraklığa geçtiği noktanın faz bileşimi hesaplanır ve eğride işaretlenir. Cloud-point metodu (2)' nin prensibi de aynıdır. Konsantrasyonu belli olan polimer çözeltisi (PEG) test tüpüne alınır ve üzerine yine konsantrasyonu belli diğer polimer çözeltisi (Dekstran) ya da tuz çözeltisi (inorganik tuzlar) azar azar ilave edilip karıştırılır. Başlangıçta karışım berraktır, ilave edilen ikinci çözelti belli bir değerin üzerine çıktığı kritik noktadan sonra bulanıklaşır ve iki faz oluşmaya başladığında bu karışımın kütlesi, hesaplanarak meydana gelen ikili fazın kompozisyonu hesaplanır ve eğride işaretlenir. Bu karışım tekrar berraklaşuncaya kadar seyreltilerek prosedür tekrarlanır (Hatti-Kaul, 2000).

Tie-line hatları uzunluk (TLL) birimi bileşenlerin konsantrasyonlarında olduğu gibi % w/w olarak ifade edilmektedir. Tie-line hatları uzunlukları ile fazların kütleleri aşağıdaki denklemle bağlantılıdır:

$$\frac{V_{üst} \rho_{üst}}{V_{alt} \rho_{alt}} = \frac{XB}{XT}$$

V; alt ve üst fazın hacimleri,  $\rho$  ise alt ve üst fazların yoğunluklarını ifade etmektedir. Eşitliğin diğer tarafını oluşturan XB (alt faz) ve XT (üst faz) ise tie-line hatlarının uzunluklarını ifade eder (Şekil 2.6.). Tie-line hatları paralel olduğundan tie-line hattının eğimi diğerlerinin çiziminde kullanılmaktadır. Faz bileşenlerinin analizi ve fazlardaki tuz ile polimer konsantrasyonlarını belirlemek için gravimetrik analiz, refraktif indeks ölçümü, iletkenlik ölçümü, boyut dışlamalı kromatografi kullanılmaktadır.

İstenilen seviyede saflaştırmanın yapılabilmesi için faz diyagramları optimum sistem koşullarının belirlenmesini sağlamaktadır. Protein saflaştırmada en uygun sulu ikili faz sistemini seçmede, hedef protein selektivitesi ( $\alpha$ ) diğer proteinlerden yüksek olmalıdır. Selektivite ( $\alpha$ ), hedeflenen proteinin dağılım katsayısının ( $K_P$ ) diğer proteinlerin dağılım katsayısına ( $K_C$ ) oranıdır.

$$Selektivite (\alpha) = K_P / K_C$$

Aynı tie-line hattı üzerindeki proteinlerin dağılım katsayıları aynı kaldığı için istenen proteinin seçimliliği de belirli bir tie-line hattı üzerinde olduğunda tüm faz kompozisyonları sabit bulunmaktadır. Sabit bir seçimliliğin önemi, saflaştırmak istenen proteinin saflaştırma faktörüne ait faz oranları çeşitlendirilerek iyileştirilmesini sağlaması olmaktadır. Düşük faz oranının olması, yüksek saflaştırma faktörüdür (Hatti-Kaul, 2000; Balasubramaniam, 2003).

$$Faz\ Oranı = \frac{Üst\ faz\ kütlesi}{Alt\ faz\ kütlesi}$$

### 2.5.2 Dağılma katsayısı (k)

Moleküllerin fazlar arasındaki dağılımıdır (K). Üst faz protein konsantrasyonunun ( $C_{üst}$ ) alt fazdaki protein konsantrasyonuna ( $C_{alt}$ ) oranıdır.

$$K = \frac{C_{üst}}{C_{alt}}$$

Dağılma katsayısı fazların, materyalin ve sıcaklığın özelliklerinin fonksiyonudur. Fazların hacim oranlarıyla, çözünen konsantrasyonlarından bağımsızdır. Proteinin dağılma katsayısı belli bir tie-line hattındaki tüm sistemler için sabittir ve dağılmayı birçok faktör etkilemektedir. Deneysel çalışmalar ile uygun dağılma katsayısı optimize edilmelidir. Dağılma katsayısı ve onu etkilemekte olan faktörler logaritmik olarak ifade edilmektedir (Hatti-Kaul, 2000).

$$\ln K = \ln K^0 + \ln K_{elec} + \ln K_{hfob} + \ln K_{biosp} + \ln K_{büy} + \ln K_{konf} + \dots$$

$K_{elec}$  ; proteinin net yükü, pH, iyon dağılımı ile polimerin yükü tarafından belirlenen elektrostatik etkileri,

$K_{hfob}$  ; hidrofobikliği,

$K_{biosp}$  ; sistemde bulunan ligandla olan afiniteye dayalı etkileşimleri,

$K_{büy}$  ; protein ve polimerin büyüklüğünü,

$K_{konf}$  ; konformasyonel etkileri,

$K^0$  ; hesaba katılmayan diğer faktörler.

### 2.5.3 Dağılma mekanizması

Dağılmayı kontrol etmekte olan mekanizma çok net bilinmemekle birlikte fazda yer alan partikül; kendisini çevreleyen moleküller ile hidrojen bağı, hidrofobik ve elektrostatik etkileşimler ile van der Waals benzeri zayıf güçler oluşturarak etkileşimde bulunmaktadır. Bu etkileşimlerin iki fazda farklı net etkileri bulunduğu tahmin edilmektedir. Dengede bulunan bir sistemde,

partikülün fazlardaki hareketi için gereken enerji ( $\Delta E$ ) ile dağılma katsayısı arasında bulunan ilişki eşitlikteki gibidir;

$$\frac{C_1}{C_2} = e^{\Delta E/kT}$$

Burada;  $C_1$  ve  $C_2$  fazlardaki partikül konsantrasyonları,  $k$  Boltzman sabiti ve  $T$  mutlak sıcaklıktır,  $\Delta E$  dağılan partikülün büyüklüğüne bağlıdır. Dağılan partikül ne kadar büyük olursa kendisini çevreleyen fazla birlikte o kadar çok atomla ilişkili olacaktır. Brønsted 1931'de dağılma ile ilgili aşağıdaki eşitliği oluşturmuştur.

$$\frac{C_1}{C_2} = e^{\lambda M/kT}$$

Bu eşitlikte;  $M$  moleküler ağırlık ve  $\lambda$  ise moleküler ağırlık dışında bulunan özelliklere bağlı faktördür. Küresel bir partikül için ise eşitlikte  $M$  yerine partikülün yüzeysel alanı ( $A$ ) ifade eden eşitliğin;

$$\frac{C_1}{C_2} = e^{\lambda A/kT}$$

dikkate alınmasını gerektiğini belirtmektedir. Bu durumda  $\lambda$  yüzeysel alan dışındaki özelliklere bağlı faktördür. Yüzeysel özellikler yüzey gerilim, birim alandaki yüzey serbest enerjisi ile ifade edilmelidir. Bu yüzden hem yüzey alanı hem büyüklük özellikleri dağılmayı belirlemede büyük önem taşımaktadır. Aynı zamanda partikülün net yüküde ( $Z$ ) dağılmayı etkilemektedir. Eğer fazlar arasında  $U_1-U_2$  şeklinde bir elektrik potansiyeli farkı bulunuyorsa eşitlikte  $Z$  ( $U_1-U_2$ ) enerji terimide bulunmalıdır.

$$\frac{C_1}{C_2} = \exp((\lambda A + Z (U_1 - U_2)) / kT)$$

Eşitlikte  $\lambda$  büyüklük ve net yük dışındaki faktörleri göstermektedir. Böylelikle, dağılmayı etkileyen toplam etki büyüklük, hidrofobisite, yüzeyin yükü

ve partikülün ya da makromolekülün konformasyonu gibi faktörlere bölünmektedir (Albertsson, 1986).

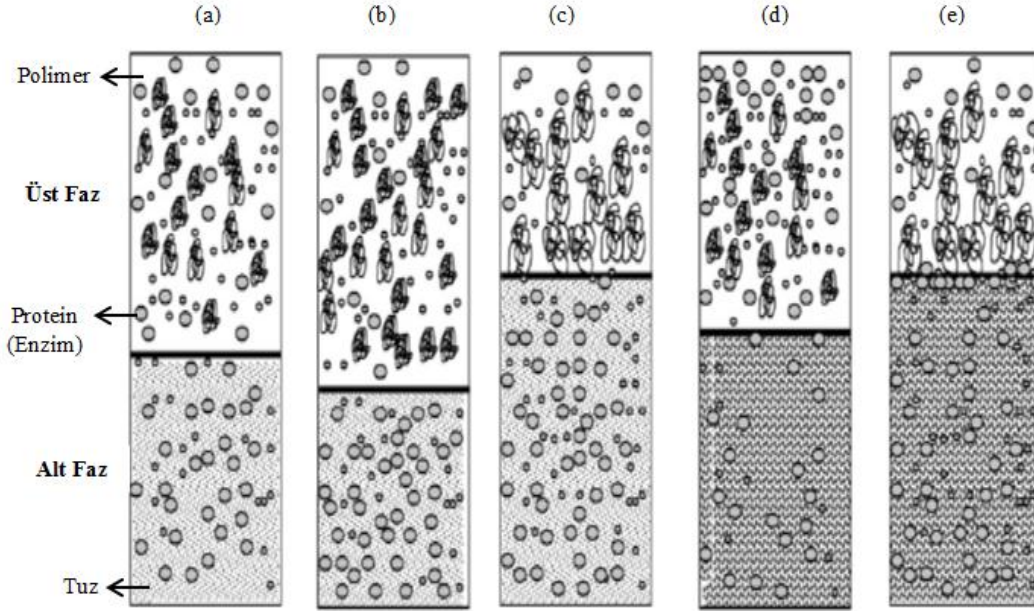
#### 2.5.4 Protein dağılımını etkileyen parametreler

Proteinler; yapısal bileşenler, hücre içi ya da dışına madde taşıyıcılar veya sinyal ileticiler ve enzimler gibi birçok özelliğe sahip biyomoleküller olarak adlandırılabilirler. Fizikokimyasal özellikleri çok iyi bilinmekte olup diğer hücre bileşenlerine (lipit, polisakkarit, nükleik asit gibi) göre çok daha kolay izole ve karakterize edilebilmektedirler.

Sulu ikili faz sistemlerinde; moleküller, fazlar arasında sistem ve moleküllerin kendilerine has özellikleri ve ortam etkileşimlerinin bağlantısıyla seçimli olarak dağılmaktadırlar. Proteinlerin dağılımını etkileyen sistemsel faktörler; sistem bileşenlerinin özellikleri, pH, konsantrasyonu, polimer molekül ağırlığı ve oranı, tuz türü ve oranıdır. Bunların yanında, proteinin dağılımında kendisinin etkilediği faktörler ise hidrofobik ve hidrofilik karakteri, yükü, yüzeyinde bulunan amino asit artıkları olmakla birlikte farklı sistemlerde bu yüzeysel özelliklerin dağılıma ne şekilde katkısı olacağıyla ilgili çok fazla bilgi bulunmamaktadır (Berggren et al., 2000).

Sulu ikili faz sistemlerinde dağılımın temel mekanizması Şekil 2.9.'daki gibidir. PEG-Tuz sistemlerinde PEG üst fazı, tuz ise alt fazı oluşturmaktadır (Şekil 2.9a). Biyomoleküllerin dağılımı üst fazı oluşturan polimerin "hacimsel dışlama etkisi" ve alt fazı oluşturan tuz çözeltisinin "salting-out" etkisine bağlı olmaktadır. Üst fazda bulunan polimerin sistemdeki konsantrasyonu arttıkça polimer tarafından kaplanan hacimde artmaktadır (Şekil 2.9b). Fakat polimer molekül kütlesi ve polimer zincir uzunluğundaki artış, üst fazda biyomolekül için yeterli yerin kalmasını engellemekte ve buna bağlı olarak biyomoleküllerin dağılımının alt faza doğru yönelmesine sebep olmaktadır ve "hacimsel dışlama etkisi" olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.9c). Alt fazda ise tuz konsantrasyonunda meydana gelen artış biyomoleküllerin çözünürlüğünü azaltmakta ve biyomoleküllerin dağılımının üst faza yönelmesine sebep olmaktadır ve "salting-out" olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.9d). Yüksek polimer molekül kütlesi ve

konsantrasyonu ile yüksek tuz konsantrasyonuna sahip sulu ikili faz sistemlerinde, biyomoleküllerin dağılımı hiçbir faza yönelmeksizin fazların ayrılma noktasında birikmeleri ile gerçekleşmektedir (Şekil 2.9e) (Babu et al., 2008).



Şekil 2.9. PEG-Tuz sistemlerinde biyomoleküllerin dağılımı (Babu, 2008).

Polimer-Polimer, Polimer-Tuz sulu ikili faz sistemlerinde kullanılan polimerler; PEG, dekstran, nişasta, polivinilalkol, UCON olup en çok kullanılanları PEG ve dekstrandır. Bunların toksik etkisi olmadığı için gıda ve ilaç endüstrisi için yapılan uygulamalarda kullanılmaktadır. Endüstriyel uygulamalarda yüksek saflıktaki dekstran pahalı olduğu için daha çok PEG/Tuz sistemleri kullanılmaktadır (Snyder et al., 1992). Polimer konsantrasyonundaki artış ile proteinlerin dağılımı tek taraflı olmakta ve dağılım katsayısı 1'in üzerine çıkmaktadır. Polimer konsantrasyonundaki artışla birlikte refraktif indeks, yoğunluk ve fazlar arasındaki vizkozitede artacaktır (Albertson, 1986). PEG hidrofobik karakterli bir polimerdir ve molekül kütlesi arttıkça hidrofobisitesi de artmaktadır (Vaidya et al., 2006). Proteinlerin dağılımına PEG molekül kütlesinin etkisi "Flory Huggins Teorisi" ile açıklanmaktadır. PEG ile protein arasındaki tercihli seçim, PEG molekül kütlesindeki artış bir noktadan sonra proteinlerin tuz fazına yönelmesiyle dışlama etkisi oluşturmaktadır. Bu sebeple proteinlerin

saflaştırılmasında yüksek molekül kütleli PEG'ler saflaştırılması istenen proteinin verimini düşüreceklerinden çok tercih edilmemektedirler (Klomkiao et al., 2005).

Polimer-Tuz sulu ikili faz sistemlerinde çoğunlukla sülfat tuzları ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ), fosfat tuzları ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), sitrat tuzları ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) kullanılmaktadır. Sulu ikili faz sistemlerinde tuzlar, fazlar arasındaki hidrofobisiteyi artırıp proteinle PEG arasındaki hidrofobisitenin artmasını ve bunun sonucunda da daha iyi bir ayrışmanın gerçekleşmesini sağlamaktadırlar (Su and Chiang, 2006). Tuzların dağılıma etkisinde alt ve üst faz arasındaki elektrik akımının farklılaşmasıyla olmaktadır. Alt faz negatif yüklü ve üst faz pozitif yüklü olup negatif yüklü proteinler üst faza elektrostatik itme kuvvetiyle gitmektedirler (Han and Lee, 1997). Tuzların hidrofobik karakterleri dağılıma etki eden en önemli faktördür. Proteinin dağılımına tuz iyonlarının etkisi genelde Hofmeister serisinde bulunan pozisyonlarıyla alakalı olup katyonlar için  $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Mg}^{+2}$  iken anyonlar için ise  $\text{SO}_4^{-2} > \text{HPO}_4^{-2} > \text{CH}_3\text{COO}^-$  şeklinde olmaktadır. Yüksek tuz konsantrasyonlarında Hofmeister serilerinin sol başlarındaki iyonların "salting out" etkisi proteinlerin çözünürlüklerini düşürmekte ve hidrofobik etkileşimleri artırarak proteinlerin PEG'ce zengin üst faza geçmesini sağlamaktadırlar (Silva and Franco, 2000).

Sulu ikili faz sistemlerinde protein konsantrasyonunun doygunluk sınırına gelmesi ve üzerine çıkmasıyla proteinlerin çökeltirek geri kazanımının düşmesine sebep olmaktadır. Bu yüzden, protein konsantrasyonları bu sistemlerde doygunluk sınırının altındaki değerlerde olmalıdır.

Faz ayrımının gerçekleşmesi sistemden sisteme farklılık göstermektedir. Bunun sebebi farklı yoğunluk ve viskozite özelliklerine sahip olmalarından kaynaklanmaktadır. PEG-Dekstran ve PEG-Tuz sistemleri en hızlı faz oluşturan sistemlerdir (Albertsson, 1986).

### 2.5.5 Sulu ikili faz sisteminin uygulama alanları

Biyolojik moleküller (proteinler, enzimler, nükleik asitler vb.) çoğunlukla seyreltik sistemlerde elde edilmektedirler ve üretimlerinde öncelik konsantrasyonlarını artırma işlemleri olmaktadır. Saflaştırma işlemi geleneksel

yöntemlerde santrifüj, filtrasyon ve yoğunlaştırma gibi farklı adımlardan oluşmakta ve bu işlemler sırasında ürün kayıpları meydana gelmektedir. Ayrıca birçok adımı içerdiği için zaman kaybı da sözkonusudur (Balasubramaniam, 2003). Sulu ikili faz sistemlerinin kullanımı; geleneksel yöntemlerin dezavantajlarını ortadan kaldırıp deriştirme, berraklaştırma ve saflaştırma basamaklarının tek bir adımda gerçekleşmesine olanak sağlayarak hem zaman hem de maliyetini azaltmaktadır.

Sulu ikili faz sistemi kullanılarak saflaştırılan enzimlerle ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. *Aspergillus oryzae*'den  $\alpha$ -galaktosidase enzimi, %12 PEG-4000 / %11.9 Fosfat sulu ikili faz sistemi ile 3.6 kat saflaştırma katsayısı ve %87.71 verim ile saflaştırılmıştır (Naganagouda and Mulimani, 2008). *Trichoderma reesei*'den  $\beta$ -glukosidaz enzimini, %18-PEG 1500 / %13 potasyum Fosfat sulu ikili faz sistemini kullanarak %92 verimle elde edilmiştir (Guatam and Simon, 2006). Tavuk yumurtasından lizozim enzimi %16.1 PEG-6000 / %12 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sulu ikili faz sistemi kullanılarak 7.6 kat saflaştırma katsayısı ve %70 verimle elde edilmiştir (Su and Chiang, 2006). Enzimlerin bitkilerden de sulu ikili faz sistemiyle başarılı saflaştırma çalışmaları bulunmaktadır. *Ananas comosus*'tan elde edilen bromelin ve fenol oksidaz enzimleri %18 PEG-1500 / %14 Fosfat sulu ikili faz sistemiyle; bromelin, %228 enzim geri kazanımı ile 4 kat saflaştırılmış ve fenol oksidaz %90 enzim geri kazanımı ile 2.7 kat saflaştırma katsayısıyla elde edilmiştir (Babu et al., 2008). Patatesten polifenol oksidaz enzimi %5 PEG-8000 / %28.5 Fosfat sistemiyle 15.7 kat saflaştırma katsayısı ve %97 verim ile elde edilmiştir (Vaidya et al., 2006).

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1 Materyal

Lakkaz enzim kaynağı olarak; ticari kültür mantarı *Agaricus bisporus* hasatından sonra, atık mantar kompostunda (Spent Mushroom Compost; SMC) bulunan atık mantar sapları kullanılmıştır. AMS içeren atık mantar kompostu PE-MA Mantarcılık (Foça-İzmir) üretim tesislerinden sağlanmıştır. Bu amaçla hasat yapılan odalardan alınan *Agaricus bisporus* atık mantar kompostu mantar sapı örnekleri aynı gün laboratuvara soğuk zincirle getirilmiştir.

#### 3.2 Kimyasallar

2,2'azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) (Sigma, A1888)

Amonyum Sülfat (  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ) (Riedel-de Haën, 11225)

Asetik Asit ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) (Riedel-de Haën, 27225)

Bovin Serum Albumin (BSA)(Sigma, P0834)

Coomasie-Brillant Blue (Fluka, 27815)

Di Potasyum Mono Hidojen Fosfat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) (Riedel-de Haën, 04248)

Di Sodyum Mono Hidojen Fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (Fluka, 71642)

Etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) (Sigma-Aldrich, 24102)

Fosforik Asit ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) (Riedel-de Haën, 04107)

Magnezyum Sülfat (  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ) (Fluka, 63140)

Polietilen Glikol 1000 (PEG 1000) (Fluka, 03395)

Polietilen Glikol 1450 (PEG 1450) (Aldrich, P5402)

Polietilen Glikol 3350 (PEG 3350) (Aldrich, 202444)

Polietilen Glikol 8000 (PEG 8000) (Aldrich, P2139)

Potasyum Di Hidrojen Fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (Riedel-de Haën, 04243)

Sodyum Asetat ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) (Merck, 1.06268)

Sodyum Bikarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) (Sigma, S8875)

Sodyum Di Hidrojen Fosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) (Sigma, S0751)

Sodyum Hidroksit ( $\text{NaOH}$ ) (Tekkim)

Sodyum Karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (Riedel-de Haën, 13418)

Sodyum Sülfat ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) (Sigma-Aldrich, 239313)

### **3.3 Cihazlar**

Analitik terazi (Precisa BJ1000 C, İsviçre)

Buzdolabı (Bosch)

Derin dondurucu (Bosch)

Hassas terazi (Denver instrument, Amerika Birleşik Devletleri)

Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı (İka Werke MSC Basic C, Amerika Birleşik Devletleri)

Liyofilizatör ( Edwards Modulyo, İngiltere)

Otomatik Pipet (10-100  $\mu\text{l}$ , 100-1000 $\mu\text{l}$ ) (NichipetEX; Japonya)

pH metre (WTW İmolab pH 720, Almanya )

Santrifüj (Hettich Rotina 35 R soğutmalı santrifüj, Almanya)

Sıcak su banyosu (Kotterman, Almanya)

Spektrofotometre (Varian Cary 300 Bio, Avustralya)

Ultrafiltrasyon (Sartorius, Sartocoon Silice 200, Almanya)

Vorteks (VWR, Almanya)

### 3.4 Çözeltiler

Çalışmalar boyunca kullanılan çözeltiler ve hazırlama şekilleri aşağıda verilmiştir.

**1 mM ABTS Çözeltisi:** Lakkaz aktivite ölçümünde, 1 mM 2,2'-Azinobis 3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit (ABTS) (514.62 g/mol) çözeltisi 0.1 M pH 4.6 asetat tamponunu kullanılarak hazırlanmıştır. Çözelti aktivite tayininden önce taze olarak hazırlanmıştır.

**0.1 M Asetat Tamponu:** 0.1 M 100 ml pH 4.0, 4.6, 5.0, 5.6 değerlerinde tampon hazırlamak için stok olarak 0.1 M Sodyum Asetat Anhidrit (8.204 g  $\text{CH}_3\text{COONa/l}$ ) ve 0.1 M Asetik Asit (13.61 g  $\text{CH}_3\text{COOH/l}$ ) çözeltileri kullanılmıştır. Sırasıyla; 0.1 M Sodyum asetat pH 4.0, 16.6 ml; pH 4.6, 44.9 ml; pH 5.0, 67.8 ml; pH 5.6, 89.3 ml ve 0.1 M Asetik asit pH 4.0, 83.4 ml; pH 4.6, 55.1 ml; pH 5.0, 32.2 ml; pH 5.6, 10.7 ml stok çözeltileri karıştırılarak hazırlanmıştır. Tüm çözeltilerin pH'ları karışımlar hazırlandıktan sonra pH metrede kontrol edilmiştir.

**0.1 M Fosfat Tamponu:** 0.1 M 100 ml pH 6.0, 6.5, 7.0, 8.0 değerlerinde tamponu hazırlamak için stok olarak 0.1 M monosodyum di hidrojen fosfat (12 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{l}$ ) ve 0.1 M di sodyum mono hidrojen fosfat (14.2 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{l}$ ) çözeltileri kullanılmıştır. Sırasıyla; 0.1 M monosodyum di hidrojen fosfat pH

6.0, 87.7 ml; pH 6.5, 68.5 ml; pH 7.0 39.0 ml; pH 8.0, 5.3 ml ve 0.1 M di sodyum mono hidrojen fosfat pH 6.0, 13.3 ml; pH 6.5, 31.5 ml; pH 7.0, 61.0 ml; pH 8.0, 94.7 ml stok çözeltileri karıştırılarak hazırlanmıştır. Tüm çözeltilerin pH'ları karışımlar hazırlandıktan sonra pH metrede kontrol edilmiştir.

**0.1 M Karbonat Tamponu:** 0.1 M 100 ml pH 9.0 değerinde tampon; stok olarak hazırlanan 0.1 M Sodyum Karbonat (10.8 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/l) çözeltisinden 10 ml ve 0.1 M Sodyum Bikarbonat (8.4 g NaHCO<sub>3</sub>/l) çözeltisinden 90 ml karıştırılarak hazırlanmıştır. Çözeltinin pH'ı karışım hazırlandıktan sonra pH metrede kontrol edilmiştir.

**Bradfort Reaktifi:** 40 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 ml %95'lik etanol içinde çözülüp, üzerine 55 ml %88'lik fosforik asit ilave edilerek distile su ile 1 l'ye tamamlanarak filtre edilmiştir. Çözelti buzdolabında ve koyu renkli şişede saklanmıştır.

### 3.5 Atık Mantar Saplarının Temizlenmesi ve Liyofilizasyonu

AMS örnekleri laboratuvara ulaştırıldıktan sonra plastik bir bıçak yardımıyla kompost atıklarından temizlenmiş ve -20 °C'de donması sağlanmıştır. Temizlenmiş ve dondurulmuş örnekler liyofilizatörde (Edwards Modulyo, İngiltere) kurutulmuştur. Böylece mantar sapı içerisindeki mevcut olan su soğukta ve vakum altında süblimleşme ile uzaklaştırılmış ve porselen havanda ezilerek toz haline getirilmiştir. Enzimin buzdolabında +4 °C'de aktivite kaybı olmaksızın uzun süre saklanması sağlanmıştır. Örneklerdeki %NEM içeriği aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

$$\% NEM = \frac{(Başlangıç Ağırlık - Kurutulduktan Sonraki Ağırlık)}{Başlangıç Ağırlık} \times 100$$

### **3.6 Ham Enzim Ekstraktının Hazırlanması ve Ekstraksiyon Veriminin Belirlenmesi**

AMS tozu %10 olacak şekilde pH 4.6 asetat tamponu içinde 1 dk. 4. kademedeki vorteks (VWR, Almanya) ile karıştırılarak buzdolabında (Bosch) 30 dk. +4 °C’de bekletilmiş sonrasında 7000 rpm’de 10 dk. santrifüjlenmiştir (Hettich Rotina 35 R soğutmalı santrifüj, Almanya).

Ekstraksiyon verimini belirlemek için 1. ekstraktın süpernatantı alınarak alınan miktar kadar kalıntı üzerine pH 4.6 asetat tamponu eklenmiştir. Aynı prosedür uygulanarak 9. ekstrakta kadar işleme devam edilmiştir. Böylece ekstraksiyon verimi için ardışık ekstraksiyonlar gerçekleştirilmiştir.

### **3.7 Lakkaz Aktivitesinin Belirlenmesi**

Lakkaz enzim aktivitesi, yapay bir substrat olan ABTS’nin oksidasyonunun izlenmesi yoluyla ölçülmüştür (Irshad et al., 2011). Bu yöntem, lakkaz aktivitesi ölçümünde (Bourbannais and Paice, 1990) çok yaygın olarak kullanılmaktadır. ABTS, daha istikrarlı ve tercih edilen hali olan radikal katyonu formuna lakkaz ile oksitlenmektedir. Oluşan yoğun mavi-yeşil renk radikal katyon miktarı ile doğru orantılıdır ve bu ilişki ile lakkaz enzim aktivitesi ölçülebilmektedir.

Enzimatik reaksiyon toplam 1 ml’lik reaksiyon hacminde gerçekleştirilmiştir. 1 mM pH 4.6 asetat tamponunda hazırlanmış 0.9 ml ABTS çözeltisi üzerine pH 4.6 asetat tampon ile uygun seyreltik 0.1 ml enzim çözeltisi ilave edilmiştir. Enzim aktivitesi, reaksiyon karışımının spektrofotometrede 420 nm’de 3 dk.’lık inkübasyon periyodunda absorbanslarının kinetik olarak ölçülmesiyle gerçekleştirilmiştir.

1 Unit (U) enzim aktivitesi; reaksiyon koşullarında, dakikada 1  $\mu$ Mol ABTS’yi okside eden enzim miktarı olarak ifade edilmiştir. Lakkaz aktivitesi U/ml olarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$Aktivite = \left( \frac{\Delta A_{420} \times V_T \times 10^6}{\varepsilon \times V_{enzim} \times t} \right) \times \text{Seyreltme Faktörü}$$

#### Sabit değerler

$\varepsilon = 36\,000 \text{ mol/cm (ışık yolu)} (36 \text{ mMol}^{-1} \text{ cm}^{-1})$  (Palmieri *et al.*, 1997)

$V_T =$  Toplam hacim, ml ( Substrat + Enzim )

$V_{enzim} =$  Enzim miktarı, ml

$t = 1 \text{ dk.}$

$10^6 =$  Sabit değer (mikromole dönüşüm faktörü)

#### Değişkenler

$\Delta A_{420} =$  Ölçüm esnasında 420 nm'deki dk.'da absorbans değişimi

Seyreltme Faktörü = Ana enzim çözeltisinin asetat tamponu ile seyreltilmesi durumunda kullanılmıştır.

### **3.8 Protein Miktarının Belirlenmesi**

Lakkaz örnekleri protein konsantrasyonlarının belirlenmesi için Bradford (Bradford, 1976) metodu kullanılmıştır. Boya bağlanması esaslı yöntemlerin en yaygını olan bu yöntemde Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası kullanılmaktadır. Bu yöntem, proteinlerin bazik gruplarıyla (Lys, Arg) boyaların asidik gruplarının etkinleşip renk oluşturması esasına dayanmaktadır.

Protein standart grafiği kullanılarak tüm ekstraktlarda protein konsantrasyonları saptanmıştır. En yaygın olarak kullanılan protein standardı Bovin Serum Albumin (BSA) 'dir. Standart BSA 'ın; 1000 µg/ml, 750 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 100 µg/ml, 75 µg/ml, 50 µg/ml konsantrasyonlarına göre BSA standart çözeltisi hazırlanmıştır.

Standartlar ve ölçümü yapılacak protein örnekleri için protein miktarı tayini; 50µl örnek, standart çözelti ve tampon (kör için) üzerine 1.5 ml Bradford reaktifi ilave edilmiş ve 10 dk. oda sıcaklığında, karanlıkta bekletildikten sonra

spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunmuştur. Örnekteki protein değeri, hazırlanan standart grafik kullanılarak hesaplanmıştır.

### **3.9 Lakkazın ATPS ile Kısmi Saflaştırılması**

#### **3.9.1 Sulu ikili faz sistemi**

Çalışmamızda sulu ikili faz denemeleri için (Benavides and Rito-Palomares, 2004) 4 PEG ve 4 tuz stok çözeltileri hazırlanmıştır. Stok PEG (%50, w/w) (PEG 1000, 1450, 3350, 8000 g/mol) çözeltileri ve stok tuz (%30, w/w) (sodyum dihidrojen fosfat/di potasyum mono hidrojen fosfat, sodyum sülfat, amonyum sülfat, magnezyum sülfat) çözeltilerinin hazırlanmasında distile su kullanılmıştır. Hazırlanan çözeltiler çalışma pH değerimiz olan 4.6'ya 1 M ve 10 M asetik asit ile 1 M sodyum hidroksit çözeltileri kullanılarak getirilmişlerdir.

Ham ekstraktaki lakkaz enziminin ikili faz sisteminde dağılımını incelemek için farklı konsantrasyonlarda PEG ve tuz çözeltileri karıştırılmıştır. Sistemdeki faz karışımlarına ait faz diyagramları ile oluşturulmuştur (Albertson, 1986; Benavides and Rito-Palomares, 2004; Yue et al., 2007). Sulu ikili faz sistemi 10 ml'lik dereceli santrifüj tüplerinde toplam miktar 5 g olacak şekilde hazırlanmıştır (Mayola-Deloisa et al., 2009). Ham enzim ekstraktı sistemin %1'ini oluşturacak şekilde ilave edilmiştir ve son sistem ağırlığı olan 5 g'a tamamlamak için bidistile su kullanılmıştır. Karışım 1 dk. 1. kademedede vorteks ile karıştırılmış ve faz ayrımının oluşması için 30 dk oda sıcaklığında (25°C) bekletilmiştir. Fazların tamamen ayrılması için, sonrasında 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Alt ve üst fazın hacimleri kaydedilmiştir. Her fazın lakkaz enzim aktivitesi ve protein miktarları yapılmıştır. Sulu ikili faz sisteminde yapılan tüm tayinler oda sıcaklığında (25±2°C) üç tekrarlı çalışılmıştır.

#### **3.9.2 Tuz türü ve konsantrasyonu**

PEG molekülü (%50'lik PEG-1000) sabit tutularak, %30'luk 4 tuz çözeltisinin (amonyum sülfat, sodyum sülfat, sodyum dihidrojen fosfat/di potasyum hidrojen fosfat, magnezyum sülfat) sistemde farklı oranlarda 15 ml'lik

santrifüj tüpünde toplam 5 g karıştırılmalarıyla, ekstraktaki lakkaz enziminin dağılımı çalışılmıştır. Bu sonuçlar baz alınarak sabit PEG-1000'de en verimli tuz türü ve konsantrasyonu belirlenmiştir.

### 3.9.3 PEG molekül kütlesi ve konsantrasyonu

En uygun tuz türünün belirlenmesinin ardından, tuz miktarı sabit tutulup %50 PEG 1000, 1450, 3350 ve 8000 sistemde farklı oranlarda tuz çözeltisiyle karıştırılarak en verimli lakkaz kazanımının olduğu PEG molekül kütlesi ve konsantrasyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

### 3.9.4 Ham enzim ekstrakt konsantrasyonu

En verimli PEG molekülü ile tuz türü ve konsantrasyonlarının belirlenmesinin ardından sistemde %1 olarak kullanılan ham enzim ekstraktı oranları değiştirilerek (% 1-7) enzim konsantrasyonunun bu ikili faz sisteminde dağılıma etkisi çalışılmıştır.

### 3.9.5 Dağılım parametreleri

Fazlar arasındaki dağılım davranışları aşağıdaki bazı parametrelerin değerlendirilmesi ile istenilen biyomolekülün etkin bir ayrımının yapılması mümkün olabilmektedir (Hatti-Kaul, 2000; Mohamadi, 2007). Etkin ayrımın nicel olarak ifadesi için aşağıdaki formüller kullanılmıştır.

**(a) Faz Hacim Oranı ( $V_R$ ):** Üst fazdaki hacmin ( $V_{üst}$ ) alt fazın hacmine ( $V_{alt}$ ) oranıdır.

$$V_R = \frac{V_{üst}}{V_{alt}}$$

**(b) Protein Dağılım Katsayısı ( $K_p$ ):** Üst fazdaki protein miktarının ( $P_{üst}$ ) alt fazdaki protein miktarına ( $P_{alt}$ ) oranıdır.

$$K_p = \frac{P_{üst}}{P_{alt}}$$

**(c) Lakkaz Enziminin Dağılım Katsayısı ( $K_e$ ):** Üst fazdaki lakkaz aktivitesinin ( $A_{üst}$ ) alt fazdaki lakkaz aktivitesine ( $A_{alt}$ ) oranıdır.

$$K_e = \frac{A_{üst}}{A_{alt}}$$

**(d) Spesifik Aktivite (SA):** Lakkaz enzim aktivitesinin (U/ml) protein miktarına (mg/ml) oranıdır. U/mg protein olarak ifade edilir.

$$SA = \frac{\text{Enzimatik Aktivite}}{\text{Protein Miktarı}}$$

**(e) Saflaştırma Katsayısı (PF):** Üst fazdaki spesifik aktivitenin, ham enzim ekstraktının spesifik aktivitesine oranıdır.

$$PF = \frac{\text{Üst faz}_{SA}}{\text{Ham Enzim Ekstrakt}_{SA}}$$

**(f) Lakkaz Enziminin Geri Kazanımı (%R):** Üst fazdaki lakkaz enzim aktivitesinin sisteme ilave edilen lakkaz ham enzim ekstraktının başlangıç aktivitesine oranıdır.

$$R(\%) = \frac{\text{Üst Fazdaki Enzimatik Aktivite}}{\text{Sisteme ilave Edilen Toplam Aktivite}}$$

**(g) Verim (%Y):** Sulu ikili faz sisteminde üst fazın verimi aşağıdaki gibi hesaplanmaktadır.

$$Y(\%) = \frac{100V_{üst} K_e}{V_{üst}K_e + V_{alt}}$$

**(h) Lakkaz Enziminin Selektivitesi ( $\alpha$ ):** Fazlardaki, lakkaz enziminin dağılım katsayısı ( $K_e$ ) ile proteinlerin dağılım katsayısı ( $K_p$ ) nın birbirine oranıdır.

$$\text{Selektivite } (\alpha) = \frac{K_e}{K_p}$$

### 3.9.6 PEG fazından enzimin alınması

Enzimin toplandığı PEG fazından enzimi konsantre etmek ve PEG'i ayırmak için Ebiltem TTO'da 10 000 kDA'luk membrandan ultrafiltrasyonu yapılmıştır. İşlem için ultrafiltrasyon cihazına (Sortarius, Almanya) 10 000 kDA'luk membran yerleştirilmiş ve 250 ml PEG fazında toplanmış enzim, 60 ml retantate olana kadar filtre işlemi gerçekleştirilmiştir.

## 3.10 Lakkaz Aktivitesine Bazı Parametrelerin Etkisi

### 3.10.1 pH etkisi

Enzim aktivitesine pH'ın etkisini incelemek için farklı pH değerlerinde (4.0-9.0) tampon çözeltilerle standart koşullarda aktiviteleri ölçülmüştür. Tampon çeşitleri ve değerleri; pH 4.0-5.6 asetat tamponu, pH 6.0-8.0 fosfat tamponu ve pH 9.0 karbonat tamponu olarak kullanılmıştır. Enzimin optimum pH değeri, enzimin % bağıl aktivitesi ile pH arasında çizilen grafik ile belirlenmiştir.

### 3.10.2 Sıcaklık etkisi

Lakkaz enzim aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimini ve optimum sıcaklığı belirlemek için enzim, 20-70°C'deki sıcaklıklarda 10 dk. bekletilmiş ve aktivitesi ölçülmüştür. Enzimin optimum sıcaklık değeri, enzimin % bağıl aktivitesi ile sıcaklık arasında çizilen grafik ile belirlenmiştir.

### 3.10.3 Kararlılık testleri

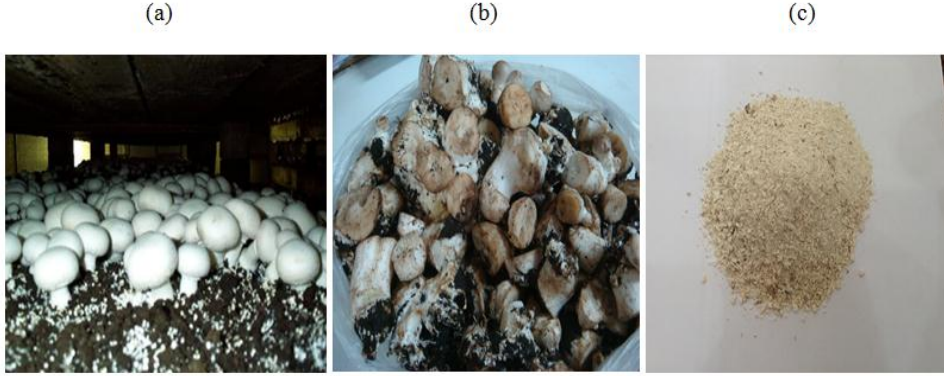
pH kararlılığı; enzim farklı pH'lardaki (asetat 4.0-5.6, fosfat 6.0-8.0, karbonat 9.0) tampon çözeltilerinde hazırlanarak oda sıcaklığında 10 gün boyunca bekletilmiş ve her gün aktiviteleri ölçülmüştür. Substrat pH'sı 4.6'ya ayarlanarak standart koşullarda aktivite ölçümleri yapılmıştır.

Termal kararlılık testi; enzim 24 saat boyunca farklı sıcaklıklarda 20-70°C bekletildikten sonra 0, 1, 2, 4, 8, 16 ve 24. saatlerde alınan örneklerden standart koşullarda (25°C'de) aktivite ölçümleri yapılmıştır.

Depo kararlılığı; enzimin uzun süre bekletilmesiyle aktivite kaybının ölçüsüdür. Bu deneme için enzim 4°C'de 3 ay boyunca haftalık örnekler alınarak aktiviteleri standart koşullarda (25°C'de) ölçülmüştür.

#### 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

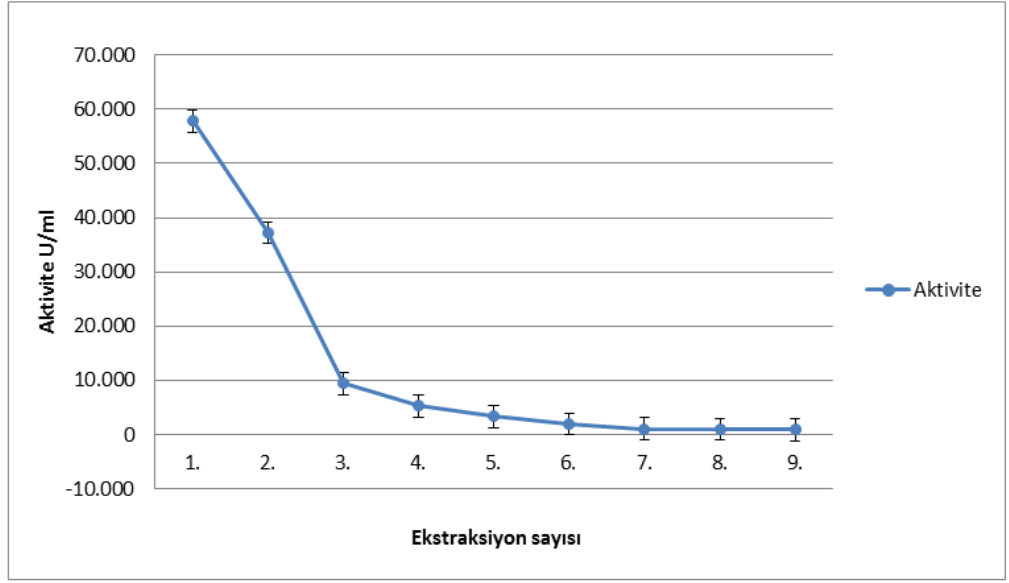
Atık mantar sapı örnekleri laboratuvara getirildikten sonra liyofilizatörde kurutulmuş ve işlem sonrasında nem miktarı % 87.79 olarak tespit edilmiştir. Böylece, 100 g yaş mantar atığından 12.21 g mantar tozu elde edilmiştir (Şekil 4.1.).



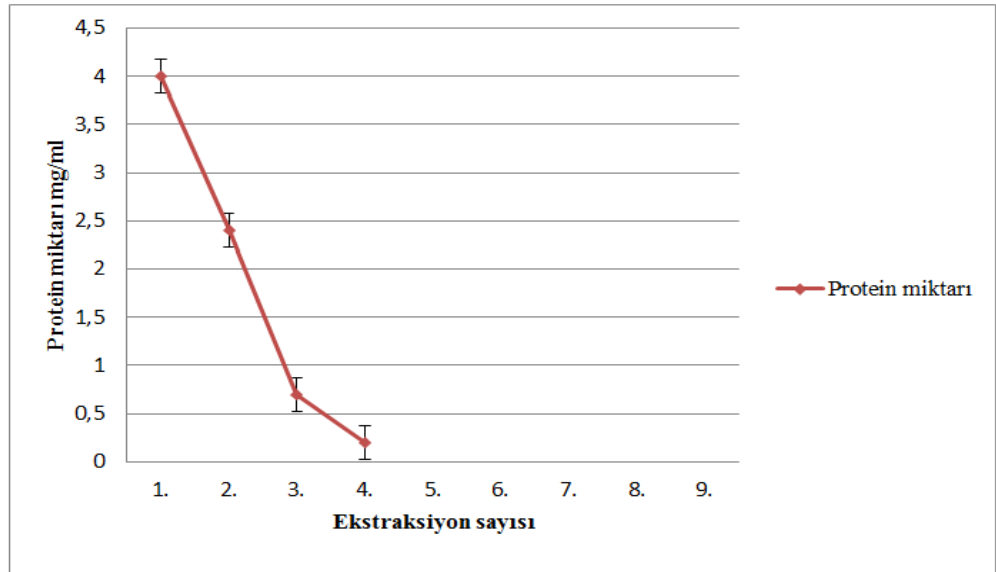
Şekil 4.1. *Agaricus bisporus*, (a) Kültür odalarında kompostta yetişmiş hali, (b) AMS'lerinin atık mantar kompostundan ayrılmış hali, (c) temizlenip liyofilize edilmiş AMS'lerinin öğütülmüş hali.

Ham enzim ekstraktının hazırlanmasında aynı zamanda ekstraksiyon verimi için ardışık ekstraksiyonlar yapılmıştır. 1 g atık mantar sapı tozundan, 9 ekstraksiyon sonucu elde edilen toplam enzim aktivitelerinin %80.46'lık kısmını ilk 2 ardışık ekstraksiyonun enzim aktivitesi oluşturmuştur. Sonraki; 3, 4, 5, 6, 7, 8 ve 9. ekstraksiyonların aktiviteleri çok düşük olduğu için, ilk iki ekstraksiyon ham enzim ekstraktı için yeterli görülmüştür (Şekil 4.2.). Ekstraksiyon sayısının artması; verim, aktivite kaybı ve seyrelmeye neden olabilir. Aynı zamanda protein miktarının da ekstraksiyon sayısı arttıkça düştüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.3.).

Bu yüzden 1. ve 2. ekstrakt karışımı yeterli görülmüştür ve sulu ikili faz sisteminde bu iki ekstrakttan elde edilen çözelti ham enzim ekstraktı olarak kullanılmıştır. Ham enzim ekstraktının, protein miktarı 3.9 mg/ml ve aktivitesi 53.330 U/ml olarak hesaplanmıştır.

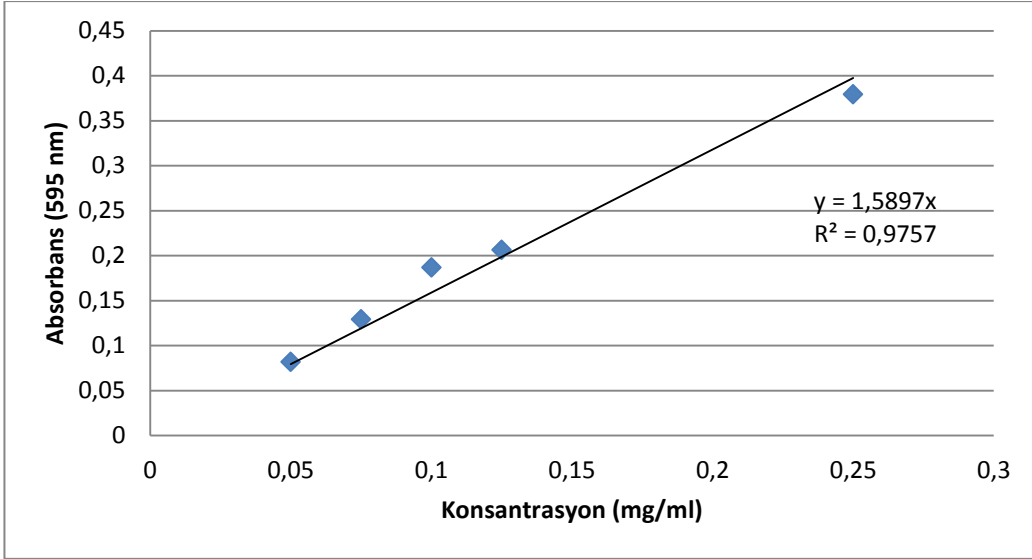


Şekil 4.2. Ham enzim ekstraktlarının, ekstraksiyon verimi ve aktivitesi (U/ml).



Şekil 4.3. Ham enzim ekstraktlarının, ekstraksiyon verimi ve protein miktarı (mg/ml).

Protein miktarlarının belirlenmesinde protein standart grafiği kullanılmıştır (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. Bradford yöntemi ile BSA kullanılarak hazırlanan protein standart grafiği.

#### 4.1 Sulu İkili Faz Sistemi

Farklı oranlarda PEG ve tuz çözeltilerinin karıştırılmasıyla hazırlanan sistemlerde fazların ayrılması gerçekleşmiş ve böylece lakkaz enziminin dağılımı sağlanmıştır. Faz ayrılmasıyla; PEG çözeltisi üst fazı, tuz çözeltisi ise alt fazı oluşturmuştur. Sulu ikili faz sistemlerinde ayrılma katsayısı hidrofobisiteye bağlı olduğu gibi proteinlerin yüklerine de bağlıdır (Andrews et al., 2005). Negatif yüklü proteinler üst faza pozitif yüklü proteinler ise alt faza ilerlemekte ve izoelektrik noktalarına (pI) göre fazları arasında dağılım göstermektedirler (Gautam and Simon, 2006). *Agaricus bisporus*'tan elde edilen lakkaz enziminin izoelektrik noktası (pI) 3.4-4.0 aralığında bulunmuştur (Wood, 1980). Lakkaz enzimi; asidik, negatif ve hidrofobik bir protein olmasından dolayı üst faza ilerlemektedir (Mayolo-Deloisa et al., 2009). Fazlar arasında oluşan hidrofobik farklılığın artmasıyla, protein molekülleri ve PEG arasındaki hidrofobik etkileşimde artar ve buna bağlı olarak daha iyi bir saflaştırılma gerçekleştirilebildiği gösterilmiştir (Su and Chiang, 2006).

Moleküllerin ikili veya üçlü fazlar arasındaki dağılım davranışları; biyomoleküllerin özellikleri, hidrofobik etkileşimler, yük, hidrojen bağları gibi birçok faktöre bağlıdır. Faz ayrılmasında, uygun bir sistemin seçimi için net açıklayıcı bir teori maalesef bulunmamaktadır. Bundan dolayı, uygulamada

enzimin optimum dağılımının sağlanması için en uygun sistemin oluşturulmasında deneysel optimizasyon çalışmaları şarttır. Lakkazın saflaştırılmasında kullanılacak sulu ikili faz sisteminin optimizasyonu ve enzimi iyi verimle yüksek oranda saflaştırabilmek için sistemi etkileyen ana parametreler olan; tuz türü ve konsantrasyonu, PEG molekül kütlesi ve konsantrasyonu, ham ekstrakt konsantrasyonları çalışmamızda optimize edilmiştir.

#### 4.1.1 Tuz türünün ve oranının belirlenmesi

Tuz türünün belirlenmesinde polimer olarak PEG-1000 kullanılmıştır. Çeşitli tuz çözeltilerinin (sodyum di hidrojen fosfat/di potasyum mono hidrojen fosfat, sodyum sülfat, amonyum sülfat, magnezyum sülfat) farklı oranları ile hazırlanan sulu ikili faz sistemlerinde *Agaricus bisporus* atık mantar saplarından elde edilen lakkaz enziminin dağılımı gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.1.'deki gibidir.

Çizelge 4.1.'de *A. bisporus* atık mantar sapı lakkazının farklı faz kombinasyonlarında dağılımı görülmektedir. PEG-tuz sulu ikili faz sistemlerinde, üst fazı oluşturan PEG fazında toplanan lakkaz enziminin en yüksek geri kazanımı (%R)  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ile hazırlanmış olan sistemlerde görülmüştür. %10 PEG ve %10  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  sisteminde faz oluşumu görülmezken diğer tüm kombinasyonlarda ikili faz oluşmuştur ve faz hacim oranı  $V_R$  1'in altındadır. %15 PEG-1000 ve %10  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  sisteminde faz hacim oranı  $V_R$  1'in üzerinde olduğu görülmüştür. %10 PEG-1000 ve %12,5  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  sisteminde en yüksek geri kazanım sağlanmıştır.

%15 PEG-1000 ve %15  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  faz bileşiminde faz hacim oranı olan  $V_R$ 'nin 1'in üzerinde olması ve diğer sistemlere göre enzim geri kazanımının (%R) düşük olması ayrıca %12.5 PEG-1000 / %12.5 ve %15  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  ile %15 PEG-1000 ve %12.5  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  sistemlerinde faz oluşumu görülmemiştir. Bu durum  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  tuzunun lakkaz enzimi için uygun bir tuz olmadığını göstermektedir.

%12.5 PEG-1000 ve %15  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ile %15 PEG-1000 ve %15  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'ta  $V_R$  değeri 1'in altında olmasına rağmen geri kazanım (%R) oranları düşüktür ve %12.5 PEG-1000 ve %12.5  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ile %15 PEG-1000 ve %12.5  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  sistemlerinde faz oluşumu görülmemiştir. Bu yüzden  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  uygun bir tuz olarak değerlendirilmemiştir.  $\text{MgSO}_4$ 'ta ise faz ayrımının çok net olmaması nedeniyle %12.5 PEG-1000 ile %12.5  $\text{MgSO}_4$  ve %15  $\text{MgSO}_4$ , %15 PEG-1000 ile %12.5  $\text{MgSO}_4$  ve %15  $\text{MgSO}_4$  sistemlerinde faz oluşumu görülmemiştir. %15 PEG-1000 ile %20  $\text{MgSO}_4$  sisteminde faz oluşmasına rağmen faz hacim oranı  $V_R$ 'nin 1'e çok yakın olması ve geri kazanım (%R) değerinin düşük olması  $\text{MgSO}_4$ 'ın uygun bir tuz olmadığını göstermiştir.

Tuzların hidrofobik karakterleri dağılıma etki eden en önemli faktör olup proteinin dağılımına tuz iyonlarının etkisi genelde Hofmeister serisindeki pozisyonlarıyla alakalıdır. Katyonlar için  $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Mg}^{+2}$  iken anyonlar için ise  $\text{SO}_4^{-2} > \text{HPO}_4^{-2} > \text{CH}_3\text{COO}^-$  şeklindedir. Yüksek tuz konsantrasyonlarında Hofmeister serilerinin sol başlarındaki iyonların "salting out" etkisi proteinlerin çözünürlüklerini düşürmekte ve hidrofobik etkileşimleri artırarak proteinlerin PEG'ce zengin üst faza geçmesini sağlamaktadırlar (Silva and Franco, 2000). Çalışmamızda PEG- $\text{Na}_2\text{SO}_4$  sisteminde lakkaz enziminin çoğunun üst faza yönlendirildiği görülmüştür. Enzimin sulu ikili faz sisteminde dağılımı hidrofobisite ile etkilenmektedir.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 'ın diğer sülfat tuzlarına oranla  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$  daha kolay faz oluşturma ve hidrofobik etkileşimi artırma özelliğine sahip olması, enzimin PEG fazına ilerlemesini sağlamıştır (Yue et al, 2007). Fazlar arasındaki hidrofobik farkın artırılması PEG ve protein molekülleri arasındaki hidrofobik etkileşimlerin daha da arttıracağından iyi bir saflaştırmaya neden olacaktır (Su and Chiang, 2006). Bu nedenle sonraki deneysel aşamalarda ikili faz sisteminde uygun tuz olarak  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  kullanılmıştır.

Çizelge 4.1. Lakkaz enziminin dağılımında faz kombinasyonları ve tuz türünün seçimi

| Faz Kombinasyonu       |                                                                               | $V_R$       | $K_p$ | PF   | R (%) |
|------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-------------|-------|------|-------|
| % PEG(%50)<br>(%, w/w) | % Tuz(%30)<br>(%,w/w)                                                         | $V_U / V_A$ |       |      |       |
| %12.5 PEG-1000         | % 12.5 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> *                      | -           | -     | -    | -     |
| %12.5 PEG-1000         | % 15 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                          | 0.57        | 2.48  | 1.45 | 61.11 |
| %15 PEG-1000           | % 12.5 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> *                      | -           | -     | -    | -     |
| %15 PEG-1000           | % 15 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                          | 0.8         | 23.7  | 0.5  | 20.66 |
| %10 PEG-1000           | % 10 Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> *                                        | -           | -     | -    | -     |
| %10 PEG-1000           | % 12.5 Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                                        | 0.43        | 6.39  | 1.21 | 94.06 |
| %10 PEG-1000           | % 15 Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                                          | 0.43        | 2.39  | 1.03 | 85.16 |
| %12.5 PEG-1000         | % 10 Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                                          | 0.72        | 3.5   | 1.58 | 66.89 |
| %12.5 PEG-1000         | % 12.5 Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                                        | 0.68        | 0.44  | 5.35 | 74.96 |
| %12.5 PEG-1000         | % 15 Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                                          | 0.56        | 0.34  | 4.85 | 54.54 |
| %15 PEG-1000           | % 10 Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                                          | 1.1         | 1.05  | 5.57 | 63.86 |
| %15 PEG-1000           | % 12.5 Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                                        | 0.72        | 0.14  | 5.93 | 59.13 |
| %15 PEG-1000           | % 15 Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                                          | 0.68        | 0.36  | 1.29 | 28    |
| %12.5 PEG-1000         | % 12.5 (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )* | -           | -     | -    | -     |
| %12.5 PEG-1000         | % 15 (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )*   | -           | -     | -    | -     |
| %15 PEG-1000           | % 12.5 (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )* | -           | -     | -    | -     |
| %15 PEG-1000           | % 15 (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )    | 1.2         | 2.35  | 0.4  | 48.89 |
| %12.5 PEG-1000         | % 12.5 MgSO <sub>4</sub> *                                                    | -           | -     | -    | -     |
| %12.5 PEG-1000         | % 15 MgSO <sub>4</sub> *                                                      | -           | -     | -    | -     |
| %15 PEG-1000           | % 12.5 MgSO <sub>4</sub> *                                                    | -           | -     | -    | -     |
| %15 PEG-1000           | % 15 MgSO <sub>4</sub> *                                                      | -           | -     | -    | -     |
| %15 PEG-1000           | % 20 MgSO <sub>4</sub>                                                        | 0.91        | 2.2   | 6.65 | 54.39 |

\*Bu faz kombinasyonlarında faz oluşumu gözlenmemiştir.

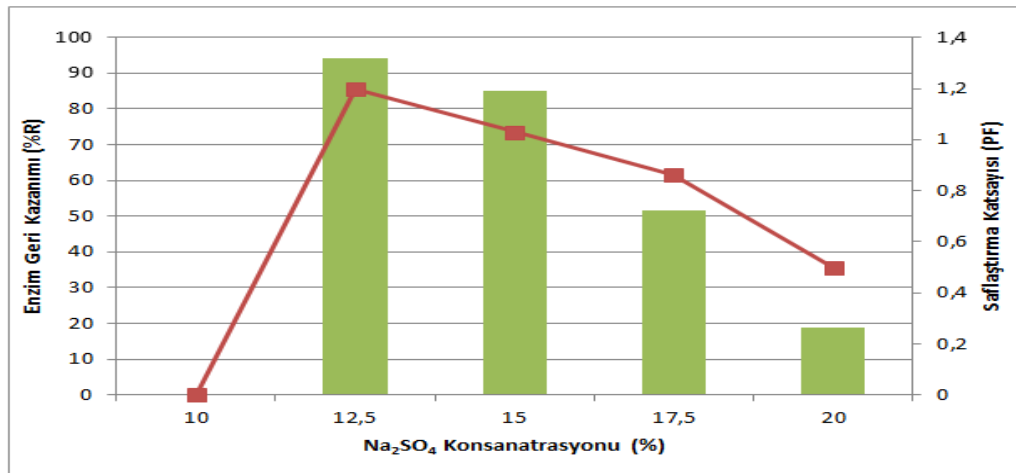
Lakkaz enziminin PEG-Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sisteminde tuz konsantrasyonunun dağılıma etkisini incelemek için %10 PEG-1000 ile tuzun % 10, 12.5, 15, 17.5, 20'lik oranları kullanılarak sistemler hazırlanmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.2. ve Şekil 4.5.'deki gibidir.

Çizelge 4.2 Tuz konsantrasyonunun enzim dağılımına etkisi.

| Tuz konsantrasyonu | PF   | Geri kazanım R (%) |
|--------------------|------|--------------------|
| 10                 | 0    | 0                  |
| 12,5               | 1.21 | 94.06              |
| 15                 | 1.03 | 85.16              |
| 17,5               | 0.86 | 51.53              |
| 20                 | 0.5  | 18.67              |

Tuz konsantrasyonu, sulu ikili faz sistemlerinde enzimin yüzey özelliklerini değiştirmektedir. Konsantrasyonun artması proteinlerin daha hidrofobik olmasını sağlayarak dağılımların üst faza ilerlemesini arttırmaktadır. Bununla birlikte, tuz konsantrasyonundaki artışın fazlası proteinlerin faz ayrımının olduğu yerde çökmesine de sebep olmaktadır. Enzimler, yüksek tuz konsantrasyonunun "salting-out" etkisiyle denatüre olmakta ve buna bağlı olarak geri kazanımları ve aktiviteleri düşmektedir (Klomklao et al., 2005; Yue et al., 2007). Bu nedenlerden dolayı, tuz konsantrasyonunun oranı enzimin geri kazanım ve dağılımı için önemli olmaktadır.

Şekil 4.6.'da görüldüğü gibi  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  konsantrasyonu %12.5 olduğunda başlangıca göre saflaştırma 1.21 kat artmakta ve geri kazanım %94.06 olmaktadır. Tuz konsantrasyonunun %12.5'ten %20'ye artmasıyla enzimin saflaştırma katsayısı (PF) ve % geri kazanımının düştüğü görülmektedir. Enzimin geri kazanımı, dağılım katsayısı ve saflaştırma katsayısı açısından çalışmaların devamında  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  konsantrasyonu %12.5 olarak seçilmiş ve kullanılmıştır.



Şekil 4.5. AMS lakkaz ekstraktından PEG-1000/ $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ikili faz sistemi ile lakkaz ayrımında Tuz konsantrasyonunun, enzim geri kazanımı ve saflaştırma katsayısı üzerine etkisi.

#### 4.1.2 PEG molekülünün kütlesi ve oranının belirlenmesi

Polimer molekül kütlesi, sulu ikili faz sistemlerinde örneklerin dağılımında etkili olup uygun molekül kütlelerinin seçimi sistemin optimizasyonunda önem taşımaktadır. Sistemde polimer-enzim etkileşimlerinin sayısını değiştirerek ya da faz diyagramını değiştirerek fazlara dağılımı etkilemektedir (Antov et al., 2006).

%10 PEG-%12.5 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve %10 PEG-%15 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sistemleri kullanılarak PEG molekül kütlelerinin; faz hacim oranına (VR), enzimin dağılma katsayısına (Ke), proteinlerin dağılma katsayısına (Kp), saflaştırma katsayısı (PF) ve enzim geri kazanımına (%R) etkisi incelenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.3. 'de verilmiştir.

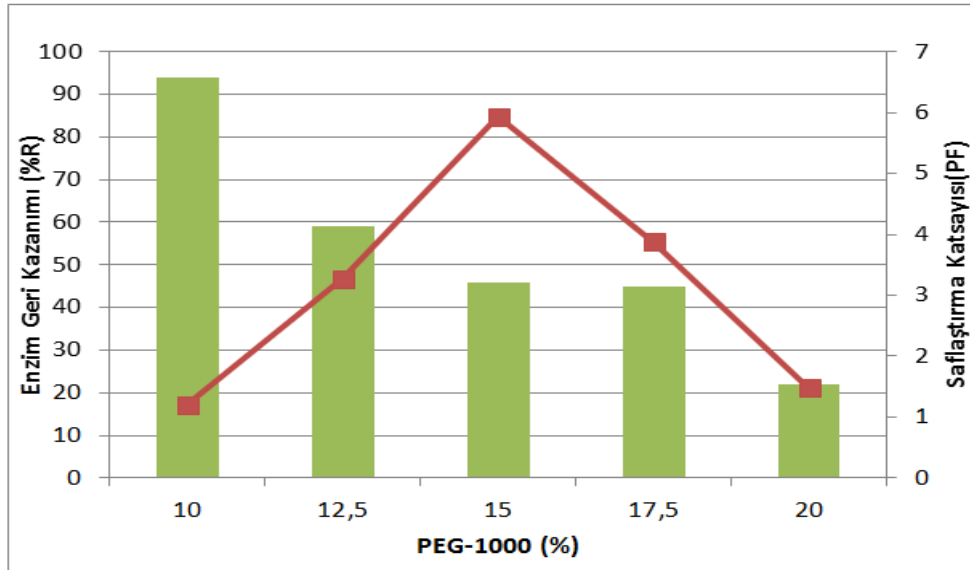
PEG zincirleri ile materyalin hidrofobik alanı arasındaki etkileşimler sistemde bulunan PEG molekül kütlesiyle bağlantılıdır. PEG molekül kütlelerinin artması ekstraksiyon verimini azaltmaktadır. Yüksek molekül kütleli PEG ve protein arasındaki etkileşim düşmekte ve bunun sonucunda da Ke düşmektedir. Bunun nedeni, polimer molekül ağırlığındaki artış polimerin dışlama etkisini yükseltmekte ve bunun sonucunda da polimerin kendi molekülleri içinde oluşturduğu hidrofobik etkileşimler ile materyalin üst fazda dağılımı engellenmektedir (Su and Chiang, 2006; Benavides and Rito-Palomares, 2004).

Çizelge 4.3. 'de görüldüğü gibi faz hacim oranları 0.37-0.47 arasında olup birbirine yakın değerlerdir. PEG molekül kütlesi arttıkça enzimin dağılma katsayısını ve geri kazanımın düştüğü görülmektedir. Buradan, PEG molekül kütlelerinin enzim dağılma katsayısına, PEG 1000 ile en yüksek geri kazanım elde edilmiştir.

Çizelge 4.3. PEG molekül kütlelerinin belirlenmesi.

| Faz Kombinasyonu       |                                        | $V_R$               | $K_e$ | $K_p$ | PF   | R (%) |
|------------------------|----------------------------------------|---------------------|-------|-------|------|-------|
| % PEG(%50)<br>(%, w/w) | % Tuz(%30)<br>(%, w/w)                 | $V_{\bar{U}} / V_A$ |       |       |      |       |
| %10 PEG-1000           | % 12.5 Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0.43                | 14.32 | 6.39  | 1.21 | 94.06 |
| %10 PEG-1000           | % 15 Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>   | 0.43                | -     | 2.39  | 1.03 | 85.16 |
| %10 PEG-1450           | % 12.5 Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0.47                | 8.5   | 1.35  | 1.13 | 57.14 |
| %10 PEG-1450           | % 15 Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>   | 0.37                | -     | 3.26  | 0.25 | 37.58 |
| %10 PEG-3350           | % 12,5 Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0.42                | 0.21  | 2.22  | 0.2  | 7.03  |
| %10 PEG-3350           | % 15 Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>   | 0.38                | -     | 7.54  | 0.1  | 3.97  |
| %10 PEG-8000           | % 12.5 Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0.42                | -     | 0.32  | 0    | 0     |
| %10 PEG-8000           | % 15 Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>   | 0.38                | -     | 0.13  | 0    | 0     |

PEG-1000 molekül kütlelerinin farklı konsantrasyonlarıyla %10-20 yapılan deneyler sonucunda en yüksek geri kazanım % 10 PEG-1000 molekül yüzdesi ile elde edilmiştir (Şekil 4.6.).

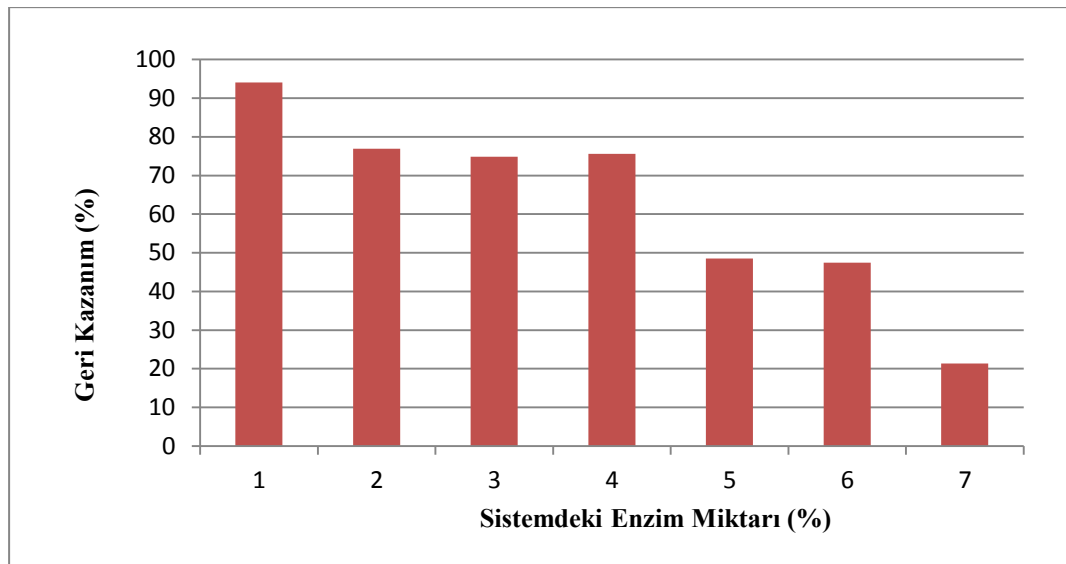


Şekil 4.6. AMS lakkaz ekstraktından PEG-1000/Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ikili faz sistemi ile lakkaz ayırımında PEG konsantrasyonunun geri kazanıma etkisi.

#### 4.1.3 Ham enzim ekstrakt konsantrasyonunun belirlenmesi

Sulu ikili faz sistemlerinde, büyük ölçekli çalışmalar için ortama verilen protein miktarı oldukça önem taşımaktadır (Antov et al., 2006). Protein konsantrasyonunun sistemde doygunluk sınırına ulaşması ve daha yükseğe çıkması proteinlerin çökmesine ve buna bağlı olarak da geri kazanımın düşük olmasına sebep olmaktadır. Bunun için protein konsantrasyonlarının sulu ikili faz sistemlerinde doygunluk sınırının altındaki değerlerde olması verim açısından çok önemlidir (Engel et al., 2000). Sisteme verilen enzim miktarı, faz bileşimi ve faz hacim oranında değişikliğe sebep olmakta ve böylece enzimin dağılımı etkilemektedir (Antov et al., 2006).

En iyi geri kazanımın alındığı %10 PEG-1000 / %12.5 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sulu ikili faz sisteminde ham enzim ekstraktının %1-7 oranlarında sisteme ilavesiyle en yüksek geri kazanım %1 ham enzim ekstraktında %94.06 olarak alınmıştır. %2, 3, 4 oranlarında birbirine yakın değerler olmasına rağmen %1 kadar yüksek olmamıştır. %7 ham ekstrakt ilavesinde ise en düşük değer olan %21.34'lük bir geri kazanım olmuştur (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. Ham enzim ekstraktının %10 PEG-1000 / %12.5 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sulu ikili faz sisteminde enzim geri kazanımına etkisi.

#### 4.1.4 Lakkaz enziminin ultrafiltrasyonu

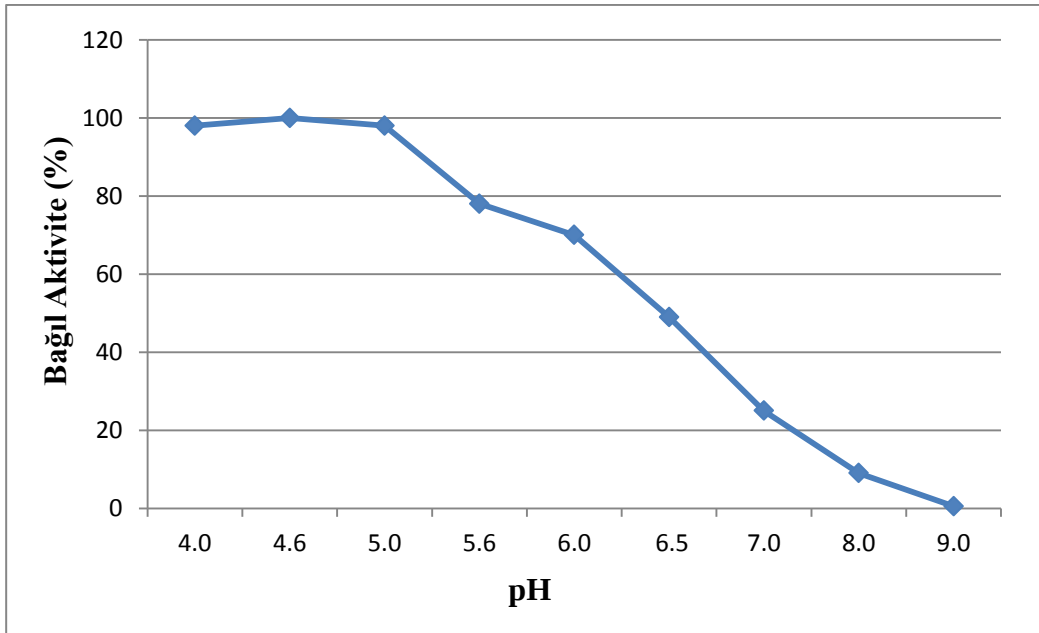
Yapılan çalışmalar sonucunda, enzimi bulunduğu PEG fazından ayırarak enzimi deriştirmek için preperatın 10 000 kDA'luk membranda ultrafiltrasyonu yapılmıştır. Konsantre edilen enzimin; protein miktarı 1.1 mg/ml, spesifik aktivitesi 24.171 U/mg olarak bulunmuştur. Ultrafiltrasyon sonrasında enzim başlangıç ham enzim ekstratına oranla 1.76 kat saflaştırılmıştır.

#### 4.2 Lakkaz Enziminin Karakterizasyonu

##### 4.2.1 pH etkisi

Protein yapıdaki moleküller olan enzimler çevre koşullarından oldukça etkilenmektedirler. Ortam pH'sıda bu çevresel koşullarından birini oluşturmaktadır. pH değişiminin enzim aktivitesi üzerine etkisi, bağıl aktivitenin optimum pH eğri grafikleri oluşturularak gerçekleştirilmektedir.

*Agaricus bisporus* atık mantar sapından elde ettiğimiz lakkaz enzimine ait optimum pH değeri 4.6 olarak bulunmuştur (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. *Agaricus bisporus* AMS'dan elde edilen lakkaz aktivitesinin pH değişimi.

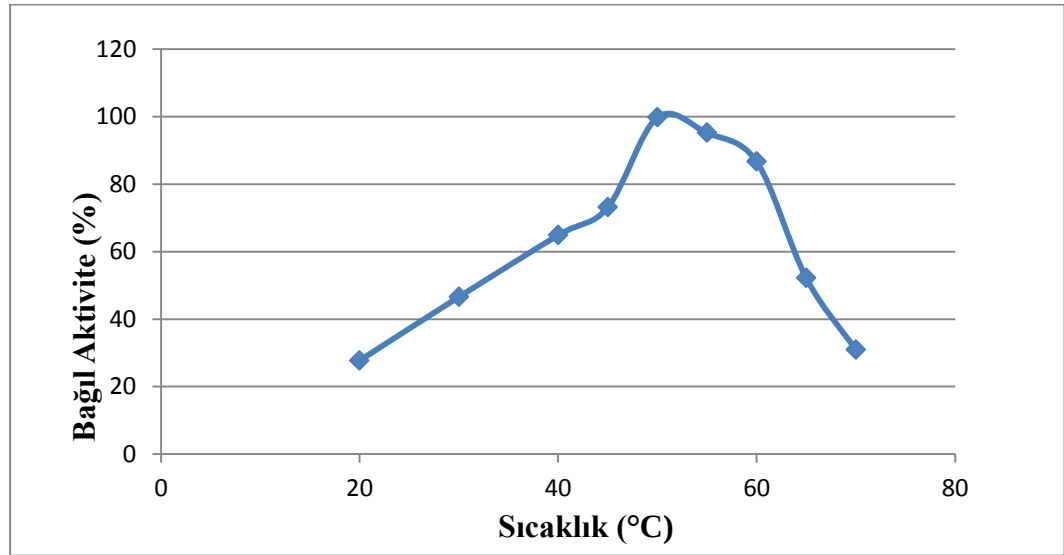
Ulrick ve arkadaşlarının (2005) yaptıkları çalışmada, *Agaricus blazei* lakkaz enziminin optimum pH'ını 7.0 olarak tespit etmişlerdir.

Murugesan ve arkadaşlarının (2006), *Pleurotus sajor-caju* ile yaptıkları çalışmada, lakkaz enzimine ait optimum pH'yı 5.0, optimum sıcaklığı 40°C olarak bulmuşlardır.

More ve arkadaşları (2011) *Pleurotus ostreatus* ile yaptıkları çalışmada lakkaz enziminin optimum pH'sını 4.5 olarak saptamışlardır.

#### 4.2.2 Sıcaklık etkisi

Sıcaklık değerlerinin artması, enzimde protein yapının denatüre olması sebebiyle aktivitenin düşmesine sebep olmaktadır. Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi genelde optimum sıcaklık eğrisi oluşturularak izlenmektedir. Bu grafik sıcaklıkla bağıl aktivitenin değişimini göstermektedir. Şekil 4.9. 'da *Agaricus bisporus* lakkazına ait optimum sıcaklık 50°C olarak saptanmıştır.



Şekil 4.9. *Agaricus bisporus* AMS'dan elde edilen lakkaz aktivitesinin sıcaklık değişimi.

Han ve arkadaşları (2005), *Trametes versicolor* lakkazının optimum pH'ını 3.0 ve optimum sıcaklığını 50°C olarak saptamışlardır.

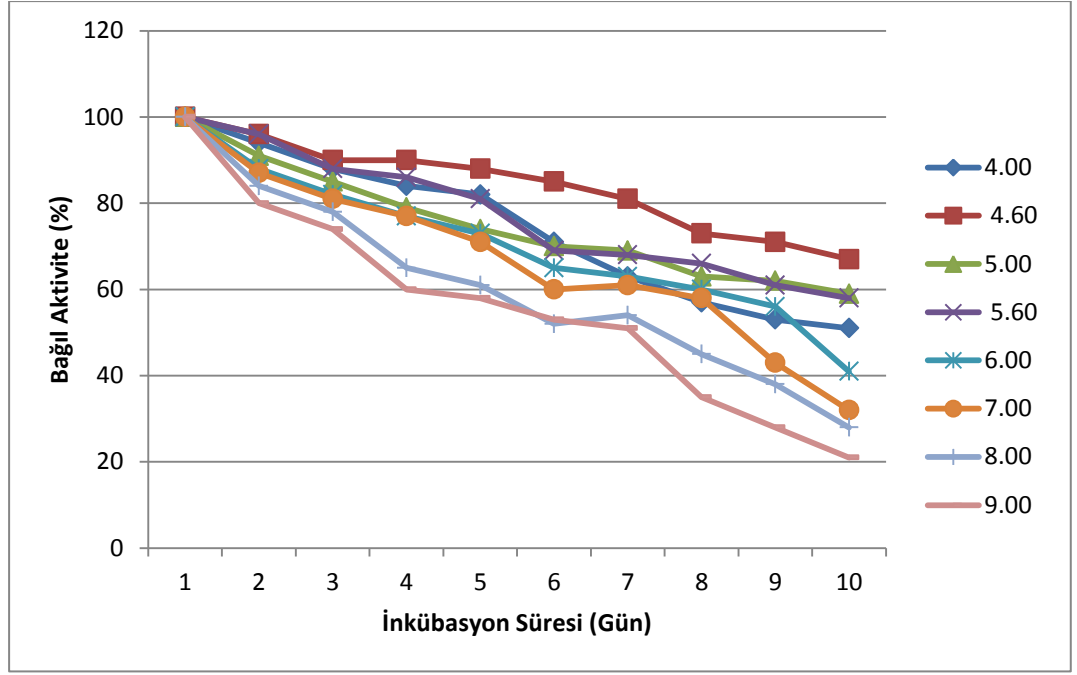
Bora P.'nin (2003), *Rhizoctonia soloni* ile yapmış olduğu çalışmada, lakkaz enziminin optimum sıcaklığının 25°C ve 4.5-6.0 pH aralığında en iyi aktiviteyi verdiğini tespit etmiştir.

Zou ve arkadaşları (2012), *Hericium coralloides* lakkazının, optimum pH'ını 2.20, optimum sıcaklığını 40-50°C olarak bulmuşlardır.

#### 4.2.3 Kararlılık testleri sonuçları

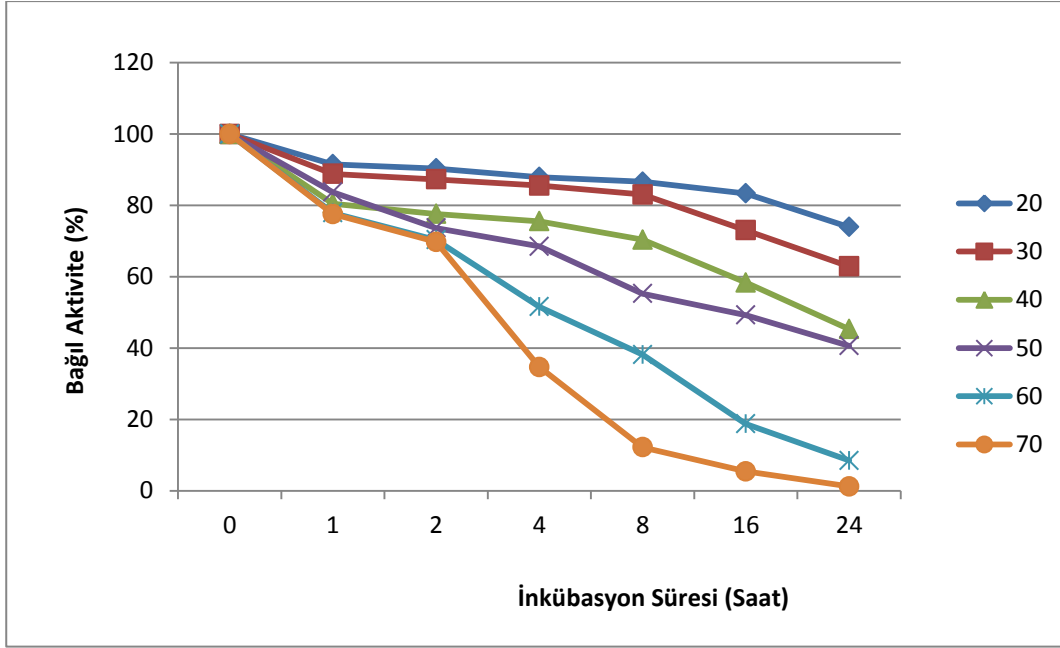
Enzim kararlılığı, zamana bağlı olarak belli çalışma koşullarında enzim aktivitesinin korunması olarak ifade edilmektedir. Özellikle endüstriyel alanda kullanılan enzimler için en önemli kriteri oluşturmaktadır. Enzimde oluşan aktivite kaybına farklı nedenler sebep olabilir.

Enzimler, protein yapıda olduklarından farklı pH'lar protein yapıları nı etkileyerek, yüksek asidik ya da bazik ortamlarda bozunmaya uğramaktadırlar. pH kararlılığında; tamponun türü ve derişimi, inkübasyon koşulları ve süresi, sıcaklık gibi etkenler yapılan çalışmaya göre farklılık gösterebilir. Çalışmamızda pH 4.0 - 9.0 aralığında farklı tampon çözeltilerinde yapılan 10 günlük aktivite takibi sonucunda, AMS'dan elde edilen lakkaz enziminin pH 4.6'da en kararlı olduğunu ve %30'luk bir aktivite kaybına uğradığı görülmüştür. En yüksek aktivite kaybı da pH 9.0'da %80 olarak saptanmıştır (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. *Agaricus bisporus* AMS'dan elde edilen lakkaz aktivitesinin pH 4.0-9.0 'larda 10 günlük pH değişimi.

Termal kararlılık; protein yapıda olan enzimler, ısıya karşı kararlı olmadıklarından sıcaklık yükseldikçe ve inkübasyon süresine bağlı olarak aktivite kaybına uğramaktadırlar. Sıcaklık sabit olsa bile inkübasyon süresindeki uzama proteinlerin denatüre olmasına ve aktivite kaybına sebep olmaktadır. AMS'dan elde edilen lakkaz enzimine ait sıcaklık stabilite sonuçlarına baktığımızda; 20°C %25 ve 30°C'de %35'lik aktivite kaybıyla en stabil dereceleri oluşturmaktadırlar. En fazla aktivite kaybıda 70°C'de olup testin 4. saatinde %70'lik bir aktivite kaybı görülmüş ve 24. saatte hiç aktivite saptanmamıştır (Şekil 4.11.).



Şekil 4.11. *Agaricus bisporus* AMS'dan elde edilen lakkaz aktivitesin 20-70°C'lerdeki 24 saatlik (0,1, 2, 4, 8, 16, 24) bağıl aktivite değişimi.

Wood (1980), çalışmasında *Agaricus bisporus* lakkazının 40°C'de 24 saat stabil kaldığını göstermiştir.

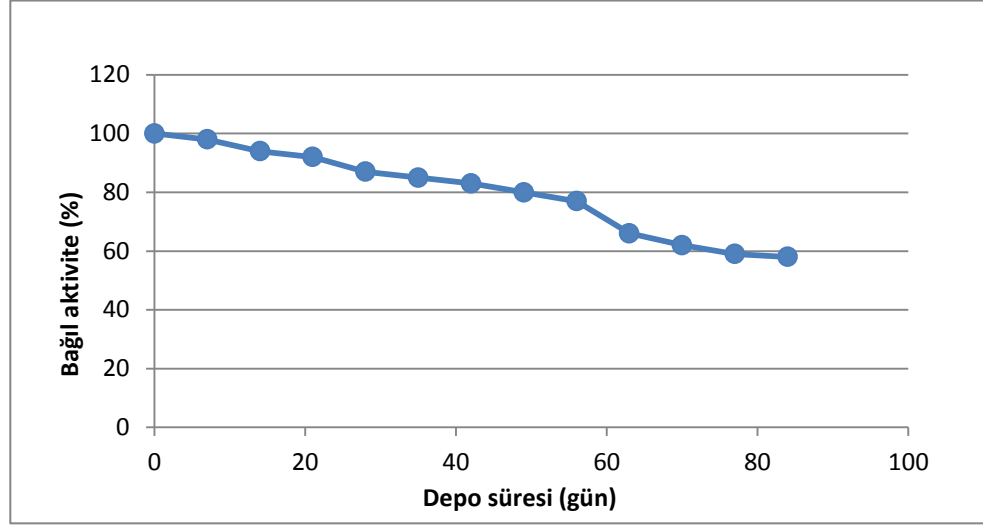
Ulrick ve arkadaşlarının (2004) yaptıkları çalışmada, *Agaricus blazei* lakkaz enziminin optimum sıcaklığını 20°C olarak saptamışlardır. Sıcaklık stabilitesinde; 20°C'de uzun süre aktivitesini korurken 30°C'de %50'sini, 40-60°C'de 30. dakikadan sonra %90'nını kaybettiğini tespit etmişlerdir.

Zou ve arkadaşları (2012), *Hericium coralloides* lakkazının Sıcaklık stabilitesinde enzim aktivitesinin 20°C'de %65'ini koruduğunu 100°C'de ise %24'ünün kaldığını saptamışlardır.

Halaburgi ve arkadaşlarının (2011) çalıştıkları *Cladosporium cladosporioides* termal lakkazının, optimum pH'ının 3.50 ve 40-70°C'de yüksek aktiviteye sahip olduğunu, ayrıca 70-80°C'de aktivitesinin %52'sini koruduğunu saptamışlardır.

AMS'dan elde edilen lakkazın depo kararlılığı çalışmalarında alınan sonuçlar enzimin 3 aylık takibi süresinde 2. aydan sonra aktivitede %30'luk bir

düşüş olduğu, 3. ayda da aktivitenin %50'sinden fazlasının korunduğu görülmüştür (Şekil 4.12.).



Şekil 4.12. *Agaricus bisporus* AMS'dan elde edilen lakkaz aktivitesin depo kararlılığının +4 °C'de 3 aylık zamanda haftalık aktivite ölçümü

More ve arkadaşları (2011) *Pleurotus ostreatus* ile yaptıkları çalışmada lakkaz enziminin optimum pH'ını 4.5, optimum sıcaklığını 65°C, sıcaklık stabilitesini 60°C'de 8 saat 70°C'de 30 dakika olduğunu, 90°C'den sonra aktivitenin %38'inin kaldığını saptamışlardır. Enzimin oda sıcaklığında 20 gün, +4 °C'de ise 60 gün stabilitesini koruduğunu gözlemlemişlerdir. Enzimi amonyum fosfat çöktürmesiyle 2.79 kat saflaştırıp %62 verimle elde etmişlerdir.

Mayola-Deloisa ve arkadaşlarının (2009) çalışmasında; *Agaricus bisporus* atık mantar kompostundan lakkaz enzimini ATPS (sulu ikili faz sistemi) ile saflaştırarak, en yüksek verimi pH 7.0 'de %5 enzim ekstraktı kullanarak PEG - Fosfat (%18 PEG 1000 ve 1450 - %15 Fosfat) sistemlerinde %95 verimle elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda, lakkaz enzim kaynağı olarak *Agaricus bisporus* atık mantar sapı kullanılmıştır. 1 g kuru atık mantar sapından elde ettiğimiz ham enzim ekstraktının protein miktarı 3.9 mg/ml ve spesifik aktivitesi 13.713 U/mg olarak saptanmıştır. Enzim, sulu ikili faz sistemi olarak en yüksek geri kazanım değerinin alındığı kombinasyon olan %10 PEG-1000 / %12.5 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / %1 ham enzim

ekstraktı karışımıyla; protein miktarı 0.46 mg/ml, spesifik aktivitesi 16.144 U/mg, saflaştırma katsayısı 1.20 , enzim geri kazanımı %94.06 ve %86'lık verim ile saflaştırılmıştır. Ultrafiltrasyon sonucu protein miktarı 1.1 mg/ml ve spesifik aktivitesinin 24.171 U/mg olduğu görülmüştür. Enzim başlangıç ham enzim ekstraktına göre 1.76 kat saflaştırılmıştır. Ayrıca lakkaz enziminin karakterizasyonu çalışmalarında, enzimin optimum pH'sının 4.6 ve optimum sıcaklığının 50 °C olduğu tespit edilmiştir. AMS'dan elde edilen lakkaz enziminin pH stabilitesinin pH 4.6'da en kararlı olduğunu ve 10 gün sonunda %30'luk bir aktivite kaybına uğradığı görülmüştür. 20°C, %25 aktivite kaybıyla en stabil sıcaklığı oluşturmuştur. Enzimin depo kararlılığında da 3. ayda %50'den fazla aktivitesini koruduğu saptanmıştır.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aaslyng D., Rorbaek K. and Sorensen N.H.**, 1996, An enzyme for dying keratinous fibres, *Int Pat Apl WO9719998*. 29.11.1996.
- Abadulla E., Tzanov T., Costa S., Robra K., Cavaco-Paulo A. and Gubitz G.M.**, 2000, Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*, *Applied And Environmental Microbiology*, 66:8, 3357-3362 pp.
- Aguilar O., Albiter V., Serrano-Carre'on L. and Rito-Palomares M.**, 2006, Direct comparison between ion-exchange chromatography and aqueous two-phase processes for the partial purification of penicillin acylase produced by *E. coli*, *Journal of Chromatography B*, 835:77-83 pp.
- Ahlawat O.P., Gupta P., Kumar S., Sharma D.K. and Ahlawat K.**, 2010, Bioremediation of fungicides by spent mushroom substrate and its associated microflora, *Indian J Microbiol*, 50:390-395 pp.
- Albertsson P.A.**, 1986, Partition of cell particles and macromolecules, 3rd ed. Wiley, New York.
- Alexandre G. and Zhulin I.B.**, 2000, Laccases are widespread in bacteria, *Trends Biotechnol*, 18:41-42 pp.
- Andrews A., Schmidt A.S. and Asenjo J.A.**, 2005, Correlation for the protein behavior of proteins in aqueous two-phase systems: effect of surface hydrophobicity and charge, *Biotechnol Bioeng*, 90(3):380-90 pp.
- Antov M.G., Peričin D.M. and Dašić M.G.**, 2006, Aqueous two-phase partitioning of xylanase produced by solid-state cultivation of *Polyporus squamosus*, *Process Biochemistry*, 41: 232-235 pp.
- Babu B.R., Rastogi N.K. and Raghavara K.S.M.S.**, 2008, Liquid-liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous twophase system, *Chemical Engineering and Processing*, 47: 83-89 pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Balasubramaniam, D.**, 2003, Lysozyme separation from tobacco extract by aqueous two-phase extraction, [http://scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd-02192003-164258/unrestricted/final\\_thesis.pdf](http://scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd-02192003-164258/unrestricted/final_thesis.pdf) (Erişim tarihi: 20 Ekim 2013)
- Bar M.**, 2001, Kinetics and physico-chemical properties of white-rot fungal laccases, <http://etd.uovs.ac.za/ETD-db/theses/available/etd-09202002-130657/withheld/BarM.PDF> (Erişim tarihi: 01 Aralık 2012)
- Barry J., Doyle O., Grant J. and Grogan H.**, 2012, Supplementary of spent mushroom substrate (SMS) to improve the structure and productivity as a casing material, *In: 18th Congress of the International Society for Mushroom Science*, Beijing, China, 735-742 pp.
- Bauer CG., Kuhn A., Gajovic N., Skorobogatko O., Holt P.J. and Bruce N.C.**, 1999, New enzyme sensors for morphine and codeine based on morphine dehydrogenase and laccase, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 364:179-183 pp.
- Baughman G.L. and Perenich T.A.**, 1998, Fate of dyes in aquatic systems: I solubility and partitioning of some hydrophobic dyes and related compounds *Environ. Toxicol. Chem.*, 7:183–199 pp.
- Benavides J. and Rito-Palomares M.**, 2004, Bioprocess intensification: a potential aqueous two-phase process for the primary recovery of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*, *Journal of Chromatography B*, 807: 33-38 pp.
- Berggren K., Nilsson A., Johansson G., Bandmann N., Nygren P. and Tjerneld F.**, 2000, Partitioning of peptides and recombinant protein–peptide fusions in thermoseparating aqueous two-phase systems: effect of peptide primary structure, *Journal of Chromatography B*, 743: 295-306 pp.
- Bertrand T., Jolivald C., Briozzo P., Caminade E., Joly N., Madzak C. and Mougin C.**, 2002, Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: insights into substrate recognition and correlation with kinetics, *Biochemistry*, 41: 7325-7333 pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Blázquez P., Casas N., Font X., Gabarrell M., Sará M. and Caminal G.,** 2004, Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor*, *Water Res.*, 38:2166-2172 pp.
- Bora P.,** 2003, Production of laccase by the phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani*, <http://core.ac.uk/download/pdf/11231059.pdf> (Erişim tarihi: 29 Aralık 2012)
- Bourbonnais R. and Paice M.G.,** 1990, Oxidation of non-phenolic substrates: an expanded role of laccase in lignin biodegradation, *FEBS Lett.*, 267:99-102 pp.
- Bradford M.M.,** 1976, A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Analytical Biochemistry*, 72:248-254 pp.
- Cai W., Martin R., Lemaure B., Leuba J.L. and Petiard V.,** 1993, Hydroxy-indoles: a new class of laccase substrates, *Plant Physiol. Biochem.*, 31: 441-445 pp.
- Call H.P. and Mücke I.,** 1997, History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator systems (LignozymR process), *J Biotechnol* , 53:163-202 pp.
- Camarero S., Ibarra D., Martinez M.J. and Martinez A.T.,** 2005, Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71:1775-1784 pp.
- Chen G.Q., Zeng G.M., Tu X., Huang G.H. and Chen Y.N.,** 2005, A novel biosorbent: characterization of the spent mushroom compost and its application for removal of heavy metals, *J Environ Sci* 17:756-760 pp.
- Cheong Y.W., Das B.K., Roy A. and Bhattacharya J.,** 2010, Performance of a SAPS-based chemo-bioreactor treating acid mine drainage using low-DOC spent mushroom compost, and limestone as substrate, *Mine Water Environ*, 29:217-224 pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Claus H.**, 2003, Laccases and their occurrence in prokaryotes, *Arch. Microbiol.*, 179:145-150 pp.
- Cooper P.**, 1995, Removing colour from dye house wastewater, *Asian Textile J.*, 3:52-56 pp.
- Córdova Juárez R.A., Gordillo Dorry L.L., Bello-Mendoza R. and Sánchez J.E.**, 2011, Use of spent substrate after *Pleurotus pulmonarius* cultivation for the treatment of chlorothalonil containing wastewater, *J Environ Manage*, 92:948-952 pp.
- De Marco A. and Roubelakis-Angelakis K.A.**, 1997, Laccase activity could contribute to cell-wall reconstitution in regenerating protoplasts, *Phytochemistry*, 46: 421-425 pp.
- Decker H. and Terwilliger N.**, 2000, Cops and robbers: putative evolution of copper oxygen-binding proteins, *J. Exp. Biol*, 203: 1777-1782 pp.
- Dubé E., Shareck F., Hurtubise Y., Daneault C. and Beauregard M.**, 2008, Homologous cloning, expression, and characterisation of a laccase from *Streptomyces coelicolor* and enzymatic decolourisation of an indigo dye, *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 79(4): 597-603 pp.
- Ducros V., Brzozowski A.M., Wilson K.S., Brown S.H., Østergaard P., Schneider D.S., Pedersen A.H. and Davies G.J.**, 1998, Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 Å resolution, *Nat. Struct. Biol*, 5: 310-316 pp.
- Ducros V., Brzozowski A.M., Wilson K.S., Østergaard P., Schneider D.S., Svendsen A. and Davies G.J.**, 2001, Structure of the laccase from *Coprinus cinereus* at 1.68 Å resolution: evidence for different type 2 Cu-depleted isoforms, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr*, 57:333-336 pp.
- Dwivedi U.N., Singh P., Pandey V.P. and Kumar A.**, 2011, Structure–function relationship among bacterial, fungal and plant laccases, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*; 68: 117-128 pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Engel S., Barak Z., Chipman D.M. and Merchuk J.C.**, 2000, Purification of acetohydroxy acid synthase by separation in an aqueous two-phase system, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 743: 281-286 pp.
- Enguita F.J., Martins L.O., Henrique A.O. and Carrondo M.A.**, 2003, Crystal structure of a bacterial endospore coat component: a laccase with enhanced thermostability properties, *J. Biol. Chem*, 278 (21): 19416-19425 pp.
- Felby C., Pedersen L.S. and Nielsen B.R.**, 1997, Enhanced auto adhesion of wood fibers using phenol oxidases. *Holzforschung*, 51:281–6 pp.
- Ferraroni M., Duchi I., Myasoedova N.M., Leontievsky A.A., Golovleva L.A., Scozzafava A. and Briganti F.**, 2005, Crystallization and preliminary structure analysis of the blue laccase from the ligninolytic fungus *Panus tigrinus*, *Acta Cryst*, 61: 205-207 pp.
- Ferraroni M., Myasoedova N.M., Schmatchenko V., Leontievsky A.A., Golovleva L.A., Scozzafava A. and Briganti F.**, 2007, Crystal structure of a blue laccase from *Lentinus tigrinus*: evidences for intermediates in the molecular oxygen reductive splitting by multicopper oxidases, *BMC Structural Biology*, 7(60) doi: 10.1186/1472-6807-7-60 pp.
- Ferry Y. and Leech D.**, 2005, Amperometric detection of catecholamine neurotransmitters using electrocatalytic laccase electrode, *Electroanalysis*, 17 2113-2119 pp.
- Finney K.N., Ryu C., Sharifi V.N. and Swithenbank J.**, 2009a, The reuse of spent mushroom compost and coal tailings for energy recovery: comparison of thermal treatment technologies, *Bioresour Technol*, 100:310-315 pp.
- Finney K.N., Sharifi V.N. and Swithenbank J.**, 2009b, Combustion of spent mushroom compost and coal tailing pellets in a fluidised-bed, *Renew Energy*, 34:860-868 pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ghosh, A., Frankland, J.C., Thurston, C.F. and Robinson, C.H.**, 2003, Enzyme production by *Mycena galopus* mycelium in artificial media and in *Picea sitchensis* F1 horizon needle litter, *Mycol. Res.*, 107:996-1008 pp.
- Golz-Berner K., Walzel B., Zastrow L. and Doucet O.**, 2004, Cosmetic and dermatological preparation containing copperbinding proteins for skin lightening, Int Pat Appl WO2004017931. 04.03.2004.
- Gray H.B., Malmstrom B.G. and Williams R.J.**, 2000, Copper coordination in blue proteins, *J. Biol. Inorg. Chem*, 5: 551-559 pp.
- Guatam S. and Simon L.**, 2006, Partitioning of  $\beta$ -glucosidase from *Trichoderma reesei* in poly(ethylene glycol) and potassium phosphate aqueous two-phase systems: Influence of pH and temperature, *Biochemical Engineering Journal* 30:104–108 pp.
- Halaburgi V.M., Sharma S., Sinha M., Singh T.P. and Karegoudara T.B.**, 2011, Purification and characterization of a thermostable laccase from the ascomycetes *Cladosporium cladosporioides* and its applications, *Process Biochemistry*, 46: 1146-1152 pp.
- Han J.H. and Lee C.H.**, 1997, Effects of salts and poly(ethylene glycol)-palmitate on the partitioning of proteins and *Bacillus subtilis* neutral protease in aqueous two-phase systems, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 9(1-2): 109-116 pp.
- Han M.J., Choi H.T. and Song H.G.**, 2005, Purification and characterization of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor*, *The Journal of Microbiology*, 3:6 555-560 pp.
- Hatti-Kaul, R.**, 2000, Aqueous Two-Phase Systems, Methods and Protocols, *Humana Press Inc.*, New Jersey, Editor: R. Hatti-Kaul, 440 p.
- Hou H., Zhou J., Wang J., Du C. and Yan B.**, 2004, Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye, *Process Biochem.*, 39: 1415-1419 pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hüttermann A., Mai C. and Kharazipour A.**, 2001, Modification of lignin for the production of new compounded material, *Appl Microbiol Biotechnol*, 55:387-94 pp.
- Irshad M., Asgher M., Sheikh M.A. and Nowaz H.**, 2011, Purification and characterization of laccase produced by *Schyzophyllum commune* IBL-06 in solid state culture of banana stalks, *BioResources* 6(3): 2861-2873 pp.
- Jarosz-Wilkolazka A., Ruzgas T. and Gorton L.**, 2004, Use of laccase-modified electrode for amperometric detection of plant flavonoids, *Enzyme Microb. Technol.*, 35: 238-241 pp.
- Jordan S.N., Mullen G.J. and Murphy M.C.**, 2008, Composition variability of spent mushroom compost in Ireland, *Bioresour Technol*, 99:411-418 pp.
- Klomklao, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Simpson, B.K. and Kishimura, H.**, 2005, Partitioning and recovery of proteinase from tuna spleen by aqueous two-phase systems, *Process Biochemistry*, 40(9): 3061-3067 pp.
- Ko H.G., Park S.H., Kim S.H., Park H.G. and Park W.M.**, 2005, Detection and recovery of hydrolytic enzymes from spent compost of four mushroom species, *Folia Microbiol*, 50:103-106 pp.
- Kuhad R.C., Singh A. and Eriksson K.E.L.**, 1997, Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell wall. In: Eriksson KEL, editor. Biotechnology in the Pulp and paper industry. *Advances in biochemical engineering biotechnology. Berlin: Springer Verlag*, Chapter 2.
- Kuznetsov B.A., Shumakovich G.P., Koroleva O.V. and Yaropolov A.L.**, 2001, On applicability of laccase as label in the mediated and mediatorless electroimmunoassay: effect of distance on the direct electron transfer between laccase and electrode, *Biosens Bioelectron.*, 16: 73-84 pp.
- Lang G. and Cotteret J.**, 1999, Hair dye composition containing a laccase (L'Oreal.; Fr.), Int Pat Appl WO9936036. 22.07.1999.
- Lau K.L., Tsang Y.Y. and Chiu S.W.**, 2003, Use of spent mushroom compost to bioremediate PAH-contaminated samples, *Chemosphere*, 52:1539-1546 pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Law W.M., Lau W.N., Lo K.L., Wai L.M. and Chiu S.W.**, 2003, Removal of biocide pentachlorophenol in water system by the spent mushroom compost of *Pleurotus pulmonarius*, *Chemosphere*, 52:1531-1537 pp.
- Lehman E., Harel E. and Mayer A.M.**, 1974, Copper content and other characteristics of purified peach laccase, *Phytochemistry*, 13:1713-1717 pp.
- Leonowicz A., Trojanowski J. and Barbara O.**, 1979, Basidiomycetes: apparent activity of the inducible and constitutive forms of laccase with phenolic substrates, *Acta Biochim. Pol*, 25: 369-378 pp.
- Leonowicz A., Szklarz G. and Wojtas-Wasilewska M.**, 1985, The effect of fungal laccase on fractionated lignosylphonates (Peritan Na), *Phytochemistry*, 24: 393-396 pp.
- Li Y.**, 2012, Present development situation and tendency of edible mushroom industry in China. In: 18th Congress of the International Society for Mushroom Science, Beijing, China, 3-9 pp.
- Lim S-H., Lee Y-H. and Kang H-W.**, 2013, Efficient recovery of lignocellulolytic enzymes of spent mushroom compost from oyster mushrooms, *Pleurotus* spp., and potential use in dye decolorization, *Mycobiolog*, 41(4): 214-220 pp .
- Lisdat F., Wollenberger U., Makower A., Hortnagl H., Pfeiffer D. and Scheller F.W.**, 1997, Catecholamine detection using enzymatic amplification, *Biosens Bioelectron*, 12:1199–1211 pp.
- Lyashenko A.V., Zhukhlistova N.E., Gabdoulkhakov, A.G., Zhukova Y.N., Voelter W., Zaitsev V.N., Bento I., Stepanova E.V., Kachalova G.S., Koroleva O.V., Cherkashyn E.A., Tishkov V.I., Lamzin V.S., Schirwitz K., Morgunova E.Y., Betzel, C., Lindleyd P.F., Mikhailova A.M.**, 2006, Purification, crystallization and preliminary X-ray study of the fungal laccase from *Cerrena maxima*, *Acta Cryst*, F62: 954-957 pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Maximo C., Amorim M.T.P. and Costa-Ferreira M.,** 2003, Biotransformation of industrial reactive azo dyes by *Geotrichum* sp. CCMI 1019, *Enzyme and Microbial Technology*, 32:145-151 pp.
- Mayer A.M.,** 1987, Polyphenol oxidases in plants-recent progress, *Phytochemistry*, 26: 11-20 pp.
- Mayolo-Deloisa K., Trejo-Hernández M.R. and Rito-Palomares M.,** 2009, Recovery of laccase from the residual compost of *Agaricus bisporus* in aqueous two-phase systems *Process Biochemistry*, 44:435-439 pp.
- Mazzola P.G., Lopes A.M., Hasmann F.A., Jozala A.F., Penna T.C.V., Magalhaes P.O., Rangel-Yagui C.O. and Pessoa A.,** 2008, Liquid-liquid extraction of biomolecules: an overview and update of the main techniques, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, (83) 143-157 pp.
- Metin İ., Güngör H. ve Çolak Ö.F.,** 2012, Ülkemizdeki bazı yenilebilir mantarların ihracat ve ithalatı, *Yemeklik mantar kongresi*.
- Mohamadi H.S., Omidinia E. and Dinarvand R.,** 2007, Evaluation of recombinant phenylalanine dehydrogenase behavior in aqueous two-phase partitioning, *Process Biochemistry* 42:1296-1301 pp.
- More S., Renuka P.S., Pruthvi K., Swetha M., Malini S. and Veena S.M.,** 2011, Isolation, Purification, and Characterization of Fungal Laccase from *Pleurotus* sp., *Enzyme Research* , Article ID 248735, 7 p.
- Murugesan K., Arulmani M., Nam I.H., Kim Y.M., Chang Y.S. and Kalaichelvan P.T.,** 2006, Purification and characterization of laccase produced by a white rot fungus *Pleurotus sajor-caju* under submerged culture condition and its potential in decolorization of azo dyes, *Appl Microbiol Biotechnol*, 72: 939-946 pp.
- Naganagouda K. and Mulimani V.H.,** 2008, Aqueous two-phase extraction (ATPE): An attractive and economically viable technology for downstream processing of *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -galactosidase, *Process Biochemistry* 43:1293–1299 pp.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Negrete, A., Ling, T. C. and Lyddiatt, A.,** 2007, Aqueous two-phase recovery of bio-nanoparticles: a miniaturization study for the recovery of bacteriophage T4, *Journal of Chromatography B.*, 854:13-19 pp.
- Oei P. and Albert G.,** 2012, Recycling casing soil. In: 18th Congress of the International Society for Mushroom Science, Beijing, China, 757-765 pp.
- Palmieri G., Giardina P., Bianco C., Scaloni A., Capasso A. and Sannia G.,** 1997, A Novel White Laccase from *Pleurotus ostreatus*, *The Journal of Biological Chemistry*, 272:50: 31301-31307 pp.
- Paloheimo M., Valtakari L., Puranen T., Kruus K., Kallio J., Mantyla A., Fagerstrom, R, Ojapalo P. and Vehmaanpera J.,** 2004, Novel laccase enzyme and use thereof, USPTO Applicaton #: 20060063246 - Class: 435183000 (USPTO).
- Parshetti G, Kalme S, Gomare S and Govindwar S,** 2007, Biodegradation of Reactive blue-25 by *Aspergillus ochraceus* NCIM-1146, *Bioresour Technol* 98:3638–3642 pp.
- Phan C.W. and Sabaratnam V.,** 2012, Potential uses of spent mushroom substrate and its associated lignocellulosic enzymes, *Appl Microbiol Biotechnol*, 96:863–873 pp.
- Raja S., Murty V.R., Thivaharan V., Rajasekar V. and Ramesh V.,** 2011, Aqueous two phase systems for the recovery of biomolecules – A Review, *Science and Technology*, 1(1): 7-16 pp.
- Ranocha P., McDougall G., Hawkins S., Sterjiades R, Borderies G., Stewart D., Cabanes-Macheteau M., Boudet A.M. and Goffner D.,** 1999, Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases- a divergent gene family in poplar , *Eur. J. Biochem*, 259: 485-495 pp.
- Ratanapongleka K.,** 2010, Recovery of Biological Products in Aqueous Two Phase Systems, *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, Vol. 1 No. 2 191-198 pp.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Roure M., Delattre P. and Froger H.**, 1992, Composition for an enzymic coloration of keratin fibres, especially for hair and its use in a dyeing process, Eur Pat Appl EP0504005. 03.03.1992.
- Selinheimo E., Kruus K., Buchert J., Hopia A. and Autio K.**, 2006, Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheological properties of wheat doughs, *J Cereal Sci*, 43:152-9 pp.
- Silva M.E. and Franco T.T.**, 2000, Liquid–liquid extraction of biomolecules in downstream processing - a review paper. *Braz J Chem Eng* 17:1-17 pp.
- Singh A.D., Abdullah N. and Vikineswary S.**, 2003, Optimization of extraction of bulk enzymes from spent mushroom compost, *J Chem Technol Biotechnol*, 78:743-752 pp.
- Singh A.D., Vikineswary S., Abdullah N. and Sekaran M.**, 2011, Enzymes from spent mushroom substrate of *Pleurotus sajor-caju* for the decolourisation and detoxification of textile dyes, *World J Microbiol Biotechnol*, 27:535-545 pp.
- Snyder S.M., Cole K.D. and Szaig D.C.**, 1992, Phase compositions, viscosities and densities for aqueous two phase systems composed of polyethylene glycol and various salts at 25° C, *Journal of Chemical & Engineering Data*, 37: 268-274 pp.
- Solomon E.I., Sundaram U.M and Machonkin T.E.**, 1996, Multicopper oxidases and oxygenases, *Chem. Rev*, 96: 2563-2605 pp.
- Stephen, J.A.**, 1995, Electrooxidation of dyestuffs in waste waters, *J. Chem. Technol.Biotechnol.*, 62 111-117 pp.
- Su C.-K. and Chian.g B.H.**, 2006, Partitioning and purification of lysozyme from chicken egg white using aqueous two-phase system, *Process Biochemistry*, 41: 257-263 pp.
- Şen S. ve Yalçın M.**, 2010, Dünya ve Türkiye'de Kültür Mantarcılığı ve Gelistirilmesi , *III. Ulusal Karadeniz Ormancılık Kongresi*, Artvin, Cilt: III: 1208-1216 s.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Thurston C.F.**, 1994, The structure and function of fungal laccases, *Microbiology*, 140: 19-26 pp.
- Trejo-Hernandez M.R., Lopez-Munguia A. and Quintero Ramirez R.**, 2001, Residual compost of *Agaricus bisporus* as a source of crude laccase for enzymic oxidation of phenolic compounds, *Process Biochem*, 36:635-639 pp.
- Tuncer M.**, 2010, Lakkaz, kısım 1: yapısı, katalitik özellikleri ve dağılımları, *Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 22: 19-63 s.
- Türkiye Ziraat Odaları Birliği**, “Çiftçi için yeni fırsat kapısı kültür mantarı üretimi”, <http://www.tzob.org.tr/> (Erişim tarihi: 14 Nisan 2014)
- Ullrich R., Huong L.M., Dung N.L. and Hofrichter M.**, 2005, Laccase from the medicinal mushroom *Agaricus blazei*: production, purification and characterization, *Appl Microbiol Biotechnol* 67: 357-363 pp.
- Vaidya B.K., Suthar H.K., Kasture S. and Nene S.**, 2006, Purification of potato polyphenol oxidase (PPO) by partitioning in aqueous two phase system, *Biochemical Engineering Journal*, 28(2): 161-16 pp.
- Walsh G.**, 2000, Biopharmaceutical benchmarks, *Nature Biotechnology*, 18(8):831-833 pp.
- Wood D.A.**, 1980, Production, purification and properties of extracellular laccase of *Agaricus bisporus*, *J. Gen. Microbiol*, 117: 327-338 pp.
- Yue H., Yuan Q. and Wang W.**, 2007, Purification of phenylalanine ammonia-lyase in PEG1000/Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> aqueous two-phase system by a two-step extraction, *Biochemical Engineering Journal* 37: 231-237 pp.
- Zou Y.Z., Wang H.X., Ng T.B., Huang C.Y. and Zhang J.X.**, 2012, Purification and Characterization of a Novel Laccase from the Edible Mushroom *Hericiu coralloides*, *The Journal of Microbiology* 50: 1: 72-78 pp.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı, Soyadı** : Ebru GÜLEÇ  
**Doğum Tarihi** : 28.08.1974  
**Doğum Yeri** : Bergama / İZMİR  
**Medeni Hali** : Bekar  
**Uyruğu** : T.C.  
**Ev Adresi** : Osmangazi Caddesi No:94 A Blok D:1 Bayraklı / İZMİR  
**e-mail** : ebrugulec@hotmail.com  
**Yabancı Dili** : İngilizce

**Eğitim Durumu** : İlk okul eğitimini Yeni İzmir İlkokulunda, ortaokul eğitimini Çamdibi Ortakulunda ve lise eğitimini ise İzmir Mersinli Teknik Lisesi Kimya Bölümünde tamamladı.

1996 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalından Biyolog olarak mezun oldu.

2012 yılından bu yana Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Ana bilim dalında Yüksek Lisans eğitimi almaktadır.

### İş Tecrübesi:

1996 - 1999 yıllarında, tekstilde kullanılan enzimlerin uygulamaya yönelik reçetelendirilmesi çalışmalarının yapıldığı ve distribütörlüğünü yaptıkları Novo Nordisk firmasının endüstriyel enzimlerinin aktivite ölçümleri, kullanımında uygulama yerine göre oluşan problemlerin giderilmesi ve yeni formülasyonların oluşturulması için kurulan Menfar Kimya Enzim Laboratuvarında, Laboratuvar görevlisi olarak çalıştı. Şirketin kapatılması nedeniyle işten ayrıldı.

1999 - 2012 yıllarında, tekstil yardımcı kimyasalları üretimi üzerine kurulmuş, seramik mediumu ve polimer yapıda dispersanların üretimi, tutkal üretimi, boya sanayi için boya bağlayıcı polimer reçinelerin üretimi, köpük kesiciler, endüstriyel ve spesifik temizlik maddelerinin üretimi yapılmakta olan Farper Kimya San. Tic. Ltd. Şti.'nde Ar-Ge çalışanı olarak başladığı görevine Ar-Ge sorumlusu olarak devam etti. Birçok ürünün laboratuvar deneylerini yaptı ve laboratuvar çalışmalarını yaptığı polimer üretimlerinde işletmede reaktör takibinde bulundu. Yüksek lisansa başlama sebebiyle işten ayrıldı.