

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ * FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Modifiye Kitosan Kompozitleri Üzerinde Lakkaz İmmobilizasyonu,
Karakterizasyonu ve İmmobilize Enzim ile Tekstil Boyalarının Giderim
Kinetiğinin İncelenmesi**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Pelin KUTLU

Anabilim Dalı : Kimya

Programı : Biyokimya

MANİSA 2015

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ * FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Modifiye Kitosan Kompozitleri Üzerinde Lakkaz İmmobilizasyonu,
Karakterizasyonu ve İmmobilize Enzim ile Tekstil Boyalarının Giderim
Kinetiğinin İncelenmesi**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Pelin KUTLU

Celal Bayar Üniversitesi Kimya Bölümünde Kabul Edilen
Yüksek Lisans Tezidir.

Tezin Teslim Tarihi: . . .2015

Tezin Sözlü Savunma Tarihi: 13.02.2015

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Tülin AYDEMİR

Jüri Üyesi: Prof. Dr. Tülin AYDEMİR

Jüri Üyesi: Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER

Jüri Üyesi: Doç. Dr. Ayşe DİNÇER

MANİSA 2015

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ	XI
KISALTMALAR LİSTESİ	XII
TEŞEKKÜRLER	XIV
ÖZET	XV
1. GİRİŞ	1
1.1. Enzim İmmobilizasyonu	2
1.2. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri	3
1.2.1. Çözünmez Formda İmmobilizasyon Yöntemleri.....	5
1.2.1.1. Bağlama Yöntemleri	5
1.2.1.2. Tutuklama Yöntemleri.....	10
1.2.2. Çözünür Formda İmmobilizasyon	12
1.3. Enzim İmmobilizasyon Yöntemlerinin Kıyaslanması	13
1.4. Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılan Taşıyıcılar	13
1.4.1. Kitin ve Kitosan	14
1.4.2. Kitin ve Kitosanın Kullanım Alanları	18
1.5. Grafen	21
1.6. Lakkaz Enzimi	27
1.6.1. Lakkaz Enziminin Bakır Merkezleri	29
1.6.2. Lakkaz Enziminin Reaksiyon Mekanizması	33
1.6.3. Lakkaz Enziminin Substratları ve İnhibitörleri.....	34
1.6.4. Lakkaz Enziminin pH ve Sıcaklık Stabiliteleri.....	35
1.6.5. Lakkaz Enziminin Potansiyel Uygulamaları.....	37
1.7. Boyar Maddeler	39
1.7.1. Reaktif Mavi 21 (RM 21).....	45
1.8. Karakterizasyon Yöntemleri.....	46
1.8.1. İnfrared Spektroskopisi	46
1.8.2. Taramalı Elektron Mikroskobu.....	46
1.8.3. X-Işını Toz Kırınım Ölçümleri	47
1.8.4. Termal Analiz Yöntemleri.....	47
1.8.5. Manyetik Duyarlılık Ölçümleri.....	48

2. MATERYAL VE YÖNTEM	50
2.2. Yöntem	51
2.2.1. İndirgenmiş Grafen Oksitin Elde Edilmesi.....	51
2.2.2. Kitosan-İndirgenmiş Grafen Oksit Boncukların Hazırlanması (Kit-RGO)	51
2.2.3. Kitosan-İndirgenmiş Grafen Oksit-Manyetit Boncukların Hazırlanması (Kit-RGO-Fe ₃ O ₄).....	52
2.2.4. Kompozit Boncukların Karakterizasyonu	52
2.2.5. Kompozit Boncukların Glutaraldehit ile Aktivasyonu ve Lakkazın İmmobilizasyonu	53
2.2.6. Taşıyıcı Üzerine Bağlanan Protein Miktarının Belirlenmesi.....	55
2.2.7. İmmobilize Enzimin Karakterizasyonu.....	56
2.2.7.1. Optimum pH	56
2.2.7.2. Optimum Sıcaklık ve Termal Stabilite.....	56
2.2.7.3. Enzim Kinetiği	57
2.2.7.4. Depolama Kararlılığı	57
2.2.7.5. Serbest ve İmmobilize Lakkaz Enziminin Organik Çözücülerdeki Stabilitesi	57
2.2.7.6. Serbest ve İmmobilize Lakkaz Enzimi Üzerine Bazı İnhibitörlerin Etkisi.....	58
2.2.8. Kit-RGO ve Kit-RGO-Fe ₃ O ₄ Üzerine İmmobilize Edilen Lakkaz ile Boya Giderimi	58
2.2.8.1. Boya Giderimini Etkileyen Faktörler	59
2.2.8.1.1. Boya Giderimi Üzerine pH Etkisi.....	59
2.2.8.1.2. Boya Giderimi Üzerine Reaksiyon Süresinin Etkisi.....	59
2.2.8.1.3. Boya Giderimi Üzerine Boya Konsantrasyonunun Etkisi.....	60
2.2.8.1.4. Boya Giderimi Üzerine Sıcaklık Etkisi	60
2.2.8.1.5. Boya Giderimi Üzerine Farklı Boncuk Miktarının Etkisi.....	60
2.2.8.1.6. Boya Giderimi Üzerine NaCl Etkisi	60
2.2.8.1.7. Boya Giderimi Üzerine Mediatör Etkisi	60
2.2.8.1.8. Boya Gideriminde İmmobilize Lakkazın Tekrar Kullanılabilirliği ..	61
2.2.8.1.9. Fitotoksisite Çalışması	61
3. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	62
3.1. Kit-RGO ve Kit-RGO-Fe ₃ O ₄ Boncuklarının Karakterizasyonları	62

3.2. Taşıyıcı Üzerine Bağlanan Protein Miktarı ve İmmobilizasyon Verimi	72
3.3. Serbest ve İmmobilize Edilen Lakkazın Karakterizasyonu	73
3.3.1. pH'nin ve Sıcaklığın Etkisinin Belirlenmesi	73
3.3.2. Enzim Kinetiği.....	78
3.3.3. Depolama Kararlılığı.....	79
3.3.4. Serbest ve İmmobilize Lakkaz Enziminin Organik Çözücülerdeki Stabilitesi	80
3.3.5. Serbest ve İmmobilize Edilen Lakkaz Enzimi Üzerine Bazı İnhibitörlerin Etkisi	81
3.3.6. İmmobilize Lakkaz ile Tekstil Boyalarının Renk Giderimi.....	82
3.3.6.1. Boya Giderimi Üzerine pH Etkisi.....	84
3.3.6.2. Boya Giderimi Üzerine Reaksiyon Süresinin Etkisi.....	85
3.3.6.3. Boya Giderimi Üzerine Boya Konsantrasyonunun Etkisi.....	86
3.3.6.4. Boya Giderimi Üzerine Sıcaklık Etkisi	87
3.3.6.5. Boya Giderimi Üzerine Farklı Boncuk Miktarının Etkisi	88
3.3.6.6. Boya Giderimi Üzerine NaCl Etkisi	89
3.3.6.7. Boya Giderimi Üzerine Mediatör Etkisi.....	91
3.3.6.8. Boya Gideriminde İmmobilize Lakkazın Tekrar Kullanılabilirliği	92
3.3.6.9. Fitotoksisite Çalışması	93
4. KAYNAKLAR	96

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1. Çapraz bağlama ile immobilizasyon

Şekil 1.2. İyonik bağlama, biyospesifik bağlama, adsorpsiyon ve şelat bağlama ile ilgili şematik gösterim

Şekil 1.3. Enzimi desteğe adsorpsiyon yöntemiyle bağlama

Şekil 1.4. Enzimin desteğe kovalent immobilizasyonu

Şekil 1.5. Reaktif amino asit artıkları

Şekil 1.6. Fonksiyonel monomerler

Şekil 1.7. Enzim tutuklama yöntemi ile immobilizasyonu

Şekil 1.8. Enzimin polimerler arasında tutuklanması

Şekil 1.9. Mikrokapsülleme ile enzim immobilizasyonu

Şekil 1.10. Enzimlerin immobilizasyonu için lipozom kapsül

Şekil 1.11. Çözünür formda immobilizasyon

Şekil 1.12. Kitosan, kitin ve selülozun yapısı

Şekil 1.13. Kitinin kitosana deasetilasyonu

Şekil 1.14. Glutaraldehit ile çapraz bağlı kitosanın reaksiyon mekanizması

Şekil 1.15. Karbonun allotropları

Şekil 1.16. Grafitin yapısı

Şekil 1.17. Grafitik formların esas yapısı olan grafen

Şekil 1.18. Grafitten, grafit oksit ve grafen oksit yapılarına geçişin temsili gösterimi

Şekil 1.19. Grafen oksitten, indirgenmiş grafen oksit yapısına geçişin temsili gösterimi

Şekil 1.20. Grafitin oksidasyon ve redüksiyonu (a); Hidrazin tarafından epoksit indirgenmesine ilişkin önerilen reaksiyon mekanizması (b)

Şekil 1.21. *Trametes versicolor* funguslarının fotoğrafı

Şekil 1.22. Lakkaz aktif bölgesi: Bakır atomu ve ligand mesafesi ile ilgili olarak yönlendirilmesi gösteren örneklendirme çizim

Şekil 1.23. Lakkazın aktif bölgesindeki bakır atomlarının düzenlenişi

Şekil 1.24. Lakkaz mediatör oksidasyon sisteminin katalitik döngüsü

Şekil 1.25. Lakkaz ile ABTS'nin oksidasyonu

Şekil 1.26. Lakkazın katalitik döngüsü 1 oksijen molekülünün indirgenmesiyle 2 H₂O molekülünün serbest kalması

Şekil 1.27. Yüklü taşıyıcıların mikro çevresinde oluşan iyonik tabakanın şematik gösterimi. Polianyonik taşıyıcı (a) ve Polikasyonik taşıyıcı (b)

Şekil 1.28. Enzim aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi (a) ve aktivasyon enerjisinin bulunması (b)

Şekil 1.29. Boyar maddelerin kullanım alanları fotoğrafları

Şekil 1.30. Görünür bölgedeki ana renkler ve yaklaşık dalga boyları

Şekil 1.31. Mordant Yellow 10 azo boyar maddesinin kimyasal yapısı üzerinde oksokrom ve kromofor grupların gösterimi

Şekil 1.32. Reaktif Mavi 21 boyasının kimyasal yapısı

Şekil 1.33. Histerisiz çevrimi

Şekil 2.1. Grafen oksit ve indirgenmiş grafen oksidin kimyasal yöntemle sentezini gösteren fotoğraflar

Şekil 2.2. Kitosan ile indirgenmiş grafen oksitin reaksiyonu

Şekil 2.3. Kitosan-indirgenmiş grafen oksit kompozit boncuk yapısının glutaraldehit ile muamelesi

Şekil 2.4. Glutaraldehit ile aktive edilmiş kitosan boncuk üzerine lakkaz immobilizasyonu

Şekil 2.5. Standart protein eğrisi

Şekil 2.6. Reaktif Mavi 21 boyasının standart grafiği

Şekil 3.1. Kitosan kompozit boncukların IR spektrumları

Şekil 3.2. Kitosan kompozit boncukların SEM görüntüleri (250 kat- 25 000 kat) (Kitosan (a-b); Kit-RGO (c-d); Kit-RGO-Fe₃O₄ (e-f))

Şekil 3.3. Kitosan kompozit boncukların XRD spektrumu (Saf Kitosan (a); Kit-RGO- Fe₃O₄(b))

Şekil 3.4. Kitosan kompozit boncukların TGA eğrileri

Şekil 3.5. Fe₃O₄ ve Kit-RGO-Fe₃O₄ ün manyetik alan şiddetinin değişim eğrileri

Şekil 3.6. Kit-RGO-Fe₃O₄ boncukların dış manyetik alan uygulanmadığında ve uygulandığındaki görünümü

Şekil 3.7. Kit-RGO boncuklarının (a) ve Kit-RGO-Fe₃O₄ boncuklarının (b) petri kabındaki görünümü

Şekil 3.8. Kit-RGO boncuklarının immobilizasyon öncesi (a) ve sonrası (b) görünümü

Şekil 3.9. Kit-RGO-Fe₃O₄ boncuklarının immobilizasyon öncesi (a) ve sonrası (b) görünümü

Şekil 3.10. Serbest ve kompozit taşıyıcıların üzerine immobilize edilen lakkazın optimum pH grafiği

Şekil 3.11. Serbest ve kompozit taşıyıcıların üzerine immobilize edilen lakkazın optimum sıcaklık ve termostabilite grafikleri

Şekil 3.12. Serbest ve kompozit taşıyıcıların üzerine immobilize edilen lakkazın Arrhenius grafiği

Şekil 3.13. Serbest ve kompozit taşıyıcıların üzerine immobilize edilen lakkazın Lineweaver-Burk grafiği

Şekil 3.14. Serbest ve kompozit taşıyıcıların üzerine immobilize edilen lakkazın 4°C depolama kararlılığı

Şekil 3.15. Serbest ve kompozit taşıyıcıların üzerine immobilize edilen lakkaz enziminin aktivitesine bazı inhibitörlerin etkisi

Şekil 3.16. Kit-RGO üzerine immobilize edilen lakkaz ile RM 21 boyasının giderimi sırasında UV-Vis spektrum taraması ve RM 21 boyasının başlangıç, 1 saat ve 24 saat gideriminden sonraki görünümü

Şekil 3.17. Kit-RGO-Fe₃O₄ üzerine immobilize edilen lakkaz ile RM 21 boyasının giderimi sırasında UV-Vis spektrum taraması ve RM 21 boyasının başlangıç, 1 saat ve 24 saat gideriminden sonraki görünümü

Şekil 3.18. RM 21 boyasının giderimine pH etkisi 25 mg L⁻¹ boya çözeltisi 1 saat 130 rpm'de oda sıcaklığında inkübasyon

Şekil 3.19. RM 21 boyasının giderimine reaksiyon süresinin etkisi (pH 5.0'da 25 mg L⁻¹ boya çözeltisi 130 rpm'de oda sıcaklığında inkübasyon)

Şekil 3.20. RM 21 boyasının giderimine boya konsantrasyonunun etkisi (pH 5.0'da boya çözeltisi 1 saat 130 rpm'de oda sıcaklığında inkübasyon)

Şekil 3.21. RM 21 boyasının giderimine sıcaklığın etkisi (pH 5.0'da 25 mg L⁻¹ boya çözeltisi 1 saat 130 rpm'de inkübasyon)

Şekil 3.22. RM 21 boyasının giderimine farklı boncuk miktarlarının etkisi (pH 5.0'da 25 mg L⁻¹ boya çözeltisi 1 saat 130 rpm'de oda sıcaklığında inkübasyon)

Şekil 3.23. RM 21 boyasının giderimine NaCl konsantrasyonunun etkisi (pH 5.0'da 25 mg L⁻¹ boya çözeltisi 1 saat 130 rpm'de oda sıcaklığında inkübasyon)

Şekil 3.24. RM 21 boyasının giderimine mediatör etkisi (pH 5.0'da 25 mg L⁻¹ boya çözeltisi 130 rpm'de oda sıcaklığında inkübasyon)

Şekil 3.25. Kit-RGO boncuk üzerine immobilize lakkazın RM 21 boyası için tekrar kullanılabilirliği (pH 5.0'da boya çözeltisi 130 rpm'de oda sıcaklığında inkübasyon)

Şekil 3.26. Kit-RGO-Fe₃O₄ boncuk üzerine immobilize lakkazın RM 21 boyası için tekrar kullanılabilirliği (pH 5.0'da boya çözeltisi 130 rpm'de oda sıcaklığında inkübasyon)

Şekil 3.27. 1 haftalık inkübasyonu sonrasında bitki tohumlarının kök uzunluklarını gösteren fotoğrafları (a) Deiyonize su (Kontrol), (b) Reaktif Mavi 21 boyası giderim sonrası, (c) Reaktif Mavi 21 (25 mg L⁻¹) boyası

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Enzim immobilizasyon yöntemleri

Tablo 2. İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması

Tablo 3. Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılar

Tablo 4. Grafit oksit sentezleme yöntemleri

Tablo 5. Boyar maddelerde bulunan kromofor gruplar

Tablo 6. Farklı taşıyıcıların üzerine immobilize edilen lakkazın protein miktarları ve yükleme etkinliği

Tablo 7. Farklı taşıyıcıların üzerine immobilize edilen lakkazın aktiviteleri ve immobilizasyon verimleri

Tablo 8. Serbest ve kompozit taşıyıcılar üzerine immobilize edilen lakkazın termal inaktivasyon parametreleri

Tablo 9. Serbest kompozit taşıyıcılar üzerine immobilize edilen lakkazın kinetik parametreleri

Tablo 10. Farklı konsantrasyonlardaki organik çözücülerde lakkazın stabilitesi

KISALTMALAR LİSTESİ

Kit: Kitosan

RGÖ: İndirgenmiş grafen oksit

DD: Deasetilasyon Derecesi

GA: Glutaraldehit

TPP: Tripolifosfat

ABTS: 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzothiazoline-6-sülfonik asit)

RM 21: Reaktif Mavi 21

mmol : Milimol

mL : Mililitre

g : Gram

°C : Santigrat derece

KBr: Potasyum bromür

XRD: X-Işınları Toz Difraksiyonu

FTIR: Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektroskopisi

JCPDS: The Joint Committee on Powder Diffraction Standart

SEM: Taramalı Elektron Mikroskobu

TGA: Termal Gravimetrik Analiz

VSM: Titreşimli Numune Manyetometresi

UV-Vis : Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopisi

K_M : Michealis-Menten sabiti

V_{max} : Maksimum reaksiyon hızı

$(E_a, \text{J mol}^{-1})$: Aktivasyon enerjisi

$(E_d, \text{J mol}^{-1})$: Denatürasyon için aktivasyon enerjisi

k_d : Termal deaktivasyon sabiti kinetiği

$(t_{1/2})$: Yarı ömür

$(\Delta H^\circ, \text{kJ mol}^{-1})$: Entalpi

$(\Delta G^\circ, \text{kJ mol}^{-1})$: Serbest enerji

$(\Delta S^\circ, \text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1})$: Entropi

TEŞEKKÜRLER

Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde hazırladığım “Modifiye Kitosan Kompozitleri Üzerinde Lakkaz İmmobilizasyonu, Karakterizasyonu ve İmmobilize Enzim ile Tekstil Boyalarının Giderim Kinetiğinin İncelenmesi” konulu yüksek lisans tezim süresince bana ayırdığı zaman ve verdiği destek için danışman Hocam Prof. Dr. Tülin AYDEMİR’e teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her aşamasında yanımda olan maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen canım aileme, sonsuz sevgisiyle yanımda olan annem Neşe KUTLU’ya, babam Şevki KUTLU’ya, kardeşim Şahika KUTLU’ya ve desteklerinden dolayı arkadaşlarıma sevgi ve minnetlerimi sunarım.

“Bu çalışma Celal Bayar Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP 2013-099 Kod’lu Proje ile desteklenmiştir. Teşekkür ederiz.”

ÖZET

Reaktif boyalar; tekstil endüstrisinde parlak renkleri, mükemmel sabitlik dereceleri ve kolay uygulanabilirlikleri nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak boyama işlemlerinden sonra atıksuda kalan çoğu reaktif boya toksik veya kanserojen etkiye sahiptir. Sentetik boyaların giderimi için başvurulan koagülasyon, flokülasyon, adsorpsiyon, oksidasyon gibi fizikokimyasal ve elektrokimyasal metotların zaman ve maliyet alıcı özellikleri ile birlikte istenilmeyen yan ürünlerin oluşumları, biyolojik veya enzimatik tekniklerle çalışan araştırmacıları tehlikeli boyaların giderimi konusunda çalışmaya yönlendirmiştir. Sentetik boyaların dekolizasyon ve giderimi için enzimatik yöntemlerin uygun maliyetliliği, toksik olmayan metabolitlerin üretimi ve ılımlı şartlar gerektirmesi (sıcaklık, basınç ve pH) gibi avantajları nedeniyle fizikokimyasal tekniklere kıyaslandığında daha fazla tercih edilen çevre dostu proseslerdir. Son yıllarda, atıksulardan boyar madde gideriminde biyolojik olarak arıtılmasına ilişkin araştırmalar artmıştır.

Bu çalışmada kitosan (Kit), indirgenmiş grafen oksit (RGO), manyetit (Fe_3O_4), glutaraldehit ile modifiye edilerek Kit-RGO ve Kit-RGO- Fe_3O_4 boncukları elde edildi. Kitosan kompozit boncukların IR, SEM, XRD, TGA ve VSM cihazları kullanılarak karakterizasyon çalışmaları yapıldı. *Trametes versicolor* (EC 1.10.3.2.) lakkaz enzimi kitosan kompozit boncuklar üzerine immobilize edildi ve immobilizasyonunda en iyi aktivite gösterdikleri koşullar (pH ve sıcaklık) belirlenerek kinetik parametreleri (K_M , V_{max} , E_a) bulundu. Immobilize lakkaz örneklerinin termal kararlılıkları, depolama kararlılıkları, inhibitör etkisi ve organik solventlere karşı stabilitesi araştırıldı ve sentetik tekstil boyası olan Reaktif Mavi 21 (RM 21)' i içeren sulu çözeltiden giderimi incelendi.

İmmobilizasyon verimleri ve gram taşıyıcı başına elde edilen enzim aktiviteleri, taşıyıcı olarak Kit-RGO kullanıldığında sırasıyla % 55.29 ve 2.372 U g^{-1} , Kit-RGO- Fe_3O_4 kullanıldığında ise % 57.07 ve 2.50 U g^{-1} olarak hesaplandı. Serbest lakkaz için optimum pH 4.0, immobilize enzimleri için optimum pH 5.0 ve optimum sıcaklıklar ise 40°C olarak belirlendi. Organik solvent, inhibitör, termostabilite ve depolama çalışmaları sonucunda immobilize enzimlerin serbest enzime göre daha kararlı ve daha az inhibe olduğu bulundu.

Çalışmada, etkili bir boya giderimi için pH, reaksiyon süresi, enzim immobilize boncuk miktarı, iyonik şiddet etkisi, boya konsantrasyonu ve sıcaklık gibi farklı parametrelerde enzimatik boya giderimi incelendi. Ayrıca muamele edilmiş boya çözeltileri ile fitotoksisite çalışmaları yapıldı. Artan immobilize enzim miktarı ve reaksiyon süresi ile boya gideriminin arttığı görüldü. Oda sıcaklığında 1 saatlik inkübasyon sonrasında Kit-RGO üzerine immobilize enzim için yüzde boya giderim değerinin % 80 ve Kit-RGO- Fe_3O_4 boncuklar üzerine immobilize enzim için ise % 85 olarak hesaplandı.

Anahtar kelimeler: Lakkaz, İmmobilizasyon, Kitosan, Boya giderimi

ABSTRACT

Reactive dyes are widely used in textile industry due to their bright colors, excellent colorfastness and easy applicability. But most of the reactive dyes, which remain in the waste water after dyeing process, have toxic and carcinogenic effects. Time and cost consuming characteristic of physicochemical methods like coagulation, flocculation, adsorption, ion-exchange, oxidation and electrochemical methods applied for removal of synthetic dyes together with generating undesirable by-products prompts researchers to study on biological or enzymatic techniques for removal of hazardous dyes. Supplying much more eco-friendly process due to production of non-toxic metabolites and requiring mild conditions (temperature, pressure and pH) in comparison with physicochemical techniques and being cost-competitive are some advantages of enzymatic methods for decolorization and removal of synthetic dyes. In recent years, the researches related to utilization of the biological treatment to remove dyes from waste water have increased.

In present work, chitosan (Kit) was modified by reduced graphene oxide (RGO), magnetite (Fe_3O_4) and glutaraldehyde (GA) and obtained Kit-RGO and Kit-RGO- Fe_3O_4 beads. Chitosan composite beads were characterized by IR, SEM, XRD, TGA and VSM. Laccase from *Trametes versicolor* (EC 1.10.3.2.) were immobilized on chitosan composite beads and the conditions in which immobilized laccases showed their maximum activities (pH and temperature) and the kinetic parameters (K_M , V_{max} , E_a) were determined. The thermal stabilities, storage stabilities, effect of inhibitors and organic solvents stabilities of all immobilized laccase preparations were researched and synthetic textile dye, reactive blue 21 was removed by immobilized laccases from aqueous solutions.

The immobilization yields and the activities per gram carrier were calculated 55.29 % and 2.372 U g^{-1} for Kit-RGO, 57.07 % and 2.50 U g^{-1} for Kit-RGO- Fe_3O_4 , respectively. Optimum pH was found as pH 4.0 for free laccase and found as pH 5.0 for immobilized enzyme, and optimum temperature was found as 40°C for free laccase and for immobilized enzyme. As a result of the organic solvents studies, thermal stabilities, storage stabilities, effect of inhibitors immobilized laccases were found to be more stable and less inhibited than free laccase.

In this study, for effective dye decolorization various parameters such as pH, incubation time, the amount of beads, ionic strength, dye concentration and temperature were investigated on enzymatic decolorization. Furthermore, phytotoxicity was performed using decolorized dye solution. As the concentration of incubation time and the amount of enzyme-immobilized enzymes was increased, the decolorization rate of dye also was increased. At room temperature, during 1 hour incubation decolorization rate were calculated as 80 % and 85 % for immobilized laccase on Kit-RGO and Kit-RGO- Fe_3O_4 beads, respectively.

Key words: Laccase, Immobilization, Chitosan, Dye decolorization

1. GİRİŞ

Enzimler biyolojik sistemlerdeki reaksiyonların canlılığa zarar vermeyecek ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan ve protein yapısında olan özel biyokatalizörlerdir [1]. Bütün proteinler gibi enzimlerin de monomeri, amino asitlerdir. Canlı organizmaların hayatsal faaliyetlerini gerçekleştirmeleri için gerekli pek çok biyokimyasal reaksiyonlardan sorumludurlar [2]. Öne çıkan avantajları yüksek katalitik etkinlikleri ve sahip oldukları özgüllükleri sebebiyledir. Enzimler sadece reaksiyonlara karşı değil substratlarına karşı da yüksek özgüllük sergilediklerinden istenilen tek bir son ürünün oluşumunu sağlamakta ve gereksiz yan ürünlerin oluşmasını engellemektedirler. Bunlara ek olarak enzimler, katalizlenmemiş reaksiyonlara kıyasla reaksiyon hızını 10^7 - 10^{16} kez artırırlar. Katalizledikleri reaksiyonlar arasında, mevcut organik kimya metotlarıyla ulaşılamayan, kompleks kimyasal transformasyon reaksiyonları da vardır. Bu durum enzimleri biyoteknolojik kullanımlar için son derece önemli kılmıştır [3]. Tüm bu özelliklerinde dolayı 1960'lardan bu yana enzimlerin endüstriyel kataliz olarak kullanımları artan bir ivmeyle yaygınlaşmaktadır [1,4]. Enzimlerin endüstriyel amaçlı, analitiksel amaçlı, tıpta teşhis, tedavi ve ilaç tasarımı amaçlı kullanımlarında geniş uygulama alanı bulmaktadırlar [1,5].

Çevre boyutu ele alındığında enzimlerin protein yapıda olmaları biyolojik olarak bozunmalarına olanak tanır ve atık yönetimini kolaylaştırır. Günümüzde kullanılabilir durumda olan tatlı su kaynakları, çeşitli sebeplerden dolayı hızla kirlenmekte ve giderek azalmaktadır. Hızla artan nüfus, kentleşme, sanayileşme ve gelişen teknoloji ile birlikte her gün yeni kirlilik çeşitleri gündeme gelmektedir. Kentsel ve kanalizasyon atıksularının yanı sıra endüstriyel atıksuları da yüzey suyu kaynaklarını etkileyen en önemli etmenlerdir. Özellikle tekstil, kozmetik, boya, kâğıt, deri, gıda, plastik vs. gibi birçok endüstriyel atıksuların neden olduğu organik (proteinler, karbonhidratlar, yağ, gres, sürfaktanlar, fenoller, pestisidler, klorlu bileşikler vb.), inorganik (krom, çinko, kurşun, nikel, bakır, arsenik, civa, antimon, kadmiyum vb.) ve çeşitli boyar madde kirlilikleri insan sağlığını ve ekolojik dengeyi tehdit etmektedir. Bu nedenle endüstriyel atıklardan bu tür kirletici maddelerin uzaklaştırılması oldukça önemlidir [6]. Mevcut atıksu sistemleri ise, bu tip atıklardan inatçı boyar maddeleri ve diğer organik kalıntıları tamamen uzaklaştırmakta yetersiz kalmaktadırlar.

Boyama atıksularının arıtılması, adsorpsiyon, koagülasyon, oksidasyon, filtrasyon ve iyonlaştırıcı radyasyon gibi kimyasal ve fiziksel yöntemler gerektirmektedir. Bu yöntemlerin tümü farklı renksizleştirme yeteneğine, sermaye maliyetine ve operasyon hızına sahiptir. Bu yöntemler arasından koagülasyon ve adsorpsiyon yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bunlar büyük miktarlarda atığa yol açmaktadır. Biyolojik yöntemler, tekstil endüstrisi için önerilen

fiziksel ve kimyasal yöntemlere karşın maliyetinin düşük olması, az çamur oluşturmaları veya alıcı ortamları için daha az zararlı yan ürünlerin oluşması gibi özelliklerinden dolayı tekstil endüstrisi atıksularının arıtımı için ideal çözüm olarak kabul edilmektedirler.

Son yıllarda, biyoteknoloji alanında özellikle atıksuların arıtılması konusunda pek çok çalışmalar yapılmaktadır. Atık ve çevre biyoteknolojisinin en önemli amaçlarından birisi atıkların içeriğinin doğanın özümleyeceği düzeye indirilmesidir. Normalde kullanılan arıtım sistemleri doğadakilerin modifiye şeklidir. Biyolojik olarak arıtım da bunu hedefler. Çünkü doğada mikroorganizmalar belirli bir hızda organik molekülleri yıkarlar [7]. Tekstil boyalarının enzimatik olarak parçalanmasını veya renk giderimini sağlayan yaklaşımlarda ise genellikle lignin peroksidaz (LiP), mangan peroksidaz (MnP) ve lakkaz gibi ligninolitik enzimlere dayanmaktadır. Lakkaz enzimleri LiP ve MnP enzimlerine göre büyük oranda parçalanmayan çevresel kirliliklerin yanı sıra hem fenolik hem de fenolik olmayan lignin esaslı bileşenleri yükseltgeyebilme yetenekleri nedeniyle oldukça ilgi çekmekte ve bu avantajları sayesinde de pek çok endüstriyel ve biyoteknolojik süreçlerde kullanılmaktadırlar. Bu uygulamaların başlıcaları kağıt, selüloz, tekstil ve petrokimya sanayilerinin neden olduğu atıkların detoksifikasyonu, nanobiyoteknoloji, medikal teşhisler ve topraktaki herbisit, pestisit ve bazı maddelerin temizlenmesidir [8]. Lakkaz enziminin günümüzde kullanılmakta olan sentetik tekstil boya da dâhil olmak üzere oldukça geniş bir çeşitlilikteki boya parçalayabilme yeteneğinden dolayı enzimatik boya giderme işlemlerinin geliştirilmesinde cazip bir çözüm olarak görülmektedir.

1.1. Enzim İmmobilizasyonu

Enzimler, canlı hücreler tarafından metabolik reaksiyonlarını devam ettirebilmek için bol miktarda sentezlenirler. Bir canlı hücreden enzimin izolasyonu ve saflaştırılması işlemleri oldukça pahalı proseslerde yapılmaktadır. Bu nedenle enzimler pahalı materyallerdir. Ayrıca suda çözünen ve çözeltide serbest halde hareket edebilen enzim moleküllerinin katalizör olarak kullanıldığı reaksiyon ortamından aktivitesini yitirmeden çıkarabilmesi olanaksız olduğundan enzimin yeniden kullanılması da söz konusu değildir. Reaksiyonun istenilen anda durdurulması için inhibitör katılması düşünülebilir. Ancak, serbest enzim tarafından kirlenmiş olan reaksiyon ürünlerine böylece yeni bir kirlilik unsuru eklenmiş olacaktır. Ürün veya ürünlerin bu kirlilik unsurlarından arıtılması maliyeti çok artırmaktadır. Bu ise enzimlerin spesifik ama o ölçüde pahalı katalizör olmaları nedeniyle maliyeti yükselten önemli bir etmendir [1,5,9]. Bu nedenle enzimler, suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanarak, suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak katılmasıyla veya suda çözünmeyen mikrokapsüllerde tutuklamakla immobilize edilirler [1,9,10].

Enzim immobilizasyonu terimi, enzimlerin fiziksel olarak belirli bir yere yerleştirilmesi veya hapsedilmesinin yanında katalitik aktivitelerinin de korunması, bu sayede de tekrarlanabilir ve sürekli uygulanabilir olmasını sağlamak olarak ifade edilebilir [11,12]. Tarihte ilk enzim immobilizasyonu 1916 yılında Nelson ve Grifftin tarafından adsorpsiyon yöntemiyle yapılmıştır. Nelson ve Grifftin sakkarozu hidroliz etmek için maya invertazını mangal kömürüne adsorbe etmişlerdir. İmmobilize enzim sistemlerinin pratik olarak ilk kullanımı ise Grobhofer ve Scheilth (1954) tarafından yapılmıştır [4,13]. İmmobilize enzimlerin diğer önemli uygulamalarına şekerler, amino asitler ve ilaçların endüstriyel ürünleri örnek olarak verilebilir [13]. İmmobilize enzimlerin ilk endüstriyel kullanımı 1969 yılında Chibata ve çalışma arkadaşları tarafından Japonya'nın Tanabe Seiyaku Limited şirketinde, '*Fungal Aminoasılazı*' (*Aspergillus oryzae aminoasılaz*) (EC 3.5.1.14) DEAE Sephadex ile iyonik bağlanmayla immobilize ederek, N-açıl-D,L-amino asitleri hidrolizle, L-amino asitlere ve N-açıl-D-amino asitlere dönüştürmüşlerdir. Daha sonra da immobilizasyon çalışmaları dünyanın her tarafında yaygınlaşmış ve çeşitli enzimler değişik amaçlarla immobilize edilmiştir [14].

İmmobilize enzimin serbest enzime üstünlükleri aşağıdaki şekilde sıralanabilir:

- ⌘ Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir,
- ⌘ Serbest enzime kıyasla daha kararludur,
- ⌘ Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur,
- ⌘ Enzimin kendi kendisini parçalaması (otoliz) olasılığı azalır,
- ⌘ Çevre koşullarına (pH, sıcaklık vb.) karşı daha dayanıklıdır,
- ⌘ Endüstriyel boyutta önemli bir ekonomi sağlar; üretim kaybı azalır,
- ⌘ Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilirler (süzme, santrifüjleme vb.) ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi söz konusu değildir [9,15].

1.2. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

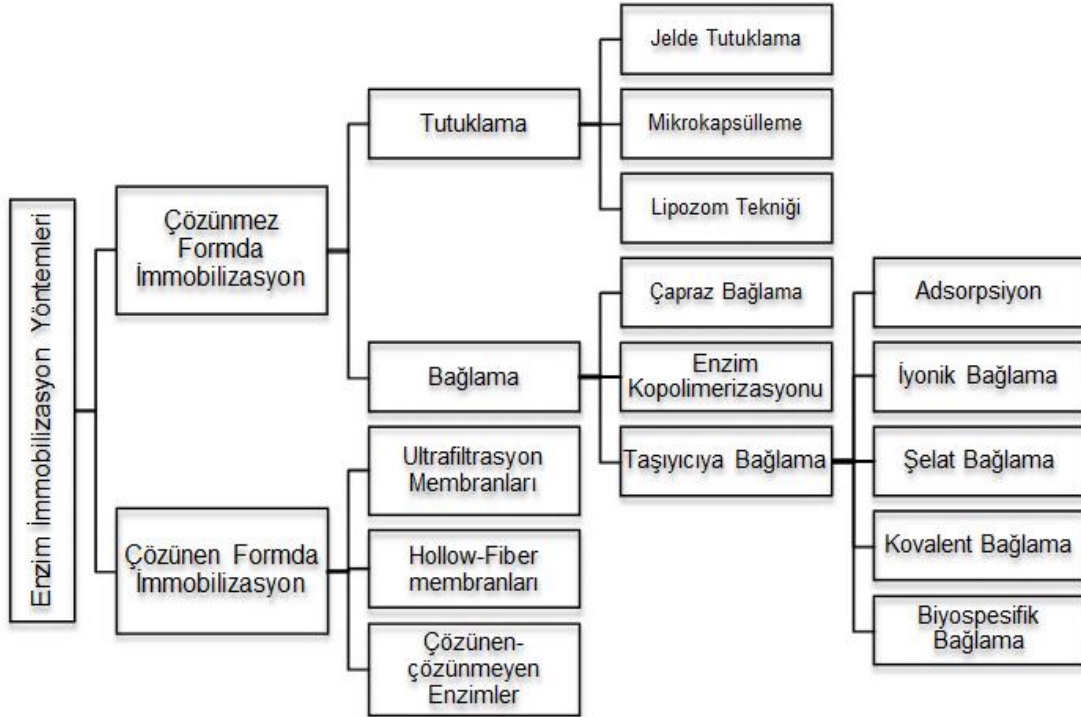
Bir enzim immobilizasyon sisteminde temel bileşenler; enzim, matriks ve enzimin matrikse bağlanma yöntemidir. Matriks, katı-faz destek ve taşıyıcı ile eş anlamlı olarak kullanılır [13]. Enzimi başka bir yüzeye immobilize ederken, enzimin katalitik aktivitesinde kayba neden olmayan, doğal yapısını ya da bağlanma bölgelerindeki reaktif gruplarını değiştirmeyen uygun metodun seçilerek, enzim için en elverişli taşıyıcı malzemelerin kullanılması en önemli noktadır [16]. Enzimin aktif bölgesine dair bilgiler bunun sağlanmasında yardımcı olacaktır. Enzimin aktif bölgesi immobilizasyon sırasında korunabilir ve korumaya yardımcı olan maddeler, daha sonra aktivite kaybına neden olmadan uzaklaştırılabilirler [4].

Kullanılan immobilizasyon tekniği ne olursa olsun immobilize edilen enzimden beklenen özellikler şunlardır:

- ⌘ Yüksek saflık,
- ⌘ Yüksek kararlılık,
- ⌘ Ekonomik olması,
- ⌘ Tekrar kullanılabilirlik,
- ⌘ Yüksek ürün yüzdesi,
- ⌘ Reaksiyon kontrolüne olanak vermesidir.

Günümüzde henüz pek çok biyokatalizör (enzim) için en uygun immobilizasyon yönteminin tasarımı izlenecek sistematik bir yöntem bulunmamaktadır. Optimizasyon şu an için deneme-yanılma yöntemiyle yürütülmektedir. Immobilizasyon tekniğinin seçimi amaçlanan sonuç esas alınarak ve biyokatalizörün, reaksiyonun ve reaktörün tipi göz önünde bulundurularak yapılmalıdır. Günümüzde kullanılan immobilizasyon yöntemleri ise aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Tablo 1). Elbette bu yöntemlerin kombinasyonları da mümkündür [4].

Tablo 1. Enzim immobilizasyon yöntemleri [5,9,15]



Buna göre immobilizasyon yöntemleri; çözünmez formda immobilizasyon ve çözünür formda immobilizasyon olmak üzere iki ana gruba ayrılır [5].

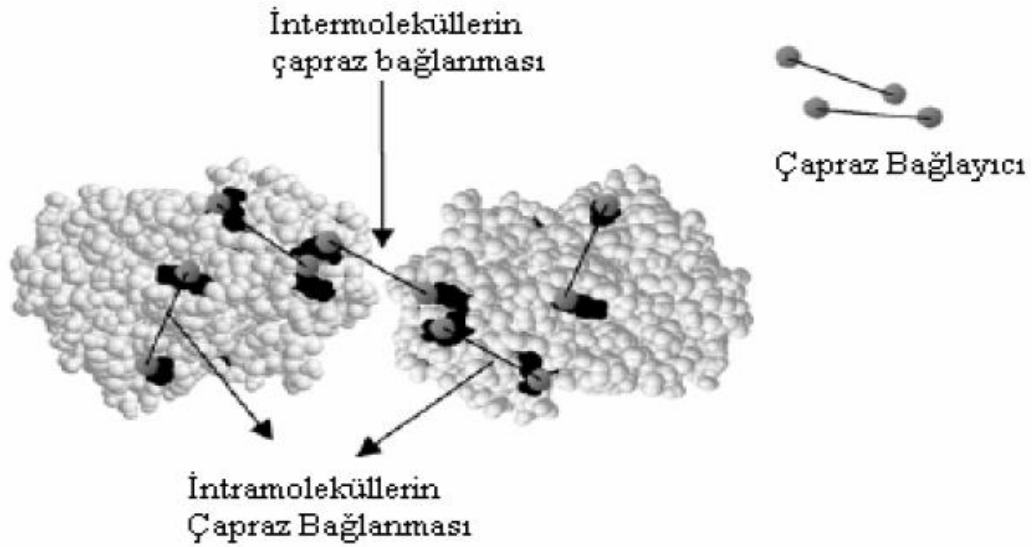
1.2.1. Çözünmez Formda İmmobilizasyon Yöntemleri

Çözünmez formda immobilizasyon yöntemleri bağlama ve tutuklama olarak ikiye ayrılmaktadır.

1.2.1.1. Bağlama Yöntemleri

Bağlama yöntemi; çapraz bağlama, enzim kopolimerizasyonu ve taşıyıcıya bağlama olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır.

* Çapraz Bağlama: Küçük molekülü iki veya çoklu fonksiyonel grupları olan reaktifler enzim molekülleri arasında çapraz bağlar yapmaktadırlar (Şekil 1.1). En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifleri; glutaraldehit, klorformat ve karbonilimidazol, heterosiklik halojenürler, bioksiranlar, gliserol poligliseridil eter, divinilsülfonlar, p-benzokinon, geçiş metal iyonları ve epiklorohidrinlerdir [5,17]. Genellikle pahalı olmadığı ve ticari olarak kolay bulunduğu için glutaraldehit çapraz bağlama reaktifi olarak kullanılmaktadır.



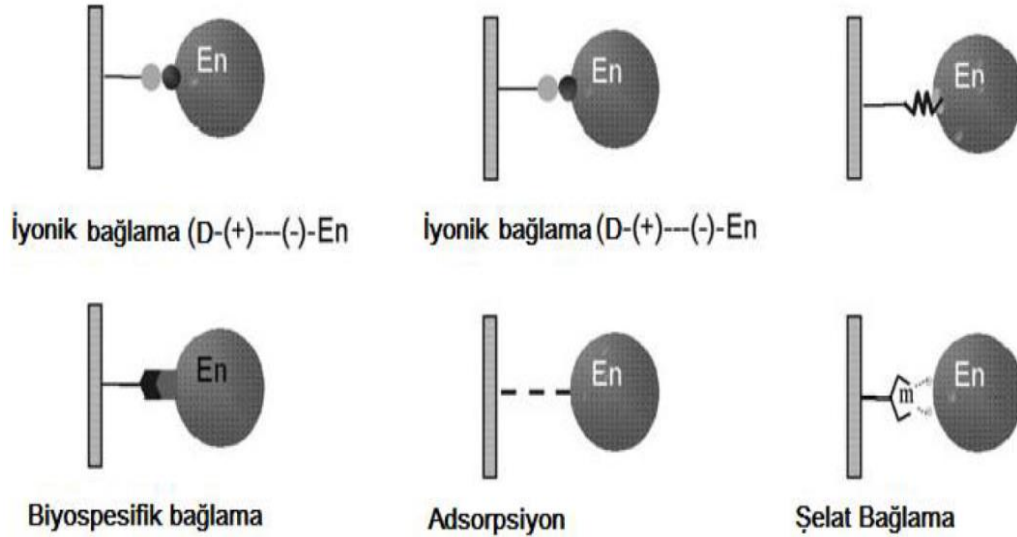
Şekil 1.1. Çapraz bağlama ile immobilizasyon [1]

* Enzim Kopolimerizasyonu: Enzimler monomerlerden biri gibi davranarak matrikse bağlanmaktadır. Yöntem polimer matrikse tutuklanmaya benzemekle birlikte enzim kaçıışının önlenmesi gibi üstünlüğü vardır.

* **Taşıyıcıya Bağlama:** Molekül yüzeyindeki fonksiyonel gruplar, iyonik gruplar ve hidrofobik bölgeler bu bağlamada rol aldığından enzim molekülünün yapısından yararlanır. Enzim immobilizasyonunda doğal veya sentetik birçok organik ve inorganik materyal kullanılmaktadır. Taşıyıcı membran, suda çözünmeyen katı veya polimer olabilir.

Taşıyıcıya bağlama yöntemleri; iyonik bağlama, biyospesifik bağlama, adsorpsiyon, şelat bağlama ve kovalent bağlama olmak üzere beş gruba ayrılır.

✂ **İyonik Bağlama:** Bu yöntem, iyon değiştirme yeteneğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik bağlanması temeline dayanır. Bazı durumlarda iyonik bağlama yanında fiziksel adsorpsiyon da etkili olmaktadır (Şekil 1.2). İyonik bağlama çok yumuşak koşullarda gerçekleştiğinden enzimin konformasyonunda ve aktif merkezde değişikliğe neden olmaz. Ancak enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ kovalent bağ kadar güçlü olmadığından enzim kaçıışı söz konusudur.

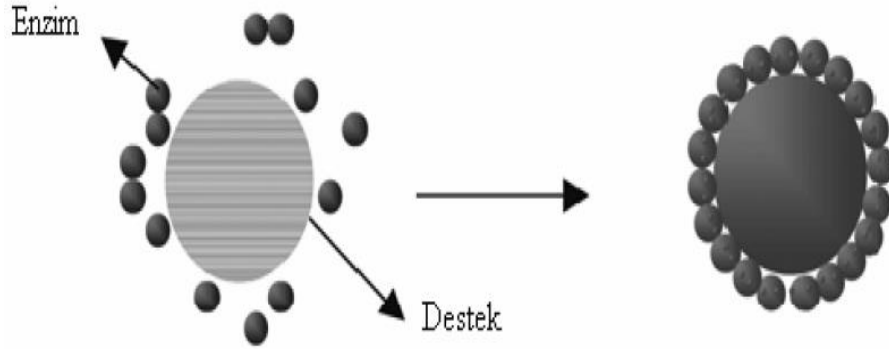


Şekil 1.2. İyonik bağlama, biyospesifik bağlama, adsorpsiyon ve şelat bağlama ile ilgili şematik gösterim (D: Destek, En: Enzim) [5]

✂ **Biyospesifik Bağlama:** Enzimler ile antikorlar ve lektinler arasındaki biyospesifik etkileşimden yararlanarak enzim immobilize edilebilir (Şekil 1.2).

✂ **Adsorpsiyon:** Enzim immobilizasyonunda kullanılan en eski ve en basit yöntemdir. Yöntem yüzey aktif, aktif karbon, gözenekli cam, kül, silikajel, CaCO_3 , nişasta, gluten gibi suda çözünmeyen bir adsorbanın enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının iyice

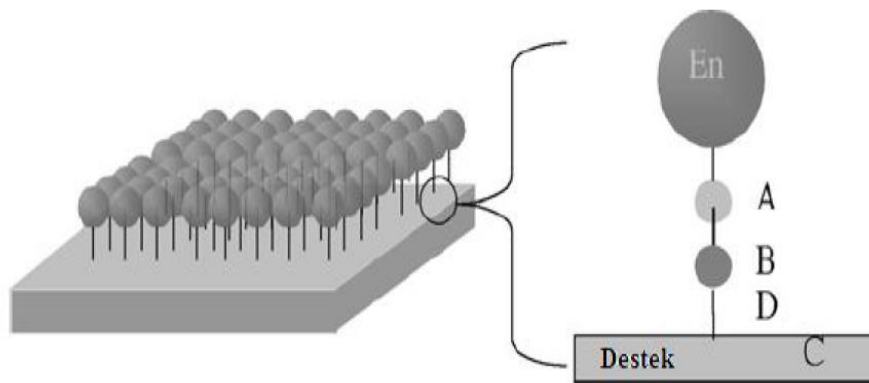
yıkanarak uzaklaştırılması temeline dayanır. Enzimin taşıyıcıya bağlanmasında etkin olan van der Waals kuvvetleridir (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Enzimi desteğe adsorpsiyon yöntemiyle bağlama [1]

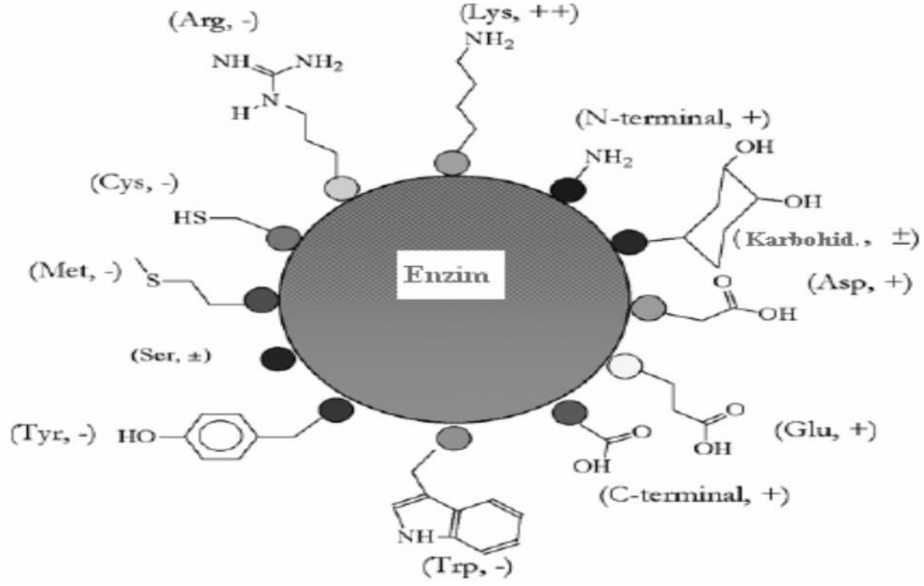
✂ Şelat Bağlama: Bu yöntemde, destek katısının yüzeyini aktifleştirmek ve enzimi destek materyaline bağlamak için geçiş elementleri Titan (III), Titan (IV), Zirkonyum (IV) kullanılır (Şekil 1.2).

✂ Kovalent Bağlama: Enzimin suda çözünmez bir taşıyıcıya kovalent bağlarla bağlanması esasına dayanır. Bu immobilizasyon tekniği genellikle enzim ve taşıyıcı arasında en güçlü bağları sağladığından yaygın olarak kullanılmaktadır. Bundan dolayı kullanılan matriksten enzimin sızıntısı kovalent bağlanmış immobilize enzimler ile sıklıkla minimuma indirilmiş olur. Kovalent bağlama yöntemi, enzim immobilizasyonu için birçok kimyasal reaksiyonları içerir. Enzimin yüzeyinde yer alan amino asit artığı ile destek yüzeyinde yer alan fonksiyonel grup arasındaki kimyasal bağ Şekil 1.4’de gösterilmiştir [5].



Şekil 1.4. Enzimin desteğe kovalent immobilizasyonu: (A) Aktif amino asit artığı; (B) Desteğin fonksiyonel bağ yapacak grubu; (C) Destek; (D) Ara kol [5].

Kovalent immobilizasyonda rol oynayan amino asit artıkları Şekil 1.5'de gösterilmiştir. Sistein, lizin, tirozin ve histidin artıkları en aktif yapılar olarak değerlendirilebilir [4].



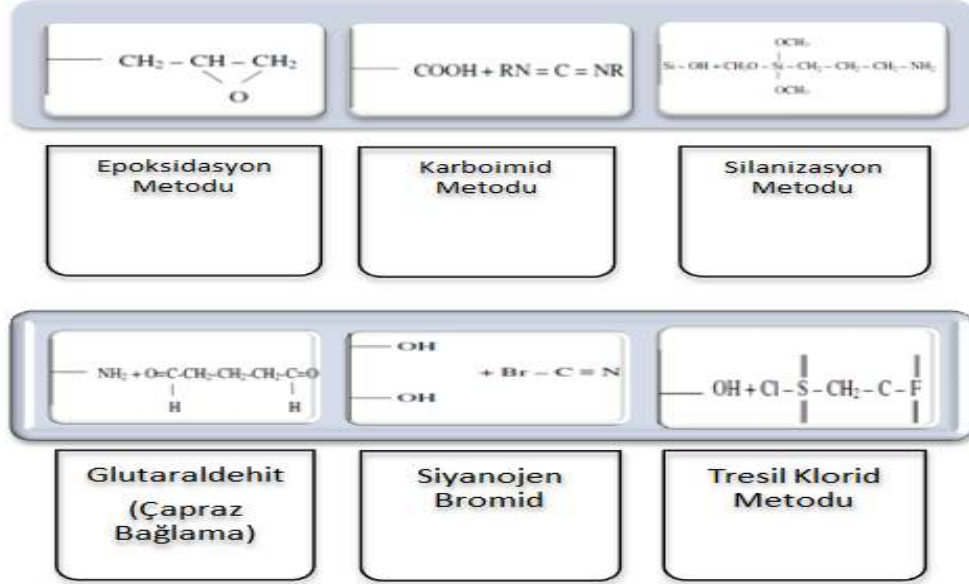
Şekil 1.5. Reaktif amino asit artıkları: (+) enzim immobilizasyonunda sıkça kullanılır; (-) enzim immobilizasyonunda sık kullanılmaz; (±) enzim immobilizasyonunda çok sık kullanılmaz; (++) enzim immobilizasyonunda çok sık kullanılır [1,5].

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcının fiziksel ve kimyasal özellikleri immobilize enzimin performansını (örneğin aktivitesini, seçiciliğini, kararlılığını) doğrudan etkilemektedir. Seçilen taşıyıcılar reaktif değilse yardımcı bir reaktif ile aktive edilmesi gerekir. Aktifleştirilmiş desteklere enzimlerin immobilizasyonunda düşük immobilizasyon etkinliği ve enzim kararlılığında artış veya azalış meydana gelebilmektedir [1,5,15].

Bağlanmada yer alabilecek fonksiyonel gruplar aşağıda listelenmiştir [9]:

- ⌘ Amino grubu
- ⌘ Karboksil grubu
- ⌘ Sülfidril grubu
- ⌘ Hidroksil grubu
- ⌘ İmidazol grubu
- ⌘ Fenolik grup
- ⌘ Tiol grubu
- ⌘ Treonin grubu
- ⌘ İndol grubu

Ardından çapraz bağlayıcı bir ajan, enzimin fonksiyonel bir grubuyla aktivite edilmiş taşıyıcıyı bağlamak için kullanılır. Taşıyıcı üzerindeki fonksiyonel grubun tanıtılması gerekmektedir. Bunun için fonksiyonel monomerlerle kopolimerizasyon ya da polimer tipi reaksiyon kullanılır. Bu amaçla kullanılan yöntemlerin başlıcaları Şekil 1.6'da verilmiştir.



Şekil 1.6. Fonksiyonel monomerler

Desteğe kovalent bağlı immobilize enzimin performansını etkileyebilecek özellikler:

- ⌘ Enzim yönlenmesi,
- ⌘ Kimyasal bağın yapısı,
- ⌘ Enzimin bağlanma ortamının özellikleri,
- ⌘ Enzim ve destek arasında oluşan bağın sayısı,
- ⌘ Desteğin yüzeyindeki ya da desteğin içindeki enzim dağılımı,
- ⌘ Desteğin fiziksel özellikleri (gözenek büyüklüğü, geçirgenliği, şekli vb.),
- ⌘ İmmobilizasyon sırasında ya da immobilizasyon sonrasında enzimin konformasyonu,
- ⌘ Desteğin kimyasal yapısı (yapının kimyasal bileşimi, aktif fonksiyonel gruplar, aktif olmayan fonksiyonel gruplar)'dır.

Kovalent bağla immobilize edilen enzimler şu avantajlara sahiptir:

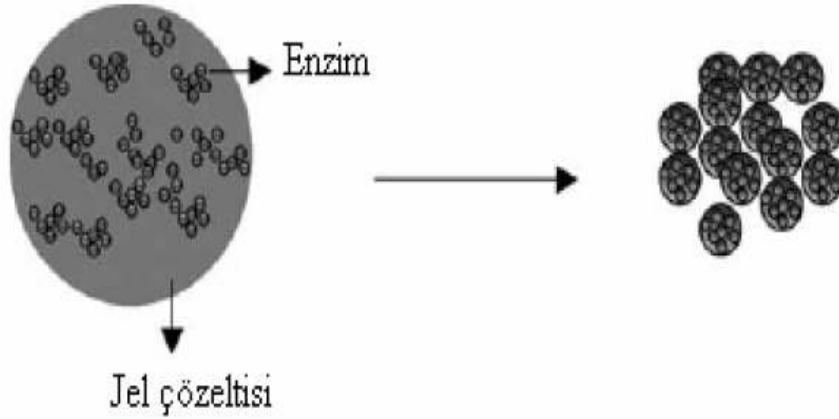
- ⌘ Oluşan sıkı bağ sonucu, kullanım aşamasında sızıntı ya da parçalanmayla karşılaşmaz,
- ⌘ İmmobilize edilmiş enzim substratla çok kolay bağlantı kurabilir çünkü enzim desteğin yüzeyinde tutturulmuştur,
- ⌘ Enzim molekülleriyle destek madde arasındaki güçlü etkileşim nedeniyle çoğunlukla ısı kararlılığında bir yükseliş görülebilir.

Diğer yandan kovalent bağın dezavantajları ise:

- ⌘ Destekler genellikle yenilenebilir değildir,
- ⌘ İmmobilizasyonun optimum koşullarını bulmak zordur,
- ⌘ Enzim moleküllerinin aktif yapısı kısmi modifikasyonlarla bozulabilir,
- ⌘ Enzim molekülleriyle destek arasındaki kuvvetli etkileşimler, enzim moleküllerinin serbest hareketini engelleyebilir ve bu da enzim aktivitesinde bir azalmaya yol açar.

1.2.1.2. Tutuklama Yöntemleri

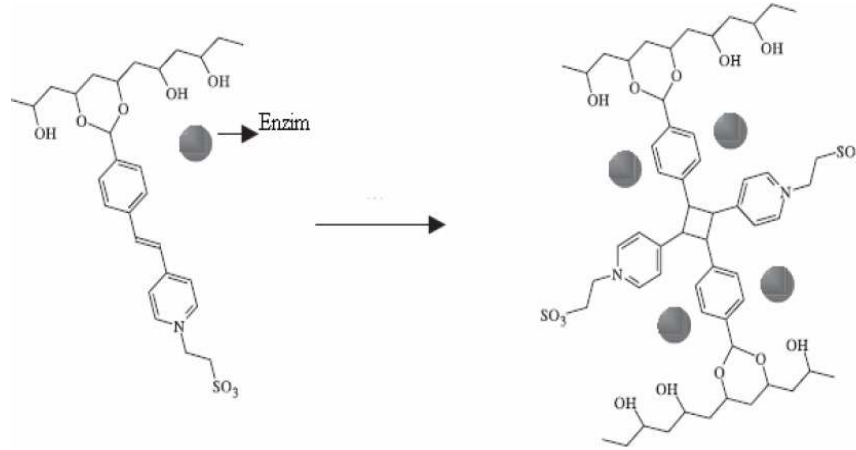
Tutuklama yönteminde, enzim molekülü belirli bir mekanda durmaya zorlanmaktadır. Enzim bulunduğu çevreden dışarıya çıkamaz. Bu işlem polimer matriks içindeki kafeslerde gerçekleştirilebileceği gibi yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ve miseller ile de gerçekleştirilebilir. Bu yöntemi, kovalent bağlama ve çapraz bağlama ile immobilizasyondan ayıran en önemli özellik enzim molekülünün fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır (Şekil1.7).



Şekil 1.7. Enzim tutuklama yöntemi ile immobilizasyonu [1]

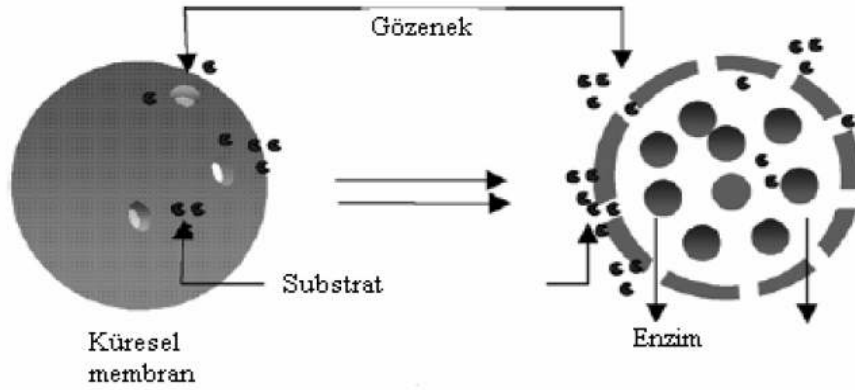
Tutuklama yöntemi; polimer matrikste tutuklama, mikrokapsülleme, lipozom tekniği olmak üzere üçe ayrılır.

* **Polimer Matrikste Tutuklama Yöntemi:** Yüksek derecede çapraz bağlı bir polimerin enzim çözeltisi içinde oluşturulması temeline dayanır (Şekil 1.8). Polimerleşme sonucu enzim molekülleri çapraz bağ ağları arasında tutuklanmakta ve böylece ana çözeltiliye geçmeleri engellenmektedir. Bu amaçla en çok kullanılan polimer N,N'-metilenbisakrilamid ile çapraz bağlanmış poliakrilamiddir.



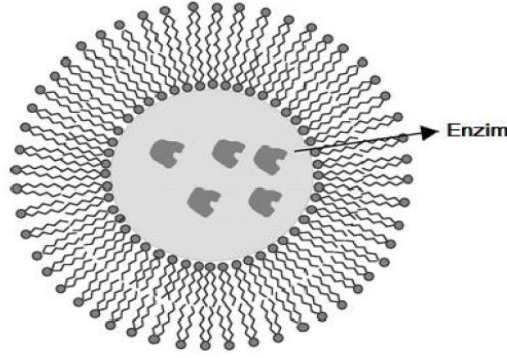
Şekil 1.8. Enzimin polimerler arasında tutuklanması [1,5]

* Mikro kapsülleme Yöntemi: Enzim moleküllerinin yarı geçirgen bir membran içinde tutuklanması esasına dayanır (Şekil 1.9). Yarı geçirgen membranın gözenek çapları; substrat moleküllerinin kapsül içine girişine ve ürün moleküllerinin dışarı çıkışına olanak verecek bir büyüklükte olmalıdır [1]. Mikro kapsüllerin büyüklüğü 1-100 μ arasında değişmektedir.



Şekil 1.9. Mikro kapsülleme ile enzim immobilizasyonu [1,5]

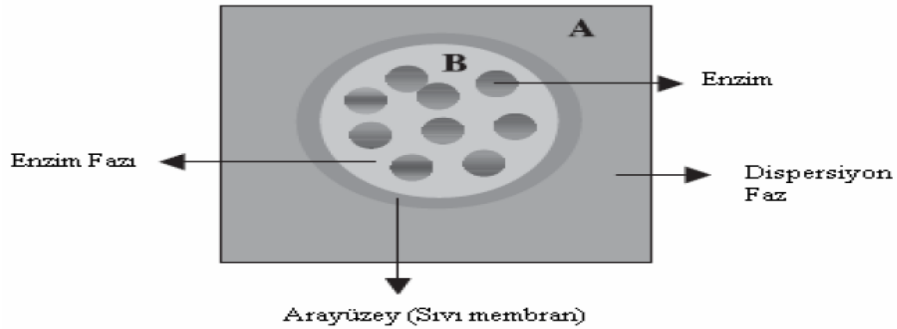
* Lipozom Tekniği: Sıvı-yüzey yapıcı membran temeline dayanır (Şekil 1.10). Yöntemin en önemli üstünlüğü; süreksiz, dönüşümlü ve tamamen fiziksel oluşudur. Önemli sakıncaları ise; substrat ve ürünün membranda geçişinin çözünürlüğe bağımlı olması, işlem sırasında enzimin inaktive olması ve sıvı olan membrandan enzimin kaçma olasılığıdır.



Şekil 1.10. Enzimlerin immobilizasyonu için lipozom kapsül [1,5]

1.2.2. Çözünür Formda İmmobilizasyon

Çözünür formda immobilizasyon yöntemi enzimin herhangi bir taşıyıcıyla fiziksel veya kimyasal etkileşiminden çok, yarı geçirgen bir zarla çevrelendiği ve enzime geniş bir hareket alanının sağlandığı bir yöntemdir. Yarı geçirgen özellik gösteren oyuk elyaf membranları ve ultrafiltrasyon membranların kullanımı enzimlerin çözünür formda immobilizasyon yöntemlerinden biridir. Bu immobilizasyon yöntemi hiçbir kimyasal bileşiğin veya tekniğin kullanılmasının gerekmediği son derece kolay bir yöntemdir. Oyuk elyaf membranlar ile ultrafiltrasyon membranları enzimi geçirmezken substrat ve ürünün geçişine izin verir. Ayrıca mikropların enzime ulaşmasını engelleyerek koruyucu etki gösterirler. Enzim taşıyıcıya herhangi bir bölgesinden bağlanmadığı için moleküller geometrisi, esnekliği ve dolayısıyla katalitik etkinliği değişmez, ancak substratın membrandan geçip enzime ulaşmasında kısıtlamalar bu yöntemin en önemli dezavantajlarından birini oluşturur. Substrat molekülü ne kadar küçükse membrandan geçişi o denli kolay olacağından enzimin etkinliği de o oranda artacaktır. Enzimler çözünür formda kullanılmadan önce düşük veya yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerle kimyasal olarak modifiye edilerek daha kullanışlı ve kararlı hale getirilebilirler [1,5,15].



Şekil 1.11. Çözünür formda immobilizasyon [1]

1.3. Enzim İmmobilizasyon Yöntemlerinin Kıyaslanması

Enzimlerin çoğuna uygulanabilen çok sayıda immobilizasyon teknikleri geliştirilmesine karşın, enzimlerin bileşenlerinin ve kimyasal özelliklerinin oldukça geniş, ürünlerin ve substratların farklı özelliklerde olmaları nedeniyle bütün enzimler veya uygulamalar için geçerli tek bir yöntem belirlemek mümkün değildir. Bu nedenle immobilizasyonu düşünülen her farklı enzim için ve her farklı durumda bir veya birkaç değişik yöntem önerilebilir. Tablo 2'de immobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanmaları gösterilmiştir [5].

Tablo 2. İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması [5,15]

Karakteristik	Fiziki Adsorpsiyon	İyonik Bağlanma	Şelat veya Metale Bağlanma	Kovalent Bağlanma
Hazırlama	Kolay	Kolay	Kolay	Zor
Bağlanma Gücü	Zayıf	Orta	Orta	Güçlü
Enzim Aktivitesi	Orta	Yüksek	Yüksek	Yüksek
Desteğin Tekrar Kullanılabilirliği	Mümkün	Mümkün	Mümkün	Nadiren
İmmobilizasyon Maliyeti	Düşük	Düşük	Orta	Yüksek
Kararlılık	Düşük	Orta	Orta	Yüksek
Genel Uygulanabilirlik	Evet	Evet	Evet	Hayır
Enzimin Mikrobiyal Ataklara Karşı Korunabilmesi	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır

Bahsedilen tüm immobilizasyon yöntemlerini bir arada değerlendirmek gerekirse, adsorpsiyon kolay ve ucuzdur ancak çoğunlukla kararlı değildir ve geriye dönüşüm gözlenir. Tutuklama ve mikrokapsülleme yönteminde ise difüzyon problemleri gözlenir. Enzimin kovalent bağlanma ile bir taşıyıcıya bağlanması endüstriyel açıdan en cazip yöntem olarak öne çıkmaktadır. Çünkü kovalent bağlanma özellikle çapraz bağlanma ile birlikte uygulandığında etkili ve karardır. Çapraz bağlama ajanı olarak da en iyi sonuçlar glutaraldehit ile yapılan çalışmalarda elde edilmiştir. Kovalent bağlanmanın uygulanacağı taşıyıcıya ait de günümüze kadar pek çok çalışma yapılmıştır. Organik ya da inorganik, doğal ya da sentetik pek çok madde denenmiş ve kitin ve kitosan içlerinde en ön plana geçen iki malzeme olmuştur [4].

1.4. Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılan Taşıyıcılar

İdeal bir taşıyıcı genel olarak; ucuzluk, zehirsizlik, hidrofiliklik, biyolojik uygunluk, mikrobiyal ataklara karşı ve basınca karşı fiziksel direnç, enzimin seçiciliğini arttırma, ürün

inhibisyonunu düşürme gibi özelliklere sahip olabilmelidir. Taşıyıcının fiziksel özellikleride (ortalama tanecik çapı, şişme davranışı, mekanik direnç ve basınç altındaki davranışı) immobilize enzimlerin performansını son derece etkilemektedir. Taşıyıcılar kimyasal bileşimlerine göre organik veya anorganik olarak sınıflandırılabilirler (Tablo 3). İnorganik taşıyıcıların pek çok avantajlarına rağmen (örneğin fiziksel, kimyasal veya mikrobiyal indirgemelere karşı yüksek stabilite), pek çok endüstriyel uygulamalarda organik taşıyıcılar kullanılır [13]. Organik taşıyıcılar doğal ve sentetik olarak alt gruplara ayrılırlar.

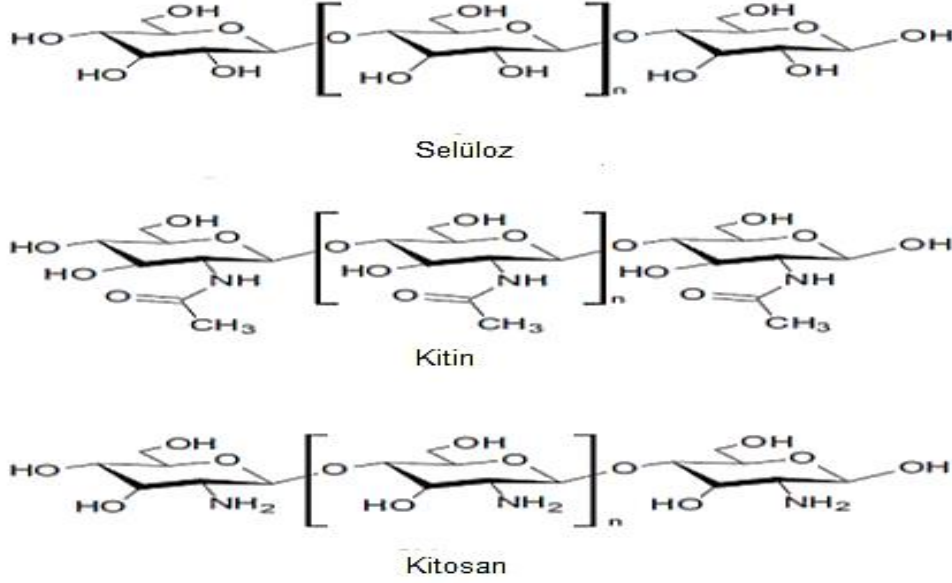
Tablo 3. Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılar [13]

Organik •Doğal Polimerler Polisakkaritler, Selüloz, Dekstran, Agar, Agaroz, Kitin, Alginat Proteinler, Kolajen, Albumin Karbon •Sentetik Polimerler Polistiren Diğer polimerler: poliakrilat, polimetakrilat, poliakrilamitler, poliamitler, vinil ve allil polimerler
İnorganik •Doğal mineraller: Bentonit, Silika •Cam (gözeneksiz ve kontrol edilmiş gözenekli), metaller, metal oksitler

1.4.1. Kitin ve Kitosan

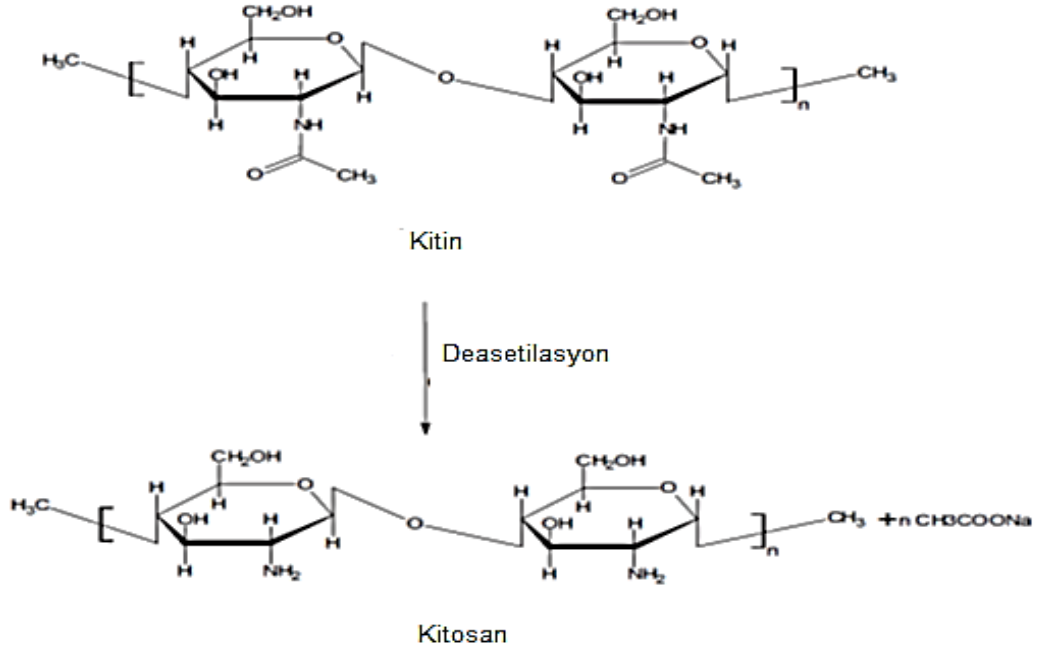
Deniz ürünleri üreten şirketler tarafından büyük miktarda yengeç ve karides kabukları değerlendirilmeden çevreye atılmaktadır ve bu kaynaklara ait atıklar yıllık 1.2 milyon tondan fazladır [18-20]. Özellikle son yıllarda atıkların yeniden değerlendirilmesinin gündeme gelmesiyle birlikte, kabuklu su ürünlerinin yenilebilir kısımları ayrıldıktan sonra kalan bu atıklar çürümeye bırakılmak yerine, kimyasal veya biyolojik yöntemlerle yeniden değerlendirilmektedir. Bu şekilde elde edilen ürünlerin başında kitin ve başlıca türevi olan kitosan gelmektedir [18]. Yengeç, istakoz ve karides gibi deniz hayvanlarının kabuk kısmı % 30-40 protein, % 30-50 kalsiyum karbonat ve kalsiyum fosfat ile % 20-30 kitinden oluşmaktadır [21]. Karides kitinlerinde % 6.29, yengeç kitinlerinde ise % 6.24 oranında azot bulunmaktadır. Bu azot oranı kitini yararlı bir şelatlaşma (metal tutma) ajanı yapmaktadır [22]. Kitin eklem bacaklıların kütikula tabakasında, ayrıca bazı fungi ve mikroorganizmaların hücre duvarlarında bulunur, kararlılık ve dayanıklılığının temelinde buradan gelir [4,9,13].

Doğada selülozdan sonra en çok bulunan ikinci biyopolimer olan kitinin yapısında, selülozun 2. karbonundaki hidroksil yerine asetamid ($-\text{NHCOCH}_3$) bağlıdır [19,23-27]. Kitin β -(1 $\rightarrow$ 4) bağları ile bağlı 2-asetamido-2-deoksi- β -D-glukoz ünitelerinden (N-asetil-D-glukozamine) meydana gelir [4,25,27]. Kitosan, kitinin başlıca türevi kimyasal olarak β -(1 $\rightarrow$ 4)-2-asetoamido-2-deoksi- β -D-glikozdan oluşan ünitelerinden oluşan bir kopolimeridir [17,19,23,25,28] (Şekil 1.12).



Şekil 1.12. Kitosan, kitin ve selülozun yapısı [23,29]

Kitosan, doğal biyopolimer kitinin deasetilasyonu (asetil gruplarının bir kısmının veya tamamının güçlü alkaliler ile uzaklaştırılması) ile elde edilen lineer hidrofilik polisakkarittir [30,31,32]. Bu nedenle kitin ile kitosan arasındaki temel fark deasetilasyon derecesinden kaynaklanmaktadır. Prensip olarak amid gruplarının hidrolizi için asidik ve bazik ortamların ikisi birden kullanılabilirse de, kitindeki glikozit bağlarının hassasiyetinden dolayı asidik hidroliz tercih edilmemektedir. Asetil gruplarının uzaklaştırılması ile kitosanın yapısında reaktif amino ($-\text{NH}_2$) grupları ortaya çıkar. Şekil 1.13'de kitinin yüksek sıcaklıkta (120 °C'de) % 40 NaOH ile etkileştirilmesi sonucu deasetillenmiş kitosanı göstermektedir. Bu serbest amino grupları kitosanın fiziksel ve kimyasal özelliklerinin temelini oluşturmaktadır. Bunun dışında asetilasyon derecesi biyolojik bozunabilirliği ve immünolojik aktiviteyi de etkilemektedir [33].



Şekil 1.13. Kitinin kitosana deasetilasyonu [29]

Kitosanın, kitin ve selülozdan farklı olarak sahip olduğu amin grubu, çözünme sırasında protonlanır ve bundan dolayı da kitosan pozitif yüklenmiş olur [34]. Bu özellik, kitosanın katyonik bir polisakkarit olduğunu gösterir [35,36]. Bununla birlikte, kitosanın polikasyonik özelliğe sahip olması, protein, anyonik polisakkaritler (alginat, karregean ve pektin gibi), anyonik glikozaminoglikanlar, yağ asitleri ve fosfolipidler gibi negatif yüklü olabilen bileşenlerle kolay bir şekilde etkileşime girmesini sağlamaktadır [25,37]. Kitosan su, alkali ve organik solventlerde çözünmez, etanolde şişer ancak amino gruplarının varlığı pH değerinin 6'dan küçük olduğu organik asitlerin pek çok çözeltilerinde çözünür hale gelir [23,25]. Bu çözünürlük, zincir boyunca tekrarlanan grupların dağılımı ile de kontrol edilebilir [24]. Asetik asit ve formik asit, kitosanı çözmek için en çok kullanılan iki asittir. Ayrıca nitrik asit, hidroklorik asit, perklorik asit ve fosforik asit gibi bazı sulu inorganik asitler de çözünme sınırlıdır (% 1 hidroklorik asitte çözünür; sülfirik ve fosforik asitte çözünmez) ancak daha uzun karıştırma ve ısıtmanın ardından kitosan çözeltileri hazırlamak için kullanılabilir [13,24].

Kitosanın kitine göre iki büyük avantajı bulunmaktadır. Bunlardan birincisi kitini çözmek için lityum klorür ve dimetilasetamid gibi toksik özellikte olabilen çözüenler kullanılmasına karşın kitosanın seyreltik asetik asit içinde kolayca çözünebilmesidir. İkinci avantajı ise birçok kimyasal reaksiyon için aktif kısım olan serbest amin gruplarına sahip olmasıdır.

Kitosanın özelliklerine etki eden parametreler; deasetilasyon derecesi, molekül ağırlığı, viskozite, çözünürlük ve renk şeklinde sıralanabilmektedir.

* **Deasetilasyon Derecesi:** Kitin ve kitosan arasındaki temel farklılık, yapılarındaki asetil içeriğinden kaynaklanmaktadır. “Deasetilasyon Derecesi (DD)” kitinin yapısında bulunan aminoasetil gruplarından asetil grubunun uzaklaştırılma derecesidir. Böylece geride sadece amin grubu kalmaktadır. Kitosanın deasetilasyon derecesinin, başta çözünme özelliği olmak üzere birçok parametre üzerinde büyük etkisi bulunmaktadır. Kitinin belli derecede deasetillenmesi (% 60 ve üzeri) sonucunda “kitosan” elde edilmektedir. Deasetilasyon derecesi metal iyonlar ile etkileşimlere girebilecek serbest amino gruplarının oranını kontrol eder. Kitosandaki amino grupları kitindeki asetamido gruplarından daha çok reaktiftir. Amin gruplarındaki azotun serbest elektron çifti metal iyonların adsorpsiyonundan sorumludur. Kitosandaki amin grubunun pKa değeri 6.2 ile 7.0 arasındadır [33,38].

* **Molekül Ağırlığı:** Kitosanın doğal ve sentetik polimerlere uygulamasında önemli olan diğer bir parametre de molekül ağırlığıdır. Kitin ve kitosanın molekül ağırlığı, elde edildiği kaynağa ve özellikle deasetilasyon koşullarına (sıcaklık, zaman ve NaOH konsantrasyonu) bağlı olarak değişmektedir. Ortamda bulunan çözünmüş oksijen, kitosanın parçalanmasına neden olmakta ve molekül ağırlığını düşürmektedir. Diğer yandan, çok yüksek sıcaklıklar da kitosanın molekül ağırlığına olumsuz etki etmektedir. Örneğin 280 °C ve üzerindeki sıcaklıklarda kitosan parçalanmaya başlamakta, polimer zinciri kopmakta ve böylece molekül ağırlığı düşmektedir [38].

* **Viskozite:** Viskozite, demineralizasyon süresinin artması ile düşmektedir. Yaklaşık 4 °C’de depolanan kitosan çözeltisinin viskozite açısından en iyi stabiliteyi gösterdiği görülmüştür [38].

* **Çözünürlük:** Kitin, çok miktardaki molekül içi ve moleküller arası hidrojen bağları ile yarı kristalin yapıda bir polimerdir. Bu nedenle seyreltik asitlerde ve birçok organik çözügede çözünmemektedir. Kitosan, katyonik yapısı sayesinde pH’nin değerinin 6’dan küçük olduğu çözeltilerde kolayca çözünabilmektedir. Diğer yandan, inorganik asitler içerisinde kitosanın çözünürlüğü oldukça düşüktür. Kitosanın çözünmesi amacıyla genellikle asetik asit, formik asit ve laktik asit gibi organik asitler kullanılmaktadır. Bunlar arasında en çok kullanılan çözgen asetik asittir [38].

* **Renk:** Kabuklu deniz hayvanlarının yapısındaki pigment, kitin ile kompleks oluşturmaktadır (4-keto ve 3,4,4-diketo- β -keroten türevleri). Toz halindeki kitosan oldukça yumuşak olup rengi açık sarıdan beyaza kadar çeşitli tonlarda değişebilmektedir. Çeşitli literatürlerde, renk giderme

işlemi için alternatif olarak; KMnO_4 , NaHSO_3 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ veya H_2O_2 gibi kimyasallarında kullanılabileceği ifade edilmektedir [38] .

Genel olarak bakıldığında kitosan aşağıda belirtilen fiziksel özelliklerinden dolayı birçok endüstriyel uygulamada kullanıma sahiptir [13,20,39]:

- ⌘ Toksik değildir, biyouyumludur ve biyobozunurdur,
- ⌘ Yenilenebilir özelliktedir, bol miktarda bulunmaktadır,
- ⌘ Çözünmesi için zararlı organik çözücülere gerek duyulmaz,
- ⌘ Katyonik polimer olup negatif yüklü yüzeyler ile kolayca etkileşir,
- ⌘ Asit giderici, antiülser, antitümör, antimikrobiyal, antioksidant, antibakteriyel ve antifungal etki gibi biyolojik etkileri vardır.

1.4.2. Kitin ve Kitosanın Kullanım Alanları

Kitin ve kitosan türevleri hem tek hücreli canlılarda hem de yüksek organizasyonlu ökaryot organizmalarda enzimatik olarak yıkıma uğrayabilmektedir. Mikroorganizmalardaki *kitinaz* ve *kitozinaz* enzimleri ile yüksek organizasyonlu canlılarda lizozomal enzimler, kitin ve kitosanı parçalarlar. Kitosanın lizozomal enzimlerin etkisi ile parçalanabilmesi, bu polimerin farmasötik alanda kullanımı açısından büyük önem taşımaktadır [24].

Doğal bir polikasyon olan kitosan da diğer polikasyonlar gibi mikroorganizmaların hücre duvarlarının yapısında bozulma meydana getirerek antimikrobiyal özellik gösterirler. Örnek olarak kültür ortamı içerisinde % 0.02 kitosan bulunması *Escherichia coli*' nin gelişimini inhibe etmiştir. Aynı zamanda çeşitli bitki patojenlerinin gelişiminide kitosanın varlığı durdurmuştur [33].

Kitin ve kitosan arasındaki ayrım için kriter polimerin seyreltik asit içerisindeki çözünürlüğüdür. Kitin az sayıda çözücüde çözünür ve kitini çözmek için kullanılan çoğu çözücüler toksiktir bu nedenle yiyecek endüstrisinde kullanılmaz. Kitosan için kullanılan çözücüler ise genellikle daha güvenlidir. Kitosan serbest amin gruplarının protonlanmasından dolayı seyreltik CH_3COOH , HCl , HBr , HI , HNO_3 ve HClO_4 'te çözünür. Bu yüzden kitosan yiyecek endüstrisinde güvenle kullanılır [22].

Kitosan son yıllarda adından sıkça bahsedilen diyetetik yardımcı maddeler arasında yer almaktadır. Sindirim enzimleri tarafından hidrolize edilememesi, yüksek viskozitesi, jel oluşturma ve yüksek su bağlama yeteneği gibi nedenlerle bitkisel diyetetik liflere benzerlik göstermektedir [13]. Ancak klasik liflerden farklıdır. Kitosan midede çözünerek, intragastrik yağ damlacıkları ile emülsiyon oluşturarak pH 6.5-6.8'de ince bağırsakta çökmeye başlamakta ve

bağırsaklarda jel oluşturmaktadır. Lipidler oluşan bu polisakkarit matriks içerisinde tutunarak dışkıyla birlikte uzaklaşmaktadır.

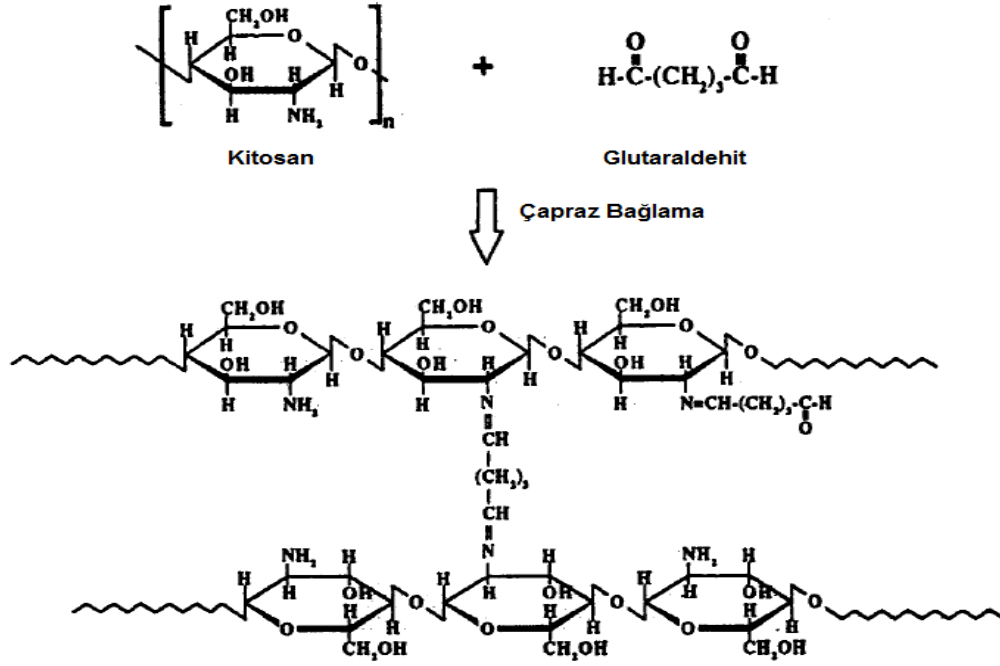
Gıdaların paketlenmesi için biyobozunur polimerlerin kullanılması çevresel ve fonksiyonel katkılarından dolayı gittikçe artmaktadır. Kitosanın bu amaçla da kullanılabileceği farkedilmiştir. Bu amaçla kitosan yaklaşık % 2 asetik veya formik asit içerisinde çözülür ve düz bir zemin üzerine dökülerek film oluşumu sağlanır. Kitosandan hazırlanan filmler üretilen gıdalara, kapsülleme malzemelerine veya paketleme materyallerine uygulanabilir [33]. Bu filmlerin önemli bir özelliği oksijene geçirgen olmasıdır. Bu nedenle yara iyileşmesi gibi çeşitli biyolojik uygulamalarda kullanılabilmektedir.

Meyve suyu üretiminde, meyvelerin preslenmesinden sonra oluşan bulanıklığın giderilmesi için jelatin gibi ajanlar kullanılmaktadır. Kitosan tuzları güçlü pozitif yükler taşıması nedeniyle, meyve suyundaki negatif yüklü kolloidlerle elektrostatik etkileşime girerek, bulanıklığa neden olan bu parçacıkların çökmesini sağlamaktadırlar. Dolayısıyla kitosan veya tuzları etkili durultma ajanları olarak kullanılabilmektedir [40].

Kitosan sahip olduğu yapısından dolayı, dispers, direkt, reaktif, asit, vat, sülfür ve naftol boyları gibi çok sayıda boya sınıfına karşı oldukça yüksek bir affiniteye sahiptir. Sadece bazik boyalar için kitosan düşük affiniteye sahiptir. Boyaların kitosan tarafından emilimi ekzotermiktir, sıcaklıktaki artış boya emilim oranını artırırken toplam emilim kapasitesini azaltır. Ayrıca atıksuyun pH değerinde bazı boyaların kitosan tarafından emiliminde önemli bir faktör olabilir. Çünkü düşük pH'larda kitosanın serbest amin grupları anyonik boylarla etkileşime girecek şekilde kolayca protonlanır [33]. Böylece, bu amin gruplarının protonlanması metal anyonları veya anyonik boylarla elektrostatik etkileşimine neden olabilir. Kitosandaki amino grupları metal iyonları ile güçlü bir şekilde etkileşim içerisindedir. Aslında, azot atomları metal katyonları ile reaksiyon verebilen serbest elektron çiftlerine sahiptir. Bu sebepten amin grupları şelatlama mekanizması ile metal katyonlarının tutulmasını sağlamaktadır [22]. Bu nedenle atıksuların civa, kurşun ve krom gibi ağır metallerden arındırılmasında kullanılmaktadır [19]. Bu biyopolimer fizikokimyasal karakteristiği, kimyasal stabilitesi, yüksek reaktivitesi, mükemmel şelatlama davranışı ve kirliliklere karşı yüksek seçiciliğiyle diğer biyomateryallere karşı cazip bir alternatif temsil etmektedir [17]. Olumlu özelliklerine rağmen, zayıf mekanik dayanıklılık ve yapısal bütünlüğünün azalması kitosanın uygulamalarını sınırlar [41]. Kitosanın modifikasyonları ile fizikokimyasal özelliklerinin ve böylece farklı alanlarda uygulamalarının geliştirilmesi amaçlanmıştır. Kitosan yaygın olarak nanomateryalleri disperse etmek için kullanılmaktadır [31]. Kitosanın fiziksel ve kimyasal özelliklerinin geliştirilmesiyle etkili bir yaklaşım dolgu organik-inorganik maddelerin eklenmesiyle kompozitlerinin oluşturulmasıdır. Bu maddeler killer,

hidroksiapatit, metal nanopartiküller, karbon nanotüp ve grafen gibi karbon temelli maddeler olabilir. Karbon nanotüpler (CNT) yapıları ve dikkat çekici özellikleri nedeniyle biyopolimer matriksler için takviye maddeleri ideal kabul edilmiştir. Ancak son yıllarda CNT'lerin sentezi sırasında oluşan yabancı maddelerden kaynaklanan toksikliği, hidrofobik özelliği nedeniyle parçacıklarının biyolojik ortamda zayıf dispersiyonu ve topaklaşması biyomalzeme olarak kullanımını kısıtlamaktadır. Son zamanlarda grafen nanolevhalarının biyopolimer kompozit materyallerinin hazırlanmasında daha iyi bir dolgu maddesi olduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda grafen iyi bir biyouyumluluğa sahiptir [43]. Son zamanlarda kitosan ile grafen çeşitli çalışmalarda kullanılmaktadır. Örneğin glukoza duyarlılık için biyonanokompozit film matriksi olarak, kreatin katkılı grafen oksit ile toksik olmayan ve biyolojik uyumlu biyokompozitler sayılabilir [42]. Bunlara ek olarak, grafen ve kitosan (kimyasal veya kovalent olmayan) arasındaki gerçek bir bağ etkileşimide görülmüştür. Bu çalışmalar suda çözünebilir kitosana indirgenmiş grafen oksit katkılı kullanımını; manyetik kitosana grafen oksit katkılı kullanımını; farklı yöntemlerde kovalent fonksiyonlandırılmış grafen oksidin ile kitosan kullanımını; nanokompozit üretmek için grafen oksit ile kitosana güçlendirme çalışmalarını da içerir. Bu çalışmalarda kitosanın doğal özellikleri ile grafen nano yapılarının dikkat çekici özelliklerini birleştirilmiştir [43]. Kitosan kompozitleri; immobilizasyon ve enzimatik uygulamalar, elektrokimyasal sensörler, biyosensörler, adsorpsiyon çalışmaları, polimerler, kapsülleme ve kaplama gibi pek çok kullanım alanına sahiptir.

Kitosan çapraz bağlama ajanları glutaraldehit, 1,1,3,3-tetrametoksipropan, oksitlenmiş β -siklodekstrin (β -siklodekstrin polialdehit), etilenglikoldiglisidileter, epiklorohidrin, gliserolpoliglisidileter veya hekzametilendiizosiyanat gibi ajanları (bi-fonksiyonel reaktifler) ile reaksiyon verebilir. Glutaraldehit ile kitosanın heterojen çapraz bağlanması sonucu özellikle amin gruplarının sayısında düşüş olur, bunun sonucunda adsorpsiyon kapasitesinde, özellikle şelatlaşma mekanizması vasıtası ile adsorplanan metal iyonlarının olması da bir düşüşe neden olur ancak kitosanın çözünmesini engeller. Diğer taraftan asetik asit çözeltisinde kitosanın homojen çapraz bağlanması gerçekleştirilmiş, ürün çöktürülmüş ve sonra çapraz bağın absorpsiyon kapasitesini artırdığı görülmüştür. Reaksiyon imin fonksiyonlarını oluşturmak için kitosanın amin grubu ile çapraz bağlama ajanı olan glutaraldehitin aldehiti arasında oluşan Schiff baz reaksiyonu sonucu glutaraldehit ile çapraz bağlanma meydana gelir [44] (Şekil 1.14).

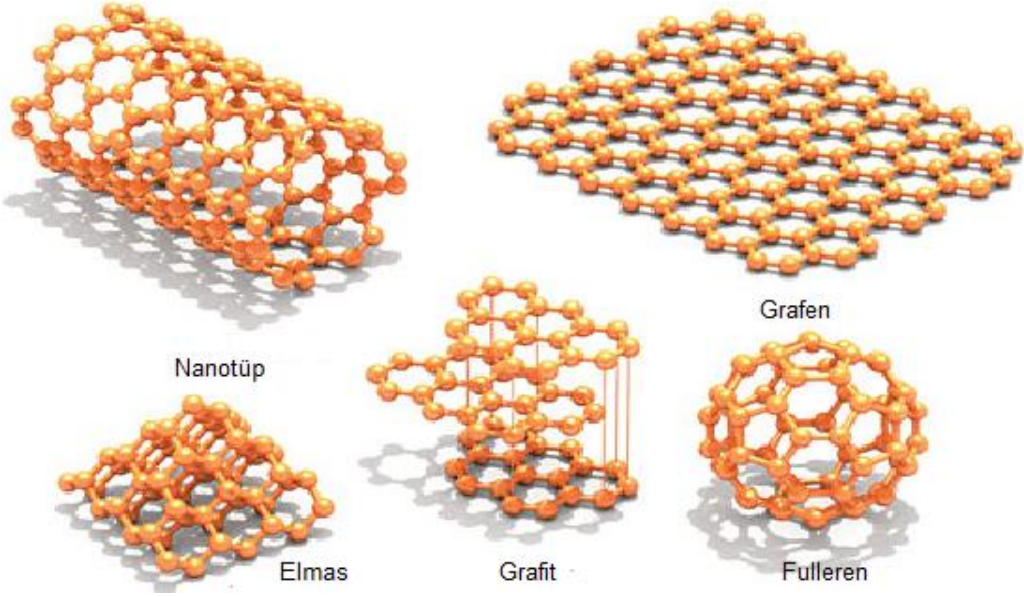


Şekil 1.14. Glutaraldehit ile çapraz bağlı kitosanın reaksiyon mekanizması [44]

Kitosan biyopolimerinin farklı çapraz bağlayıcı maddelerle ya da fiziksel modifikasyonlar ile oluşturulan kitosan bazlı adsorbentler jeller, membranlar, nanolifler, boncuklar, mikropartiküller, nanopartiküller tiplerine kadar farklı formlarda kullanım açısından çok yönlü malzemelerdir [17,29]. Kitin-kitosan tozları ve tabakaları ticari ürün olarak Sigma-Aldrich ve Kitosan jel tanecikleri (Chitopearl) Fuji Spinning Co. Ltd. (Tokyo, Japonya), firmalarından elde edilebilirler. Farklı formlardaki kitin ve kitosanlar laboratuvar ortamında üretilmektedir [4,23].

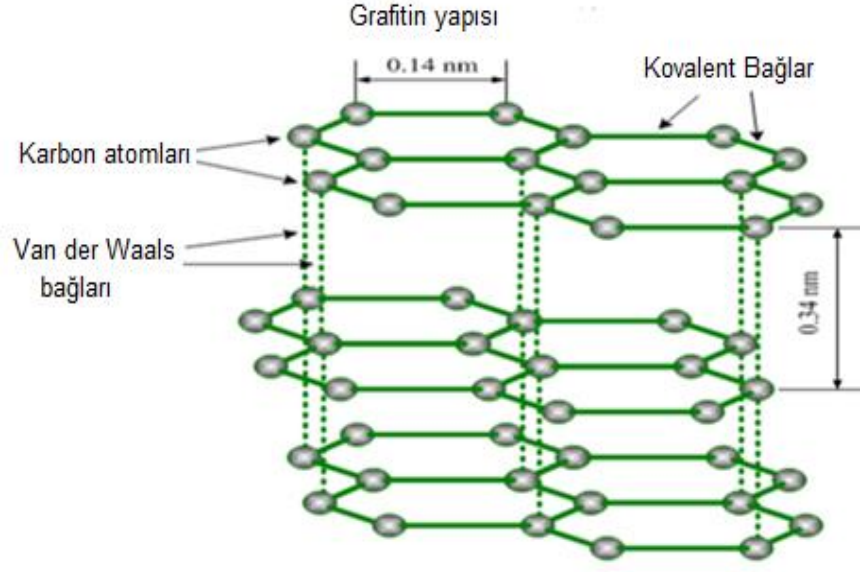
1.5. Grafen

Karbon tabanlı maddeler, gruplar ya da moleküller birçok açıdan diğer maddelerden farklıdırlar. Bu fark karbon atomunun elektron dağılım şemasında değişik konfigürasyonların kullanılmasının mümkün olmasından ya da diğer bir deyişle atomik orbitallerinin farklı melezleşmesinden kaynaklanır [46]. Elektronik konfigürasyonuna (sp , sp^2 veya sp^3) bağlı olarak, amorf karbon, iki boyutlu grafit veya üç boyutlu elmas gibi çeşitli allotropik formlar sergiler [45].



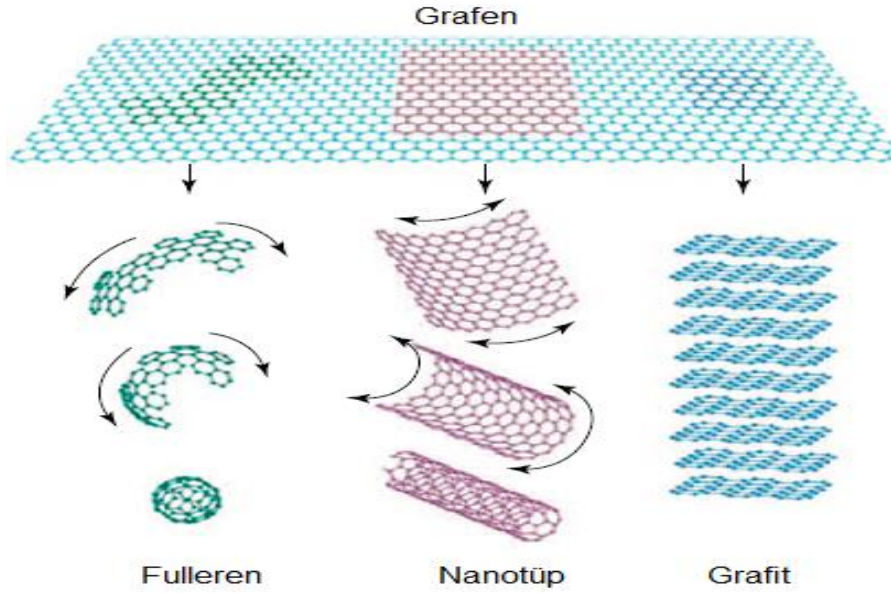
Şekil 1.15. Karbonun allotropları: Nanotüp (1 boyutlu, sp^2), Elmas (3 boyutlu, sp^3), Grafit (2 boyutlu, sp^2), Grafen (2 boyutlu, sp^2), Fulleren (0 boyutlu) [47]

Şekil 1.15’de karbon atomunun en önemli allotropları görünmektedir. Bu allotropların her birinin detaylı bir şekilde incelenmesinin sonucunda hepsinin benzen halkalı aynı motif yapıya sahip olduğu anlaşılmıştır. Linus Pauling 1950’lerde bu allotropların yapısını ilk keşfeden bilim adamıdır. Karbon atomları 2s ve 2p orbitallerinin birleşimi ile 120 derece açılı sp^2 melezleşmesi yaparken boşta kalan pz orbitalleri ise grafenin elektronik özelliklerini belirleyerek ona sıra dışı özellikler kazandırır. Saydam olan bu grafen tabakasının özelliği elektriği ve ısıyı çok hızlı bir şekilde iletmesidir. Grafenin yapısı çelikten 6 kat hafif olup, yoğunluğu ise 6 kat daha düşüktür. Buna karşılık çelikten 6 kat daha sert ama 13 kat daha fazla esneme yeteneğine sahiptir. Grafenin verilen bir doğrultuda silindirik bir şekilde kıvrılmasıyla ve iki uçtaki karbon atomlarının birbirleri ile bağ yapmasıyla elde edilen bir diğer karbon allotropu yapılar karbon nanotüplerdir. Karbon nanotüpler bir boyutlu yapılardır. Grafit ise grafen tabakalarının üst üste gelerek aralarında zayıf van der Waals etkileşimi ile bağlanması sonucu elde edilen üç boyutlu allotropudur. Bu etkileşim oldukça zayıftır. Kurşun kalemi kâğıda sürtünce bu zayıf bağlar kırılır ve kâğıda yayılan grafen ve grafit tabakalar yazı izlerini oluşturur.



Şekil 1.16. Grafitin yapısı [48]

Şekil 1.16'da da görüldüğü üzere grafit çok tabakalı bir yapıya sahiptir. Her bir tabakada karbon atomları 0.142 nm (1.42 Angstrom) aralıklarla birbirine altıgen örgü yapısıyla bağlı olup tabakalar arası uzaklığı ise 0.34 nm'dir. Normal şartlarda karbon atomunun en kararlı olduğu durum grafit durumudur [46].



Şekil 1.17. Grafitik formların esas yapısı olan grafen [49,50]

Tüm grafitik formların esas yapısı olan grafen, son 4 ila 5 yıl içerisinde en heyecan verici araştırma konularından birisi haline gelmiştir. Bu iki boyutlu materyal, 6 üyeli halkayı oluşturan karbon atomlarının tabakalarını kapsayan yeni bir nanokarbon oluşturur [46,49,51]. Grafitin temel yapısı olan grafen, düz bir petek yapısında düzenlenmiş sp^2 karbon atomlarından oluşan bir atomik kalınlıkta tabakadır (Şekil 1.17). Grafen çok yüksek mekanik dayanıklılığa, yüzey alanına, termal ve elektriksel iletkenliğe sahiptir. Bununla birlikte, grafen hidrofobiktir ve sonuç olarak sadece uygun yüzey aktif madde ilavesi ile polar çözücüler içinde kararlı dispersiyonlar elde edilebilir [52]. Grafen üretimi; mekaniksel eksfoliyasyon, sıvı faz eksfoliyasyonu, termal eksfoliyasyon, elektrolitik eksfoliyasyon, kimyasal buhar biriktirme, epiksiyel büyüme ve kimyasal oksidasyonu gibi çeşitli teknolojik yöntemlerle gerçekleştirilmektedir [41]. Bu teknolojiler arasında, kimyasal oksidasyon basitliği, ekonomik açıdan kolaylığı ve ölçeklenebilirliği nedeniyle en popüler sentez yöntemidir. Grafitin kimyasal oksidasyonu sülfürik asit, nitrik asit ve fosforik asit gibi konsantre asitler ile potasyum permanganat ve potasyum perklorat gibi son derece okside edici maddeler kullanılarak oluşturulmuş bir yöntemdir. Bununla birlikte oksidasyon basamağı grafen oksitin hazırlanması için genellikle çok meşakkatli basamaktır ve kontrol gerektirir. Bu nedenle grafen oksitin verimli bir sentezi için, grafitin eksfoliyasyonu basit bir metot gerektirir [41].

Günümüzde grafen oksit (GO) Brodie, Staudenmaier ya da Hummer yöntemleri ile bu yöntemlerden bazı varyasyonları kullanılarak grafit oksitin elde edilişi üzerinden sentezlenmektedir [53] (Tablo 4).

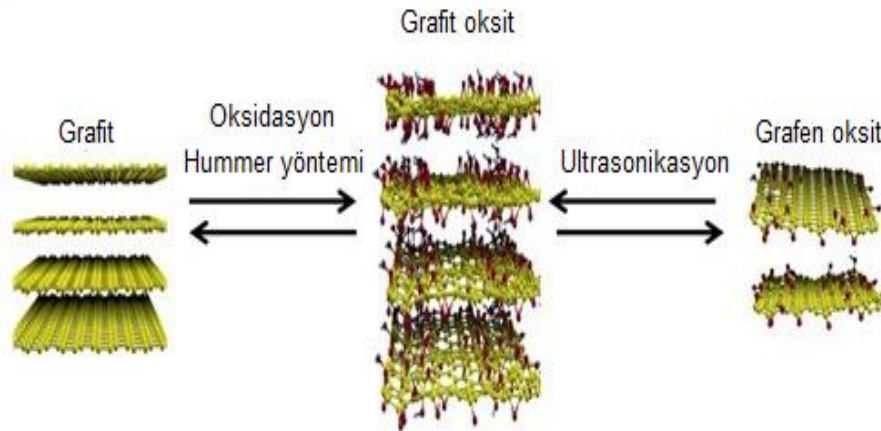
Tablo 4. Grafit oksit sentezleme yöntemleri [53]

Grafit Oksit Sentez Yöntemleri	Brodie Yöntemi	Grafit + $KClO_4$ $\xrightarrow[60\text{ }^\circ\text{C}]{+HNO_3}$ $\xrightarrow{H_2O}$ Dağılma $\rightarrow$ GO
	Staudenmaier Yöntemi	Grafit $\xrightarrow[5\text{ }^\circ\text{C}]{+H_2SO_4/HNO_3}$ $\xrightarrow{KClO_4}$ $\xrightarrow{H_2O}$ Dağılma $\rightarrow$ GO
	Hummer-Offeman Yöntemi	Grafit $\xrightarrow[0\text{ }^\circ\text{C}]{+H_2SO_4}$ $\xrightarrow[<20\text{ }^\circ\text{C}]{KMnO_4}$ $\xrightarrow[90\text{ }^\circ\text{C}]{H_2O}$ $\xrightarrow{H_2O_2}$ Dağılma $\rightarrow$ GO

Brodie, grafitin oksidasyonu için nitrik asit içerisinde potasyum kloratı kullanmış ve tekrarlanan muamelelerden sonra, grafit oksit olarak adlandırılan şeffaf parçacıklı sarı dispersiyonu elde etmiştir. 19. yy'ın sonlarında, Staundenmaier tarafından iki aşamalı bir prosedürle grafit oksiti üretme yöntemi geliştirilmiştir [54]. Staundenmaier yöntemi 60 °C civarındaki sıcaklıklarda ayrışan klorindioksit (ClO_2)'in artan konsantrasyonlarında oluşan tahmin edilemeyen patlamaların neden olduğu tehlike minimize ederek büyük ölçülerde grafit oksidin hazırlanmasını mümkün kılmaktadır [54]. Bu yöntemin avantajı sadece hızlı olması değil aynı zamanda daha koruyucu olmasıdır. Yöntemin birinci basamağında grafit, sülfürik asit ve nitrik asit ve potasyum kloratın karışımı ile muamele edilmektedir. İkinci basamağında ise potasyum permanganat ile oksidasyonu sonucu grafit oksit elde edilmektedir [54]. Dolayısıyla Staudenmaier yöntemi patlamaların tehlikelerini minimize ederek büyük ölçülerde grafit oksidin hazırlanmasını mümkün kılmaktadır [54]. Hummer'in yöntemi ise daha yüksek verimli, daha az tehlikeli ve daha az zaman tükettiği için daha yaygındır. Bu yöntem grafen tabakaları arasındaki oksijen moleküllerinin büyük miktarlarda etkileşimine yol açan sülfürik asit ve potasyum permanganat ile grafitin muamelesini içermektedir [55]. Hummer ve Offeman tarafından 1958 yılında geliştirilen bu yöntem en önemli ve yaygın kullanılan grafit oksit sentez yöntemidir (Hummer yöntemi). Bu yöntemde grafitin oksidasyonu, grafit tozunun bir kat ağırlığına muadili olarak üç katına denk KMnO_4 ve 0.5 katına denk NaNO_3 'ı içeren konsantre H_2SO_4 içerisinde muamele edilerek gerçekleştirilmiştir.

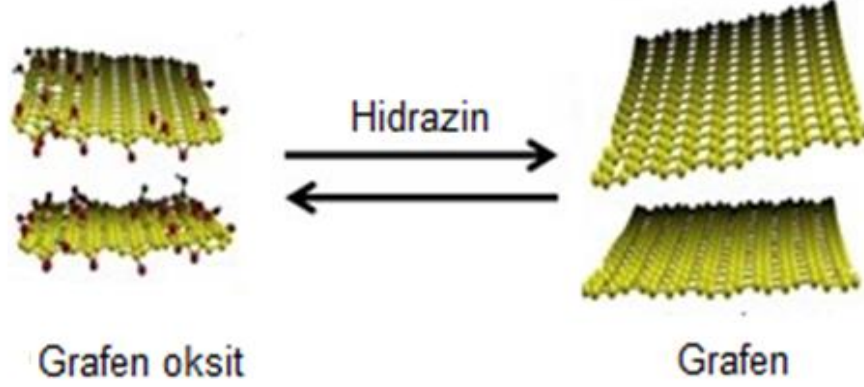
Hummer'in yöntemi daha önceki tekniklere göre en az üç önemli avantaja sahiptir [56]:

- ⌘ Birincisi, birkaç saat içerisinde reaksiyon tamamen tamamlanabilmektedir.
- ⌘ İkinci olarak, patlayıcı ClO_2 'nin oluşumdan dolayı reaksiyon güvenliği artırmak için KClO_3 'ün kullanımı yerine KMnO_4 kullanılmaktadır.
- ⌘ Üçüncüsü, dumanlı HNO_3 'ün yerine NaNO_3 'ın kullanımı ile asit dumanının oluşumu elimine edilmektedir [56].



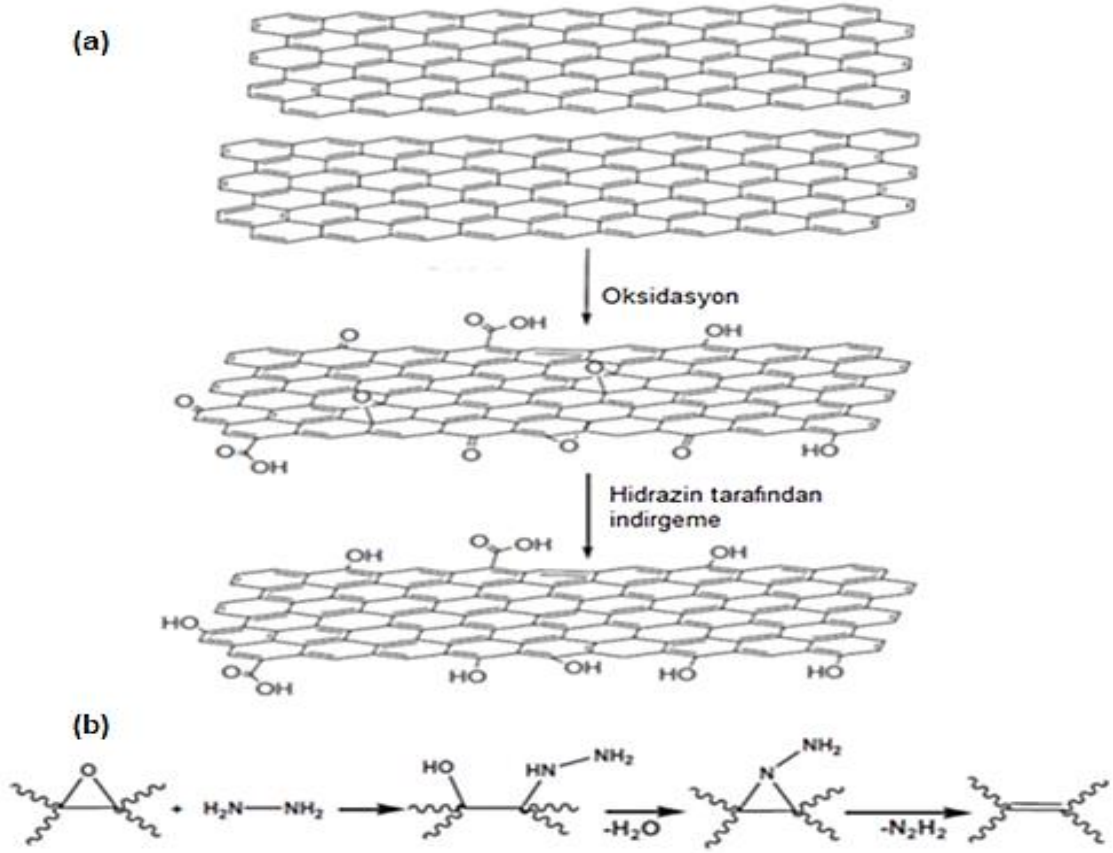
Şekil 1.18. Grafiten, grafit oksit ve grafen oksit yapılarına geçişin temsili gösterimi [57]

Dağılmış (eksfolie edilmiş) grafit oksitin veya grafen oksitin katmanlarının oluşturulması için grafit oksitte ultrasonik dalgalar yardımıyla görünür partikülü kalmayana kadar muamele edilir [45,51] (Şekil 1.18).



Şekil 1.19. Grafen oksitten, indirgenmiş grafen oksit yapısına geçişin temsili gösterimi [57,58]

Eremia ve arkadaşları (2013) çalışmalarında, indirgenmiş grafen oksitin yüzeyinde enzim ile agresif etkileşimlere meyilli grupların daha az olması ve yapısında (grafen ile grafen okside göre) daha fazla bulunan yapısal boşlukları ile elektron aktarım hızının ve enzim yüklemesinin daha iyi olması sebebiyle enzim immobilizasyonunda indirgenmiş grafen oksitin daha iyi bir aday olduğunu vurgulamıştır [59]. Grafen oksit yapısından grafene geçiş için çeşitli indirgeme yöntemleri kullanılmaktadır. İndirgeme yöntemleri arasında: termal indirgeme, kimyasal indirgeme, çok basamaklı indirgeme sayılabilir. Kimyasal indirgeme de, termal indirgemedede olduğu gibi grafen oksitteki tüm fonksiyonel grupların uzaklaştırılabilmesi mümkün değildir. Grafen oksidin kimyasal indirgenmesinin en önemli avantajı düşük veya orta derece sıcaklıklarda indirgeme ajanlarının yardımı ile deoksijenizasyonun olabilmesidir. Kimyasal indirgeme prosesleri kimyasal reaksiyonlara dayandıklarından, kimyasal deoksijenizasyon indirgeyici ajanlara bağlı olarak belli gruplara karşı seçimli olabilir [60]. Genel olarak, grafen oksit levhalarının indirgenmesi güçlü indirgeyiciler kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Tipik indirgeyici ajanlar hidrazin, 1,1-dimetil hidrazin, hidrokinon, askorbik asit, sodyum borhidrür (NaBH_4)'dür [51,55,60-63]. Hidrazin hidrat diğer güçlü indirgeyicilerden farklı olarak su ile reaksiyon vermez ve çok ince ve kaliteli grafit benzeri levhalar üretiminde en iyisi olduğu bulunmuştur [64,65] (Şekil 1.20). İndirgenme işlemleri sırasında, grafen oksitin sudaki kahverengi renkli dispersiyonu siyaha döner ve indirgenmiş levhalar kümelenmiştir ve çökmüştür. İndirgenmiş grafen oksit oksijen atomlarını uzaklaştırılmış olması nedeniyle daha az hidrofilik olmuştur ve böylece çökelmiştir. Hidrazin epoksitlerle birlikte halka açılması olayında yer alır ve hidrazino alkoller oluştururlar [60,64-66].



Şekil 1.20. Grafitin oksidasyon ve redüksiyonu (a); Hidrazin tarafından epoksit indirgenmesine ilişkin önerilen reaksiyon mekanizması (b) [60,64-66]

1.6. Lakkaz Enzimi

Lignin, bitki hücre duvarının yapısal oluşumunu sağlayan, selüloz ve hemiselülozu mikrobiyal ataklara karşı koruyan ve çeşitli hidroliz edilmeyen -C-C- ve -C-O- bağları tarafından birbirine bağlanan fenil propanoid birimleri içeren kompleks bir biyopolimerdir [67,68]. Lignin molekülleri hücre içine taşınabilmesi için oldukça büyüktür. Heterojen yapısından dolayı ligninin biyolojik olarak parçalanması için ekstraselüler enzimler olması gereklidir. Ligninin degradasyonundan sorumlu iki tip ekstraselüler enzim vardır. Bunlar fenoloksidazlar ve peroksidazlardır. Polifenoloksidazlar (PFO enzimleri), oksidoredüktaz grubuna giren enzimlerdir ve bakır içerirler. Substratları fenolik bileşiklerdir. Özellikle bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan PFO'lar, hayvansal dokular ve küf mantarlarında da bulunmaktadır. Substratlarını oksijen eşliğinde esmer renkli bileşiklere oksitlemektedirler. Bu olay gıda teknolojisinde enzimatik esmerleşme olarak da bilinmektedir [69].

Lakkazlar (EC 1.10.3.2, p-difenol: benzendiol: dioksijen oksidoredüktaz), mavi bakır proteinleridir fakat çoğunlukla polifenol oksidazlar olarak tanımlanırlar [70]. Lakkaz, substratın oksidasyonu katalizlerken oksijenin suya indirgenmesini sağlar. Bu reaksiyonu aşağıdaki eşitliğe göre katalizlenir [17,71-73]:



Bitkiler, mantarlar, bakteriler ve böcekler tarafından üretilen lakkazlar, lignin ve bazı inorganik iyonların moleküler formları, metoksifenoller, fenoller, o- ve p- difenoller, aminofenoller, polifenoller, poliaminler gibi pek çok organik bileşiğin oksidasyonunu katalizler [17,72-77].

Lakkaz 19. yüzyıldan bu yana çalışan birkaç enzim arasındadır. Lakkaz ilk olarak Japon vernik ağacı *Rhus vernicifera* ağacının salgıladığı bulunmuştur [68,78-80]. İzolasyonu ve pürifikasyonundan yaklaşık 10 yıl sonra 'lakkaz' olarak adlandırılmıştır [67]. Sonrasında 1896 yılında Bertrand ve Labord, lakkazın funguslar tarafından da salgılanan bir enzim olduğunu bulmuştur. Literatürde anlatılan lakkazların büyük bir çoğunluğu yüksek organizasyonlu mantarlardan izole edilmiştir [68]. Ancak en yaygın lakkaz üreticileri *Trametes versicolor* (Şekil 1.21), *Trametes hirsuta*, *Trametes ochracea*, *Trametes villosa*, *Trametes gallica*, *Cerrena maxima*, *Coriolopsis polyzona*, *Lentinus tigrinus* ve *Pleurotus eryngii* gibi ağaç çürükçül mantarlarıdır [68,81].



Şekil 1.21. *Trametes versicolor* funguslarının fotoğrafı [84]

Lakkaz enzimi elde edilen bakteri *Azospirillum lipoferum* [67,82] ve *Alteromonas sp.* [83]'dur. Bakteriyel lakkazların bakır emilini maksimize ederek gerçekleştirmesinde (bakır homeostazisi), hidrojen peroksit ve UV ışıklarına spor koruması yoluyla sağlanan korumada ve kahverengi spor pigmentlerinin biyosentezinde rol oynadığını görülür [79].

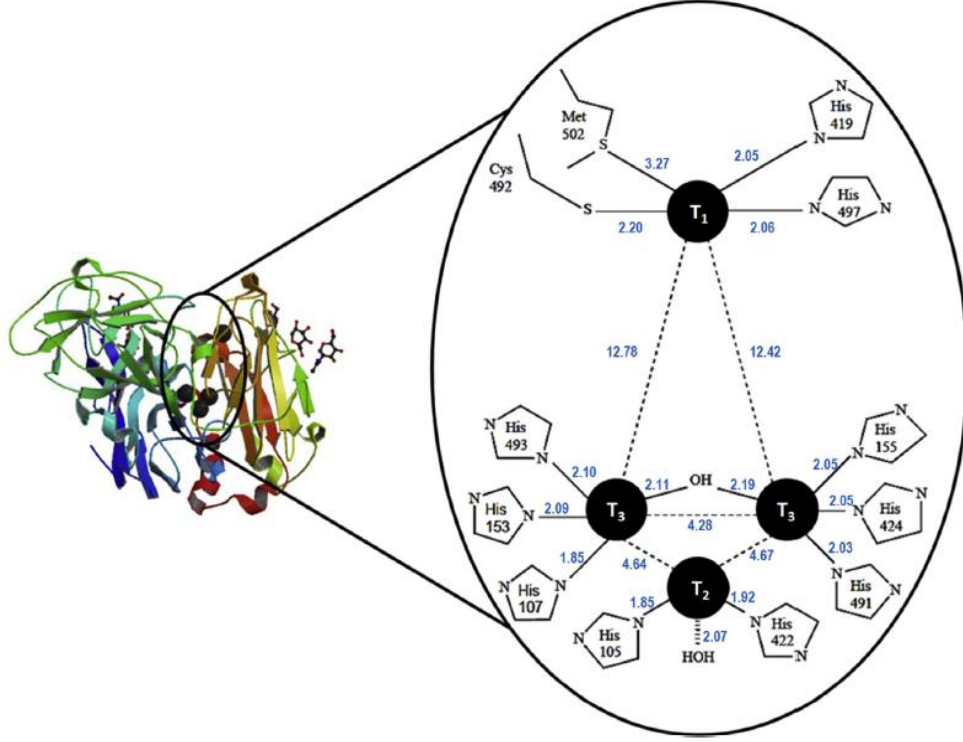
Ağaçlar, şalgam, pancar, elma, kuşkonmaz, patates, armut ve diğer çeşitli sebzelerde de lakkaz tespit edilmiştir [81]. Tüm bitki lakkazları moleküler ağırlığı 90-130 kDa arasında ve (% 22-45) yüksek karbonhidratlı monomerik proteinlerdir [68]. Aynı zamanda lakkazın Bombyx (ipek böceği), Calliphora (gök sinekler), Drosophila (meyve sineği), Lucilia (yeşil sinek), Manduca (domates kudu), Musca (karasinek), Oryctes (gergedan böceği), Papilio (narenciye kırlangıç türü), Sarcophaga (yumurtalarını ete bırakan karasinek), Schistocerca (çekirge) ve Tenebrio (un kurdu)'yu içeren çok sayıda böcek cinsinde mevcut olduğu bulunmuştur [81]. Böceklerde lakkaz tipi proteinlerin asıl fonksiyonlarının epidermisteki kütikulanın sertleştirilmesi sağlamak olduğuna düşünülmektedir [79].

Lakkazlar izoenzimler halinde bulunur ve oligomerlerden multimerik kompleksler oluşturur. Çoğunlukla monomer başına üç redoks bölgesine bağlı dört bakır atomu içerir. Monomer sınıflarının molekül ağırlığı 50-100 kDa arasındadır. Yapısında bulunan % 10-45 oranındaki kovalent bağlı karbonhidrat kısmı enzime yüksek stabilite sağladığı bir glikoproteindir [85]. Enzimin içerdiği karbonhidratlar: heksozamin, glikoz, mannoz, galaktoz, fruktoz ve arabinozdur [86].

1.6.1. Lakkaz Enziminin Bakır Merkezleri

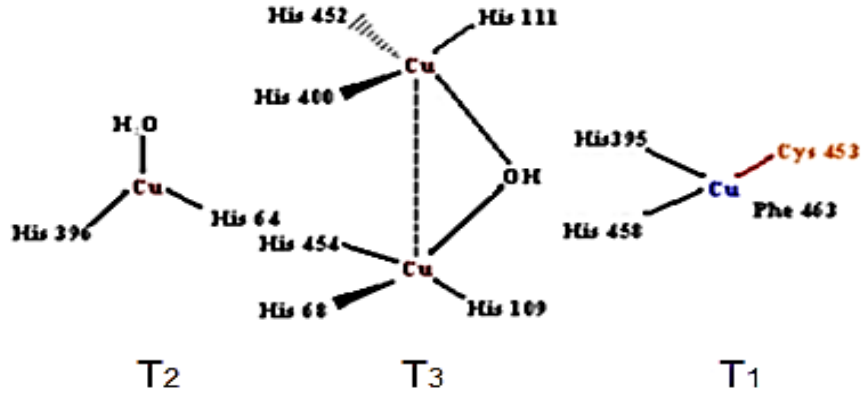
Lakkazlar monomerik veya multimerik bakır içeren enzimlerdir ve bu enzimlerde bakır atomu önemli bir prostetik gruptur [67]. Monomerik lakkaz moleküllerinin yapıları UV-Visible ile elektron paramanyetik rezonans (EPR) spektroskopisi teknikleri kullanılarak üç gruba ayrılmıştır [80, 87-89] (Şekil 1.22):

- ⌘ Tip1 (T1), EPR spektrumlarıyla saptanabilir, 605 nm dalga boyunda bir absorpsiyon bandı gösteren mavi bakır;
- ⌘ Tip2 (T2), EPR spektrumlarıyla saptanabilir, UV-Vis bölgede absorpsiyon bandı olmayan normal bakır; azid, florid ve siyanide karşı affinitesi vardır.
- ⌘ Tip3 (T3), EPR ile saptanamayan, 330 nm'de absorpsiyon bandı gösteren birleşmiş iki çekirdekli bakır merkezidir.



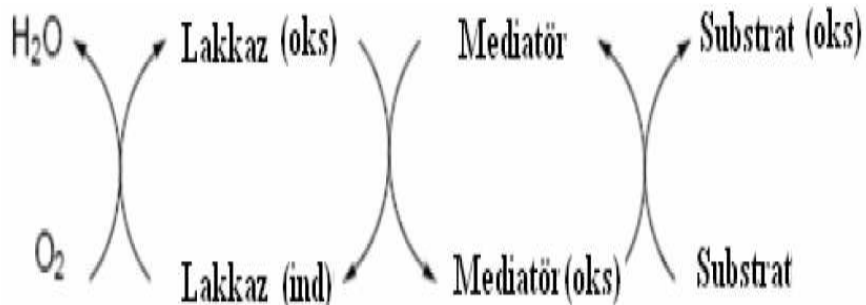
Şekil 1.22. Lakkaz aktif bölgesi: Bakır atomu ve ligand mesafesi ile ilgili olarak yönelmesini gösteren örneklendirme çizim (*B.subtilis* lakkazının (Cot A) bakır merkezleri) [67,90,91]

Bakır molekülleri genellikle histidin, lösin ve sistein kalıntıları ile koordine edilmiştir [89]. T1 bakırı çoğunlukla iki histidin amino asitinin iki azotu ve sistein amino asitinin de kükürt grubu ile bağ yapmış durumdadır (Şekil 1.22). Lakkaz enziminin karakteristik mavi renginden T1 bakırın, sistein (Cys) amino asitinin kükürt (S) grubu ile yaptığı bağ sorumludur [67]. Bu tip enzimde T1 bölgesinin fonksiyonu T2/T3 kümelenmiş bakıra elektron transferinin ardından, indirgen substrattan (elektron donörü) elektron alımını sağlamaktır [67]. T2 bakır merkezinde 2 histidin amino asiti ve T3 bakır merkezinde de 6 histidin aminoasiti bulunmaktadır [90,92]. T2 ve T3 bakır merkezleri ise bir bütün olarak değerlendirilebilir ve bu nedenle de genellikle 'üç çekirdekli bakır kümesi' olarak adlandırılırlar ve moleküler oksijenin suya indirgenmesi sırasında suyun serbest bırakıldığı yerdir [89,90,93]. İki T3 bakır atomu arasındaki kuvvetli antiferromanyetik bağlanma hidroksil köprüsü ile oluşur. Bu geometri bozulmuş trigonal bipiramidal kooordinasyon olarak tanımlanmaktadır (Şekil 1.23).



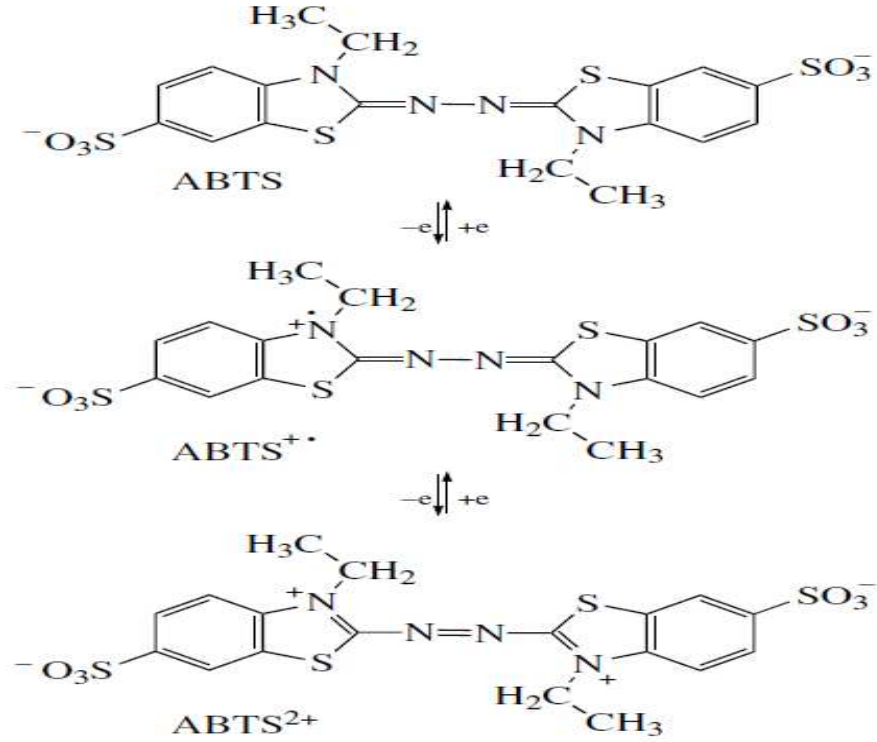
Şekil 1.23. Lakkazın aktif bölgesindeki bakır atomlarının düzenlenişi [67,68]

Lakkazın substrat aralığı kısmi olarak redoks potansiyeline (E_o) göre belirlenmiştir. Genelde fungus kaynaklı lakkaz ile ağaç kaynaklı lakkaz karşılaştırıldığında fungus kaynaklı olan yüksek redoks potansiyeline sahip olduğu görülmüştür. Fungus kaynaklı: 0.5-0.8 V, ağaç kaynaklı: 0.3-0.4 V değerindedir. Bu yüksek değer Tip 1 bakırının sahip olduğu üç ligandın (2 histidin(his) ve 1 sistein (cys)) trigonal piramidal geometrideki koordinasyonu sonucudur [67] (Şekil 1.23). Lakkazların rapor edilen redoks potansiyelleri fenolik olmayan bileşiklerin redoks potansiyellerinden daha düşüktür. Bu nedenle de lakkazlar normalde bu tip maddeleri oksitleyemezler. Buna rağmen, elektron transfer aracıları (redoks aracıları veya mediatör) olarak rol alan küçük moleküllerin varlığında ise lakkazların fenolik olmayan bileşikleri de oksitlediği bulunmuştur. Yüksek redoks potansiyeline sahip (>900 mV) küçük molekül ağırlıklı doğal bileşikler mediatör olarak adlandırılır [67]. Mediatörler substrat ile lakkaz arasında elektron taşıyıcı gibi davranan küçük moleküller olup, bu küçük moleküller kütleli bileşikler enzimatik oksidasyonla kararlı radikallere dönüştürülürler ve bu moleküller, bir çeşit elektron mekiği (redoks aracı) olarak davranırlar ve prensipte lakkaz enzimlerinin substratı olmayan diğer bileşikleri oksitlerler [67,93] (Şekil 1.24).



Şekil 1.24. Lakkaz mediatör oksidasyon sisteminin katalitik döngüsü [67,78]

Lakkaz enzimleri için ilk redoks aracı olarak ABTS'nin 2,2'-azino-bis-(3- etilbenzothiazoline-6-sülfonik asit) tanımlanmasından, son zamanlardaki -NOH- tipi sentetik redoks araçlarının (HBT: 1-hidroksibenzotriazole; VLA: violurik asit ve NHA: *N*-hidroksiasetanilide) ve fenol aromatik türevlerinin (ferrosiyanid) kullanılmasına kadar olan süreçte, lakkaz enzimleri ile fenolik olmayan bileşiklerin oksidasyon mekanizmaları hakkında çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu bulgular ise lakkaz enzimleri tarafından oksitlenen bileşiklerin çeşitliliğinin daha da genişlemesine yol açmıştır [93].

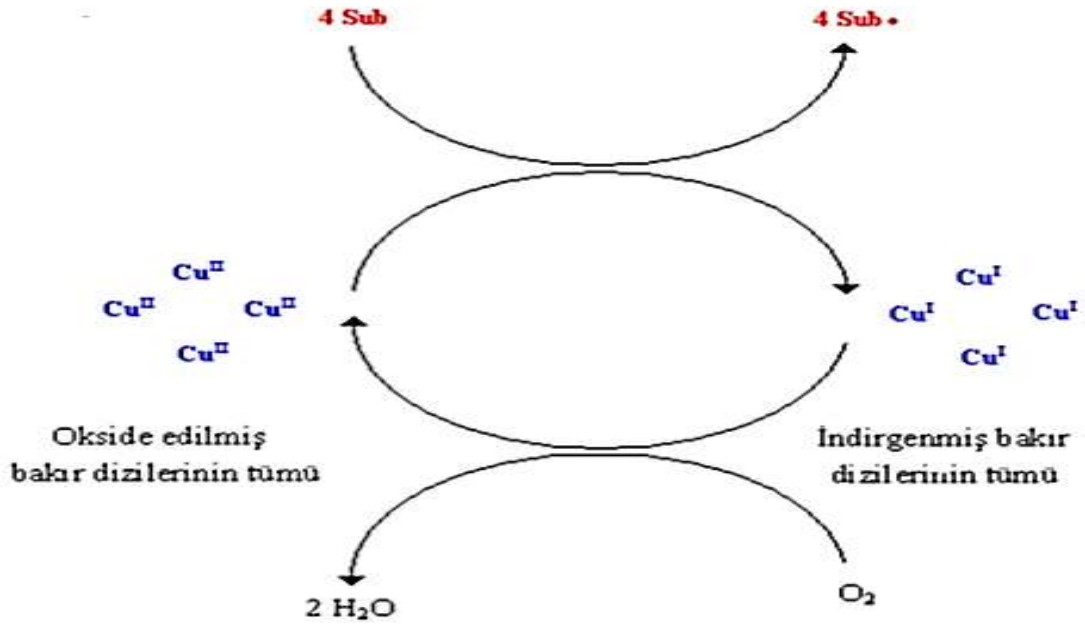


Şekil 1.25. Lakkaz ile ABTS'nin oksidasyonu [78]

Doğal olarak bulunan redoks araçlarının kullanılması ise hem çevresel hem de ekonomik açıdan avantajlar sunmaktadır. Lakkaz mediatör sistemler (LMS) (lakkaz aracılıklı sistemler) ise kağıt hamurunun delignifikasyonu ve beyazlatılması, organik kirleticilerin oksidasyonu, çaylardaki drogların (bir bitkinin tamamını veya yaprak, kök, meyve gibi kısımlarının kurutulması ile elde edilen ürün) ve fenollerin analizi gibi biyosensörlerin veya biyoyakıt hücrelerinin geliştirilmesi, tekstil boyalarının renk giderimi, biyoremediasyon, meyve sularının ve şarapların berraklaştırılması gibi çok sayıdaki sürece uygulanmıştır [93].

1.6.2. Lakkaz Enziminin Reaksiyon Mekanizması

Lakkaz enzimlerinde bulunan farklı bakır merkezleri, indirgenmiş bir substrattan aldıkları elektronları, toksik peroksit ara ürünlerinin oluşmasına yol açmadan, moleküler oksijene aktarırlar. Redoks prosesi bakır atomlarının oluşturduğu katalitik merkezinde gerçekleşir [93]. Moleküler oksijeni, dört elektron transfer ederek iki su molekülüne indirger [68]. Katalitik döngüde 1 oksijen molekülünün indirgenmesiyle, 2 H₂O molekülünün serbest kalması, 4 substrat molekülünün oksitlenmesi sonucu 4 radikalın oluşmasıyla gerçekleşir [68] (Şekil 1.26).



Şekil 1.26. Lakkazın katalitik döngüsü 1 oksijen molekülünün indirgenmesiyle 2 H₂O molekülünün serbest kalması [68]

ABTS gibi belirli substratlar potansiyel olarak iki elektronunu verebilmesine rağmen lakkazlar sadece 1e⁻ oksidasyonunu tamamlayabilmektedirler [67]. Substratların oksidasyonu reaktif radikallerin oluşmasına yol açmaktadır. Oluşan reaktif radikaller ise enzimatik olmayan reaksiyonlar ile aşağıdaki reaksiyonlara katılırlar [90]:

* Polimerlerin Parçalanması: Lakkaz, lignin veya humik asit gibi kompleks doğal polimerlerin parçalanmasında rol almaktadır. Üretilen reaktif radikaller, kovalent bağların kırılmasına ve monomerlerin serbest bırakılmasına yol açarlar. Sterik engelleme nedeniyle lakkaz, doğrudan doğruya polimer ile temas edemeyebilir. Bunun yerine, lakkaz tarafından okside ve aktive edilebilen küçük organik moleküller veya metaller (örneğin veratril alkol, 3-hidroksi-antranilik asit ve Mn²⁺) radikal katalizli polimerizasyonu sağlayabilirler [90,93].

* Aromatik Halkaların Kırılması: Çeşitli çalışmada, aromatik halkaların lakkaz aracılığı ile kırıldığı rapor edilmektedir. Bu reaksiyon ise nitroaromatikler ve sentetik boyalar gibi ksenobiyotik bileşiklerin parçalanması açısından biyoteknolojik olarak ilgi çekmektedir [90,93].

* Monomerlerin Çapraz Bağlanması: Fenolik bileşiklerin ve aromatik anilinlerin lakkaz ile enzimatik oksidasyonu, radikallerin oluşmasına yol açar. Oluşan radikaller ise birbiri ile tepkimeye girerek C-C, C-O ve C-N bağları aracılığı ile kovalent olarak bağlanarak dimerleri, oligomerleri veya polimerleri oluştururlar. Topraklardaki doğal veya ksenobiyotik fenoller veya aromatik aminler, böylece organik hümik matriksine bağlanabilirler. Sübstitüe bileşiklerin olması halinde ise reaksiyon kısmi demetilasyon ve dehalojenizasyon eşliğinde gerçekleşebilir. Lakkaz enzimlerinin sahip olduğu bu kapasite ise bu enzimlerin, kirlenmiş topraklar veya atıksuların detoksifikasyonunda kullanılma potansiyellerinin temelini oluşturur. Lakkaz aracılığıyla fenolik prekürsörlerin çapraz bağlanması yüksek organizasyonlu bitkiler için lignifikasyon sürecinin bir parçasıdır. Katekollerin proteinler ile lakkaz katalizli oksidatif kenetlenme reaksiyonları böcekler için kütikula sertleşmesi ile ilgili olabilir [90,93].

1.6.3. Lakkaz Enziminin Substratları ve İnhibitörleri

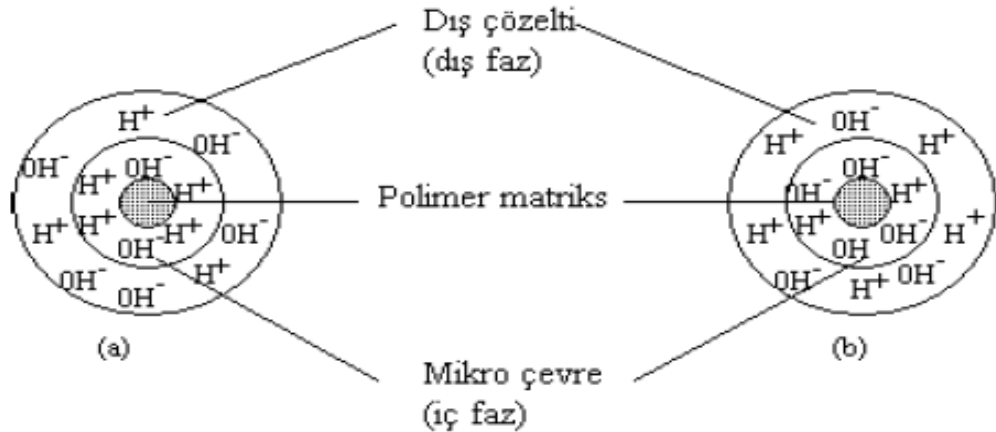
Lakkaz enziminin reaksiyon verdiği substratlar, geniş bir aralıkta değişmektedir. Bu substratlardan bazıları metoksifenoller, o- ve p-difenoller, aminofenoller, polifenoller, anilinler, benzen tiyoller ve fenotiyazinler 4-benzendiol, syringaldazine, naftol, askorbat, pirogallol, kresol, siringik asit vb. türevleridir [14,17,72,93,94]. Substrat aralığı N-hidroksibenzotriazol (HBT), 3-hidroksiantranilik asit, ve 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzothiazoline-6-sülfonik asit) (ABTS) gibi diğer fenolik olmayan bileşiklerin dahil edilmesiyle artırılabilir [71]. Substratların sayısı lakkazın mediatörlerle kombinasyonu kullanılarak daha da artırılmaktadır [95]. Farklı organizmalardan elde edilen lakkazların substrat özgüllükleri farklılıklar göstermekle birlikte, lakkaz aktivitesini belirlemek ve ölçmek için yaygın olarak kullanılan birkaç bileşik de bulunmaktadır. Bu bileşiklerden ikisini ise SGZ (syringaldazine; 4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzaldehid azin) ve ABTS oluşturmaktadır. Bu iki substratın her ikisi de lakkaz enzimleri için özgüldür. Fakat hidrojen peroksit varlığında peroksidaz enzimleri tarafından da oksitlenirler [73]. Bu iki bileşiğin her ikisi de zehirli olmadığı gibi, oksitlendiklerinde oluşturdukları yoğun renkleri nedeniyle özellikle lakkaz aktivitelerinin fotometrik olarak belirlendiği durumlarda kullanışlıdır. 2,6-Dimetoksifenol ise doğal olarak bulunan bir lakkaz substratı olmasına rağmen, zehirlidir ve zamanla oto-oksidasyona uğrama eğilimindedir [93]. Yaygın olarak ABTS kullanıldığında oksidasyonu ile aktivite ölçümü, diğer yöntemlerle (fenolik substratlarla) kinonlar açığa çıkarken ABTS oksidasyonu sonucunda tek bir adımda renkli ürün olan ABTS⁺ radikal katyonunun oluşması ile sonlanmasına dayandırılabilir. Lakkazlar kaynağından bağımsız olarak, birçok

anyon tarafından inhibe edilebilir. Florür, siyanür, tiyosiyanat ve azid benzeri anyonların bakır bölgeleri ile etkileşime girmesiyle kuvvetli şekilde inhibe olabilir.

1.6.4. Lakkaz Enziminin pH ve Sıcaklık Stabiliteleri

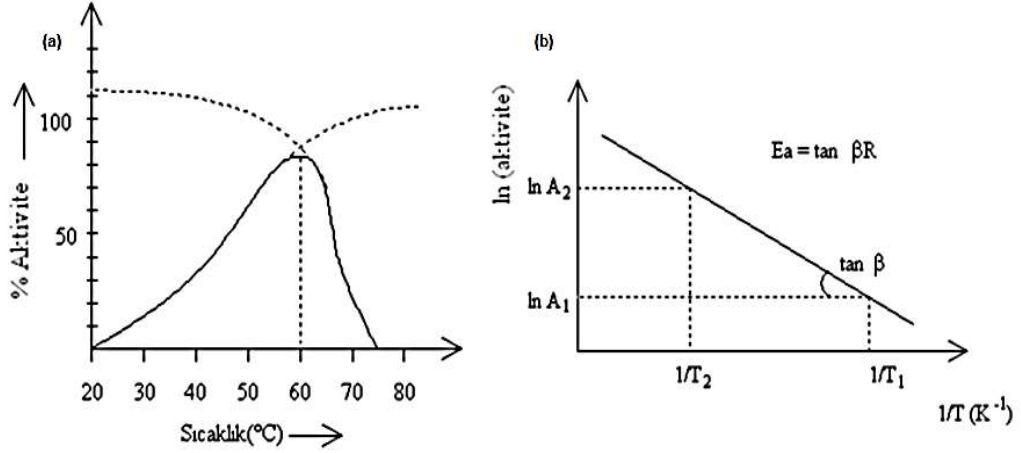
Aktiviteye pH'nın Etkisi: Lakkaz enzimleri için aktivitelerinin pH'a bağımlı olması bu parametreyi önemli kılar. Fenolik substratlar için lakkaz enzimlerinin pH bağımlılıkları çan eğrisi şeklindedir. Bunun nedeni ise pH'daki artışın, fenolik bileşiklerin pH'ya bağlı olarak fenol-fenolat dönüşümleri nedeniyle redüksiyon potansiyelindeki bir düşüşe bağlanırken, aktivitenin pH ile olan yarışmacı körelmesi ise üç çekirdekli kümedeki hidroksit inhibisyonuna bağlanmıştır [93]. Çan eğrisi şeklindeki eğrinin maksimum noktası ise genellikle asidik pH'larda meydana gelmektedir, fakat maksimum aktivitenin pH 9-10 gibi bazik bölgelerde meydana geldiği lakkaz enzimleri de bulunmaktadır [93]. Tipik fungal lakkaz enziminin optimum pH değeri asidik bölgededir.

İmmobilizasyonun sonrasında taşıyıcıya bağlı enzimlerin pH aktivite eğrilerindeki kaymanın nedeni kovalent bağlanma sırasında enzim molekülünün uğradığı kimyasal değişimdir. Çünkü enzim yüklü taşıyıcılarda immobilize edilirse enzimin mikro çevresi ile ölçüm yapılan, çözelti bölgesi arasında H^+ ve OH^- gruplarının dağılımı bakımından önemli farklılıklar oluşur [96] (Şekil 1.27). Bu etkiyi inceleyebilmek için taşıyıcının yüksüz olması gerekir. pH aktivite eğrisinin serbest enziminkine kıyasla asidik veya bazik bölgeye kaymasının nedenlerinden biri de, enzimatik reaksiyon sonucu immobilize enzim molekülünün mikroçevresinde H^+ veya OH^- iyonu birikmesidir. Dolayısıyla immobilizasyondan sonra enzimin optimum pH değerinden kayma gözlenir.



Şekil 1.27. Yüklü taşıyıcıların mikro çevresinde oluşan iyonik tabakanın şematik gösterimi. Polianyonik taşıyıcı (a); Polikasyonik taşıyıcı (b) [96]

Serbest ve immobilize enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi genellikle “optimum eğrileri” çizilerek belirlenir (Şekil 1.28). Bu grafik bağıl aktivitenin sıcaklık ile değişimini gösterir. Bağıl aktivite ise deney koşullarında elde edilen aktivitenin yine aynı koşullarda ulaşılan en yüksek aktiviteye oranıdır ki bu oran hiçbir zaman 1’den veya % 100’den büyük olamaz. Immobilizasyondan sonra enzimin optimum sıcaklığı genellikle değişir. Bu değişimi daha iyi yorumlayabilmek için (bağıl aktivitelerin) $1/T$ ’ye karşı grafiğe geçirilmesi (Arrhenius diyagramı) daha uygun olur [96] (Şekil 1.28).



Şekil 1.28. Enzim aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi (a) ve aktivasyon enerjisinin bulunması (b) [94]

Tipik fungal lakkaz enziminin aktivite gösterdiği sıcaklık 50-70 °C arasında değişir [97]. Bains ve ark., tarafından endüstriyel atıksu ile kirlenen topraklardan izole edilen proteobakteri üyesi alkali tolerant bir bakteri izolatının ürettiği lakkaz enziminin ise en az 24 saat süreyle pH 3-10.6 arasında kararlı olduğu, optimal aktivitesini ise 55 °C’de ve pH 6.5’de gösterdiği rapor edilmiştir. *B. subtilis* endospor kılıf proteini olan *CotA* ise substrat olarak ABTS’ye karşı en yüksek lakkaz aktivitesini 75 °C’de göstermiştir. *S. Cyaneus* tarafından üretilen lakkaz enzimin optimal sıcaklığının ise 70 °C olduğu belirlenmiştir. Bu enzim, ortam pH’sının 5.0-8.0 olduğu koşullarda ve 40 °C’de, 120 dk. inkübe edildiğinde aktivitesinin % 100’ünü korurken; aynı sıcaklıkta fakat ortam pH’sının 3.0-4.0 olduğu koşullarda ise aktivitesinin % 50’sini koruduğu belirlenmiştir [93]. Gedikli ve arkadaşlarının ticari olarak piyasada satılan bir kot boyasının *Trametes versicolor* ATCC 200801’in buğday kepeği içeren potato dekstroz broth besiyerinde geliştirilmesi ile elde edilen lakkaz aktivitesi yüksek kültür sıvısı ile renk giderimi çalışılmasında, enzimatik renk gideriminde optimum değerini pH 4.0 olarak bulunmuştur. Çalışmada inkübasyon sıcaklığının enzimatik renk giderimine etkisini belirlemek amacıyla 20-90 °C arası

sıcaklık değerleri çalışılmış ve 55 °C'ye kadar sıcaklık arttıkça yüzde boya gideriminin arttığı ancak daha sonra belirgin bir biçimde azaldığı rapor edilmiştir [98].

1.6.5. Lakkaz Enziminin Potansiyel Uygulamaları

Çevre Kirliliklerinin Kontrolünde: Bazen kısmi demetilasyon ve dehalojenilasyon eşliğinde çok sayıda farklı kovalent bağlarla (C–C, C–O, C–N) moleküllerin bağlanmasını katalizleyen lakkaz, çevre kirliliğinin kontrolü için kullanılabilir. Mantar lakkazlarının klorofenol, klorlu hidroksil bifenil, bisfenol A (BPA) ve nonil fenoller gibi çevresel kirleticileri degrede veya polimerize edebildiği pek çok raporda bildirilmiştir. Çevre kirliliği kontrollü için, bağlama reaksiyonları uygulamaları, immobilizasyonu yoluyla toksik ve dirençli ksenobiyotiklerinin sızmasını önlemenin yanı sıra detoksifiye etmek için polimerizasyon reaksiyonlarına da dayanmaktadır. Topraklarda ise enzimatik bağlama organik hümik materyal üzerine doğal veya ksenobiyotik fenollerin bağlanması için yeni bir yol açmıştır. Hümik maddelerin 2,4,6-trinitrotoluen (TNT)'in bağlanması, amidodinitrotoluen, diamino nitrotoluenler, dinitrotoluen gibi, esas bileşene göre daha az toksik fakat hala zehirli, ürünlere TNT'nin basit alternatif biyolojik transformasyonunu sağlamıştır. Dawel ve arkadaşları 2,4-diamino-6-nitrotoluen (2,4-DANT)'nın izole edilen bağlama ürününün yapısını belirlemek amacıyla, hümik bir bileşeni olarak guaiakolüne (metil katekole), organik toprak matriksi üzerinde indirgenmiş 2,4,6-trinitrotoluen metabolitlerinin tersinmez olarak lakkaz aracılı bağlanması için bir model önermişlerdir. Bu enzimatik bağlama yoluyla TNT'nin detoksifikasyonu üzerine benzer çalışmalara başlanmıştır. TNT anaerobik/aerobik inkübasyon boyunca katekol veya toprak hümik asidine bağlanarak detoksifiye edilmiştir [99]. İnek gübresinden gelen anaerobik mikroorganizmalar, anaerobik aşaması süresince TNT'nin indirgenmesi için kullanılmıştır. Daha sonra, *Trametes villosa*dan elde edilen bir lakkazın, hümik asit ile % 25 ve katekol ile % 74 verimle bağlanmasıyla sonuçlanan hümik maddelere metabolitlerin oksidatif olarak bağlanması için aerobik fazda kullanılmıştır. Benzer şekilde, Wang ve arkadaşları TNT metaboliti 4-amino-2,6-dinitrotoluen (4-ADNT)'nin fenolik hümik monomerler üzerine başarılı bağlanmasını rapor etmişlerdir. Son zamanlarda, Nyanhongo ve arkadaşları da hümik monomerler ferulik asit ve guaiakolin (metil katekolün) TNT metabolitlerini immobilize etmede çok etkili olduğunu ve bütün stabil TNT metabolitlerin birikimini önlediğini rapor etmişlerdir. Bu çalışmaların özellikle hümik maddelerin mevcut olduğu veya kolaylıkla eklenebildiği atıksular ve aşırı derecede kirlenmiş topraklarda pratik bir geçerliliği vardır. TNT'yi hızlıca kültür içinde dönüştüren bir lakkaz geni *Trametes versicolor* suşundan başarılı bir şekilde klonlanmıştır. TNT ve onun katabolik ara maddeleri mantar kültürüne eklendiğinde ilk birkaç saat içerisinde onların dönüştürüldüğünü rapor etmişlerdir [99].

Lakkazların aynı zamanda pentaklorofenoller ile kirlenmiş toprakların iyileştirilmesi için potansiyel bir reaksiyon olan pentaklorofenol, hümik asit ve ferulik asitlerin kovalent bağlanmalarına aracılık ettiğini görülmüştür. Bu durum polimerizasyon ve azaltılmış toksisite ile sonuçlanan bir mediatör (ABTS) yoluyla kolaylaştırılmış antrasen ve benzo (α) pirenin lakkaz oksidasyonu içinde kanıttır. Metilfenoller ve klorofenoller, onların hümik asitlerin üzerine bağlanması yoluyla detoksifiye edilmiştir. Çoğu araştırmacı bisfenol A, nonil fenol, oktil fenol, triklosan, etinilestradiol ve sentetik östrojen gibi endokrin bozucu kimyasalların lakkaz aracılı detoksifikasyon veya uzaklaştırılması rapor etmişlerdir. Endokrin bozucu ajanların detoksifikasyonun veya uzaklaştırılmasının lakkaz aracılı oligomerizasyon ve polimerizasyon yoluyla kolaylaştığı ortaya çıkarmışlardır [99].

Lignoselülozik malzemelerin modifikasyonu: Lignoselülozik malzemelerin lakkaz aracılı modifikasyonu iki ana yol üzerinden gerçekleştirilir: Lignoselülozik malzeme üzerine düşük molekül ağırlıklı bileşenleri bağlanması ve '*in situ*' yoluyla lignin moleküllerinin lakkaz aracılı çapraz bağlanmasıdır. Düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin lakkaz aracılı bağlanması, lignoselülozik malzemenin fonksiyonlandırılması için daha ılımlı çevre dostu bir yöntemdir. Özellikle kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde, lakkaz kullanılarak lignoselülozik malzemelerin elyaf kimyası değiştirme etkisi kağıdın mekaniksel özelliklerinin iyileştirilmesi üzerine pek çok çalışma ile sürdürülmektedir. Fenolik asitler kullanılarak kağıt hamurunun artırılan mukavemet özelliklerinde pek çok başarılı sonuç elde edilmiştir ve bu durum hidrojen bağlanmaları ve aynı zamanda kağıttaki fenolik radikallerin çapraz bağlanmasını arttıran karboksil gruplarının artışıyla ilgili olduğu ortaya çıkmıştır. Çoğu araştırma kağıdın yapısal özellikleri üzerine odaklanmış olsa da son zamanlarda antimikrobiyal veya antioksidan özellikli fonksiyonel ambalaj materyali geliştirmeyi amaçlayan yenilikçi araştırmalarda da bir artış olmuştur. Örneğin, Elegir ve arkadaşları ağartılmamış kağıt tabakası üzerine lakkaz aracılı olarak antimikrobiyal aktiviteye sahip fenollerin aşılmasını rapor etmiştir. Elde edilen kağıtlardan kağıt tabakasında sadece monomerik polimer türevlerinin olanına karşı Gram pozitif *Staphylococcus aureus* ve Gram negatif *Escherichia coli*'nin büyük bir etki gösterdiği görülmüştür [99].

Tekstil endüstrisi: Günümüzde, tekstil boyaları özel kimyasallar endüstrisinde önemli bir kesimi oluşturmaktadır. Tekstil endüstrisi tarafından boyaların tüketimi, toplam boyar madde pazarının üçte ikisini oluşturur. Lakkaz enzimleri boyaların giderimi için uygun enzimler olarak gözükmektedir onlar sadece çeşitli kimyasal yapıdaki boyaların degradasyonu için kullanım potansiyeline sahip değildir aynı zamanda boyaların uzaklaştırılması için temel oluşturan bağlanma reaksiyonlarına aracılık edebilirler. Örneğin, *T. villosa* lakkazın azo boya

degradasyonu dışında, aromatik aminler ve katekol arasındaki bağlanma reaksiyonlarını katalizleyebildiği gözlenmiştir [99].

Biyosensör: Birçok lakkaz temeli biyosensörler, lakkazın oksijeni suya indirgemesi ve dolayısıyla da analitin oksidasyonu sırasında sensörün oksijen tüketiminin takip etmesi ilkesine dayanmaktadır. Çoğu araştırmacı, Rodriguez Couto ve Herrera tarafından araştırılan sensör temelli lakkaz gibi uygulamaların veya diğer lakkaz mediatör sistemi ile birleştirilen diğer polifenol okside edici tirozin gibi enzimlerin benzer sensörler kombinasyonlarını temel alan başarılı yapımlar rapor edilmektedir [99].

Gıda Endüstrisi: Enzimler, gıda maddelerini geliştirme yeteneklerini ve en az yan etki ve maliyeti ile spesifik bir şekilde yürütmeleri nedeniyle gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılırlar. Özellikle içecek endüstrisinde lakkaz enzimi aracılıklı bağlama reaksiyonları kullanılmıştır. Şaraplarda, demir, bakır ve/veya enzimler ile aldehitlerin amino asitlerin katılımı ile katalizlenen polifenol oksidasyonları renk bulanıklığına aroma ve lezzet değişikliğine neden olur. Dolayısıyla lakkaz enzimi katalizli bağlama reaksiyonları ile polifenollerin oligomerizasyonu ya da polimerizasyonu ile şarap içerisinde stabilize edici yöntem olarak uygulanmaktadır [99].

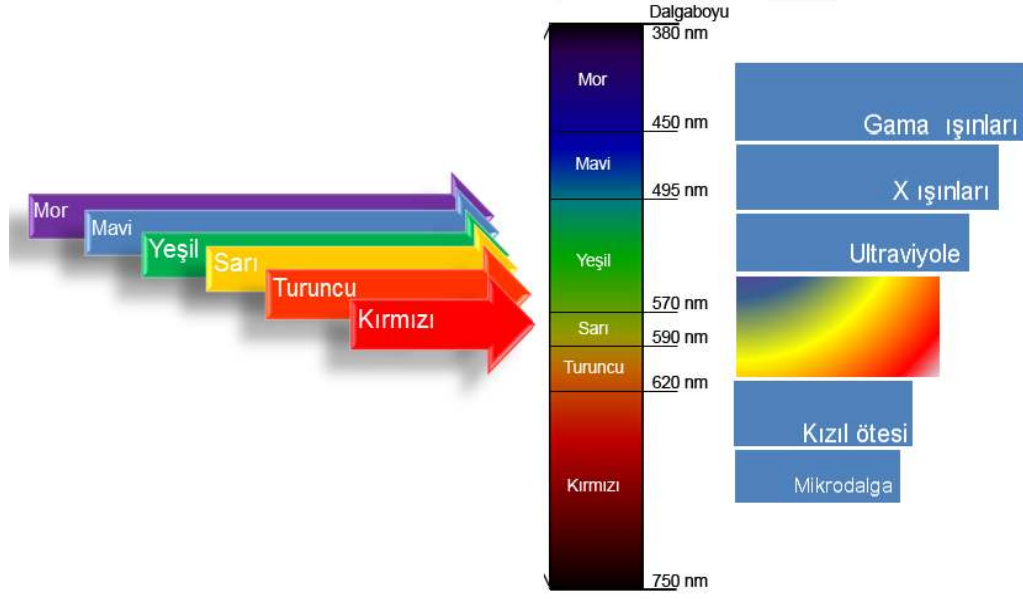
1.7. Boyar Maddeler

Sentetik boyalar tekstil endüstrisinin deri tekstili alanında, kâğıt üretiminde, gıda teknolojisinde, tarımsal araştırmalarda, fotoelektrokimyasal hücrelerde ve saç boyası gibi pek çok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır [100]. Bu organik boyalar ve pigmentler için dünya talebinin her yıl % 3.5 artacağı tahmin edilmektedir [101]. Günümüzde 100.000'in üzerinde sentetik boya ticari olarak kullanılmakta ve yılda 7×10^5 ton boya üretimi yapılmaktadır [95, 102-104].



Şekil 1.29. Boyar maddelerin kullanım alanları fotoğrafları

İnsan gözü 380 nm ile 780 nm arasındaki dalga boylarını algılayabilir. Genel olarak bir maddenin renkli olması görünür bölge ışınlarının bir bölümünü soğurmasıyla ilişkilidir. Bir maddenin renkliliğini açıklamak için bugüne kadar ortaya birçok teori konulmuştur. İçlerinde en bilinenlerinden biri moleküler bağ teorisidir. Bu teoriye göre madde tarafından ışığın belli dalga boyu soğurulur ve insan gözü soğrulan rengi değil tamamlayıcısını algılar. Bu algılama, ışığın maddeler üzerine çarpması ve kısmen soğrulup kısmen yansması nedeniyle çeşitlilik gösterir ki bunlar renk tonu veya renk olarak adlandırılır. Tüm dalga boyları birden aynı anda gözümüze ulaşırsa bunu beyaz, hiç ışık ulaşmazsa siyah olarak algılarız. Görünür bölgedeki ana renkler ve yaklaşık dalga boyları Şekil 1.30'da verilmiştir [105].



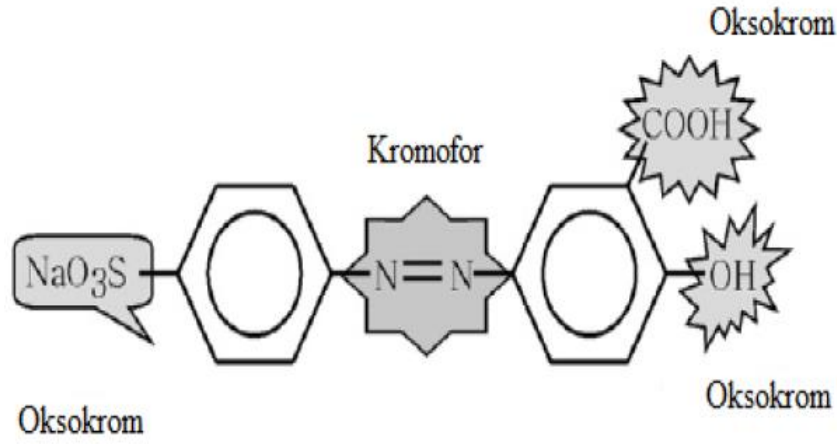
Şekil 1.30. Görünür bölgedeki ana renkler ve yaklaşık dalga boyları

Organik bileşiklerin bir kısmı tekstil materyallerini (iplik, kumaş vs.) renklendirmek için kullanılır. Boyar maddelerin pigmentlerden farkı, boyaların maddelere özgün affinite göstermeleridir [105]. Boyalar genellikle iki anahtar bileşenden oluşan küçük moleküllerdir. Bunlardan 'kromofor grup' boyaya rengini veren grup; 'fonksiyonel grup' ise boyanın kumaşa sabitlenmesini sağlayan gruptur. Normalde bütün hidrokarbonlar renksizdirler ancak bunlara kromofor adı verilen doymamış gruplar bağlanırsa renkli görünürler. Kromofor grup bağlanmış hidrokarbonlara ise "kromojen" adı verilmektedir. Kromofor renk verici anlamındadır ve Tablo 5'de boyar maddelerde bulunan kromofor grupları görülmektedir [106-109].

Tablo 5. Boyar maddelerde bulunan kromofor gruplar

Kimyasa yapı grupları	Nitroso grubu	—NO (veya =N·OH)
	Nitro grubu	—NO ₂ (veya =NO·OH)
	Azo grubu	—N=N·
	Etilen grubu	=C=C=
	Karbonil grubu	=C=O
	Karbon-azot grubu	=C=NH ve -CH=N·
	Kükürt grubu	=C=S ve ≡C-S-S·

Kromojenlerin tam olarak boyar madde özelliği kazanabilmesi için “ oksokrom ” adı verilen ikinci seri grup moleküllerin bileşiğe bağlanması gerekmektedir. Oksokrom gruplar kromojene bağlanarak hem renk şiddeti hem de renk derinliğini arttırmaktadır. Bunlar genellikle amino ($-NH_2$), hidroksil ($-OH$) gibi tuz oluşturan gruplar veya bunların türevi çözünebilir radikaller, karboksil ($-COOH$) veya sülfon ($-SO_3H$)'lardır [108] (Şekil 1.31). Her yıl üretilen çeşitli boyalar arasında, tekstilden ilaca kadar değişen sektörlerde dünya çapında kullanılan sentetik boyaların en yaygın kromofor grubu üretilen boyaların % 80-90'ını oluşturan azo ($-N=N-$) sınıfıdır [111-113].



Şekil 1.31. Mordant Yellow 10 azo boyar maddesinin kimyasal yapısı üzerinde oksokrom ve kromofor grupların gösterimi [110]

Boyar maddeler birkaç şekilde sınıflandırılabilir. Sınıflandırmada çözünürlük, kimyasal yapı, boyama özellikleri, kullanış yerleri gibi çeşitli karakteristikler göz önüne alınabilir [114]. Kimyasal yapılarına göre; azo, antraknon, indigo, polimetin, arilkarbonyum, ftalosiyanın, nitro ve sülfür boyarları olarak; uygulama yöntemlerine göre ise: anyonik, katyonik, doğrudan, dispers, vat ve reaktif boyar maddeler olarak sınıflandırılabilir. Bunlardan sayıca en çok olanı ve kullanılanı dispers ve reaktif boyar madde gruplarıdır [106,109]. Genel bir sınıflandırma yapmak gerekirse boyar maddeler üç grupta incelenebilir. Anyonik (direkt, asit ve reaktif boyalar), katyonik (bazik boyalar) ve non-iyonik (dispers boyalar) olarak sınıflandırılabilir.

* Katyonik (Bazik) Boyar Maddeler: Bu grup boyar maddeler suda çözülür ve çözelti içerisinde renkli katyonlara ayrılır. Bu nedenle sıkça katyonik boya adıyla da anılırlar. Renkli bir katyon ile renksiz bir anyondan ibarettir. Pozitif yük taşıyıcı olarak N veya S atomu içerirler. Yapılarından dolayı bazik (proton alan) olarak etki ettiklerinden anyonik grup içeren liflerle bağlanırlar. Bu Boyar maddeler yün liflerindeki $-COOH$ grupları ile elektrostatik bağ oluşturabildiklerinden yün

liflerini direkt olarak boyayabilmektedir. Bazı bazik boyalar biyolojik aktivite gösterirler ve tıpta antiseptik olarak kullanılırlar [108].

* **Asit Boyar Maddeler:** Anyonik ve suda çözünebilen bu boyaların molekülünde bir veya birden fazla OH^- , SO_3H^- , COOH^- gibi oksokrom grupları içerirler [111]. Genel formülleri $\text{Bm-SO}_3^-\text{Na}^+$ (Bm: boyarmadde, renkli kısım) şeklinde yazılabilir. Bu boyalar Na^+ , K^+ , Ca^+ , NH_4^+ vb. gruplarla tuz oluştururlar ve çözelti içinde negatif yükü verecek şekilde iyonlaşırlar. Belirli bir ölçüde kağıt, deri, yiyecek ve kozmetik alanlarında da kullanılır [107].

* **Direkt (Substantif) Boyar Maddeler:** Bu boyar maddeler anyonik boyar maddeler olup, çözücü grup olarak genellikle sülfonik ($-\text{SO}_3\text{Na}$) grubu bazen de karboksilik asitlerin sodyum tuzlarını içermektedirler. Boyar maddeler, selüloz liflerini ve kısmen de protein liflerini boyayan boyar maddelerdir. Kağıt, deri, yün, ipek, naylonun boyanmasında kullanılırlar [111].

* **Dispers Boyar Maddeler:** Amino ve hidroksil grupları içeren düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Elektronik fotoğrafçılık sektöründe, termal transfer baskı ve termal transferle boya yayma işlemlerinde dispers sınıfına dahil boyar maddeler kullanılır [107,108].

* **Reaktif Boyar Maddeler:** Reaktif boyar maddeler suda kolay çözünürler. Reaktif boyar maddeler uygun koşullar altında lif ile kimyasal reaksiyona girerek, kovalent bağ özelliğine sahip tek boyar madde sınıfıdır. Küçük ve basit molekül yapısına sahiptirler. Küçük partikül özelliği life hızlı bir şekilde nüfuz etmelerini sağlar. Ticari olarak 1956'da piyasaya çıkan bu boya türü, basit boyama yöntemiyle yıkanmaya karşı çok yüksek oranda dayanıklılık sağlamıştır [108]. Bu boyalar, kimyasal yapıları, molekül boyutu ve yapısı nedeniyle biyolojik indirgenmeye dayanıklıdır. Alıcı ortamlarda kolayca biyolojik indirgenmeye uğramayan reaktif boyalar tekstil atıksularında problem yaratan bileşikler olarak tanımlanırlar [115].

Kumaşa renk vermek için yapılan boyama prosesinde kullanılan boyar madde atıksuların özelliklerini belirlemektedir. Tek bir boyama işlemi için farklı kimyasal sınıfındaki boyar maddelerin birlikte kullanılabilmesi çıkış suyu bileşimini daha da karmaşık hale getirmekte ve renk giderimini daha da zorlaştırmaktadır [98]. Tekstil atıksularının en belirgin özelliği renkleridir. Çok küçük miktarda suyun içinde var olan boya (bazı boyalar için 1 ppm'den bile daha az) organik yük olarak kirliliğin küçük bir kısmını oluştursa da yüksek görünürlüktedir ve göller, nehirler ve diğer su birikintilerindeki suyun şeffaflığı, estetik değeri ve gaz çözünürlüğünü etkilemektedir [104]. Boyama sürecinde çeşitli amaçlarla yardımcı kimyasallar olarak metal tuzları, asitler, bazlar, tamponlar, kompleks madde yapıcılar, dağıtıcı, düzgünleştirici ajanlar, yüzey aktif maddeleri, okside edici maddeler, indirgeyici maddeler,

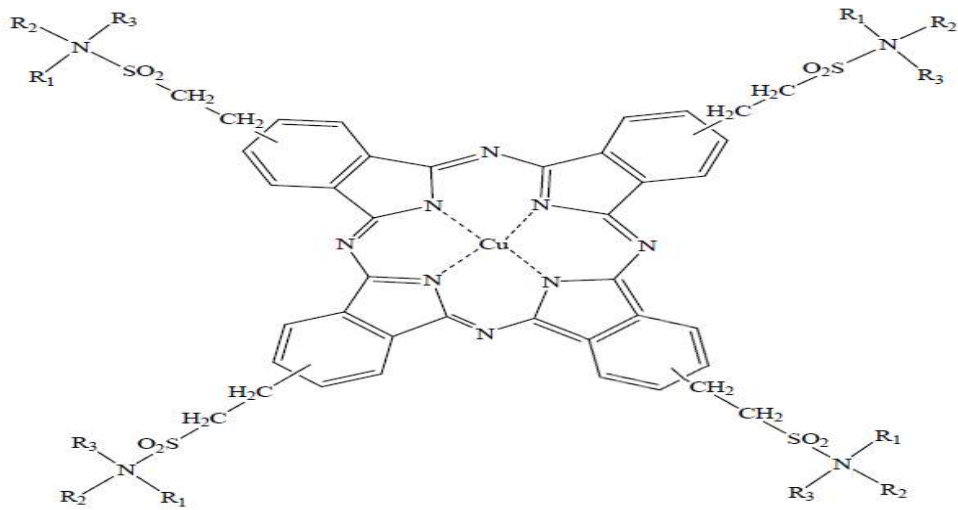
taşıyıcılar kullanılabilir. Bu nedenle, boyama işlemi sonucunda çıkış sularında boyar madde haricinde çok sayıda farklı bileşiklerde bulunabilmektedir. Sucul ortamlarda birikimleri sonucu toksik ve kanserojenik ürün oluşum riski gibi nedenleri de renk giderim proseslerinin önemini arttırmaktadır. Boyar madde renk gideriminin derecesi zaman, sıcaklık, pH ve boyama işlemlerinde kullanılan yardımcı kimyasallar gibi çeşitli faktörlerin etkisi altındadır. Suda çözünebilen reaktif ve asit boyar maddeler geleneksel arıtma sistemlerinden etkilenmeden çıktıkları için çevresel açıdan en sorunlu boyalar olarak kabul edilirler [100]. Renk adsorpsiyon, koagülasyon, çökeltme, iyon değişimi, oksidasyon ve elektrokimyasal metotlar dahil olmak üzere fiziksel ve kimyasal yöntemlerle atıklardan giderilmektedir [116]. Ancak, bu yöntemler mali ve metodolojik dezavantajlara sahiptir. Ayrıca zaman alıcı ve çoğunlukla etkisizdirler [95,109].

Son zamanlarda, enzim bazlı biyoremediasyon geleneksel fiziksel ve kimyasal giderimden üstün birçok avantajı sunduğu için artan bir şekilde ilgi toplamaktadır. Çevresel uygulamalar için enzim kullanmanın faydaları düşük enerji gereksinimi, proses sürecinin kontrolü ve yüksek verimlilik içerir. Birçok enzimin çevresel uygulamalarda önemli rol oynadığı bildirilmiştir. Biyodegradasyon proseslerinde kullanılan serbest enzim limitasyonuna göre, enzim immobilizasyonu enzimatif stabilitenin geliştirilmesi ve ürünlerin enzimden kolay ayrılması, yeniden kullanılabilirlik, işlem maliyetini azaltmak ve gibi birçok avantaj sunar [101]. Günümüzde biyoteknoloji alanında özellikle atıksuların arıtılması konusunda pek çok çalışmalar yapılmaktadır [8,118]. Atık ve çevre biyoteknolojisinin en önemli amaçlarından birisi atıkların içeriğinin doğanın özümleyeceği düzeye indirilmesidir. Normalde kullanılan arıtım sistemleri doğadakilerin modifiye şeklidir. Biyolojik olarak arıtım da bunu hedefler. Boyar maddelerin renk giderim hızları enzim kaynağına ve boyar maddenin kimyasal yapısına bağlıdır. Boyar maddelerin biyolojik arıtmalarının temeli ve anahtarı her bir boyar maddeyi etkili bir şekilde renksizleştirecek uygun mikroorganizma türünü saptamaktır [117]. Tekstil boyalarının enzimatif olarak parçalanmasını veya renk giderimini sağlayan yaklaşımlarda ise genellikle lignin peroksidaz (LiP), mangan peroksidaz (MnP) ve lakkaz gibi ligninolitik enzimlere dayanmaktadır. Lakkaz enzimlerinin LiP ve MnP enzimlerine göre çok daha fazla aromatik bileşiklerin oksidasyonlarını sağlamalarından dolayı, günümüzde kullanılmakta olan sentetik tekstil boyaları da dâhil olmak üzere oldukça geniş bir çeşitlilikteki boyaların enzimatif olarak giderilmesinde cazip bir çözüm olarak görülmektedir [95]. Azo boyalarının mikrobiyal indirgenmesi üzerine mevcut çoğu çalışmalar çok az tuzlu veya tuzun olmadığı şartlar altında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar büyük miktarlarda tuzların pek çok tekstil atıksuyu içerisinde azo boyalar ile birlikte bulunduğu gerçeğini ihmal etmiştir. Tekstil boyamada, çeşitli tuzlar organik kirleticilerin ayrılması (tuzlu su ile durulama), boyar maddelerin çökeltmesine yardımcı olmak (tuz ile çöktürme) ve boyaların standartlaştırmak için konsantre boyalar ile karıştırarak kullanılmaktadır. Ayrıca pH'ın

artması için boya banyosu içerisinde NaOH'ın eklenmesi ile de sodyum seviyesi artabilir. Yüksek tuz konsantrasyonları plazmolize neden olabilir ve biyolojik aktiviteyi azaltabilir [119].

1.7.1. Reaktif Mavi 21 (RM 21)

Remazol Turquoise R-P (C.I. Reactive Blue 21, CAS No:12236-86-1) (RM 21) kapalı moleküler formülü ($C_{40} H_{26} Cu N_{10} O_{16} S_6$), moleküler ağırlığı $1159.62 \text{ g mol}^{-1}$ olan bir boyadır [120,121]. Reaktif mavi 21 boyası reaktif grubu vinilsülfonik asit ($\text{Dye-SO}_2\text{-CH=CH}_2$) olan ftalosiyanın boyar madde örneğidir [122] (Şekil 1.32). Ftalosiyanın reaktif boyalar mavi ve yeşil renkler üretmek için kullanılan metal kompleks boyalardır. Bu boyalar tekstil boyalarının en önemli boya sınıflarından bir olan reaktif boyalar sınıfına dâhildir [123]. Tekstil boyaları arasında azo boyalar kadar dikkat edilmesi gereken bu boya sınıfında ftalosiyanın kromofor grubu, bakır, nikel, krom ve diğer metallerle kompleks yapısı içerebilir [122]. Bu boyaların büyük bir çoğunluğu bakır içeren ftalosiyanın boyalardır. Bakır metali içerdikleri için özel bir toksisitesi olduğu düşünülen bu boyalar potansiyel olarak mutajenik, zararlı ve kanserojeniktir [122,123]. Ftalosiyanın boyaların, renk sabitliği ve oksidatif degradasyona karşı dayanıklılığı gibi doğal özellikleri, tekstil atıksularından renk giderimini biraz daha zorlaştırmaktadır. Reaktif ftalosiyanın boyalar suda çözünürlüğü yüksek, anerobik şartlar altında biyolojik degradasyona dayanıklı olduğundan atıksu arıtım tesislerinde adsorpsiyon yoluyla etkin bir şekilde uzaklaştırılmazlar. Araştırmacılar, boyanın son derece seçimli doğası nedeniyle geleneksel yöntemlere karşı potansiyel ve uygulanabilir bir alternatif olarak enzimatik muamele ile çalışmaya dikkat çekmişlerdir. Ftalosiyanın boyaların sulu ortamlardan gideriminde peroksidazlar son yıllarda da özellikle beyaz çürükçül mantarlarla çalışılmaktadır [123].



Şekil 1.32. Reaktif Mavi 21 boyasının kimyasal yapısı [121]

1.8. Karakterizasyon Yöntemleri

1.8.1. İnfrared Spektroskopisi

İnfrared spektroskopisi numunenin, infrared bölgede tüm frekansları içeren elektromanyetik dalga ile kimyasal bağlarındaki titreşiminin ölçülmesi prensibine dayanmaktadır [124,125]. Moleküldeki atomların titreşimi sırasında atomlar arası uzaklık büyüyüp küçüldüğünden iki atom arasında bir elektriksel alan meydana gelir [125]. Bu elektriksel alanın titreşimi IR ışınının elektriksel alanının titreşimine uyunca absorbsiyon koşulu sağlanmış olur ve IR ışını absorblanır. Bütün moleküler titreşimler IR enerjisinin soğurulmasına neden olmaz. IR enerjisinin soğurulmasıyla titreşim olması için, titreşim olduğunda molekülün dipol momentinde değişiklik olmalıdır. Bu koşulu sağlayan maddelere “ IR aktif maddeler ” denir [126]. Kızıl ötesi bölgesinde kimyasal bağların titreşimlerindeki değişim ve absorbsiyon özellikleri spektral piklerin oluşmasını sağlar. Her fonksiyonel grup kendine özgü titreşim sıklığına sahiptir ve her kızıl ötesi ışık dizisi (spektrum) özgüdür.

1.8.2. Taramalı Elektron Mikroskobu

1933 yılında Max Knoll ve Ernst Ruska adlı iki Alman bilim adamı görüntüyü oluşturmak için, foton yerine elektronları kullanan elektron mikroskobunu keşfetmişlerdir. Hareketli parçacıklara eşlik eden dalga boyunun bulunması, bu konudaki çalışmaları yönlendirmiş ve ışık kullanılan mikroskopların yerine elektron kullanılan, daha yüksek çözünürlük gücü sağlayan mikroskopların keşfine gidilmiştir. Elektron mikroskobuyla iki boyutlu görüntü yanında üç boyutlu görüntü alınması da sağlanmıştır. Kullanılan elektron demetinin önce hızlandırılması sağlanmakta ve hızlandırılan elektronların incelenen malzemenin ya içinden geçirilmesi ya da yüzeyinden yansıtılması ile görüntü elde edilmektedir. Elektron demeti örnek malzemenin içinden geçirildiğinde mikroskoplara geçirmeli elektron mikroskobu (TEM-Transmission Electron Microscope), örnek malzemenin yüzeyinden yansıtılarak görüntüsünün elde edildiği mikroskoplara ise taramalı elektron mikroskobu (SEM-Scanning Electron Microscope) olarak denilmektedir. Taramalı elektron mikroskoplarıyla incelenen cisimlerin üç boyutlu görüntüleri elde edilmektedir [127]. TEM'in takip prosedürü; tespit, dehidratasyon, gömme, kesit alma ve boyama aşamalarından oluşur. SEM'deki takip prosedürü ise TEM'e benzerlik göstermekle birlikte dokudan kesit alınmaması ve doku yüzeyinin altın gibi bir metal veya karbon ile kaplanması yönünden farklılık gösterir. TEM'in çalışma prensibi kurşun sitrat-uranil asetat ile boyanmış dokunun içinden geçen elektronlarla etkileşimi esasına dayanmaktadır. Oluşan görüntü siyah-beyaz ve iki boyutludur. Buna karşın SEM' de kaplanmış doku yüzeyine çarparak

saçılan elektronların bir dedektör ile toplanmasıyla oluşan üç boyutlu bir görüntü söz konusudur [128].

1.8.3. X-Işını Toz Kırınım Ölçümleri

X-ışını kırınımı, kristal yapıların analizinde kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemle, bir malzemenin kristal yapısı incelenebilmektedir. İngiliz fizikçi W.H. Bragg tarafından 1913 yılında ortaya atılan kurama göre, malzemeye gönderilen X-ışını, yapıdaki atomlardan kırınımına uğramakta ve saçılmaktadır. Saçılan X-ışınlarının şiddeti ölçülüp, incelenerek, bir kristal yapı içindeki elektron yoğunluğu dağılımı bulunabilmektedir. X-ışınları toz yöntemleri her bir kristal madde için X-ışını kırınım deseninin sadece o kristale özgü olması temeline dayanır. Böylece eğer numunenin kırınım deseni karşılaştırıldığı maddenin literatürdeki kırınım deseni ile tam uyuşursa (kırınım açıları aynı olursa), numunenin kimyasal bileşimi bulunabilir [129]. Analitik kırınım çalışmaları için kristal numune homojen, ince bir toz elde edilene kadar öğütülür. Bu durumda çok sayıda küçük kristal tanecikleri bütün mümkün yönlerde yönlendirilir; böylece bir X-ışını demetinin malzeme içinden geçerken çok sayıda taneciğin bütün mümkün düzlemler arası boşluklarda yansıması için Bragg şartını yerine getirecek şekilde yönlendirilmiş olması beklenir [129].

1.8.4. Termal Analiz Yöntemleri

Termal analiz, bir maddenin sıcaklığını belirli bir programa bağlı olarak değiştirirken, maddenin fiziksel ve kimyasal özelliklerinde meydana gelen değişiklikleri ölçmeye yarayan bir dizi ölçme tekniğidir. Ölçümü yapılacak madde kimyasal bir reaksiyonun ürünü de olabilir. Başlıca fiziksel özellikler kütle, sıcaklık, entalpi, boyut vb.dir. Bir minerale veya bir maddeye uygulanan termal işlemlerle, ısıtma veya soğutma sırasında meydana gelen reaksiyonlar nedeni ile olan kütle ve enerji değişimlerinin bulunmasında kullanılan yöntemlere “ termoanalitik yöntemler ” denir. Bu prensiplerden hareket ederek, incelenmek istenen madde ile termal olarak inert davranan diğer bir maddenin, kontrollü ısıtma sırasında, kütle, hacim ve diğer özelliklerindeki farklarına dayanan çok çeşitli aletli yöntemler geliştirilmiştir. Bu termal metotlar arasında, daha çok maddenin kimyasal özelliklerini incelemeye yarayan üç metot oldukça önemlidir. Bunlar; Termogravimetri (TG), Diferansiyel Termal Analiz (DTA) ve Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC)’dir. Termogravimetrik analiz metotlarında (TG) programlı olarak artırılan (bazen de eksiltile) bir sıcaklık işlemiyle maddenin kütleğinde meydana gelen kayıp (değişiklik) sıcaklığın veya zamanın fonksiyonu olarak incelenir. Zamanın fonksiyonu olarak maddenin kütleğinde meydana gelen azalmayı (bazen artmayı) gösteren grafiğe “ termogram ” veya “ termal bozunma eğrisi ” denir. Genel olarak kütle değişimlerinin nedeni, su gibi uçucu

bileşenlerin uzaklaşması veya maddenin ayrışmasıdır [130]. Termogravimetrik analizde, kontrollü bir hızla, uygun bir atmosferde ısıtılan maddenin kütlesindeki değişimler çok hassas elektronik bir terazi ile ölçülür. Numuneler özelliklerine uygun bir sıcaklık programında ısıtılır. Numune kütlesindeki değişim miktarı, zaman ya da sıcaklığın bir fonksiyonu olarak kaydedilir. Çizilen termogramlarda istenen sıcaklık aralığındaki ağırlık kaybı yüzde olarak hesaplanır.

1.8.5. Manyetik Duyarlılık Ölçümleri

Bir maddenin manyetik özelliği, içinde bulunan elektronlar ve çekirdeklerin elektriksel özelliklerinden gelir. Ancak çekirdeklerden gelen manyetik özellikler, elektronlardan gelen manyetik özelliklerden binlerce defa daha küçük olduğundan, maddenin manyetik özelliği denince akla elektronlardan meydana gelen manyetik özellikler gelir. Bütün maddeler manyetik alandan etkilenir ve manyetikleşmenin derecesine “ manyetik duyarlılık ” denir. Manyetik özelliklerin büyüklükleri ve sıcaklığa bağımlılıkları farklıdır. Manyetizmanın bazı türleri şunlardır:

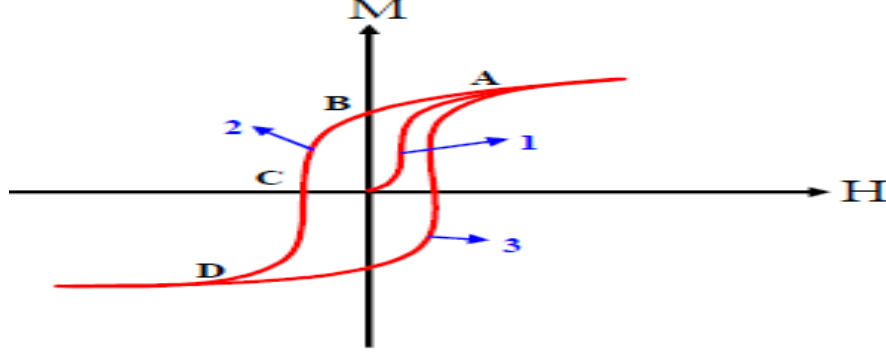
* Ferromanyetik maddeler: Belirli bir sıcaklığın altında kalıcı manyetik özelliğe sahiptirler; çok güçlü pozitif duyarlılık, atomların manyetik momentleri aynı doğrultuda yönlenmiştir, dış manyetik alan kalktığında manyetik özelliklerini korurlar. Örnek olarak “ saf demir, nikel ” verilebilir [131].

* Ferrimanyetik maddeler: Kristal içindeki iyonların manyetik momentleri antiparalel yönelmiştir, birbirlerini tamamen yok etmemiştir, net manyetik moment hâlâ mevcuttur ve çok güçlü pozitif duyarlılığa sahiptirler. Örnek olarak “ bazı demiroksit ve sülfidler, magnetit, maghemit ” verilebilir [131].

* Antiferromanyetik maddeler: Yönelmeleri sonucu atom veya iyonların manyetik momentleri birbirlerini yok eder, net manyetik moment sıfırdır. Orta kuvvette pozitif manyetik duyarlılığı temsil ederler. Örnek olarak “ bazı demiroksitler, hematit, gotit ” verilebilir [131].

* Paramanyetik maddeler: Zayıf pozitif duyarlılığa sahip, manyetik alan tarafından zayıfça çekilirler, eşleşmemiş elektronlara sahiptirler. Elektronların spin ve orbital hareketleri manyetizmayı doğurur. Dış manyetik alan kalktığında manyetizmaları yok olur. Eşleşmemiş elektron sayısı arttıkça paramanyetik özellik artar. Örnek olarak “ birçok demir içeren mineral, tuz, biotit, olivin ” verilebilir [131].

* Diyamanyetik maddeler: Manyetik momente sahip değildirler, dış manyetik alan tarafından zayıfça itilirler; tüm elektronları eşleşmiştir; zayıf negatif duyarlılık temsil ederler. Örnek olarak “su, organik madde, plastik, kuvars, CaCO_3 ” verilebilir [131].



Şekil 1.33. Histerisiz çevrimi [132]

Şekil 1.33’de ilk olarak 1 numaralı eğride sıfırdan başlayarak örneğe dışardan bir manyetik alan uygulandığında, örnek içerisindeki manyetik bölgeler hemen düzenlenir ve malzeme “A” noktasında doyma mıknatıslanması değerine ulaşır. Daha sonra dış manyetik alan sıfıra doğru azaltılmaya başlandığında, (2 numaralı eğri) manyetik bölgeler kolay eksenleri doğrultusunda düzenlenmeye başlar. Fakat uygulanan alan sıfır olduğunda bazı manyetik bölgeler kolay eksenlerine düzenlenmeden kalırlar, işte bu manyetik bölgelerde “B” noktasında ki kalıcı mıknatıslanma değerini (M_r) oluştururlar. Dış alan ters yönde uygulanmaya devam edilirse “C” noktasında ki uygulanan alan değerinde malzemeden hiçbir mıknatıslanma değeri elde edilemez, yani dışarıdan bir etkiyle malzemenin mıknatıslanması “sıfır” yapılmış olur. Bu değere zorlayıcı alan (H_c) denir ve bu değer bize bir malzemenin mıknatıslanmasının ne kadar kolay ya da zor kaldırılabilceği konusunda bilgi verir. Manyetik alan ters yönde arttırılmaya devam ettirildiğinde malzeme içindeki manyetik bölgeler ters yönde yönelip “D” noktasında eksi olarak doyuma ulaşacaklardır. Bu doyumdan sonra ters uygulanan alan azaltılıp daha sonra ilk yönelimle yeniden uygulandığında da (3 numaralı eğri) üstteki eğrinin simetriği bir eğri elde edilmiş olacaktır. İşte bu çevrime “manyetik histerisiz” denir [132].

Bu çalışmada, lakkaz enziminin, kitosanın indirgenmiş grafen oksit ve manyetit ile modifiye edilmesi sonucu oluşturulan kitosan-indirgenmiş grafen oksit (Kit-RGO) ve kitosan-indirgenmiş grafen oksit-manyetit (Kit-RGO- Fe_3O_4) boncukları üzerine immobilize edilmesi amaçlandı. Hazırlanan kompozit taşıyıcılar üzerine enzimin immobilizasyonu gerçekleştirildikten sonra karakterizasyon çalışmaları yapıldı. Bu amaçla serbest ve immobilize enzimin optimum pH ve sıcaklık, kinetik sabitleri, organik solvent, inhibitör ve depolama stabilitesi belirlendi. Ayrıca çalışmada immobilize enzimi ile ftalosiyanın bir boya olan Reaktif Mavi 21 adlı tekstil boyasının enzimatik olarak dekolorizasyonu üzerine etki eden faktörler incelendi.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

Deneysel çalışmalarda, Perkin Elmer UV-Vis Spektrofotometresi, FEG/FEI Quanta MK2 model taramalı elektron mikroskobu, Empyrean Panalytical model X-ışını toz difraktometresi, SII Exstar 7300 marka Diamod TG/DTA model termal analiz cihazı, Lake Shore Titreşimli Manyetometresi (VSM), pH metre, manyetik karıştırıcı, inkübatör, analitik terazi, otomatik pipet, çalkalayıcı gereçleri kullanıldı.

Kullanılan kimyasallar, kitosan (deasetilasyon derecesi % 75-85, orta molekül ağırlıklı, Brookfield viskozitesi % 1 asetik asit içerisinde 25°C'de 200-800 cps), grafit (+100 mesh, flake form), H₂O₂ (% 30), asetik asit (% 100), sodyum asetat, potasyum permanganat, glutaraldehit (% 25), hidrazin monohidrat (% 100), sodyum tripolifosfat (TPP), [2,2'-azino-bis-(3-etilbenzothiazoline-6-sülfonik asit)] (ABTS), etanol (% 95), fosforik asit (% 88), Coomassie Brilliant Blue G-250, dipotasyum hidrojen fosfat (K₂HPO₄), potasyum hidrojen fosfat (KH₂PO₄), sığır serum albümin, tris (hidroksimetil) aminometan, hidroklorik asit, sodyum hidroksit, sülfürik asit (H₂SO₄), demir(II)sülfat heptahidrat (FeSO₄·7H₂O), demir(III)klorür heksahidrat (FeCl₃·6H₂O), polietilen glikol (PEG 4000), sodyum klorür, metanol, dimetilsülfoksit, asetonitril, EDTA, sistein ve NaN₃'dür. Bu çalışmada kullanılan tüm kimyasallar Fluka ve Sigma–Aldrich firmalarından temin edildi. Reaktif Mavi 21 (RM 21, Cl:12236-86-1) boyası DyStar (Türkiye) firmasından sağlandı.

Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması:

Asetik Asit çözeltisi (% 2'lik): 2 mL asetik asit, saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

TPP (% 2'lik): 20 g TPP tartıldı ve 900 mL saf suda çözüldü. Çözeltinin pH'ı derişik HCl ile 8.2'ye ayarlandı ve hacmi 1 litreye tamamlandı.

Glutaraldehit çözeltisi (% 4'lük): 50 mM pH 5.0 asetat tamponunda hazırlandı.

Lakkaz enzim çözeltisi: 5 mg enzim, 0.1 M pH 5.0 fosfat tamponu ile 5 mL'ye tamamlandı.

ABTS (1 mM): 0.1 M pH 5.0 asetat tamponunda hazırlandı.

Bradford reaktifi: 40 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 mL (% 95'lik) etanolde çözüldü. Çözeltiye 55 mL % 88'lik fosforik asit eklendi ve hacmi deiyonize su ile 1 litreye tamamlandı.

pH 3.0-4.0 asetat tamponu: 0.1 M sodyum asetat ve 0.1 M asetik asit çözeltileri ile hazırlandı.

pH 5.0-7.0 fosfat tamponu: 0.1 M (KH₂PO₄) ve 0.1 M (K₂HPO₄) çözeltileri ile hazırlandı.

pH 8.0 Tris-HCl tamponu: 0.1 M tris (hidroksimetil) aminometan ve 0.1 M HCl ile hazırlandı.

Standart protein çözeltisi (1 mg mL⁻¹): 10 mg sığır serum albümin tartıldı ve hacmi saf su ile 10 mL'ye tamamlandı.

2.2. Yöntem

2.2.1. İndirgenmiş Grafen Oksitin Elde Edilmesi

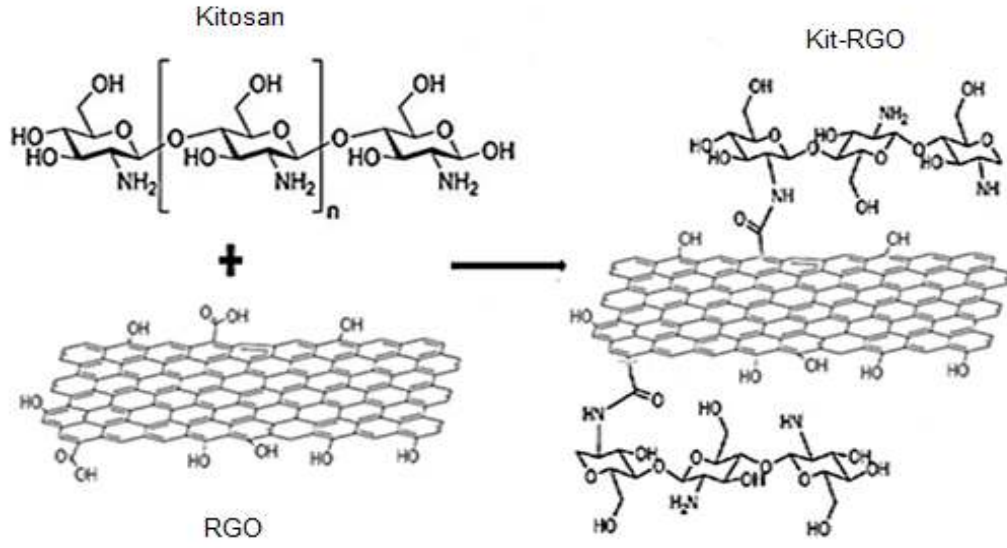
Beş gram grafit, 2.5 g NaNO_3 ve 115 mL % 98'lik H_2SO_4 ile 30 dk boyunca karıştırıldı. İçerisine 15 g KMnO_4 eklenip 2 saat daha karıştırıldı ve sıcaklığın 35°C civarında tutulmasına dikkat edildi. Çözelti içerisine yavaş yavaş yaklaşık 230 mL saf su ilavesinin ardından 700 mL sıcak saf su ilave edildi. Artan sıcaklığı düşürmek için karışım bir süre buz banyosunun içerisinde tutuldu. İçerisine % 30'luk H_2O_2 'den yaklaşık 12.5 mL ilave edildi. Çözelti sıcakken süzülde ve sırasıyla önce % 5'lik HCl ile ardından 300 mL saf suyla yıkandı. Süzülen madde vakumlu fırında kurutuldu [41,133-138]. Elde edilen grafit oksitten, 1 mg mL^{-1} 'lik konsantrasyonda hazırlanan çözelti, belirli süre ultrasonike edilerek grafen oksite çevrildi [42,138]. Grafen oksitin indirgeme işlemi hidrazin monohidratla yapıldı [42,133,137-139].



Şekil 2.1. Grafen oksit ve indirgenmiş grafen oksidin kimyasal yöntemle sentezi [139]

2.2.2. Kitosan-İndirgenmiş Grafen Oksit Boncuklarının Hazırlanması (Kit-RGO)

Kitosan-indirgenmiş grafen oksit kompozit boncuklarının hazırlanması (Kit-RGO): 2 g kitosan % 2'lik asetik asit çözeltisi içinde çözöldü. Kitosan çözeltisine kitosanın beşte biri kadar indirgenmiş grafen oksit eklenerek hazırlanan süspansiyon, soğuk TPP içine ucu kesilmiş bir şırınga iğnesi yardımıyla damlatıldı, sertleşmesi için 4 saat karıştırılarak bekletildi. Sertleşen boncuklar süzölerek bol saf su ile yıkandı ve immobilizasyon işlemlerinde kullanılmak üzere 4°C 'de depolandı.



Şekil 2.2. Kitosan ile indirgenmiş grafen oksit reaksiyonu [140]

2.2.3. Kitosan-İndirgenmiş Grafen Oksit-Manyetit Boncukların Hazırlanması (Kit-RGO-Fe₃O₄)

Manyetik partiküllerinin hazırlanmasında, Yuanbi ve ark., (2002) tarafından geliştirilen yöntem izlenildi [141]. Yönteme göre, FeSO₄·7H₂O: FeCl₃·6H₂O (2:3 mol:mol) ile PEG 4000 ile 100 mL deiyonize suda karıştırıldı. Çözeltinin pH'ı 11 olacak şekilde (0.3 mol L⁻¹) sulu amonyak çözeltisi ile ayarlandı. Fe₃O₄'ün oluşumundan dolayı çözeltinin siyah renk olduğu gözlemlendi. Fe₃O₄ nanopartikülleri süzgeç kağıdıyla süzülerek kurutuldu. Elde edilen manyetit, indirgenmiş grafen oksit ile aynı miktarda alınıp, kitosan çözeltisine eklenerek Kit-RGO-Fe₃O₄ oluşturuldu. Kitosanın bu kompozit taşıyıcısının hazırlanmasında, diğer taşıyıcının oluşturulmasındaki basamaklar izlendi.

2.2.4. Kompozit Boncukların Karakterizasyonu

Kompozit boncukların İnfrared Spektroskopisi, saf ve kuru KBr içinde diskler hazırlanıp Perkin Elmer model spektrometresi kullanılarak alındı. Kompozit boncukların yüzey yapılarının görüntüleri değişik büyütme ölçeklerinde, FEG/FEI Quanta MK2 model taramalı elektron mikroskopunda alındı. XRD analizleri, CuKα_{1,2} (λ=1.54060) kaynaklı, Empyrean Panalytical model X-ışını toz difraktometresi kullanılarak yapıldı. (Radyasyon kaynağı tüp voltajı 45 kV ve tüp akımı 40 mA). Kompozit boncukların termal analizleri, N₂ (g) atmosferinde, 10 °C dk⁻¹ ısıtma hızında, oda sıcaklığından 800 °C sıcaklığa kadar çıkılarak SII Exstar 7300 marka Diamod

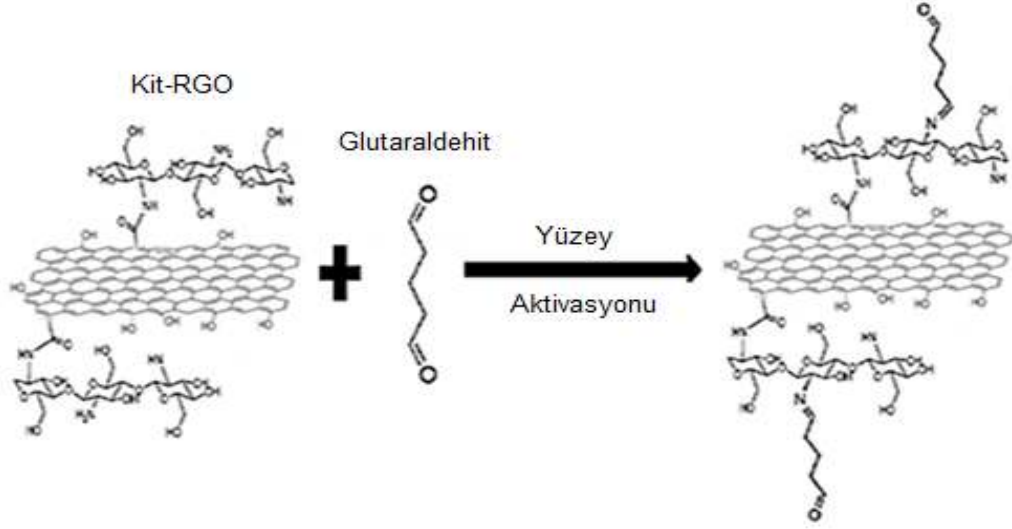
TG/DTA model termal analiz cihazı ile yapıldı. Kompozit boncukların manyetik duyarlılık ölçümleri, Lake Shore Titreşimli Manyetometresi (VSM) ile yapıldı. Numunelere ± 6 kOe lik bir manyetik alan uygulanarak elde edilen manyetizasyon değerleri oda sıcaklığında ölçüldü. Manyetik alan içindeki parçacıkların manyetizasyonları birim kütle başına manyetik moment (emu g^{-1}) olarak ifade edildi.

2.2.5. Kompozit Boncukların Glutaraldehit ile Aktivasyonu ve Lakkazın İmmobilizasyonu

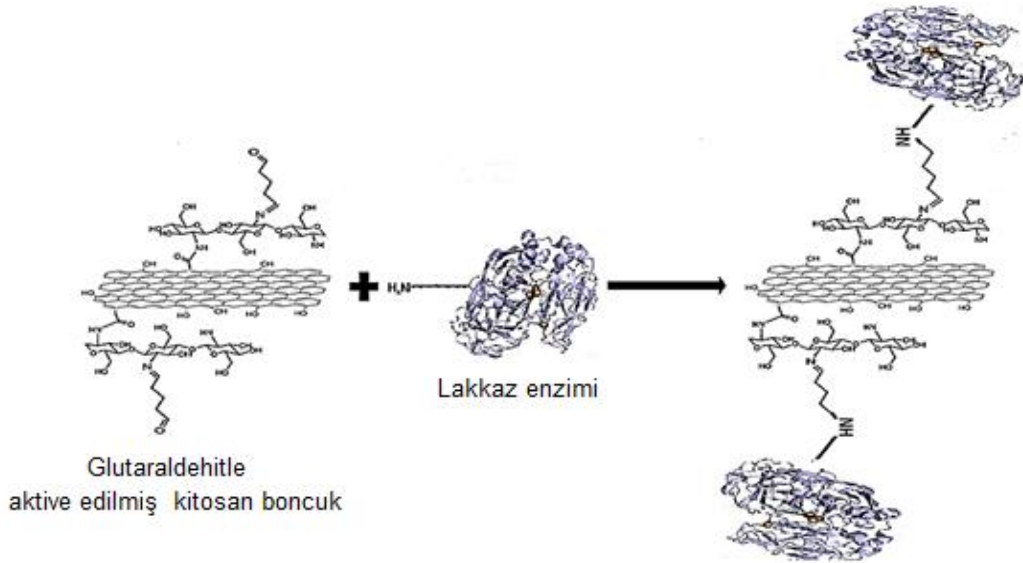
Hazırlanan kitosan kompozitlerine lakkazın immobilizasyonu için çapraz bağlayıcı bir ajan olan glutaraldehit kullanıldı. Kitosan kompozit boncuklar, yüzde 2-5 arasında değişen konsantrasyonlarda hazırlanan glutaraldehit çözeltisi ile 3 saat boyunca 37 °C'de inkübe edilip çapraz bağlandı. Çapraz bağlayıcının fazlasının uzaklaştırılması için boncuklar önce saf suyla daha sonra pH 5.0 fosfat tamponu ile yıkanarak süzüldü. Enzim immobilizasyonu gerçekleştirildi ve yüzde aktivite değerleri hesaplanarak en uygun glutaraldehit konsantrasyonu belirlendi.

Glutaraldehitte muamele edilmiş boncuklar 1 mg mL^{-1} lakkaz içeren enzim çözeltisi ile 4 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, kompozit yüzeyine bağlanan enzimlerin saptanması için boncuk aktivite ölçümleri yapılırken, bağlanmayan enzimlerin tayini için ise üst faz ve yıkama sularında enzimatik aktivite ölçümleri yapıldı.

Serbest ve immobilize edilmiş lakkazın aktivitesi Wolfenden ve Willson (1982) tarafından geliştirilen yöntemle göre, 420 nm'de ABTS'nin dönüşümü sonucu absorbanstaki artışın spektrofotometrik ölçülmesiyle hesaplandı [143,144]. Enzim aktiviteleri, substrat olarak 0.1 M pH 5.0 asetat tamponunda hazırlanan ABTS kullanılarak ölçüldü. pH 5.0'da 1 dakikada 1 μmol ABTS'yi dönüşüme uğratan enzim miktarı bir ünite olarak tanımlandı [144-147].



Şekil 2.3. Kitosan-indirgenmiş grafen oksit kompozit boncuk yapısının glutaraldehit ile muamelesi [140, 142]



Şekil 2.4. Glutaraldehit ile aktive edilmiş kitosan boncuk üzerine lakkaz immobilizasyonu [142]

İmmobilizasyon verimi (% İY) aşağıdaki formüle göre hesaplandı (2) [148-150]:

$$\% \text{ İY} = [(U \text{ total} - U \text{ kalan}) / U \text{ total}] \times 100 \quad (2)$$

Bu eşitlikte, U total: serbest enzimin aktivitesi ve U kalan: filtratta bulunan enzim aktivitesidir.

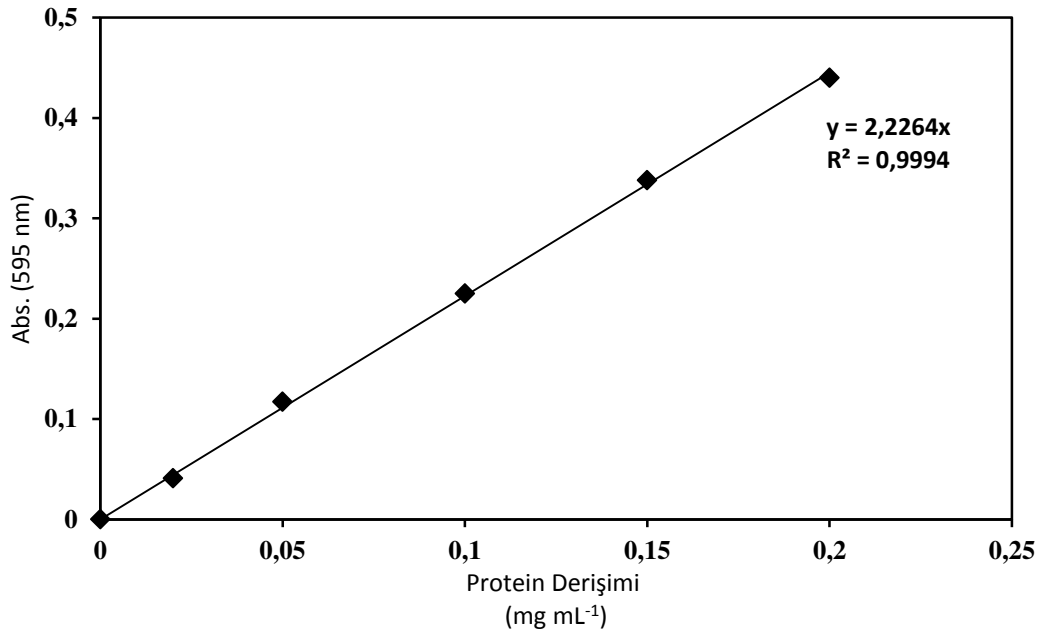
İmmobilize lakkazın gram taşıyıcı başına düşen aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı [148]:

$$\text{Aktivite (U g}^{-1}\text{)} = \frac{\Delta \text{Abs} / \text{dk} \times \text{seyreltme faktörü} \times V \text{ reaksiyon} \times 10^6}{\varepsilon \times M_{\text{taşıyıcı}}} \quad (3)$$

Formülde, V reaksiyon (mL) = örnek hacmine, ε = molar ekstraksiyon kat sayısı ($\lambda_{420 \text{ nm}}$ için $36\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ve $M_{\text{taşıyıcı}}$ (g) = ölçümde kullanılan taşıyıcı miktarına karşılık gelmektedir.

2.2.6. Taşıyıcı Üzerine Bağlanan Protein Miktarının Belirlenmesi

Serbest enzim, filtrat ve yıkama sularındaki protein miktarı, Bradford ve arkadaşları (1976) tarafından geliştirilen yöntemi göre, sığır serum albumin kullanılarak 595 nm'de spektrofotometrik olarak tayin edildi [151]. Standart protein eğrisinin çiziminde, deney tüplerine sırasıyla 0.02, 0.05, 0.1, 0.125, 0.15, 0.2 mg mL⁻¹ olan ara stoklardan 0.1 mL eklendi ve her birinin üzerine 2 mL Bradford reaktifi eklenerek 10 dk oda sıcaklığında bekletildi. Elde edilen değerler, derişime karşı grafiğe geçirilerek standart protein eğrisi oluşturuldu (Şekil 2.5), ve örneklerin protein içeriklerinin belirlenmesinde kullanıldı [151-153].



Şekil 2.5. Standart protein eğrisi

2.2.7. İmmobilize Enzimin Karakterizasyonu

Her bir deney seti üç defa tekrarlanıp, değerlerin ortalamaları alınarak sonuçlar elde edildi.

2.2.7.1. Optimum pH

pH'in bir fonksiyonu olarak serbest ve immobilize lakkaz enziminin aktivitesi pH 3.0-8.0 aralığında substrat olarak 1 mM ABTS kullanılarak tayin edildi. Deneyler sırasında, 0.1 M sodyum asetat (pH 3.0-4.0), 0.1 M potasyum fosfat (pH 5.0-7.0) ve 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) tamponları kullanıldı. Lakkaz enziminin aktivitesi standart analiz koşullarında ölçüldü ve yüzde değerleri hesaplandı.

2.2.7.2. Optimum Sıcaklık ve Termal Stabilité

Optimum sıcaklığı belirlemek üzere, serbest enzim ve immobilize enzim 20 ile 80 °C arasında değişen sıcaklıklarda izlendi. Sıcaklık stabilitesini belirlemek için, serbest ve kompozit taşıyıcılar üzerine immobilize enzim 10-70 °C arasında değişen sıcaklıklarda bir saat bekletildi ve geri kazanılan aktivite standart koşullarda ölçüldü. Serbest ve immobilize lakkaz formlarının her ikisi için aktivasyon enerjisi (E_a) Arrhenius grafiğinin [$\log V$ yüzde aktivitenin logaritmasına karşı Kelvin ($1000/T$) cinsinden mutlak sıcaklığın tersi] eğiminden aşağıda verilen eşitliğe göre hesaplandı [154-156]:

$$\text{Eğim} = (-E_a) / R \quad (4)$$

Lakkazın aktivitesinin termal inaktivasyon sabiti (k_d) ve yarı ömürleri ($t_{1/2}$) farklı sıcaklıklarda araştırıldı. Geri kazanılan aktivite 0. dk'daki enzim aktivitesi % 100 alınarak hesaplandı. Sonuçlar birinci dereceden termal deaktivasyon sabiti (k_d), yarı ömür süreleri ($t_{1/2}$) ve D değerleri (sabit bir sıcaklıktaki enzim aktivitesinin % 90'ını inaktive etmek için gereken süre veya % 10'luk geri kazanılan aktiviteyi sağlamak için farklı sıcaklıklardaki inkübasyon zamanı) her bir sıcaklık değeri için bulundu. Serbest ve immobilize lakkazın termal deaktivasyon sabiti (k_d) eşitlik 5'e göre hesaplandı, eşitlikte A , t (dk) sonraki aktivite iken; A_0 , başlangıç enzim aktivitesidir. Serbest ve immobilize enzimin yarı ömür süreleri ($t_{1/2}$) ve D değerleri aşağıdaki eşitlikler kullanılarak hesaplandı [154-156]:

$$\ln A = \ln A_0 - k_d \times t \quad (5)$$

$$t_{1/2} = 0.693 / k_d \quad (6)$$

$$D \text{ değeri} = \ln 10 / k_d \quad (7)$$

Lakkazın termal denatürasyonu için aktivasyon enerjisi (E_d) termal inaktivasyon sabitinin logaritmasının ($\ln k_d$) mutlak sıcaklığa karşı grafiğinden eşitlik 8'e göre bulundu:

$$\text{Eğim} = (-E_d) / R \quad (8)$$

Lakkazın termal denatürasyonu için entalpi (ΔH° , kJ mol⁻¹), serbest enerji (ΔG° , kJ mol⁻¹) ve entropideki (ΔS° , J mol⁻¹ K⁻¹) değişiklikler aşağıdaki eşitlikler kullanılarak hesaplandı [154-156]:

$$\Delta H^\circ = E_d - RT \quad (9)$$

$$\Delta G^\circ = -RT \ln (k_d \times h) / (k_b \times T) \quad (10)$$

$$\Delta S^\circ = (\Delta H^\circ - \Delta G^\circ) / T \quad (11)$$

Eşitlikte, T , mutlak sıcaklığa (K); R , gaz sabitine (8.314 J mol⁻¹ K⁻¹); h , Plank sabitine (11.04×10^{-36} J min) ve k_B ise Boltzman sabitine (1.38×10^{-23} J K⁻¹) karşılık gelmektedir [154-156].

2.2.7.3. Enzim Kinetiği

Serbest ve immobilize lakkaz'ın aktiviteleri optimum şartlarda farklı substrat derişimlerinde (0.01-1.0 mM) ölçüldü ve Lineweaver-Burk grafiği yardımıyla Michealis-Menten (K_M) sabitini ve maksimum reaksiyon hızı (V_{max}) değerleri belirlendi.

2.2.7.4. Depolama Kararlılığı

Depolama sıcaklığı ve süresinin lakkaz enziminin aktivitesi üzerine etkisini incelemek için serbest, Kit-RGO ve Kit-RGO-Fe₃O₄ üzerine immobilize edilen lakkaz enzimi 4 °C'de depolandı ve belli sürelerde aktiviteleri ölçüldü.

2.2.7.5. Serbest ve Immobilize Lakkaz Enziminin Organik Çözücülerdeki Stabilitesi

Organik çözücülerin enzim aktivitesi üzerine etkilerini belirlemek üzere serbest, Kit-RGO ve Kit-RGO-Fe₃O₄ üzerine immobilize edilen lakkaz enzimi farklı konsantrasyonlardaki (% 0, %

10, % 30 ve % 50) metanol, etanol, DMSO, asetonitril organik çözücülerini içerisinde 30° C'de 24 saat bekletildi. Daha sonra hazırlanan ABTS ile enzim aktiviteleri ölçüldü.

2.2.7.6. Serbest ve İmmobilize Lakkaz Enzimi Üzerine Bazı İnhibitörlerin Etkisi

Serbest ve Kit-RGO ile Kit-RGO-Fe₃O₄ üzerine immobilize edilen lakkaz enzimi üzerine bazı denatüre edici kimyasalların etkisini belirlemek için kompozit boncuklardan 10 mg tartıldı. 30 µM NaN₃, 30 µM Sistein, 30 µM EDTA çözeltilerinde 30 dakika 35 °C'de inkübe edildi. Kontrol grubu olarak inhibitör kullanılmadan hazırlanan standart reaksiyon karışımındaki enzimlerin aktiviteleri kullanıldı. İnhibisyon yüzdesi ise aşağıdaki formülden hesaplandı [157]:

$$\text{İnhibisyon (\%)} = [(A_o - A_i) / A_o] \times 100 \quad (12)$$

Bu eşitlikte, A_o: inhibitör kullanmadan belirlenen enzim aktivitesini ve A_i: inhibitör varlığında enzim aktivitesini ifade eder.

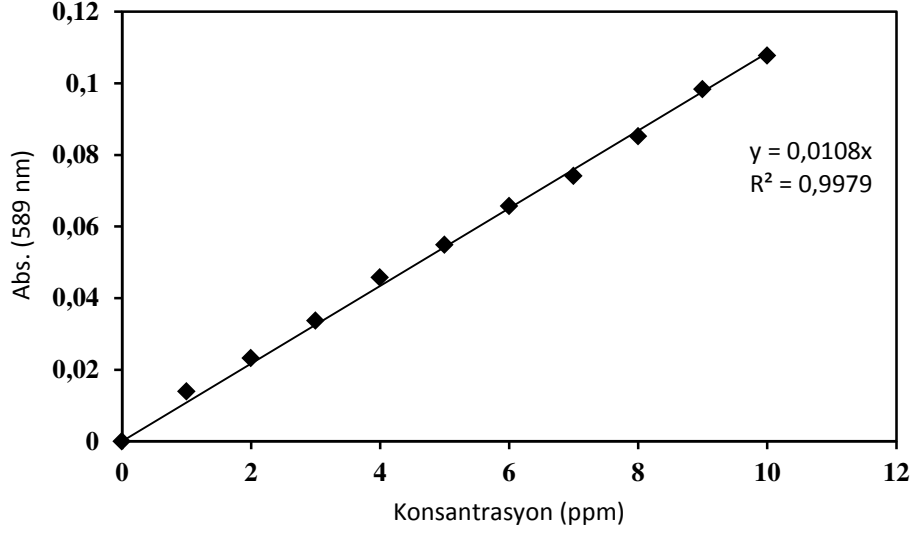
2.2.8. Kit-RGO ve Kit-RGO-Fe₃O₄ Üzerine İmmobilize Edilen Lakkaz ile Boya Giderimi

Lakkaz enziminin boya giderimindeki etkinliğini belirlemek için bir tekstil boyası olan Reaktif Mavi 21 (RM 21) boyası ile çalışıldı. Boya giderimini incelemek üzere absorbansı, maksimum dalga boylarında çift ışınlı Perkin Elmer spektrofotometresi ile ölçüldü. Yüzde boya giderimi aşağıdaki denkleme göre hesaplandı [113,145,158]:

$$\text{Boya giderimi (\%)} = [(A_o - A_t) / A_o] \times 100 \quad (13)$$

Bu formülde, A_o: boyanın başlangıç absorbansını ve A_t: giderim sonrası boya absorbansını ifade etmektedir.

RM 21 standart grafiği oluşturulmak üzere, 1-10 ppm arasında değişen konsantrasyonlarda boya çözeltileri hazırlanarak maksimum dalga boyunda (589 nm) absorbansları okundu ve elde edilen değerlere göre standart grafiği oluşturuldu (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Reaktif Mavi 21 boyasının standart grafiği

2.2.8.1. Boya Giderimini Etkileyen Faktörler

Her bir deney seti üç defa tekrarlanıp, değerlerin ortalamaları alınarak sonuçlar elde edildi.

2.2.8.1.1. Boya Giderimi Üzerine pH Etkisi

Reaktif Mavi 21'in giderimine pH etkisinin incelenmesi, 0.1 M sodyum asetat (pH 3.0-4.0) ve 0.1 M potasyum fosfat (pH 5.0-8.0) tamponları kullanılarak hazırlanan boya çözeltileriyle yapıldı. Enzim immobilize edilen boncuklardan 100 mg alınıp, üzerine 10 mL (25 mg L⁻¹) farklı pH'larda hazırlanmış boya çözeltileri ilave edilerek 130 rpm'de oda sıcaklığında inkübe edildi. Enzimle muamele edilen boya çözeltilerinin absorbans ölçümleri alınıp yüzde boya giderim değerleri hesaplandı.

2.2.8.1.2. Boya Giderimi Üzerine Reaksiyon Süresinin Etkisi

Enzim immobilize edilen 100 mg Kit-RGO ve Kit-RGO-Fe₃O₄ boncukları 10 mL (25 mg L⁻¹) pH 5.0'da hazırlanmış boya çözeltileri ile farklı süreler boyunca (30, 45, 60, 180, 300 dk, 24 ve 48 saat) 130 rpm'de oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası enzimle muamele edilen boya çözeltilerinin absorbans ölçümleri alınarak yüzde boya giderim değerleri hesaplandı.

2.2.8.1.3. Boya Giderimi Üzerine Boya Konsantrasyonunun Etkisi

Enzim immobilize edilen 100 mg Kit-RGO ve 100 mg Kit-RGO-Fe₃O₄ boncukları üzerine 10 mL pH 5.0'da hazırlanan RM 21 boyasının 10-200 mg L⁻¹ arasında değişen konsantrasyonlarından ilave edilerek 1 saat 130 rpm'de oda sıcaklığında inkübe edildi. Bir saatin sonunda, enzim ile muamele edilen boyanın maksimum dalga boyunda absorbens ölçümleri alınarak yüzde boya giderim değerleri hesaplandı.

2.2.8.1.4. Boya Giderimi Üzerine Sıcaklık Etkisi

Enzim immobilize edilen 100 mg Kit-RGO ve 100 mg Kit-RGO-Fe₃O₄ boncukları üzerine 10 mL (25 mg L⁻¹) pH 5.0'da hazırlanan boya çözeltileri ile 1 saat boyunca 20, 25, 30, 40, 50, 60 ve 70 °C'de 130 rpm'de ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrası enzim ile muamele edilen boyanın absorbens ölçümleri alınarak yüzde boya giderim değerleri hesaplandı.

2.2.8.1.5. Boya Giderimi Üzerine Farklı Boncuk Miktarının Etkisi

Enzim immobilize edilen Kit-RGO ve Kit-RGO-Fe₃O₄ boncuklarının 10, 25, 50, 75, 100 mg'ları üzerine 10 mL (25 mg L⁻¹) pH 5.0'da hazırlanan boya çözeltisi konularak 1 saat 130 rpm'de oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası enzim ile muamele edilen boyanın absorbens ölçümleri alınarak yüzde boya giderim değerleri hesaplandı.

2.2.8.1.6. Boya Giderimi Üzerine NaCl Etkisi

100 mg enzim immobilize edilen Kit-RGO ve Kit-RGO-Fe₃O₄ üzerine, 10 mL (25 mg L⁻¹) boya çözeltisinde 100, 300, 500, 1000 mM konsantrasyonlarında olacak şekilde NaCl çözeltisi konularak 1 saat 130 rpm'de oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası enzim ile muamele edilen boyanın absorbens ölçümleri alınarak yüzde boya giderim değerleri hesaplandı.

2.2.8.1.7. Boya Giderimi Üzerine Mediatör Etkisi

Mediatör etkisinin belirlenmesinde, 100 mg lakkaz enzimi immobilize edilen boncukları içeren 10 mL (25 mg L⁻¹) boya çözeltisinin içerisine 0.5, 1.0, 3.0 mM konsantrasyonlarında olacak şekilde katekol ve syringaldazine mediatörlerinden konulup, immobilize enzimler ile 130

rpm'de oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası enzim ile muamele edilen boya çözeltilerinin absorbans ölçümleri alınarak yüzde boya giderim değerleri hesaplandı.

2.2.8.1.8. Boya Gideriminde İmmobilize Lakkazın Tekrar Kullanılabilirliği

Kit-RGO ve Kit-RGO-Fe₃O₄ taşıyıcılarında immobilize edilen lakkazın boya gideriminde tekrar kullanılabilirliğini belirlemek için; immobilize enzimler tamponda hazırlanmış boya çözeltileriyle 3 saat inkübe edildi ve enzim immobilize edilen boncuklar reaksiyon ortamından ayrılarak immobilize enzimlerin aktivite değerleri ölçüldü. İmmobilize enzim ile muamele edilen boyanın absorbans değerleri 589 nm'de ölçülüp yüzde boya giderim değerleri hesaplandı. Bu işlemler, 10 ardışık döngüyü oluşturacak şekilde her seferinde kullanılan immobilize boncukların tampon çözeltisi yıkanması ile tekrarlandı.

2.2.8.1.9. Fitotoksisite Çalışması

Fitotoksisite çalışması, immobilize enzim ile muamele edilmiş ve edilmemiş boya çözeltilerinde bitki tohumlarının çimlendirilmesiyle yapıldı. Çalışmada *Cicer arietinum* (nohut) ve *Hordeum vulgare* (arpa) bitki tohumları karanlık ortamda, boya ve immobilize enzim ile muamele edilmiş olmuş boya çözeltileriyle 1 hafta inkübe edildikten sonra, hem boya çözeltilerindeki hem de deiyonize su içerisindeki tohumların, tohum çimlenme yüzdeleri ve kök uzunlukları ölçülerek yapıldı. Deiyonize suda büyütülen tohumlardan elde edilen değerler kontrol grubu değerleri olarak alındı ve bitki tohumlarının çimlenme indeksi değerleri aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı [159];

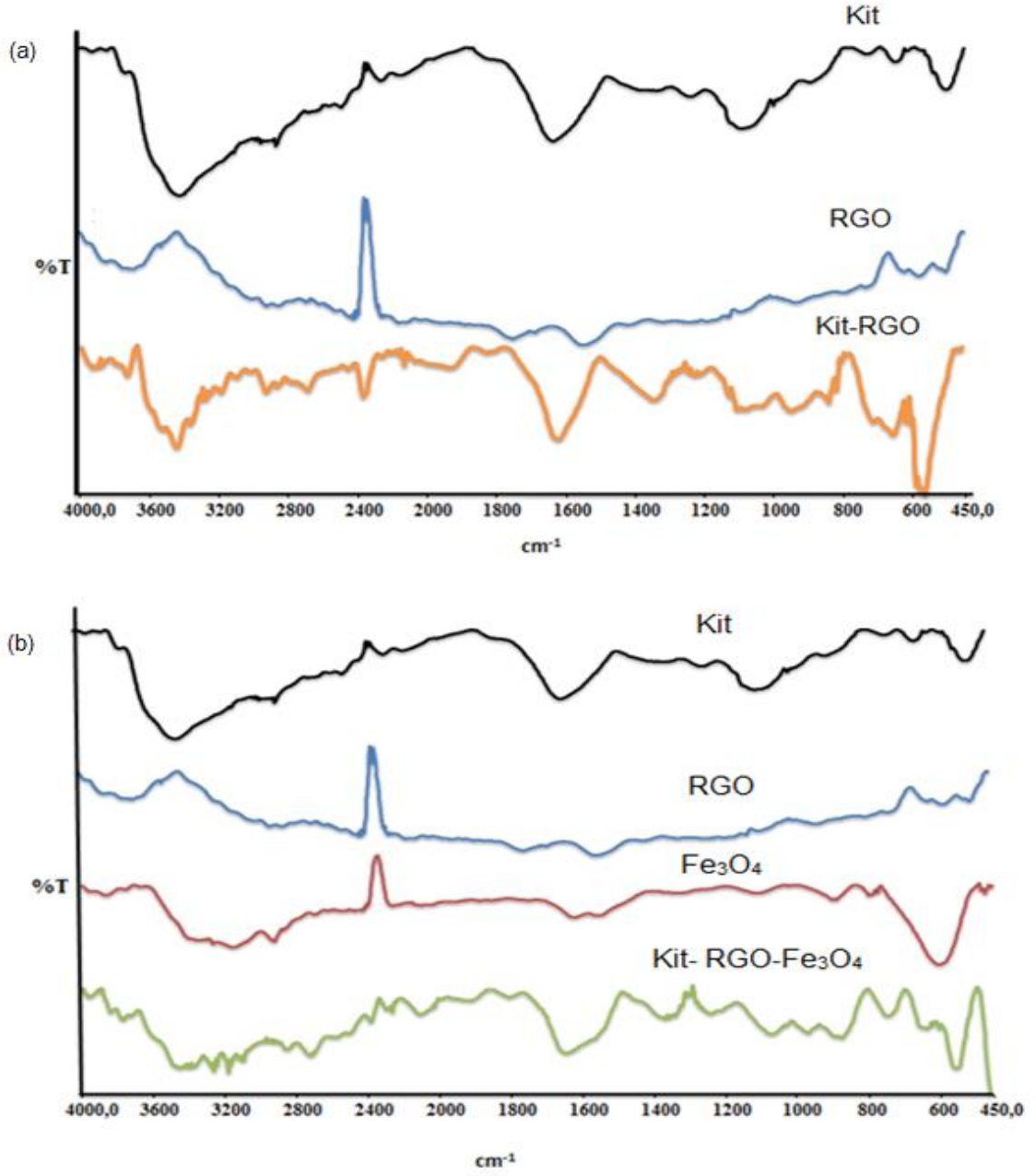
$$GI = GP \times (La / Lc) \quad (14)$$

Bu eşitlikte, GI, çimlenme indeksi; GP, kontrol grubunda çimlenen tohum sayısının yüzdesi; La, boya çözeltileri ile büyütülen tohumların ortalama kök uzunluğu; Lc, kontrol grubundaki tohumların ortalama kök uzunluğudur.

3. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

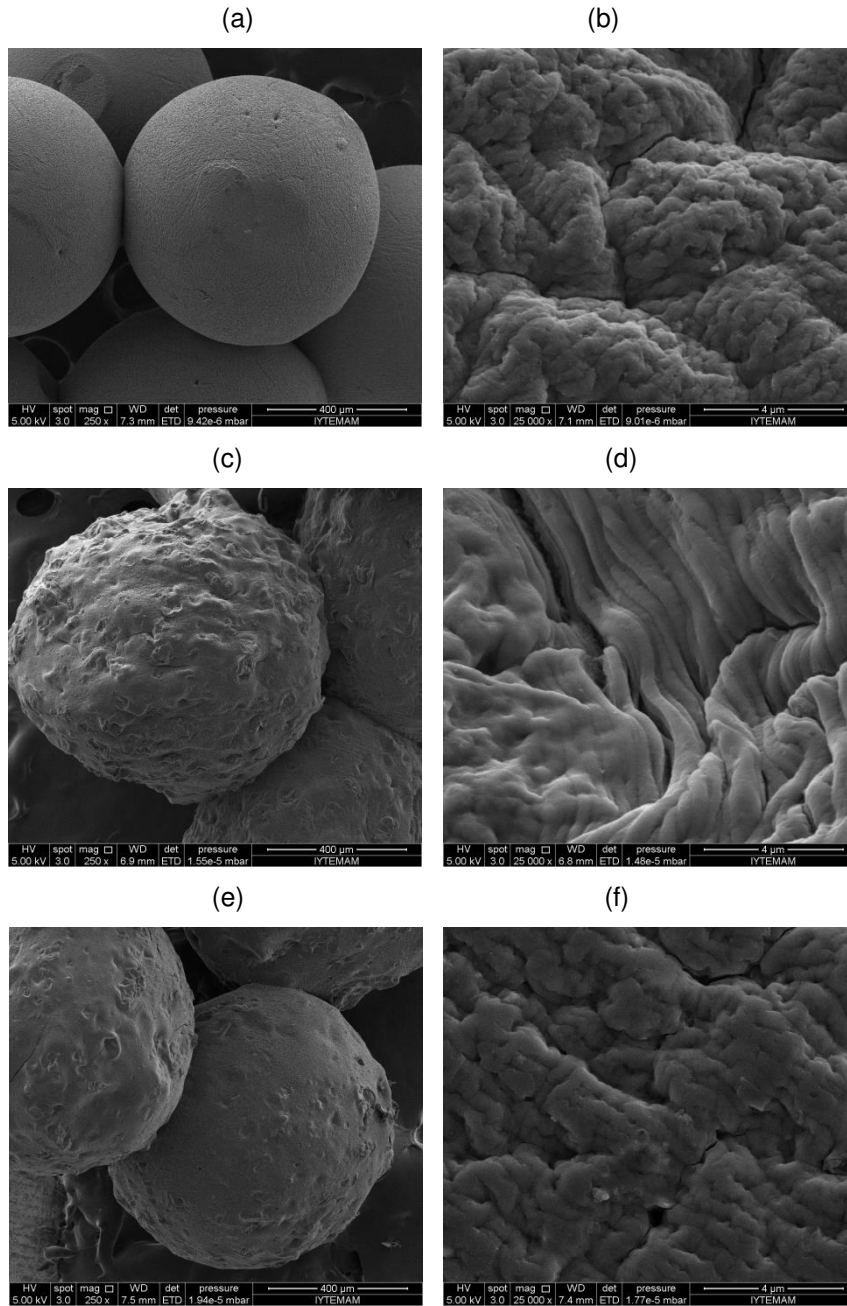
3.1. Kit-RGO ve Kit-RGO-Fe₃O₄ Boncuklarının Karakterizasyonları

Kitosan ve kompozit boncukların hazırlanmasında kullanılan indirgenmiş grafen oksit ve manyetite ait FTIR spektrumları Şekil 3.1 (a)–(b)’de görülmektedir. Kitosanın IR spektrumu değerlendirildiğinde 3400 cm⁻¹’deki güçlü bant O-H gerilme titreşimi, N-H bağı uzama titreşimi ve polisakkaritin yapısındaki molekül içi hidrojen bağlanmaları nedeniyledir. 1636 cm⁻¹’deki pik ise kitosandaki C=O gerilme titreşiminden kaynaklanan piktir. 1027 cm⁻¹’deki bant (amino grup bandı) C-N gerilme titreşimine ve 1096 cm⁻¹’deki bant ise hidroksil grubunun gerilme titreşimine dayandırılabilir. Kitosanın 1131 cm⁻¹’deki karakteristik bandından polisakkaritin birimlerindeki (1-4) glukozidik bağlarının, 1028 cm⁻¹’deki bandından ise glikozun halkasal yapısındaki C-O-C bağlarının gerilme titreşiminin ve 1060-1015 cm⁻¹’dekilerden ise halkasal bileşiğin CH-OH bağlarının sorumlu olduğu görülmektedir [43]. İndirgenmiş grafen okside ait spektrumda, 3689 cm⁻¹, 2422 cm⁻¹ ve 1618 cm⁻¹’de görülen pikler yapıdaki O-H gruplarının ve aromatik C=C’ların gerilme titreşimleri ile ilişkilendirilebilir. Bu çalışmada indirgeyici kimyasal olarak eklenen hidrazinin epoksit halkalarını kolaylıkla açarak hidrazino alkol oluşturduğu bilinmektedir [65]. Elde edilen RGO’ya ait spektrum oksijen içeren fonksiyonel grupların büyük bir kısmının hidrazin ile indirgeme sırasında, grafen oksitten uzaklaştırıldığını ortaya koymaktadır [160]. Fe₃O₄’ün IR spektrumunda ise 600 cm⁻¹’deki bant Fe-O titreşimini gösterirken 1618 cm⁻¹’deki bandı NH₂ grubuna dayandırılabilir. NH₂’nin karakteristik bandı, sadece ‘Fe₃O₄’ partiküllerinde 1618 cm⁻¹’de gözlenmektedir. NH₂ grubu, sudan gelen OH titreşimi tarafından olası bir engellenmeden dolayı 3400cm⁻¹’de NH titreşimi görülmemesi söz konusu olabilir [161]. Xiao ve ark., (2012) 608 cm⁻¹ civarındaki pikin manyetik parçacıkların varlığını doğrulayan, Fe-O titreşimine ait olduğunu rapor etmişlerdir [162]. Kit-RGO-Fe₃O₄ ‘ün spektrumunda görüldüğü gibi, Narayanan ve ark., çalışmalarında yaklaşık olarak 1600 cm⁻¹’deki pikin sp² hibridizasyonuna sahip bal peteği yapısındaki aromatik C=C titreşimlerinin gösterdiğini belirtmiştir [163]. Yao ve ark., ise 1618 cm⁻¹’deki pikin aromatik C=C ve 1035 cm⁻¹’deki pikin ise alkoksi gerilmelerinden kaynaklandığı rapor etmişlerdir [160].



Şekil 3.1. Kitosan kompozit boncukların IR spektrumları

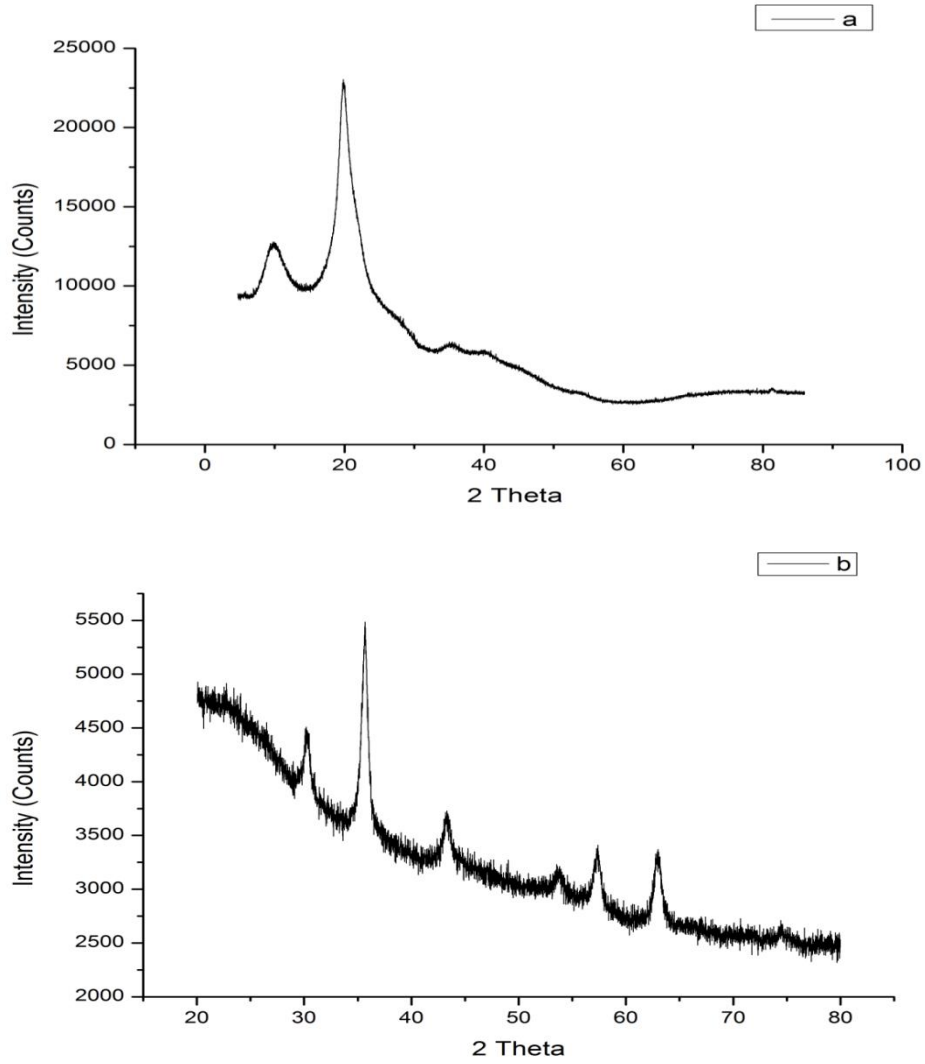
SEM görüntüleri (Şekil 3.2) incelendiğinde kitosan ile oluşturulan boncukların yüzey morfolojisinin 250 kat büyütmede küresel formda ve düzenli yapısının olduğu; 25 000 kat büyütmede ise boncuk yüzeylerinde derin olmayan hafif bir çatlak görülmektedir. Li ve ark., (2013) kitosanın pürüzsüz ve düz bir morfolojisinin olduğunu rapor etmişlerdir [164]. Kitosan kompozit boncuklarının SEM mikrofotografılarında, boncuk duvarlarının kitosan boncuk duvarlarına göre hafif içe göçük bir görüntü sergiledikleri gözükmemektedir (Şekil 3.2 c-e).



Şekil 3.2. Kitosan kompozit boncukların SEM görüntüleri (250 kat- 25 000 kat) (Kitosan (a-b); Kit-RGO (c-d); Kit-RGO-Fe₃O₄ (e-f))

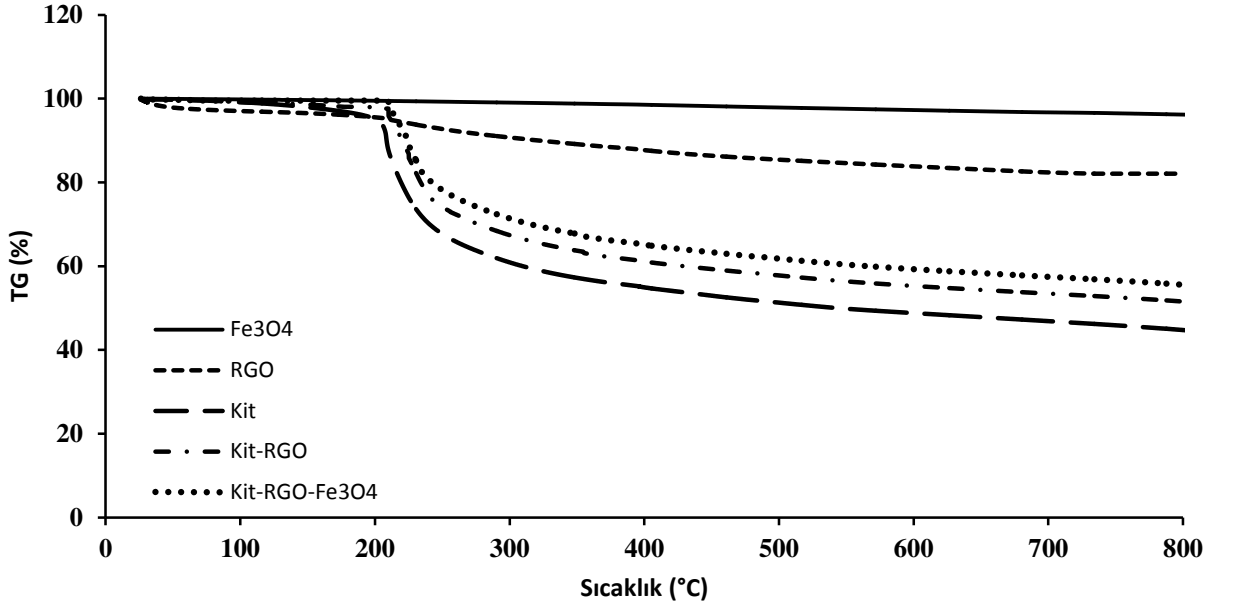
Şekil 3.3’de kitosan ve kitosan kompozit boncuklarının XRD spektrumları verilmektedir. Çalışmada, kitosana ait X-Ray difaktogramında kristal bir yapı sergilediği görülmektedir. Ayrıca manyetik kitosan kompozit boncuğun XRD spektrumunun, Fe₃O₄ parçacıklarının (Referans kodu 98-004-9549, 98-005-6120), X-ışını kırınım spektrumuyla, birebir örtüştüğü görülmektedir

(Şekil 3.3). $2\theta = 10^\circ$ ve 20.09° pikleri için, Li ve ark., (2013) çalışmasında kitosanın XRD spektrumu sonuçlarına göre kristal yapıda olduğunu rapor etmişler [164]; bunun aksine, Acharyulu ve arkadaşları (2013) kitosan için yarı kristal yapıda olduğunu rapor etmişlerdir [165]. Haldori ve ark., (2013) ise kitosana ait XRD kırınımında 19.77° deki geniş pikin polimerin amorf yapısını gösterdiğini belirtmiştir [166]. Çalışmamıza benzer olarak Hong ve arkadaşlarının (2007) karboksillendirilmiş süperparamanyetik nanojeller üzerine immobilizasyon çalışmasında, Fe_3O_4 ile bu nanojellerin XRD spektrumunun özdeş çıktığını rapor edilmiştir. Nanojellin XRD spektrumu incelendiğinde, $2\theta = 30.1, 35.3, 43.2, 53.5, 57.0$ ve 62.8 derecelerindeki kesin piklerin Fe_3O_4 'e ait olduğunu bildirmişlerdir [167]. Xiao ve ark., (2012) çalışmasında $2\theta = 25.1^\circ$ merkezli difraksiyon pikinin kimyasal olarak indirgenmiş grafen oksiti belirttiğini ve geniş piklerin ise grafenin tabakalarının zayıf istiflenmeler yönünde düzenlenmiş olmasından görüldüğünü ifade etmişlerdir [162].



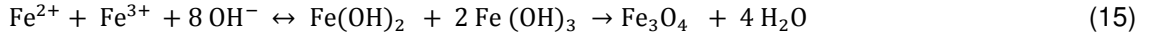
Şekil 3.3. Kitosan kompozit boncukların XRD spektrumları (Saf Kitosan (a); Kit-RGO- Fe_3O_4 (b))

TGA, çeşitli organik veya inorganik esaslı maddelerin bozunma sıcaklıkları, nem içeriğini anlamak için yararlı bir tekniktir [165]. Kompozit boncukların, termal bozundurulması sonucundaki TGA eğrileri Şekil 3.4'de verilmektedir. TGA spektrumunda 300 °C için Fe_3O_4 , RGO, Kit, Kit-RGO ve Kit-RGO- Fe_3O_4 boncukları için % TG değerleri sırasıyla % 99.05, % 90.72, % 60.90, % 67.40 ve % 71.40'dır. 500 °C'de Fe_3O_4 , RGO, Kit, Kit-RGO ve Kit-RGO- Fe_3O_4 boncukları için kütle kaybı değerleri ise sırasıyla % 2.12, % 14.58, % 48.71, % 42.22 ve % 38.22 olarak bulunurken 800 °C için kütle kayıpları sırasıyla % 3.82, % 17.92, % 55.26, % 48.46 ve % 44.45 olduğu hesaplandı. Kompozit boncukların TGA eğrileri ile kitosanın TGA eğrisi karşılaştırıldığında daha fazla termal stabiliteye sahip olduğu açıkça görülmektedir. Acharyulu ve arkadaşları (2013), kitosanın TGA spektrumunun % 65'nin 840 °C civarında bozunduğunu göstermişlerdir. Ayrıca çalışmalarının sonucunda kitosanın % 65'inin bozunduğunu ve % 35.07'sinin tortu benzeri formda geri kaldığını rapor etmişlerdir [165]. Shouman ve arkadaşları da yaptıkları çalışmada (2012), kitosanın 100 °C'ye kadar olan sıcaklık aralığında, kütle kaybının (% 5.26) nemin uzaklaştırılması nedeniyle olduğunu, 216-316 °C civarındaki ikinci aşamasında % 24.5'luk kütle kaybının depolimerizasyon reaksiyonlarından kaynaklandığını bulmuşlardır. 316-600 °C aralığındaki sıcaklıkta ise % 10.08'lik kütle kaybı görüldüğünü rapor etmişlerdir [168]. El-Hefian ve arkadaşlarının (2010) çalışmasında ise kitosanın TGA eğrisinde 2 basamakta kütle kaybı gözlemlendiği ifade edilmiş, birinci basamakta 30 ile 145 °C arasında nemin buharlaşması nedeniyle % 5'lik kütle kaybının olduğuna, ikinci basamağın ise yaklaşık 150 °C civarında başladığına ve % 47 kütle kaybının olduğuna, bunun ise kitosanın dekompozisyonundan kaynaklandığına, 500 °C'de ise toplam kütle kaybının % 52 olarak bulunduğuna vurgu yapılmıştır [169]. Stankovich ve arkadaşları (2007) indirgenmiş grafen oksit için, kimyasal indirgemeler yoluyla termal olarak kararsız oksijen içeren fonksiyonel grupların uzaklaştırılması ile termal stabilitesinin artırdığına dikkat çekmişlerdir. 100 °C'deki küçük kütle kaybının adsorbe edilen suyun uzaklaştırılmasından olabileceğini ve 800 °C'ye kadar önemli bir kütle kaybının tespit edilmediğini belirtmişlerdir [65]. Arsalani ve ark., (2010) Fe_3O_4 'ün TGA eğrisinde toplamda % 3.2'lik olarak görülen kütle kaybının adsorbe edilen fiziksel ve kimyasal suyun uzaklaştırılması nedeniyle olduğunu rapor etmişlerdir [170]. Mohammadi ve ark., (2013) tarafından Fe_3O_4 'ün TGA eğrisinde görülen ilk kütle kaybının, 250 °C'den daha az bir sıcaklıkta fiziksel olarak adsorbe edilen suyun uzaklaşması nedeniyle, ikinci kütle kaybının ise sentezi sırasında Fe_3O_4 nanopartikülünün yüzeyine absorbe olan hidroksil gruplarından kaynaklandığı ifade edilmiştir [171].

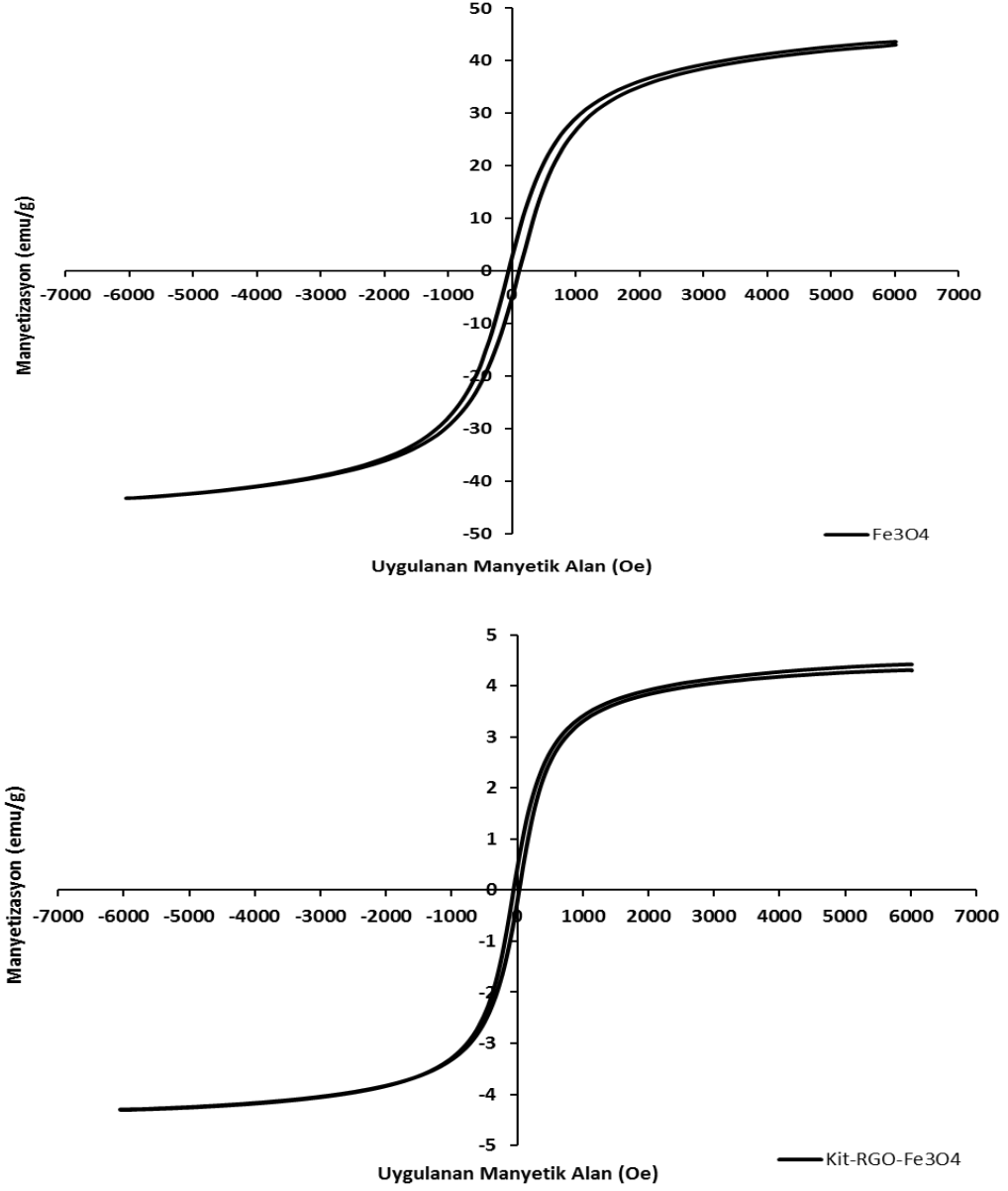


Şekil 3.4. Kitosan kompozit boncukların TGA eğrileri

Kit-RGO-Fe₃O₄ boncuklarının hazırlanması için kullanılan manyetit parçacıkları Fe²⁺: Fe³⁺ katyonlarının sulu ortamda kuvvetli bir bazla çöktürülmesi reaksiyonu sonucu elde edilir. Reaksiyonun prensibi şöyledir [172]:



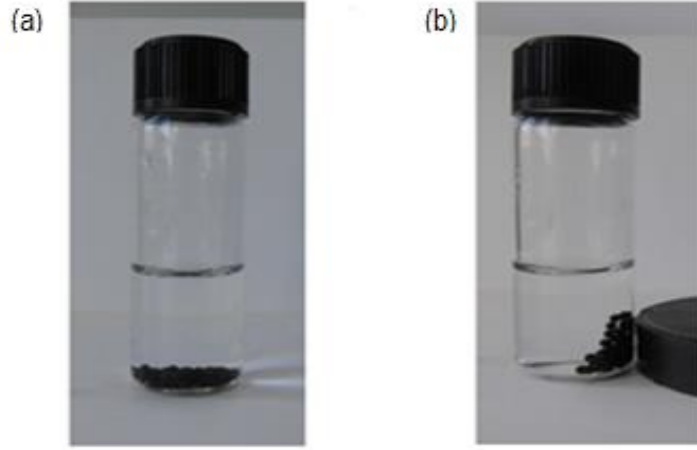
Manyetometri cihazından alınan verilere göre sentezlenen Fe₃O₄ ve Kit-RGO-Fe₃O₄ boncuklarının 298 K'de manyetizasyon doygunluğunu sırasıyla 43.66 emu g⁻¹ ve 4.41 emu g⁻¹ 'dır. Sentezlenen Fe₃O₄ ve manyetik kitosan kompozit boncuğun manyetik alan şiddetinin değişim eğrisi Şekil 3.5'de verilmektedir.



Şekil 3.5. Fe_3O_4 ve Kit-RGO- Fe_3O_4 'ün manyetik alan şiddetinin değişim eğrileri

Literatürdeki deneysel verilere göre manyetik partiküllerin doyum manyetizasyonu değerlerinin, 30 - 50 emu g^{-1} aralığına karşılık geldiği rapor edilmiştir [173]. Xu ve arkadaşları (2013) araştırmalarında Fe_3O_4 'ün manyetizasyon doygunluğu (M_s) 47.90 emu g^{-1} ve silanlanmış manyetik nanopartikülün manyetizasyon doygunluğu ise 33.00 emu g^{-1} olarak bulmuştur [174]. Wang ve arkadaşları (2013) çalışmalarında Fe_3O_4 'ün manyetizasyon doygunluğunu 71.9 emu g^{-1} olarak bulmuşlar ve yüksek manyetizasyon doygunluğunun iyi bir kristal yapıya sahip olduğunu gösterdiğini ifade etmişlerdir [51]. Liu ve arkadaşları (2012)

çalışmalarında, lakkaz enziminin immobilizasyonda kullanılan karbon temelli manyetik kompozitin manyetizasyon doygunluğunu 4.1 emu g^{-1} olarak saptamış ve bu manyetizasyon değerinin dışarıdan bir manyetik alan uygulandığında, materyalin sulu çözelti ortamından ayrılmasına olanak sağlayabileceği rapor edilmiştir [175]. Çalışmamızda enzim immobilizasyon için kullandığımız Kit-RGO-Fe₃O₄ boncuklar oda sıcaklığında dışarıdan bir manyetik alan uygulandığında çözelti ortamından kolaylıkla ayrılabilir (Şekil 3.6).

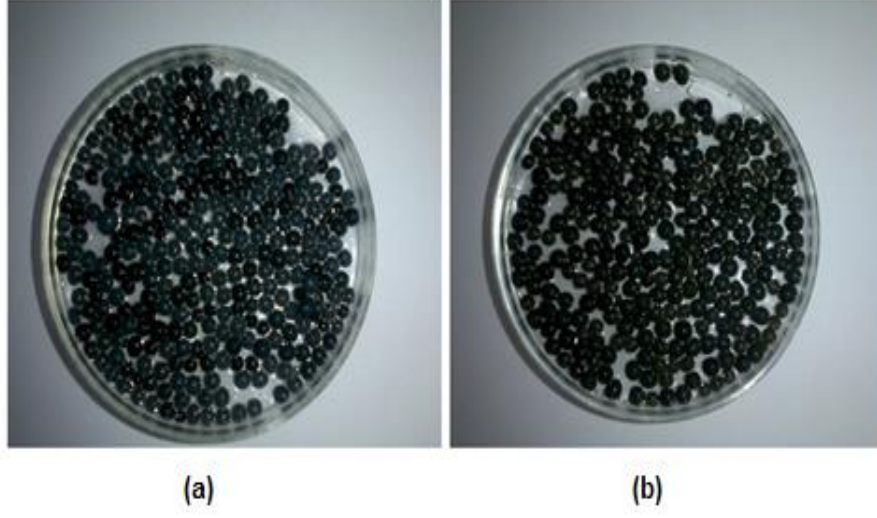


Şekil 3.6. Kit-RGO-Fe₃O₄ boncukların dış manyetik alan uygulanmadığında ve uygulandığında görünümü

İmmobilize enzimlerin reaksiyon ortamından kolaylıkla uzaklaştırılabilmesine ve tekrar kullanabilmelerine olanak sağladığı için son yıllarda manyetik taşıyıcılara yönelik çalışmalar oldukça dikkat çekmektedir. Manyetik partiküllerin kullanılması enzim immobilizasyonu için aşağıdaki avantajlara sahiptir:

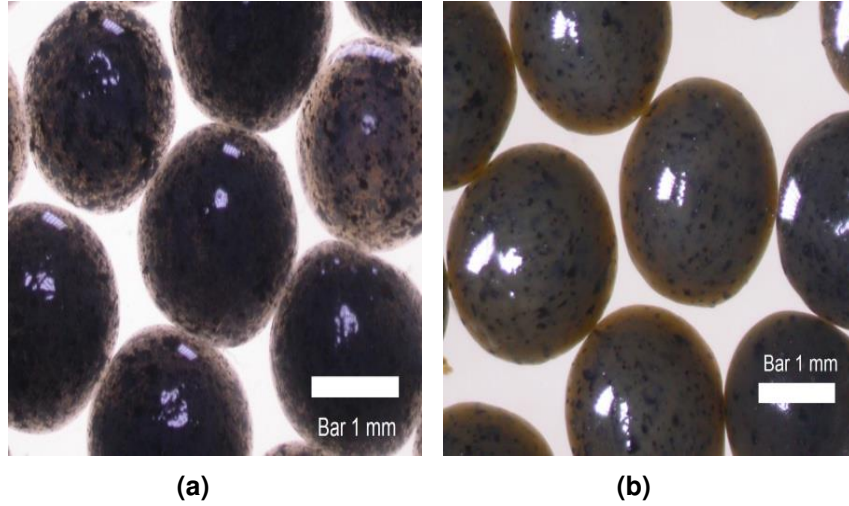
- Yükleme etkinliği için daha fazla spesifik yüzey alanı sağlamak,
- Daha az kütle transferi direnci ve daha az kirlenme,
- Manyetik alan altında immobilize enzimlerin daha seçici olarak ayrılması ve dolayısıyla daha düşük işlem maliyeti,
- Enzim katalizli tepkimeler için sürekli sistemlerde uygulama [176].

Hazırlanan Kit-RGO ve Kit-RGO-Fe₃O₄ boncukları petri kabındaki genel görünümüne ilişkin fotoğrafı Şekil 3.7’de verilmektedir.

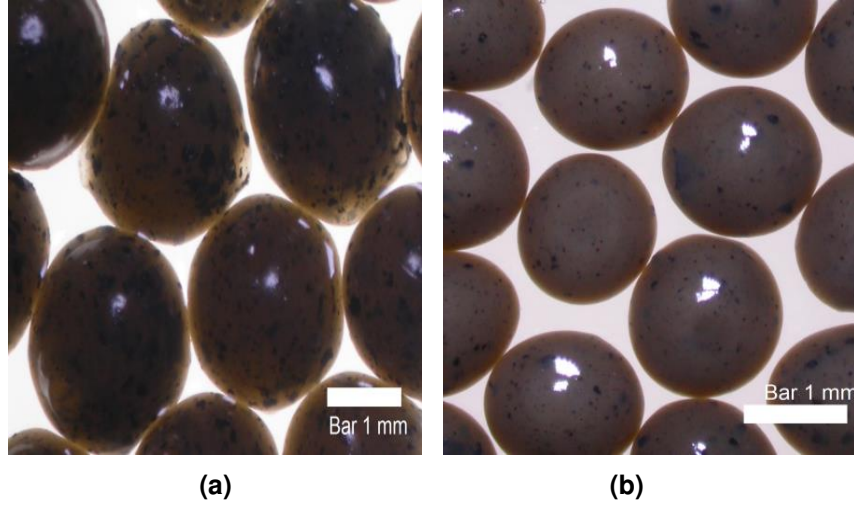


Şekil 3.7. Kit-RGO boncuklarının (a) ve Kit-RGO-Fe₃O₄ boncuklarının (b) petri kabındaki görünümü

Olympus SZ 51 model mikroskopa çekilen Kit-RGO ve Kit-RGO-Fe₃O₄ boncukların mikroskopik fotoğraflardan elde edilen boyutlar sırasıyla yaklaşık olarak 1.3 ± 0.2 mm ve 1.4 ± 0.3 mm olarak belirlendi. Üzerinde enzim immobilize edilmiş boncuklar ve immobilizasyonda kullanılmak üzere hazırlanan boncuklar arasında boyut farkı gözlenmedi (Şekil 3.8 ve Şekil 3.9).



Şekil 3.8. Kit-RGO boncuklarının immobilizasyon öncesi (a) ve sonrası (b) görünümü



Şekil 3.9. Kit-RGO-Fe₃O₄ boncuklarının immobilizasyon öncesi (a) ve sonrası (b) görünümü

Lakkaz enziminin immobilizasyonu sonrasında yapılan aktivite ölçümlerinde en uygun glutaraldehit konsantrasyonu % 4 olarak belirlendi. Literatürde, Yang ve arkadaşları (2006) modifiye kitosan üzerine lakkaz immobilizasyonu çalışmalarında % 1'lik glutaraldehiti [71], Spinelli ve arkadaşları (2013) % 3'lük glutaraldehiti [147], Pavlidis ve arkadaşları (2012) % 4'lük glutaraldehiti [177], Zhang ve arkadaşları (2009) % 5'lik glutaraldehiti [146], Jiang ve arkadaşları (2005) manyetik kitosan mikrosferleri üzerine lakkaz immobilizasyonu çalışmalarında % 8'lik glutaraldehiti [28], Hai-Yan ve arkadaşları (2006) ile Silva ve arkadaşları (2007) ise çalışmalarında % 10'luk glutaraldehiti kullandıklarını belirtmişlerdir [145,178]. Zhang ve arkadaşları (2009) glutaraldehitin çapraz bağlamaya ek olarak lakkazı denatüre ettiğini bildirmişlerdir [146]. Ayrıca, yüksek glutaraldehit konsantrasyonlarında kitosanın amino grubu ile glutaraldehitin reaksiyonunun artması sonucu kitosanın lakkazla etkili bir şekilde bağlanmasında azalmaya yol açtığına rapor etmişlerdir [146]. Spinelli ve arkadaşları da çalışmalarında, benzer şekilde yüksek glutaraldehit konsantrasyonlarının enzim yapısında bozulmalara, aktivitesinde azalmalara neden olduğunu bildirmişlerdir [145]. Çalışmalarında, asidik veya nötral ortamda, glutaraldehitin monomerlerinin (serbest aldehit formu veya siklik hemiasetal) karışımı şeklinde veya polimeri (siklik hemiasetal oligomer) olarak bulunup enzimin lizin artıklarının ε-amino gruplarına nükleofilik saldırı yaparak Schiff bazı oluşturduklarını rapor etmişlerdir. Schiff bazıları asidik koşullar altında kararsızdır [145]. Bazı koşullar altında, amin ile α,β-doymamış oligomerik aldehitin reaksiyonu asit hidrolizine karşı dayanıklı bir Schiff bazı ve bir Michael katılma ürünü olmak üzere 2 ürün verebilir. Asidik koşullar altında glutaraldehitin çapraz bağlanma kinetiğinin, bazı veya nötral koşullar altındaki çapraz bağlanma kinetiğinden daha yavaş olduğu bilinmektedir [145].

Çalışmamıza benzer şekilde, Champagne ve Ramsay (2010) tarafından yapılan çalışmalarında lakkaz enzimi glutaraldehit ile 2 saat boyunca çapraz bağlanmış ardından pH 5.0 fosfat tamponuyla hazırlanmış lakkaz enzim çözeltisi ile 36 saat 4 °C'de inkübe edilmiştir [179]. Enzimin aktivite ölçümlerini ise Wolfenden ve Willson (1982) tarafından belirlenen yöntemle göre yapmışlardır. Zhang ve arkadaşları da (2009) çalışmalarında çapraz bağlamanın süre ile arttığını ve çalışmaları için en iyi çapraz bağlama süresini 10 saat olduğunu ifade etmişlerdir [146]. Taşıyıcı üzerine immobilize edilen lakkazın miktarının artan reaksiyon süresiyle arttığını ancak aktivitesinin ortamdaki glutaraldehit ile reaksiyonu sırasında azaldığını rapor etmişlerdir [146].

3.2. Taşıyıcı Üzerine Bağlanan Protein Miktarı ve İmmobilizasyon Verimi

Kit-RGO ve Kit-RGO-Fe₃O₄ boncukları üzerine bağlanan protein miktarının bulunması için serbest enzim, filtrat ve yıkama sularında protein tayini yapıldı. Şekilde 2.5'de görülen standart protein eğrisi kullanılarak her bir taşıyıcı için protein miktarları belirlendi ve yükleme etkinlikleri hesaplandı. İmmobilizasyon sonrasında Kit-RGO ve Kit-RGO-Fe₃O₄ boncukları üzerine bağlanan protein miktarları Tablo 6'da verilmektedir.

Tablo 6. Farklı taşıyıcıların üzerine immobilize edilen lakkazın protein miktarları ve yükleme etkinliği

	Kit-RGO	Kit-RGO-Fe ₃ O ₄
Başlangıç Protein Miktarı (mg)	1.0	1.0
Bağlanan Protein (mg)	0.45	0.49
Yükleme Etkinliği (%)	45.76	49.51

İmmobilize lakkazın aktivitesi, gram taşıyıcı başına düşen aktivite olarak hesaplandı. Kompozit boncuklar üzerine immobilize edilen lakkazın aktiviteleri ve immobilizasyon verimleri Tablo 7'de verilmektedir.

Tablo 7. Farklı taşıyıcıların üzerine immobilize edilen lakkazın aktiviteleri ve immobilizasyon verimleri

	Kit-RGO	Kit-RGO-Fe ₃ O ₄
Aktivite (U/g taşıyıcı)	2.37	2.50
İmmobilizasyon Verimi (%)	55.29	57.07

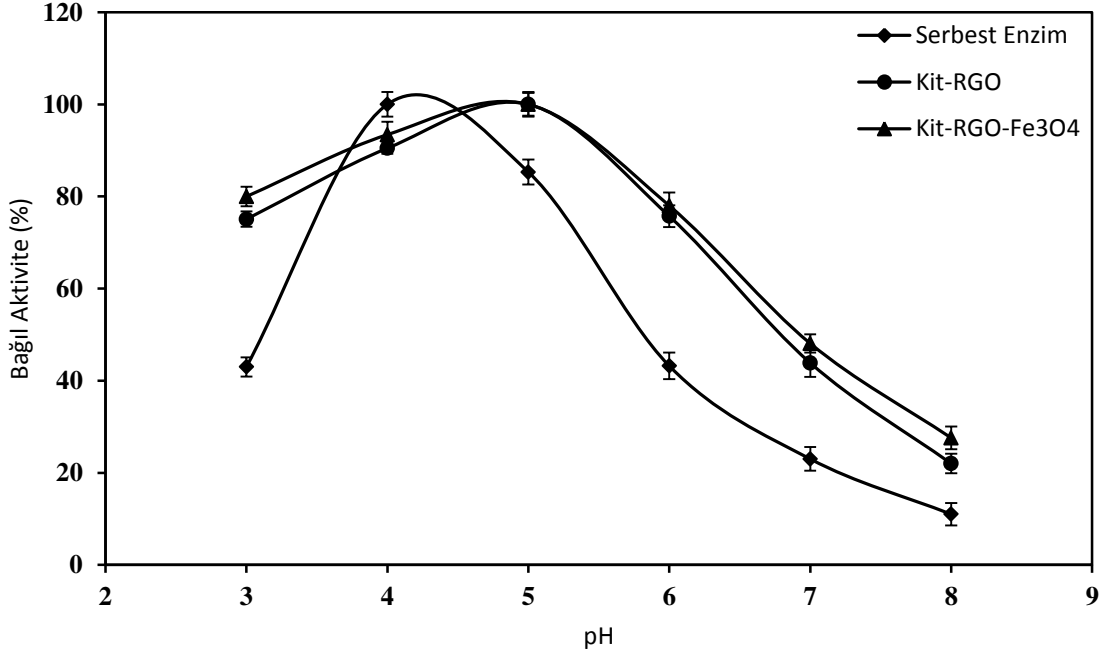
Silva ve arkadaşlarının (2007) aktifleştirilmiş amino grubu olan naylon dokuma kumaşını taşıyıcı olarak kullandıkları çalışmada, protein tutma miktarı % 30 ve immobilizasyon verimi % 2 olarak bulunmuştur [145]. Spinelli ve arkadaşları (2013) Amberlite IR-120 H boncukları üzerine immobilizasyon çalışmasında immobilizasyon verimini % 78 olarak hesaplamışlardır [147]. Kunamneni ve arkadaşları (2008) epoksi taşıyıcılar üzerine immobilize edilen lakkazın, Sepabeads EC-EP3 taşıyıcısı için enzim aktivitesini 203 U g^{-1} , Dilbeads NK taşıyıcısı için enzim aktivitesini 91 U g^{-1} olarak rapor etmişlerdir [109]. Yinghui ve arkadaşları (2002), aktive edilmiş polivinil alkol taşıyıcı üzerine kovalent bağlanmış lakkaz immobilizasyonunda, *Parus conchatus*'dan elde edilen lakkazın maksimum aktivitesini 1.2 U g^{-1} olarak tanımlamıştır [180]. Hai-Yan ve arkadaşları (2006) nanokompozitin üzerine immobilize lakkaz enzimin aktivitesini 1430 U g^{-1} bulmuşlardır [178].

3.3. Serbest ve İmmobilize Edilen Lakkazın Karakterizasyonu

Her bir deney seti üç defa tekrarlandı. Elde edilen değerlerin ortalaması alınarak çizilen grafiklerdeki hata çubukları, yüzde beşten küçük standart hatayı temsil etmektedir.

3.3.1. pH'nin ve Sıcaklığın Etkisinin Belirlenmesi

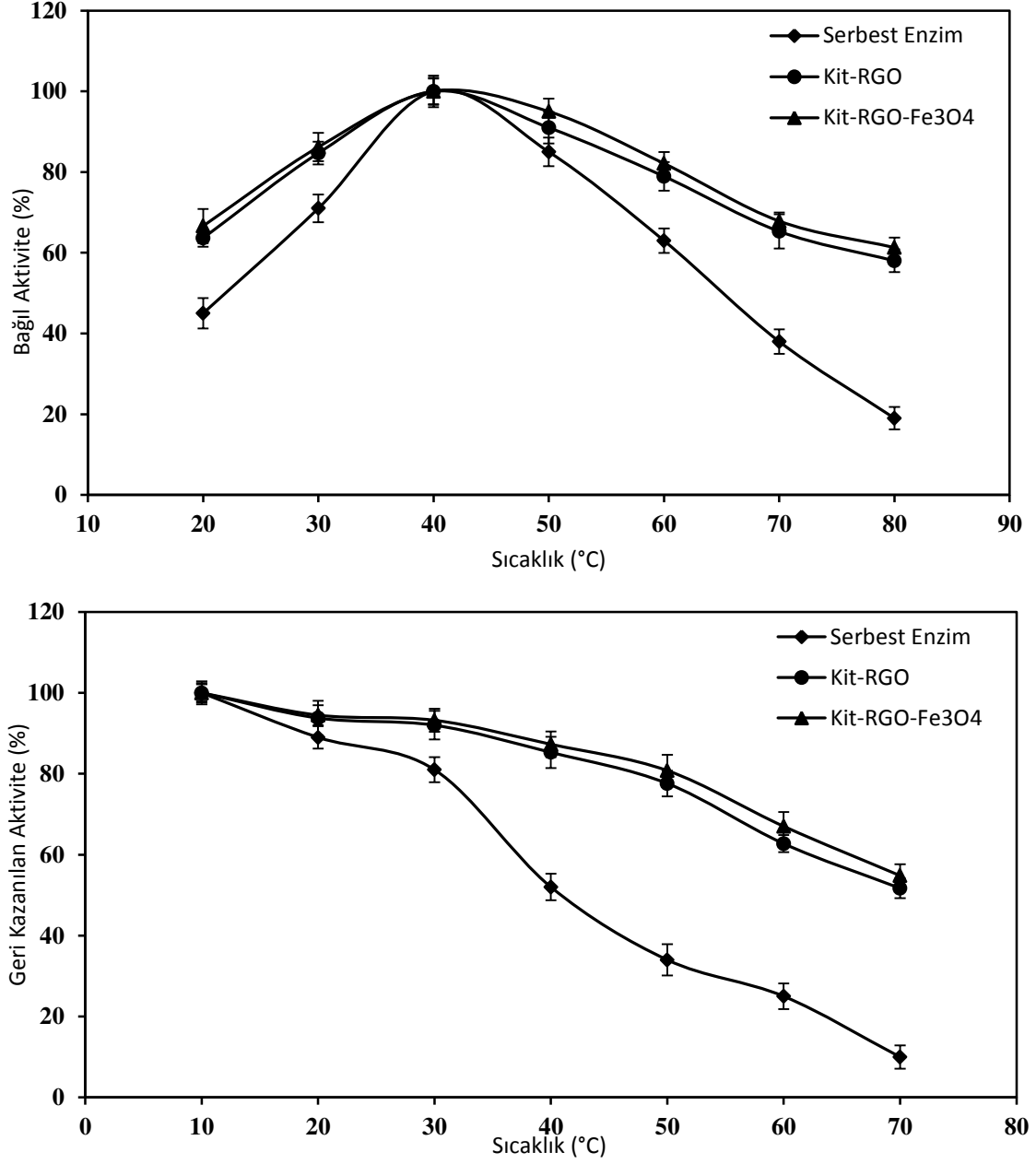
Serbest ve immobilize lakkaz enziminin aktivitesine pH etkisinin belirlenmesinde, pH 3.0-8.0 aralığında substrat olarak ABTS çözeltisi kullanılarak ölçüldü ve yüzde aktivite değerleri hesaplandı. Deneyler sırasında sodyum asetat tamponu (pH 3.0-4.0), potasyum fosfat tamponu (pH 5.0-7.0) ve Tris-HCl tamponu (pH 8.0) kullanıldı. Serbest ve immobilize enzimlerin optimum pH değerleri sırasıyla 4.0 ve 5.0 bulundu (Şekil 3.10). Optimum pH değerleri arasında 1.0 birimlik bazik bölgeye kayma söz konusudur. İmmobilizasyon sonrası enzimin optimum pH değerinde görülen bu kaymanın enzim ve taşıyıcının yüklü yüzeyi arasındaki iyonik etkileşimler nedeniyle olduğu düşünülmektedir.



Şekil 3.10. Serbest ve kompozit taşıyıcıların üzerine immobilize edilen lakkazın optimum pH grafiği

Spinelli ve arkadaşları (2013) çalışmalarında, serbest ve Amberlite IR-120 H boncuklar üzerine immobilize lakkazın optimum pH'sini 4.5 olarak bulmuşlardır [147]. Sathishkumar ve arkadaşları ise (2014) serbest lakkazın optimum pH'sini 5.5 immobilize lakkazın optimum pH'sini ise 6.5 olarak bulmuşlardır [181]. Wang ve arkadaşları da (2010) optimum pH'yi serbest ve immobilize lakkaz enzimleri için sırasıyla 4.0 ve 5.0 olarak bulmuşlardır [182]. Optimum pH'de görülen kaymanın enzim ile desteğin yüzeyindeki gruplar arasında oluşan iyonik etkileşimlerden kaynaklandığını rapor etmişlerdir [182]. Çalışmada kullanılan indirgenmiş grafen oksitten, grafen oksitten farkı yapıda epoksit gruplarının uzaklaştırılması sonucu matriksi üzerinde karboksil gruplarının ($-\text{COOH}$) ve hidroksil iyonlarının (OH^-) bulunmasıdır [65,168].

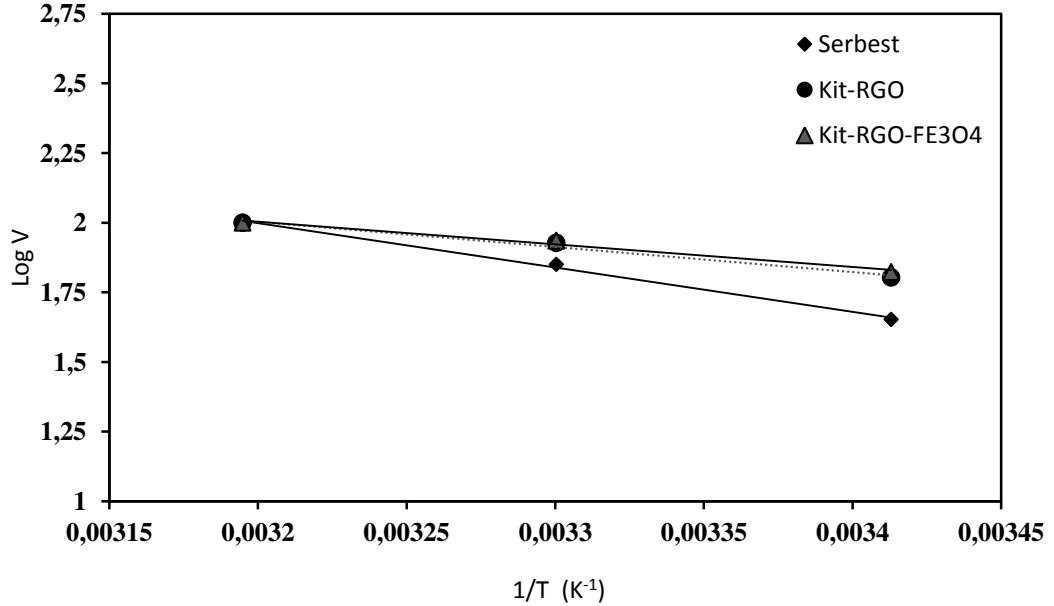
Enzimlerle katalizlenen reaksiyonların hızları sıcaklıkla artmakla birlikte, yüksek sıcaklıklarda enzimlerin protein yapılarından dolayı aktiviteleri azaldıkça bu reaksiyonların hızları azalmaktadır. Reaksiyon hızının maksimuma eriştiği noktadaki sıcaklık derecesine “optimum sıcaklık” denir. Enzimlerin büyük çoğunluğunun optimum sıcaklığı $30 - 40^\circ\text{C}$ 'dir ve 45°C 'nin üzerinde denatürasyon başlar. Çalışmada serbest ve immobilize enzimler için optimum sıcaklık değeri 40°C olarak belirlendi (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. Serbest ve kompozit taşıyıcıların üzerine immobilize edilen lakkazın optimum sıcaklık ve termostabilite grafikleri

Sathishkumar ve arkadaşları (2014) serbest enzim için optimum sıcaklığı 30 °C, immobilize enzim için ise 40 °C olarak belirlemişlerdir [181]. Makas ve arkadaşları (2010) çalışmalarında serbest lakkaz enzimi ve karragenan ile ya poli(akrilamit-akrilik asit) ya da poli(akrilamit-itakonik asit)'te tutuklama yoluyla ile immobilizasyonunda optimum pH'leri sırasıyla 5.0, 5.0 ve 5.5 bulmuşlardır [183]. Ayrıca hem serbest hem de immobilize enzim için

optimum sıcaklık değerini de 40 °C bulmuşlardır. Kunamneni ve arkadaşları (2008) epoksi taşıyıcılar üzerine immobilize edilen lakkazın ve serbest lakkaz enziminin optimum sıcaklığını 60 °C olarak belirlemiştir [109]. Kumar ve arkadaşları (2012) ise ABTS substratı kullanıldığında lakkaz enzimi için optimum pH 4.0 ve sıcaklığı ise 45 °C olarak bulmuşlardır [184]. Ayrıca çalışmalarında fungal lakkazların büyük bir çoğunluğunun hafif asidik koşullar (pH 4.0-6.0) altında fonksiyonel olduğunu ve optimum sıcaklık değerinin 30 – 55 °C arasında olduğunu vurgulamışlardır [184]. Karagöz ve arkadaşları (2011) çalışmalarında serbest lakkazın optimum sıcaklığını 35 °C ve poly(VFA-co-EGDMA) mikrokürecikleri üzerine immobilize lakkazın optimum sıcaklığını 45 °C bulduklarını rapor etmişlerdir [185]. Serbest, Kit-RGO ve Kit-RGO-Fe₃O₄ immobilize lakkaz enzimlerine ait aktivasyon enerjileri için Arrhenius grafiği kullanılarak bulunan eşitlikleri sırasıyla şöyledir: $y = -1592.1x + 7.0931$, $y = -902.59x + 4.8915$ ve $y = -810.65x + 4.5971$. Serbest, Kit-RGO ve Kit-RGO-Fe₃O₄ üzerine immobilize lakkazın E_a değeri sırasıyla 30.48 kJ mol⁻¹, 17.28 kJ mol⁻¹ ve 15.52 kJ mol⁻¹ olarak hesaplandı (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. Serbest ve kompozit taşıyıcıların üzerine immobilize edilen lakkazın Arrhenius grafiği

Elde edilen bulgulara göre lakkaz enziminin yarı ömür süreleri ve D değerleri kovalent immobilizasyon sonrasında tüm sıcaklıklarda dikkate değer ölçüde arttığı bulundu. Bu durum serbest lakkazın termal stabilitesinin, kitosan kompozit taşıyıcıları üzerine immobilize lakkazdan daha düşük olduğunu göstermektedir. Ayrıca bu çalışmada, 40 °C'de serbest enzimin yarı ömrü 63.58 dk, Kit-RGO ve Kit-RGO-Fe₃O₄ üzerine immobilize enzimler içinse sırasıyla 261.32 ve 305.88 dk olarak hesaplandı. Termal denatürasyon için aktivasyon enerjisi (E_d) Arrhenius grafiği kullanılarak tespit edildi. E_d değeri serbest enzim için 35.92 kJ mol⁻¹, Kit-RGO için 43.55

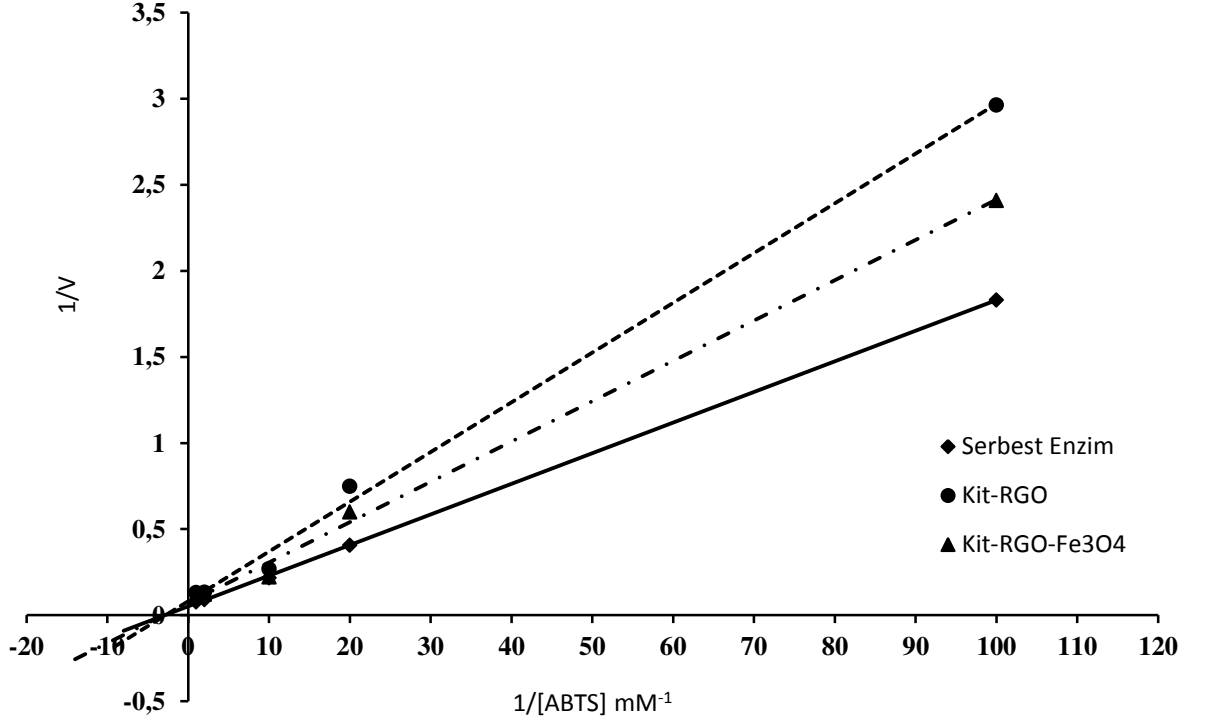
kJ mol^{-1} ve Kit-RGO- Fe_3O_4 için $44.60 \text{ kJ mol}^{-1}$ olarak hesaplandı. Kitosan kompozitleri üzerine immobilize edilen lakkazların Ed değerlerinin, serbest enzimin Ed değerinden daha yüksek olması immobilize enzimlerin daha stabil ve termal denatürasyona karşı daha dirençli olduğunu göstermektedir. 40°C 'de serbest enzimin ΔH° değeri $33.32 \text{ kJ mol}^{-1}$ iken Kit-RGO ve Kit-RGO- Fe_3O_4 kompozit boncukları üzerine immobilize edilen lakkazın ΔH° değeri sırasıyla $40.95 \text{ kJ mol}^{-1}$ ve $41.99 \text{ kJ mol}^{-1}$ olarak hesaplandı (Tablo 8). Enzimin her iki formu içinde artan sıcaklıkla birlikte ΔH° değerinde görülen azalmalar, yüksek sıcaklıklarda enzimin daha az enerji ile denatüre olacağını ortaya çıkarmaktadır. Serbest enzimin 40°C 'de açığa çıkan Gibbs serbest enerji değeri (ΔG°) $99.19 \text{ kJ mol}^{-1}$ iken immobilizasyon sonrasında, sırasıyla Kit-RGO ve Kit-RGO- Fe_3O_4 kompozit boncukları üzerine immobilize edilen lakkazın ΔG° değerleri $102.87 \text{ kJ mol}^{-1}$ ve $103.28 \text{ kJ mol}^{-1}$ olarak bulundu. Tablo 9'da görüldüğü gibi ΔG° değerlerinin sıcaklıkla arttığı saptandı, fakat serbest ve immobilize lakkaz enzimleri arasında büyük farklılıklar olmadığı görüldü. ΔG° değerlerinin sıcaklıkla artışının enzimin her iki formda da gerçekleştiği fakat immobilize enzim formunda çok daha az oranda olduğu bulundu. İmmobilize enzimlerin ΔS° değerleri diğer formlar karşılaştırıldığında önemli bir derecede daha az negatiftir. Farklı sıcaklıklarda entropi değerlerindeki değişimler, sıcaklığın ve konformasyonun değişikliği sonucunda olabilmektedir [154,188].

Tablo 8. Serbest ve kompozit taşıyıcıların üzerine immobilize edilen lakkazın termal inaktivasyon parametreleri

Lakkaz		Sıcaklık ($^\circ\text{C}$)					
		20°C	30°C	40°C	50°C	60°C	70°C
k_d (dk^{-1})	Serbest enzim	0.001942	0.003512	0.001089	0.017981	0.023105	0.038376
	Kit-RGO	0.001072	0.001389	0.002652	0.004227	0.007772	0.010995
	Kit-RGO- Fe_3O_4	0.000943	0.001168	0.002265	0.003555	0.006672	0.010018
$t_{1/2}$ (dk)	Serbest enzim	356.806302	197.322497	63.585131	38.542480	29.993629	18.057964
	Kit-RGO	646.402858	498.671116	261.323759	163.957206	89.164252	63.027464
	Kit-RGO- Fe_3O_4	735.013994	593.147328	305.883114	194.921182	103.864746	69.171455
D-değeri (dk)	Serbest enzim	1185.235363	655.4637624	211.216408	128.029999	99.632519	59.984753
	Kit-RGO	2147.214114	1656.480389	868.062475	544.631299	296.184861	209.363958
	Kit-RGO- Fe_3O_4	2441.561637	1970.310460	1016.079261	647.487102	345.016806	229.772969
ΔH° (kJ mol^{-1})	Serbest enzim	33.488792	33.405652	33.322512	33.239372	33.156232	33.073092
	Kit-RGO	41.121875	41.038735	40.955954	40.872455	40.789315	40.706175
	Kit-RGO- Fe_3O_4	42.164451	42.081311	41.998171	41.915031	41.831891	41.748751
ΔG° (kJ mol^{-1})	Serbest enzim	96.899910	98.799394	99.197618	101.106953	103.627324	105.376683
	Kit-RGO	98.347455	101.134909	102.875632	104.995026	106.643659	108.941264
	Kit-RGO- Fe_3O_4	98.660400	101.571971	103.285343	105.459576	107.065565	109.206523
ΔS° ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$)	Serbest enzim	-216.420198	-215.820932	-210.463597	-210.116349	-211.624901	-210.797642
	Kit-RGO	-195.309146	-198.337208	-197.827594	-198.5218906	-197.760791	-198.931195
	Kit-RGO- Fe_3O_4	-192.818939	-196.38810	-195.805662	-196.732339	-195.896918	-196.669885

3.3.2. Enzim Kinetiği

Serbest lakkaz enzimi, Kit-RGO ve Kit-RGO-Fe₃O₄ üzerine immobilize lakkaz için, 0.1 M, pH 5.0 tampon içerisinde hazırlanan farklı substrat derişimleri kullanılarak belirlenen aktivite değerleri ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil 3.13'de gösterilmektedir.



Şekil 3.13. Serbest ve kompozit taşıyıcıların üzerine immobilize edilen lakkazın Lineweaver-Burk grafiği

Serbest ve immobilize lakkaz için K_M , V_{max} değerleri her bir enzim için çizilen Lineweaver-Burk grafiğinden hesaplanarak bulundu. Bu sonuçlar Tablo 9'da gösterilmektedir.

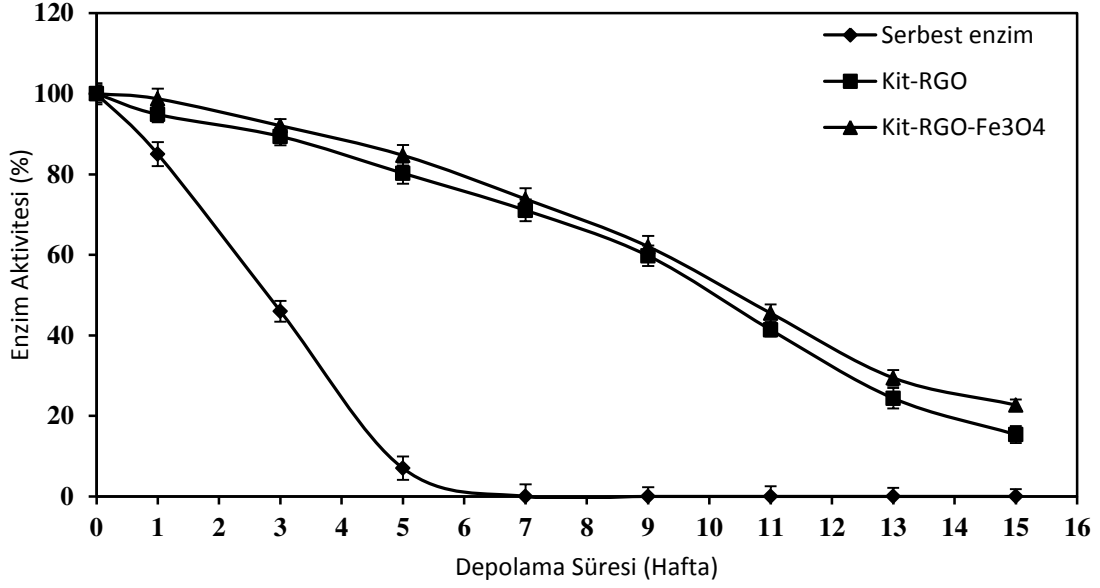
Tablo 9. Serbest ve kompozit taşıyıcıların üzerine immobilize edilen lakkazın kinetik parametreleri

	Serbest Enzim	Kit-RGO	Kit-RGO-Fe ₃ O ₄
K_M (mM)	0.29	0.50	0.47
V_{max} (U/mg)	12.80	7.87	8.43

Bir enzim için K_M değeri, maksimum hızın yarısına erişildiği andaki substrat konsantrasyonunu ve aynı zamanda K_M değer ne kadar küçükse enzimin substrata ilgisi o kadar yüksektir. Çalışmamızda immobilize enzimler için hesaplanan K_M değerleri Kit-RGO üzerine immobilize edilen enzim için 0.50 mM, Kit-RGO- Fe_3O_4 üzerine immobilize edilen enzim için 0.47 mM'dır. Her iki immobilize enziminde K_M değerinin serbest enzimin K_M değerinden yüksek olması, immobilize lakkazın substrata ilgisinin serbest lakkazın ilgisinden daha düşük olduğu anlamına gelmektedir. Immobilize enzimlerin K_M ve V_{max} değerlerindeki değişiklikler, enzimin desteğe bağlanması sırasında: substrata bağlanması için gerekli esnekliğinin azalması, taşıyıcının enzimin aktif bölgelerinde meydana getirdiği sterik engellemeler ya da substrat difüzyonunun sınırlanması nedeniyle olabilir [189-193].

3.3.3. Depolama Kararlılığı

Depolama kararlılığı özellikle immobilize enzimlerin uygulama alanları ile ilgili önemli bir faktördür ve enzimin saklama koşullarına bağlı bir parametredir. Genellikle, suda çözünmez enzim preparatları liyofilize edilerek ya da süspansiyon şeklinde 4-5 °C'de saklanabilirler. Serbest ve kompozit taşıyıcılarda immobilize edilen lakkaz enziminin 4 °C'de tampon çözeltisi içerisinde depolanarak belirli aralıklarla aktiviteleri ölçüldü ve elde edilen sonuçlar grafik olarak Şekil 3.14'de verilmektedir. Bir haftalık depolama sonunda serbest enzimin başlangıç aktivitesinin % 85'ini; Kit-RGO boncuklar üzerine immobilize edilen lakkaz ise başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 95'ini, Kit-RGO- Fe_3O_4 boncuk üzerine immobilize edilen lakkazın ise başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 99'unu koruduğu saptandı. Immobilize enzimlerin 7 haftalık depolama sonuçlarına göre aktivitelerinin yaklaşık olarak % 75'ini korudukları hesaplandı. 11 haftalık depolama sonuçlarına göre ise aktivitelerinin yaklaşık % 45'ini korudukları bulundu. Kunamneni ve arkadaşları (2008) Sepabeads EC-EP3 üzerine immobilize ettikleri lakkazın 4 °C'de ilk 2 ay depolama periyodu sonunda enzim aktivitesinin % 2.5'ini yitirdiğini belirtmiştir [109]. Sonraki 2 ay depolama sonucunda enzim aktivitesinin % 1.3'ünü yitirdiğini göstermişlerdir. Toplamda 4 hafta sonunda aktivitesinin % 3.8'ini kaybettiğini rapor etmişlerdir [109]. Spinelli ve arkadaşları (2013) 4°C'de depoladıkları 7 gün sonunda serbest enzimin aktivitesinin % 18.5 azaldığını, aynı süre zarfında Amberlite IR-120 H boncukları üzerinde immobilize lakkazın aktivitesinin ise % 1.4 olarak azaldığını rapor etmişlerdir [147]. Jiang ve arkadaşları (2005) ise 4 °C'de 1 aylık depolama süresince serbest ve manyetik kitosan mikrokürecikleri üzerine immobilize lakkazın depolama kararlılığının azaldığı ifade etmişlerdir [28]. İlk 2 haftalık depolama süresinde aktivitede % 20'lik düşüş olduğunu ve daha sonrasında aktivitenin yavaşça azalarak toplamda % 30'luk düşüş görüldüğünü belirtmişlerdir. Aynı koşullar altında, serbest enzimin aktivitesindeki azalmayı % 70 olarak bulmuşlardır [28].



Şekil 3.14. Serbest ve kompozit taşıyıcıların üzerine immobilize edilen lakkazın 4°C depolama kararlılığı

3.3.4. Serbest ve İmmobilize Lakkaz Enziminin Organik Çözücülerdeki Stabilitesi

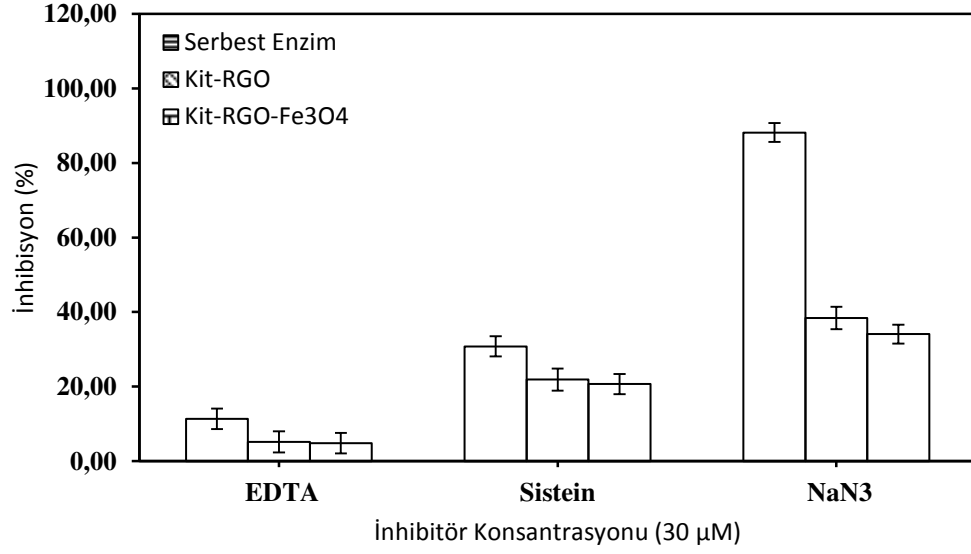
Serbest ve immobilize edilen lakkaz enzimi üzerine organik çözücülerin etkisinin belirlenmesinde, enzim farklı konsantrasyonlarda hazırlanan farklı organik solventlerin (metanol, etanol, DMSO, asetonitril) içerisinde 30 °C'de 24 saat bekletildi. Hazırlanan ABTS ile geri kazanılan aktiviteleri ölçüldü ve sonuçlar Tablo 10'da verildi. Kullanılan organik çözücüler arasında en yüksek geri kazanılan aktivite değerleri enzimin her iki formu içinde DMSO çözücüsü içerisinde elde edildi. Çalışmamızda kompozit taşıyıcı üzerine immobilize lakkaz enzimlerinin geri kazanılan aktivite değerlerinin, serbest enzime oranla daha yüksek olduğu saptandı. Enzim moleküllerinin organik çözücü ile doğrudan temasının enzimin katalik olarak aktif konformasyonunu etkilediği düşünülmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda organik çözücü kullanılarak su-organik çözücü sistemleri oluşturulursa, proteinlerin yüzey tabakası üzerindeki su molekülleri ile organik çözücülerin yer değiştirmesi nedeniyle enzimin aktivitesinde azalma görülür [194]. Enzimlerin immobilizasyonu, organik solvent içerisindeki aktivite azalmasından enzimleri koruyan en yararlı tekniklerden biridir. Çalışmamıza benzer şekilde, Kunamneni ve arkadaşları (2008) immobilize lakkazın farklı organik çözücülerin artan konsantrasyonlarında serbest enzime göre daha yüksek aktivite gösterdiğini belirtmiştir [109].

Tablo 10. Farklı konsantrasyonlardaki organik çözücülerde lakkazın stabilitesi

Organik çözücü	Lakkaz	Geri Kazanılan Aktivite (%)			
		0	10	30	50
Metanol	Serbest enzim	100	75.06	68.85	43.26
	Kit-RGO	100	87.03	71.48	63.49
	Kit-RGO-Fe ₃ O ₄	100	86.11	75.06	53.66
Etanol	Serbest enzim	100	77.00	62.00	53.53
	Kit-RGO	100	89.00	68.00	54.98
	Kit-RGO-Fe ₃ O ₄	100	87.84	71.00	60.78
DMSO	Serbest enzim	100	91.84	66.31	40.79
	Kit-RGO	100	96.77	69.73	43.42
	Kit-RGO-Fe ₃ O ₄	100	91.00	70.26	45.37
Asetonitril	Serbest enzim	100	48.00	15.64	5.89
	Kit-RGO	100	74.57	58.55	24.67
	Kit-RGO-Fe ₃ O ₄	100	71.58	47.85	23.89

3.3.5. Serbest ve İmmobilize Edilen Lakkaz Enzimi Üzerine Bazı İnhibitörlerin Etkisi

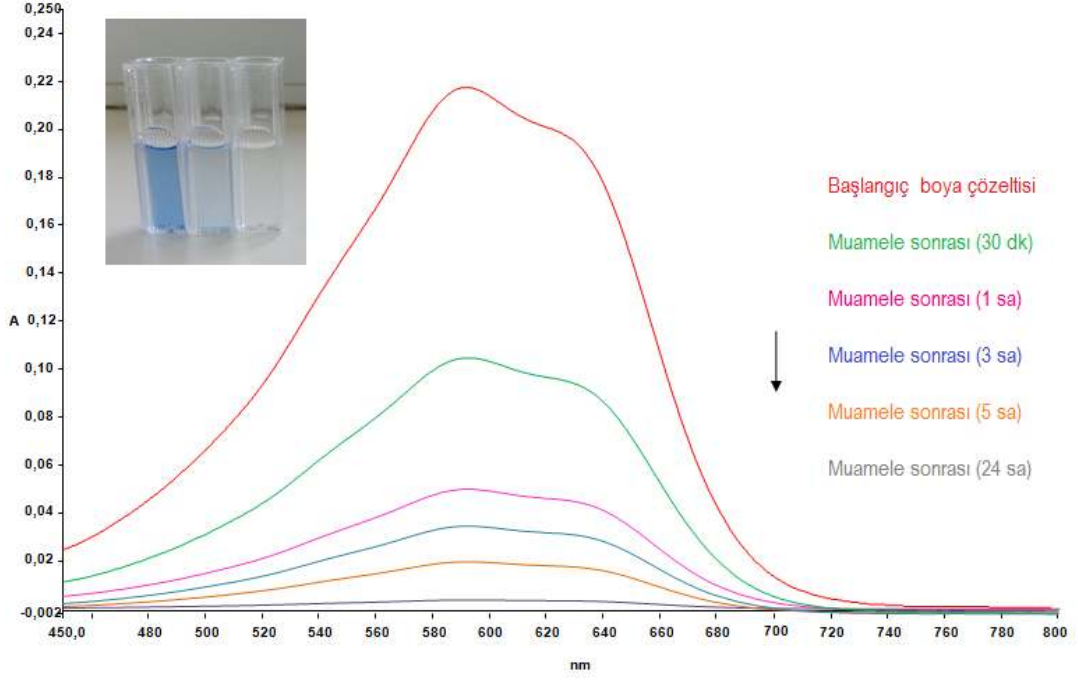
İnhibitörler, reaksiyon ortamına eklendiğinde reaksiyon hızını azaltan doğal ya da yapay kimyasal maddelerdir. Bileşiklerin inhibe edici etkileri inhibitörün saflığına, konsantrasyonuna, enzimin kaynağına, substratın varlığına, pH ve sıcaklığa bağlıdır. İnhibe edici kimyasallar içerisinde enzim stabilitesini belirlemek için immobilize enzimler, 30 µM NaN₃, 30 µM Sistein, 30 µM EDTA içerisinde 30 dakika boyunca 35 °C sıcaklıkta inkübe edildi. Elde edilen verilere göre lakkaz enzimi üzerine en az inhibe edici EDTA bulunurken, en fazla inhibe edici NaN₃ olarak saptandı. Kompozit taşıyıcılar arasında demirli taşıyıcı üzerine immobilize edilen lakkazın diğer kompozit taşıyıcı göre daha az inhibe olduğu bulundu. Bizim sonuçlarımıza benzer şekilde, Minussi ve ark., (2007) çalışmalarında EDTA'nın enzim aktivitesini sodyum azid ve sisteinden daha az inhibe ettiği bulmuşlardır [195]. EDTA, enzimin inorganik kofaktörüyle inaktif kompleksler oluşturabilmesi nedeniyle lakkaz enziminde dahil olduğu metallo enzimlerin bir inhibitörüdür. EDTA tarafından inhibe olan lakkazlar *Trametes versicolor*, *Pseudomonas desmolyticum* ve *Bacillus sp. ADR* lakkazlarıdır [196]. Kumar ve arkadaşları (2012) ile Ryan ve arkadaşları (2003) çalışmalarında NaN₃'in lakkazın tip 2 ve tip 3 bakır merkezlerine bağlanmasıyla iç elektron transferini etkilediğini ve bu şekilde lakkazın aktivitesini inhibe ettiğini belirtmişlerdir [184,197].



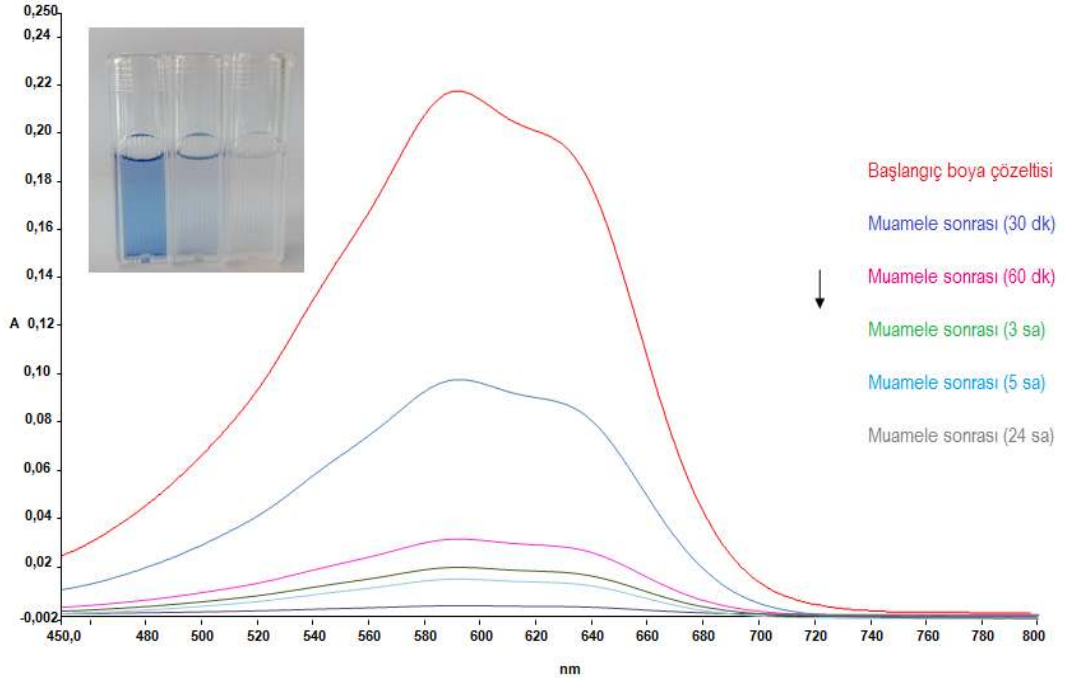
Şekil 3.15. Serbest ve kompozit taşıyıcıların üzerine immobilize edilen lakkaz enzimin aktivitesine bazı inhibitörlerin etkisi

3.3.6. İmmobilize Lakkaz ile Tekstil Boyalarının Renk Giderimi

Çalışmanın ikinci aşamasında hazırlanan immobilize enzimlerin endüstriyel amaçlı uygulaması olarak model boya seçilen Reaktif Mavi 21 (RM 21) tekstil boyasının giderim çalışmaları yapıldı. RM 21 boyasının Kit-RGO ve Kit-RGO-Fe₃O₄ boncuklar üzerine immobilize edilen lakkazlar tarafından 30 dk, 60 dk, 3 saat, 5 saat ve 24 saat sürelerinde alınan UV-Vis spektrum tarama sonuçları etkili bir boya gideriminin gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 3.16-3.17).



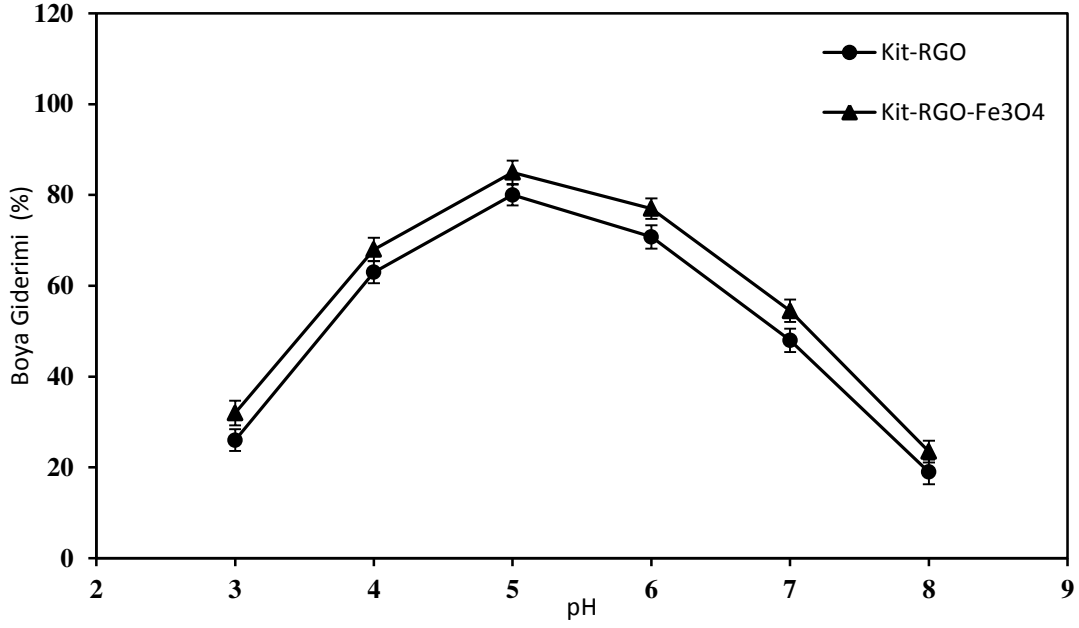
Şekil 3.16. Kit-RGO üzerine immobilize edilen lakkaz ile RM 21 boyasının giderimi sırasında UV-Vis spektrum taraması ve RM 21 boyasının başlangıç, 1 saat ve 24 saat gideriminden sonraki görünümü



Şekil 3.17. Kit-RGO-Fe₃O₄ üzerine immobilize edilen lakkaz ile RM 21 boyasının giderimi sırasında UV-Vis spektrum taraması ve RM 21 boyasının başlangıç, 1 saat ve 24 saat gideriminden sonraki görünümü

3.3.6.1. Boya Giderimi Üzerine pH Etkisi

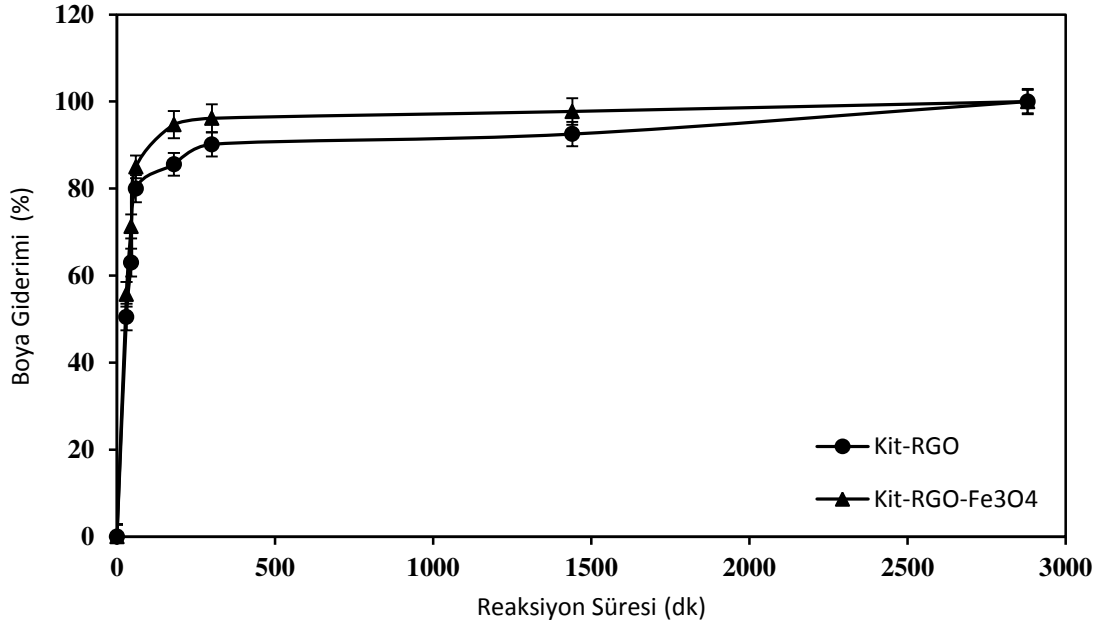
İmmobilize enzimler (100 mg) tampon çözeltileriyle hazırlanan boya çözeltileri ile oda sıcaklığında inkübe edildi. Muamele edilmiş boya çözeltilerinin 589 nm'de absorbands ölçümleri alınarak boya giderimi değerleri hesaplandı. Kit-RGO ve Kit-RGO-Fe₃O₄ üzerine lakkaz enzimleri ile boya giderimi için optimum pH 5.0 olarak bulundu (Şekil 3.18). Çalışmamızda diğer pH değerlerinde de boya gideriminin gerçekleştiği görüldü. Champagne ve Ramsay (2010) çalışmalarında ise pH 5.0 fosfat tamponu ile hazırlanmış boya çözeltileri arasında immobilize lakkazın indigo (Asit Mavi 74), antrakinin (Reaktif Mavi 19 ve Disperse Mavi 3) boyalarını diğer azo boyalardan (Reaktif Siyah 5 ve Asit Kırmızı 27) daha hızlı giderdiğini tespit etmişlerdir [179]. Çalışmamıza benzer şekilde Rodríguez Couto (2007) tarafından lakkaz ile Indigo carmine boyasının pH 8.0 ve 9.0 gibi yüksek pH değerlerinde boya gideriminin gerçekleştirildiği rapor edilmiştir [198]. Mogharabi ve arkadaşları da aljinat-jelatin karışımı jel üzerine immobilize lakkaz ile boya giderimi için optimum pH'yi 8.0 olarak bulmuşlardır [199]. Murugesan ve arkadaşları (2007) çalışmalarında *Ganoderma lucidum* lakkaz ile Reaktif Siyah 5 ve Remazol Brilliant Mavi R boyaları için pH 4.0 değerinde boya gideriminin daha iyi olduğunu rapor etmişlerdir [200]. Michniewicz ve arkadaşlarının (2008) çalışmalarında ise *Cerrena unicolor* lakkazıyla tekstil boyası gideriminde Asit Mavi 62, Asit Mavi 40, Reaktif Mavi 81, Direk Siyah 22 ve Asit Kırmızı 27 boyalarının giderimi proseslerinde tüm boyalar için optimum pH 3.5 olarak tespit edilmiştir [201]. Silva ve arkadaşlarının (2012) çalışmasında RM 21 bakır ftalosiyanın boyası Turnip peroksidaz enzimi ile okside edilmeye çalışılmıştır [123]. Ayrıca bu çalışmalarında, Souza ve arkadaşlarının Horsehadish peroksidaz ile boyayı okside ettiklerinin ve boyanın giderimini % 59 olarak bulunduklarını belirtmişlerdir [123].



Şekil 3.18. RM 21 boyasının giderimi üzerine pH etkisi (25 mg L⁻¹ boya çözeltisi 1 saat 130 rpm'de oda sıcaklığında inkübasyon)

3.3.6.2. Boya Giderimi Üzerine Reaksiyon Süresinin Etkisi

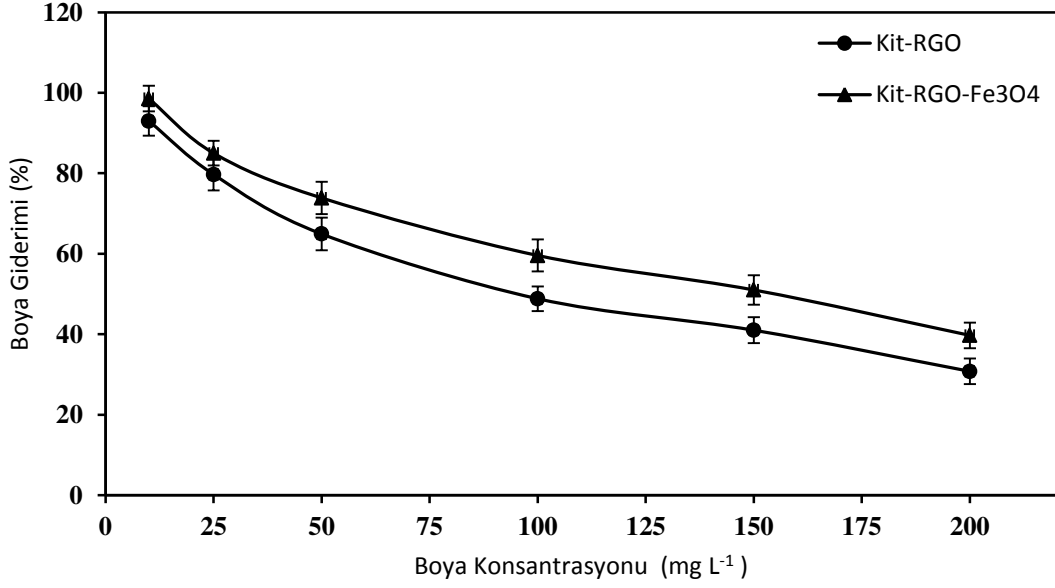
Reaksiyon süresinin boya giderimi üzerine etkisini belirlemek için enzim immobilize edilen kompozit boncuklar boya çözeltileriyle farklı süreler boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonucu muamele edilmiş boya çözeltilerinin absorbans değerleri ölçülüp, yüzde boya giderimleri hesaplandı. RM 21 boyası ile yapılan denemeler sonucu inkübasyon süresi arttıkça boya gideriminin de arttığı gözlemlendi (Şekil 3.19). 30. dk sonunda, Kit-RGO üzerine immobilize enzimle boya giderimi % 50.47 olarak bulunurken Kit-RGO-Fe₃O₄ üzerine immobilize enzimle boya giderimi % 55.73 olarak hesaplandı. 1 saatlik inkübasyon sonrasında ise bu değer Kit-RGO ve Kit-RGO-Fe₃O₄ üzerine immobilize lakkaz için sırasıyla % 80 ve % 85 olarak bulundu. 5 saatlik inkübasyonun ardından Kit-RGO ve Kit-RGO-Fe₃O₄ üzerine immobilize lakkaz ile boyaların giderim değerleri sırasıyla % 90.17 ve % 96.15 olarak bulundu. Karagöz ve ark., (2011) tarafından yapılan çalışmada N-vinilformamidin polimerizasyonu ile oluşturulan mikrokürecikler üzerine lakkaz enzimi immobilize edilmiş ve kesikli yöntem kullanılarak 18 saatte Direk blue 1 boyasının yaklaşık % 54-68 ve Direk red 128 boyasının % 73-78 oranında degrade edildiği rapor edilmiştir [185]. Bayramoğlu ve arkadaşlarının (2010) immobilize lakkaz enzimi ile kesikli sistemle boya giderim çalışmalarında ise Reactive Green 19, Reactive Red 2 ve Reactive Brown 10 boya için 6 saatte boya degradasyonu yaklaşık olarak % 38, % 51 ve % 59 olarak bulunduğu belirtilmiştir [202].



Şekil 3.19. RM 21 boyasının giderimi üzerine reaksiyon süresinin etkisi (pH 5.0'da 25 mg L⁻¹ boya çözeltisi 130 rpm'de oda sıcaklığında inkübasyon)

3.3.6.3. Boya Giderimi Üzerine Boya Konsantrasyonunun Etkisi

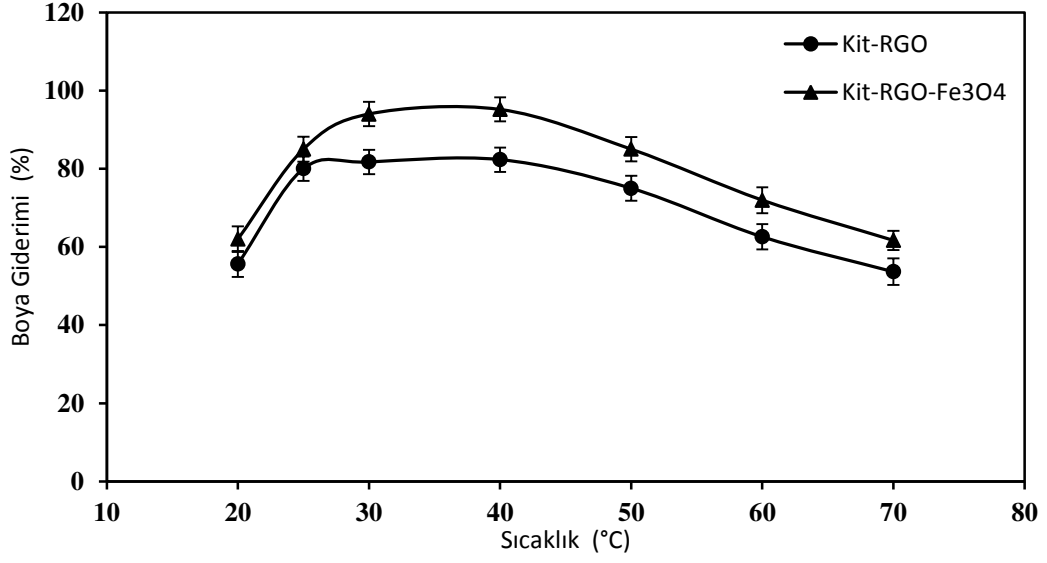
10-200 mg L⁻¹ arasında değişen konsantrasyonlardaki boya çözeltileri ile lakkaz enzimi immobilize edilen kitosan kompozit boncuklar 1 saat 130 rpm'de oda sıcaklığında inkübe edildi. Boyanın maksimum dalga boyunda, muamele edilmiş boya çözeltilerinin absorbans ölçümleri alınarak yüzde boya giderimleri hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.20'de grafik olarak verildi. Çalışma sonuçlarına göre artan boya konsantrasyonu ile yüzde boya giderim değerlerinin azaldığı bulundu. Çalışmamıza benzer şekilde Murugensan ve arkadaşları (2007) *Ganoderma lucidum* lakkazı ile yaptıkları boya giderim çalışmalarında Reaktif Siyah 5 ve Remazol Brilliant Mavi R boyalarının artan boya konsantrasyonlarında boya giderim değerlerinin azaldığını ifade etmişlerdir [200].



Şekil 3.20. RM 21 boyasının giderimi üzerine boya konsantrasyonunun etkisi (pH 5.0'da boya çözeltisi 1 saat 130 rpm'de oda sıcaklığında inkübasyon)

3.3.6.4. Boya Giderimi Üzerine Sıcaklık Etkisi

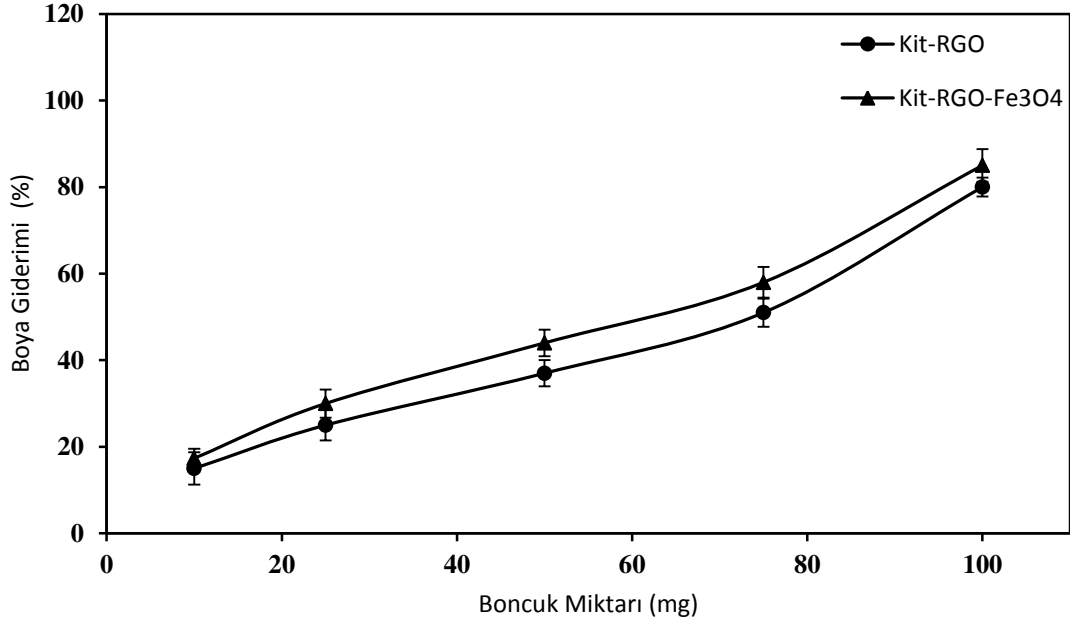
Boya giderimine sıcaklığın etkisi incelemek için pH 5.0'da hazırlanmış boya çözeltileri Kit-RGO ve Kit-RGO-Fe₃O₄ boncukları üzerine immobilize lakkaz ile 20, 25, 30, 40, 50, 60 ve 70 °C'lerde 1 saat boyunca inkübe edildi. Muamele edilmiş boya çözeltilerinin absorbanları alınarak yüzde boya giderimleri hesaplandı. Çalışma sonuçlarına göre oda sıcaklığında her iki kompozit taşıyıcı üzerine immobilize enzim ile boya gideriminin % 70'in üzerinde olduğu, 40 °C'de ise Kit-RGO boncuk üzerine immobilize enzim kullanılarak yüzde boya giderim % 82.33 ve Kit-RGO-Fe₃O₄ boncuklar üzerine immobilize enzim kullanılarak yüzde boya giderim % 95.16 olarak bulundu. 50 °C ve üzerindeki sıcaklıklarda da her iki immobilize enzim ile boya giderim değerleri % 50'den fazladır (Şekil 3.21). Bizim çalışmamıza benzer olarak, Murugensan ve arkadaşları (2007) çalışmalarında *Ganoderma lucidum* lakkazı ile Reaktif Siyah 5 ve Remazol Brilliant Mavi R boyalarının giderimine ilişkin yaptıkları çalışmada 60 °C'ye kadar sıcaklık artıkça boya giderimlerinin arttığını rapor etmişlerdir [200]. Reaktif siyah 5 boyası için 60 °C'de 1 saatlik inkübasyon sonrasında boya giderim değerinin, oda sıcaklığındaki değerinden % 13.8 kat daha fazla olduğunu ve 70 °C'lerde ise % 42'lere azaldığını belirlemişlerdir. Reaktif Brilliant Remazol R boyası içinse, 30°C'de 1 saatlik inkübasyon sonrasında % 70.4 boya giderimi gözlemlerken, 60 °C'de % 98 boya giderimini başardıklarını vurgulamışlardır [200]. Khelifi ve ark. (2010) çalışmalarında *Trametes troglia* lakkazı için boya gideriminde optimum sıcaklığı 50 °C bulmuşlardır [157].



Şekil 3.21. RM 21 boyasının giderimi üzerine sıcaklığın etkisi (pH 5.0'da 25 mg L⁻¹ boya çözeltisi boya çözeltisi 1 saat 130 rpm'de inkübasyon)

3.3.6.5. Boya Giderimi Üzerine Farklı Boncuk Miktarının Etkisi

Enzim immobilize edilen Kit-RGO ve Kit-RGO-Fe₃O₄ boncuklarının 10, 25, 50, 75, 100 mg'ı, RM 21 (pH 5.0) boya çözeltisi ile 1 saat 130 rpm'de oda sıcaklığında inkübe edildi ve yüzde boya giderimi hesaplandı. Şekil 3.22'de grafik olarak verilen sonuçlar artan immobilize enzim miktarı ile boya gideriminin arttığını göstermektedir. Çalışma sonuçlarımıza benzer şekilde, Murugesan ve arkadaşları (2007) tarafından lakkaz enzimi ile yapılan boya giderim çalışmalarında, enzim miktarı arttıkça boya gideriminin arttığı bildirilmiştir [200].



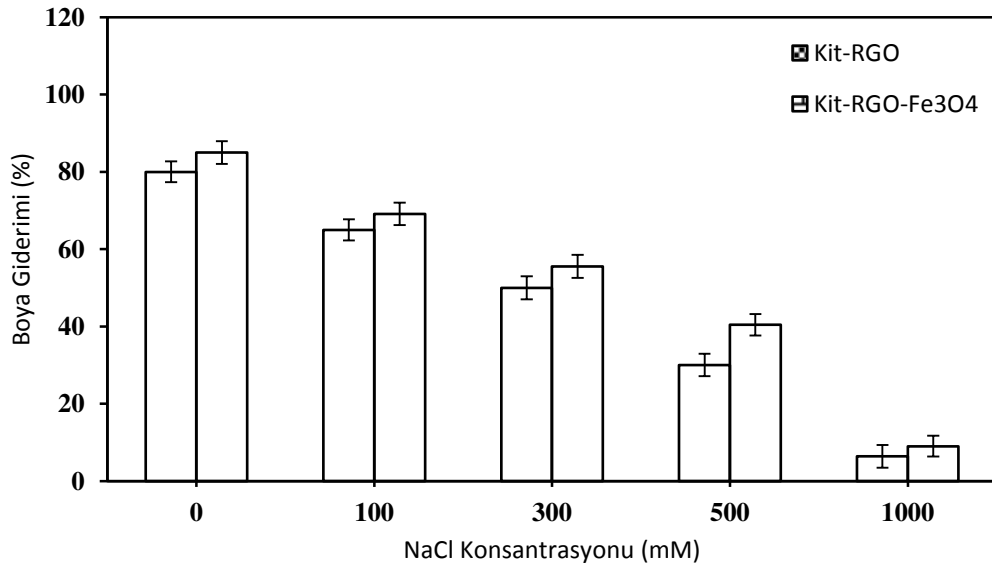
Şekil 3.22. RM 21 boyasının giderimi üzerine farklı boncuk miktarlarının etkisi (pH 5.0'da 25 mg L⁻¹ boya çözeltisi 1 saat 130 rpm'de oda sıcaklığında inkübasyon)

3.3.6.6. Boya Giderimi Üzerine NaCl Etkisi

Pamuk, kenevir, keten gibi selülozik bir elyafı boyamak için kumaş suya konulduğunda yüzeyi negatif iyonlarla yüklenir. Aynı zamanda, selülozik kumaşları boyamada sıklıkla kullanılan reaktif boyalar da negatif yüklere sahiptir dolayısıyla boya ile lifler aslında miknatısın itici uçları gibi birbirlerine karşı itme kuvveti uygulanması söz konusu olur. Tuz kullanılmadan selülozik kumaşlarla boyama yapıldığında, boya molekülleri fiberin yüzeyinde kalırlar ve kumaşın rengi çok değişmez. Fakat suya tuz eklenildiğinde, çözelti pozitif sodyum iyonları (Na⁺) ve negatif klor (Cl⁻) iyonlarına ayrılır. Pozitif sodyum iyonları negatif yükü nötralize etmek için kumaşın yüzey ile etkileşirler. Daha sonra, boya molekülleri van der Waals kuvvetleri tarafından fibere doğru çekilir ve boya fiberin molekülleriyle etkileşir, tuz burada boyayı tutmak için bir tutkal gibi davranmaktadır [203]. Diğer bir deyişle, boyama işlemlerinde tuz kullanımı ile amaçlanan boyayı kumaş üzerine sabitlemektir. Mendoza ve arkadaşları (2011) çalışmalarında tekstil atıksularının 50 mM'ın üzerinde NaCl içerdiğini belirtmişlerdir [204]. Literatürdeki, azo boyalarının mikrobiyal indirgenmesi üzerine mevcut çoğu çalışmalar ise çok az tuzlu veya tuzun olmadığı şartlar altında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar büyük miktarlarda tuzların pek çok tekstil atıksuyu içerisinde azo boyalar ile birlikte bulunduğu gerçeğini ihmal etmiştir [119]. Tekstil boyamada, çeşitli tuzlar organik kirleticilerin ayrılması (tuzlu su ile durulama), boyar maddelerin çökelmesine yardımcı olmak (tuz ile çöktürme) ve boyaların standartlaştırmak için konsantre boyalar ile karıştırarak kullanılmaktadır. Ayrıca pH'nin artması için boya banyosu içerisine

NaOH'ın eklenmesi ile de sodyum seviyesi artabilir. Yüksek tuz konsantrasyonları plazmolize neden olabilir ve biyolojik aktiviteyi azaltabilir. Tuzlu koşullar altında azo boya giderimi mikrobiyal flora üzerine tuzun inhibitör etkisi nedeniyle genellikle azaltılmıştır. Klasik aktif çamur sistemlerine girmeden önce atıksuların seyreltilmesi tuz stresini azaltabilir; ancak, bu atıksuların hacmini daha da artırmaktadır ve böylece arıtma yükünü de artırmış olur [119].

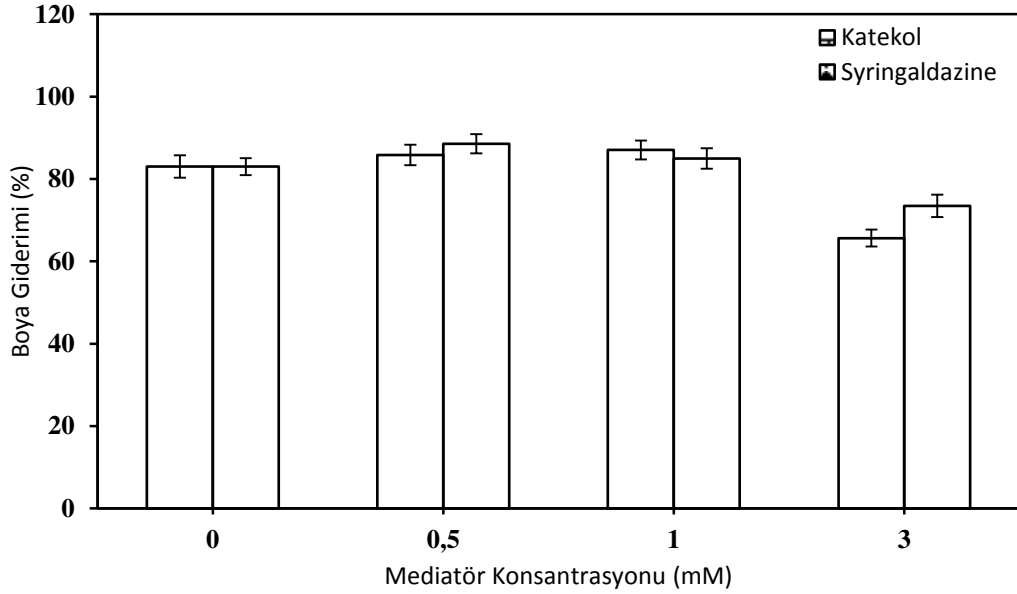
Boya giderimi üzerine NaCl etkisinin incelenmesi için, Kit-RGO ve Kit-RGO-Fe₃O₄ üzerine immobilize enzimler farklı konsantrasyonlarda NaCl içeren RM 21 (pH 5.0) boya çözeltileri ile 1 saat 130 rpm'de oda sıcaklığında inkübe edildi ve yüzde boya giderimi hesaplandı. 100 mM'lık tuz konsantrasyonu içeren boya çözeltilerinde Kit-RGO ve Kit-RGO-Fe₃O₄ üzerine immobilize lakkazlar ile yüzde boya giderim değeri sırasıyla % 65.00 ve % 69.14 iken, 300 mM NaCl içeren boya çözeltisinde boya giderim değerleri sırasıyla % 50.00 ve % 55.54 olarak; 500 mM NaCl içeren boya çözeltisinde ise sırasıyla % 30.00 ve % 40.44 olarak bulundu. Elde edilen sonuçlara göre artan NaCl miktarı ile yüzde boya giderimi azalmaktadır (Şekil 3.23). Bizim bulgularımıza benzer olarak, Mendoza ve arkadaşları (2011) *Trametes versicolor* lakkazı kullanılarak gerçekleştirilen boya giderimi çalışmalarında Red FN-2BL boyasının giderimi üzerine 5 mM, 25 mM, 50 mM ve 100 mM'lık NaCl konsantrasyonlarının boyanın giderimini etkilemediğini ancak çalıştıkları Red BWS, Remazol Blue RR ve Blue 4BL boya için 100 mM'a kadar ki NaCl konsantrasyonlarının boyaların giderimini belli oranlarda azalttığını rapor etmişlerdir. Lakkazın aktivitesi üzerine NaCl'nin inhibisyon etkisine rağmen tüm boyalarda 100 mM'a kadar ki NaCl konsantrasyonlarında % 50'nin üzerinde boya giderimini gerçekleştirdiklerini vurgulamışlardır [204].



Şekil 3.23. RM 21 boyasının giderimine NaCl konsantrasyonunun etkisi (pH 5.0'da 25 mg L⁻¹ boya çözeltisi 1 saat 130 rpm'de oda sıcaklığında inkübasyon)

3.3.6.7. Boya Giderimi Üzerine Mediator Etkisi

Çalışmada katekol ve syringaldazine mediatorleri kullanılarak yüzde boya giderimi üzerine etkisi araştırıldı. Ortama mediator ilave edilmediğinde % 83 civarında olan boya giderim değerinin 0.5 mM'lık katekol ilavesi ile boya giderim değerinin % 85.83'e, syringaldazine ilavesiyle boya giderim değerinin % 88.55'e çıktığı görüldü. 3 mM'lık katekol ve syringaldazine mediatorleri eklendiğinde ise boya giderim değerleri sırasıyla % 65.64 ve % 73.43 olarak hesaplandı. Artan mediator konsantrasyonuna bağlı olarak boya giderim yüzdelerindeki azalmanın nedeninin oluşan mediator radikallerinin enzim üzerine inhibisyon etkisi göstermesinden olabileceği düşünülmektedir (Şekil 3.24).



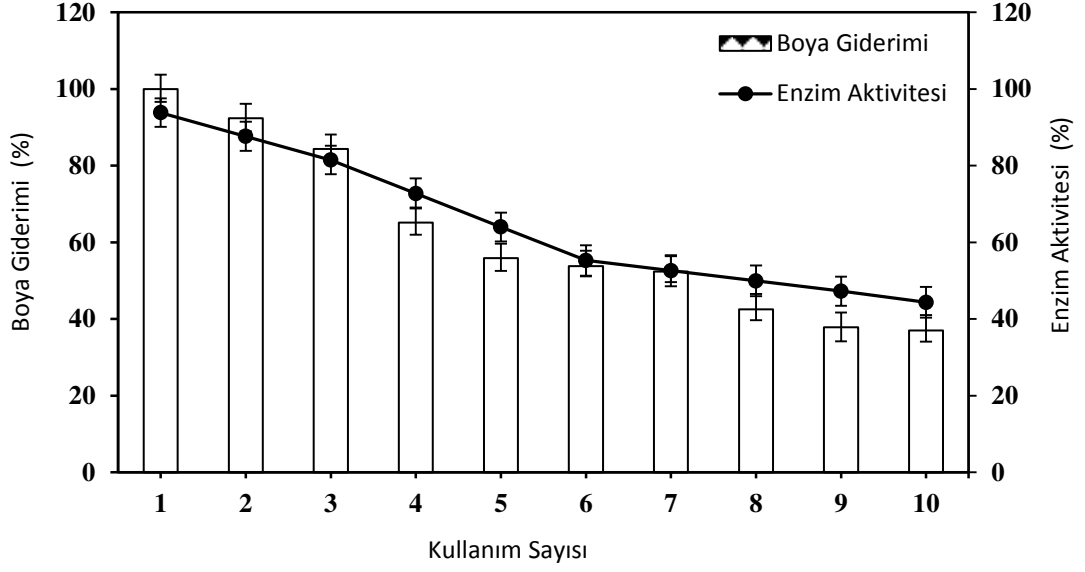
Şekil 3.24. RM 21 boyasının giderimine mediator etkisi (pH 5.0'da 25 mg L⁻¹ boya 130 rpm'de oda sıcaklığında inkübasyon)

Bizim bulgularımıza benzer olarak, Khelifi ve ark. (2010) lakkaz mediatorlü sistemlerde boya giderim çalışmalarında yüksek mediator konsantrasyonlarında boya giderim oranlarının azaldığı belirtmişlerdir [157]. Bu düşünüşün, mediatorlerin oksidasyonu sonucunda artan radikal konsantrasyonunun enzimin üzerine toksik etkisinden kaynaklanabileceğini ifade etmişlerdir. Ayrıca çalışmalarında, lakkaz mediator sistemlerinin boya giderim reaksiyonlarında olumlu etki göstermelerinin öncelikle mediator konsantrasyonuna ve kullanılan lakkazın aktivitesine bağlı olduğunu vurgulamışlardır [157]. Murugensan ve arkadaşları (2007) *Ganoderma lucidum* lakkazı ile Reaktif Black 5 boyası giderim çalışmalarında HBT mediatorünün etkisini saptamak için 0.2-5.0 mM'lık konsantrasyon aralığında çalışmışlardır. Bu çalışma için 1 mM'lık HBT konsantrasyonuna kadar boya gideriminde artış gözlemleyerek, 1mM'lık HBT'de % 73 boya

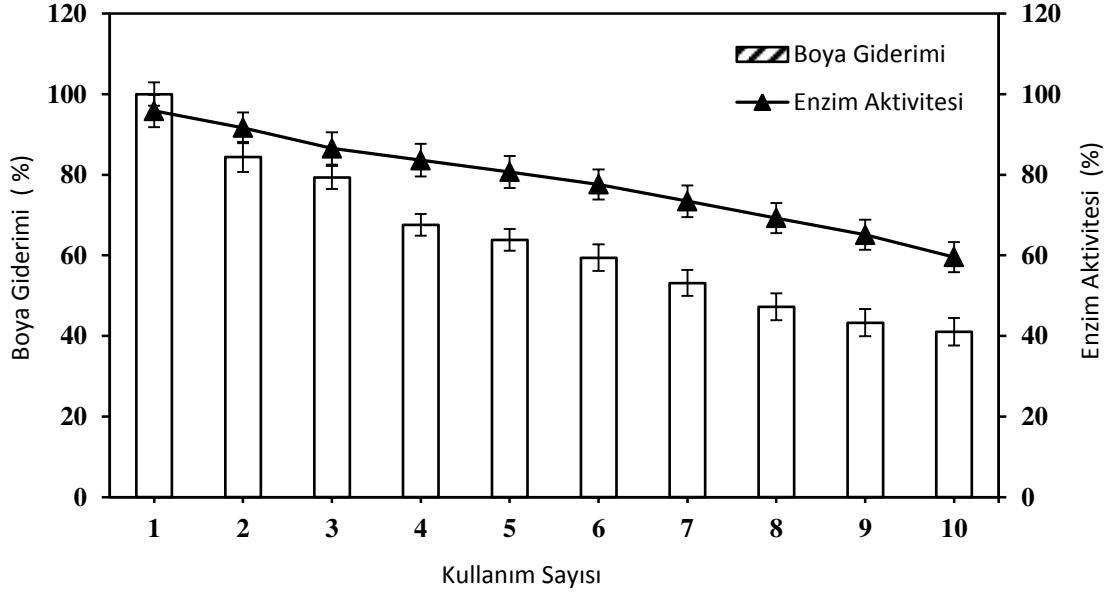
giderimi bulduklarını ve maksimum boya giderimi için gerekli minimum HBT konsantrasyonun 1 mM olduğunu rapor etmişlerdir [200]. Murugensan ve arkadaşlarının (2009) *Ganoderma lucidum* lakkazı ile diğer çalışmalarında HBT ve syringaldazine mediatörlerinin varlığında gözlemledikleri yüzde boya giderim değerleri % 82 ve % 80'dir [205].

3.3.6.8. Boya Gideriminde İmmobilize Lakkazın Tekrar Kullanılabilirliği

Kit-RGO ve Kit-RGO-Fe₃O₄ taşıyıcılarına immobilize edilen lakkazın boya gideriminde tekrar kullanılabilirliğini belirlemek için; immobilize enzimler RM 21 (pH 5.0) boya çözeltisi ile 3 saat 130 rpm'de oda sıcaklığında inkübe edildi ve enzim immobilize edilen boncuklar reaksiyon ortamından ayrılarak aktivite ölçümleri yapıldı. İmmobilize enzimlerle muamele edilen boyanın da, inkübasyon sonrasında absorbansı ölçülerek yüzde boya giderim değeri hesaplandı. Bu işlemler 10 ardışık döngü oluşturacak şekilde tekrarlandı. Elde edilen verilere göre Kit-RGO boncuk üzerine immobilize edilen lakkazın birinci kullanımı sonrasında yüzde boya giderim değerleri % 100 alındığında, beşinci kullanımı sonrasında % 55.85, onuncu kullanımı sonrasında % 36.99 olarak hesaplandı. Aynı boncuk üzerine immobilize lakkaz enziminin başlangıç aktivitesi ise kullanım sırasına göre ilk döngü sonrasında % 93.82, beşinci döngü sonrasında % 64.01 ve onuncu döngüden sonrasında % 44.35 olarak ölçüldü (Şekil 3.25). Kit-RGO-Fe₃O₄ taşıyıcısı üzerine immobilize lakkaz enzimi birinci kullanımında yüzde boya giderim değeri % 100 alındığında ise beşinci kullanım sonrasında % 63.82, on döngü sonrasında % 41.06 olarak hesaplandı (Şekil 3.26). Manyetikli kompozit boncuklar üzerindeki immobilize enzim aktiviteleri ise aynı kullanımlar için sırasıyla % 95.83 değerinden % 80.69'a ve onuncu döngü sonrasında ise % 59.57 olarak ölçüldü. Kunamneni ve arkadaşları (2008) Sepabeads EC-EP3 üzerine immobilize lakkazları ile Methyl Green boyasının giderim çalışmasında 6 defa kullanmış ve 5. kullanım sonrasında aktivitenin % 41'den daha fazla olduğunu ve 6.kullanımda gözlemledikleri düşüşün ise enzimin inaktive olmasıyla ilgili olduğunu rapor etmişlerdir [109]. Karagöz ve arkadaşları (2011) poli(VFA-co-EGDMA) mikrokürecikleri üzerine immobilize lakkaz ile boyaların giderimi çalışmalarında 5 kez kullanımı sonrasında immobilize enzimin aktivitesinde yavaş yavaş azalma gözlemlediklerini belirtmiştir [185].



Şekil 3.25. Kit-RGO boncuk üzerine immobilize lakkazın RM 21 boyası için tekrar kullanılabilirliği (pH 5.0'da boya çözeltisi 130 rpm'de oda sıcaklığında inkübasyon)



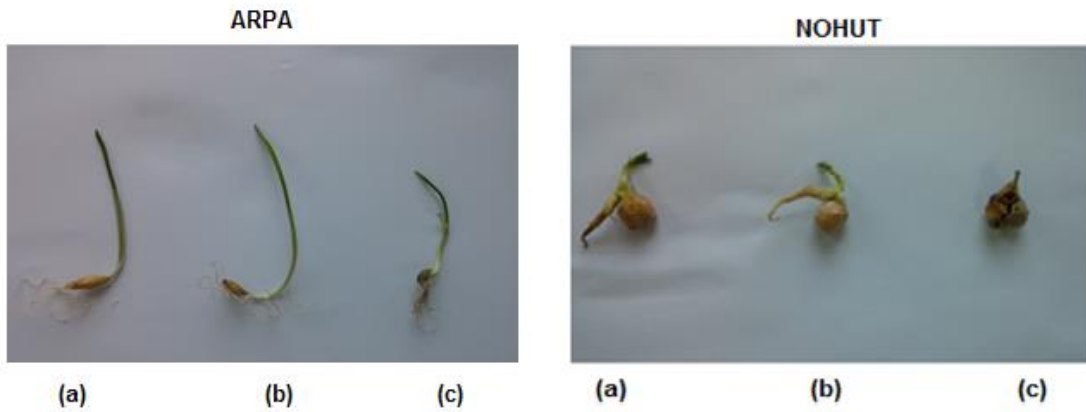
Şekil 3.26. Kit-RGO-Fe₃O₄ boncuk üzerine immobilize lakkazın RM 21 boyası için tekrar kullanılabilirliği (pH 5.0'da boya çözeltisi 130 rpm'de oda sıcaklığında inkübasyon)

3.3.6.9. Fitotoksosite Çalışması

Arıtımı yapılmamış boya atıklarının boşaltıldığı su kaynakları tarım amaçlı kullanılabilir. Bu nedenle boya atıklarının degradasyon öncesi ve sonrası

fitotoksitesinin incelenmesi önemlidir. Bu denemede tohumların çimlenme indeksi (GI) temel alınarak bitki yetiştirmede muamele edilmiş boyanın fitotoksikliği değerlendirilmeye çalışıldı. GI değerinin hesaplanması, fitotoksik bileşenlerin varlığına karşı duyarlı olan kök uzaması ve tohum çimlenmesine ilişkin ölçümler dikkate alınarak yapılmaktadır. Çalışmada, *Cicer arietinum* (nohut) ve *Hordeum vulgare* (arpa) bitki tohumları sırasıyla çift çenekli ve tek çenekli bitkilere örnek olarak seçildi. Arpa bitkisinin kontrol grubunda ortalama kök uzunluğu 24.2 mm ve çimlenme % 100'dür. Boya çözeltisi ile büyütülen arpa tohumları için ortalama kök uzunluğu ve çimlenmiş tohum sayısı sırasıyla 7.3 mm ve % 100; immobilize enzimle muamele edilen boya çözeltisiyle büyütülen arpalar için ise 16.4 mm ve % 100 olarak hesaplandı. Nohut tohumlarının kontrol grubu için ortalama kök uzunluğu 25.2 mm ve çimlenmiş tohum % 100'dir. Boya çözeltisi ile büyütülen nohut tohumlarında bulunan ortalama kök uzunluğu 9.0 mm ve çimlenmiş tohum sayısı % 40 iken; immobilize enzimle muamele edilen boya çözeltisiyle büyütülenlerde 21.5 mm ve % 100'dir.

Zucconi ve diğerleri (1985) çimlenme indeksi değeri için % 50'den düşük değerin yüksek fitotoksik olduğunu, % 50-80 arasındaki değerlerin orta derecede fitotoksik olduğunu, % 80'den yüksek değerlerin ise fitotoksik bileşen olmadığını belirtmişlerdir [206]. Çalışma sonuçlarına göre çimlenme indeksleri hesaplandığında, boya çözeltileri ile yetiştirilen arpanın yüzde çimlenme indeksi % 30.16 iken nohuttun yüzde çimlenme indeksi % 35.71 olarak; enzimatik boya giderimi sonrası elde edilen boya çözeltisi ile büyütülen arpa ve nohut tohumlarının yüzde çimlenme indeksleri ise sırasıyla % 68 ve % 85.31 olarak hesaplandı. Bu verilere göre enzim immobilize edilmiş boncuklarla muamele edilmiş boya çözeltisinin, RM 21 boyasından daha az fitotoksik olduğu söylenebilir. Şekil 3.27'de çalışmaların sonuçlarına ait fotoğraf görüntüleri verilmektedir.



Şekil 3.27. 1 haftalık inkübasyonu sonrasında bitki tohumlarının kök uzunluklarını gösteren fotoğrafları (a) Deiyonize su (Kontrol), (b) Reaktif Mavi 21 boyası giderim sonrası, (c) Reaktif Mavi 21 (25 mg L⁻¹) boyası

Osma ve ark. tarafından (2010) bir antrakinon cinsi boya olan Remazol Brilliant Blue R (RBBR) ile *Trametes pubescens* lakkaz ile gerçekleştirilen giderim çalışmasında, İngiliz çimi (*Lolium perenne*) yapılan fitotoksosite çalışmasında RBBR ile muamelede % 93 çimlenme indeksi, RBBR'nin giderim sonrası oluşan ürünü ile % 100 çimlenme indeksi bulduklarını rapor etmişlerdir. Osma ve diğerleri bu nedenle RBBR'nin giderim ürünün hala çimler için toksik olmasına rağmen orijinal boyadan daha az toksik olduğunu göstermişlerdir [159].

Sonuç olarak, parçalanmayan çevresel kirliliklerin yanı sıra hem fenolik hem de fenolik olmayan lignin esaslı bileşenleri yükseltgeyebilme yetenekleri nedeniyle oldukça ilgi çeken ve bu avantajları sayesinde uygulamaların başlıcaları kağıt, selüloz, tekstil ve petrokimya sanayilerinin neden olduğu atıkların detoksifikasyonu, nanobiyoteknoloji, medikal teşhisler ve topraktaki herbisit, pestisit ve bazı maddelerin temizlenmesi gibi pek çok endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilir. Günümüz şartlarında lakkazlar ucuz ve kolay elde edilemediği için proseslerde kullanım şartlarının iyileştirmek için büyük ölçekli lakkaz uygulamalarının taşıyıcı üzerine enzim immobilizasyonu ile enzimatik uygulamaları sağlanarak enzimlerin aktivitesi, kararlılığı artırılabilir böylelikle maliyet azaltılır ve proseslerin kontrolü sağlanır. Taşıyıcı üzerine kovalent bağlamayla enzim immobilizasyonu yöntemi lakkaz immobilizasyonu için uygun bir yöntemdir. Bu yöntemle lakkaz immobilizasyonu yüksek verimle gerçekleştirilebilir. İmmobilizasyonda taşıyıcı olarak kullanılan kitosanın ucuz oluşu, toksik olmayışı ve yapısındaki hidroksil ve amino gruplarının varlığı nedeniyle enzimlere kolayca bağlanması immobilizasyon için önemli avantajlardır. Bu reaktif gruplar sayesinde kitosan kolayca kimyasal modifikasyona uğrayabilmektedir. Fiziksel modifikasyon kitosanın adsorpsiyon özelliğini artırırken, kimyasal modifikasyon yalnız adsorpsiyon özelliğini arttırmakla kalmayıp kitosanın kuvvetli asitlerde çözünmesini önlemektedir. Bu çalışmada da indirgenmiş grafen oksit ve indirgenmiş grafen oksit-manyetit kullanılarak hazırlanan kitosan kompozit boncukların üzerine immobilize edilen lakkazın serbest lakkaz enzimine göre pH'a, sıcaklığa, inhibitörlere, organik solventlere dayanıklılığı artırılmış ve aktivitesini çok fazla kaybetmeden depolanması sağlanmıştır. Kitosanın indirgenmiş grafen oksit-manyetit ile belli oranlarda karıştırılmasıyla hazırlanan kompozit boncuk üzerine immobilize edilen lakkazın diğer kompozit boncuğa oranla sıcaklık ve pH'a daha stabil olduğu, aktivitesi çok kaybetmeden daha uzun süre depolandığı, inhibitörlerden daha az etkilendiği, boya gideriminin daha yüksek değerde olduğu ve boya giderim üzerine etkili olan parametrelerin etkilerine karşı daha dayanıklı olduğu belirlendi. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar Kit-RGO ve Kit-RGO-Fe₃O₄ üzerine immobilize edilen lakkazın endüstride kullanım açısından serbest lakkaz enzimine oranla başarılı bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir.

4. KAYNAKLAR

- [1]Alagöz D., β -galaktozidaz ve Glukoz İzomeraz'ın Eupergit Desteğe Kovalent İmmobilizasyonu Ve İmmobilize Enzimlerin Laktoz Hidrolizi Ve Glukoz İzomerizasyonunda Kullanılması, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. 2007.
- [2]Sümengen M., Laktik Asit Bakterilerinden Fitaz Üretimi Ve Endüstriyel Kullanım Olanakları, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. 2011.
- [3]Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. Biochemistry (5Th ed).New York: W.H. Freeman and Co. [QP514.2 .B452 2002] LOC: Sci and Tech. 2002.
- [4]Özçömlekçi E., Proteaz Enziminin Glutaraldehit Kullanarak Kovalent Bağlanma İle İmmobilizasyonunda Optimum Şartların Belirlenmesi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. 2006.
- [5]Alptekin Ö., Katalazın Eupergit, Florisil Ve Cam Desteklere Kovalent Olarak İmmobilizasyonu Ve Karakterizasyonu, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. 2009.
- [6]Fidan S., Korcan S.E., Ciğerci İ.H., Erdoğan S.F., Bazı Metallerin *Pleurotus* türlerinin Boya Dekolorizasyonu ve Lakkaz, MnP Enzim Aktiviteleri Üzerine Olan Etkisi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi. 2012; 12: 33-41.
- [7]Mercimek H.A., *Trametes Versicolor*'ın Tekstil Boyalarının Gideriminde Kullanım Olanakları, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı. 2007.
- [8]Arık B., Ekmekçi Körlü A., DURAN K., Lakkaz Enzimlerinin Tekstilde Kullanım Alanları, Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi, 2008; 2: 17-22.
- [9]Çoşkun G., Glutatyon -S-Transferaz Enziminin Farklı Taşıyıcılarda İmmobilizasyonu Ve Bazı Özelliklerinin İncelenmesi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. 2007.
- [10]Klibanov, A.M., Immobilized Enzymes and Cells as Practical Catalysts. Sci. 1983; 219: 722-727.
- [11]Bakker, M., Immobilisation of metalloenzymes and their application in nonnatural conversions, Technical University Delft, 2000.
- [12]Cabral, J.M.S., Kennedy J.F., Immobilisation techniques for altering thermal stability of enzymes In: Gupta MN (Ed.) Thermostability of enzymes", Springer, 2000,163.
- [13]Çolak U., İnsan Serum Paraoksonaz Enziminin Kitosan Üzerine İmmobilizasyonu Ve Karakterizasyonu Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. 2011.
- [14]Yamak Ö., Poli(akrilamit)-Sodyum Aljinat, Poli(akrilamit-N-İzopropilakrilamit)-Sodyum aljinat, Poli(akrilamit-N-İzopropilakrilamit) Hidrojellerine Lakkaz İmmobilizasyonu, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. 2007.
- [15]Hürrem F., Katalazın Çapraz Bağlı Enzim Agregatlarını (Clea) Oluşturma Yöntemiyle İmmobilizasyonu Ve Karakterizasyonu, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. 2010.

- [16]Wang F., Guo C., Liu H.Z., Liu C.Z. Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase by metal affinity adsorption on magnetic chelator particles, J. Chem. Technol. Biotechnol. 2008; 83: 97–104.
- [17]Fernandes C.S., Olivera I.R.W.Z., Orlando F.F., Almir S., Vieira C.L., Biosensor based on laccase immobilized on microspheres of chitosan crosslinked with tripolyphosphate, Sensors and Actuators B 133. 2008; 202–207.
- [18]Gürel A., Kuzgun Karaton N., Kitosan Üretimi ve Özellikleri İle Kitosanın Kullanım Alanları, Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi. 2013; 6(2):16-21.
- [19]Crini G., Non-conventional low cost adsorbents for dye removal: A Review, Bioresour. Technol. 2006; 97: 1061–1085.
- [20]Gökçe Y., Kitosan Nanoparçacıklarının Sentezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. 2008.
- [21]İmamoğlu Ö. Biyokontrolde doğal ürünlerin kullanılması; Kitosan. Turk Hij Den Biyol Derg, 2011; 68(4): 215-22.
- [22]Şahin M., Kitosanın Schiff Baz Türevlerinin Sentezi Ve Metal Komplekslerinin İncelenmesi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. 2007.
- [23]Krajewska B., Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A Review, Enzyme Microb. Technol. 2004; 35: 126–139.
- [24]Tarım E., Kitosan İle Sulu Çözeltilerden Krom Uzaklaştırması, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. 2011.
- [25]Kumari A., Kayasta A.M., Immobilization of soybean (Glycine max) α -amylase onto Chitosan and Amberlite MB-150 beads: Optimization and characterization, J. Mol. Catal. B: Enzym. 2011; 69: 8-14.
- [26]Öktem T., Demir A.,Seventekin N., Kitosanın Tekstil Sanayiinde Antimikrobiyal Madde Olarak Kullanımının Araştırılması,Tekstil Ve Konfeksiyon. 2008; 2: 94-102.
- [27]Sureshkumar M., Lee C.H.,Polydopamine coated magnetic-chitin (MCT) particles as a new matrix for enzyme immobilization, Carbohydr. Polym. 2011; 84: 775–780.
- [28]Jiang D.S., Long S.Y., Huang J., Xiao H.Y., Zhou J.H., Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase on magnetic chitosan microspheres, Biochem. Eng. J. 2005; 25: 15–23.
- [29]Shukla S.K., Mishra A.K., Arotiba O.A., Mamba B.B., Chitosan based nanomaterials: A state of the art review, Int. J. Biol. Macromol. 2013; 59: 46–58.
- [30]Lee U.H.,Yoo H.Y., Lkhagvasuren T., Song Y.S., Park C., Kim J., Kim S.W., Enzymatic fuel cells based on electrodeposited graphite oxide/cobalt hydroxide/chitosan composite–enzyme electrode, Biosens. Bioelectron. 2013; 42: 342–348.
- [31]Yang S., Luo S.L., Liu C., Wei W., Direct synthesis of graphene–chitosan composite and its application as an enzymeless methyl parathion sensor, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2012; 96: 75– 79.

- [32]Shawky H.A., El-Aassar A.H.M., Abo-Zeid D.E., Chitosan/Carbon Nanotube Composite Beads: Preparation, Characterization, and Cost Evaluation for Mercury Removal from Wastewater of Some Industrial Cities in Egypt, *J. Appl. Polym. Sci.* 2012; 125: E93–E101.
- [33]Peker İ., Oktar F., Eroğlu M., Morkoç E., Kerevit Kabuklarından Kitosan Üretilmesi Ve Kesilmiş Sütün Suyundan Laktoz İzolasyonu İşleminde Kullanılması, Marmara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi. 2006.
- [34]Lee D.W., Powers K., Baney R., Physicochemical properties and blood compatibility of acylated chitosan nanoparticles, *Carbohydr. Polym.* 2004; 58: 371-377.
- [35]Zhai R., Zhang B., Wan Y., Li C., Wang J., Liu J., Chitosan-Halloysite hybrid-Nanotubes: Horseradish Peroxidase Immobilization and Applications in Phenol Removal, *Chem. Eng. J.* 2013; 214: 304-309.
- [36]Lopez-Leon T., Carvalho, E.L.S., Seijo B., Ortega-Vinuesa J.L., Bastos-Gonzalez D. Physicochemical Characterization of Chitosan Nanoparticles: Electrokinetic and Stability Behavior, *J. Colloid Interface Sci.* 2005; 283: 344-351.
- [37]Tharnatan R.N., Kittur F.S., Chitin the undisputed biomolecule of great potential, *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2003; 43(1): 61-87.
- [38]Demir A., Seventekin N., Kitin, Kitosan ve Genel Kullanım Alanları, *Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 2009 ; 3(2): 92-103.
- [39]Abdelaal M.Y., Sobahi T.R., Al-Shareef H.F., Modification of chitosan derivatives of environmental and biological interest: A green chemistry approach, *Int. J. Biol. Macromol.* 2013; 55: 231– 239.
- [40]Kurt Ş., Zorba Ö., Kitin, Kitosan ve Türevlerinin Gıdalarda Kullanım Olanakları, *Gıda.* 2005; 30(6): 371-378.
- [41]Lim H.N., Huang N.M., Loo C.H., Facile preparation of graphene-based chitosan films: Enhanced thermal, mechanical and antibacterial properties, *J. Non-Cryst. Solids.* 2012; 358: 525–530.
- [42]Bustos-Ramírez K., Martínez-Hernández A.L., Martínez-Barrera G., Icaza M., Castaño V.M., Velasco-Santos C., Covalently Bonded Chitosan on Graphene Oxide via Redox Reaction, *Materials* 2013; 6 (3): 911-926.
- [43]Pandele, A. M., Dinescu, S., Costache, M., Vasile, E., Obreja, C., Iovu, H., Ionita, M., Preparation and In Vitro, Bulk, and Surface Investigation of Chitosan/Graphene Oxide Polym. Composite 2013; 34, 2116–2124.
- [44]The Sorbents: Chitin, Chitosan and Derivatives, <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/6426/05CAPITOL3.pdf;jsessionid=D05DD22737F4B89D36F178E16A2E85D9.tdx2?sequence=5>

- [45]Manocha L. M., Gajera H., Mankadia V., Manocha S., Oxidation-Reduction Of Natural Graphite- A Step Towards Synthesis Of Graphene, *Journal of Pure and Applied Sciences*. 2010; 18: 92 – 97.
- [46]Kozal B., Karbon Tabanlı Petek Örgülerin Elektronik Özellikleri, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. 2012.
- [47]Littlejohn S.D., Background Theory, Electrical Properties of Graphite Nanoparticles in SiliconSpringer Theses. 2014; 5-38.
- [48]Kopeliovich D., Graphite, <http://www.substech.com/>
- [49]Swapan K.P., Enoki T., Rao C.N.R., Graphene and Its Fascinating Attributes, <http://www.worldscibooks.com/physics/7989.html>, 2011.
- [50]Kuila T., Bose S., Mishra A.K., Khanra P., Kim N.H., Lee J.H., Chemical functionalization of graphene and its applications, *Prog. Mater Sci.* 2012;57(7):1061–1105.
- [51]Wang C., Feng C., Gao Y, Ma X., Wu Q., Wang Z., Preparation Of A Graphene-Based Magnetic Nanocomposite For The Removal Of An Organic Dye From Aqueous Solution, *Chem. Eng. J.* 2011; 173 (1): 92– 97.
- [52]Pinto A.M., Gonçalves I.C., Magalhaes F.D., Graphene-based materials biocompatibility: A Review, *Colloids Surf., B.* 2013; 111: 188–202.
- [53]Wang S., Sun H., Ang H.M., Tadé M.O., Adsorptive remediation of environmental pollutants using novel graphene-based nanomaterials, *Chem. Eng. J.* 2013; 226: 336–347.
- [54]Eigler S., Transparent and Electrically Conductive Films from Chemically Derived Graphene, *Physics and Applications of Graphene – Experiments*, DOI: 10.5772/14133, 2011.
- [55]Ramachandran R., Felix S., Joshi G.M., Raghupathy B.P.C., Jeong S.K., Grace A.N., Synthesis of graphene platelets by chemical and electrochemical route, *Mater. Res. Bull.* 2013; 48(10): 3834–3842.
- [56]Chen J., Yao B., Li C., Shi G., An improved Hummers method for eco-friendly synthesis of graphene oxide, *Carbon*. 2013; 64: 225–229.
- [57]Ghaffarzadeh Khasha, IDTechEx forecasts a \$100 million graphene market in 2018, <https://www.cambridgenetwork.co.uk>, 2012)
- [58] University of Turku, Graphenes, <http://www.utu.fi/en/units/sci/units/chemistry/research/mcca/Pages/Subpages%20of%20Functional%20Materials/Graphenes.aspx>, 24.04.2014
- [59]Eremia S.A.V., Vasilescu I., Radoi A., Litescu S.C., Radu G.L., Disposable biosensor based on platinum nanoparticles-reduced graphene oxide-laccase biocomposite for the determination of total polyphenolic content, *Talanta*. 2013; 110: 164–170.
- [60]Pei S., Cheng H.M., The reduction of graphene oxide, *Carbon*. 2012; 50(9): 3210-3228.
- [61]Shen J., Li T., Long Y., Shi M., Li N., Ye M., One-step solid state preparation of reduced graphene oxide, *Carbon*. 2012; 50 (6): 2134 –2140.

- [62]Park S., An J., Potts J.R., Velamakann A., Murali S., Ruoff R.S., Hydrazine-reduction of graphite- and graphene oxide, *Carbon*. 2011; 49 (9): 3019–3023.
- [63]Zhao Y., Zhou Y., O'Hayre R., Shao Z., Electrocatalytic oxidation of methanol on Pt catalyst supported on nitrogen-doped graphene induced by hydrazine reduction, *J. Phys. Chem. Solids*. 2013; 74 (11): 1608–1614.
- [64]Hakimi M., Alimard P., Graphene: Synthesis and Applications in Biotechnology - A Review, *World Applied Programming*. 2012. 2 (6); 377-388.
- [65]Stankovich S., Dikin D.A., Piner R.D., Kohlhaas K.A., Kleinhammes A., Jia Y., Wu Y., Nguyen S.T., Ruoff R.S., Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide, *Carbon*. 2007; 45(7): 1558–1565.
- [66]Singh V., Joung D., Zhai L., Das S., Khondaker S. I., Seal S., Graphene based materials: Past, present and future, *Prog. Mater Sci*. 2011; 56 (8): 1178–1271.
- [67]Dizge M.G., *Trametes versicolor* Beyaz Çürükçül Fungusundan Lakkaz Enziminin Saflaştırılması Ve Kısmi Nitelendirilmesi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik Ve Fen Bilimleri Enstitüsü. 2007.
- [68]Kuzucu M., Pazarlıoğlu N.K., Ozmen F., Karani O.R., Akdogan H.A., Gocenoglu A., Ucar M.C., Erden E., Simulation Of Cinnabarinic Acid Production In Batch Cultures Of *Pycnoporus cinnabarinus*, *J. Biotechnol*. 2008; 136:452.
- [69]Gökkaya Ö., Beyaz kiraz meyvesi (*Starks Gold*) Polifenoloksidaz Enziminin Karakterizasyonu, Çukurova Üniversitesi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü. 2009.
- [70]Camarero S., Garcia O., Vidal T., Colom J., Rio J.C., Gutierrez A., Gras J.M., Monje R., Martinez M.J., Martinez A.T., Efficient Bleaching Of Non-Wood High-Quality Paper Pulp Using Laccase-Mediator System, *Enzyme Microb. Technol*. 2004; 35 (2-3): 113–120.
- [71]Yang W.Y., Min D.Y., Wen S.X., Jin L., Rong L., Tetsu M., Bo C., Immobilization And Characterization Of Laccase From Chinese *Rhus Vernicifera* On Modified Chitosan, *Process Biochem*. 2006; 41(6): 1378–1382.
- [72]Xu X., Lu P., Zhou Y., Zhao Z., Guo M., Laccase Immobilized On Methylene Blue Modified Mesoporous Silica MCM-41/PVA, *Mater. Sci. Eng., C*. 2009; 29 (7): 2160–2164.
- [73]Tan Y., Deng W., Ge B., Xie Q., Huang J., Yao S., Biofuel Cell And Phenolic Biosensor Based On Acid-Resistant Laccase–Glutaraldehyde Functionalized Chitosan–Multiwalled Carbon Nanotubes Nanocomposite Film, *Biosens Bioelectron*. 2009; 24 (7): 2225–2231.
- [74]Couto R.S., Herrera T.J.L., Industrial And Biotechnological Applications Of Laccases: A Review. *Biotechnol. Adv*. 2006; 24 (5): 500–513.
- [75]Call H.P., Mucke I., History, Overview And Applications Of Mediated Lignolytic Systems, Especially Laccase-Mediator-Systems (Lignozym ® process). *J. Biotechnol*. 1997; 53 (2-3): 163–202.

- [76]Hassani T., Ba S., Cabana H., Formation of enzyme polymer engineered structure for laccase and cross-linked laccase aggregates stabilization, *Bioresour Technol.* 2013; 128: 640–645.
- [77]Arsenault A., Cabana H., Jones J.P., Laccase-Based CLEAs: Chitosan as a Novel Cross-Linking Agent, *Enzyme Research*, Enzyme Research 2011; 2011: 1-10.
- [78]Morozova O.V, Shumakovich G.P., Shleev S.V., Yaropolov Y.I. Laccase-Mediator Systems And Their Applications: A Review, *Appl Biochem Microbiol.* 2007; 43(5): 523–35.
- [79]Giardina P., Faraco V., Pezzella C., Piscitelli A., Vanhulle S., Sannia G. Laccases: A Never-Ending Story, *Cell Mol Life Sci.* 2010;67(3): 69–85.
- [80]Fernández-Fernández M., Sanromán M.S., Moldes D., Recent developments and applications of immobilized laccase, *Biotechnol Adv.* 2013; 31(8): 1808-25.
- [81]Madhavi V., Lele S.S., Laccase: Properties and Applications, *Bioresources*, 2009; 4(4): 1694-1717.
- [82]Givaudan A., Effosse A., Faure D, Potier P., Bovillant M., Bally R. Polyphenoloxidase from *azospirillum lipoferum* isolated from the rhizosphere: evidence for a laccase in non-motile strains of *azospirillum lipoferum*. *FEMS Microbiol Lett.* 1993;108 (2): 205–210.
- [83]Sanchez-Amat A, Solano F., A pluripotent polyphenoloxidase from the melanogenic marine *Alteromonas* sp. shares catalytic capabilities of tyrosinase and laccases, *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 240 (3):787–92.
- [84]Cardinal-Watkins C., Nicell J. A., Enzyme-catalyzed oxidation of 17 β -Estradiol using immobilized laccase from *T. Versicolor*, *Enzyme Research* 2011; 2011: 1-11.
- [85]Rotkova J., Sulakova R., Korecka L., Zdrzilova P., Jandova M., Lenfeld J., Horak D., Bilkova Z., Laccase immobilized on magnetic carriers for biotechnology applications, *J. Magn. Magn. Mater.* 2009; 321(10): 1335–1340.
- [86]Aytar P., Beyaz Çürükçül Funguslarla Linyit Kömüründen Kükürt Giderimi İçin Optimum Koşulların Belirlenmesi, Balıkesir Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü. 2007.
- [87]Forde J., Tully E., Vakurov A., Gibson T.G., Millner P., Fagain C.F., Chemical modification and immobilisation of laccase from *Trametes hirsuta* and from *Myceliophthora thermophila*, *Enzym. Microb. Technol.* 2010;46 (6): 430–437.
- [88]Enaud E., Trovaslet M., Naveau F., Decristoforo A., Bizet S., Vanhulle S., Jolivald C., Laccase chloride inhibition reduction by an anthraquinonic substrate, *Enzym. Microb. Technol.* 2011; 49 (6-7): 517– 525.
- [89]Torres E., Jaimes Bustos I., Borgne L.S., Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants, *Appl. Catal., B.* 2003; 46 (1): 1–15.
- [90]Claus H., Laccases: structure, reactions, distribution, *Micron.*2004;35(1-2):93–96.

- [91]Rivera-Hoyos C.M., Morales-Alvarez E.D., Poutou-Pinales R.A., Pedroza-Rodriguez A.M., Rodriguez-Vazquez R., Delgado-Boada J.M., Fungal Laccases, Fungal Biology Reviews. 2013; 27 (3-4): 67-82.
- [92]Bermek H., Li K., Eriksson E-L. K., Laccase-less mutants of the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus* cannot delignify kraft pulp, J. Biotechnol.1998;66(2-3):117–124.
- [93]Tuncer, M.,Lakkaz, Kısım 1: Potansiyel Endüstriyel Ve Biyoteknolojik Uygulamaları,Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi. 2010;22: 19-63
- [94] Stoilova I., Krastanov A., Stanchev V., Properties of crude laccase from *Trametes versicolor* produced by solid-substrate fermentation, Adv Biosci Biotechno. 2010; 1: 208-215.
- [95]Cristovao R.Q.,Tavares A.P.M.,Brigida A.I., Loureiro J.M.,Boaventura R.A.R., Macedo E.A., Coelho M.A.Z., Immobilization Of Commercial Laccase Onto Green Coconut Fiber By Adsorption And Its Application For Reactive Textile Dyes Degradation, J Mol Catal B Enzym. 2011; 72(1-2): 6–12.
- [96]Arslan F., Ksantin Tayini İçin Polipirol Filme Ksantin Oksidaz Enziminin İmmobilizasyonu İle Yeni Bir Biyosensör Hazırlanması, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. 2004.
- [97]Akardere E., Zeytinyağı Fabrikası Sıvı Atığının Biyoarıtımında Fenol Parçalayıcı Enzim Aktivitelerinin İncelenmesi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı. 2012.
- [98]Gedikli S., Aytar P. Çabuk A., Ünal A. Kolankaya N., Lakkaz Enzimi ile Kot Boyarmaddesinin Dekolorizasyonu, Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi –C, Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji. 2010; 1 (1): 59-70.
- [99]Kudanga T., Nyanhongo G.S., Guebitz G.M., Burton S., Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: A review, Enzym. Microb. Technol. 2011; 48 (3): 195–208.
- [100]Forgacs E., Cserhati T.T., Oros G., Removal Of Synthetic Dyes From Wastewaters: A Review, Environment International. 2004; 30 (7): 953– 971.
- [101]Lu L., Zhao M., Li G.F., Li J., Wang T.N., Li D.B., Xu T.F., Decolorization of synthetic dyes by immobilized spore from *Bacillus amyloliquefaciens*, Catal. Commun. 2012; 26 (5): 58–62.
- [102]Kapdan I.K., Kargi F., Atıksulardan Tekstil Boyar Maddelerinin Adsorpsiyonlu Biyolojik Arıtım İle Giderimi. Turk J. Engin. Environ. Sci., 2000; 24: 161-169.
- [103]Yu J., Wang X., Yue P.L., OPTIMAL Decolorization And Kinetic Modeling Of Synthetic Dyes By Pseudomonas Strains, Water Res. 2001; 35(15): 3579–3586.
- [104]Banat I.M., Nigam P., Singh D., Marchant R., Microbial Decolorization Of Textile-Dyecontaining Effluents: A Review, Bioresour. Technol. 1996; 58 : 217-227.
- [105]Kaya C., İnorganik Kimya 2,Özkan Matbacılık Gazetecilik San.Tic.Ltd.Şti., Ankara, 2010, 2, 1-475.

- [106]Temoçin H., Tekstil Atık Sularının Renginin Giderilmesi, Marmara Üniversitesi, Tekstil Eğitimi Anabilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü. 2006.
- [107]Savcı S., Basic Blue 41 Boyar Maddesinin Canlı Ve İnaktif Sucul Bitki *Myriophyllum Spicatum* Tarafından Adsorblanabilirliğinin İncelenmesi, Çukurova Üniversitesi, Çevre Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü. 2005.
- [108]Barışık Ş., Bazı Endüstrilerden Çıkan Atık Çamurların Boyar Madde Gideriminde Adsorban Olarak Kullanımının İncelenmesi, Çukurova Üniversitesi, Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü. 2009.
- [109]Kunamneni A., Ghazi I., Camarero S., Ballesteros A., Plou F.J., Alcalde M., Decolorization of synthetic dyes by laccase immobilized on epoxy-activated carriers, Process Biochem. 2008; 43 (2): 169–178.
- [110]Çevre ve Şehircilik Bakanlığı, 109G083 Nolu Tübitak Kamag Projesi, <http://www.csb.gov.tr/db/cygm/editordosya/ArTesOpYonElKitabi.pdf>.
- [111]Diler E., Sulu Ortamda Bulunan Azo Boyar Maddelerinin Fotokatalitik Oksidasyon Yöntemi İle Parçalanması Ve Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi, Balıkesir Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2010.
- [112]Jain K., Shah V., Chapla D., Madamwar D., Decolorization and degradation of azo dye – Reactive Violet 5R by an acclimatized indigenous bacterial mixed cultures-SB4 isolated from anthropogenic dye contaminated soil, J Hazard Mater. 2012; 30 (213– 214): 378– 386.
- [113]Rodríguez Couto S., Decolouration of industrial azo dyes by crude laccase from *Trametes hirsuta*, J Hazard Mater.2007; 148 (3): 768–770.
- [114]Uçar B., Tekstil Atık Sularındaki Reaktif Boyaların Farklı Katı Atıklar Kullanılarak Adsorpsiyonla Giderimi Ankara Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü. 2009.
- [115]Aldegs Y., Khraisheh, M.A.M., Allen, S.J, Ahmad, M.N., Effect of Carbon Surface Chemistry on the Removal of Reactive Dyes From Textile Effluent. Water Researce.2000; 34 (3): 927-935.
- [116]Champagne P.P., Ramsay J.A., Reactive Blue 19 Decolouration By Laccase Immobilized On Silica Beads, Appl Microbiol Biotechnol. 2007; 77(4): 819–823.
- [117]Erkurt E.A., Ünyayar A., Kumbur H., Remazol Brilliant Blue Royal, Drimaren Blue CL-BR'nin Beyaz Çürükçül Funguslar Tarafından Renk Gideriminin Araştırılması, <http://ekk2008.itu.edu.tr>
- [118]Yıldız S., Namal O.Ö., Çekim M., Atık Su Arıtma Teknolojilerindeki Tarihsel Gelişimler, Selçuk Üniversitesi, Müh. Bilim ve Tekn. Derg., 2013; 1(1): 57-67.
- [119]Meng X., Liu G., Zhou J., Fu Q. S., Wang G., Azo dye decolorization by *Shewanella aquimarina* under saline conditions, Bioresour Technol.2012; 114: 95–101.

- [120]Fontenot E.J., Lee Y.H., Matthews R.D., Zhu G., Pavlostathis S.G., Reductive Decolorization of a Textile Reactive Dye bath Under Methanogenic Conditions, *Appl Biochem Biotechnol.* 2003; 109 (1-3): 207-225.
- [121]Sohrabi M.R., Moghri M., Masoumi H.R.F., Amiri S., Moosavi N., Optimization of Reactive Blue 21 removal by nanoscale zero-valent iron using response surface methodology, *Arabian Journal of Chemistry*, Baskıda, 2014.
- [122]Neta J.J.S., Moreira G.C., Silva C.J., Reis C., Reis E.L., Use of polyurethane foams for the removal of the Direct Red 80 and Reactive Blue 21 dyes in aqueous medium, *Desalination* 2011; 281: 55–60.
- [123]Silva M. C., Corrêa A.D., Amorim S.M.T.P., Parpot P., Torres J.A., Chagasa P.M.B., Decolorization of the phthalocyanine dye reactive blue 21 by turnip peroxidase and assessment of its oxidation products, *J Mol Catal B Enzym.*2012; 77: 9–14.
- [124]Akar İ., Teorik Ve Deneysel Titreşim Spektroskopisi Yardımıyla 5-Kloro-8-Hidroksikinolin Ve Zn Ve Mn Komplekslerinin İncelenmesi, Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. 2011.
- [125]Başyigit K.G., Karahan A.G., Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi Ve Laktik Asit Bakterilerinin Tanısında Kullanılması, *Gıda*, 2010; 35 (6): 445-452.
- [126]Turhan O., Bazı Organik Reaksiyonların Ve Metal Ligant Etkileşmelerinin FT-IR İle Eşzamanlı İncelenmesi, Balıkesir Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü. 2008.
- [127]Coşkun, A., Nano Dünyanın Elektronik Gözlüğü Elektron Mikroskobu, http://vizyon21yy.com/documan/egitim_ogretim/icatlar_buluslar/Elektron_Mikroskobu.pdf, Bilim ve Teknik, 2010, 120-122.
- [128]Akçayöz D., Köken K., Kunt G., Müldür İ.B., Saykal S.G., Elektron Mikroskobun Tıpta Kullanım Alanları, <http://tip.baskent.edu.tr/egitim/mezuniyetoncesi/calismagrp/ogrsmpzsnm12/11.2.pdf>
- [129]Yüzüak E., Tb₅Si₂-xGe₂-xT₂x (T=Fe, Mn) Alaşımlarının Yapısal Ve Manyetik Özelliklerinin İncelenmesi, Ankara Üniversitesi, Fizik Mühendisliği Anabilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü. 2008.
- [130]Başkale G., Mononükleer ve Polinükleer Rutenyum-Oksim Komplekslerinin Sentez Ve Molekül Yapısı, Süleyman Demirel Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü. 2007.
- [131]İsmail M.T., Işıklı Göl (Çivril, Denizli) Tortularının Sedimentolojik İncelenmesi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. 2009.
- [132]Tekerek A. Ş., LaMn₂Si₂ alaşımlarının nanoparçacıklarının manyetik ve yapısal özellikleri, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. 2007.

- [133]Kovtyukhova N. I, Ollivier P.J., Martin B.R., Mallouk T.E., Chizhik S.A., Buzaneva E.V., Gorchinskiy A. D., Layer-by-Layer Assembly of Ultrathin Composite Films from Micron-Sized Graphite Oxide Sheets and Polycations, *Chem. Mater.*1999; 11 (3): 771-778.
- [134]Hummers W., Offeman R., Preparation Of Graphitic Oxide, *J. Am. Chem. Soc.*, 1958; 80 (6): 1339–1339
- [135]Guo J, Wang R., Tjiu W.W., Pan J., Liu T., Synthesis of Fe nanoparticles@graphene composites for environmental applications, *J Hazard Mater* 2012; 30 (225– 226): 63–73.
- [136]Botas C., Alvarez P., Blanco P., Granda M., Blanco C., Santamaria R., Romasanta L.J., Verdejo R., Lopez-Manchado M.A., Menendez R., Graphene materials with different structures prepared from the same graphite by the Hummers and Brodie methods, *Carbon*. 2013; 65: 156 –164.
- [137]Wang G., Shen X., Wang B., Yao J., Park J., Synthesis and characterisation of hydrophilic and organophilic graphene nanosheets, *Carbon* 2009; 47 (5): 1359 –1364.
- [138]Karthick R., Brindha M., Selvaraj M., Ramu S., Stable colloidal dispersion of functionalized reduced graphene oxide in aqueous medium for transparent conductive film, *J. Colloid Interface Sci.* 2013; 406: 69–74.
- [139]Phan D.T., Chung G.S., P–n junction characteristics of graphene oxide and reduced graphene oxide on n-type Si(111), *J. Phys. Chem. Solids*. 2013; 74 (11): 1509–1514.
- [140]Singh A., Sinsinbar G., Choudhary M., Kumar V., Pasricha R., Verma H.N., Singh S.P., Arora K., Graphene oxide-chitosan nanocomposite based electrochemical DNA biosensor for detection of typhoid, *Sens Actuators B Chem.*2013; 185: 675– 684.
- [141]Yuanbi Z., Zumin Q., Jiaying H., Preparation and Analysis of Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles Used as Targeted-drug Carriers, *Chin. J. Chem. Eng.* 2008; 16(3): 451-455.
- [142]Songulashvili G., Jimenez-Tobon G.A., Jaspers C., Penninckx M.J., Immobilized laccase of *Cerrina unicolor* for elimination of endocrine disruptor micropollutants, *Fungal Biol.* 2012; 116 (8): 883 -889.
- [143]Sunil S.M., Renuka P.S., Pruthvi K., Swetha M., Malini S., Veena S.M., Isolation, Purification, and Characterization of Fungal Laccase from *Pleurotus sp.* *Enzyme Research* 2011 (2011), 1-7.
- [144]Wolfenden B.S., Willson RL. Radical cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of ABTS. *J Chem Soc Perkin Trans.* 1982; 2: 805–812.
- [145]Silva C., Silva C.J., Zille A., Guebitz G.M., Paulo A.C., Laccase immobilization on enzymatically functionalized polyamide 6,6 fibres, *Enzyme Microb. Technol.* 2007; 41 (6-7): 867–875.
- [146]Zhang J., Xu Z., Chen H., Zong Y., Removal of 2,4-dichlorophenol by chitosan-immobilized laccase from *Coriolus versicolor*, *Biochem. Eng. J.* 2009; 45 (1): 54–59.

- [147]Spinelli D., Fatarella E., Michelea A. D., Pognia R., Immobilization of fungal (*Trametes versicolor*) laccase onto Amberlite IR-120 H beads: Optimization and characterization, *Process Biochem.* 2013; 48 (2): 218–223.
- [148]Silva A.M., Tavares A.P.M., Rocha C.M.R., Cristóvão R.O., Teixeira J.A., Macedo E.A., Immobilization of commercial laccase on spent grain, *Process Biochemistry* 2012;47: 1095–1101.
- [149]Cavellol A., Contreras-Esquivel J.C., Cavalitto S.F., Immobilization of a keratinolytic protease from *Purpureocillium lilacinum* on genipin activated-chitosan beads, *Process Biochem.* 2014; 49 (8):1332–1336
- [150]Adriano W.S., Filho E.H.C., Silva J.A., Giordano R.L.C., Gonçalves L.R.B., Stabilization of penicillin G acylase by immobilization on glutaraldehyde-activated chitosan, *Braz J Chem Eng.* 2005; 22(4):529-538.
- [151]Bradford M., A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Anal. Biochem.* 1976; 72 (1-2): 248-254.
- [152]Ateş S., Doğan N.S, Properties of Immobilized Phenylalanine Ammonia Lyase and Investigation of its Use for the Prediagnosis of Phenylketonuria, *Turk J Biochem.* 2010; 35 (1): 58–62.
- [153]Daâssi D., Rodríguez-Couto S., Nasri M., Mechichi T., Biodegradation of textile dyes by immobilized laccase from *Corioloropsis gallica* into Ca-alginate beads, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2014; 90:71-78.
- [154]Nagar S., Mittal A., Kumar D., Kumar L., Gupta V.K., Immobilization of xylanase on glutaraldehyde activated aluminum oxide pellets for increasing digestibility of poultry feed, *Process Biochem.* 2012; 47 (9): 1402–1410.
- [155]Pal A., Lobo M., Khanum F., Extraction, Purification and Thermodynamic Characterization of Almond (*Amygdalus communis*) β -Galactosidase for the Preparation of Delactosed Milk, *Food Technol. Biotechnol.* 2013; 51 (1): 53–61.
- [156]Rasera K., Ferla J., Dillon A.J.P., Riveiros R., Zeni M., Immobilization of laccase from *Pleurotus sajor-caju* in polyamide membranes, *Desalination* 2009; 245 (1-3): 657–661.
- [157]Khlifi R., Belbahri L., Woodward S., Ellouz M., Dhouib A., Sayadi S., Mechichi T., Decolourization and detoxification of textile industry wastewater by the laccase-mediator system, *J Hazard Mater.* 2010; 175 (1-3): 802–808.
- [158]Matto M., Husain Q., Decolorization of direct dyes by immobilized turnip peroxidase in batch and continuous processes, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2009; 72 (3): 965– 971.
- [159]Osma J.F., Toca-Herrera J.L, Rodriguez-Couto S., Transformation pathway of Remazol Brilliant Blue R by immobilised laccase, *Bioresour Technol.* 2010; 101(22): 8509–8514.

- [160]Yao Y., Miao S., Liu S., Ma L.P., Sun H., Wang S., Synthesis, characterization, and adsorption properties of magnetic Fe_3O_4 @graphene nanocomposite, *Chem. Eng. J.* 2012; 184 (1): 326– 332.
- [161]Kouassi G.K., Irudayaraj J., McCarty G., Examination of Cholesterol oxidase attachment to magnetic nanoparticles, *J Nanobiotechnol* 2005; 3(1): 1-9.
- [162]Xiao-chen Wu, Yan Z., Cong-yu W., Hai-xia W., Preparation and characterization of magnetic Fe_3O_4 /CRGO nanocomposites for enzyme immobilization, *Trans. Nonferrous Met. Soc. China* 2012; 22 (1): 162-168.
- [163]Narayanan T.N., Liu Z., Lakshmy P.R., Gao W., Nagaoka Y., Kumar D. S., Lou J., Vajtai R., Ajayan P.M., Synthesis of reduced graphene oxide- Fe_3O_4 multifunctional freestanding membranes and their temperature dependent electronic transport properties, *Carbon*. 2012; 50 (3); 1338 –1345.
- [164]Li B., Shan C.L., Zhou Q., Fang Y., Wang Y.L., Xu F., Han L.R., Ibrahim M., Guo L.B., Xie G.L., Sun G.C., Synthesis, Characterization, and Antibacterial Activity of Cross-Linked Chitosan-Glutaraldehyde, *Mar. Drugs*. 2013; 11 (5): 1534-1552.
- [165]Acharyulu R.S., Gomathi T., Sudha P.N., Physico-chemical characterization of cross linked chitosan –polyacrylonitrile polymer blends, *Der Pharmacia Lettre*, 2013; 5 (2): 354-363.
- [166]Haldorai Y., Shim J.J., Multifunctional Chitosan-Copper Oxide Hybrid Material: Photocatalytic and Antibacterial Activities, *Int J Photoenergy*. 2013; 2013: 1-8.
- [167]Hong J., Xu D., Gong P., Ma H., Dong L., Yao S., Conjugation of enzyme on superparamagnetic nanogels covered with carboxyl groups, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 2007; 850 (1-2): 499–506.
- [168]Shouman M.A., Khedr S.A., Attia A.A., Basic Dye Adsorption on Low Cost Biopolymer: Kinetic And Equilibrium Studies, *IOSR-JAC*. 2012; 2(4): 27-36.
- [169]El-Hefian E.A., Elgannoudi E.S., Mainal A., Yahaya A.H., Characterization of chitosan in acetic acid: Rheological and thermal studies, *Turk J Chem* 2010; 34 (1): 47 – 56.
- [170]Arsalani N., Fattahi H., Nazarpour M., Synthesis and characterization of PVP-functionalized superparamagnetic Fe_3O_4 nanoparticles as an MRI contrast agent, *Express Polym Lett*. 2010; 4(6): 329–338.
- [171]Mohammadi A., Barikani M., Barmar M., Effect of surface modification of Fe_3O_4 nanoparticles on thermal and mechanical properties of magnetic polyurethane elastomer nanocomposites, *J Mater Sci*. 2013; 48:7493–7502.
- [172]Indira T.K., Lakshmi P.K., Magnetic nanoparticles - A review, *Int. J. Pharm. Sci. Nanotechnol* 2010; 3 (3): 1035-1042.
- [173]Goya G. F., Berquo T.S., Fonseca F.C., Static and dynamic magnetic properties of spherical magnetite nanoparticles, *J Appl Phys* 2003; 94 (5), 3521-3528

- [174]Xu J., Ju C., Sheng J., Wang F., Zhang Q., Sun G., Sun M., Synthesis and Characterization of Magnetic Nanoparticles and Its Application in Lipase Immobilization, *Bull. Korean Chem. Soc.* 2013; 34(8): 2408-2412.
- [175]Liu Y., Zeng Z., Zeng G., Tang L., Pang Y., Li Z., Liu C., Lei X., Wu M., Ren P., Liu Z., Chen M., Xie G. , Immobilization of laccase on magnetic bimodal mesoporous carbon and the application in the removal of phenolic compounds, *Bioresour Technol.* 2012; 115:21-26.
- [176]Tang T., Fan H., Ai S., Han R., Qiu Y., Hemoglobin (Hb) immobilized on amino-modified magnetic nanoparticles for the catalytic removal of bisphenol A, *Chemosphere.* 2011; 83 (3): 255-64.
- [177]Pavlidis I. V., Vorhaben T., Tsoufis T., Rudolf P., Bornscheuer U. T., Gournis D., Stamatis H., Development of effective nanobiocatalytic systems through the immobilization of hydrolases on functionalized carbon-based nanomaterials, *Bioresour. Technol.* 2012; 115: 164–171.
- [178]Hai-yan X., Jun H., Cheng L., De-sheng J., Immobilization of laccase on amine-terminated magnetic nano-composite by glutaraldehyde crosslinking method, *Trans. Nonferrous Met.Soc. China.* 2006; 16: 414-418.
- [179]Champagne P.P., Ramsay J.A., Dye decolorization and detoxification by laccase immobilized on porous glass beads, *Bioresour Technol.* 2010;101(7):2230–2235.
- [180]Yinghui D., Qiuling W., Shiyu F., Laccase stabilization by covalent binding immobilization on activated polyvinyl alcohol carrier, *Lett. Appl. Microbiol.* 2002; 35 (6): 451–456.
- [181]Sathishkumar P., Kamala-Kannan S., Cho M., Kim J.S., Hadibarata T., Salim M.R., Oh B.-T., Laccase immobilization on Cellulose nanofiber: The catalytic efficiency and recycle application for simulated dye effluent treatment, *J Mol Catal B Enzym.* 2014; 100: 111– 120
- [182]Wang F., Guo C., Yang L.R., Liu C.Z., Magnetic mesoporous silica nanoparticles: Fabrication and their laccase immobilization performance, *Bioresour.Technol.* 2010; 101 (23): 8931–8935.
- [183]Makas Y. G., Kalkan N. A., Aksoy S., Altinok H., Hasirci N., Immobilization of laccase in k-carrageenan based semi-interpenetrating polymer networks, *J Biotechnol.* 2010; 148 (4): 216-220.
- [184]Kumar V.V., Sathyaselvabala V., Premkumar M.P., Vidyadevi T., Sivanesan S., Biochemical characterization of three phase partitioned laccase and its application in decolorization and degradation of synthetic dyes, *J Mol Catal B Enzym.* 2012; 74 (1-2): 63-72.
- [185]Karagoz B., Bayramoglu G., Altintas B., Bicak N., Arica M.Y., Amine functional monodisperse microbeads via precipitation polymerization of N-vinyl formamide: Immobilized laccase for benzidine based dyes degradation, *Bioresour Technol.* 2011; 102(13): 6783-6790.
- [186]Tayefi-Nasrabadi H, Asadpour R., Effect of heat treatment on buffalo (*Bubalus bubalis*) lactoperoxidase activity in raw milk, *J Biol Sci.* 2008; 8(8): 1310–1315.

- [187]Mainer G., Sanchez L., Ena J.M., Calvo M., Kinetic and thermodynamic parameters for heat denaturation of bovine milk IgG, IgA and IgM, *J Food Sci* 1997; 62(5): 1034–1038.
- [188]Pal A., Khanum F., Covalent immobilization of xylanase on glutaraldehyde activated alginate beads using response surface methodology: Characterization of immobilized enzyme, *Process Biochem.* 2011; 46 (6): 1315–1322.
- [189]Chang M.Y., Kao C.H., Juang R.S., Thermal inactivation and reactivation of β -glucosidase immobilized on chitosan-clay composite. *Int J Biol Macromol.* 2008; 43(1): 48-53.
- [190]Bayramoglu, G., Kacar, Y., Arica, M.Y., Covalent immobilization of lipase onto hydrophobic group incorporated poly(hydroxyethyl-methacrylate) based membrane matrix. *J. Food Eng.* 2002; 52 (4): 367–374.
- [191]Shao, J., Ge, H., Yang, Y., Immobilization of polyphenol oxidase on chitosan-SiO₂ gel for removal of aqueous phenol. *Biotechnol Lett.* 2007 29(6):901-905.
- [192]Arica M. Y., Altintas B., Bayramoğlu G., Immobilization of laccase onto spacer-arm attached non-porous poly(GMA/EGDMA) beads: Application for textile dye degradation, *Bioresour Technol.* 2009;100(2):665–669.
- [193]Bayramoğlu G., Arica M. Y., Immobilization of laccase onto poly(glycidylmethacrylate) brush grafted poly(hydroxyethylmethacrylate) films: Enzymatic oxidation of phenolic compounds, *Mat Sci Eng C-Bio* 2009; 29(6): 1990–1997.
- [194]Wan Y.-Y., Lu R., Xiao L., Du Y.-M., Miyakoshi T., Chen C.-L., Knill C.J., Kennedy J. F., Effects of organic solvents on the activity of free and immobilised laccase from *Rhus vernicifera*, *Int J Biol Macromol.* 2010; 47(4): 488-495.
- [195]Minussi R.C., Miranda M. A., Silva J.A., Ferreira C.V., Aoyama H., Marangoni S., Rotilio D., Pastore G.M., Durán N., Purification, characterization and application of laccase from *Trametes versicolor* for colour and phenolic removal of olive mill wastewater in the presence of 1-hydroxybenzotriazole, *Afr J Biotechnol.* 2007; 6 (10):1248-1254.
- [196]Ratanapongleka K., Phetsom J., Decolorization of Synthetic Dyes by Crude Laccase from *Lentinus Polychrous* Lev., *Int. J. Chem. Eng. Appl.* 2014; 5 (1): 26-30.
- [197]Ryan S., Schnitzhofer W., Tzanov T., Cavaco-Paulo A., Gübitz G.M., An acid-stable laccase from *Sclerotium rolfsii* with potential for wool dye decolourization, *Enzyme and Microbial Technology.* 2003; 33 (6): 766–774.
- [198]Rodríguez-Couto S., Laccase from *Trametes hirsuta* Grown on Paper Cuttings: Application to Synthetic Dye Decolorization at Different pH Values, *Eng. Life Sci.* 2007; 7 (3): 229–234.
- [199]Mogharabi M., Nassiri-Koopaei N., Bozorgi-Koushalshahi M., Nafissi-Varcheh N., Bagherzadeh G., Faramarzi M. A., Immobilization of Laccase in Alginate-Gelatin Mixed Gel and Decolorization of Synthetic Dyes, *Bioinorg. Chem. Appl.* 2012; 2012:1-6.

- [200]Murugesan K., Nam I.H., Kim Y.M., Chang Y.S., Decolorization of reactive dyes by a thermostable laccase produced by *Ganoderma lucidum* in solid state culture, *Enzyme Microb. Technol.* 2007; 40(1): 1662–1672.
- [201]Michniewicz A., Ledakowicz S., Ullrich R., Hofrichter M., Kinetics of the enzymatic decolorization of textile dyes by laccase from *Cerrena unicolor*, *Dyes and Pigments* 2008; 77 (2): 295-302.
- [202]Bayramoğlu G., Yilmaz M., Arica M.Y., Reversible immobilization of laccase to poly(4-vinylpyridine) grafted and Cu(II) chelated magnetic beads: Biodegradation of reactive dyes, *Bioresour Technol.* 2010; 101 (17): 6615–6621.
- [203]Ecotextile, <http://oecotextiles.wordpress.com/tag/reactive-dye>
- [204]Mendoza L., Jonstrup M., Hatti-Kaul R., Mattiasson B., Azo dye decolorization by a laccase/mediator system in a membrane reactor: Enzyme and mediator reusability, *Enzyme Microb Technol.* 2011; 49(5): 478–484.
- [205]Murugesan K., Kim Y.-M., Jeon J.-R., Chang Y.-S., Effect of metal ions on reactive dye decolorization by laccase from *Ganoderma lucidum*, *J Hazard Mater.* 2009; 168(1): 523–529.
- [206]Zucconi F., Monaco A., Forte M., De-Bertoldi M., Phytotoxins during the stabilization of organic matter. In: Gasser, J.K.R., Commission European Communities (Eds.), *Composting of Agricultural and Other Wastes*. Elsevier Applied Science Publishers, 1985; 73–86.