

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ * FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MODİFİYE KİTOSAN TÜREVLERİNDE İMMOBİLİZE EDİLEN LAKKAZ
İLE BOYA GİDERİMİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Günay İrem ALTINDAĞ

Anabilim Dalı : Kimya

Programı : Biyokimya

MANİSA 2013

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ * FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MODİFİYE KİTOSAN TÜREVLERİNDE İMMOBİLİZE EDİLEN LAKKAZ
İLE BOYA GİDERİMİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GÜNAY İREM ALTINDAĞ

Celal Bayar Üniversitesi Kimya Bölümünce Kabul Edilen
Yüksek Lisans Tezidir.

Tezin Teslim Tarihi: 11.06.2013

Tezin Sözlü savunma Tarihi: 25.06.2013

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Tülin AYDEMİR

Jüri Üyesi: Prof. Dr. Tülin AYDEMİR

Jüri Üyesi: Prof. Dr. Leman TARHAN

Jüri Üyesi: Doç. Dr. Ayşe DİNÇER

2013

MANİSA

ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ	xi
KISALTMALAR LİSTESİ	xii
TEŞEKKÜRLER	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xv
1.GİRİŞ	1
1.1. Enzim İmmobilizasyonu	1
1.2. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri	3
1.2.1. Tutuklanmış Enzimler	3
1.2.2. Bağlanmış Enzimler	5
1.2.2.1. Çapraz Bağlama	5
1.2.2.2. Taşıyıcıya Bağlanma Yöntemleri	5
1.3. Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılan Adsorbanlar	8
1.3.1. Kitin	9
1.3.2. Kitosan	9
1.3.2.1. Kitosanın Özelliklerine Etki Eden Parametreler	11
1.3.2.2. Kitosanın Kullanım Alanları	11
1.3.3. Çok Duvarlı Karbon Nanotüp (MWCNTs)	12
1.4. Lakkaz	14
1.4.1. Bakır Merkezleri	17
1.4.2. Protein Karakterizasyonu	18

1.4.3. Lakkaz Enzimlerinin Reaksiyon Mekanizmaları	19
1.4.4. Lakkaz Enziminin Endüstriyel ve Biyoteknolojik Uygulamaları	20
1.5. Boyar Maddeler	21
1.5.1. Metil Kırmızısı (MR)	23
1.5.2. Metilen Mavisi (MB)	24
1.5.3. Kristal Viyole (CV)	24
2. MATERYAL VE YÖNTEM	26
2.1. Materyal	26
2.1.1. Çözeltilerin Hazırlanması	26
2.2. Yöntem	27
2.2.1. Çok Duvarlı Karbon Nanotüplerin (MWCNTs) Fonksiyonlandırılması	27
2.2.2. Çok Duvarlı Karbon Nanotüp-Kitosan (MWCNTs-CS) Boncukların Hazırlanması	27
2.2.3. Kitosan Aktivasyonu için Glutaraldehit Konsantrasyonunun Belirlenmesi	28
2.2.4. Lakkaz Enziminin Çapraz Bağlı Boncuklar üzerine İmmobilizasyonu	29
2.2.5. Serbest ve İmmobilize Lakkazın Aktivite Ölçümü	29
2.2.6. İmmobilizasyon Veriminin Hesaplanması	30
2.2.7. Taşıyıcı Üzerine Bağlanan Protein Miktarının Belirlenmesi	30
2.2.8. İmmobilizasyon Süresinin Belirlenmesi	31
2.2.9. İmmobilize Enzimin Karakterizasyonu	31
2.2.9.1. Optimum pH' ın Belirlenmesi	31
2.2.9.2. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi	31
2.2.9.3. Enzim Kinetiği	31
2.2.9.4. Depolama Kararlılığı	31

2.2.10. MWCNTs-CS Üzerine İmmobilize Edilen <i>T. Versicolor</i> Lakkaz ile Boya	
Giderimi	32
2.2.10.1. İmmobilize Lakkaz ile Metil Kırmızısı (MR) Boyasının Giderimi	33
2.2.10.2. İmmobilize Lakkaz ile Metilen Mavisi (MB) Boyasının Giderimi	34
2.2.10.3. İmmobilize Lakkaz ile Kristal Viyole (CV) Boyasının Giderimi	35
2.2.11. Boya Giderimini Etkileyen Faktörler	35
2.2.11.1. Boya Giderimi Üzerine pH Etkisi	35
2.2.11.2. Boya Giderimi Üzerine Reaksiyon Süresinin Etkisi	36
2.2.11.3. Boya Giderimi Üzerine Boya Konsantrasyonunun Etkisi	36
2.2.11.4. Boya Giderimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	36
2.2.11.5. Boya Giderimi Üzerine Farklı Boncuk Miktarının Etkisi	36
3.SONUÇLAR VE ÖNERİLER	37
3.1. MWCNTs-CS Üzerine Lakkaz İmmobilizasyonu İçin Optimum Koşullarının	
Belirlenmesi	37
3.2. İmmobilize Enzimin Karakterizasyonu	38
3.2.1. Optimum pH, Sıcaklık ve İmmobilizasyon Veriminin Belirlenmesi	38
3.2.2. Enzim Kinetiği	40
3.2.3. Depolama Kararlılığı	42
3.3. Tekstil Boyalarının İmmobilize <i>T. Versicolor</i> Lakkaz ile Renk Giderimi	43
3.4. Boya Giderimi Üzerine pH Etkisi	46
3.5. Boya Giderimi Üzerine Reaksiyon Süresinin Etkisi	48
3.6. Boya Giderimi Üzerine Boya Konsantrasyonunun Etkisi	50
3.8. Boya Giderimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	52
3.9. Boya Giderimi Üzerine Farklı Boncuk Miktarının Etkisi	54

SEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1. Tutuklanmış immobilize enzim çeşitleri.

Şekil 1.2. Çapraz bağlı immobilize enzim çeşitleri.

Şekil 1.3. Taşıyıcıya bağlı immobilize enzim çeşitleri.

Şekil 1.4. Kitin

Şekil 1.5. Kitosan

Şekil 1.6. Kitosanın çapraz bağlanması.

Şekil 1.7. CNT Graphene Yapısına ait temsili örnek modeli.

Şekil 1.8. Karbonun bazı allotropları: a) elmas; b) grafit; c) altıgen elmas; d-f)fullerenler (C_{60} , C_{540} , C_{70}) g) amorf karbon h) karbon nanotüp.

Şekil 1.9. Karbonun Fulleren yapısı.

Şekil 1.10. a) Tek katmanlı b) Çok katmanlı c) Çift katmanlı d) Fulleren içeren tek katmanlı.

Şekil 1.11. Çeşitli organizmalar tarafından üretilen çoklu-bakır içeren oksidazların genel katlanmalarını gösteren kurdela modelleri. A: CotA (*B. subtilis*), B: CueO (*E. coli*), C: LtLa (*L. tigrinus*), D: CmLa (*C. maxima*), E: CcLa (*C. cinerius*) ve F: TvLa (*T. versicolor*).

Şekil 1.12. *T. versicolor* lakkazının X ışını kristallografisi.

Şekil 1.13. *T. versicolor'* dan elde edilen lakkazın kristal yapısı (Mavi küreler katalitik reaksiyonda rol oynayan 4 bakır iyonunu göstermektedir. 3 domain de farklı renklerle gösterilmiştir).

Şekil 1.14. Yüksek OPS değerleri ile kalıntıların lokasyonlarını gösteren (sarı) *Bacillus subtilis* CotA protein yapısının kurdela modeli. Bakır atomları ise kırmızı küreler olarak gösterilmiştir.

Şekil 1.15. *Bacillus subtilis* lakkazının (CotA) bakır merkezleri.

Şekil 1.16. Metil kırmızısı.

Şekil 1.17. Metilen mavisi.

Şekil 1.18. Kristal viyole.

Şekil 2.1. –COOH fonksiyonlandırılmış MWCNTs.

Şekil 2.2. MWCNT –CS boncuklar.

Şekil 2.3. MWCNTs -CS boncukların Glutaraldehit ile çapraz bağlanması.

Şekil 2.4. Glutaraldehit ile çapraz bağlı kitosan boncuk üzerine lakkaz immobilizasyonu.

Şekil 2.5. MR boyasının standart grafiği.

Şekil 2.6. MB boyasının standart grafiği.

Şekil 2.7. CV boyasının standart grafiği.

Şekil 3.1. Serbest ve MWCNTs-CS üzerine immobilize edilen lakkazın optimum pH grafiği.

Şekil 3.2. Serbest ve MWCNTs-CS üzerine immobilize edilen lakkazın optimum sıcaklık grafiği.

Şekil 3.3. Serbest lakkazın Lineweaver-Burk grafiği.

Şekil 3.4. İmmobilize lakkazın Lineweaver-Burk grafiği.

Şekil 3.5. Serbest lakkazın 4 °C ve 25°C' de depolanması.

Şekil 3.6. İmmobilize lakkazın 4 °C ve 25 °C' de depolanması.

Şekil 3.7. İmmobilize lakkaz ile MR boyasının giderimi sırasında 5, 15, 30, 45, 60 dk. ve 48 saat sürelerinde UV-Vis spektrum taraması.

Şekil 3.8. İmmobilize lakkaz ile MB boyasının giderimi sırasında 5, 15, 30, 45, 60 dk. ve 48 saat sürelerinde UV-Vis spektrum taraması.

Şekil 3.9. İmmobilize lakkaz ile CV boyasının giderimi sırasında 5, 15, 30, 45, 60 dk. ve 48 saat sürelerinde UV-Vis spektrum taraması.

Şekil 3.10. MR boyasının giderimi üzerine pH etkisi 25 ppm boya çözeltisi, 35 °C' de 1 saat 130 rpm' de inkübasyon.

Şekil 3.11. MB boyasının giderimi üzerine pH etkisi 25 ppm boya çözeltisi, 35 °C' de 1 saat 130 rpm' de inkübasyon.

Şekil 3.12. CV boyasının giderimi üzerine pH etkisi 5 ppm boya çözeltisi, 35 °C' de 1 saat 130 rpm' de inkübasyon.

Şekil 3.13. MR boyası giderimi üzerine reaksiyon süresi etkisi pH 6.0'da 25 ppm boya çözeltisi 35°C' de 130 rpm' de inkübasyon.

Şekil 3.14. MB boyası giderimi üzerine reaksiyon süresi etkisi pH 5.0' de 25 ppm boya çözeltisi 35°C' de 130 rpm' de inkübasyon.

Şekil 3.15. CV boyası giderimi üzerine reaksiyon süresi etkisi pH 4.0' de 5 ppm boya çözeltisi 35°C' de 130 rpm' de inkübasyon.

Şekil 3.16. MR boyasının giderimi üzerine boya konsantrasyonunun etkisi (2.5- 25 ppm), pH 6.0, 35 °C' de 90dk. 130rpm' de inkübasyon.

Şekil 3.17. MB boyasının giderimi üzerine boya konsantrasyonunun etkisi (2.5- 25 ppm), pH 5.0, 35 °C' de 90dk. 130rpm' de inkübasyon.

Şekil 3.18. CV boyasının giderimi üzerine boya konsantrasyonunun etkisi (2.5- 25 ppm), pH 4.0, 35 °C' de 90dk. 130rpm' de inkübasyon.

Şekil 3.19. MR boyasının giderimi üzerine farklı sıcaklıkların etkisi pH 6.0 ' da 60dk. 130 rpm' de inkübasyon.

Şekil 3.20. MB boyasının giderimi üzerine farklı sıcaklıkların etkisi pH 5.0' de 60dk. 130 rpm' de inkübasyon.

Şekil 3.21. CV boyasının giderimi üzerine farklı sıcaklıkların etkisi pH 4.0' de 60dk. 130 rpm' de inkübasyon.

Şekil 3.22. MR boyasının giderimi üzerine farklı boncuk miktarlarının etkisi pH 6.0' da 60dk. 130 rpm' de inkübasyon.

Şekil 3.23. MB boyasının giderimi üzerine farklı boncuk miktarlarının etkisi pH 5.0' de 60dk. 130 rpm' de inkübasyon.

Şekil 3.24. CV boyasının giderimi üzerine farklı boncuk miktarlarının etkisi pH 4.0' de 60dk. 130rpm' de inkübasyon.

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1. Enzimlerin sınıflandırılması.

Tablo 1.2. Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılar.

Tablo 2.1. MR, MB ve CV boyaalarının yapıları ve maksimum dalga boyları.

Tablo 3.1. Serbest ve immobilize lakkazın kinetik parametreleri.

Tablo 3.2. MR, MB ve CV boyaaları için 1, 3, 24 ve 48 saat sonunda gerçekleşen % boya giderimleri.

KISALTMALAR

CS: Kitosan

MWCNT: Çok duvarlı karbon nanotüp

CNT: Karbon nanotüp

DMSO: Dimetilsülfoksit

GA: Gluteraldehit

TPP: Tripolifosfat

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

MR: Metil Kırmızı

MB: Metilen Mavisi

CV: kristal Viyole

K_m : Michealis-Menten sabiti

V_{max} : Maksimum reaksiyon hızı

TEŞEKKÜRLER

Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans tezi kapsamında hazırlanan bu çalışmanın gerçekleştirilmesi sırasında, bize yol gösteren, yüksek lisans eğitimimiz süresince bizden katkılarını esirgemeyen ve her yönüyle bize örnek olan çok değerli tez danışmanım, fikir hocam Prof. Dr. Tülin AYDEMİR' e şükranlarımı sunarım.

Öğrenim hayatım süresince maddi ve manevi desteğini esirgemeyen biricik aileme de sonsuz teşekkürler.

ÖZET

Sentetik boyalar yaygın olarak tekstil, kâğıt, kozmetik, deri boyama, renkli fotoğraf, ilaç ve gıda endüstrisinde renk verici maddeler olarak kullanılmaktadır. Sentetik boyaların doğal boyalar ile karşılaştırıldığında ışığa ve sıcaklığa karşı yüksek stabilite göstermesi, sentezinin kolay olması ve uygun maliyet sağlaması gibi özelliklerinden dolayı boya ve tekstil sanayinde kullanımı önemli ölçüde artmıştır. Bu boyaların toksik, mutajenik ve kanserojen etkileri olduğu bilinmektedir. Bunun yanı sıra sentetik boyalar ciddi çevre kirliliğine neden olmaktadır. Atık sulardan boya giderimi için pek çok fiziksel ve / veya kimyasal yöntemler bulunmaktadır, fakat piyasadaki mevcut yöntemlerin çoğunun pahalı olması bu yöntemlerin uygulamasını kısıtlar. Ayrıca bu yöntemlerde aşırı kimyasal kullanımı ikincil bir çevre kirliliği problemine neden olmaktadır. Bu nedenle araştırmacılar, daha ekonomik ve etkili yollar incelemektedir ve bu yöntemlere alternatif olarak enzimatik boya giderimi uygulamaları son yıllarda büyük ilgi görmüştür. Enzimlerin aktivitesinin, kararlılığının ve seçiciliğinin artırılması için, genellikle enzimin katı bir destek üzerine immobilizasyonu çalışmalarına yoğunlaşmıştır. Lakkaz enziminin hem spesifikliğin yüksek olması hem de geniş bir substrat aralığına sahip olması boya ve fenol giderimi, ağartma gibi biyoteknolojik uygulamalarda biyokatalizör olarak kullanımına yol açmıştır.

Bu çalışmada, üç sentetik tekstil boyası, Metil Kırmızısı (MR), Metilen Mavisi (MB) ve Kristal Viyole (CV) 'nin immobilize lakkaz ile tekstil boyası içeren sulu çözeltilerden giderimi incelendi. MWCNT-kitosan kompozit lakkaz (benzendiol: oksijen oksidoredüktaz, EC 1.10.3.2) immobilizasyonu için taşıyıcı olarak kullanılmıştır. Serbest enzim ve MWCNT-CS boncuk üzerine immobilize edilen lakkazın karakterizasyon ve optimizasyon çalışmaları sonucunda, serbest lakkaz için optimum pH 4.0, immobilize lakkaz için optimum pH 5.0 ve sıcaklık 40 °C olarak saptandı.

Depolama kararlılığı çalışmalarında ise serbest lakkaz ve immobilize lakkaz enzimleri 4°C ve 25 °C' de depolanarak belirli aralıklarla aktiviteleri ölçüldü. Depolama çalışmaları sonucu immobilize lakkazın serbest lakkaza göre 4°C ve 25°C' de daha kararlı olduğu saptandı.

Etkili bir boya giderimi için pH, sıcaklık, süre, başlangıç boya konsantrasyonu, boncuk miktarı gibi farklı parametrelerde enzimatik boya giderimi incelendi. Boya giderimi çalışmalarında optimum pH MR boyası için pH 6.0, MB boyası için pH 5.0 ve CV boyası için pH 4.0 olarak belirlendi. Yüzde boya giderimi 120 dakika sonunda MR boyası için %64.2, MB boyası için %72.3 ve CV boyası için %40.2 olarak bulundu. Optimum deney koşulları altında 35 °C' de 130 rpm' de 24 saat inkübasyon sonucu toksik azo boyası MR için % 96.9, katyonik bazik boya MB için % 93.1 ve katyonik bazik boya CV için %79.5 giderim gerçekleşti.

ABSTRACT

Synthetic dyes are widely used as coloring agents in the textile, paper, cosmetics, leather dyeing, color photography, pharmaceutical and food industries. Synthetic dyes are also increasingly used in the textile and dyeing industries because of their ease and cost-effectiveness in synthesis, high stability to light, temperature, variety in color compared with natural dyes. These dyes are toxic, mutagenic and carcinogenic. Furthermore, synthetic dyes cause serious environmental pollution. There are several physical and/or chemical processes for dye removal from wastewater. However, several commercially available methods are expensive, which limit their application. A secondary pollution problem in these processes will arise because of excessive chemical use. Therefore researchers are investigating an economic and effective way. Alternatively, enzymatic dye decolorization applications have received great attention in recent years. To improve enzyme activity, stability and selectivity, enzymes have generally been studied with the enzymes immobilized on a solid support. Laccase is highly specific and has a wide range of substances suitable for different application processes. The ability of laccase enzymes to be highly useful biocatalysts for various biotechnological applications such as dye decolorization, removal of phenol, bleaching.

In this study, three synthetic textile dyes, Methyl Red (MR), Methylene Blue (MB) and Crystal Violet (CV) were removed by immobilized laccase from aqueous solutions in a batch system. MWCNT-chitosan composite beads were used for immobilization of laccase (benzenediol:oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2) as a carrier. Optimum pH was found as pH 4.0 for free laccase and found as pH 5.0 for immobilized laccase. Optimum temperature was found as 40°C for free and immobilized laccase. It was observed that resistance of immobilized laccase to changes in temperature is more than free laccase.

In the storage stability studies, free and immobilized laccase enzyme was stored at 4 °C and 25°C for enzyme activities were measured at regular times. As a result of storage studies, immobilized laccase was found to be more stable than free laccase.

Effect of pH, temperature, incubation time and dye concentration was investigated on enzymatic dye decolorization. The optimum pH for maximum decolorization of methyl red, methylene blue and crystal violet was found as pH 6.0, pH 5.0 and pH 4.0 respectively. Dye decolorization percentage was found to be as 64.2% for methyl red, 72.3% for methylene blue and 40.2% for crystal violet after 120 min. incubation. Under the experimental condition showed 96.9% decolorization of a toxic azo dye MR (pH 6.0), 93.1% decolorization of a basic dye MB (pH 5.0) and 79.5% decolorization of a basic dye CV (pH 4.0) were achieved by using immobilized laccase within 24 h at 35 °C (130 rpm).

1. GİRİŞ

Enzimler canlı organizmalarda meydana gelen tüm reaksiyonların, ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan ve bu reaksiyonları koordine eden protein yapıdaki spesifik biyolojik katalizörlerdir. Biyolojik sistemlerde meydana gelen tepkimeler laboratuvar koşullarında oluşturulmak istenildiğinde çok yüksek sıcaklık, basınç vb. ağır koşullar uygulanması gerekir. Bu koşullar altında bile birçoğu izlenemeyecek derecede yavaştır. Enzimler ise çok daha yumuşak koşullarda olağanüstü katalitik aktiviteye sahip moleküllerdir [1].

Hücrelerde organik maddelerin yapılması ve yıkılması, sindirim, kas kasılması, hücre solunumu gibi önemli faaliyetler çeşitli metabolizma reaksiyonlarının sonucudur ve bu reaksiyonlar enzimlerin katalitik etkisiyle mümkün olmaktadır [2]. Enzimlerin kimyasal katalizörlerden en önemli farkı spesifik olmalarıdır. Metabolizma reaksiyonları her ne kadar farklı enzimler tarafından kataliz edilirse de, bunlardan ancak pek azı belirli bir substrat için spesifiktir. Bazı enzimler sadece bir tek substrata etki edebilirken, bazı enzimler bir grubu oluşturan substratlara etki edebilir [3]. Hayvan, bitki ve mikroorganizmalarda meydana gelen metabolik tepkimelerin tümü farklı ve özel enzimler tarafından katalize edildiği için bilinen enzimlerin sayısı çok fazladır ve bunlara her geçen gün yenileri eklenmektedir. Enzimler bugün hücreden çıkmış ve artık çeşitli bakımlardan günlük ve ekonomik hayata girmiştir. Gıda, tekstil, ziraat, tıp, eczacılık, deri, kağıt, ekmek yapımı, bira, şarap gibi alkollü içecek üretiminde, peynir ve süt ürünlerinde, invert şeker eldesinde, kozmetik, deterjan üretiminde, su arıtımında vb. pek çok alanda uygulamaları vardır. Endüstriyel önemi bulunan pek çok reaksiyon, çeşitli canlı sistemlerde çok daha kolay ve yumuşak koşullar altında meydana gelir ve reaksiyon hızının 10^{16} kata kadar artması gibi pek çok avantaja sahiptirler. Bu nedenle endüstride enzimlerin kullanılması, yüksek sıcaklık ve basınç gibi fazla enerjiye gereksinim gösteren koşullar gerektirmeyeceği gibi kimyasal katalizörlere kıyasla ekonomik ve pratik faydalar sağlar.

1.1.Enzim İmmobilizasyonu

Enzimler, suda çözünen katalizörlerdir bu nedenle endüstriyel uygulamalarda serbest enzimin aktivitesini kaybetmeden geri kazanılması çok zordur. Serbest enzim, reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılamadığından reaksiyonun kontrolü çok güçtür. Reaksiyonun istenilen anda durdurulabilmesi için reaksiyon ortamına inhibitör eklenebilir. Ancak serbest enzim tarafından kirletilmiş olan reaksiyon ürünlerine böylece yeni bir kirlilik unsuru eklenmiş olur. Ürün veya ürünlerin bu kirlilik unsurlarından arıtılması maliyeti çok arttırmaktadır. Katalizör olarak kullanılan serbest enzimi reaksiyon ortamından aktivitesini yitirmeden çıkarabilmek olanaksız olduğundan enzimin yeniden kullanılması da söz konusu değildir. Bu ise enzimlerin spesifik ama o ölçüde pahalı katalizör olmaları nedeniyle maliyeti yükselten önemli bir etmendir. Bunun yanı sıra serbest enzimler sürekli üretim sistemlerine de

uygulanamamaktadır. Enzim saflaştırma işlemlerinin zahmetli ve pahalı olmasının yanı sıra endüstriyel uygulamalarda karşılaşılan serbest enzimin kısmen kararsızlığı, mekanik dayanıksızlığı, ürün oluşumunun kontrol zorluğu gibi etkenlerin üstesinden gelmek için immobilizasyon teknikleri geliştirilmiştir. Enzimi reaksiyon ortamından aktivitesini yitirmeden, istenilen anda ve kolay bir işlemle uzaklaştırmaya olanak sağlayan çözüm yolu enzimlerin immobilizasyonu yöntemidir [2].

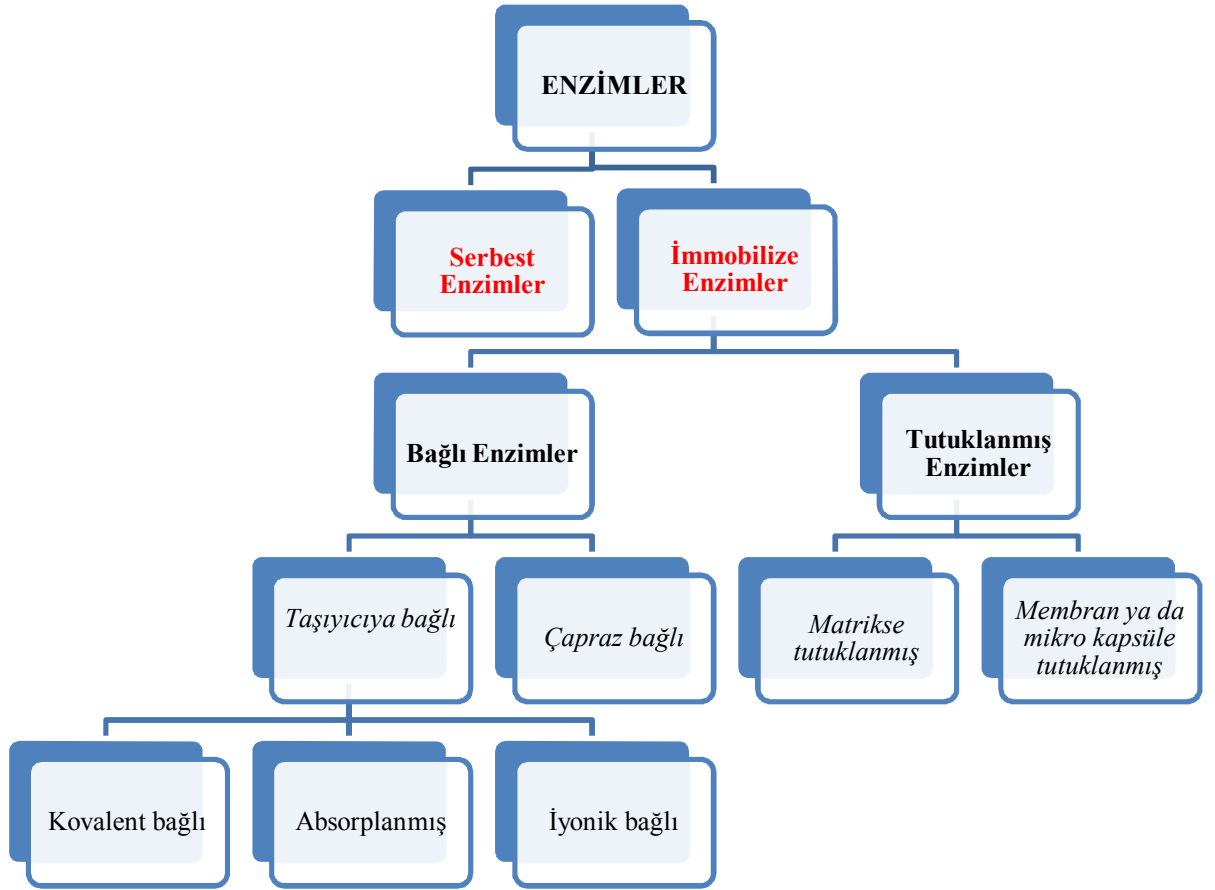
Tarihte ilk enzim immobilizasyonu 1916 yılında Nelson ve Grifin tarafından adsorpsiyon yöntemiyle yapılmıştır. Nelson ve Grifin sakkarozu hidroliz etmek için maya invertazını mangal kömürüne adsorbe etmişlerdir. Immobilize enzim sistemlerinin pratik olarak ilk kullanımı ise Grobhofer ve Scheilth (1954) tarafından yapılmıştır. Araştırmalarında; karboksipeptidaz, diastaz, pepsin ve ribonükleaz enzimlerini poliaminostiren reçinesine kovalent bağlanma ile immobilize etmişler ve bu immobilize enzim türevlerinin kinetik parametrelerini incelemişlerdir. Daha sonra da immobilizasyon çalışmaları dünyanın her tarafında yaygınlaşmış ve çeşitli enzimler değişik amaçlarla immobilize edilmiştir [3].

Enzimler çeşitli taşıyıcılara tutuklama, adsorpsiyon, iyonik bağlanma ve kovalent bağlanma yolu ile immobilize edilebilirler. Enzim immobilizasyonunda çeşitli materyaller kullanılmaktadır. Bu destek materyalleri jel matriks, membran formunda polimerik veya inorganik katı, partikül veya mikroküre formunda bulunabilirler [4]. Enzimin suda çözünmeyen polimerlere kovalent olarak bağlanması, suda çözünmeyen organik ya da anorganik desteklere adsorpsiyonu, suda çözünmeyen jel matriksler ya da yarı geçirgen mikro kapsüller içinde tutulması suretiyle immobilizasyonu yapılmaktadır. Her durumda enzim yerleşimi için suda çözünmeyen bir materyal gereklidir [5].

İmmobilize enzimin doğal (serbest) enzime üstünlükleri aşağıdaki şekilde sıralanabilir:

- Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir (süzme ve santrifüjleme v.b.) ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem yaratmaz.
- Çevre koşullarına (pH, sıcaklık v.b.) karşı daha dayanaklıdır.
- Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
- Sürekli işlemlere uygulanabilir.
- Doğal enzime kıyasla daha kararlıdır.
- Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.
- Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilir.
- Enzimin kendi kendini parçalaması olasılığı azalır.

Enzimler immobilize enzimler ve serbest enzim olmak üzere iki şekilde sınıflandırılır. İmmobilize enzimler ise bağlı ve tutuklanmış enzimler olarak ayrılır. Enzim immobilizasyon yöntemleri şekil de gösterilmiştir [6].

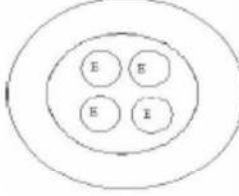


Tablo 1.1. Enzimlerin sınıflandırılması.

1.2. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

1.2.1. Tutuklanmış Enzimler

Prensip olarak tutuklama enzim molekülünü belirli bir mekanda durmaya zorlamaktır. Enzim bulunduğu çevreden dışarı çıkmaz. Bu işlem polimer matriks içindeki kafeslerde ya da yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ile gerçekleştirilebilir.

Enzim İmmobilizasyon Türü	Şematik Gösterimi	Özellikleri
Mikrokapsülleme		Hücreler yarı geçirgen bir zardan oluşan mikrokapsüller içine tutuklanır. Sistemin temeli zarın seçiciliğine dayandığından gözenek çapından büyük olan moleküller zar dışına çıkamazlar. Bu yöntemden küçük molekül ağırlıklı ürün eldesinde faydalanılır. Mikrokapsüller genellikle küreseldir.
Polimer Matrikste Tutuklama		Bu yöntem, polimerizasyonun gerçekleştiği ortamda, çapraz bağlı taşıyıcılarla enzimin tutularak hapsedilmesi esasına dayanır. Böylelikle enzim kaçış mümkün değildir.

Şekil 1.1. Tutuklanmış immobilize enzim çeşitleri [7].

- a) **Matrikste tutuklama:** Polimerizasyon ve çapraz bağlamanın oluşturduğu ortamda enzim de bulunduğu takdirde enzim çapraz bağlama sonucu oluşan odacıklarda tutulmaktadır. Bu amaçla en çok kullanılan polimer N-N'-metilenbisakrilamid ile çapraz bağlanmış poliakrilamiddir. Çaprazık bağ yüzdesi enzim moleküllerinin tutuklanabileceği ancak substrat moleküllerinin enzim moleküllerine ulaşmasına engelleyip, enzimin zincir yapısını zorlayıp aktivite kaybına veya tamamen inaktif olmasına neden olmayacak şekilde ayarlanmalıdır. Uygun çaplı substrat molekülleri polimer kafes içinde tutuklanmış enzim moleküllerine ulaşır ve reaksiyon ürünleri de dışarı çıkar. Tutuklama yöntemi ile immobilize edilecek enzimin substratının küçük molekül olması gerekmektedir.

Yöntemin yararları; çok kolay uygulanan fiziksel bir yöntem oluşu, az miktarda enzimle gerçekleşmesi, kimyasal bir bağlanma olmadığından yüklü taşıyıcıya gerek duyulmamaktadır. Yöntemin sakıncası ise immobilize enzimin ancak küçük molekül substrata karşı iyi bir aktivite göstermesidir.

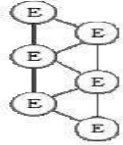
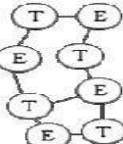
- b) **Mikrokapsüllerde enzim immobilizasyonu:** Yöntem mikrokapsülü çerçeveleyen membranın yarı geçirgen olması temeline dayanır. Enzim moleküllerinin kapsül dışına çıkışı engellenirken daha küçük molekül yapısındakiler substrat molekülleri kapsül içine girebilmekte ürün molekülleri ise kapsülden dışarı çıkabilmektedir.

1.2.2. Bağlanmış Enzimler

1.2.2.1. Çapraz Bağlama

Küçük molekülü bi- veya multi fonksiyonel reaktifler enzim molekülleri arasında bağlar yaparak suda çözünmeyen komplekslerin oluşmasını sağlar. Çapraz bağlanma derecesi ve immobilizasyon, protein ve reaktif konsantrasyonuna, pH'a ve immobilize edilecek enzime bağlıdır. En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifleri glutaradehit (Schiff bazı), izosiyanat türevleri (peptid bağı), bisdiazobenzidin (diazobağlanması), N-N-polimetilenbisizodoasetamid (alkillenme), 1,5-difloro-2,4-dinitrobenzen ve N,N-etilenbismaleimiddir.

Çapraz bağlanma reaksiyonu çok yumuşak koşullarda gerçekleşmediğinden bazı durumlarda önemli ölçüde aktivite kaybı söz konusu olabilir.

Enzim Immobilizasyon Türü	Şematik Gösterimi	Özellikleri
Homo-çapraz Bağlama		Avantaj: Enzim çok güçlü bağlanır, adsorplanmış enzimler stabilize edilecek enzim kaçıışı önlenir. Dezavantaj: Enzim hareketi sınırlı, hazırlanması zor, genl uygulanabilirliği düşük, rejenerasyon mümkün değil
Ko-çapraz Bağlama		Avantaj: Homo-çapraz bağlama metoduna göre güvenilirlik, aktivite, kararlılık daha fazla. Dezavantaj: Homo-çapraz bağlama metoduna göre maliyeti daha fazla.

Şekil 1.2. Çapraz bağı immobilize enzim çeşitleri [7].

1.2.2.2. Taşıyıcıya Bağlanma Yöntemleri

Taşıyıcıya bağlanma en eski enzim yöntemlerinden biridir. Bu yöntem kovalent, iyonik veya adsorptif biçimde gerçekleşir. Enzime göre taşıyıcı seçmek çok önemlidir. Taşıyıcı seçiminde esas alınan kriterler şunlardır; partikül büyüklüğü, hidrofilik grupların hidrofobik gruplara oranı ve taşıyıcının kimyasal bileşimi. Genel olarak taşıyıcının hidrofil karakteri ve yüzey alanının artması ile birim taşıyıcı başına bağlı enzim miktarı da artmaktadır. Bu tip immobilizasyonda kullanılan taşıyıcılar doğal veya sentetik olabilir. Taşıyıcıya bağlanma yöntemi ile enzim immobilizasyonu 3 alt grupta incelenebilir.

- a) **Kovalent bağlanma:** Enzimlerin reaktif taşıyıcılara kovalent bağlanması genelde sulu ortamda gerçekleştirilir. Burada dikkat edilmesi gereken noktalar şunlardır; bağlanmanın enzim aktivitesi için zorunlu gruplar üzerinden olması, bağlanma sırasında sterik etkilerin nedeni ve bu engellerin en aza indirgenmesidir.

Taşıyıcıya bağlanmanın yararları:

- Reaktif taşıyıcıya enzimin bağlanması kolaydır ve bağlı olmayan enzim yıkama ile uzaklaştırılabilir.
- Değişik fiziksel formlarda imal edilebilirler.
- Reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılabilir.
- Ürünleri kirletmez.
- Katı taşıyıcıya bağlı katalizör kullanışlıdır.
- Taşıyıcının yapısına bağımlı olarak yeni spesifiklikler kazanılabilir.
- Sürekli sistemlere uygundur.

Taşıyıcıya bağlanmanın sakıncaları:

- Enzim immobilizasyon koşullarından etkilenebilirler.
- Aktivite için zorunlu aminoasit artıkları üzerinden bağlanma gerçekleşebilir.
- Enzimin taşıyıcıya bağlanması özel ve masraflı preparasyonları gerekli kılabilir.
- Polimer taşıyıcının sebep olduğu sterik engelleme nedeni ile aktive azabilir.

- b) **İyonik bağlanma:** bu yöntem iyon değiştirme yeteneğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik bağlanması temeline dayanır. İyonik bağlanma 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.

- c) **Adsorpsiyon:** Enzim immobilizasyonunda kullanılan en eski ve en basit yöntemdir. Proteinler ve özellikle enzimler katı yüzeylerde adsorpsiyonu detaylıca araştırılmıştır. Son 20-25 yıldan beri suda çözünmeyen taşıyıcılarda adsorpsiyon yönteminin enzim immobilizasyonunda oldukça sık kullanıldığını görmekteyiz. Bu yöntem, suda çözünmeyen yüzey aktif bir adsorbanın enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının iyice yıkanarak uzaklaştırılması temeline dayanır.

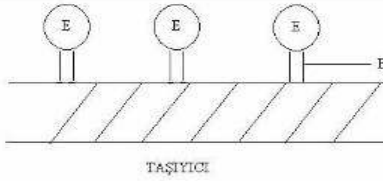
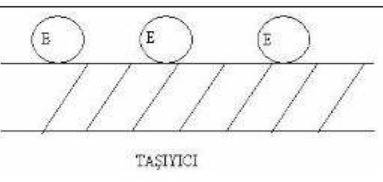
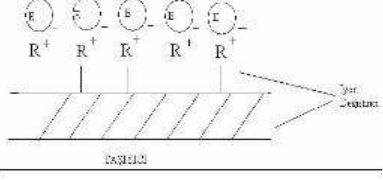
Prensip olarak bir proteinin aktif yüzeylerde adsorpsiyonu tersinir bir işlem olmalıdır. Ancak bazı durumlarda tersinir olmayan bir adsorpsiyon söz konusu olabilmektedir. Eğer aktivite sabit kalıyor ve immobilize enzim sürekli işlemlerde kullanılabilirse bu tip adsorpsiyon, enzim immobilizasyonu için ideal durumdur. Tersinir adsorpsiyon enzim immobilizasyonu için pek uygun değildir.

Adsorpsiyon yönteminin yararları;

- 1) İşlevin basit oluşu
- 2) Değişik biçim ve yükteki taşıyıcıları seçme olanağı vermesi
- 3) Bir yandan immobilizasyon gerçekleştirilirken diğer yandan enzim saflaştırılmasına olanak sağlamasıdır.

Yöntemin sakıncaları ise;

- 1) Her ne kadar immobilizasyon işlemi kolaysa da optimal koşulların sağlanması çok güçtür.
- 2) Eğer enzim ile taşıyıcı arasında kuvvetli bir bağlanma yoksa bu durumda desorpsiyon sonucu enzim serbest halde reaksiyon ortamına geçmekte ve ürünlerin kirlenmesine neden olmaktadır.

İmmobilizasyon Türü	Şematik Gösterimi	Özellikleri
Kovalent Bağlama		Avantaj: Enzim kaçıışı yok, sürekli sistemlere uygulanabilir, optimizasyon var. Dezavantaj: Rejenerasyon yok, enzim denatürasyonu, yanlış bağlanma
Adsorptif Bağlama		Avantaj: İşlem basit, denatürasyon riski yok, enzim saflaştırma olanağı var. Dezavantaj: Enzim kaçıışı hızlı, ürün kirliliği mevcut, optimizasyon zor
İyonik Bağlama		Avantaj: Rejenerasyon mümkün, kolay işlem, enzim aktivitesi korunabilir. Dezavantaj: Taşıyıcı ile enzim arası bağ zayıf, enzim kaçıışı hızlı, ürün kirliliği mevcut.

Şekil 1.3. Taşıyıcıya bağlı immobilize enzim çeşitleri [7]

1.3. Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılan Adsorbanlar

Enzim immobilizasyonunda doğal veya sentetik birçok organik ve inorganik materyal kullanılmaktadır. Taşıyıcı membran, suda çözünmeyen katı veya polimer olabilir. Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcıda aranan nitelikler şunlardır [8]:

- Hidrofilik karakter,
- Suda çözünmeme,
- Gözenekli yapı,
- Mekanik stabilite uygun partikül formu,
- Kimyasal ve termal stabilite,
- Kovalent bağlamada kullanılacak taşıyıcıların yumuşak koşullarda reaksiyon verebilen fonksiyonel grupları taşıması,
- Mikroorganizmalara karşı dirençlilik,
- Ucuzluk,
- Zehirsizlik,
- Rejenere olabilme.

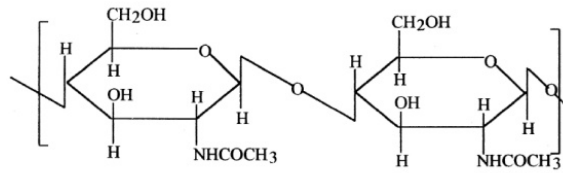


Tablo 1.2. Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılar.

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcılar reaktif değilse yardımcı bir reaktif ile aktive edilmesi gerekir. İmmobilizasyon çok yumuşak koşullarda (oda sıcaklığı, nötral pH vb.) gerçekleştirilmelidir. Taşıyıcı suda çözünmemeli ancak büyük ölçüde hidrofobik karakterli de olmamalı, suda ıslanabilmeli, ayrıca mekanik kararlı olmalıdır. Taşıyıcıların seçiminde enzim - taşıyıcı bağının aktivite için zorunlu gruplar üzerinden olmaması, pH ve çözücülere karşı dayanıklı olması taşıyıcının enzim tarafından parçalanmaması ve mikroorganizma üremesine olanak vermemesi, gibi özellikler taşımasına dikkat edilmelidir [2].

1.3.1. Kitin

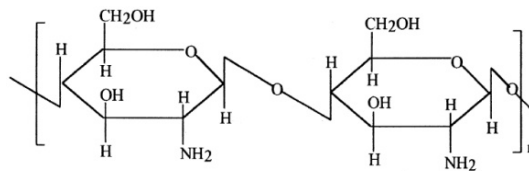
Kitin, doğada en yaygın bulunan ikinci amino polisakkarid olup, çeşitli alanlarda yüksek kullanım potansiyeline sahip yeni bir fonksiyonel materyaldir. Yengeç, karides gibi kabuklu su ürünlerinin ana bileşeni olup, böceklerin iskeletinde ve mantarların hücre duvarlarının yapısında da bulunmaktadır. Dünyada yıllık kitin üretiminin yaklaşık 150×10^3 ton civarında olduğu belirtilmektedir. Bir biyopolimer olan kitin, esas olarak poli-[β -(1,4)-2-asetamid-2-deoksi-b-D-glukopiranoz] yapısında olup çok düşük oranda 2-amino-2-deoksi-b-glukopiranoz monomerlerini de içermektedir. Kitin ve kitosan üretimi günümüzde özellikle Oregon, Washington, Virginia, Japonya ve Antartika'daki kabuklu deniz hayvanlarından üretilen konserve endüstrisine bağımlı olarak gerçekleştirilmektedir. Kabuklu su ürünleri artıklarının başta kitin olmak üzere çeşitli ürünlerin eldesi şeklinde değerlendirilmesiyle hem ekonomik açıdan kazanç hem de çevre açısından oldukça büyük yarar sağlanmış olmaktadır. Kitinin birçok türevi bulunmakla beraber, bunlar arasında en önemlisi kitosandır [8,9].



Şekil 1.4. Kitin

1.3.2. Kitosan

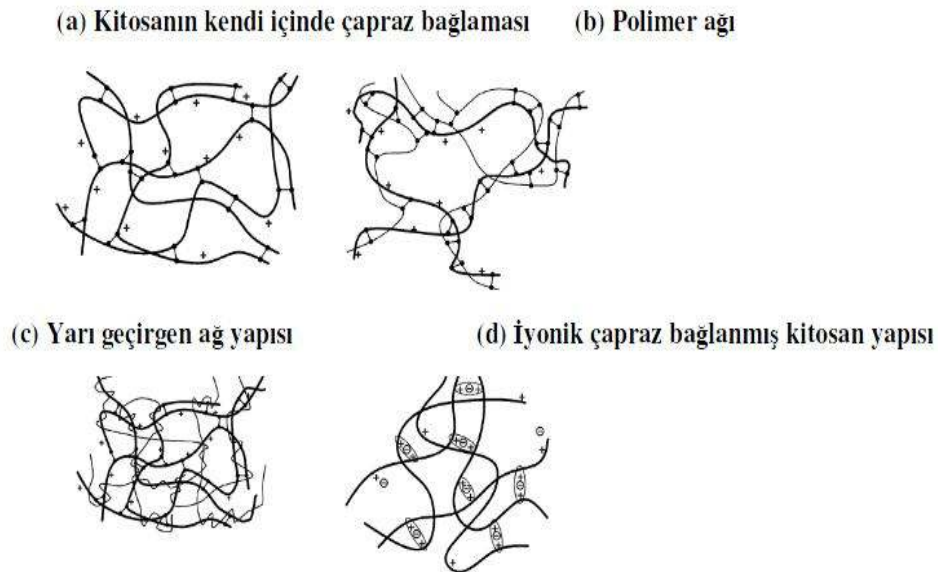
Kitosan, kitin türevi doğal bir polisakkarittir ve ilk kez 1811 yılında Henri Bracannot tarafından keşfedilmiştir. Bracannot, mantarlarda bulunan kitini sülfürik asitte çözmeye çalışmış ancak başarılı olamamıştır. 1894'de Hoppe-Seyler, kitini potasyum hidroksit içerisinde 180°C 'de işleme sokmuş (deasetilasyon) ve asetil içeriği azaltılmış bir ürün olan kitosanı elde etmiştir. Aynı yıl, Clark ve Smith tarafından çok iyi oryante olmuş kitosan lifi üretimi de başarı ile gerçekleştirilmiştir [6]. Kitinin yüksek sıcaklıkta, sodyum hidroksit veya potasyum hidroksit içeren heterojen ortamda deasetilasyonu sonucu yapı kitosana [β -(1-4) 2-amino-2-deoksi D-glukoz] dönüşür [10].



Şekil 1.5. Kitosan

Kitinin belli derecede deasetillenmesi (% 60 ve üzeri) sonucu elde edilen kitosanın özelliklerine deasetilasyon derecesi, viskozite, çözünürlük, renk ve molekül ağırlığı gibi parametreler etki etmektedir [8]. Kitin ve kitosan yapısındaki asetil içeriği temel farklılığı oluşturmaktadır. Kitinin yapısında bulunan aminoasetil gruplarından asetil grubunun uzaklaştırılma derecesine Deasetilasyon Derecesi (DD) denir. Böylece geride sadece amin grubu kalmaktadır. 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. Kitosan, çevreye zarar vermeden biyolojik olarak parçalanabilir özelliktedir ve in-vivo testler kitosanın insan vücuduna herhangi bir yan etkisi bulunmadığını göstermiştir. Vücutta tükürük veya midede bulunan lipaz enzimi tarafından parçalanabilmektedir ve bu parçalanma sonucunda amin şekerleri gibi toksik özellikte olmayan ürünler açığa çıkmaktadır [8]. Kitin ve kitosan polisakkaritleri, kimyasal olarak selüloza benzemekle birlikte kendi aralarında birtakım farklılıklar göstermektedir. Selülozda, ikinci karbon atomuna bağlı hidroksil (-OH) grubu bulunurken, kitinde asetamid (-NHCOCH₃), kitosanda ise amin (-NH₂) grubu bulunmaktadır [11]. Buna ek olarak, bu destek materyalleri enzim immobilizasyonunda taşıyıcı olarak birçok avantaj sunar [12]. Reaksiyona girebilen bir amino ve hidroksil fonksiyonel grupların varlığı halinde kitosan kolayca modifiye edilerek kovalent olarak fonksiyonlandırılır ve daha kararlı, dengeli özelliklere sahip bir kompozit elde edilir [13].

Kitosanın çapraz bağlanmasında en fazla kullanılan çapraz bağlayıcılar, glioksal ve glutaraldehitir. Glutaraldehit, kitosanın amin gruplarına imin grubu üzerinden bağlanmaktadır.



Şekil 1.6. Kitosanın çapraz bağlanması.

1.3.2.1. Kitosanın Özelliklerine Etki Eden Parametreler

- **Deasetilasyon Derecesi:** Kitin ve kitosan arasındaki temel farklılık, yapılarındaki asetil içeriğinden kaynaklanmaktadır. Kitosanın deasetilasyon derecesinin, başta çözünme özelliği olmak üzere birçok parametre üzerinde büyük etkisi bulunmaktadır.
- **Viskozite:** Yaklaşık 4 °C'de depolanan kitosan çözeltisinin viskozite açısından en iyi stabiliteyi gösterdiği görülmüştür.
- **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 bağlı olarak değişmektedir, bunun yanı sıra çok yüksek sıcaklıklar kitosanın molekül ağırlığına olumsuz etki etmektedir.
- **Çözünürlük:** Kitosanın çözünürlüğünü etkileyen sıcaklık, çözgen konsantrasyonu ve partikül büyüklüğü gibi birçok parametre bulunmaktadır. Kitosanın en az % 75-80 deasetilasyon derecesinde çözünürlüğünün iyi olduğu gözlenmiştir. Kitosan, katyonik yapısı sayesinde pH<6 ortamında bazı çözeltilerde kolayca çözünmektedir. Genellikle asetik asit, formik asit ve laktik asit gibi organik asitlerde çözünmektedir. Bunlar arasında en çok kullanılan çözgen asetik asittir.
- **Renk:** Kabuklu deniz hayvanlarının yapısındaki pigment, kitin ile kompleks oluşturmaktadır. Kitinden kitosan eldesi esnasında renk giderim işlemi gerçekleştirilmektedir. Toz halindeki kitosan oldukça yumuşak olup rengi açık sarıdan beyaza kadar farklı tonlarda değişebilmektedir.

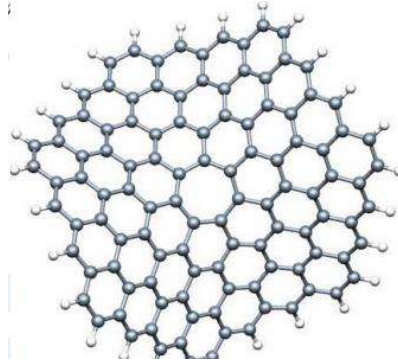
1.3.2.2. Kitosanın Kullanım Alanları

Kitosan günümüzde tıp, gıda, tekstil, ziraat, kozmetik, eczacılık, atık su arıtımı, biyoteknoloji gibi pek çok alanda kullanılmaktadır. Medikal alanda dikiş ipi, yara bandı, sargı bezi, kontakt lens yapımı, kolesterol kontrolünde, ilaçlarda, medikal yapay deri vb. şekillerde kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra yara tedavisini % 30 oranında hızlandırmaktadır. Kitosandan elde edilen bandajlar Irak savaşı sırasında önem kazanmış ve bandajlar sayesinde kanın durdurulması sağlanarak yaraların daha hızlı iyileşmesine katkıda bulunulmuştur [6]. Kitosan gıda alanında doğal kıvamlaştırıcı, yiyecek katkı maddesi, atık yiyeceklerin tekrar işlenmesi, hipokolestrolemik madde (zayıflama maddesi) olarak kullanılmaktadır. Ziraatte ise bitki katkı maddesi olarak ve gübre yapımında kullanılmaktadır. Saç şekillendirici yapımı, nemlendirici kremlerde, deodorantlarda koku giderici olarak kozmetik alanında da kullanılmaktadır. Biyolojik açıdan uyum gösteren kitosan, pek çok ilaç formülasyonunda kullanılmaktadır. İlaçlar, kitosan matriksi içerisine film, mikrokapsül, kaplanmış tablet vb. şekillerde yerleştirilmektedir. Biyoteknolojide ise enzim immobilizasyonunda kullanılmaktadır [8]. Tekstil sanayinde yünü

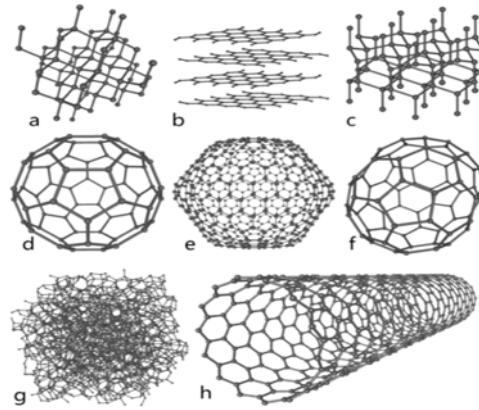
kumaşlarda çekmezlik sağlaması, reaktif boyamada tuz miktarını azaltması, kozmetikte deodorant maddesi olarak kullanılmaktadır [14].

1.3.3. Çok Duvarlı Karbon Nanotüp (MWCNTs)

Karbon nanotüpler, hekzagonal sistemde bazal düzlemlerde oluşan C-C bağlarının (Graphene yapısı) yuvarlatılması ile elde edilen silindirik yapılardır. İnsan saçından 10.000 kez daha ince, farklı yarıçaplarda olabilen katlı veya çok katlı karbon atomlarından oluşan tabaklardır [15].

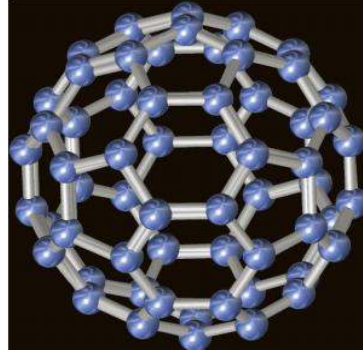


Şekil 1.7. CNT Graphene yapısına ait temsili örnek modeli.



Şekil 1.8. Karbonun bazı allotropları: a) elmas b) grafit c) altıgen elmas d-f) fullerenler (C_{60} , C_{540} , C_{70}) g) amorf karbon h) karbon nanotüp.

CNT' ler ilk olarak Moskovadaki Kimyasal Fizik Enstitüsü' ndeki araştırmacıların, bağımsız olarak aynı anda karbon nanotüpleri ve nanotüp demetlerini keşfetmesi ile elde edilmiştir. Karbon nanotüpler, silindirlerden oluşan fulleren tipi yapılardır. 60 ya da daha fazla karbon atomunun birleştirilmesiyle oluşan futbol topu şeklindeki moleküllerin keşfiyle başlamıştır. Bu topların diğer atom veya moleküllerle yaptığı bileşiklere “fulleren” denir [16].

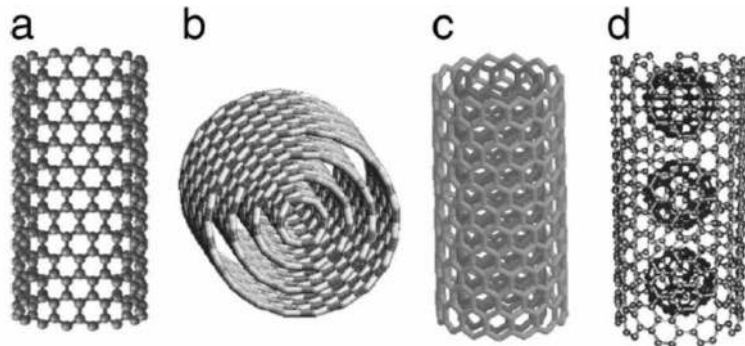


Şekil 1.9. Karbonun Fulleren yapısı.

Karbon nanotüpler, tesadüfen keşfedilmiş olmasına rağmen; yoğun bir şekilde karbon nanotüplerin özelliklerinin araştırılmasına yol açmıştır. Gerçekten de araştırmacılar karbon nanotüplerin nano ölçekte birçok fiziksel, kimyasal, yapısal, elektriksel ve optik özelliklerinin olduğunu bulmuşlardır. Bu nedenle karbon nanotüplerin pek çok uygulama alanı belirmiştir [16].

Üretilen karbon nanotüp formları katlı veya çok katlı olma özelliklerine göre 4 şekilde sınıflandırılır.

- | | |
|------------------|---------------------------------|
| 1. Tek katmanlı | 2. Çok katmanlı |
| 3. Çift katmanlı | 4. Fulleren içeren tek katmanlı |



Şekil 1.10. a) Tek katmanlı b) Çok katmanlı c) Çift katmanlı d) Fulleren içeren tek katmanlı [15].

CNT-CS kompozitler; immobilizasyon ve enzimatik uygulamalar, elektrokimyasal sensörler, biosensörler, adsorpsiyon çalışmaları, polimerler, kapsülleme ve kaplama gibi pek çok kullanım alanına sahiptir [17]. Yapılan enzim immobilizasyon çalışmalarında kitosan matriksinde tutulan karbon nanotüplerin, enzim yüklemesini, stabilizasyonu, mekanik-termal dayanıklılığı arttırdığı, yüzey alanını genişlettiği ve enzim kaçışını azalttığı rapor edilmiştir [18,19]. Oksidasyonda CNT' ler yerine çok katlı CNT' ler kullanılarak elektrokatalitik özellikleri artırır. Bununla birlikte, MWCNT' leri asitleştirme işlemi ile fonksiyonlandırarak, elektroaktif bölgeleri genişletilebilir. Artan elektroaktif bölgeleri ile oksidasyon için daha yüksek katalitik aktivite sağlar [20].

1.4. Lakkaz

Lakkaz (EC 1.10.3.2, sistematik adı: parabenzenediol: oksijen oksidoredüktaz) çoklu bakır içeren bir oksidazdır [21,22]. Lakkaz molekülü, üç redoks bölgesinde dağılmış monomer başına genellikle dört bakır atomu içeren dimerik veya tetramerik glikoproteindir. Bu enzim, moleküler dioksijenin suya indirgenmesi ile birleştirilen, bazı inorganik iyonların yanı sıra orto ve paradifenollerin, aminofenollerin, polifenollerin, poliaminlerin, ligninlerin ve aril diaminlerin oksidasyonunu katalizlemektedir [23]. Yani lakkaz, elektron alıcısı olarak moleküler oksijeni kullanmak suretiyle çeşitli fenolik bileşiklerin oksidasyonunu katalizleyen polifenol oksidaz grubu bir enzimdir [23].

Lakkaz enzimi, fenol oksidazların içinde en dikkat çeken enzimlerden birisidir. Bu enzim doğada oldukça yaygın olarak bulunmaktadır. İlk olarak Schoenbein tarafından 1856 yılında *Boletus luciferus* turunun ekstraktında mavi bir pigment tespit edilmiştir [24,25]. Lakkaz adı ise ilk kez 1883 yılında bu enzimin tanımlanmış olduğu Japon vernik ağacı (*lacquer*) olan *Rhus vernicifera*' dan türetilmiştir [26'den Yoshida, 1883]. Aynı enzim 1895 yılında Bertrand tarafından da bazı fungus türlerinde tanımlanmıştır [27]. Daha sonraları ise şeftali, tütün ve kavak gibi çok sayıdaki bitkide de lakkaz enzimlerinin varlığı belirlenmiştir [28].

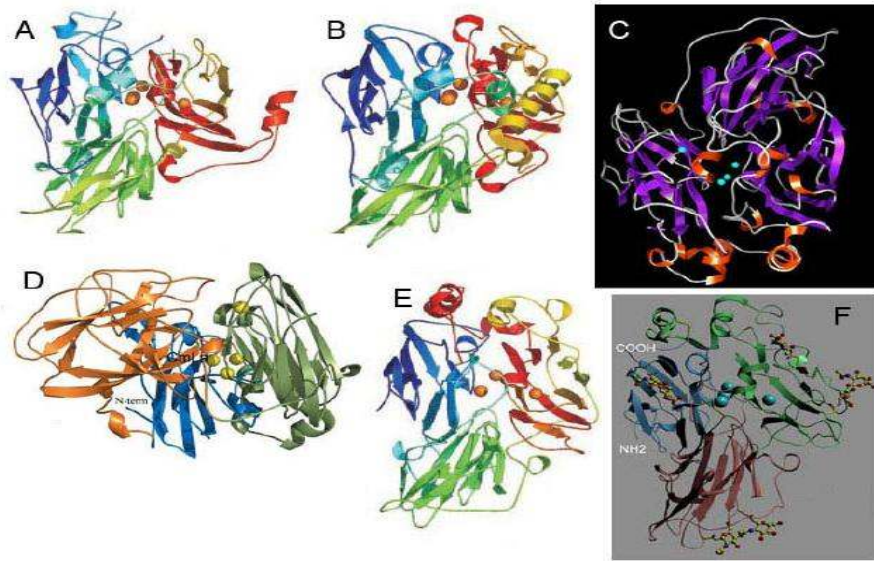
Bu enzim bitki, mantar ve bakterilerden elde edilir [29]. Bitkilerde yaygın olarak bulunmasına rağmen, bitkisel lakkazların karakterizasyonu ve kullanımı mikrobiyal kökenli lakkaz enzimlerine göre çok da yaygın değildir. Bunun nedenlerinden birisi, ham bitkisel özütlerin oldukça geniş bir substrat özgüllüğü gösteren çok sayıda oksidatif enzimleri içermesi nedeniyle bitkisel lakkazların belirlenmesinin ve saflaştırılmasının zor olmasıdır.

Şimdiye kadar karakterizasyonu yapılmış olan lakkaz enzimlerinin büyük bir çoğunluğunun kaynağını ise genellikle iyi bir lignin parçalayıcısı olan beyaz-çürükçül funguslar oluşturmaktadırlar. İyi bilinen lakkaz üreticileri arasında *Podospora anserina*, *T. versicolor*, *Polyporus ostreatus* (yeni adı, *Trametes cubensis*), *Neurospora crassa*, *A. Bisporus*, *Botrytis cinerea*, *Pleurotus ostreatus*, *Phlebia radiata*, *Coriolus (Trametes) polyporus*, *Pycnoporus*

cinnabarinus, *Chaetomium thermophilum* ve *Coprinus cinereus* gibi çok sayıda fungus bulunmaktadır [28].

Mavi bakır-içeren proteinler (mavi oksidazlar) prokaryotlar ve ökaryotlar arasında yaygın olmakla birlikte, lakkaz-benzeri enzimler 20-25 yıl öncesine kadar sadece ökaryotik organizmalarda (funguslar, bitkiler ve bazı böcekler) tanımlanmıştır. Bununla birlikte, lakkaz geninin ilk defa *A. Lipoferum* genomunda bulunduğu gösterilmesi [30] üzerine gerçekleştirilen genomik veri-bankalarının taranması sonucunda, lakkaz genlerinin diğer prokaryotlar arasında da dağılım gösterdiği belirlenmiştir. Prokaryotlar arasında lakkaz enzimlerinin yaygın olarak bulunduğu bilinmesine rağmen, günümüze kadar tam olarak saflaştırılan ve karakterizasyonu yapılan bakteriyel kaynaklı lakkaz enzimlerinin sayısı oldukça azdır [28].

Bakteriyel lakkazlar genellikle intrasellüler veya periplazmik proteinler iken fungal lakkazlar daha çok ekstrasellülerdir. Bitki lakkazları lignin polimer oluşumunun radikal bazlı mekanizmalarında rol oynarken, fungal lakkazlar morfogenez, fungal patojen/konakçı bitki etkileşimleri, stres mekanizması ve lignin parçalanması gibi olaylarda rol oynamaktadırlar. Lakkaz orto ve parafenoller, aminofenoller, polifenoller, poliaminler, lignin ve aril diaminlerin oksidasyonunu katalizlerler [31].

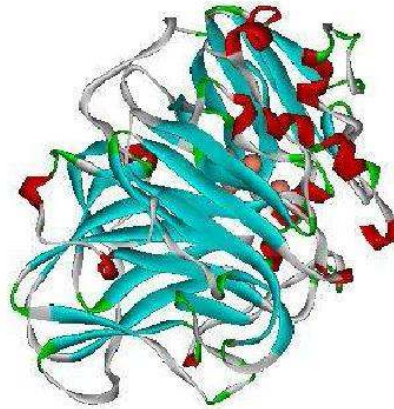


Şekil 1.11. Çeşitli organizmalar tarafından üretilen çoklu-bakır içeren oksidazların genel katlanmalarını gösteren kurdela modelleri. A: CotA (*B. subtilis*), B: CueO (*E. coli*), C: LtLa (*L. tigrinus*), D: CmLa (*C. maxima*), E: CcLa (*C. cinerius*) ve F: TvLa (*T. versicolor*) [28].

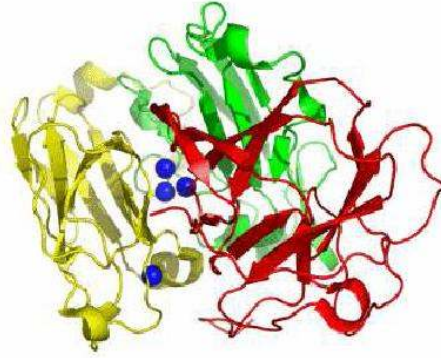
Bakteriyel lakkazların fungal lakkazlarla yapısal olarak karşılaştırılmasında, model bir yapı olarak CotA (*B. subtilis*) proteini ele alınarak yapılmıştır. CotA, monomerik bir proteindir.

Lakkaz için substrat özgüllüğü N-hidroksibenzotriazol (HBT) ve 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzothiazoline-6-sulfonik asit) (ABTS) gibi geniş ve çeşitli polifenollerin, aromatik aminler ve aminofenoller içerir [29,32,33]. Substrat özgüllüğünün geniş olması nedeniyle çevre kirliliğinin giderilmesinde sürekli çalışılan ve vazgeçilmesi zor olan bir enzimdir. Diğer enzimler ile karşılaştırıldığında, lakkazın oldukça spesifik olduğu ve farklı uygulama işlemleri için oldukça geniş bir yelpazesi olduğu bilinmektedir. Diğer peroksidaz grubu enzimler oksitleyici olarak toksik ve inhibisyon etkileri olan hidrojen peroksit gereksinim duyarken, lakkaz enzimi bu amaçla sadece çözünmüş oksijeni kullanır [23]. Lakkazın organik maddeler, klorofenoller, aromatik hidrokarbonlar toksik petrokimya sanayi, klorlu fenolik bileşikler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, sentetik boyalar ve atık sular gibi çevresel kirlleticilerin biyoremediasyon için yararlı olduğu gösterilmiştir [22,33,34]. Bugüne kadar, lakkaz farklı destekler üzerine pek çok farklı immobilizasyon metodu (taşıyıcıya kimyasal bağlama ve adsorpsiyon, membran yüzeyine kimyasal bağlama ve adsorpsiyon vb.) kullanılarak immobilize edilmiştir [29].

Lakkaz enzimlerinin moleküler yapısı genellikle funguslardan izole edilen enzimlerden elde edilmiştir. Lakkaz enziminin moleküler yapısı bir glikoprotein şeklindedir. Monomerlerin moleküler kütleleri ise 50-110 kDa arasında değişmektedir. Lakkaz genellikle asidik izoelektrik noktasına sahiptir. Lakkaz enzimlerinin önemli bir özelliği ise protein kısmı kovalent olarak bağlanmış olan ve proteinin toplam kütlesinin %10-45'ini oluşturan bir karbonhidrat kısmının da bulunmasıdır. Enzimin içerdiği karbonhidratlar, heksozamin, glikoz, mannoz, galaktoz, fruktoz ve arabinozdur [24]. Karbonhidrat kısım enzimin yüksek kararlılık göstermesine katkıda bulunmaktadır [28].



Şekil 1.12. *T. versicolor* lakkazının X ışını kristallografisi [24].



Şekil 1.13. *T. versicolor*' dan elde edilen lakkazın kristal yapısı (Mavi küreler katalitik reaksiyonda rol oynayan 4 bakır iyonunu göstermektedir. 3 domain de farklı renklerle gösterilmiştir) [24].

1.4.1. Bakır Merkezleri

Lakkaz enzimlerinin katalitik aktivitelerini gösterilebilmeleri için, aktif olan her bir lakkaz proteini için en az 4 bakır atomu gerekmektedir. Lakkaz proteinlerinin her birinde bulunan bakır iyonlarının ışık absorbansları ve elektronparamanyetik davranışları farklı olduğu için spektroskopik özelliklerine bağlı olarak Tip 1, Tip 2, Tip 3 olarak üç ana sınıfta gruplandırılırlar [28].

- **Tip1:** paramanyetik “mavi” bakır (Cu1), absorbans 610 nm (okside formda iken), redoks potansiyeli +785 mV. Tip1 bakır, çoklu-bakır içeren protein moleküllerinin tipik mavi renginden sorumludur. Bu mavi rengin nedeni ise bakır-sistein kovalent bağının neden olduğu yoğun elektronik absorpsiyonun bir sonucudur.
- **Tip2:** paramanyetik “mavi-olmayan” bakır (Cu4); azid, florid ve siyanide karşı affinitesi vardır. Tip2 bakır ise görünür spektrumda absorpsiyon göstermez ve Elektron Paramagnetik Resonans (EPR) çalışmalarında paramanyetik özellikler göstermektedir. Tip2 bakır atomu 2 histidin kalıntısı ile koordine edilmektedir.
- **Tip3:** diamanyetik spin-eşleşmeli bakır-bakır çifti (Cu2 ve Cu3), absorbans 330 nm (okside formda iken). 330 nm’de bir elektron adsorpsiyonu nedeni ile spektrofotometrik olarak karakterize edilebildiği gibi, bakır çiftinin anti-ferromanyetik eşleşmesinin bir sonucu olarak EPR sinyalinin olmaması ile de karakterize edilebilmektedir. Tip3 bakır atomu 6 histidin kalıntısı ile koordine edilmektedir.

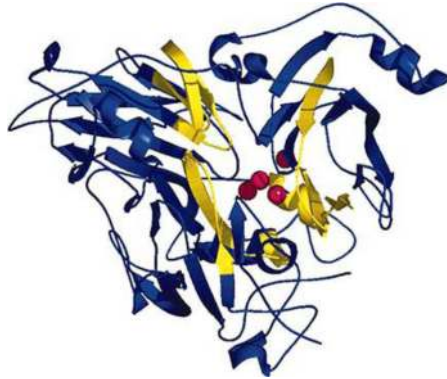
Tip2 ve Tip3 bakır merkezleri ise bir bütün olarak değerlendirilebilir ve bu nedenle de genellikle “trinükleer küme” olarak adlandırılırlar. Trinükleer küme ise moleküler oksijenin indirgendiği ve suyun serbest bırakıldığı yerdir.

1.4.2. Protein Karakterizasyonu

Çok sayıdaki bakteriyel türün genomik analizleri sonucunda, bakteriler arasında lakkaz-benzeri çoklu-bakır içeren oksidazların oldukça yaygın olduğu görülmüştür [35,36]. Buna rağmen, günümüze kadar yapısal olarak karakterize edilmiş olan *C. cinerius* [28,37], *T. versicolor* [38], *M. albomyces* [39], *Lentinus (Panus) tigrinus* [40,41] ve *Cerrena maxima* [42] kaynaklı lakkaz enzimlerinin hepsi de fungal kökenlidir. X-ışını kristallografisine dayalı olarak üç-boyutlu yapısı rapor edilen bakteriyel lakkaz enzimleri ise *B. subtilis* kaynaklı CotA ve *E. coli* kaynaklı CueO [28] proteinleri olmuştur.

Lakkaz proteinlerinin polipeptid motifleri ise tipik olarak 3 kupredoksin bölgesinden oluşmaktadır: Disülfid bağları 1. bölgeyi, 2. ve 3. Bölgelere bağlamaktadır ve trinükleer küme ise 1. ve 3 bölgeleri birleştirmektedir. İndirgenmiş substrat ise yüzeydeki bir yarığa bağlanmakta ve bitişikte bulunan 3. bölgenin Tip1 bölgesi tarafından oksitlenmektedir. İndirgenmiş substrat tarafından verilen elektronlar ise trinükleer kümeye transfer edilmekte ve burada ko-substrat olan dioksijen ise iki su molekülüne indirgenmektedir [28].

Moleküler kütlesi 65 kDa olan CotA proteini ise oldukça termostabil bir lakkazdır. Protein yapılarının karakterizasyonu için atomik paketleme önemli bir ölçüm olarak kabul edilmektedir. Atomik paketlemeyi tarif etmek için birkaç metot tanımlanmıştır ve CotA proteini için OSP (occluded surface packing) değerleri üç aralık göstermiş olup, bu değerler oldukça paketlenmiş bir yapıya denk gelmektedir (Şekil 12) [28].



Şekil 1.14. Yüksek OPS değerleri ile kalıntıların lokasyonlarını gösteren (sarı) *Bacillus subtilis* CotA protein yapısının kurdela modeli. Bakır atomları ise kırmızı küreler olarak gösterilmiştir [28].

1.4.3. Lakkaz Enzimlerinin Reaksiyon Mekanizmaları

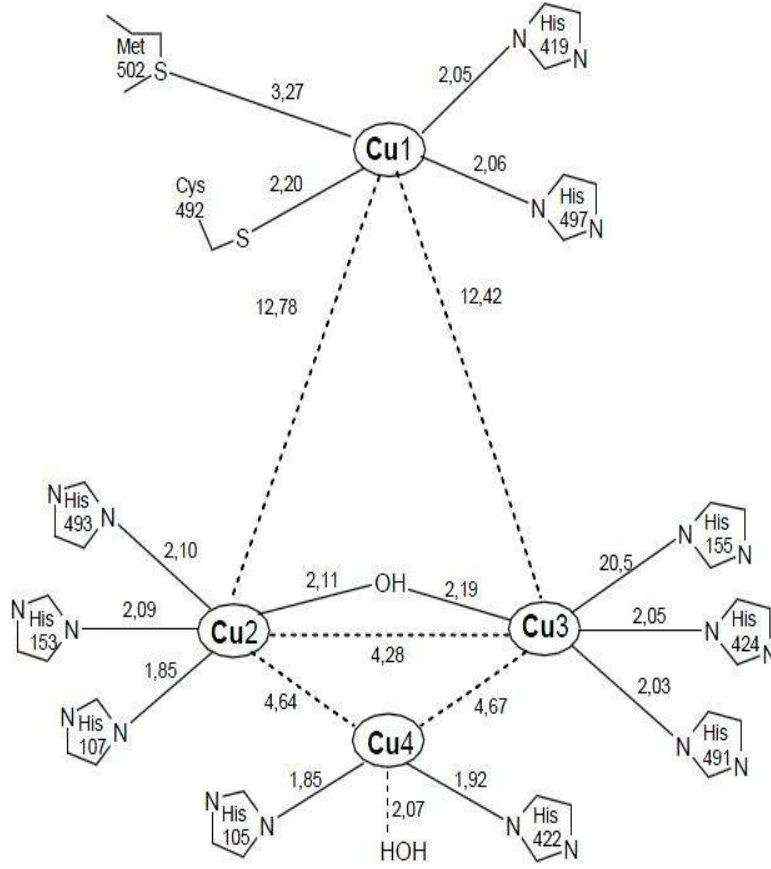
Lakkaz enzimlerinde bulunan farklı bakır merkezleri, indirgenmiş bir substrattan aldıkları elektronları, toksik peroksit ara-ürünlerinin oluşmasına yol açmadan, atmosferik moleküler oksijene aktarırlar. Bu reaksiyon ise Tip1 bakır tarafından katalizlenen substratın dört monoelektronik oksidasyonu ile başarılmaktadır. Elektronlar ise daha sonra, moleküler oksijenin indirgendiği ve suyun serbest bırakıldığı trinuklear kümeye transfer edilirler [28].

Substratların oksidasyonu reaktif radikallerin oluşmasına yol açmaktadır. Oluşan reaktif radikaller ise enzimatik-olmayan reaksiyonlar ile aşağıdaki reaksiyonlara katılırlar:

i. 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. Oluşan son-ürünün yapısı ise ara-ürünlerin reaktivitesi ve reaksiyonun gerçekleştiği çevrenin pH'sı tarafından belirlenir. Lakkaz enzimlerinin sahip olduğu bu kapasite ise bu enzimlerin, kontamine toprakların ve atık suların detoksifikasyonunda kullanılma potansiyelinin temelini oluşturmaktadır [28].

ii. Polimerlerin parçalanması: Lakkaz, lignin veya humik asit gibi kompleks doğal polimerlerin parçalanmasında rol almaktadır. Üretilen reaktif radikaller, kovalent bağların (özellikle alkil-aril) 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 radikal-katalizli polimerizasyonu sağlayabilirler [28].

iii. Aromatik halkaların kırılması: Birkaç çalışmada, aromatik halkaların lakkaz aracılığı ile kırıldığı rapor edilmektedir. Bu reaksiyon ise nitroaromatikler ve sentetik boyalar gibi ksenobiyotik bileşiklerin parçalanması açısından biyoteknolojik olarak oldukça ilgi çekmektedir [28].



Şekil 1.15. *Bacillus subtilis* lakkazının (CotA) bakır merkezleri [28].

1.4.4. Lakkaz Enziminin Endüstriyel ve Biyoteknolojik Uygulamaları

Lakkaz, endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamalar açısından çok kullanılan bir enzimdir. Bu enzim tekstil, gıda, ilaç, kağıt endüstrisi ve nanobiyoteknoloji gibi birçok alanda kullanılmaktadır.

Lakkaz gıda endüstrisinde ekmek pişirme süreçlerinde daha taze ekmek eldesi [43], meşrubat ve içki (şarap, meyve suyu, bira) süreçlerinde berrak meyve suyu eldesi, şarap ve biralardaki bulanıklığın giderilmesi, askorbik asit belirlenmesi [44], şeker pancarında pektinin ayrılması gibi pek çok uygulamada kullanılabilir [24]. Lakkazın, gıda ürünlerinin kalitesini ve üretimini arttırdığı belirtilmiştir.

Selüloz ve kağıt endüstrisinde, kağıt hazırlığı sırasında odun hamuru ayrılması, beyazlatılması ve lignin parçalanmasında kullanılır [44].

Tekstil endüstrisinde tekstil atık sularının renksizleştirilmesinin yanı sıra ağartma, kaynatma, temizleme, denim terbiyesi, denim yıkama, yünün boyanması ve hatta boyar maddelerin sentezinde de kullanılmaktadır [14,45].

Lakkazlar, selülozik liflerde bulunan yağlar, mumlar, pektinler, proteinler ve pigmentler gibi doğal renklendirici maddelerin uzaklaştırılması ve bu sayede boyama, baskı ve bitim gibi işlemlere hazırlanması amacıyla kullanılmaktadır. Yüksek beyazlık dereceleri için ardarda oksidasyon işlemleri uygulanmasında ağartma maddeleri, liflere aşırı miktarlarda verilmekte, bu da zararlı atıklara neden olmaktadır. Lakkaz ön işleminin pamuklu kumaşların beyazlığını geliştirdiği ve sonraki ağartma işleminde kullanılan hidrojen peroksitin konsantrasyonunu önemli derecede azalttığı tespit edilmiştir [14].

Lakkazlar, denim yıkamada taşlama işleminde ponza taşlarının yerine kullanılabilir. Denim yıkamada ponza taşı ile istenilen aşındırmanın sağlanması için ürünler yıkanır ve yıkamanın ardından ürünler kısmen ağartılmaktadır. Bu işlemlerin tümü büyük çevresel kirliliğe yol açtığından enzim uygulamaları avantaj sağlamaktadır [14].

Kaynatma işlemleri, çeşitli kimyasal maddelerle yapılmakta ve çevresel açıdan kirlilik oluşturmaktadır. Bu nedenle daha ekolojik bir proses olan enzimatik kaynatma tercih edilmektedir [14].

Çoğu sentetik boyar maddeler, toksik, kanserojen ve genotoksik etkiler göstermektedir. Mevcut atık su sistemleri ise, bu tip atıklardan inatçı boyar maddeleri ve diğer organik kalıntıları tamamen uzaklaştırmakta yetersiz kalmaktadır ve mevcut fiziksel, kimyasal yöntemler yüksek maliyete ve büyük miktarlarda atığa neden olmaktadır. Bu nedenle lakkazların tekstil atık sularının biyolojik parçalanması ve renksizleştirilmesinde kullanımı maliyet ve ekolojik açıdan büyük yarar sağlamaktadır [14,44,45].

Bunların yanı sıra lakkaz ilaç endüstrisinde, nanobiyoteknolojide, toprak biyoremediasyonunda, analitik biyosensörlerde, kömür sıvılaştırılmasında, fenolik bileşiklerin detoksifikasyonunda, yağ fabrikası atık suyundan fenol gideriminde ve daha pek çok alanda kullanılmaktadır [24,43,44,46].

1.5. Boyar Maddeler

Sentetik boyalar yaygın olarak tekstil, kâğıt, kozmetik, deri boyama, matbaa, renkli fotoğraf, plastik, ilaç ve gıda endüstrisinde renk verici maddeler olarak kullanılmaktadır [47,48]. Günümüzde 100.000'in üzerinde sentetik boya ticari olarak kullanılmakta ve yılda 7×10^5 ton boya üretimi yapılmaktadır [49]. Üretim ve kullanım sırasında arta kalan boyalar göz önüne alınacak olursa renkli atık sular çevresel açıdan önemli derecede kirlilik oluşturmaktadır.

Sadece tekstil endüstrisindeki bu boyaların boyama işlemi sırasında % 10-15' inin atık olarak kaybolduğu tahmin edilmektedir [47].

Boyar madde molekülleri, aromatik yapı gibi, görünür ışığı (400-750nm dalga boyunda) absorbe eden ve boyanın elyafın üzerine ve içine tutunması sağlayan kromojen gruplar içerir. Kromojen gruplar, kromofor adı verilen grupları içeren aromatik yapıdır. Kromofor renk verici anlamındadır ve kimyasal yapılarına göre; Nitraso, Nitro, Azo, Etilen, Karbonil, Karbon-Azot, Kükürt grupları olmak üzere 7 gruba ayrılırlar. Bir ya da birden çok bağ içermektedir. Bu bağlar değişkendir ve ışığı absorplayarak boyanın parlak renkli görünümünü sağlamaktadırlar [50]. En yaygın kromofor grubu azot-azot çift bağı ile karakterize edilen azo ($-N=N-$) sınıfı boyalardır.



Fotoğraf 1.1. Boyar maddelerin bazı kullanım alanları.

Boyar maddeler; çözünürlük, kimyasal yapı, boyama özellikleri gibi çeşitli karakteristikleri göz önüne alınarak sınıflandırılır.

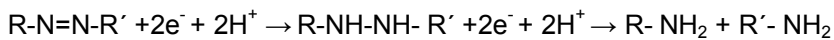
Boyar maddeler reaktif boyalar, asidik boyalar, bazik boyalar, direkt boyalar, dispers boyalar olarak sınıflandırılabilir [47]. Daha genel bir sınıflandırma yapmak gerekirse boyar maddeler üç grupta incelenebilir [50].

1. Katyonik boyar maddeler: Bazik boyar maddeler
2. Anyonik boyar maddeler: Direkt, asit ve reaktif boyar maddeler
3. İyonik olmayan boyar maddeler: Dispers boyar maddeler

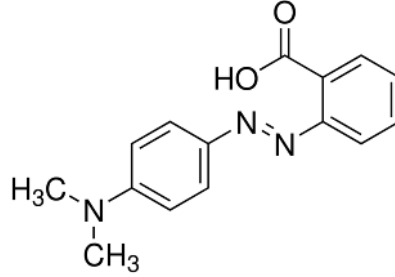
1. Bazik Boyar Maddeler: Organik bazların hidroklorürleri şeklinde olup katyonik grubu renkli kısımda taşırlar. N veya S atomu içerirler. Yapılarından dolayı bazik (proton alan) olarak etki ettiklerinden anyonik grup içeren liflerle bağlanırlar [50].
2. Asit Boyar Maddeler: OH⁻, SO₃H, COOH⁻ gibi oksokrom grupları içerirler. Bu boyalar Na⁺, K⁺, Ca⁺, NH₄⁺ vb. gruplarla tuz oluştururlar ve çözelti içinde negatif yükü verecek şekilde iyonlaşırlar. Oksokrom grubu boyanın renk tonunu da değiştirebilir, fakat gerçek rengin ortaya çıkmasını sağlayamaz[47,50].
3. Direkt Boyar Maddeler: Direkt boyarmaddeler, selülozik lifin boyanmasında herhangi bir ön işlem gerektirmeden doğrudan boyama yapılabilen boyarmaddelerdir. Substantif boyarmaddeler olarak da adlandırılırlar. Direkt boyarmaddeler suda çözünebilen bileşiklerdir ve bazik ve asit boyarmaddelerden selülozik elyafa karşı substantivitelerinin fazla olması ile ayrılır [51]. Önceden bir işlem yapılmaksızın boyar madde çözeltisinden selüloz veya yüne doğrudan doğruya çekilirler. Kağıt, deri, yün, ipek, naylon ve bast elyafın boyanmasında kullanılırlar [50].
4. Dispers Boyar Maddeler: Moleküllerinin yapısındaki amino ve hidroksil grupları grupları dispersiyon özelliklerini sağlamaktadır. Düşük molekül ağırlıklı dispers boyalar suda az miktarda çözünebildiklerinden dolayı sudaki dispersiyonları halinde uygulanırlar [52].
5. Reaktif Boyar Maddeler: Reaktif boyar maddeler uygun koşullar altında lif ile kimyasal reaksiyona girerek, kovalent bağ özelliğine sahip tek boyar madde sınıfıdır [50]. Küçük ve basit molekül yapısına sahiptirler ve suda kolayca çözünürler. Piyasada kullanılmakta olan boyaların % 70'ini oluşturan azo kromoforlu reaktif boyalar (-N=N-) çift bağı ile karakterize edilirler [53,54].

1.5.1. Metil Kırmızısı (MR)

Metil kırmızısı, bir anyonik azo boyasıdır ve sentetik organik renklendirme uygulamalarında azot – azot çift bağı (–N=N–) ile karakterize edilir. Azo boyaları monoazo, diazo ve triazo olarak sınıflandırılabilir ve asit, baz, direkt, dispers, azoik ve pigmentler olarak 6 uygulama katagori de mevcuttur [49]. Azo boyaları ile renk giderimde şu denklem gerçekleşmektedir [55];



Azo boyaları tekstil atık sularında yaygın olarak bulunmaktadır ve dayanıklılığı çevresel kirliliğe neden olmaktadır Metil kırmızısı genellikle kâğıt baskı ve tekstil boyamada kullanılır ve göz, cilt ve sindirim sistemi tahrişine neden olmaktadır [48].

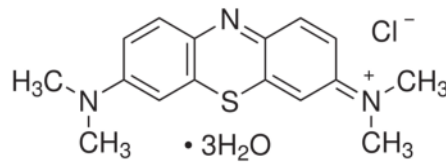


Şekil 1.16. Metil kırmızısı

1.5.2. Metilen Mavisi (MB)

Metilen mavisi katyonik bazik bir boyadır, sulu çözelti içinde pozitif yüklü iyonlar şeklinde bulunur [56]. Suda eritildiği zaman mavi bir çözelti meydana getiren, oda sıcaklığında katı, kokusuz ve koyu yeşil toz şeklinde bir boyadır.

MB medikal kullanımı oldukça fazla görülür, ayrıca yaygın olarak kağıt ve tekstil endüstrisinde kullanılır. Tekstil endüstrisinde pamuklu boyamada ve kağıt endüstrisinde ise kağıt renklendirmede oldukça önemli bir boya maddesidir [56,57]. Bu boya aşırı tehlikeli değildir ancak kullanımında zararlı etkileri görülmektedir. Akut maruziyetinde kalp atışlarında hızlanma, kusma, şok, sarılık, doku hasarı ve Heinz body oluşumu gibi etkiler görülebilir [56].

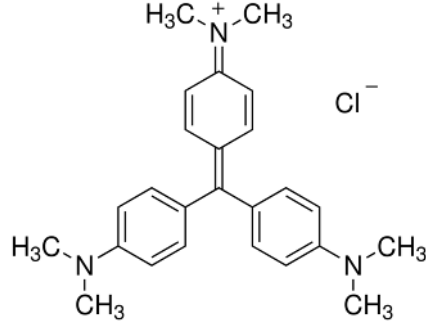


Şekil 1.17. Metilen mavisi

1.5.3. Kristal Viyole (CV)

Kristal viyole katyonik, bazik bir boyadır. Katyonik boyalar anyonik boyalara göre daha toksiktir. Bu boyanın kısa süreli maruziyeti sonucu organizmalar üzerine zararlı etkileri olduğu gösterilmiştir [58].

Kristal viyole, çeşitli boyalar arasında yaygın olarak kullanılan bir boyadır. Bu boyanın biyolojik boyamada, veterinerlikte, dermatolojide dermatolojik ajan olarak, deterjanlarda, mürekkep kalemlerde, tekstilde deri ceketlerde ve kağıt endüstrisinde kullanım alanı bulunmaktadır. Ancak bu boya oldukça mutajen ve mitotik zehirli bir boyadır [59].



Şekil 1.18. Kristal viyole

Renk giderimi adsorpsiyon, koagülasyon-çökeltme, iyon değişimi, oksidasyon ve elektrokimyasal yöntemler dahil olmak üzere çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemler ile gerçekleştirilebilir. Ancak boya giderimi için gerekli bu yöntemlerin pahalı olması uygulamasını kısıtlamaktadır [47,60]. Fiziksel ve kimyasal yöntemlerin uygulanmasında ikincil bir problem de kimyasalların aşırı kullanımıdır [60]. Alternatif olarak enzimatik renk giderimi etkin uygulama tekniği ile son yıllarda büyük ilgi gören bir yöntemdir [47,49].

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

T. versicolor laccase (13.6 U mg⁻¹), kitosan, Bovine serum albumin (BSA), Coomassie brilliant blue G-250, 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzothiazoline-6-sulfonik asit) (ABTS), Glutaraldehit (25 wt. % in H₂O), asetik asit, Kristal viyole ve Metil kırmızısı Sigma–Aldrich (Almanya). Metilen mavisi Hoechst, NaOH Riedel-de Haën, HCl ve sodyum asetat Merck. Multiwall carbon nanotube (diam. 110-170 nm, length=5-9 micron, 90+%) Aldrich. Çalışmada kullanılan diğer tüm kimyasallar analitik saflıktadır.

Araştırmada kullanılan araç ve gereçler; UV-vis spektrofotometre (Shimadzu UV), pH metre, magnetik karıştırıcı, inkübatör, analitik terazi, otomatik pipet, çalkalayıcı, vortex.

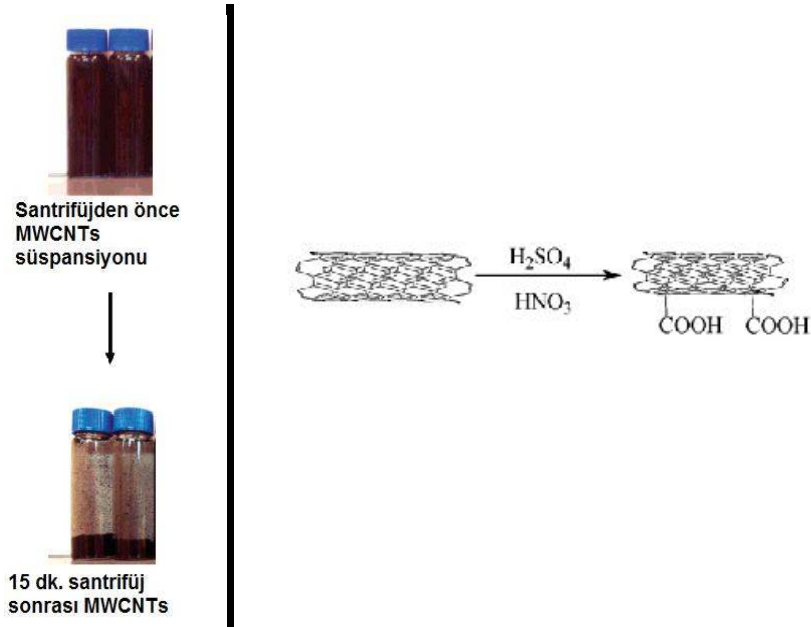
2.1.1. Çözeltilerin hazırlanması

- Glutaraldehit çözeltisi (% 4'lük): 50 mM pH 5.0 asetat tamponunda hazırlandı.
- ABTS (100 mM): 0,1 M pH 5.0 asetat tamponunda hazırlandı.
- TPP: % 2'lik sodyum trifosfat pentabazik hazırlamak için 20 g TPP tartıldı ve 900 ml saf su da çözüldü. Hacmi 1 lt' ye tamamlandı ve çözeltinin pH'ı derişik HCl ile 8.2' ye ayarlandı. 1 gün dolapta bekletilerek soğutuldu.
- Lakkaz enzim çözeltisi: 5 mg enzim 10 mL 0.1 M pH 5.0 asetat tamponunda hazırlandı.
- Standart protein çözeltisi (1 mg/ml): 10 mg sığır serum albümin tartıldı ve hacmi saf su ile 10 ml' ye tamamlandı.
- Bradford reaktifi: 40 mg Coomassie Brilliant Blue, 50 ml %95' lik etanolde çözüldü. Çözeltiye 55 ml % 88' lik fosforik asit eklendi ve hacmi deiyonize H₂O ile 1 litreye tamamlandı.
- Asetik asit çözeltisi (% 2' lik): 2 ml asetik asit saf su ile 100 ml' ye tamamlandı.
- Kitosan (%2' lik) : 100 ml asetik içine 2 g kitosan konulup, manyetik karıştırma ile homojenize edildi.
- pH 2.0, 3.0, 4.0 ve 5.0 asetat tamponu: 0,1M sodyum asetat ve 0,1M asetik asit çözeltileri ile hazırlandı.
- pH 6.0, 7.0 ve 8.0 fosfat tamponu: 0,1M KH₂PO₄ ve 0,1M K₂HPO₄ çözeltileri hazırlandı.
- MR stok boya çözeltisi: 25 ppm boya çözeltisi pH 6.0 tamponu ile hazırlandı.
- MB stok boya çözeltisi: 25 ppm boya çözeltisi pH 5.0 tamponu ile hazırlandı.
- CV stok boya çözeltisi: 25 ppm boya çözeltisi pH 4.0 tamponu ile hazırlandı.

2.2. Yöntem

2.2.1. Çok Duvarlı Karbon Nanotüplerin (MWCNTs) Fonksiyonlandırılması

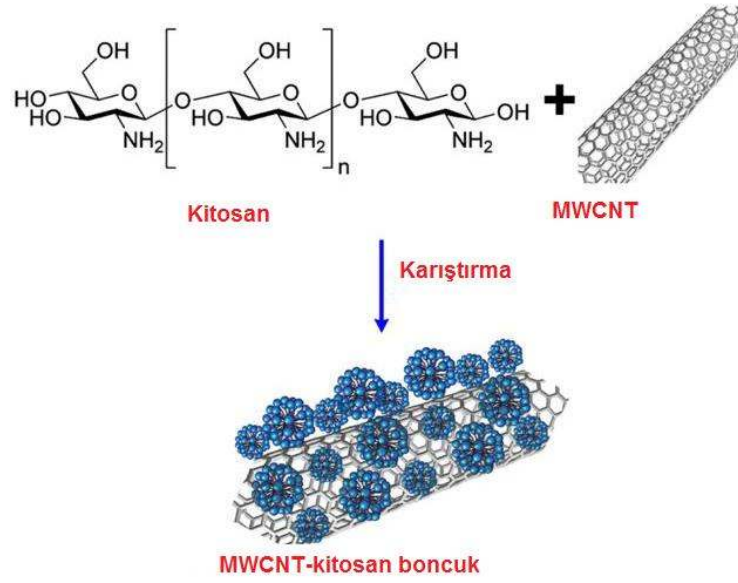
MWCNTs 3:1 (v/v) konsantre H_2SO_4 - HNO_3 asit karışımında kimyasal olarak fonksiyonlandırıldı. Fonksiyonlandırma işlemi $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de 3.5 saat manyetik karıştırma ile geri soğutucu altında yapıldı. Aktifleştirme ile MWCNT' ün $-COOH$ grupları aktifleştirilerek, karboksil grubu fonksiyonlandırılmış MWCNTs elde edildi (MWCNTs- $COOH$) [61]. Elde edilen MWCNT-asit süspansiyonu santrifüjlenerek, MWCNTs katı olarak ayrıldı. Ayrılan katı pH 7.0 olana kadar ultra saf su ile yıkandı ve etüvde kurutuldu.



Şekil 2.1. $-COOH$ fonksiyonlandırılmış MWCNTs [62,63].

2.2.2. Çok Duvarlı Karbon Nanotüp-Kitosan (MWCNTs-CS) Boncukların Hazırlanması

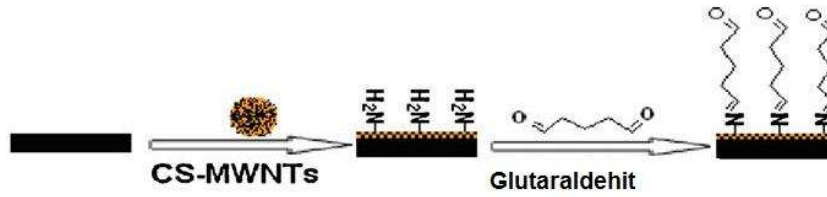
2 g kitosan 100 ml % 2' lik asetik asit çözeltisi içinde çözüldü ve çözeltinin içerisine 250 mg aktive edilmiş MWCNT ilave edilerek homojen bir çözelti elde edildi. Daha sonra uniform siyah çözelti elde edilene kadar ultrasonik banyo içerisinde bekletildi. Hazırlanan çözelti soğuk TPP çözeltisi içine ucu kesilmiş iğne yardımı ile damlatılarak sertleşmesi için 4 saat manyetik karıştırma altında bekletildi. Sertleşen boncuklar süzülerek bol saf su ile yıkandı ve kullanılmak üzere 4°C ' de depolandı.



Şekil 2.2. MWCNT –CS boncuklar [64].

2.2.3. Kitosan Aktivasyonu İçin Glutaraldehit Konsantrasyonunun Belirlenmesi

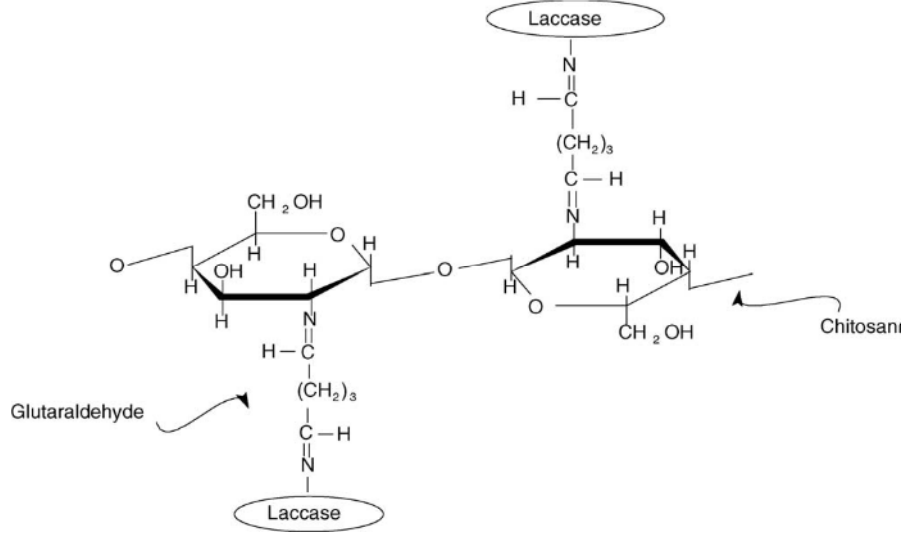
Lakkaz immobilizasyonu için optimum glutaraldehit konsantrasyonunu belirlemek üzere modifiye kitosan boncuklar 40°C’ de 2 saat süre ile % 2 - 5 arasında değişen konsantrasyonlarda glutaraldehit ile çapraz bağlandı. Çapraz bağlama sonrasında glutaraldehitin aşırısını uzaklaştırmak üzere boncuklar önce saf su daha sonra pH 5.0 asetat tamponu ile yıkandı. % aktivite değerleri hesaplanarak immobilizasyon için uygun glutaraldehit konsantrasyonu belirlendi [65,66].



Şekil 2.3. MWCNTs -CS boncukların Glutaraldehit ile çapraz bağlanması [61].

2.2.4. Lakkaz Enziminin Çapraz Bağlı Boncuklar Üzerine İmmobilizasyonu

0.5 g boncuk üzerine 2.5 ml enzim çözeltisi ilavesi ile 4 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra boncuklar enzim çözeltisinden ayrılıp, bağlanmayan enzim pH 5.0 asetat tamponu ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Serbest enzim, süpernatant ve yıkama sularında enzim aktivite ve protein tayinleri yapıldı [67,68].



Şekil 2.4. Glutaraldehyt ile çapraz bağlı kitosan boncuk üzerine lakkaz immobilizasyonu [69].

2.2.5. Serbest ve İmmobilize Lakkazın Aktivite Ölçümü

Serbest lakkaz aktivitesi, Niku-Paavola ve ark. (1990) belirlediği yöntemle göre 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) substratı kullanılarak 420 nm'de spektrometrik olarak absorbanstaki artış belirlenerek ölçüldü. 1 dakikada 1 μ mol ABTS'yi dönüşüme uğratan enzim miktarı bir ünite olarak tanımlandı [70].

İmmobilize Lakkaz aktivitesi, 3 ml ABTS (0,1 M pH 5.0 asetat tamponunda hazırlanan) içerisinde 50 mg immobilize lakkaz veya 100 μ l serbest lakkaz içeren reaksiyon ortamında ölçüldü. Reaksiyon 40 °C'de 3 dakikada gerçekleştirildi. 3 dakika sonra immobilize boncuklar reaksiyon karışımından ayrılarak reaksiyon durduruldu. 40 °C pH 5.0' de 1 dakikada 1 μ mol ABTS'yi dönüşüme uğratan enzim miktarı bir ünite olarak tanımlandı ve immobilize lakkaz aktivitesi U/g taşıyıcı olarak verildi [71-73].

2.2.6. İmmobilizasyon Veriminin Hesaplanması

İmmobilizasyon verimi (% İY) aşağıdaki formüle göre hesaplandı [74]:

$$\% \text{ İY} = \frac{U_{akt}}{U_{total} - U_{kalan}} \times 100 \quad (1)$$

U_{akt} : İmmobilize enzimin aktivitesi

U_{total} : Serbest enzimin aktivitesi

U_{kalan} : Filtratta bulunan enzim aktivitesi

İmmobilize lakkaz aktivitesi gram taşıyıcı başına düşen aktivite olarak aşağıdaki formüle göre hesaplandı [11]:

$$A(U/g) = \frac{U_{akt}}{W_{taşıyıcı}} \quad (2)$$

U_{akt} : İmmobilize enzimin aktivitesi

$W_{taşıyıcı}$: Kullanılan taşıyıcının ağırlığı

2.2.7. Taşıyıcı Üzerine Bağlanan Protein Miktarının Belirlenmesi

Protein miktarı, Bradford yöntemine (1976) göre Bovine serum albumin (BSA) kullanılarak 595 nm. de spektrofotometrik olarak tayin edildi [75]. Serbest enzim, filtrat ve yıkama sularının protein miktarları belirlendi. Yöntem; organik boyaların, proteinlerin asidik ve bazik gruplarıyla etkileşerek renk oluşturmasını esas alır. Boya-bağlama temelli yöntemlerin en yaygını Bradford tarafından geliştirilen Bradford tayinidir. Bu metotta Comassie Brilliant Blue G-250 boyasının kullanılır ve yöntem oldukça duyarlıdır (5-100 µg protein/ml).

Standart protein eğrisinin çizimi; 6 adet deney tüpü alınarak tüplere sırasıyla 0.02-0.05-0.1-0.125-0.15-0.2 mg/ml olan ara stoklardan 0.1 ml eklendi. Tüplerin her birine 2 ml Bradford reaktifi eklenerek 10 dk. oda sıcaklığında bekletilip 595 nm. de absorbansları ölçülmüştür. Bu değerler, derişime karşı grafiğe geçirilerek standart protein eğrisi oluşturulmuştur, elde edilen grafik örneklerin protein içeriklerinin belirlenmesinde kullanıldı [11].

2.2.8. İmmobilizasyon Süresinin Belirlenmesi

İmmobilizasyonun ne kadar sürede gerçekleşeceğini belirlemek için boncuklar 1-5 saat arası değişen sürelerde immobilize edildi ve bu süreler sonunda aktiviteleri ölçülerek optimum immobilizasyon süresi belirlendi.

2.2.9. İmmobilize Enzimin Karakterizasyonu

2.2.9.1. Optimum pH' ın Belirlenmesi

pH'ın bir fonksiyonu olarak serbest ve immobilize lakkaz enziminin aktivitesi pH 3.0-8.0 aralığında substrat olarak 100 mM ABTS kullanılarak tayin edildi. Deneyler sırasında, 0.05 M sodyum asetat (pH 4.0-5.0), 0.05 M potasyum fosfat (pH 6.0-7.0) ve 0.05 M Tris-HCl (pH 8.0) tamponları kullanıldı. Lakkaz aktivitesi standart analiz koşullarında ölçüldü ve % değerleri hesaplandı.

2.2.9.2. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

Optimum sıcaklığı belirlemek üzere, serbest enzim ve immobilize enzim 10 ile 80 °C arasında değişen sıcaklıklarda bir saat inkübe edildi ve lakkaz enziminin aktivitesi standart koşullarda ölçüldü.

2.2.9.3. Enzim Kinetiği

MWCNTs-CS boncuklar üzerine immobilize edilen enzimin Michealis-Menten (K_M) sabitini ve maksimum reaksiyon hızını (V_{max}) belirlemek üzere 0.1 M pH 5.0 asetat tamponu içinde hazırlanan farklı ABTS konsantrasyonlarında aktivite ölçümü yapıldı. Lineweaver-Burk ($1/V - 1/[S]$) grafiğinden K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı [76,77].

2.2.9.4. Depolama Kararlılığı

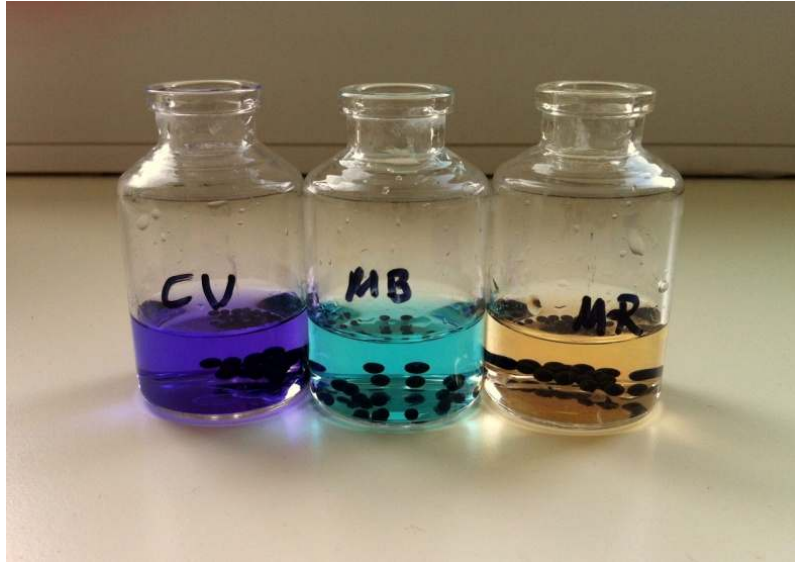
Depolama sıcaklığının ve depolama süresinin lakkaz aktivitesi üzerine etkisini incelemek için MWCNTs-CS boncuklar üzerine immobilize edilen enzimler 4 °C ile 25°C' de depolandı ve belli sürelerde aktivite ölçümleri alındı.

2.2.10. MWCNTs-CS Üzerine İmmobilize Edilen *T. versicolor* Lakkaz ile Boya Giderimi

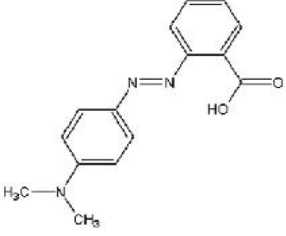
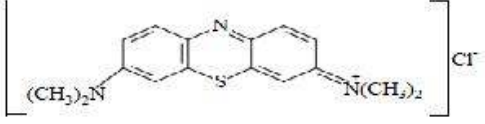
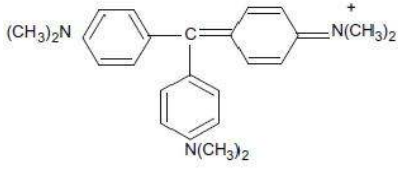
T. versicolor lakkaz enziminin boya giderim etkinliğini belirlemek için üç farklı boya Metil kırmızısı (MR), Metilen mavisi (MB) ve Kristal viyole (CV) boya ile çalışıldı. Farklı boyaların giderimini incelemek üzere absorbanlar, görünür bölgede maksimum dalga boylarında çift ışınli Shimadzu spektrofotometresi ile ölçüldü. Boyaların renklerinin yüzde giderimi aşağıdaki denkleme (3) göre hesaplandı [49];

$$\% \text{ Boya Giderimi} = \frac{I-F}{I} \quad (3)$$

I: Boyanın başlangıç konsantrasyonu, *F*: Giderim sonrası boya konsantrasyonu.



Fotoğraf 2.1. MWCNTs-CS Üzerine İmmobilize Edilen Lakkaz ile Boya Giderimi.

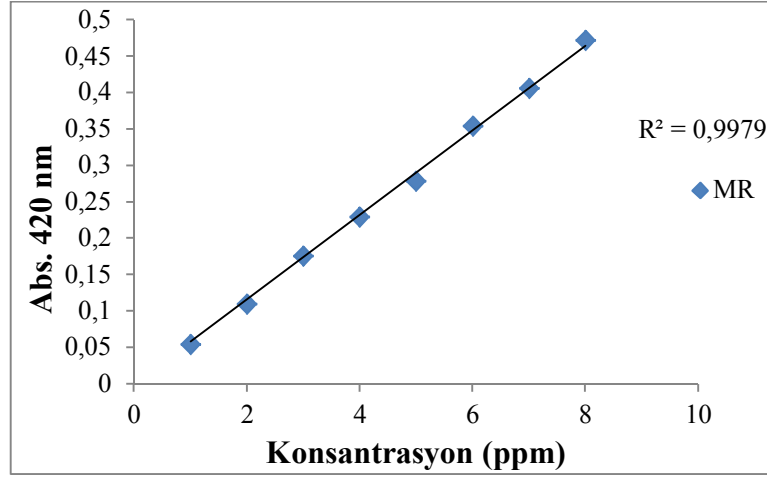
Boya	Yapısı	Dalga Boya (nm)
Metil kırmızısı		420
Metilen mavisi		665
Kristal viyole		590

Tablo 2.1. MR, MB ve CV boyaalarının yapıları ve maksimum dalga boyları.

2.2.10.1. İmmobilize Lakkaz ile Metil Kırmızısı (MR) Boyasının Giderimi

Lakkaz ile immobilize edilmiş MWCNTs-CS boncuklardan 50 mg alınıp, üzerine 2.5 ml pH 6.0' da hazırlanmış Metil kırmızısı boya çözeltisi ilave edilerek 35°C' de 130 rpm' de inkübe edildi. Daha sonra immobilize lakkaz, çözelti ortamından alınarak kalan boya miktarını belirlemek üzere 420 nm' de ölçüm alındı. Absorbans sonuçlarına göre % boya giderimi hesaplandı.

MR standart grafiği oluşturulmak üzere, 1-8 ppm arasında değişen konsantrasyonlarda MR boya çözeltileri hazırlanarak 420 nm' de absorbansları okundu ve elde edilen değerlere göre standart grafiği oluşturuldu (Şekil 2.5).

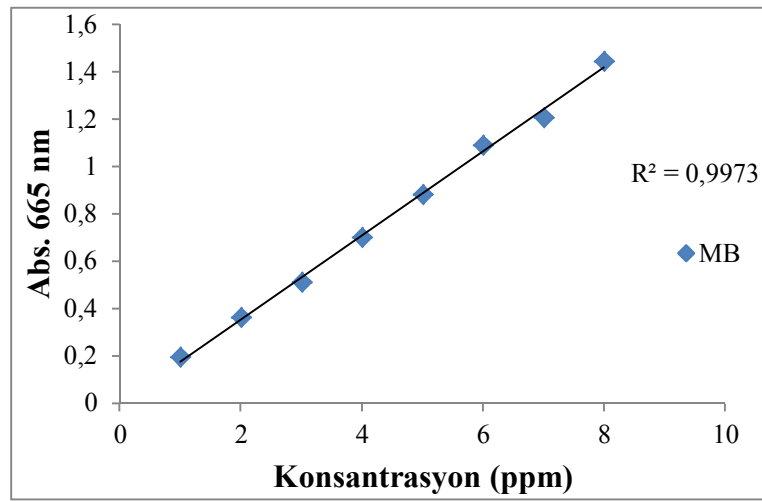


Şekil 2.5. MR boyasının standart grafiği.

2.2.10.2. İmmobilize Lakkaz ile Metilen Mavisi (MB) Boyasının Giderimi

Lakkaz ile immobilize edilmiş MWCNTs-CS boncuklardan 50 mg alınıp, üzerine pH 5.0' de hazırlanmış 2.5 ml Metilen mavisi boya çözeltisi ilave edilerek 35°C' de 130 rpm' de inkübe edildi. Daha sonra immobilize lakkaz, çözelti ortamından alınarak kalan boya miktarını belirlemek üzere 665 nm' de ölçüm alındı. Absorbans sonuçlarına göre % boya giderimi hesaplandı.

MB standart grafiği oluşturulmak üzere, 1-8 ppm arasında değişen konsantrasyonlarda MB boya çözeltileri hazırlanarak 665 nm' de absorbansları okundu ve elde edilen değerlere göre standart grafiği oluşturuldu (Şekil 2.6).

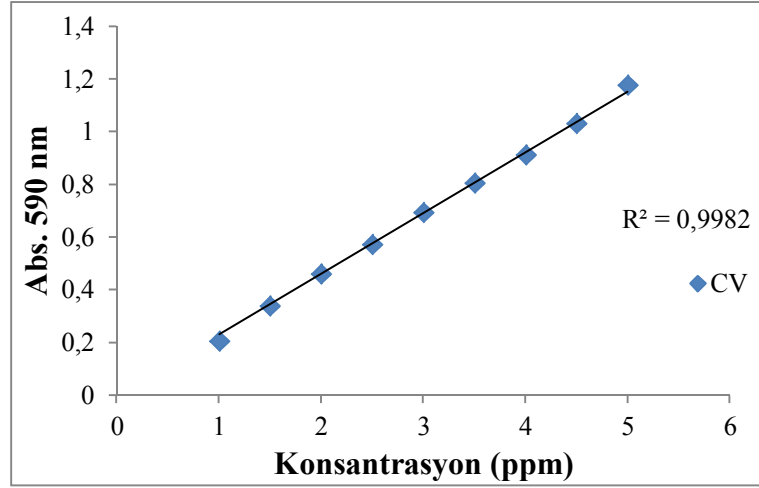


Şekil 2.6. MB boyasının standart grafiği.

2.2.10.3. İmmobilize Lakkaz ile Kristal Viyole (CV) Boyasının Giderimi

Lakkaz ile immobilize edilmiş MWCNTs-CS boncuklardan 50 mg alınıp üzerine pH 4.0' de hazırlanmış 2.5 ml Kristal viyole boya çözeltisi ilave edilerek 35°C' de 130 rpm' de inkübe edildi. Daha sonra immobilize boncuklar çözelti ortamından alınarak kalan boya miktarını belirlemek üzere 590 nm' de ölçüm alındı. Absorbans sonuçlarına göre % boya giderimi hesaplandı.

CV standart grafiği oluşturulmak üzere, 1-8 ppm arasında değişen konsantrasyonlarda CV boya çözeltileri hazırlanarak 590 nm' de absorbansları okundu ve elde edilen değerlere göre standart grafiği oluşturuldu (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. CV boyasının standart grafiği.

2.2.11. Boya Giderimini Etkileyen Faktörler

2.2.11.1. Boya Giderimi Üzerine pH Etkisi

Boya giderimi çalışmalarında kullanılan boya çözeltileri, pH' ları HCl ve NaOH ile ayarlanmış olan sulu çözeltiler ile hazırlandı. Boya gideriminde pH etkisini belirlemek üzere pH 2-8 arasındaki boya çözeltileri kullanıldı. Üç boya için ayrı ayrı 50 mg MWCNTs-CS boncuk tartıldı. Tartılan boncuklardan birincisinin üzerine 2.5 ml farklı pH' lardaki 25 ppm MR boya çözeltisi, ikincisinin üzerine 25 ppm MB boya çözeltisi ve üçüncüsünün üzerine 5 ppm CV boya çözeltisi konuldu. İmmobilize lakkaz üzerine konulan boya çözeltileri 1 saat 35 °C' de 130 rpm' de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası absorbans ölçümleri alınarak % boya giderimi hesaplandı.

2.2.11.2. Boya Giderimi Üzerine Reaksiyon Süresinin Etkisi

Üç boya için ayrı ayrı tartılan 50 mg MWCNTs-CS boncuklardan birincisinin üzerine 2.5ml 25 ppm pH 6.0' da hazırlanan MR boya çözeltisi, ikincisinin üzerine 2.5 ml 25 ppm pH 5.0' de hazırlanan MB boya çözeltisi, üçüncüsünün üzerine 2.5 ml 5 ppm pH 4.0' de hazırlanan CV boya çözeltisi konuldu. Boya çözeltileri farklı süreler boyunca (30, 60, 90, 120, 150, 180 dk, 240dk. ve 24 saat) 35 °C' de 130 rpm' de immobilize lakkaz ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrası absorbands ölçümleri alınarak % boya giderimi hesaplandı.

2.2.11.3. Boya Giderimi Üzerine Boya Konsantrasyonunun Etkisi

Üç boya için ayrı ayrı tartılan 50 mg MWCNTs-CS boncuklardan birincisinin üzerine 2.5 ml pH 6.0' da hazırlanan MR, ikincisinin üzerine pH 5.0' de hazırlanan MB, üçüncüsünün üzerine ise pH 4.0' de hazırlanan CV boya çözeltisinin 2.5-25 ppm arasında değişen konsantrasyonları konularak 1.5 saat 35 °C' de 130 rpm' de inkübe edildi. 1.5 saat giderimin sonunda boyaların maksimum dalga boyunda absorbands ölçümleri alınarak % boya giderimi hesaplandı.

2.2.11.4. Boya Giderimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Üç boya için ayrı ayrı 50 mg MWCNTs-CS boncuk tartılarak, birincisinin üzerine 2.5 ml 25 ppm pH 6.0' da hazırlanan MR boya çözeltisi, ikincisinin üzerine 2.5 ml 25 ppm pH 5.0' de hazırlanan MB boya çözeltisi ve üçüncüsünün üzerine ise 2.5 ml 5 ppm pH 4.0' de hazırlanan CV boya çözeltisi konuldu. Boya çözeltileri 1 saat boyunca 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70 °C' lerinde 130 rpm' de immobilize lakkaz ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrası absorbands ölçümleri alınarak % boya giderimi hesaplandı [78].

2.2.11.5. Boya Giderimi Üzerine Farklı Boncuk Miktarının Etkisi

50, 100, 150, 200, 250 mg MWCNTs-CS boncukların her birinin üzerine 2.5 ml 5 ppm boya çözeltisi konularak 1 saat 35 °C' de 130 rpm' de inkübe edildi. Bu işlem pH 6.0' da hazırlanan MR boya çözeltisi, pH 5.0' de hazırlanan MB boya çözeltisi ve pH' 4.0' de hazırlanan CV boya çözeltisi için uygulandı. Farklı boncuk miktarlarının boya çözeltileri ile inkübasyonu sonucu absorbands değerleri ölçülüp yüzde boya giderimi hesaplandı.

3. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

3.1. MWCNTs-CS Üzerine Lakkaz İmmobilizasyonu İçin Optimum Koşullarının Belirlenmesi

Glutaraldehit ile çapraz bağlanmış ve lakkaz enzimi immobilize edilmiş MWCNTs-CS boncukların fotoğrafı Fotoğraf 3.1' de gösterilmiştir. Çalışmamızda boncuk yapımı için %2' lik kitosan kullanılmış, kitosan ile MWCNT' ün belli bir oranda karıştırılması ile boncuklar hazırlanmıştır. Boncuk yapımında 5 mg/ml oranındaki CS-MWCNT karışımı kullanıldığında boncukların dayanıklılığının daha iyi olduğu tespit edilmiştir.

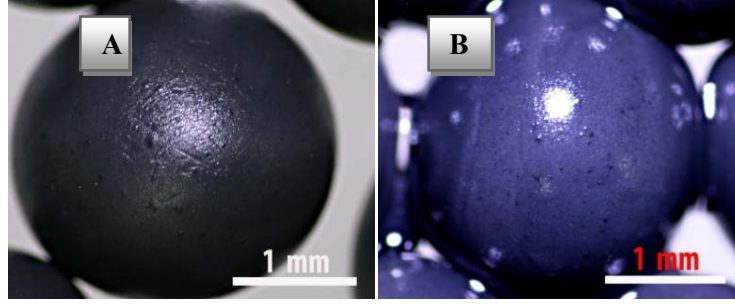


Fotoğraf 3.1. MWCNTs-CS boncukların genel görünümü.

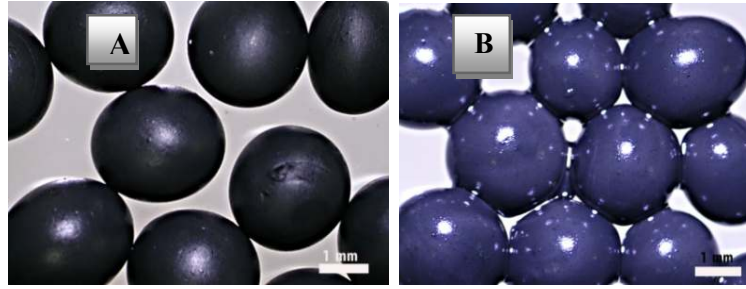
Hazırlanan boncuklar, çapraz bağlanma için %2 - %5 arasında değişen oranlarda glutaraldehit ile aktive edildi. İmmobilizasyon için uygun glutaraldehit konsantrasyonu % 4 olarak bulundu. Jiang ve arkadaşları (2005) manyetik kitosan mikrosferleri üzerine lakkaz immobilizasyonu çalışmalarında %8 lik GA, Yang ve arkadaşları (2006) modifiye kitosan üzerine lakkaz immobilizasyonu çalışmalarında %1 lik GA, Pavlidis ve arkadaşları (2012) ise %4 lük GA kullandıklarını belirtmişlerdir [66,67,79].

İmmobilizasyon süresinin enzim aktivitesi üzerine etkisini incelemek için MWCNTs-kitosan boncuklar 1-5 saat arasında değişen sürelerde lakkaz ile inkübe edildi ve uygun immobilizasyon süresi MWCNTs-CS boncuklar için 4 saat olarak saptandı.

GA ile çapraz bağlı immobilize boncukların (A) ve kontrol grubu boncukların (B) çekilen mikroskopik fotoğrafları Fotoğraf 3.2. ve Fotoğraf 3.3' de görülmektedir. Boncuk boyutları yaklaşık olarak 2.36 mm olarak belirlenmiş, kontrol ve GA ile çapraz bağlı immobilize lakkaz boncukları arasında boyut farkı gözlenmemiştir.



Fotoğraf 3.2. (A) Çapraz bağlı immobilize boncuk ve (B) kontrol boncuk.

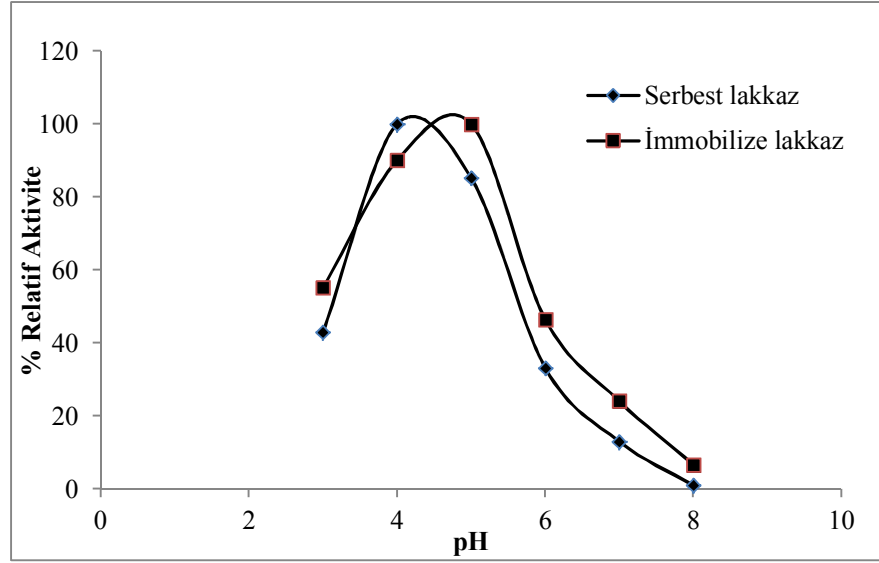


Fotoğraf 3.3. (A) Çapraz bağlı immobilize boncuklar ve (B) kontrol grubu boncuklar.

3.2. İmmobilize Enzimin Karakterizasyonu

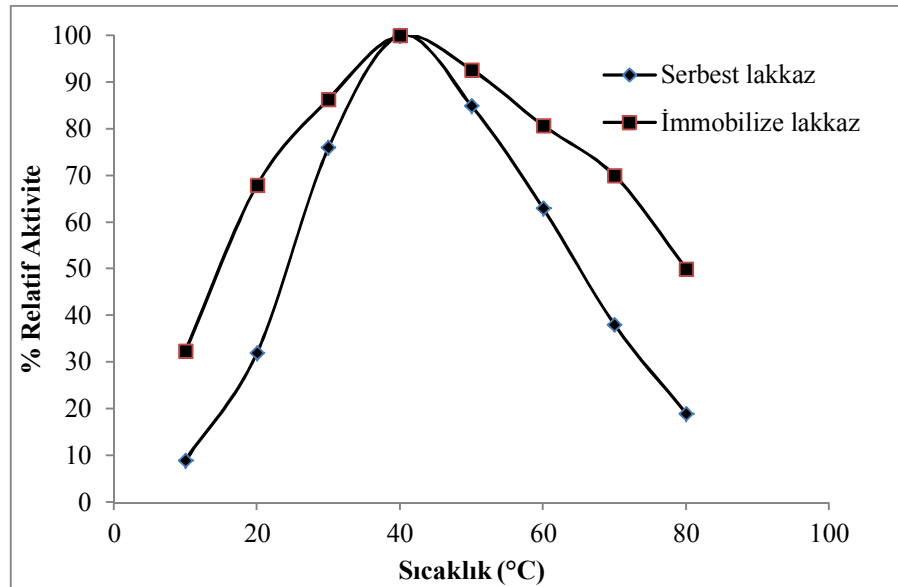
3.2.1. Optimum pH, Sıcaklık ve İmmobilizasyon Veriminin Belirlenmesi

Serbest ve immobilize lakkaz enziminin optimum pH' larının belirlenmesi için 3-8 arası değişen pH' larda aktiviteleri ölçülerek, % aktivite değerleri hesaplandı. Şekil 3.1' de gösterildiği gibi serbest ve MWCNTs-CS üzerine immobilize edilmiş lakkazın optimum pH'ları sırasıyla pH 4.0 ve pH 5.0 olarak belirlendi. Enzim immobilizasyonunda taşıyıcı üzerine bağlanma ile oluşan iyonik etkileşimler serbest ve immobilize enzimin optimum pH' nın değişmesine yol açar. Buradaki değişimin nedeni H^+ veya OH^- iyonları ile matriks arasında elektrostatik etkileşimlerin olmasından kaynaklanabilir [80]. Poliiyonik matriksler optimum pH değerlerinde bir kaymaya yol açar ve enzim mikroçevresi ile yığın fazı arasında proton dağılımına neden olur. MWCNT-CS üzerine lakkaz immobilizasyonu sonucu pH bazik bölgeye doğru 1.0 birimlik bir kayma meydana gelmiştir. Bu kayma matriksin yüküne bağlıdır ve bu çalışmadaki bazik bölgeye kayma MWCNT-kitosan matriksinin polianyonik karakterinden kaynaklanmaktadır. Benzer şekilde Lu ve arkadaşları (2007) serbest lakkaz için optimum pH' ı 3.0, immobilize lakkaz için optimum pH' ı 4.5 olarak; Çorman ve arkadaşları (2010) ise serbest lakkaz için optimum pH' ı 4.0, immobilize lakkaz için pH' ı 5.0 olarak belirtmişlerdir [80,81].



Şekil 3.1. Serbest ve MWCNTs-CS üzerine immobilize edilen lakkazın optimum pH grafiği.

Serbest ve MWCNTs-CS üzerine immobilize edilen lakkaz enziminin optimum sıcaklıklarının belirlenmesi için 10-80 °C arasındaki farklı sıcaklıklarda % aktivite değerleri ölçüldü. Şekil 3.2' de gösterildiği gibi serbest ve immobilize lakkaz enziminin optimum sıcaklığı 40 °C olarak belirlendi.



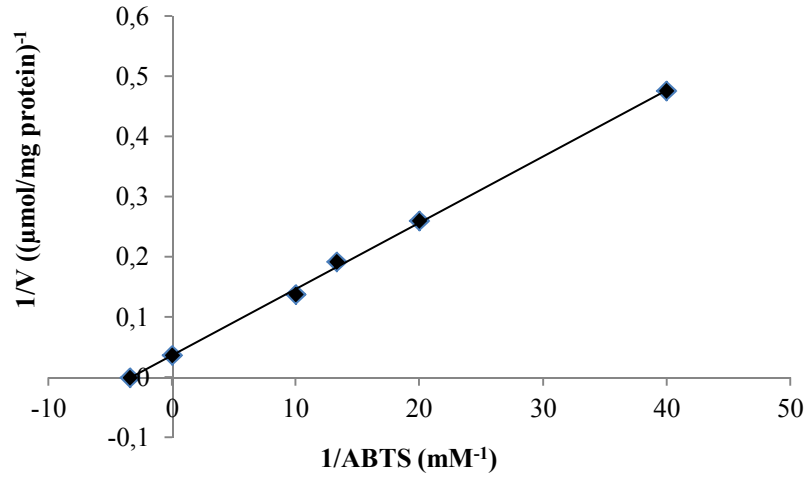
Şekil 3.2. Serbest ve MWCNTs-CS üzerine immobilize edilen lakkazın optimum sıcaklık grafiği.

İmmobilizasyon çalışmamızda %83 immobilizasyon verimi elde edildi ve immobilize lakkazın aktivitesi 3.51 U/g boncuk olarak bulundu. Başlangıç protein miktarı (mg) 0.049, bağlanan protein miktarı (mg) ise 0.032 olarak tayin edildi.

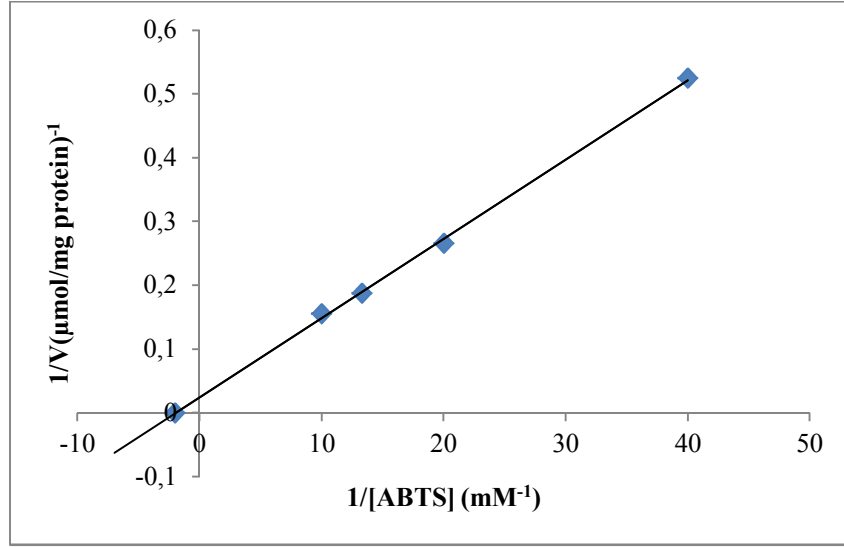
Enzimatik boya gideriminde, kitosan matriksinde tutulan MWCNT taşıyıcı olarak kullanıldığında mekanik ve termal açıdan daha dayanıklı bir yapı elde edildi. MWCNT' ler asitleştirme işlemi ile fonksiyonlandırdı ve elektroaktif bölgelerinin genişletilmesi katalitik aktivitesinin artmasını sağladı. MWCNTs ile modifiye edilen kitosanın stabilizasyonunun ve yüzey alanının artması ile daha etkili bir uygulama gerçekleştirildi. Benzer şekilde Sadighi ve arkadaşlarının (2013) immobilize lakkaz ile yaptığı çalışmada, kitosanı nanopartikül ile modifiye ederek cam boncuk elde etmişler ve kitosan-nanopartikül kompozitlerle elde edilen boncukların stabilizasyonun ve dayanıklılığının arttığını belirtmişlerdir. Bir başka çalışmada ise Jiang ve arkadaşları (2005) lakkaz immobilizasyonunda taşıyıcı olarak kullandıkları kitosanı manyetik ile modifeye ederek enzimin tekrar kullanılabilirliğini ve stabilizasyonunu arttırdıklarını rapor etmişlerdir.

3.2.2. Enzim Kinetiği

0.1 M pH 5.0 asetat tamponu ile hazırlanan farklı ABTS derişimleri kullanılarak serbest ve MWCNT-CS üzerine immobilize edilen lakkazın aktivite değerleri ölçülerek, Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 3.3-4). Grafikten elde edilen serbest ve immobilize enzimlerin K_M ve V_{max} değerleri Tablo 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Serbest lakkazın Lineweaver-Burk grafiği.



Şekil 3.4. İmmobilize lakkazın Lineweaver-Burk grafiği.

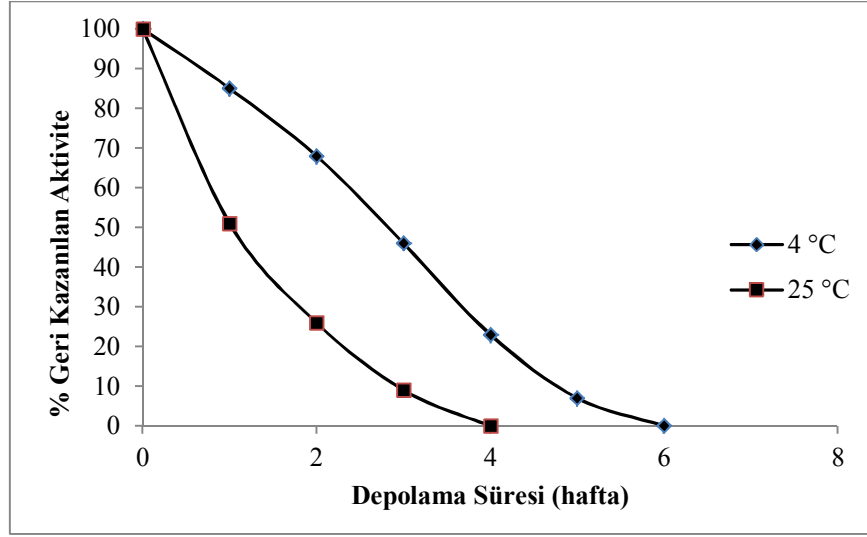
	Serbest lakkaz	İmmobilize lakkaz
K_M (mM)	0.301	0.502
V_{max} (U/mg)	27.01	14.3

Tablo 3.1. Serbest ve immobilize lakkazın kinetik parametreleri.

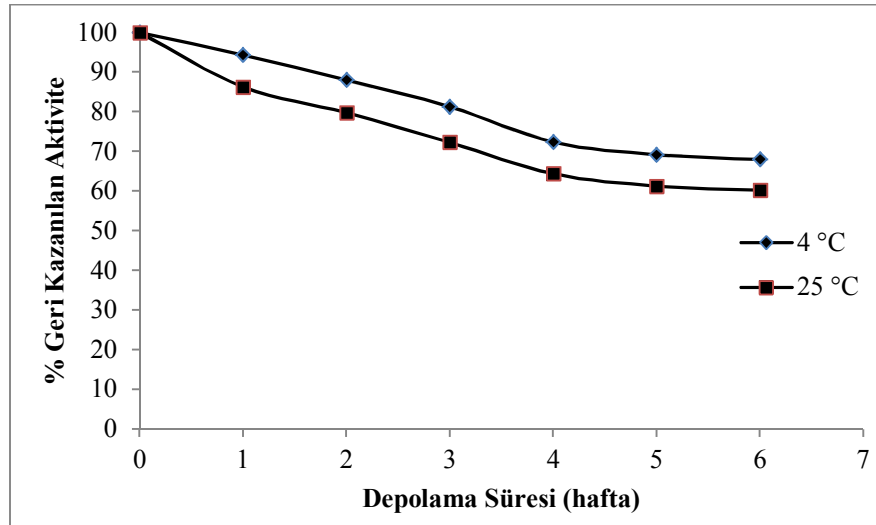
Bizim bulgularımıza benzer olarak, Liu ve arkadaşları (2011), manyetik bimodal gözenekli karbon üzerinde lakkaz immobilizasyonunda serbest ve immobilize lakkazın K_m değerlerini sırasıyla 0,232 mM ve 0,550 mM olarak, V_{max} değerlerini sırasıyla 20,98 U/mg ve 18,75 U/mg olarak rapor etmişlerdir. Bayramoğlu ve arkadaşları (2010), poly(4-vinylpyridine) ve Cu(II) şelatlı boncuklar üzerine lakkaz immobilizasyonunda ise serbest enzim için K_m değerini 0,32 mM immobilize enzim için K_m değerini 0,41 mM olarak bulmuşlardır. V_{max} değerini ise serbest enzim için 23,1 U/mg, immobilize enzim için 17,8 U/mg olarak belirtmişlerdir. İmmobilize lakkazın K_m değerinin serbest enziminkinden yüksek olması, immobilize lakkazın substrata affinitesinin serbest lakkazın affinitesinden daha düşük olduğu anlamına gelmektedir. K_m değerindeki artışın nedeni taşıyıcının aktif bölgelerinin meydana getirdiği sterik engelleme, substrat bağlanması için gerekli enzim esnekliğinin azalması ya da substrat difüzyonunun sınırlanması olabilir [67].

3.2.3. Depolama Kararlılığı

Serbest ve MWCNT-CS üzerine immobilize edilmiş lakkaz 4 °C ve 25 °C' de uygun koşullarda depolandı ve belirli aralıklarla aktiviteleri ölçüldü. Sonuçlar Şekil 3.5-6' da görülmektedir. 4 °C' de depolanan serbest lakkaz 6 hafta sonunda aktivitesini tamamen yitirirken, 6 hafta sonunda 4 °C 'de depolanan immobilize lakkazın aktivitesi % 32 azalmıştır. 25 °C' de depolanan serbest lakkaz 4 hafta sonunda aktivitesini tamamen yitirirken, 6 hafta sonunda 25 °C 'de depolanan immobilize lakkazın aktivitesi % 40 azalmıştır. Jiang ve arkadaşlarının (2005) yaptığı çalışmada serbest enzim 1 ay sonunda %70 aktivite kaybettiği, manyetik kitosan mikrosfer üzerine immobilize edilen lakkazın ise 1 ay sonunda %30 aktivite kaybettiği rapor edilmiştir.



Şekil 3.5. Serbest lakkazın 4 °C ve 25 °C'de depolama kararlılığı.



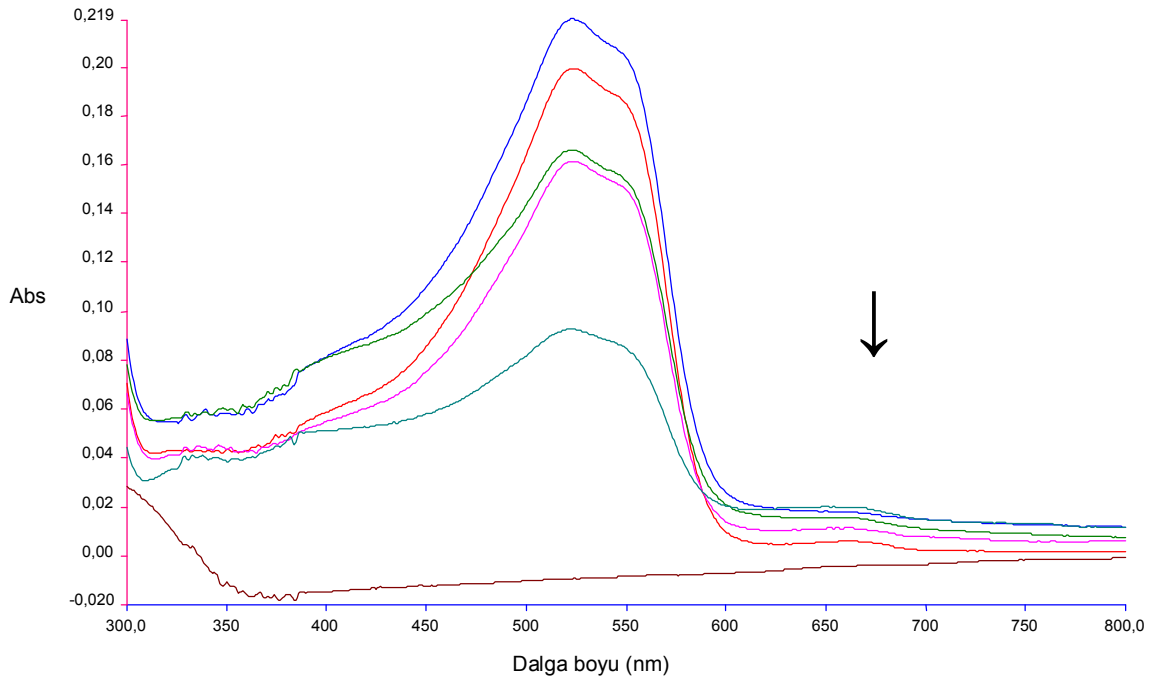
Şekil 3.6. İmmobilize lakkazın 4 °C ve 25 °C'de depolama kararlılığı.

3.3. Tekstil Boyalarının immobilize *T. Versicolor* Lakkaz ile Renk Giderimi

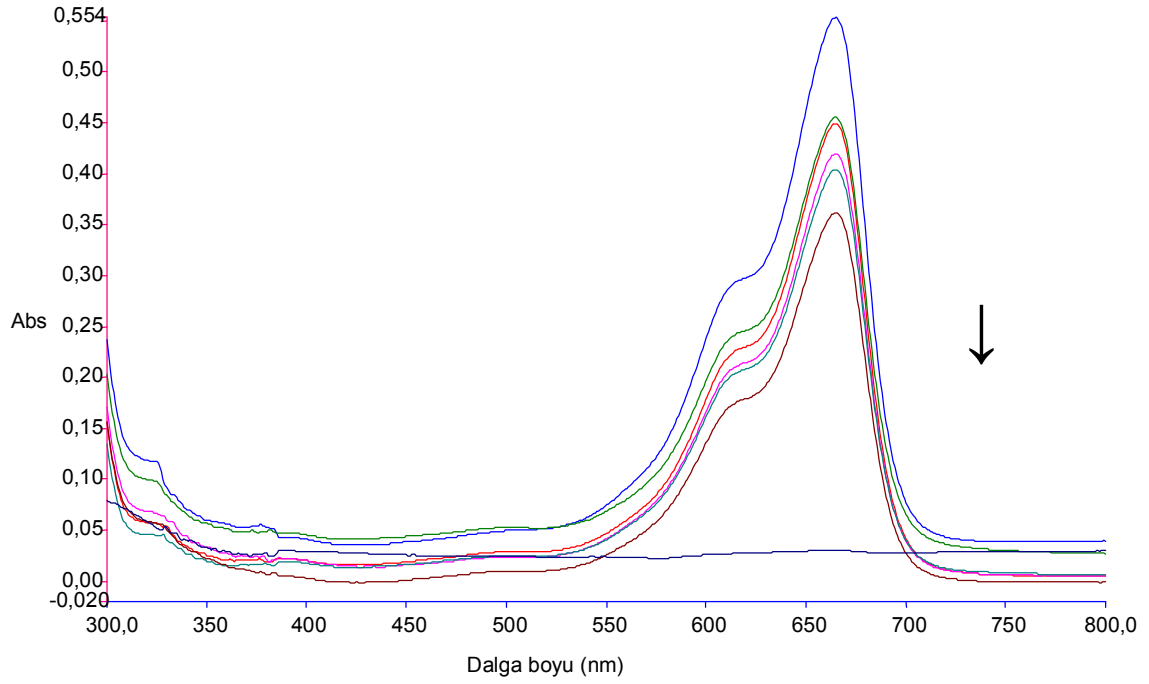
Çalışmamızda MWCNTs-CS boncuklar üzerine immobilize edilen lakkaz enzimi ile Metil kırmızısı, Metilen mavisi ve Kristal viyole boyalarının renk giderimi gerçekleştirilmiştir ve boya giderim oranları Tablo 3.2’de görülmektedir. MR, MB ve CV boyaalarının 5, 15, 30, 45, 60 dk. ve 48 saat sürelerinde alınan UV-Vis spektrum tarama sonuçları etkili bir boya giderimi gerçekleştiğini göstermektedir (şekil 3.7-9). Boyaların başlangıç ve giderimden sonraki görüntüleri Fotoğraf 3.4-6’da görülmektedir.

CV (5 ppm)	%Boya Giderimi	MR (25 ppm)	%Boya Giderimi	MB (25 ppm)	%Boya Giderimi
1h	31	1h	56.1	1h	63.4
3h	47.5	3h	71.4	3h	78.1
24h	79.5	24h	97,2	24h	93.1
48h	100	48h	100	48h	100

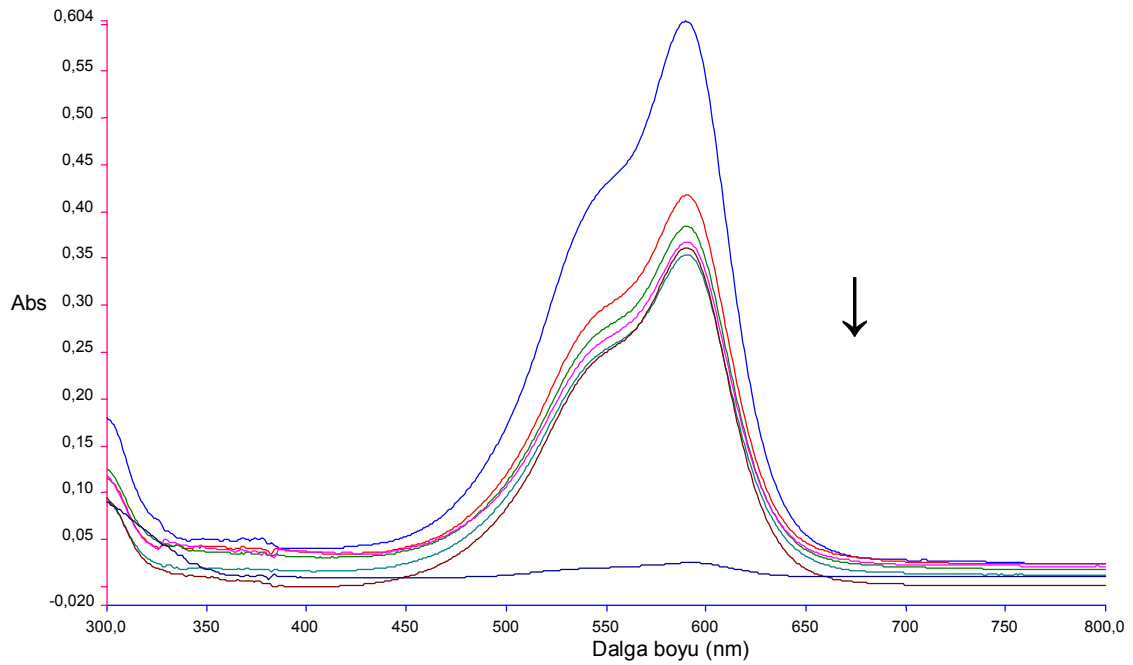
Tablo 3.2. MR, MB ve CV boyaaları için 1, 3, 24 ve 48 saat sonunda gerçekleşen % boya giderimleri.



Şekil 3.7. Immobilize lakkaz ile MR boyasının giderimi sırasında 5, 15, 30, 45, 60 dk. ve 48 saat sürelerinde UV-Vis spektrum taraması.



Şekil 3.8. İmmobilize lakkaz ile MB boyasının giderimi sırasında 5, 15, 30, 45, 60 dk. ve 48 saat sürelerinde UV-Vis spektrum taraması.



Şekil 3.9. İmmobilize lakkaz ile CV boyasının giderimi sırasında 5, 15, 30, 45, 60 dk. ve 48 saat sürelerinde UV-Vis spektrum taraması.



Fotoğraf 3.4. MR boyasının başlangıç, 1 saat ve 24 saat gideriminden sonraki görünümü.



Fotoğraf 3.5. MB boyasının başlangıç, 1 saat ve 24 saat gideriminden sonraki görünümü.



Fotoğraf 3.6. CV boyasının başlangıç, 1 saat ve 24 saat gideriminden sonraki görünümü.

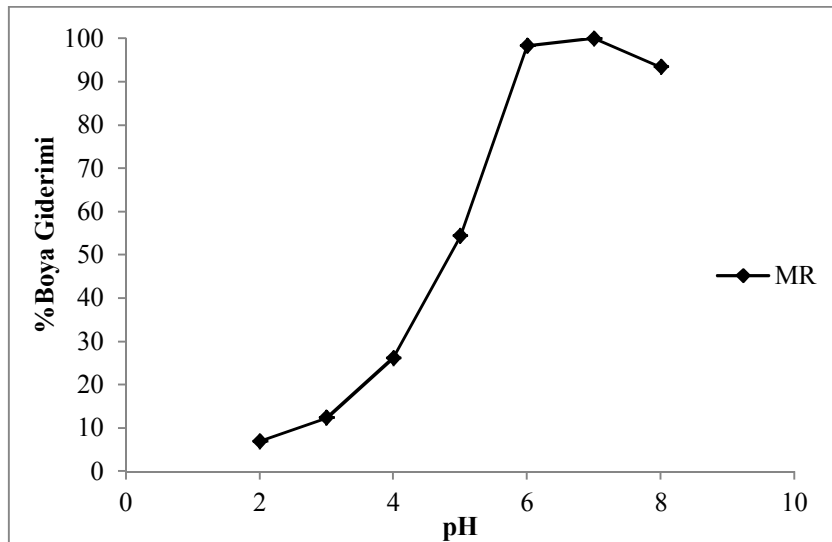
MWCNTs-CS üzerine immobilize edilen lakkaz ile boyanın renk giderimi diğer kaynaklarla karşılaştırıldığında etkili bir giderim gerçekleştiği görülmektedir. Kumar ve arkadaşlarının (2012) *P. Ostreatus* lakkaz enzimi ile yaptığı boya giderimi çalışmalarında 2 saat sonunda Methl Red boyasının %23 giderildiği, Metyhlene Blue boyasının % 50 giderildiği belirtilmiştir. Güler ve arkadaşlarının (2012) manyetik kitosan boncuk üzerine immobilize edilen lakkaz ile Methyl Orange boyasının giderim çalışmasında 6 saat sonunda %36 giderim

gerçekleştiği rapor edilmiştir. Nyanhongo ve arkadaşlarının (2001) *T. Versicolor* lakkaz ile yaptığı boya giderim çalışmasında 3 saat sonunda Acid Blue boyasının %51, Acid Violet boyasının %26 giderildiği belirtilmiştir. Yan ve arkadaşlarının (2009) lakkaz enzimi ile Kristal viyole boyasının giderimi çalışmalarında 4 saat sonunda % 14 giderim gerçekleştiği rapor edilmiştir [11,82,83,84].

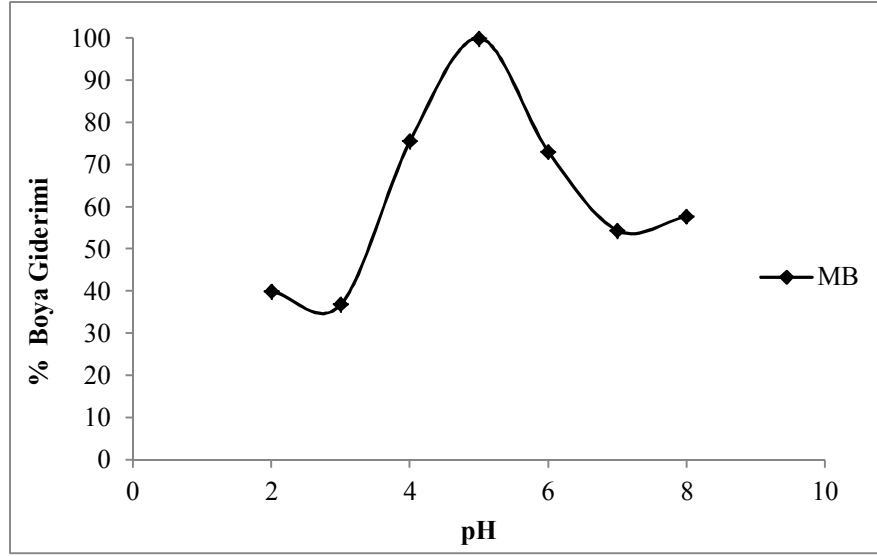
Metil kırmızısı (MR), Metilen mavisi (MB) ve Kristal viyole (CV) boyalarının renk giderimi üzerine pH, başlangıç boya konsantrasyonu, reaksiyon süresi ve sıcaklık gibi çeşitli fizikokimyasal parametrelerin etkileri araştırılmıştır.

3.4. Boya Giderimi Üzerine pH Etkisi

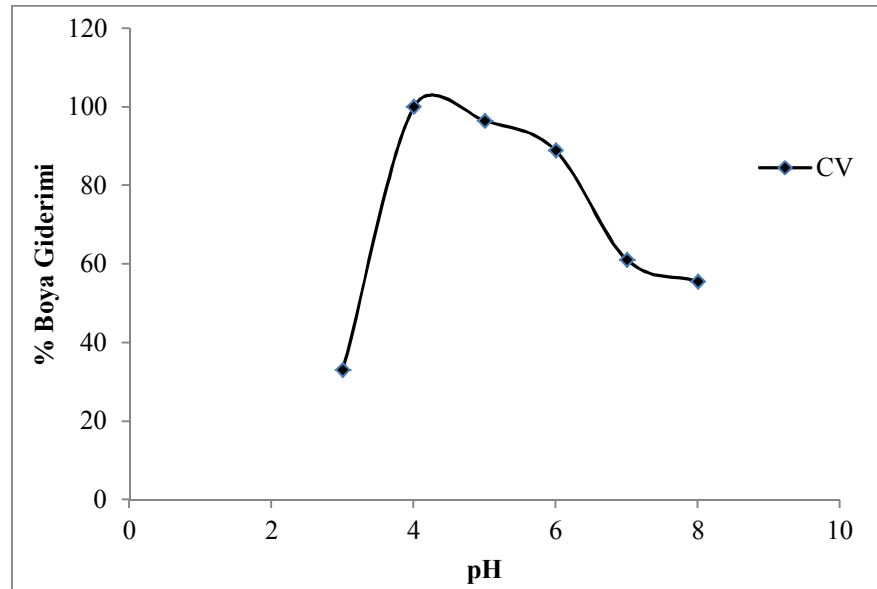
T. versicolor lakkazın immobilizasyonu sonucu elde edilen MWCNTs-CS boncuklar ile boyaların renk giderimi üzerine pH etkisi incelendi. MR, MB ve CV olmak üzere üç ayrı boya için pH etkisi çalışmalarında pH' ları HCl ve NaOH ile ayarlanmış (pH 2-8) sulu çözeltiler kullanıldı. Metil kırmızısı (MR) boyası için pH 2-5 arası kırmızı renk, alkali bölge pH 6-12 arası ise sarı renk gözlenmektedir. Metilen mavisi (MB) ve Kristal viyole (CV) boyalarında ise pH değişimi ile renk değişimi gözlenmemektedir. İmmobilize lakkaz ile boya giderimi için optimum pH, MR boyası için pH 6.0 (şekil 3.10), MB boyası için pH 5.0 (şekil 3.11) ve CV boyası için pH 4.0 (şekil 3.12) olarak bulundu. Lakkaz enzimi ile Metil kırmızısı boyasının gideriminde pH etkisi için benzer sonuçlar Jadhav ve arkadaşları tarafından da (2008) rapor edilmiştir. Optimum pH Metilen mavisi (MB) için Saeed ve arkadaşları (2009) tarafından pH 5.0; Kristal viyole (CV) için Dai ve arkadaşları (2010) tarafından pH 4.0 olarak rapor edilmiştir [85,86].



Şekil 3.10. MR boyasının giderimi üzerine pH etkisi 25 ppm boya çözeltisi, 35 °C' de 1 saat 130 rpm' de inkübasyon.



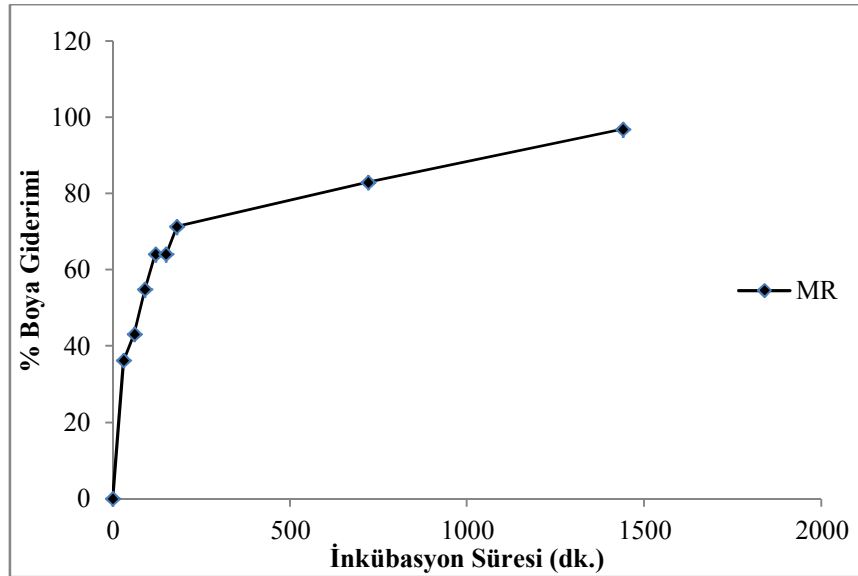
Şekil 3.11. MB boyasının giderimi üzerine pH etkisi 25 ppm boya çözeltisi, 35 °C' de 1 saat 130 rpm' de inkübasyon.



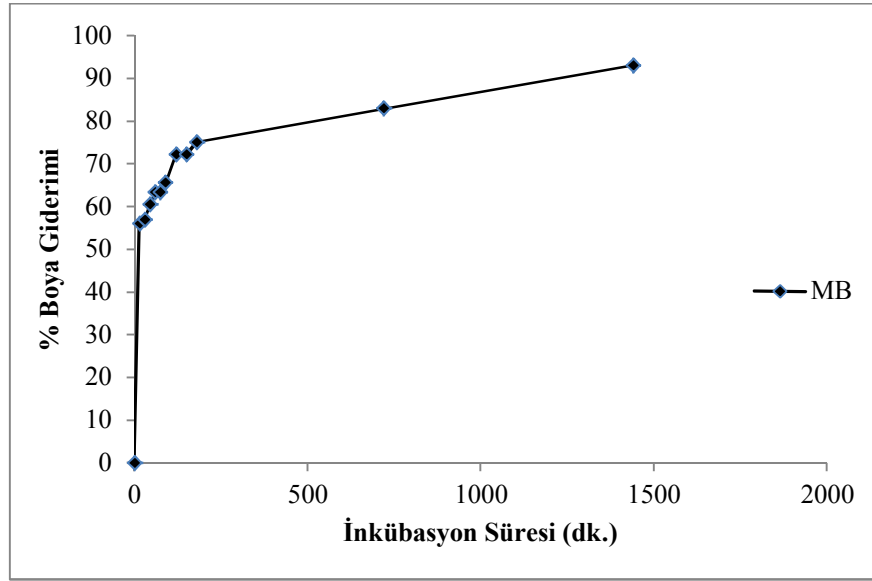
Şekil 3.12. CV boyasının giderimi üzerine pH etkisi 5 ppm boya çözeltisi, 35 °C' de 1 saat 130 rpm' de inkübasyon.

3.5. Boya Giderimi Üzerine Reaksiyon Süresinin Etkisi

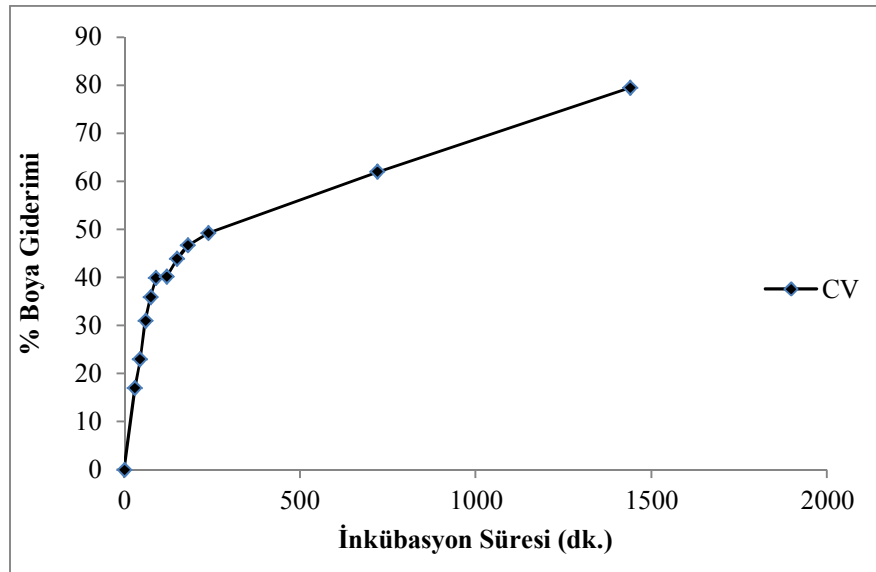
Reaksiyon süresinin boya giderimi üzerine etkisini belirlemek için MWCNTs-CS boncuklar üzerine immobilize edilen lakkaz ile boya çözeltileri farklı süreler boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonucu absorbans değerleri ölçülüp, % boya giderimi hesaplandı. MR, MB ve CV boya ile yapılan denemeler sonucu inkübasyon süresi arttıkça boya gideriminin de arttığı gözlenmektedir (şekil 3.13-15). MR boyası için 30 dakika sonra %36.3 boya giderimi, 120 dakika sonra %64.2 boya giderimi, 24 saat sonunda ise %96.9 boya giderimi gerçekleşti. MB boyası için 30 dakika sonunda % 56 boya giderimi, 120 dakika sonunda %72.3 boya giderimi, 24 saat sonunda ise %93.1 boya giderimi gözlemlendi. CV boyası için 30 dakika sonunda % 23 boya giderimi, 120 dakika sonunda %40.2 boya giderimi, 24 saat sonunda ise %79.5 boya giderimi gerçekleşti. Ayed ve arkadaşlarının (2011) MR boyası ile yaptığı çalışmada, Chen ve arkadaşlarının (2008) CV boyası ile yaptığı çalışmada ve Ferreira-Leitao ve arkadaşlarının (2007) MB boyası ile yaptığı çalışmada süre arttıkça boya gideriminin de arttığı rapor edilmiştir [49,87,88].



Şekil 3.13. MR boyası giderimi üzerine reaksiyon süresi etkisi pH 6.0' da 25 ppm boya çözeltisi 35°C' de 130 rpm' de inkübasyon.



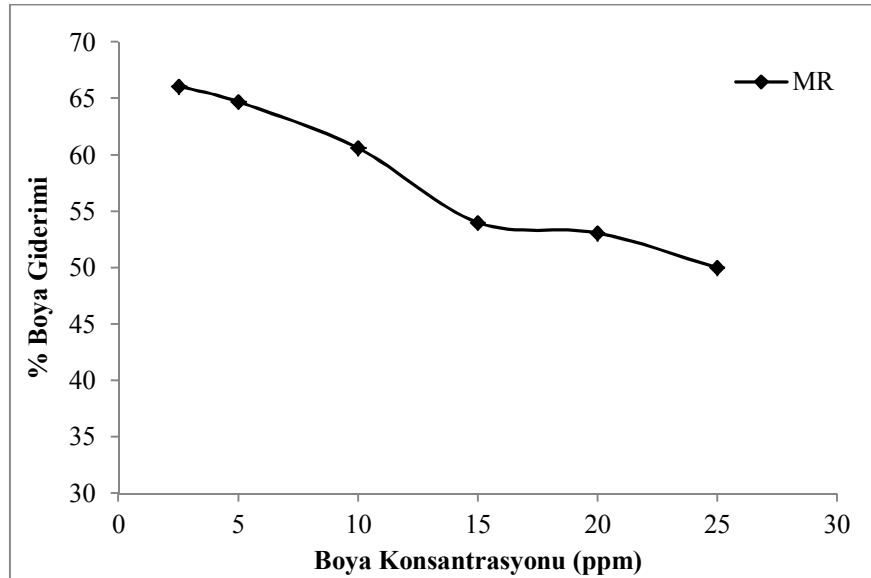
Şekil 3.14. MB boyası giderimi üzerine reaksiyon süresi etkisi pH 5.0' de 25 ppm boya çözeltisi 35°C' de 130 rpm' de inkübasyon.



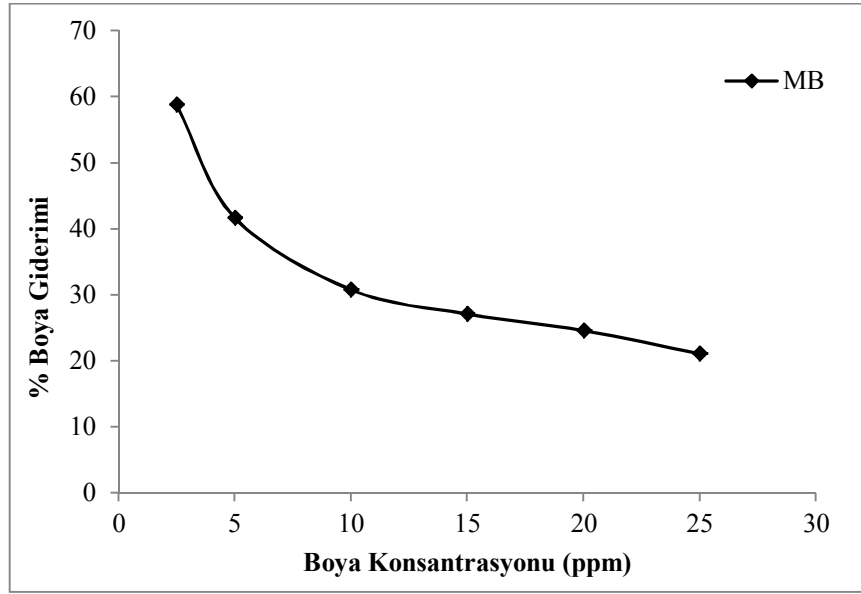
Şekil 3.15. CV boyası giderimi üzerine reaksiyon süresi etkisi pH 4.0' de 5 ppm boya çözeltisi 35°C' de 130 rpm' de inkübasyon.

3.6. Boya Giderimi Üzerine Konsantrasyonun Etkisi

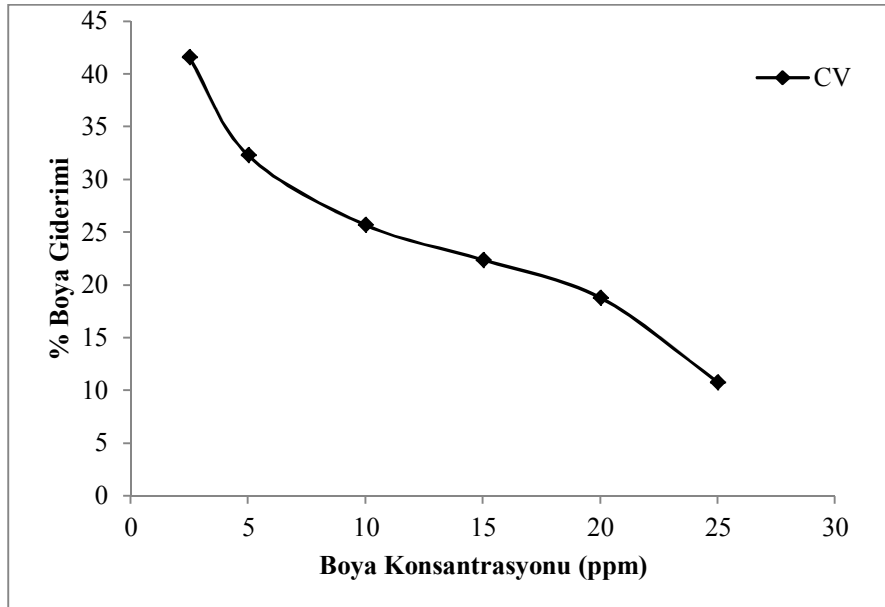
İmmobilize lakkaz ile boya gideriminde konsantrasyon etkisini belirlemek için 2.5-25 ppm arasında değişen farklı konsantrasyonlarda boya çözeltileri ile 1.5 saat 35 °C' de 130 rpm' de inkübe edildi. 1.5 saatin sonunda her boyanın maksimum dalga boyunda absorbans ölçümleri alınarak % boya giderimi hesaplandı. Sonuçlar her üç boya içinde artan boya konsantrasyonu ile azalan boya gideriminin olduğunu göstermiştir (Şekil 3.16-18). Benzer sonuçlar Chen ve arkadaşlarının (2008) CV boyası ile yaptığı çalışmada, Ayed ve arkadaşlarının MB boyası için yaptığı çalışmada ve Alam ve arkadaşlarının (2009) MR boyası ile yaptığı çalışmada konsantrasyon arttıkça boya gideriminin azaldığı rapor edilmiştir [49,87,89]. MR boyasının 2.5 ppm boya konsantrasyonunda %66.1 boya giderimi, 25 ppm boya konsantrasyonunda ise %50 boya giderimi gerçekleşti. MB boyasının 2.5 ppm boya konsantrasyonunda %58.8, 25 ppm boya konsantrasyonunda ise %22 boya giderimi gerçekleşti. CV boyası için ise 2.5 ppm boya konsantrasyonunda %41.6, 25 ppm boya konsantrasyonunda %10.8 boya giderimi gerçekleşti.



Şekil 3.16. MR boyasının giderimi üzerine boya konsantrasyonunun etkisi (2.5- 25 ppm), pH 6.0, 35 °C' de 90dk. 130 rpm' de inkübasyon.



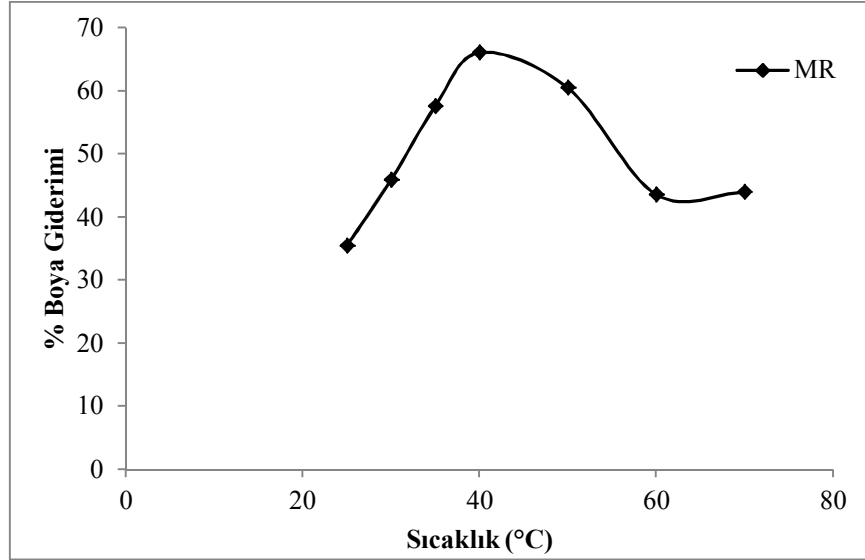
Şekil 3.17. MB boyasının giderimi üzerine boya konsantrasyonunun etkisi (2.5- 25 ppm), pH 5.0, 35 °C' de 90dk. 130 rpm' de inkübasyon.



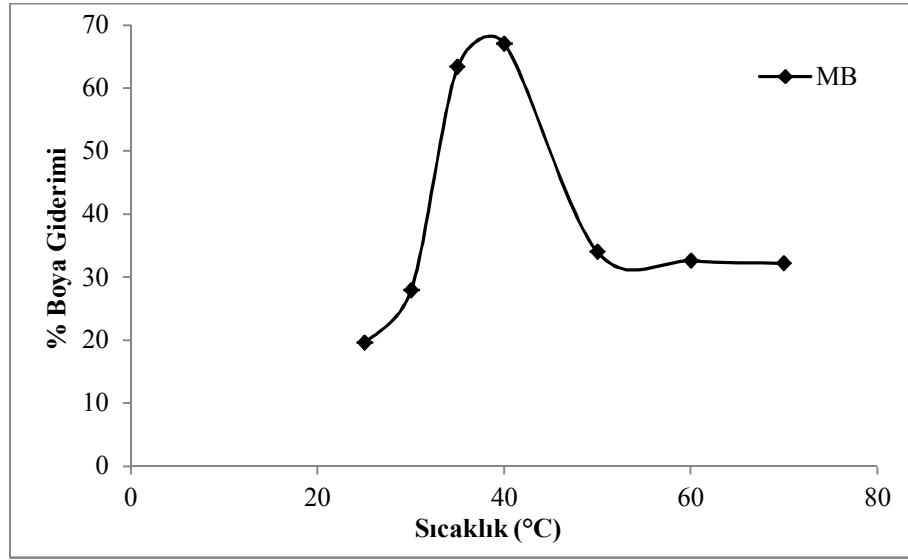
Şekil 3.18. CV boyasının giderimi üzerine boya konsantrasyonunun etkisi (2.5- 25 ppm), pH 4.0, 35 °C' de 90dk. 130 rpm' de inkübasyon.

3.7. Boya Giderimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

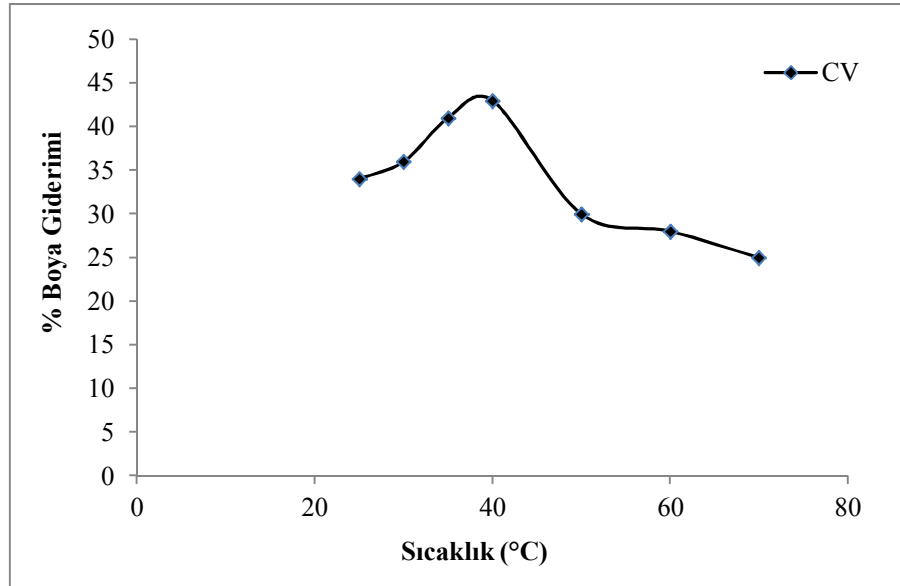
İmmobilize lakkaz ile farklı sıcaklıklardaki boya giderimini incelemek için 25-70 °C arasında değişen sıcaklıklarda çalışıldı. Bu sıcaklıklarda gerçekleşen boya giderimlerinin sonunda kalan boyaların absorbens değerleri ölçülerek % boya giderimi hesaplandı. MR, MB ve CV boyalarının giderimine sıcaklığın etkisi Şekil 3.19-21’ de gösterildi. Sonuçlar 40 °C’ ye kadar sıcaklık arttıkça giderimin arttığını, ancak 40 °C’ den sonra giderimde yavaş yavaş bir azalma olduğunu göstermektedir. MR boyası için 40 °C’ de %66.1, 70 °C’ de %44; MB boyası için 40 °C’ de %67.1, 70 °C’ de ise %33 ve CV boyası için 40 °C’ de %43, 70 °C’ de ise %26 giderim olduğu belirlenmiştir. Ayed ve arkadaşlarının (2006) *S. paucimobilis* ile yaptığı çalışmada 40 °C’ den sonra giderimin azaldığı, Sadighi ve arkadaşlarının (2013) yaptığı immobilize lakkaz ile boya giderimi çalışmalarında 50 °C’ den sonra giderimin azaldığı belirtilmiştir [87,90].



Şekil 3.19. MR boyasının giderimi üzerine farklı sıcaklıkların etkisi pH 6.0 ’ da 60dk. 130 rpm’ de inkübasyon.



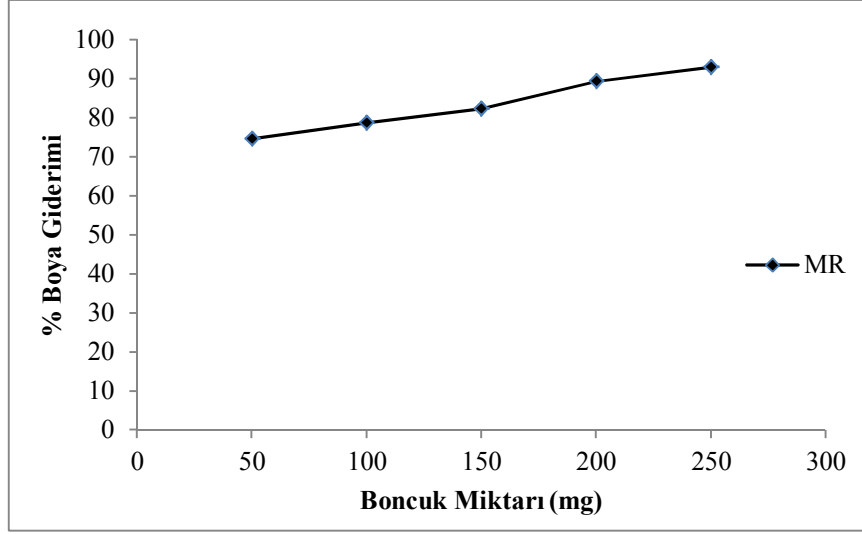
Şekil 3.20. MB boyasının giderimi üzerine farklı sıcaklıkların etkisi pH 5.0' de 60dk. 130 rpm' de inkübasyon.



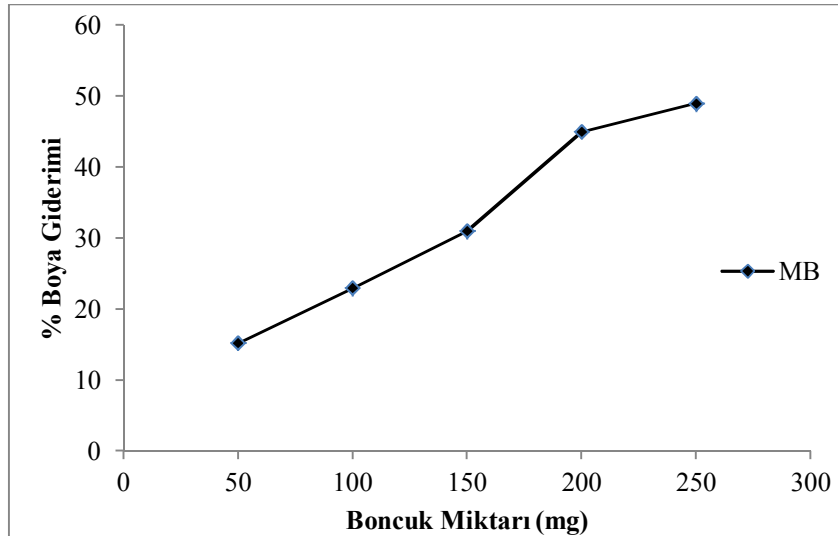
Şekil 3.21. CV boyasının giderimi üzerine farklı sıcaklıkların etkisi pH 4.0' de 60dk. 130 rpm' de inkübasyon.

3.8. Boya Giderimi Üzerine Farklı Boncuk Miktarının Etkisi

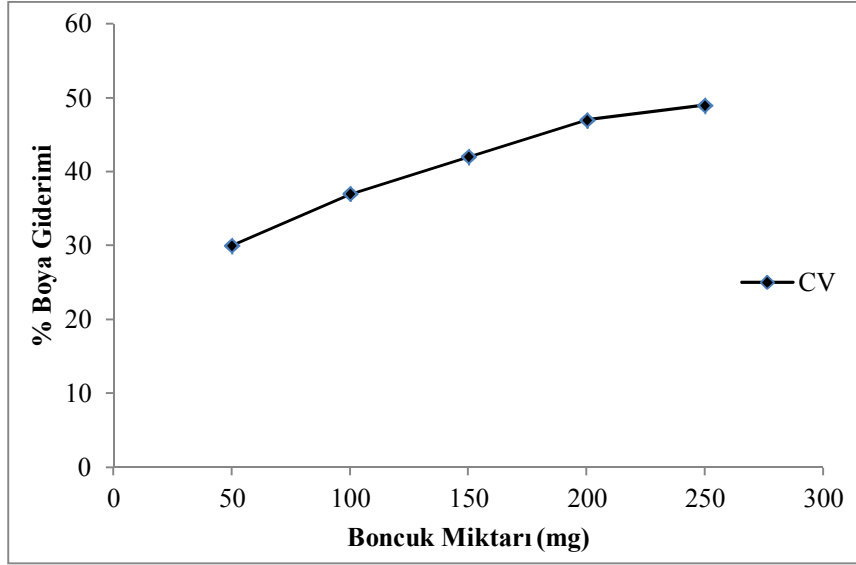
50, 100, 150, 200, 250 mg MWCNTs-CS boncukları MR (pH 6.0), MB (pH 5.0) ve CV (pH 4.0) boya çözeltileri ile 1 saat 35 °C' de 130 rpm' de inkübe edildi ve % boya giderimi hesaplandı. Sonuçlar artan immobilize enzim miktarı ile boya gideriminin arttığını (şekil 3.22-24) göstermiştir. Benzer sonuçlar Murugesan ve arkadaşlarının (2006) lakkaz enzimi ile yaptığı boya giderim çalışmalarında enzim miktarının artması ile boya gideriminin arttığını belirtmiştir.



Şekil 3.22. MR boyasının giderimi üzerine farklı boncuk miktarlarının etkisi pH 6.0' da 60dk. 130 rpm' de inkübasyon.



Şekil 3.23. MB boyasının gideriminde farklı boncuk miktarlarının etkisi pH 5.0' de 60dk. 130 rpm' de inkübasyon.



Şekil 3.24. CV boyasının giderimi üzerine farklı boncuk miktarlarının etkisi pH 4.0' de 60dk. 130 rpm' de inkübasyon.

Sonuç olarak endüstriyel uygulamalarda kullanılan lakkaz enzimi immobilize edilerek spesifikliğinin yüksek olması ve geniş bir substrat aralığına sahip olması nedeniyle boya, fenol giderimi ve ağartma gibi biyoteknolojik uygulamalarda biyokatalizör olarak kullanılabilir. Enzimatik uygulamalarda taşıyıcı üzerine enzim immobilizasyonu enzimlerin aktivitesinin, kararlılığının ve seçiciliğinin artırılması için tercih edilen bir yöntem olmakla birlikte endüstriyel uygulamaların maliyetini azaltır ve proses kontrolü sağlar. Taşıyıcı üzerine kovalent bağlamayla enzim immobilizasyonu yöntemi lakkaz immobilizasyonu için uygun bir yöntemdir. Bu yöntemle lakkaz immobilizasyonu yüksek verimle gerçekleştirilebilir. Immobilizasyonda 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 modifiye kitosan üzerine lakkaz enzimi başarı ile immobilize edilmiştir. Lakkazın MWCNT-CS kompozitine bağlanması enzimin negatif karboksil grupları ile kitosanın pozitif yüklü amin grupları arasındaki elektrostatik kuvvetler sayesinde gerçekleşmektedir. Kitosanın MWCNT ile modifikasyonu sayesinde kitosan üzerine immobilize

edilen lakkazın immobilizasyon verimi, pH ve sıcaklığa karşı dayanıklılığı, tekrar kullanılabilirliği ve aktivitesini kaybetmeden daha uzun süre depolanması sağlanmıştır. Çalışmalarımızda MWCNTs-CS üzerine immobilize edilen *T. Versicolor* lakkaz ile farklı sınıftaki boyaların gideriminin gerçekleştirilebildiği saptanmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, immobilize lakkaz tarafından tekstil boyası içeren sulu çözeltilerden MR, MB ve CV boyalarının renginin %100' e kadar giderilebildiğini göstermektedir.

4. KAYNAKLAR

- [1] Gözükara E. M., Biyokimya, İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, 3, 2 (1997) 572-582.
- [2] Brandi P., D'Annibale A., Galli C., Gentili P., Pontes A. S. N., In search for practical advantages from the immobilisation of an enzyme: the case of laccase, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 41 (2006) 61-69.
- [3] Yamak Ö., Poli(akrilamit)-Sodyum Aljinat, Poli(akrilamit-N-izopropilakrilamit)- Sodyum aljinat, Poli(akrilamit-N-izopropilakrilamit) Hidrojellerine Lakkaz İmmobilizasyonu, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Ens., Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2007.
- [4] Uygun M., Aktaş Uygun D., Karagözler A. A., PVA-Aljinat Küreler Üzerine α -Amilaz Enziminin İmmobilizasyonu, e-TRALLEIS, 1 (2013) 45-50.
- [5] Ateş S., İmmobilize Enzimler ve Besin Endüstrisinde Kullanımı, Gıda, 18 (2) (1993) 129-130.
- [6] Hürrem F., Katalazın Çapraz Bağlı Enzim Agraferatlarını (CLEA) Oluşturma Yöntemiyle İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Ens., Yüksek Lisans Tezi, Adana, 2010.
- [7] Bilen Ç., Paraoksonaz Enziminin Glutaraldehit ile İmmobilizasyonu ve Bazı Ağır Metaller Karşı Affinitesinin Araştırılması, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Ens., Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir , 2009.
- [8] Demir A., N. Seventekin, Kitin, Kitosan ve Genel Kullanım Alanları, Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi Cilt: 3, No: 2, (2009) 92-103.
- [9] Kumar M.N.V., A review of chitin and chitosan applications, Reactive & Functional Polymers 46 (2000) 1-27.
- [10] Tarım E., Kitosan İle Sulu Çözeltilerden Krom Uzaklaştırılması, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Ens., Yüksek Lisans Tezi, Isparta, 2011.
- [11] Güler S., Kitosan Türevlerinde İmmobilize Edilen Lakkaz Enziminin Aktiviteleri, Stabiliteleri ve Reaksiyon Kinetiklerinin İncelenmesi, Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Ens., Yüksek Lisans Tezi, Manisa, 2012.

- [12] Pereira E. B., Castro H. F., Moraes F. F., Zanin G. M., Kinetic Studies of Lipase from *Candida rugosa* A Comparative Study Between Free and Immobilized Enzyme onto Porous Chitosan Beads, Maringá State University, Department of Chemical Engineering, Brazil, 2001.
- [13] Diaconu M., Litescu S.C, Radu G.L., Laccase–MWCNT–chitosan biosensor—A new tool for total polyphenolic content evaluation from in vitro cultivated plants, *Sensors and Actuators B* 145 (2010) 800–806.
- [14] Arık B., Ekmekçi A. , Körlü K., Duran, Lakkaz Enzimlerinin Tekstilde Kullanım Alanları, Ege Üniversitesi, Tekstil Mühendisliği, Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi, İzmir, 2 (2008)17 -22.
- [15] Akbulut H., karbon nanotüpler, Ankara Üniversitesi, Metalurji ve Malzeme Mühendisliği, 2006.
- [16] Koç M. B., Nanotüpler, Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, 2003.
- [17] Wu Z., Feng W., Feng Y., Liu Q., Xu X., Sekino T., Fujii A., Ozaki M., Preparation and characterization of chitosan-grafted multiwalled carbon nanotubes and their electrochemical properties, *Carbon* 45 (2007) 1212–1218.
- [18] Ma L., Lu W., Wen J., Encapsulation of lactate dehydrogenase in carbon nanotube doped alginate–chitosan capsules, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 56 (2009) 102–107.
- [19] Tan H., Feng W., Ji P., Lipase immobilized on magnetic multi-walled carbon nanotubes, *Bioresource Technology* 115 (2012) 172–176.
- [20] Ge B., Tan Y., Xie Q., Ma M., Ya S., Preparation of chitosan–dopamine-multiwalled carbon nanotubes nanocomposite for electrocatalytic oxidation and sensitive electroanalysis of NADH, *Sensors and Actuators B* 137 (2009) 547–554.
- [21] Bayramoglu G., Kaya B., Arica M.Y., Immobilisation of *Candida rugosa* lipase onto spacer-arm attached (GMA-HEMA-EGDMA) beads. *Food Chemistry* 92 (2005) 261–268.
- [22] 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, *Bioresource Technology* 100 (2009) 665–669.

- [23] 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*, Cilt/Vol.:1-Sayı/No: 1 (2010) 59-70.
- [24] Aytar P., Beyaz Çürükçül Funguslarla Linyit Kömüründen Kükürt giderimi İçin Optimum Koşulların Belirlenmesi, *Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir*, Temmuz, 2007.
- [25] Thurston C. F., The structure and function of fungal laccases, *Microbiology* 140, (1994) 19-26.
- [26] Liu, Z. Zeng, G. Zeng, L. Tang, Y. Pang, Z. Li, C. Liu, X. Lei, M. Wu, P. Ren, Z. Liu, M. Chen, G. Xie, Immobilization of laccase on magnetic bimodal mesoporous carbon and the application in the removal of phenolic compounds, *Bioresource Technology* (2011).
- [27] Bertrand G., Sur la laccase et sur le pouvoir oxydant de cette diastase. *CR Acad. Sci. Paris* 120: 266-269, 1 895.
- [28] Tuncer M., Lakkaz, Kısım 1: Yapısı, Katalitik özellikleri ve Dağılımları, *Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 22 (2010) 19-63.
- [29] Bryjak J., Kruczkiewicz P., Rekuć A., Peczyńska-Czoch W., Laccase immobilization on copolymer of butyl acrylate and ethylene glycol dimethacrylate, *Biochemical Engineering Journal* 35 (2007) 325–332.
- [30] Givaudan A., Effosse A., Faure D., Potier P., Bouillant M.L., Bally R., “Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere: evidence for laccase activity in nonmotile strains of *Azospirillum lipoferum*”, *FEMS Microbiol. Lett.*, 108 (1993) 205–210.
- [31] Araújo J.H.B., Uemura V.O., Moraes F.F., Barbosa A.M., Zanin G.M., A Comparative Study on Fungal Laccases Immobilized on Chitosan, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48 (2005) 1-6.
- [32] D’Annibale A., Stazi S. R, Vinciguerra V., Mattia E.D., Sermanni G. G., Characterization of immobilized laccase from *Lentinula edodes* and its use in olive-mill wastewater treatment, *Process Biochemistry* 34 (1999) 697–706.

- [33] Bautista L. F., Morales G., Sanz R., Immobilization strategies for laccase from *Trametes versicolor* on mesostructured silica materials and the application to the degradation of naphthalene, *Bioresource Technology* 101 (2010) 8541–8548.
- [34] Dhillon G.S., Kaur S., Brar S. K., In-vitro decolorization of recalcitrant dyes through an ecofriendly approach using laccase from *Trametes versicolor* grown on brewer's spent grain, *International Biodeterioration & Biodegradation* 72 (2012) 67-75.
- [35] Enguita F.J., Martins L.O., Henrique A.O., M.A. Carrondo, "Crystal structure of a bacterial endospore coat component: a laccase with enhanced thermostability properties", *J. Biol. Chem.*, 278 (21) (2003) 19416–19425.
- [36] Alexandre G., Zhulin I.B. "Laccases are widespread in bacteria", *Trends Biotechnol.*, 18 (2000) 41–42.
- [37] Ducros V., Brzozowski A.M., Wilson K.S., Østergaard P., Schneider D.S., Svendsen A., Davies G.J., "Structure of the laccase from *Coprinus cinereus* at 1.68 Å resolution: evidence for different type 2 Cu-depleted isoforms", *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 57 (2001) 333–336.
- [38] Bertrand T., Jolival C., Briozzo P., Caminade E., Joly N., Madzak C., Mougin C., "Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: insights into substrate recognition and correlation with kinetics", *Biochemistry*, 41 (2002) 7325–7333.
- [39] Hakulinen N., Kiiskinen L., Kruus K., Saloheimo M., Paananen A., Koivula A., Rouvinen J., "Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear site", *Nat. Struct. Biol.*, 9 (2002) 601–605.
- [40] Ferraroni M., Duchi I., Myasoedova N.M., Leontievsky A.A., Golovleva L.A., Scozzafava A., Briganti F., "Crystallization and preliminary structure analysis of the blue laccase from the ligninolytic fungus *Parus tigrinus*", *Acta Cryst.*, F 61 (2005) 205-207.
- [41] Ferraroni M., Myasoedova N.M., Schmatchenko V., Leontievsky A.A., Golovleva L.A., Scozzafava A., Briganti F. "Crystal structure of a blue laccase from *Lentinus tigrinus*: evidences for intermediates in the molecular oxygen reductive splitting by multicopper oxidases", *BMC Structural Biology*, 7(60) (2007) 1472-6807.

- [42] Lyashenko A.V., Zhukhlistova N.E., Gabdoulkhakov A.G., Zhukova Y.N., Voelter W., Zaitsev V.N., Bento I., Stepanova E.V., Kachalova G.S., Koroleva O.V., Cherkashyn E.A., Tishkov V.I., Lamzin V.S., Schirwitz K., Morgunova E.Y., Betzel C., Lindleyd P.F. Mikhailova A.M., "Purification, crystallization and preliminary X-ray study of the fungal laccase from *Cerrena maxima*", *Acta Cryst.*, F 62 (2006) 954–957.
- [43] Imran M., Asad M. J., Hadri S.H. and Mehmood S., Production and industrial applications of laccase enzyme, *Journal of Cell and Molecular Biology* 10(1) (2012) 1-11.
- [44] Couto S. R., Herrera J.L.T., Industrial and biotechnological applications of laccases: A review, *Biotechnology Advances* 24 (2006) 500–513.
- [45] Couto S. R., Herrera J.L.T., Lacasses in the textile industry, *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 1 (4) (2006) 115-120.
- [46] Fernández-Fernández M., Sanromán M.Á., Moldes D., Recent developments and applications of immobilized laccase, *Biotechnology Advances* (2012) 18.
- [47] Murugesan K., Nam I., Kim Y., Chang Y., Decolorization of reactive dyes by a thermostable laccase produced by *Ganoderma lucidum* in solid state culture, *School of Environmental Science and Engineering*, 2006.
- [48] Muthuraman G., Teng T. T., Extraction of Metil kırmızısı from industrial wastewater using xylene as an extractan, *Progress in Natural Science* 19 (2009) 1215–1220.
- [49] Ayed L., Mahdhi A., Cheref A., Bakhrouf A., Decolorization and degradation of azo dye Metil kırmızısı by an isolated *Sphingomonas paucimobilis*: Biototoxicity and metabolites characterization, *Desalination* 274 (2011) 272–277.
- [50] MERCİMEK H. A., *Trametes Versicolor*'ın Tekstil Boyalarının Gideriminde Kullanım Olanakları, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 2007.
- [51] Forgacs E., Cserhá'tia T., Oros G., Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review, *Environment International* 30 (2004) 953– 971.
- [52] Atav R., Delituna A., Poliester Liflerinin Dispers Boyarmaddelerle Boyanması Sırasında Kullanılan Yardımcı Maddeler, *Electronic Journal of Textile Technologies* 4,1, (2010) 73-83.

- [53] Dokuzoğlu Z., Alkan U., Yentürk A., Reaktif Boyar Madde İçeren Tekstil Atıksularının İleri Oksidasyonu, Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi, 13, 2, 2008.
- [54] Pearce C.I., Lloyd J.R., Guthrie J.T., The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review, Dyes and Pigments 58 (2003) 179–196.
- [55] Cheng X.H., Guo W., The oxidation kinetics of reduction intermediate product of Metil kırmızısı with hydrogen peroxide, Dyes and Pigments 72 (2007) 372-377.
- [56] Uddin M. T., Islam M. A., Mahmud S., Rukanuzzaman M., Adsorptive removal of Metilen mavisi by tea waste, Journal of Hazardous Materials 164 (2009) 53–60.
- [57] Saeed A., Iqbal M., Zafar S.I., Immobilization of *Trichoderma viride* for enhanced Metilen mavisi biosorption: Batch and column studies, Journal of Hazardous Materials 168 (2009) 406–415.
- [58] El-Sayed G.O., Removal of Metilen mavisi and Kristal viyole from aqueous solutions by palm kernel fiber, Desalination 272 (2011) 225–232.
- [59] Kumar R., Ahmad R., Biosorption of hazardous Kristal viyole dye from aqueous solution onto treated ginger waste (TGW), Desalination 265 (2011) 112–118.
- [60] Jadhav J.P., Parshetti G.K., Kalme S.D., Govindwar S.P., Decolourization of azo dye Metil kırmızısı by *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 463, Chemosphere 68 (2007) 394–400.
- [61] Wang Q., Zhang B., Lin X., Weng W., Hybridization biosensor based on the covalent immobilization of probe DNA on chitosan–mutiwall carbon nanotubes nanocomposite by using glutaraldehyde as an arm linker, Sensors and Actuators B 156 (2011) 599– 605.
- [62] Kim B., Sigmund W. M., Functionalized Multiwall Carbon Nanotube/Gold Nanoparticle Composites, Langmuir 20 (2004) 8239-8242.
- [63] Chen H., Zhang Z., Luo L., Yao S., Surface-imprinted chitosan-coated magnetic nanoparticles modified multi-walled carbon nanotubes biosensor for detection of bovine serum albumin, Sensors and Actuators B 163 (2012) 76– 83.

- [64] Li C., Yang K., Zhang Y., Tang H., Yan F., Tan L., Xie Q., Yao S., Highly biocompatible multi-walled carbon nanotube–chitosan nanoparticle hybrids as protein carriers, *Acta Biomaterialia* 7 (2011) 3070–3077.
- [65] Sureshkumar M., Lee C., Polydopamine coated magnetic-chitin (MCT) particles as a new matrix for enzyme immobilization, *Carbohydrate Polymers* 84 (2011) 775–780.
- [66] Yang W., Min D., Wen S., Jin L., Rong L., Tetsuo M., Bo C., Immobilization and characterization of laccase from Chinese *Rhus vernicifera* on modified chitosan, *Process Biochemistry* 41 (2006) 1378–1382.
- [67] Katuri K. P., Mohan S. V., Sridhar S., Pati B.R., Sarma P.N., Laccase membrane reactors for decolorization of an acid azo dye in aqueous phase: Process optimization, *water research* 43 (2009) 3647–3658.
- [68] Jiang D., Long S., Huang J., Xiao H., Zhou J., Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase on magnetic chitosan microspheres, *Biochemical Engineering Journal* 25 (2005) 15–23.
- [69] Zhang J., Xu Z., Chen H., Zong Y., Removal of 2,4-dichlorophenol by chitosan-immobilized laccase from *Coriolus versicolor*, *Biochemical Engineering Journal* 45 (2009) 54–59.
- [70] Niku-Paavola, M.-L., Raaska, L., Itavaara, M., Detection of white-rot fungi by a non toxic stain. *Mycol. Res.* 94 (1990) 27–31.
- [71] Rasera K., Ferla J., Dillon A.J.P., Riveiros R., Zeni M, Immobilization of laccase from *Pleurotus sajor-caju* n polyamide membranes, *Desalination* 245 (2009) 657–66.
- [72] Silva C., Silva C. J., Zille A., Guebitz, G. M. Paulo A. C. Laccase immobilization on enzymatically functionalized polyamide 6,6 fibres, *Enzyme and Microbial Technology* 41 (2007) 867–875.
- [73] Wolfenden BS, 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 2* (1982) 805–12.
- [74] Cristovao R. O., Tavares A. P.M., Brigida A. I, Loureiro J. M., Boaventuraa 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, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 72 (2011) 6– 12.

[75] Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.

[76] Michniewicz A., Ledakowicz S., Ullrich R., Hofrichter M., Kinetics of the enzymatic decolorization of textile dyes by laccase from *Cerrena unicolor*, *Dyes and Pigments* 77 (2008) 295-302.

[77] Mane V. S., Mall I. D., Srivastava V. C., Kinetic and equilibrium isotherm studies for the adsorptive removal of Brilliant Green dye from aqueous solution by rice husk ash, *Journal of Environmental Management* 84 (2007) 390–400.

[78] Chen G., Huang M., Chen L., Chen D., A batch decolorization and kinetic study of Reactive Black 5 by a bacterial strain *Enterobacter* sp. GY-1, *International Biodeterioration & Biodegradation* 65 (2011) 790-796.

[79] Pavlidi 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, *Bioresource Technology* 115 (2012) 164–171.

[80] Lu L., Zhao M., Wang Y., Immobilization of laccase by alginate–chitosan microcapsules and its use in dye decolorization, *World J Microbiol Biotechnol* 23 (2007) 159–166.

[81] Çorman M. E., Ozturka N., Bereli N., Akgol S., Denizli A., Preparation of nanoparticles which contains histidine for immobilization of *Trametes versicolor* laccase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 63 (2010) 102–107.

[82] 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, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 74 (2012) 63– 72.

- [83] Yan K., Wang H., Zhang X., Biodegradation of Kristal viyole by low molecular mass fraction secreted by fungus, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 5, 108 (2009) 421–424.
- [84] Nyanhongo G.S., Gomes J., Ubitz G.M. G., Zvauya R., Read J., Steiner W., Decolorization of textile dyes by laccases from a newly isolated strain of *Trametes modesta*, *Water Research* 36 (2002) 1449–1456.
- [85] Saeed A., Iqba M., Zafar S.I., Immobilization of *Trichoderma viride* for enhanced Metilen mavis biosorption: Batch and column studies, *Journal of Hazardous Materials* 168 (2009) 406–415.
- [86] Dai Y., Niu J., Liu J., Yin L., Xu J., In situ encapsulation of laccase in microfibers by emulsion electrospinning: Preparation, characterization, and application, *Bioresource Technology* 101 (2010) 8942–8947.
- [87] Chen C.H., Chang C.-F., Ho C.-H., Tsai T.-L., Liu S.-M, Biodegradation of Kristal viyole by a *Shewanella* sp. NT0U1, *Chemosphere* 72 (2008) 1712–1720.
- [88] Ferreira-Leitao V.S., Andrade de Carvalho M. E. , Bon E. P.S., Lignin peroxidase efficiency for Metilen mavis decolouration: Comparison to reported methods, *Dyes and Pigments* 74 (2007) 230-236.
- [89] Alam M. Z., Mansor M. F, Jalal K.C.A., Optimization of decolorization of Metilen mavis by lignin peroxidase enzyme produced from sewage sludge with *Phanerocheate chrysosporium*, *Journal of Hazardous Materials* 162 (2009) 708–715.
- [90] Sadighi A., Famarzi M.A., Congo red decolorization by immobilized laccase through chitosan nanoparticles on the glass beads, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 44 (2013) 156–162.