



**LAKKAZ ENZİMİNİN TEKSTİL BOYAR MADDELERİNİN
GİDERİMİNDE KULLANILMASI**

Saadet Rüya HÜRMÜZLÜ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2020

Saadet Rüya HÜRMÜZLÜ tarafından hazırlanan “LAKKAZ ENZİMİNİN TEKSTİL BOYAR MADDELERİNİN GİDERİMİNDE KULLANILMASI” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Nurdan SARAÇOĞLU

Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

İkinci Danışman: Öğr. Gör. Dr. Müjgan OKUR

Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Başkan: Prof. Dr. Zümriye AKSU

Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Üye: Doç. Dr. S. Ferda MUTLU

Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Üye: Prof. Dr. Emine BAYRAKTAR

Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Tez Savunma Tarihi: 21/07/2020

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Prof. Dr. Sena YAŞYERLİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Saadet Rüya HÜRMÜZLÜ

21/07/2020

LAKKAZ ENZİMİNİN TEKSTİL BOYAR MADDELERİNİN GİDERİMİNDE KULLANILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Saadet Rüya HÜRMÜZLÜ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temmuz 2020

ÖZET

Tez çalışmasında, kitosan/halloysit kürelerine lakkaz enzimi immobilize edilerek sulu ortamdan remazol red (RR) tekstil boyar maddesinin giderimi gerçekleştirilmiştir. İmmobilize enzim içeren kürenin sentezi aşamasında; en yüksek yükleme ve immobilizasyon verimi elde edilen kitosan, halloysit, çapraz bağlayıcı (glutaraldehit) ve enzim derişimleri belirlenmiştir. Ağırlıkça %2,5 kitosan, %2 halloysit, %1 glutaraldehit ve 1 mg/mL derişiminde enzim çözeltisi ile hazırlanmış immobilize enzim küreleri kullanılmıştır. ABTS substratı ile en yüksek aktivite baz alınarak serbest ve immobilize enzim için en uygun çalışma koşulları belirlenmiştir. Serbest enzim için en uygun pH 6, en uygun sıcaklık 45°C; immobilize enzim için en uygun pH 5, en uygun sıcaklık ise 35°C olarak belirlenmiştir. Substrat olarak ABTS kullanıldığında, pH 5 ve 25°C de kinetik parametreler, K_m ve V_m , serbest enzim için sırasıyla 302,45 μM ve 909,09 $\mu M/dak.$, immobilize enzim için ise 353,33 μM ve 129,87 $\mu M/dak.$ bulunmuştur. Depolama stabilitesi çalışmasında; 59 günün sonunda immobilize enzim aktivitesinin %56'sını korurken, serbest enzimin ise aktivitesinin %23'ünü koruduğu gözlenmiştir. Serbest enzim ve immobilize enzim ile 20-100 ppm aralığında hazırlanan remazol red (RR) çözeltilerinde boya giderimi çalışılmıştır. Serbest enzim ile boya giderimi gerçekleşmezken, immobilize lakkaz içeren küreler ile % giderim %93,33 ile %86,89 arasındadır. İmmobilize lakkaz enziminin boyar madde giderim kinetik parametreleri, pH 5 ve 30°C'de, K_m değeri yaklaşık 558 μM , V_m ise 1,59 $\mu M/dak.$ bulunmuştur. Remazol red (RR) giderim çalışmalarında ise, boyar madde giderim verimine medyatörlerin etkisi incelenmiştir. Serbest enzimle ABTS, HBT, TEMPO ve VLA varlığında sırasıyla %77,17; %96,05; %31,89; %96,32 giderim elde edilmiştir. İmmobilize enzimle ise sırasıyla %80,81; %96,31; %83,87 ve %97,43 giderim yapılarak daha yüksek boyar madde giderim verimleri elde edilmiştir. İmmobilize enzim küreleri, HBT ve VLA varlığında, boyar madde giderimi için 15 kez tekrar kullanılmıştır. İmmobilize enzim kürelerinin 15. kullanımı sonunda; HBT varlığında %42, VLA varlığında %54 boyar madde giderimi elde edilmiştir. 15 kez kullanımın aktiviteye etkisi incelendiğinde ise immobilize enzimin HBT varlığında aktivitesinin %42'sini, VLA varlığında aktivitesinin %49'unu koruduğu gözlenmiştir.

Bilim Kodu : 91203
Anahtar Kelimeler : Lakkaz, boyar madde, parçalanma, immobilizasyon
Sayfa Adedi : 83
Danışman : Prof. Dr. Nurdan SARAÇOĞLU
İkinci Danışman : Öğr. Gör. Dr. Müjgan OKUR

THE USE OF LACCASE ENZYME IN THE REMOVAL OF TEXTILE DYES

(M. Sc. Thesis)

Saadet Rüya HÜRMÜZLÜ

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

July 2020

ABSTRACT

In this study, laccase enzyme was immobilized on chitosan/halloysite spheres and used to degrade remazol red (RR) textile dye from aqueous medium. In the sphere synthesis stage; chitosan, halloysite, crosslinker (glutaraldehyde) and enzyme concentrations were determined according to the highest loading and immobilization efficiency. On the basis of these studies, immobilized enzyme spheres which were containing chitosan, halloysite and glutaraldehyde percentages in mass as 2.5%, 2% and 1%, respectively and were prepared with 1 mg/mL enzyme solution were used for dye removal. Optimum working conditions for free and immobilized enzyme were determined based on the highest activity with ABTS substrate. Optimum pH for free laccase was found to be 6, optimum temperature for free laccase was found to be 45°C and the optimum pH for immobilized laccase was found to be 5, optimum temperature for immobilized laccase was found to be 35°C. When ABTS was used as substrate at pH 5 and 25°C, the kinetic parameters, K_m and V_m , were determined as 302.45 μM and 909.09 $\mu M/min$ for free enzyme and 353.33 μM and 129.87 $\mu M/min$ for immobilized enzyme, respectively. In storage stability study; at the end of 59 days, it was observed that 56% of immobilized enzyme activity and 23% of free enzyme activity were retained. With free enzyme and immobilized enzyme, dye removal was studied in dye solutions prepared in 20-100 ppm range. While no dye removal occurred with free enzyme, % Removal with laccase immobilized spheres achieved between %93.33 and %86.89. The immobilized enzyme dye removal kinetic parameters K_m and V_m , were determined as 558 μM and 1.59 $\mu M/min$, respectively. The effect of mediators on remazol red (RR) degradation studies were investigated. For free enzyme, in the presence of ABTS, HBT, TEMPO and VLA; 77.17%, 96.05%, 31.89% and 96.32% removal was obtained. When the same study was performed with immobilized enzyme; 80.81%, 96.31%, 83.87% and 97.43% removal was achieved and higher yields were obtained. Immobilized enzyme spheres were reused 15 times in the presence of HBT and VLA for dye removal. When used for the 15th time, the spheres obtained 42% and 54% dye removal in the presence of HBT and VLA. The effect of reusing of immobilized enzyme 15 times on activity was examined and it was observed that the immobilized enzyme retained 42% of its activity in the presence of HBT and 49% of its activity in the presence of VLA.

ScienceCode : 91203
Key Words : Laccase, dye, degradation, immobilization
Page Number : 83
Supervisor : Prof. Dr. Nurdan SARAÇOĞLU
Co-Supervisor : Instructor Dr. Müjgan OKUR

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmam boyunca bana yol gösteren, yardım ve katkılarını esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Nurdan SARAÇOĞLU'na ve Öğr. Gör. Dr. Müjgan OKUR'a, deneysel çalışmaların gerçekleştirilmesi için laboratuvarının imkanlarından faydalanmamı sağlayan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Habibe Canan CABBAR'a, eğitimim boyunca bana destek olan aileme ve arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi'ne (06/2018-18 kodlu proje) teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. ATIK SU ARITIMI	3
2.1. Fiziksel Yöntemler	3
2.1.1. Adsorpsiyon	3
2.1.2. İyon değişimi.....	4
2.1.3. Ters osmoz	5
2.2. Kimyasal Yöntemler	6
2.2.1. Oksidasyon.....	6
2.2.2. Çöktürme.....	9
2.2.3. Cucurbituril ile arıtım.....	9
2.3. Biyolojik Yöntemler.....	10
2.4. Enzimler	11
2.4.1. Enzim kinetiği	12
2.4.2. Lakkaz enzimi	13
2.5. Enzim İmmobilizasyonu	16
2.5.1. Adsorpsiyon	18

	Sayfa
2.5.2. Çapraz bağlama.....	19
2.5.3. Tutuklama	19
2.5.4. Kapsülleme.....	19
2.5.5. Kovalent bağlama	20
2.6. İmmobilizasyonda Kullanılan Destek Malzemeleri.....	21
2.6.1. Kitosan	22
2.6.2. Halloysit.....	24
2.7. Lakkaz Medyatörleri	25
2.8. Boyar Madde Giderimi	27
2.8.1. Remazol red RR boyar maddesi.....	27
3. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	31
4. DENEYSEL ÇALIŞMA.....	37
4.1. CTS/HNT Kürelerinin Hazırlanması	37
4.2. Enzim İmmobilizasyonu	38
4.3. Karakterizasyon Çalışmaları	38
4.4. Enzim Aktivitesi.....	39
4.4.1. Serbest enzim aktivitesi	39
4.4.2. İmmobilize enzim aktivitesi.....	40
4.5. Protein Tayini.....	41
4.6. Yükleme ve İmmobilizasyon Verimi	43
4.7. Enzim Kinetiği	43
4.8. Serbest ve İmmobilize Enzim Aktivitesine pH ve Sıcaklık Etkisi.....	44
4.9. Serbest ve İmmobilize Enzim Aktivitesine Depolama Stabilitésinin Etkisi	44
4.10. Boyar Madde Giderim Çalışmaları	45
4.10.1. Boyar madde giderim kinetiği	46
4.10.2. Boyar madde giderimine medyatörlerin etkisi	47

	Sayfa
4.10.3. İmmobilize enzimin boyar madde gideriminde yeniden kullanımı	47
5. BULGULAR VE TARTIŞMA	49
5.1. Enzim İmmobilizasyonu	49
5.1.1. CTS/HNT oranının immobilizasyon verimine etkisi	49
5.1.2. Glutaraldehit derişiminin immobilizasyon verimine etkisi.....	51
5.1.3. İmmobilize enzim hazırlama çözeltilisindeki enzim derişiminin immobilizasyon verimine etkisi.....	52
5.2. Karakterizasyon Çalışmaları	53
5.2.1. SEM analizi.....	53
5.2.2. FT-IR analizi	55
5.2.3. XRD analizi.....	57
5.3. Kinetik Parametreler	58
5.4. Lakkaz Aktivitesine pH Etkisi	59
5.5. Lakkaz Aktivitesine Sıcaklık Etkisi	60
5.6. Lakkaz Aktivitesine Depolama Stabilesi Etkisi.....	61
5.7. Boyar Madde Giderim Çalışmaları	62
5.7.1. Boyar madde giderim kinetiği parametreleri	64
5.7.2. Boyar madde giderimine medyatörlerin etkisi.....	65
5.7.3. Boyar madde gideriminde immobilize enzimin yeniden kullanımı.....	69
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	73
KAYNAKLAR	77
ÖZGEÇMİŞ	83

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Boyar madde gideriminde uygulanan fiziksel ve kimyasal yöntemlerin karşılaştırılması.....	10
Çizelge 2.2. Enzimlerin sınıflandırılması, ana sınıflar [28].....	11
Çizelge 2.3. İmmobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması	21
Çizelge 2.4. Kitosanın kullanım alanları [43].....	23
Çizelge 4.1. Küre sentezinde kullanılan kitosan ve halloysit oranları.....	37
Çizelge 4.2. Bradford protein tayini için hazırlanan örnekler	41
Çizelge 4.3. Tampon çözeltilerin hazırlanması.....	44
Çizelge 4.4. Boyar madde derişimi tayini için hazırlanan örnekler.....	45
Çizelge 5.1. Serbest ve immobilize enzimin kinetik parametreleri (pH 5, 25°C).....	58
Çizelge 5.2. İmmobilize lakkaz enziminin boyar madde giderim kinetik parametreleri (pH 5, 30°C).....	64

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Adsorpsiyon yöntemi ile atık su arıtımı.....	4
Şekil 2.2. İyon değiştirme sistemi.....	5
Şekil 2.3. Membran filtrasyon sistemi	6
Şekil 2.4. Oksidasyon yöntemi ile atık suların arıtımı.....	7
Şekil 2.5. Çöktürme sistemi	9
Şekil 2.6. Lineweaver-Burk grafiği	13
Şekil 2.7. Lakkaz enziminin Ribbon diyagramı [33].....	14
Şekil 2.8. Lakkazın yapısındaki bakır atomları [34].....	15
Şekil 2.9. Lakkazın katalitik döngüsü [35]	15
Şekil 2.10. İmmobilizasyon yöntemleri (E: Enzim)	18
Şekil 2.11. İmmobilizasyonda kullanılan destek malzemelerinin sınıflandırılması [37]	22
Şekil 2.12. Kitin ve kitosanın kimyasal yapısı [42]	23
Şekil 2.13. Halloysit nano tüpünün şematik gösterimi [10].....	24
Şekil 2.14. CTS/HNT kompoziti	25
Şekil 2.15. Lakkaz-medyatör sisteminin katalitik döngüsü [11]	26
Şekil 2.16. Lakkaz medyatörleri [11]	26
Şekil 2.17. Remazol red RR boyar maddesinin yapısı [53].....	28
Şekil 2.18. Fenolik azo boyasının lakkaz ile oksidasyonu [55].....	29
Şekil 4.1. Bradford protein tayini kalibrasyon grafiği	42
Şekil 4.2. Remazol red (RR) boyar maddesinin görünür spektrumu	45
Şekil 4.3. Remazol red (RR) kalibrasyon grafiği.....	46
Şekil 5.1. Kitosan miktarının yükleme ve immobilizasyon verimine etkisi	50
Şekil 5.2. Halloysit miktarının yükleme ve immobilizasyon verimine etkisi.....	51
Şekil 5.3. Glutaraldehit derişiminin yükleme ve immobilizasyon verimine etkisi.....	52
Şekil 5.4. Enzim derişiminin yükleme ve immobilizasyon verimine etkisi	53

Şekil	Sayfa
Şekil 5.5. Lakkaz içermeyen CTS/HNT kürelerinin (a,b) ve lakkaz immobilize edilmiş CTS/HNT kürelerinin (c,d) SEM görüntüsü	55
Şekil 5.6. Saf CTS, saf HNT, CTS/HNT ve CTS/HNT/lakkaz'a ait FT-IR spektrumu .	56
Şekil 5.7. Saf CTS, saf HNT, CTS/HNT ve CTS/HNT/lakkaz'a ait XRD desenleri	58
Şekil 5.8. Serbest ve immobilize enzimin Lineweaver-Burk grafiği	59
Şekil 5.9. Serbest ve immobilize enzim için en uygun pH	60
Şekil 5.10. Serbest ve immobilize enzim için en uygun sıcaklık	61
Şekil 5.11. Serbest ve immobilize enzimin depolama stabilitesi	62
Şekil 5.12. Enzim immobilize edilmemiş CTS/HNT küreleri ile gerçekleşen boyar madde giderimleri	63
Şekil 5.13. İmmobilize enzim ile boyar madde derişiminin zamanla değışimi	63
Şekil 5.14. İmmobilize enzim ile boyar madde giderim verimleri	64
Şekil 5.15. İmmobilize enzimin boyar madde giderim kinetiği için Lineweaver-Burk grafiği	65
Şekil 5.16. Boyar madde derişiminin medyatör varlığında zamana bağılı değışimi (serbest enzim)	66
Şekil 5.17. Serbest enzimle boyar madde giderimine medyatörlerin etkisi	66
Şekil 5.18. Boyar madde derişiminin medyatör varlığında zamana bağılı değışimi (immobilize enzim)	67
Şekil 5.19. İmmobilize enzimle boyar madde giderimine medyatörlerin etkisi	68
Şekil 5.20. İmmobilize enzimin yeniden kullanımının boyar madde giderimine etkisi .	70
Şekil 5.21. İmmobilize enzimin yeniden kullanımının aktiviteye etkisi	71

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 5.1. %1 CTS içeren küreler (a), enzim eklendikten sonra kürelerin bozulması (b)	49
Resim 5.2. Sırasıyla %2, %2,5 ve %3 CTS içeren küreler	50

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

k_m

Michaelis-Menten hız sabiti

v_m

Maksimum hız

u

Ünite

Kısaltmalar

Açıklamalar

ABTS

2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)

BSA

Sığır serum albümini

CTS

Kitosan

FT-IR

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi

GLU

Glutaraldehit

HBT

1-Hidroksibenzotriazol

HNT

Halloysit nanotüp

SEM

Taramalı Elektron Mikroskobu

TEMPO

(2,2,6,6-Tetrametilpiperidin-1-il)oksil

VLA

Violurik asit

XRD

X-Işını Difraktometresi

1. GİRİŞ

Tekstil endüstrileri yoğun miktarda renkli ve tehlikeli atıklar oluşturarak önemli çevresel sorunlara neden olmaktadır. Alıcı su ortamlarına verilen boyar madde içeren tekstil atık suları; suyun ışık geçirgenliğini, duruluğunu olumsuz etkilemekte ve sucul ekosistemlere zarar vermektedir. İnsan sağlığı için de tehlikeli olan boyar maddeler suda çok küçük miktarlarda (1 ppm) bulunsada dahi suyun zehirli bileşiklerle kirlenmesine neden olabilmektedir. Bu nedenle tekstil atık sularının arıtımı oldukça önem kazanmaktadır.

Son yıllarda yapılan birçok çalışmada atık sulardan boyar madde giderimi çeşitli yöntemlerle gerçekleştirilmektedir. Boyar madde gideriminde fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler bulunmaktadır. Ancak bu yöntemler arasından biyolojik yöntemler, diğer yöntemlere kıyasla daha düşük maliyetli olması ve boyayı zararsız yan ürünlere dönüştürmesi nedeniyle ideal bir çözüm olmuştur. Mikroorganizmaların ve enzimlerin kullanıldığı bu yöntem son zamanlarda ilgi çekici olmuştur [1]. Bu yöntemde, çeşitli mikroorganizmalardan elde edilen enzimler ile boyar maddelerin giderim prosesi fiziksel ve kimyasal yöntemlere göre daha kolay uygulanabilmekte ve daha verimli bir şekilde gerçekleşmektedir.

Gıda endüstrisi, kağıt hamuru ve kağıt endüstrisi, tekstil endüstrisi ve kozmetik gibi çeşitli alanlarda kullanılan lakkaz enzimi (EC 1.10.3.2) ile son zamanlarda yapılan birçok çalışma, bu enzimin boyar madde gideriminde de umut verici olduğunu ortaya koymuştur [2]. Yapısında çoklu bakır içeren lakkaz, mantarlardan ve bitkilerden elde edilmektedir.

Boyar madde gideriminde serbest olarak kullanılan lakkaz enzimini; daha yüksek boyar madde giderim verimi elde etmek, suda çözünmeyen hale getirmek, dayanıklılık kazandırmak ve ortamdan kolay ayrılabilmesini sağlamak amacıyla immobilize etmek gerekmektedir. Aynı zamanda immobilizasyon, enzimin, yeniden kullanılmasına ve aktivitesini daha uzun süre korumasına da olanak sağlamaktadır. Enzimi, katı bir desteğe immobilize ederek yapılan boyar madde giderim çalışmalarında oldukça yüksek verimler elde edilmektedir. Sağladığı birçok üstünlük nedeniyle çeşitli immobilizasyon teknikleri geliştirilmiştir [3-7].

İmmobilizasyon ile enzim katı destek materyaline çeşitli yöntemlerle tutunarak suda çözünmeyen hale gelmektedir. Bu yöntemler; adsorpsiyon, kovalent bağlama, kapsülleme, tutuklama ve çapraz bağlama şeklindedir. Uygun yöntemin belirlenmesinin yanında seçilen destek materyali de önem taşımaktadır. Enzim immobilizasyonunda kullanılan destek malzemeleri; suda çözünmeyen, ısıl, mekanik ve kimyasal olarak stabil ve mikrobiyolojik saldırılara karşı dirençli olmalıdır. Destek malzemesinin proteinlere karşı yüksek afiniteye sahip olması ve enzimlere daha kolay bağlanabilmesi için fonksiyonel gruplara sahip olması gerekmektedir. Ayrıca hidrofiliklik, mekanik stabilite ve sertlik, hazırlama kolaylığı, uygun yüzey alanı ve geçirgenlik gibi özellikleri de bulunmalıdır. Doğal bir polimer olan ve dünyada selülozdan sonra en çok kullanılan kitinin türevi olan kitosan maddesi, bu özelliklerin çoğunu sunmaları bakımından ilgi çekici olmuştur [4]. Halloysit nanotüpleri ise destek malzemesine dayanıklılık kazandıran, kitosanın özelliklerini geliştirmek amacıyla immobilizasyonda kullanılması mümkün olan kil yapısında bir malzemedir [8-9] .

Boyar madde giderim verimini artırmak amacıyla “medyatör” adı verilen çeşitli kimyasallar kullanılmaktadır [11,12]. Böylelikle enzimin, substratı olmayan molekülleri de parçayabilmesi mümkün olmaktadır.

Bu çalışmada; serbest lakkaz enziminin boyar madde giderim verimini artırmak ve yeniden kullanımını sağlamak amacıyla immobilizasyon yapılarak medyatör ortamında boyar madde giderimi gerçekleştirilmiştir. Serbest enzim ve immobilize enzim için en uygun çalışma koşulları (pH, sıcaklık) ve kinetik parametreler (K_m ve V_m) belirlenmiştir. Daha sonra paralel olarak hem serbest enzim hem de immobilize enzim ile remazol red (RR) boyasının giderimi gerçekleştirilmiştir.

2. ATIK SU ARITIMI

Tekstil fabrikaları günlük olarak milyonlarca litre arıtılmamış, boyar madde içeren atık suları alıcı su ortamlarına boşaltmaktadır. Tekstil atık sularının arıtım yapılmadan çevreye bırakılması, içeriğindeki boyaların zehirliliğinin etkisinde kalan organizmalar üzerinde akut veya kronik etkilere yol açmaktadır. Özellikle azo boya içeren atık sular doğada oldukça inatçıdır. Suların renklenmesine yol açarak ışığın geçirgenliğini azaltması nedeniyle suda yaşayan fitoplanktonların fotosentez yapmasına engel olmakta ve suyun pH'ını değiştirmektedir. Ayrıca bu durum, biyokimyasal ve kimyasal oksijen ihtiyacının artmasını da beraberinde getirmektedir. Giderim işlemi gerçekleştirilmez ise, boyar maddeler uzun süre doğada kalarak çevre ve canlı yaşamı için tehlike oluşturmayı sürdürecektir [13].

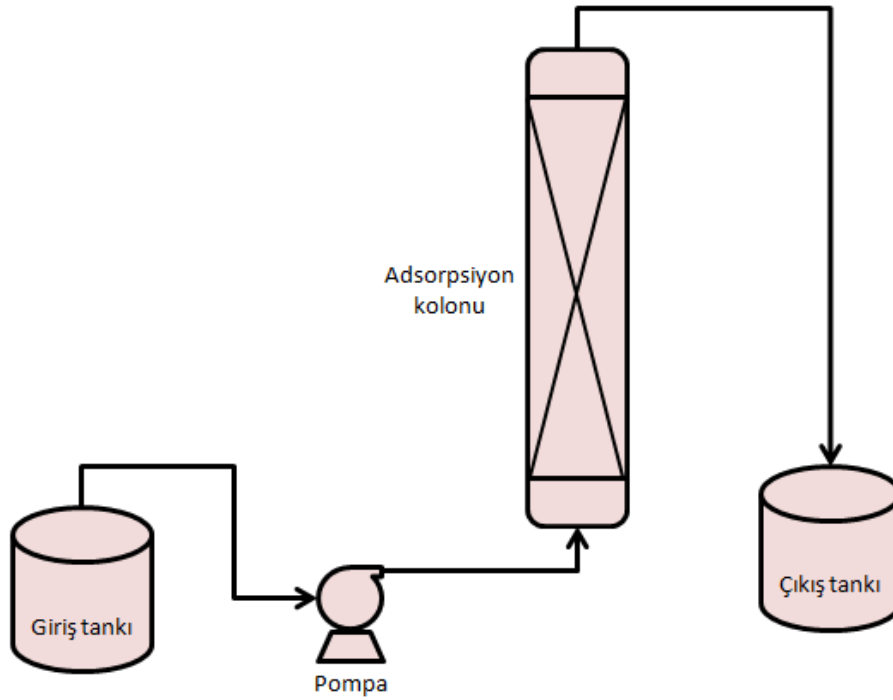
Günümüzde uygulanmakta olan çeşitli atık su arıtım yöntemleri bulunmaktadır. Bunlar; fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemlerdir [14,15].

2.1. Fiziksel Yöntemler

Fiziksel yöntemler; adsorpsiyon, iyon değişimi ve membran filtrasyonu yöntemlerini içerir.

2.1.1. Adsorpsiyon

Suda çözülmüş boyar maddelerin katı bir malzeme yüzeyinde toplanmasına dayanan bir yöntemdir. Kararlı bileşikler verimli bir şekilde giderebilmesi nedeniyle ilgi çekici olan adsorpsiyon yöntemi ile gerçekleştirilen boyar madde gideriminde en çok kullanılan adsorban aktif karbondur [16]. Katyonik, asit ve mordan boyar maddelerde etkili olan aktif karbon, reaktif ve diğer boyar maddelerde daha az giderim yapmaktadır. Aktif karbonun giderimde yeniden kullanımı; verimini düşüreceğinden dolayı fazla malzemeye (aktif karbona) gerek duyulmaktadır. Malzemenin pahalı olması da yöntemin sakıncalarındandır. Daha ekonomik bir adsorban olan turba, silika jel, odun talaşı ve killer de bu yöntemde yeğlenmektedirler. Ancak aktif karbon kadar verimli olmadıkları görülmüştür [17,18].

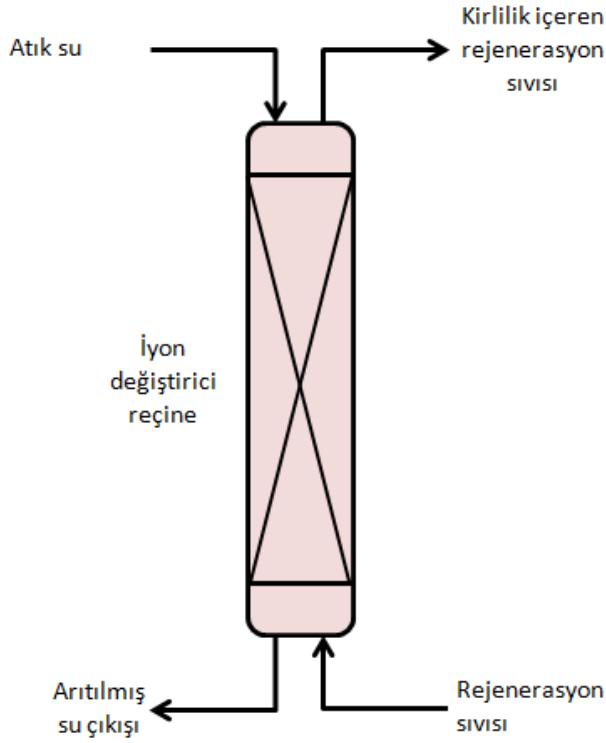


Şekil 2.1. Adsorpsiyon yöntemi ile atık su arıtımı

Şekil 2.1’de adsorpsiyon yöntemi ile atık su arıtım prosesi gösterilmektedir. Adsorpsiyon kolonuna giriş tankından pompalanan atık su, kolondaki adsorban malzemeler yardımıyla arıtılmakta ve bir sonraki proseslerde kullanılmak amacıyla arıtılan su çıkış tankına verilmektedir.

2.1.2. İyon değişimi

Bu yöntemde, su içerisinde istenmeyen iyonlar uygun bir anyon ve katyon tipi iyon değiştirici kolonda tutulmaktadır (Şekil 2.2). Günümüzde en yaygın kullanılan iyon değiştiriciler reçinelerdir. Aynı zamanda selüloz, protein, toprak, humus, bakteri ve algler gibi doğal iyon değiştiriciler de bulunmaktadır. Ancak bu işlem, boyar madde gideriminde yüksek verim elde edilememesi nedeniyle yaygın kullanılamamaktadır. İyon değiştiriciler ile gerçekleştirilen giderimde; atık su, var olan değişim bölgeleri dolana kadar iyon değişim reçinesi üzerinden geçirilmektedir. Böylelikle hem katyonik hem de anyonik boyalar atık sudan uzaklaştırılabilmektedir. İyon değiştirici kolonların rejenere edilebilmesiyle adsorban kaybının önlenmesi, çözücünün kullanım sonrası geri kazanılması ve boyar maddelerin etkin bir şekilde giderilmesi gibi üstünlükleri olsa da bu yöntemin her tür boya için uygulanamıyor olması ve kullanılan çözücülerin pahalı olması bu yöntemin en büyük sakıncasıdır [18].

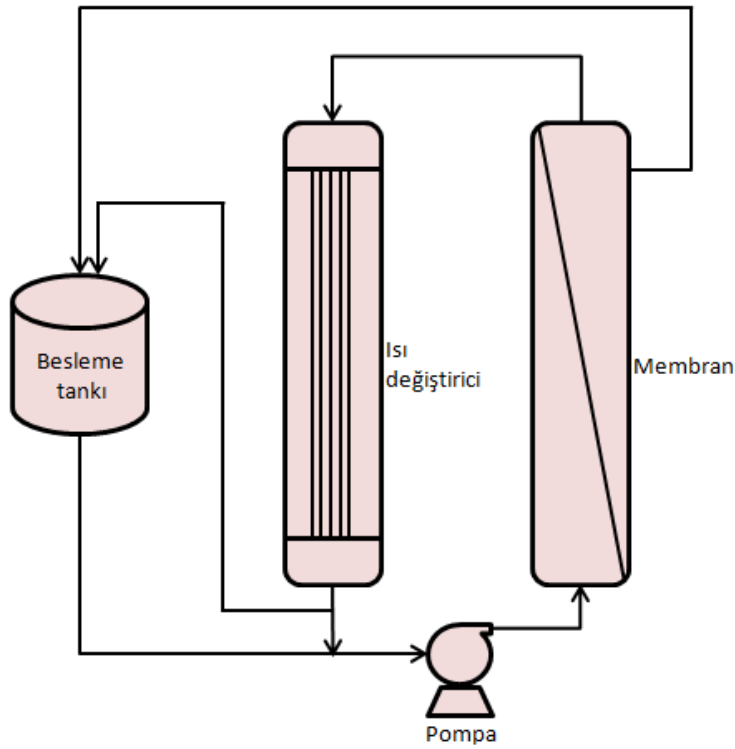


Şekil 2.2. İyon değiştirme sistemi

2.1.3. Ters osmoz

Bu yöntem, boyanın atık sudan sürekli olarak arıtılmasını ve konsantre edilebilmesini mümkün kılmaktadır. Sıcaklığa dirençli olması, kimyasal ortama ve mikrobiyal saldırıya dayanıklı olması diğer yöntemlere göre üstünlüğü olduğunu göstermektedir. Çözülmüş organik ve inorganik maddelerin sudan uzaklaştırıldığı, yüksek basınç uygulanan bu sistemde atık suyun yeniden kullanımı amaçlanmaktadır. Kullanılan ters osmoz membranları ile %90'ın üzerinde verim elde edilebilmektedir [19]. Şekil 2.3'te gösterilen membran filtrasyon sistemi ile, boyar madde ve yardımcı kimyasallar içeren atık suların tek basamakta arıtımı gerçekleştirilmektedir.

Membranların iyon seçici özellikte olmaları nedeniyle yalnızca bir kısım maddeleri geçirebilmektedir. Bu durum, membranların kullanımını sınırlandırmaktadır. Atık suyun düşük derişimlerde boyar madde içerdiği durumlarda membranlar yardımıyla giderim gerçekleştirilmesi uygun olmaktadır. Ancak bu yöntem ile sudaki çözülmüş katı madde içeriği azalmamaktadır. Ayrıca, membranların giderim sonrası tıkanmalarından dolayı yenilenmelerinin gerekliliği, yüksek maliyet ve giderimden sonra kalan atıkların giderilememesi de bu yöntemin olumsuzluklarındandır [18].



Şekil 2.3. Membran filtrasyon sistemi

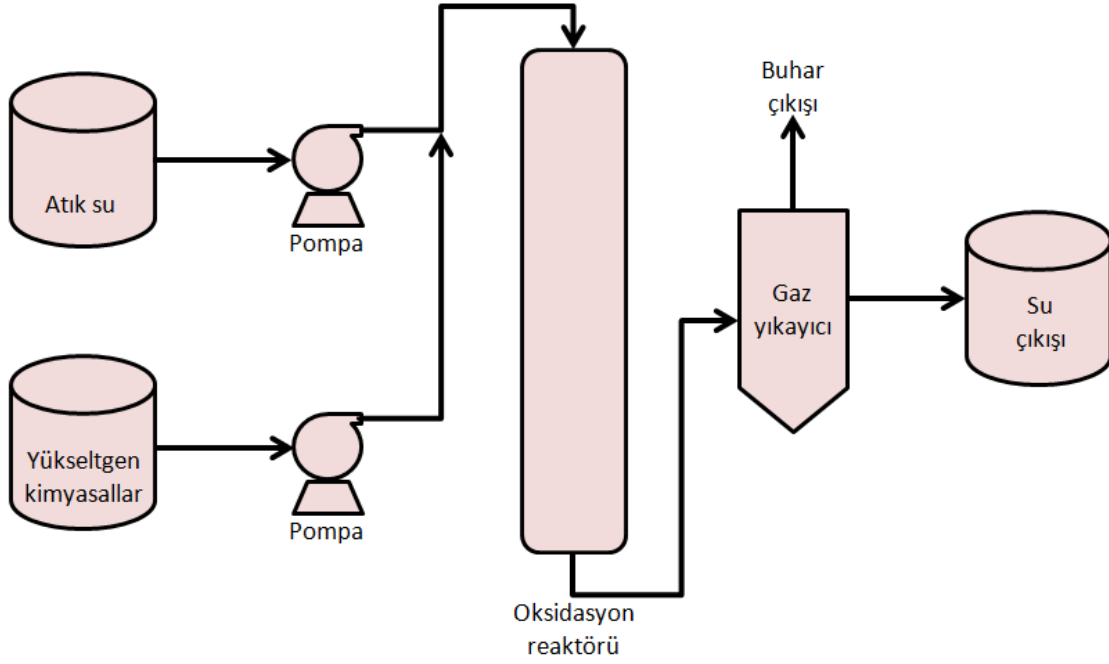
2.2. Kimyasal Yöntemler

Atık su arıtımında oldukça yaygın olan kimyasal yöntemler; oksidasyon, çöktürme ve cucurbituril ile arıtım yöntemlerinden oluşur.

2.2.1. Oksidasyon

Kimyasal yöntemlerin en yaygın olanıdır. Oksidasyonun amacı, serbest halde veya bir bileşimin yapısında bulunan elementin değerliğinin yükseltilmesidir. Renk giderimi proseslerinde de yararlanılan, Şekil 2.4'te gösterilen, oksidasyon yöntemi; istenmeyen bileşiklerin zararsız hale getirilmesi ve daha sonraki arıtım prosesleri için uygun hale getirilmesi için uygulanmaktadır [17].

Oksidasyon yöntemi; ozonlama, sodyum hipoklorit (NaOCl), Fenton reaktifi, elektrokimyasal ve fotokimyasal yöntemler olmak üzere farklı şekillerde uygulanmaktadır [14,15,18].



Şekil 2.4. Oksidasyon yöntemi ile atık suların arıtımı

Ozon, yüksek kararsızlığa sahip olması nedeniyle iyi bir yükseltgendir ve ozonla gerçekleştirilen oksidasyon işlemi ile fenol, pestisit, klorlu ve aromatik hidrokarbonların parçalanması mümkün olmaktadır. Bunun yanı sıra, tekstil endüstrilerinin oluşturduğu atık sulardaki diğer kirletici maddelerin de giderimini sağlamaktadır [20]. Ozonlama; KOİ oluşturmeyen, çamur ve toksik metabolitlerin oluşmadığı bir yöntemdir [21]. Oksidasyon işlemi için ozon kullanımının üstünlüğü, ozonun gaz halinde uygulanmasından dolayı atık suyun ve çamurun hacmini artırmamasıdır. Ozonlama ile, boyar maddelerde bulunan kromofor gruplarının kırılması sonucu renk gideriminin gerçekleşmesi söz konusudur. Bu yöntemin sakıncaları ise, giderim sonucu oluşan kimyasal maddelerin atık suda zehirli ve kanserojenik etkilere neden olması, ozonun yarı ömrünün kısa olması, bazik ortamlarda ozonun bozunması ve yüksek maliyet gerektirmesidir [18].

Kimyasal oksidasyonda kullanılan diğer bir bileşik ise sodyum hipoklorit (NaOCl)'tir. Yapısında bulunan Cl^+ ile boyar maddedeki azo bağın kırılmasına neden olmaktadır. Böylece renk giderimi gerçekleşmektedir. Ortamdaki klor miktarının artmasıyla boyar maddenin giderimi de artmaktadır. Dispers boyaların giderimi için uygun olmayan bu yöntemin alıcı su ortamlarındaki zehirli ve kanserojenik etkilerinden dolayı son zamanlarda kullanımı azalmaktadır [18].

Fenton reaktifi, H_2O_2 -Fe(II), kullanılan yöntemde giderim, hem sorpsiyon hem de bağlanma yoluyla gerçekleşmektedir. Bu yöntemin çözünebilen ve çözünmeyen boyalar için etkili olduğu görülmüştür. Ancak bu yöntemin, reaktifte ve boya moleküllerinde topaklanma oluşması nedeniyle çamur oluşması gibi bir sakıncası bulunmaktadır. Konsantrasyon safsızlıkları içeren çamurun giderilmesi gerekmekte ve bu durum çevresel sorunlara neden olmaktadır [17].

Elektrokimyasal yöntemlerle gerçekleştirilen boya madde giderimi ise, kimyasal tüketiminin az olması ve çamur oluşumu gerçekleşmemesi nedeniyle etkili yöntemlerden birisidir. Bu yöntemde anot, katot, elektrolit çözelti ve güç kaynağından oluşan elektrokimyasal reaktörler kullanılmaktadır. Katotta bulunan yük oksidasyonun azalmasına neden olurken, anottaki yük ise oksidasyonu artırmaktadır. Oksidasyonun değişimi de ortamdaki kimyasalların formlarını değiştirmekte ve etkili bir boya madde giderimi sağlamaktadır. Ekonomik bir giderim sağlayan bu yöntem, dirençli olan kirleticilerin gideriminde de oldukça etkilidir. Arıtma metabolitleri genellikle tehlikeli değildir. Ancak elektrokimyasal yöntemin yüksek akış hızı nedeniyle boya madde gideriminde azalmaya neden olması gibi sakıncası da bulunmaktadır [18].

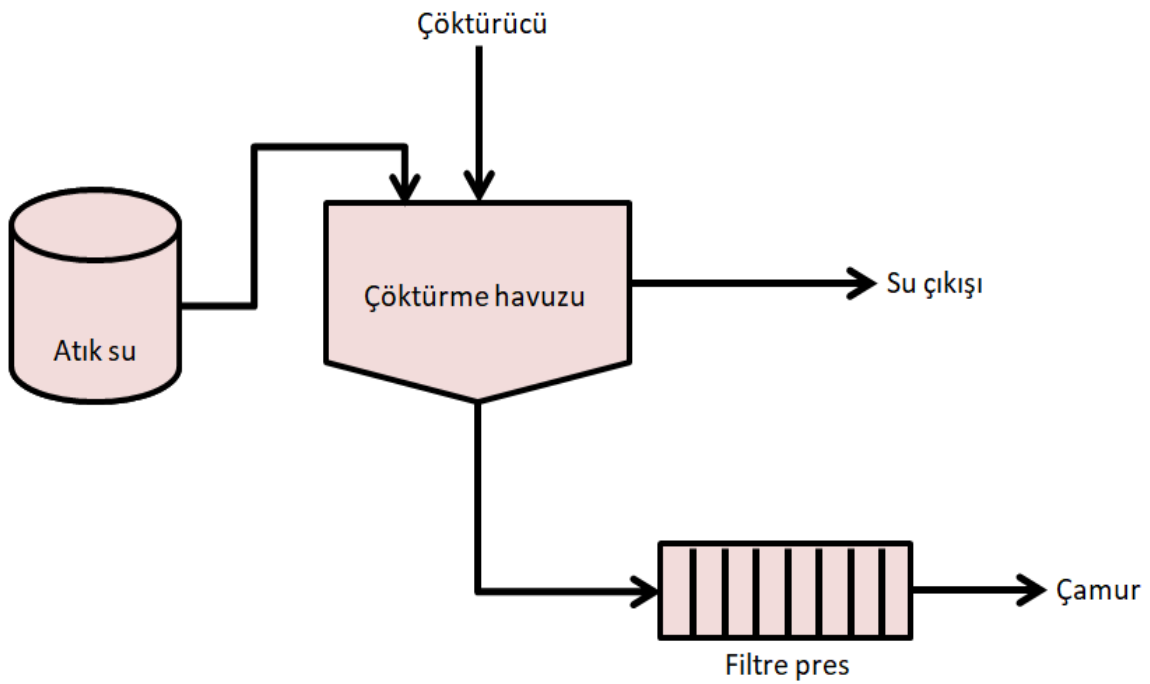
Oksidasyon yöntemlerinin sonuncusu olan fotokimyasal yöntemde, H_2O_2 varlığında UV işlemi ile boya molekülleri CO_2 ve H_2O 'ya indirgenmektedir. Bozunma, yüksek derişimlerde hidroksil radikallerinin üretilmesinden kaynaklanmaktadır. UV ışığı ile, H_2O_2 gibi kimyasalları aktive edilmekte ve hidroksil radikaline parçalanma gerçekleşmektedir (Eşitlik 2.1).



Boya madde giderim hızı, UV ışıınımı, pH, boyanın yapısı ve boya banyosu bileşimine bağlıdır. Başlangıç materyallerine ve boya madde gideriminin derecesine bağlı olarak halojenürler, metaller, inorganik asitler, organik aldehitler ve organik asitler gibi yan ürünler oluşabilir. Fotokimyasal yöntemle boya madde gideriminin çamur oluşturmaması ve kötü kokuların oluşmaması gibi üstünlükleri bulunmaktadır [18].

2.2.2. Çöktürme

Kimyasal maddeler yardımıyla atık su içerisindeki çözünmüş veya askıda kalmış bileşiklerin daha az çözünür hale dönüştürülmesi, bir başka deyişle çökelmenin kolaylaştırılması işlemidir (Şekil 2.5). Çöktürme yönteminde kullanılan kimyasallardan bazıları; FeCl_3 , $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, FeSO_4 ve kireçtir. Bu yöntemde operasyonel maliyetin fazla olması ve oluşan çamuru gidermede oluşan maliyet, sakıncaları oluşturmaktadır [14].



Şekil 2.5. Çöktürme sistemi

2.2.3. Cucurbituril ile arıtım

Cucurbituril ($\text{C}_{36}\text{H}_{36}\text{N}_{24}\text{O}_{12}$), glikoluril ve formaldehitin siklik bir polimeridir [22]. Çeşitli tekstil boyaları için cucurbituril oldukça iyi sorpsiyon kapasitesi gösteren bir kimyasaldır. Aromatik bileşiklerle kompleks oluşturmakta ve reaktif boyaların adsorpsiyonu için uygun bulunmaktadır. Endüstriyel olarak uygulanabilir olması için, sabit yataklı sorpsiyon filtreleri gerekmektedir. Diğer birçok kimyasal yöntem gibi maliyet de büyük bir sakıncadır [18].

2.3. Biyolojik Yöntemler

Fiziksel ve kimyasal yöntemler; büyük miktarlarda kimyasal kullanımı gerektirmesi, giderim sonrası zararlı yan ürünlerin oluşması, düşük giderim verimi ve yüksek maliyet gibi olumsuzluklara sahip olduğundan (**Çizelge 2.1**), bu yöntemlere seçenek olarak biyolojik yöntemlere yönelmeyi beraberinde getirmiştir [23].

Çizelge 2.1. Boyar madde gideriminde uygulanan fiziksel ve kimyasal yöntemlerin karşılaştırılması

Yöntem	Üstünlükler	Sakıncalar
Adsorpsiyon	Çok çeşitli boyaların etkili giderimi	Aktif karbonun pahalı olması
İyon değişimi	Rejenerasyon sayesinde adsorban kaybı olmaması	Her boya için uygulanamaması
Ters osmoz	Her tür boyanın etkili giderimi	Konsantre çamur oluşumu
Oksidasyon		
Ozonlama	Gaz halinde uygulanması ve hacimde değişim olmaması	Yarılanma süresinin kısa olması
Sodyum hipoklorit	Azo bağının hızlı şekilde kırılması	Aromatik amin salınımı
Fenton reaktifi	Hem çözünebilen hem çözünemeyen boyaların gideriminde etkili olması	Çamur oluşumu
Elektrokimyasal	Yıkım bileşiklerinin tehlikesiz olması	Elektrik maliyeti
Fotokimyasal	Çamur oluşmaması	Yan ürünlerin oluşumu
Çöktürme	Birçok arıtma ünitelerinde uygulanabilmesi	Fazla çamur oluşturmaması
Cucurbituril	Çeşitli boyalar için yüksek sorpsiyon kapasitesi	Yüksek maliyet

Biyolojik yöntem, tekstil atık sularında boyar madde giderimi için fiziksel ve kimyasal yöntemlerle karşılaştırıldığında, daha ucuz ve çevre dostu bir seçenek sunmaktadır. Bakteriler, mantarlar ve mayalar da içinde olmak üzere tekstil boyalarını parçalayabilen bir dizi mikroorganizma bulunmuştur [13]. Mikroorganizmaların boyar maddeleri parçalamaları, enzimler aracılığı ile gerçekleşmektedir. Son yıllarda, tekstil boyar maddelerinin renksizleştirilmesi için enzim sistemleri geliştirilmiştir [3,8,24,25].

2.4. Enzimler

Enzimler protein yapılı, hücrelerdeki kimyasal tepkimeleri katalizleyen moleküllerdir [26]. Konvansiyonel katalizörlere göre enzimler, daha uygulanabilir olmayı sağlayan pek çok özelliğe sahiptir. Bunlardan bazıları; biyolojik olarak parçalanabilir katalizörler olmaları nedeniyle çevreyi en düşük düzeyde etkilemeleri, düşük ve yüksek substrat derişimlerinde çalışmaya izin vermeleri, geniş bir pH ve sıcaklık aralığında çalışmaları, çok fazla çamurun oluşmaması ve kontrolünün kolay olmasıdır [27].

Hücrelerden özütlenen enzimler, ticari olarak önemli proseslerde katalizör olarak kullanılmaktadır. Örneğin; tatlandırıcı ajanların üretiminde, antibiyotiklerin modifikasyonunda, çamaşır yıkama tozlarında, çeşitli temizlik ürünlerinde, klinik, adli ve çevresel uygulamalarda kilit rol oynamaktadır. **Çizelge 2.2'**de enzimlerin sınıflandırılması verilmiştir.

Çizelge 2.2. Enzimlerin sınıflandırılması, ana sınıflar [28]

Sınıf	Katalizlediği Reaksiyon
1 Oksidoredüktazlar	İndirgenme-yükseltgenme reaksiyonları
2 Transferazlar	Fonksiyonel grupların bir molekülden diğerine transferi
3 Hidrolazlar	Hidroliz
4 Liyazlar	Oksidasyon ve hidrolizden başka yollarla bağların yıkılması ve oluşması
5 İzomerazlar	İzomerizasyon
6 Ligazlar	Yüksek enerjili bir bağın hidrolizi ile iki molekülün birbirine bağlanması

Endüstriyel olarak pek çok alanda kullanılmakta olan enzimler, genelde mikroorganizmalar tarafından üretilmektedirler. Bunun nedeni, mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin bitkilerden veya hayvanlardan elde edilen enzimlere göre yüksek katalitik aktiviteye sahip olmaları, kararlı ve ekonomik olmaları, istenmeyen ürün oluşturmamaları gibi üstünlüklere sahip olmalarıdır.

Enzimlerin etki ettiği maddelere substrat denmektedir. Enzim katalizli bir tepkime genellikle Eşitlik2.2'de olduğu gibi iki aşamada ilerlemektedir.



Substrat (S), enzimin (E) aktif bölgesine hidrojen bağları ve iyonik bağlarla bağlanmakta ve enzim-substrat kompleksi oluşmaktadır. Tepkime gerçekleşir gerçekleşmez ürün (P), enzimden ayrılmakta ve enzim daha sonra başka bir substrat molekülüne yeniden bağlanabilmektedir. Enzimler bir dakikada binlerce sayıda tepkimeye girerek bu döngüyü yürütebilmektedirler. Tepkimenin başlayabilmesi için gerekli olan aktivasyon enerjisini düşürerek tepkimelerin kısa zamanda, az miktarda enerji ile gerçekleşmesini sağlamaktadır.

Enzimlerin çok sayıda farklı bileşiği okside edebilmeleri nedeniyle tekstil atık sularındaki boyar maddelerin arıtımında kullanılmaları yoğun bir şekilde incelenmiştir. Lignin peroksidaz, manganez peroksidaz ve lakkaz gibi ligninolitik enzimler, normalde karbon, azot veya kükürt gibi besin seviyeleri sınırlandığında beyaz çürük mantarlar tarafından hücre dışı ortama salgılanarak üretilmektedirler. Boyaların enzimatik giderimi ile, kromoforlar yok edilmekte ve zehirlilik azalmaktadır.

2.4.1. Enzim kinetiği

Enzim katalizli tepkimelerin hızını belirlemek için enzim kinetiği çalışmaları önem taşımaktadır. Yaygın olarak enzim kinetiği, Michaelis-Menten eşitliğine göre (Eşitlik 2.3) belirlenmektedir [29]. Bu eşitliğe göre tepkimenin hızı, substrat derişimi cinsinden ifade edilmektedir.

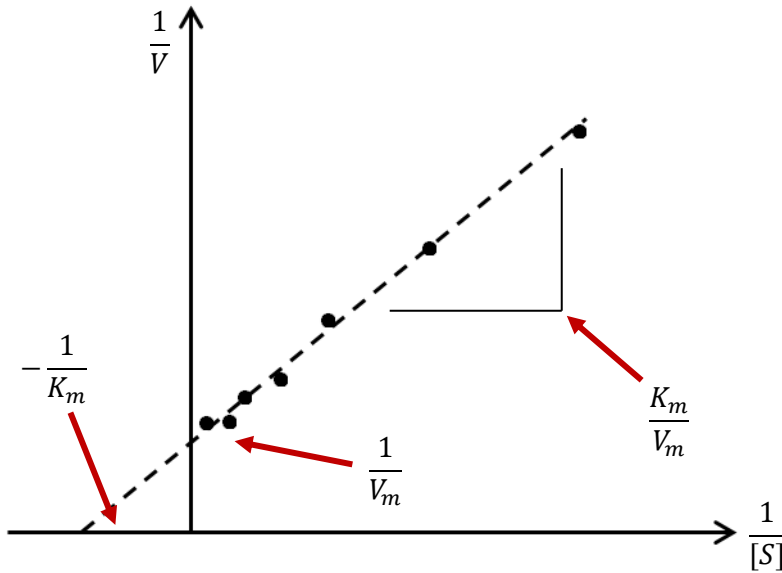
$$V \left(\frac{M}{dk} \right) = \frac{V_m + [S]}{K_m + [S]} \quad (2.3)$$

Bu eşitlikte, V_m maksimum tepkime hızını, $[S]$ substrat derişimini ve K_m ise Michaelis-Menten hız sabitini ifade etmektedir. Maksimum hıza, enzimi doyuran substrat derişiminde ulaşılmaktadır. Tepkime hızı maksimum hızın yarısına eşit olduğunda K_m , substrat derişimine eşit olmaktadır. Kinetik parametreleri (V_m ve K_m) belirlemek için tipik yöntem farklı substrat derişimlerinde ($[S]$) bir seri enzim ölçümü yapılması ve tepkime başlangıç hızının (V_0) ölçülmesidir (Eşitlik 2.4). Burada ‘başlangıç’ teriminden kasıt, tepkime hızının başlangıçtan sonraki nispeten kısa bir süre içinde ölçülmesidir. Bu süre zarfında enzim-substrat kompleksinin oluşmuş olduğu ama substrat derişiminin yaklaşık sabit olduğu ve dolayısıyla denge veya kararlı hal yaklaşımının geçerli olduğu varsayılmaktadır. Ayrıca enzim ve substrat derişimlerinin en sağlıklı bilindiği tepkime koşulları da geçerlidir.

$$V|_0 = \left. \frac{-d[S]}{dt} \right|_0 = \left. \frac{d[P]}{dt} \right|_0 \quad (2.4)$$

Belirlenen tepkime hızları, substrat derişimlerine karşı grafiğe geçirildiğinde Michaelis-Menten eşitliği ile V_m ve K_m parametreleri hesaplanabilmektedir. Bu parametreleri belirlemek için Michaelis-Menten eşitliğinin doğrusallaştırılmış hali de kullanılmaktadır. Bunun için oldukça yaygın kullanılan yöntem ise Eşitlik 2.5'te verilen Lineweaver-Burk eşitliğidir [30].

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_m [S]} + \frac{1}{V_m} \quad (2.5)$$



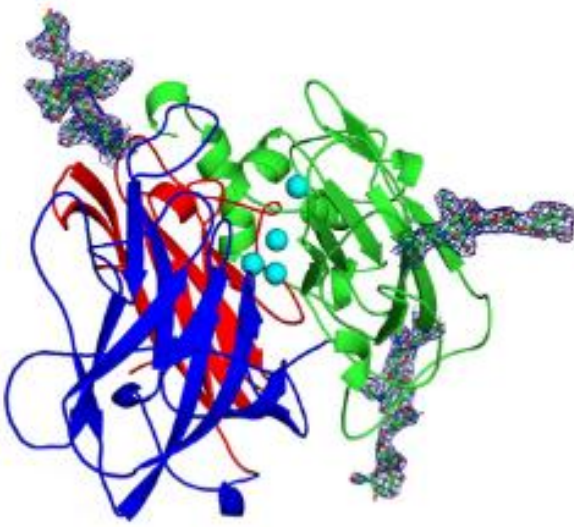
şekil 2.6. Lineweaver-Burk grafiği

Lineweaver-Burk'a göre, $1/V$ değerlerine karşı $1/[S]$ değerleri grafiğe geçirilmektedir (şekil 2.6). Grafiğin eğimi Eşitlik 2.5'te bulunan K_m/V_m değerine eşittir. Grafiğin kayması ise $1/V_m$ değerini ifade etmektedir. Böylece kinetik parametreler olan V_m ile K_m bulunabilmektedir.

2.4.2. Lakkaz enzimi

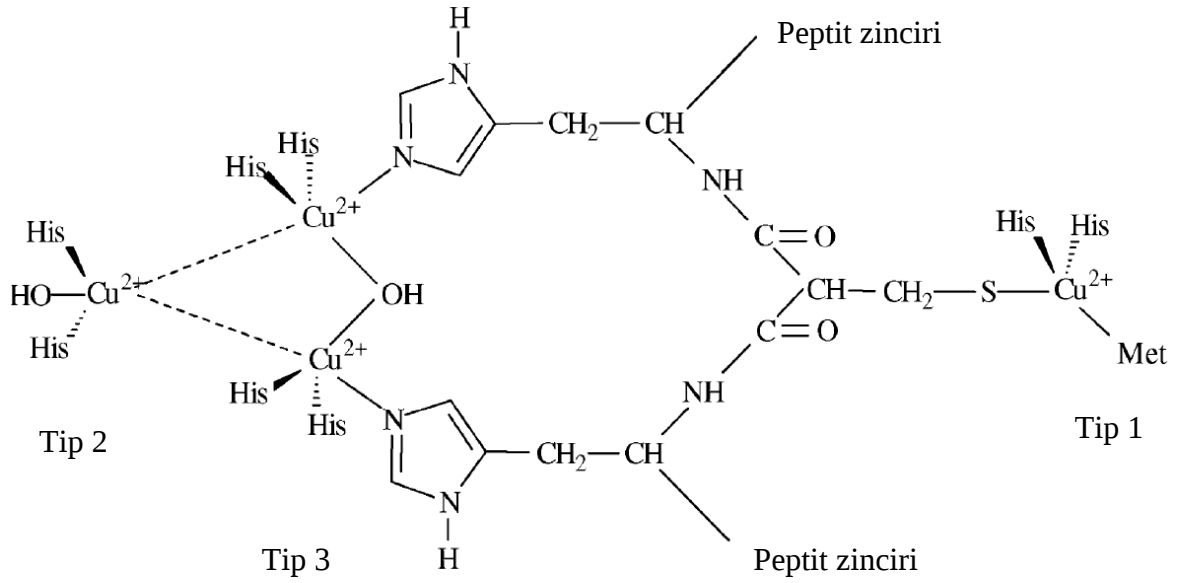
Atık su arıtma işlemlerinde çevresel olarak zararlı bileşikler yerine daha evre dostu bileşiklerin kullanılması gerekliliği ve var olan atık su arıtma teknolojileri ile verimli şekilde giderilmeyen kirleticilerin etkin bir şekilde giderilmesi gerekliliği nedeniyle son

yıllarda ilgi çekici olan lakkaz enzimi (EC 1.10.3.2), ilk olarak 1883 yılında Yoshida tarafından, Japonya’da, *Rhus vernicifera* ağacında keşfedilmiştir [31]. Doğada çeşitli bitkiler, böcekler, bakteri ve mantarlar tarafından üretilmektedir. Çoklu bakır atomu içeren lakkaz (Şekil 2.7), **Çizelge 2.2**’de gösterilen enzim sınıflarından 1. sınıf olan oksidoredüktazlardandır [23]. Bu sınıfa dahil olan enzimlerin önemli bir özelliği de substrat spesifikliğinin geniş olması ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilir olmasıdır [32].

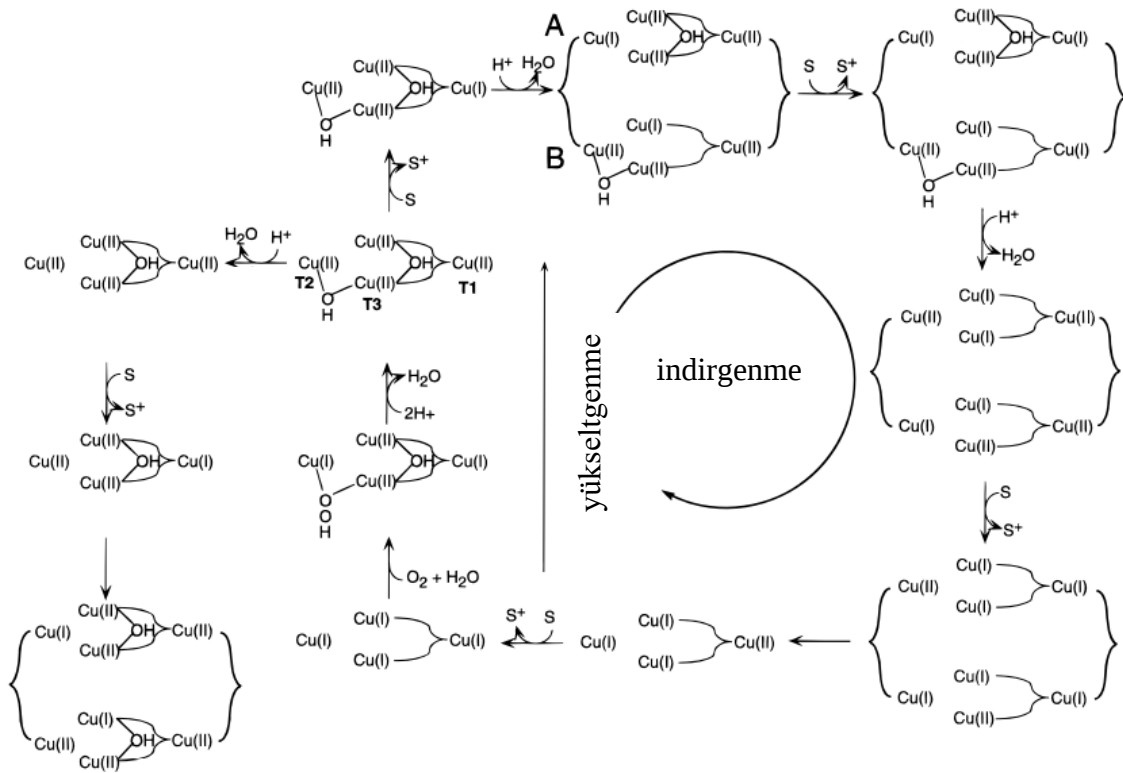


Şekil 2.7. Lakkaz enziminin Ribbon diyagramı [33]

Oldukça geniş substrat aralığına sahip olan lakkaz enzimi elektron alıcısı olarak moleküler oksijeni kullanmaktadır. Şekil 2.8’de gösterildiği gibi, yapısında Tip 1, Tip 2 ve Tip 3 olarak gruplanmak üzere 4 adet bakır atomu bulunmaktadır. Tip 1 bakır atomunun yer aldığı kısım mavi bölge de denilen mononükleer kısım, Tip 2 ve Tip 3 bakır atomunun yer aldığı kısım ise trinükleer kısımdır. Şekil 2.9’da gösterilen lakkazın katalitik döngüsünde; moleküler oksijen, enzime trinükleer merkezdeki Tip 2 ve Tip 3 bakırlardan bağlanmaktadır. Tip 1 bakır yardımıyla substrattan elektron koparılmakta ve substratın oksidasyonu gerçekleşmektedir. Koparılan elektron ise Tip 2 ve Tip 3 bakırın yer aldığı trinükleer merkeze taşınmaktadır. İndirgenen Tip 1 bakırdaki elektron moleküler oksijene aktarılarak indirgenmesini ve su oluşmasını sağlamaktadır.



Şekil 2.8. Lakkazın yapısındaki bakır atomları [34]



Şekil 2.9. Lakkazın katalitik döngüsü [35]

Lakkaz enzimi, oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptir. Bunlar;

- Gıda endüstrisi,
- Kağıt endüstrisi,
- Tekstil endüstrisi,
- Kot yıkama,
- Tekstil ürünlerinin ağartılması,
- Enzimatik kaynatma prosesi,
- Nanobiyoteknoloji,
- Kozmetik,
- Sentetik kimyasal üretimi ve
- Tekstil atık sularındaki boyar maddelerin giderimidir [1].

Lakkaz ile yapılan giderim çalışmaları sonucu oluşan ürünlerin daha az zehirli olması nedeniyle lakkaz kullanımına yönelim artmaktadır. Lakkaz enzimi, su kütlelerinde bulunan birçok kirletici maddenin giderilmesi için önemli bir potansiyele sahiptir. Bu kirleticiler arasında klorofenoller, boyalar, bisfenol A, nonilfenol ve triklosan gibi kimyasallar bulunmaktadır [36].

Enzimlerin serbest halde kullanımları, enzimin stabilitesini koruyamaması ve aktivitesini kaybetmesi gibi kullanımlarını sınırlandıran olumsuz durumlara neden olmaktadır. Ayrıca, su ortamında çözülmüş enzimler atık sudan zorlukla ayrılabilmekte ve bu nedenle yeniden kullanılamamaktadırlar. Bu nedenlerden ötürü, enzimlerin çeşitli malzemeler üzerinde immobilizasyonu gerekli hale gelmiştir.

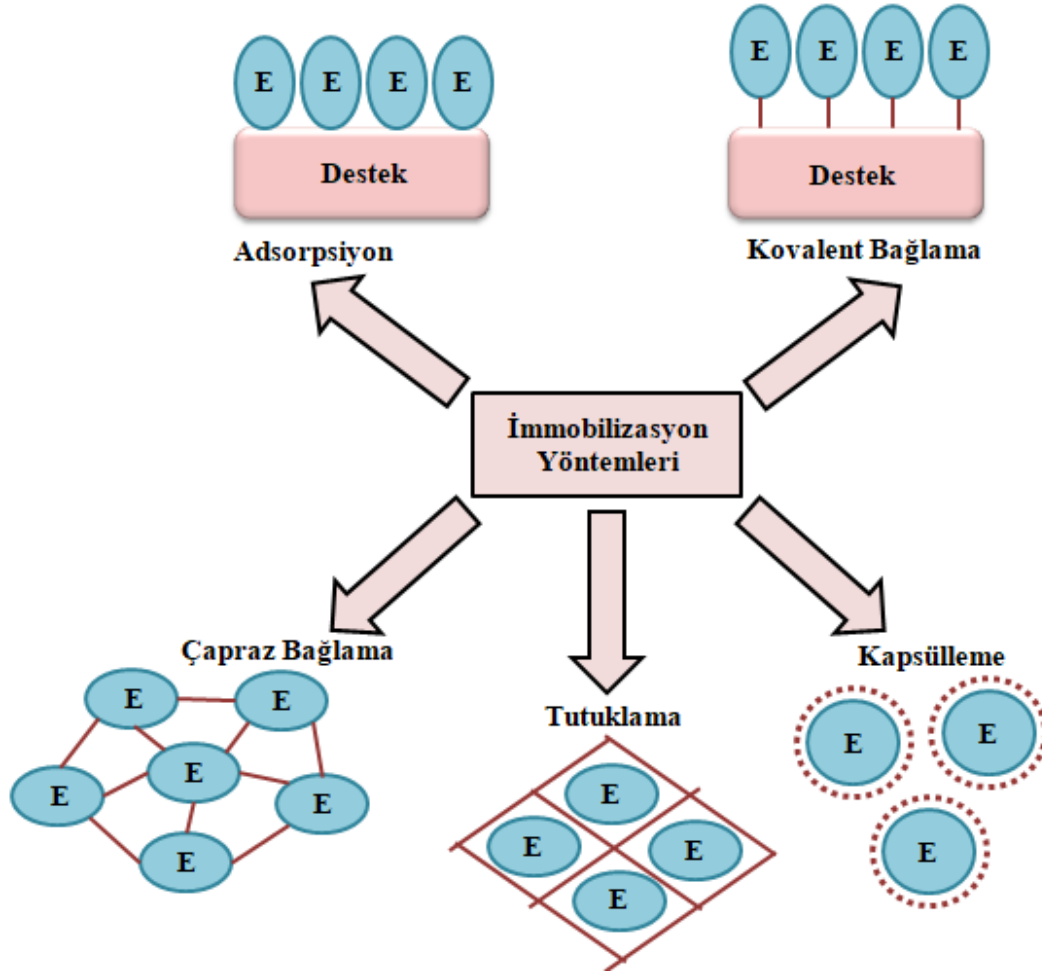
2.5. Enzim İmmobilizasyonu

Boyar madde giderimi için biyokatalizör olarak kullanılmakta olan enzimlerle ilgili sınırlamaları ortadan kaldırmak amacıyla sıklıkla kullanılan bir teknik immobilizasyondur. İmmobilizasyon, katalizörlerin çözünmez bir destek matrisi (taşıyıcı) ile bağlanması, uygun bir geometriye sahip olması anlamına gelmektedir [37,38]. Enzim, immobilize edilerek birçok gelişmiş özellik kazanmaktadır. Bu özellikler arasında;

- Çeşitli denatüre edici koşullarda enzimin stabilitesi,
- pH toleransı,
- Fonksiyonel kararlılık,
- Enzimin ortamdan daha kolay ayrılabilmesi
- Enzimin arka arkaya birçok kez kullanılmasına izin vermesi,
- Kontaminasyon riskinin az olması yer alabilir [39].

Kullanılan immobilizasyon yöntemine bağlı olarak, lakkazların enzimatik stabilitesinin önemli ölçüde iyileştirildiği ve enzimlerin yeniden kullanılmasının mümkün olduğu görülmüştür [23]. Bu işlemde, enzimi immobilize etmek için uygun bir taşıyıcı, pH ve sıcaklık gibi uygun koşullar seçmek gerekmektedir. Seçilen immobilizasyon yöntemi ile hem katalitik gereksinimleri (verimlilik, kararlılık vb.) hem de katalitik olmayan gereksinimleri (ayırma, kontrol edilebilirlik vb.) karşılamalıdır.

Adsorpsiyon, çapraz bağlama, tutuklama, kapsülleme ve kovalent bağlama olmak üzere beş farklı yöntemle enzimlerin immobilizasyonu mümkündür (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. İmmobilizasyon yöntemleri (E: Enzim)

2.5.1. Adsorpsiyon

Bilinen en eski yöntemlerden olan bu yöntemde enzim, yüzeyi aktif olan inert bir adsorban malzemenin dış yüzeyine bağlanmaktadır. Diğer yöntemlere göre daha kolay uygulanabilmektedir. Enzim ile taşıyıcı maddenin yüzeyi arasındaki elektrostatik etkileşimler, Van der Waals kuvvetleri aracılığıyla gerçekleşmektedir [40].

Adsorpsiyon yönteminde en sık kullanılmakta olan adsorbanlar; aktif karbon, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (kalsiyum fosfat), CaCO_3 (kalsiyum karbonat), gözenekli cam, gluten ve nişastadır. Genel olarak bu yöntem, immobilizasyon yöntemleri arasında en yavaş olanıdır. Adsorpsiyon işleminde, kimyasal bir reaksiyon gerçekleşmediğinden dolayı immobilize edilmiş enzimin aktif bölgesi bloke olabilir ve bu da enzimin aktivitesinin büyük ölçüde azalmasına neden olmaktadır [38]. Ayrıca destek materyalinden enzim kaybı ve ürünü ayırmanın zor olması da yöntemin diğer sakıncalarındandır [40].

2.5.2. Çapraz bağlama

Çapraz bağlama yöntemi yalnızca enzime bağlıdır. Büyük, üç boyutlu kompleks bir yapı hazırlamak amacıyla enzim moleküllerinin birbiri ile birleştirilmesiyle gerçekleştirilmektedir. Bu nedenle destek materyaline gerek duyulmamaktadır. İki veya çok fonksiyonlu çapraz bağlama reaktifleri ile enzimler birbirine bağlanır. En çok kullanılan çapraz bağlayıcılar glutaraldehit, kloroformat, epiklorohidrin, bioksiüranlar ve toluen diizosiyanat gibi reaktiflerdir [40].

2.5.3. Tutuklama

Bu yöntemde, enzimler doğal veya yapay polimerlerden oluşan kafesler içinde tutuklanmaktadır. Substrat polimer kafeslerin içine girerek buradaki enzimle katalizlenerek ürün dışarı çıkmaktadır. Enzim ve destek materyali arasında herhangi bir kovalent bağ oluşmadığından enzim üç boyutlu yapısında değişim gözlenmemektedir. Bu nedenle aktivitede kayıp olmamaktadır.

Son zamanlarda tutuklama yönteminde destek materyali olarak genellikle aljinat jelleri, poliakrilamid, karragenan, kitin ve kitosan gibi polimerler kullanılmaktadır. Kullanılan jel kafesinin gözenek boyutu, enzimin sızamayacağı kadar sıkı ve aynı zamanda substrat ve ürünün geçişine de izin verecek büyüklükte olmalıdır [40]. Kafeslerden enzimin kaçacağı olması ve makromoleküler yapıları substratların geçişini önleyen yüksek difüzyon bariyerinin varlığı da bu yöntemin sakıncalarındandır [39].

2.5.4. Kapsülleme

Kapsülleme yönteminde, enzim molekülleri yarı geçirgen membranın gözeneklerinin içinde tutulmaktadır. Bu yarı geçirgen membranların gözenek çapları, düşük molekül ağırlıklı substrat moleküllerinin kapsül içerisine girebileceği ve ürün moleküllerinin kapsülün dışarısına çıkabileceği büyüklükte olmalıdır. Çapları 10-100 µm arasında olan mikrokapsüller oluşturmak amacıyla naylon ve selüloz nitrat gibi çok sayıda malzeme kullanılmaktadır. Substrat moleküllerinin küçük olması, kapsülleme yöntemi ile immobilize edilen enzimin daha verimli olmasını sağlamaktadır [40].

2.5.5. Kovalent bağlama

Enzim, kimyasal bir tepkime yoluyla suda çözünmeyen bir matrise kovalent olarak bağlanmaktadır. Bu yöntemde, bir ucu enzimin fonksiyonel gruplarına diğer ucu da destek materyaline bağlanarak enzimi kovalent bağ ile immobilize etmeyi sağlayan bir çapraz bağlama reaktifi kullanılmaktadır. Destek materyali ile enzim arasında oluşan bağ oldukça kuvvetlidir. Böylelikle, enzim çözelti ortamına karışmamaktadır. Günümüze kadar uygulanan immobilizasyon yöntemlerinden en etkili olanıdır [38]. Bu yöntem ile enzimin destek materyaline çok noktalı kovalent bağlanmasını sağlayarak enzimin aktivitesi, stabilitesi ve yeniden kullanılabilirliğini artırmak olasıdır.

Kovalent bağlama yönteminde kullanılan destek materyalinin suda çözünürlüğü az olmalı ve mekanik stabilitesinin yüksek olmalıdır. Aynı zamanda destek materyalinin enzim tarafından parçalanmaması, dayanıklı olması ve mikroorganizma üremesine izin vermemesi gerekmektedir. Kullanılan destek materyallerinden bazıları; selüloz, nişasta, agaroz, silika ve gözenekli camdır.

Kovalent bağlama yöntemiyle enzimin immobilizasyonu iki adımda gerçekleşmektedir. Birincisi, destek materyalinin yüzeyinde bulunan fonksiyonel grupların belirli bir reaktif tarafından aktivasyonudur. İkincisi ise, destek materyalinin aktifleştirilmiş yüzeyi ile kovalent bağ oluşturmak üzere enzimin eklenmesidir. Aktivasyonun amacı destek materyalinin üzerinde güçlü elektrofilik fonksiyonel gruplar oluşturmaktır. Birleştirme aşamasında ise aktive edilmiş gruplar, çoğu enzimin fonksiyonel grupları olan, amino grupları (NH_2) ile tepkimeye girerek güçlü kovalent bağ oluşturmaktadır [40].

Yukarıda anlatıldığı gibi enzimler birçok yöntem kullanılarak immobilize edilebilmektedir. Her yöntemin kendine özgü üstünlükleri ve sakıncaları bulunmaktadır (Çizelge 2.3). Bu nedenle pratikte, yapılması planlanan uygulama ışığında her enzimin immobilizasyonu için uygun bir yöntem ve en uygun koşulların belirlenmesi önemlidir.

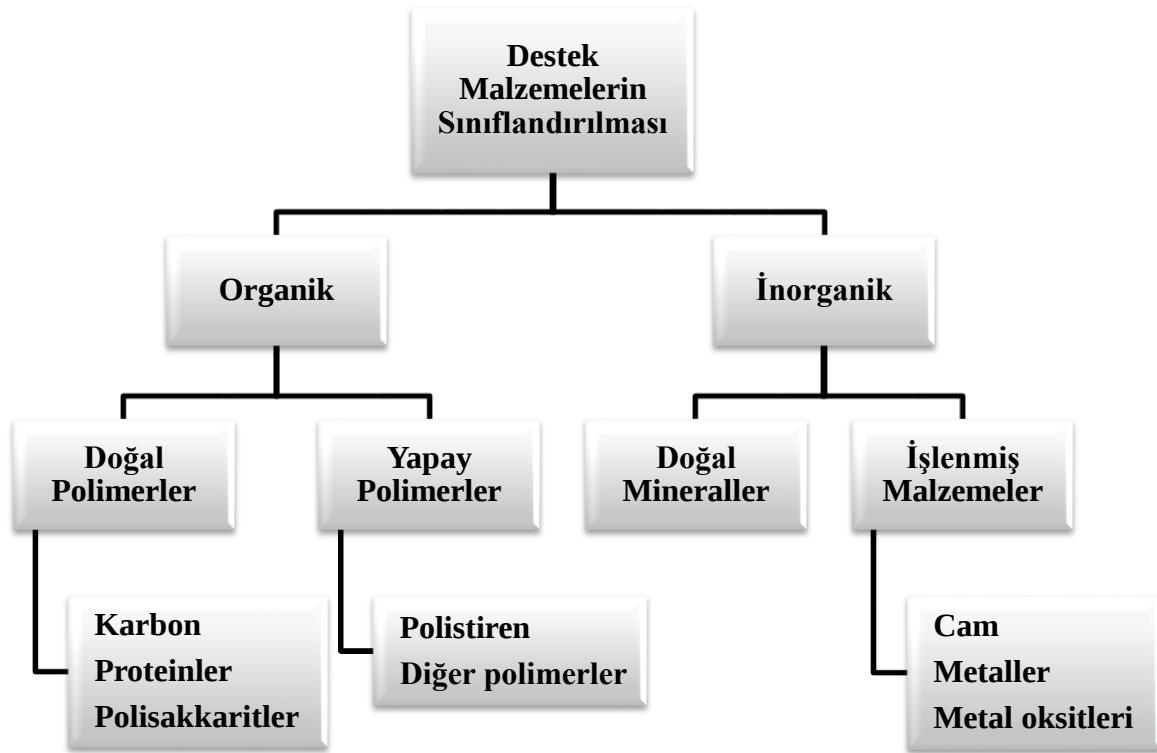
Çizelge 2.3. İmmobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması

Karakteristikler	Adsorpsiyon	Çapraz Bağlama	Tutuklama	Kapsülleme	Kovalent Bağlama
Hazırlama	Kolay	Zor	Zor	Kolay	Zor
Enzim Aktivitesi	Düşük	Orta	Yüksek	Yüksek	Yüksek
Substrat özgüllüğü	Değişken değil	Değişken	Değişken değil	Değişken değil	Değişken
Bağ gücü	Zayıf	Güçlü	Güçlü	Orta	Güçlü
Uygulanabilirlik	Düşük	Düşük	Yüksek	Orta	Orta
Maliyet	Düşük	Orta	Düşük	Düşük	Yüksek

2.6. İmmobilizasyonda Kullanılan Destek Malzemeleri

İmmobilize enzimlerin özellikleri, hem enzimin hem de destek malzemesinin özelliklerine bağlıdır. Bu nedenle destek malzemesi seçimi oldukça önemlidir. Doğru bir şekilde seçilen destek, immobilize sistemin işlevsel performansını önemli ölçüde artırabilmektedir. Destek malzemeler suda çözünmeyen, ısı ve kimyasal olarak kararlı ve mikrobiyolojik saldırılara karşı dirençli olmalıdır. Destek malzemesinin proteinlere karşı yüksek ilginliğe sahip olması ve enzimlere daha kolay bağlanabilmesi için fonksiyonel gruplara sahip olması gerekmektedir. Ayrıca hidrofiliklik, mekanik stabilite ve sertlik, yenilenebilirlik, hazırlama kolaylığı, uygun yüzey alanı ve geçirgenlik gibi özelliklere de sahip olması gerekmektedir. Aynı zamanda bu malzemeler ekonomik olmalı ve biyolojik olarak parçalanabilir olmalıdır. Bu özelliklere sahip malzemeler, kirleticilerin giderilmesi için lakkazın uygulanabilirliğini artırmaktadır [41].

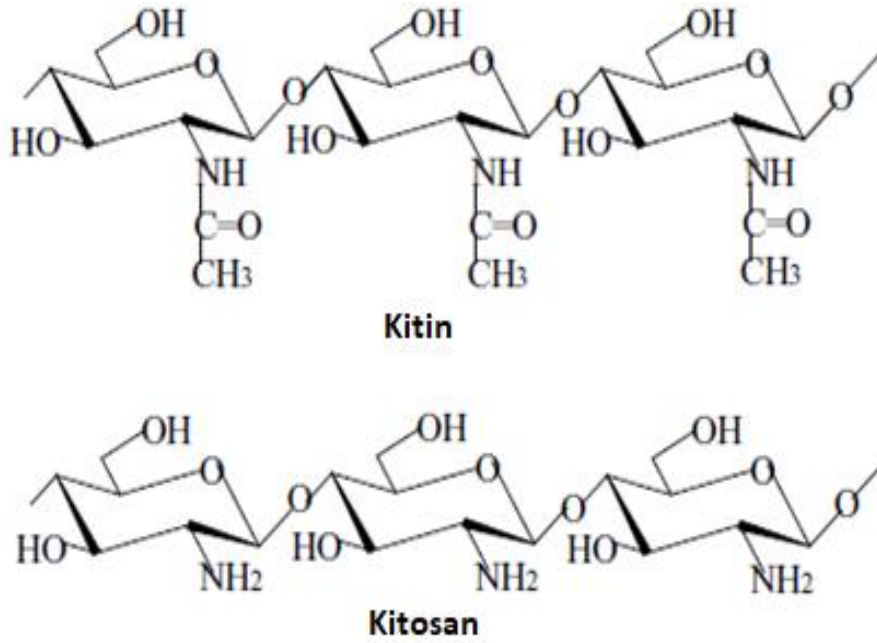
Enzim immobilizasyonunda kullanılan destek malzemeleri organik ve inorganik kökenli olarak iki ana sınıfa ayrılmaktadır (Şekil 2.11). Bu malzemelerden özellikle polimer olanları üretim kolaylığı ve enzim immobilizasyonu için modifiye edilebilmesi nedeniyle son yıllarda ilgi çekici olmuştur. Enzim moleküllerinin girebileceği boyutta gözenekleri olan polimerler ticari olarak elde edilebileceği gibi, laboratuvar ortamında da üretilmektedir.



Şekil 2.11. İmmobilizasyonda kullanılan destek malzemelerinin sınıflandırılması [37]

2.6.1. Kitosan

Kitosan (CTS); böceklerin iskeletinde, yengeç, karides, ıstakoz ve kril gibi kabuklu su ürünlerinin ana bileşeni olan ve mantarların hücre duvarında bulunan kitin maddesinin bir türevidir. Kitin ve kitosan doğal poliaminosakkaritlerdir (Şekil 2.12), kitin dünyanın en bol, yenilenebilir organik kaynaklarından biridir.



Şekil 2.12. Kitin ve kitosanın kimyasal yapısı [42]

Kitosan polisakkaritinin kullanıldığı pek çok alan bulunmaktadır. Bu alanlardan bazıları; tıp, ziraat, biyoteknoloji, tekstil, gıda endüstrileri, su arıtım prosesleri ve kozmetiktir. Kitosanın bu alanlardaki özgün kullanımlarına Çizelge 2.4’te yer verilmiştir.

Çizelge 2.4. Kitosanın kullanım alanları [43]

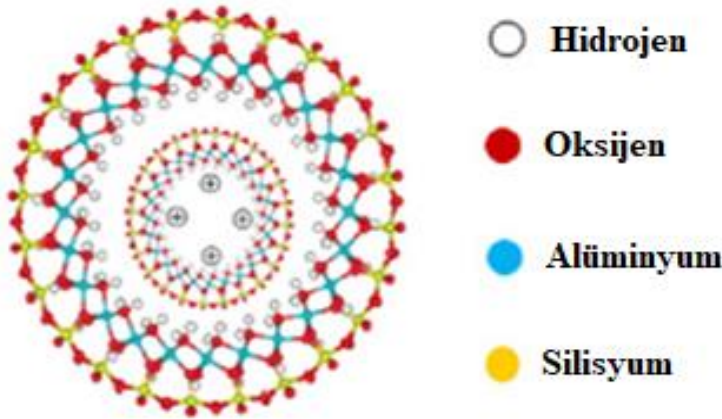
Alan	Kullanım
Tıp	Yara bandı ve sargı bezi yapımı Yanıkların tedavi edilmesi Kan pıhtılaştırıcı İlaç salımı
Ziraat	Bitki katkı maddeleri Antimikrobiyal maddeler Gübre yapımı Böcek ilaçları
Biyoteknoloji	Enzim immobilizasyonu Kromatografik yöntemler
Tekstil	Yünlü kumaşlara çekmezlik sağlama Reaktif boyamada Pamuğa boyanabilirlik kazandırma
Gıda	Kıvamlaştırıcı Yiyecek ve hayvan yemlerinde katkı maddesi Zayıflatma maddeleri
Su arıtımı	Atık sularda pıhtılaştırma ve çökeltme Metal iyonu uzaklaştırma
Kozmetik	Saç şekillendiriciler Cilt nemlendiriciler

Kitosanın biyoteknolojik uygulamalarda kullanımı, kitine göre daha üstünlük içerir. Kitini çözmek için zehirli özellikte olabilen çözücüler kullanılırken, kitosanın seyreltik asetik asit içinde kolayca çözünebilmesi ve birçok kimyasal tepkime için gereken aktif kısma yani serbest amin ($-NH_2$) gruplarına sahip olması kitosana olan ilgiyi artırmıştır [44].

Kitin ve kitosanın en önemli özelliklerinden biri de; biyobozunur polimerler olduklarından dolayı çevre dostu materyaller olması ve insan sağlığı ve doğal çevre için güvenli olmasıdır. Ancak, kitosanın mekanik dayanım ve ısı kararlılık açısından bazı sınırlamaları vardır. Bu sakıncaları önlemek için ve kitosan anayapısını güçlendirmek için halloysit gibi çeşitli dolgu maddeleri kullanılmaktadır [45].

2.6.2. Halloysit

Halloysit (HNT) $Al_2Si_2O_5(OH)_4 \times nH_2O$ kimyasal formülüne sahip, topraklarda bulunan doğal bir allüminosilikat killere aittir. Birkaç magmatik ve magmatik olmayan kaya türlerinin aşınması ile oluşmaktadır. Çoğunlukla ıslak tropik aşınmış kayalarda bulunmaktadır. İçi boş nano tüpler biçiminde bir yapıya sahip olan HNT, alüminyum ve silisyum dioksitten oluşmaktadır (Şekil 2.13). Genel olarak, HNT'lerin uzunluğu 0.2–1.5 mm arasındadır [45].



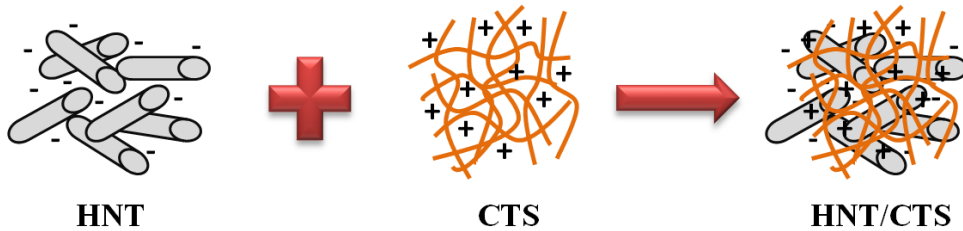
Şekil 2.13. Halloysit nano tüpünün şematik gösterimi [10]

Halloysitin su tutma kapasitesi ve iyon değiştirme gücü yüksektir. Halloysit tarafından bileşiklerin adsorplanmasında birçok etken bulunmaktadır. Bunlar; adsorbe edilecek bileşiklerin büyüklüğü, kimyasal yapıları, halloysitin yapısındaki tabakaların polar olması

ve bu tabakalar arasında bulunan katyonların türüdür. Halloysitin tetrahedral tabakasında bulunan Al^{3+} ve Si^{4+} iyonlarının birbirleriyle yer değiştirmesi sonucunda negatif bir net yük oluşmaktadır. Genellikle anyonik bir yüzeye sahiptirler.

Çevre dostu olmaları, bol bulunabilirliği ve biyouyumlulukları nedeniyle halloysit kullanımı birçok çalışmada ilgi çekici olmuştur. Halloysitlerin kullanıldığı alanların bazıları; doku mühendisliği, enzim immobilizasyonu, ilaç dağıtımı, kanser hücresi izolasyonu, kemik implantı ve kozmetik sektörüdür [46].

Enzim immobilizasyonunda destek materyali olarak kitosan ve halloysitten oluşan kompozitler kullanılabilir (Şekil 2.14). Bu iki materyalin bir araya gelmesiyle daha kararlı ve gelişmiş özelliklere sahip bir destek malzemesi meydana gelmektedir. Kitosanın yapısında bulunan amingruplarının ($-NH_2$) asidik ortamlarda $-NH_3^+$ formunda bulunmaları ve halloysitin de anyonik yüzeye sahip olması nedeniyle oluşan bir elektrostatik çekim ve hidrojen bağlarının da etkisiyle CTS/HNT kompoziti oluşmaktadır. Oluşan bu kompozitin zehirli olmaması, biyolojik olarak parçalanabilmesi ve çevre dostu olması önemli üstünlüklerindendir. Ayrıca CTS/HNT kompoziti ile tıbbi atık sularda bulunan ilaç giderimi gerçekleştirilebilirken aynı zamanda bu kompozit ilaç taşıyıcı sistemlerde ve doku mühendisliği uygulamalarında da kullanılabilir [8].

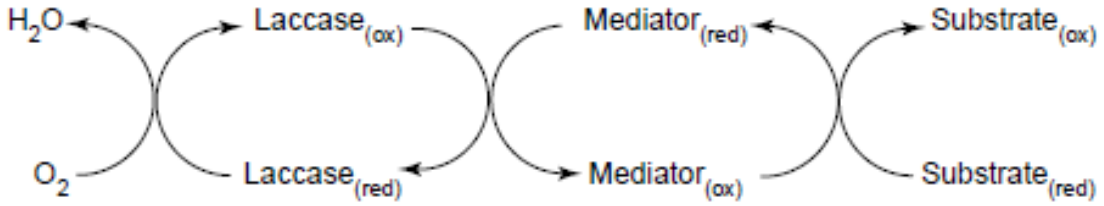


Şekil 2.14. CTS/HNT kompoziti

2.7. Lakkaz Medyatörleri

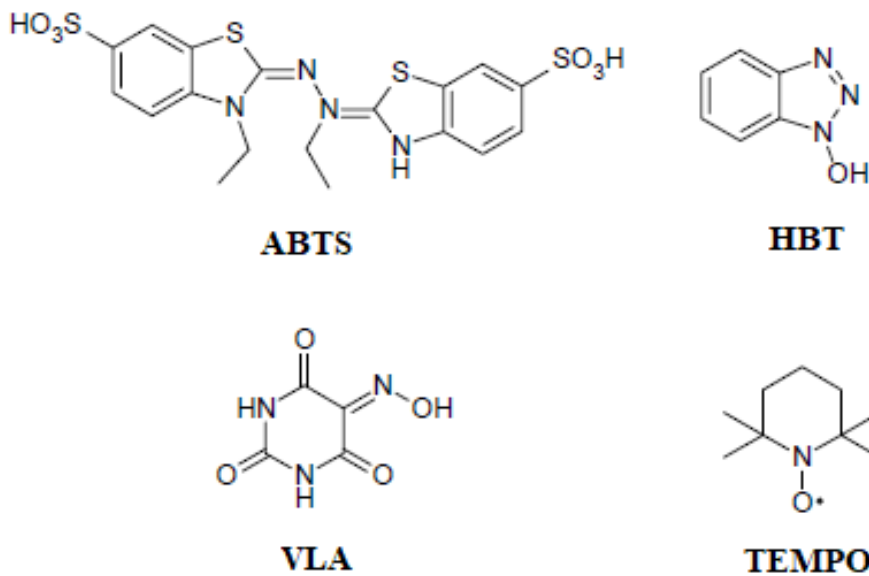
Lakkaz enzimi, düşük redoks potansiyeli ($\leq 0,8$ V) nedeniyle yalnızca fenolik bileşikleri oksitleyebilmektedir. Bununla birlikte medyatör olarak adlandırılan, yüksek redoks potansiyeline ($> 0,9$ V) sahip, düşük moleküler ağırlıklı doğal bileşiklerin varlığında lakkaz uygulaması, fenolik olmayan bileşiklerin veya yüksek redoks potansiyelli diğer bileşiklerin oksidasyonunu mümkün kılmaktadır [12,47].

Medyatörler, enzim tarafından oksitlendikten sonra katalitik sistemden uzaklaşır ve büyük boyutundan dolayı enzimin aktif bölgesine giremeyen veya yüksek redoks potansiyeli nedeniyle enzim tarafından doğrudan oksitlenemeyen substratları oksitlemektedir (Şekil 2.15). İdeal bir redoks medyatörü, iyi bir lakkaz substratı olmalıdır, oksitlenmiş ve indirgenmiş formları kararlı olmalı ve enzimatik tepkimeyi inhibe etmemelidir [48].



Şekil 2.15. Lakkaz-medyatör sisteminin katalitik döngüsü [11]

Lakkaz-medyatör sisteminde ilk kullanılan medyatör ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)'dir [47]. HBT (1-Hidroksibenzotriazol), TEMPO ((2,2,6,6-Tetrametilpiperidin-1-il)oksil) ve VLA (violurik asit) gibi birçok bileşik de lakkaz medyatörü olarak kullanılmaktadır (Şekil 2.16).



Şekil 2.16. Lakkaz medyatörleri [11]

Substratın oksidasyonu, ABTS varlığında substrata bir elektron aktarım mekanizması ile, HBT ve VLA varlığında (substratta zayıf C-H bağları bulunuyorsa) hidrojen atomunun aktarım mekanizması ile ve TEMPO varlığında ise farklı bir mekanizma olan iyonik oksidasyon ile gerçekleşmektedir [49].

Lakkaz enzimi ile boyar madde giderim çalışmalarında, medyatör kullanılması lakkazın katalitik aktivitesini artırmakta ve parçalanmaya karşı dirençli bileşiklerin oksidasyonunu kolaylaştırmaktadır.

2.8. Boyar Madde Giderimi

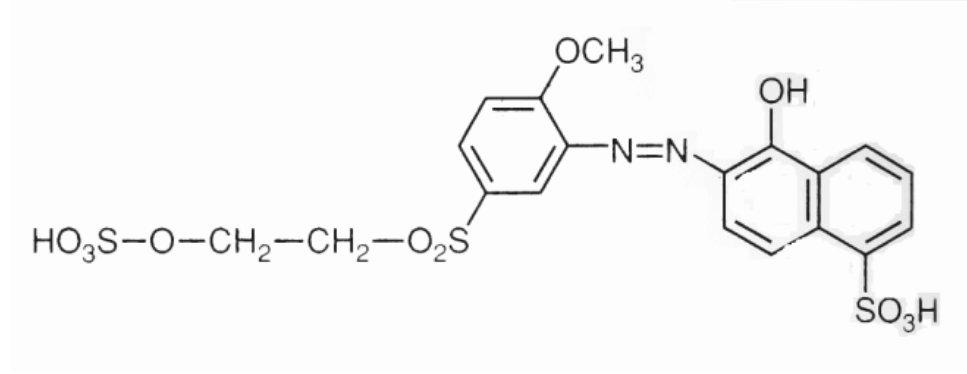
İlk çağlardan beri insanlar gerek mağaralarda, gerekse derilerinde ve giysilerinde renklendirme yapmaya gerek duymuşlardır. Bunun için manganez oksit, hematit, okra, kurum gibi doğal kökenli boyalar kullanmışlardır. Doğal tekstil boyaları da temel olarak bitki, böcek, mantar ve likenlerden elde edilmiştir. İlk yapay boya olan mauveine (leylak rengi), 1856 yılında, William Henry Perkin tarafından keşfedilmiştir. Günümüzde bu boyaların en büyük tüketicisi tekstil endüstrisidir [50].

Bir bileşiğin renkli olabilmesi için, görünür aralıktaki (380-780 nm) ışınımı absorplaması gerekmektedir. Bu özellik kromofor ve oksokrom adı verilen iki farklı gruptan kaynaklanmaktadır. Kromofor grubu belirgin olarak elektron çekme grubu olup bileşiğin renginden sorumludur. Oksokrom ise kromoforun rengini yoğunlaştıran, boyanın liflere bağlanmasını ve çözünürlüğü sağlamakta olan gruptur [51].

2.8.1. Remazol red RR boyar maddesi

Renklerinin parlak olması, renk sabitlenmesi ve kolay uygulanabilirliği nedeniyle tekstil endüstrisinde geniş kullanımı bulunan reaktif boyalar, kromoforlarına göre birçok gruba ayrılabilir. Bunlardan en önemlileri; azo, antrakınon, ftalosiyenin, triarilmetan, klorotriazin ve vinil sülfon boyalarıdır [52]. Vinil sülfon boyaları; pamuk, ipek ve yün için etkili bir şekilde kullanılan bir reaktif boya sınıfıdır. Ayrıca ilk tanıtıldıkları ticari markalı isimden sonra ‘remazol’ boyaları olarak da bilinmektedirler. Şekil 2.17’de bu çalışmada giderimi gerçekleştirilen, bir vinil sülfon boya olan remazol red RR boyar maddesinin yapısı verilmiştir. İlk olarak 1956 yılında piyasaya sürülmüştür. Bu boyar madde genellikle

pamuk ve elyafla kovalent bağ oluşturmaktadır. Yün ve naylon üzerinde ise az miktarda kullanılmaktadır [53].

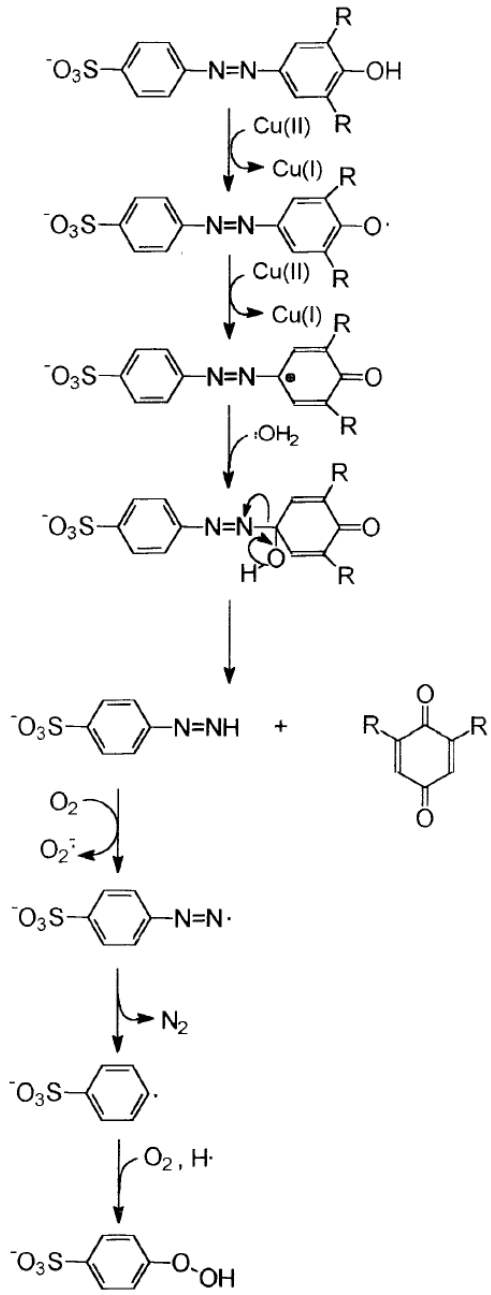


Şekil 2.17. Remazol red RR boyar maddesinin yapısı [53]

Vinil sülfon boyaları diğer boyar maddelere göre daha az reaktiftir. Bu nedenle bu boyaların büyük bir kısmı boyama banyosunda kalmaktadır ve endüstriyel atık su olarak boşaltılmaktadır. Bu tür boyar maddelerin atık sularda bulunması suda çok fazla kirliliğe neden olmaktadır.

Boyalar atık sularda bilinen ilk kirleticilerdendir. Suda çok az miktarda bulunması bile (1 ppm) gözle görülebilmektedir. Atık sularda bulunan boyar maddeler suyun yalnızca doğal rengini değil, aynı zamanda göl, nehir ve su kütlelerinde bulunan sucul ekosistemi ve ışığın emilimini/yansımasını da etkilemektedir. Birçok yapay boya zehirli ve kanserojendir. Ülkemizde Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü'nün 29.12.1994 tarihli 15488 sayılı genelgesi ile 1 Mart 1995 tarihinden itibaren zararlı olduğu belirtilen boyar maddelerin kullanımı yasaklanmıştır [54].

Tekstil endüstrisinde kullanılan boyar maddeler ışığa, suya, çeşitli kimyasallara ve mikrobiyal saldırılara karşı kararlı olacak şekilde sentezlenmektedir. Bu inatçı doğaları nedeniyle ağartılmaları zor olduğundan alıcı su ortamlarına boşaltılmadan önce atık sulardan uzaklaştırılmaları gerekmektedir. Bölüm 2.4'te bahsedildiği gibi; çevreyi, sucul ekosistemi ve insan sağlığını tehdit eden bu boyar maddelerin giderimi lakkaz enzimi ile mümkün olmaktadır. Lakkazın boyar maddeyi giderim mekanizması Şekil 2.18'de verilmiştir.



Şekil 2.18. Fenolik azo boyasının lakkaz ile oksidasyonu [55]

3. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

Son yıllarda serbest ve immobilize lakkaz enzimi ile yapılan boyar madde giderim çalışmalarının bir kısmı aşağıda verilmiştir.

Lu ve diğ. (2007) sentezledikleri kitosan/aljinat mikrokapsüllerine lakkaz enzimini immobilize etmişlerdir. Serbest ve immobilize enzim aktivitesine pH ve sıcaklığın etkisini incelemişlerdir. Serbest enzim için en uygun pH 3 iken immobilize enzim için en uygun pH 4,5 olmuştur. En uygun sıcaklık ise serbest enzim için 60°C ve immobilize enzim için 65°C olarak bulunmuştur. Alizarin red boyar maddesinin giderim çalışmaları medyatörsüz ve medyatör olarak ABTS kullanılacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Medyatörsüz giderim gözlenmezken ABTS varlığında serbest enzimle %66 giderim elde edilirken immobilize enzimle yaklaşık %40 giderim gözlenmiştir. Bu durumun immobilize enzimdeki difüzyon sınırlamasından kaynaklandığını bildirmişlerdir [56].

Dai ve diğ. (2010) yaptıkları çalışmada, *Tremates versicolor*'dan elde edilen lakkaz enzimini elektrospinleme ile sentezledikleri poli (D,L-laktit) mikrofiberlerine kapsülleme yöntemiyle immobilize etmişlerdir. Lakkaz aktivitesine depolama etkisi incelenmiştir. 2 hafta boyunca depolanan serbest ve immobilize lakkaz enziminin bu süre sonunda aktiviteleri belirlenmiştir. Serbest enzim aktivitesinin %80'ini kaybederken immobilize enzim ise yaklaşık %50'sini korumuştur. Serbest ve immobilize enzim ile crystal violet boyar maddesinin giderim çalışmaları gerçekleştirilmiştir Serbest enzim ile medyatör olmadan giderimin çok yavaş olduğu gözlenirken medyatör olarak ABTS kullanıldığında giderimin %92'ye ulaştığı gözlenmiştir. İmmobilize enzim ile medyatör varlığında gerçekleştirilen boyar madde giderim çalışmasında ise %80 giderim elde edilmiştir. Bunun nedeninin difüzyon sınırlaması olduğunu belirtmişlerdir. Serbest ve immobilize enzim ile gerçekleştirilen boyar madde giderimine pH'ın etkisi incelenmiştir. Serbest enzimle en yüksek giderimi pH 4'te elde edilirken, immobilize enzimle en yüksek giderim pH 6'da elde edilmiştir. İmmobilize enzimin 10 kez tekrar kullanımı sonunda aktivitesinin %53'ünü koruduğu gözlenmiştir [57].

Sadighi ve Faramarzi (2013) yaptıkları çalışmada; *Paraconiothyrium variabile*'den üretilen lakkaz enzimini kitosan ve cam kürelerine immobilize etmişlerdir. Çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit kullanmışlardır. Aktiviteye pH ve sıcaklık etkisi

incelenmiştir. En uygun pH serbest ve immobilize enzim için 5 olarak kaydedilmiştir. En uygun sıcaklık ise serbest enzim için 30°C iken, immobilize enzim için 100°C'ye kadar yükselmiştir. Congo red boyar maddesinin giderimi gerçekleştirilirken medyatör etkisi incelenmiştir. Immobilize enzim ile Congo red gideriminin, medyatör olarak HBT kullanıldığında %60, medyatör kullanılmadığında ise giderimin yaklaşık %30 olduğu bildirilmiştir. Immobilize enzimin 25 kez yeniden kullanımı sonunda aktivitesinin %98-99'unu koruduğu görülmüştür [58].

Xu ve diğ. (2013) yaptıkları çalışmada *Trametes versicolor*'dan elde edilmiş lakkaz enzimini kitosan/poli vinil alkol kompozitinden sentezledikleri nanofibröz membranlara glutaraldehit ile immobilize etmişlerdir. Serbest ve immobilize enzim aktivitesine pH ve sıcaklığın etkisini incelemişlerdir. Serbest enzim ve immobilize enzim için optimum pH 4 bulunmuştur. En uygun sıcaklık ise serbest ve immobilize enzim için 40°C olarak belirlenmiştir. Depolama stabilitesi incelendiğinde; 10 günün sonunda serbest enzimin aktivitesinin %20'sini koruduğu, immobilize enzimin ise aynı süre sonunda aktivitesinin %60'ını koruduğu gözlenmiştir. Immobilize enzimi 2,4-diklorofenol gideriminde kullanmışlar ve giderimin yaklaşık %87 olduğunu bildirmişlerdir. Immobilize enzim 7 kez yeniden kullanım sonunda %54 giderim sağlamıştır [59].

Yang ve diğ. (2014) *Cerrena sp.*'den lakkaz enzimi üretim çalışmaları gerçekleştirmişlerdir. Ürettikleri lakkaz ile 25 farklı boyar maddenin giderimini yapmışlardır. Lakkaz enziminin çalıştığı en uygun koşulları (pH ve sıcaklık) belirlemişlerdir. En uygun pH 3 ve en uygun sıcaklık 45°C olarak bulunmuştur. Gerçekleştirdikleri 25 adet farklı boyar maddenin giderim çalışmalarında %50 ile %98 arasında boyar madde giderim verimini sağlamışlardır [60].

Satishkumar ve diğ. (2014); çalışmalarında lakkaz enzimini selüloz nanofiber üzerine immobilize etmişlerdir. Lakkaz enziminin çalıştığı en uygun koşulları belirlemişlerdir. Serbest lakkaz için en uygun pH 5,5 ve immobilize lakkaz için en uygun pH 6,5 olarak belirlenmiştir. En uygun sıcaklık ise serbest lakkaz için 30°C ve immobilize enzim için 30-40°C arasında olmuştur. Immobilize ettikleri lakkaz enzimini simüle boya atığı gideriminde kullanmışlardır. Giderim, medyatörsüz ve medyatör olarak HBT ile siringaldehit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Medyatör olmadan immobilize enzim ile %37 giderim gerçekleşirken, HBT varlığında %70 ve siringaldehit varlığında ise %56

giderim sağlanmıştır. İmmobilize lakkaz 10 kez tekrar kullanıldığında yaklaşık %50 giderim sağlarken aktivitesinin de %67'sini korumuştur [61].

Lin ve diğ. (2015) yaptıkları çalışmada; *Trametes versicolor*'dan elde edilen lakkaz enzimini kitosan/CeO₂ kürelerine glutaraldehit ile immobilize etmişlerdir. Enzim aktivitesine pH ve sıcaklığın etkisi incelenerek hem serbest hem immobilize için en uygun pH 6, en uygun sıcaklık ise 35°C olmuştur. Serbest ve kitosan/CeO₂ kürelerine immobilize edilmiş lakkaz ile Methyl Red ve Orange II boyalarının giderimi gerçekleştirilmiştir. Methyl Red giderimi serbest ve immobilize enzim için sırasıyla %49 ve %83, Orange II giderimi ise %67 ve %92 olarak elde edilmiştir. Kitosan/CeO₂ kürelerine immobilize edilmiş lakkaz enziminin 10 kez kullanımının sonunda aktivitesinin %60'ının korunduğu gözlenmiştir [62].

Sun ve diğ. (2015), poliakrilamid/kitosan hidrojel sentezleyerek lakkaz enzimini bu hidrojele immobilize etmişlerdir. Lakkaz aktivitesine pH etkisini incelemişlerdir. Serbest lakkaz için en uygun pH 6 ve immobilize enzim için en uygun pH 5 olarak bulunmuştur. İmmobilize lakkaz enzimi ile malachite green boyar maddesinin giderimi gerçekleştirilmiştir. Boyar madde gideriminde immobilize lakkaz enzimini 5 kez yeniden kullanmışlardır. Bu kullanımın sonunda %70 giderim elde edilmiştir [63].

Köklükaya ve diğ. (2016), çalışmalarında sentezledikleri poli(akrilamit-krotonik asit)/aljinat hidrojellerine *Trametes versicolor*'dan elde edilen lakkaz enzimini immobilize etmişlerdir. Aktiviteye pH ve sıcaklık etkisine bakılmıştır. Serbest enzim için en uygun pH 5 iken, immobilize enzim için 5,5'tir. En uygun sıcaklık; serbest enzim için 40°C ve immobilize enzim için 50°C olarak kaydedilmiştir. 42 günlük depolama sonunda serbest enzimin aktivitesi %55 korunurken, immobilize enzimin aktivitesi %71 korunmuştur. Boyar madde giderim çalışmalarında serbest ve immobilize enzim ile Acid Orange 52 boyar maddesinin giderimi gerçekleştirilmiştir. Serbest enzim ile %63 giderim gerçekleşirken ortama medyatör olarak ABTS eklendiğinde giderim %73 olmuştur. İmmobilize enzim ile yapılan giderim de %73'tür. İmmobilize enzim, 10 kez yeniden kullanımının sonunda aktivitesinin %62'sini korumuştur [64].

Jaiswal ve diğ. (2016) yaptıkları çalışmada; papaya yapraklarından elde ettikleri lakkaz enzimini, kitosan kürelerine immobilize ederek indigocarmine boyasının gideriminde

kullanmışlardır. Serbest ve immobilize enzim aktivitesine pH ve sıcaklığın etkisine bakılarak, en uygun pH'ın sırasıyla serbest ve immobilize enzim için 8 ve 10 olduğunu; en uygun sıcaklığın ise serbest enzim için 70°C, immobilize enzim için 80°C olduğunu bildirmişlerdir. Indigocarmine boyar maddesinin giderimi serbest enzim kullanıldığında %56 iken, immobilize enzim kullanıldığında %100'e ulaşmıştır. 4 kez kullanım sonunda; kitosan kürelerine immobilize edilmiş lakkaz enziminin, boyar maddenin %17'sini giderebildiği görülmüştür [7].

Dai ve diğ. (2016); *Pleurotus ostreatus*'tan elde edilmiş lakkaz enzimi ile boya giderim çalışmaları yapmışlardır. Lakkaz enzimini, hazırladıkları Fe₃O₄/SiO₂ nanopartiküllerine immobilize etmişlerdir. Çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit kullanılmıştır. Procion Red MX-5B boyar maddesinin, serbest enzim ve immobilize enzim kullanılarak giderimi gerçekleştirilmiştir. Serbest enzim ile boyar maddenin yalnızca %16,5'i giderilirken, immobilize enzim ile boyar maddenin yaklaşık %99'u giderilmiştir. 5 ay depolama süresinin sonunda %96 verimle giderim yapmıştır. Fe₃O₄/SiO₂ nanopartiküllerine immobilize edilen lakkaz enziminin, 50 kez yeniden kullanımının sonunda boyar maddenin %50'sini giderdiği görülmüştür [6].

Zheng ve diğ. (2016) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, *Trametes pubescens*'ten üretilen lakkaz enzimi ile Acid Black 172 boyar maddesinin giderimi yapılmıştır. Araştırmacılar, lakkaz enzimini çapraz bağlama yöntemiyle kitosan kürelerine immobilize ederken, çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit kullanmışlardır. Serbest ve immobilize enzim aktivitesine pH ve sıcaklığın etkisi incelenmiştir. Serbest enzimin çalıştığı en uygun pH değeri 4,5 iken, immobilize enzimin en uygun pH değeri 5'e yükselmiştir. En uygun sıcaklık ise serbest ve immobilize enzim için sırasıyla 50°C ve 60°C'dir. 30 gün boyunca depolanan serbest ve immobilize enzim, bu süre sonunda sırasıyla aktivitelerinin %15'ini ve %30'unu korumuşlardır. Acid Black 172 boyar maddesini; serbest enzim %56 oranında gidermiştir. Immobilize enzim ise boyar maddenin %68'ini gidermiştir. Kitosan kürelerine immobilize edilen enzimin 14 kez tekrar kullanımı sonunda aktivitesinin %20'sini koruduğu görülmüştür [65].

Alver ve diğ. (2017); *Trametes versicolor*'dan elde edilen lakkaz enzimini adsorpsiyon yöntemiyle Cu(II) şelatlı kitosan nanopartiküllerine immobilize etmişlerdir. Serbest ve immobilize enzim aktivitesine pH ve sıcaklığın etkisini incelemişlerdir. Serbest enzim için

en uygun pH 5,5 ve immobilize enzim için en uygun pH 6 bulunmuştur. En uygun sıcaklığın ise serbest enzim için 30°C ve immobilize enzim için 30-40°C arasında olduğu görülmüştür. Fenol gideriminde kullandıkları immobilize lakkaz ile medyatörlü ve medyatörsüz olarak çalışmışlardır. Medyatör kullanılmadığında fenol giderimi %80'in altına olmuş ve medyatör olarak ABTS kullanıldığı zaman fenol giderimi %86 olmuştur. 8 kez yeniden kullanılan immobilize enzimin bu kullanım sonucu aktivitesinin %50'sini koruduğu görülmüştür [66].

Li ve diğ. (2017) yaptıkları çalışmada bakteriyel selüloz/TiO₂ kompozit membranlara lakkaz enzimini immobilize etmişlerdir. Serbest ve immobilize enzim için en uygun çalışma koşullarını belirlemişlerdir. Serbest enzim için en uygun pH 3,5 iken immobilize enzim için en uygun pH 2,5 olmuştur. Enzim aktivitesine sıcaklığın etkisini inceledikleri zaman; serbest enzim için en uygun sıcaklığın 55°C ve immobilize enzim için 50°C olduğu görülmüştür. Immobilize ettikleri lakkaz enzimini reactive red X-3B boyar maddesinin giderim çalışmalarında kullanmışlardır. 10 kez yeniden kullanım sonucunda ise enzimin aktivitesinin %57'den fazlasını koruduğu görülmüştür [5].

Bagewadi ve diğ. (2017); *Trichoderma harzanium*'dan ürettikleri lakkaz enzimi ile boyar madde giderim çalışmaları yapmışlardır. Lakkaz enzimi, Ca-aljinat/kitosan kürelerine immobilize edilmiştir. Enzim aktivitesine pH ve sıcaklığın etkisi incelenmiştir. Serbest ve immobilize enzim için en uygun pH sırasıyla 5 ve 6'dır. En uygun sıcaklık ise serbest enzim ve immobilize enzim için aynı olup 50°C'dir. Malachite green boyası ile giderim çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Medyatörlü ve medyatörsüz ortamda giderim yapılmıştır. Medyatör olarak HBT kullanıldığında %85 giderim gerçekleşirken medyatör kullanılmadığında giderim %78 olmuştur [67].

Asgher ve diğ. (2017) boyar madde giderim çalışması gerçekleştirmişlerdir. *Trametes versicolor*'dan ürettikleri lakkaz enzimini, kitosan kürelerine çapraz bağlama yöntemi ile immobilize etmişlerdir. Çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit kullanılmıştır. Enzim aktivitesine pH ve sıcaklığın etkisi incelenmiştir. En uygun pH, serbest ve immobilize lakkaz enzimi için sırasıyla 5 ve 6 olarak kaydedilmiştir. En uygun sıcaklık ise; serbest enzim için 45°C, immobilize enzim için 60°C'dir. 28 günlük depolama süresinin sonunda serbest enzim, aktivitesinin %46'sını; immobilize enzim ise %87'sini korumuştur. Sandal-fix Red C₄BLN tekstil boyasının; serbest enzim ile %67'si, immobilize enzim ile %98'i

giderilmiştir. Boyar madde gideriminde immobilize enzimin 10 kez kullanımının sonunda aktivitesinin %80'ini koruduğu sonucu elde edilmiştir [4].

Ma ve diğ. (2018) gerçekleştirdikleri çalışmalarda; *Trametes pubescens*'den elde edilmiş lakkaz enzimini, kitosan kürelerine çapraz bağlama yöntemiyle immobilize etmişlerdir. Çapraz bağlayıcı olarak genipin kullanılmıştır. Lakkaz aktivitesine pH ve sıcaklığın etkisi incelenmiş, serbest ve immobilize enzim için en uygun pH sırasıyla 5 ve 4,5; en uygun sıcaklık ise 50°C ve 55°C olarak kaydedilmiştir. 30 günlük depolamanın sonunda serbest enzim aktivitesinin %15'ini korurken, immobilize enzim aktivitesinin %57'sini korumuştur. Naphtol Green B boyasının giderim çalışmalarında serbest ve immobilize enzimin boyar madde giderimi sırasıyla %38 ve %65 olmuştur. İmmobilize enzimin 14 kez yeniden kullanımı sonucu aktivitesinin %45'ini koruduğunu bildirmişlerdir [24].

Salami ve diğ. (2018) gerçekleştirdikleri tekstil boyar maddelerinin giderim çalışmalarında; *Myceliophthora thermophila*'dan elde edilen lakkaz enzimini kullanmışlardır. Lakkaz enzimini sentezledikleri silika-epoksi desteklerine immobilize etmişlerdir. pH ve sıcaklığın aktiviteye etkisi incelenmiştir. Serbest lakkaz enziminin en uygun pH değeri 4 iken, immobilize lakkaz enziminde en uygun pH 5 olmuştur. En uygun sıcaklık ise hem serbest hem de immobilize enzim için 35°C olarak bulunmuştur. Çeşitli boyaların kullanıldığı boyar madde giderim çalışmalarında ortama medyatör eklenerek giderime etkisi incelenmiştir. Malachite green boyasının gideriminde; medyatör kullanılmadığında verim %57 iken, medyatör olarak HBT kullanıldığında verim %96'ya ulaşmıştır. İmmobilize enzimin tekrar kullanım çalışmalarında, Malachite green boyasının gideriminde 8. kez kullanıldığında aktivitesinin %61'ini koruduğunu ortaya koymuşlardır [3].

4. DENEYSEL ÇALIŞMA

4.1. CTS/HNT Kürelerinin Hazırlanması

Kullanılan kimyasallar:

- Kitosan (Sigma-Aldrich)
- Halloysit (Sigma-Aldrich)
- %1 Asetik asit çözeltisi
- 1 M NaOH çözeltisi

Deneyin yapılışı:

%1'lik asetik asit çözeltisinden 100 mL alınıp içerisine %0-2 (ağırlık/hacim) olacak şekilde farklı miktarlarda halloysit eklenerek 1 saat boyunca karıştırılmıştır. Halloysit ortama iyice dağıldıktan sonra içine kitosan oranı %1-3 (ağırlık/hacim) arasında olacak şekilde farklı miktarlarda kitosan eklenmiştir. Kitosan ve halloysit oranları Çizelge 4.1'de verilen miktarlara göre hazırlanan jel kıvamındaki karışım, homojen oluncaya kadar 3 saat boyunca karıştırılmıştır. Elde edilen jel, şırınga yardımı ile 1 M NaOH çözeltisine damlatılarak küreler oluşturulmuştur. Kürelerin yapısının stabil olması için, küreler 1 M NaOH çözeltisinde 2 saat boyunca karıştırılmıştır. Küreler süzgeç kağıdı ile süzülmüş, saf suyla yıkanmış ve sonra kullanılmak üzere pH 5 tampon çözeltisinde 4°C'de saklanmıştır.

Çizelge 4.1. Küre sentezinde kullanılan kitosan ve halloysit oranları

Kitosan	Halloysit
%1	%0
	%0,5
	%1
	%2
%2	%0
	%0,5
	%1
	%2
%2,5	%0
	%0,5
	%1
	%2
%3	%0
	%0,5
	%1
	%2

4.2. Enzim İmmobilizasyonu

Kullanılan kimyasallar:

- Glutaraldehit çözeltisi
- *Trametes versicolor*'dan elde edilmiş lakkaz enzimi (>0,5 U, Sigma-Aldrich)
- CTS/HNT küreleri

Deneyin yapılışı:

Enzimi kürelere immobilize etmeden önce çapraz bağlayıcı olarak kullanılan glutaraldehit çözeltisi içerisinde küreler 2 saat bekletilmiştir. Glutaraldehit derişimi %0,5-1,5 (hacim/hacim) olarak değıştirilmiş ve enzim immobilizasyon verimine etkisi incelenmiştir. Enzim immobilizasyon verimine enzim hazırlama çözeltisinin derişiminin etkisini incelemek için 1, 2 ve 3 mg/mL derişimlerinde enzim çözeltisi hazırlanmış ve bu çözeltilerle immobilizasyon gerçekleştirilmiştir. Küreler immobilizasyon için enzim çözeltisi içerisinde 4°C'de 24 saat boyunca bekletilmiştir. İmmobilizasyonun tamamlanmasından sonra küreler süzölmüş ve yıkanmıştır. İmmobilize enzimin aktivitesi ve çözeltide kalan protein miktarı belirlenmiş ve daha sonra boyar madde giderimi çalışmaları kullanılmıştır.

4.3. Karakterizasyon Çalışmaları

Hazırlanan kürelerin morfolojisini ve kristal yapısını incelemek amacıyla karakterizasyonu yapılmıştır. Saf kitosan, saf halloysit, CTS/HNT küreleri ve lakkaz immobilize edilmiş CTS/HNT kürelerinin karakterizasyon çalışmalarında kullanılabilmesi için -20°C'de dondurulmuş ve -80°C'de liyofilizatör kullanılarak kurutulmuştur. Ardından, kuruyan örnekler havanda öğütölerek toz haline getirilmiştir. Örneklerin SEM, FT-IR ve XRD analizleri yapılmıştır.

SEM analizi lakkaz enzimi içermeyen CTS/HNT küreleri ile lakkaz enzimi içeren CTS/HNT örnekleri için yapılmıştır. SEM görüntülerinden yola çıkılarak enzimin kürelere bağlanmasıyla yapıda oluşan morfolojik değışiklikler incelenmiştir. SEM analizleri QUANTA 400F Field Emission marka taramalı elektron mikroskopunda

gerçekleştirilmiştir. Örnekler pirinç veya alüminyum örnek tutucu üzerine karbon bantla tutturulmuş ve analiz 20 kV voltajda gerçekleştirilmiştir.

FT-IR analizi ve XRD analizi ise saf kitosan, saf halloysit, CTS/HNT küreleri ve lakkaz immobilize edilmiş CTS/HNT küreleri için yapılmıştır. FT-IR analizleri Perkin Elmer Spectrum 400 marka Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi ile 400-4000 cm^{-1} aralığında yapılmıştır. XRD analizleri ise Rigaku Ultima-IV cihazında 0,01 adım aralığında, $2\theta=2-90^\circ$ aralığında $\text{CuK}\alpha$ (λ : 0,15406 nm) X ışın kaynağı kullanılarak yürütülmüştür. XRD analizlerinden elde edilen veriler Bragg yasası ile değerlendirilmiştir.

4.4. Enzim Aktivitesi

Serbest enzim ve immobilize enzimin aktivitesini hesaplamak için enzim içeren örneğin taşıdığı enzim ünite sayısının ve protein miktarının belirlenmesi gerekmektedir. 1 enzim ünitesi 1 dakikada 1 μmol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

4.4.1. Serbest enzim aktivitesi

Kullanılan kimyasallar:

- *Trametes versicolor*'dan elde edilmiş lakkaz enzimi ($>0,5$ U, Sigma-Aldrich)
- ABTS (Sigma-Aldrich)
- 0,1 M Sodyum asetat tampon çözeltisi

Deneyin yapılışı:

Enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Substrat olarak ABTS kullanılmış ve kullanılan ABTS'nin zamana bağlı absorbans değişimleri kaydedilmiştir. Enzim ünitesi Eşitlik 4.1, enzim aktivitesi Eşitlik 4.2 kullanılarak hesaplanmıştır.

0,1 M sodyum asetat tamponunda 0,5 mM ABTS çözeltisi hazırlanmıştır. Tampon çözelti ile hazırlanan 1 mg/mL derişimindeki enzim çözeltisinden 0,1 mL ve ABTS çözeltisinden 0,9 mL UV küvetine alınmıştır. 25°C 'de 1 dk boyunca, her 5 saniyede bir UV spektrofotometrede 420 nm dalga boyunda absorbans ölçülmüş ve enzim aktivitesi hesaplanmıştır.

$$\text{Spesifik aktivite } \left(\frac{U}{L} \right) = \frac{Abs \times V \times 10^6}{\Delta t \times \varepsilon \times v \times d} \quad (4.1)$$

Abs: Absorbans

V: Toplam örnek hacmi, mL

ε : Ekstinksiyon katsayısı, $M^{-1}cm^{-1}$ (420 nm’de ABTS için $\varepsilon = 36000 M^{-1}cm^{-1}$)

Δt : Tepkime süresi, dk

v: Enzim miktarı, mL

d: Işık yolu, cm

$$\text{Spesifik Aktivite } \left(\frac{U}{mg} \right) = \frac{\text{Ünite}}{\text{protein miktarı}} \quad (4.2)$$

4.4.2. İmmobilize enzim aktivitesi

Kullanılan kimyasallar:

- İmmobilize lakkaz enzimi küreleri
- ABTS (Sigma-Aldrich)
- 0,1 M Sodyum asetat tampon çözeltisi

Deneyin yapılışı:

Serbest enzim için yapılan çalışmada olduğu gibi; aktivite tayini, spektrofotometrik olarak ve ABTS substratının kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Enzim aktivitesi Eşitlik 4.3 kullanılarak hesaplanmıştır.

İmmobilize enzimin aktivitesini belirlemek için öncelikle 0,1 M sodyum asetat tamponunda 0,5 mM ABTS çözeltisi hazırlanmıştır. Tampon çözeltiden 0,1 mL, ABTS çözeltisinden 0,9 mL ve 2 adet immobilize enzim küresi spektrofotometre küvetine alınmıştır. 25°C’de 10 dk boyunca, her 60 saniyede bir UV spektrofotometresinde 420 nm dalga boyunda absorbans ölçülmüş ve enzim aktivitesi hesaplanmıştır.

$$\text{Spesifik Aktivite } \left(\frac{U}{mg} \right) = \frac{Abs \times V \times 10^6}{\Delta t \times \varepsilon \times M \times d} \quad (4.3)$$

Abs: Absorbans

V: Toplam örnek hacmi, mL

ϵ : Ekstinksiyon katsayısı, $M^{-1}cm^{-1}$ (420 nm’de ABTS için $\epsilon = 36000 M^{-1}cm^{-1}$)

Δt : Tepkime süresi, dk

M: İmmobilize edilmiş enzim miktarı, μg

d: Işık yolu, cm

4.5. Protein Tayini

Kullanılan kimyasallar:

- BSA (Sigma Aldrich)
- %0,9 NaCl çözeltisi
- Bradford reaktifi; 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 mL %95’lik etanol içinde çözüldükten sonra, 100 mL %85’lik (w/v) fosforik asit eklenmesiyle hazırlanmıştır. Oluşan çözelti saf suyla 1 litreye seyreltilmiştir.

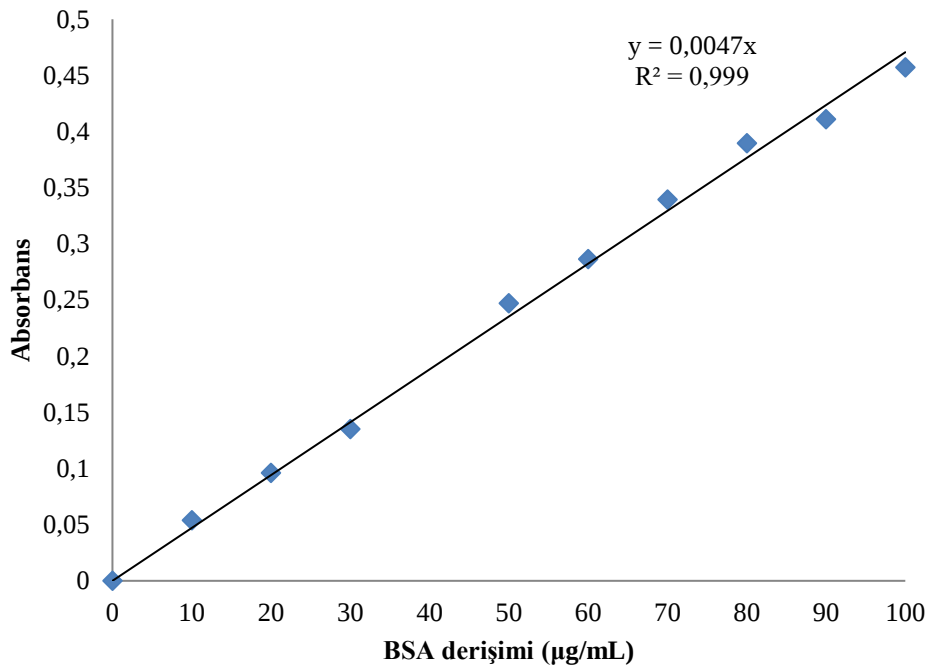
Deneyin yapılışı:

Kalibrasyon için; %0,9 NaCl çözeltisinde 1 mg/mL derişiminde BSA hazırlanmıştır. Çizelge 4.1’de verilen derişimlerde (10-100 $\mu g/mL$) BSA çözeltileri elde etmek için toplam hacim 5 mL olacak şekilde 1 mg/mL’lik BSA çözeltisi, %0,9 NaCl eklenerek seyreltilmiştir. BSA çözeltisinden 0,1 mL ve Bradford reaktifinden 1 mL UV küvetine alınmıştır, 2 dk boyunca renk oluşumu için beklenmiştir. UV spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda absorbansları okunmuştur. Absorbans değerlerine karşı BSA derişimi grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.1).

Çizelge 4.2. Bradford protein tayini için hazırlanan örnekler

Tüp No.	BSA der. ($\mu g/mL$)	1 mg/mL BSA çöz. (mL)	%0,9 NaCl (mL)	BSA-NaCl çöz. (mL)	Bradford çöz. (mL)
1	10	0,05	4,95	0,1	1
2	20	0,1	4,9	0,1	1
3	30	0,15	4,85	0,1	1

4	40	0,2	4,8	0,1	1
5	50	0,25	4,75	0,1	1
6	60	0,3	4,7	0,1	1
7	70	0,35	4,65	0,1	1
8	80	0,4	4,6	0,1	1
9	90	0,45	4,55	0,1	1
10	100	0,5	4,5	0,1	1



Şekil 4.1. Bradford protein tayini kalibrasyon grafiğı

Serbest enzimin protein miktarını belirlemek için BSA çözeltisi yerine 0,1 mL enzim çözeltisi ile 1 mL Bradford reaktifinin 2 dk boyunca tepkimesi sonunda absorbans değeri kaydedilmiştir. Kalibrasyon grafiğinin doğru denklemi kullanılarak örneklerin protein miktarı bulunmuştur.

İmmobilize enzimin protein miktarını belirlemek için, öncelikle immobilizasyon işlemi için kullanılacak enzim çözeltisindeki serbest enzimin protein tayini yapılmıştır. İmmobilizasyon gerçekleştikten sonra kürelerin süzöntü ve yıkama suları toplanmıştır. Süzöntüden alınan 0,1 mL ile 1 mL Bradford reaktifinin 2 dk süren tepkimesi sonundaki

absorbans değerleri kaydedilmiştir ve kalibrasyon grafiğinden süzüntü içerisinde kalan protein miktarı belirlenmiştir. Enzimin immobilize edilmeden önce belirlenen protein miktarı ile immobilizasyon sonrası süzüntüde kalan protein miktarı arasındaki fark kürelerdeki protein miktarını göstermektedir.

4.6. Yükleme ve İmmobilizasyon Verimi

Enzim immobilizasyonu çalışmalarında farklı oranlarda CTS/HNT içeren küreler hazırlanmış ve farklı derişimlerde glutaraldehit ile çapraz bağlanmıştır. Ayrıca enzim immobilizasyonuna enzim miktarının etkisini incelemek amacıyla 1, 2 ve 3 mg/mL enzim içeren özeltiiler kullanılarak immobilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Tüm bu parametreler incelenirken enzim yükleme verimi ve enzim immobilizasyon verimi hesaplanmıştır. Yükleme ve immobilizasyon verimi Eşitlik 4.4 ve Eşitlik 4.5 kullanılarak belirlenmiştir.

$$\text{Yükleme Verimi (\%)} = \frac{C_i V_i - C_F V_F}{C_i V_i} \times 100 \quad (4.4)$$

C_i : Serbest enzimin protein miktarı, $\mu\text{g/mL}$

V_i : Serbest enzim hacmi, mL

C_F : Süzüntüdeki protein miktarı, $\mu\text{g/mL}$

V_F : Süzüntü hacmi, mL

$$\text{İmmobilizasyon Verimi (\%)} = \frac{A_i}{A_f} \times 100 \quad (4.5)$$

A_i : İmmobilize enzim aktivitesi, U/mg

A_f : Serbest enzim aktivitesi, U/mg

4.7. Enzim Kinetiği

Serbest ve immobilize enzimin kinetik parametrelerini belirlemek amacıyla farklı derişimlerdeki substrat özeltiileri ile başlangıç hızı verisinden enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Substrat olarak ABTS'nin 0,2-1 mM derişimlerindeki özeltiileri

kullanılmıştır. Enzimin substrata ilgisini belirleyen Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_m) Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak, Eşitlik 4.6 ile belirlenmiştir.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_m [S]} + \frac{1}{V_m} \quad (4.6)$$

4.8. Serbest ve İmmobilize Enzim Aktivitesine pH ve Sıcaklık Etkisi

Serbest ve immobilize enzim aktivitesine farklı pH'ların etkisi incelenmiştir. pH 4-10 arasında Çizelge 4.3'te belirtilen tampon çözeltiler hazırlanmıştır. Her pH için enzim aktivitesi bölüm 4.4.1 ve bölüm 4.4.2'de anlatıldığı gibi belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. Tampon çözeltilerin hazırlanması

pH	Tampon Çözelti
4	82 mL 0,1 M asetik asit + 18 mL 0,05 M sodyum asetat
5	1 adet fosfat-sitrat tampon tableti + 100 mL saf su
6	100 mL 0,1 M KH_2PO_4 + 11,2 mL 0,1 M NaOH
7	100 mL 0,1 M KH_2PO_4 + 58,2 mL 0,1 M NaOH
8	100 mL 0,1 M KH_2PO_4 + 93,4 mL 0,1 M NaOH
9	0,6 M glisin tamponu (Saf suyla 0,1 M'a seyreltilerek kullanılmıştır.)
10	10x tris-HCl tamponu (Saf suyla 10 kat seyreltilerek kullanılmıştır.)

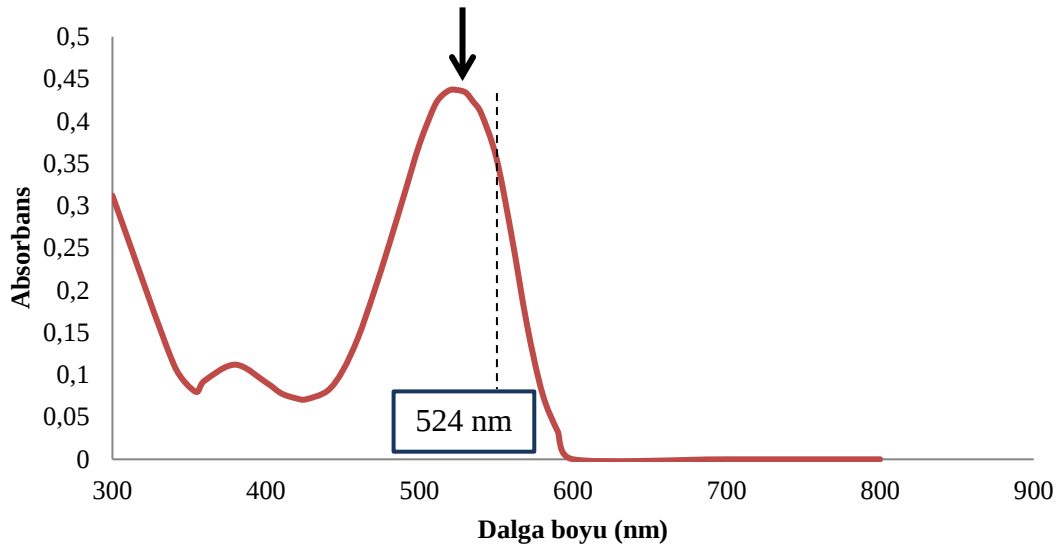
Serbest ve immobilize enzimin en yüksek aktiviteyi gösterdikleri en uygun pH değerleri belirlendikten sonra aktiviteye sıcaklığın etkisi, serbest ve immobilize enzimin en uygun pH'larında belirlenmiştir. Sıcaklık değerleri 25, 35, 45 ve 55°C olarak ayarlanmıştır. Her sıcaklık değerinde 15 dakika bekletilen serbest ve immobilize enzim aktivitesi bölüm 4.4.1 ve bölüm 4.4.2'de anlatıldığı gibi belirlenmiştir.

4.9. Serbest ve İmmobilize Enzim Aktivitesine Depolama Stabilesinin Etkisi

Enzim aktivitesine depolama etkisini incelemek amacıyla hazırlanan serbest enzim çözeltisi ve immobilize enzim küreleri 59 gün boyunca tampon çözelti içerisinde 4°C'de saklanmıştır. Belirli aralıklarla serbest enzimden ve immobilize enzimden alınan örneklerin ABTS'nin substrat olduğu ortamlarda aktiviteleri bölüm 4.4.1 ve bölüm 4.4.2'de anlatıldığı gibi belirlenmiştir.

4.10. Boyar Madde Giderim Çalışmaları

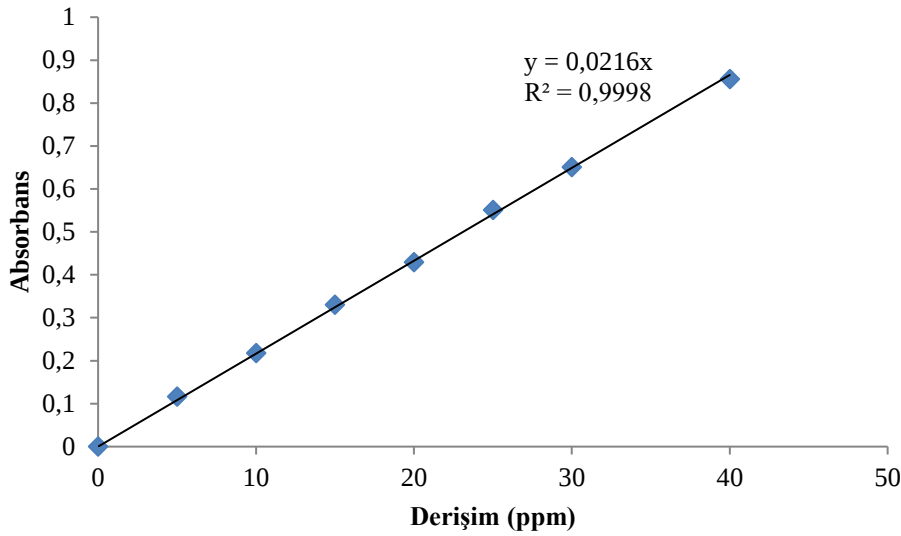
Boyar madde giderimi deneylerini gerçekleştirmeden önce boyar maddenin UV spektrofotometresinde maksimum dalga boyu belirlenmiş ve çalışma doğrusu oluşturulmuştur. Kalibrasyon için Remazol red (RR) boyar maddesinin en yüksek pik verdiği dalga boyu, spektrum taramasıyla belirlenmiştir (Şekil 4.2). 100 ppm Remazol red (RR) stok çözeltisi hazırlanmıştır. Çizelge 4.2’de verilen derişimlerde boyar madde çözeltileri elde etmek için toplam hacim 5 mL olacak şekilde 100 ppm boyar madde çözeltisi tampon çözelti ile seyreltilmiştir. Spektrofotometre küvetine 1 mL boyar madde çözeltisi konularak UV spektrofotometresinde 524 nm dalga boyunda absorbans değerleri kaydedilmiş ve derişime karşı absorbans grafiği çizilmiştir (Şekil 4.3). Kalibrasyon grafiğinin doğru denklemi ile derişimi bilinmeyen örneklerin boyar madde derişimi bulunmuştur.



Şekil 4.2. Remazol red (RR) boyar maddesinin görünür spektrumu

Çizelge 4.4. Boyar madde derişimi tayini için hazırlanan örnekler

Tüp No.	Boya der. (ppm)	100 ppm boya çöz. (mL)	Tampon çöz. (mL)
1	5	0,25	4,75
2	10	0,5	4,5
3	15	0,75	4,25
4	20	1	4
5	25	1,25	3,75
6	30	1,5	3,5
7	40	2	3



Şekil 4.3. Remazol red (RR) kalibrasyon grafiğı

Boyar madde giderimi için; pH 5 tampon çözeltisinde 20 mL hacimde, 20, 40, 60, 80 ve 100 ppm derişimlerinde boyar madde çözeltisi hazırlanmıştır. İçerisine 10 adet immobilize enzim küreleri atılmış ve paralel şekilde 10 adet küreye immobilize edilmiş enzim miktarı ile aynı miktarda serbest enzimin eklendiğı boyar madde çözeltileri çalkalamalı su banyosunda 30°C’de, 20 saat boyunca giderim yapmak üzere karıştırılmıştır. Belirli sürelerde ortamdan 1’er mL örnek alınarak UV spektrofotometresinde 524 nm dalga boyunda absorbans ölçülmüştür. Daha sonra boyar madde giderim verimi serbest ve immobilize enzim için Eşitlik 4.7’deki gibi hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Giderim} = \frac{A_0 - A_f}{A_0} \times 100 \quad (4.7)$$

A_0 : Başlangıç boya çözeltisi absorbansı

A_f : Giderim sonrası boya çözeltisi absorbansı

4.10.1. Boyar madde giderim kinetiğı

İmmobilize enzim ile gerçekleştirilen boyar madde gideriminin kinetik parametreleri (K_m ve V_m) belirlenmiştir. Boyar maddenin substrat olarak kullanıldığı, pH 5 ve 30°C’de gerçekleştirilen kinetik çalışmada, farklı derişimlerdeki Remazol red (RR) çözeltilerinin başlangıç giderim hızı belirlenmiştir (Eşitlik 2.4). Boyar maddenin 20-100 ppm

derişimlerdeki çözeltileri kullanılmıştır. Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_m) Lineweaver-Burk grafiğı kullanılarak, Eşitlik 4.6 ile belirlenmiştir.

4.10.2. Boyar madde giderimine medyatörlerin etkisi

Kullanılan kimyasallar:

- Remazol red (RR)
- Serbest lakkaz enzimi ve immobilize enzim küreleri
- 1 mM ABTS çözeltisi (Sigma-Aldrich)
- 1 mM HBT çözeltisi (Sigma-Aldrich)
- 1 mM TEMPO çözeltisi (Sigma-Aldrich)
- 1 mM VLA çözeltisi (Sigma-Aldrich)

Deneyin yapılışı:

200 ppm'lik stok Remazol red (RR) çözeltisi pH 5 tamponunda hazırlanmıştır. Her bir medyatörün etkisini incelemek üzere 4 adet erlen alınmıştır ve stok boyar madde çözeltisi koyulmuştur. Boyar madde çözeltilerine 1 mM'lık medyatör çözeltileri eklenmiştir. Son hacim 20 mL, boyar madde derişimi 90 ppm ve ABTS, HBT, TEMPO ve VLA'nın son molariteleri ise 0,5 mM olmuştur. Medyatör içeren boyar madde çözeltilerine 10 ar adet immobilize enzim küreleri eklenmiş ve paralel şekilde aynı miktarda serbest enzimin eklendiğı boyar madde çözeltileri çalkalamalı su banyosunda 30°C'de, 28 saat boyunca giderim yapmak üzere 100 rpm'de karıştırılmıştır. Belirli sürelerde ortamdan 1 mL örnek alınarak UV spektrofotometresinde 524 nm dalga boyunda absorbans ölçülmüştür. Daha sonra boyar madde giderim verimi serbest ve immobilize enzim için Eşitlik 4.7'deki gibi hesaplanmıştır.

4.10.3. İmmobilize enzimin boyar madde gideriminde yeniden kullanımı

İmmobilize enzim, ortamdan kolaylıkla ayrılabilmesi özelliğinden dolayı boyar madde giderim çalışmalarında kolaylıkla yeniden kullanılabilir. Bu nedenle CTS/HNT kürelerine immobilize edilmiş lakkaz enzimi remazol red (RR) gideriminde 15 kez yeniden kullanılmıştır. Her bir giderim işlemi 24 saat süresince gerçekleştirilmiştir. Her kullanım sonrası küreler pH 5 tampon çözeltisiyle yıkanmış ve bir sonraki kullanım için yeni boyar madde çözeltisi ortamına eklenmiştir. Bölüm 4.10.2'de anlatıldığı gibi, medyatör olarak HBT ve VLA varlığında 15 kez boyar madde giderimi gerçekleştirilmiş ve bu süre

boyunca boyar madde giderim verimi belirlenmiştir. Ayrıca immobilize enzimin 15 kez kullanımının aktiviteye etkisini incelemek amacıyla her kullanım sonrası aktivite bölüm 4.4.2’de anlatılan yöntemle göre belirlenmiştir.

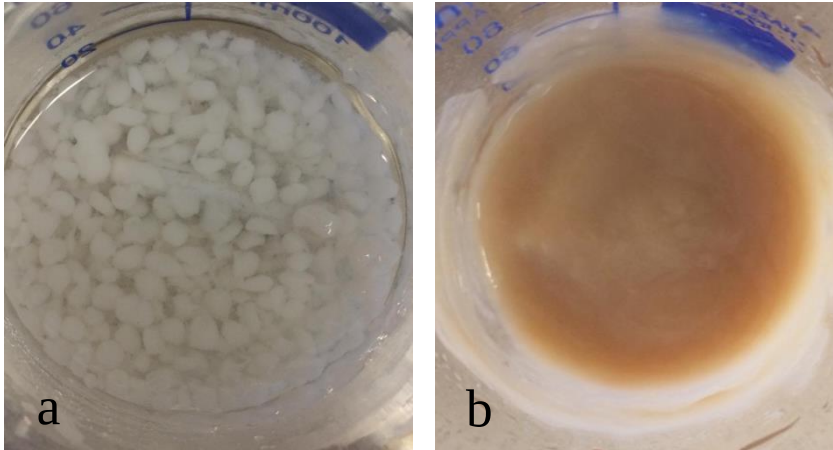
5. BULGULAR VE TARTIŞMA

5.1. Enzim İmmobilizasyonu

Lakkaz enziminin immobilizasyon verimine etki eden parametreler incelenmiştir. Yüksek immobilizasyon verimin sağlandığı; destek malzemesinde bulunan CTS/HNT oranı, glutaraldehit derişimi ve enzim derişimi belirlenmiştir.

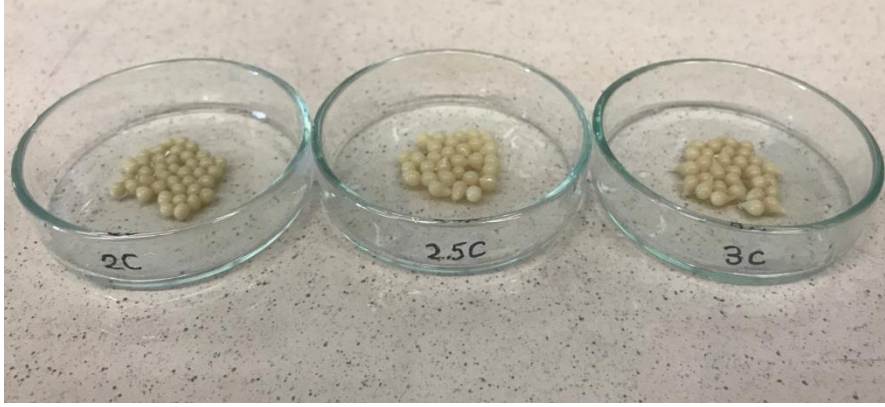
5.1.1. CTS/HNT oranının immobilizasyon verimine etkisi

CTS/HNT oranı farklı küreler hazırlamak için öncelikle halloysit miktarı sabit (%1) tutulmuştur. Kitosan miktarı ise %1, %2, %2,5 ve %3 (ağırlık/hacim) olarak değiştirilerek küreler hazırlanmıştır. Hazırlanan kürelere enzim immobilize edilmiştir. Ancak %1 kitosan içeriğı ile hazırlanan kürelerin düzensiz ve şekillerinin bozuk olduğu gözlenmiştir (Resim 5.1a). Aynı zamanda bu kürelere enzim immobilize edildiğinde kürelerin tümüyle çözündüğü ve yok olduğu gözlenmiştir (Resim 5.1b). Daha önce Jaiswal ve diğ. (2016) yaptıkları çalışmada da benzer şekilde kitosan içeriğinin %1 olduğu durumda kürelerin enzim immobilizasyonu sırasında bozulduğu bildirilmiştir [7].



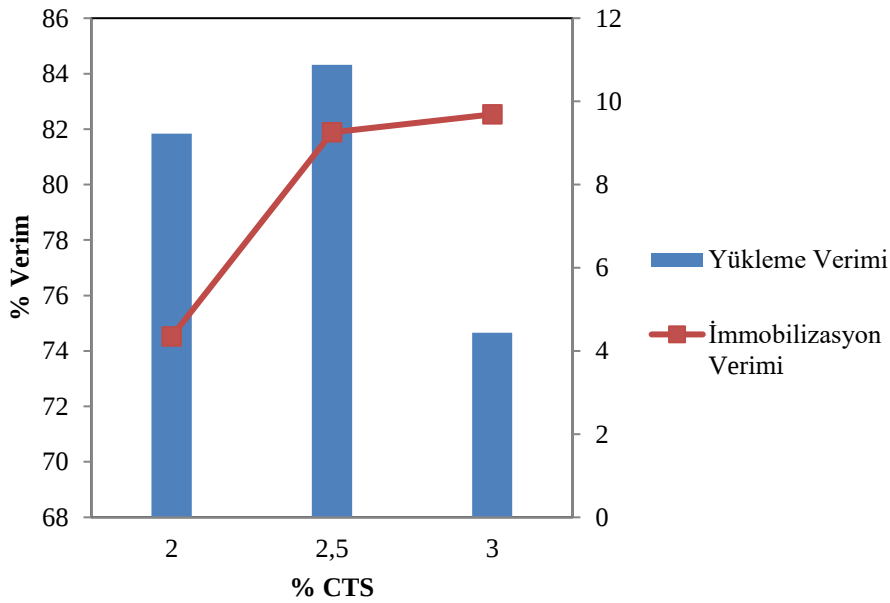
Resim 5.1. %1 CTS içeren küreler (a), enzim eklendikten sonra kürelerin bozulması (b)

CTS içeriğı %2, %2,5 ve %3 (ağırlık/hacim) olan küreler ile çalışmalar sürdürüldüğünde kürelerin daha dayanıklı ve bozulmayan bir yapıda oluştuğı gözlenmiştir (Resim 5.2).



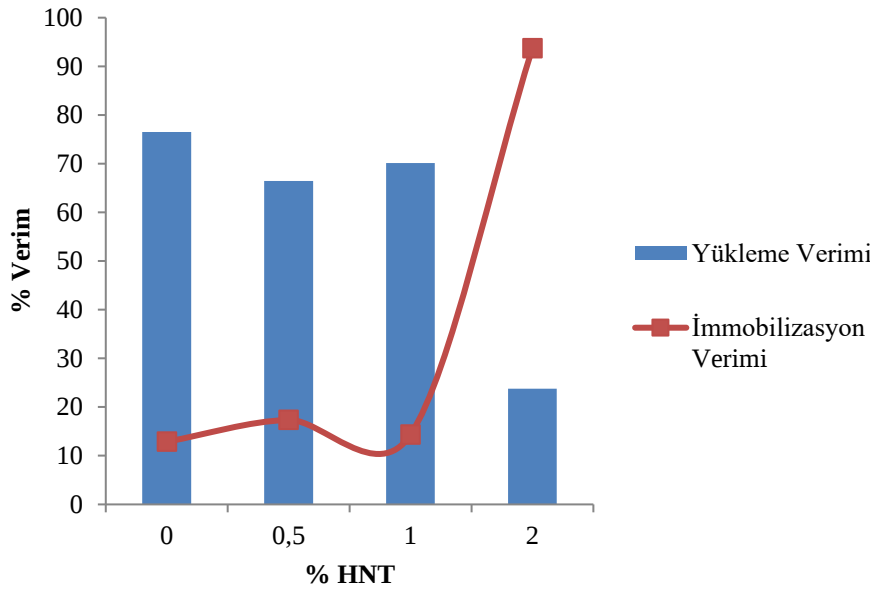
Resim 5.2. Sırasıyla %2, %2,5 ve %3 CTS içeren küreler

Şekil 5.1’de görüldüğü gibi immobilizasyon verimi %3 kitosan içeren kürelerde daha yüksek olsa da %2,5 kitosan içeren kürelerde en yüksek yükleme verimi elde edilmiştir (%84). Kitosan oranı %2 iken gözenek boyutunun daha büyük olması nedeniyle enzim sızıntısı meydana gelmekte ve bu durum verimin düşmesine neden olmaktadır [4]. Ayrıca %3 kitosan içeren jel karışımı oldukça katı bir kıvam aldığından küre hazırlanırken zorluklara neden olmaktadır. Jel karışım şırınga yardımıyla NaOH çözeltisine damlatıldığında küre şeklini değil damla şeklini almıştır. Bu nedenle kitosan oranı %2,5 olarak seçilmiştir. Elde edilen kürelerin çapı 3 mm olarak ölçülmüştür. Literatürde de, %2,5 CTS içeren kürelerle yapılan çalışmalarda yüksek verim elde edilmiştir [4,7].



Şekil 5.1. Kitosan miktarının yükleme ve immobilizasyon verimine etkisi

En uygun kitosan oranı belirlendikten sonra haloysit miktarının yükleme ve immobilizasyon verimine etkisi incelenmiştir (Şekil 5.2). Bu amaçla %0, %0,5, %1 ve %2 (ağırlık/hacim) oranında haloysit içeren küreler hazırlanmış ve bu kürelere immobilize edilmiş enzimlerin yükleme ve immobilizasyon verimleri belirlenmiştir. %2 haloysit içeren küreler ile yapılan çalışmalarda yükleme verimi %44, immobilizasyon verimi %94 bulunmuştur. Bu nedenle immobilizasyon verimi dikkate alınarak en uygun haloysit oranı %2 olarak belirlenmiştir.

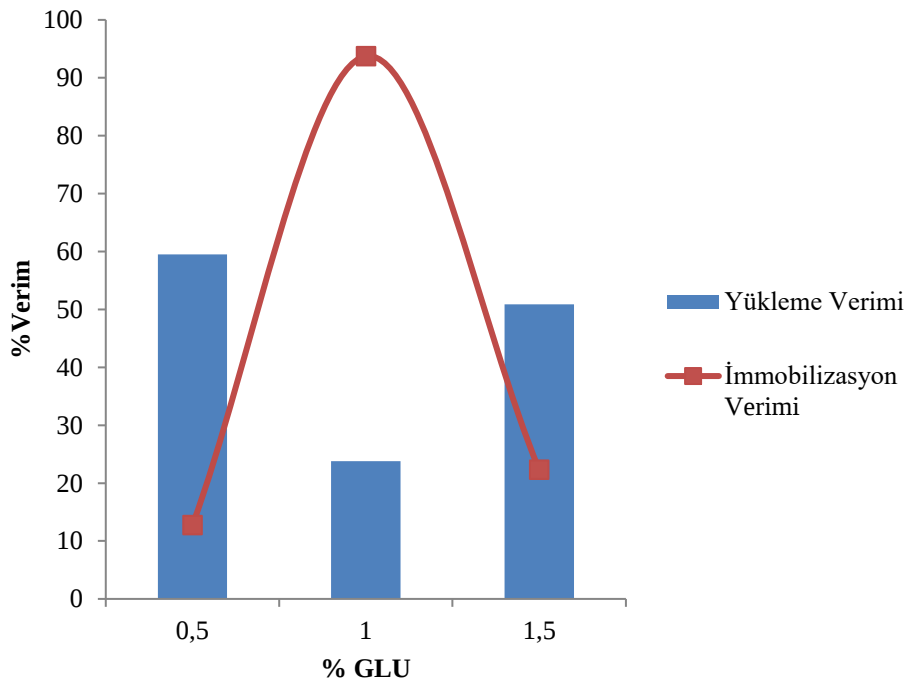


Şekil 5.2. Haloysit miktarının yükleme ve immobilizasyon verimine etkisi

5.1.2. Glutaraldehit derişiminin immobilizasyon verimine etkisi

HNT ile CTS asetik asit çözeltisinde karıştırıldığında, CTS protonlaşarak negatif yük taşıyan HNT'nin yüzeyine adsorplanmaktadır. Glutaraldehit ise taşıdığı $-CHO$ grubu yardımı ile CTS'nin amino grupları ile etkileşmektedir. Glutaraldehit molekülün diğer ucundaki serbest $-CHO$ grubu ise enzim molekülünün yapısındaki $-NH_2$ grupları ile bağlanarak enzimin katı matriks ile kovalent olarak bağlanmasında köprü görevi yapmaktadır. CTS/HNT oranı 2,5/2 olarak belirlenen küreler ile yapılan çalışmalarda çapraz bağlayıcı olarak kullanılan glutaraldehit derişiminin (%0,5-1,5) enzim yükleme ve immobilizasyon verimine etkisi incelenmiştir. En yüksek immobilizasyon verimi (%94), %1'lik glutaraldehit çözeltisi ile yapılan çapraz bağlamada gözlenmiştir (Şekil 5.3). Glutaraldehit yalnızca enzimin destek malzemesine bağlanmasını değil aynı zamanda kürelerin sert ve dayanıklı olmasını da sağlamaktadır [4]. Nguyen ve diğ. (2016) de benzer

şekilde, gerçekleştirdikleri çalışmada %1'lik glutaraldehit kullanıldığında yüksek lakkaz aktivitesi elde etmişlerdir [68]. Düşük glutaraldehit derişiminde kürelere yeterince enzim bağlanmadığından düşük aktivite gözlenmiştir. Glutaraldehit derişiminin yüksek olması ise CTS/HNT kürelerinin yüzeyinde çoklu çapraz bağlanma noktalarının oluşmasına neden olabilmektedir. Bu durum kürelerdeki gözeneklerin tıkanmasına ve kütle aktarımı etkilerinin ağırlaşmasına neden olabilir. Ayrıca enzimin aktif merkezine bağlanması da enzim denaturasyonuna neden olabilmektedir. Dolayısıyla enzimin aktivitesinde azalma meydana gelmiştir [4,69].

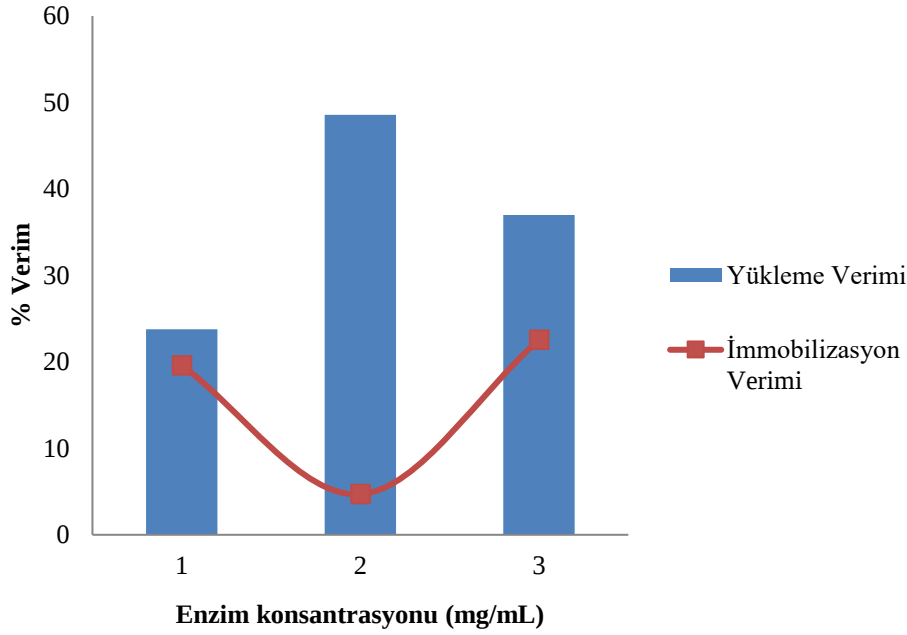


Şekil 5.3. Glutaraldehit derişiminin yükleme ve immobilizasyon verimine etkisi

5.1.3. İmmobilize enzim hazırlama çözeltisindeki enzim derişiminin immobilizasyon verimine etkisi

İmmobilizasyon için hazırlanan enzimin derişimi de önemli bir parametredir. CTS/HNT kürelerine immobilize edilmek üzere; 1, 2 ve 3 mg/mL derişiminde enzim çözeltileri hazırlanmıştır. Bu ortama CTS/HNT küreleri eklenerek immobilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Yükleme ve immobilizasyon verimi açısından, en yüksek yükleme veriminin (%49) gözleendiği enzim derişiminin 2 mg/mL olduğu görülmüştür (Şekil 5.4). Enzim derişiminin 1 mg/mL olduğu durumda immobilizasyon verimi daha yüksek olduğundan daha sonraki çalışmalarda kullanılan enzim çözeltisi 1 mg/mL derişiminde

hazırlanmıştır. Bu bölüme kadar olan çalışmalar temel alınarak ağırlıkça %2,5 kitosan ve %2 halloysit, %1 glutaraldehit ve 1 mg/mL derişiminde enzim çözeltisi ile hazırlanmış immobilize enzim küreleri boyar madde gideriminde kullanılmıştır. Bu yöntemle elde edilen küreler 3 mm boyutundadır ve enzim kapasitesi 20 µg/g olarak elde edilmiştir.



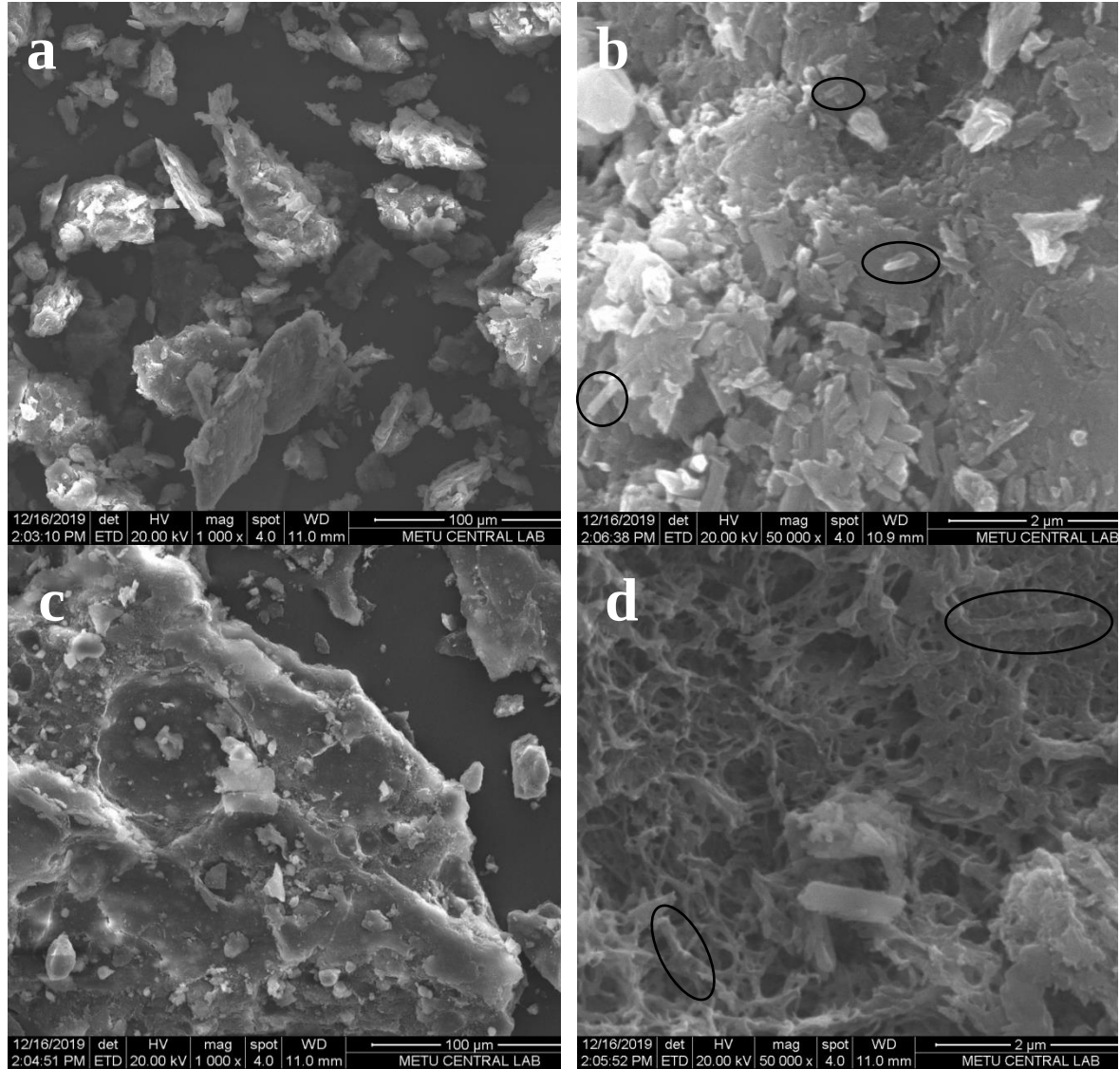
Şekil 5.4. Enzim derişiminin yükleme ve immobilizasyon verimine etkisi

5.2. Karakterizasyon Çalışmaları

5.2.1. SEM analizi

Şekil 5.5a ve b lakkaz içermeyen CTS/HNT, c ve d ise lakkaz içeren CTS/HNT/lakkaz kürelere ait farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntülerini vermektedir. HNT nanotüpleri ortalama 0,5-2 µm uzunluğa ve 30-80 nm çapa sahip nanotüplerdir [69]. Şekil 5.5a'da (1000x büyütme) CTS/HNT kürelerin pürüzlü ve kısmen düzgün yüzeylere ve sıkı bir yapıya sahip oldukları görülmektedir. Zhai ve diğ. (2013), pürüzlü yüzeylerin daha fazla enzim immobilizasyonuna izin verecek yüzey alanını arttırarak enzim yükleme verimini arttırıcı yönde etki göstereceğini belirtmişlerdir [8]. Fakat bu görüntülerden yapıdaki HNT nanotüpleri gözükmemektedir. Şekil 5.5b'de (50.000x büyütme) hallosit nanotüplerin kitosan tarafından kaplandığı görülebilmektedir. Şekil 5.5c ve d'de glutaraldehit ile etkileştirilmiş ve lakkaz immobilize edilmiş CTS/HNT/lakkaz kürelerinin SEM görüntüleri verilmiştir. Şekil 5.5c'de (1000x büyütme) lakkaz immobilize edilmiş CTS/HNT/lakkaz

kürelerin Şekil 5.5a'ya göre pürüzlülüğün kısmen azaldığı bölgelerin oluştuğu görülmüştür. Nguyen ve diğ. (2016), lakkaz enziminin glutaraldehit ile işlem görmüş kitosana immobilize edildiğinde, eğri bükü ve pürüzlü olan yüzeylerin pürüzlülüğünün azaldığını belirtmişlerdir [68]. CTS/HNT/lakkaz kürelerin SEM görüntülerine daha yakından bakıldığında (50.000x büyütme), CTS/HNT yüzeyinin enzimle bir ağ şeklinde kaplandığı, enzim immobilizasyon işleminin CTS/HNT yüzeyinin morfolojisini değiştirdiği ve enzim immobilizasyon işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştiği görülmüştür. Diğer yandan bu görüntülerde CTS/HNT/lakkaz kürelerin yüzey pürüzlülüğünün arttığı ve HNT nanotüplerinin enzim immobilizasyonu nedeniyle pürüzlülüğünün arttığı ve kalınlaştığı gözlenmiştir. Zhai ve diğ. (2013), kitosan-hallosite horseradish peroksidaz immobilizasyonu gerçekleştirdikleri çalışmada, enzim immobilize edilmiş HNT'nin saf HNT'ye göre daha fazla pürüzlü ve daha kalın olduğunu belirtmişlerdir [8].

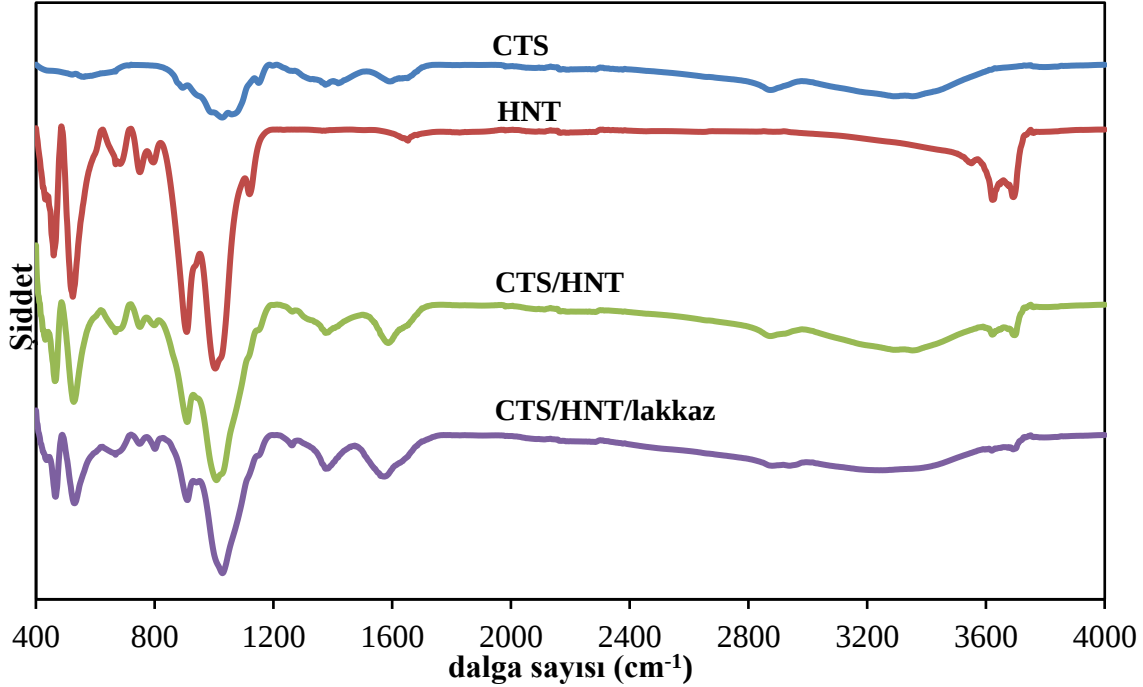


Şekil 5.5. Lakkaz içermeyen CTS/HNT kürelerinin (a,b) ve lakkaz immobilize edilmiş CTS/HNT kürelerinin (c,d) SEM görüntüsü

5.2.2. FT-IR analizi

Saf CTS, saf HNT ve CTS/HNT'ye ait FT-IR spektrumu Şekil 5.6'da verilmiştir. Saf kitosana ait $3200-3600\text{ cm}^{-1}$ 'deki geniş pik -OH gruplarının gerilmesini göstermektedir. Bu bant hidrojen bağlarından dolayı geniştir. Bu bölgede -OH bandı ile N-H gerilme bandı üst üste binmektedir [68]. 2873 cm^{-1} 'de bulunan pik alifatik C-H gerilmesine aittir [71]. 1375 ve 1593 cm^{-1} 'deki pikler amid I, amid II ve amid III gruplarının üst üste çakışmasını göstermektedir [72]. 1059 ve 1150 cm^{-1} 'de C-O-C simetrik ve asimetrik gerilmesi görülmektedir. Saf HNT'ye ait 3692 ve 3622 cm^{-1} 'de halloysitin iç yüzeyindeki hidroksil gruplarına ait gerilme titreşimleri, 3551 cm^{-1} 'de suyun -OH gerilmesi, 1653 cm^{-1} 'de suyun deformasyonu, 1119 ve 1004 cm^{-1} 'de Si-O gerilmesi, 907 cm^{-1} 'de Al-OH titreşimleri

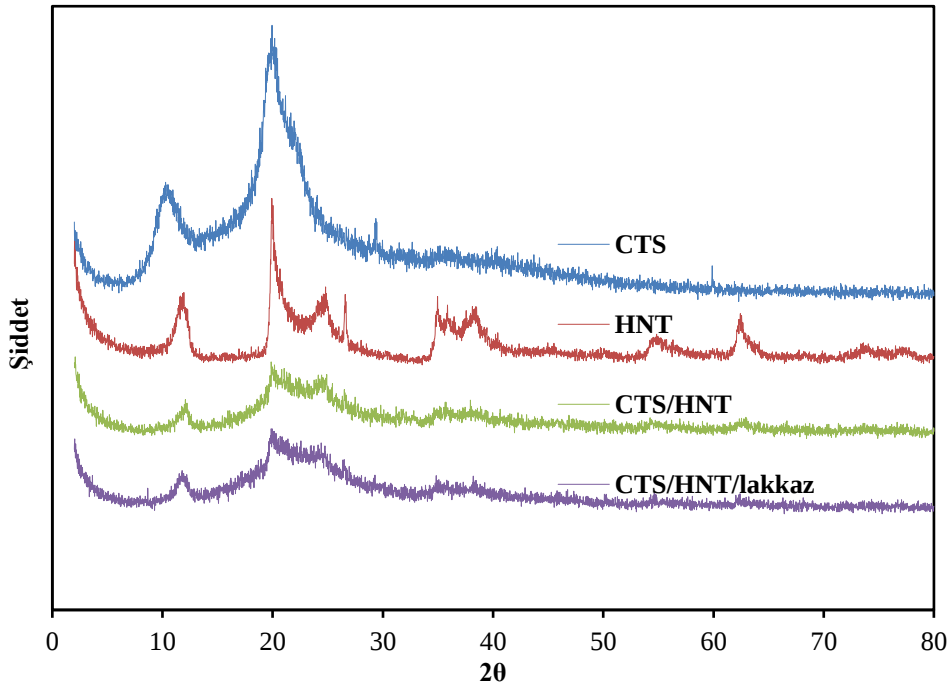
görülmektedir [8,70]. 795, 750 ve 668 cm^{-1} 'deki pikler Si-O gerilmesine aittir [73]. 524, 459 ve 438 cm^{-1} ise Al-O-Si, Si-O-Si ve Si-O deformasyonuna ait piklerdir [73]. CTS/HNT kompozitine ait FT-IR spektrumunda, saf CTS ve saf HNT'ye ait tüm karakteristik pikler görülmektedir. 3200 ve 3600 cm^{-1} arasında geniş pikin görülmesi ve HNT'ye ait karakteristik piklerin şiddetindeki azalma, CTS'nin yapısında bulunan pozitif yüklü amino grupları ile negatif yüklü HNT arasındaki elektrostatik etkileşmeden kaynaklanmaktadır [8]. CTS/HNT kompozitine ait spektrumda, HNT'ye ait karakteristik piklerin şiddetindeki azalma HNT yüzeyinin kitosan ile kaplanmasından kaynaklanmaktadır. CTS/HNT kompoziti glutaraldehit ile modifiye edilip lakkaz immobilize edildiği zaman CTS/HNT spektrumunda bazı değişiklikler meydana gelmiştir. CTS/HNT/Lakkaz'a ait spektrumda 1500-1700 cm^{-1} 'deki piklerin şiddetinde artış olmuştur. CTS/HNT/Lakkaz ve CTS/HNT'ye ait spektrumlarda, saf HNT'ye ait 3692 ve 3622 cm^{-1} 'de halloysitin yüzeyindeki hidroksil gruplarını gösteren piklerin şiddetinde azalma gözlenmiştir. Bu durum hidroksil ve organik gruplar arasındaki hidrojen bağlarının oluşumundan kaynaklanabilir.



Şekil 5.6. Saf CTS, saf HNT, CTS/HNT ve CTS/HNT/lakkaz'a ait FT-IR spektrumu

5.2.3. XRD analizi

Hazırlanan malzemelerin yapısal özelliklerinin incelenmesi için XRD analizi yapılmıştır. Şekil 5.7’de saf CTS’ye ait XRD deseninde 10,32 ve 19,76 2θ açısındaki pikler CTS’nin karakteristik pikleridir ve bu pikler CTS’nin yarı kristal yapıya sahip olduğunu göstermektedir [74]. Saf HNT’nin XRD analizi, kompozit yapıdaki HNT’nin durumunu göstermektedir. XRD kırınım desenlerinde 2θ açılarındaki bazal yansımalar (d_{001}) HNT’nin tam hidrate ($d=10$ Å), kısmi hidrate ($d=7-10$ Å) ve dehidrate ($d=7$ Å) olup olmadığını göstermektedir [75]. Bu çalışmada 11,80; 19,88 ve 24,80 2θ ’daki pikler halloysite ait karakteristik piklerdir [76]. HNT’ye ait XRD kırınım desenlerinde, $2\theta=11,80$ açısında keskin bir pik vermiştir ve bu açığa karşılık gelen kırınım piki 7,5 Å (d_{001}) bazal boşluğa karşılık gelmektedir. Bu değer HNT’nin kısmi hidrate yapıda olduğunu göstermektedir. CTS/HNT ve CTS/HNT/Lakkaz kompozitlerinde saf HNT’ye benzer şekilde bazal boşluk değeri değişmemiş ve yarı hidrate HNT yapısı görülmüştür. CTS/HNT ve CTS/HNT/Lakkaz kompozit yapılarına ait XRD kırınım desenlerinde HNT’ye ait karakteristik pikler görülmüş, fakat herhangi bir yeni pik gözlenmemiştir. Kompozit yapıdaki HNT’ye ait karakteristik piklerin şiddetinin azaldığı belirlenmiştir. Bu durumun kitosan ve HNT’nin birbiri ile iyi bir karışım oluşturmamasından ve kitosan-HNT etkileşmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Benzer durum kitosan/bentonit kompozitine ait XRD spektrumlarında da gözlenmiştir [77].



Şekil 5.7. Saf CTS, saf HNT, CTS/HNT ve CTS/HNT/lakkaz'a ait XRD desenleri

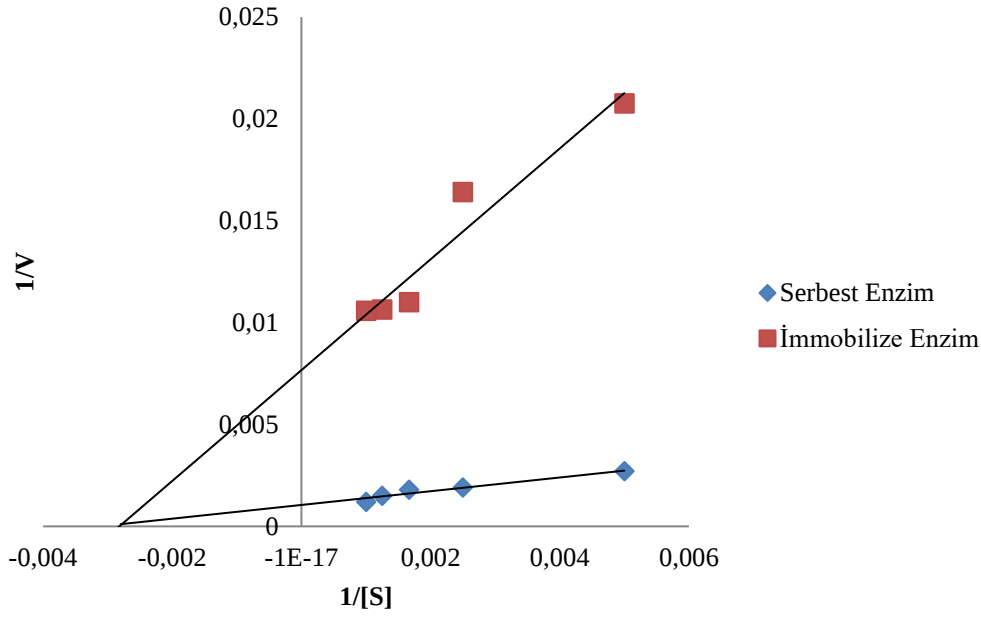
5.3. Kinetik Parametreler

Serbest ve immobilize enzimin kinetik parametreleri, farklı derişimlerde ABTS kullanılarak belirlenmiştir (Çizelge 5.1).

Çizelge 5.1. Serbest ve immozilize enzimin kinetik parametreleri (pH 5, 25°C)

Enzim	K_m (μM)	V_m ($\mu\text{M}/\text{dk}$)
Serbest lakkaz enzimi	302,45	909,09
İmmobilize lakkaz enzimi	353,33	129,87

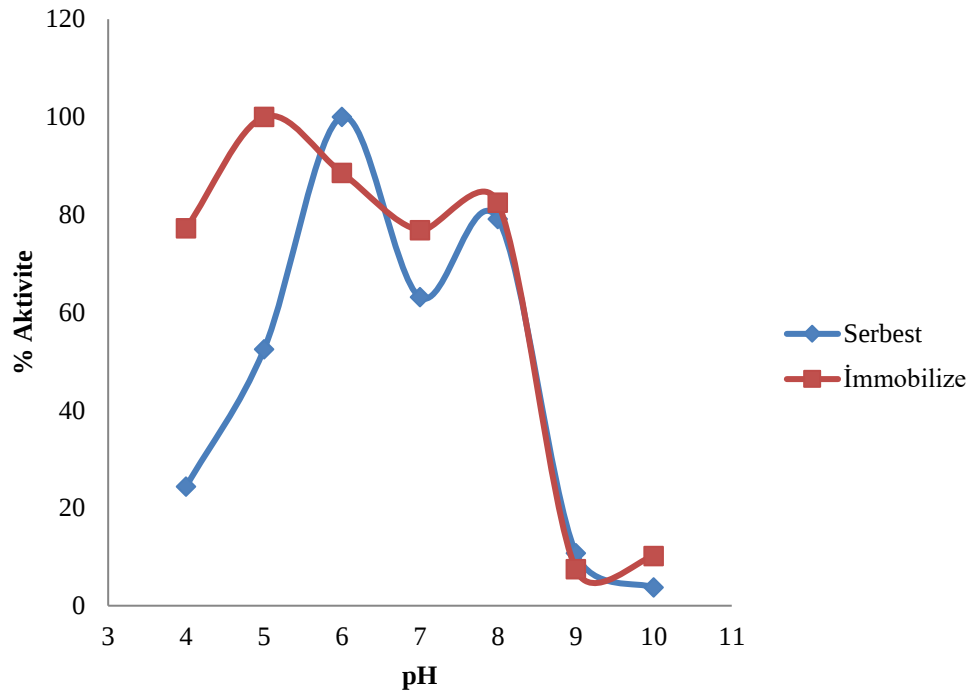
Lineweaver-Burk grafiğı kullanılarak (Şekil 5.8) Michaelis-Menten sabiti (K_m) serbest enzim ve immobilize enzim için sırasıyla 302,45 μM ve 353,33 μM olarak hesaplanmıştır. Maksimum hız (V_m) ise serbest enzim için 909,09 $\mu\text{M}/\text{dak}$ ve immobilize enzim için 129,87 $\mu\text{M}/\text{dak}$ olarak belirlenmiştir. İmmobilize enzimin K_m değeri daha yüksek olması enzimin substrata olan afinitesinin azalması anlamına gelmektedir. Bu durum enzimin mikro çevresindeki değışiklikten, aktif bölgenin sterik engelinden, enzimin substrata bağlanması için gerekli esnekliğini kaybetmesinden veya substratı parçalamaya difüzyon direnci oluşmasından kaynaklanabilmektedir. Önceki çalışmalarda bu duruma benzer şekilde immobilize enzimin serbest enzime göre K_m değeri artışı ve V_m değeri azalma gözlenmiştir [3,5,7,61,62,66].



Şekil 5.8. Serbest ve immobilize enzimin Lineweaver-Burk grafiği

5.4. Lakkaz Aktivitesine pH Etkisi

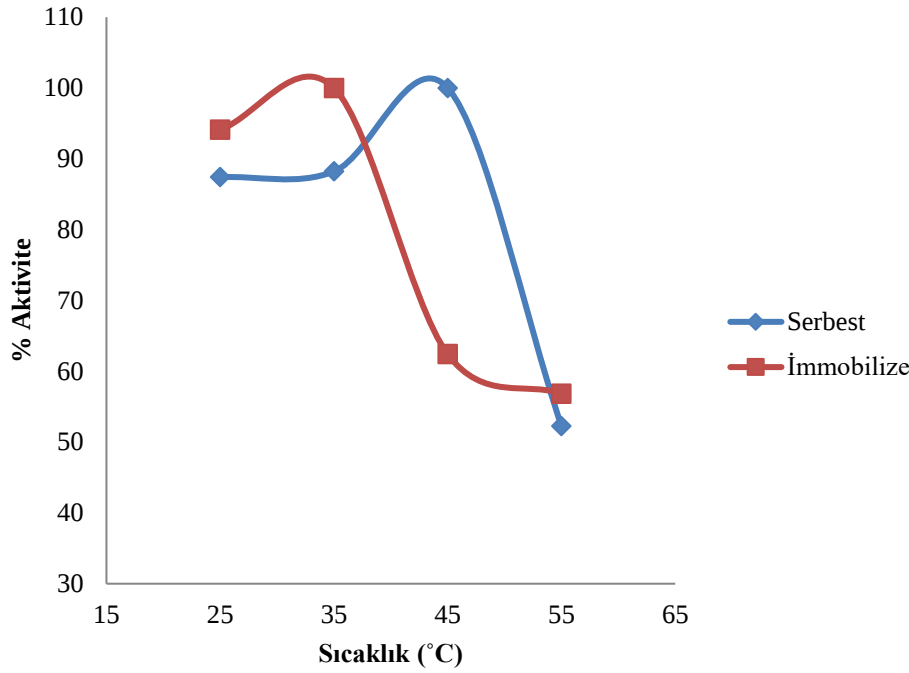
Serbest ve immobilize enzimin en yüksek aktivite gösterdiği en uygun pH değerini belirlemek için, pH 4-10 arasında değiştirilmiş ve enzim aktiviteleri Eşitlik 4.1, Eşitlik 4.2 ve Eşitlik 4.3 ile belirlenmiştir. Serbest enzimin en yüksek aktiviteyi gösterdiği en uygun pH 6, immobilize enzimin en yüksek aktiviteyi gösterdiği en uygun pH ise 5 olarak bulunmuştur (Şekil 5.9). Daha önce yapılan çalışmalarda da (Bagewadi ve diğ. (2017), Sun ve diğ. (2015)) benzer olarak en yüksek aktivitenin gözlemlendiği en uygun pH değerleri serbest ve immobilize enzim için sırasıyla pH 6 ve pH 5 olarak bulunmuştur [63,67].



Şekil 5.9. Serbest ve immobilize enzim için en uygun pH

5.5. Lakkaz Aktivitesine Sıcaklık Etkisi

Serbest ve immobilize enzimin en yüksek aktivite gösterdiği en uygun sıcaklık değerini belirlemek için 25-55°C’de aktivite tayini yapılmıştır. Serbest lakkaz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık 45°C olmuştur (Şekil 5.10). Daha önce Asgher ve diğ. (2017) yaptıkları çalışmada da serbest enzimin en uygun sıcaklığını 45°C olarak bildirmişlerdir [4]. İmmobilize lakkaz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık ise 35°C’dir (Şekil 5.6). Buna benzer sonuçlar daha önce Salami ve diğ. (2018) ve Lin ve diğ. (2015) tarafından yapılan çalışmalarda da görülmüştür [3,62].

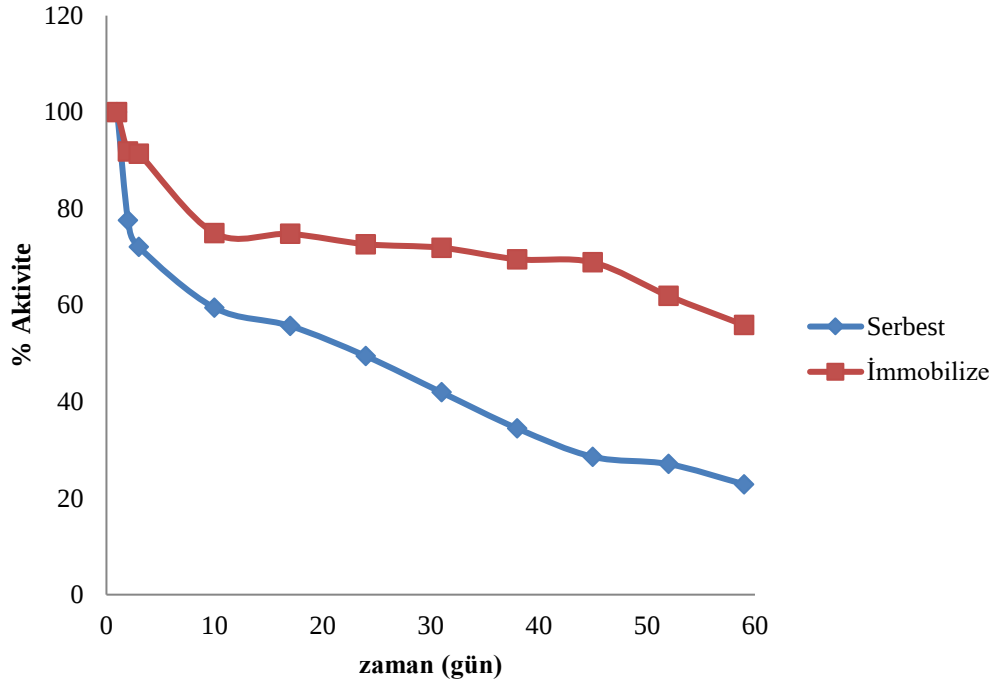


Şekil 5.10. Serbest ve immobilize enzim için en uygun sıcaklık

5.6. Lakkaz Aktivitesine Depolama Stabilitesi Etkisi

Serbest ve immobilize enzim aktivitesine depolama etkisini incelemek amacıyla 59 gün boyunca 4°C’de depolanan örneklerin aktivitesi belirli aralıklarla ölçülmüştür. Depolama stabilitesi enzimin performansını değerlendirmek açısından önemli bir parametredir. Çünkü enzimler uzun süreli depolandıklarında aktiviteleri azalmaktadır [4]. Şekil 5.11’de görüldüğü gibi 59 günlük depolamanın sonunda hem serbest hem de immobilize enzimin aktivitesinde azalma görülmüştür. İmmobilize enzim 59 günün sonunda aktivitesinin %56’sını korurken, serbest enzim başlangıçtaki aktivitesinin %23’ünü korumuştur. Enzim immobilizasyonu yapılan birçok çalışmada da benzer şekilde serbest enzim aktivitesine kıyasla, immobilize enzimin aktivitesini daha uzun süre koruduğu görülmektedir. Asgher ve diğ. (2017) lakkaz enzimini kitosan kürelerine immobilize ettikleri çalışmada, 28 günlük depolama sonunda serbest enzimin aktivitesinin %46’sını ve immobilize enzimin aktivitesinin %87’sini koruduğunu bildirmişlerdir [4]. Zheng ve diğ. (2016) yaptıkları çalışmada lakkazı kitosana immobilize etmişler ve 30 günlük depolama stabilitesini incelemişlerdir. Serbest enzim bu süre sonunda aktivitesinin %15’ini, immobilize enzim ise aktivitesinin %40’ını korumuştur [65]. Benzer şekilde Ma ve diğ. (2018), Köklükaya ve diğ. (2016), Xu ve diğ. (2013) lakkaz immobilizasyonu gerçekleştirdikleri çalışmalarda da

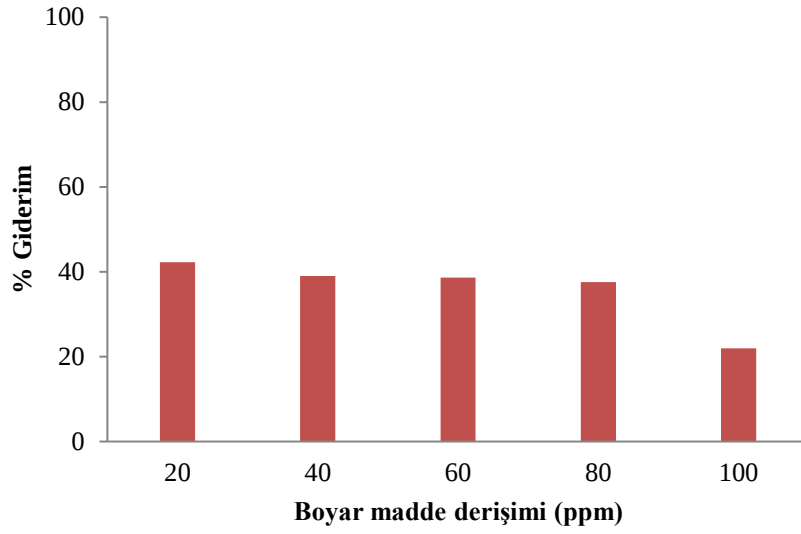
depolama stabilitesi incelendiğinde immobilize enzim serbest enzime göre aktivitesini daha uzun süre korumuştur [24,59,64].



Şekil 5.11. Serbest ve immobilize enzimin depolama stabilitesi

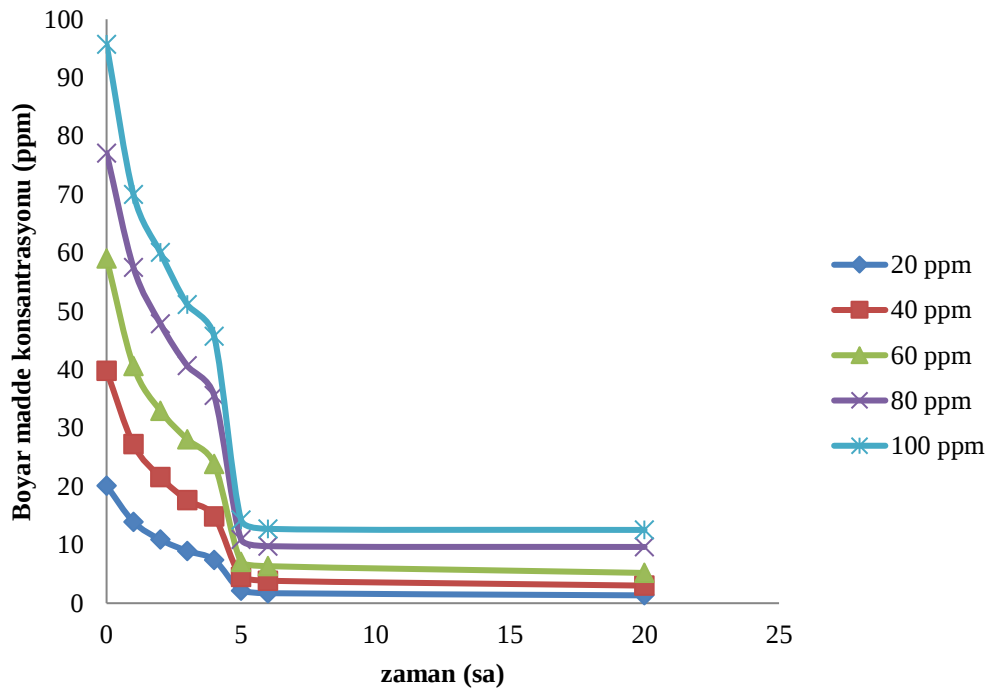
5.7. Boyar Madde Giderim Çalışmaları

Serbest ve immobilize enzim ile 20-100 ppm boyar madde derişimi aralığında remazol red (RR) giderimi çalışılmıştır. Serbest enzimin kullanıldığı deneylerde boyar madde giderimi oldukça düşük oranda olmuştur (%1-2). İmmobilize enzim ile boyar madde giderimine başlamadan önce enzim immobilize edilmemiş CTS/HNT kürelerinin boyar maddeyi adsorplayıp adsorplamadığı incelenmiştir. Şekil 5.13'te görüldüğü gibi enzim immobilize edilmemiş CTS/HNT kürelerinin adsorpsiyonu ile de boyar madde giderimi gerçekleşmiştir. Düşük derişimde boyar madde içeren ortamda (20 ppm) CTS/HNT küresi ile %42 boyar madde giderimi gerçekleştirirken boyar madde derişimi 20 ppm'den 100 ppm'e arttıkça giderim verimi düşmüştür. Boyar madde derişimi 100 ppm olduğunda ise CTS/HNT adsorpsiyonu ile %22 giderim gerçekleşmiştir.



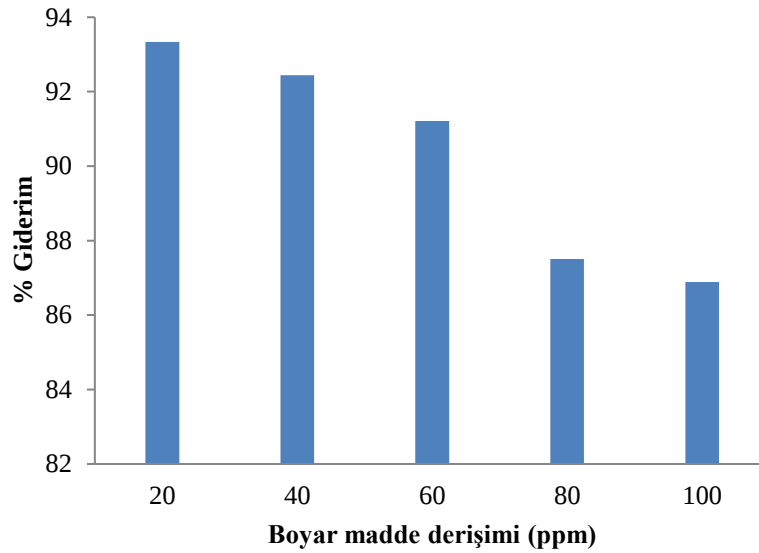
Şekil 5.12. Enzim immobilize edilmemiş CTS/HNT küreleri ile gerçekleşen boyarmadde giderimleri

İmmobilize enzim ile yapılan boyarmadde gideriminde, ortamda bulunan boyarmadde derişiminin zamanla azaldığı görülmüştür (Şekil 5.13).



Şekil 5.13. İmmobilize enzim ile boyarmadde derişiminin zamanla değişimi

İmmobilize enzim ile gerçekleştirilen % Giderim (Şekil 5.14), Eşitlik 4.7 kullanılarak 20, 40, 60, 80 ve 100 ppm’lik remazol red (RR) çözeltileri için sırasıyla %93,33; %92,44; %91,22; %87,51; %86,89 olarak hesaplanmıştır. Her bir boya derişimi için oldukça yüksek giderim verimi elde edilmiştir. Bu giderime CTS/HNT kürelerinin yapmış olduğu adsorpsiyon dahildir.



Şekil 5.14. İmmobilize enzim ile boyar madde giderim verimleri

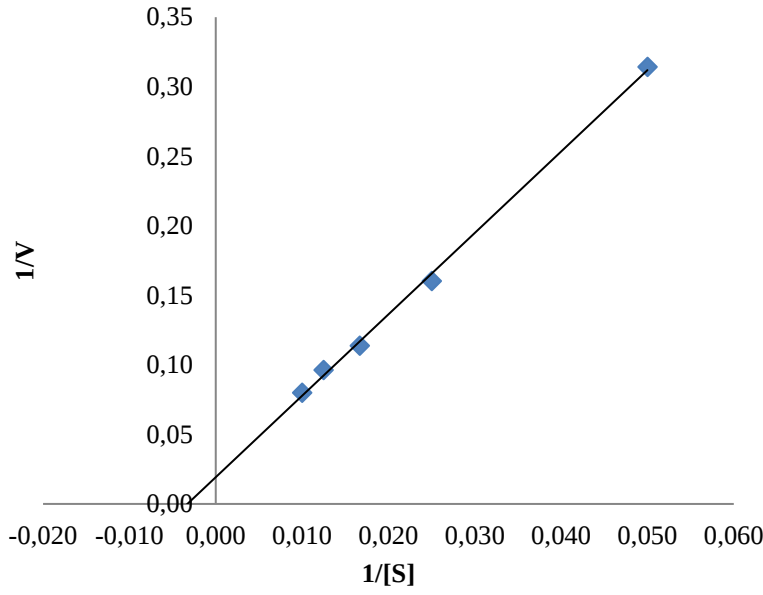
5.7.1. Boyar madde giderim kinetiği parametreleri

İmmobilize enzim ile gerçekleştirilen boyar madde gideriminin kinetik parametreleri Remazol red (RR) boyar maddesinin 20-100 ppm derişimlerdeki çözeltileri kullanılarak belirlenmiştir (Çizelge 5.2).

Çizelge 5.2. İmmobilize lakkaz enziminin boyar madde giderim kinetik parametreleri (pH 5, 30°C)

Enzim	K_m (μ M)	V_m (μ M/dk)
İmmobilize lakkaz enzimi	558	1,59

Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_m) Lineweaver-Burk grafiği (Şekil 5.15) kullanılarak, Eşitlik 4.6 ile belirlenmiştir.

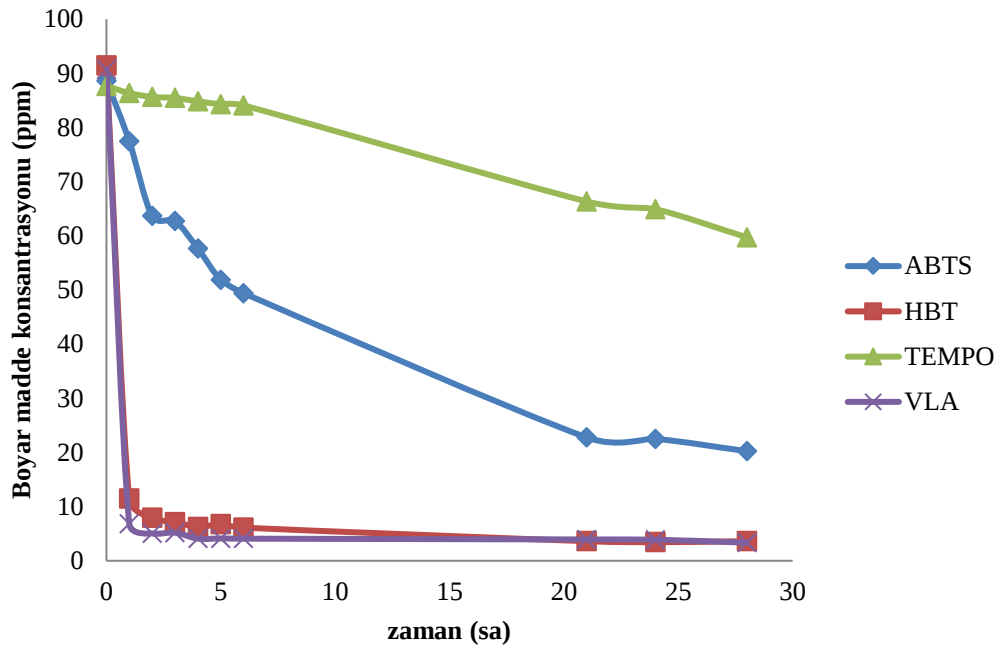


Şekil 5.15. İmmobilize enzimin boyar madde giderim kinetiği için Lineweaver-Burk grafiği

5.7.2. Boyar madde giderimine medyatörlerin etkisi

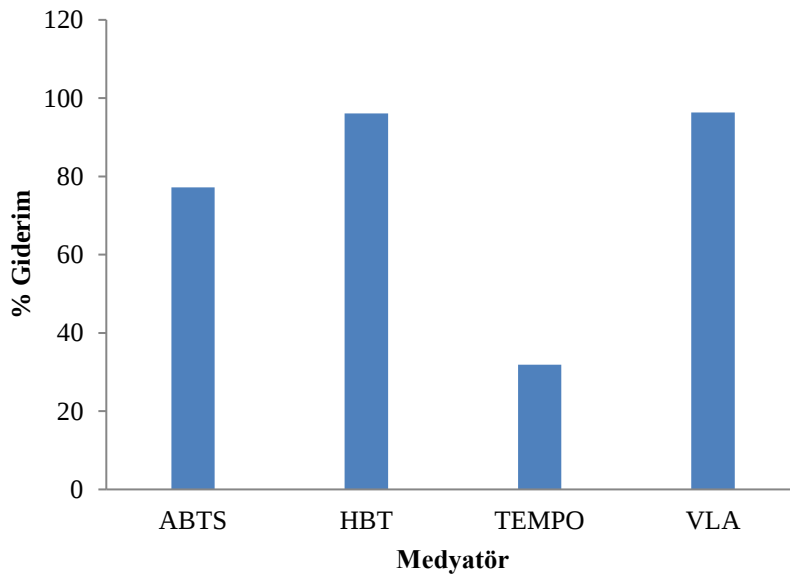
Medyatörler enzimlerin substrata afinitesini artıran yapılardır. Bu nedenle serbest ve immobilize enzim ile gerçekleştirilen remazol red (RR) giderimine farklı medyatörlerin etkisi incelenmiştir. Medyatör olarak ortama ABTS, HBT, TEMPO ve VLA eklenmiştir. 28 saatlik giderim süresince belirli aralıklarla boyar madde derişim değışimleri kaydedilmiştir.

Tek başına kullanıldığında giderim gerçekleştirmeyen serbest enzim, medyatör varlığında yüksek verimle boyar madde giderimi yapmıştır. Şekil 5.16'da serbest enzimle yapılan giderim çalışmasındaki boyar madde derişiminin zamanla değışimi verilmiştir.



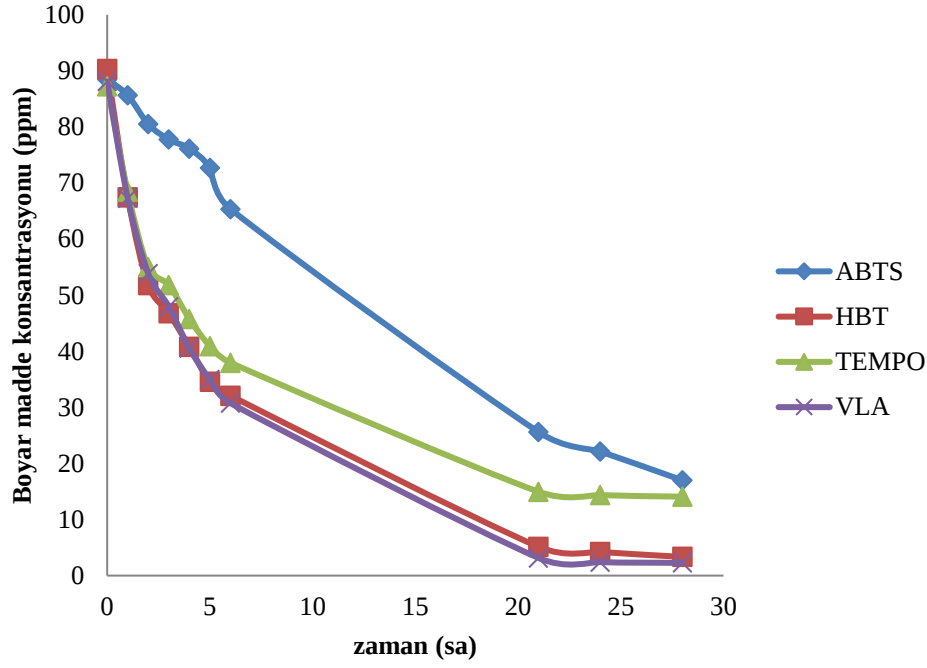
Şekil 5.16. Boyar madde derişiminin medyatör varlığında zamana bağı değışimi (serbest enzim)

Başlangıç boyar madde derişiminin 90 ppm olduğı durumda; ABTS, HBT, TEMPO ve VLA varlığında, serbest enzim ile gerçekleştirilen % Giderim (Şekil 5.17), sırasıyla %77,17; %96,05; %31,89 ve %96,32 olarak hesaplanmıştır. Özellikle HBT ve VLA kullanımı verimi oldukça artırmıştır.



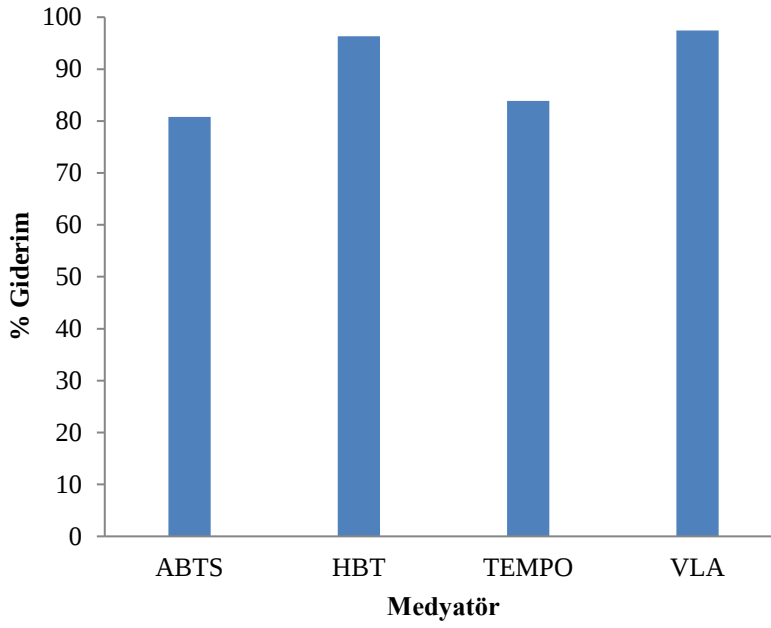
Şekil 5.17. Serbest enzimle boyar madde giderimine medyatörlerin etkisi

İmmobilize enzimin tek başına 90 ppm'lik remazol red (RR) giderimi %86,89 olarak kaydedilmiştir. Ortama medyatörlerin eklenmesiyle gerçekleştirilen 28 saatlik boyar madde giderimi süresince belirli aralıklarla derişimdeki düşüş incelenmiştir (Şekil 5.18).



Şekil 5.18. Boyar madde derişiminin medyatör varlığında zamana bağlı değişimi (immobilize enzim)

İmmobilize enzim ile ABTS, HBT, TEMPO ve VLA varlığında gerçekleştirilen % Giderim (Şekil 5.19), Eşitlik 4.7 kullanılarak sırasıyla %80,81; %96,31; %83,87 ve %97,43 olarak hesaplanmıştır.



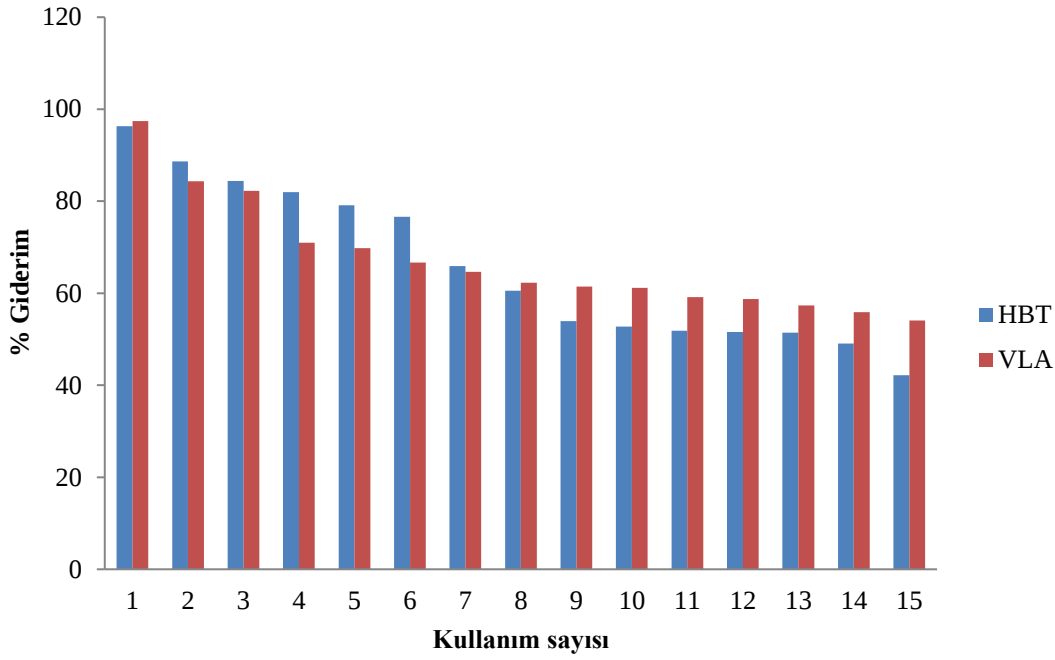
Şekil 5.19. İmmobilize enzimle boyar madde giderimine medyatörlerin etkisi

Ortama medyatör eklendiğinde boyar madde giderimi hem serbest enzim hem de immobilize enzim için oldukça verimli bir şekilde gerçekleşmiştir. Serbest enzim ile giderimde olduğu gibi immobilize enzim kullanılarak yapılan remazol red (RR) giderim çalışmalarında da, kullanılan medyatörlerden özellikle HBT ve VLA kullanımı boyar madde giderim verimini oldukça artırmıştır. Literatürde ise yapılan bazı çalışmalarda, benzer şekilde medyatör olarak HBT kullanıldığında daha yüksek % giderim elde etmişlerdir. Salami ve diğ. (2018) lakkaz ile Acid orange 156 boyar maddesinin giderimini yaptıkları çalışmada medyatör olmadan %43 giderim, medyatör olarak HBT kullanıldığında ise %92 giderim elde etmişlerdir [3]. Bagewadi ve diğ. (2017) lakkaz enzimi ile malachite green boyasının giderimi yapmışlardır. Medyatörsüz %78 boyar madde giderimi gerçekleşirken HBT varlığında boyar madde giderimi %85'e yükselmiştir [67]. Sadighi ve diğ. (2013) de benzer şekilde lakkaz ile congo red giderimi gerçekleştirdiklerinde medyatör olmadan %30, medyatör olarak HBT kullanıldığında ise %60 giderim elde etmişlerdir [58]. Köklükaya ve diğ. (2016) acid orange 52 boyar maddesinin lakkaz enzimi kullanılarak giderimini gerçekleştirdikleri çalışmada medyatörsüz %45 boyar madde giderimi ve medyatör olarak ABTS kullanıldığında ise %73 boyar madde giderimi elde etmişlerdir [64].

İmmobilize enzimin serbest enzime göre önemli üstünlükleri enzimin ortamdan kolaylıkla ayrılabilmesi, aktivitesini daha uzun süre koruyabilmesi ve boyar madde giderim çalışmalarında yeniden kullanılabilmesidir.

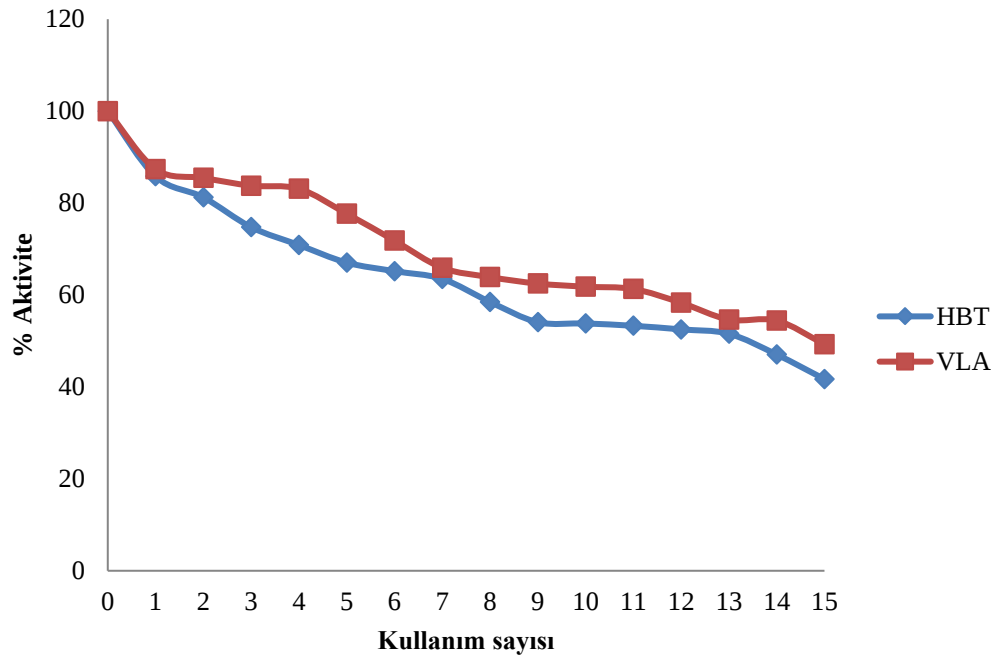
5.7.3. Boyar madde gideriminde immobilize enzimin yeniden kullanımı

Yapılan çalışmalarda en yüksek boyar madde giderim verimi HBT ve VLA varlığında gerçekleştirilen çalışmalarda elde edilmiştir (Şekil 5.19). Bu nedenle yeniden kullanım çalışmalarında medyatör olarak kullanılmak üzere HBT ve VLA seçilmiştir. Boyar madde gideriminde 15 kez yeniden kullanılan immobilize enzimin HBT ve VLA varlığında boyar madde giderimi Şekil 5.20’de verilmiştir. HBT’li ortamda immobilize enzimin ilk kullanımında gerçekleştirdiği boyar madde giderimi %96, 15’inci kullanımında gerçekleştirdiği boyar madde giderimi ise %42 olmuştur. VLA varlığında gerçekleştirilen çalışmalarda immobilize enzim ilk kullanımda %97 giderim sağlarken 15’inci kullanımda giderim %54 olmuştur. Daha önce yapılan çalışmalarda da immobilize enzimin yeniden kullanımı incelenmiştir. Jaiswal ve diğ. (2016) immobilize lakkaz enzimini indigocarmine gideriminde 4 kez yeniden kullanmışlardır. İlk kullanımda %100 giderim sağlarken 4’üncü kullanımda giderim %17 olmuştur [7]. Sun ve diğ. (2015) immobilize lakkaz enzimini malachite green boyar maddesinin giderim çalışmalarında 5 kez yeniden kullanmışlardır. Bu kullanımın sonunda immobilize enzim ile %70 boyar madde giderimi elde etmişlerdir [63]. Benzer şekilde Satishkumar ve diğ. (2014) gerçekleştirdikleri çalışmada immobilize lakkazı 10 kez benzetim boya atığının gideriminde kullanmışlardır. 10 kullanım sonunda %50 boyar madde giderimi elde etmişlerdir [61].



Şekil 5.20. İmmobilize enzimin yeniden kullanımının boyar madde giderimine etkisi

İmmobilize enzimin yeniden kullanımının aktiviteye etkisi ise Şekil 5.21’de gösterilmiştir. HBT varlığında gerçekleşen boyar madde giderim çalışmalarında immobilize enzim 15 kez yeniden kullanıldığında aktivitesinin %42’sini korumuştur. VLA’lı ortamda boyar madde giderimi yapıldığında ise immobilize enzim 15’inci kullanım sonunda aktivitesinin %49’unu korumuştur. Literatürde daha önce yapılan çalışmalara bakıldığında immobilize enzimin yeniden kullanımı ile aktivitesinin değişimi incelenmiştir. Ma ve diğ. (2018) gerçekleştirdikleri çalışmada immobilize lakkazı 14 kez tekrar kullanmışlardır. 14 kullanım sonunda enzim aktivitesinin %45’ini korumuştur [24]. Satishkumar ve diğ. (2014) immobilize lakkazın 10 kez yeniden kullanımı sonunda aktivitesinin %67’sini koruduğunu bildirmişlerdir [61]. Zheng ve diğ. (2016) immobilize lakkaz enziminin 6 kez yeniden kullanımı sonunda aktivitesinin %60’ından fazlasını koruduğunu bildirmişlerdir [65].



Şekil 5.21. İmmobilize enzimin yeniden kullanımının aktiviteye etkisi

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmasında, çevre ve insan sağlığı açısından oldukça zararlı etkileri bulunan tekstil boyar maddelerinden olan remazol red (RR) giderimi serbest lakkaz enzimi ve CTS/HNT kürelerine immobilize edilmiş lakkaz enzimi ile gerçekleştirildi. Çalışmalar kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.

1. Serbest lakkaz enzimi için ABTS substrat olarak kullanılarak kinetik çalışma gerçekleştirilmiştir. Serbest lakkaz için bulunan kinetik parametreler Lineveawer-Burk'a göre belirlenen K_m değeri $302,45\mu M$ ve V_m ise $909,09\mu M/dak$ şeklindedir.
2. Serbest lakkaz enziminin aktivitesini etkileyen parametreler (pH, sıcaklık, depolama stabilitesi) incelenmiştir. pH 4-10 arasında lakkaz enzimi ABTS substratı ile tepkimeye sokularak aktivitesi belirlenmiştir. En yüksek aktivite pH 6'da elde edilmiştir. Ortam bazikleştikçe aktivitede çok fazla düşüş gerçekleşmiştir. Aynı şekilde, lakkaz enziminin ABTS ile 25, 35, 45 ve 55°C sıcaklıklarda tepkimesi sonunda belirlenen en yüksek aktivite 45°C'de elde edilmiştir. Depolama stabilitesine bakıldığında ise; 4°C'de, 59 günlük bir depolamanın sonunda serbest lakkaz başlangıçtaki aktivitesinin %23'ünü koruyabilmiştir.
3. Enzimin kitosan/halloysit kürelerine immobilizasyon koşulları eniyilenmiştir. ABTS substratı ile immobilizasyon verimine %kitosan, %halloysit, %glutaraldehit ve enzim derişiminin etkisi incelenmiştir. En yüksek aktivitenin gözleendiği ağırlıkça %2,5 kitosan oranı ve %2 halloysit oranı olmuştur. Glutaraldehit derişimi ise %1 iken yüksek aktivite gözlenmiştir. İmmobilizasyon işlemi sırasında 1 mg/mL enzim derişimi ile çalışmak verimli olmuştur.
4. Lakkaz enzimi serbest haldeyken 100 ppm derişimindeki remazol red (RR) boyar maddesini %1-2 gibi çok düşük oranda giderdiğinden, ortama lakkaz medyatörleri eklenmiştir. ABTS, HBT, TEMPO ve VLA varlığında serbest lakkazın remazol red (RR) %giderim değerleri sırasıyla %77,17; %96,05; %31,89; %96,32 olmuştur.
5. Medyatörler aracılığı ile enzime direnç gösteren 100 ppm'lik remazol red (RR) boyar maddesinin giderimi mümkün olmuştur. En yüksek verim HBT ve VLA varlığında elde edilmiştir. ABTS varlığında da %77,17 gibi iyi bir verim sağlansa da HBT ve VLA kadar

etkili olamamıştır. Bunun nedeni enzimin ABTS ile tepkimeye girmesi sonucu ortamda mavi renk oluşumuna neden olmasıdır.

6. İmmobilize enzim ile ABTS kullanılarak kinetik çalışma yapılmıştır. İmmobilize enzim için elde edilen kinetik parametreler; K_m 353,33 μ M ve V_m 129,87 μ M/dak şeklindedir. K_m değerinin serbest enzime göre daha yüksek bir değer olması substrata olan afinitesinin düştüğünü göstermektedir. Bunun nedeni serbest enzimin sıvı ortamda çözünerek hızlı bir şekilde tepkimeye girebilmesi ancak, boncuk şeklindeki küreye immobilize haldeyken kütle aktarım dirençlerinin etkin olması nedeniyle substrat ile tepkimenin daha yavaş gerçekleşmesidir.

7. İmmobilize enzim aktivitesine etki eden parametreler incelenmiştir (pH, sıcaklık, depolama). pH 4-10 arasında ABTS substratı ile tepkimeye giren immobilize enzim küreleri için en yüksek aktivite değerine pH 5'te ulaşılmıştır. İmmobilize enzimin de serbest enzim gibi bazık ortamda aktivitesi düşmektedir. Ancak yine de serbest enzime kıyasla, çok düşük ve çok yüksek pH'larda gösterdiği aktivite daha yüksek olmuştur. Sıcaklık etkisine bakıldığında ise en yüksek aktivite 35°C'de elde edilmiştir. 59 günlük depolamanın aktiviteye etkisi incelendiğinde bu süre sonunda başlangıç aktivitesinin %56'sının korunduğu sonucuna ulaşılmıştır. Enzimin immobilize halde saklanması aktivitesini kaybetmemesi veya daha az kaybetmesi açısından önemlidir. İmmobilize edilerek depolanan lakkaz enzimi ile daha verimli sonuçlar alınmıştır.

8. İmmobilize enzim ile remazol red (RR) giderim çalışmaları yapılmıştır. Boyar madde gideriminin kinetik parametrelerini belirlemek için farklı derişimlerde (20-100 ppm) hazırlanan remazol red (RR) çözeltileri kullanılmıştır. Lineweaver-Burk grafiği çizilerek elde edilen K_m değeri yaklaşık 558 μ M, V_m ise dakikada 1,59 μ M şeklindedir.

9. İmmobilize lakkaz enziminin remazol red (RR) giderimine medyatörlerin etkisi incelenmiştir. Medyatör olarak ABTS, HBT, TEMPO ve VLA kullanıldığında elde edilen giderim verimi sırasıyla; %80,81; %96,31; %83,87; %97,43 olmuştur. Medyatör varlığında kürelere immobilize olan enzimler ile giderim daha verimli şekilde gerçekleşmiştir.

10. İmmobilize enzimin serbest enzime göre daha dayanıklı, kararlı olması ve ortamdan kolaylıkla ayrılabilmesi gibi üstünlükleri bulunmaktadır. Bu sayede enzimi boyar madde

gideriminde yeniden kullanmak mümkün olmaktadır. Hazırlanan immobilize enzim küreleriyle HBT ve VLA varlığında boyar madde giderimi 15 kez yinelenmiştir. HBT eklenen ortamda gerçekleşen 15 kullanım sonunda boyar madde giderimi %42 olmuştur. VLA varlığında 15inci kullanım sonrası boyar madde giderimi ise %54 olmuştur. Ayrıca yeniden kullanımın aktiviteye etkisi de incelenmiştir. 15 kez yeniden kullanım sonunda HBT'li ortamda aktivitenin %42'si korunurken VLA'lı ortamda ise aktivitenin %49'u korunmuştur.

Gelecek çalışmalar için öneriler aşağıda verilmiştir.

1. Farklı boyutlarda enzim küreleri hazırlanarak kütle aktarımı etkileri incelenebilir.
2. Farklı boyar maddeler ile giderim çalışmaları gerçekleştirilebilir.
3. Glutaraldehit yerine başka çapraz bağlayıcı malzemeler kullanılabilir.
4. Boya parçalanma ürünleri araştırılabilir.

KAYNAKLAR

1. Demiralp, B., Büyük, İ., Aras, S., Duman, D. C. (2015). Lakkaz enziminin endüstriyel ve biyoteknoloji alanında kullanımı. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 72 (4), 351-368.
2. Couto, S. R., Herrera, J. L. T. (2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnology Advances*, 24, 500-513.
3. Salami, F., Habibi, Z., Yousefi, M., Mohammadi, M. (2018). Covalent immobilization of laccase by one pot three component reaction and its application in the decolorization of textile dyes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, 144-151.
4. Asgher, M., Noreen, S., Bilal, M. (2017). Enhancing catalytic functionality of *Trametes versicolor* IBL-04 laccase by immobilization on chitosan microspheres. *Chemical Engineering Research and Design*, 119, 1-11.
5. Li, G., Nandgaonkar, A. G., Wang, Q., Zhang, J., Krause, W. E., Wei, Q., Lucia, L. A. (2017). Laccase-immobilized bacterial cellulose/TiO₂ functionalized composite membranes: Evaluation for photo- and bio-catalytic dye degradation. *Journal of Membrane Science*, 525, 89-98.
6. Dai, J., Wang, H., Chi, H., Wang Y., Zhao, J. (2016). Immobilization of laccase from *Pleurotus ostreatus* on magnetic seperable SiO₂ support and excellent activity towards azo dye decolorization. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 4, 2585-2591.
7. Jaiswal, N., Pandey, V. P., Dwivedi, U. N. (2016). Immobilization of papaya laccase in chitosan led to improved multipronged stability and dye discoloration. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86, 288-295.
8. Zhai, R., Zhang, B., Wan, Y., Li, C., Wang, J., Liu, J. (2013). Chitosan-halloysite hybrid nanotubes: Horseradish peroxidase immobilization and applications in phenol removal. *Chemical Engineering Journal*, 214, 304-309.
9. Peng, Q., Liu, M., Zheng, J., Zhou, C. (2015). Adsorption of dyes in aqueous solutions by chitosan-halloysite nanotubes composite hydrogel beads. *Microporous and Mesoporous Materials*, 201, 190-201.
10. Pandey, G., Munguambe, D. M., Tharmavaram, M., Rawtani, D., Agrawal, Y. K. (2017). Halloysite nanotubes - An efficient 'nano-support' for the immobilization of α -amylase. *Applied Clay Science*, 136, 184-191.
11. Riva, S. (2006). Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology*, 24 (5), 219-226.
12. Cañas, A. I., Camarero, S. (2010). Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnology Advances*, 28, 694-705.

13. Chacko, J. T., Subramaniam, K. (2011). Enzymatic degradation of azo dyes - a review. *International Journal of Environmental Sciences*, 1 (6), 1250-1260.
14. Kocaer, F. O., Alkan, U. (2002). Boyar madde içeren tekstil atıksularının arıtım alternatifleri. *Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 7 (1), 47-55.
15. Sundararaman, T. R., Ramamurthi, V., Partha, N. (2009). Decolourization and COD removal of reactive yellow 16 by Fenton oxidation and comparison of dye removal with photo Fenton and sono Fenton process. *Modern Applied Science*, 3 (8), 15-22.
16. Crini, G. (2006). Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: a review. *Bioresource Technology*, 97, 1061-1085.
17. Raghavacharya, C., (1997). Colour removal from industrial effluents: a comparative review of available technologies. *Chemical Engineering World*, 32, 53-54.
18. Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R., Nigam, P. (2001). Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Biosource Technology*, 77, 247-255.
19. Machenbach, I. (1998). Membrane technology for dyehouse effluent treatment. *Membrane Technology*, 96, 7-11.
20. Lin, S. H., Lin, C. M. (1993). Treatment of textile waste effluents by ozonation and chemical coagulation, *Water Research*, 27 (12), 1743-1748.
21. İnce, N. H., Gönenç, D. T. (1997). Treatability of a textile azo dye by UV/H₂O₂, *Environmental Technology*, 18 (2), 179-185.
22. Karcher, S., Kornmüller, A., Jekel, M. (2001). Cucurbituril for water treatment. Part I: Solubility of cucurbituril and sorption of reactive dyes. *Water Research*, 35 (14), 3309-3316.
23. Gasser, C. A., Ammann, E. M., Shahgaldian, P., Corvini, P. F.-X. (2014). Laccases to take on the challenge of emerging organic contaminants in wastewater. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 9931-9952.
24. Ma, H. F., Meng, G., Cui, B. K., Si, J., Dai, Y. C. (2018). Chitosan crosslinked with genipin as supporting matrix for biodegradation of synthetic dyes: Laccase immobilization and characterization. *Chemical Engineering Research and Design*, 132, 664-676.
25. Shaheen, R., Asgher, M., Hussain, F., Bhatti, H. N. (2017). Immobilized lignin peroxidase from *Ganoderma lucidum* IBL-05 with improved dye decolorization and cytotoxicity reduction properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 103, 57-64.
26. Jenkins, R. O. (2003). *Enzymes. In: Textile Processing with Enzymes. Eds: Cavaco-Paulo A., Gübitz G. M., Woodhead Publishing Limited, Boca Raton, 1-41.*

27. Nicell, J. A., Bewtra, J. K., Biswas, N., St.Pierre, C. C., Taylor, K. E. (1993). Enzyme catalyzed polymerization and precipitation of aromatic compounds from aqueous solution. *Canadian Journal of Civil Engineering*, 20, 725-735.
28. Robinson, P. K. (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays Biochemistry*, 59, 1-41.
29. Michaelis, L., Menten, M. L. (1913). Die kinetik der invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift*, 49, 333-369.
30. Lineweaver, H., Burk, D. (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of American Chemical Society*, 56, 658-666.
31. Yoshida, H. (1883). Chemistry of lacquer. *Journal of the Chemical Society*, 43, 472-486.
32. Slomczynski, D. (1996), *Further studies of laccase from Botrytis cinerea: substrate specificity and biochemical properties in relation to biotechnology transfers*, Ph. D. Thesis, State University of New York.
33. Orlikowska, M., Alanis, M. J. R., Bujacz, A., Luna, C. H., Rubio, R., Parra, R., Bujacz, G. (2018). Structural studies of two thermostable laccases from the white-rot fungus *Pycnoporous sanguineus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 1629-1640.
34. Durán, N., Rosa, M. A., D'Annibale, A., Gianfreda, L. (2002). Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 31 (7), 907-931.
35. Solomon, E. I., Sundaram, U. M., Machonkin, T. E. (1996). Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical Reviews*, 96, 2563-2605.
36. Ba, S., Arsenault, A., Hassani, T., Jones, J. P., Cabana, H. (2013). Laccase immobilization and insolubilization: from fundamentals to applications for the elimination of emerging contaminants in wastewater treatment. *Critical Reviews in Biotechnology*, 33 (4), 404-418.
37. Bilal, M. Asgher, M., Saldivar, R. P., Hu, H., Wang, W., Zhang, X., Iqbal, H. M. N. (2017). Immobilized ligninolytic enzymes: an innovative and environmental responsive technology to tackle dye-based industrial pollutants - a review. *Science of the Total Environment*, 576, 646-659.
38. Asgher, M., Shahid, M., Kamal, S., Iqbal, H. M. N. (2014). Recent trends and valorization of immobilization strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 101, 56-66.
39. Wong, J. K. H., Tan, H. K., Lau, S. Y., Yap, P. S., Danquah, M. K. (2019). Potential and challenges of enzyme incorporated nanotechnology in dye wastewater treatment: a review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7, 1-17.

40. Hassan, M. E., Tamer, T. M., Omer, A. M. (2016). Methods of enzyme immobilization. *International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research*, 7 (6), 385-392.
41. Ba, S., Kumar, V. V. (2017). Recent developments in the use of tyrosinase and laccase in environmental applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37 (7), 819-832.
42. Krajewska, B. (2004). Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 126-139.
43. Demir, A., Seventekin, N. (2009). Kitin, kitosan ve genel kullanım alanları. *Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 3 (2), 92-103.
44. Yıldız, P. O., Yangılar, F. (2014). Gıda endüstrisinde kitosanın kullanımı. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 30 (3), 198-206.
45. Lazzara, G., Massaro, M., Milioto, S., Riela, S. (2017). Halloysite-based bionanocomposites. *Handbook of Composites from Renewable Materials*, 7, 557-584.
46. Liu, M., Jia, Z., Jia, D., Zhou, C. (2014). Recent advance in research on halloysite nanotubes-polymer nanocomposite. *Progress in Polymer Science*, 39, 1498-1525.
47. Bourbonnais, R., Paice, M. G. (1990). Oxidation of non-phenolic substrates: an expanded role for laccase in lignin biodegradation, *FEBS Letters*, 267 (1), 99-102.
48. Johannes, C., Majcherczyk, A. (2000). Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 524-528.
49. d'Acunzo, F., Baiocco, P., Fabbrini, M., Galli, C., Gentili, P. (2002). A mechanistic survey of the oxidation of alcohols and ethers with the enzyme laccase and its mediation by TEMPO. *European Journal of Organic Chemistry*, 2002 (24), 4195-4201.
50. Anjaneyulu, Y., Chary, N. S., Raj, D. S. S. (2005). Decolourization of industrial effluents - available methods and emerging technologies - a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 4, 245-273.
51. Christie, R. M. (2001). *Colour Chemistry*. Royal Society of Chemistry, Cambridge.
52. Dos Santos, A. B., Cervantes, F. J., Yaya-Beas, R. E., van Lier, J. B. (2003). Effect of redox mediator, AQDS, on the decolourisation of a reactive azo dye containing triazine group in a thermophilic EGSB reactor. *Enzyme Microbial Technology*, 33 (7), 942-951.
53. Ara, N. J., Hasan, M. A., Rahman, M. A., Salam, M. A., Salam, A., Alam, A. M. S. (2013). Removal of remazol red from textile waste water using treated sawdust - an effective way of effluent treatment. *Bangladesh Pharmaceutical Journal*, 16 (1), 93-98.
54. Becenen, N. (2017). Azo boyarmaddelerinin yasaklanması: bebek ve çocuk giysilerinde uygulanabilirliğinin araştırılması. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 6 (10), 1-6.

55. Chivukula, M., Renganathan, V. (1995). Phenolic azo dye oxidation by laccase from *Pyricularia oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (12), 4374-4377.
56. Lu, L., Zhao, M., Wang, Y. (2007). Immobilization of laccase by alginate-chitosan microcapsules and its use in dye decolorization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 159-166.
57. Dai, Y., Niu, J., Liu, J., Yin, L., Xu, J. (2010). In situ encapsulation of laccase in microfibers by emulsion electrospinning: preparation, characterization, and application. *Biosource Technology*, 101, 8942-8947.
58. Sadighi, A., Faramarzi, M. A. (2013). Congo red decolorization by immobilized laccase through chitosan nanoparticles on the glass beads. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44, 156-162.
59. Xu, R., Zhou, Q., Li, F., Zhang, B. (2013). Laccase immobilization on chitosan/poly(vinyl alcohol) composite nanofibrous membranes for 2,4-dichlorophenol removal. *Chemical Engineering Journal*, 222, 321-329.
60. Yang, J., Lin, Q., Ng, T. B., Ye, X., Lin, J. (2014). Purification and characterization of a novel laccase from *Cerrena* sp. HYB07 with dye decolorizing ability. *Plos One*, 9 (10), 1-13.
61. Satishkumar, P., Kannan, S. K., Cho, M., Kim, J. S., Hadibarata, T., Salim, M. R., Oh, B. T. (2014). Laccase immobilization on cellulose nanofiber: the catalytic efficiency and recyclic application for simulated dye effluent treatment. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 100, 111-120.
62. Lin, J., Fan, L., Miao, R., Le, X., Chen, S., Zhou, X. (2015). Enhancing catalytic performance of laccase via immobilization on chitosan/CeO₂ microspheres. *International Journal of Biological Macromolecules*, 78, 1-8.
63. Sun, H., Yang, H., Huang, W., Zhang, S. (2015). Immobilization of laccase in a sponge-like hydrogel enhanced durability in enzymatic degradation of dye pollutants. *Journal of Colloid and Interface Science*, 450, 353-360.
64. Köklükaya, S. Z., Sezer, S., Aksoy, S., Hasırcı, N. (2016). Polyacrylamide-based semi-interpenetrating Networks for entrapment of laccase and their use in azo dye decolorization. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 63 (5), 699-707.
65. Zheng, F., Cui, B. K., Wu, X. J., Meng, G., Liu, H. X., Si, J. (2016). Immobilization of laccase onto chitosan beads to enhance its capability to degrade synthetic dyes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 110, 69-78.
66. Alver, E., Metin, A. Ü. (2017). Chitosan based metal-chelated copolymer nanoparticles: laccase immobilization and phenol degradation studies. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 125, 235-242.
67. Bagewadi, Z. K., Mulla, S. I., Ninnekar, H. Z. (2017). Purification and immobilization of laccase from *Trichoderma harzianum* strain HZN10 and its application in dye decolorization. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15 (1), 139-150.

68. Nguyen, T. A., Fu, C. C., Juang, R. S. (2016). Effective removal of sulfur dyes from water by biosorption and subsequent immobilized laccase degradation on crosslinked chitosan beads. *Chemical Engineering Journal*, 304, 313-324.
69. Kumari, A., Kayastha, A. M. (2011). Immobilization of soybean (*Glycine max*) α -amylase onto chitosan and amberlite MB-150 beads: optimization and characterization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 69, 8-14.
70. Zhai, R., Zhang, B., Liu, L., Xie, Y., Zhang, H., Liu, J. (2010). Immobilization of enzyme biocatalyst on natural halloysite nanotubes. *Catalysis Communications*, 12, 259-263.
71. Gür, E., Altınışık, A., Yurdakoç, K. (2017). Preparation and characterization of chitosan/sepiolite bionanocomposites for tetracycline release. *Polymer Composites*, 38 (9), 1810-1818.
72. Souza, V. G. L., Pires, J. R. A., Vieira, E. T., Coelho, I. M., Duarte, M. P., Fernando, A. L. (2019). Activity of chitosan-montmorillonite bionanocomposites incorporated with rosemary essential oil: from *in vitro* assays to application in fresh poultry meat. *Food Hydrocolloids*, 89, 241-252.
73. Deng, L., Yuan, P., Liu, D., Du, P., Zhou, J., Wei, Y., Song, Y., Liu, Y. (2019). Effects of calcination and acid treatment on improving benzene adsorption performance of halloysite. *Applied Clay Science*, 181, 1-8.
74. Dey, S. C., Al-Amin, M., Rashid, T. U., Sultan, M. Z., Ashaduzzaman, M., Sarker, M., Shamsuddin, S. M. (2016). Preparation, characterization and performance evaluation of chitosan as an adsorbent for remazol red. *International Journal of Latest Research in Engineering and Technology*, 2 (2), 52-62.
75. Zheng, Y., Wang, A. (2009). Enhanced adsorption of ammonium using hydrogel composites based on chitosan and halloysite. *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 47 (1), 33-38.
76. Zhang, A. B., Pan, L., Zhang, H. Y., Liu, S. T., Ye, Y., Xia, M. S., Chen, X. G. (2012). Effects of acid treatment on the physico-chemical and pore characteristics of halloysite. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 396, 182-188.
77. Liu, M., Wu, C., Jiao, Y., Xiong, S., Zhou, C. (2013). Chitosan-halloysite nanotubes nanocomposite scaffolds for tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry B*, 1 (15), 2078-2089.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : HÜRMÜZLÜ, Saadet Rüya
 Uyruğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 24.02.1994, Ankara
 Medeni hali : Bekar
 Telefon : 05437116740
 e-posta : ruyahurmuzlu@live.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi/Kimya Mühendisliği	Devam ediyor
Lisans	Gazi Üniversitesi/Kimya Mühendisliği	2016
Lise	Ömer Seyfettin Lisesi	2012

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
-	-	-

Yabancı Dili

İngilizce

Yayınlar

1. Hürmüzlü, R., Okur, M., Saraçoğlu, N. (2019). The use of Laccase enzyme in the removal of textile dyes, 3rd International Symposium on Multidisciplinary Studies and Innovative Technologies, Ankara.

Hobiler

Yüzme, gitar, puzzle yapma



GAZİ GELECEKTİR..