**T.C.**

**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

# MANTAR LAKKAZ'ININ ALGİNAT JELLERDE TUTUKLANMASI VE ATIK SULARDA BOYAR MADDE GİDERİLMESİNDE KULLANILMASI

**Evren BAŞOĞLU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**Danışman: Doç. Dr. Hülya YAĞAR**

**EDİRNE-2013**

# MANTAR LAKKAZ'ININ ALGİNAT JELLERDE TUTUKLANMASI VE ATIK SULARDA BOYAR MADDE GİDERİLMESİNDE KULLANILMASI

**EVREN BAŞOĞLU**

**YÜKSEK LİSANS**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**2013**

**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof. Dr. Mustafa ÖZCAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

Prof. Dr. Ayten SAĞIROĞLU
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Hülya YAĞAR
Tez Danışmanı

Bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Kimya Anabilim Dalında bir Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri : İmza

Prof. Dr. Ayten SAĞIROĞLU

Doç. Dr. Figen İNCEOĞLU

Doç. Dr. Hülya YAĞAR

Tarih: 17 / 07 / 2013

**T.Ü.FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**DOĞRULUK BEYANI**

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.

17 / 07 / 2013

Evren BAŞOĞLU

Yüksek Lisans Tezi

Mantar Lakkaz'ının Alginat Jellerde Tutuklanması ve Atık Sularda Boyar Madde Giderilmesinde Kullanılması

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

# ÖZET

Bu çalışma kapsamında, *Boletus edulis* mantarından izole edilen lakkaz enzimi alginat/karragenan boncuklara immobilize edildi, serbest ve immobilize enzimlerin bazı özellikleri belirlendi ve bazı tekstil boyaları kullanılarak boya giderme aktiviteleri incelendi.

*Boletus edulis* mantarından izole edilerek % 40-60 $(NH_4)_2SO_4$ tuz çöktürmesi ve diyaliz ile elde edilen lakkaz enzimi alginat/karragenan boncuklarda tutuklandı. Lakkaz aktivitesi tayini substrat olarak 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) kullanılarak gerçekleştirildi. Protein tayini Bradford yöntemi ile yapıldı. Serbest ve immobilize enzimin lakkaz aktiviteleri sırasıyla; 281.896 U/mg ve 41.818 U/mg olarak belirlendi. İmmobilizasyon ve çalışma koşullarının optimizasyon çalışması sonucunda; damlatma çözeltisi olarak % 2'lik $CuCl_2$, Destek:Yüklenen enzim miktarı oranı 1:5 (w:v), boncuk boyutu 1.8 mm, aktivite tayininde kullanılacak boncuk miktarı 0.25 g olarak belirlendi.

Serbest enzim için optimum pH 2.0, optimum sıcaklık 25 °C; $K_m$ ve $V_{max}$ değerleri sırasıyla 0.333 mM ve 196.078 U/mg olarak belirlendi. İmmobilize enzim için ise optimum pH 3.5, optimum sıcaklık 37 °C, $K_m$ ve $V_{max}$ değerleri sırasıyla 0.642 mM ve 33.445 U/mg olarak belirlendi. Tekrar kullanılabilirlik çalışmasında immobilize enzimin 14. döngü sonunda aktivitesinin % 69'unu koruduğu gözlendi. Depo kararlılığı çalışmasında, +4 °C'de, serbest enzimin 28 günün sonunda başlangıç aktivitesini % 77 oranında, immobilize enzimin ise yaklaşık % 92 oranında koruduğu gözlendi. Termal kararlılık çalışmasında, serbest enzim 70 °C'de aktivitesini büyük ölçüde korurken, immobilize enzimin 70 °C'de aktivitesinin yaklaşık % 55'ini kaybettiği gözlendi. Renk giderme çalışmasında, Reactive Blue 19, Reactive Red 239, Reactive Orange ve Reactive Violet boyar maddeleriyle serbest enzim kullanılarak % 85-90 arasında renk giderme aktivitesi elde edildi. En yüksek renk giderme aktivitesi,% 88.9 ile Reactive Orange boyar maddesinde belirlendi.

Yıl : 2013

Sayfa Sayısı : 87

Anahtar Kelimeler : Lakkaz, *Boletus edulis*, immobilizasyon, alginat, karragenan, renk giderme aktivitesi

Master Thesis

Entrapment of Mushroom Laccase in Alginate Gels and Using for Decolorisation of Textile Dyes in Waste Waters

Trakya University Institute of Natural Sciences

Chemistry

## ABSTRACT

In this study, laccase isolated from *Boletus edulis* mushroom was immobilized alginate+carrageenan gel beads, some characteristics of free and immobilized laccases were determined, and their decolorisation activities evaluated by using same textile dyes.

Laccase isolated from fresh *Boletus edulis* mushroom was applied 40-60 % $(NH_4)_2SO_4$ precipitation and dialysis, and then was immobilized alginate+carrageenan gel beads. Laccase activity was carried out by using 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonicacid) (ABTS) as substrate. Protein determinations were done with Bradford method. Laccase activities were determined as 281.896 U/mg and 41.818 U/mg for free and immobilized enzyme, respectively. Dropping solution was determined as 2 % $CuCl_2$. Support:Loading enzyme ratio was 1:5 (w:v). Optimum bead diameter and optimum bead amount were determined to be 1.8 mm and 0.25 g, respectively.

For free laccase, optimum pH was 2.0, optimum temperature 25 °C, $K_m$ and $V_{max}$ values were 0.333 mM and 196.078 U/mg protein, respectively. For immobilized laccase, these parameters were pH 3.5, 37 °C, 0.642 mM and 33.445 U/mg, respectively. In reusability assay, immobilized laccase saved 69 % of its initial activity at the end of 14 cycles. In the storage stability assay at 4 °C, free and immobilized enzyme saved 77 % and about 92 % of their initial activities at the end of 28 days, respectively. In thermal stability assay, free enzyme saved largely its activity at 70 °C while immobilized enzyme lost 55 % of its initial activity. In decoulorisation assay, using Reactive Blue 19, Reactive Red 239, Reactive Orange and Reactive Violet dyes, 85-90 % decolorization was obtained for the free enzyme. The most effective decolorization activity was determined to be 88.9 % with Reactive Orange dye.

Year : 2013

Number of Pages : 87

Keywords : Laccase, *Boletus edulis*, immobilization, alginate, carrageenan, decolorization activity

# TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgisi ve tecrübesinden yararlandığım, araştırmacı yönünden ilham aldığım, tez çalışmam boyunca öneri ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Hülya YAĞAR' a

Çalışmanın her aşamasında yardımlarını ve katkılarını esirgemeyen bölüm hocalarıma ve arkadaşlarıma,

Tezde kullanılan boyar maddeleri sağlayan Atilla ŞABUDAK'a ve Resaş Kimya Tekstil Sanayi ve Tic. Ltd. Şirketi'ne,

Bugünlere gelmemi sağlayan, maddi ve manevi her zaman yanımda olan aileme,

Sonsuz teşekkülerimi sunarım…

Bu çalışma, TÜBAP 2013/31 no'lu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

# İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... i

ABSTRACT ..... iii

TEŞEKKÜR ..... v

SİMGELER DİZİNİ ..... ix

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... x

TABLOLAR DİZİNİ ..... xii

BÖLÜM 1 ..... 1

GİRİŞ ..... 1

BÖLÜM 2 ..... 4

GENEL BİLGİLER ..... 4

2.1. Lakkaz ..... 4

2.1.1. Lakkazların Genel Yapısı ..... 6

2.1.2. Lakkazların Reaksiyonları ..... 9

2.1.3. Lakkazların Elde Edildiği Kaynaklar ..... 12

2.1.4. Lakkazların Kullanım Alanları ..... 14

2.2. İmmobilizasyon ..... 18

2.2.1. İmmobilizasyon Yöntemleri ..... 19

2.2.1.1. İmmobilizasyon Sistemlerindeki Önemli Hususlar ..... 20

2.1.1.2. İmmobilizasyonYöntemlerine ve Taşıyıcılara Genel Bakış ..... 21

2.3. Alginat Jelde Tutuklama ..... 26

2.4. Karragenan Jelde Tutuklama ..... 27

2.5. Lakkazlar ile Gerçekleştirilen İmmobilizasyon Çalışmaları ..... 30

2.6. Tezde Kullanılan İmmobilizasyon Yöntemine Genel Bakış ..... 33

2.7. *Boletus edulis* ..... 34

2.8. Boyar maddeler ..... 35

2.8.1. Azo Boyar Maddeler ..... 35

BÖLÜM 3 ..... 37

MATERYAL VE METOTLAR ..... 37

3.1. Materyaller ..... 37
3.1.1. Kimyasal Maddeler ..... 37
3.1.2. Kullanılan Cihazlar ..... 37
3.1.3. Hazırlanan Çözeltiler ..... 38
3.2. Metotlar ..... 39
3.2.1. *Boletus edulis*'ten Lakkaz Enzimi İzolasyonu ..... 39
3.2.2. Amonyum Sülfat Çöktürmesi ..... 40
3.2.3. Diyaliz ..... 40
3.2.4. Alginat+Karragenan Jelde Tutuklama ..... 41
3.2.5. Protein Tayini ..... 41
3.2.5.1. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini ..... 41
3.2.6. Enzimatik Aktivite Tayini ..... 42
3.2.7. İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu ..... 43
3.2.7.1. Damlatma Çözeltisinin Optimizasyonu ..... 43
3.2.7.2. Enzim Miktarı Optimizasyonu ..... 44
3.2.7.3. Boncuk Boyutu Optimizasyonu ..... 44
3.2.7.4. Boncuk Miktarı Optimizasyonu ..... 44
3.2.8. *Boletus edulis*'ten İzole Edilen Lakkaz'ın Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi ..... 45
3.2.8.1. Optimum pH ..... 45
3.2.8.2. Optimum Sıcaklık ..... 45
3.2.8.3. Termal Kararlılık ..... 46
3.2.8.4. $K_m$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Belirlenmesi ..... 46
3.2.8.5. İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanılabilirliği ..... 46
3.2.8.6. İmmobilize Enzimin Depo Kararlılığı ..... 47
3.2.9. Serbest Ve İmmobilize Enzimle Azo Boyar madde Giderme ..... 47
BÖLÜM 4 ..... 49
DENEY SONUÇLARI VE BULGULAR ..... 49
4.1. *Boletus edulis*'ten Lakkaz İzolasyonu ..... 49
4.2. *Boletus edulis* Lakkaz'ının Alginat+Karragenan Jele İmmobilizasyonu ..... 50
4.3. Protein Standart Grafiğinin Hazırlanması ..... 51
4.4. İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu ..... 52
4.4.1. Damlatma Çözeltisinin Optimizasyonu ..... 52

4.4.2. Enzim Miktarı Optimizasyonu ..... 53
4.4.3. Boncuk Boyutu Optimizasyonu ..... 54
4.4.4. Boncuk Miktarı Optimizasyonu ..... 55
4.5. *Boletus edulis*'ten Elde Edilen Lakkaz'ın Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi ..... 56
4.5.1. Optimum pH ..... 56
4.5.2. Optimum Sıcaklık ..... 57
4.5.3. Termal Kararlılık ..... 58
4.5.4. $K_m$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Belirlenmesi ..... 60
4.5.5. İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanılabilirliği ..... 61
4.5.6. Depo Kararlılığı ..... 62
4.5.7. Boya Giderme ..... 63
BÖLÜM 5 ..... 68
TARTIŞMA ..... 68
KAYNAKLAR ..... 75
ÖZGEÇMİŞ ..... 87

# SİMGELER DİZİNİ

| | |
|---|---|
| BSA | : Sığır Serum Albümini (Bovine Serum Albumin) |
| PVP | : Polivinil Pirolidon |
| U | : Ünite |
| $K_m$ | : Michaelis-Menten hız sabiti |
| $V_{max}$ | : Maksimum Hız |
| ABTS | : 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) |
| HBT | : 1-hidroksibenzotriazol hidrat |
| VA | : Violurik asit monohidrat |
| PPO | : Polifenol Oksidaz |
| P(AAm-NIPA) | : Poli(akrilamid-N-izopropilakrilamid) |
| P(AAm)/Alg | : (Poli-akrilamid)/Alginat |
| P(AAm-NIPA)/Alg | : Poli(akrilamid-N-izopropilakrilamid)/Alginat |
| MWCNT | : Çok duvarlı karbon nanotüp |
| PAP | : Poli (azetidin)-prepolimer |
| [P(AAm-AA)/κ-car] | : Poli(akrilamid-akrilik asit)/κ-Karragenan |
| [P(AAm-IA)/κ-car] | :Poli(akrilamid-itakonik asit)/κ-Karragenan |
| APTES | : 3-aminopropiltrietoksisilan |
| GLUTAL | : Glutaraldehit |
| CEPEI | : Alkillenmiş polietilenimin |
| GCE | : Camsı karbon elektrod |
| M | : β-D-mannuronik asit |
| G | : α-L-glukuronik asit |
| LMS | : Lakkaz medyatör sistemler |

# ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Medyatör olarak kullanılan moleküller ..... 5

Şekil 2.2. Lakkazların medyatör aracılığıyla elektron kopararak moleküler oksijeni suya indirgemesi ..... 5

Şekil 2.3. Lakkazın yapısında bulunan bakır atomları ..... 6

Şekil 2.4. Lakkaz enzimindeki mononükleer ve trinükleer kümeler ..... 7

Şekil 2.5. Lakkazların katalitik döngüsü ..... 8

Şekil 2.6. Lakkazların kataliz şeması ..... 9

Şekil 2.7. Monomerlerin çapraz bağlanması ..... 10

Şekil 2.8.Polimerlerin degradasyonu ..... 11

Şekil 2.9. Aromatik halkaların parçalanması ..... 12

Şekil 2.10. İmmobilizasyon yöntemleri ..... 20

Şekil 2.11. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi ..... 22

Şekil 2.12. Alginat polimerinin kimyasal yapısı ..... 27

Şekil 2.13.κ-Karragenan polimerinin kimyasal yapısı ..... 29

Şekil 2.14. Bu çalışmada uygulanan immobilizasyon akış şeması ..... 33

Şekil 2.15. *Boletus edulis*'in ham (solda) ve olgun (sağda) fotoğrafları ..... 34

Şekil 2.16. Tezde kullanılan bazı azo boyar maddeler ..... 36

Şekil 3.1. Denemelerde kullanılan *Boletus edulis* mantarının fotoğrafı ..... 39

Şekil 4.1. *Boletus edulis* lakkazının alginat+karragenan jelde tutuklanmasıyla elde edilen boncukların fotoğrafı ..... 50

Şekil 4.2. Bradford yöntemi ile hazırlanan standart protein grafiği ..... 51

Şekil 4.3. Damlatma çözeltisi optimizasyon grafiği ..... 52

Şekil 4.4. Alginat+karragenan jellere yüklenecek enzim miktarı optimizasyon grafiği ..... 53

Şekil 4.5. Boncuk boyutu optimizasyon grafiği ..... 54

Şekil 4.6. Boncuk miktarı optimizasyon grafiği ..... 55

Şekil 4.7. Serbest ve immobilize enzime ait optimum pH grafiği ..... 56

Şekil 4.8. Serbest ve immobilize enzim için optimum sıcaklık grafiği .....57
Şekil 4.9. Serbest enzimin termal kararlılık grafiği .....58
Şekil 4.10. İmmobilize enzimin termal kararlılık deneyindeki değerlerine ait grafik ....59
Şekil 4.11. Serbest ve immobilize enzim için oluşturulan Lineweaver-Burk grafiği .....60
Şekil 4.12. İmmobilize enzimin tekrar kullanılabilirlik grafiği .....61
Şekil 4.13. Serbest ve immobilize enzimin depo kararlılığı grafiği.....62
Şekil 4.14.Serbest ve immobilize enzimlerin medyatörsüz boya giderme grafiği.....66
Şekil 4.15. Serbest ve immobilize enzimin HBT medyatörü ile boya giderme grafiği ..66
Şekil 4.16. Serbest ve immobilize enziminVA medyatörü ile boya giderme grafiği .....67

# TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. İmmobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması ..... 21

Tablo 2.2. Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcı çeşitleri ..... 23

Tablo 2.3. Kovalent bağlamada proteinlerle bağ kurabilecek fonksiyonel gruplar ..... 23

Tablo 4.1. *Boletus edulis* lakkaz'ının izolasyonunda belirlenen protein ve enzim aktiviteleri ..... 49

Tablo 4.2. İmmobilizasyon koşullarının optimizasyon verileri ..... 55

Tablo 4.3. Serbest ve immobilize enzimlerin kinetik değerler ..... 60

Tablo 4.4. Serbest ve immobilize enzimin bazı biyokimyasal özellikleri ..... 63

Tablo 4.5. İmmobilize ve serbest enzimle yapılan boya giderme çalışmaları ..... 65

# BÖLÜM 1

# GİRİŞ

Enzimler, canlı hücrelerce sentezlenen, fakat yalnızca hücre içinde değil hücre dışında da etkinlik gösterebilen biyolojik katalizörlerdir. Biyokimyasal reaksiyonları yüksek bir özgüllükle katalizleme yeteneğine sahiptirler. Kimyasal katalize göre daha ucuz ve daha kolay kataliz yeteneğine sahip oldukları için günümüzde enzimlerden endüstriyel anlamda sıklıkla faydalanılmaktadır.

Endüstriyel uygulamalar genellikle sulu ortamda gerçekleştirildikleri için reaksiyon ortamına ilave edilen enzimin geri kazanımı neredeyse imkansızdır. Bunun yanı sıra reaksiyon ortamındaki enzim, zamanında uzaklaştırılamaz ise istenmeyen reaksiyonlara ve sonuç olarakta istenmeyen ürün oluşumuna sebebiyet vermektedir. Enzimin aktivitesini durdurmak için ortama inhibitör etkili madde katıldığında ise kimyasal kirlilik meydana gelmektedir.

Bahsedilen bütün olumsuzlukların önüne geçebilmek için araştırmacılar enzim immobilizasyonu işine yoğunlaşmışlardır. Yaklaşık 40 yıldan bu yana enzim immobilizasyonu üzerine araştırmalar yapılmaktadır [1].

Lakkazlar (E.C.1.10.3.2; *p*-difenol: oksijen oksidoredüktaz), difenolik bileşikleri oksijen varlığında oksitleyen oksido redüktaz türevi bakır kofaktörlü enzimlerdir. Substrat molekülünden bir elektron koparıp bunu moleküler oksijene aktararak su açığa çıkartır. Bu aktivite, yapısında bulunan 4 adet $Cu^{+2}$ atomu tarafından gerçekleştirilir [2].

Lakkazlar, kağıt ve kağıt hamuru ağartma, tekstil, petrokimya, biyoremidasyon, antikanser ilaçlarının yapımı, kozmetik, biyosensör gibi çok sayıda endüstriyel alanda etkin olarak kullanılmaktadır. İmmobilizasyon çalışmalarıyla lakkaz enziminin kullanılabilirliği daha da arttırılabilir.

Lakkazın en çok ilgi çeken kullanım alanlarından biride tekstil sektöründe kullanılan atık sudaki renk kirliliğinde temizleyici ajan olarak kullanılmasıdır. Son yıllarda tekstil sektörüne artan ilgi çok sayıda tekstil fabrikası açılmasına sebep olmuş, bu durum beraberinde su kirliliği problemini getirmiştir. Boya içeren atık suların arıtılmasında kullanılan kimyasal metotlar pahalı olup pek de etkili değildir [3]. Lakkazların buradaki rolü ise tekstil sektöründe kullanılan boyar maddelerin parçalanmasını sağlamasından ileri gelmektedir. "Lakkaz medyatör sistemler (LMS)" aracılığıyla substratı olmayan birçok molekülü yükseltegeyebilen lakkazlar, boyalar üzerinde de etkili olmaktadır.

Enzimler gibi biyolojik veya kimyasal materyallerin taşıyıcı polimerlere tutuklama yöntemiyle immobilizasyonu bilimsel ve endüstriyel uygulamalarda çok geniş bir kullanım alanına sahiptir. Tutuklama işlemini gerçekleştirmek amacıyla kullanılan alginat, agaroz, karragenan, kitin ve kitosan gibi polimerler doğal olmaları sebebiyle toksik olmama, biyouyumluluk ve biyobozunabilirlik gibi avantajlara sahiptir. Alginat ve karragenan polimerleri gıda, ilaç, tekstil, kozmetik gibi birçok sektörde etkin olarak kullanılmaktadır. Bunun yanında alginat ve karragenan jeller tutuklama yönteminde sıklıkla kullanılan polimer materyallerdir [4].

Lakkazlar; bitki, böcek kabuğu ve funguslar gibi ökaryotik kaynakların yanı sıra *Bacillus subtilis, Streptomyces lavendulae* gibi prokaryotik kaynaklarda da bulunmaktadır. Bitkisel kaynaklar, izolasyon sonrası saflaştırma güçlükleri sebebiyle fazla kullanım alanına sahip olmasa da, literatürde en çok kullanım alanına sahip lakkaz kaynağı funguslar olduğu görülmektedir. Son yıllarda artan bir şekilde prokaryotik kaynaklardan elde edilen lakkazlar da kullanılmaya başlanmıştır [2].

*Boletus edulis* mantarı, şapkalı bir mantar olup *Boletaceae* ailesinden Boletus cinsine aittir. Ham haldeyken şapkalarının altı beyaz renkte iken olgunlaştığında şapkasının altındaki renk sarımsı-yeşil bir renge dönüşür. Çörek mantarı, Bolet mantarı, Ayı mantarı olarak da bilinir. Bilimsel adındaki *bolet* latincede "üstün mantar", *edulis*'de "yenebilen" anlamındadır.

Farklı mantarlardan lakkaz izolasyonu ve aktiviteleri çeşitli bilimsel araştırmalarla bildirilmiştir. Bu tez kapsamında da, Kırklareli-Saray ilçesinde yetişen bir

mantar olan *Boletus edulis* mantarından lakkaz enzimi izole edilerek alginat/karragenan jele immobilizasyonu amaçlanmıştır. Serbest ve immobilize lakkazın; optimum pH, optimum sıcaklık, $K_m$ ve $V_{max}$ kinetik sabitleri, termal kararlılık, tekrar kullanılabilirlik ve depo kararlılığı gibi bazı biyokimyasal özellikleri incelenmiştir. Ayrıca *Boletus edulis* lakkazının boya giderme aktivitesi çeşitli tekstil boyaları kullanılarak çalışılmıştır.

# BÖLÜM 2

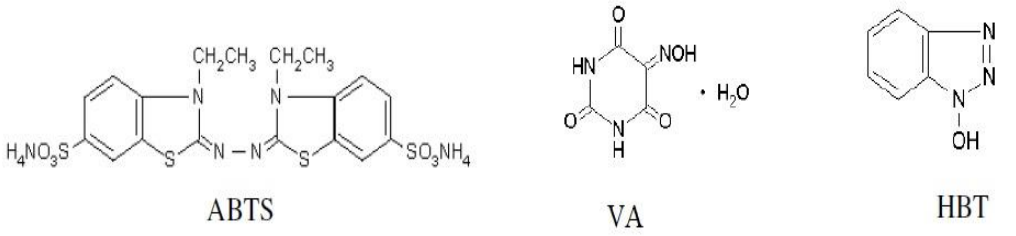
# GENEL BİLGİLER

## 2.1. Lakkaz

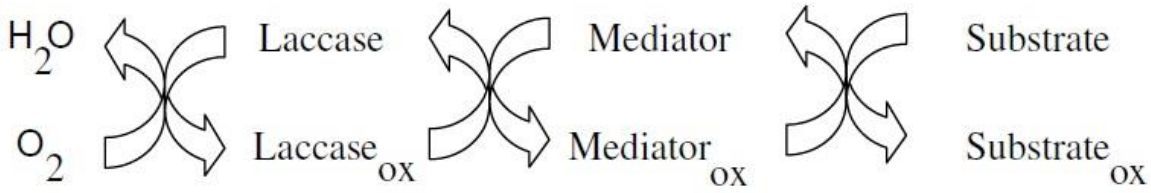
Lakkazlar, 19. yüzyıldan bu yana üzerinde sıkça çalışılan enzimlerden biri olmuştur. Lakkaz; polifenol oksidaz (PPO) sınıfına dahil bir enzim olup aktif merkezinde birden fazla bakır içeren bir enzimdir [5]. Polifenol oksidazlar ilk olarak Yoshida tarafından 1883 yılında Japonya'daki *Rhus vericifera* vernik ağacında keşfedilmiştir [6]. PPO grubuna ait 3 enzim sınıfı bulunmaktadır: 1- Kateşol oksidaz (E.C 1.10.3.1; o-difenol oksijen redüktaz), 2- Kresolaz (E.C 1.14.18.1; monofenol monooksijenaz) ve 3- Lakkaz (E.C 1.10.3.2; *p*-difenol: oksijen oksidoredüktaz) [7].

Çoklu bakır içeren enzimler arasında yer alan lakkaz, substratları okside ederken moleküler oksijenden faydalanmaktadır. Lakkazlar, yapılarında bulundurdukları kofaktör bakırlar yardımıyla aromatik veya aromatik olmayan substratlardan birer elektron koparıp onları radikalik hale dönüştürür; bu sırada koparmış olduğu elektronları moleküler oksijene aktarır ve son durumda oksijen molekülüne toplamda 4 elektron aktararak oksijen molekülünü indirgeyererek suya dönüşmesini sağlar[2].

Lakkazlar, kendi substratları yanında birtakım medyatör moleküller aracılığıyla lakkaz substratı olmayan başka molekülleri de oksitleyebilmektedir. Böyle sistemler lakkaz medyatör sistem (LMS) olarak adlandırılmaktadır. LMS'lerde medyatör olarak 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzothiazoline-6-sülfonik asit) (ABTS), 1-hidroksibenzotriazol (HBT), violurik asit monohidrat (VA) gibi maddeler kullanılmaktadır. Bu moleküllerin açık formülü Şekil 2.1'de verilmiştir. LMS'lere ait oksidasyon Şekil 2.2'de gösterilmektedir.




**Şekil 2.1.** Medyatör olarak kullanılan moleküller [6]




**Şekil 2.2.** Lakkazların medyatör aracılığıyla elektron koparak moleküler oksijeni suya indirgemesi [6]

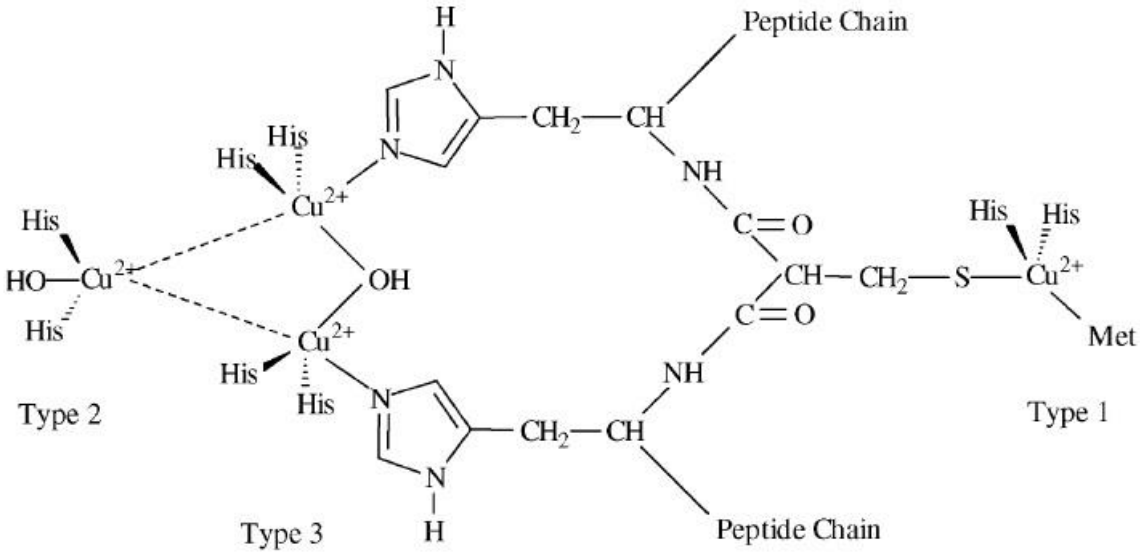
Lakkazlara çok çeşitli canlı kaynaklarda rastlanmıştır. Bu kaynaklar bitkiler, bazı böcekler [8, 9] olarak sıralanabilir. Bunların yanında endüstriyel olarak yüksek kullanım potansiyeline sahip fungal kökenli çok sayıda lakkazda bulunmaktadır. Bunların içinde *Ascomycetes* ve özellikle de *Basidomycetes* fungusları sayılabilir [6].

Literatürde rapor edilmiş olan çalışmalarda lakkaz proteinlerinin moleküler ağırlıkları 50-130 kDa arasında değiştiği gözlenmiştir. Bitkisel kaynaklı lakkazlarda karbonhidrat ağırlıkları protein ağırlığının % 45'ini kapsarken, fungal kaynaklı lakkazlarda karbonhidrat ağırlıkları protein ağırlığının % 10-20'sini kapsadığı belirlenmiştir [2].

### 2.1.1. Lakkazların Genel Yapısı

Çok sayıda biyolojik lakkaz kaynağı bulunmasına rağmen, bunların yapısı hakkında bilgi genel anlamda fungal kökenli lakkazlardan izole edilerek belirlenmiştir. Lakkaz enzimlerinin en karakteristik özelliklerinden biri protein yapısına kovalent olarak bağlı bulunan ve enzimin toplam ağırlığının %10-45'ini oluşturan bir karbonhidrat kısmının bulunmasıdır. Bu karbonhidrattan oluşan kısım enzimin kararlılığına katkıda bulunur [2].

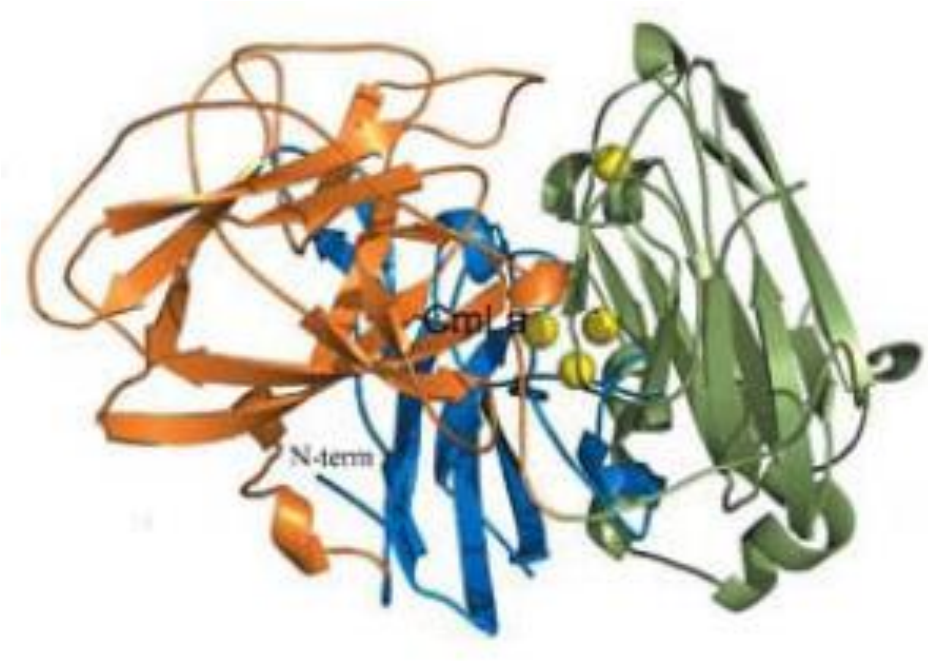
Bilindiği üzere lakkazlar çoklu bakır içeren PPO sınıfı enzimlerin bir üyesidirler. Katalitik aktivitelerini sahip oldukları bu bakır atomları sayesinde gerçekleştirirler. Yapılarında 4 adet bakır atomu bulunmaktadır ve bunlar Tip 1, Tip2 ve Tip 3 olmak üzere gruplanmışlardır (Şekil 2.3). Tip 1 bölgesine bağlı olan bakır mavi bakır olarak adlandırılmaktadır.




**Şekil 2.3.** Lakkazın yapısında bulunan bakır atomları [10]

Şekil 2.3'te görüldüğü üzere 4 bakır atomu farklı bir şekilde gruplanmıştır. Böyle olduğu içinde reaksiyonlar buna göre gerçekleşirler. Tip 1 bakır atomunun

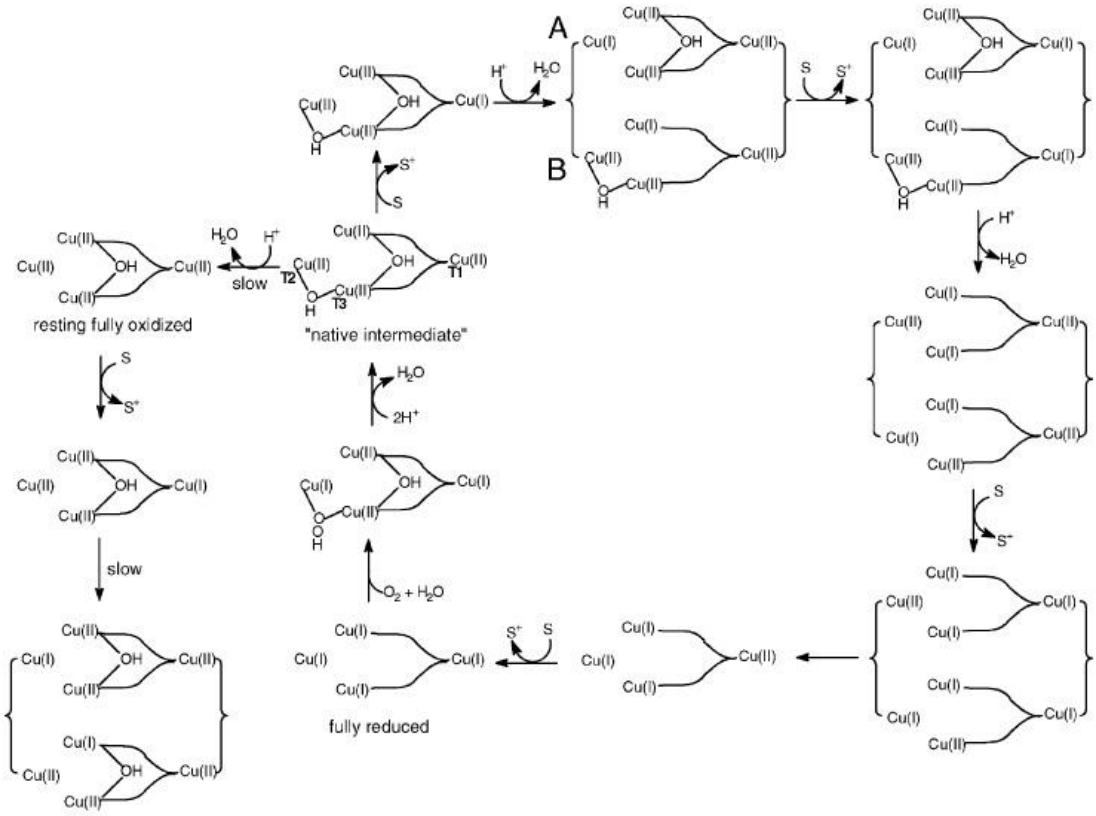
bulunduğu bölge mononükleer bölge, Tip 2 ve Tip 3 bakır atomlarının bulunduğu bölge ise trinükleer küme olarak adlandırılır (Şekil 2.4).




**Şekil 2.4.** Lakkaz enzimindeki mononükleer ve trinükleer kümeler [2]

Mononükleer bölgede substratın oksidasyonu gerçekleşirken, trinükleer bölgede moleküler oksijenin suya indirgenmesi gerçekleşir (Şekil 2.5). İndirgeme işlemi şu şekilde ilerler:

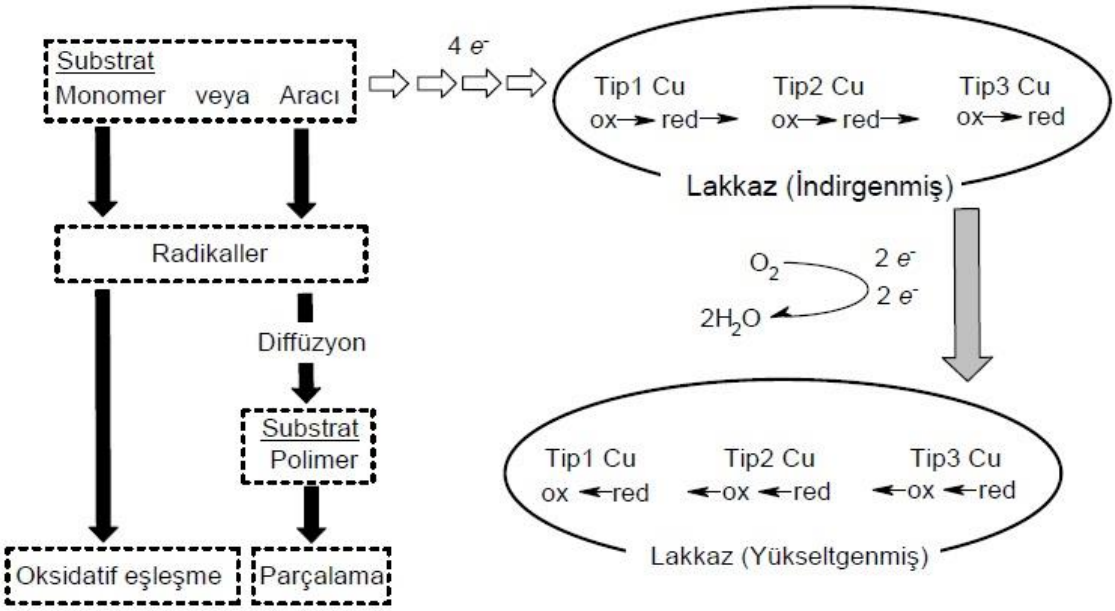
- Ortamda bulunan moleküler oksijen suyla birlikte enzime Tip 3'deki binükleer merkezden ve Tip 2 ile Tip 3'teki bakırlardan bağlanır [11].
- Daha sonra Tip 1 bölgesindeki bakır, substrattan bir elektron koparark substratı oksitler.
- Bu sırada Tip 1 bakır substrattan koparmış olduğu elektronla indirgenir.
- Ortamdaki bir proton Tip 1 bölgesindeki elektronla birlikte indirgenme bölgedesinde bağlı halde bulunan OH grubuna aktarılır.
- Enzimin farklı bir substrattan tekrar elektron almasıyla işlemler tekrarlanır ve bağlanan bölgede moleküler oksijen su olarak ayrılır.




**Şekil 2.5.** Lakkazların katalitik döngüsü [10]

### 2.1.2. Lakkazların Reaksiyonları

Lakkazların hemen hepsinde ortak olarak bulunan bakır merkezleri bu enzimlerin katalizledikleri reaksiyonlar açısından hayati önem taşımaktadırlar. Katalizledikleri reaksiyonun genel şeması Şekil 2.6'da gösterilmiştir.

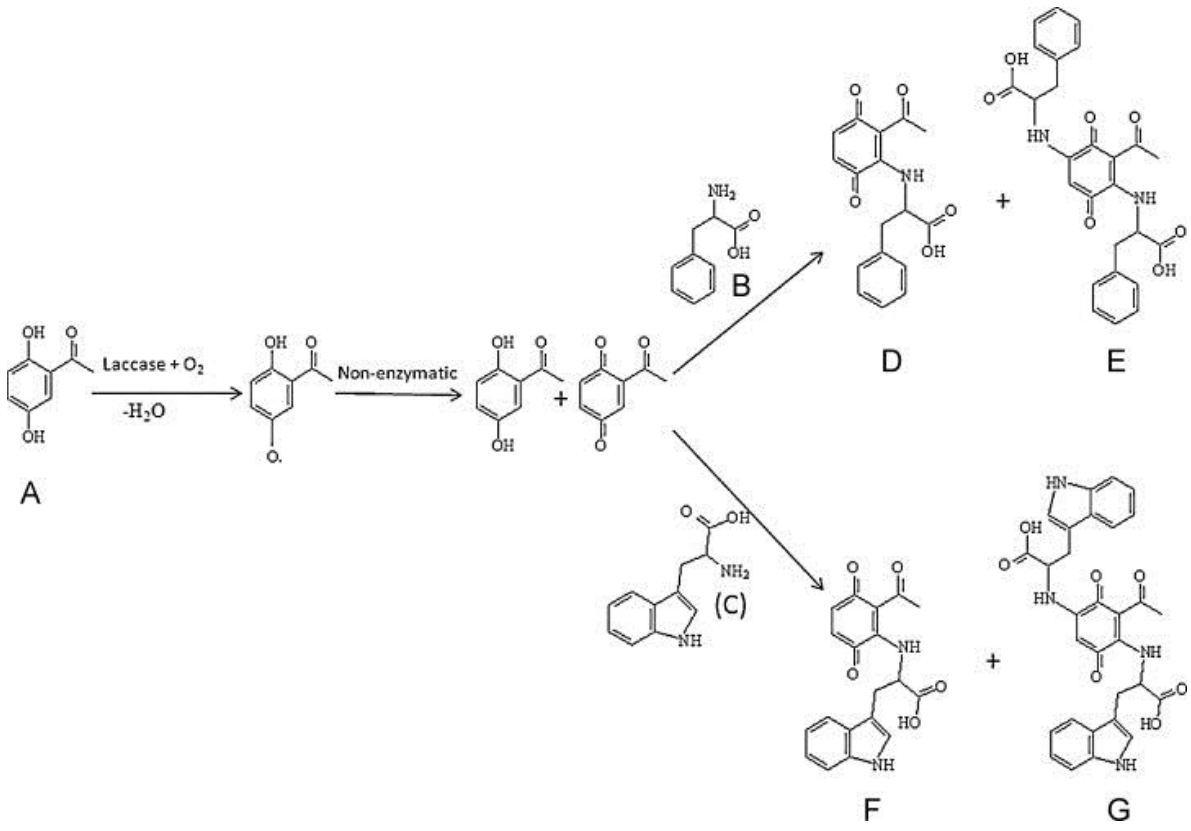



**Şekil 2.6.** Lakkazların kataliz şeması [2]

Bakır merkezleri sayesinde substrattan aldıkları elektronları moleküler oksijene aktaran lakkazlar su açığa çıkarırken, elektron koparmış oldukları okside substratlar ise toksik peroksit ara ürünlerinin oluşmasına yol açmadan radikalik moleküllere dönüşür. Oksitlenmiş bu substratlar diğer taraftan kendi içlerinde enzimatik olmayan şu reaksiyonları yürütürler:

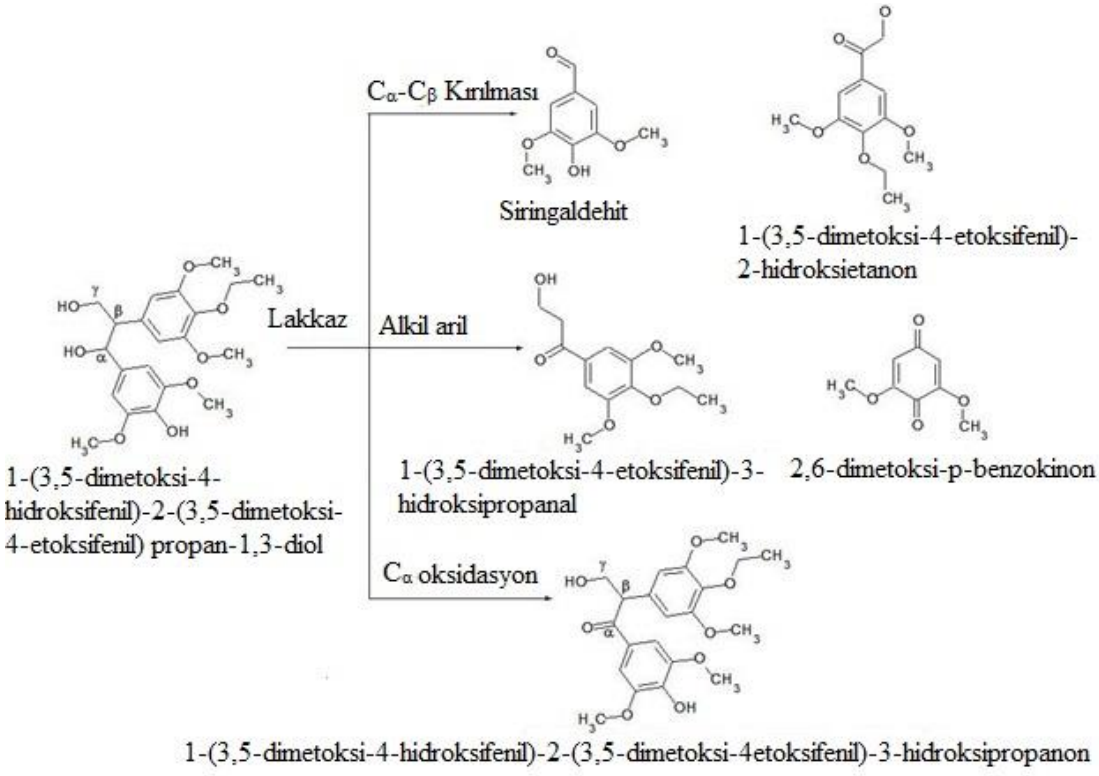
- Monomerlerin çapraz bağlanması
- Polimerlerin degradasyonu
- Aromatik halkaların parçalanması

**Monomerlerin çapraz bağlanması:** Lakkazlar, fenolik bileşikler ve anilinler gibi bileşikleri katalizlediklerinde söz konusu bu moleküller radikaller meydana getirirler. Bu radikaller kendi aralarında C-C, C-O ve C-N atomları arasında bağlanmalar göstererek dimerler, oligomerler ve polimerler oluştururlar (Şekil 2.7) [12]. Yüksek bitkilerdeki fenolik öncüllerin bu şekilde çapraz bağlanarak polimerler meydana getirmesi lignifikasyon prosesinin bir parçasıdır. Bunun yanında böceklerde kateşollerin oksidatif eşleşmesi sonucu proteinlerle birlikte dış iskelet oluşturmada etkindir [9]. Mikroorganizmalarda ise lakkazın, protein kalıntıları arasındaki çapraz bağlanmalar sonunda *Bacillus* sporlarındaki sıcaklığa ve UV ışığa karşı olan dayanıklılıkla bir ilişkisi olup olmadığı tartışılmaktadır [13].



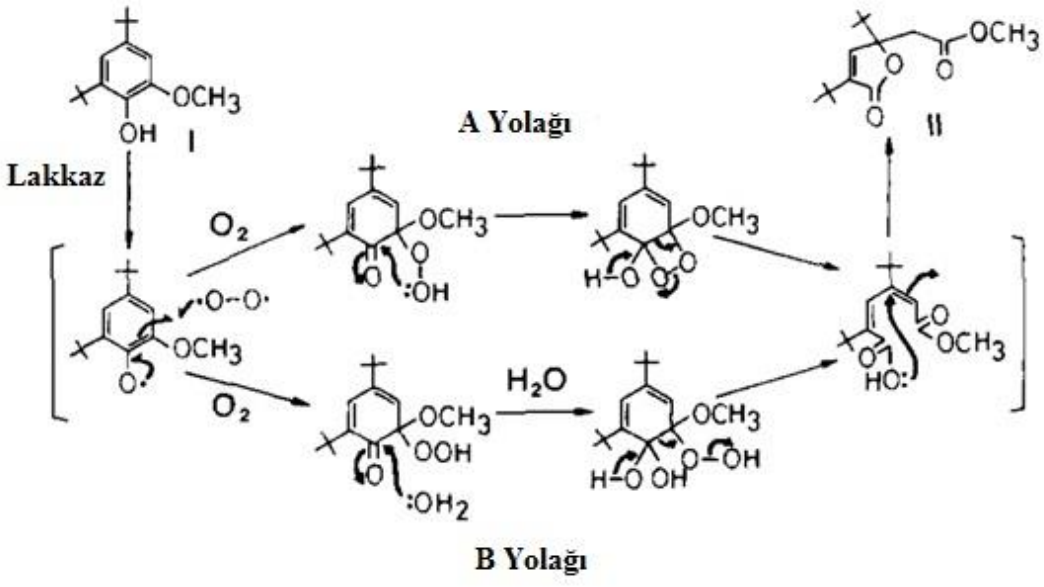

**Şekil 2.7.** Monomerlerin çapraz bağlanması [14]

**Polimerlerin degradasyonu:** Lakkazların dahil olduğu bir diğer reaksiyon tipi de polimerlerin parçalanmasıdır. Humik asit ve lignin gibi doğal kompleks polimerlerin parçalanmasında endüstriyel olarak lakkaz kullanımı yaygındır [14]. Polimerler gibi büyük moleküllerde sterik engellerin çok büyük olduğu göz önüne alınırsa lakkazların bu tür büyük polimerlerle doğrudan reaksiyona giremeyeceği açık bir şekilde görülür. Bu durumda LMS adı verilen sistemler kullanılır. Bu sistemlerde polimerler organik medyatörler (violurik asit, ABTS, HBT vb) ve inorganik medyatörler (Mn) vasıtasıyla parçalanabilir. Lakkaz yardımıyla oksitlenerek radikalik hale gelen medyatörler polimerlerin kovalent bağlarına saldırır ve onları parçalayarak monomerlerin serbest kalmasını sağlar (Şekil 2.8).




**Şekil 2.8.**Polimerlerin degradasyonu [15]

**Aromatik halkaların parçalanması:** Literatürde rapor edilmiş birkaç çalışmada lakkazların aromatik bileşiklerde halkaları parçalama (Şekil 2.9) yönünde etki ettiği bildirilmiştir [16]. Bu tür reaksiyonlar nitroaromatikler, sentetik boyalar gibi ksenobiyotiklerin parçalanmasına etki etmesinden dolayı biyoteknolojik uygulamalar açısından ilgi çekmektedir.




**Şekil 2.9.** Aromatik halkaların parçalanması [16]

### 2.1.3. Lakkazların Elde Edildiği Kaynaklar

Lakkazlar ilk keşfedildiklerinde yalnızca ökaryotik canlılarda (funguslar, bitkiler ve bazı böcekler) tanımlanmışlardı. Fakat 1993 yılında Givaudan vd. *Azospirillium lipoferum* bakterisinde yaptıkları polifenoloksidaz çalışması sırasında lakkaz enzimine rastlamıştır ve bu lakkazların prokaryotik organizmalardaki varlığını gösteren ilk çalışmadır [5].

Bu durumda lakkazlar ökaryotik ve prokaryotik organizmalarda bulunan PPO türevi çoklu bakır içeren enzimlerdir demek yanlış olmaz.

Ökaryot organizmalarda lakkazların en büyük iki grubu bitki ve funguslardır [17]. Bunun yanında böceklerde de bulunduğuna dair literatür bilgisi vardır [9, 18].

Bitkiler açısından bakıldığında, lakkazlar funguslarda bulunduğu miktara göre bitkilerde çok daha düşük miktarlardadır. Bunun yanında bitkilerde çok fazla miktarda oksidatif enzim bulunması ve hepsinin de substrat özgüllüğünün fazlasıyla geniş olması nedeniyle lakkazların varlığı çok zor belirlenmektedir. Lakkaz hücre duvarlarına bağlı olduğu için bundan ileri gelen bir zorluk da söz konusu olabilir. Yine de lakkazların ilk belirlendiği kaynak olan Japon vernik ağacı (*Rhus vernicifera*) bitkisel bir kaynak olduğundan üzerinde çok fazla çalışma gerçekleştirilmiştir; buna bağlı olarak da çok detaylı bir şekilde karakterizasyonu yapılmıştır [19]. *Pinus taeda*'nın ksilem dokusunda eksprese edilmiş 8 farklı lakkaz içerdiği belirlenmiştir [20], *Populus euramericana* ksilem dokusunda kesin olarak 5 adet lakkaz belirlenmiştir [21]. Fungal lakkazlarla ilgili rapor edilen çok fazla çalışmaya rağmen bitkilerlede ilgili çalışmaların azımsanmayacak sayıda olduğu görülmektedir. Özellikle ksilem dokularında bulunan çok sayıdaki lakkaz varlığı, bitkileri lakkazlar açısından zengin kılmaktadır.

Funguslar açısından ele alındığında ise, lakkazların en önemli kaynaklarından birinin funguslar olduğu göze çarpmaktadır. Özellikleri genel anlamda iyi bir lignin parçalayıcısı olan beyaz çürükçül mantarlar lakkaz kaynakları arasında başı çekmektedirler. İyi lakkaz kaynaklarından birkaçı *Trametes cubensis*, *Trametes versicolor* [22], *Pondospora anserina*, *Neurospora crassa* [23], *Agaricus bisporus* [24], *Pleurotus ostreatus* [25] olarak sıralanabilir. Funguslar lakkaz açısından fazlasıyla zengin olduğundan bunlar üzerine yapılan çalışmalar daha fazladır. Yapılan çok sayıda fungus çalışmasında lakkazla ilgili genler klonlanarak uygun bir şekilde depolanmıştır. Tüm fungal lakkazlarda aktif bölge korunurken geri kalan protein ve karbonhidrat yapıları çok büyük değişiklikler göstermiştir [26].

Böceklerde ise, lakkazların böcek kabuklarının oluşumunda rol alabileceği düşünülmektedir. Bilindiği gibi lakkaz enziminin katalizlediği reaksiyonlar sonucunda oluşan radikalik gruplar kendi aralarında reaksiyonlar vererek dimer, oligomer ve polimer meydana gelebilmektedir. Mark Pryor 1940 yılında, böcek kabuklarındaki *o*-kinonlar ilk etapta lakkaz enzimince katalizlenip radikal forma dönüştürüldüğünü söylemiş, devamında ise radikalik gruplar kendi aralarında serbest amino grupları ile reaksiyon verip polimerleşerek böcek kabuklarını oluşturduğunu ileri sürmüştür [18].

Prokaryotlardaki lakkazlar incelendiğinde ökaryotik lakkazlara oranla daha fazla avantajı bulunmaktadır. Endüstriyel uygulamalar göz önüne alınırsa, sentetik boyaların detoksifikasyonu, pestisitlerin giderilmesine dayalı biyoremidasyon, anti-kanser ilaçlarının etken maddelerinin katalizlenmesi, su arıtma sistemlerinde temizleme ajanı olarak kullanılması gibi birçok uygulamada hem ökaryotik hem prokaryotik lakkazlar görev alabilirler. Fakat ökaryotik lakkazlar bahsedilen çoğu işlemde redoks medyatörleri kullanırken, prokaryotik lakkazlar medyatör varlığı ya da yokluğu fark etmeden her daim reaksiyonları katalizleyebilir [27]. Fungal lakkazlara göre bakteriyel lakkazlar; yüksek sıcaklıkta, yüksek pH'ta, yüksek konsantrasyonda ve bakır, klor iyonu varlığında bile çok daha kararlıdır. Bunun yanısıra bakteri lakkazlarının immobilizasyon işleminde uygulanabilirlikleri daha fazladır [28].

### 2.1.4. Lakkazların Kullanım Alanları

Lakkazların oksitleme yeteneği, yalnızca fenolik ve fenolik olmayan bileşiklere karşı değil, bunun yanında substratları dışında kalan ve çevre için zararlı olup yıkılmaya karşı dirençli diğer birçok molekülüde kapsar. Bunun yanında almış olduğu elektronları özel kofaktör akseptörler dışında en basit anlamda hava oksijenine aktarabilmeleri lakkaz enzimini benzersiz kılmaktadır. Substrat özgüllüğünün bu şekilde düşük olması ve aktivitesini göstermedeki basitliği sebebiyle lakkazı biyoteknolojik ve endüstriyel uygulamalarda tercih sebebi haline getirmiştir.

Bu biyoteknolojik ve endüstriyel uygulamalara göz atılacak olursa;

- Kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde ağartma,
- Tekstil ve petrokimya endüstrisindeki uygulamalardan ileri gelen atık suların detoksifikasyonu,
- Çeşitli biyosensörlerin yapılmasında,
- Anti kanser ilaçlarının etken maddelerinin sentezlerini katalizlemede,
- Kozmetik ürünlerde katkı maddesi olarak kullanılması,
- Herbisit ve pestisit gibi ksenobiyotiklerin kirlettiği toprakların biyoremidasyonunda kullanıldığı bilinmektedir [29].

Endüstriyel alanda oksidasyon reaksiyonları bir takım sorunları beraberinde getirir. Bunlar;

- Spesifik olmayan veya ortamda gerçekleşmesi istenmeyen yan reaksiyonlar,
- Çevre için kirlilik tehdidi oluşturan toksik kimyasalların kullanılması yada oluşmasıdır.

Durum böyle olunca araştırmacılar, bu uygulamaları yalnızca istedikleri yönde ilerletebilmek adına biyolojik sistemlere dayalı reaksiyonlara yönelmişlerdir. Biyolojik sistemlerde bu tür reaksiyonları yüksek seçicilikte gerçekleştiren sistemler ise enzimlerdir. Enzimler;

- Özgül olmaları,
- Biyolojik açıdan parçalanabilir yapıda olmaları sebebiyle doğaya zarar vermemeleri,
- Reaksiyonları daha ılımlı koşullarda gerçekleştirebilmeleri gibi özellikleri sayesinde endüstriyel uygulamalarda fazlasıyla rağbet görmektedirler [2].

Lakkazlarla ilgili şu ana kadar rapor edilmiş redoks potansiyelleri, fenolik olmayan bileşiklerle karşılaştırıldığında daha düşük potansiyele sahip oldukları gözlenmiştir. Bu sebeple normal şartlarda lakkaz enzimleri bu tür molekülleri oksitleyemez. Fakat, medyatörler yani elektron transfer aracıları sayesinde bu tür kendinden daha yüksek redoks potansiyeline sahip moleküllerideoksitleyebilir hale geldiği bildirilmiştir [30]. Bu tür sistemler daha öncede belirtildiği gibi lakkaz medyatör sistemler (LMS) olarak adlandırılırlar.

Lakkaz medyatör sistemlerinin uygulama alanlarına bakılacak olursa;

- Kağıt hamurunun ligninden arındırılması (delignifikasyon) ve beyazlatılması [31],
- Organik kirleticilerin oksitlenmesi [32],
- Çaydaki etken maddelerin ve fenolik maddelerin biyosensör ile incelenmesi [33],
- Biyosensörlerin ve biyoyakıt hücrelerinin geliştirilmesi [34],
- Polimerlerin sentezi [19],

- Tekstil boyalarının kirlettiği suların detoksifikasyonu (boya giderme) [35],
- Biyoremidasyon [36],
- Gıda sektöründeki uygulamalar [37] şeklinde sıralanabilir.

**Kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde kullanımı:** Kağıt endüstrisinde lakkaz kullanımı özellikle kağıdın ağartılması işleminde öne çıkmaktadır. Geleneksel tekniklerle yapılan beyazlatma klor temelli olup kağıt hamurundaki ligninin giderilmesini (delignifikasyon) sağlamaktadır; fakat kullanılan klor bileşikleri çevresel sorunlara sebep olduğundan üreticileri daha alternatif yollar aramaya itmiştir. Daha sonra araştırmacılar biyolojik sistemlerle ağartma işlemini keşfederek buna yönelmişlerdir.

Lakkazların kağıt hamurunda delignifikasyon amacıyla kullanılması önceden uç koşullarda yapılan ağartma işlemini daha ılımlı koşullarda gerçekleştirilebilir hale getirmiştir. Bunun yanı sıra biyolojik sistemlerin kullanılması çevreye hiçbir şekilde zarar vermediğinden yöntemi cazip kılmaktadır [38,39].

Daha öncede bahsedildiği gibi lakkazların redoks potansiyelleri fenollerle karşılaştırıldığında daha yüksektir fakat LMS kullanılarak bu sorun aşılmıştır. Delignifikasyon işleminde de lakkaz yalnızca lignin polimeri içerisindeki bir takım fenolleri (% 10) oksitleyebilirken, LMS sayesinde lignin polimerinin tamamını oksitleyebilmektedir. LMS için kullanılan en tipik medyatör ABTS'dir. ABTS'nin sahip olduğu küçük boyutlar onun sterik engel yaşamaksızın lignin polimerini parçalamasını sağlar. Özellikle fungal lakkazlar LMS sistemleriyle kağıt ve kağıt hamurunun kappa numarasına etki ederek beyazlatılmasında etkilidir [40, 41].

Lakkazlar odun temelli kompozit madde üretilmesinde de kullanılmaktadır. Odunların yapısındaki liflerin içindeki lignini oksitleyip daha aktif hale getirir ve bu sayede birbirine yapışarak bütün halinde duran lifler daha sağlam bir yapı oluşturmaktadır [19, 42]

**Tekstil endüstrisindeki kullanımı:** Tekstil endsütrisi, boya işlemlerinin en çok kullanıldığı sektörlerin başında gelmektedir. Tekstil ürünlerinin işlenmesi sırasında fazlasıyla yaş işlem yapıldığından çok fazla miktarda su ve kimyasal madde kullanılmaktadır. Sektörde kullanılan kimyasal inorganik maddelerden başlayarak

fenolik ve polimerik organik bileşiklere kadar çok fazla çeşitlilik göstermektir [43]. Bu durum nedeniyle yaş işlemler sırasında kullanılan sulara aşırı miktarda kimyasal ajan karıştığı için ortaya büyük bir çevre sorunu çıkmaktadır.

Boyar maddelerin, tekstil endüstrisinde renk solmalarına karşı dirençli olması özellikle tercih edilen bir durumdur. Boyar maddelerin bu derece dirençli olmaları onların ışığa, suya ve hatta kimyasal maddelere karşı bile dayanıklı kılar [44, 45]. Bazı durumlarda ise boyar maddelerin parçalanması sonucu açığa çıkan maddeler öncekilerden çok daha toksik olabilmektedir [46]. Bu sebeple boya giderme işlemlerinde de araştırmacılar enzimatik yöntemlere başvurmuşlardır.

Lakkaz gibi ligninolitik enzimler boyar maddelerin giderilmesinde etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Lakkazın, aromatik bileşikler üzerinde oksidasyon etkisi olması ve özellikle de substrat özgüllüğünün çok düşük olması lakkazların boyar maddelerin giderilmesinde kullanımını daha cazip hale getirmektedir. Bu sebeple lakkaz doğal boyaların yanında sentetik boyalarla da etkin bir şekilde kullanılmaktadır [47].

Tekstil sektöründe kullanılan lakkazlar ağırlıklı olarak beyaz çürükçül funguslardır; fakat son zamanlarda prokaryot kökenli *Streptomyces sp.* lakkazıyla ilgili çalışmalar da mevcuttur [48].

**Biyosensörler ve Nanobiyoteknoloji:** Son yıllarda biyokimya ve elektrokimya belirli bir analitik disiplinde bir araya getirilerek çok çeşitli sensörler yapılmaya başlamıştır. Biyosensör olarak adlandırılan bu uygulama şekli çok yüksek duyarlılıkla çok düşük konsantrasyonlardaki maddeleri algılayarak analiz sınırlarını çok genişletmişlerdir. Örneğin klinik ve çevresel alanlarda biyosensörlerle ilgili çok sayıda çalışma mevcuttur [49].

Lakkazlar, ilave kofaktör olmaksızın ve oksidoredüktaz sınıfına dahil bir enzim olduğundan elektron transfer reaksiyonlarını katalizleme yeteneğine sahiptir; bu bağlamda çeşitli fenolik bileşiklerin [50], oksijenin [51] ve hatta azidlerin [52] belirlenmesi amacıyla biyosensör uygulamalarında kullanılmaktadır.

Biyo-yakıt hücrelerinde lakkazlar katotlara tutuklanarak güç üretmede kullanılabilir [53]. Küçük transmitter sistemlerinde gerekli olan gücün üretilmesi bu sisteme örnektir.

**Gıda sektöründeki uygulamaları:** Lakkazlar bu sektörde gıdaların genel anlamda göze hitap etmesine ve daha çok tercih edilmesine yönelik işlerde kullanılır. Örneğin;

- Meyve sularında, biralarda, şaraplarda bulanıklık oluşturan fenolik bileşiklerin giderilmesinde,
- Sularda bulunan fenollerle aromatik aminlerin kullanma sularıyla içme sularında bulunması sağlık açısından tehdit oluşturduğundan bunların temizlenmesinde,
- Akdeniz bölgesindeki zeytinyağı fabrikalarından çıkan atıkların suyu kirlettiği durumlarda kullanılmaktadır [37].

## 2.2. İmmobilizasyon

Enzimler, normal şartlarda çok uzun bir süreçte ya da uç koşullar altında gerçekleşebilecek reaksiyonları katalizleyerek bunların çok daha ılımlı ve kabul edilebilir koşullarda gerçekleşmesini sağlar. Bunun yanında enzimler suda çözünebilen spesifik katalizörlerdir. Günümüzde de endüstriyel uygulamaların çoğu sulu ortamlarda enzimler vasıtasıyla gerçekleştirilmektedir. Bu şekilde sanayide yüksek saflıkta ve uygun ekonomik koşullarda ürünler elde edilmektedir.

Fakat enzimlerin serbest formlarda kullanılması onları çoğu zaman tek kullanımlık hale getirmekte ve bir daha geri kazanılması ya da aynı aktivite ile kullanılmasını mümkün kılmamaktadır. Sürekli yeni enzim temin edilmesi ise maliyet artışına neden olacaktır. Bunun yanı sıra enzimlerin gerektiği zamanlarda ortamdan uzaklaştırılamamaları reaksiyonların kontrolünü güçleştirmektedir. Enzimleri kontrol etmek maksadıyla ortama inhibitör eklenmesi söz konusu olabilir; fakat böyle olduğunda ortamda ekstra kontaminasyona sebep olacaktır. Bu da ürünü saf elde etmek için yüksek maliyetlerle yapılan arıtma işlemine fazladan arıtma işlemi ekleyeceği için maliyeti daha da arttıracaktır. Daha da önemlisi endüstriyel uygulamalar sürekli bir üretim hattına gereksinim duydukları için serbest enzimlerin tek kullanımlık olmaları istenmeyen bir durumdur [54, 55].

Yukarıda belirtilen tüm sorunları çözümleyebilmek için araştırmacılar tarafından yürütülen çalışmalar sonucunda immobilizasyon sistemleri geliştirilmiştir.

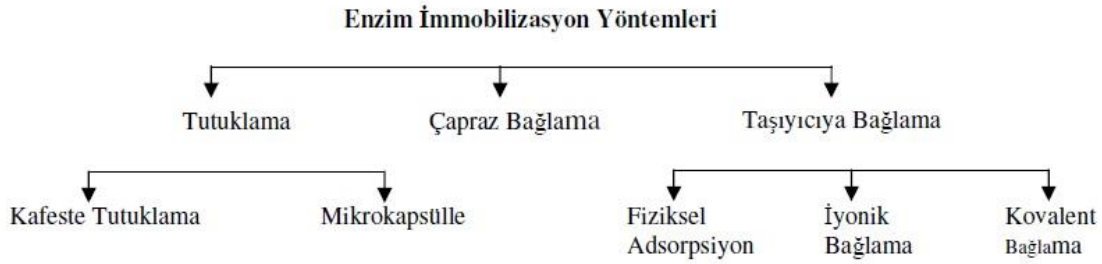
İmmobilizasyon, enzimlerin suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanması, suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak katılması ve suda çözünmeyen bir matriks veya suda çözünmeyen mikrokapsüllerde tutuklanması olarak tanımlanmıştır [1].

İmmobilize enzimin serbest enzim karşısında getirmiş olduğu üstünlükler aşağıdaki gibi sıralanabilir [1]:

- İmmobilize enzim birçok defa ve uzun soluklu kullanılabilir.
- Enzimin kendi kendini parçalaması olasılığını minimum düzeye indirir.
- Enzim kararlılığı doğal enzimlere oranla daha yüksektir.
- Sürekli işlemlerde uygulanabilirliği vardır.
- Çevresel koşullara (pH, sıcaklık, v.b.) karşı dayanıklılığı yüksektir.
- Bazı durumlarda sahip olduğu aktivite serbest enzime oranla daha yüksek olabilir.
- Ürün oluşumu kontrol edilebilir.
- Birbirini takip eden birden fazla basamaklı reaksiyonlar için uygulanabilir.
- Mekanistik çalışmalar için uygundur.
- Kataliz işleminin sonunda ortamdan kolaylıkla uzaklaştırılabilir ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi önlenmiş olur.

### 2.2.1. İmmobilizasyon Yöntemleri

Genel olarak bakılırsa üç tür enzim immobilizasyon yöntemi vardır. Bunlar; tutuklama, çapraz bağlama ve taşıyıcıya bağlama yöntemleridir (Şekil 2.10) [56,57].




**Şekil 2.10.** İmmobilizasyon yöntemleri [56]

### 2.2.1.1. İmmobilizasyon Sistemlerindeki Önemli Hususlar

İmmobilizasyon yöntemi seçilirken dikkat edilmesi gereken en önemli husus enzimin aktif merkezinin zarar görmemesidir. İmmobilizasyon yöntemi enzime aktif bölgesinden bağlanma yaparsa enzim aktivitesi bir hayli düşecektir. Bu noktada immobilizasyon yöntemi seçilirken ya enzimin aktif merkezinden bağlanma gerçekleştirmeyecek bir yöntem belirlenmelidir ya da immobilizasyon sırasında aktif merkez korunmalıdır [58]. Bunun yanında immobilizasyon yöntemi seçiminde 4 ana husus önemlidir. Bunlar;

- Güvenilirlik,
- Maliyet,
- Aktivitenin korunması,
- Kararlılık gibi kriterlerdir.

İmmobilizasyon yöntemleriyle ilgili Tablo 2.1'de karşılaştırma yapılmıştır.

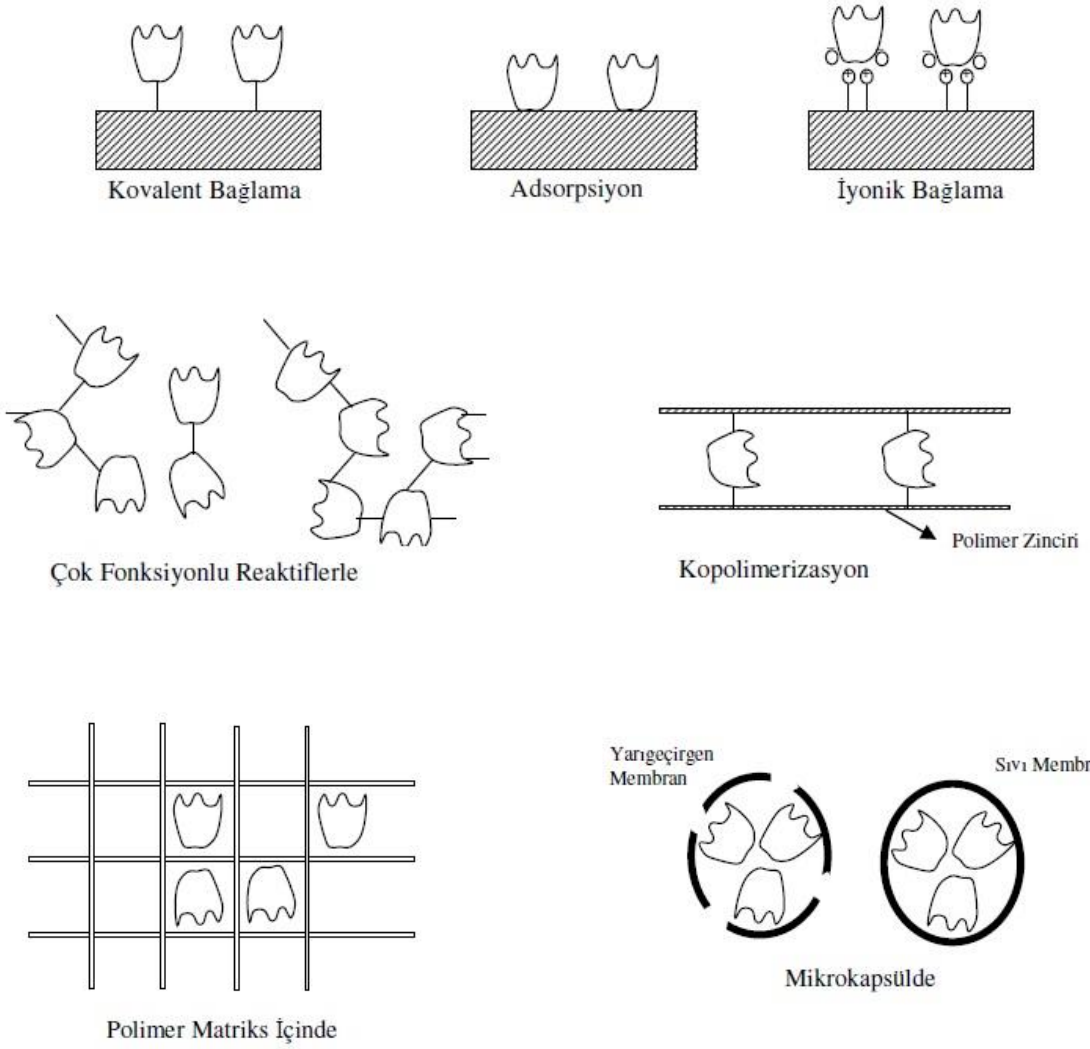
**Tablo 2.1.** İmmobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması [56]

| **Karakteristik** | **Taşıyıcıya Bağlama Yöntemi** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Kovalent Bağlama | Adsorpsiyon | İyonik Bağlama | Çapraz Bağlama | Tutuklama |
| Hazırlama | Zor | Kolay | Kolay | Zor | Zor |
| Enzim Aktivitesi | Yüksek | Düşük | Yüksek | Orta | Yüksek |
| Substrat Spesifikliği | Değişmez | Değişmez | Değişmez | Değişebilir | Değişmez |
| Rejenerasyon | Mümkün Değil | Mümkün | Mümkün | Mümkün Değil | Mümkün Değil |
| Genel Uygulanabilirlik | Orta | Düşük | Orta | Düşük | Yüksek |
| İmmobilizasyon Maliyeti | Yüksek | Düşük | Düşük | Orta | Düşük |
| Bağ Gücü | Kuvvetli | Zayıf | Orta | Kuvvetli | Kuvvetli |

### 2.1.1.2. İmmobilizasyonYöntemlerine ve Taşıyıcılara Genel Bakış

Taşıyıcıyı seçerken; partikül boyutu, toplam yüzey alanı, taşıyıcının kimyasal kompozisyonu gibi bir çok parametre göz önüne alınır (Tablo 2.1).

Enzim immobilizasyon yöntemleri Şekil 2.11'de gösterilmiştir.




**Şekil 2.11.** Enzim immobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi [56]

İmmobilizasyon yöntemleri önemli olduğu kadar enzimlerin immobilize edileceği materyallerin seçimide fazlasıyla önemlidir. Taşıyıcı seçilirken; immobilizasyon yöntemi, substratın reaktör tipi ve mekanik özellikler, immobilizasyon iyonik veya kovalent bağlama ile gerçekleştirilecekse taşıyıcının fonksiyonel gruplar içermesi gibi özelliklere dikkat edilmesi önemlidir. Yüklü taşıyıcının kullanılması, enzim optimum pH'sının 1-2 birim, $K_m$ değerinin ise 10 kata kadar değişmesine sebep olabilirler [58].

Taşıyıcı çeşitleri Tablo 2.2'de verilmiştir.

**Tablo 2.2.** Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcı çeşitleri [56]

| **Doğal Taşıyıcılar** | | **Sentetik Polimerler** |
|---|---|---|
| *Anorganik* | *Doğal Polimerler* | |
| Cam | Selüloz | Polistiren |
| Silikajel | Nişasta | Poliakrilamid |
| Alüminyum oksit | Dekstran | Naylon |
| Bentonit | Agaroz | Polivinilalkol |
| Hidroksiapatit | Karragenan | Oksiranlar |
| Titandioksit | Alginat | Metakrilat |
| Zirkonyumdioksit | Kollajen | İyon değiştirici reçineler |
| Nikeloksit | Kitin | |

**Kovalent Bağlama Yöntemi:** Bu yöntemde işlemin esası taşıyıcı materyale enzimi kovalent bağlamaya dayanır. Bu yöntem, protein kimyasında sulu ortamlarda geçekleştirilir. Tablo 2.3'te proteini taşıyıcıya bağlamada kullanılacak fonksiyonel gruplar listelenmiştir [56, 59, 60].

**Tablo 2.3.** Kovalent bağlamada proteinlerle bağ kurabilecek fonksiyonel gruplar

| **Amino asit** | **Reaktif grup** |
|---|---|
| Lizin, N-uç | Amino |
| Sistein | Sülfhidril |
| Glutamat, Aspartat ve C-uç | Karboksil (α, γ) |
| Tirozin | Fenolik hidroksil |
| Serin, Treonin | Alkol (primer) |
| Arginin | Guanidino |
| Histidin | İmidazol |
| Sistin | Disülfit |
| Metiyonin | Tiyoeter |
| Triptofan | İndol |

Bu yöntemin avantajlarından biri, enzim ve destek maddesi arasında kuvvetli bir bağ meydana gelmesidir. Bu şekilde enzim çözeltiye karışmadan kataliz reaksiyonunu gerçekleştirebilir [61]. Kovalent bağlamada dikkat edilmesi gereken en önemli nokta, bağlanmanın enzim aktivitesinde kullanılan bölgelerden olmaması ve bağlanma sırasındaki sterik engellemeler nedeniyle bu grupların rahatsız edilmemesidir [56, 57].

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcıların aktivitesi yeterli değilse yardımcı reaktifler eklenerek akitiviteleri arttırılır. İmmobilizasyon çok ılımlı koşullarda (oda sıcaklığı, nötral pH v.b. ) yapılmalıdır. Taşıyıcının sudaki çözünürlüğü az olmalıdır fakat hidrofobik yönü çok kuvvetli olmamalıdır, suda ıslanabilirken mekanik açıdan da kararlı olmalıdır. Taşıyıcı materyal enzim tarafından parçalanmamalı, mikroorganizma üremesine mahal vermemeli ve pH ile çözgenlere karşı dayanıklı olmalıdır [56].

**Adsorpsiyon yöntemi:** Enzim immobilizasyonuyla ilgili bilinen en eski ve kolay yöntem adsorpsiyon yöntemidir. Yöntemin esası; yüzey aktif olup aynı zamanda suda da çözünmeyen adsorban bir maddenin enzim çözeltisiyle karıştırılması ve fazladan kalmış enzimin yeteri kadar suyla yıkanıp uzaklaştırılmasına dayanmaktadır. Enzim, taşıyıcı materyale Van der Waals kuvvetleri ile bağlanmaktadır.

Enzim immobilizasyonunda sıklıkla kullanılan materyallere bakılacak olursa; aktif karbon, gözenekli cam, diatome toprağı, kollodyum, hidroksiapatit, kalsiyum fosfat, $CaCO_3$, nişasta, kül, glütendir. Enzim adsorpsiyonundaki önemli hususlar incelenirse; pH, sıcaklık, çözgen, enzim-adsorban oranı ve iyon şiddeti gibi faktörler önem taşımaktadır [56].

**Çapraz bağlama yöntemi:** Küçük moleküllü tekli veya çoklu fonksiyonel gruba sahip reaktifler, enzim molekülleri arasında bağlar yaparak sonuçta suda çözünmeyen komplekslerin oluşmasını sağlarlar. İmmobilizasyon ve çapraz bağlama seviyesinin bağlı olduğu hususlar; protein ve reaktif konsantrasyonuna, pH'ya ve immobilize edilecek enzim cinsine bağlıdır.

Bu yöntem ile immobilizasyon 4 şekilde gerçekleştirilir. Bunlar;

- Enzimin yalnız bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu,
- Enzimin ilkin bir protein varlığında bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu,

- Enzimin suda çözünen bir taşıyıcıda adsorpsiyonundan sonra bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu,
- Enzimin bifonksiyonel reaktif tarafından aktive edilmiş polimer taşıyıcı ile reaksiyonu gibi yöntemler bulunmaktadır.

En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifleri; glutaraldehit, epiklorohidrin, kloroformat ve karbonilimidazol, transizyon metal iyonları, heterosiklik halojenürler, p-benzokinon, bioksiüranlar ve divinilsülfonlardır [56].

**Tutuklama yöntemi:** Temel olarak bu yöntem enzimi belirli bir yerde durmaya zorlamaktır. Enzim bulunduğu konumdan hareket etmez ve dışarıya çıkamaz. Fakat substrat ve ürün enzimin tutuklu bulunduğu alan içersine girip çıkabilirler. Yani, enzimin kendisinin korunduğu fakat substratın ve oluşan ürünlerin içinden geçebildiği polimerik matrikse hapsedilmesine dayalı bir yöntemdir. Tutuklama yönteminin diğer yöntemlerden farkı enzimin destek materyaline herhangi bir bağ ile bağlı olmadan kafes benzeri bir yapı içerisinde tutulmasıdır. Destek materyali olarak, kitosan, alginat, kitin, karragenan, jelatin, agaroz, pektin ve poliakrilamid gibi polimerler kullanılmaktadır [62].

Kafes benzeri yapı, destek materyalinin polimerizasyon ve çapraz bağlanmalar yapması sonucu oluşur ve enzimde bu yapının içinde tutuklu bir şekilde kalır. Poliiyonik polimer reaktifi enzimle birlikte karıştırılır, daha sonrada ortama iyon değiştirici bir reaksiyonla multivalent katyonlar ilave edilerek çapraz bağlanmalar sonucunda enzim tutuklanır.

Tutuklama yönteminin diğer yöntemlere olan üstünlükleri sıralanacak olursa;

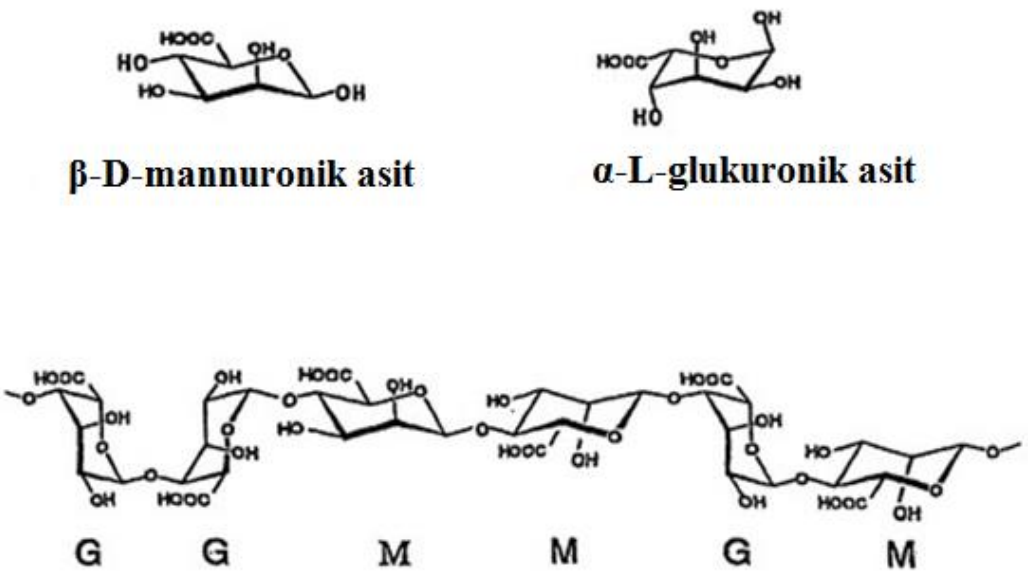
- Enzimin aktif merkezinden herhangi bir bağlanma olmadığından aktivite kaybı olmaz
- Denatürasyon minimuma indirgenmiştir
- Farklı enzimlerin aynı anda immobilizasyonunu sağlayabilir
- Substrat ile enzimin etkileşimi için geniş bir bölge mevcuttur.

## 2.3. Alginat Jelde Tutuklama

Alginat, immobilizasyon yöntemleri arasında tutuklama yöntemi için kullanılan destek materyallerinden biridir. İmmobilizasyon uygulamalarında kullanımı oldukça yaygın olan alginat, birçok sektörde aktif olarak kullanılmaktadır. Suda çözünür bir yapı olan alginat, ticari olarak sodyum alginat formunda satılmaktadır. Kullanıldığı sektörlere bakılacak olursa;

- İlaç sektörü (hazımsızlık ve reflü ilaçları, sargı bezi, dişçilik v.b.)
- Tekstil sektörü (boyar maddelerde kıvam arttırıcı, azo boya baskısı v.b.)
- Kağıt sektörü (sertlik verme amacıyla)
- İnşaat sektörü (çimento, alçı ve harcın plastikliğini arttırmada)
- Gıda sektörü (dondurma-yoğurt pürüzsüzleştirme, süt ürünlerinde kıvam arttırıcı, bira-kahve gibi ürünlerde köpük oluşturucu olarak, unlu mamüllerde su tutucu v.b.) gibi kullanım alanları vardır.

Alginat aynı zamanda alginik asit olarak da adlandırılmaktadır. Alginat, deniz yosunu türlerinden kahverengi alglerin hücre duvarlarına yayılmış olarak bulunan anyonik bir polisakkarittir. Su ile muamele edildiğinde viskoz bir yapıya bürünür. Ekstrakt halindeyken kendi ağırlığının 200-300 katı kadar suyu emebilir. Ticari olarak sodyum tuzu ($NaC_6H_7O_6$), kalsiyum tuzu ($C_{12}H_{14}CaO_{12}$) ve potasyum tuzu ($KC_6H_7O_6$) olarak satılmaktadır. Yapısına bakılacak olursa, 1-4 bağlı β-D-mannuronik asit (M) ve α-L-glukuronik asit (G) formlarından oluşmuş bir yapıdır. Bu yapıların bağlanmaları miktarlarına göre değişmektedir. Heteropolimerik olarak bağlanmış (MG) bloklarının arasına miktarlarına bağlı olarak homopolimerik (MM) ve (GG) blokları girerek, alginat yapısını meydana getirirler (Şekil 2.12). İki değerli katyonların bağlanmasıyla jel yapısı elde edilir. Bu jel yapısının dayanıklılığı polimerin G içeriğine bağlıdır. G içeriği ise alginik asidin elde edildiği kaynağa göre % 20-75 arasında değişir. GG blokları arasında $Ca^{+2}$ iyonunun tuz köprüleri oluşturarak polimeri kararlı ve bozunması güç bir jel haline getirir.




**Şekil 2.12.** Alginat polimerinin kimyasal yapısı [4]

Alginat maddesiyle elde edilen jel biyokimyasal olarak kararlı ve inert bir yapıdır. Bu şekilde istenmeyen reaksiyonlara sebep olmadan doğrudan immobilize edilmiş enzimin çalışmasına olanak sağlar. Jel boncuklarda sızıntı oluşabilir. Bunun nedeni başlangıç alginat konsantrasyonu olabilir, alginat miktarı boncukların mekanik yönlerini etkileyebilir.

$Cu^{+2}$ ve $Pb^{+2}$ gibi 2 değerli başka katyonlar alginat için yüksek affiniteye sahip olup daha kararlı jeller üretilmesinde etkili olurlar. Toksisite riskleri olduğu için kullanım alanları sınırlıdır. $Cu^{+2}$ polifenoloksidaz sınıfı enzimlerin immobilizasyon işlemlerinde kullanılabilir; çünkü polifenoloksidaz sınıfı enzimlerin büyük bir çoğunluğu çoklu bakır merkezi içeren enzimlerdir.

## 2.4. Karragenan Jelde Tutuklama

Karragenan, kırmızı deniz yosunlarından elde edilen sülfatlanmış doğrusal yapıda bir polisakkarittir. Stabilizatör ve jelleşme özelliklerinden dolayı en geniş kullanım alanı gıda sektörüdür. Temel uygulamaları diyet yiyecekler ile et ürünleri alanındadır. Bunun sebebi proteinlerle güçlü bağlar yapabilmelerinden ileri gelir.

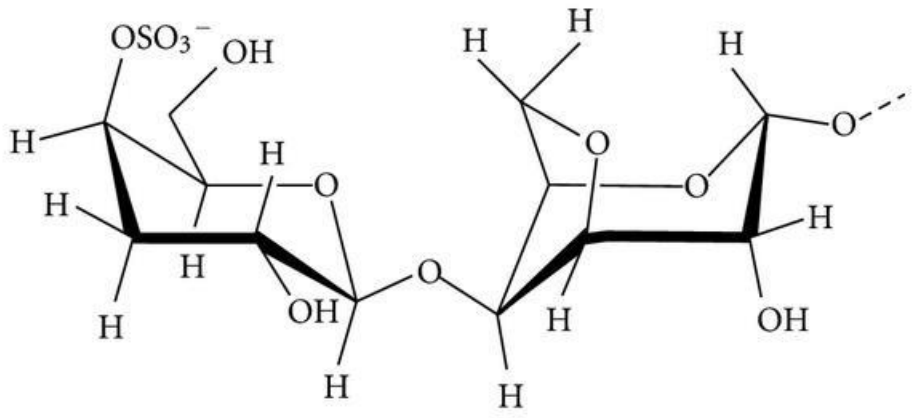
Sülfatlanma sayılarına göre üç çeşit karragenan bulunmaktadır. Bunlar; her bir disakkarit için tek bir sülfat olan kappa-karragenan, her bir disakkarit için iki sülfat bulunan iota-karragenan ve her bir disakkarit için üç sülfat bulunan lambda-karragenandır. Bu karragenan çeşitlerinin özellikleri ise;

- Kappa formu potasyum iyonu varlığında sağlam ve hareketsiz jeller yapar, gıda proteinleriyle sağlam bağlanmalar gösterir
- İota formu kalsiyum iyonları varlığında yumuşak jeller yapar.
- Lambda formu ise jel yapısında olmayıp gıda ürünlerinin katı formunu arttırmada kullanılır.

Karragenan da alginat gibi endüstriyel anlamda çok fazla kullanım alanına sahiptir. Bunlar incelenecek olursa;

- Gıda sektörü (dondurulmuş ürünler, süt ürünleri, bira, nişastalı ürünler, işlenmiş et ürünleri, jöleler vb.)
- Kozmetik sektörü (diş macunu, şampuanlar, kremler vb.)
- İlaç sektörü (hap ve kapsüllerde dolgu maddesi)
- Diğer alanlar (biyoteknoloji, yangın söndürücü, ayakkabı cilası) şeklindedir.

κ-Karragenan yapısı, β-D-galaktoz sülfat ve 3,6-anhidro-α-D-galaktoz birimlerinin sülfatlı ve sülfatsız hallerinin alfa 1-3 ve beta 1-4 glikozidik bağları oluşturularak birbirlerine bağlanmasıyla oluşurlar (Şekil 2.13). κ-Karragenan metal iyonları, aminler, amino asit türevleri ve suda çözünür organik çözücüler varlığında kolayca jele dönüşebilir [63].




**Şekil 2.13.**κ-Karragenan polimerinin kimyasal yapısı [64]

Karragenan jelde tutuklama işlemi düşük maliyetli, kolay ve kabul edilebilir koşullarda gerçekleştirilebildiğinden yaygın olarak kullanılmaktadır. Ilımlı immobilizasyon koşulları ve hücrelerin yüksek yoğunluğu nedeniyle hücre sızıntılarını engellemesi sebebiyle ideal bir immobilizasyon materyalidir. Bu özellikler sayesinde diğer materyallerden çok daha avantajlıdır [64].

**Jelde tutuklama işleminin prensibi**, enzim çözeltisinin jel öncesi formdaki destek maddesiyle karıştırıldıktan sonra önceden hazırlanmış katılaştırıcı çözeltiye ilave edilerek enzim çevresinin jel ile sarılmasına dayanır. Oluşan jel yapısının sağlamlığı jel materyalinin konsantrasyonu ile yakından bağlantılıdır. Karregenan konsantrasyonu ise karragenanın tipine bağlıdır. Enzim ve karragenan çözeltisinin karışımına bir vana vasıtasıyla (çekme metodu), bir enjektör yardımıyla (damlatma metodu) veya sıvıda ya da havada yayma şeklinde (dispersiyon metodu) istenilen şekiller verilir. İmmobilize enzimler küp, boncuk veya membran şeklinde olabilirler. Bu şekiller uygulama cinsine göre belirlenir. κ-Karragenan maddesinin jelleşmesi; $K^+$ gibi genellikle katyon karakterli ajanlar varlığında gerçekleşir. Jelleşme için uygun sıcaklık önemlidir. Yüksek sıcaklıklarda jelleşme gözlenmez. Bunun yanında reaksiyonlar yüksek ısılarda gerçekleşirse jelin parçalanma riski oluşabilir. Genelde immobilize enzimlerin aktiviteleri ve verimleri yüksek olur [65].

Damlatma metodu laboratuvar ortamında uygulanabilecek en basit metotlardan biridir. Bu işlemde öncelikle enzim çözeltisi jel maddesi ile önceden belirlenmiş oranlarda karıştırılır ve kabarcık bırakmayacak şekilde homojen bir karışım elde edilir. Sonra bir enjektör yardımıyla elde edilen homojen karışımdan bir miktar çekilerek destek maddesini jelleştirecek çözeltiye damla damla ilave edilir. Enjektörün ucunda oluşan damlalar jelleştirme çözeltine damladıkça küresel ve uniform yapıda boncuklar elde edilir. Böylelikle enzim içeride kalmış olup etrafı jel maddesi ile çevrelenir. Jel gözeneklerinin ideal boyutta olması önemlidir; çünkü enzimin içeride tutularak dışarıya çıkması engellenirken içeriye substrat girişi ve içeriden ürün çıkışına izin verecek boyutta olmalıdır [65].

## 2.5. Lakkazlar ile Gerçekleştirilen İmmobilizasyon Çalışmaları

Hem ökaryotik hem de prokaryotik kaynaklardan elde edilen lakkazların potansiyellerinin araştırılması amacıyla birçok immobilizasyon çalışması yapılmıştır. Özellikle fungal lakkazlarla ilgili çok sayıda immobilizasyon çalışması mevcuttur. Kültür ortamında yetiştirilmiş fungus ve mantarlardan izole edilen lakkazların immobilizasyonları ve çeşitli alanlarda kullanım potansiyelleri ile ilgili araştırma sayısı her geçen gün artmaktadır.

Fungal kökenli lakkazlarla ilgili birkaç çalışma aşağıda verilmiştir.

***Neurosporra crossa*** lakkazının immobilizasyonu, CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose 4B üzerine kovalent bağlanma yöntemi ile yapılmıştır. Sonuçta aktivitede % 25'lik bir düşüş gözlenirken $K_m$ değerinde bir artış gözlenmiştir. Aktivitedeki düşüşe substrat difüzyonu sırasındaki sterik engellemenin neden olduğu düşünülmektedir [66].

***Rhizoctonia praticola*** lakkazının aktifleştirilmiş Celite materyaline immobilizasyonu % 89 verimle gerçekleştirilmiştir. İmmobilize enzim doğal ortamda bulunan enzimlere benzer bir şekilde yüksek bir kataliz kabiliyeti sergilemiştir. Serbest ve immobilize enzim aktiviteleri arasındaki benzerlikler immobilizasyon işleminde yapılan inaktivasyonlar ile gösterilmiştir [67].

***Polyporus versicolor*** lakkazı, adsorpsiyon ve tutuklama yöntemleri ile birkaç destek (jelatin, poliüretan, sepharose 4B-Epi-IDA-$Cu^{+2}$ vb.) üzerine immobilize edilmiş ve farklı uygulamalarda kullanılmıştır [68, 69, 70]. Sepharose 4B-Epi-IDA-$Cu^{+2}$ maddesi üzerine yapılan immobilizasyon çok yüksek bir verimle gerçekleşmiş olup mükemmel bir kararlılık sergilerken, hızlı, çevre dostu ve düşük maliyetli bir destek olarak da dikkat çekmiştir. İmmobilize enzim elma suyunun berrakleştırılmasında (fenollerin, flavonollerin ve kromofor grupların indirgenme verimi sırasıyla % 48.6, % 47 ve % 43) kullanılmıştır [70].

***Coriolus hirsutus*** lakkazıyla ilgili literatürde ilginç bir bildirim olmuştur. Bu lakkaz çözeltisi benzen/*n*-bütanol çözeltisi içindeki alkillenmiş polietilenimin (CEPEI) içerisine eklendiğinde misel benzeri ilginç bir yapı elde edilmiştir. İmmobilize enzim 4°C'de 20 gün bekledikten sonra başlangıç aktivitesinin % 40'ını kaybetmiştir. Bunun dışında 20°C'de bekletilen bir başka immobilize enzim örneği ise başlangıç aktivitesinin % 80'ini kaybetmiştir [71].

***Trametes versicolor*** lakkazı literatürde en çok çalışılan fungal lakkaz kaynağıdır. *Trametes versicolor* lakkazıyla ilgili yapılan çalışmalar sırasıyla şöyledir:

*Trametes versicolor* lakkazı 3-aminopropiltrietoksisilan (APTES) ve glutaraldehit (GLUTAL) ile aktifleştirilmiş değişik tipteki cam boncuklar üzerine immobilize edilmiştir [72, 73, 74, 75]. Bu destekle yapılan immobilizasyonlarda verim % 100 olup aktivitenin % 90 kadarı korunmuştur. Spesifik aktivitenin serbest enzime göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir [75].

APTES-GLUTAL ile aktive edilmiş lakkaz uzun süreli çalışmalarda iyi bir kararlılık sergilemiştir. Kesikli işlemde kullanıldığında, her defasında ortamdaki ürünlerin yıkanarak uzaklaştırılması kaydıyla arka arkaya 6 oksidatif döngüden sonra aktivitesinin büyük bir bölümünü koruduğu gözlenmiştir. Yüksek sıcaklıklarda ise doğal olarak bulunduğu haline göre daha az duyarlılık göstermiştir [73].

Lakkaz enzimi önceden APTES/GLUTAL ile muamele edilmiş verimli alüvyon toprağına, kaolinite ve iki farklı montmorillonite immobilize edilmiştir. Kil ve toprağa immobilizasyonundan sonra yüksek seviyelerde lakkaz aktivitesi görülmüştür. Montmorillonit immobilizasyonunda ise cam boncuk üzerine yapılan denemelerde

benzer sonuçlara ulaşılmıştır. Tüm immobilize enzimler için 4°C'de 4 aylık beklemeden sonra bile ilk aktivitelerinin hemen hemen tamamının korunduğu gözlenmiştir [75,77].

İmmobilize lakkazın biyosensör uygulamalarındaki kullanımları da mevcuttur. Biyosensörler farklı ön muamelelerden geçirilmiş karbon fiberler ile hazırlanmış olup farklı metotlar ile kullanılmıştır: Kovalent bağlamada redoks polimer bağlayıcısı olarak polietilen bis-glisidil eter (PEG) kullanılmıştır ve lakkazın camsı karbon elektrod (GCE) yüzeyine [78, 79]; fiziksel adsorpsiyon, karbodiimid eşlenmesi, GLUTAL aktivasyonu, GLUTAL ve karbodimidin belli orandaki kombinasyonu kullanılmıştır [80].

Mantar kökenli birkaç immobilizasyon çalışması aşağıda verilmiştir. Literatürde geçen çalışmalarda lakkaz ya da tirozinaz diye spesifik bir ayrım yapılmamıştır. Bu sebeple bunlar genel olarak polifenoloksidaz (PPO) çalışmaları başlığı altında verilecektir [10].

Mantardan elde edilmiş PPO cam boncuklara immobilize edilmiştir. Çözücü olarak su ve kloroform kullanarak fenollerin kinonlara enzimatik oksidasyonu araştırıldı [81].

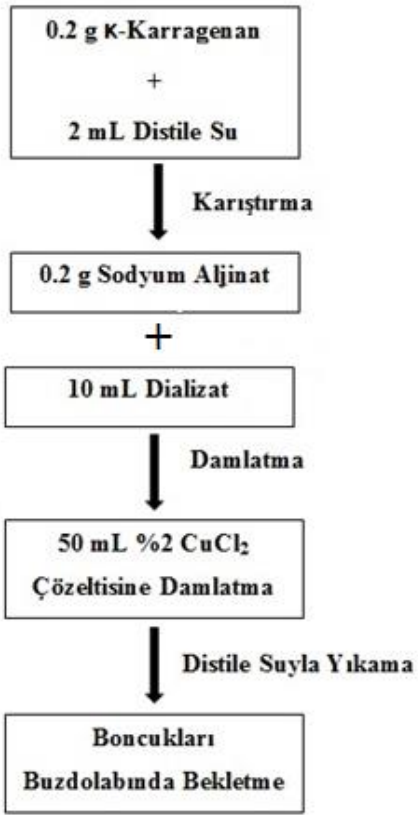
PPO adsorpsiyonu için önceden HCl ile aktive edilmiş cam boncuklar, zeolit ve sepiolit kullanılarak immobilize PPO'nun organik çözücüler içiersindeki katalitik reaksiyonları çalışılmıştır. Organik çözeltilerde genellikle beklenildiği gibi reaksiyonun ilk dakikalarında inaktivasyon olmamıştır, muhtemelen kinon ürünlerinin organik bir faza transferi gerçekleşmiş olabilir. Buna rağmen sonuçlara göre cam boncuklar en iyi destek olarak göze çarpmıştır [82]. İmmobilize PPO için optimum sıcaklık 30°C ve optimum pH'de 7.0 olarak belirlenmiştir. *o*-krezol $K_m$ ve $V_{max}$ değerleri sırasıyla 1.22 mM ve 45 nmol $min^{-1}$ $mg^{-1}$ olarak belirlenirken, fenol için 5.42 mM ve 207 nmol $min^{-1}$ $mg^{-1}$ olarak belirlenmiştir.

Bazı çalışmalardaorganik çözeltilerde PPO'nun konformasyonel değişmeler geçirdiği belirtilmiştir. Toluen içerisinde meydana gelen termal inaktivasyon poliol ilavesiyle azalmıştır ve sistemin içerdiği su miktarına göre aktivitenin bir kısmı korunabilmiştir [83].

PPO'nun epiklorohidrin ile aktifleştirilmiş karboksimetilselüloz boncukları üzerine kovalent immobilizasyonu % 44'lük bir verim ortaya koymuştur [84]. Serbest enzim için optimum sıcaklık 40°C iken immobilize enzimde 50°C'ye çıkmıştır. Depo kararlılığı ise serbest enzime göre daha yüksek olduğu görülmüştür.

## 2.6. Tezde Kullanılan İmmobilizasyon Yöntemine Genel Bakış

Bu tez kapsamında immobilizasyon tekniklerinden tutuklama yöntemi uygulanmıştır. Şahin vd. (2005) kullandığı immobilizasyon yönteminin modifikasyonu uygulanmıştır. Kullandıkları yöntem sodyum alginat ve karragenandan hazırlanan jel karışımlarına enzimlerin tutuklama yöntemiyle immobilizasyonudur. Destek olarak kullanılan çeşitli polimerlerden jeller hazırlanması daha iyi özellikli polimer destekler elde etme imkanı sunabilmektedir. *Boletus edulis* mantarından izole edilen lakkazın immobilizasyon uygulaması Şekil 2.14'de gösterilmiştir.




**Şekil 2.14.** Bu çalışmada uygulanan immobilizasyon akış şeması

## 2.7. *Boletus edulis*

*Boletus edulis*, Basidomiset türevi bir fungus olup Boletaceae ailesinden Boletus cinsine aittir. Genel olarak Kuzey Yarımküre'de Avrupa, Asya ve Kuzey Amerika'ya dağılmış bir şekildedir. Doğası gereği Güney Yarımküre'de bulunamamasına rağmen Güney Afrika, Avustralya ve Yeni Zelanda'nın bazı bölgelerinde rastlanmıştır. Avrupa'daki bazı mantarların moleküler filogenetik analizleriyle Boletus türü mantarlar olduğu kesin olarak tespit edilmiştir [85].

Funguslar (mantarlar) ormanlardaki ağaçlarda simbiyotik ektomikorizal bir ilişkiyle ağaçların köklerinde yaşayıp, büyüyen organizmalardır. Yaz ve sonbahar mevsimlerinde gövdelerinde spor üretirler. Gövdeleri yaklaşık 35 cm çapta ve 3 kg ağırlığa kadar kahverengi bir şapkaya sahiptir. Diğer boletler gibi, gövdesi boyunca şapkanın altına kadar uzanan borucukları vardır. Olgunlaştığında por ya da tübüller açılarak sporlar dışarı çıkarlar. Porlar, mantar gövdesinin ham dönemlerinde beyazımsı renkteyken olgunlaştığında yeşilimsi sarı renge dönüşür (Şekil 2.15.).



**Şekil 2.15.** *Boletus edulis*'in ham (solda) ve olgun (sağda) fotoğrafları [85]

*Boletus edulis* çeşitli organik bileşikler de üretmektedir. Bunların başlıcaları şunlardır;

- Biyolojik aktivitesi olan steorid türevi ergosterol,
- Karbonhidrat bağlı proteinler,
- Antiviral bileşikler,

- Antioksidanlar,
- Bitkilerin şelasyon için kullandığı glutatyon polimeri fitoşelatin.

## 2.8. Boyar maddeler

Cisimlerin renklendirici maddeler vasıtasıyla farklı renklere büründürülmesi işlemi boyamak olarak adlandırılır. Cisimlerin boyamak suretiyle dış etkilere karşı korunması ve güzel görünüm elde etme amacıyla boyalar kullanılmaktadır. Günlük konuşmada boya ve boyar madde kelimeleri birbiri yerine kullanılmasına rağmen bu iki kelime birbirinden tamamen farklıdır [86].

Bağlayıcılar aracılığı ile yüzeye tutturulan ve çoğunlukla anorganik temelli olan maddelere boya adı verilir. Bu sebeple boyalar bağlayıcılarla bir araya getirilmiş karışımlar olarak nitelendirilir. Yüzeye bu şekilde tutundukları içinde fiziksel etkilerle kolaylıkla yüzeyden ayrılabilirler. Boyar maddeler ise, çoğunlukla organik temelli olup cisimlerin yüzeylerine kimyasal etkilerle birleşerek, cisim yüzeyinde değişikler oluştururlar. Süspansiyon ya da çözelti formundadırlar. Cismin yüzeyi ile fizikokimyasal bir ilişki söz konusudur. Böyle olunca da, boyar maddeler, boyaların aksine fiziksel işlemlerle cismin yüzeyinden ayrılmazlar [86].

Boyar maddeler çok farklı başlıklar altında sınıflandırılabilir. Çözünürlüklerine, kimyasal yapılarına, boyama özelliklerine, kullanılış yerlerine göre sınıflandırılabilir. Bu tez kapsamında kimyasal yapılarına göre "azo boyar maddeler" olarak sınıflandırılan boyar maddeler incelenmiştir.

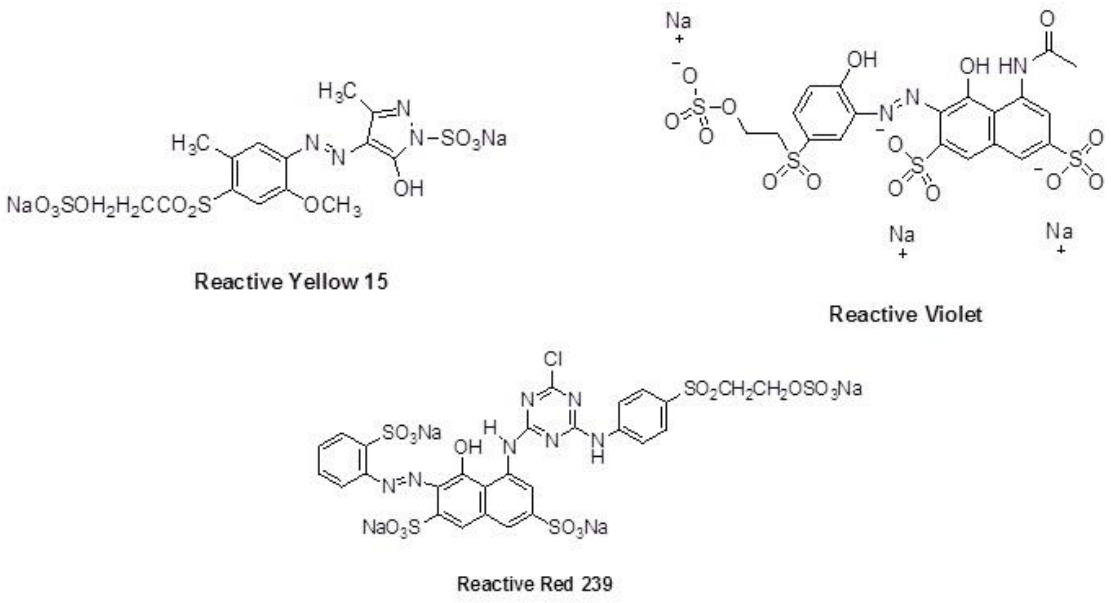
### 2.8.1. Azo Boyar Maddeler

Yapılarında kromofor grup olarak azo (-N=N-) grubu bulunduran boyar maddelere azo boyar maddeler denir. Bu gruptaki azot atomları, $sp^2$ hibritleşmesi ile karbon atomlarına bağlanır.

Alifatik grup içeren azo boyar maddelerinin renk şiddetleri düşüktür. Renk tonları geniş bir spektruma sahiptir. Doğal boyar maddelerin içinde azo grubuna rastlanmaz. Bu sınıf boyar maddelerin hepsi sentetik olarak elde edilirler. Sentezlerinin

sulu çözelti içinde ve basit olarak yapılması yanında, başlangıç maddelerinin sınırsız olarak değiştirilebilmesi çok sayıda azo boyar maddesinin elde edilebilmesini mümkün kılar.

Azo boyar maddeleri boyama güçlerinin çok olması, ucuz çıkış maddelerinden kolayca elde edilebilmeleri, çok geniş renk aralığını kapsamaları ve iyi haslık özellikleri göstermeleri sebebiyle daha çok tercih edilir. Azo boyar maddelerinin tek dezavantajı mavi-mor renk aralığında donuk renkler vermeleriydi, ancak bu dezavantaj hetero halkalı bileşenler kullanımıyla bu renk aralığında daha parlak renkler elde edilerek giderilmiştir [87].




**Şekil 2.16.** Tezde kullanılan bazı azo boyar maddeler [87]

Bu çalışmada, *B. edulis* şapkalı mantarlarından izole edilen lakkaz enzimi alginat+karragenandan oluşan jelde tutuklanarak, ABTS substratı varlığında serbest ve immobilize enzimin bazı biyokimyasal özellikleri belirlenmiş, ayrıca bu enzimlerin ülkemizde tekstil endüstrisinde sıklıkla kullanılan bazı boyar maddelerin renklerininin giderilmesinde aktiviteleri araştırılmıştır. Şekil 2.16'da tezde kullanılan azo boyar maddelere örnek verildi.

# BÖLÜM 3

# MATERYAL VE METOTLAR

## 3.1. Materyaller

### 3.1.1. Kimyasal Maddeler

Kullanılan kimyasallar parantez içinde verilen firmalardan temin edilmiştir.

Sodyum klorür (Riedel-de Haen), asetik asit (Riedel-de Haen), sodyum hidroksit (Merck), 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)(Sigma), amonyum sülfat (Fluka), κ-Karragenan (Sigma), sodyum alginat (Sigma), bakır (II) klorür (Merck), triton X-100 (Sigma), polivinilpirolidon (Sigma), sığır serum albümini BSA (Sigma), etanol (Riedel-de Haen), *o*-fosforik asit (Atabay), sodyum sülfit (Tekkim), sülfürik asit (Tekkim), diyaliz membranı (Sigma), sitrik asit (Sigma), disodyum fosfat (Riedel-de Haen), hidroklorik asit (Tekkim)

Reactive Black 5, Reactive Yellow 15, Reactive Blue 19, Reactive Red 239, Reactive Orange, Reactive Violet boyar maddeleri ise Resaş Kimya Tekstil Sanayi ve Tic. Ltd. Şirketinden sağlandı.

### 3.1.2. Kullanılan Cihazlar

- pH Metre (Jenco 6173)
- Blender (Homojenizer) (Waring)
- Orbital çalkalayıcı (Wiseshake Daihan SHO-1D)
- Su banyosu (Clifton)
- Çalkalamalı su banyosu (Wisebath Daihan)
- Santrifüj (Hettich Zentrifugen Rotina 38R)

- Derin dondurucu (-80 °C) (Wise Cyro Daihan)
- Buzdolabı ve bulaşık makinası (Arçelik, ev tipi)
- Ultrasonik su banyosu (Wiseclean Daihan)
- Terazi (Precisa XB 220A)
- Spektrofotometre ve Mikroplaka Okuyucu (Thermo Scientific)
- Isıtıcı ve manyetik karıştırıcı (IKA RH basic-2)
- Mikro pipetler (Eppendorf)
- Vorteks (Whırlı mixer)

### 3.1.3. Hazırlanan Çözeltiler

**İmmobilizasyon için gerekli çözeltiler;**

- % 2'lik $CuCl_2$ çözeltisi (w/v)

**Tampon hazırlamak için gerekli çözeltiler;**

- 0.1 M $CH_3COOH$ çözeltisi
- 0.1 M NaOH çözeltisi
- 0.1 M Disodyum sitrat çözeltisi
- 0.1 N HCl çözeltisi
- 0.1 M Sitrik asit çözeltisi
- 0.2 M Disodyum fosfat çözeltisi

**Protein tayini için gerekli çözeltiler;**

- % 0.1'lik sığır serum albümini (w/v)
- Bradford reaktifi

Bradford reaktifi: 50 mg Coomassie Brillant Blue G-250, 25 mL etanol ve 50 mL *o*-fosforik asitle 10 dakika karıştırıldı, distile suyla 500 mL'ye tamamlandı. Whatman no:1 kağıdından iki kere süzülerek koyu renkli şişede buzdolabında saklandı.

**Lakkaz aktivitesi tayini için gerekli çözeltiler;**

- 0.1 M Sodyum asetat tamponu (pH 4.5)
- 5 mM ABTS (0.1 M sodyum asetat tamponunda (pH 4.5))

## 3.2. Metotlar

### 3.2.1. *Boletus edulis*'ten Lakkaz Enzimi İzolasyonu

Bu çalışmada Kırklareli'ne bağlı Saray ilçesinden temin edilen *Boletus edulis* mantarları kullanıldı (Şekil 3.1) İzolasyon işlemi Zhang'ın kullandığı yönteme göre gerçekleştirildi [88].



**Şekil 3.1.** Denemelerde kullanılan *Boletus edulis* mantarının fotoğrafı

Mantarlar kullanılıncaya kadar -80 °C'deki derin dondurucuda saklandı. Derin dondurucudan alınan mantarların üzerindeki kirlilikleri gidermek amacıyla distile su ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Temizlenen mantarların çelik bıçak ile kafa ve gövde kısımları kesildi.Kesilen mantarlar 1:3 oranında 0.15 M NaCl çözeltisi (w/v) , 1:0.3

oranında %1'lik Triton X-100 çözeltisi (w/v), 1:0.001 oranında polivinilpirolidon (PVP) (w/w) ile birlikte Waring blender da homojenize edildi. Elde edilen homojenat 2 saat buzdolabı içerisinde soğukta bekletildi. Beklemenin ardından iki kat tülbentten süzüldü ve süzüntü 10 °C'de, 8000 rpm'de, 40 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrasında sıvı kısım ham ekstrakt olarak adlandırılırken, çökelti halindeki katı kısım atıldı [88]. Ham ekstrakta protein tayini ve enzimatik aktivite tayini yapıldıktan sonra amonyum sülfat çöktürmesi işlemine geçildi.

### 3.2.2. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

İzolasyon sonrası elde edilen ham ekstrakta amonyum sülfat çöktürmesi işlemi uygulandı. İlk etapta % 40 doygunluğa getirildi ve bir gece boyunca buzdolabı bekletildikten sonra 10 °C'de, 8000 rpm'de 45 dakika santrifüjlendi. Katı kısımlar süzülerek atıldı ve sıvı kısım ayrıldı. Ayrılan bu sıvı kısım % 40-60 amonyum sülfat doygunluğuna getirildi ve bir gece buzdolabında bekletilerek santrifüjlendi. Sıvı kısımlar ayrılarak çökeltiler 0.1 M sodyum asetat tamponunda (pH 4.5) çözüldü.

% 40-60 amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilen protein çözeltisine protein ve enzimatik aktivite tayini yapıldı.

### 3.2.3. Diyaliz

% 40-60 amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilen protein çözeltisi 0.1 M sodyum asetat tamponuna (pH 4.5) karşı tamponun 3 defa değiştirilmesi koşuluyla 24 saat diyalizlendi. Diyaliz işlemi manyetik karıştırıcı üzerinde buzdolabında (+4 °C) gerçekleştirildi. Diyaliz işleminden sonra elde edilen diyalizat koyu renkli bir şişede buzdolabında saklandı.

### 3.2.4. Alginat+Karragenan Jelde Tutuklama

Bu çalışmada lakkaz enziminin alginat ve karragenan jel karışımındaki immobilizasyonu Şahin'in yöntemi kullanılarak yapıldı [89].

Bu yönteme göre sodyum alginat 1:10 (w:v) oranında ılık distile suyla çözüldü. Sodyum alginat miktarına eşit miktarda κ-karragenan bu karışımına ilave edildi. Elde edilen jel karışımına 1:5 oranında diyalizat çözeltisi yavaş yavaş ilave edilerek bir baget yardımıyla homojen karışım elde edildi. Bu homojen enzim-destek karışımı yeşil uçlu enjektör yardımıyla % 2'lik $CuCl_2$ damlatma çözeltisine manyetik karıştırıcı üzerinde damlatıldı ve oluşan boncuklar bir süre bekletilerek süzgeç yardımıyla damlatma çözeltisinden ayrıldı ve distile suyla yıkanarak kullanılıncaya kadar buzdolabında saklandı. Yıkama suları ve damlatma çözeltisi de protein tayini için saklandı.

### 3.2.5. Protein Tayini

Protein tayini kapsamında, *Boletus edulis* mantarlarından izole edilen lakkaz çözeltisinin, immobilizasyondan sonra damlatma çözeltisi ve yıkama sularının protein içeriklerinin belirlenmesi amacıyla Bradford yöntemi ile protein tayini yapıldı.

#### 3.2.5.1. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini

Protein varlığını belirlemede kullanılan en temel yöntemlerden biri Bradford protein tayini yöntemidir.

Protein konsantrasyonunun belirlenebilmesi için günümüze kadar çok çeşitli direkt ve indirekt teknikler geliştirilmiştir. Bu yöntemler Kjeldahl metodu, infrared spektroskopisi, turbidimetri, flourimetri, refraktometre, polarimetre gibi yöntemlerdir. Ancak günümüzde, protein tayinleri daha çok, UV-spektrofotometrik temelli ya da görünür bölgede absorpsiyon veren renkli bir ürün oluşturmasına dayalı kimyasal esaslı yöntemlerle gerçekleştirilmektedir. Bradford yöntemi de görünür bölgede çalışılan bu yöntemlerden biridir [90].

Yöntemin esası Coomassie Brillant Blue G-250 adı verilen boyar maddenin protein varlığında renk değiştirmesine dayanır. Asidik ortamdaki protonlardan

dolayıkırmızı renkli hali kararlı olan olan Coomassie Brillant Blue G-250, ortamda protein varlığı söz konu olduğundaproteinin bazik ve aromatik amino asitlerine bağlı halde mavi renklidir çünkü amino asitlere bağlıyken protonsuz bir durumda kararlılığını koruduğu için kalıcı bir mavi renk oluşturmuştur.Boyanın proteine bağlanması yaklaşık 2 dakikada tamamlanır ve 1 saat boyunca renk kararlılığını korur [91]. Oluşan mavi renk 595 nm'de maksimum absorbans verdiğinden Bradford yöntemiyle protein tayini yapılırken 595 nm'de okuma yapılır. Oluşan rengin şiddeti ortamdaki mevcut protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Ortamdaki çeşitli kimyasalların meydana getirdiği girişimden, diğer protein tayini yöntemlerinin aksine Bradford yöntemi çok daha az etkilenmektedir.

Bradford yöntemi ile protein tayini aşağıda bahsedildiği gibi gerçekleştirildi. Standart grafiği hazırlamak için stadart proteint olarak % 0.1'lik sığır serum albümini kullanılmıştır.

Protein içeriği belirlenecek lakkaz çözeltisi ve immobilizasyon sırasında kullanılan damlatma çözeltisi ve yıkama sularından 100'er µL örnek alındı. Standart protein grafiği oluşturmak için ise 10, 20, 40, 60, 80, 100 µL sığır serum albümini çözeltisi alındı ve distile su ile 100 µL'ye tamamlandı. Tüm örneklere 5 mL Bradford reaktifi eklenip vortekslendikten sonra 5 dakika beklendi. Beklemenin sonunda tüm örneklerin absorbansları 595 nm'de okundu. Şahit olarak 100 µL distile su kullanıldı.

Artan konsantrasyonlarda hazırlanan sığır serum albümini örneklerinin absorbansları ile konsantrasyonları arasında standart protein grafiği oluşturuldu; lakkaz enzimi çözeltisi ile yıkama suları ve damlatma çözeltisinin protein içerikleri bu standart protein grafiği yardımıyla belirlendi.

### 3.2.6. Enzimatik Aktivite Tayini

*Boletus edulis* mantarından % 40-60 amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz ile elde edilen protein çözeltisinin lakkaz aktivitesi spektrofotometrik yöntemle belirlendi.

Aktivite tayininde Shin ve Lee metodu kullanılarak yapıldı. Aktivite tayini için; diyalizattan 0.1 mL ve immobilize enzimden de 0.25 g alındı. Şahit çalışmalarda ise

serbest enzim için 0.1 mL 0.1 M disodyum sitrat/HCl tamponu (pH 2.0); immobilize enzimde ise 0.1 mL 0.1 M sitrat/disodyumfosfat tamponu (pH 3.5) kullanıldı. Substrat olarak ABTS kullanıldı [92]. Serbest ve immobilize enzim için substrat çözeltileri hazırlanırken sırasıyla 0.1 M disodyum sitrat/HCl tamponu (pH 2.0) ve 1 mL 0.1 M sitrat/disodyumfosfat tamponu (pH 3.5) kullanıldı. Serbest enzimin aktivitesi ölçülürken 0.1 mL serbest enzim alınıp üzerine 0.9 mL 5mM ABTS ilave edildi ve karanlıkta, 25 °C'de, 3 dakika muamele edildikten sonra 420 nm'de okuma yapıldı. İmmobilize enzimin aktivitesi ölçülürken 0.25 g immobilize enzim alınıp üzerine 2 mL 5 mM ABTS ilave edildi ve karanlıkta, 37 °C'de, 10 dakika muamele edildikten sonra 420 nm'de okuma yapıldı.

1 ünite enzim aktivitesi, 1 µmol ABTS'yi 1 dakikada oksitleyebilen enzim miktarı olarak tanımlandı [92].

$$\textbf{\textit{1 lakkaz ünitesi}} = \frac{(\boldsymbol{\Delta A x Substrat\ hacmi\ (mL) x\ 10^6})}{\boldsymbol{\varepsilon x Enzim\ miktarı\ (mL\ veya\ g\ boncuk) x zaman (dk)}}$$

(ABTS için $\mathcal{E}$ =36,000 $M^{-1}$ $cm^{-1}$)

Serbest lakkaz için hacimsel aktivite U/mL, immobilize lakkaz için ise U/g olarak tanımlanırken; spesifik aktivite mg protein başına düşen hacimsel aktivite olarak tanımlandı.

### 3.2.7. İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

Bu çalışmada *B. edulis* lakkazının alginat+karragenan jeline immobilizasyonunun bazı koşulları optimize edildi.

#### 3.2.7.1. Damlatma Çözeltisinin Optimizasyonu

Damlatma çözeltisi olarak % 2'lik KCl (v:w), % 2'lik $CuCl_2$ (v:w) ve % 2 KCl-% 2 $CuCl_2$ (1:1; v:v) çözeltileri kullanılarak lakkaz immobilizasyonları yapıldı. En yüksek aktivite % 2'lik $CuCl_2$ çözeltisinde görüldüğü için değişen konsantrasyonlarda

% 1, % 2 ,% 3 ve % 4'lük $CuCl_2$ çözeltileri hazırlanarak yeni lakkaz immobilizasyonları gerçekleştirildi.

### 3.2.7.2. Enzim Miktarı Optimizasyonu

Alginat ve karragenan (w:w; 1:1) tartılarak, 1:10 oranında (w:v) ılık distile suda çözülerek hazırlanan jel karışımı immobilizasyon desteği olarak kullanıldı.

Bu jel karışımına yüklenecek enzim miktarını belirlemek için; yukarıda hazırlanan desteğe 2.5 mL, 5 mL ve 7.5 mL diyalizat eklenerek immobilizasyon gerçekleştirildi.

İşlemin sonunda immobilize enzimlere aktivite tayini yapılarak uygun enzim miktarı belirlendikten sonra optimizasyon çalışmasının devamında bu enzim miktarı sabit tutularak devam edildi.

### 3.2.7.3. Boncuk Boyutu Optimizasyonu

Bu çalışmada boncuk boyutları farklı enjektörler kullanılarak boncuk boyutu belirlendi. Her bir damlatma işlemi için eşit miktarda jel hazırlanıp uygun miktarda diyalizat eklendi. Yeşil uçlu enjektör (çap: 0,80 mm), kahverengi uçlu enjektör (çap: 0.45 mm), ve pastör pipeti (çap: 2 mm) yardımıyla damlatma çözeltilerine damlatılarak immobilizasyon işlemi gerçekleştirildi. Elde edilen boncukların ortalama boyutları kupmas yardımıyla ölçülerek belirlendi.

Yapılan aktivite tayinleri ile en yüksek aktivitenin görüldüğü boncuk boyutu belirlendikten sonra bundan sonraki immobilizasyonlarda bu enjektör kullanılarak çalışmaya devam edildi.

### 3.2.7.4. Boncuk Miktarı Optimizasyonu

Yukarıda belirtilen optimum koşullarda elde edilen immobilize boncuklardan 0.1 g, 0.25 g ve 0.5 g immobilize enzim kullanılarak lakkaz aktivite ölçümleri gerçekleştiridi.

En yüksek aktivitenin görüldüğü boncuk miktarı ile immobilize enzimin aktivite tayinleri yürütüldü.

### 3.2.8. *Boletus edulis*'ten İzole Edilen Lakkaz'ın Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi

*Boletus edulis* mantarından izole edilen lakkazın uygun immobilizasyon koşulları belirlendi. Optimum koşullarda gerçekleştirilen immobilizasyonlar sonrası optimum koşullarda yapılan aktivite tayinleri ile; serbest ve immobilize enzimin optimum pH, optimum sıcaklık, $K_m$-$V_{max}$ değerleri, termal kararlılığı belirlendi. Ayrıca immobilize enzimin tekrar kullanılabilirliği ve depo kararlılığı belirlemek için çalışmalar yapıldı.

#### 3.2.8.1. Optimum pH

Serbest ve immobilize enzimin çalışabileceği en uygun pH'ı belirlemek üzere serbest enzim için 0.1 M disodyum sitrat/HCl tamponuyla (pH 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0), immobilize enzim için 0.1 M sitrat/disodyum fosfat tamponuyla (pH 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0) çalışıldı. Bu tampon çözeltilerde hazırlanan substrat çözeltileri ile aktivite tayinleri gerçekleştirildi.

En yüksek lakkaz aktivitesinin görüldüğü pH değeri optimum çalışma pH'ı olarak belirlendi.

#### 3.2.8.2. Optimum Sıcaklık

Serbest ve immobilize enzimin optimum sıcaklığını belirlemek için; serbest enzim için 15-30 °C sıcaklık aralığında; immobilize enzim için 30-50 °C sıcaklık aralığında aktivite çalışmaları gerçekleştiridi.

En yüksek aktivitenin görüldüğü sıcaklık değerleri serbest ve immobilize enzimin optimum sıcaklıkları olarak belirlenerek bundan sonraki aktivite çalışmaları bu sıcaklıklarda yürütüldü.

#### 3.2.8.3. Termal Kararlılık

Serbest ve immobilize enzimde termal kararlılığı belirlemek için, 50 °C, 60 °C ve 70 °C'de denemeler yapıldı. Belirtilen sıcaklıklarda 30 ve 60 dakika bekletildikten sonra 1 dakika buz banyosunda soğutulan tüplerin serbest ve immobilize enzim için önceden belirlenmiş koşullarında hazırlanan ABTS çözeltileri ile lakkaz aktiviteleri belirlendi.

Elde edilen aktivite sonuçlarından serbest ve immobilize enzimin termal kararlılıkları belirlendi.

#### 3.2.8.4. $K_m$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Belirlenmesi

Serbest enzim için 0.1 M disodyum sitrat/HCl tamponu (pH 2.0) kullanılarak 0.0001 M, 0.000125 M, 0.00025 M, 0.0005 M, 0.001 M, 0.002 M konsantrasyonlara sahip ABTS çözeltileri hazırlanarak aktivite tayinleri yapıldı.

İmmobilize enzim için 0.1 M sitrat/disodyum fosfat tamponu (pH 3.5) kullanılarak 0.0001 M, 0.000125 M, 0.00025 M, 0.0005 M, 0.001 M, 0.002 M konsantrasyonlara sahip ABTS çözeltileri hazırlanarak aktivite tayinleri yapıldı.

Serbest ve immobilize enzim için Lineweaver-Burk doğruları çizilerek her iki enzimin $K_m$ ve $V_{max}$ değerleri belirlendi.

#### 3.2.8.5. İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanılabilirliği

İmmobilize enzim için tekrar kullanılabilirlik denemesi için önceden belirlenmiş koşullarda çalışıldı. İmmobilize enzimin her aktivite ölçümü sonrasında rejenerasyonu yapılarak kalan lakkaz aktivitesi yeniden belirlendi.

Rejenerasyon işlemi her aktivite ölçümü sonrasında immobilize enzimin % 2'lik $CuCl_2$ çözeltisinde 5 dakika 150 rpm'de [93], ardından buzdolabı koşullarında 4 °C'de 20 dakika bekletilmesi şeklinde yürütüldü.

### 3.2.8.6. İmmobilize Enzimin Depo Kararlılığı

Serbest ve immobilize enzimin depo kararlığını belirlemek için; 30 gün boyunca 4 °C'de buzdolabında saklanan serbest ve immobilize enzimlerden sırasıyla 1 mL ve 0.25 g örnekler alınarak 2 günde bir lakkaz aktivite tayini yapıldı.

Elde edilen aktivite sonuçları değerlendirilerek serbest ve immobilize enzimin aktivitelerini koruyabilecekleri süreç belirlendi.

### 3.2.9. Serbest Ve İmmobilize Enzimle Azo Boyar Madde Giderme

Boya giderme denemesi serbest ve immobilize enzim için belirlenen optimum koşullarda gerçekleştirildi. Serbest ve immobilize enzimin seçilen tekstil boyasını giderme aktivitesi aşağıdaki formül kullanılarak belirlendi[94].

$$\% \text{ Boya Giderme} = ((\Delta A_{İlk} - \Delta A_{Son}) \times 100) / \Delta A_{İlk}$$

Boya giderme denemesinde; serbest ve immobilize enzim için; boya, enzim ve tampon çözelti içeren reaksiyon ortamı toplam 6 mL olacak şekilde hazırlandı. Her iki enzim için; ayrıca medyatörlü denemeler de yapıldı. Medyatör olarak 1-hidroksibenzotriazol hidrat (HBT) ve violurik asit monohidrat (VA) kullanıldı.

Boya giderme denemesinde kullanılan boyar maddeler sırasıyla şu şekildedir; Reactive Black 5, Reactive Yellow 15, Reactive Blue 19, Reactive Red 239, Reactive Orange, Reactive Violet.

Serbest enzim denemeleri için;

- Serbest EnzimBoya Giderme İçeriği: 0.25 mL diyalizat, 1 mL azo boya (250 mg/L), 5 mL 0.1 M disodyum sitrat/HCl tamponu (pH 2.0)
- Serbest Enzim HBT Medyatörlü Enzim Boya Giderme İçeriği: 0.25 mL diyalizat, 1 mL azo boya (250 mg/L), 1mL 0.005 M HBT, 4 mL 0.1 M disodyum sitrat/HCl tamponu (pH 2.0)

- Serbest Enzim VA Medyatörlü Enzim Boya Giderme İçeriği: 0.25 mL diyalizat, 1 mL azo boya (250 mg/L), 1mL 0.005 M VA, 4 mL 0.1 M disodyum sitrat/HCl tamponu (pH 2.0)

  Şahit denemeleri için diyalizat yerine aynı oranda distile su kullanıldı.

  İmmobilize enzim denemeleri için reaksiyon ortamının bileşimi şöyledir:

- İmmobilize Enzim Medyatörsüz Deneme: 0.5 g boncuk, 1 mL azo boya (250 mg/L), 5 mL 0.1 M sitrat/disodyum fosfat tamponu (pH 3.5)
- İmmobilize Enzim HBT Medyatörlü Deneme: 0.5 g boncuk, 1 mL azo boya (250 mg/L), 1mL 0.005 M HBT, 4 mL 0.1 M sitrat/disodyum fosfat tamponu (pH 3.5)
- İmmobilize Enzim VA Medyatörlü Deneme: 0.5 g boncuk, 1 mL azo boya (250 mg/L), 1mL 0.005 M VA, 4 mL 0.1 M sitrat/disodyum fosfat tamponu (pH 3.5)

Şahit denemeleri için distile su ile hazırlanmış boncuklar kullanıldı.

Yukarıda belirtilen reaksiyon içerikleri, serbest enzim için 25 °C, immobilize enzim için 37 °C'de çalkalamalı su banyosunda 150 rpm'de inkübe edildi. İnkübasyonda 30 dakika, 1 saat, 2 saat, 4 saat, 6 saat ve 24. saatte 100'er µL örnek alınarak mikroplaka okuyucuda absorbansları belirlendi. Yüzde boya giderme aktiviteleri hesaplandı.

# BÖLÜM 4

# DENEY SONUÇLARI VE BULGULAR

## 4.1. *Boletus edulis*'ten Lakkaz İzolasyonu

Tekirdağ'ın Vize ilçesinden temin edilen *Boletus edulis* mantarları Bölüm 3.2.1'de belirtilen işlemlerden geçirilerek lakkaz enzimi izole edildi ve elde edilen çözelti "ham ekstrakt" olarak adlandırıldı. Elde edilen ham ekstrakt Bölüm 3.2.2'de belirtildiği gibi % 40-60 amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Sonrasında Bölüm 3.2.3'te açıklandığı gibi diyaliz uygulandı. Diyaliz işleminden sonra elde edilen çözelti "diyalizat" olarak adlandırıldı. Elde edilen diyalizat bu çalışmada enim kaynağı olarak kullanıldı. İzolasyon sırasında elde edilmiş bu fraksiyonlara ait protein ve aktivite değerleri Tablo 4.1'de verilmiştir.

**Tablo 4.1.** *Boletus edulis* lakkaz'ının izolasyonunda belirlenen protein ve enzim aktiviteleri

| | **Hacim (mL)** | **Protein Miktarı (mg/mL)** | **Toplam Protein (mg)** | **Toplam Aktivite Ünite (U)** | **Hacimsel Aktivite (U/mL)** | **Spesifik Aktivite (U/mg)** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Ham Ekstrakt** | 800 | 0.5163 | 413.04 | 36800 | 46 | 89.095 |
| **$(NH_4)_2SO_4$** | 42.6 | 1.4366 | 61.199 | 11504.55 | 270.060 | 187.985 |
| **Diyalizat** | 50 | 1.0003 | 50.015 | 14099.05 | 281.981 | 281.896 |

### 4.2. *Boletus edulis* Lakkaz'ının Alginat+Karragenan Jele İmmobilizasyonu

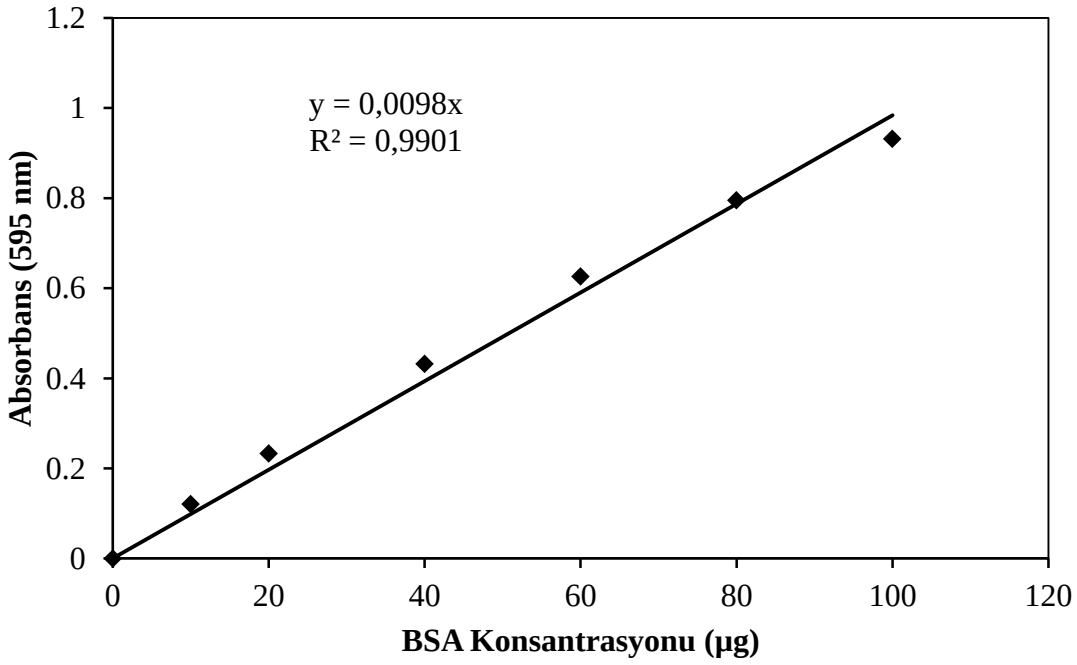
*Boletus edulis*'ten izole edilen lakkaz enzimi alginat/karragenan jel içersine immobilizasyonu Bölüm 3.2.4'te belirtildiği gibi Şahin yönteminin modifikasyonuyla gerçekleştirildi. İmmobilize enzimler boncuk şeklinde elde edildi. Elde edilen boncuklar Şekil 4.1'de görülmektedir. Boncuklardakiprotein immobilizasyonu yaklaşık % 100 olurken, boncuklara ait spesifik aktivite 41.818 U/mg olarak belirlendi.



**Şekil 4.1.** *Boletus edulis* lakkazının alginat+karragenan jelde tutuklanmasıyla elde edilen boncukların fotoğrafı

### 4.3. Protein Standart Grafiğinin Hazırlanması

Kantitatif protein tayini Bradford yöntemi ile yapıldı. 1 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan sığır serum albümini (BSA) stok 10, 20, 40, 60, 80 ve 100 µL örnekler alındı. Tüm örneklerin hacmi distile suyla 100 µL'ye tamamlandı. Şahit olarak ise 100 µL distile su kullanıldı. Her örneğe 5 mL Bradford reaktifi ilave edildi ve 10 dakika beklendikten sonra spektrofotometreyle 595 nm'de absorbans okumaları yapıldı. BSA konsantrasyonu-Absorbans grafiği çizildi (Şekil 4.2).

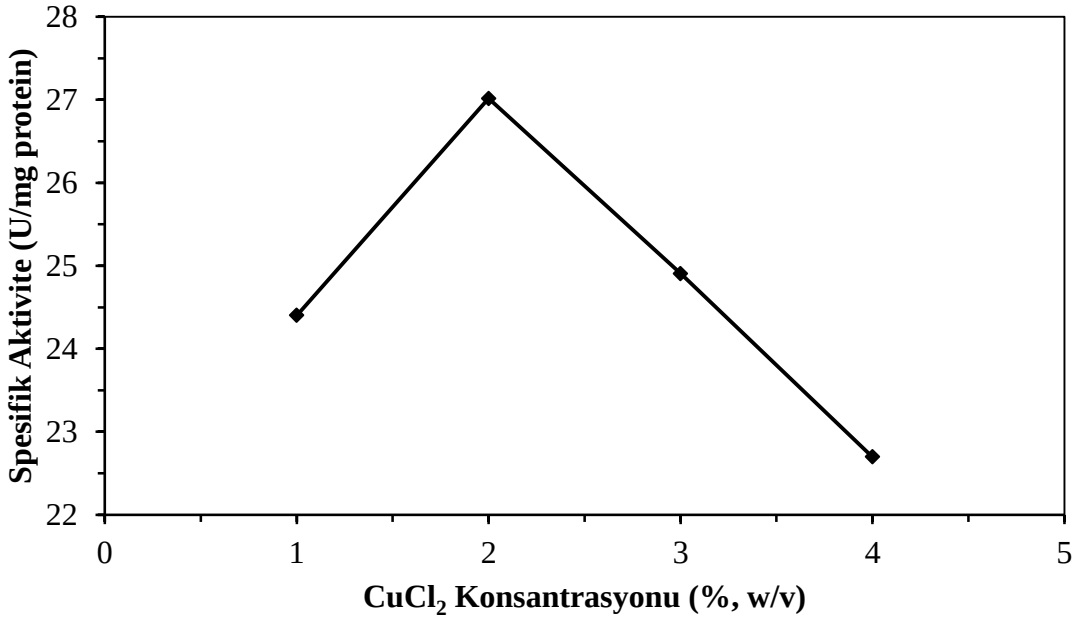



**Şekil 4.2.** Bradford yöntemi ile hazırlanan standart protein grafiği

## 4.4. İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

### 4.4.1. Damlatma Çözeltisinin Optimizasyonu

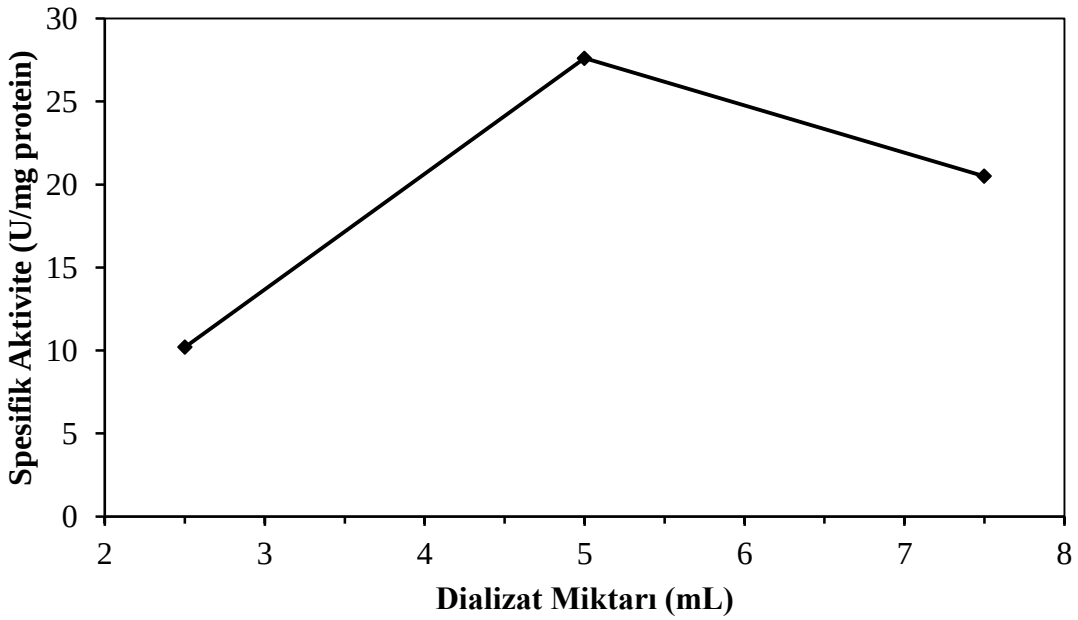
Damlatma çözeltisinin optimizasyonu Bölüm 3.2.7.1'de belirtildiği gibi yapıldı. Şahin'in ve ark.'nın uyguladığı yöntemdeki gibi eşit hacimde karıştırılmış % 2 $CuCl_2$ ve % 2 KCl çözeltisi kullanıldığında uygun çözelti olmadığı gözlendi. Sadece % 2 KCl çözeltisi damlatma çözeltisi olarak kullanıldığında ise boncuk formu elde edilemedi. Bu nedenle damlatma çözeltisi olarak sadece $CuCl_2$ çözeltisi denenmeye karar verildi. % 1, % 2, % 3 ve % 4'lük (w/v) $CuCl_2$ konsantrasyonlarında hazırlanan damlatma çözeltileri ile gerçekleştirilen immobilizasyonla elde edilen boncukların lakkaz aktiviteleri çalışıldı. Şekil 4.3'te görüldüğü gibi en yüksek aktivite damlatma çözeltisi olarak % 2'lik $CuCl_2$ çözeltisi kullanıldığında gözlendi.




**Şekil 4.3.** Damlatma çözeltisi optimizasyon grafiği

### 4.4.2. Enzim Miktarı Optimizasyonu

Enzim miktarı optimizasyonu Bölüm 3.2.7.2'de belirtildiği gibi yapıldı. Miktar olarak Destek:Enzim oranı 1:2.5, 1:5 ve 1:7.5 oranları çalışıldı. En yüksek aktivite 1:5 oranındaki 5 mL diyalizat kullanıldığında hazırlanan boncuklarda gözlendi. Belirlenen sonuçlar Şekil 4.4'te verildi.

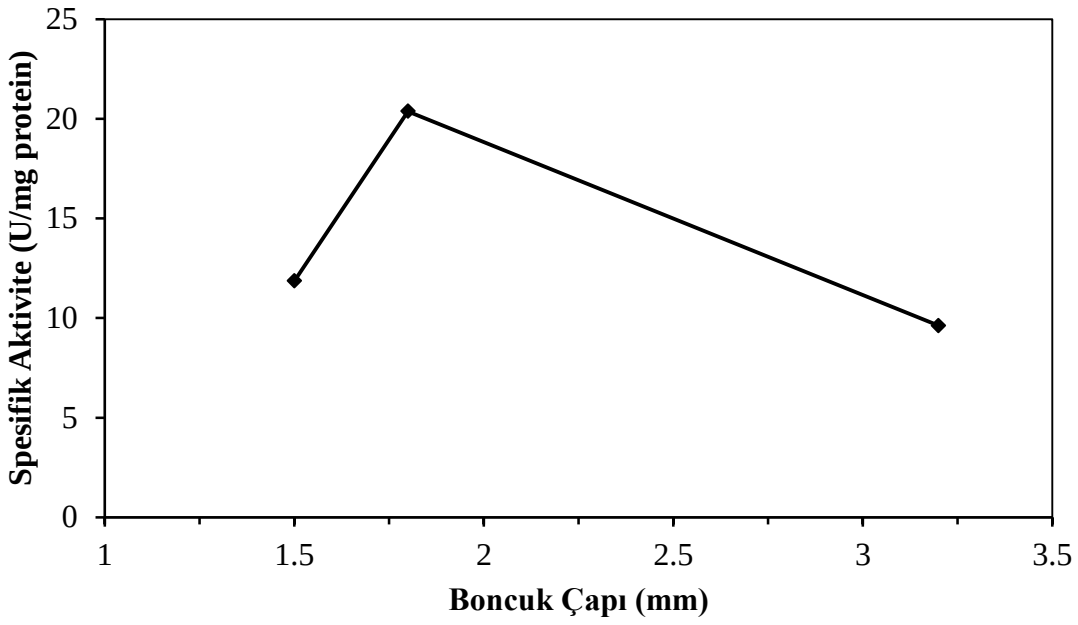



**Şekil 4.4.** Alginat+karragenan jellere yüklenecek enzim miktarı optimizasyon grafiği

### 4.4.3. Boncuk Boyutu Optimizasyonu

Boncuk boyutu optimizasyonu Bölüm 3.2.7.3'te belirtildiği gibi yapıldı. Bu amaçla, yeşil uçlu enjektör (çap: 0.80 mm), kahverengi uçlu enjektör (çap: 0.45 mm) ve pastör pipeti (çap: 2.00 mm) kullanıldı.

Denemeler sonucunda yeşil enjektörle yapılmış 1.8 mm çapa sahip boncuklara immobilize enzim en yüksek aktiviteyi gösterdiğinden bundan sonraki çalışmalarda bu enjektör ile boncuk yapıldı. Kahverengi uçlu enjektör ile 1.5 mm çaplı immobilize enzimler elde edilirken, pastör pipetiyle 3.2 mm çaplı boncuklar elde edildi. Sonuçlara ait grafik Şekil 4.5'te verildi.

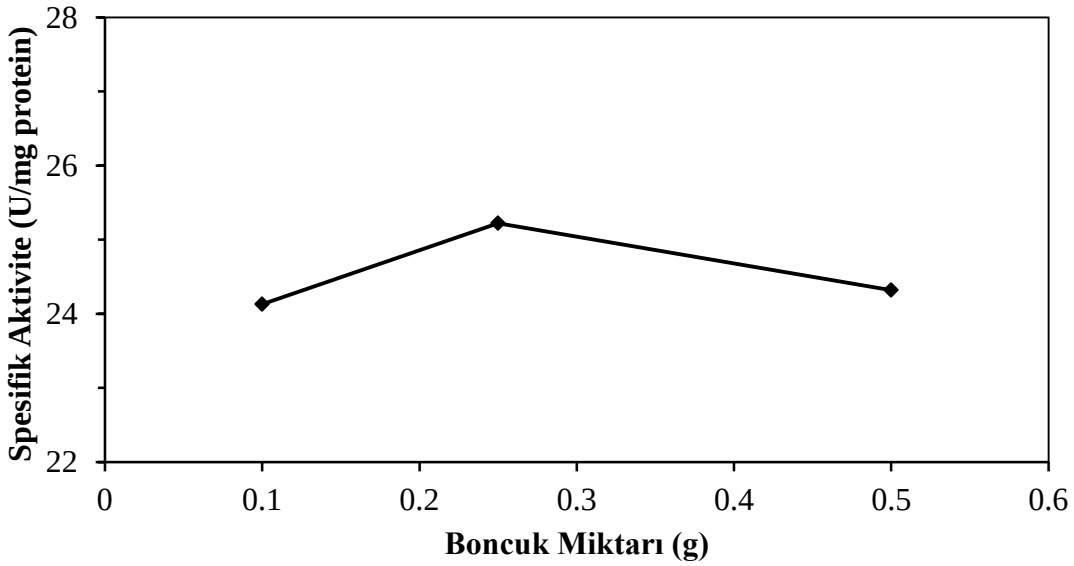



**Şekil 4.5.** Boncuk boyutu optimizasyon grafiği

### 4.4.4. Boncuk Miktarı Optimizasyonu

Boncuk miktarı optimizayonu Bölüm 3.2.7.4'te belirtildiği gibi yapıldı. Sırasıyla 0.1 g, 0.25 g ve 0.5 g boncuklar tartılarak uygun koşullarda aktivite tayini yapıldı.

Sonuçlara göre en yüksek aktivite 0.25 g boncuk kullanıldığında elde edildi ve bundan sonraki aktivite deneylerinde boncuk miktarı 0.25 g olarak çalışıldı. Sonuçlara ait grafik Şekil 4.6'da görülmektedir.




**Şekil 4.6.** Boncuk miktarı optimizasyon grafiği

İmmobilizasyon koşullarının optimizasyonu sonucunda elde edilen veriler Tablo 4.2'te verilmiştir.

**Tablo 4.2.** İmmobilizasyon koşullarının optimizasyon verileri

| Boncuk Miktarı (g) | Enzim Miktarı (mL) | Boncuk Boyutu (mm) | Damlatma Çözeltisi $CuCl_2$ (%, w/v) |
|---|---|---|---|
| 0.25 | 5 | 1.8 | 2 |

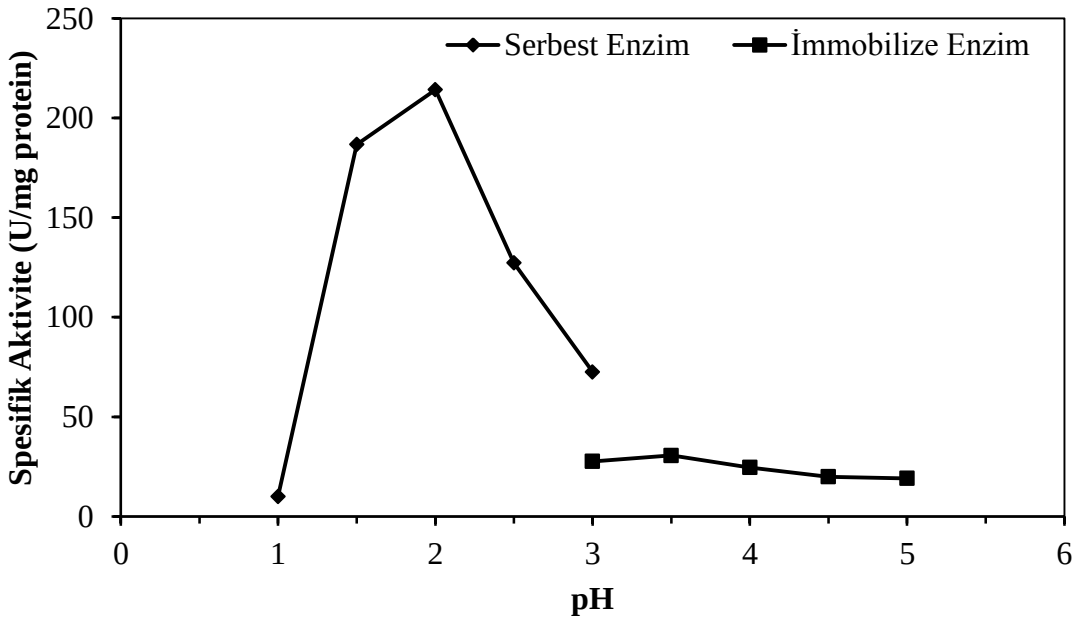
## 4.5. *Boletus edulis*'ten Elde Edilen Lakkaz'ın Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi

### 4.5.1. Optimum pH

Optimum pH çalışması Bölüm 3.2.8.1'de belirtildiği gibi yapıldı. 0.1 M disodyum sitrat/HCl tamponuyla yapılan serbest enzim için optimum pH çalışması sonuçlarına göre en yüksek aktivite pH 2.0'de gözlendi.

İmmobilize enzim için ise; optimum çalışması 0.1 M sitrat/disodyum fosfat tamponuyla yapıldı. İmmobilize enzim için optimum pH 3.5 olarak belirlendi.

pH çalışmasından elde edilen sonuçlara ait grafik Şekil 4.7'de verildi.




**Şekil 4.7.** Serbest ve immobilize enzime ait optimum pH grafiği

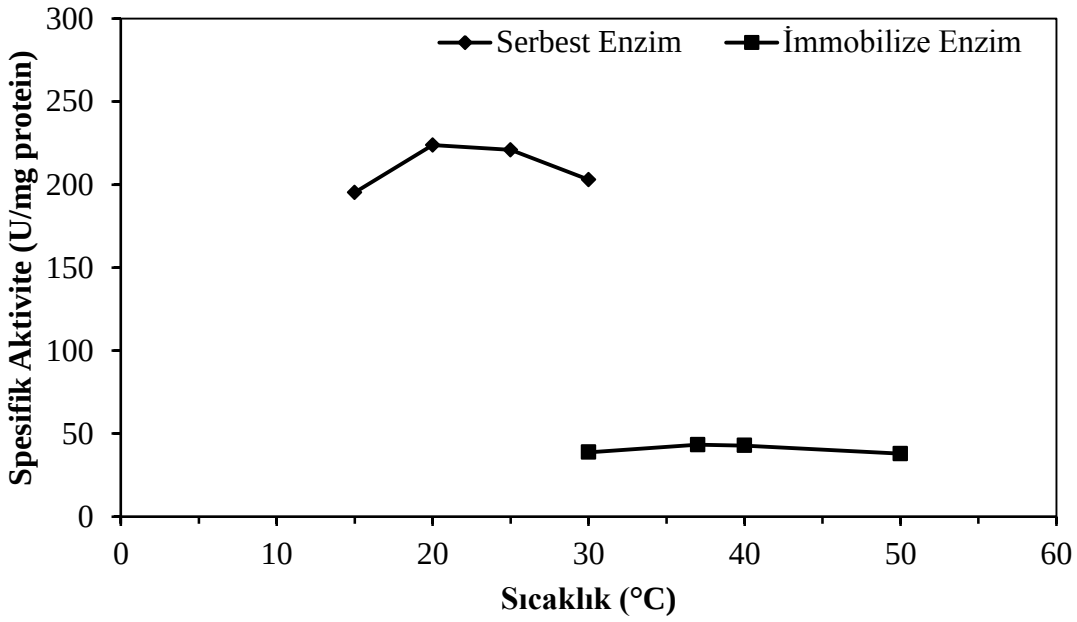
### 4.5.2. Optimum Sıcaklık

Optimum sıcaklık çalışması Bölüm 3.2.8.2'de belirtildiği gibi yapıldı.

Serbest enzimin aktivite sonuçlarına göre en yüksek aktivite 20 °C olarak belirlenmesine rağmen sıcaklığı sabit tutmada yaşanan zorluk nedeniyle 25 °C optimum sıcaklık olarak belirlendi.

İmmobilize enzim için ise en yüksek aktivite 37 °C'de gözlendi.

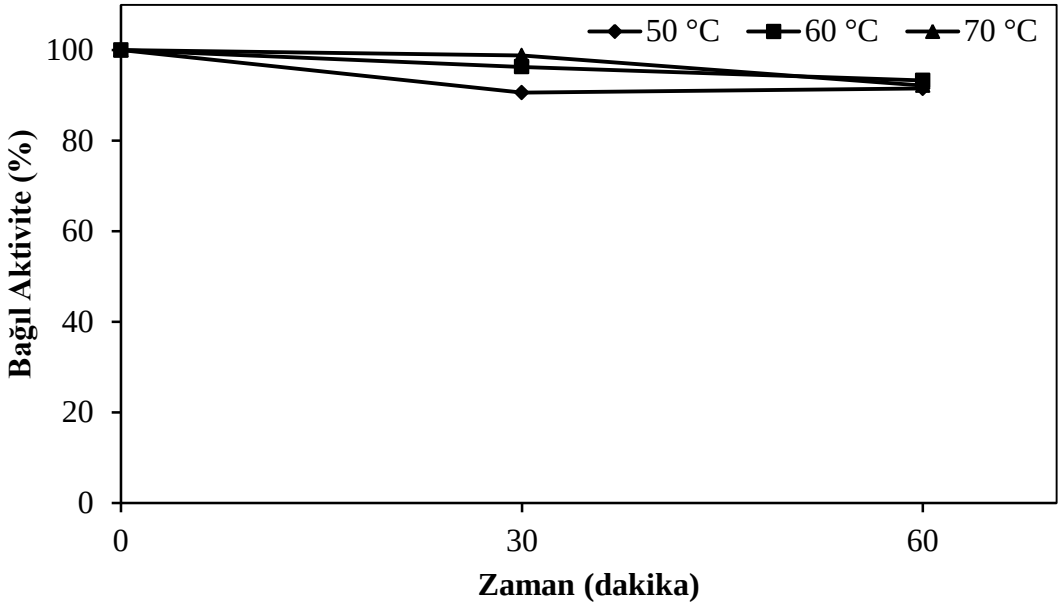
Sonuçlara ait değerlerin grafiği Şekil 4.8'de verildi.



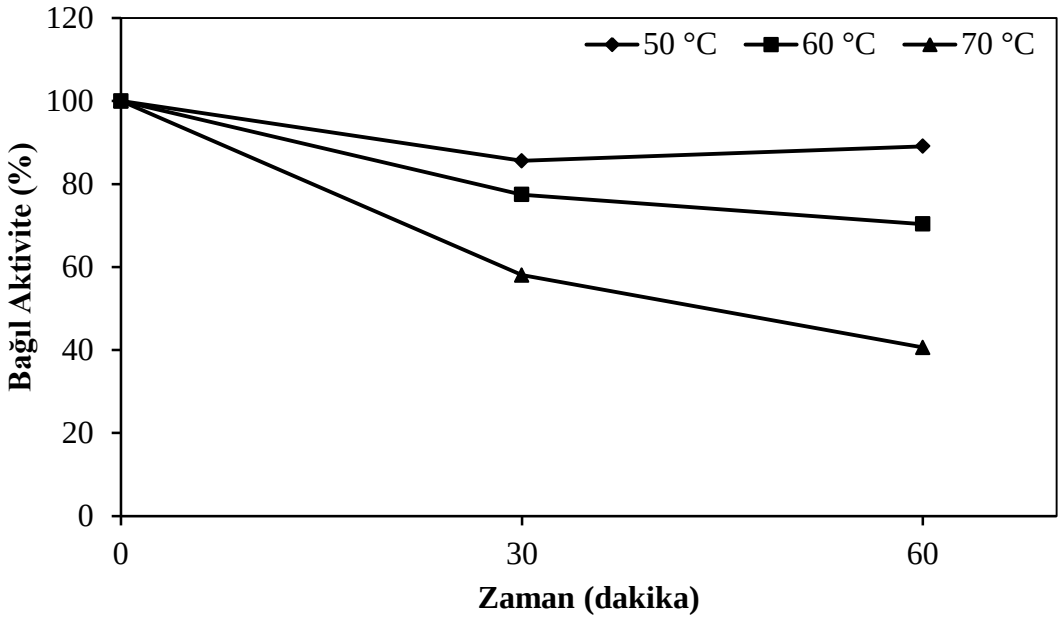

**Şekil 4.8.** Serbest ve immobilize enzim için optimum sıcaklık grafiği

### 4.5.3. Termal Kararlılık

Termal kararlılık çalışması Bölüm 3.2.8.3'te belirtildiği gibi gerçekleştirildi. Serbest ve immobilize enzim örnekleri 50 °C, 60 °C ve 70 °C sıcaklıktaki su banyolarında 30 dakika ve 60 dakikalık periyotlarda tutulduktan sonra buz banyosuna daldırıldı ve 1 dakika beklemenin ardından ABTS substratı kullanılarak lakkaz aktivite tayini yapıldı. Aktivite sonuçlarına göre bağıl aktivite ve zaman grafiği çizilerek serbest ve immobilize enzimin termal kararlılığı incelendi. Serbest ve immobilize enzime ait termal kararlılık grafikleri sırasıyla Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'de verildi. Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da görüldüğü gibi 50 °C'de serbest enzim 30 dakikada aktivitesinin % 91'ini korurken, immobilize enzim % 86'sını korumuştur. 70 °C'de serbest enzim 60 dakikada aktivitesinin % 92'sini korurken immobilize enzim % 41'ini korumuştur. Bu sonuçlara göre serbest enzim sıcaklık yükseldikçe aktivitesinin nerdeyse tamamını korurken, sıcaklık artışıyla immobilize enzimin aktivitesini kaybettiği gözlendi.



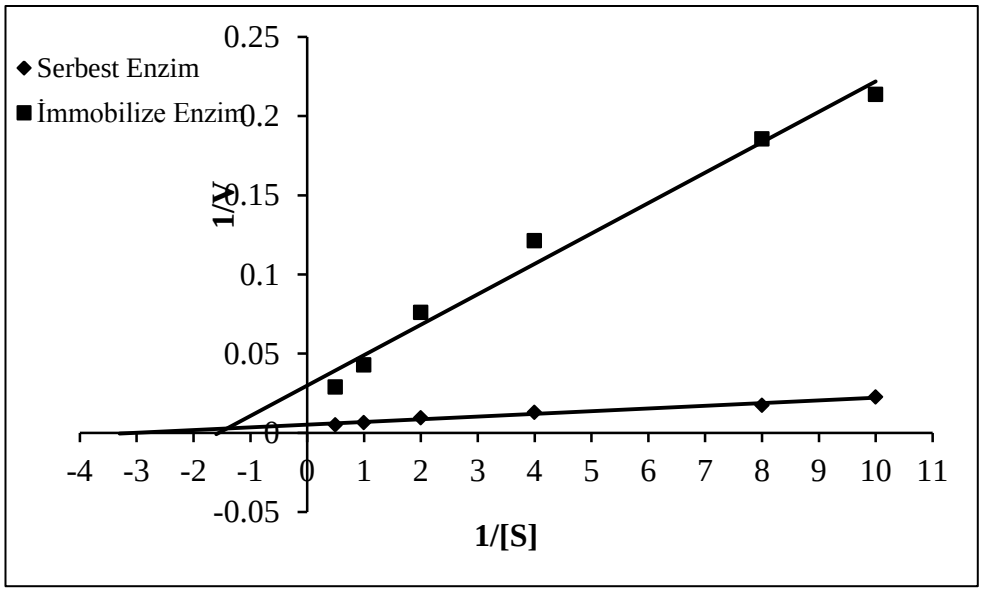

**Şekil 4.9.** Serbest enzimin termal kararlılık grafiği




**Şekil 4.10.** İmmobilize enzimin termal kararlılık deneyindeki değerlerine ait grafik

### 4.5.4. $K_m$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Belirlenmesi

$K_m$ ve $V_{max}$ değerlerinin belirlenmesi Bölüm 3.2.8.4'te belirtildiği gibi yapıldı. Optimum şartlarda serbest ve immobilize enzimlerin belirlenen tamponlarında 0.0001 M-0.002 M konsantrasyon aralığında hazırlanan ABTS çözeltileri ile lakkaz aktivite ölçümleri yapıldı. Spesifik aktivite (U/mg) ile substrat konsantrasyonları arasında oluşturulan Lineweaver-Burk grafiklerinden yararlanarak $K_m$ ve $V_{max}$ değerleri hesaplandı (Şekil 4.11).




**Şekil 4.11.** Serbest ve immobilize enzim için oluşturulan Lineweaver-Burk grafiği

Lineweaver-Burk grafikleri çizildikten sonra her iki grafik için belirlenen doğru denklemlerinden $K_m$ ve $V_{max}$ değerleri belirlendi, ayrıca katalitik etkinlik değeri de ($V_{max}/K_m$) hesaplandı (Tablo 4.3).

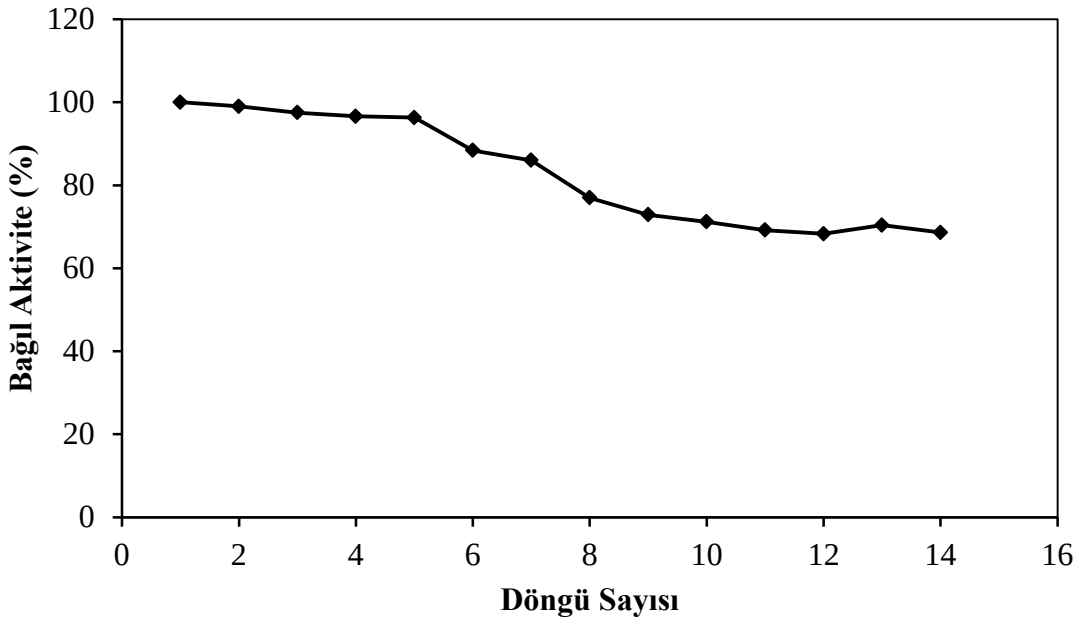
**Tablo 4.3.** Serbest ve immobilize enzimlerin kinetik değerler

| | $K_m$ (mM) | $V_{max}$ (U/mg) | $V_{max}/K_m$ |
|---|---|---|---|
| Serbest Enzim | 0.333 | 196.078 | 588.824 |
| İmmobilize Enzim | 0.642 | 33.445 | 52.095 |

### 4.5.5. İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanılabilirliği

İmmobilize enzimin kesikli sistemlerde tekrar kullanılabilirliği çalışması Bölüm 3.2.8.6'da belirtildiği gibi yapıldı.

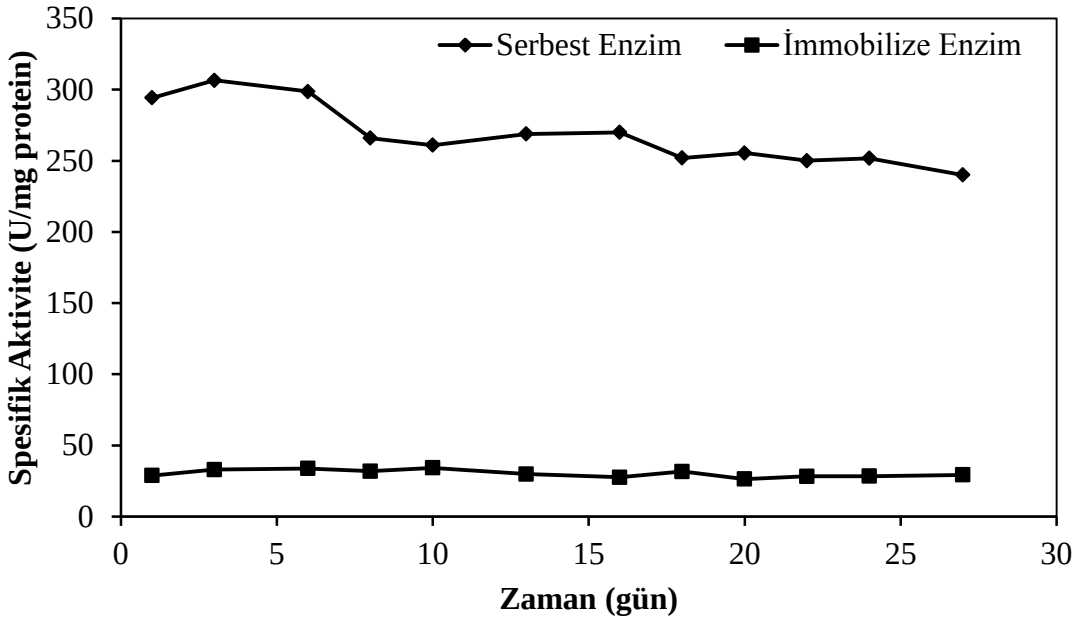
Hazırlanan immobilize boncukların optimum koşullarda ilk aktivite ölçümü alındı ve Ramsay'ın [93] metodununun modifikasyonu ile boncuklar rejenere edildi. En yüksek spesifik aktivite % 100 kabul edilerek bağıl aktivite-döngü sayısı arasında yeniden kullanılabilirlik grafiği oluşturdu (Şekil 4.12). İmmobilize boncuklar aktivitelerini 7. döngüye kadar aktivitesinin % 86'sını korurken, 14. döngüde ise % 68'ini koruduğu gözlendi.




**Şekil 4.12.** İmmobilize enzimin tekrar kullanılabilirlik grafiği

### 4.5.6. Depo Kararlılığı

Serbest ve immobilize enzimin depo kararlılığı Bölüm 3.2.8.7'de belirtildiği gibi yürütüldü. Her iki enzimden de örnekler alınarak 2 günlük periyotlarda 28 gün boyunca aktivite ölçümleri yapıldı. Sonuçlara ait grafik Şekil 4.13'te verildi.




**Şekil 4.13.** Serbest ve immobilize enzimin depo kararlılığı grafiği

Bu tez kapsamında, *Boletus edulis* mantarından izole edilen serbest lakkazın ve alginat+karragenan jelde immobilze lakkazın belirlenen bazı biyokimyasal özellikleri Tablo 4.4'te verilmiştir.

**Tablo 4.4.** Serbest ve immobilize enzimin bazı biyokimyasal özellikleri

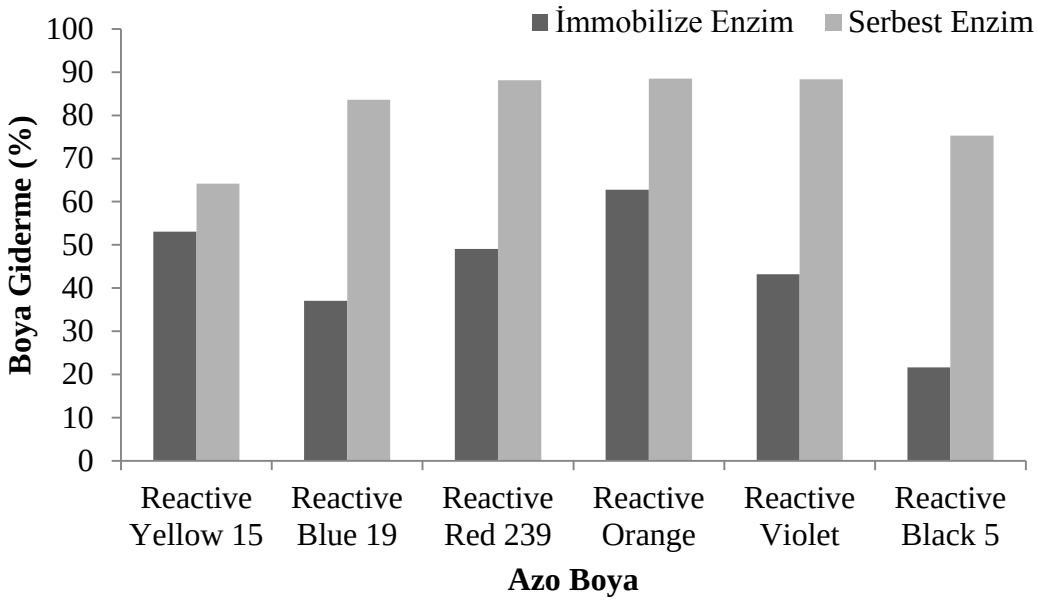
| | | Serbest Enzim | İmmobilize Enzim |
|---|---|---|---|
| **Optimum pH** | | 2.0 | 3.5 |
| **Optimum Sıcaklık (°C)** | | 25.0 | 37.0 |
| **Termal Kararlılık (60 °C kalan % bağıl aktivite değerleri)** | **30 dk** | 96.3 | 77.5 |
| | **60 dk** | 93.3 | 70.4 |
| **$V_{max}/K_m$** | | 588.824 | 52.095 |
| **Tekrar Kullanılabilirlik (Döngü sayısı)** | | - | 14 |
| **Depo Kararlılığı (Aktivitesinin %50'sini koruduğu gün)** | | 28 | 28 |

### 4.5.7. Boya Giderme

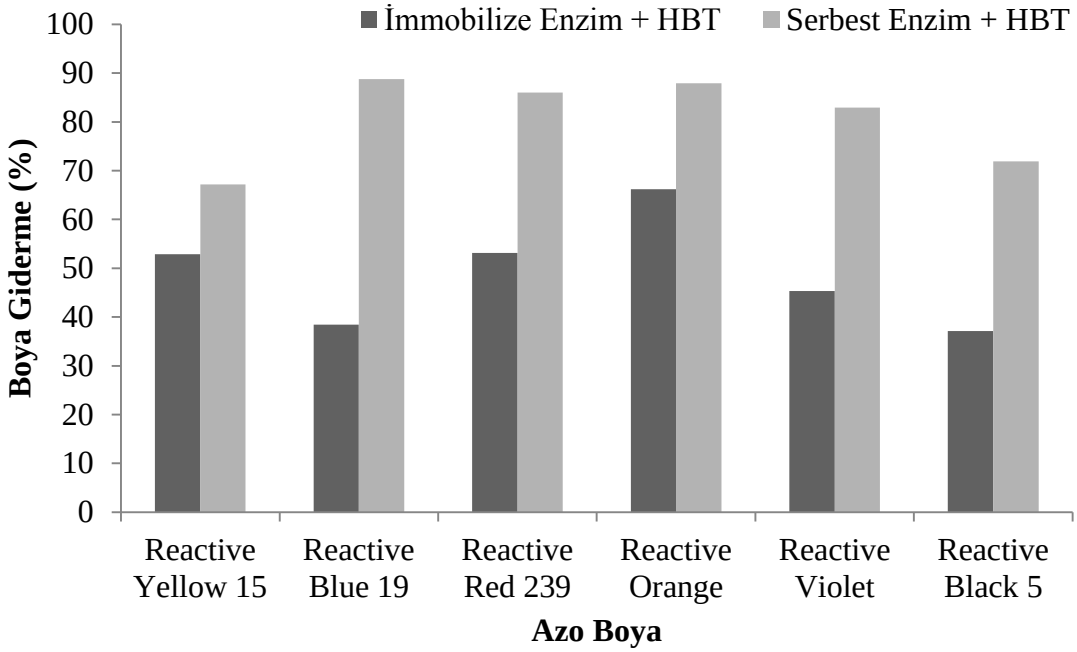
Boya giderme işlemi Bölüm 3.2.9'da belirtildiği gibi yürütüldü. Altı farklı azo boyar madde ile çalışıldı. *Boletus edulis*'ten izole edilen serbest lakkaz enziminin ve immobilize enzimin bu boyalar için 30 dakika, 1 saat, 2 saat, 4 saat, 6 saat ve 24. saatteki boya giderme aktiviteleri belirlendi. Bu amaçla literatürde belirtilen Reactive Yellow 15 için 416 nm, Reactive Blue 19 için 592 nm, Reactive Black 5 için 595 nm, Reactive Red 239 için 542 nm, Reactive Orange için 525 nm, Reactive Violet için 548 nm dalga boylarında absorbans ölçümleri yapıldı [95, 96, 97, 98]. Maksimum absorbanslarındaki düşüşten faydalanılarak 30 dakika, 1 saat, 2 saat, 4 saat, 6 saat ve 24. saatteki boya giderme aktiviteleri yüzde olarak hesaplandı. Serbest ve immobilize enzimin zamana karşı hesaplanan bu boya giderme aktivite sonuçları Tablo 4.5'te verildi. Ayrıca bu boyalara ait serbest ve immobilize enzimin medyatörsüz ortamda 24. saatteki renk giderme aktivite grafiği Şekil 4.14'te, medyatör olarak HBT kullanılarak gerçekleştirilen 24. saatteki renk giderme çalışmalarının sonucu Şekil 4.15 ve VA kullanıldığında elde edilen sonuçlar ise Şekil 4.16'da grafik olarak verildi.

**Tablo 4.5.** İmmobilize ve serbest enzimle yapılan boya giderme çalışmaları

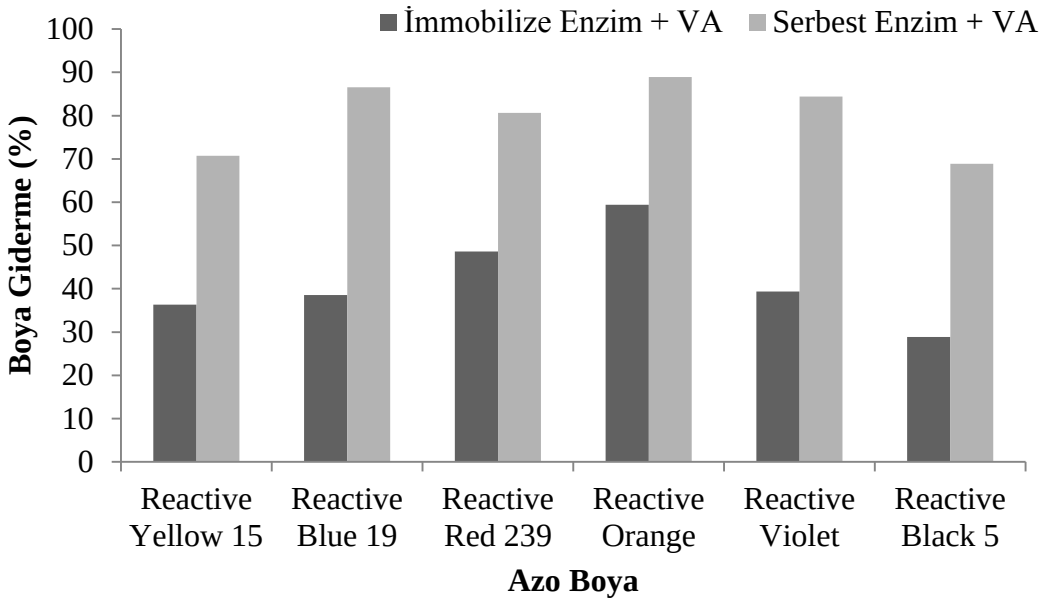
| | | | Boya Giderme Aktivitesi (%) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 30 dk | 1 saat | 2 saat | 4 saat | 6 saat | 24 saat |
| Reactive Yellow 15 | Serbest | Medyatörsüz | 3.93 | 11.34 | 19.95 | 33.51 | 38.09 | 64.17 |
| | | HBT'li | 6.85 | 14.59 | 28.31 | 34.13 | 45.20 | 67.20 |
| | | VA'lı | 6.63 | 11.26 | 22.55 | 26.06 | 35.98 | 70.74 |
| | İmmobilize | Medyatörsüz | 32.71 | 37.26 | 49.19 | 52.09 | 55.28 | 53.07 |
| | | HBT'li | 28.68 | 39.27 | 48.77 | 46.82 | 53.85 | 52.89 |
| | | VA'lı | 26.61 | 26.97 | 29.78 | 32.61 | 36.96 | 36.35 |
| Reactive Blue 19 | Serbest | Medyatörsüz | 29.58 | 31.78 | 32.86 | 41.37 | 51.07 | 83.63 |
| | | HBT'li | 27.76 | 32.62 | 40.14 | 52.54 | 66.18 | 88.81 |
| | | VA'lı | 36.27 | 39.14 | 45.39 | 56.68 | 65.12 | 86.57 |
| | İmmobilize | Medyatörsüz | 22.83 | 27.24 | 28.84 | 30.19 | 33.33 | 37.08 |
| | | HBT'li | 22.10 | 28.83 | 31.72 | 32.83 | 35.58 | 38.46 |
| | | VA'lı | 20.37 | 27.52 | 35.11 | 30.59 | 33.02 | 38.56 |
| Reactive Red 239 | Serbest | Medyatörsüz | 34.18 | 37.29 | 48.63 | 58.02 | 65.39 | 88.16 |
| | | HBT'li | 32.20 | 33.47 | 39.27 | 50.00 | 58.02 | 86.05 |
| | | VA'lı | 29.63 | 35.22 | 38.88 | 47.60 | 49.89 | 80.62 |
| | İmmobilize | Medyatörsüz | 30.58 | 38.46 | 47.01 | 49.79 | 53.15 | 49.04 |
| | | HBT'li | 28.86 | 39.23 | 46.41 | 51.87 | 54.92 | 53.13 |
| | | VA'lı | 28.93 | 35.38 | 43.88 | 51.64 | 52.03 | 48.60 |
| Reactive Orange | Serbest | Medyatörsüz | 15.20 | 26.02 | 36.84 | 46.78 | 60.41 | 88.50 |
| | | HBT'li | 8.85 | 27.48 | 34.23 | 47.02 | 54.87 | 87.90 |
| | | VA'lı | 13.79 | 21.83 | 35.86 | 42.03 | 54.12 | 88.90 |
| | İmmobilize | Medyatörsüz | 28.91 | 42.07 | 50.00 | 59.44 | 64.50 | 62.80 |
| | | HBT'li | 32.84 | 45.92 | 56.48 | 61.89 | 64.63 | 66.20 |
| | | VA'lı | 28.73 | 39.32 | 49.42 | 54.86 | 57.02 | 59.40 |
| Reactive Violet | Serbest | Medyatörsüz | 33.64 | 38.65 | 47.83 | 56.23 | 62.57 | 88.33 |
| | | HBT'li | 18.74 | 26.39 | 44.26 | 51.80 | 58.10 | 82.92 |
| | | VA'lı | 15.03 | 25.96 | 42.10 | 53.99 | 56.63 | 84.40 |
| | İmmobilize | Medyatörsüz | 21.84 | 30.42 | 37.71 | 42.28 | 45.54 | 43.18 |
| | | HBT'li | 23.15 | 28.32 | 37.32 | 38.55 | 42.82 | 45.32 |
| | | VA'lı | 22.32 | 28.12 | 36.36 | 39.84 | 41.79 | 39.39 |
| Reactive Black 5 | Serbest | Medyatörsüz | 23.58 | 31.35 | 36.45 | 41.33 | 46.24 | 73.99 |
| | | HBT'li | 13.13 | 27.77 | 34.77 | 45.10 | 50.06 | 67.83 |
| | | VA'lı | 20.54 | 21.24 | 31.05 | 42.28 | 42.13 | 68.95 |
| | İmmobilize | Medyatörsüz | 20.03 | 21.04 | 23.50 | 24.67 | 26.68 | 19.41 |
| | | HBT'li | 16.33 | 24.68 | 24.22 | 23.91 | 24.87 | 26.99 |
| | | VA'lı | 19.01 | 16.94 | 18.54 | 17.86 | 20.08 | 28.91 |




**Şekil 4.14.**Serbest ve immobilize enzimlerin medyatörsüz boya giderme grafiği




**Şekil 4.15.** Serbest ve immobilize enzimin HBT medyatörü ile boya giderme grafiği




**Şekil 4.16.** Serbest ve immobilize enziminVA medyatörü ile boya giderme grafiği

# BÖLÜM 5

# TARTIŞMA

Lakkazlar, kağıt ve kağıt hamuru ağartma, tekstil, petrokimya, biyoremidasyon, antikanser ilaçlarının yapımı, kozmetik, biyosensör gibi çok sayıda endüstriyel alanda etkin olarak kullanılan biyolojik katalizörlerdir. Literatür incelendiğinde lakkazlarla yapılan çok sayıda araştırma göze çarpmaktadır. Bu çalışma kapsamında, Kırklareli şehrinin Saray ilçesinden temin edilen *Boletus edulis* mantarından lakkaz enzimini izole edilerek alginat+karragenan desteğe tutuklama yöntemiyle immobilizasyon işlemi gerçekleştirildi ve serbest ve immobilize enzimin bazı biyokimyasal özellikleri incelendi. Ayrıca serbest ve immobilize enzimin tekstil endüstrisinde sıklıkla kullanılan bazı boyar maddeleri giderme aktivitesi çalışıldı.

Literatürdeki lakkaz çalışmalarından da görülebileceği üzere, lakkaz enziminin elde edildiği çok sayıda kaynak vardır. Bölüm 2.1.3'te de belirtildiği gibi bitki, böcek, fungus gibi ökaryotik kaynakların yanında, bazı bakterilerden de lakkaz izolasyonları prokaryotik kaynakların da lakkaz kaynakları arasında yer aldığını göstermektedir. Prokaryatik lakkazlar son yıllarda giderek artan bir kullanıma sahip olsalar da, fungal kökenli lakkazlar mevcut durumda en çok kullanım alanına sahip lakkazlar sıfatını taşımaya devam etmektedir.

Literatürde hem serbest hem de immobilize olmak üzere çok sayıda lakkaz çalışmasına rastlanmaktadır. İmmobilizasyonda; tutuklama, adsorpsiyon, çapraz bağlama gibi çok sayıda teknik kullanılmıştır. Bu çalışmada *Boletus edulis* mantarından izole edilen lakkaz tutuklama yöntemi kullanılarak alginat+karragenan jele immobilize edildi.

*Boletus edulis* mantarından lakkaz izolasyonu, Bölüm 3.2.1'de bahsedildiği gibi mantarın şapka ve gövde kısmı 0.15 M NaCl, %1 Triton X-100 ve PVP ile birlikte Waring blender ile homojenize edildi. PVP, mantar yapısında bulunan polimerik

yapıları uzaklaştırmak amacıyla kullanıldı. Triton X-100 ise mantar hücrelerinde lakkaz enziminin zara bağlı olması nedeniyle zar yapısını çözerek lakkaz enzimini elde etmek için kullanıldı [99]. Elde edilen homojenata saflaştırma basamağı olarak % 40-60'lık amonyum sülfat $(NH_4)_2SO_4$ çöktürmesi uygulandı. Zhang vd. [88] ve Patrick vd. [100] literatürde mantarlardan lakkaz izolasyonunu benzer şekilde % 80. amonyum sülfat çöktürmesiyle yapmışlardır [88].

% 40-60'lık $(NH_4)_2SO_4$ çöktürmesinin ardından amonyum sülfat'ın uzaklaştırılması için Bölüm 3.2.3'te belirtildiği gibi diyaliz işlemi uygulanmıştır. % 40-60'lık $(NH_4)_2SO_4$ fraksiyonuna 0.1 M sodyum asetat tamponuna (pH 4.5) karşı tampon 3 kez değiştirilmek suretiyle 24 saat buzdolabında (4-6 °C) manyetik karıştırıcı üzerinde diyaliz işlemi gerçekleştirilmiştir.

Lakkaz aktivitesi tayini ABTS substratına karşı Bölüm 3.2.6'da belirtildiği şekilde Shin ve Lee'nin [92] yöntemi ile gerçekleştirildi. Literatürde bu yöntemi ve substratı kullanan çok sayıda araştırma mevcuttur. Bunlardan bazıları Zhang vd. [101], Ng ve Wang [102], Tian vd. [103], Sun vd. [104], Hu vd'dir [105].

İmmobilizasyon, Bölüm 2.2'de belirtildiği gibi enzimlerin bir destek üzerine veya içerisine bağlanıp hareketsiz hale getirilerek kullanılması işlemine denir. Bu şekilde enzimden serbest enzimde olduğu gibi geri kazanım sorunu olmadan maksimum verim elde edilmek istenmektedir. Çok çeşitli immobilizasyon yöntemleri mevcuttur. Elde bulunun enzime ve uygulanacak yönteme göre en uygun immobilizasyon yöntemi seçilerek ona uygun işlem yapılır.

Tutuklama yöntemi literatürde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Yamak vd. [106], Tortolini vd. [107], Makas vd. [108] lakkazı çeşitli kaynaklardan elde ettikten sonra tutuklama yöntemiyle immobilize ederek kullanan araştırmacılardan bazılarıdır. Yamak vd. P(AAm-NIPA), P(AAm)/Alg ve P(AAm-NIPA)/Alg materyallerine, Tortolini vd. MWCNT elektroduna PAP kimyasalıyla ve Makas vd. [P(AAm‑AA)/κ-car] ve [P(AAm‑IA)/κ-car] materyallerine tutuklama yapmışlarıdır.

Bu çalışmada *Boletus edulis* mantarından izole edilmiş lakkaz; immobilizasyon yöntemlerinden tutuklama yöntemi kullanılarak immobilize edilmiştir. İmmobilizasyon işlemi Bölüm 3.2.4'te belirtildiği gibi Şahin vd.'nin yöntemi temel alınarak

gerçekleştirildi [89]. Bu yönteme göre alginat ve karragenan polimerleri belli oranlarda karıştırıldı ve içerisine bir miktar diyalizat konarak enzim içeren jel elde edildi. Jel indükleyici multivalent katyonlar kullanılarak suda çözünmeyen, dayanıklı immobilize boncuklar yapıldı. Jel indükleyici yani damlatma çözeltisi olarak % 2'lik $CuCl_2$ kullanıldı.

Protein tayinleri Bradford yöntemi ile yapıldı. Bölüm 3.2.5.1'de belirtildiği standart protein çözeltisi olarak sığır serum albümini kullanıldı ve BSA standart grafiği çizildi (Şekil 4.2). Serbest enzimin doğrudan kendisine protein tayini işlemi uygulanırken, immobilize enzim için damlatma çözeltisi ve yıkama sularına protein tayini yapıldı. Yapılan immobilizasyon işlemi sonucunda immobilize enzimin spesifik aktivitesi 41.818 U/mg protein olarak belirlendi. İmmobilizasyon yüzdesi ise % 100 olarak tespit edildi. Serbest enzimin spesifik aktivitesi 281.896 U/mg protein olarak belirlenmiştir.

İmmobilizasyon işleminde enzim aktivitesini etkileyen birtakım etkenler vardır. Bunlardan bazıları; damlatma çözeltisinin konsantrasyonu, enzim miktarı, boncuk boyutu ve boncuk miktarıdır.

Alginat+karragenan destek olarak seçildiğinde damlatma çözeltisi olarak $CuCl_2$, KCl ve $CaCl_2$ çözeltilerinin kullanıldığı literatürde belirlenmiştir. Bu çalışmada lakkazın bakır kofaktörlü bir enzim olması ve alginat polimerinin $Cu^{+2}$ iyonuna olan ilgisi nedeniyle $CuCl_2$ çözeltisi kullanılmıştır [109, 110]. Damlatma çözeltisinin belirlenmesi Bölüm 3.2.7.1'de belirtildiği gibi yapıldı, damlatma çözeltisi olarak için $CuCl_2$ çözeltisinin % 2'lik (w/v) konsantrasyonunun en uygun olduğu belirlendi (Şekil 4.3).

İmmobilizasyon esnasında alginat+karragenan desteğine yüklenecek enzim miktarı optimizasyonu Bölüm 3.2.7.2'de belirtildiği gibi yapıldı. Enzim çözeltisinden 2.5 mL, 5 mL ve 7.5 mL alınarak sabit destek oranında immobilizasyonlar gerçekleştirildi. Elde edilen boncuklara lakkaz aktivite tayini ve protein tayini yapılarak optimum enzim miktarı belirlendi (Şekil 4.4). Şekilde görüldüğü gibi en yüksek aktivite 1:5 oranında yani 5 mL enzimi kullanılarak elde edilen boncuklarda belirlendi.

En yüksek aktivite gözlenecek boncuk boyutunun optimizasyonu Bölüm 3.2.7.3'te belirtildiği gibi farklı çaplarda 3 enjektör kullanılarak gerçekleştiridi. Yeşil uçlu enjektör (0.80 mm), kahverengi uçlu enjektör (0.45 mm) ve pastör pipet (2.00 mm) ile sırasıyla 1.8 mm çaplı, 1.5 mm çaplı ve pastör pipetiyle de 3.2 mm çaplı boncuklar elde edildi. En yüksek lakkaz aktivitesi yeşil uçlu enjektör ile elde edilen boncuklarda gözlendi (Şekil 4.5). Yeşil uçlu enjektör ile elde edilen boncukların fotoğrafı Şekil 4.1'de verilmiştir.

Boncuk miktarı optimizasyonunda ise 0.1 g, 0.25 g ve 0.5 g immobilize boncuk kullanılarak enzimatik aktivite tayini yapıldı ve en yüksek aktivite 0.25 g boncuk kullanıldığında gözlendi (Şekil 4.6).

İmmobilizasyon koşulları optimize edildikten sonra serbest ve immobilize enzim için bazı biyokimyasal karakteristik özellikler belirlendi. Bunlar; optimum pH, optimum sıcaklık, termal kararlılık, $K_m$ ve $V_{max}$ değerleri, depo kararlılığı ve immobilize enzimler için tekrar kullanılabilirlik olarak sıralanabilir.

İmmobilizasyon işlemiyle enzim daha kararlı bir hal alarak serbest enzime göre daha dayanıklı hale gelir. İmmobilizasyon enzimin çalışması için gerekli pH değerini değiştirebilir veya çalıştığı pH aralığını genişletebilir ve bu şekilde serbest enzime göre daha dayanıklı olabilir. Bu çalışmada optimum pH belirlenirken iki farklı tampon kullanıldı. Serbest enzim için 0.1 M disodyum sitrat/HCl tamponu, immobilize enzim için ise 0.1 M sitrat/disodyum fosfat tamponu tamponu kullanıldı. Serbest enzim için optimum pH 2.0; immobilize enzim için optimum pH 3.5 olarak belirlendi (Şekil 4.8). Yamak vd. *Terametes versicolor*'dan lakkaz izole etmişler, enziminin immobilize ve serbest halleri için pH 3.0-8.0 aralığında çalışmışlardır. Çalışma sonuçlarına göre her iki enzimin çalışma pH'ını 5.5-6.0 olarak belirlemişlerdir [106]. Bryjack vd. *Cerrena unicolor*'dan elde edilen lakkaz için gerçekleştirilen optimum pH çalışmasında serbset enzim için optimum pH 5.0-5.5 olarak belirlenirken, immobilize enzim için pH 6.0-6.5 olarak belirlenmiştir [111].

Optimum sıcaklık optimizasyonu Bölüm 3.2.8.2'de belirtildiği gibi yapıldı. Serbest ve immobilize enzim belirlenen optimum koşullarda değişen sıcaklarda inkübe edildikten sonra aktivite tayini yapıldı. Şekil 4.9'da görüldüğü gibi en yüksek aktivite;

serbest enzim için 25 °C, immobilize enzim için 37 °C sıcaklıklarda belirlendi. Unal ve Pazarlioglu *Terametes versicolor*'dan elde ettikleri lakkazı jelatinde immobilize ettikten sonra optimum sıcaklığı 35 °C olarak belirlemişlerdir [112]. Kunamneni vd. *Myceliopthora thermophila*'dan elde ettikleri lakkazın hem serbest hem de immobilize formu için belirledikleri optimum sıcaklık değeri 60 °C'dir [113].

Termal kararlılık çalışması, Bölüm 3.2.8.3'te belirtildiği gibi yapıldı. Serbest ve immobilize enzimlerden alınan örnekler 50 °C, 60 °C ve 70 °C'de 30 dakika ve 60 dakika süresince bekletilidi ve ardından 1 dakika buz banyosunda tutulduktan sonra lakkaz aktivitesi tayini yapıldı. Serbest enzim için 30 dakikalık beklemelerin sonunda 50 °C, 60 °C ve 70 °C'deki kalan bağıl aktivite değerleri yaklaşık olarak sırasıyla % 90, % 96 ve % 98 olarak belirlendi; 60 dakikalık değerler ise sırasıyla % 90, % 93 ve % 92 olarak belirlendi (Şekil 4.10). İmmobilize enzim için 30 dakikalık beklemelerin sonunda 50 °C, 60 °C ve 70 °C'deki kalan bağıl aktivite değerleri yaklaşık olarak sırasıyla % 85, % 77 ve % 58 olarak belirlenirken; 60 dakikalık değerler ise sırasıyla % 80, % 70 ve % 41 olarak belirlendi (Şekil 4.11). Serbest enzimin immobilize enzimden daha iyi termal kararlılığa sahip olduğu gözlendi. Bunun nedeni immobilizasyonun muhtemel difüzyon engeli olabileceği düşünülmektedir. Jiang vd. *Pycnoporus sanguineus* lakkazıyla yaptıkları termal kararlılık çalışmasında 60 °C'de 3.5 saat beklettikleri serbest ve immobilize enzimde sırasıyla % 19 ve % 74'lük aktiviteler gözlemişlerdir [114].

$K_m$ (Micheals Menten sabiti) ve $V_{max}$ reaksiyon hız değerleri Lineweaver-Burk eğrisinden elde edildi (Şekil 4.12). Serbest ve immobilize enzimin $K_m$ ve $V_{max}$ değerlerini belirlemek üzere; çalışma tamponlarında 0.0001 M, 0.000125 M, 0.00025 M, 0.0005 M, 0.001 M ve 0.002 M konsanrasyonlarda hazırlanan substrat çözeltileri ile aktivite tayinleri yapıldı. Serbest enzim için $K_m$ değeri 0.333 mM olarak belirlenirken, $V_{max}$ değeri 196.078 U/mg olarak belirlendi; immobilize enzim için $K_m$ değeri 0.642 mM olarak belirlenirken, $V_{max}$ değeri 33.445 U/mg olarak belirlendi. Bayramoglu vd *Terametes versicolor* serbest ve immobilize lakkaz enzimi için $K_m$ ve $V_{max}$ değerleri sırasıyla; 0.32 mM ve 23.1 U/mg protein, 0.41 mM ve 17.8 U/mg protein olarak belirlemişlerdir. [115]. Arica vd. *Rhus vernicifera* lakkazıyla yaptıkları çalışmalarında serbest ve immobilize enzim için belirledikleri $K_m$ ve $V_{max}$ değerleri sırasıyla; 0.27 mM ve 96.4 U/mg, 0.47 mM ve 77.6 U/mg proteindir [116].

Tekrar kullanılabilirlik çalışmasında 0.25 g immobilize boncuk alınarak aktivite tayini yapıldı. Boncukların ilk 5 döngü içerisinde aktivitelerini % 90'ın üzerinde koruduğu gözlendi. 6. döngüden 10. döngüye kadar bağıl aktivite % 80-70 civarında kalırken, son döngüde (14. döngü) aktivitesi aktiviteleri % 69 olarak tespit edildi (Şekil 4.13). Cristovao vd.'nin immobilize lakkazla yaptıkları tekrar kullanılabilirlik çalışmasında 5. döngüde aktivitesinin yaklaşık % 70'ini, 10. döngüde % 50'sini ve son döngüde (16. döngü) % 30'unu koruduğu gözlenmiştir [117].

Depo kararlığı optimizasyonu Bölüm 3.2.8.7'de belirtildiği gibi yapıldı. Serbest ve immobilize enzimler buzdolabında (4 °C) bekletilerek, 30 gün boyunca 2 gün aralıklarla aktivite tayini yapıldı. İmmobilize enzim aktivitesini 30 gün boyunca korurken, serbest enzimin aktivitesinde 6. günden sonra % 13'lük bir düşüş gözlendi (Şekil 4.14). Kunamneni vd. *Myceliophthora thermophila* lakkazıyla yaptıkları depo kararlılığı çalışmasında, 2 aylık bir süre boyunca immobilize enzim aktivitesinde % 2.5'luk bir düşüş gözlenmiştir. Serbest enzimde ise % 5'lik bir aktivite kaybı tespit edilmiştir [113].

Bu çalışmada *Boletus edulis* mantarından izole edilen lakkazın reaktif tekstil boyaları üzerindeki renk giderimi çalışıldı. Yapılan renk giderme çalışmaları ise Bölüm 3.2.9'da belirtildiği gibi gerçekleştirildi. Mevcut reaktif boyalar önceden belirlenmiş koşullarda hazırlandı. Serbest ve immobilize enzimler boyalarla tek başlarına ve medyatörlerle birlikte çeşitli süreçlerle muamele edildi. Medyatör olarak hidroksibenzotriazol (HBT) ve violurik asit monohidrat (VA) kullanıldı (Şekil 4.15, Şekil 4.16, Şekil 4.17).

Kokol vd. serbest lakkaz enzimiyle yapmış oldukları boya giderme çalışmalarında Reactive yellow 15, Reactive blue 19 ve Reactive black 5 boyalarını kullanmışlardır. Enzimin medyatörsüz tek başına boya giderme çalışmasının yanında HBT ve VA medyatörleri kullanarak da boya giderme denemeleri yapmışlardır. Reactive yellow 15 ile medyatörsüz, HBT'li ve VA'lı 24 saat sonundaki boya giderme değerleri yaklaşık olarak sırasıyla % 7, % 30 ve % 95 olarak belirlenmiştir; Reactive blue 19 için sırasıyla % 17, % 15 ve % 20 olarak belirlenmiştir; Reactive black 5 için sırasıyla % 0, % 95 ve % 45 olarak belirlenmiştir [95]. Cristovao vd. *Aspergillus*'tan elde edilen ticari lakkaz ile Reactive Yellow 15, Reactive Red 239 ve Reactive Black 5

boyalarıyla boya giderme çalışmışlardır. Spektrum çalışması şeklide yapılan çalışmada boyaların değişen konsantrasyonları kullanılmıştır. Kültür ortamlarında immobilize edilmeden yapılan bu boya gidermede sonuçlar sırasıyla; Reactive Yellow 15 % 63, Reactive Black 5 % 86 ve Reactive Red 239 % 41'dir [118]. Kumar vd. üçlü faz ayırma tekniği (TPP) ile ürettikleri lakkaz enzimini bu çalışmaya benzer olarak Reactive Orange ve Reactive Violet ile boya gidermeleri çalışmıştır. Reaksiyon ortamları hazırlandıktan sonra bir süre karanlıkta inkübe edip daha sonra Reactive orange ile yaklaşık % 85, Reactive Violet ile yaklaşık % 62 bir boya gidermesi elde etmişlerdir [97].

Bu tez kapsamında, *Boletus edulis* mantarından ilk kez lakkaz enzimi izole edilerek alginat+karragenan boncuklara immobilize edildi. Serbest ve immobilize *Boletus edulis* mantarı lakkazının bazı biyokimyasal özellikleri belirlendi (Tablo 4.4). Serbest enzimin termal kararlılığının ve kinetik parametrelerin immobilize enzime göre daha yüksek olduğu gözlendi. İmmobilizasyon işleminin enzimde tekrar kullanılabilirliği ve depo kararlılığını arttırdığı tespit edildi. Serbest enzimin çalışma pH'ı 2.0, immobilize enzimin çalışma pH'ı 3.5 olarak belirlendi. Ayrıca serbest enzim ile elde edilen boya giderme değerlerinin immobilize enzimden daha iyi olduğu gözlendi.

# KAYNAKLAR

[1] Telefoncu, A., ***Enzimoloji***, Aydın: Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi, (1997)

[2] Tuncer, M., ***Lakkaz, Kısım 1: Yapısı, Katalitik Özellikleri ve Dağılımları - Lakkaz, Kısım 2: Potansiyel Endüstriyel ve Biyoteknolojik Uygulamaları***, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 22, 19-63, (2010)

[3] Baughman, G.L.; Perenich, T.A., ***Fate of dyes in aquatic systems: I solubility and partitioning of some hydrophobic dyes and related compounds***, Environ. Toxicol. Chem., 7, 183–199, (1988)

[4] Bickerstaff, G.F., ***Immobilization of enzymes and cells***, Methods in enzymology, Humana Press, 1-11, (1997)

[5]Thurston, C. F., ***The structure and function of fungal laccases***, Microbiology, 140, 19-26, (1994)

[6]A. Kunamneni, S. Camarero, C. G. Burgos, F. J. Plou, A. Ballesteros ve M. Alcalde, ***Engineering and Applications of fungal laccases for organic synthesis***, Microbial Cell Factories, 7, 32, (2008)

[7]A. M. Mayer, ***Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places?***, Phytochemistry, 67, 2318-2331, (2006)

[8] N. T. Dittmer, R. J. Suderman, H. Jiang, Y. C. Zhu, M. J. Gorman, K. J. Kramer ve M. R. Kanost, ***Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, Manduca sexta, and the malaria mosquito, Anopheles gambiae***, Insect Biochemistry and Molecular Biology, 34, 29–41, (2004)

[9] K. J. Kramer, M. R. Kanost, T. L. Hopkins, H. Jiang, Y. C. Zhu,R. Xu, J. L. Kerwind ve F. Turecek, ***Oxidative conjugation of catechols with proteins in insect skeletal systems***, Tetrahedron, 57, 385-392, (2001)

[10] N. Durán, M. A. Rosa, A. D'Annibale ve L. Gianfreda, ***Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review***, Enzyme and Microbial Technology, 31, 907–931, (2002)

[11] J. Torres ve M. T. Wilson, ***The reactions of copper proteins with nitric oxide***, Biochimica et Biophysica Acta, 1411, 310-322, (1999)

[12] H. Claus, ***Laccases: Structure, Reactions, Distribution***, Micron, 35, 93–96, (2004)

[13] M.-F. Hullo, I. Moszer, A. Danchin veI. M. Verstraete, ***CotA of Bacillus subtilis Is a Copper-Dependent Laccase***, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 183, 18, 5426–5430, (2001)

[14] H. Claus ve Z. Filip, ***Degradation and transformation of aquatic humic substances by laccase-producing fungi Cladosporium cladosporioides and Polyporus versicolor***, Acta Hydrochim. Hydrobiol., 26, 180–185, (1998)

[15] O. Sánchez, R. Sierra ve C. J. Alméciga-Díaz, ***Delignification Process of Agro-Industrial Wastes an Alternative to Obtain Fermentable Carbohydrates for Producing Fuel, Alternative Fuel,*** Dr. Maximino Manzanera, ISBN: 978-953-307-372-9, (2011)

[16] S. Kawal, T. Umezawa, M. Shimada ve T. Higuchi, ***Aromatic ring cleavage of 4,6-di(tert-butyl) guaiacol, a phenolic lignin model compound, by lactase of Coriolus versicolor***, Kyoto University Research Section of Lignin Chemistry, Wood Research Institute, 236, 2, 309-311, (1988)

[17] E. I. Solomon, U. M. Sundaram ve T. E. Machonkin, ***Multicopper Oxidases and Oxygenases***, Chemical Reviews, 96, 2563-2605, (1996)

[18] S. O. Andersen, ***Insect cuticular sclerotization: A review***, Insect Biochemistry and Molecular Biology, 40, 166-178, (2010)

[19] A. Hüttermann, C. Mai ve A. Kharazipour, ***Modification of lignin for the production of new compounded materials***, Applied Microbiology and Biotechnology,55, 387-394, (2001)

[20] Y. Sato, B. Wuli, R. Sederoff ve R. Whetten, ***Molecular cloning and expression of eight laccase cDNAs in loblolly pine (Pinus taeda)***, Journal Of Plant Research, 114, 1114, 147-155, (2001)

[21] P. Ranochal, G. McDougall, S. Hawkins, R. Sterjiades, G. Borderies, D. Stewart,M. C. Macheteau, A. M. Boudet ve D. Goffner, ***Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases a divergent gene family in poplar***, European Journal of Biochemistry, 259, 485-495, (1999)

[22] J. Rogalski, T. Lundell, A. Leonowicz ve A. Hattaka, ***Production of Laccase, Lignin Peroxidase and Manganese-dependent Peroxidase by Variouse Strains of Trametes versicolor Depending on Culture Conditions***, Acta Microbiologica Polonica, 40, 221-234, (1991)

[23] S. C. Frohnerve K. E. Eriksson, ***Purification and Properties of Neurospora crassa Laccase***, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 120, 1, 458-465, (1974)

[24] D. A. Wood, ***Production, Purification and Properties of ExtracellularLaccase of Agaricus bisporus***, Journal of General Microbiology, 117, 327-338, (1980)

[25] G. Sannia, P. Giardina, M. Luna, M. Rossi ve V. Buonocore, ***Laccase from Pleurotus ostreatus***, Biotechnology Letters, 8; 797-800; (1987)

[26] A. M. Mayer ve R. C. Staples, ***Laccase: New functions for an old enzyme***, Phytochemistry, 60, 551–565, (2002)

[27] E. Dube, F. Shareck, Y. Hurtubise, C. Daneault ve M. Beauregard, ***Homologous cloning, expression, and characterisation of a laccase from Streptomyces coelicolor and enzymatic decolourisation of an indigo dye***, Applied Microbiology and Biotechnology, 79, 597‑603, (2008)

[28] U. N. Dwivedi, P. Singh, V. P. Pandey ve A. Kumar, ***Structure, function relationship among bacterial, fungal and plant laccases***, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 68, 117–128, (2011)

[29] S.R. Couto ve J.L.T. Herrera, ***Industrial and biotechnological applications of laccases: A review***, Biotechnology Advances, 24, 500–513, (2006)

[30] R. Bourbonnais ve M. G. Paice, ***Oxidation of non-phenolic substrates An expanded role for lactase in lignin biodegradation***, Febs Letters, 267,1, 99-102, (1990)

[31] H. Palonen ve L. Viikari, ***Role of Oxidative Enzymatic Treatments on Enzymatic Hydrolysis of Softwood***, Wiley InterScience, (2004)

[32] D. E. Dodor, H.-M. Hwang ve S. I.N. Ekunwe, ***Oxidation of anthracene and benzo[α]pyrene by immobilized laccase from Trametes versicolor***, Enzyme and Microbial Technology, 35, 210–217, (2004)

[33] A.L. Ghindilis,V.P Gavrilova ve A.I. Yaropolov, ***Laccasebased biosensor for determination of polyphenols: determination of catechols in tea***, Biosensors & Bioelectronics, 7, 127–131, (1992)

[34] B.A. Kuznetsov, G.P. Shumakovich, O.V. Koroleva ve A.I. Yaropolov, ***On applicability of laccase as label in the mediated and mediatorless electroimmunoassay: effect of distance on the direct electron transfer between laccase and electrode***, Biosensors & Bioelectronics, 16, 73–84, (2001)

[35] H. Claus, G. Faber ve H. König, ***Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases***, Applied Microbiology and Biotechnology, 59, 672–678, (2002)

[36] D. Wesenberg, I. Kyriakides ve S. N. Agathos, ***White-rot fungi and their enzymes for the treatmentof industrial dye effluents***, Biotechnology Advances, 22, 161–187, (2003)

[37] R. C. Minussi, G. M. Pastore ve N. Duran, ***Potential applications of laccase in the food industry***, Trends in Food Science & Technology, 13, 205–216, (2002)

[38] D.N. Carter, D.G. McKenzie, A.P. Johnson ve K. Idner, ***Performance parameters of oxygen delignification***, Tappi Journal, 80, 111–117, (1997)

[39] R.C. Kuhad, A. Singh ve K.E.L. Eriksson, ***Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell wall***, Advancesin Biochemical Engineering/Biotechnology, 57, 47–125, (1997)

[40] K.K.Y. Wong, K. B. Anderson ve R. P. Kibblewhite, ***Effects of the laccase mediator system on the handsheet properties oftwo high kappa kraft pulps***, Enzyme and Microbial Technology, 25, 125–131, (1999)

[41] C. Crestini ve D. S. Argyropoulos, ***The Early Oxidative Biodegradation Steps of Residual Kraft Lignin Models with Laccase***, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 6, 2161-2169, (1998)

[42] C. Felby, L.S. Pedersen ve B.R. Nielsen, ***Enhanced auto adhesion of wood fibers using phenol oxidases***, Holzforschung, 51, 281–286, (1997)

[43] I. M. Banat, P. Nigam, D. Singh ve R. Marchant, ***Microbial Decolorizaion Of Textile-Dye Containing Effluents: A Review***, Bioresource Technology, 58, 217-227, (1996)

[44] V.J.P. Poots ve J.J. McKay, ***The removal of acid dye from effluent using natural adsorbents-I Peat***, Water Research, 10, 1061–1066, (1976)

[45] G. McKay, ***Waste colour removal from textile effluents***, American Dyestuff Reporter, 68, 29–36, (1979)

[46] J.T. Spadaro, I Lorne, V Renganathan, ***Hydroxyl radical mediated degradation of azo dyes: evidence for benzene generation***, Environmental Science & Technology, 28, 1389–1393, (1994)

[47] S. Rodrıguez Couto, M. Sanroma ve G.M. Gübitz, ***Influence of redox mediators and metal ions on synthetic acid dye decolourization by crude laccase from Trametes hirsuta***, Chemosphere, 58, 417‑422, (2005)

[48] K.N. Niladevi ve P. Prema, ***Effect of inducers and process parameters on laccase production by Streptomyces psammoticus and its application in dye decolourization***, Bioresource Technology, 99, 4583–4589, (2008)

[49] B. Haghighi, L. Gorton, T. Ruzgas ve L.J. Jönsson, ***Characterization of graphite electrodes modified with laccase from Trametes versicolor and their use for bioelectrochemicalmonitoring of phenolic compounds in flow injection analysis***, Analytica Chimica Acta, 487, 3–14, (2003)

[50] J. Kulys ve R. Vidziunaite, ***Amperometric biosensors based on recombinant laccases for phenols determination***, Biosensors and Bioelectronics, 18, 319-325, (2003)

[51] A. E. Gardiol, R. J. Hernandez, B. Reinhammart ve B. R. Harte, ***Development of a gas-phase oxygen biosensor using a blue copper-containing oxidase***, Enzyme and Microbial Technology, 18, 347-352, (1996)

[52] D. Leech ve F. Daigle, ***Optimisation of a reagentless laccase electrode for the detection of the inhibitor azide***, Analyst, 123 (1998) 1971–1974

[53] S. C. Barton, M. Pickard, R. Vazquez-Duhalt ve A. Heller, ***Electroreduction of O2 to water at 0.6 V (SHE) at pH 7 on the 'wired' Pleurotus ostreatus laccase cathode***, Biosensors and Bioelectronics, 17, 1071-1074, (2002)

[54] B. Krajewska,***Application of Chitin -and Chitosan- Based Materials for Enzyme Immobilizations: A Review***, Enzyme and Microbial Technology, 35, 126-139, (2003)

[55] H. Uhlig,***Industrial Enzymes and Their Applications***, John Wiley & Sons, USA, (1998)

[56] A. Telefoncu, ***Temel ve Uygulamalı Enzimoloji***, Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu Kitabı, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, (1986)

[57] A. Wiseman, ***Handbook of Enzyme Biotechnology***, Halsted Press, New York, (1975)

[58] L. Goldstein, ***Methods in Enzymology***, Academic Press, New York, 19, 935, (1970)

[59] L. Goldstein ve G. Manecke, ***Applied Biochemistry and Bioengineering***, Academic Press, New York, 1, 23-125, (1976)

[60] K. Mosback ***Immobilized Enzymes, Methods in Enzymology***, Academic Press, New York, 44, (1976)

[61]B. M. Brena ve F. Batista-Viera, ***Immobilization of Enzymes***, Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells, Second Edition, (2006)

[62] D.T. Wadiack ve R.G. Carbonell, ***Kinetic behavior of macroencapsulated β-galactosidase, biotechnology bioengineering***, Biotechnology and Bioengineering17, 1157-1181, (1975)

[63] P.D. Dessai, A. Dave ve S. Dev, ***Entrapment of lipase into κ-carrageenan beads and its use in hydrolysis of olive oil in biphasic system***, Journal of MolecularCatalysis B: Enzymatic, 31, 143-150, (2004)

[64] P. D. Desai, A. M. Dave ve S. Devi, ***Entrapment of lipase into K-carrageenan beads and its use in hydrolysis of olive oil in biphasic system***, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 31, 143–150, (2004)

[65] J.L. Iborra, A. Manjon ve M. Canovas, ***Immobilization in Carrageenans***, Methods in enzymology, Humana Press, New Jersey, 53-60, (1997)

[66] S.C. Froehner ve K. Eriksson, ***Properties Of The Glycoprotein Laccase Immobilized By Two Methods***, Acta Chemica Scandinavica. Series B: Organic Chemistry And Biochemistry, 29, (1975)

[67] K.L. Shuttleworth ve J.M. Bollag,***Soluble and immobilized laccase as catalysts for the transformation of substituted phenols***, Enzyme And Microbial Technology, 8, 3, 171-177, (1986)

[68] P. Piacquadio, G. DeStefano, M. Sammartino ve V. Sciancalepore, ***Phenol removal from apple juice by laccase immobilized on $Cu^{+2}$-chelate regenerable carrier***, Biotechnology Techniques, 11, 515–7, (1997)

[69] V.A. Bogdanovskaya, M.R. Tarasevich, F. Scheller, D. Pfeifer ve U. Wollenberg, ***Influence of the immobilization technique on the activity of laccase.*** Elektrokhimiya, 23, 666–8, (1987)

[70] DeStefano G, Piacquadio P, Sciancalepore V.,***Metal-chelate regenerable carries in food processing***. Biotechnology Technique, 10, 857–60, (1996)

[71] A.V. Vakurov, A.K. Gladilin, A.V. Levashov ve Y.L. Khmelnitsky,***Dye enzyme–polymer complexes: stable organosoluble biocatalysts for non-aqueous enzymology***, Biotechnology Letters, 16, 175–8, (1994)

[72] J. Rogalski, M. Wojtas-Wasilewska, R. Apalovic ve A. Leonowicz, ***Affinity chromatography as a rapid and convenient method for purification of fungal laccases***,Biotechnology and Bioengineering, 37, 770–7, (1991)

[73] Leonowicz A, Sarkar JM, Bollag JM. ***Improvement in stability of an immobilized fungal laccase***, Applied Microbiology and Biotechnology, 29, 129–35, (1988)

[74] Cliffe S, Filippini C, Schneider M, Fawer M. ***Membrane-type immobilized enzyme reactors for use in flow-injection analysis***. Analytice Chimica Acta, 256, 53-57, (1992)

[75] L. Gianfreda ve J.M. Bollag, ***Effect of soils on the behavior of immobilized enzymes***, Soil Science Society Americe Journey, 58, (1994)

[76] S.H. Day ve R.L. Legge, ***Immobilization of tyrosinase for use in non-aqueous media: enzyme deactivation phenomena***, Biotechnology Technique, 9, (1995)

[77] P. Ruggiero, J.M. Sarkar ve J.M. Bollag, ***Detoxification of 2,4-dichlorophenol by a laccase immobilized on soil or clay***, Soil Science, 147, (1989)

[78] D. Leech ve F. Daigle, ***Optimization of a reagentless laccase electrode for the detection of inhibitor azide***, Analyst, 123, (1998)

[79] F. Daigle, F. Trudeau, G. Robinson, M.R. Smyth ve D. Leech, ***Mediated reagentless enzyme inhibition electrodes***, Biosensensors & Bioelectronics, 13, 417, (1998)

[80] R.S. Freire, N. Duran ve L.T. Kubota, ***Effects of fungal laccase immobilization procedures for the development of a biosensor for phenol compounds***, Talanta, 6, 543-681, (2001)

[81] R. Z. Kazandjian ve A. M. Klibanov, ***Regioselective oxidation of catalyzed by polyphenoloxidase in chloroform***. Journal of the Chemical Society, 107, (1985)

[82] P. Estrada, R. Sanchez-Muniz, C. Acebal, R. Arche ve M.P. Castillon, ***Characterization and optimization of immobilized polyphenoloxidase in low-water organic solvents***. Biotechnology and Applied Biochemistry, 14, 12–20, (1991)

[83] P. Estrada, R. Sanchez-Muniz, C. Acebal, R. Arche, M.P. Castillon ve W. Baroto, ***Thermoinactivation of polyphenoloxidase in organic solvents with low water content***. Progress in Biotechnology, 8, (1992)

[84] M.Y. Arica, ***Immobilization of polyphenoloxidase on carboxymethylcellulose hydrogel beads: preparation and characterization***, Polymer International, 49, (2000)

[85] http://en.wikipedia.org/wiki/Boletus_edulis

[86] İ. Başer ve Y. İnanıcı, ***Boyar madde Kimyası***, Marmara Universitesi Yayınları 7, 10, (1990)

[87] H. Temocin, ***Tekstil Atık Sularının Renginin Giderilmesi***, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, (2006)

[88] G.-Q. Zhang, Y.-F. Wang, X.-Q. Zhang, T. B. Ng ve H.-X. Wang, ***Purification and characterization of a novel laccase from the ediblemushroom Clitocybe maxima***, Process Biochemistry, 45, 627‑633, (2010)

[89] F. Sahin, G. Demirel ve H. Tumturk, ***A novel matrix for the immobilization of acetylcholinesterase***, International Journal of Biological Macromolecules, 37, 148–153, (2005)

[90]E. Dinçkaya, Genel Metotlar, ***Protein Saflaştırması ve Karakterizasyonu***, Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu, Çeşme-İzmir, (1996)

[91] M. M. Bradford, ***A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation ofMicrogram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding***, ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, 72, 248-254, (1976)

[92] K.-S. Shin ve Y.-J. Lee, ***Purification and Characterization of a New Memberof the Laccase Family from the White-Rot Basidiomycete Coriolus hirsutus***, Archives of Biochemistry and Biophysics, 384, 1, 109–115, (2000)

[93] J.A. Ramsay, W.H.W. Mok, Y.-S. Luu ve M. Savage, ***Decoloration of textile dyes by alginate-immobilized Trametes versicolor***, Chemosphere, 61, 956‑964, (2005)

[94]V. V. Kumar, M.P. Kumar, K.V. Thiruvenkadaravi, P. Baskaralingam, P. S. Kumar ve S. Sivanesan, ***Preparation and characterization of porous cross linked laccase aggregates for the decolorization of triphenyl methane and reactive dyes***, Bioresource Technology, 119, 28–34, (2012)

[95] V. Kokol, A. Doliska, I. Eichlerova, P. Baldrian ve F. Nerud, ***Decolorization of textile dyes by whole cultures of Ischnoderma resinosumand by purified laccase and Mn-peroxidase***, Enzyme and Microbial Technology, 40, 1673–1677, (2007)

[96]R. O. Cristóvao, A. P.M. Tavares, L. A. Ferreira, J. M. Loureiro,R. A.R. Boaventura ve E. A. Macedo, ***Modeling the discoloration of a mixture of reactive textiledyes by commercial laccase***, Bioresource Technology, 100, 1094–1099, (2009)

[97] V. V. Kumar, V. Sathyaselvabala, M.P. Premkumar, T. Vidyadevi ve S. Sivanesan, ***Biochemical characterization of three phase partitioned laccase and itsapplication in decolorization and degradation of synthetic dyes***, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 74, 63– 72, (2012)

[98] N. Sheth ve S. Dave, ***Enhanced biodegradation of Reactive Violet 5R manufacturing wastewaterusing down flow fixed film bioreactor***, Bioresource Technology, 101, 8627–8631, (2010)

[99] D. Leventer, ***Enginardan polifenoloksidaz enziminin izolasyonu, salaştırılması ve bazı özelliklerinin incelenmesi***, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, (2005)

[100] F. Patrick, G. Mtui, A. M. Mshandete, G. Johansson ve A. Kivaisi, ***Purification and characterization of a laccase from thebasidiomycete Funalia trogii (Berk.) isolated in Tanzania***, African Journal of Biochemistry Research, 3, 5, 250-258, (2009)

[101] G.-Q. Zhang, Y.-F. Wanga, X.-Q. Zhang, T. B. Ng ve H.-X. Wang, ***Purification and characterization of a novel laccase from the edible mushroom Clitocybe maxima***, Process Biochemistry, 45, 627‑633, (2010)

[102] T.B. Ngave H.X. Wang, ***A homodimeric laccase with unique characteristicsfrom the yellow mushroom Cantharellus cibarius***, Biochemical and Biophysical Research Communications, 313, 37‑41, (2004)

[103] G. T. Tian, G. Q. Zhang, H. X. Wang ve T. B. Ng, ***Purification and characterization of a novel laccase from themushroom Pleurotus nebrodensis***, Biochimica Polonica Acta, 59, 3, 407-412, (2012)

[104] J. Sun, Q. J. Chen, Q. Q. Cao, Y. Y. Wu, L. J. Xu,M. J. Zhu,T. B. Ng, H. X. Wangve G. Q. Zhang, ***A Laccase with Antiproliferative and HIV-I Reverse Transcriptase Inhibitory Activities from the Mycorrhizal Fungus Agaricus placomyces***, Hindawi Publishing CorporationJournal of Biomedicine and Biotechnology Volume,(2012)

[105] D.D. Hua, R.Y. Zhangb, G.Q. Zhanga, H.X. Wanga ve T.B. Ng, ***A laccase with antiproliferative activity against tumor cells from an edible mushroom, white common Agrocybe cylindracea***, Phytomedicine, 18, 374–379, (2011)

[106] O. Yamak, N. A. Kalkan, S. Aksoy, H. Altinok ve N. Hasirci, ***Semi interpenetrating polymer networks (semi-IPNs) for entrapmentof laccase and their use in Acid Orange 52 decolorization***, Process Biochemistry, 44, 440‑445, (2009)

[107] C. Tortolini, S. Rea, E. Carota, S. Cannistraro ve F. Mazzei, ***Influence of the immobilization procedures on the electroanalytical performances ofTrametes versicolor laccase based bioelectrode***, Microchemical Journal, 100, 8–13, (2012)

[108] Y. G. Makas, N. A. Kalkan, S. Aksoy, H. Altinok ve N. Hasirci, ***Immobilization of laccase in κ-carrageenan based semi-interpenetrating polymernetworks***, Journal of Biotechnology, 148, 216–220, (2010)

[109] N.I. Korolev, ***Interaction of $Cu^{+2}$ and $Ca^{+2}$ ions with DNA immobilized in polyacrylamide gel***, Molekulyarnaya Biologiya, 18, 2, 457-465, (1984)

[110] S. Ates, E. Cortenlioglu, E. Bayraktar ve U. Mehmetoglu, ***Production of l-DOPA using Cu-alginate gel immobilizedtyrosinase in a batch and packed bed reactor***, Enzyme and Microbial Technology, 40, 683–687, (2007)

[111] J. Bryjak, P. Kruczkiewicz, A. Rekuc ve W. Peczynska-Czoch, ***Laccase immobilization on copolymer of butylacrylate and ethylene glycol dimethacrylate***, Biochemical Engineering Journal, 35, 325–332, (2007)

[112] Y. Deniz Unal ve N. Kasikara Pazarlioglu, ***Production and Gelatin Entrapment of Laccase from Trametes versicolor and its Application to Quantitative Determination of Phenolic Contents of Commercial Fruit Juices***, Food Biotechnology, 25, 351‑368, (2011)

[113] A. Kunamneni, I. Ghazi, S. Camarero,A. Ballesteros, F. J. Plou ve M. Alcalde, ***Decolorization of synthetic dyes by laccase immobilizedon epoxy-activated carriers***, Process Biochemistry, 43, 169–178, (2008)

[114] Jiang D, Long S, Huang J, Xiao H, Zhou J.,***Immobilization of Pycnoporus sanguineus laccase on magnetic chitosan microspheres***, Biochemical Engineering Journal, 25, 15–23, (2005)

[115] G. Bayramoglu, M. Yilmaz ve M. Y. Arica, ***Reversible immobilization of laccase to poly(4-vinylpyridine) grafted and Cu(II)chelated magnetic beads: Biodegradation of reactive dyes***, Bioresource Technology, 101, 6615–6621, (2010)

[116] M. Y. Arıca, B. Altıntas ve G. Bayramoglu, ***Immobilization of laccase onto spacer-arm attached non-porouspoly(GMA/EGDMA) beads: Application for textile dye degradation***, Bioresource Technology, 100, 665–669, (2009)

[117] R. O. Cristovaoa, A. P.M. Tavaresa, A. I. Brigidab, J. M. Loureiroa, R. A.R. Boaventuraa, E. A. Macedoa ve M. A. Z. Coelho, ***Immobilization of commercial laccase onto green coconut fiber by adsorptionand its application for reactive textile dyes degradation***, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 72, 6– 12, (2011)

[118] R. O. Cristovaoa, A. P.M. Tavares, J. M. Loureiro, R. A.R. Boaventura ve E. A. Macedo, ***Treatment and kinetic modelling of a simulated dye house effluentby enzymatic catalysis***, Bioresource Technology, 100, 6236–6242, (2009)

# ÖZGEÇMİŞ

09.03.1988 tarihinde İstanbul' da doğdum. İlk öğrenimimi Özel Yankı İlköğretim Okulunda, orta öğrenimimi Ataköy Cumhuriyet Lisesinde tamamladım. 2007 yılında Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde lisans eğitimime başlayıp, 2011 yılında tamamladım. 2011 yılında başladığım Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimimi sürdürmekteyim. 2012-2013 öğretim yılında, Eğitim Fakültesi Fen Bilgisi Öğretmenliği bölümünde kısmi zamanlı öğrenci statüsünde laboratuvar görevlisi olarak çalıştım.