

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TRAKYA BÖLGESİ'NDE YETİŞEN *BOLETUS EDULIS* MANTARINDAN
İZOLE EDİLEN LAKKAZ ENZİMİNİN ÇEŞİTLİ DESTEKLERE
İMMOBİLİZASYONU VE TEKSTİL ATIK SULARINDAKİ
BOYARMADDELERİN RENKSİZLEŞTİRİLMESİNDE KULLANILMASI**

DİDEM TUNCAY

DOKTORA TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: PROF. DR. HÜLYA YAĞAR

EDİRNE 2014

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü onayı



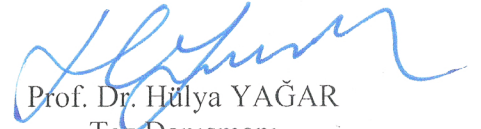
Prof. Dr. Mustafa ÖZCAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tezin Doktora tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.



Prof. Dr. Ayten SAĞIROĞLU
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Hülya YAĞAR
Tez Danışmanı

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

Jüri Üyeleri

İmza

Prof. Dr. Ayten SAĞIROĞLU



Prof. Dr. Hülya YAĞAR



Prof. Dr. Ayşegül PEKSEL



Prof. Dr. Figen ERTAN



Doç. Dr. Şebnem Selen İŞBİLİR



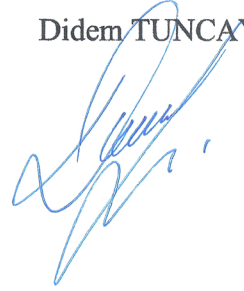
Tarih: 10/06/2014

T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA DOKTORA 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.

10/06/2014

Didem TUNCAY



Doktora Tezi

Trakya Bölgesi’nde Yetişen *Boletus edulis* Mantarından İzole Edilen Lakkaz Enziminin
Çeşitli Desteklere İmmobilizasyonu ve Tekstil Atık Sularındaki Boyarmaddelerin
Renksizleştirilmesinde Kullanılması

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmada, lakkaz enzimi yenilebilir *Boletus edulis* mantarından izole edilerek üçlü faz ayırma tekniği (TPP) ile kısmi olarak saflaştırıldı ve modifiye edilen ayçiçek sapı ve pirinç kabuğuna adsorbsiyon yöntemi ile immobilize edildi. Bu immobilize lakkaz sistemleri ile tekstil boyarmaddelerinden Reaktif Mavi-19 (RB-19), Reaktif Sarı-15 (RY-15), Reaktif Kırmızı-239 (RR-239)’un belirlenen optimum koşullarda renk giderimleri gerçekleştirildi.

Kırklareli-Demirköy’den toplanan *Boletus edulis* mantarları Triton X-100 ve polivinilpirolidon içeren 0.15 M NaCl çözeltisi ile Waring blender kullanılarak oda sıcaklığında homojenize edildi. Elde edilen ham ekstrakt TPP yöntemi ile deriştirildi ve kısmi olarak saflaştırıldı. Bu amaçla; % 40-60 doygunlukta amonyum sülfat eklenen ham ekstrakta 1.0:1.0 (v/v) oranında *t*-bütanol eklendi. Santrifüj sonrasında, proteince zengin orta faz ayrılarak dializlendi. Uygulanan protein ve enzim aktivitesi sonuçlarına göre *Boletus edulis* lakkazının 11.7 kat oranında saflaştırıldığı belirlendi. Bu enzim çözeltisi modifiye edilen ayçiçek sapı ve pirinç kabuğuna adsorbsiyon metodu ile immobilize edildi, immobilize enzim preparatları DASE ve DPKE olarak tanımlandı. DASE ve DPKE’nin 2,2’-azinobis[3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit]diamonyum tuzu (ABTS) substratı için bazı özellikleri belirlendi. DASE ve DPKE için optimum pH 3.5 ve optimum sıcaklık değeri 45 °C olarak belirlendi. Lineweaver-Burk grafiğinden yararlanılarak K_m ve V_{max} değerleri DASE için 0.789 mM ve 175.44 U/mg protein; DPKE için 1.616 mM and 153.85 U/mg protein olarak hesaplandı. Termal kararlılık çalışmasında, 60 °C’de 30 dakika bekletilen DASE ve DPKE’nin başlangıç

aktivitelerinin sırasıyla % 72.54 ve % 37.2'sini koruduğu belirlendi. Tekrar kullanılabilirlik çalışması ile DASE ve DPKE'nin 7. döngü sonunda ABTS için başlangıç aktivitelerinin sırasıyla % 71 ve % 65.4'ünü koruduğu gözlemlendi.

DASE ve DPKE'nin renk giderme aktivitelerini belirlemek üzere; RB-19, RY-15 ve RR-239 boyarmaddeleri için 50-250 mg/mL konsantrasyon aralığında çalışıldı. HBT ve VA medyatörlerine gerek duymaksızın DASE ve DPKE sistemleri, belirlenen optimum koşullarda RB-19, RY-15 ve RR-239 için 1 saatin sonunda % 85'in üzerinde renk giderme aktivitesi gösterdi. DASE ve DPKE'nin renk giderme aktivitelerinin asidik koşullarda daha yüksek olduğu belirlendi. Tekrar kullanılabilirlik çalışmasında, DASE ve DPKE'nin boya giderme aktivitelerinin 10. döngü sonunda % 50'sini koruduğu görüldü. İmmobilize sistemler ile işlem gören RB-19, RY-15 ve RR-239 boyarmaddelerinin biyodönüşümleri UV-VIS spektrofotometre ile görüntülendi. DASE ve DPKE'nin renk giderme aktivitelerinin 10 mM Mn^{+2} ve Cu^{+2} ile artarken, 10 mM Fe^{+2} iyonu, 10 mM Tween 80 ve 1000 mg/L PVA ile azaldığı belirlendi.

Yıl : 2014

Sayfa Sayısı : 142

Anahtar Kelimeler : Lakkaz, *Boletus edulis*, TPP, immobilizasyon, ayçiçek sapı, pirinç kabuğu, renk giderme

Doctorate Thesis

Immobilization on the Various Supports of Laccase Enzyme Isolated from *Boletus edulis* Mushroom Growing in Trakya Region and Decolorization of the Dyestuffs in the Textile Waste Waters

Trakya University Institute of Natural Sciences

Chemistry

ABSTRACT

In this study, laccase which isolated from the edible mushroom *Boletus edulis* was partially purified with Three-phase partitioning (TPP) method. *Boletus edulis* laccase was immobilized onto modified sunflower stalks or modified rice husks with adsorption method. Also, these immobilized laccase systems were used for the decolorization assays of textile dyes including Reactive Blue-19 (RB-19), Reactive Yellow-15 (RY-15) and Reactive Red-239 (RR-239) in the determined optimum conditions.

Boletus edulis mushrooms obtained from Kırklareli-Demirköy were homogenized with 0.15 M NaCl solution containing Triton X-100 and polyvinylpyrrolidone by using Waring blender at room temperature. Laccase was concentrated and partially purified from this crude extract by using TPP method. For this purpose, ammonium sulphate at 40-60 % saturation was added to crude extract, and then *t*-butanol was added to salty solution at the rate of 1:1 (v/v). This mixture was centrifuged, and the middle phase which is rich with protein was separated, and then dialyzed. The results of protein and enzyme activity assays showed that laccase was purified 11.7-fold compared to crude extract. *Boletus edulis* laccase were immobilized onto modified sunflower stalks and rice husks by using adsorption method. Immobilized enzymes were defined as DASE and DPKE, respectively. Some properties of DASE and DPKE were determined for 2,2'-azinobis[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]diammonium salt (ABTS) used as substrate. Optimum pH and temperature were

3.5 and 45 °C for both DASE and DPKE, respectively. The K_m and V_{max} values were calculated from Lineweaver-Burk plot as 0.789 mM and 175.44 U/mg protein for DASE, respectively. For DPKE, these parameters were 1.616 mM and 153.85 U/mg protein. In thermal stability assay at 60 °C, DASE and DPKE saved 72.54 % and 37.2 % of their initial activities for 30 minutes, respectively. In reusability assays, DASE and DPKE saved about 71 % and 65.4 % of their initial activities at the end of 7 cycles for ABTS.

The immobilized laccases efficiently decolorized the dye solutions including RB-19, RY-15 and RR-239 prepared in the concentration range of 50-250 mg/mL without addition of HBT and VA as redox mediator. DASE and DPKE showed the decolorization activity about 85 % at the end of 1 h for RB-19, RY-15 and RR-239 in the determined optimum conditions. The decolorization activities of DASE and DPKE were observed to be higher in the acidic conditions. In reusability assays, DASE and DPKE saved about 50 % of their initial activities at the end of 10 cycles for all dyes. The biodegradation of RB-19, RY-15 and RR-239 were monitored with UV-VIS spectrophotometer. The decolorization activities of DASE and DPKE increased with 10 mM Mn^{+2} and Cu^{+2} , but they decreased with 10 mM Tween 80 and 1000 mg/L PVA.

Year : 2014

Number of Pages : 142

Keywords : Laccase, *Boletus edulis*, TPP, immobilization, sunflower stalks, rice husk, decolorization

TEŞEKKÜRLER

Doktora eğitimim de dâhil olmak üzere akademik yaşamımda bilgisi ve tecrübesi ile bana daima destek olan tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Hülya YAĞAR'a,

Çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen bölüm hocalarıma ve arkadaşlarıma,

Tezde kullanılan mantarları temin eden Akya Mantar'a,

Tezde kullanılan boyarmaddeleri temin eden Atilla ŞABUDAK'a ve Resaş Kimya Tekstil Sanayi ve Tic. Ltd. Şirketi'ne,

Tezde kullanılan pirinç kabuklarını temin eden Başsel Tic. Ltd. Şirketi'ne,

Bugünlere gelmemi sağlayan ve hep yanımda olan aileme,

Yol arkadaşım Maraton'a...

Sonsuz teşekkürler...

Bu çalışma, TÜBAP 2012/143 no'lu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜRLER	v
İÇİNDEKİLER	vi
SEMBOLLER ve KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
TABLolar DİZİNİ	xv
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2	4
KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
2.1. Lakkazlara Genel Bakış.....	4
2.2. Lakkazların Yapısı	9
2.3. Lakkazların Etki Mekanizması.....	10
2.4. Lakkazın Substrat Spesifitesine Göre Sınıflandırılması.....	14
2.5. Lakkazın Kaynakları	15
2.5.1. Bitkisel Lakkazlar	15
2.5.2. Fungal Lakkazlar	16
2.5.3. Bakteriyel Lakkazlar.....	18
2.5.4. Böceklerden Üretilen Lakkazlar	18
2.6. Lakkaz-Medyatör Sistemleri (LMSs).....	19
2.7. Lakkazın Endüstriyel ve Biyoteknolojik Uygulamaları	22
2.8. Lakkazın İzolasyonu ve Saflaştırılması.....	29
2.8.1. Kaynak Seçimi.....	30
2.8.1.1. <i>Boletus edulis</i>	31
2.8.2. Lakkaz İzolasyonu	32

2.8.3. Lakkazın Üçlü Faz Ayırma Tekniği ile Deriştirilmesi ve Kısmi Saflaştırılması	33
2.9. Lakkazın İmmobilizasyonu	36
2.9.1. İmmobilizasyon Yöntemleri	38
2.10. Sentetik Boyarmaddeler	42
BÖLÜM 3	45
MATERYAL VE METODLAR.....	45
3.1. Materyaller	45
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	45
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	45
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler	46
3.2. Metotlar	47
3.2.1. <i>Boletus edulis</i> Mantar Lakkazının İzolasyonu.....	47
3.2.2. Üçlü Faz Ayırma Tekniği (TPP) ile Lakkazın Deriştirilmesi ve Kısmi Saflaştırılması	47
3.2.4. İmmobilizasyon Desteklerinin Hazırlanması.....	48
3.2.5. <i>Boletus edulis</i> Mantar Lakkazının Ayçiçeği Sapı ve Pirinç Kabuğu Üzerine İmmobilizasyonu	49
3.2.6. Protein Tayini	50
3.2.7. Enzimatik Aktivite Tayini	51
3.2.8. DAS ve DPK Üzerine Yüklenecek Protein Miktarı Optimizasyonu.....	52
3.2.9. İmmobilize Enzimler DASE ve DPKE'nin Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi	52
3.2.9.1. Lakkaz Aktivite Tayininde Kullanılacak DASE ve DPKE Miktarı Optimizasyonu	53
3.2.9.2. DASE ve DPKE için Lakkaz Aktivitesi Ölçümünde Kullanılacak Sürenin Belirlenmesi.....	53
3.2.9.3. pH Optimizasyonu	53

3.2.9.4. Sıcaklık Optimizasyonu	54
3.2.9.5. DASE ve DPKE'nin K_m ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi	54
3.2.9.6. Termal Kararlılık.....	54
3.2.9.7. DASE ve DPKE Sistemlerinin Tekrar Kullanılabilirliği	55
3.2.10. İmmobilize Lakkaz Sistemlerinin (DASE ve DPKE) Bazı Tekstil Boyarmaddelerinin Renklerini Giderme Etkilerinin Belirlenmesi	55
3.2.10.1. pH Optimizasyonu	56
3.2.10.2. Sıcaklık Optimizasyonu	57
3.2.10.3. Enzim Miktarı Optimizasyonu	57
3.2.10.4. Boya Konsantrasyonu Optimizasyonu	58
3.2.10.5. Tekrar Kullanılabilirlik	58
3.2.10.6. İmmobilize <i>Boletus edulis</i> Mantar Lakkazının RB-19, RY-15 ve RR-239 Boyarmaddelerinin Biyodönüşümüne Etkisinin İncelenmesi	59
3.2.11. İmmobilize Lakkaz Sistemleri (DASE ve DPKE) ile Tekstil Boyarmaddelerinin Renk Giderimine Medyator Etkisinin İncelenmesi.....	62
3.2.12. İmmobilize Lakkaz Sistemleri (DASE ve DPKE) Tekstil Boyarmaddelerinin Renk Giderimine Bazı Kimyasallar ve Metal İyonlarının Etkisinin İncelenmesi.....	62
3.2.12.1. Kimyasalların Etkisi.....	63
3.2.12.2. Bazı Metal İyonlarının Etkisi	63
BÖLÜM 4	64
SONUÇLAR	64
4.1. <i>Boletus edulis</i> Mantar Lakkazının İzolasyonu ve Üçlü Faz Ayırma Tekniği (TPP) ile Deriştirilmesi ve Kısmi Olarak Saflaştırılması.....	64
4.2. <i>Boletus edulis</i> Mantar Lakkazının Ayçiçek Sapı ve Pirinç Kabuğu Üzerine İmmobilizasyonu	66
4.3. Protein Tayini için Standart Grafiğin Hazırlanması.....	67
4.4. İmmobilize Lakkazların (DASE ve DPKE) Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi	68

4.4.1. Lakkaz Aktivite Tayininde Kullanılacak DASE ve DPKE Miktarı Optimizasyonu	68
4.4.2. DASE ve DPKE'nin Lakkaz Aktivitesi Ölçümünde Kullanılacak Sürenin Belirlenmesi	69
4.4.3. pH Optimizasyonu	70
4.4.4. Sıcaklık Optimizasyonu	71
4.4.5. DASE ve DPKE'nin K_m ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi.....	72
4.4.6. Termal Kararlılık	73
4.4.7. DASE ve DPKE Sistemlerinin Tekrar Kullanılabilirliği	75
4.5. İmmobilize Lakkaz Sistemlerinin (DASE ve DPKE) Bazı Tekstil Boyarmaddelerinin Renklerini Giderme Etkilerinin Belirlenmesi.....	76
4.5.1. pH Optimizasyonu	76
4.5.2. Sıcaklık Optimizasyonu	80
4.5.3. Enzim Miktarı Optimizasyonu.....	83
4.5.4. Boya Konsantrasyonu Optimizasyonu.....	86
4.5.5. Tekrar Kullanılabilirlik	89
4.5.6. İmmobilize <i>Boletus edulis</i> Mantar Lakkazının RB-19, RY-15 ve RR-239 Boyarmaddelerinin Biyodönüşümüne Etkisinin İncelenmesi	93
4.6. İmmobilize Lakkaz Sistemlerinin (DASE ve DPKE) Tekstil Boyarmaddelerinin Renk Giderimine Medyator Etkisinin İncelenmesi	97
4.7. İmmobilize Lakkaz Sistemleri (DASE ve DPKE) Tekstil Boyarmaddelerinin Renk Giderimine Bazı Kimyasalların Etkisinin İncelenmesi.....	104
4.8. İmmobilize Lakkaz Sistemleri (DASE ve DPKE) Tekstil BoyarmaddelerininRenk Giderimine Bazı Metal İyonlarının Etkisi.....	108
BÖLÜM 5	112
TARTIŞMA	112
KAYNAKLAR	127
ÖZGEÇMİŞ	142

SEMBOLLER ve KISALTMALAR

BSA	: Sığır Serum Albümini
PVP	: Polivinilpirolidon
ABTS	: 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
TPP	: Üçlü Faz Ayırma Tekniği
U	: Ünite
RB-19	: Reaktif Mavi-19
RY-15	: Reaktif Sarı-15
RR-239	: Reaktif Kırmızı-239
HBT	: 1-Hidroksibenzotriazol
VA	: Violurik asit
PPO	: Polifenol Oksidaz
LMSs	: Lakkaz medyatör sistemleri
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
PVA	: Polivinil Alkol
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi
E°	: Redoks potansiyeli
DEAE	: Dietilaminoetil
CM	: Karboksimetil
DAS	: Delignifiye ayçiçek sapı
DPK	: Delignifiye pirinç kabuğu
DASE	: Delignifiye ayçiçek sapına immobilize lakkaz enzimi
DPKE	: Delignifiye pirinç kabuğuna immobilize lakkaz enzimi
EPR	: Elektron paramanyetik rezonansı
TEMPO	: 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Lakkazın bakır koordinasyon merkezlerinin şematik gösterimi.....	5
Şekil 2.2. Lakkazın kataliz mekanizması.....	6
Şekil 2.3. Lakkaz-mediyatör sistemlerinin kataliz mekanizması.....	7
Şekil 2.4. ABTS'nin lakkaz tarafından oksidasyonu	7
Şekil 2.5. Lakkazın bazı yapay mediyatörlerinin kimyasal yapısı.....	8
Şekil 2.6. Lakkazın katalitik döngüsü.....	11
Şekil 2.7. Monomerlerin çapraz bağlanması.....	12
Şekil 2.8. Polimerlerin degradasyonu	13
Şekil 2.9. Aromatik halkaların yıkılması	14
Şekil 2.10. Lakkaz katalizinde mediyatörlerin rolü	19
Şekil 2.11. <i>Boletus edulis</i> mantarı.....	32
Şekil 2.12. Üçlü faz ayırma tekniği (TPP).....	33
Şekil 2.13. İmmobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi [110].....	37
Şekil 2.14. Tezde kullanılan boyarmaddelerin kimyasal yapıları.....	44
Şekil 3.1a. DASE renk giderme sistemi	60
Şekil 3.1b. DPKE renk giderme sistemi	61
Şekil 4.1a. İmmobilizasyonda kullanılacak DAS:Protein miktarı (w/w) oranı optimizasyonu	66
Şekil 4.1b. İmmobilizasyonda kullanılacak DPK:Protein miktarı (w/w) oranı optimizasyonu	66
Şekil 4.2. Standart protein grafiği	67
Şekil 4.3a. Enzim aktivite tayininde kullanılacak DASE miktarının optimizasyonu.....	68
Şekil 4.3b. Enzim aktivite tayininde kullanılacak DPKE miktarının optimizasyonu.....	68
Şekil 4.4a. DASE'nin ABTS ile reaksiyon süresine bağlı olarak aktivitesinin değişimi	69
Şekil 4.4b. DPKE'nin ABTS ile reaksiyon süresine bağlı olarak aktivitesinin değişimi	69
Şekil 4.5a. DASE'nin lakkaz aktivitesinin pH'a bağlı değişimi	70
Şekil 4.5b. DPKE'nin lakkaz aktivitesinin pH'a bağlı değişimi	70
Şekil 4.6a. DASE'nin lakkaz aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi	71
Şekil 4.6b. DPKE'nin lakkaz aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi	71

Şekil 4.7a. DASE için oluşturulan Lineweaver-Burk grafiği	72
Şekil 4.7b. DPKE için oluşturulan Lineweaver-Burk grafiği.....	73
Şekil 4.8a. DASE için termal kararlılık grafiği	74
Şekil 4.8b. DPKE için termal kararlılık grafiği	74
Şekil 4.9a. DASE için tekrar kullanılabilirlik grafiği	75
Şekil 4.9b. DPKE için tekrar kullanılabilirlik grafiği.....	76
Şekil 4.10a. RB-19 Optimum pH grafiği.....	77
Şekil 4.10b. RB-19 Optimum pH grafiği.....	77
Şekil 4.11a. RY-15 Optimum pH grafiği.....	77
Şekil 4.11b. RY-15 Optimum pH grafiği	77
Şekil 4.12a. RR-239 Optimum pH grafiği.....	78
Şekil 4.12b. RR-239 Optimum pH grafiği	78
Şekil 4.13a. RB-19 Optimum sıcaklık grafiği	80
Şekil 4.13b. RB-19 Optimum sıcaklık grafiği	80
Şekil 4.14a. RY-15 Optimum sıcaklık grafiği	81
Şekil 4.14b. RY-15 Optimum sıcaklık grafiği.....	81
Şekil 4.15a. RR-239 Optimum sıcaklık grafiği	81
Şekil 4.15b. RR-239 Optimum sıcaklık grafiği	81
Şekil 4.16a. RB-19 Enzim miktarı optimizasyon grafiği	83
Şekil 4.16b. RB-19 Enzim miktarı optimizasyon grafiği	83
Şekil 4.17a. RY-15 Enzim miktarı optimizasyon grafiği	84
Şekil 4.17b. RY-15 Enzim miktarı optimizasyon grafiği	84
Şekil 4.18a. RR-239 Enzim miktarı optimizasyon grafiği	84
Şekil 4.18b. RR-239 Enzim miktarı optimizasyon grafiği	84
Şekil 4.19a. RB-19 Boya konsantrasyonu optimizasyon grafiği.....	86
Şekil 4.19b. RB-19 Boya konsantrasyonu optimizasyon grafiği.....	86
Şekil 4.20a. RY-15 Boya konsantrasyonu optimizasyon grafiği.....	87
Şekil 4.20b. RY-15 Boya konsantrasyonu optimizasyon grafiği	87
Şekil 4.21a. RR-239 Boya konsantrasyonu optimizasyon grafiği.....	87
Şekil 4.21b. RR-239 Boya konsantrasyonu optimizasyon grafiği.....	87
Şekil 4.22a. RB-19'un renk giderimi için tekrar kullanılabilirlik grafiği.....	90
Şekil 4.22b. RB-19'un renk giderimi için tekrar kullanılabilirlik grafiği	90

Şekil 4.23a. RY-15'in renk giderimi için tekrar kullanılabilirlik grafiği	91
Şekil 4.23b. RY-15'in renk giderimi için tekrar kullanılabilirlik grafiği	91
Şekil 4.24a. RR-239'un renk giderimi için tekrar kullanılabilirlik grafiği.....	92
Şekil 4.24b. RR-239'un renk giderimi için tekrar kullanılabilirlik grafiği	92
Şekil 4.25. RB-19 çözeltisinin biyodönüşümü (a) RB-19 çözeltisinin UV-VIS absorbands spektrumu, (b) DASE ile işlem gören RB-19 çözeltisinin UV-VIS absorbands spektrumu, (c) DPKE ile işlem gören RB-19 çözeltisinin UV-VIS absorbands spektrumu.....	94
Şekil 4.26. RY-15 çözeltisinin biyodönüşümü (a) RY-15 çözeltisinin UV-VIS absorbands spektrumu, (b) DASE ile işlem gören RY-15 çözeltisinin UV- VIS absorbands spektrumu, (c) DPKE ile işlem gören RY-15 çözeltisinin UV- VIS absorbands spektrumu.....	95
Şekil 4.27. RR-239 çözeltisinin biyodönüşümü (a) RR-239 çözeltisinin UV- VIS absorbands spektrumu, (b) DASE ile işlem gören RR-239 çözeltisinin UV- VIS absorbands spektrumu, (c) DPKE ile işlem gören RR-239 çözeltisinin UV- VIS absorbands spektrumu.....	96
Şekil 4.28a. RB-19 medyatör miktarı optimizasyon grafiği.....	97
Şekil 4.28b. RB-19 medyatör miktarı optimizasyon grafiği	97
Şekil 4.29a. RB-19 medyatör miktarı optimizasyon grafiği.....	98
Şekil 4.29b. RB-19 medyatör miktarı optimizasyon grafiği	98
Şekil 4.30a. RY-15 medyatör miktarı optimizasyon grafiği	98
Şekil 4.30b. RY-15 medyatör miktarı optimizasyon grafiği	98
Şekil 4.31a. RY-15 medyatör miktarı optimizasyon grafiği	99
Şekil 4.31b. RY-15 medyatör miktarı optimizasyon grafiği	99
Şekil 4.32a. RR-239 medyatör miktarı optimizasyon grafiği.....	99
Şekil 4.32b. RR-239 medyatör miktarı optimizasyon grafiği	99
Şekil 4.33a. RR-239 medyatör miktarı optimizasyon grafiği.....	100
Şekil 4.33b. RR-239 medyatör miktarı optimizasyon grafiği	100
Şekil 4.34a. DASE'nin RB-19'un rengini giderme aktivitesine.....	105
bazı kimyasalların etkisi.....	105
Şekil 4.34b. DPKE'nin RB-19'un rengini giderme aktivitesine	105
bazı kimyasalların etkisi.....	105

Şekil 4.35a. DASE'nin RY-15'in rengini giderme aktivitesine	106
bazı kimyasalların etkisi.....	106
Şekil 4.35b. DPKE'nin RY-15'in rengini giderme aktivitesine	106
bazı kimyasalların etkisi.....	106
Şekil 4.36a. DASE'nin RR-239'un rengini giderme aktivitesine.....	107
bazı kimyasalların etkisi.....	107
Şekil 4.36b. DPKE'nin RR-239'un rengini giderme aktivitesine	107
bazı kimyasalların etkisi.....	107
Şekil 4.37a. DASE'nin RB-19'un rengini giderme aktivitesine.....	109
bazı metal iyonlarının etkisi	109
Şekil 4.37b. DPKE'nin RB-19'un rengini giderme aktivitesine	109
bazı metal iyonlarının etkisi	109
Şekil 4.38a. DASE'nin RY-15'in rengini giderme aktivitesine	110
bazı metal iyonlarının etkisi	110
Şekil 4.38b. DPKE'nin RY-15'in rengini giderme aktivitesine	110
bazı metal iyonlarının etkisi	110
Şekil 4.39a. DASE'nin RR-239'un rengini giderme aktivitesine.....	111
bazı metal iyonlarının etkisi	111
Şekil 4.39b. DPKE'nin RR-239'un rengini giderme aktivitesine	111
bazı metal iyonlarının etkisi	111

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 4.1. <i>Boletus edulis</i> mantar lakkazının izolasyon ve kısmi saflaştırma basamakları sonucu belirlenen protein ve enzim aktiviteleri	64
Tablo 4.2. <i>Boletus edulis</i> mantar lakkazının deriştirilmesi amacıyla uygulanan amonyum sülfat doygunluklarının etkisi	65
Tablo 4.3. TPP’de kullanılacak % 40-60 NH ₄ (SO ₄) ₂ ’lı ekstrakt:t-bütanol (v/v) oranının belirlenmesi için gerçekleştirilen optimizasyon çalışmasının sonuçları.....	65
Tablo 4.4. İmmobilizasyon sonucu elde edilen DASE ve DPKE sistemlerinin protein ve enzim aktivite tayin sonuçları	67
Tablo 4.5. DASE ve DPKE’nin aktivite tayini için yapılan optimizasyon çalışmalarının sonuçları.....	72
Tablo 4.6. DASE ve DPKE için gerçekleştirilen kinetik çalışma sonuçları	73
Tablo 4.7. DASE ve DPKE’nin RB-19, RY-15, RR-239 için optimum pH çalışması sonuçları.....	79
Tablo 4.8. DASE ve DPKE’nin RB-19, RY-15, RR-239 için optimum sıcaklık çalışması sonuçları.....	82
Tablo 4.9. DASE ve DPKE’nin RB-19, RY-15, RR-239 için optimum enzim miktarı çalışmasının sonuçları.....	85
Tablo 4.10. DASE ve DPKE’nin RB-19, RY-15, RR-239 için optimum boya konsantrasyonu çalışmasının sonuçları.....	88
Tablo 4.11. DASE’nin RB-19, RY-15 ve RR-239 boyarmaddelerinin renk giderme aktivitelerine medyatörlerin etkisi	101
Tablo 4.12. DPKE’nin RB-19, RY-15 ve RR-239 boyarmaddelerinin renk giderme aktivitelerine medyatörlerin etkisi	103

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Enzimler, biyolojik sistemlerde tepkimelerin ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan protein yapılı spesifik biyokatalizörlerdir. Gerekli koşullar sağlandığında enzimler doğal ortamlarının dışında da ilgili oldukları tepkimeleri çok hızlı ve spesifik biçimde katalizleyebilirler. Bu durum, enzimlerin endüstriyel, tıbbi, bilimsel ve analitik amaçla pratikte kullanılabilirliklerini gündeme getirmiştir. Yapılan birçok bilimsel çalışma ile enzimlerin canlı materyallerden izolasyonu, saflaştırılması ve kullanım özelliklerinin iyileştirilmesi için farklı yaklaşımlar öne sürülmüştür.

Protein izolasyonu ve saflaştırılması oldukça zahmetli ve pahalı proseslerle gerçekleştirilmektedir. Endüstriyel uygulamalar için gerekli bol miktarda enzimin canlı kaynaklardan elde edilebilmesi için farklı yöntemler geliştirilmiştir. Üçlü faz ayırma yöntemi (TPP) bunlardan biridir. TPP yöntemi, hedef proteinlerin çöktürülmesi ve saflaştırılması için kolay, etkili ve ekonomik bir yöntemdir. İşlem, ham ekstrakta tuz ardından bir organik çözücü eklenmesi yoluyla gerçekleştirilir. Ekleme işleminden sonra oluşan üç fazdan en üstteki organik faz, en alttaki sulu faz ve ortadaki protein içeren faz olarak tanımlanmaktadır. Protein içeren orta faz diğer fazlardan ayrılarak işlem tamamlanır.

Lakkazlar (EC 1.10.3.2, *p*-difenol:dioksijen oksidoredüktaz), polifenol oksidaz (PPO) adlı çoklu bakır içeren bir enzim grubunda yer alırlar. Difenoller, süstitüe monofenoller, aromatik ve alifatik aminler gibi çeşitli substratların oksidasyonunu katalizlerler. Substratın oksidasyonu sırasında “elektron alıcısı” olarak görev yapan moleküler oksijen, suya indirgenmektedir. Polifenol oksidaz enzimlerinden biri olan lakkaz, bakır kofaktörü taşımaktadır. Lakkazların, geniş substrat spesifiteleri, elektron alıcısı olarak moleküler oksijeni kullanmaları ve ürün olarak sadece su açığa çıkarmaları endüstride bu enzimlerin tercih edilmesinin nedenleridir. Lakkazlar, atık su arıtımı için boyarmaddelerin renk giderimi (dekolorizasyon) ve ksenobiyotiklerin degradasyonu işlemlerinde, biyoyakıt hücrelerinin geliştirilmesinde, oksijen miktar tayini ve atık sularda bulunan fenolik bileşiklerin belirlenmesi amacıyla biyosensör geliştirmede ve gıda endüstrisinde fenolik bileşiklerin giderilmesi için kullanılabilmektedirler. Ayrıca lakkazlar, elektron transferinde görev alan medyatör adı verilen küçük moleküller ile kullanıldıklarında fenolik olmayan substratları da katalizleyerek daha geniş uygulama alanlarına sahip olmaktadır.

İmmobilizasyon, enzimlerin suda çözünmeyen katı desteklere sabitlenmesi olarak tanımlanır ve enzimlerin kullanım özelliklerini geliştirmektedir. Enzimlerin immobilizasyonu ile elde edilen sistemler, suda çözünmeyen, tekrar kullanılabilen, kesintisiz işlem yapabilen, ürün oluşumunun kontrol altında tutulabildiği, çevre koşullarına daha dayanıklı ve daha kararlı yapıların elde edilmesine imkan tanımaktadır. Enzim destek arasındaki ilişki adsorbsiyon, tutuklama, kovalent bağlama yöntemleri ile gerçekleştirilebilir. Adsorbsiyon yöntemi ile gerçekleştirilen immobilizasyon işlemleri kolay uygulanabilir, genelde enzimin aktif merkezine zarar vermez ve ılımlı koşullarda gerçekleştirilir.

Tarımsal atıklar, selülozik yapıları nedeniyle enzimlerin adsorbsiyon tekniği ile immobilizasyonunda destek olarak kullanılabilir. Bölgemizde yoğun şekilde yetiştirilen ayçiçeği ve pirincin işlenmesi sonucu arta kalan ayçiçek sapları ve pirinç kabuklarının değerlendirilmesi hem ekonomik olarak hem de çevresel anlamda büyük bir önem taşımaktadır.

Enzimlerin kullanıldığı prosesler, çevresel sorunlara karşı yeni yaklaşımlar sağladığı için arıtma sistemlerinde tercih sebebi olmaktadır. Tekstil endüstrisinde

elyafa renk vermek için gerçekleştirilen boyama ve baskı işlemlerinde farklı kimyasal yapılara sahip boyarmaddeler kullanılmaktadır. Renklendirme işlemleri sonunda, tekstil yüzeyine fikse olmayan boyarmaddelerin giderilmesi için etkin arıtma işlemleri gerçekleştirilmediğinde, atık sular renklenmektedir. Suyun renklenmesi, su altında yaşayan canlılar için de büyük tehlike oluşturmaktadır. Renklenme sonucunda ışık geirgenliğı azalan sularda fotosentez olayının gerçekleşmesi zorlaşmaktadır. Özellikle sentetik boyarmaddelerin ve yan ürünlerinin doğa için toksik etkilerinin bulunması ve canlılar üzerinde mutajenik, kanserojenik etkilere neden olabilmesi tekstil atık sularının arıtımlarını zorunlu hale getirmektedir.

Mantarlar, lakkazların en önemli doğal kaynaklarıdır. Özellikle lignin degradasyonunda görev alan lakkazlar, mantarların yapısında bol miktarda bulunmaktadır. *Boletus edulis* yenilebilir mantar türü, ülkemizin kuzey bölgelerinde yetişmektedir. Bolet, porçini, ayı mantarı, çörek mantarı gibi farklı isimlerle anılmaktadır.

Bu tez kapsamında, Kırklareli-Demirköy çevresinden toplanan *Boletus edulis* mantarlarından lakkazın izolasyonu ve elde edilen ham ekstraktan kolayca ölçeklenebilen ve direkt olarak ham ekstraktlara uygulanabilen, üçlü faz ayırma tekniğı (TPP) ile lakkazın kısmi saflaştırılması amaçlanmıştır. Kısmi saflaştırma sonucu elde edilen lakkaz, modifiye edilmiş ayçiçek sapı ve pirinç kabuklarına adsorbsiyon tekniğı ile immobilize edilmiş ve bu immobilize enzimlerin bazı özellikleri incelenmiştir. *Boletus edulis* lakkazının immobilizasyonu ile oluşturulan kesikli sistemler kullanılarak, tekstil atık sularında bulunan reaktif boyarmaddelerin renklerini gidermedeki etkileri incelenmiştir. Ayrıca immobilize sistemlerin farklı medyatörler, tekstil atık sularında bulunan bazı iyonlar ve bazı kimyasallar varlığında çeşitli reaktif boyarmaddelerinin renk giderimi aktivitelerine olan etkileri belirlenmeye çalışılmıştır.

BÖLÜM 2

KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Lakkazlara Genel Bakış

Lakkazlar (EC 1.10.3.2, *p*-difenol:dioksijen oksidoredüktaz), polifenoloksidaz (PPO) adlı çoklu bakır içeren bir enzim grubunda yer alırlar. Difenoller, süstitüe monofenoller, aromatik ve alifatik aminler gibi çeşitli substratların oksidasyonunu katalizlerler. Oksidasyon sırasında “elektron alıcısı” olarak görev yapan moleküler oksijen suya indirgenir [1].

Lakkaz ilk olarak Yoshida (1883) tarafından *Rhus vernicifera* adı verilen Japon vernik ağacında bulunarak tanımlandı. Bu durum lakkaz enzimini tanımlanan gelmiş geçmiş en eski enzimlerden biri yapmaktadır [2,3].

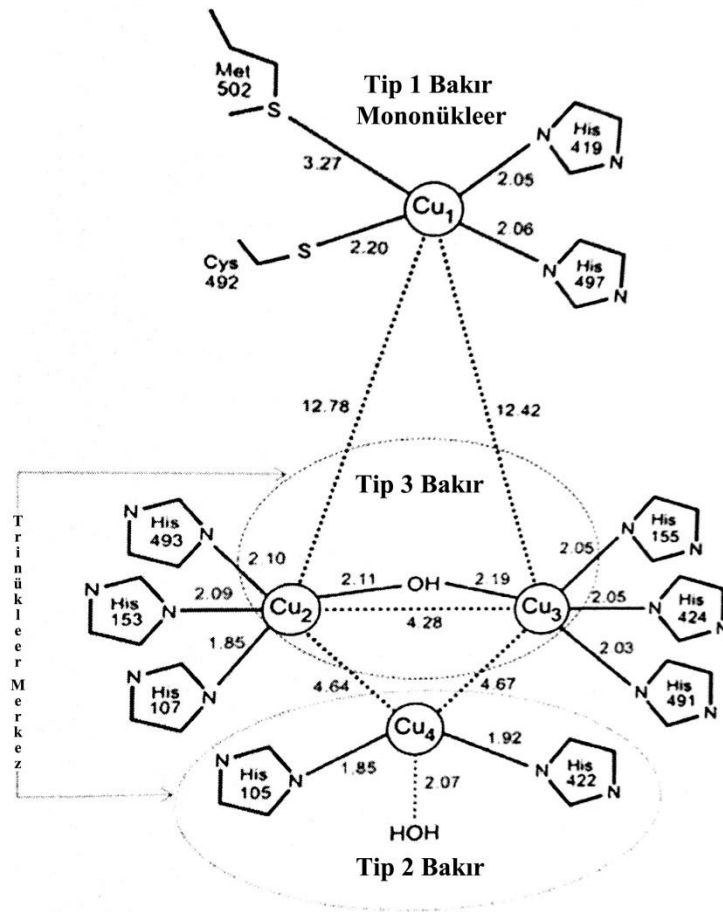
Yüksek bitkilerden ve funguslardan sonra bakterilerde ve böceklerde de lakkaz benzeri enzimlerin varlığına rastlanmaktadır [4].

Lakkazlar bulundukları doğal kaynaklarda, lignifikasyon, yara iyileştirme ve demir oksidasyonu (bitkilerde), delignifikasyon, pigmentasyon, patogeneze ile birlikte sert spor kesesi oluşumu (funguslarda), melanin oluşumu, endospor kabuk protein sentezi (bakterilerde) gibi olayların gerçekleşmesinde rol alırlar.

Bakterilerde lakkazların birçoğu hücre içinde bulunurken bitki ve fungus lakkazları hücre dışında bulunmaktadır [5].

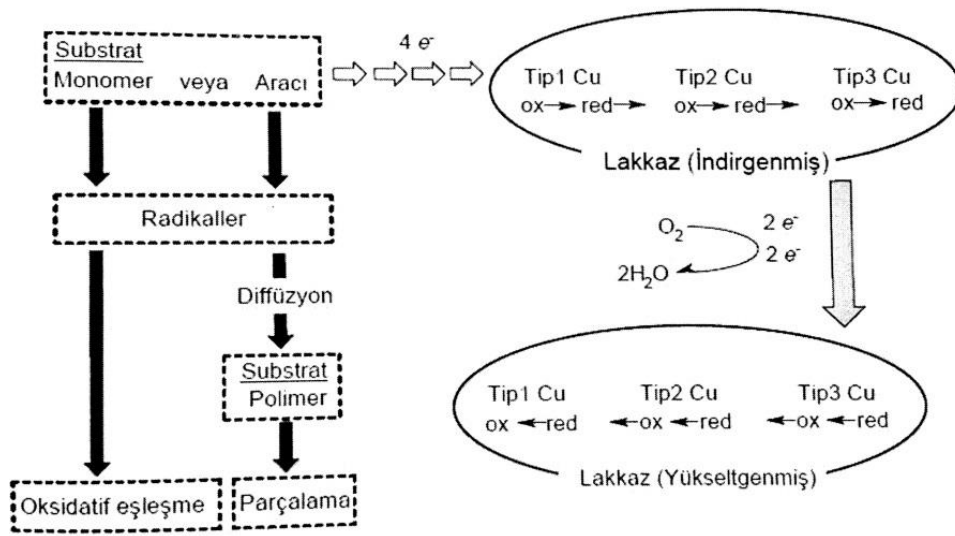
Lakkazlar, dimerik veya tetramerik glikoproteinlerdir. Bakır kofaktörü içerirler. Katalitik fonksiyonlarını gerçekleştirebilmeleri için üç merkezde bulunan 4 farklı bakır atomuna ihtiyaçları vardır. Tip 1 bakır atomunun bulunduğu mononükleer merkezde substrat oksidasyonu gerçekleşirken, Tip 2 ve Tip 3 bakır atomlarının oluşturduğu trinükleer merkezde ise oksijen suya indirgenmektedir.

Lakkazların indüksiyon mekanizmaları, fizikokimyasal özellikleri (izoelektrik noktaları, karbonhidrat içerikleri) ve biyokimyasal özellikleri değişse de lakkaz enzimlerinin bakır bağlama bölgeleri (domainleri) sıkı bir şekilde korunmuştur. Şekil 2.1'de *Trametes versicolor*'dan elde edilen lakkazın aktif bölgesinde bulunan bakır koordinasyon merkezleri yapısı şematik olarak gösterilmiştir [5].



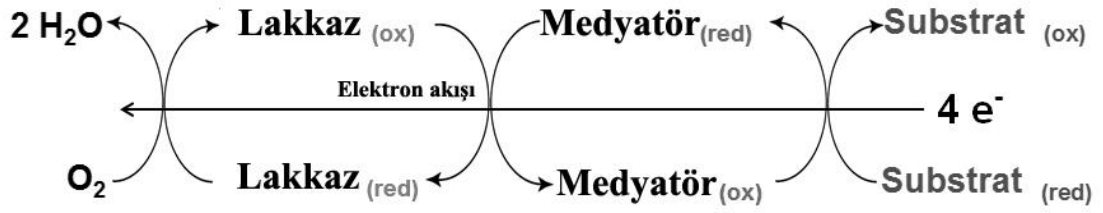
Şekil 2.1. Lakkazın bakır koordinasyon merkezlerinin şematik gösterimi [5]

Çoklu bakır içeren bir protein olan lakkazların, reaksiyon mekanizmaları radikal katalizlidir (Şekil 2.2). Lakkazlar, peroksidazlar ve tirozinazlar ile birlikte doğada yaygın olarak bulunan fenol oksitleyici enzimlerin büyük bir grubunu oluşturmaktadırlar. Reaksiyon tiplerine bağlı olarak bu enzimler, elektronları bir substrattan başka bir akseptöre transfer eden oksidoredüktaz enzimleridir. Bu enzimlerin katalizlediği tepkimelerde rol oynayan elektron akseptörü, lakkaz ve tirozinaz için atmosferik O_2 iken peroksidaz için H_2O_2 'dir [6, 7].



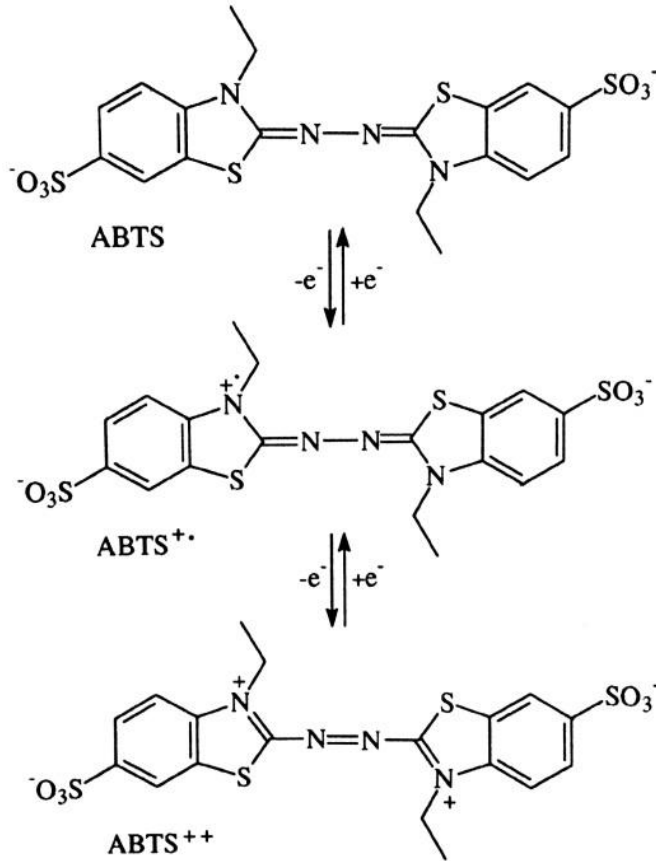
Şekil 2.2. Lakkazın kataliz mekanizması [7]

Lakkazlar, geniş aralıklı substrat spesifitesine sahiptirler. Mono, di ve polifenoller, aminofenoller, metoksifenoller, aromatik aminler ve askorbat gibi bileşik gruplarını içeren çok çeşitli substratların oksidasyonunu katalizlerler. Ancak yüksek redoks potansiyelli substratlar, lakkazlar tarafından direkt okside edilemezler. Örneğin, lignin biyodegradasyonunda lakkazın rolü fenolik parçacıklarla sınırlıdır. “Medyatör” denilen elektron taşıyıcı küçük moleküller, bu tip tepkimelerde aracı substratlar olarak rol alırlar ve lakkazın doğrudan oksitleyemediği büyük moleküllerin ve hatta fenolik olmayan substratların bile oksidasyonuna olanak sağlarlar. Lakkazın medyatörleri okside etmesi sonucu ürettiği yüksek redoks potansiyelli araçlar fenolik olmayan bileşiklerin oksidasyonunu sağlar. Bu aracı bileşikler, sonra başlangıç formuna indirgenerek redoks döngüsünü tamamlar (Şekil 2.3). Bu nedenle, lakkaz-medyatör sistemleri (LMSs), lakkazın okside edebildiği bileşik aralığını ciddi oranda artırır [8].



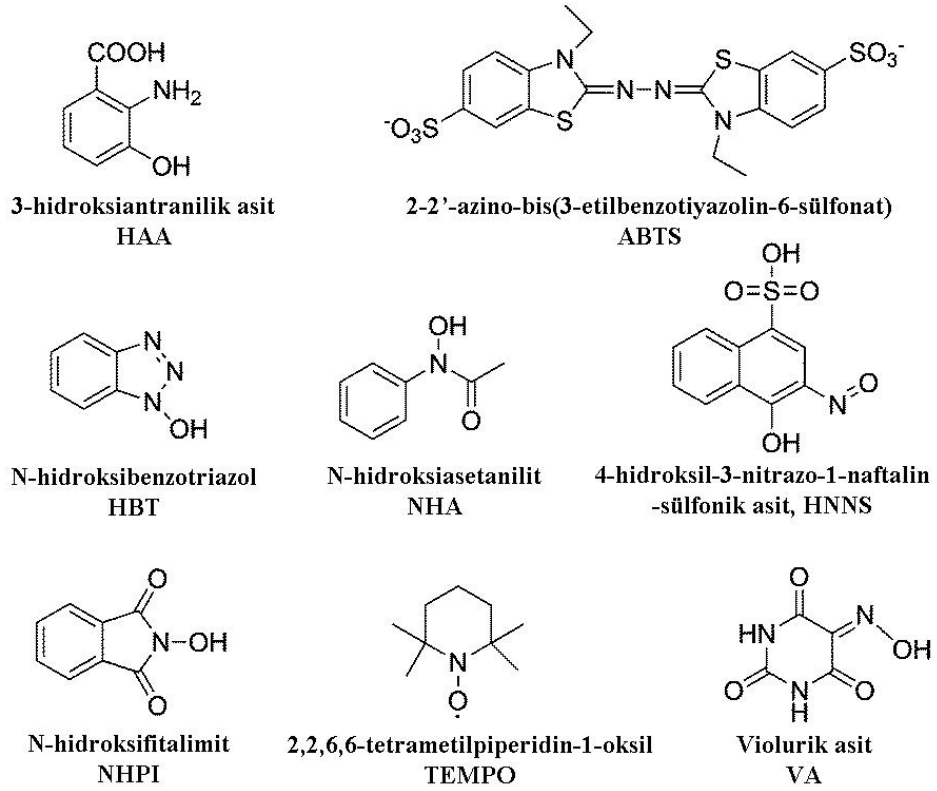
Şekil 2.3. Lakkaz-medyatör sistemlerinin kataliz mekanizması [6]

Lakkazın ilk yapay substratı olan ABTS (2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6 sülfonik asit)'dir. Şekil 2.4'te ABTS molekülünün oksitlenme tepkimesinin mekanizması verilmiştir. ABTS aynı zamanda medyatör olarak da kullanılabilir. İlk defa, Bourbonnais ve Paice (1990) ABTS'nin medyatör olarak görev aldığı bir çalışma yaptı. Bu çalışmada, lakkazın substratı olmayan lignin modelli fenolik olmayan bileşiklerin oksidasyonu lakkaz-ABTS işbirliği ile gerçekleştirildi ve bu lakkaz-medyatör sistemi kağıt delignifikasyonu için 1990 yılında kullanıldı. [9].



Şekil 2.4. ABTS'nin lakkaz tarafından oksidasyonu [9]

Lakkazın yapay medyatörlerine örnek olarak ABTS yanında, 3-hidroksiantranilik asit (HAA), N-hidroksibenzotriazol (HBT), N-hidroksifitalimit (NHPI), violurik asit (VA), N-hidroksiasetanilit (NHA), 4-hidroksil-3-nitrazo-1-naftalin-sülfonik asit (HNNS), 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil (TEMPO) verilebilir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Lakkazın bazı yapay medyatörlerinin kimyasal yapısı [6]

Lakkaz-medyatör sistemleri kağıt hamurlarının ağartılması, delignifikasyonu, polisiklik aromatik hidrokarbonların degradasyonu ve tekstil boyarmaddelerinin renk giderme işlemleri gibi farklı biyoteknolojik alanlarda başarılı bir şekilde kullanılmaktadır [6].

Lakkazlar, yukarıda da bahsedildiği gibi okside edebildikleri substrat aralığının geniş olması nedeniyle birçok endüstriyel alandaki biyoteknolojik proseslerde kullanılmaktadır. Fenolik bileşikleri degrade edebilme kapasiteleri nedeniyle atık su arıtımında boyarmaddelerin renk giderimi ve ksenobiyotiklerin degradasyonu işlemlerinde; elektrobiyokimya alanında, biyoyakıt hücrelerinin geliştirilmesi, oksijen

miktar tayini ve atık sularda bulunan fenolik bileşiklerin belirlenmesi amacıyla biyosensör geliştirmede ve gıda endüstrisinde fenolik bileşiklerin giderilmesi için lakkazlardan yararlanılmaktadır [8].

2.2. Lakkazların Yapısı

Lakkazlar, tipik monomerik ekstraselüler enzimlerdir. Yapılarındaki 3 redoks merkezine bağlı (Tip 1, Tip 2, Tip 3) dört tane bakır atomu içeren dimerik veya tetramerik glikoproteinlerdir. Bu bakır bölgeleri verdikleri karakteristik elektronik paramanyetik rezonans (EPR) sinyalleri ile birbirinden ayrılmaktadır.

- Tip 1: Paramanyetik ‘mavi’ bakır, okside formda 610 nm’de absorbans gösterir.
- Tip 2: Paramanyetik ‘mavi olmayan’ bakır, görünür bölgede absorbans göstermez.
- Tip 3: Diamanyetik spin eşleşmeli bakır-bakır çifti, okside formda 330 nm’de absorbans gösterir.

Tip 1 bakır, trigonal bir koordinasyona sahiptir. Bu trigonal yapıda, korunmuş ekvatorial ligandlar; 2 histidin ve 1 sistin ve genellikle değişken bir ligand bulunmaktadır. Değişken aksiyal ligand bakteriyel lakkazlarda (CotA) metiyonin, fungal lakkazlar da ise lösin veya fenilalanindir. Bu aksiyal ligandın enzimin aktivitesini düzenleyen mekanizmayı mümkün kılarak enzimin potansiyel oksidasyonunu kuvvetlice etkilediği geniş biçimde tartışılmaktadır. *Trametes villosa*’dan elde edilen fungal lakkazın oksidasyon potansiyelini, fenilalaninden metiyonine dönüştüren mutasyonun önemli şekilde düşürdüğü belirtilmiştir. Tip 1 bakır, kovalent bakır-sistein bağından kaynaklanan yoğun elektronik absorbsiyondan dolayı mavi renk verir. Yüksek redoks potansiyeli nedeniyle (+790 mV) substrat oksidasyonu mavi bakırın bulunduğu alanda gerçekteşir. Tip 2 bakır görünür bölgede absorbsiyon göstermez ve EPR çalışmalarında paramanyetik özellikler açığa çıkarır. Tip 2 bakır stratejik olarak tip 3 bakıra yakındır, bir çift çekirdekli merkez spektroskopik olarak 330 nm’deki (okside form) bir elektron adsorbsiyonu ile ve bakır çiftinin anti-ferromanyetik eşleşmesi sonucu oluşan EPR sinyalini vermemesi ile tanınmaktadır. Tip 3 bakır merkezi tirozinaz hemosiyanin içeren bir protein süper ailesinin genel özelliğidir.

Bir trinükleer küme oluşturan Tip 2 ve Tip 3 bakır atomları moleküler oksijenin indirgendiği ve suyun açığa çıktığı bölgedir. Tip 2 bakır 2 histidin; Tip 3 bakır ise 6 histidin ile bir aradadır. İki tip 3 bakır atomunun arasındaki güçlü anti-ferromanyetik eşleşme, bir hidroksil köprüsü tarafından korunmaktadır [10].

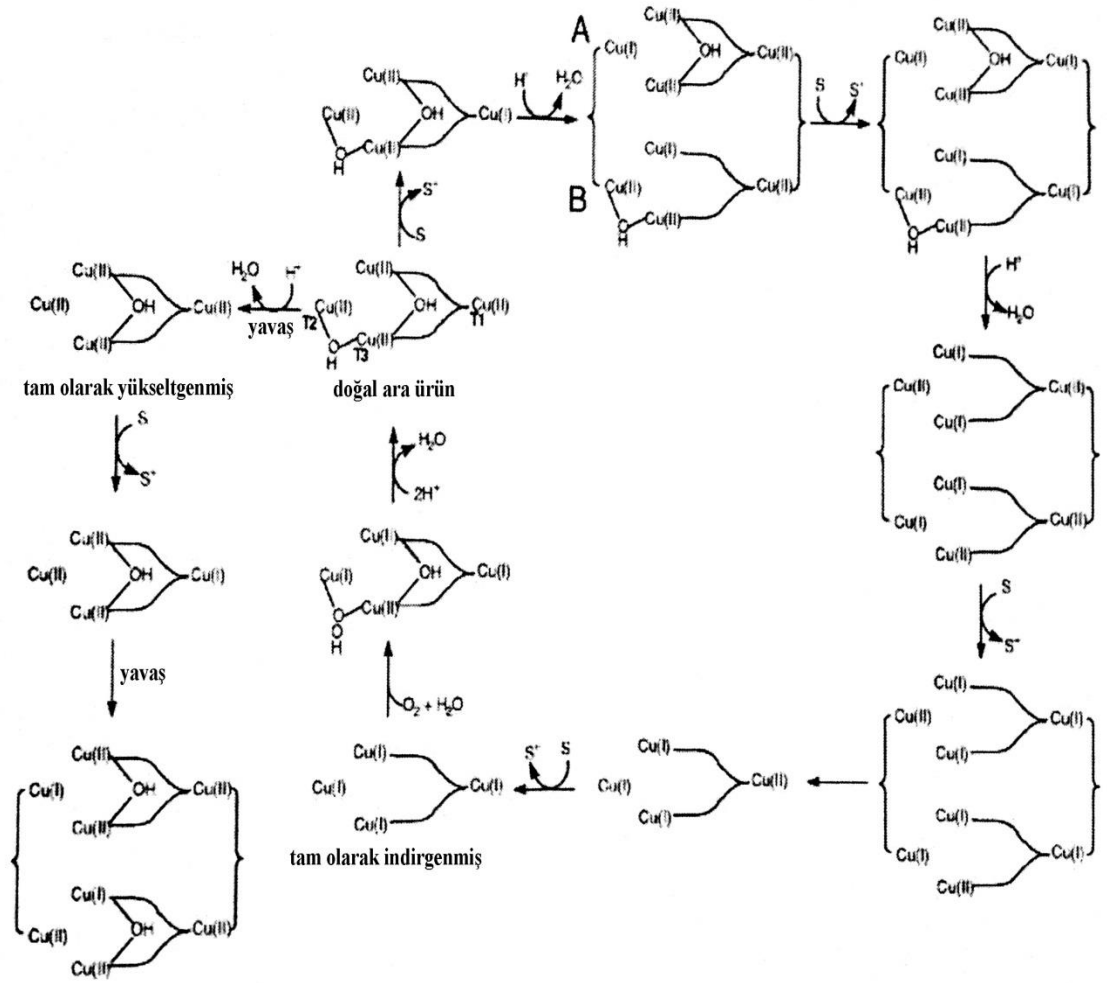
2.3. Lakkazların Etki Mekanizması

Lakkazlar, peroksidazların aksine H_2O_2 yerine O_2 kullanarak bileşikleri oksitler. Lakkazların katalitik fonksiyonlarının gerçekleşmesi Bölüm 2.2’de söz edilen 3 farklı bakır merkezine yayılan bakır atomlarına bağlıdır. Lakkaz enzimi substratlardan elektroni alır (her birinde tek elektron olmak üzere 4 basamakta) ve onları polimerize olabilen serbest radikallere dönüştürür. Elektronların tamamını alarak indirgenen enzim, elektronları suyun oluşumu için moleküler oksijene taşır (Şekil 2.6). Lakkaz katalizindeki başlıca 3 adım tam olarak aşağıda verilmiştir;

I. Tip 1 Cu atomunun indirgenmesi

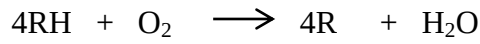
II. Tip 1 Cu atomundan, Tip 2 ve Tip 3 Cu atomlarının oluşturduğu trinükleer kümeye elektron transferi

III. Trinükleer kümede oksijenin suya indirgenmesi [10]



Şekil 2.6. Lakkazın katalitik döngüsü [11]

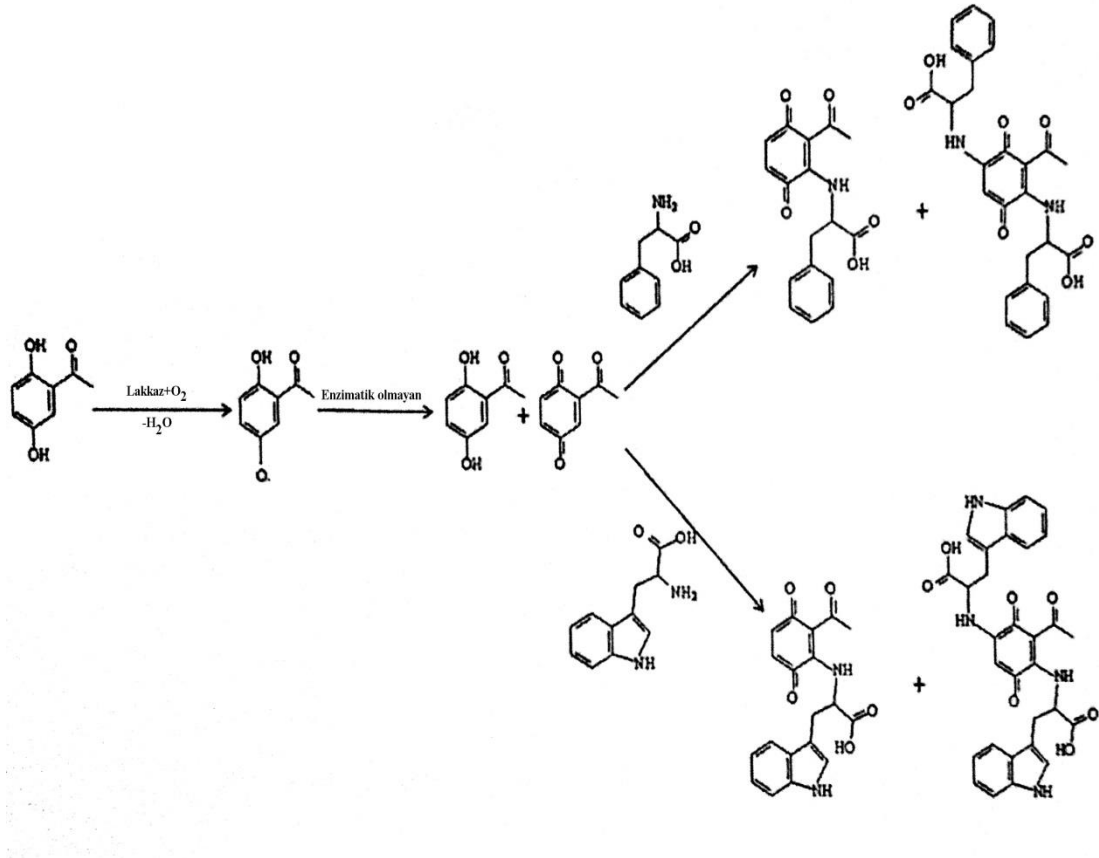
Lakkazın katalitik döngüsü sonucunda gerçekleşen reaksiyon mekanizması toplu olarak aşağıdaki gibidir;



Lakkazın katalizi sonrasında reaktif radikallere dönüşen substratlar ($4R^{\cdot}$) kendi içlerinde enzimatik olmayan aşağıdaki tepkimeleri yürütürler;

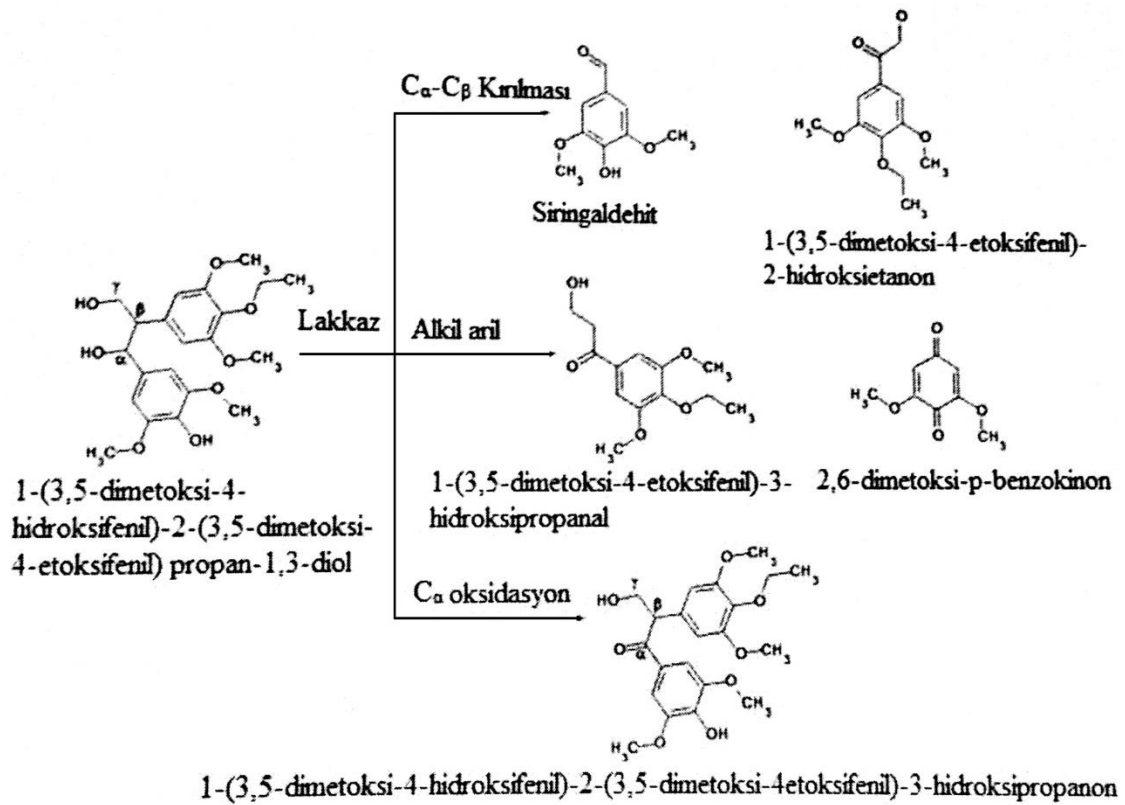
- Monomerlerin çapraz bağlanması
- Polimerlerin parçalanması
- Aromatik halkalarının kırılması

Monomerlerin çapraz bağlanması: Fenolik bileşikler ve anilinlerin lakkazlar tarafından gerçekleşen enzimatik oksidasyonu sonucu oluşan serbest radikaller C-C, C-O, C-N, kovalent bağlanmalar sonucu dimer, oligomer ve polimer yapılar oluştururlar (Şekil 2.7). Toprakta bulunan doğal ve ksenobiyotik fenolikler veya aromatik aminler böylece organik humik matrikse bağlanabilir. Sübstitüe bileşikler için reaksiyon kısmi demetilasyon ve dehalojenizasyon eşliğinde olabilir. Lakkazın bu kapasitesi kirli toprağın ve suların detoksifikasyonundaki kullanım potansiyeli için temel teşkil eder. Yüksek bitkilerde fenolik öncülerin çapraz bağlanması lakkazlar tarafından gerçekleştirilen lignifikasyon işleminin bir basamağıdır. Böceklerde, proteinlerle kateşolün lakkaz kataliziyle oksidatif eşleşmesi kütikül tabakasının sertleşmesinde rol alabilir. Mikroorganizmalarda proteinlerin çapraz bağlanması, *Bacillus* sporlarının sıcaklık ve UV ışınlarına karşı dayanıklılığında lakkaz enziminin görev aldığı tartışılmaktadır [10].



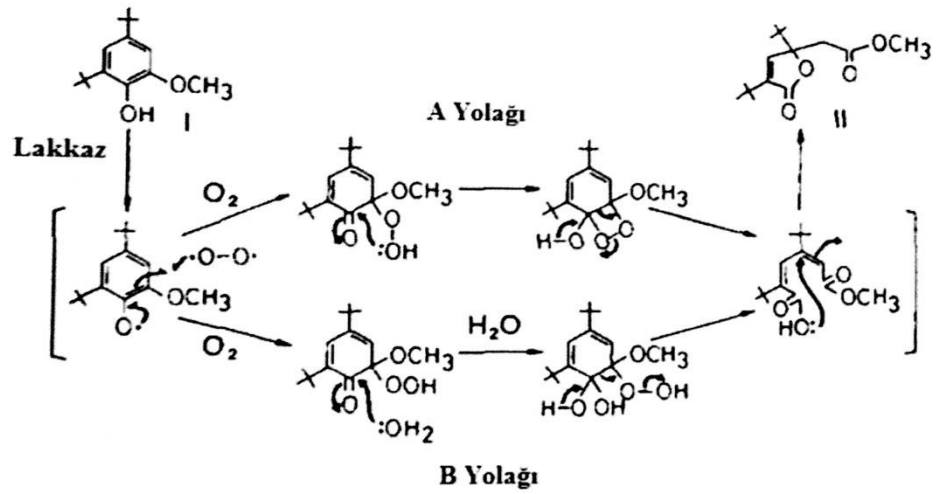
Şekil 2.7. Monomerlerin çapraz bağlanması [12]

Polimerlerin degradasyonu: Lakkazlar lignin veya humik asitler gibi kompleks doğal polimerlerin yıkımında yer almaktadırlar (Şekil 2.8). Serbest radikallerin oluşumu, kovalent bağların kırılmasına ve monomer oluşumuna neden olur. Sterik engeller nedeniyle enzimler polimerlere direkt olarak etki edemeyebilir. Bunun yerine lakkazlar tarafından yükseltgenebilecek ya da aktiveleştirilecek küçük organik moleküller veya metaller radikal katalizli depolimerizasyona aracılık ederler. Fizyolojik olmayan medyatörler lakkazların yükseltgeme potansiyelini arttırmak için biyoteknolojik işlemlerde kullanılmaktadırlar [10].



Şekil 2.8. Polimerlerin degradasyonu [13]

Aromatik halkaların yıkılması: Lakkazların aromatik bileşiklerin halka yapısını kırma tepkimelerini katalizlediği yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Şekil 2.9). Böylece lakkazlar, nitro-aromatik bileşikler, sentetik boyalar gibi ksenobiyotik bileşiklerin kimyasal yapılarını bozabilmektedir [10].



Şekil 2.9. Aromatik halkaların yıkılması [14]

2.4. Lakkazın Substrat Spesifitesine Göre Sınıflandırılması

Lakkazlar (EC 1.10.3.2) geniş bir enzim grubu olan polifenol oksidaz ailesine dâhildirler. Polifenol oksidazlar (PPO), elektron alıcı O_2 ile birlikte aromatik bileşiklerini yükseltgeyebilen bakır proteinleridir [11].

Polifenoloksidazlar aktivitelerine göre üç tipe sınıflandırılırlar:

- Kateşol oksidaz veya *o*-difenol: oksijen oksidoredüktaz (EC 1.10.3.1)
- Lakkaz veya *p*-difenol: oksijen oksidoredüktaz (EC 1.10.3.2)
- Krezolaz veya monofenol monooksijenaz (EC 1.14.18.1)

Bu enzimler, substrat spesifiteleri nedeniyle birbirlerinden ayrılabilirler [15].

Lakkazları substrat spesifitesine göre diğer polifenol oksidazlardan ayırmak zordur. Bunun nedenlerinden biri tirozinaz ile lakkazın substrat aralığının örtüşmesidir. Kateşol oksidaz veya tirozinazlar, kreazolaz (L-tirozinin oksidasyonu) aktivitesinin yanı sıra *o*-difenol aktivitesine de sahiptirler. Lakkazlar *orto* ve *para* difenol aktivitesine sahiptirler. Özellikle *para* difenol grubuna karşı ilgileri daha yüksektir. Sadece tirozinazlar kreazolaz aktivitesi gösterirler ve sadece lakkazlar şiringaldezini (SGZ; N,N'-bis-3,5-dimetoksi-4-hidroksibenzilidin hidrazin) yükseltgeyebilme yeteneğine sahiptirler [16].

Bunun yanında, *Alteromonas sp.*'den izole edilen polifenol oksidazların hem lakkaz hem de tirozinaz aktivitelerini sergilediği belirlenen bir çalışma da bulunmaktadır [17].

Lakkazların substrat spesifitelerinin önemli ölçüde düşük olması da lakkazları diğer polifenol oksidazlardan ayırmada problem yaratmaktadır. Ancak etki ettikleri substrat çeşitliliği oldukça geniştir. Thurston, yaptığı bir çalışmanın sonucunda, hidrokinon ve kateşol gibi basit difenollerin tüm lakkazlar için olmasa da çoğu için iyi birer substrat olduğunu ancak guaikol ve 2,6 dimetoksifenol (DMP) bileşiklerinin genelde daha uygun substratlar olduğunu ortaya koymuştur.

Substratlarına göre lakkazı tanımlamadaki diğer bir zorluk, substrat çeşitliliğinin kaynaktan kaynağa çeşitlilik göstermesidir. Örneğin farklı funguslardan elde edilen lakkazlar için; *Neurospora crassa* lakkazı sadece *para* ve *orto* difenoller, *Cerrena unicolor* *p*-süstitüe fenoller, *Trametes versicolor* lakkazı *orto*-süstitüe fenoller yükseltir. Ayrıca, *Cerrena unicolor* ve *Trametes versicolor* lakkazlarının her ikisi de meta-süstitüe fenollerinin oksitlenme tepkimelerini katalizleyebilir [16].

2.5. Lakkazın Kaynakları

2.5.1. Bitkisel Lakkazlar

Lakkaz ilk kez Japon vernik ağacı olarak bilinen *Rhus vernicifera*'da tanımlandıktan sonra mango, mung fasulyesi, şeftali, çam, erik, fırvun inciri, kavak gibi farklı bitkilerde de belirlenmiştir [7].

Bazı bitkilerde lakkazın çoklu formları da bulunmaktadır. Gelişen tekniklerle birlikte tütün (*Nicotiana tabacum*) [18], mısır tohumları (*Zea mays*) [19] ve delice otundan da (*Lolium perenne*) [20] lakkaz enzimleri elde edilerek karakterize edilmiştir.

Lakkazlar bitkilerde dehidrojenatif mekanizma yoluyla ligninin polimerizasyonunda, iyileştirme sürecinde ve Fe (II) iyonunun Fe (III) iyonuna oksidasyonunda rol alırlar [5].

2.5.2. Fungal Lakkazlar

Doğada bulunan mantar türlerinin çoğunda lakkaz üretimi gerçekleşmektedir. Doğada yaygın olarak bulunan lakkazlar en çok funguslardan izole edilip saflaştırılmış ve karakterize edilmişlerdir. Bilinen en iyi lakkaz üreticilerinden *Basidiomycetes* sınıfına ait mantarların yanı sıra *Duteromycetes* ve *Ascomycetes* fungusları da lakkaz kaynaklarındandır.

Bunların arasında özellikle *Basidiomycetes*'ler sınıfında yer alan beyaz çürükçül fungusların etkili lakkaz kaynağı oldukları doğrulanmıştır. Lakkaz üretiminin düşük olduğu funguslar ile ilgili henüz yapılan detaylı bir çalışma yoktur. *Trametes versicolor*, *Plreurotus eryngii*, *Chaetomium thermophile*, *Trametes hirsute*, *Trametes ochracea*, *Trametes villosa*, *Trametes gallica*, *Cerrena maxima*, *Phlebia radiata*, *Coriolopsis polyzona*, *Lentinus tigrinus* beyaz çürükçül fungusları iyi bilinen lakkaz üreticilerindendir. Lakkazlar soft, beyaz çürükçül ve Geophildae saprofit mantarlarının birçok türünden elde edilmektedirler. *Myceliophthora thermophila*, *Aspergillus*, *Curvularia*, *Penicillium* ve *Chaetomium thermophile* gibi saprofit *Ascomycetes* kompostlarında ve toprakta *Mycelia sterlia* funguslarında da lakkazların varlığı rapor edilmiştir [5, 21].

Lakkazlar aynı zamanda fungus türü olan birkaç şapkalı yenilebilir mantardan da izole edilip saflaştırılarak karakterize edilmişlerdir. Bunlar; *Agrocybe cylindracea* [22], *Clitocybe maxima* [23], *Ganoderma* sp. MK05 [24], *Ganoderma lucidum* [25], *Pleurotus eryngii* [26], *Albatrella dispansus* [27], *Hericium erinaceum* [28], *Tricholoma giganteum* [29], *Cantharellus cibarius* [30], *Boletus edulis* [31] şapkalı mantar türleridir. Aynı zamanda *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes* ve *Agaricus bisporus* gibi yenilebilir birçok mantar da lakkaz kaynağıdır [21].

Beyaz çürükçül fungusların etkili bir şekilde ligninin yapısını bozdukları bilinmektedir. Beyaz çürükçül funguslarda bulunan yüksek aktiviteye sahip lakkaz, hücre duvarının yapısında bulunan lignin gibi kompleks bir yapıyı depolimerize etmektedir. Bu degradasyon prosesi, diğer bazı enzimlerin sinerjistik etkisini ve enzimatik polimerizasyon ile depolimerizasyon arasındaki dengeyi kurmaya yardımcı enzimatik olmayan tepkimeleri de içermektedir. Lakkaza ek olarak lignin degradasyonuna katkıda bulunan diğer enzimler;

1. Lignin peroksidaz: Fenolik ve fenolik olmayan bileşiklerin oksidasyonunu katalizler

2. Mangan peroksidaz

3. Glukoz oksidaz ve glioksal oksidaz: H_2O_2 üretimi için

4. Sellobiyoz-kinon oksidoredüktaz: Kinonların indirgenmesi için

Biyopolimerlerin degradasyonunun yanı sıra fungal lakkazların pigment üretimi, şapka oluşumu, detoksifikasyon, patojenez ve morfogenez gelişimi gibi farklı işlevleri de vardır [5].

Fungal lakkazlar, farklı kültür koşulları altında çoklu enzimler olarak meydana gelirler. Molekül ağırlıkları ortalama 50-100 kDa olan glikoproteinlerdir ve lakkazın yüksek kararlılığının neden olduğu düşünülen % 10-45 oranında karbonhidrat içerirler. [10]. Lakkazların çoğu tipik olarak mannoz, N-asetil glukozamin ve galaktozdan oluşan kovalent bağlı karbohidrat parçası içermektedir. Fungal lakkazlar sadece havaya ihtiyaç duymaları, ürün olarak sadece su üretmeleri, geniş substrat spesifitesine sahip olmaları nedeniyle biyoteknolojik çalışmalar için, ideal yeşil teknoloji olarak göz önünde bulundurulmaktadır [32].

Bitkisel ve fungal lakkazlar arasında bir karşılaştırma yapacak olursak bitkisel lakkazlar ligninin radikal temelli polimerizasyonunda görev alırken fungal lakkazlar lignin biyodegradasyonuna katkıda bulunurlar ki bu durum funguslara yeşil teknoloji de önemli bir yer kazandırır [21]. Bitkisel lakkazlar % 22-45 ve fungal lakkazlar % 10-25 glikolize enzimlerdir. Bitki lakkazları fungal lakkazlara göre daha yüksek oranda glikozilasyonda yer alırlar. Fungal lakkazlar bitki lakkazlarından daha düşük molekül ağırlığına sahiptirler. SDS-PAGE sonuçlarına göre moleküler ağırlığının % 10-50'sinin glikozilasyona atfedildiği belirtilmiştir. Glikolizasyon salgı, bakır retensiyonu, termal kararlılık ve enzim aktivitesi için gereklidir [5].

2.5.3. Bakteriye Lakkazlar

20-25 yıl öncesine kadar lakkaz benzeri enzimler sadece fungus, bitki ve bazı böceklerden tanımlansa da lakkaz geninin ilk defa bitki kökeni ile ilişkili *Azospirillum lipoferum* adlı bir bakteride bulunması ile prokaryotlarda da lakkazın varlığı ispatlanmış [33] ve melanin oluşumunda görev aldığı belirtilmiştir [34]. Prokaryotlardaki lakkazlar ile ilgili yapılan çalışmaların devamında; yaygın olarak toprakta ve farklı ot ile tahıl türlerinin rizosferinde bulunan, aşılacağı kültür bitkilerinin büyümelerini önemli ölçüde ilerleten *Azospirillum* ve bir heterosist siyanobakteri olan *Anabaena azollae* adlı bakterilerde de lakkaz aktivitesine rastlanmıştır. Ayrıca, *Bacillus subtilis* adlı bakterinin endospor kabuğundaki kahverengi spor pigmentlerinin üretimine yol açan termostabil bir CotA lakkazını içerdiği rapor edilmiştir. Bu lakkazlar, sporların UV ışınları ve H₂O₂'den korunmasına yardımcı olabilirler [5]. *Streptomyces cyaneus*, *Streptomyces lavendulae*, *Bordetella compestris*, *Caulobacter crescentus*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia pestis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas desmolyticum* NCIM 2112, *Bacillus* sp. ADR son yıllarda rapor edilen bakteriye lakkaz kaynaklarıdır [35-40]. Bakteriye lakkazların çoğu (*A. lipoferum*, *Marinomonas mediterranea*, *B. subtilis*) hücre içinde lokalize haldedir.

Fungal lakkazların aksine bakteriye lakkazlar oldukça aktiftirler ve yüksek sıcaklıklarda, klor ve bakır iyonlarının yüksek konsantrasyonlarında ve yüksek pH değerlerinde çok daha fazla kararlıdır ve immobilize edilen spor lakkazlarının hemen hemen hepsi bütün endüstriye prosesler için uygundur [5].

2.5.4. Böceklerden Üretilen Lakkazlar

Lakkaz enzimi, *Bombyx*, *Calliphora*, *Diptera*, *Drosophila*, *Lucilia*, *Manduca*, *Musca*, *Oryctes*, *Papilio*, *Phormia*, *Rhodnius*, *Sarcophaga*, *Schistocerca* ve *Tenebrio* gibi farklı böceklerden de karakterize edilmiştir [37].

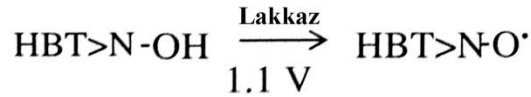
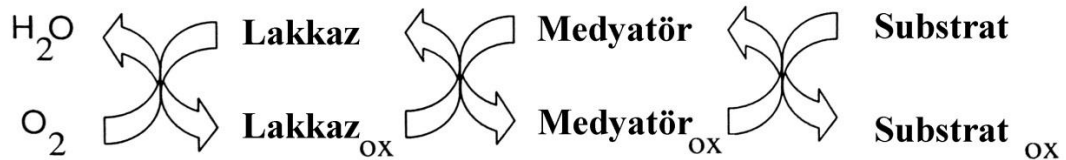
Böceklerde lakkazların kütikül tabakasını sertleştirmede aktif olduğu belirtilmektedir [21].

2.6. Lakkaz-Medyatör Sistemleri (LMSs)

Geniş substrat spesifitesi, elektron alıcısı olarak moleküler oksijeni kullanma ve tepkimeleri sonucunda su açığa çıkarma gibi özellikleri nedeniyle kullanılabilirliği yüksek olan lakkazların rapor edilen redoks potansiyelleri fenolik olmayan bileşiklerden çok daha düşük olduğu için bu enzimler bu tip substratları oksitleyemezler. Örneğin kağıt üretiminde lignin degradasyonu için lakkazın ilk kullanımı başarısızlıkla sonuçlanmıştır [41, 42].

Ancak, “**medyatör**” isimli elektron transferi görevini üstlenen küçük moleküller varlığında lakkazlar fenolik olmayan substratları oksitleyebilirler [9, 43].

Lakkazın düşük molekül ağırlıklı ABTS, HBT gibi medyatörler ile kombinasyonu lakkaz substratlarının dönüşüm verimini ve oranını arttırmasının yanında enzimin dağarcığında bulunmayan substratların oksidasyonunu katalizlemeye yol açar. LMS’ler lakkaza oranla daha yüksek redoks potansiyeline (E°) sahip substratları okside edebilmektedir. Lakkazın Tip 1 bakır merkezinde E° değeri 475-790 mV arasındadır. Ancak LMS, E° değeri 1100 mV’un üzerinde olan molekülleri oksitlemesine izin vermektedir (Şekil 2.11) [32].



Şekil 2.10. Lakkaz katalizinde medyatörlerin rolü [32]

Böylece medyatörler, bir elektron taşıyıcısı olarak davranarak yüksek molekül ağırlıklı lignin, selüloz, nişasta gibi biyopolimerlerin lakkaz ile birlikte oksidasyonunu

başarırlar. Redoks medyatörü, elektron taşıma özelliği ile enzim ve polimer arasındaki sterik engelin üstesinden gelmiş olur. LMS, yapılan birçok araştırma ve alınan patentlere göre çoğu biyoteknolojik uygulama ve çevresel uygulamalarda etkili sonuçlar ortaya koymuştur [44].

İdeal redoks medyatörleri küçük, enzimi inhibe etmeden kararlı radikallerine dönüşebilen, geri dönüşümlü bir mekanizmaya sahip özellikte olmalıdır [45]. Öncelikle enzim tarafından oksitlenerek az veya çok kararlı hale geçen radikaller, enzimatik olmayan bir mekanizma ile medyatörler tarafından enzimatik paketten uzaklaştırılır ve yüksek redoks potansiyeli nedeniyle lakkazın substratı olmayan hedef bileşiğin oksidasyonunu başarır [9, 46, 47].

Medyatörler, sterik engel nedeniyle aktif bölgeye giremeyen kompleks substratların (lignin polimerleri gibi) oksidasyonunu sağlayan elektron taşıyıcıları olarak görev yaparlar. Lakkazın ilk yapay medyatörü, fenolik olmayan lignin modeli bileşiklerin oksidasyonu için medyatör olarak kullanılan ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilen benzotiazolin-6-sülfonik asit)'dir [9]. Fenolik olmayan lignin modeli bileşiklerin [48] ve organik boyaların [49] oksidasyonu, bir elektron transfer mekanizmasının meydana gelmesini sağlayan lakkaz-ABTS sistemi ile gerçekleştirilir [50].

1990'dan beri bulunan ve oksidasyon mekanizması aydınlatılan sentetik medyatörler; 1-hidroksibenzotriazol (HBT), N-hidroksifitalimit (HPI), violurik asit (VA) veya N-hidroksiasetanilit (NHA)'tir [51-54].

Lakkaz-medyatör sistemleri kimyasal yapıları ve etkili redoks potansiyellerine bağlı olarak spesifik oksidasyon mekanizmalarına sahiptirler. Bu nedenle, aynı başlangıç maddeleriyle gerçekleştirilen tepkimelerde bile farklı ürünler elde edilebilir. Örneğin ABTS ve HBT iki farklı radikal yolu izlerler;

i) $ABTS^{\bullet+}$ veya $ABTS^{+2}$ radikallerinin elektron transferi (ET)

ii) HBT'nin nitroksil radikallerinin hidrojen atom transferi (HAT).

TEMPO (2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil) ise iyonik oksidasyon mekanizmasını takip eder.

TEMPO, trifenilamin ve fenotiyazin türevleri gibi organik bileşikler; Mn^{+2} gibi metal iyonları; 3-hidroksiantranilik asit (3-HAA), 4-hidroksibenzoik asit, fenol kırmızısı gibi fenolik bileşikler lakkazın yapay medyatörleridir. Ayrıca şiringaldehit, asetoşiringon, vanilin, asetovanilon, p-kumarik asit, sinapik asit, ferulik asit gibi lignin polimerizasyonu ile ilişkili doğal lakkaz medyatörleri de bulunmaktadır [32].

Lakkaz medyatörlerinin kullanımı endüstriyel ve çevresel uygulamalar için giderek artmaktadır [45].

Kullanımı ile ilgili yapılan ilk araştırmalar sonucunda;

- Kağıt hamuru delignifikasyonu [48, 55-57],
- Organik kirliliklerin oksidasyonu [58],
- Biyosensör geliştirilmesi [59-61],
- Biyoyakıt hücrelerinin geliştirilmesi [62],
- Tekstil biyolojik bitim işlemlerinde [63] kullanılabileceği belirtilmiştir.

Yukarıda belirtilen amaçlar için birkaç organik ve inorganik bileşik etkili medyatörler olarak kullanılmıştır. N-hidroksi ve ferrosiyanür gibi sırasıyla tiol ve fenol aromatik türevleri bunlardan bazılarıdır. Lakkaz, degradasyon ve dekolorizasyona karşı dirençli olan bazı boyarmaddeler için renk giderme işlemleri LMS'ler ile başarılmıştır. Lakkaz ve redoks medyatörleri tarafından gerçekleştirilen renk giderme uygulamaları ile çok başarılı sonuçlar elde edilmiştir [64-69].

DeniLite®, ticari lakkaz-medyatör (fenotiyazin-propiyonat) sistemi kot pantolon fabrika proseslerinde indigonun renk giderimi için kullanılmaktadır. 2001'de ZYtex Zylite isimli yine indigoyu degrade edebilecek bir lakkaz-medyatör sistemi geliştirmiştir. Tekstil boyarmaddelerinin oksidasyonu için kullanılan lakkaz medyatör sistemlerinde görev alan medyatörler; HBT, trifenilamin ve fenotiyazin gibi nitrazo bileşikleri [70]; asetoşiringon, şiringaldehit gibi dimetoksi fenoller [70-73] ve sinapik asittir [45].

LMS'nin bütün bu avantajları yanında iki büyük dezavantajı kullanımlarını kısıtlamaktadır; pahalıdır ve toksik türevler oluşturabilirler. Hatta bazı durumlarda medyatörün oksidasyonu sırasında oluşan medyatör radikalleri, lakkazı inaktive edebilir

ya da medyatör özelliği olmayan inaktif moleküllere dönüşebilirler. Bilim dünyası son zamanlarda maliyeti düşük ve çevreye duyarlı doğal medyatörlere yönelmiştir. Funguslar tarafından üretilen bu medyatörler fenol, anilin, 4-hidroksi benzoik asit, 4-hidroksibenzil alkol olarak tanımlanmıştır. Günümüzde boyarmaddelerin renk giderimi, polisiklik aromatik hidrokarbonların yok edilmesi, kağıt hamurunun ağartılması için doğal lakkaz medyatörleri olan ve lignin degradasyonunda rol alan fenolik bileşikler (asetoşiringon, şiringaldehit, vanilin, asetovanilin, ferulik asit, p-kumarik asit) hayli etkili lakkaz medyatörleri olarak belirtilmektedir. Bu doğal bileşikler düşük maliyetlerle elde edilebilmeleri ve çevreye karşı duyarlı olmaları nedeniyle biyoteknolojik prosesler için önemlidirler [32].

2.7. Lakkazın Endüstriyel ve Biyoteknolojik Uygulamaları

Lakkazlar, onları birçok biyoteknolojik uygulama için oldukça kullanışlı hale getiren fenolik ve fenolik olmayan lignin türü bileşiklerin yanı sıra dayanıklı çevresel kirlilikleri de okside edebilme yetenekleri nedeniyle son yıllarda araştırmacılar tarafından yoğun ilgi görmektedirler. Özellikle kağıt ve kağıt hamurundan kaynaklanan endüstriyel atıkların detoksifikasyonunda, tekstil ve petrokimya endüstrisinde, medikal diagnostik alanda ve bir biyolojik iyileştirme ajanı olarak topraktaki ksenobiyotik maddelerin, herbisit, pestisit ve bazı tahrip edicilerin yok edilmesinde kullanılmaktadır. Lakkazlar ayrıca, bazı su arıtma sistemlerinde temizleme ajanı, anti-kanser ilaçlarının üretilmesinde katalizör ve hatta kozmetik ürünlerinde de kullanılmaktadır. Polimerik ürünlerin üretimi için de lakkaz önemli bir sentez aracıdır [44].

Fizikokimyasal yöntemler, büyüyen çevresel kaygılar, yasal kısıtlamalar, artan bilgi birikimi gibi birçok nedenden dolayı farklı endüstriyel uygulamalar için günümüzde yeşil kimya teknolojilerinde büyük yer kaplayan enzimlerle ilgili yapılan çalışmalar takip edilmektedir. Lakkaz katalizli reaksiyonlar, genellikle çevre dostudur ve uygulama alanları geniştir. Lakkazın ko-substrat olarak sadece oksijene ihtiyaç duyması, reaksiyon ürünü olarak sadece su açığa çıkarması, lakkaz medyatör sistemleri ile daha da genişleyen substrat çeşitliliği bu enzimlerin endüstriyel ve biyoteknolojik alanlarda dikkat çekmesi için yeterlidir. Sonuç olarak son yıllarda lakkazın uygulama alanları ile ilgili yapılan araştırmalarda çok büyük artış görülmektedir.

Bu alanları genel anlamda sınıflandıracak olursak;

- Kağıt endüstrisi (Biyolojik kağıt ve ağartma)
- Biyolojik iyileştirme (Renk giderme, poliaromatik hidrokarbon degradasyonu, vb)
- Tekstil Endüstrisi (Ağartma, Denim işlemleri)
- Gıda Endüstrisi
- Organik Sentez
- Biyosensör ve İmmünassay Teknikler

Kağıt Endüstrisi

Kağıt üretimi için gerekli olan ligninin uzaklaştırılması ve buna bağlı olarak kağıdın ağartılması işlemleri için lakkazlar kullanılmaktadır.

Odunun yapısında bulunan lignin ve fiberler birbirlerine yapışık haldedirler. Kağıt üretimi için, fiberlerden ligninin degradasyon ile uzaklaştırılması gerekmektedir (delignifikasyon). Klasik yöntemler ile yapılan lignin uzaklaştırma işlemleri sonucunda elde edilen kağıdın karakteristik özellikleri çok iyi değildir ve güneş ışığına maruz bırakıldığında çabuk sararır. Ayrıca bu işlemler sırasında enerji tüketimi çok yoğundur ve kullanılan kimyasallar (ClO_2 , vb) çevre için büyük bir yük oluşturur. Beyaz çürükçül fungusların, ligninolitik enzimler (Lakkaz, Lignin peroksidaz, Mangan bağımlı peroksidaz vb) için verimli bir kaynak olmasının keşfedilmesi ile kağıt üretimi ve ağartılması işlemleri daha yumuşak koşullarda gerçekleştirilmeye başlanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda lignin degradasyonu için birkaç enzimatik işlem belirlenmiştir. Fungal lakkazlar lignin yapısında bulunan fenollerin sadece % 10'nunu yükseltgeyebilirken medyatörler yardımı ile bu oran arttırılmış ve lakkazları delignifikasyon ve ağartma işlemleri için potansiyel hale getirmiştir.

Kompozit malzeme yapımında da, lakkazlar lignini yükseltgeyerek birbirleriyle tepkimeye girmelerini ve böylece daha sıkı yapıların elde edilmesini sağlarlar [7, 17].

Biyolojik İyileştirme

Fungal lakkazlar, dirençli çevresel kirliliklerin degradasyonu için kullanılmaktadırlar. *Pycnoporus cinnabarinus*, *P.ostreatus*, *T.versicolor*, *C.gallica* gibi iyi birer lakkaz üreticisi olan beyaz çürükçül funguslar yardımı ile biyolojik iyileştirme işlemleri gerçekleştirilmektedir [44].

Lakkazlar, endüstriyel atıklarda, kirli toprak ve kirli sularda bulunan farklı aromatik ksenobiyotiklerin ve kirliliklerin oksidatif detoksunda kullanılmaktadırlar. Lakkazlar ile direkt olarak klor giderimi, aromatik halka kırılması, polisiklik aromatik hidrokarbonların mineralizasyonu, kağıt hamuru ve pamuk mili artıklarının degradasyonu, tekstil boyarmaddelerinin renk giderme işlemleri gerçekleştirilir [17].

Ksenobiyotiklerle birlikte poliallilamin hidroklorürler (PAH) toprak kirliliğinin temel kaynağını oluştururlar. Bu nedenle, bu tür bileşiklerin parçalanması ekolojik denge için oldukça önemlidir. Lakkaz enzimlerinin katalitik özellikleri yardımıyla fosil yakıtların kullanılmasından ve petrolden kaynaklanan PAH'lar lakkaz enzimleri tarafından parçalanabilmektedir [7].

Panus tigrinus ve *Coriolus versicolor* funguslarından elde edilen lakkaz ve Mn-peroksidaz enzimleri ile 2,4,6-triklorfenol bileşiği, 2,6-dikloro-1,4-hidrokinol ve 2,6-dikloro-1,4-benzokinona dönüştürülebilmektedir. *Trametes hirsuta* fungusundan elde edilen lakkaz ile farklı alken bileşikler HBT gibi medyatörler varlığında keton veya aldehite oksitlenebilmektedir. *Coriolopsis gallica* lakkazı ABTS ve HBT varlığında karbazol, N-etil karbazol, flüorin ve dibenzotiofen gibi zararlı bileşikler oksitleyebilmektedir. Ayrıca, 2,6-dimetoksifenol, 4-izopropenil fenol, bisfenol-A gibi fenolik bileşikler de çeşitli fungal lakkazlar ve medyatörler yardımı ile bulundukları ortamdan uzaklaştırılabilmektedirler [4].

Tekstil Boyarmaddelerinin Renklerinin Giderilmesi

Tekstil boyarmaddelerinin renk giderimi için yapılan işlemler biyolojik iyileştirmenin basamaklarından biridir.

Lakkazların, tekstil boyarmaddelerinin renk giderimi için iyi bir potansiyele sahip oldukları belirtilmektedir [73].

Tekstil ürünlerinin renklendirilmesi işlemlerinde, etkili olmayan yöntemler yüzünden boyarmaddelerin % 10-15'i çevreye bırakılmaktadır [74].

Bu durum suda yüksek oranda istenmeyen kirlilik birikimine yol açmıştır. Piyasada ticari olarak satılan 100.000'den daha fazla türde boyarmadde bulunmaktadır. Tüm dünyada her yıl yaklaşık 800.000 ton renklendirici kullanılmakta ve en az % 10'u atık sularla çevreye yayılmaktadır. Işığa, sıcaklığa ve mikrobiyal etkilere karşı dayanıklı olan bu bileşikler çevrede bozulmadan kalmaktadırlar. Boyarmaddeler, aromatik yapılı bileşiklerdir ve farklı türde bağ yapıları içerirler. Bu endüstriyel atıklar zehirlidir ve atık sularda yüksek kimyasal oksijen ihtiyacı ile biyolojik oksijen ihtiyacı oranı KOİ/BOİ, süspanse halde bulunmaları ve canlı renkleri ile karakterize edilirler. Renk giderimi kimyasal ve adsorbsiyon, koagülasyon-flokülasyon, iyon değişimi, oksidasyon ve elektrokimyasal yöntemler ile giderilebilir. Ancak bu yöntemler pahalı ve uygulamaları sınırlıdır. Tekstil endüstrisinde yer alan boyarmaddelerin yapısal çeşitliliği arıtma ile ilgili mevcut yöntemlerin tartışılması gerekliliğini ortaya koymuş ve pratik biyokimyasal yöntemlerin geliştirilmesi gerekliliğini doğurmuştur. Lignin degradasyonunda yer alan enzimlerin kullanılabilirliği boyarmaddelerin arıtımı ile ilgili alternatif yöntemlerin ortaya çıkmasına yol açmıştır [17].

Beyaz çürükçül fungusların sahip oldukları ligninolitik enzim sistemleri azo, heterosiklik, reaktif ve polimerik boyarmaddelerin degradasyonu için oldukça etkili sonuçlar sergilemişlerdir [75].

Lakkazlar diğer ligninoseleülozik enzimlere göre daha avantajlı oldukları için uygulama alanları daha geniştir. Serbest, immobilize lakkaz ve lakkaz medyatör sistemleri yardımıyla çok sayıda renklendirici için renk giderme prosesleri kesikli ve sürekli sistemler ile çalışılmıştır [17].

Zamora ve arkadaşları, imidazol ile modifiye edilen silika, karbodiimid/glutaraldehit ile modifiye edilen cam seramiğe, amberlit IRA-400'e ve aminopropiltrietoksilan/glutaraldehit ile modifiye edilen kile *Trametes versicolor* lakkazının immobilizasyonu gerçekleştirmişlerdir. Elde ettikleri immobilize lakkaz

sistemlerinin reaktif mavi-19, reaktif siyah-5, reaktif turuncu-122 ve reaktif kırmızı-251 boyarmaddelerinin renklerini giderme etkilerini incelemişlerdir. Serbest ve immobilize enzimlerin renk giderme aktivitesine HBT'nin etkisi çalışılmış ve bu medyatörün renk giderimine etkisi belirlenmiştir [76].

Palmieri ve arkadaşları, *Pleurotus ostreatus* fungal enziminin reaktif mavi-19 üzerine etkilerini incelemişler ve boyarmaddeyi substrat olarak kullanarak ortamın sıcaklık ve pH'nın etkilerini çalışmışlardır. Enzimin 3-6 gün içerisinde RB-19 için % 90'ın üzerinde renk giderimi etkisine sahip olduğunu belirlemişlerdir [77].

Kokol ve arkadaşları, *Ischnoderma resinosa* ekstrasellüler lakkazının RB-19, RY-15, Reaktif siyah 5, Reaktif kırmızı 22'nin renklerini HBT ve VA varlığında giderme aktivitelerini belirlemişlerdir [78].

Ramsay ve arkadaşları, reaktif siyah 5, reaktif mavi 19 ve reaktif kırmızı 22 boyarmaddelerinin renklerini alginata enkapsülasyon yöntemi ile immobilize edilen lakkaz ile giderilebildiğini belirlemişlerdir [79].

Salony ve arkadaşları tarafından, *Cyathus bullerianus* ürettiği fungal lakkaz ile birçok azo ve asit boyarmaddelerin renklerinin giderildiği rapor edilmiştir [80].

Kunamneni ve arkadaşları, *Ascomycete Myceliophthora thermophila* fungal lakkazını epoksi ile aktive edilen taşıyıcılara immobilize ederek tasarladıkları sürekli sistem ile reaktif siyah 5, asit mavi 25, metil oranj, RB-19, metil yeşil, asit yeşili boyarmaddelerinin renk giderimi etkilerini inceleyerek medyatör varlığında iyi sonuçlar elde etmişlerdir [81].

Kumar ve arkadaşları, *P. ostreatus* lakkazından TPP yöntemi ile saflaştırılan lakkazın, metil yeşil, violet, indigo karmin, metilen mavisi, reaktif yeşili, reaktif sarı, reaktif turuncu, reaktif violet, reaktif siyah ve metil kırmızısı boyarmaddelerinin renklerini giderme etkilerini değerlendirmişlerdir. Redoks medyatörü kullanmadan trifenil metan, azo ve indigo boyarmaddelerinin renk gideriminde lakkazın etkili olduğunu rapor etmişlerdir [82].

Khammuang ve arkadaşları, yenilebilir bir mantar olan *Ganoderma* sp.'den lakkazı amonyum sülfat ile çöktürerek DEAE-selüloz anyon değiştirici kromatografi ile

saflaştırmışlardır. Elde edilen lakkazın RB-19'un rengini 30 °C'de, beş saatte % 80 oranında giderdiğini bildirmişlerdir [24].

Cristovao ve arkadaşları, adsorbsiyon tekniği ile yeşil hindistan cevizi kabuğuna immobilize ettikleri ticari lakkazın Reaktif Sarı (15, 176), Reaktif Kırmızı (239, 180), Reaktif Siyah-5 ve Reaktif Mavi 114 boyarmaddelerinin rengini giderme etkilerini belirlenen optimum koşullarda incelemişlerdir [83].

Gedikli ve arkadaşları, *Trametes versicolor*'dan elde edilen lakkaz ile 55°C'de (pH 4.0) 75 mg/L derişimli kot boyarmaddesinin rengini 120 dakikada % 68.02 oranında giderdiklerini rapor etmişlerdir. Ayrıca reaksiyon ortamına çeşitli metal iyonları ve tekstilde kullanılan yardımcı kimyasallar ekleyerek renk giderme oranına etkilerini incelemişlerdir [84].

Wong ve arkadaşları, *Trametes versicolor* lakkazının çeşitli azo, antrokinon ve indigo boyarmaddelerine medyatörsüz ve ABTS'li ortamda etkilerini incelemişlerdir [69].

Mechichi ve arkadaşları, *Trametes trogii*'den izole edilen lakkazın reaktif mavi-19 için gösterdiği renk giderme aktivitesini inceleyerek, Fe⁺², SDS, L-sistein, ve EDTA gibi kimyasalların renk giderme aktivitesine etkilerini kıyaslamışlardır. 100 mg/L konsantrasyona sahip boyarmadde çözeltisi için % 90 oranında renk giderimi elde etmişlerdir [85].

Zang ve arkadaşları, *Panus Rudis*'tan elde edilen lakkazın asit yeşil-27, asit violet-7 ve indigo kırmızısı boyarmaddeleri için renk giderme aktivitelerini incelemişlerdir. ABTS'nin renk giderimine etkisini belirlemişlerdir [86].

Ayrıca, *Bacillus* sp. ADR ve *Pseudomonas desmolyticum* NCIM 2112 bakteriyel lakkazları ile de renk giderme işlemleri tanımlanmıştır [87, 88].

Tekstil Endüstrisinde

Liflerin yapısında bulunan yağlar, mumlar, pektinler, proteinler ve pigmentler gibi doğal renklendiriciler ön terbiye işlemleri ile liflerden uzaklaştırılmalıdır. Ön

terbiye işlemleri, tekstil yüzeyinin boya, baskı ve bitim işlemlerine hazırlanmaları için gerçekleştirilen işlemlerdir. Renklendiricilerin uzaklaştırılması için ağır koşullarda tekstil yüzeyleri yükseltgen maddeler ile birkaç kez işleme sokularak ağartma işlemi gerçekleştirilir. Yoğun miktarda kullanılan ağartıcıların fazlası, işlem sonunda kumaşın defalarca yıkanması ile atık sulara geçmektedir.

Tzanov ve arkadaşları, pamuğun kimyasal olarak ağartılması prosesinden önce gerçekleştirdikleri lakkaz ön işlemi ile; Basto ve arkadaşları da yine pamuğun lakkaz ile ağartılması ile ilgili yaptıkları çalışmalar ile başarılı olmuşlardır. Böylece daha hafif koşullarda ve kısa süren işlemler ile ağartma prosesleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca işlemin uygulandığı pamuklu kumaşların beyazlık dereceleri de artmıştır. LMS ağartıcı sistemler patentli olarak çeşitli firmalarca kullanılmaktadır (DeniLite®).

Denim yıkama işleminde, denim kumaşlar ponza taşı ile taşlandıktan sonra sodyum hipoklorit ile ağartılırlar. Muamele sonunda, kumaş yüzeyi nötrleştirilerek tekrar tekrar yıkanır. Atık yıkama sularının çevreye verdiği zarar nedeniyle alternatif yöntemler aranmış ve lakkazların bu tip kumaşların ortak boyarmaddesi olan indigo'nun rengini açabildiği belirlenmiştir. Novozyme (Novo Nordisk, Danimarka) firması 1996'da bu işlem için lakkazı endüstriyel açıdan kullanmaya başlamıştır [89].

Ayrıca lakkazlar, tekstil fiberlerinin yüzeylerine bağlanarak tekstil ürünlerine antioksidan, antibakteriyel ve su itici özellikler kazandırmaları ile ilgili çalışmalarda da yer almaktadırlar [1].

Gıda Endüstrisinde

Gıda endüstrisinde, bira, içme suyu ve yağ fabrikalarının atık sularında bulunan fenolik bileşiklerin biyolojik olarak iyileştirilmesi; meyve suyu ve alkollü içeceklerde fenolik bileşikler nedeniyle oluşan bulanıklığın giderilmesi için geliştirilen ekolojik proseslerde fungal lakkazlar kullanılmaktadır [17].

Biyosensör ve Diagnostik Uygulamalar

Biyosensörler, klinik tanılarda ve çevre analizlerinde dedektör olarak kullanılmaktadır. Lakkaz temelli birçok biyosensörün prensibi, analitin oksidasyonu sırasında gerçekleşen oksijen tüketiminin izlenmesidir. Lakkazların kofaktöre ihtiyaç duymadan elektron transfer tepkimelerini katalizleyebilme özellikleri, biyosensör geliştirme ile ilgili çalışmalarda da yer edinmelerini sağlamıştır. Fenol, anilin, morfin, kodein, kateşolamin, bitki flavonoidleri gibi maddelerin tanınması ve immünoassay çalışmaları için lakkazın immobilize edildiği biyosensörler geliştirilmiştir [44]. Lakkazlar antibadi, antijen, DNA, RNA, biyotin gibi moleküllere kovalent olarak bağlanabildikleri için immünokimyasal, histokimyasal veya nükleik asit tanıları için kullanılabilirler [17].

2.8. Lakkazın İzolasyonu ve Saflaştırılması

Proteinler, heterojen özellik taşıyan makromoleküller olmaları nedeniyle biyolojik proseslerde yaygın olarak yer almaktadırlar. Doğal ortamları dışında kararlı değildirler. Hücre içi ve hücre dışı ortamlarda farklı özellikler sergilerler. Hücrenin büyük bir miktarını oluşturdıkları için canlı organizmanın en önemli bileşenleridirler ve hücrelerin ana fonksiyonlarını gerçekleştirirler.

Proteinlerin çeşitli biyolojik fonksiyonlarının öğrenilmesi ve biyoteknolojik çalışmalarda bu makromoleküllere duyulan ihtiyacın artması ile protein izolasyonu ve saflaştırma prosesleri önem kazanmıştır. Günümüze gelinceye kadar birçok izolasyon, saflaştırma ve yapı analizi tekniği geliştirilmiştir. İzole edilerek saflaştırılacak protein için hedeflenen saflık oranı, proteinin kullanım amacına göre değişmektedir. Yapı analizi gibi araştırma hedefli kullanılacak ise saflık düzeyi çok yüksek olmalıdır. Ancak, endüstriyel işlemlerde kullanılacak proteinin saflık düzeyi daha düşük olabilir. Kararlı, bol miktarda ve iyi karakterize edilmiş olması yeterlidir [90].

2.8.1. Kaynak Seçimi

Lakkazlar için Bölüm 2.5'te de belirtildiği gibi yüksek bitkiler, funguslar, bakteriler ve böcekler doğal enzim kaynağıdır. Yapılan enzim izolasyonu ve saflaştırma çalışmalarında, seçilen kaynaktan hedeflenen protein hem kararlı hem de bol miktarda bulunmalıdır. Ayrıca kaynağın kolay sağlanabilir ve ucuz olması da önemlidir. Seçilen organizmaya göre ilgili proteinin nerede bulunduğu (organ, doku, hücre, organel vb.) ve elde edilecek proteinin hangi amaçla kullanılacağı bilinmelidir.

Beyaz çürükçül funguslar, en çok çalışılan lakkaz kaynağı olarak literatürlere geçmişlerdir. Endüstriyel anlamda da en çok kullanılan lakkaz kaynağı yine bu fungus türleridir. Özellikle *Basidiomycetous* ailesinden *Pleurotus ostreatus*, *Trametes trogii*, *Hericium erinaceum*, *Tricholoma giganteum*, *Cantharellus cibarius*, *Trametes versicolor* ve *Phanerochaete chrysosporium*, *Lentinula edodes* lakkaz üretiminin gerçekleştirildiği önemli fungus kaynaklarıdır [24].

Lakkazlar ekstraselüler enzimler olarak bilinseler de, mantarların yenilebilir kısımlarından da intraselüler yapılı lakkaz enzimleri izole edilerek ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

Zhang ve arkadaşları; *Clitocybe maxima* mantarından 0.15 M NaCl ile izole ettikleri lakkazı amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değiştirici kromatografi (DEAE-selüloz, SP-sepharoz ve Q-sepharoz) uyguladıktan sonra jel filtrasyonu ile saflaştırmışlardır. SDS-PAGE yöntemi ile saflık kontrolünü yaparak molekül ağırlığını tayin etmişlerdir [23].

Khammuang ve arkadaşları; *Ganoderma* sp. MK05 lakkazını destile su ile izole ederek amonyum sülfatlama ile proteinleri çöktürme işlemini gerçekleştirmişlerdir. Yapılan DEAE-selüloz iyon değiştirici kromatografi ile saflaştırma işlemini tamamlamışlardır [24].

Wang ve Ng; *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus eryngii*, *Albatrella dispansus*, *Hericium erinaceum*, *Tricholoma giganteum*, *Cantharellus cibarius* yenilebilir mantar türleri ile çalışmışlardır. Çalışmalarında destile su ile mantar ekstraktlarını bu kaynaklardan lakkaz izole ederek sırasıyla DEAE-Selüloz iyon değiştirici kromatografi, affinite kromatografisi, CM-selüloz ile iyon değiştirici kromatografi ve Sephadex 75

ile FPLC-jel filtrasyonu işlemlerini gerçekleştirmişler ve saflaştırdıkları lakkazların karakteristik özelliklerini incelemişlerdir [25-30].

Başoğlu ve Yağar, Tekirdağ-Saray ilçesinden toplanan *Boletus edulis* mantarını 0.15 M NaCl çözeltisi ile homojenize ettikten sonra elde edilen ham ekstrakta % 40-60 amonyum sülfat çöktürmesi uygulamıştır. Tuzlu örneklerin dializi sonucu elde edilen dializatı enzim kaynağı olarak kullanmıştır [31].

Bu tez çalışmasında, lakkaz kaynağı olarak Kırklareli-Demirköy çevresinden toplanan, yenilebilir *Boletus edulis* mantarları kullanılmıştır. *Boletus edulis* mantarından izole edilen lakkaz enzimi, ilk kez üçlü faz ayırma yöntemi ile kısmi olarak saflaştırılmıştır.

2.8.1.1. *Boletus edulis*

Mantarlar, ekosistemin önemli parçalarından biridir. Son 2 milyar yıldır bitki ve hayvansal yapıları çürüttükleri bilinmektedir. Yapılarındaki protein yapılı enzimler, çürütme işlemini katalizleyen biyomoleküllerdir. Orman ekosistemlerinde karbondioksit salınımını gerçekleştirmektedirler. Ayrıca toprağın yapısını bitki gelişimi için uygun hale getirirler. "Mikoriza" denilen ortaklıklar oluşturarak bitkilerin köklerine tutunurlar ve bitki köklerinden karbonhidrat alırlar. Bu sırada bitki de, mantarın hifleri yardımı ile topraktan su ve suda çözünen tuzları adsorblar [91, 92].

Boletus edulis, *Boletaceae* familyasından yenilebilen bir şapkalı mantar türüdür (Şekil 2.12). *Bolet* Latince "üstün mantar", *edulis* "yenebilen" anlamındadır. Avrupa, Asya ve Amerika'nın kuzey bölgelerinde sıklıkla yetişen bir mantar türüdür. Türkiye'de yaygın olarak "Ayı" veya "Çörek" mantarı olarak anılmaktadır. Yurt dışında da "Çörek" ve "Cep" mantarı olarak isimlendirilir. İtalyanlar "Porcini" olarak isimlendirmektedirler. Çok lezzetli ve hoş kokulu bir mantar türüdür. Şapkasının boyutları 7-30 cm arasında değişmektedir. Şapkasının rengi kestane kahverengisidir ancak uçlara doğru renk açılmaktadır. Şekli kabarmış çöreğe benzer. Borucukları, bir arada ve birbirlerine sıkıca bağlıdırlar. Sapa boyları kısalarak bağlanır, uzun ve incedirler. Önce boz beyaz daha sonra yeşilimsi sarı, zeytin yeşili rengindedir, şapkadan

kolayca ayrılabilirler. Delikçikler, minik ve yuvarlaktır. Renkleri yaşam süreci içinde kirli beyazdan sarıya ardından da yeşilimsi sarıya dönüşmektedir. Sapları kuvvetlidir. İlk zamanlarında sapları kısa ve alt kısımlarına doğru şişkindir. Büyüme süresince sap boyları uzar ve düzgün bir hal alır. Sap boyu 15-20 cm, sap genişlikleri 3-4 cm civarındadır. Renk bakımından önce beyaz açık bozdur, sonra esmer kahverengiye döner. Yukarı kısmı, ince, belirsiz beyaz soluk renkli damarlı ağ gibi görünüşe sahiptir, bazen bütün yüzeyi böyledir. Etli kısmı gençken sert, beyazımsı, olgunlaşınca yumuşak, sünger gibi sarımsıdır. Şapkada dış zarın altı koyu kahverengi renktedir. Spor izi sarıdır. Haziran-Ağustos ve Eylül-Kasım arası meşe, huş, kayın, çam, ladin ağaçlarının altında ve çevresinde, asidik yapılı topraklarda, ormanlık yolların kenarlarında ve çürümüş yaprakların altında bol miktarda görülmektedir [93-96].



Şekil 2.11. *Boletus edulis* mantarı [93]

2.8.2. Lakkaz İzolasyonu

Proteinler heterojen özellik taşıyan biyomoleküllerdir ve doğal ortamları dışında kararlı olmayabilirler. Hücre içi bir proteinin saflaştırılması için öncelikle bulunduğu hücre ve dokuların proteine zarar verilmeden parçalanması gerekmektedir. Proteinin izolasyonu, protein için uygun koşullar sağlanarak (pH ve sıcaklık) belirlenen fiziksel ya da kimyasal bir yöntem ile gerçekleştirilebilir. Bu işlem sırasında ortamın pH değerini sabit tutacak bir tampon çözeltisi kullanılarak proteinin denatüre olması engellenmelidir. Aynı zamanda izolasyon sırasında proteinleri çözünür hale getirmek için yüzey aktif maddeler kullanılabilir.

Doku ve hücre parçalanması sonucu kaynaktan izole edilerek çözünürleştirilen proteinlerden istenmeyen partiküllerin uzaklaştırılması ve böylece protein çözeltisinin

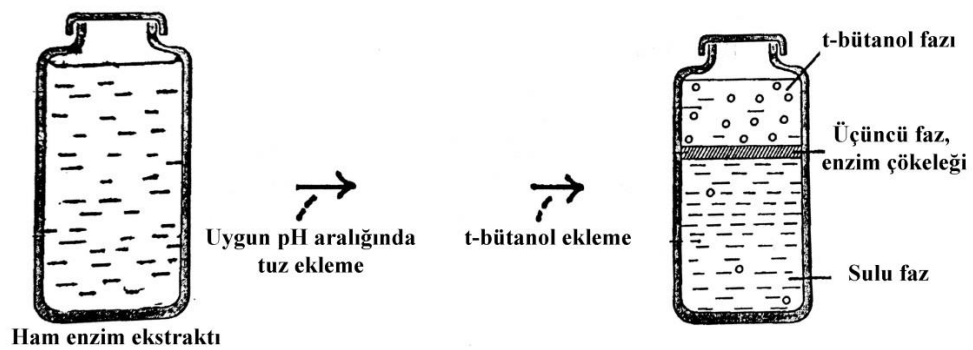
berraklaştırılması için partiküllerin boyutu ve yoğunluğuna göre ayırma prensibine dayanan santrifüj, ultrasantrifüj işlemleri gerçekleştirilir [90].

Bu tez çalışmasında, taze *Boletus edulis* mantarları, 0.15 NaCl ile Waring blendırda homojenize edildikten sonra istenmeyen partiküllerin uzaklaştırılması için santrifüj işlemi uygulanmış ve ham ekstrakt elde edilmiştir.

2.8.3. Lakkazın Üçlü Faz Ayırma Tekniği ile Deriştirilmesi ve Kısmi Saflaştırılması

Enzimlerin izolasyonu ve saflaştırılması ile ilgili farklı yöntemler geliştirilmesine rağmen bunların çoğu yöntemlerin zorluğu, işlem basamağı sayısının çok olması ve üretim maliyetleri nedeniyle hedef proteinler için kolay, etkili ve ekonomik yöntemler değildir.

Üçlü faz ayırma tekniği (TPP), proteinlerin izolasyonu ve çöktürülmesi için kullanılan alternatif bir yöntemdir. Yöntem, ham ekstrakta önce tuz ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ardından da organik bir çözücü (tersiyer-bütanol) eklenmesi ile gerçekleştirilir. Eklemekten sonra bir saat içinde en üstte organik, en altta sulu çözelti ve ortada protein çözeltisi olmak üzere üç faz oluşumu gözlenir (Şekil 2.12.).



Şekil 2.12. Üçlü faz ayırma tekniği (TPP) [97]

Amonyum sülfat tuzu, sulu çözeltilerden proteinlerin salting-out yöntemine göre alınması için geleneksel bir kosmotropik maddedir. Kosmotroplar, protein ekstraksiyonu ve saflaştırma işlemlerinin farklı basamaklarında ve farmakolojik

preparasyonlardaki proteinlerin çöktürülmesi için kullanılırlar. Amonyum sülfat tuzu, proteinlerin yüklü yüzeylerindeki etkileşimi arttırarak çökmelerini sağlar. *t*-bütanol ise bağlı olduğu protein çökeleklerinin yüzdürme kuvvetini arttırarak onların yoğun tuz çözeltisinin üzerinde yüzmesini sağlar. Kalan proteinler, sakkaritler, hücre parçaları, zenginleştirilmiş halde en alt fazda yer alırken, pigmentler, lipitler veya hidrofobik materyaller üst fazda konsantre haldedir. Protein içeriği fazla olan orta faz diğer iki fazı birbirinden ayırmaktadır. Kozmotropi, salting out, kosolvent çöktürme, izoionik çöktürme, osmotik elektrostatik güçler ve protein hidrasyon değişimlerinin tamamı orta fazda çöken proteinlerin nedenidir. Organik çözücüler ile çöktürme, izoelektronik noktada çöktürmenin prensibi ile aynı prensibe sahiptir. Organik çözücüler dielektrik sabiti dolayısıyla çözme kuvvetini düşürürler. Böylece proteinlerin çözünürlüğü azalır. Elektrostatik çekimlerin etkisi ile agregasyon meydana gelir. TPP ile çöken enzimlerin tekrar çözdürülmesi hacimsel ve spesifik aktivitlerini geri kazandırmaktadır. *t*-bütanol, oda ve daha yüksek sıcaklıklarda bir araya getirme ajanı gibi davranmaktadır. C-1 ve C-2 kosolventlerinin (etanol gibi) bu tip özellikleri yoktur [97, 98].

TPP ilk olarak ham selüloz [99] ve diğer enzimlerin litre bazında çöktürülmesi için bir ön işlem tekniği olarak geliştirildi [100]. Bu çalışmanın devamında TPP, izolasyon sonrası çöktürme işlemlerinde de sıkça kullanılmaya başlandı. TPP yönteminin kökeni, 1972'de *t*-bütanol-su karışımında birçok enzimin aktivite gösterebildiğinin belirlendiği bir çalışmaya dayanır [101]. Bazı enzimler *t*-bütanol-su karışımında katalitik aktivite gösterebilirken sadece birkaç enzim ve protein bu tip kosolvent-su karışımlarında aktivitelerini kaybetmişlerdir. Yapılan farklı bir çalışmada, izole edilen eritrosit enzimlerinden hemoglobin gibi istenmeyen proteinlerin bir yana toplanıp ayrıldığı görülmüştür. Böylece, TPP'nin hedeflenen proteinleri istenmeyen proteinlerden ayırmak için de kullanışlı bir yöntem olduğu belirlenmiştir [102].

TPP, farklı enzimlerin aktivitelerini % 100-1000 oranında arttırmıştır. TPP, kolayca ölçeklenebilir ve direkt olarak ham ekstraktlara uygulanabilir bir işlemdir [97, 103].

Kumar ve arkadaşları tarafından, *P. ostreatus* fungusundan üretilen lakkazın TPP yöntemi ile saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Yapılan işlemde ham ekstrakt % 60 amonyum sülfat tuzu ile doyurulduktan sonra santrifüj tüplerine, tuzlu ham ekstrakt:*t*-

bütanol oranı 1.0:1.8 (v/v) olacak şekilde *t*-bütanol eklenmiş ve 45 °C sıcaklıkta faz ayrımı için beklenmiştir. Faz oluşumundan sonra tüpler 2000xg’de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Orta fazda bulunan enzim ayrılarak, 0.1 M asetat tamponunda (pH 4.0) çözülmüştür. Elde edilen lakkazın özellikleri incelenmiş ve bazı sentetik boyarmaddelerin renk giderme etkinlikleri belirlenmiştir [82].

Akardere ve arkadaşları, ekmek mayasından (*S. cerevisiae*) elde ettikleri ham invertaz ekstraktını % 50 oranında amonyum sülfat tuzu ile doyurduktan sonra tuzlu ekstrakt:*t*-bütanol oranı 1.0:0.5 (v/v) olacak şekilde TPP uygulamışlardır. 15 kat daha saf ve % 363 oranında yenilenen aktiviteye sahip invertaz elde etmişlerdir [104].

Şen ve arkadaşları, pepinodan (*Solanum muricatum*) TPP ile α -galaktozidaz enzimini 6.2 kat daha saf halde elde edilerek % 127 oranında aktivitede iyileşme olduğunu belirlemişlerdir [103].

Rajeeva ve arkadaşları tarafından *Ganoderma* sp. WR-1 kültüründen elde ettikleri lakkazı iki basamaklı TPP ile % 60 oranında saflaştırılmışlardır [105].

Kat ve arkadaşları, kokulu kara üzümünden üçlü faz sistemi ile saflaştırdıkları invertaz enziminin termal kararlılığını incelemişlerdir [106].

Aynı zamanda, *Aspergillus oryzae*’den invertaz ve α -galaktozidaz; domatesten pektinaz ve α -galaktozidaz; *Dacus carota*’dan fosfolipaz D; *Aspergillus niger*’den ksilanaz, domatesten invertaz, *Calotropis procera* lateksinden ve papaya kabuklarından proteaz saflaştırılması için de TPP kullanılmıştır [103].

Bu tez çalışmasında, Bölüm 2.8.2’de belirtildiği şekilde *Boletus edulis*’ten izole edilerek elde edilen ham ekstraktın kısmi saflaştırılması için TPP uygulanmıştır.

TPP yönteminden sonra, elde edilen amonyum sülfatlı çözeltiden tuzun uzaklaştırılabilmesi için 0.1 M sodyum asetat tamponuna (pH 4.5) karşı dializ işlemi gerçekleştirildi. Dializ işlemi, manyetik karıştırıcı üzerinde + 4 °C’de 24 saat boyunca tamponun 3 kez değiştirilmesi ile tamamlandı.

Elde edilen dializat “enzim kaynağı” olarak kullanıldı.

2.9. Lakkazın İmmobilizasyonu

Bir enzimin immobilizasyonu genel olarak, enzimin çözünmeyen bir desteğe tutturulması olarak tanımlanabilir [107]. Gerçek anlamda ilk enzim immobilizasyon denemelerinin sonuçları 1950’li yıllarda birçok çalışma grubu tarafından aynı anda yayınlanmıştır. Daha sonra bu alandaki çalışmalar dünyanın her tarafından popülerite kazanmış olup enzimler değişik amaçlarla immobilize edilmiştir [108].

Enzimlerin stereoizomerik, yönsel ve kimyasal özgüllüklerinin yanı sıra doğal ve deneysel koşullarda aktivitelerini gösterebilmeleri onların çevresel ve biyoteknolojik uygulamalarda yer almalarını sağlamaktadır. Ancak bir enzimin verdiği tepkime için “uygun” olarak tanımlansa bile uygulama koşullarında uzun süre kararlılığını sürdürememesi ve tekrar kullanılamaması enzimlerin pratikte kullanılabilirliğini sınırlamaktadır. Enzimlerin immobilizasyonu uygulamalardaki bazı kısıtlamaların üstesinden gelebilmektedir. İmmobilize enzimlerin üstünlüklerini sıralayacak olursak;

- Enzimlerin kararlılığı artar.
- Bazı durumlarda serbest enzime göre daha yüksek aktivite gösterirler.
- Tekrar tekrar kullanılabilirler.
- Sürekli sistemler için kullanışlı hale gelirler.
- Ekstrem pH ve sıcaklık gibi koşullara karşı dayanıklı hale gelirler.
- Tepkime ortamından istenilen anda uzaklaştırılabilirler ve ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- Ürün ve proteinler bir arada bulunması engellenir [107-109].

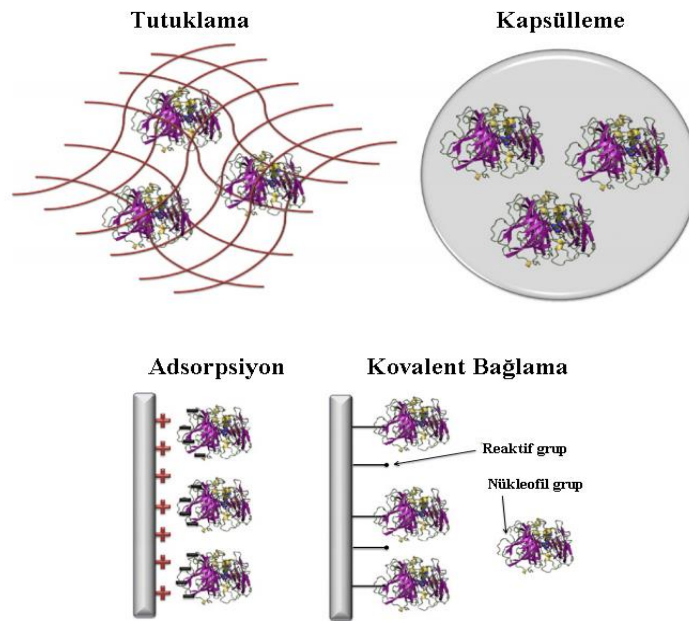
Enzim immobilizasyonunda en önemli faktör, enzim-destek bağlanma yönteminin doğru seçilmesidir. Bağlanma sırasında enzimin konformasyonel değişikliğe uğraması enzimin aktifliğinin azalmasına neden olabilir. Enzimin aktif bölgesindeki reaktif gruplar ile tepkimeden kaçınılmalıdır. İmmobilize enzimin yüzeyi, enzim içi hidrojen bağlarının veya elektron geçiş komplekslerinin oluşumundan ve yapının muhafaza edilmesinden sorumludur. Bu bağlar enzimin hareketini önler ve böylece termal stabilite yükselir. Yüzey ve enzimin mikro çevresinin yüklü oluşu enzimin optimum pH’dan 2 birim değişebilmesini sağlar. Enzimin etkili çalışabilmesinde pH çalışma bölgesinin geniş olması büyük yarar sağlar.

Destek; Enzim immobilizasyonunun başarısını belirleyecek diğer bir etmen de destek seçimidir. Destek seçimi yapılırken immobilizasyon yöntemine uygun olmasına dikkat edilmelidir. Destek, suda çözünmemeli, gözenekli, tanecik boyutları uygun, mekanik, kimyasal ve termal olarak kararlı, mikroorganizmalara karşı dirençli, zehirsiz, rejenere olabilen ve ucuz olmalıdır. Ayrıca, kovalent bağlama yöntemi ile gerçekleştirilen immobilizasyon için kullanılacak destek ılımlı koşullarda reaksiyon verebilmelidir. İmmobilizasyonda kullanılan destek çeşitleri inorganik ve organik olmak üzere ikiye ayrılabilir;

- İnorganik Yapılı Destekler; Kıl, cam, silikajel, hidroksiapatit, titandioksit, nikeloksit, ponza taşı, aktif karbon, alüminyum oksit vb.
- Organik Yapılı Destekler: Selüloz, agaroz, pektin, kitosan, dekstran, nişasta, karragenan gibi doğal polimerler ve polistiren, polivinil asetat, poliakrilamid, naylon, vinil ve allil polimerler, oksiranlar, metakrilat, maleik anhidrid polimerler gibi sentetik polimerler.

İmmobilizasyon metodlarının sınıflandırılması etkileşimin ve kullanılan desteğin özellikleri esas alınarak yapılmıştır [108, 110].

İmmobilizasyon yöntemleri şematik olarak Şekil 2.13'te verilmiştir.



Şekil 2.13. İmmobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi [110]

2.9.1. İmmobilizasyon Yöntemleri

Kovalent Bağlama Yöntemi: Desteğe kovalent bağlama yönteminde bir protein olan enzim molekülünün kimyasal yapısından yararlanır. Enzim molekülünün yüzeyinde bulunan fonksiyonel gruplar, iyonik gruplar ve hidrofobik bölgeler bu bağlanmada rol alırlar.

Kovalent bağlanma ile gerçekleştirilen enzim immobilizasyonu, enzimin kalitesini sabit tutar, sürekli sistemlerde kullanılabilirliğini sağlar, enzimin üç boyutlu yapısını korur ve denatürasyon ajanlarına karşı dayanıklı kılar. En büyük dezavantajı; kovalent bağın enzimin aktif bölgesinde gerçekleşebilecek bir modifikasyona neden olmasıdır. Aynı zamanda destek, glutaraldehit, etilen glikol, divinil sülfon, karbodiimid, 1,6-hekzandiamin gibi bifonksiyonel çapraz bağlama ajanları kullanılarak çapraz bağlanma ile immobilizasyon gerçekleştirilebilir [8].

Kovalent bağlanma ile immobilizasyon, endüstriyel uygulamalar için oldukça ilgi çekici bir yöntemdir. Bu nedenle son yıllarda kovalent bağlama ile immobilize edilen lakkaz yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu teknikte destek üzerindeki kimyasal gruplar proteinlerin nükleofilik grupları ile aktive edilir ve reaksiyon verir. Birçok enzim, yüzeyinde bol miktarda bulunan ve reaktifliği yüksek olan lizin-amino gruplarını kullanarak desteğe kovalent olarak bağlanır. İmmobilizasyon için destekler reaktif özellik gösteren kısa ara kollar içermelidir. Bu kollara enzimin farklı noktalardan desteğe bağlanarak sağlam bir yapı oluşturması için ihtiyaç vardır [111].

Kovalent lakkaz immobilizasyonunda silika temelli kaolinit veya mesoporöz silika nanopartikülleri, epoksi ile aktive edilen Eupergit C ve Sepha boncuklar, karbon, cam, altın, gümüş veya grafit temelli elektrotlar, manyetik özelliğe sahip destekler (Fe_2O_3), alümina gibi destekler kullanılmaktadır. Farklı fiber ve polimer (nylon, kitosan, polivinilalkol, vb.) yapıların destek olarak kullanıldığı çalışmalar enzim ve destek arasında önceden gerçekleştirilen bağlanmalar ile gerçekleştirilir [8].

İyonik Bağlama Yöntemi: Bu yöntemde enzim, iyon değiştirme yeteneğine sahip ve suda çözünmeyen desteklere iyonik olarak bağlanır. İyonik bağlanma ile enzimin immobilizasyonu daha ılıman koşullarda gerçekleştirildiği için enzimin

konformasyonel yapısında ve aktif merkezinde değişiklik olmaz. Ancak enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ kovalent bağ kadar güçlü değildir [8, 108].

Tutuklama Yöntemi: Kitosan, alginat, kitin, karragenan, jelatin, poliakrilamid, agaroz gibi bir matrikste enzimin tutulması işlemidir [8]. Enzim öncelikle monomer çözeltide süspanse edilir ve ardından gerçekleştirilen polimerizasyon işlemi ile enzimin çevre ile ilişkisi kesilir. Kolay bir immobilizasyon yöntemidir ve enzimin yapısal bir değişiklik olmaz. Ancak bu yöntem tutuklanan enzim oranının düşük olması ve kütle transferinin sınırlı olması ile karakterize edilmektedir [111].

Bu yöntem ile elde edilen immobilize lakkaz genelde boyarmaddelerin renk giderimi için kullanılmıştır [112].

Mikrokapsülleme ile yapılan immobilizasyon işlemi de tutuklama prensibine dayanır. Polietilenimin gibi polimerler, SiO₂ gibi inorganik materyaller, silika matriks, altın elektrot ve alümina boncuklar kullanılarak hazırlanan mikro boyutlu yarı geçirgen zara enzimin tutuklanması işlemidir [111].

2002 yılında lakkaz enziminin mikrokapsülleme ile tutuklama işlemi çalışılmıştır ve bu yöntem ile ilgili çalışmalara devam edilmektedir [8].

Adsorbsiyon Yöntemi: Bir biyokomponentin üzerine enzimin, kovalent olmayan iyonik etkileşim, hidrojen bağları, Van der Waals kuvvetleri gibi zayıf çekim kuvvetleri ile bağlanması işlemidir. Enzim çözeltisi, çözünmeyen bir destek ile muamele edilir ve ardından adsorblanamayan enzim tampon ile yıkanarak ortamdan uzaklaştırılır. Adsorbsiyon yöntemi ile gerçekleştirilen immobilizasyon sırasında ortamın pH değeri ve iyonik şiddeti, destek yüzeyinin hidrofobikliği, destek:enzim miktarı oranı dikkate alınmalıdır. Diğer yöntemlere göre daha basit ve daha ucuzdur. Bu nedenle biyoteknolojik ve çevresel uygulamalar için kullanım potansiyeli oldukça fazladır [8, 108].

İmmobilizasyon prosedürünün kolaylığı, kimyasal modifikasyona ihtiyaç duyulmadan enzim kararlılığının korunması adsorbsiyon metodunu destekleyen avantajlardan bazılarıdır. Yapılan çalışmalarda inaktif enzimin desorpsiyonundan sonra desteğin tekrar kullanılabilmesi daha az kalıntı ve daha az maliyet gibi avantajlarının da olduğunu göstermektedir. Ancak bu teknik, enzim-destek arasında düşük bağlanma

enerjisi nedeniyle substrat varlığında enzimin desorbsiyonu ile sonuçlanabilir. Bu durumu pH, sıcaklık ve iyonik şiddet etkileyebilir. Yine de çözünmeyen biyokatalizörler yaratmak için sıklıkla uygulanan bir immobilizasyon yöntemidir [83].

Lakkazların adsorbsiyon yöntemi ile gerçekleştirilen immobilizasyon çalışmaları sonucunda immobilize lakkazın tekrar kullanılabilirliği, zorlu ortam koşullarına karşı kararlılığı, depolama süresi ve katalitik kapasitesinde artış gözlenmiştir. Destek olarak, selüloz, silikajel, aktif karbon, gözenekli cam, hidroksiapatit, kalsiyum fosfat, kalsiyum karbonat, diatome toprağı, kollodyum, nişasta, kül, gluten, polimer yapılı aromatik reçineler kullanılmaktadır [8].

Aspergillus sp.'den elde edilen lakkaz cam, cam tozu, silika jel, naylon-66 membranına adsorbsiyon tekniğı ile immobilize edilmiştir. En iyi sonuç naylon-66 membranına immobilize edilen lakkaz için belirlenmiş ve enzim aktivitesini 245 kat arttırdığı rapor edilmiştir. İmmobilize lakkazın dietil eter ve etil asetat çözeltilerinde 72 saat boyunca aktivitesini koruduğı belirlenmiştir. Ancak metilenklorür çözeltilisinde immobilize lakkazın aktivitesini kaybettiğı bildirilmiştir [113].

Lentinula edodes'den elde edilen lakkaz, kitosan üzerine adsorbsiyon yöntemi ile immobilize edilerek ardından glutaraldehit ile çapraz bağlama gerçekleştirilmiştir. İmmobilize lakkazın spesifik aktivitesi ve substrata olan ilgisinin serbest enzime göre düşüş gösterdiği ancak immobilizasyon işleminin sıcaklık, pH ve depolama gibi farklı parametrelere karşı enzimin katalitik yeteneğini ve kararlılığını arttırdığını bildirmişlerdir. Ayrıca yağlı atık suların zehirsizleştirilmesinde ve renklerini gidermede etkili olduğu rapor edilmiştir [114].

Trametes hirsuta'dan saflaştırılan lakkazın alümina üzerine adsorbsiyon yöntemi ile gerçekleştirilen immobilizasyonu sonucu bazı enzim inhibitörlerine karşı (boyamaya yardımcı maddeler, bakır şelatlayıcılar) termal kararlılığını korumayı başardığı belirlendi. İmmobilize lakkazın antrokinon boyarmaddelerinin toksik etkisini % 80 oranında azalttığı belirlenmiştir [115].

Coriolus versicolor, immobilize lakkaz ve tirozinaz enzimleri ile modifiye edilen grafit elektrot fenollerin tanınması için geliştirilen bir biyosensör olarak kullanılmıştır [116].

Geotrichum candidum lakkazı toprağa absorbe edilerek fenollerin yeraltı sularından giderilmesi için kullanılmıştır [117].

Polyporus versicolor lakkazı, epibromhidrin, iminodiasetik asit ve Cu tuzları ile modifiye edilen Sepharose 4B desteğine adsorbsiyon tekniği ile immobilize edilerek meyve sularından fenolik bileşiklerin ve flavanollerin giderilmesi için kullanılmıştır [118-121].

Genetik olarak modifiye edilen *Aspergillus* ticari lakkazı, yeşil hindistan cevizi kabuğuna hiçbir ön işlem uygulamaksızın adsorbsiyon yöntemi ile immobilize edilmiş ve reaktif boyarmaddelerin rengini gidermede kullanılmıştır [83].

İmidazol ile modifiye edilen silikajel, silanlanmış alümina partikülleri, APTES-glutaraldehit kullanılarak hazırlanan kontrollü gözenekli cam boncuklar adsorbsiyon yöntemi ile lakkaz immobilizasyonu da yapılan çalışmalara örnek olarak verilebilir. Elde edilen immobilize lakkazlar boya gidermede kullanılmıştır [122-125].

Bu tez çalışmasında, immobilizasyon desteği olarak selülozik yapılı ayçiçek sapı ve pirinç kabuğu kullanılmıştır. Ayçiçek sapları, Ergene Ovası'ndan hasat sonrası kuru formda tarladan toplandı ve pirinç kabukları ise Başsel Ltd.Şti'nden temin edildi. Immobilizasyon işlemi öncesinde bu destek materyallerinin modifikasyonları gerçekleştirildi. Öncelikle ayçiçek saplarının kabuk kısımları ve pirinç kabukları ayrı ayrı blenderda öğütüldü. Ardından tanecik boyutu homojenizasyonu için 1.00 mm gözenek boyutlu elek ile elendi. Elenen desteklerin modifikasyonu HCl ile asidik parçalama ve NaOH ile kısmi delignifikasyon işlemi uygulanarak gerçekleştirildi. Tüm işlemler tamamlandıktan sonra tekrar 1.00 mm'lik elek ile elenen destekler immobilizasyon işlemi için hazır hale getirildi. Delignifiye edilen ayçiçeği sapı ve pirinç kabuklarına *Boletus edulis* lakkazı, ilk kez kısmi olarak adsorbsiyon yöntemi ile immobilize edildi.

Böylece, elde edilmesi kolay ve maliyeti düşük olan ayçiçek sapı ve pirinç kabukları gibi tarımsal atıklarla uygulanması basit, ucuz bir immobilizasyon işlemi gerçekleştirildi.

Souza ve arkadaşları tarafından pirinç kabuğu ve kısmi olarak delignifiye edilen pirinç kabuğuna invertaz enzimi immobilize edilmiştir. İmmobilizasyon sonunda nötr ortamda kısmi olarak delignifiye edilmeyen pirinç kabuklarına immobilize enzimin aktivitesinde % 1’lik bir iyileşme gerçekleşmiştir. Kısmi olarak delignifiye edilen pirinç kabuğuna immobilize enzimin aktivitesinin pH 7.0’de % 75; pH 10.0’da % 99 oranında arttığı belirlenmiştir [126].

Rocha ve arkadaşları da kısmi delignifiye edilen arpa artıklarına tripsin enzimini immobilize etmişlerdir [127].

Silva ve arkadaşları, ticari lakkazı arpa artıklarına ve kısmi olarak delignifiye edilen arpa artıklarına adsorbsiyon yöntemi ile; glisidol ve glisidol-etilendiamin ile modifiye edilen kısmi olarak delignifiye edilmiş arpa artıklarına ise kovalent bağlama metodu ile immobilize etmişlerdir [128].

2.10. Sentetik Boyarmaddeler

Sentetik boyarmaddeler tekstil, kağıt, baskı, kozmetik ve eczacılık gibi bir çok alanda geniş olarak yer alan kimyasallardır. Kromofor grupları, boyarmaddelerin yapısında bulunurlar ve boyarmaddelerin renginden sorumludurlar. Boyarmaddeler boyanacak yüzey ile bu gruplar üzerinden kimyasal tepkimeye girerler ve renklendirme işlemi gerçekleşmiş olur. Boyarmaddeler kromofor gruplarına göre; azo, antrokinon, akridin, arilmetan, siyanin, fitalosiyanin, nitro, nitrozo, kinon-imin, tiazol veya ksanten şeklinde sınıflandırılabilirler [81].

19. yy’dan itibaren geliştirilmeye başlanan sentetik boyarmaddeler, renk çeşitliliği, yüksek haslık, kolay uygulanma, kaynak sıkıntısının olmaması, tekstil lifine kolayca fikse olabilme, sektörün boyarmadde talebine karşılık verebilmesi gibi avantajlar nedeniyle tercih edilmektedir. Endüstriyel alanda, sentetik boyarmaddelerin yüksek miktarlarda kullanımı çevreye aktarılan boya miktarını ciddi boyutlara taşımıştır. Bu nedenle tekstil endüstrisi atık suları tüm dünyada ciddi çevresel problemler yaratmaktadır. Sentetik boyarmaddelerin çoğu toksik, karsinojenik, mutajenik ve alerjik etkilere sahiptirler. Çeşitli sektörlerde kullanılan boyarmaddelerin % 70’ini azo boyarmaddeler oluşturmaktadır. Kullanılan azo boyarmaddelerinin 320

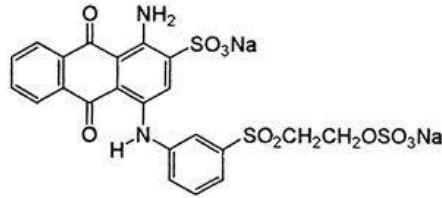
taneden 130 tanesinin parçalanma ürünleri arilaminlerdir. Arilamin bileşikleri kanserojen özellikte olmaları nedeniyle Avrupa’da ve Türkiye’de bazı azo boyarmaddelerin kullanımı yasaklanmıştır. Diğer bir kanserojen etkili boyarmadde sınıfı krom boyarmaddeleridir. Bu renklendiriciler, protein molekülleri ile tepkimeye girerek allerjen etki yaratmaktadırlar. Ayrıca atık sularda boyarmadde içeriği nedeniyle oluşan renklenme, sudaki canlı hayatı da olumsuz şekilde etkilemektedir. Renklenen su, güneş ışığının su altına ulaşmasını engelleyerek sudaki canlı hayatını tehlikeye atmaktadır. Azo boyarmaddeler, reaktif boyarmaddelerin önemli bir grubudur. [129].

Reaktif boyarmaddeler: Sentetik boyarmaddelerin önemli bir üyesi olan reaktif boyarmaddeler, boyanacak tekstil yüzeyinin yapısındaki fonksiyonel gruplar ile kovalent bağlar oluştururlar. Tüm boyama işlemleri için uygun olan reaktif boyarmaddeler ile renklendirilen tekstil yüzeylerinin yıkama, ışık gibi haslıkları yüksektir. Reaktif boyarmaddelerin yapısında, renk verici kromofor grup, kromofor grubu tekstil lifine bağlayan reaktif grup ve suda çözünmesini sağlayan sülfonik asit grupları bulunmaktadır. Reaktif gruplar ile kromofor gruplarını bir arada tutan bağlar $-NH^+$, $-CO^-$, $-SO_2^-$ gibi fonksiyonel yapılarla gerçekleştirilmektedir. Renk çeşitliliği kromofor gruplarına göre belirlenir. Örneğin; monoazo ve diazo grupları sarı, turuncu ve kırmızı, bakırlı mono ve diazo yapısındaki kromofor grupları mor, koyu kırmızı ve lacivert, antrakınon ve ftalosiyanın türevleri ise parlak ve açık mavi renkli boyarmaddelerin nedenidir [129, 130].

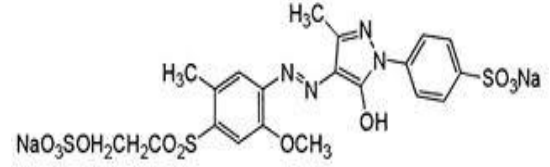
Azo grubunu içeren reaktif boyarmaddeler, kromofor yapılarında azo ($-N=N$) grubu içeren reaktif boyarmaddelerdir. Endüstride en çok kullanılan boyarmadde grubudur. Reaktif Sarı-15 ve Reaktif Kırmızı 239 boyarmaddeleri bu gruba dahildir. Kromofor yapısında antrokinon grubu içeren boyarmaddelerin yapısında iki tane kinon içeren halka yapıları bileşik bulunmaktadır. Reaktif Mavi 19 en önemli üyelerinden biridir [129, 130].

Bu tez çalışmasında, *Boletus edulis*’ten izole edilen ve TPP yöntemi ile kısmi olarak saflaştırılan lakkaz enzimi, modifiye edilen ayçiçeği sapı ve pirinç kabuğuna adsorbsiyon yöntemi ile immobilize edildikten sonra bazı reaktif boyarmaddelerin renklerini giderme etkileri incelendi. Kullanılan reaktif boyarmaddeler, Reaktif Mavi-19 (RB-19), Reaktif Sarı-15 (RY-15) ve Reaktif Kırmızı 239 (RR-239)’dur (Şekil 2.14).

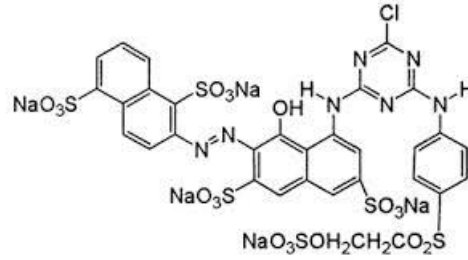
Çalışmada, immobilize enzimlerin renk giderme etkilerinin en yüksek olduğu koşullar belirlenerek çeşitli medyatörlerin, tekstil yardımcı kimyasallarının ve çeşitli metal iyonlarının boyarmaddelerin renk giderimine etkileri araştırıldı.



Reaktif Mavi-19



Reaktif Sarı-15



Reaktif Kırmızı 239

Şekil 2.14. Tezde kullanılan boyarmaddelerin kimyasal yapıları [131]

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METODLAR

3.1. Materyaller

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS), 1-Hidroksibenzotriazol (HBT), Violurik asit (VA), Triton X-100, Polivinilpirolidon (PVP), Sığır Serum Albümini (BSA), Etilendiamintetraasetik asit (EDTA), Polivinil Alkol (PVA), Tween 80, Hidrojen peroksit Sigma-Aldrich Co.'dan; Tersiyer bütanol, Sitrik asit, Sodyum hidroksit, Hidroklorik asit, Aseton, Etanol, Kalsiyum klorür, Mangan (II) klorür, Magnezyum klorür, Bakır (II) klorür, Demir (II) klorür, Merck KGaA'dan; Disodyum hidrojenfosfat, Sodyum klorür, Asetik asit Riedel-de Haen AG.'den; Sodyum sülfat, Sülfürik asit Tekkim'den; *o*-fosforik asit Atabay'dan temin edildi.

Reaktif Mavi 19, Reaktif Sarı 15, Reaktif Kırmızı 239 boyarmaddeleri Resaş Kimya Tekstil Sanayi ve Tic. Ltd. Şirketi'nden sağlandı.

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Deneylerde, Biyokimya araştırma laboratuvarında bulunan spektrofotometre ve mikropilok okuyucu (Thermo Scientific), ultrasonik su banyosu (Wisclean DAIHAN, WUC-AO3H, Kore), hassas terazi (Precisa XB 220A, Precisa Gravimetrics

AG/Switzerland), ısıtıcı ve manyetik karıştırıcı (IKA RH basic-2), mikropipetler (20 µL, 200 µL, 1000 µL Eppendorff), pH metre (Jenco 6173), Vorteks, inkübatör, derin dondurucu (-80 °C) (Wise Cyro Daihan), buzdolabı (Arçelik, ev tipi), soğutmalı ultrasantrifüj (Hettich Zentrifugen Rotina 38R), vakumlu evaporatör, blender (Waring), orbital çalkalayıcı (Wishshake Daihan SHO-1D), çalkalamalı su banyosu (Wisebath Daihan) kullanıldı.

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

Tampon hazırlamak için gerekli çözeltiler;

- 0.1 M CH₃COOH çözeltisi
- 0.1 M NaOH çözeltisi
- 0.1 M Sitrik asit çözeltisi
- 0.2 M Disodyum hidrojen fosfat çözeltisi

Enzim izolasyonu için gerekli çözeltiler

- % 1'lik (v/v) Triton X-100 çözeltisi
- 0.15 M NaCl çözeltisi

Delignifikasyon için gerekli çözeltiler

- % 3'lük (v/v) HCl çözeltisi
- % 2'lik (v/w) NaOH çözeltisi

Lakkaz aktivitesi tayini için gerekli çözeltiler

- 0.1 M sitrat-disodyumfosfat tamponu (pH 3.5)
- 5 mM ABTS çözeltisi (0.1 M sitrat-disodyumfosfat tamponunda taze olarak hazırlandı ve ışık geçirmeyen şişelerde +4°C'de saklandı).

Protein tayini için gerekli çözeltiler

- % 0.1'lik (w/v) Sığır Serum Albümini
- Bradford Reaktifi

Bradford Reaktifi: 50 mg Coomassie Brilliant Blue G-250'ye 25 mL etanol ve 50 mL *o*-fosforik asit eklenerek 10 dakika boyunca karıştırıldı ve destile su ile 500 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti, Whatman no:1 kağıdı ile iki kez süzüldü. Koyu renkli şişede +4°C'de saklandı.

3.2. Metotlar

3.2.1. *Boletus edulis* Mantar Lakkazının İzolasyonu

İzolasyon işleminde enzim kaynağı olarak, Kırklareli-Demirköy çevresinden toplanan *Boletus edulis* mantarları kullanıldı. -80 °C'de derin dondurucuda hiçbir işlem görmeden saklanan taze mantarların +4 °C'de çözülmesi beklendi, destile su ile yıkandı, kurulandı. Mantarlar, Mantar miktarı:NaCl çözelti hacmi oranı 1:3 (w/v) olacak şekilde, 1 gram mantar başına 300 µL % 1'lik Triton X-100 ve 1 mg polivinilpolipirrolidon içeren 0.15 M NaCl çözeltisi ile oda sıcaklığında Waring blender kullanılarak 2 dakika homojenize edildi. Enzimleri çözünür hale getirmek üzere gerçekleştirilen işlem sonrası elde edilen homojenat +4 °C'de 2 saat bekletildi, ardından çift katlı tülbent bezden süzüldü. Süzüntüler, +10 °C'de 8000 rpm'de 40 dakika santrifüjlendi. Elde edilen sıvı kısım "ham ekstrakt" olarak isimlendirildi [23].

3.2.2. Üçlü Faz Ayırma Tekniği (TPP) ile Lakkazın Deriştirilmesi ve Kısmi Saflaştırılması

Boletus edulis mantarlarından izole edilerek elde edilen ham ekstraktan üçlü faz ayırma tekniği (TPP) uygulanarak lakkaz enziminin deriştirilmesi ve kısmi saflaştırılması gerçekleştirildi [82, 103, 105].

TPP'nin ilk basamağı olan amonyum sülfatlama ile proteinleri çöktürme işleminde kullanılacak amonyum sülfat konsantrasyonunu (%) belirleyebilmek için ham ekstrakt örneklerine farklı tuz konsantrasyonlarında amonyum sülfat çöktürmesi uygulandı (% 20, % 40, % 40-60, % 40-80). Elde edilen çökelekler 0.1 M disodyum asetat tamponunda (pH 4.5) çözülerek bu protein örneklerinin enzim aktivite ve protein tayinleri yapıldı. Lakkazın maksimum çöktüğü tuz oranı % 40-60 olarak belirlendikten

sonra, elde edilen amonyum sülfatlı örneğe eklenecek olan *t*-bütanol hacminin optimizasyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla; % 40-60 $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ 'lı örnek:*t*-bütanol oranı 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5 (v/v) denemeleri gerçekleştirildi ve % 40-60 $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ 'lı örnekt:*t*-bütanol oranı 1.0:1.0 (v/v) olarak belirlendi.

Bu amaçla, ham ekstraktın tamamı amonyum sülfat tuzu ile % 40 doygunluğa getirilerek bir gece boyunca +4 °C'de bekletildi. Sonrasında çökelti +10 °C'de, 8000 rpm' de 40 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrası istenmeyen proteinlerin bulunduğu çökelti atıldı, supernatant alındı. Süpernatant % 60 amonyum sülfat doygunluğuna getirildi. Ardından karışıma eşit hacimde *t*-bütanol (1.0:1.0; v/v) eklendi, 35 °C'de dikkatlice karıştırıldı ve aynı sıcaklıkta 1 saat bekletildi. 1 saat sonunda, +25 °C'de 4000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi.

Santrifüj sonrası tüplerde üstte organik, ortada lakkaz içeren çökeleğin bulunduğu faz ve altta sulu faz olmak üzere 3 fazın tam olarak ayrıldığı görüldü. Fazlardan organik ve sulu faz pipetle dikkatli bir şekilde ayrıldıktan sonra lakkaz içeren orta faz çökelekleri 0.1 M disodyum asetat tamponu (pH 4.5) ile çözüldü. Enzim aktivite ve protein tayinleri yapıldı.

3.2.3. Dializ

Üçlü faz sistemi ile kısmi olarak saflaştırılan enzim çözeltisi, 0.1 M sodyum asetat tamponuna (pH 4.5) karşı dializlendi. Dializ işlemi, manyetik karıştırıcı üzerinde + 4 °C'de 24 saat boyunca tamponun 3 kez değiştirilmesi ile gerçekleştirildi.

Elde edilen dializat “enzim kaynağı” olarak kabul edilerek tezde immobilizasyon işlemleri için kullanıldı.

3.2.4. İmmobilizasyon Desteklerinin Hazırlanması

Bu çalışmada immobilizasyon desteği olarak Ergene Ovası'ndan hasat sonrası kuru formda tarladan toplanan ayçiçek sapları ve Başsel Ltd. Şti. tarafından sağlanan pirinç kabukları kullanıldı. Ayçiçek sapları ve pirinç kabuklarına *Boletus edulis*

mantarından izole edilen ve kısmen saflaştırılan lakkaz enziminin immobilizasyonunun öncesinde bu desteklerin modifikasyonları gerçekleştirildi. Bu amaçla asitleme ile parçalama, NaOH ile kısmi delignifikasyon yapıldı [132].

Waring blender ile öğütülen kuru ayçiçek sapları ve pirinç kabukları 1.00 mm gözenek çaplı elek ile elendi. Elenen ayçiçeği sapları ve pirinç kabukları % 3'lük (v/v) HCl çözeltisi ile 60 °C'de 2.5 saat manyetik karıştırıcı üzerinde asitleme işlemine maruz bırakıldı. Soğutulduktan sonra ayçiçek sapları ile pirinç kabukları destile su ile yıkanarak süzüldü ve kurutuldu. Kurutulan ayçiçek sap ve pirinç kabukları, 30 °C'de % 2'lik (w/v) NaOH çözeltisi ile 24 saat boyunca 120 rpm'de orbital çalkalayıcıda karıştırılarak kısmen delignifiye edildi ve nötral pH değerine ulaşınca kadar destile su ile yıkanarak süzülüp kurutuldu. Elde edilen kurutulmuş ve Waring blenderla toz haline getirilmiş ayçiçek sapları 1.00 mm gözenek çaplı elek ile elendi üst kısım "delignifiye ayçiçek sapı" olarak isimlendirildi ve çalışmada bu destek "DAS" olarak adlandırılarak kullanıldı. Benzer şekilde pirinç kabukları da kurutulup toz haline getirildi. 1.00 mm gözenek çaplı elek ile elendi ve üst kısım "delignifiye pirinç kabuğu" olarak isimlendirildi ve çalışmada bu destek "DPK" kısaltması ile adlandırıldı.

3.2.5. *Boletus edulis* Mantar Lakkazının Ayçiçeği Sapı ve Pirinç Kabuğu Üzerine İmmobilizasyonu

Boletus edulis mantarından izole edilen ve TPP yöntemi ile kısmi olarak saflaştırılan lakkaz, dializ sonrasında fiziksel adsorbsiyon yöntemi ile destek olarak belirlenen modifiye edilmiş ayçiçek saplarına ve pirinç kabuklarına ayrı ayrı immobilize edildi. Bu amaçla, destek:protein oranı 1:2.7 (w/w) olacak şekilde hazırlanan enzim ve desteklerin soğukta 18 saat, 110 rpm'de orbital çalkalayıcıda inkübasyonu gerçekleştirildi. İnkübasyon sonunda destek-enzim sistemlerine, yüklenen dializat hacminin 2 katı kadar soğuk aseton eklenerek +4°C'de 110 rpm'de orbital çalkalayıcıda 1 saat daha karıştırılarak protein çöktürülmesi sağlandı. İşlem sonunda, vakumlu süzme işlemi ile immobilize enzimler süzüldü, soğuk aseton ve tamponla ile yıkandı. İmmobilize enzimler, oda sıcaklığında süzgeç kâğıdının üzerinde bekletilerek kurutuldu ve elde edilen süzüntülerden vakumlu evaporatör ile asetonları uçuruldu. Süzüntü ve yıkama suları protein tayini gerçekleştirmek üzere +4 °C'de saklandı [83, 128].

Delignifiye edilmiş ayçiçek saplarına immobilize edilen enzim “DASE” olarak; delignifiye edilmiş pirinç kabuğuna immobilize edilen enzim “DPKE” olarak adlandırıldı. İmmobilize enzimler için lakkaz aktivite tayinleri, süzüntü ve yıkama sularında protein tayini gerçekleştirildi. Protein tayini sonuçlarına göre immobilizasyon verimleri hesaplandı.

3.2.6. Protein Tayini

Elde edilen protein çözeltisi ve immobilize enzimlerin protein tayinleri Bradford yöntemine göre gerçekleştirildi [133].

Toplam protein tayini için geliştirilen UV metodu, uzak UV metodu, asit ile parçalama, Biüre, Bradford, floresans emisyon, bikinkonik asit, Hartree-Lowry metodu gibi birçok direkt ve indirekt yöntem bulunmaktadır. Görünür bölgede spektrofotometrik olarak gerçekleştirilen Bradford yöntemi, protein tayini için hızlı ve hassas bir yöntemdir. Coomassie brilliant blue G-250 ile proteinin pH bağımlı geri dönüşümlü bağlanması sonucu renk dönüşümünün 595 nm’de ölçümü ile gerçekleştirilir.

Boyanın kırmızı formu proteine bağlandığında mavi formuna dönüşür. Protein-boya kompleksi protein tayininin duyarlılığı yüksek molar adsorpsiyon (ϵ) katsayısına sahip olmasına dayanmaktadır. Protein-boya bağlanması çok kısa bir sürede gerçekleştiği ve renk, yaklaşık bir saat boyunca kararlılık gösterdiği için hızlı ve süre sıkıntısı olmayan bir yöntemdir. Ayrıca sodyum veya potasyum gibi katyonlarla ya da sakkaroz gibi karbonhidratlarla girişimi çok azdır [90].

TPP yöntemi ile elde edilen serbest lakkaz enzim çözeltisinin ve immobilize enzimlerin süzüntü ve yıkama sularının protein tayinlerinin Bradford yöntemine göre gerçekleştirildi. Yöntemde standart protein olarak seçilen sığır serum albümini proteininin % 0.1’lik çözeltisinden farklı konsantrasyonlarda protein çözeltileri hazırlanarak standart protein grafiği çizildi. Grafik için % 0.1’lik sığır serum albümini çözeltisinden (standart protein çözeltisi) 10, 20, 40, 60, 80 ve 100’er μ L alınarak her birinin hacmi destile su ile 100’er μ L’ye tamamlandı. Tayin yapılacak örneklerden de 100’er μ L alındı. Her birine 5 mL Bradford reaktifi eklenerek vorteksleme işlemi

yapıldı ve her biri 10 dakika bekletildi. Standart protein çözeltileri ve örnekler 10 dakika sonunda tekrar vortekslenerek absorbans değerleri 595 nm’de okundu. Şahit olarak 100 µL destile su kullanıldı.

Standart protein çözeltisinin farklı konsantrasyonları ile bu konsantrasyonlarda okunan absorbans değerleri arasında standart protein grafiği oluşturuldu. Örneklerin absorbans değerlerine karşılık gelen konsantrasyon değerleri bu grafik denklemi yardımıyla hesaplandı.

3.2.7. Enzimatik Aktivite Tayini

Boletus edulis mantarından izole edilerek saflaştırılan serbest enzimin, DASE ve DPKE’nin aktivite tayinleri spektrofotometrik yöntem ile gerçekleştirildi.

Lakkaz aktivitesi tayini Shin ve Lee’nin yöntemi uygulandı [134]. Bu amaçla serbest ve immobilize enzimlerin aktivite tayini için substrat olarak 0.1 M sitrat-disodyumfosfat tamponunda (pH 3.5) hazırlanan 5 mM’lık ABTS (2,2’-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)) çözeltisi kullanıldı.

Serbest enzimin aktivite tayini için, 100 µL dializat ve 900 µL ABTS çözeltisinden oluşan reaksiyon karışımının 3 dakika boyunca 420 nm’de absorbans değişimi izlendi. Şahit olarak 100 µL, 0.1 M sitrat-disodyumfosfat (pH 3.5) kullanıldı.

İmmobilize lakkazın aktivite tayini için; 10 mg DASE, 2 mL 5mM ABTS çözeltisi ile 45 °C’de 10 dakika çalkalamalı su banyosunda 150 rpm’de çalkalanarak ağzı kapalı cam tüplerde inkübe edildi. 10 dakikalık inkübasyon sonunda süzgeç kağıdı ile süzülerek 420 nm’de absorbans değişimi ölçüldü. Aynı işlemler DPKE için de gerçekleştirildi.

1 lakkaz ünitesi, 1 µM ABTS’yi 1 dakikada oksitleyebilen enzim miktarı olarak tanımlandı [134].

$$1 \text{ lakkaz ünitesi} = \frac{(\Delta A \times \text{Substrat hacmi (mL)} \times 10^6)}{\epsilon \times \text{Enzim miktarı (mL veya g destek)} \times \text{zaman (dk)}}$$

ABTS için $\epsilon = 36,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Serbest lakkaz için 1 enzim ünitesi U/mL olarak tanımlanırken, immobilize lakkaz için U/g olarak tanımlandı.

Spesifik aktivite ise mg protein başına düşen enzim ünitesi olarak tanımlandı ve tezde U/mg olarak verildi.

3.2.8. DAS ve DPK Üzerine Yüklenecek Protein Miktarı Optimizasyonu

Boletus edulis'ten elde edilen lakkazın kısmi olarak delignifiye edilen ayçiçeği sapı (DAS) ve pirinç kabuğu (DPK) üzerine immobilizasyonu için Destek:Protein miktarı (w/w) oranı belirlendi.

Bu amaçla; DAS:Protein miktarı ve DPK:Protein miktarı (w/w) oranları 1:1.8, 1:2.7, 1:3.6 olacak şekilde immobilizasyonları gerçekleştirildi. Immobilizasyon işlemleri Bölüm 3.2.5'de belirtildiği gibi tamamlandıktan sonra her bir farklı Destek:Protein miktarı (w/v) oranlarında hazırlanan DASE ve DPKE'ler için lakkaz aktivite tayinleri yapıldı. En yüksek aktivite gösteren DASE ve DPKE örnekleri belirlenerek bundan sonraki çalışmalar bu oranlara göre gerçekleştirildi.

3.2.9. İmmobilize Enzimler DASE ve DPKE'nin Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi

Bölüm 3.2.8'de belirtildiği gibi yapılan optimizasyon çalışması ile belirlenen Destek:Protein miktarı DAS ve DPK için (1:2.7 w/w) oranına göre lakkaz enzimi immobilize edildi. Immobilizasyon sonucu elde edilen DASE ve DPKE'nin en yüksek lakkaz aktivitesini gösterdiği optimum koşullar (immobilize enzim miktarı, zaman, pH, sıcaklık belirlendi. DASE ve DPKE için gerçekleştirilen kinetik çalışması ile K_m ve V_{max} değerleri belirlendi. Ayrıca, immobilize sistemlerin termal kararlılık ve tekrar kullanılabilirlik özellikleri incelendi.

3.2.9.1. Lakkaz Aktivite Tayininde Kullanılacak DASE ve DPKE Miktarı Optimizasyonu

DASE ve DPKE miktar optimizasyonu için her iki immobilize sistemden 5, 10, 25, 50 ve 100'er mg tartılarak ağzı kapalı cam tüplerde 25 °C'de çalkalamalı su banyosunda 150 rpm'de çalkalanarak 5 dakika 5 mM ABTS çözeltisi (0.1 M sitrat-disodyumfosfat tamponunda pH 3.5) ile inkübe edildi. Lakkaz aktiviteleri, çözeltilerin absorbansları 420 nm'de ölçülerek spektrofotometrik olarak belirlendi.

En yüksek lakkaz aktivitesinin görüldüğü DASE ve DPKE miktarları optimum enzim miktarı olarak belirlendi.

3.2.9.2. DASE ve DPKE için Lakkaz Aktivitesi Ölçümünde Kullanılacak Sürenin Belirlenmesi

10 mg DASE ve DPKE ağzı kapalı cam tüplerde 3, 5, 10 ve 15 dakika boyunca çalkalamalı su banyosunda (150 rpm) 5 mM ABTS çözeltisi (0.1 M sitrat-disodyumfosfat tamponunda pH 3.5) ile 25 °C'de inkübe edilerek immobilize enzimlerin en yüksek aktivite gösterdiği tepkime süreleri belirlenerek optimizasyon işlemi tamamlandı.

3.2.9.3. pH Optimizasyonu

İmmobilize lakkaz sistemlerinin maksimum aktivite gösterdiği pH değerini belirlemek için; farklı pH değerine sahip (pH 3.0, 3.5, 4.0, 4.5) 0.1 M sitrat-disodyumfosfat tamponları hazırlandı. Ölçüm yapılacak pH değerlerindeki tamponlar ile hazırlanan 5 mM'lık ABTS çözeltileri, 10 mg DASE ve DPKE ile 10 dakika boyunca çalkalamalı su banyosunda (150 rpm) ağzı kapalı tüplerde 25 °C'de inkübe edilerek süre sonunda lakkaz aktiviteleri ölçüldü. Her iki sistem için de en yüksek aktivitenin görüldüğü pH değerine sahip tampon çözeltisi çalışma tamponu olarak belirlendi ve bundan sonraki çalışmalarda kullanıldı.

3.2.9.4. Sıcaklık Optimizasyonu

İmmobilize enzimlerin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklığı belirleyebilmek amacıyla, 10 mg DASE ve DPKE'nin 5 mM ABTS (0.1 M sitrat-disodyumfosfat pH 3.5) ile reaksiyonu 30, 40, 45 ve 50 °C sıcaklıklarda 10 dakika çalkalamalı su banyosunda 150 rpm'de inkübe edilerek gerçekleştirildi. Yapılan aktivite tayini sonrasında immobilize sistemlerin optimum sıcaklık değerleri belirlendi.

3.2.9.5. DASE ve DPKE'nin K_m ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi

İmmobilize enzim sistemleri için, 0.1 M sitrat-disodyumfosfat tamponu (pH 3.5) kullanılarak 0.1, 0.125, 0.25, 0.5, 1 ve 2 mM konsantrasyonlara sahip ABTS çözeltileri hazırlandı ve 45 °C'de aktivite tayinleri gerçekleştirildi.

İmmobilize enzim sistemleri için Lineweaver-Burk doğruları çizilerek her iki sistemin K_m ve V_{max} değerleri belirlendi.

3.2.9.6. Termal Kararlılık

DASE ve DPKE immobilize enzim sistemlerinin termal kararlılık özelliklerini belirlemek için, 45, 50, 60 ve 70 °C sıcaklık değerlerinde 30 ve 60 dakika bekletilen DASE ve DPKE 1 dakika buz banyosunda tutulduktan sonra 5 mM ABTS çözeltisine (0.1 M sitrat-disodyumfosfat tamponunda hazırlanan (pH 3.5)) karşı aktivite tayinleri gerçekleştirildi.

Elde edilen aktivite sonuçlarına göre, DASE ve DPKE'nin termal kararlılık özellikleri belirlendi. 45 °C'de elde edilen aktivite değerleri % 100 kabul edilerek bağlı aktivite-sıcaklık grafikleri çizildi.

3.2.9.7. DASE ve DPKE Sistemlerinin Tekrar Kullanılabilirliği

İmmobilize sistemlerin tekrar kullanılabilirlik denemeleri için önceden belirlenen optimum koşullarda çalışıldı. DASE ve DPKE için gerçekleştirilen her aktivite ölçümü sonrasında sistemlerin rejenerasyonu yapıldı.

Denemeler için, tüplerde bulunan immobilize enzim sistemlerine 2'şer ml ABTS çözeltisi eklendi ve sistemler 45 °C'de 10 dakika boyunca 150 rpm'de çalkalandı. Çalkalama sonrası, çözeltiler süzgeç kağıdı ile süzülerek immobilize sistemlerden uzaklaştırıldı. Elde edilen süzüntülerin renk değişimleri 420 nm'de spektrofotometrik ölçümler ile belirlendi. Süzgeç kağıdının üzerinde kalan DASE ve DPKE 10'ar ml çalışma tamponu ile (pH 3.5) yıkandı ve tekrar süzüldü. 30 dakika oda sıcaklığında rejenere edilen immobilize sistemlerin lakkaz aktiviteleri tekrar belirlendi. Bu işlem, 14 döngü boyunca tekrarlandı.

3.2.10. İmmobilize Lakkaz Sistemlerinin (DASE ve DPKE) Bazı Tekstil Boyarmaddelerinin Renklerini Giderme Etkilerinin Belirlenmesi

DASE ve DPKE sistemlerinin Reaktif Mavi 19 (RB-19), Reaktif Sarı 15 (RY-15) ve Reaktif Kırmızı 239 (RR-239) tekstil boyarmaddelerinin renk giderimi aktivitelerinin en yüksek olduğu koşulların belirlenmesi için optimum pH, optimum sıcaklık, immobilize enzim miktarı optimizasyonu, boya konsantrasyonu optimizasyonu denemeleri yapıldı.

DASE ve DPKE'nin renksizleştirme aktivitelerini en iyi şekilde gerçekleştirdiği koşulları belirlemek üzere; 100'er mg DASE ve DPKE tartılarak ağzı kapalı, koyu renkli şişelere konuldu. Her bir şişeye 2 mL boyarmadde çözeltisi (0.1 M sitrat-disodyumfosfat tamponunda) eklenerek renk giderme sistemleri hazırlandı. Şahit çözeltisi (0.1 mL, 0.1 M sitrat-disodyumfosfat tamponu ve 2 mL boyarmadde çözeltisi) ile birlikte hazırlanan sistemler 37 °C'de, çalkalamalı su banyosunda (150 rpm) çalkalandı. Bu sistemler ve şahit çözeltilerinden 15, 30 ve 60. dakikalarda 96 kuyucuklu mikropakanın her bir kuyucuğuna 100'er µL örnek alınarak RB-19, RY-15, RR-239

için sırasıyla 592 nm [76], 416 nm [78] ve 542 nm [83] dalga boylarında absorbanları ölçüldü.

Aynı işlemler, lakkazın immobilize edildiği DAS ve DPK destekleri için de uygulandı. Böylece DAS ve DPK desteklerinin ortamdaki boyarmaddeleri adsorblama etkileri belirlendi.

DAS, DASE, DPK ve DPKE sistemlerinin boyarmaddelerin renk giderme % aktiviteleri aşağıda belirtilen formüle göre hesaplandı [24].

$$\% \text{ Renk Giderme} = \frac{\Delta A_{\text{şahit}} - \Delta A_{\text{son}}}{\Delta A_{\text{şahit}}} \times 100$$

DASE ve DPKE üzerinde bulunan immobilize lakkazın renk giderme %'sini belirlemek için aşağıdaki formüller kullanıldı.

$$\% \text{ Renk Giderme} = \text{DASE'nin Renk Giderme \% 'si} - \text{DAS'ın Renk Giderme \% 'si}$$

$$\% \text{ Renk Giderme} = \text{DPKE'nin Renk Giderme \% 'si} - \text{DPK'nin Renk Giderme \% 'si}$$

değerleri de hesaplanmıştır.

3.2.10.1. pH Optimizasyonu

DASE ve DPKE immobilize sistemlerinin Reaktif Mavi 19, Reaktif Sarı 15, Reaktif Kırmızı 239 tekstil boyalarının renklerini giderme aktiviteleri üzerine pH'ın etkisini belirlemek için, çalışılan boyarmadde çözeltileri 0.1 M sitrat-disodyumfosfat tamponunun farklı pH değerlerinde (pH 1.5-5.0), derişimleri 100 mg/L olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan boyarmadde çözeltilerinin 100 mg DASE ve DPKE ile reaksiyonları, ağzı kapalı şişelerde 37 °C'de çalkalamalı su banyosunda (150 rpm) gerçekleştirildi. 100'er mg DASE ve DPKE'nin çalışılan 3 boyarmadde için 15, 30 ve 60. dakikalarda renksizleştirme aktiviteleri ölçüldü. En yüksek renk giderme aktivitesinin görüldüğü pH değerleri belirlendi ve bundan sonraki çalışmalarda bu pH değerlerinde gerçekleştirildi.

3.2.10.2. Sıcaklık Optimizasyonu

İmmobilize sistemlerin en yüksek renk giderme aktivitesine sahip olduğu sıcaklık değerlerinin belirlenebilmesi amacıyla optimum sıcaklık çalışması yapıldı. DASE ve DPKE'nin renk giderme aktiviteleri 20-60°C aralığındaki sıcaklık değerlerinde 15, 30 ve 60. dakikalarda gerçekleştirilen spektrofotometrik ölçümlerle tayin edildi. 100 mg DASE ile yapılan sıcaklık optimizasyonu için 0.1 M sitrat-disodyum fosfat tamponunda hazırlanan 100 mg/L derişimli RB-19 (pH 3.5), RY-15 (pH 3.0) ve RR-239 (pH 2.0); 100 mg DPKE ile yapılan sıcaklık optimizasyonu için 0.1 M sitrat-disodyum fosfat tamponunda hazırlanan RB-19 (pH 3.5), RY-15 (pH 4.0) ve RR-239 (pH 2.5) boyarmadde çözeltileri kullanıldı.

İmmobilize sistemlerin, çalışılan üç reaktif boyarmadde için en yüksek renk giderme %'sinin belirlendiği sıcaklıklar optimum sıcaklık olarak belirlendi, bundan sonraki çalışmalar bu sıcaklıklarda yürütüldü.

3.2.10.3. Enzim Miktarı Optimizasyonu

En iyi renk giderme aktivitesinin elde edilebilmesi amacıyla, kullanılacak optimum DASE ve DPKE miktarları belirlendi. Bu amaçla, DASE'den 5-200 mg değer aralığında tartımlar alınarak Bölüm 3.2.10'da belirtildiği şekilde denemeler gerçekleştirildi. 0.1 M sitrat-disodyumfosfat tamponunda hazırlanan 100 mg/L'lik RB-19 (pH 3.5), RY-15 (pH 3.0) ve RR-239 (pH 2.0) çözeltilerinin renklerinin giderilme işlemleri sırasıyla önceden belirlenen 25, 50, 40 °C optimum sıcaklıklarda gerçekleştirildi.

En yüksek renk giderimi aktivitesini gösterecek DPKE miktarlarının belirlenmesi için, 5-200 mg değer aralığında DPKE tartılarak 0.1 M sitrat-disodyumfosfat tamponunda hazırlanan 100 mg/L'lik RB-19 (pH 3.5, 25 °C), RY-15 (pH 4.0, 50 °C) ve RR-239 (pH 2.5, 50°C) çözeltileri ile gerçekleştirildi.

İmmobilize sistemlerin, çalışılan üç reaktif boyarmadde için en yüksek renk giderme %'sinin belirlendiği immobilize enzim miktarları, optimum enzim miktarı olarak kabul edildi ve bundan sonraki çalışmalarda bu miktarlar kullanıldı.

3.2.10.4. Boya Konsantrasyonu Optimizasyonu

İmmobilize enzim sistemlerinin en yüksek renk giderimi aktivitesini gösterdiği boyarmadde konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla, boya konsantrasyonu optimizasyonu gerçekleştirildi. DASE ve DPKE sistemleri önceden belirlenen optimum koşullara göre hazırlandı.

150 mg DASE, 0.1 M sitrat-disodyumfosfat tamponunda (pH 3.5) hazırlanan 25, 50, 100, 200, 400 mg/L derişimli RB-19 ile 25 °C’de; 100 mg DASE, 0.1 M sitrat-disodyumfosfat tamponunda (pH 3.0) hazırlanan 50, 100, 150, 200 mg/L RY-15 ile 50 °C’de; 50 mg DASE, 0.1 M sitrat-disodyumfosfat tamponunda (pH 2.0) hazırlanan 50, 100, 200, 250 mg/L derişimli RR-239 ile 40 °C’de renk giderme denemeleri gerçekleştirildi.

100 mg DPKE, 0.1 M sitrat-disodyumfosfat tamponunda (pH 3.5) hazırlanan 25, 50, 100, 200, 400 mg/L derişimli RB-19 ile 25 °C’de; 150 mg DPKE, 0.1 M sitrat-disodyumfosfat tamponunda (pH 4.0) hazırlanan 50, 100, 150, 200, 250, 400 mg/L RY-15 ile 50 °C’de; 100 mg DPKE, 0.1 M sitrat-disodyumfosfat tamponunda (pH 2.5) hazırlanan 50, 100, 200, 250 mg/L derişimli RR-239 ile 50 °C’de renk giderme denemeleri gerçekleştirildi.

15, 30 ve 60. dakikalarda, her bir boyarmaddenin en yüksek absorbands değeri gösterdikleri dalga boylarında aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Elde edilen değerlere göre DASE ve DPKE’nin en yüksek renk giderimi %’sine sahip boya konsantrasyonları optimum boya konsantrasyonları olarak kabul edildi.

3.2.10.5. Tekrar Kullanılabilirlik

DASE ve DPKE immobilize sistemlerinin tekrar kullanılabilirlik denemesi için önceden belirlenen optimum koşullarda çalışıldı. İmmobilize sistemlerin her bir aktivite ölçümü sonrasında rejenerasyonları gerçekleştirilerek kalan renk giderme aktiviteleri yeniden belirlendi.

Her bir boyarmadde için 250 mg DASE ve DPKE kullanıldı. 0.1 M sitrat-disodyumfosfat tamponunda (pH 3.5) hazırlanan 50 mg/L derişimli RB-19 ile 25 °C’de; 0.1 M sitrat-disodyumfosfat tamponunda (pH 3.0) hazırlanan 200 mg/L derişimli RY-15 ile 50 °C’de; 0.1 M sitrat-disodyumfosfat tamponunda (pH 2.0) hazırlanan 100 mg/L derişimli RR-239 ile 40 °C’de DASE’nin tekrar kullanılabilirlik denemeleri gerçekleştirildi.

0.1 M sitrat-disodyumfosfat tamponunda (pH 3.5) hazırlanan 100 mg/L derişimli RB-19 ile 25 °C’de; 0.1 M sitrat-disodyumfosfat tamponunda (pH 4.0) hazırlanan 250 mg/L RY-15 ile 50 °C’de; 0.1 M sitrat-disodyumfosfat tamponunda (pH 2.5) hazırlanan 200 mg/L derişimli RR-239 ile 50 °C’de DPKE’nin tekrar kullanılabilirlik denemeleri gerçekleştirildi.

Denemeler için, kahverengi şişelerdeki immobilize enzim sistemlerine 2’şer ml boyarmadde eklendi ve sistemler her bir boyarmadde için belirlenen sıcaklıkta 15 dakika boyunca 150 rpm’de çalkalandı. alkalama sonrası boya çözeltileri süzgeç kağıdı ile süzölerek immobilize sistemlerden uzaklaştırıldı. Elde edilen boyarmadde süzölüntülerinin renk değişimleri RB-19 için 592 nm, RY-15 için 416, RR-239 için 542 nm’de spektrofotometrik ölçölmler ile belirlendi. Süzgeç kağıdının üzerinde kalan DASE ve DPKE 5’er ml çalışma tamponu ile (her bir sistem ve boyarmadde için belirlenen optimum pH değerlerinde) yıkandı ve tekrar süzölldü. 30 dakika, +4 °C’de bekletilerek rejenere edilen immobilize sistemler tekrar aynı işlemlere tabi tutuldu. Her bir işlem sonucunda, immobilize sistemlerin % renk giderme aktiviteleri hesaplandı.

şahit çözeltileri, her bir sistem ve boyarmadde için belirlenen pH değerinde çalışma tamponu (0.1 mL) ve her bir sistem ve boyarmadde için belirlenen konsantrasyonda hazırlanan boyarmadde çözeltileri (2 mL) ile hazırlandı.

3.2.10.6. İmmobilize *Boletus edulis* Mantar Lakkazının RB-19, RY-15 ve RR-239 Boyarmaddelerinin Biyodönüşümüne Etkisinin İncelenmesi

DASE ve DPKE sistemleri, Bölüm 3.2.10’da belirtildiği gibi gerçekleştirilen çalışmalar sonucu belirlenen optimum koşullara göre hazırlandı (şekil 3.1a.-3.1b.).

Hazırlanan sistemler, ağzı kapalı koyu renkli şişelerde 60 dakika boyunca çalkalamalı su banyosunda 150 rpm’de çalkalandı. Elde edilen örneklerin 200-800 nm dalga boyları arasında spektrum taramaları yapıldı ve immobilize enzim sistemleri ile muamele edilmeyen RB-19, RY-15, RR-239 çözeltileri için gerçekleştirilen 200-800 nm arasında dalga boyu taramaları ile karşılaştırıldı [82].

REAKTİF MAVİ - 19 Çalışma Sıcaklığı 25 °C	REAKTİF SARI - 15 Çalışma Sıcaklığı 50 °C	REAKTİF KIRMIZI - 239 Çalışma Sıcaklığı 40 °C
ŞAHİT 0.1 mL 0.1 M Sitrat-disodyumfosfat tamponu (pH 3.5) + 2 mL RB-19 çözeltisi (50 mg/L) 0.1 M Sitrat-disodyumfosfat tamponu (pH 3.5)	ŞAHİT 0.1 mL 0.1 M Sitrat-disodyumfosfat tamponu (pH 3.0) + 2 mL RY-15 çözeltisi (200 mg/L) 0.1 M Sitrat-disodyumfosfat tamponu (pH 3.0)	ŞAHİT 0.1 mL 0.1 M Sitrat-disodyumfosfat tamponu (pH 2.0) + 2 mL RR-239 çözeltisi (100 mg/L) 0.1 M Sitrat-disodyumfosfat tamponu (pH 2.0)
DAS 150 mg DAS + 2 mL RB-19 çözeltisi (50 mg/L) 0.1 M Sitrat-disodyumfosfat tamponu (pH 3.5)	DAS 100 mg DAS + 2 mL RY-15 çözeltisi (200 mg/L) 0.1 M Sitrat-disodyumfosfat tamponu (pH 3.0)	DAS 50 mg DAS + 2 mL RR-239 çözeltisi (100 mg/L) 0.1 M Sitrat-disodyumfosfat tamponu (pH 2.0)
DASE 150 mg DASE + 2 mL RB-19 çözeltisi (50 mg/L) 0.1 M Sitrat-disodyumfosfat tamponu (pH 3.5)	DASE 100 mg DASE + 2 mL RY-15 çözeltisi (200 mg/L) 0.1 M Sitrat-disodyumfosfat tamponu (pH 3.0)	DASE 50 mg DASE + 2 mL RR-239 çözeltisi (100 mg/L) 0.1 M Sitrat-disodyumfosfat tamponu (pH 2.0)

Şekil 3.1a. DASE renk giderme sistemi

REAKTİF MAVİ - 19 Çalışma Sıcaklığı 25 °C	REAKTİF SARI - 15 Çalışma Sıcaklığı 50 °C	REAKTİF KIRMIZI - 239 Çalışma Sıcaklığı 50 °C
ŞAHİT 0.1 mL 0.1 M Sitrat-disodyumfosfat tamponu (pH 3.5) + 2 mL RB-19 çözeltisi (100 mg/L) 0.1 M Sitrat-disodyumfosfat tamponu (pH 3.5)	ŞAHİT 0.1 mL 0.1 M Sitrat-disodyumfosfat tamponu (pH 4.0) + 2 mL RY-15 çözeltisi (250 mg/L) 0.1 M Sitrat-disodyumfosfat tamponu (pH 4.0)	ŞAHİT 0.1 mL 0.1 M Sitrat-disodyumfosfat tamponu (pH 2.5) + 2 mL RR-239 çözeltisi (200 mg/L) 0.1 M Sitrat-disodyumfosfat tamponu (pH 2.5)
DPK 100 mg DPK + 2 mL RB-19 çözeltisi (100 mg/L) 0.1 M Sitrat-disodyumfosfat tamponu (pH 3.5)	DPK 150 mg DPK + 2 mL RY-15 çözeltisi (250 mg/L) 0.1 M Sitrat-disodyumfosfat tamponu (pH 4.0)	DPK 100 mg DPK + 2 mL RR-239 çözeltisi (200 mg/L) 0.1 M Sitrat-disodyumfosfat tamponu (pH 2.5)
DPKE 100 mg DPKE + 2 mL RB-19 çözeltisi (100 mg/L) 0.1 M Sitrat-disodyumfosfat tamponu (pH 3.5)	DPKE 150 mg DPKE + 2 mL RY-15 çözeltisi (250 mg/L) 0.1 M Sitrat-disodyumfosfat tamponu (pH 4.0)	DPKE 100 mg DPKE + 2 mL RR-239 çözeltisi (200 mg/L) 0.1 M Sitrat-disodyumfosfat tamponu (pH 2.5)

Şekil 3.1b. DPKE renk giderme sistemi

3.2.11. İmmobilize Lakkaz Sistemleri (DASE ve DPKE) ile Tekstil Boyarmaddelerinin Renk Giderimine Medyatör Etkisinin İncelenmesi

DASE ve DPKE sistemleri, Bölüm 3.2.10’da yapılan çalışmalar sonucu belirlenen optimum koşullara göre yeniden hazırlandı (Şekil 3.1a-3.1b.).

Çalışmada 0.1 M sitrat-disodyumfosfat tamponunda hazırlanan 5 mM’lık 1-hidroksibenzotriazol (HBT) ve violurik asit (VA) medyatörleri kullanıldı. İmmobilize sistemlere farklı hacimlerde eklenen (25-500 µL) medyatörlerin boyarmaddelerin renk giderimi aktivitesi üzerine etkileri incelendi.

Kahverengi şişelerde hazırlanan sistemler su banyosunda 150 rpm’de çalkalandıktan sonra 15, 30 ve 60. dakikalarda absorbans ölçümleri gerçekleştirildi. Her bir sistemin, çalışılan boyarmaddeler için renk giderme %’leri belirlendi. Elde edilen değerler, DASE ve DPKE’nin medyatörsüz ve optimum koşullarda her bir boyarmadde için belirlenen en yüksek renk giderme %’lerine göre değerlendirildi [76, 78].

3.2.12. İmmobilize Lakkaz Sistemleri (DASE ve DPKE) Tekstil Boyarmaddelerinin Renk Giderimine Bazı Kimyasallar ve Metal İyonlarının Etkisinin İncelenmesi

Lakkaz enzimi ile renksizleştirme işlemlerinin amaçlandığı tekstil atık sularında boyarmaddeler dışında tekstil fabrikalarında kullanılan metal şelatlayıcı etilendiamintetraasetik asit (EDTA), ağartıcı hidrojen peroksit, sentetik haşılalayıcı ve sertleştirici polivinil alkol (PVA); yüzey aktif bir madde olan Tween 80 gibi çeşitli kimyasallar da bulunmaktadır [84, 135].

Yardımcı kimyasallar yanında, doğal bitkisel liflerin ziraat işlemleri sırasında defoliantlardan veya pestisidlerden liflere geçen, tekstil işlemlerinde kullanılan bazı kimyasalların, çeşitli boyarmaddelerin ve suyun içeriğinde bulunan önemli miktarda kalsiyum, magnezyum, bakır, demir, krom gibi metal iyonlarını da mevcuttur [136].

Bu çalışmada, her iki immobilize sistem için optimize edilen renk giderme koşulları sabit tutularak, tekstil endüstrisinin atık sularında yaygın olarak bulunabilecek yardımcı kimyasal maddeler ve metal iyonlarının renk giderim sürecine etkileri incelendi.

3.2.12.1. Kimyasalların Etkisi

Kimyasalların renksizleştirme sürecine olası etkilerini inceleyebilmek amacıyla; PVA (100 ve 1000 mg/L), EDTA (1 ve 10 mM), H_2O_2 (1 ve 10 mM), Tween 80 (1 ve 10 mM) çözeltileri 0.1 M sitrat-disodyumfosfat tamponunda hazırlandı ve Şekil 3.1a.-3.1b.'de verilen sistemlerin her birine kimyasalların farklı konsantrasyonlarından 100'er μ l eklenerek 60. dakika sonunda absorbans ölçümleri gerçekleştirildi. Yapılan aktivite tayinleri sonucu her bir sistemin RB-19, RY-15, RR-239 boyarmaddelerinin renk giderimi aktivitesine belirlenen kimyasalların etkileri belirlendi.

DASE ve DPKE sistemlerinin her bir boyarmadde için Bölüm 3.2.10'da belirlenen optimum koşullara göre gerçekleştirilen renksizleştirme işlemlerinde 60. dakikada elde edilen renk giderme %'leri baz alınarak değerlendirildi.

3.2.12.2. Bazı Metal İyonlarının Etkisi

DASE ve DPKE'nin RB-19, RY-15, RR-239 boyarmaddelerinin renklerinin giderimine etkilerini incelemek amacıyla 0.1 M sitrat-disodyumfosfat tamponunda (herbir sistem ve boyarmadde için belirlenen optimum pH değerlerinde) hazırlanan 1 ve 10 mM'lık $CuCl_2$, $MnCl_2$, $CaCl_2$, $MgCl_2$, $FeCl_2$ çözeltileri kullanıldı.

Şekil 3.1a-3.1b'de belirtilen deney ortamlarına farklı konsantrasyonlardaki her bir metal çözeltisinden 100'er μ L eklenerek renksizleştirme işlemleri uygulandı. Optimum koşullarda gerçekleştirilen işlemler sonucu 60. dakikalarda spektrofotometrik absorbans ölçümleri yapıldı ve % renk giderme aktiviteleri belirlendi.

DASE ve DPKE sistemlerinin her bir boyarmadde için Bölüm 3.2.10'da belirlenen optimum koşullara göre gerçekleştirilen renksizleştirme işlemlerinde 60. dakikada elde edilen renk giderme %'leri karşılaştırılarak değerlendirildi.

BÖLÜM 4

SONUÇLAR

4.1. *Boletus edulis* Mantar Lakkazının İzolasyonu ve Üçlü Faz Ayırma Tekniği (TPP) ile Deriştirilmesi ve Kısmi Olarak Saflaştırılması

Boletus edulis mantar lakkazının izolasyonu, Bölüm 3.2.1’de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen çözelti “Ham ekstrakt” olarak isimlendirildi.

Ham ekstrakt, üçlü faz ayırma tekniği (TPP) ile Bölüm 3.2.2’de belirtildiği şekilde deriştirildi ve elde edilen amonyum sülfatlı protein çözeltileri, 0.1 M sodyum asetat tamponuna (pH 4.5) karşı dializlendi. Dializ işlemi, manyetik karıştırıcı üzerinde + 4 °C’de 24 saat boyunca tamponun 3 kez değiştirilmesi ile gerçekleştirildi.

İzolasyon ve deriştirme işlemleri sonucu elde edilen örneklerin enzim aktivite ve protein tayini sonuçları Tablo 4.1’ te verilmiştir. Enzimin deriştirilmesi için uygulanan TPP yöntemi ile *Boletus edulis* lakkazının 11.7 kat kısmi olarak saflaştırıldığı görüldü.

Tablo 4.1. *Boletus edulis* mantar lakkazının izolasyon ve kısmi saflaştırma basamakları sonucu belirlenen protein ve enzim aktiviteleri

	Protein Miktarı (mg/mL)	Hacimsel Aktivite (U/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma Faktörü
Ham Ekstrakt	0.65	13.3	20.46	1
TPP orta faz çökeleği	0.68	94.33	138.72	6.78
Dializat	0.42	100.79	240	11.7

Ayrıca TPP'nin ilk basamağı olan amonyum sülfatlama ile proteinleri çöktürme işleminde kullanılacak amonyum sülfat konsantrasyonunu (%) belirleyebilmek için, ham ekstrakt örneklerine farklı oranlarda amonyum sülfat çöktürmesi uygulandı (% 20, % 40, % 40-60, % 40-80). 0.1 M disodyum asetat tamponunda (pH 4.5) çözülerek elde edilen tuzlu örneklerin enzim aktivite ve protein tayinleri yapıldı (Tablo 4.2). Elde edilen değerlere göre ham ekstrakta % 40 oranında amonyum sülfatlama uygulandığında istenmeyen proteinlerin çöktüğü belirlendi. TPP yönteminde kullanılacak olan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ doygunluk oranının % 40-60 olduğu belirlendi (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. *Boletus edulis* mantar lakkazının deriştirilmesi amacıyla uygulanan amonyum sülfat doygunluklarının etkisi

Amonyum Sülfat Konsantrasyonu (%)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)
0-20	0.44
20-40	2.9
40-60	73.12
40-80	23.77

TPP yönteminin ikinci basamağında amonyum sülfatlı protein çözeltisine eklenmesi gereken *t*-bütanol miktarının belirlenebilmesi amacıyla 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5 (v/v) % 40-60 $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ 'lı protein ekstraktı:*t*-bütanol) oranları çalışıldı. TPP ile çöktürülen orta faz örneklerine uygulanan protein tayini ve enzim aktivite tayinleri sonucunda % 40-60 $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ 'lı ekstrakt:*t*-bütanol oranı 1.0:1.0 (v/v) olduğu belirlendi (Tablo 4.3.).

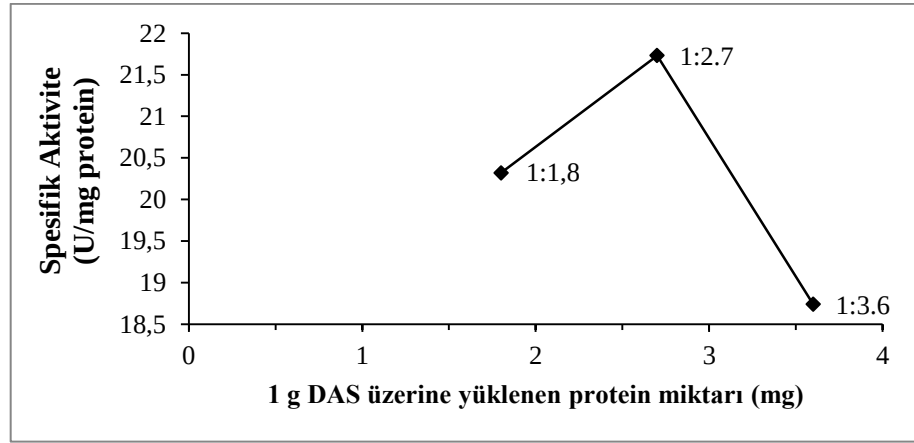
Tablo 4.3. TPP'de kullanılacak % 40-60 $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ 'lı ekstrakt:*t*-bütanol (v/v) oranının belirlenmesi için gerçekleştirilen optimizasyon çalışmasının sonuçları

Amonyum sülfatlı ekstrakt: <i>t</i> -bütanol oranı (v/v)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)
1.0:0.5	65.16
1.0:1.0	68.08
1.0:1.5	61.47

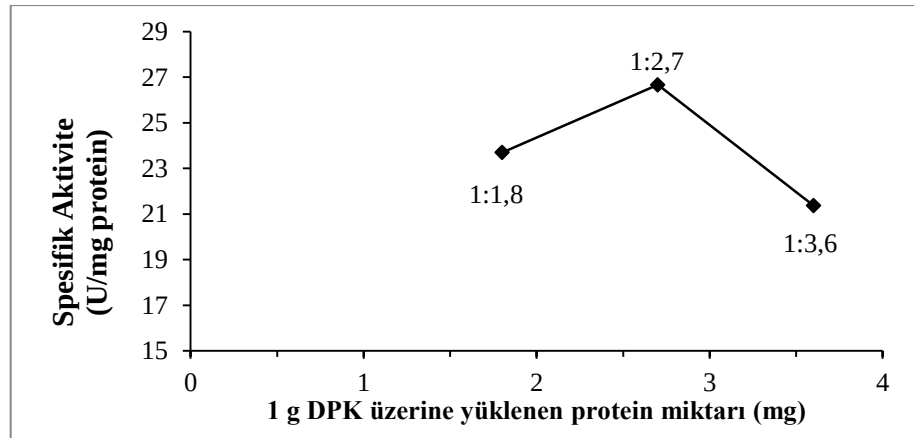
4.2. *Boletus edulis* Mantar Lakkazının Ayçiçek Sapı ve Pirinç Kabuğu Üzerine İmmobilizasyonu

Boletus edulis mantarından izole edilen ve TPP yöntemi ile kısmi olarak saflaştırılan lakkaz, dializ sonrasında Bölüm 3.2.5'te belirtildiği gibi fiziksel adsorbsiyon yöntemi ile destek olarak belirlenen modifiye edilmiş ayçiçek saplarına ve pirinç kabuklarına ayrı ayrı immobilizasyonlar gerçekleştirildi.

Bölüm 3.2.8'de belirtildiği şekilde 1 gram DAS üzerine ve 1 gram DPK üzerine yüklenecek protein miktarı oranı 1:2.7 (Destek:Protein miktarı; w/w) olarak belirlendi (Şekil 4.1a-4.1b).



Şekil 4.1a. İmmobilizasyonda kullanılacak DAS:Protein miktarı (w/w) oranı optimizasyonu



Şekil 4.1b. İmmobilizasyonda kullanılacak DPK:Protein miktarı (w/w) oranı optimizasyonu

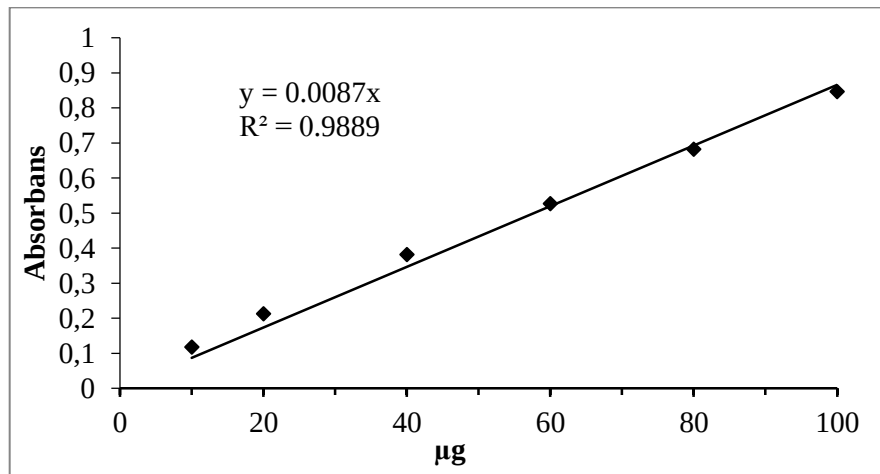
Belirlenen Destek:Protein miktarı (w/w) oranlarına göre immobilizasyon işlemi gerçekleştirildikten sonra elde edilen immobilize enzimlerin (DASE ve DPKE) tutunma yüzdeleri ve spesifik aktiviteleri hesaplandı (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. İmmobilizasyon sonucu elde edilen DASE ve DPKE sistemlerinin protein ve enzim aktivite tayin sonuçları

İmmobilize Sistem	Tutunan Protein Miktarı (mg protein/g destek)	Ünite (U/g destek)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)	Tutunma %
DASE	3.8	170.6	44.9	93
DPKE	3.61	180.3	49.9	95

4.3. Protein Tayini için Standart Grafiğın Hazırlanması

Elde edilen protein çözeltisi ve immobilize enzimlerin protein tayinleri, Bradford yöntemine göre gerçekleştirildi. Hazırlanan standart protein çözeltisinin farklı konsantrasyonları ile bu konsantrasyonlarda okunan absorbans değerleri arasında standart protein grafiğı oluşturuldu. Grafiğın doğru denklemi $y = 0.0087x$ ($R^2=0.9899$) olarak belirlendi, örneğın protein konsantrasyonu bu grafik denklemi yardımıyla hesaplandı (Şekil 4.2.).



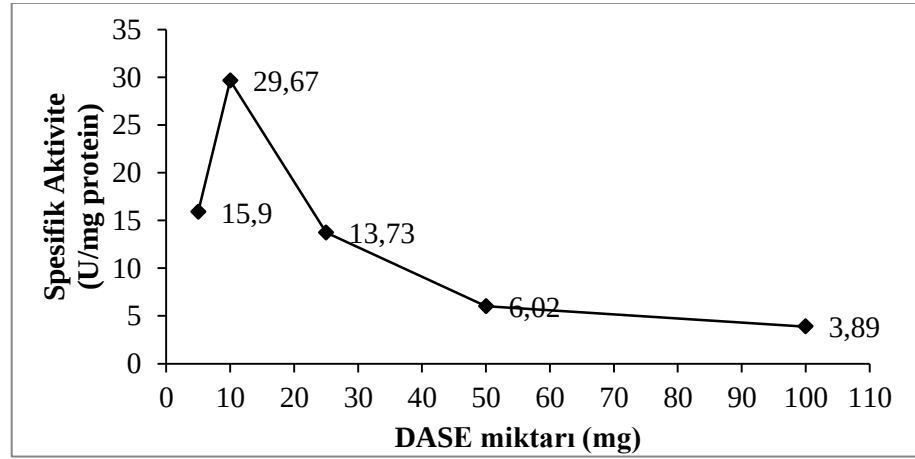
Şekil 4.2. Standart protein grafiğı

4.4. İmmobilize Lakkazların (DASE ve DPKE) Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi

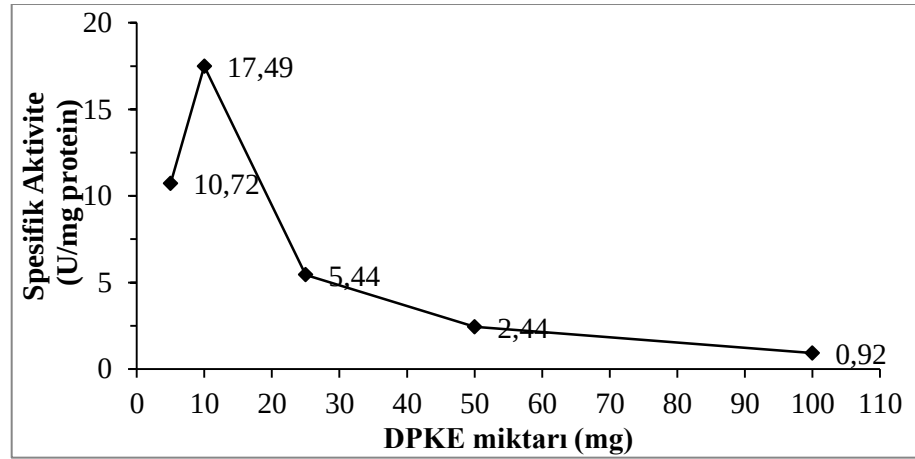
4.4.1. Lakkaz Aktivite Tayininde Kullanılacak DASE ve DPKE Miktarı Optimizasyonu

Miktar optimizasyonu, DASE ve DPKE'den 5, 10, 25, 50, 100 mg tartılarak Bölüm 3.2.9.1'de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Her bir sistemin 5 mM ABTS (0.1 M sitrat disodyum fosfat tamponunda pH 3.5) çözeltisine karşı en yüksek enzim aktivite değerinin gösterdiği DASE ve DPKE miktarı 10 mg olarak belirlendi.

Elde edilen sonuçlara göre Spesifik Aktivite (U/mg protein)-Enzim Miktarı (mg) grafikleri çizildi (Şekil 4.3a-4.3b).



Şekil 4.3a. Enzim aktivite tayininde kullanılacak DASE miktarının optimizasyonu

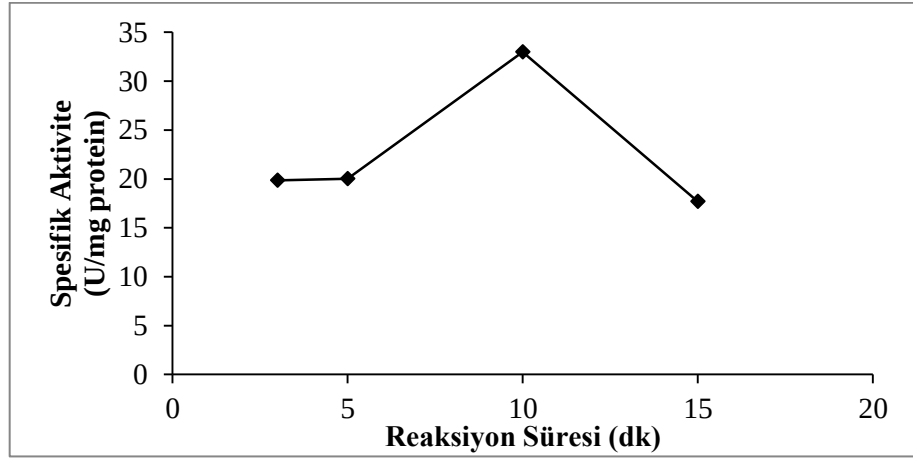


Şekil 4.3b. Enzim aktivite tayininde kullanılacak DPKE miktarının optimizasyonu

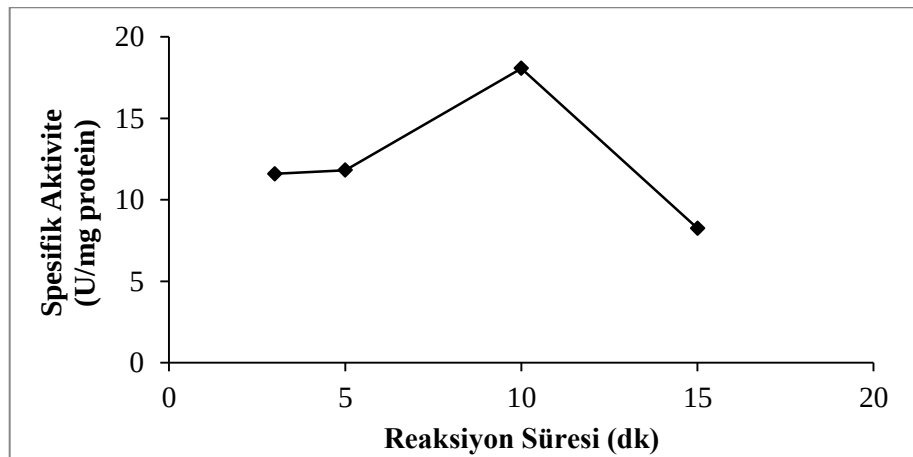
4.4.2. DASE ve DPKE'nin Lakkaz Aktivitesi Ölçümünde Kullanılacak Sürenin Belirlenmesi

İmmobilize sistemlerin ABTS ile reaksiyonunda kullanılacak sürenin belirlenmesi için Bölüm 3.2.9.2'de belirtildiği şekilde 3, 5, 10 ve 15 dakika sonucu DASE ve DPKE'nin lakkaz aktiviteleri spektrofotometrik olarak ölçüldü (Şekil 4.4a-4.4b).

En yüksek aktivite değerleri DASE ve DPKE için 10 dakikalık reaksiyon süresinde gözlemlendi.



Şekil 4.4a. DASE'nin ABTS ile reaksiyon süresine bağlı olarak aktivitesinin değişimi

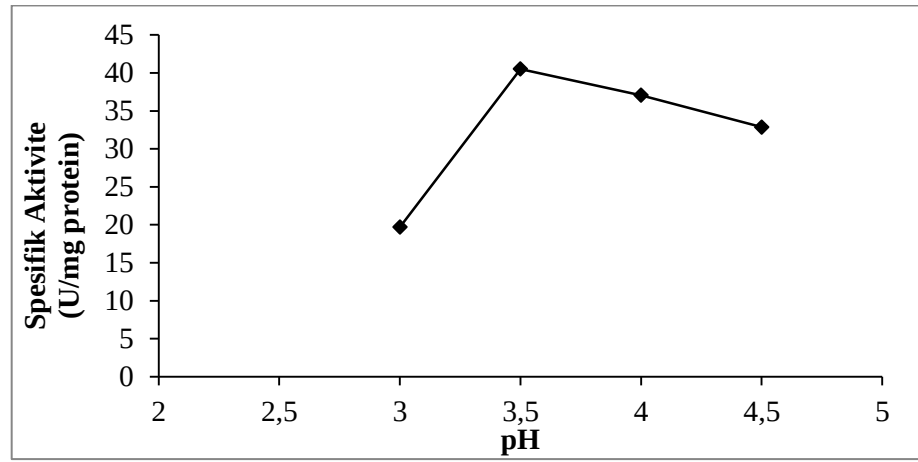


Şekil 4.4b. DPKE'nin ABTS ile reaksiyon süresine bağlı olarak aktivitesinin değişimi

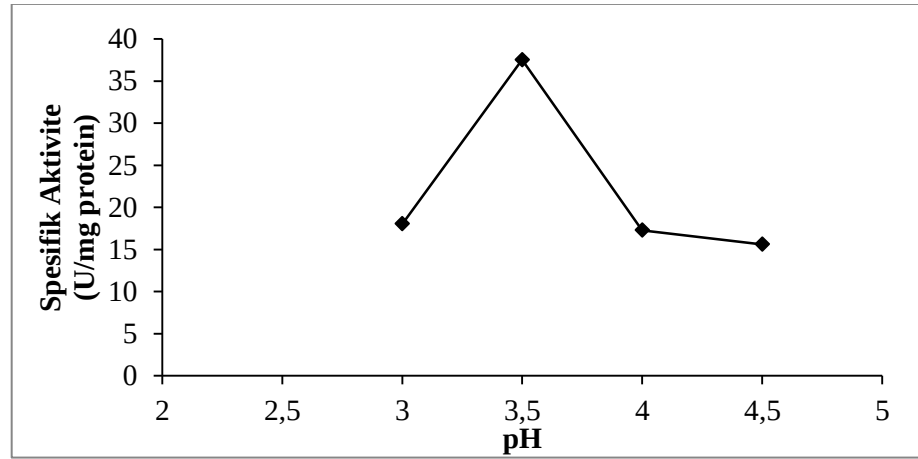
4.4.3. pH Optimizasyonu

pH optimizasyonu, Bölüm 3.2.9.3’ de belirtildiği şekilde çalışıldı. pH’ı 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 olan 0.1 M’lık disodyum-sitrat tamponlarında hazırlanan 5 mM’lık ABTS çözeltileri için DASE ve DPKE’nin lakkaz aktiviteleri ölçüldü.

Yapılan ölçümler sonucunda DASE ve DPKE için en yüksek aktivite pH 3.5’ta görüldü (Şekil 4.5a-4.5b).



Şekil 4.5a. DASE’nin lakkaz aktivitesinin pH’a bağlı değişimi

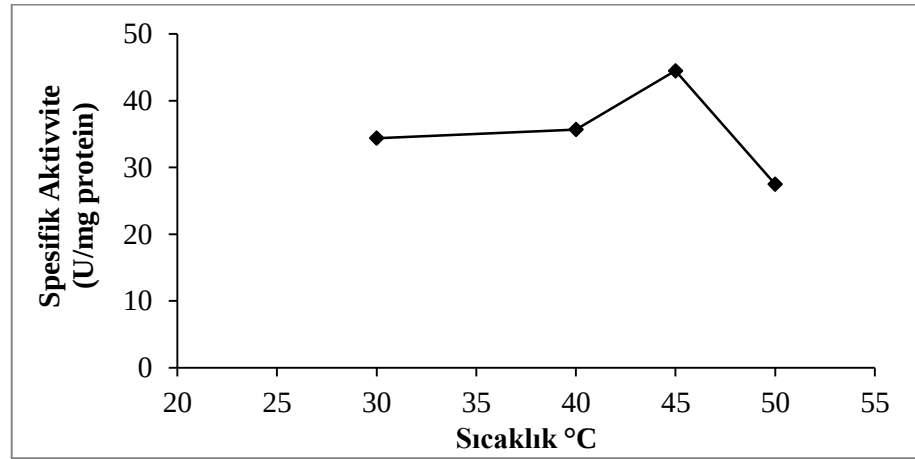


Şekil 4.5b. DPKE’nin lakkaz aktivitesinin pH’a bağlı değişimi

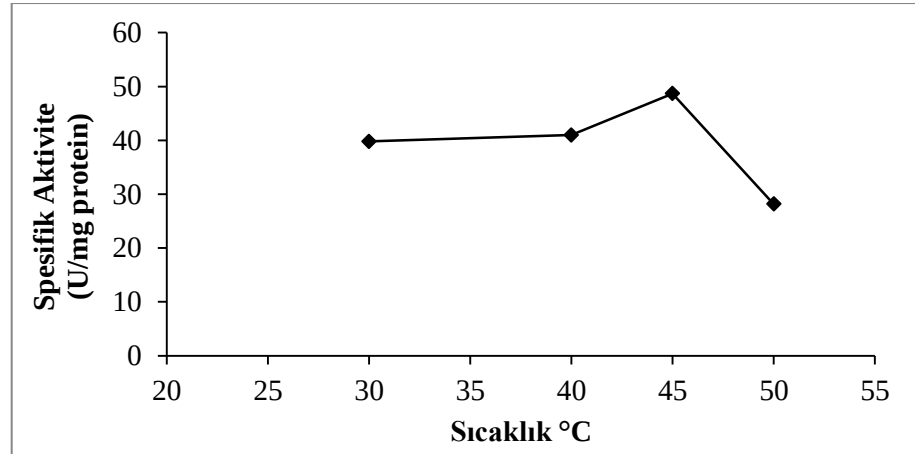
4.4.4. Sıcaklık Optimizasyonu

Sıcaklık optimizasyonu Bölüm 3.2.9.4’te belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. DASE ve DPKE sistemlerinin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık değerlerinin belirlenebilmesi için 30, 40, 45 ve 50 °C sıcaklıklarda çalışıldı.

Her iki immobilize sistem için de optimum sıcaklık değeri 45 °C olarak belirlendi (Şekil 4.6a-4.6b).



Şekil 4.6a. DASE’nin lakkaz aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi



Şekil 4.6b. DPKE’nin lakkaz aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi

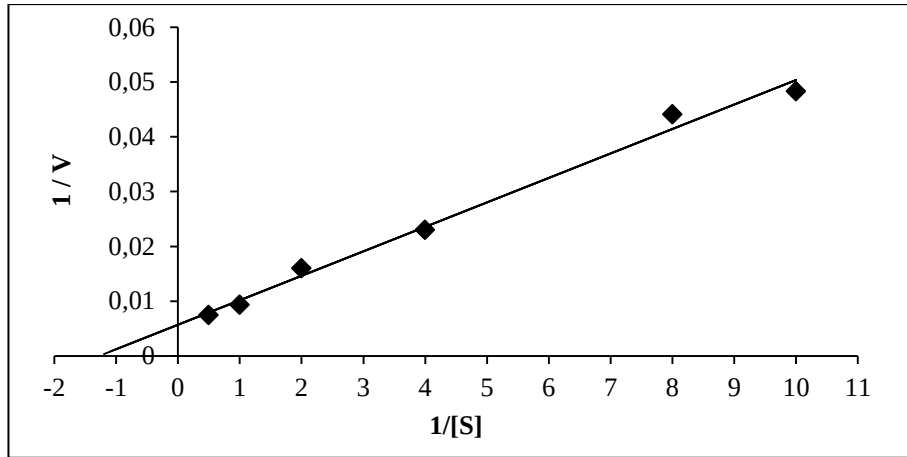
DASE ve DPKE’nin aktivite tayininde kullanılacak immobilize enzim miktarı, ABTS ile reaksiyon süresi, optimum pH ve optimum sıcaklık çalışmaları sonucu elde edilen sonuçlar Tablo 4.5’te verildi.

Tablo 4.5. DASE ve DPKE'nin aktivite tayini için yapılan optimizasyon çalışmalarının sonuçları

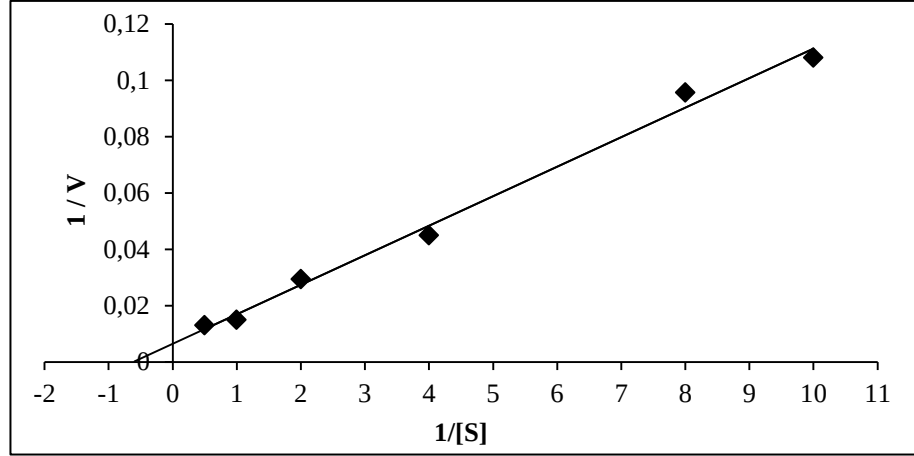
İmmobilize Sistem	İmmobilize Enzim Miktarı (mg)	Reaksiyon Süresi (dk)	Optimum pH	Optimum Sıcaklık (°C)
DASE	10	10	3.5	45
DPKE	10	10	3.5	45

4.4.5. DASE ve DPKE'nin K_m ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi

İmmobilize enzim sistemlerinin K_m ve V_{max} değerleri Bölüm 3.2.9.5'te belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Optimum şartlarda, DASE ve DPKE'nin 0.1 -2 mM konsantrasyon aralığında hazırlanan ABTS çözeltilerine karşı gösterdiği aktivite değerleri belirlendi. Spesifik aktivite (U/mg protein) ile substrat konsantrasyonları arasında oluşturulan Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Şekil 4.7a-4.7b).



Şekil 4.7a. DASE için oluşturulan Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.7b. DPKE için oluşturulan Lineweaver-Burk grafiği

Lineweaver-Burk grafiklerinden yararlanılarak her iki immobilize sistem için K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı, aynı zamanda katalitik etkinlik değerleri (V_{max}/K_m) belirlendi (Tablo 4.6).

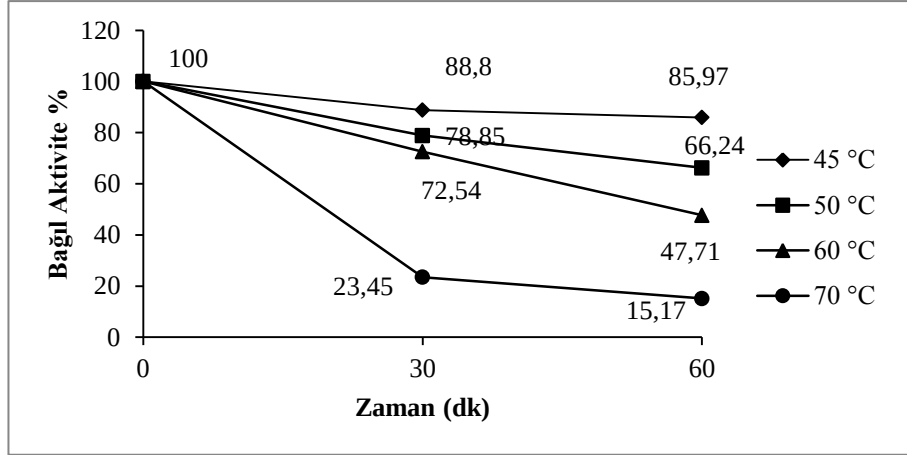
Tablo 4.6. DASE ve DPKE için gerçekleştirilen kinetik çalışma sonuçları

İmmobilize Sistem	K_m (mM)	V_{max} (U/mg)	V_{max}/K_m
DASE	0.789	175.44	222.36
DPKE	1.616	153.85	95.2

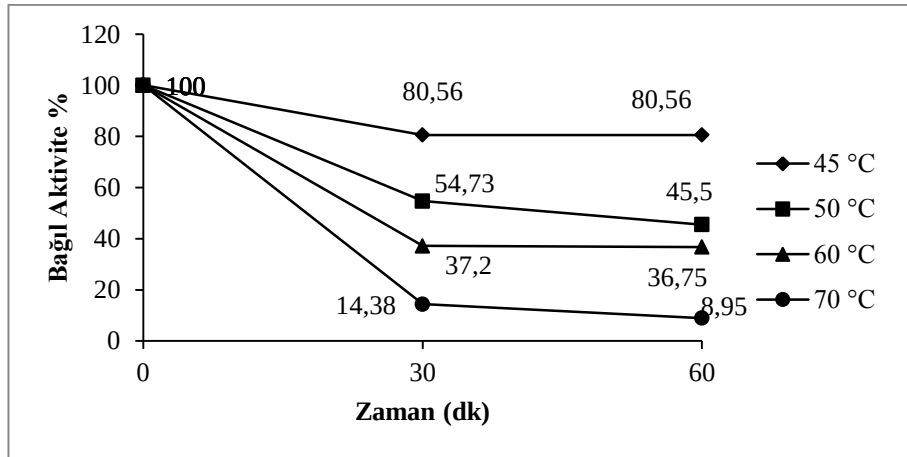
4.4.6. Termal Kararlılık

Bölüm 3.2.9.6'da belirtildiği şekilde gerçekleştirilen termal kararlılık çalışmasına göre immobilize enzim (DASE ve DPKE) örnekleri 45, 50, 60 ve 70 °C sıcaklıklardaki su banyolarında 30 ve 60 dakikalık periyotlarda bekletildi. İşlem sonunda 1 dakika boyunca buz banyosunda tutulan DASE ve DPKE için aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Aktivite tayini sonuçlarına bakılarak her bir sıcaklıkta 30 ve 60 dakika bekletilen immobilize enzimlerin termal kararlılıkları hesaplanan bağlı

aktivitelerine göre değerlendirildi. DASE ve DPKE için 45 °C’de hiçbir ön işleme maruz bırakılmadan gerçekleştirilen aktivite tayini sonuçları % 100 olarak kabul edildi ve Bağlı aktivite-Zaman grafikleri çizildi (Şekil 4.8a-4.8b).



Şekil 4.8a. DASE için termal kararlılık grafiği



Şekil 4.8b. DPKE için termal kararlılık grafiği

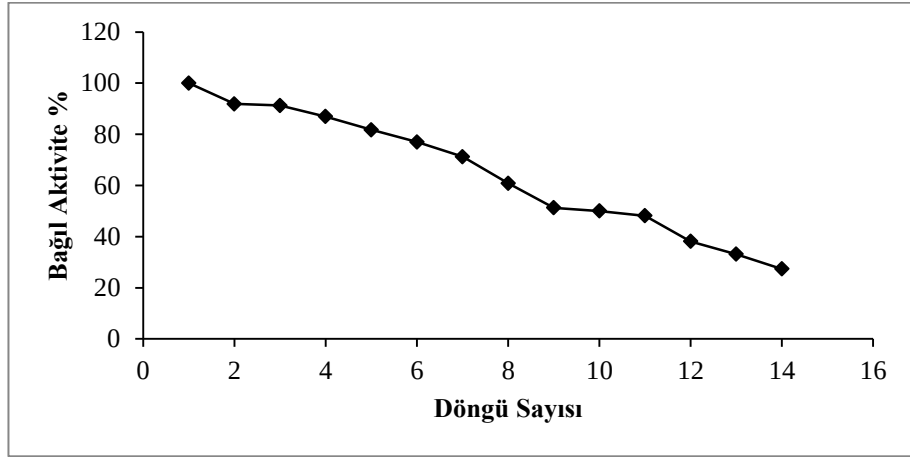
Şekil 4.8a’da görüldüğü gibi DASE; 60 °C’de, 60 dakikada bağlı aktivitesinin % 47.71’ini; 70 °C’de ise 60 dakikada bağlı aktivitesinin % 15.17’ sini korumaktadır. Şekil 4.8b’de görüldüğü gibi DPKE; 60 °C’de, 60 dakikada bağlı aktivitesinin % 36.75’ini; 70 °C’de ise 60 dakikada % 8.95’ini korumaktadır. Sonuçlara bakıldığında

her iki immobilize sistemin de yüksek sıcaklıklarda aktivitelerinin bir kısmını koruduğu gözlenmiştir ancak her iki immobilize enzim de termostabil değildir. Yine de bu çalışmada, DASE'nin termal kararlılığının DPKE'ye göre daha yüksek olduğu görülmektedir.

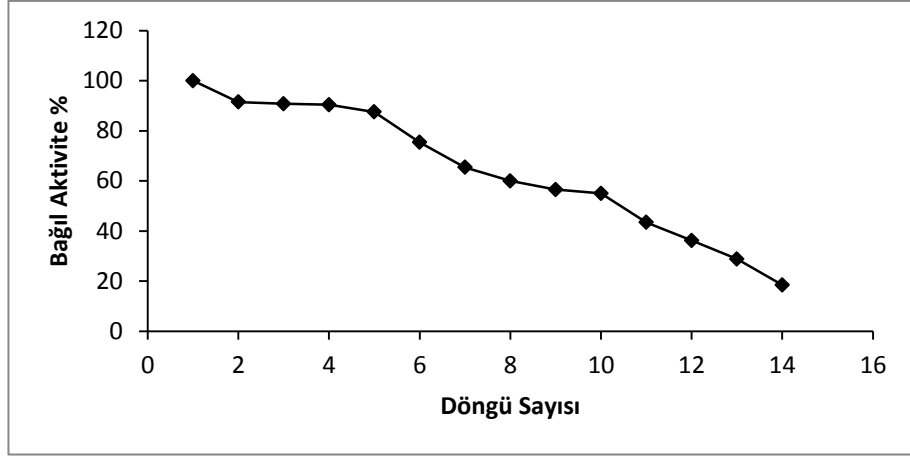
4.4.7. DASE ve DPKE Sistemlerinin Tekrar Kullanılabilirliği

DASE ve DPKE için tekrar kullanılabilirlik çalışması Bölüm 3.2.9.7'de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.

Hazırlanan immobilize sistemlerin optimum koşullarda ilk aktiviteleri ölçüldükten sonra DASE ve DPKE tampon ile yıkanıp oda sıcaklığında 30 dakika bekletilerek rejenere edildi. Ölçülen ilk spesifik aktivite değerleri her iki sistem için de % 100 kabul edilerek her rejenerasyon sonunda aktivite ölçümlerine devam edildi. Elde edilen değerler ile DASE ve DPKE için bağıl aktivite-döngü sayısı grafikleri çizildi (Şekil 4.9a-4.9b).



Şekil 4.9a. DASE için tekrar kullanılabilirlik grafiği



Şekil 4.9b. DPKE için tekrar kullanılabilirlik grafiği

DASE, bağli aktivitesinin % 71'ini 7. döngüye kadar korurken 14. döngüde ise % 27.36'sını koruduğu gözlenmiştir. DPKE, 7. döngüye kadar bağli aktivitesinin % 65'4 ünü korurken, 14. döngüde ise % 18.47'sini koruduğu gözlenmiştir.

4.5. İmmobilize Lakkaz Sistemlerinin (DASE ve DPKE) Bazı Tekstil Boyarmaddelerinin Renklerini Giderme Etkilerinin Belirlenmesi

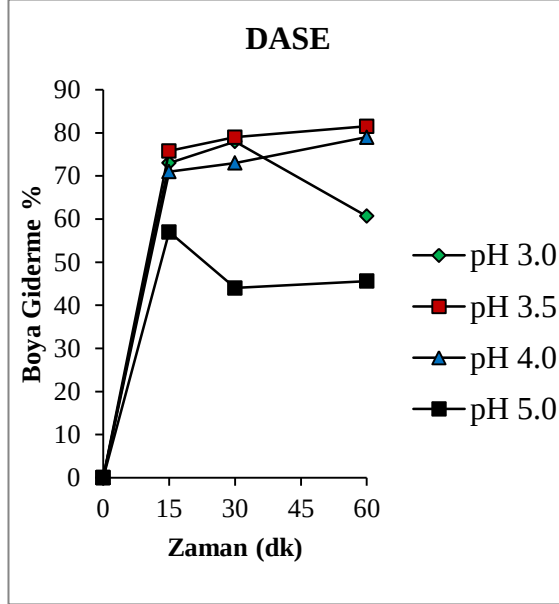
Tezin bu bölümünde, DASE ve DPKE sistemlerinin, Reaktif Mavi 19 (RB-19), Reaktif Sarı 15 (RY-15) ve Reaktif Kırmızı 239 (RR-239) tekstil boyarmaddelerinin renklerini giderme aktivitelerinin en yüksek olduğu koşullar (pH, sıcaklık, enzim miktarı, boya konsantrasyonu) belirlendi.

Denemeler için, Bölüm 3.2.10'da belirtildiği şekilde hazırlanan sistemler kullanıldı.

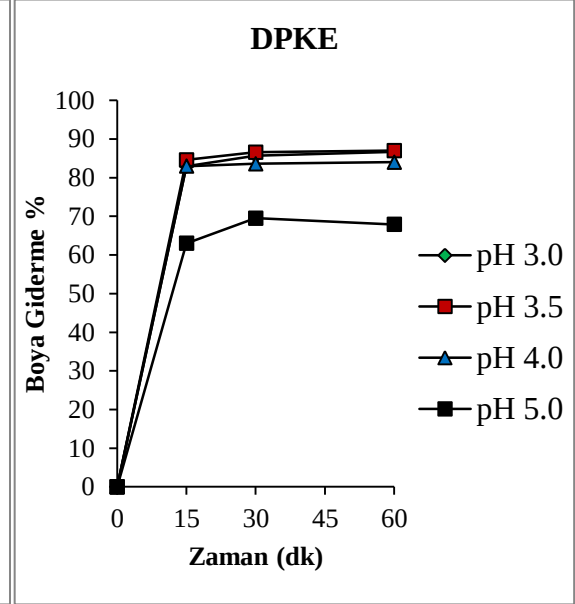
4.5.1. pH Optimizasyonu

Bölüm 3.2.10.1'de verildiği şekilde gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda, DASE ve DPKE'nin çalışılan 3 boyarmadde için 15, 30 ve 60. dakikalarda renksizleştirme aktiviteleri ölçüldü. Yapılan denemeler sonucunda 60. dakikada elde

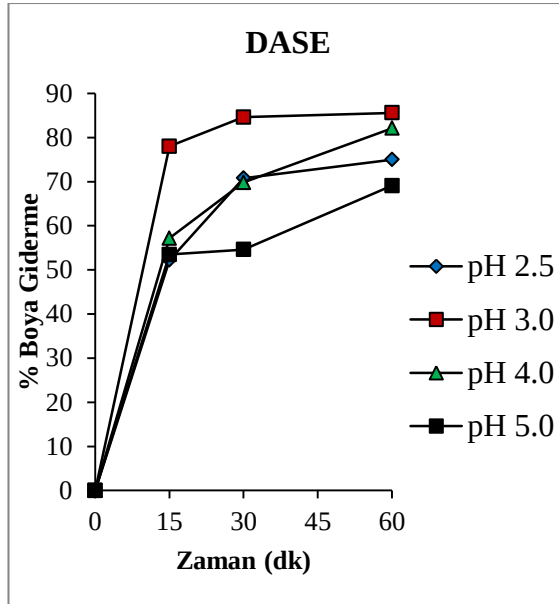
edilen en yüksek renk giderme %'lerine göre optimum pH değerleri belirlendi (Şekil 4.10a, 4.10b, 4.11a, 4.11b, 4.12a, 4.12b).



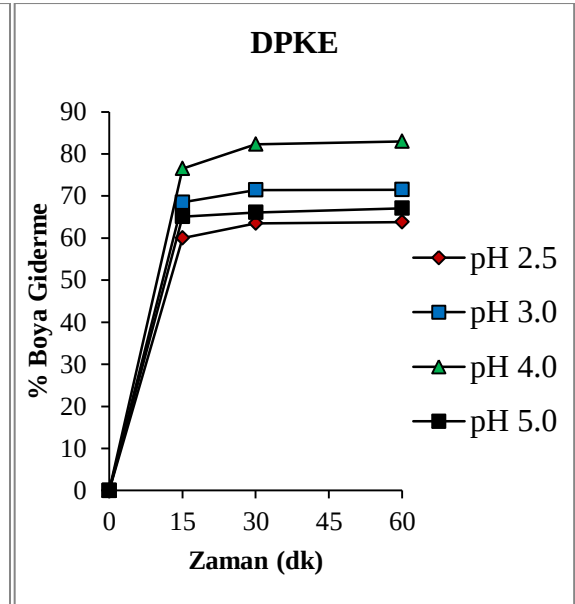
Şekil 4.10a. RB-19 Optimum pH grafiği



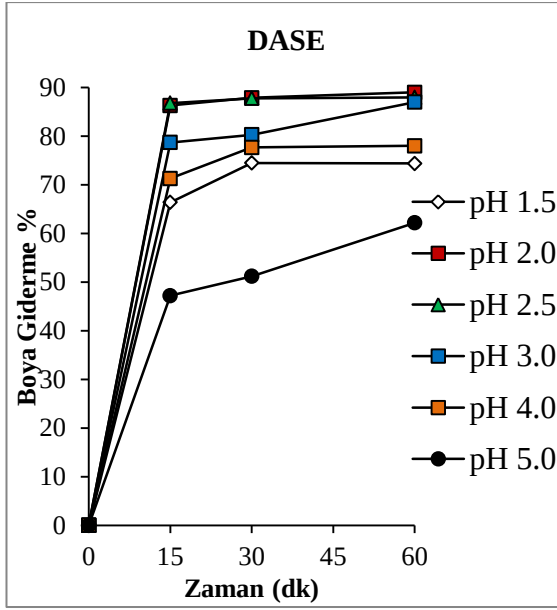
Şekil 4.10b. RB-19 Optimum pH grafiği



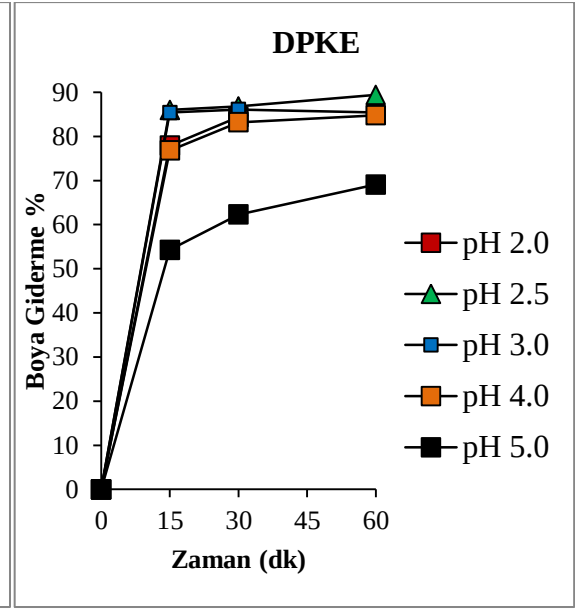
Şekil 4.11a. RY-15 Optimum pH grafiği



Şekil 4.11b. RY-15 Optimum pH grafiği



Şekil 4.12a. RR-239 Optimum pH grafiği



Şekil 4.12b. RR-239 Optimum pH grafiği

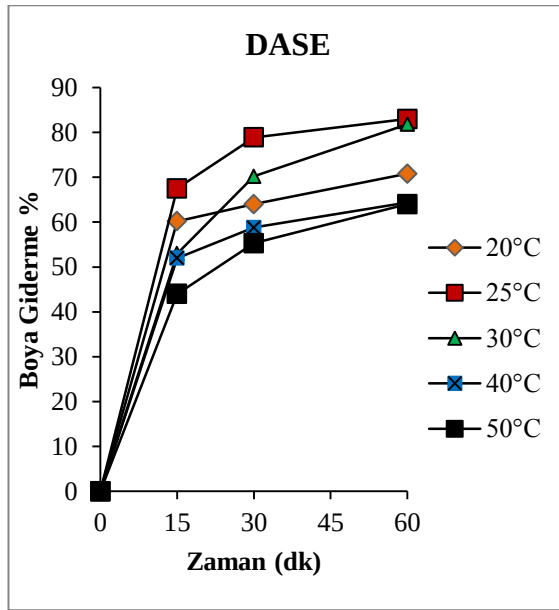
Tablo 4.7. DASE ve DPKE'nin RB-19, RY-15, RR-239 için optimum pH çalışması sonuçları

		pH	Boya Giderme Aktivitesi (%)		
			15 dk	30 dk	60 dk
DASE	RB-19	3.0	73	78	60.7
		3.5	75.8	79	81.5
		4.0	71	73	79
		5.0	57	44	45.6
	RY-15	2.5	52.2	70.8	75
		3.0	78	84.6	85.6
		4.0	57.2	69.8	82.1
		5.0	53.5	54.6	69.1
	RR-239	1.5	66.4	74.5	74.4
		2.0	86.3	87.9	89
		2.5	86.8	87.8	88
		3.0	78.7	80.3	87
		4.0	71.3	77.7	78
		5.0	47.2	51.2	62.2
DPKE	RB-19	3.0	83	85.7	86.7
		3.5	84.6	86.6	87
		4.0	83	83.6	84
		5.0	63	69.5	67.9
	RY-15	2.5	60	63.5	63.8
		3.0	68.5	71.4	71.5
		4.0	76.5	82.3	83
		5.0	65.1	66.1	67.1
	RR-239	2.0	77.9	84.4	85.4
		2.5	86	86.8	89.4
		3.0	85.4	86.1	85.4
		4.0	76.8	83.2	84.8
		5.0	54.3	62.3	69.1

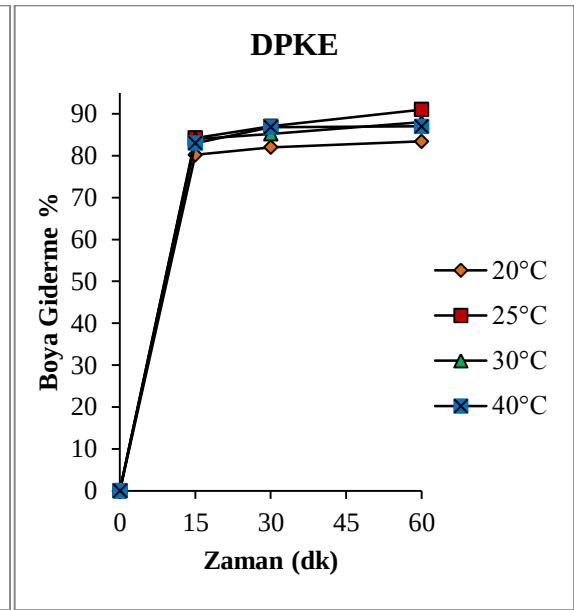
DASE ile belirlenen optimum pH değerleri, RB-19 için pH 3.5; RY-15 için pH 3.0; RR-239 için pH 2.0'dir. DPKE ile belirlenen optimum pH değerleri, RB-19 için pH 3.5; RY-15 için pH 4.0; RR-239 için pH 2.5'tur (Tablo 4.7.).

4.5.2. Sıcaklık Optimizasyonu

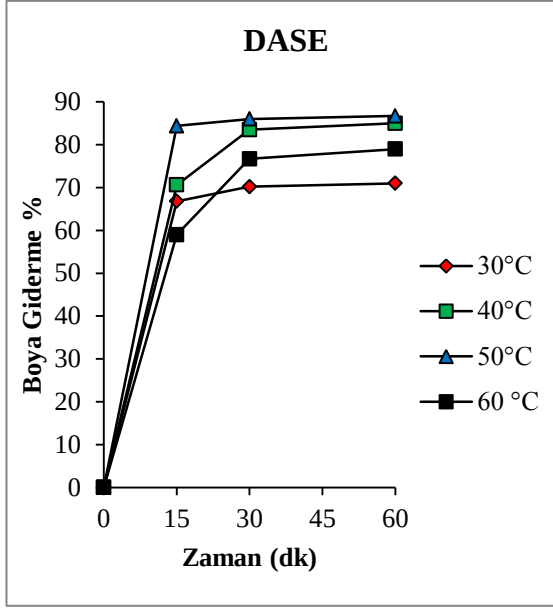
Bölüm 3.2.10.2'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda DASE ve DPKE'nin farklı sıcaklıklarda çalışılan 3 boyarmadde için 15, 30 ve 60. dakikalarda renksizleştirme aktiviteleri ölçüldü. Yapılan denemeler sonucunda 60. dakikada elde edilen en yüksek renk giderme %'lerine göre optimum sıcaklık değerleri belirlendi (Şekil 4.13a, 4.13b, 4.14a, 4.14b, 4.15a, 4.15b).



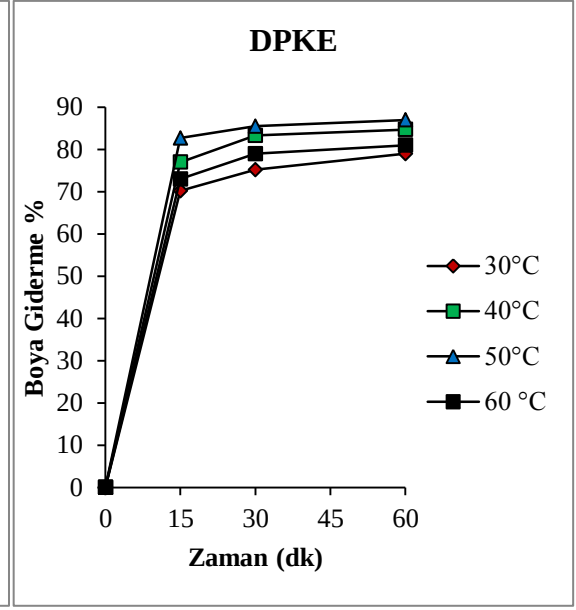
Şekil 4.13a. RB-19 Optimum sıcaklık grafiği



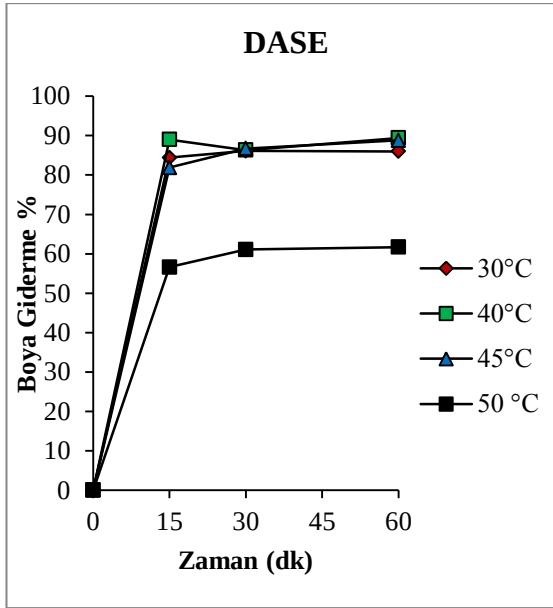
Şekil 4.13b. RB-19 Optimum sıcaklık grafiği



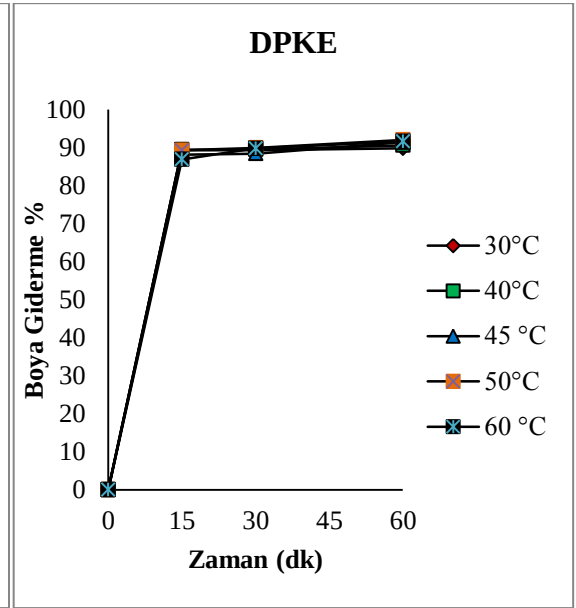
Şekil 4.14a. RY-15 Optimum sıcaklık grafiği



Şekil 4.14b. RY-15 Optimum sıcaklık grafiği



Şekil 4.15a. RR-239 Optimum sıcaklık grafiği



Şekil 4.15b. RR-239 Optimum sıcaklık grafiği

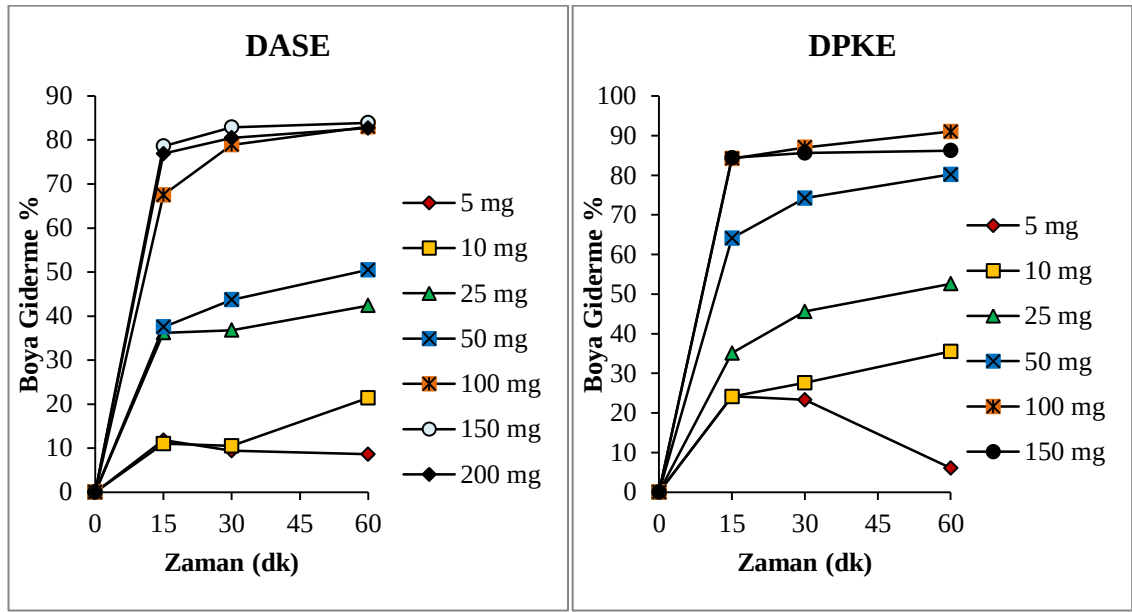
Tablo 4.8. DASE ve DPKE'nin RB-19, RY-15, RR-239 için optimum sıcaklık çalışması sonuçları

		Sıcaklık (°C)	Boya Giderme Aktivitesi (%)		
			15 dk	30 dk	60 dk
DASE	RB-19	20	60.2	64	70.8
		25	67.5	78,9	83
		30	53	70.2	81.8
		40	52	58.8	64.4
		50	44	55.3	64
	RY-15	30	66.8	70.2	71
		40	70.6	83.5	85
		50	84.4	86	86.7
		60	59	76.7	79
	RR-239	30	84.4	86.1	86
		40	89	86.3	89.4
		45	81.9	86.7	88.8
		50	56.6	61.1	61.7
DPKE	RB-19	20	80.2	82	83.4
		25	84.2	87	91
		30	84	85.2	88
		40	83	86.8	87
		50	81.7	86.5	84
	RY-15	30	70.2	75.2	79
		40	77	83. 3	84. 7
		50	82.7	85.5	87
		60	73	79	81
	RR-239	30	89.3	89.3	89.8
		40	89.4	89.5	90.6
		45	88.1	88.4	91.4
		50	89.3	89.9	92
		60	86.9	89.8	91.6

DASE ile belirlenen optimum sıcaklık değerleri, RB-19 için 25 °C; RY-15 için 50 °C; RR-239 için 40 °C'dir. DPKE ile belirlenen optimum pH değerleri, RB-19 için 25 °C; RY-15 için 50 °C; RR-239 için 50 °C'dir (Tablo 4.8.).

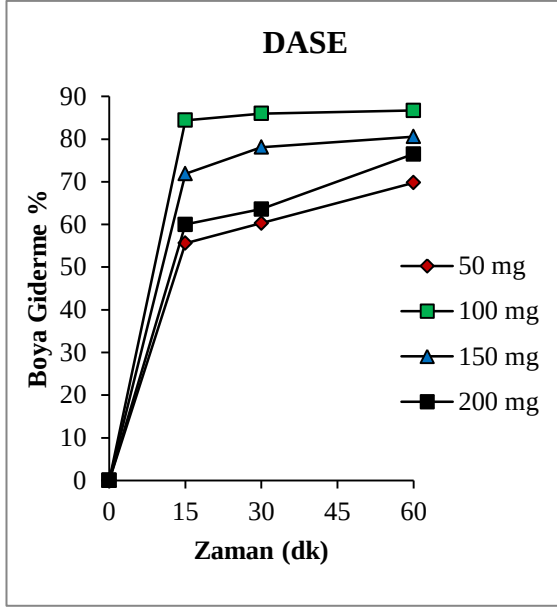
4.5.3. Enzim Miktarı Optimizasyonu

Bölüm 3.2.10.3'te belirtildiği şekilde gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda farklı enzim miktarlarındaki DASE ve DPKE'nin, çalışılan 3 boyarmadde için 15, 30 ve 60. dakikalarda renksizleştirme aktiviteleri ölçüldü. Yapılan denemeler sonucunda 60. dakikada elde edilen en yüksek renk giderme %'lerine göre optimum enzim miktarları belirlendi (Şekil 4.16a, 4.16b, 4.17a, 4.17b, 4.18a, 4.18b).

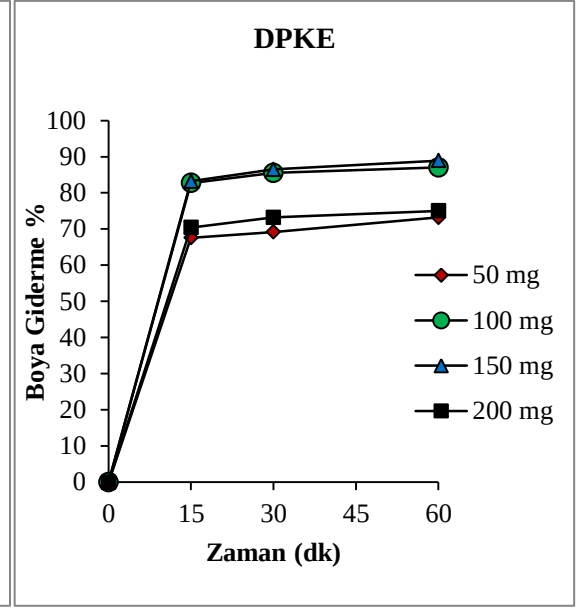


Şekil 4.16a. RB-19 Enzim miktarı optimizasyon grafiği

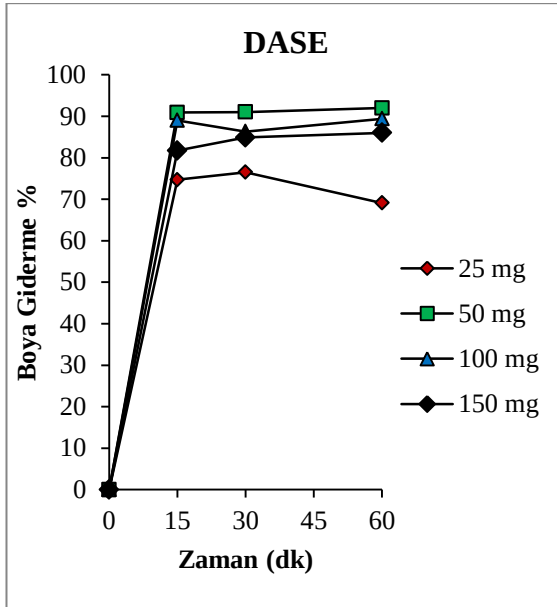
Şekil 4.16b. RB-19 Enzim miktarı optimizasyon grafiği



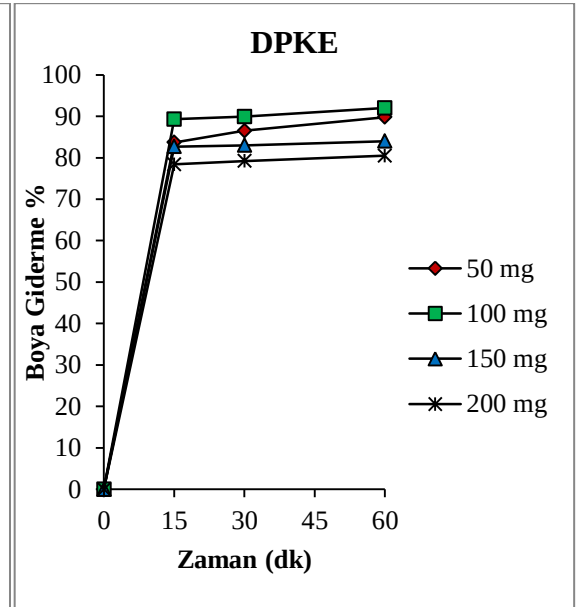
Şekil 4.17a. RY-15 Enzim miktarı optimizasyon grafiği



Şekil 4.17b. RY-15 Enzim miktarı optimizasyon grafiği



Şekil 4.18a. RR-239 Enzim miktarı optimizasyon grafiği



Şekil 4.18b. RR-239 Enzim miktarı optimizasyon grafiği

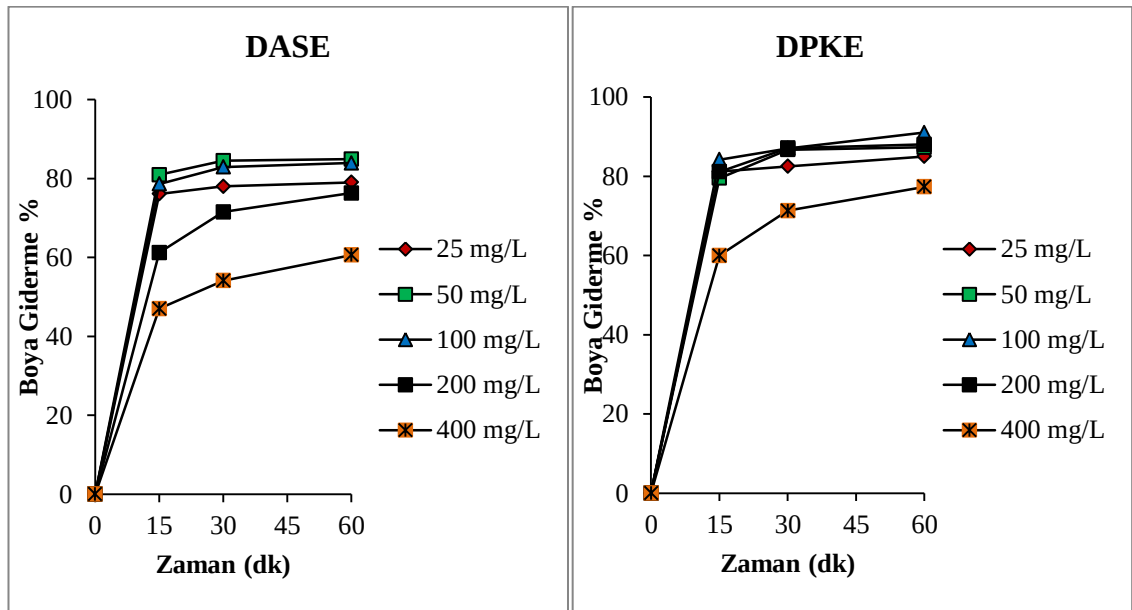
Tablo 4.9. DASE ve DPKE'nin RB-19, RY-15, RR-239 için optimum enzim miktarı çalışmasının sonuçları

		İmmobilize Enzim Miktarı (mg)	Boya Giderme Aktivitesi (%)		
			15 dk	30 dk	60 dk
DASE	RB-19	5	11.8	9.4	8.6
		10	11	10.5	21.4
		25	36.2	36.8	42.4
		50	37.5	43.7	50.5
		100	67.5	78.9	83
		150	78.6	82.9	83.9
		200	76.9	80.5	82.7
	RY-15	50	55.6	60.3	69.8
		100	84.4	86	86.7
		150	71.9	78.1	80.6
		200	60	63.6	76.5
	RR-239	25	74.7	76.5	69.1
		50	90.9	91	92
		100	89	86.3	89.4
		150	81.7	84.9	86
DPKE	RB-19	5	23.2	23.3	6.1
		10	24.1	27.6	35.5
		25	35.1	45.6	52.6
		50	64.1	74.2	80.2
		100	84.2	87	91
		150	84.4	85.6	86.2
	RY-15	50	67.6	69.2	73.2
		100	82.7	85.5	87
		150	83.2	86.5	88.9
		200	70.4	73.2	75
	RR-239	50	83.7	86.5	89.8
		100	89.3	89.9	92
		150	82.7	83	84
		200	78.4	79.2	80.5

Belirlenen optimum DASE miktarları, RB-19 için 150 mg; RY-15 için 100 mg; RR-239 için 50 mg'dır. DPKE miktarı için belirlenen optimum değerler, RB-19 için 100 mg; RY-15 için 150 mg; RR-239 için 100 mg'dır (Tablo 4.9.).

4.5.4. Boya Konsantrasyonu Optimizasyonu

Bölüm 3.2.10.4'te belirtildiği şekilde gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda, DASE ve DPKE'nin çalışılan 3 boyarmadde için farklı boya konsantrasyonlarında 15, 30 ve 60. dakikalarda renksizleştirme aktiviteleri ölçüldü. Yapılan denemeler sonucunda 60. dakikada elde edilen en yüksek renk giderme %'lerine göre optimum boya konsantrasyonları belirlendi (Şekil 4.19a, 4.19b, 4.20a, 4.20b, 4.21a, 4.21b).

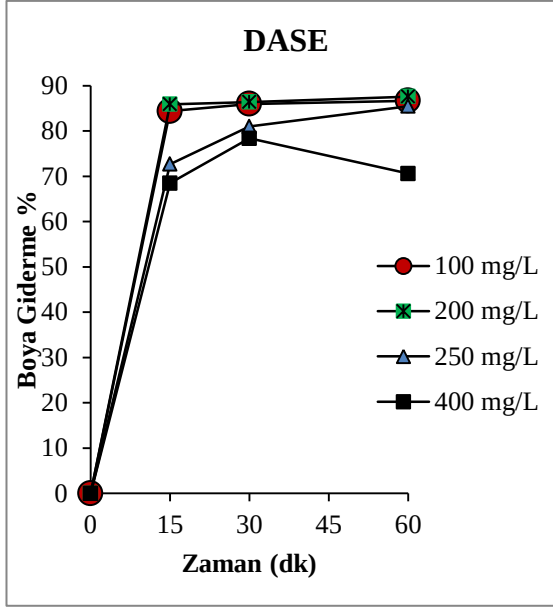


Şekil 4.19a. RB-19 Boya

konsantrasyonu optimizasyon grafiği

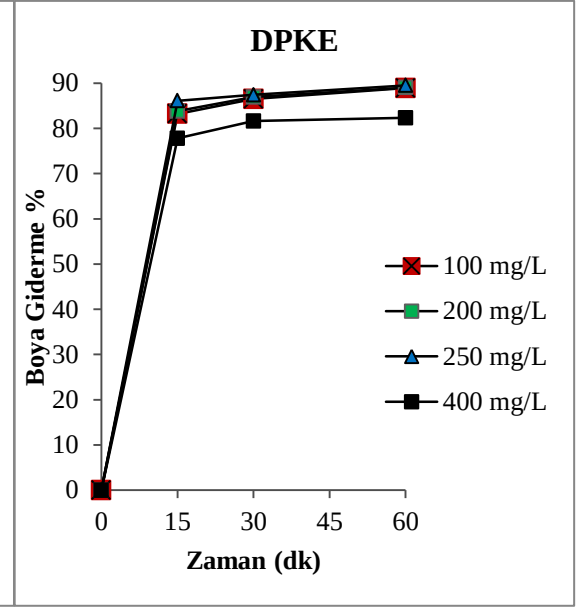
Şekil 4.19b. RB-19 Boya

konsantrasyonu optimizasyon grafiği



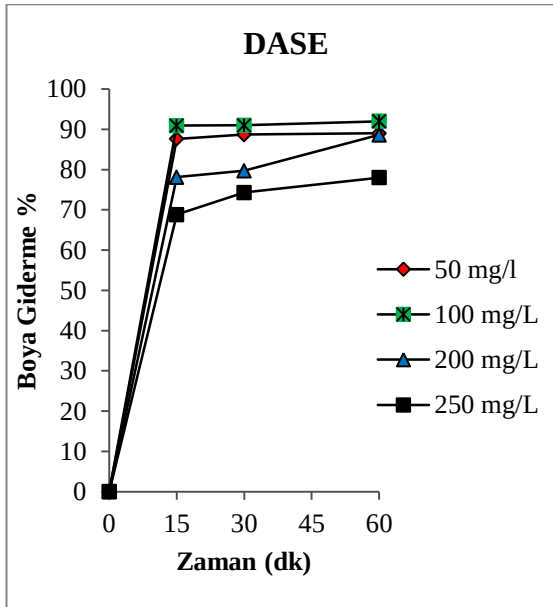
Şekil 4.20a. RY-15 Boya

konsantrasyonu optimizasyon grafiği



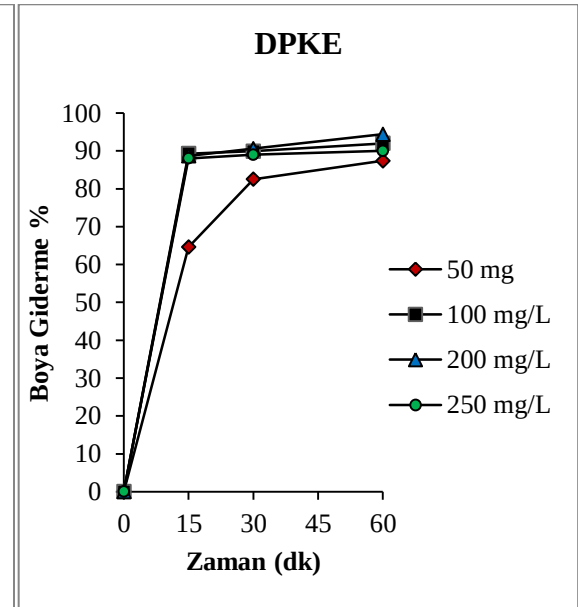
Şekil 4.20b. RY-15 Boya

konsantrasyonu optimizasyon grafiği



Şekil 4.21a. RR-239 Boya

konsantrasyonu optimizasyon grafiği



Şekil 4.21b. RR-239 Boya

konsantrasyonu optimizasyon grafiği

Tablo 4.10. DASE ve DPKE'nin RB-19, RY-15, RR-239 için optimum boya konsantrasyonu çalışmasının sonuçları

		Boya Konsantrasyonu (mg/L)	Boya Giderme Aktivitesi (%)		
			15 dk	30 dk	60 dk
DASE	RB-19	25	76.1	78	79
		50	80.9	84.5	84.9
		100	78.6	82.9	83.9
		200	61.2	71.5	76.3
		400	47	54.1	60.6
	RY-15	100	84.4	86	86.7
		200	85.9	86.4	87.6
		250	72.7	81	85.5
		400	68.5	78.4	70.6
	RR-239	50	87.6	88.7	89
		100	90.9	91	92
		200	78.1	79.7	88.6
		250	68.8	74.3	78
DPKE	RB-19	25	81.2	82.5	85
		50	79.5	86.7	87.3
		100	84.2	87	91
		200	81.1	87.1	88
		400	60	71.3	77.3
	RY-15	100	83.2	86.5	88.9
		200	83.8	86.9	89
		250	86.1	87.4	89.5
		400	77.8	81.6	82.3
	RR-239	50	64.6	82.5	87.4
		100	89.3	89.9	92
		200	88.7	90.6	94.4
		250	88	89	90

DASE için belirlenen optimum boya konsantrasyonu değerleri, RB-19 için 50 mg/L; RY-15 için 200 mg/L; RR-239 için 100 mg/L'dir. DPKE için belirlenen optimum boya konsantrasyonu değerleri, RB-19 için 100 mg/L; RY-15 için 250 mg/L; RR-239 için 200 mg/L'dir (Tablo 4.10).

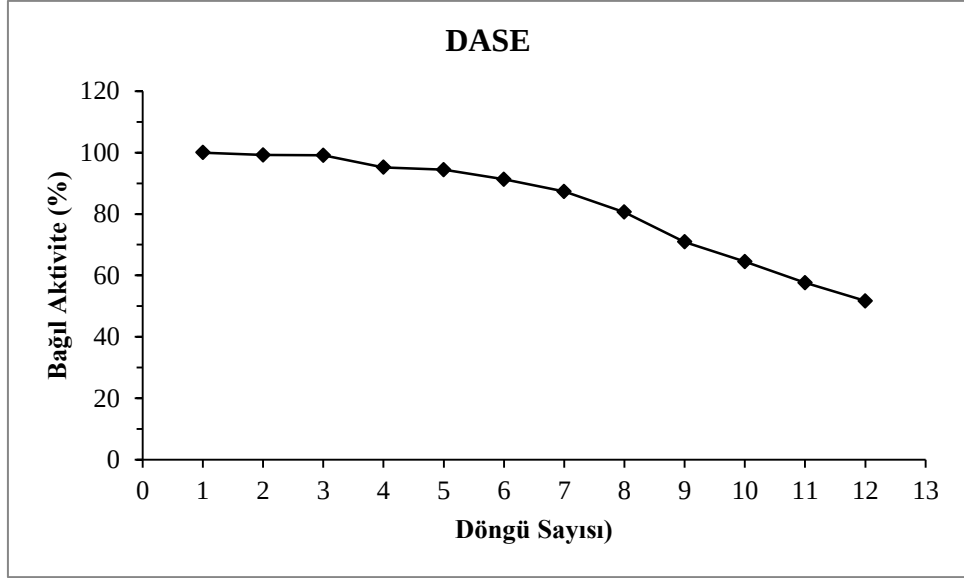
4.5.5. Tekrar Kullanılabilirlik

İmmobilize sistemlerin kesikli sistemlerde tekrar kullanılabilirliği, Bölüm 3.2.10.5'te belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.

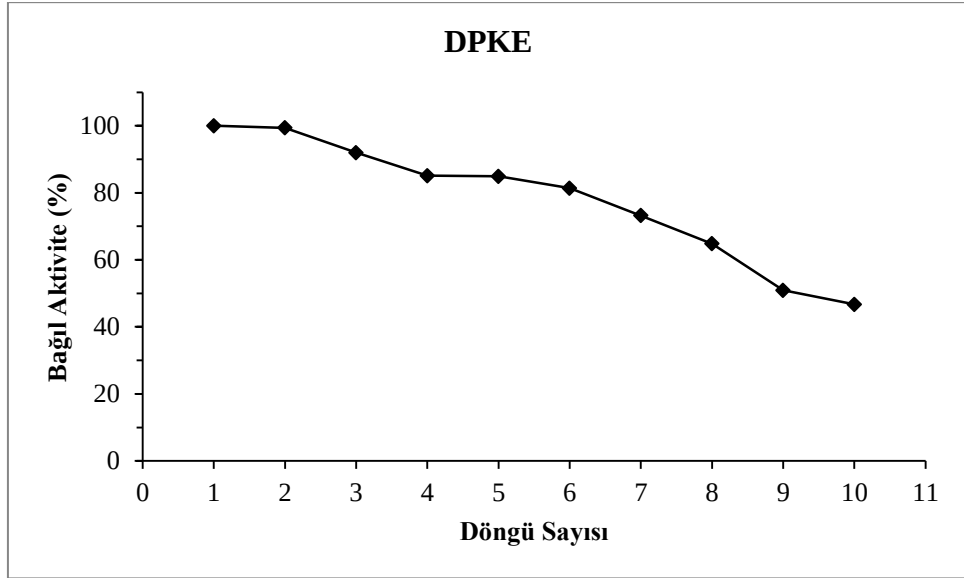
Hazırlanan immobilize sistemlerin optimum koşullarda çalışılan 3 boyarmadde için çoklu kez renk giderme aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. En yüksek boya giderme % değerleri, % 100 kabul edilerek bağlı aktivite-döngü sayısı grafikleri çizildi (Şekil 4.22a, 4.22b, 4.23a, 4.23b, 4.24a, 4.24b).

DASE immobilize sistemi RB-19 için 8. döngüye kadar aktivitesinin % 80,6'sını; RY-15 için 7. döngüye kadar aktivitesinin % 81,3'ünü, RR-239 için 8. döngüye kadar aktivitesinin % 80,3'ünü koruduğu görüldü.

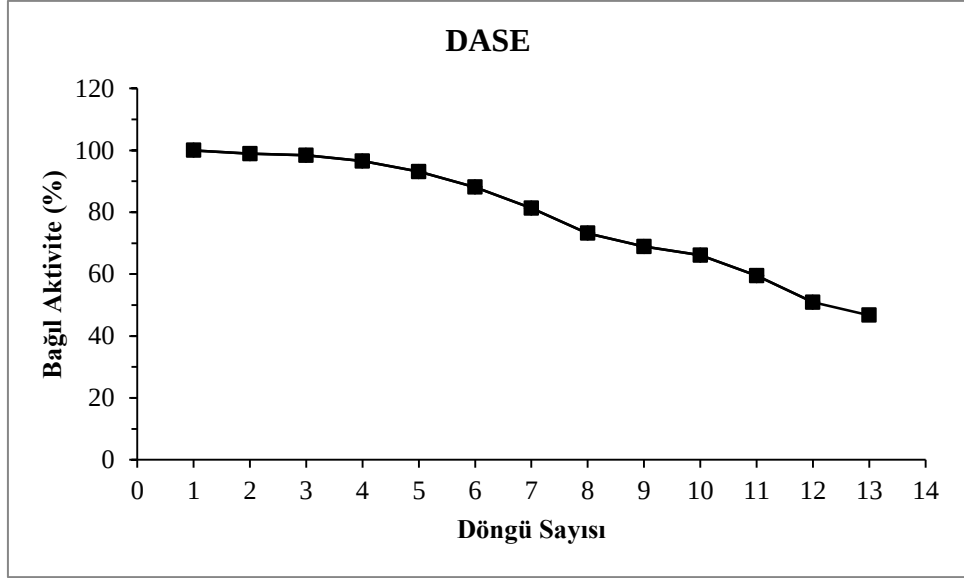
DPKE immobilize sistemi RB-19 için 6. döngüye kadar aktivitesinin % 81,4'ünü; RY-15 için 5. döngüye kadar aktivitesinin % 83,6'sını, RR-239 için 5. döngüye kadar aktivitesinin % 80,6'sını koruduğu görüldü.



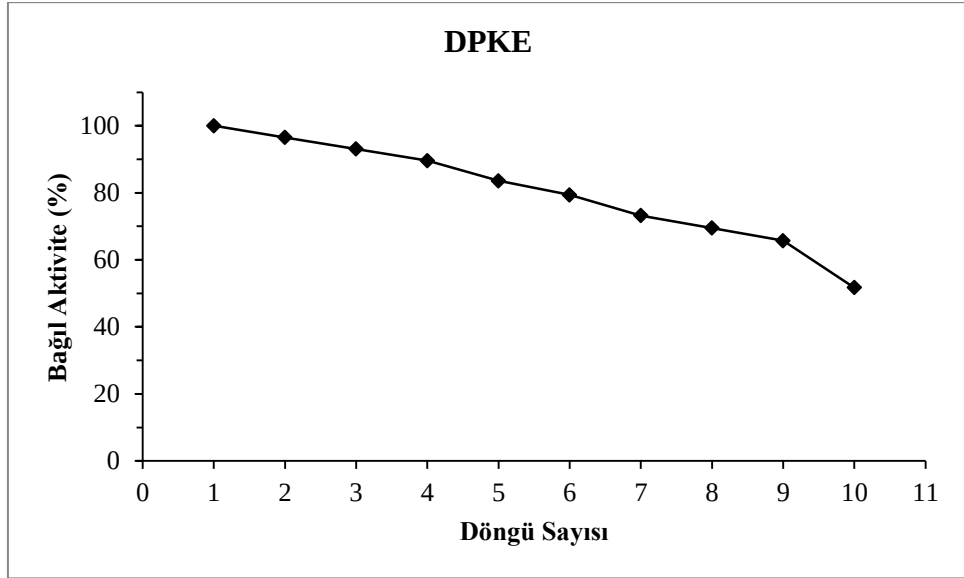
Şekil 4.22a. RB-19'un renk giderimi için tekrar kullanılabilirlik grafiği



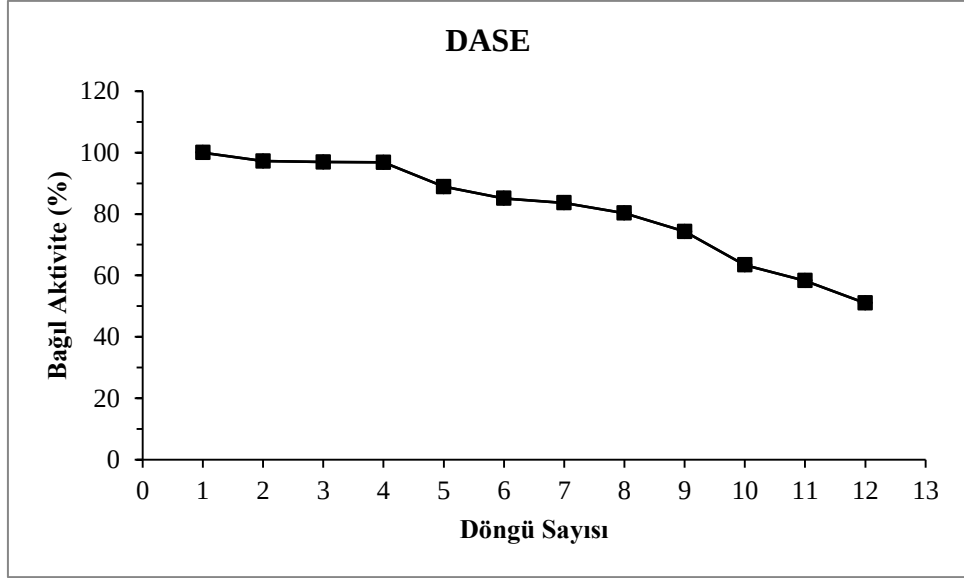
Şekil 4.22b. RB-19'un renk giderimi için tekrar kullanılabilirlik grafiği



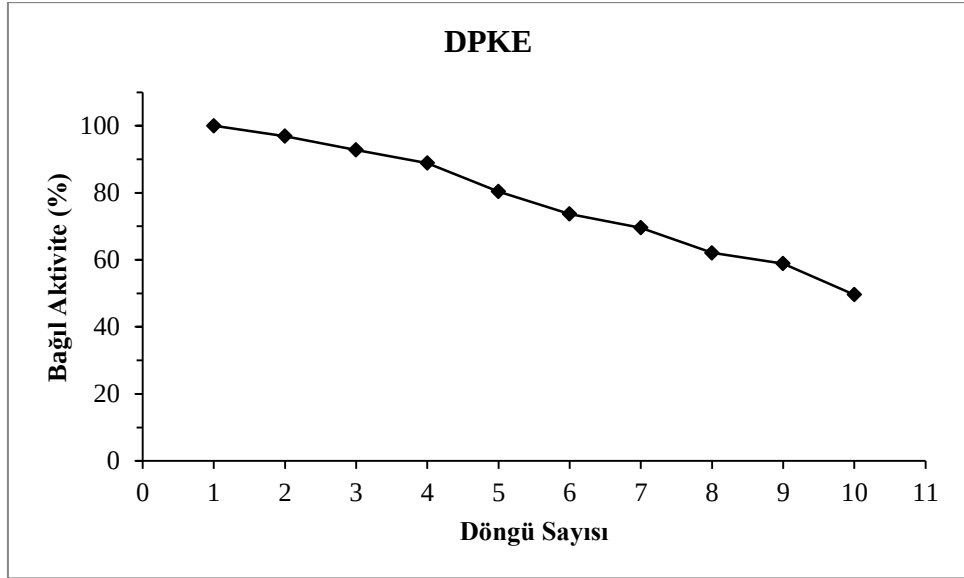
Şekil 4.23a. RY-15'in renk giderimi için tekrar kullanılabilirlik grafiği



Şekil 4.23b. RY-15'in renk giderimi için tekrar kullanılabilirlik grafiği



Şekil 4.24a. RR-239'un renk giderimi için tekrar kullanılabilirlik grafiği

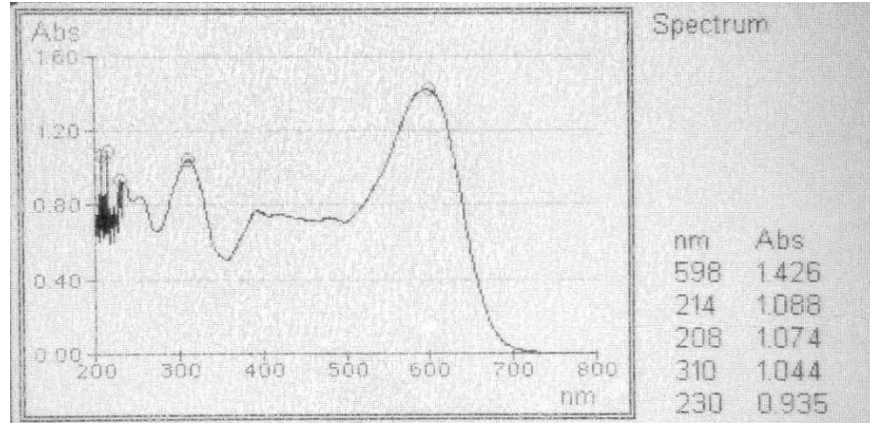


Şekil 4.24b. RR-239'un renk giderimi için tekrar kullanılabilirlik grafiği

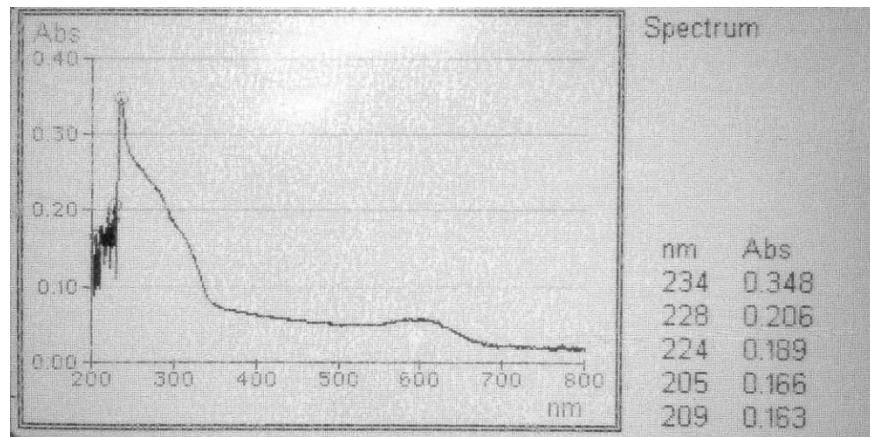
4.5.6. İmmobilize *Boletus edulis* Mantar Lakkazının RB-19, RY-15 ve RR-239 Boyarmaddelerinin Biyodönüşümüne Etkisinin İncelenmesi

DASE ve DPKE sistemlerinin RB-19, RY-15 ve RR-239 boyarmaddelerinin biyodönüşümüne etkileri optimum koşullarda Bölüm 3.2.10.6’da belirtildiği şekilde 200-800 nm dalga boyu arasında spektrum taramaları yapılarak gerçekleştirildi.

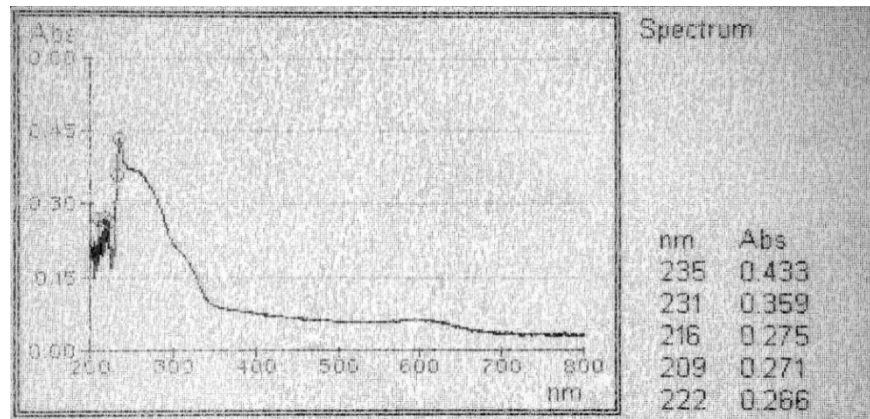
İmmobilize enzim sistemleri ile işlem görmeyen RB-19, RY-15, RR-239 çözeltileri için gerçekleştirilen spektrum taramaları ile karşılaştırma sonucunda, immobilize enzim sistemleri ile muamele edilmeyen boyarmaddelerin max absorbans gösterdiği piklerin, renk giderme işlemlerinden sonra yok olduğu gözlemlendi. Bu durum, immobilize sistemlerin boyarmadde çözeltilerinin yapılarını degrade ettiğini ortaya koymaktadır (Şekil 4.25, 4.26, 4.27).



(a)

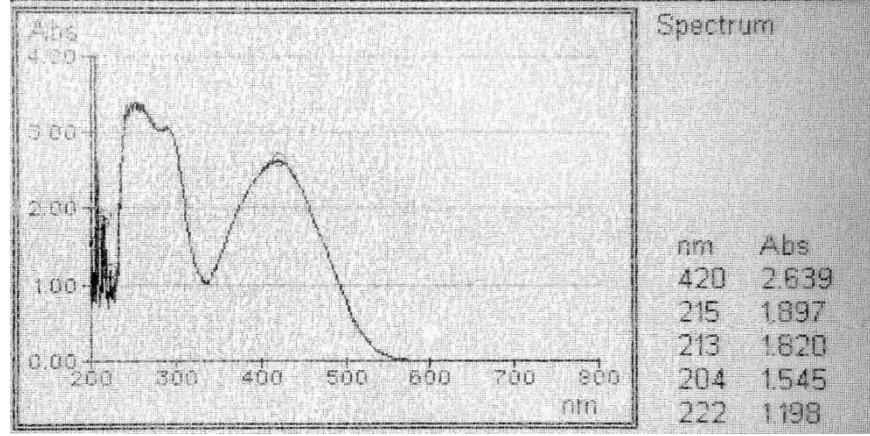


(b)

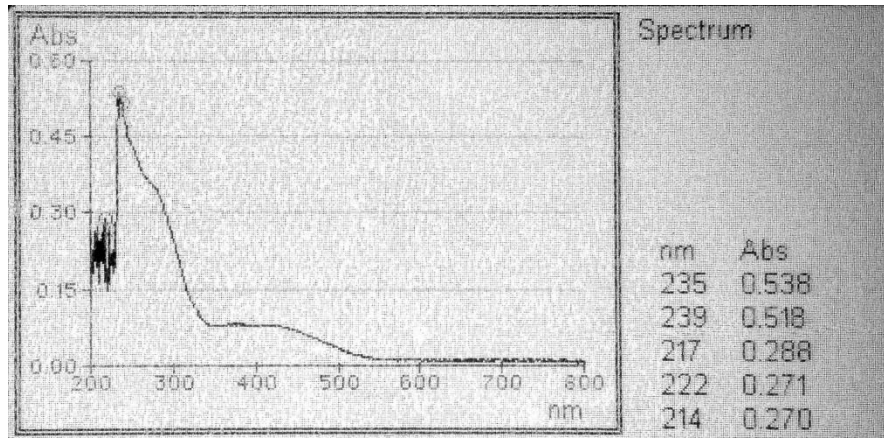


(c)

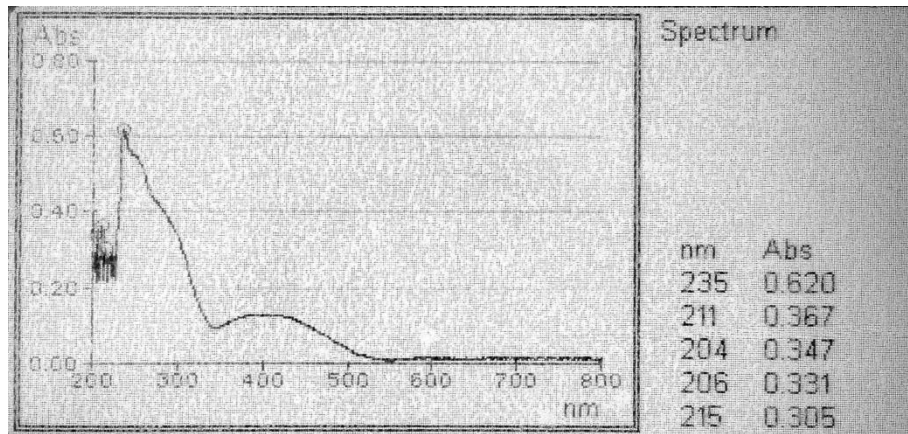
Şekil 4.25. RB-19 çözeltisinin biyodönüşümü (a) RB-19 çözeltisinin UV-VIS absorbands spektrumu, (b) DASE ile işlem gören RB-19 çözeltisinin UV-VIS absorbands spektrumu, (c) DPKE ile işlem gören RB-19 çözeltisinin UV-VIS absorbands spektrumu



(a)

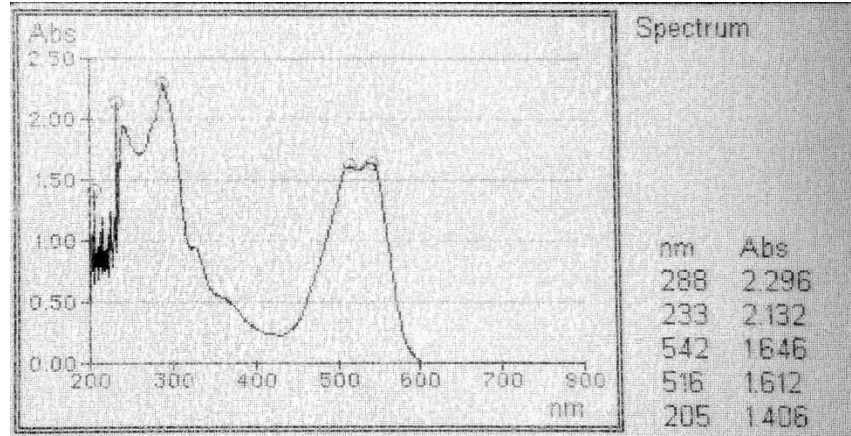


(b)

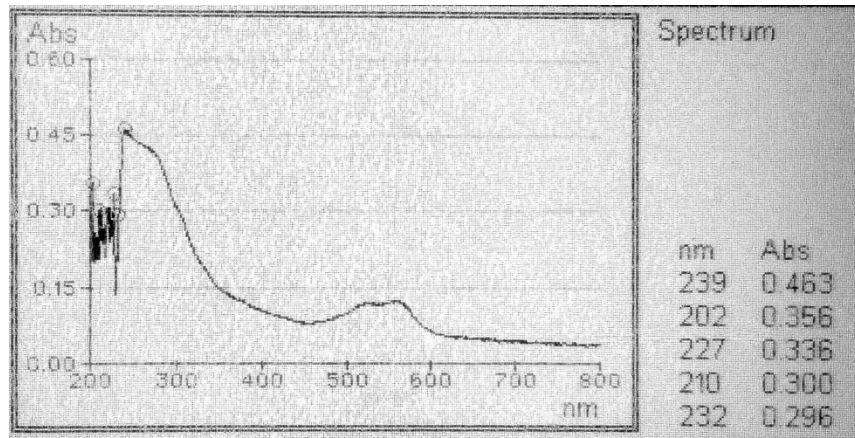


(c)

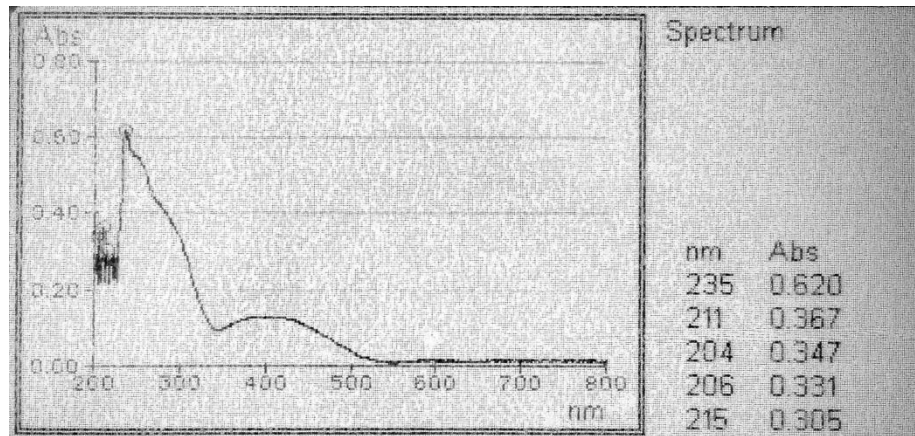
Şekil 4.26. RY-15 çözeltisinin biyodönüşümü (a) RY-15 çözeltisinin UV-VIS absorbans spektrumu, (b) DASE ile işlem gören RY-15 çözeltisinin UV- VIS absorbans spektrumu, (c) DPKE ile işlem gören RY-15 çözeltisinin UV- VIS absorbans spektrumu



(a)



(b)



(c)

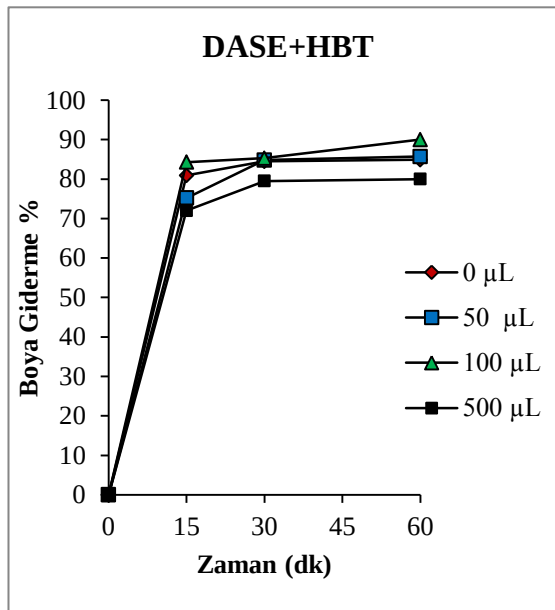
Şekil 4.27. RR-239 çözeltisinin biyodönüşümü (a) RR-239 çözeltisinin UV- VIS absorbans spektrumu, (b) DASE ile işlem gören RR-239 çözeltisinin UV- VIS absorbans spektrumu, (c) DPKE ile işlem gören RR-239 çözeltisinin UV- VIS absorbans spektrumu

4.6. İmmobilize Lakkaz Sistemlerinin (DASE ve DPKE) Tekstil Boyarmaddelerinin Renk Giderimine Medyatör Etkisinin İncelenmesi

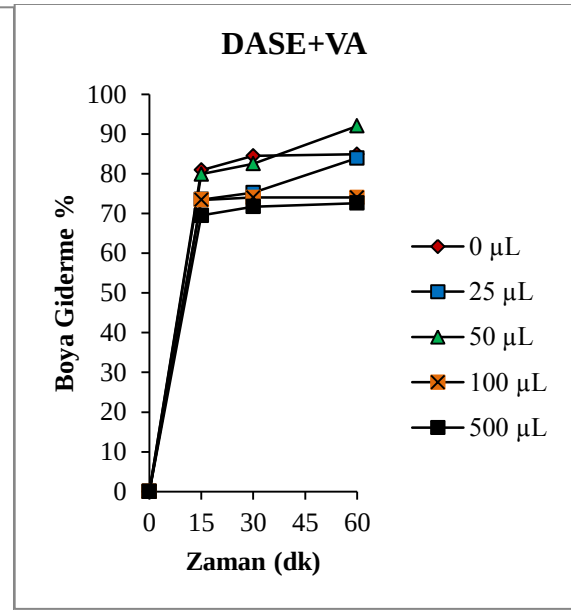
0.1 M sitrat-disodyumfosfat tamponunda hazırlanan 5 mM'lık 1-hidroksibenzotriazol (HBT) ve violurik asit (VA) medyatörlerinin farklı miktarları kullanılarak DASE ve DPKE'nin renk giderme aktivitelerine etkileri incelendi.

Bu çalışmada, Reaktif Mavi 19 (RB-19), Reaktif Sarı 15 (RY-15) ve Reaktif Kırmızı 239 (RR-239) tekstil boyarmaddelerinin renk giderme %'lerinin en yüksek olduğu optimum şartlara göre yeniden hazırlanan sistemleri kullanıldı (Şekil 3.1a-3.1b)

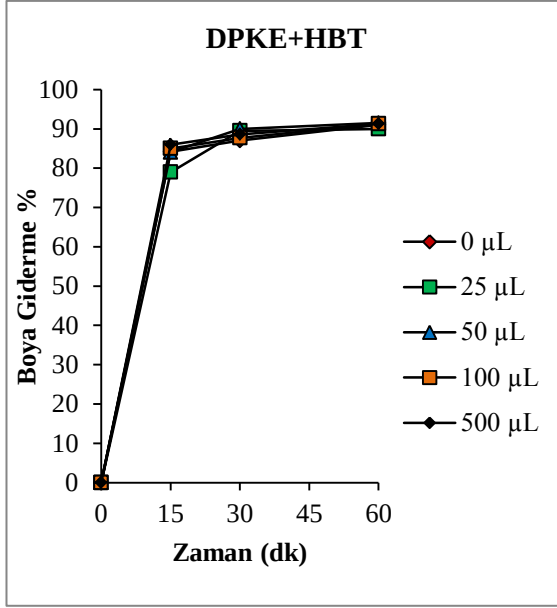
Bölüm 3.2.11'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilen denemeler ile her bir renk giderme sistemine farklı hacimlerde 5 mM HBT ve VA medyatörleri eklendi. 15, 30 ve 60. dakikalarda yapılan spektrofotometrik ölçümler sonucunda, immobilize sistemlerin boyarmaddelerin renk giderme aktiviteleri üzerine etkileri belirlendi (Şekil 4.28a-b, 4.29a-b, 4.30a-b, 4.31a-b, 4.32a-b, 4.33a-b).



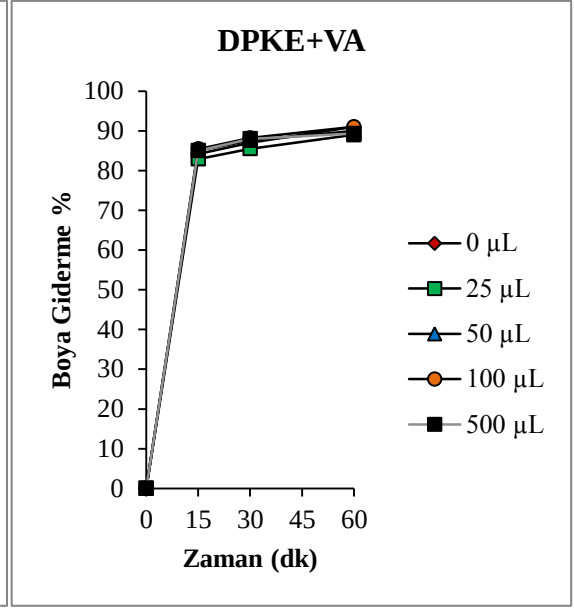
Şekil 4.28a. RB-19 medyatör miktarı optimizasyon grafiği



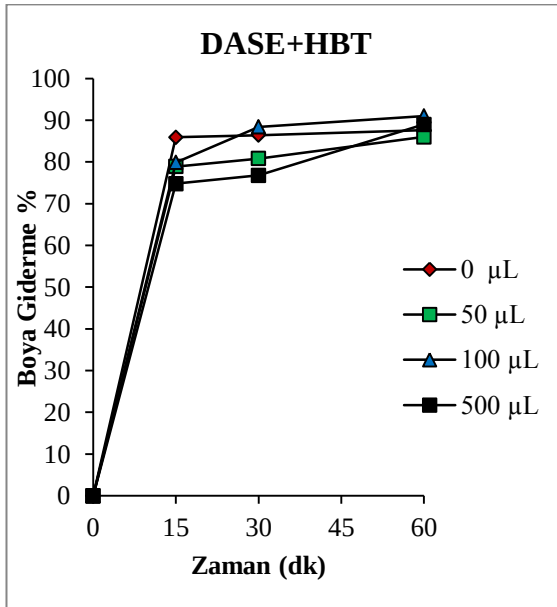
Şekil 4.28b. RB-19 medyatör miktarı optimizasyon grafiği



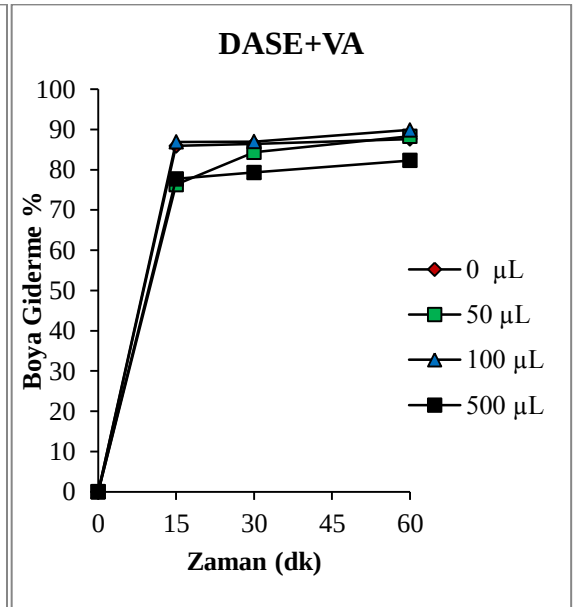
Şekil 4.29a. RB-19 medyatör miktarı optimizasyon grafiği



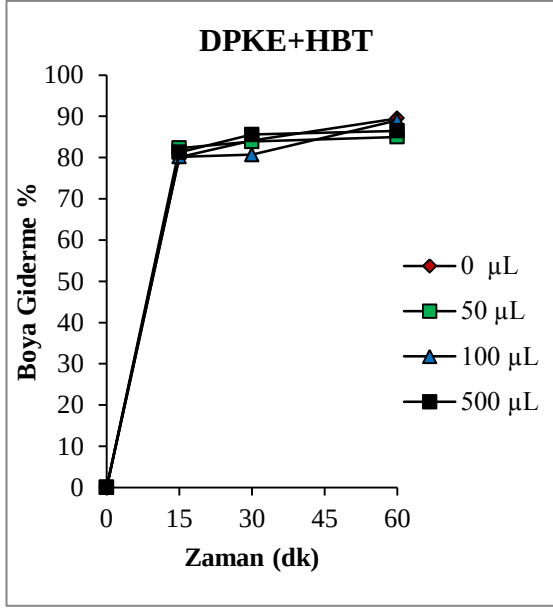
Şekil 4.29b. RB-19 medyatör miktarı optimizasyon grafiği



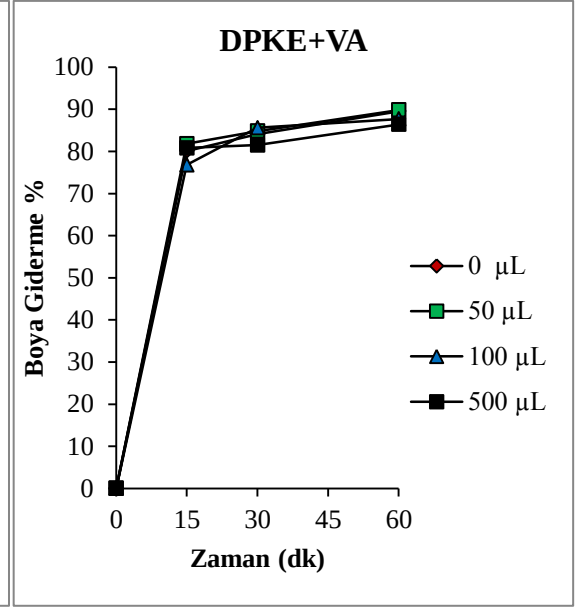
Şekil 4.30a. RY-15 medyatör miktarı optimizasyon grafiği



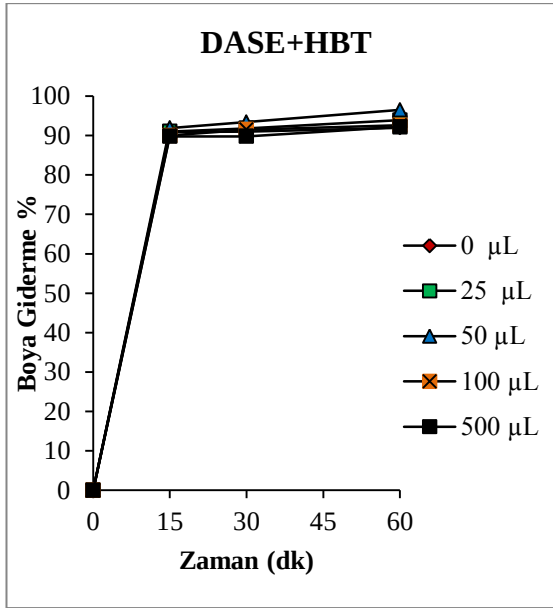
Şekil 4.30b. RY-15 medyatör miktarı optimizasyon grafiği



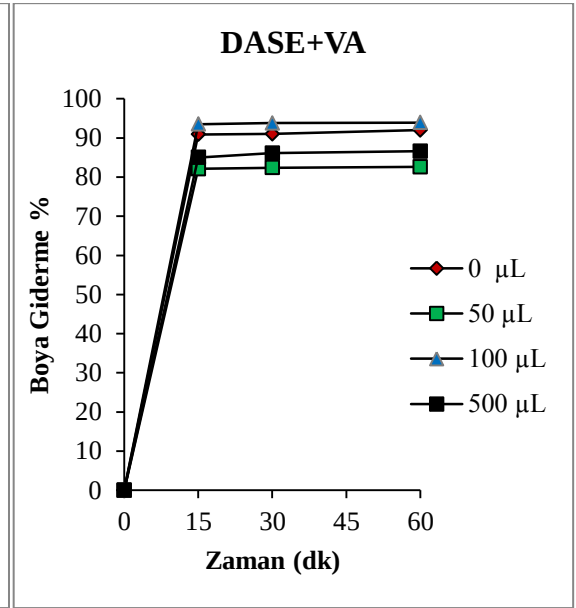
Şekil 4.31a. RY-15 medyatör miktarı optimizasyon grafiği



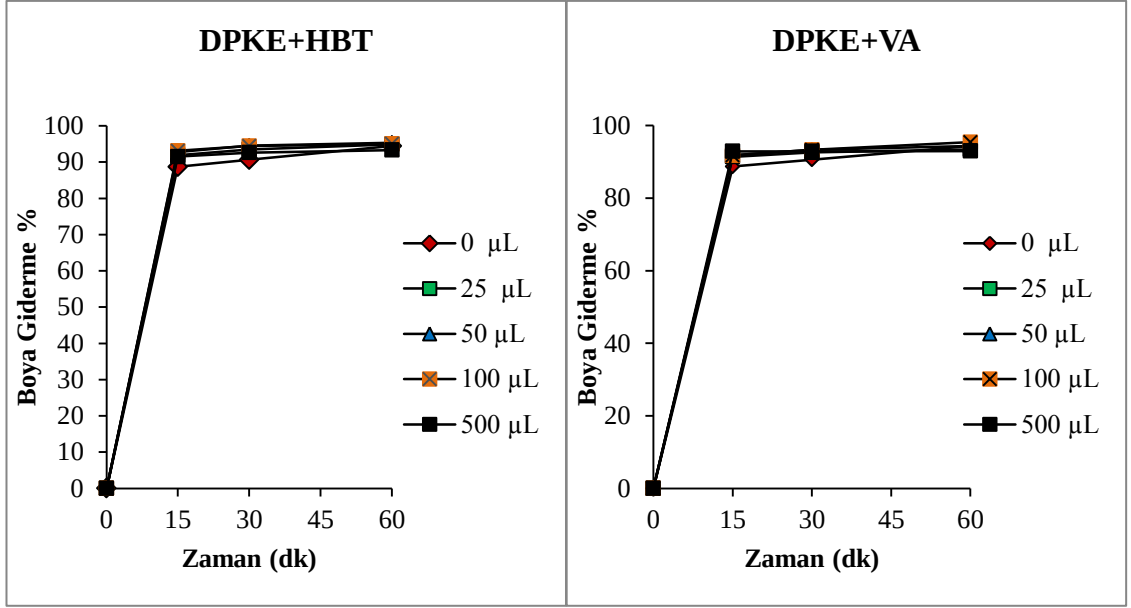
Şekil 4.31b. RY-15 medyatör miktarı optimizasyon grafiği



Şekil 4.32a. RR-239 medyatör miktarı optimizasyon grafiği



Şekil 4.32b. RR-239 medyatör miktarı optimizasyon grafiği



Şekil 4.33a. RR-239 medyatör miktarı optimizasyon grafiği

Şekil 4.33b. RR-239 medyatör miktarı optimizasyon grafiği

Tablo 4.11. DASE'nin RB-19, RY-15 ve RR-239 boyarmaddelerinin renk giderme aktivitelerine medyatörlerin etkisi

		Medyatör	Medyatör Hacmi (µL)	Boya Giderme %		
				15 dk	30 dk	60 dk
DASE	RB-19	HBT	0	80.9	84.5	84.9
			50	75.2	84.8	85.7
			100	84.3	85.3	90
			500	72	79.5	80
		VA	0	80.9	84.5	84.9
			25	73.5	75.2	83.9
			50	79.9	82.5	92
			100	73.4	74	74
			500	69.5	71.7	72.6
	RY-15	HBT	0	85.9	86.4	87.6
			50	78.9	80.8	86
			100	79.9	88.4	91
			500	74.8	76.8	89
		VA	0	85.9	86.4	87.6
			50	76.3	84.3	88.3
			100	86.9	87	89.9
			500	77.7	79.3	82.3
	RR-239	HBT	0	90.9	91	92
			25	91	91.8	93.9
			50	91.9	93.4	96.5
			100	90	91.5	92.6
			500	89.8	89.8	92.2
		VA	0	90.9	91	92
			50	82.1	82.4	82.6
			100	93.5	93.8	93.9
			500	85	86.1	86.6

Elde edilen 60. dakikadaki sonuçlara göre, HBT ve VA medyatör çözeltilerinin DASE'nin RB-19, RY-15 ve RR-239 boyarmaddelerinin renk giderme aktivitesine etkilerinin çok düşük olduğu belirlendi. RB-19 için 100 µL HBT çözeltisi % 5; 50 µL VA çözeltisi % 7, RY-15 için 100 µL HBT çözeltisi % 3.4, 100 µL VA çözeltisi % 2.3; RR-239 için 50 µL HBT çözeltisi % 4.5, 100 µL VA çözeltisi % 1.9 oranında arttırmaktadır (Tablo 4.11.).

Tablo 4.12. DPKE'nin RB-19, RY-15 ve RR-239 boyarmaddelerinin renk giderme aktivitelerine medyatörlerin etkisi

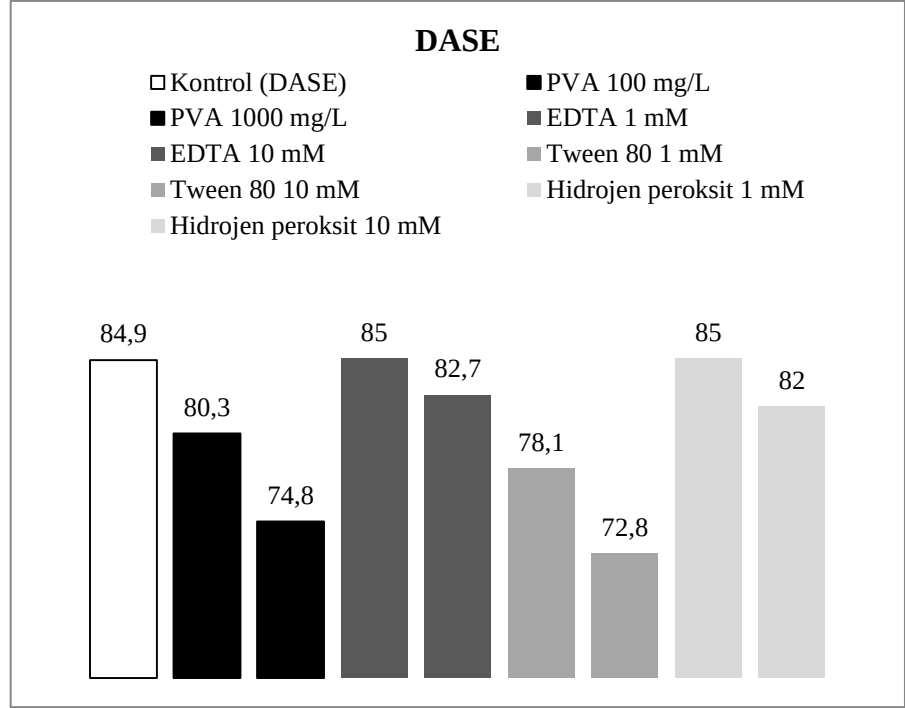
		Medyatör	Medyatör Hacmi (µL)	Boya Giderme %		
				15 dk	30 dk	60 dk
DPKE	RB-19	HBT	0	84.2	87	91
			25	79	89.5	90
			50	84.1	90	91.5
			100	85	87.7	91.3
			500	86	88.6	91.3
		VA	0	84.2	87	91
			25	82.9	85.5	89
			50	85.1	87.6	90
			100	85.4	88.2	91
			500	85	88	89.3
	RY-15	HBT	0	80.1	84.1	89.5
			50	82.3	83.9	85
			100	80.2	80.7	89
			500	81.3	85.6	86.5
		VA	0	80.1	84.1	89.5
			50	81.8	84.8	89.8
			100	76.8	85.6	87.7
			500	80.8	81.5	86.4
	RR-239	HBT	0	88.7	90.6	94.4
			25	91.9	93.5	94.9
			50	92.8	94.5	95.3
			100	93.1	94.4	95
			500	91.5	92.6	93.3
		VA	0	88.7	90.6	94.4
			25	91.4	92.6	93.4
			50	91.8	93.3	94.4
			100	91.8	93.3	95.4
			500	92.9	92.9	93

Elde edilen 60. dakikadaki sonuçlara göre, HBT ve VA medyatör çözeltilerinin DPKE'nin RB-19, RY-15 ve RR-239 boyarmaddelerinin renk giderme aktivitesine etkilerinin çok düşük olduğu belirlendi. RB-19 için 50 µL HBT çözeltisi % 0.5; RY-15 için 50 µL VA çözeltisi % 0.3; RR-239 için 50 µL HBT çözeltisi % 0.9, 100 µL VA çözeltisi % 1 oranında arttırmaktadır (Tablo 4.12.).

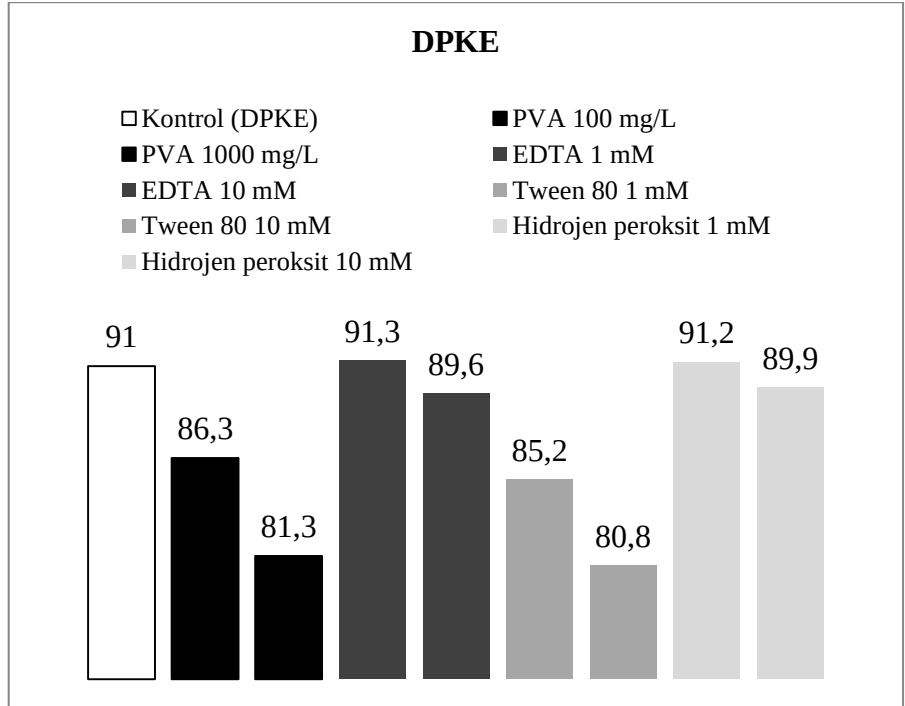
4.7. İmmobilize Lakkaz Sistemleri (DASE ve DPKE) Tekstil Boyarmaddelerinin Renk Giderimine Bazı Kimyasalların Etkisinin İncelenmesi

PVA (100 mg/L ve 1000 mg/L), EDTA, H₂O₂, Tween 80 maddeleri her bir boyarmadde için belirlenen optimum pH değerlerinde hazırlanan 1 mM ve 10 mM'lık çözeltilerinin Reaktif Mavi 19 (RB-19), Reaktif Sarı 15 (RY-15) ve Reaktif Kırmızı 239 (RR-239) boyarmaddelerinin DASE ve DPKE sistemleri ile renklerinin giderilmesine etkileri, Bölüm 3.2.12'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilerek belirlendi. Çalışma, Bölüm 3.2.10'da belirlenen optimum koşullara göre elde edilen renk giderme yüzdeleri baz alınarak değerlendirildi ve bu değerler 'kontrol' olarak ifade edildi.

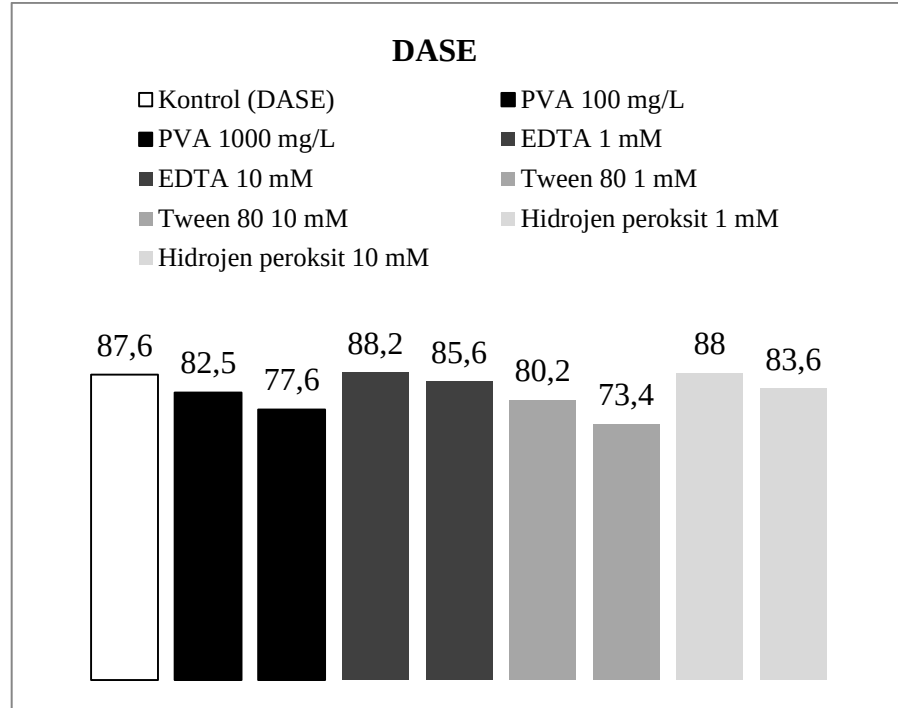
Yapılan değerlendirmeler sonucunda, PVA ve Tween 80 çözeltilerinin DASE ve DPKE'nin renk giderme aktivitelerini azalttığı görülmektedir. Bu çözeltilerin ortamdaki derişimlerinin artması, DASE ve DPKE'nin aktivitelerini daha da azaltmaktadır. 1 mM EDTA ve 1 mM H₂O₂ çözeltileri ise immobilize sistemlerin renk giderme aktivitesine net bir etkide bulunmamaktadır (Şekil 4.34a-b, 4.35a-b, 4.36a-b).



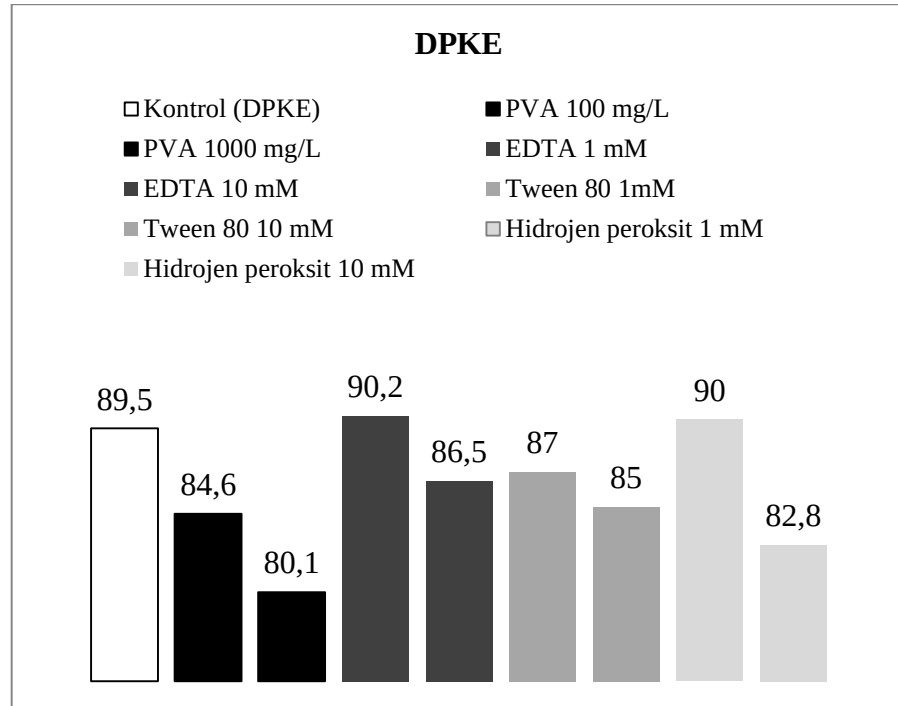
Şekil 4.34a. DASE'nin RB-19'un rengini giderme aktivitesine bazı kimyasalların etkisi



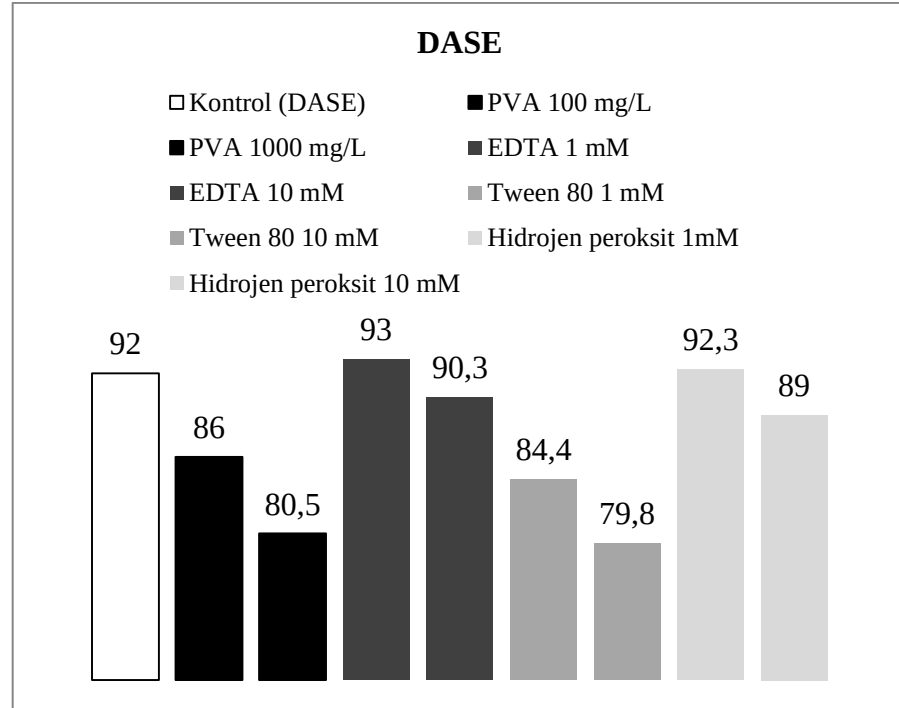
Şekil 4.34b. DPKE'nin RB-19'un rengini giderme aktivitesine bazı kimyasalların etkisi



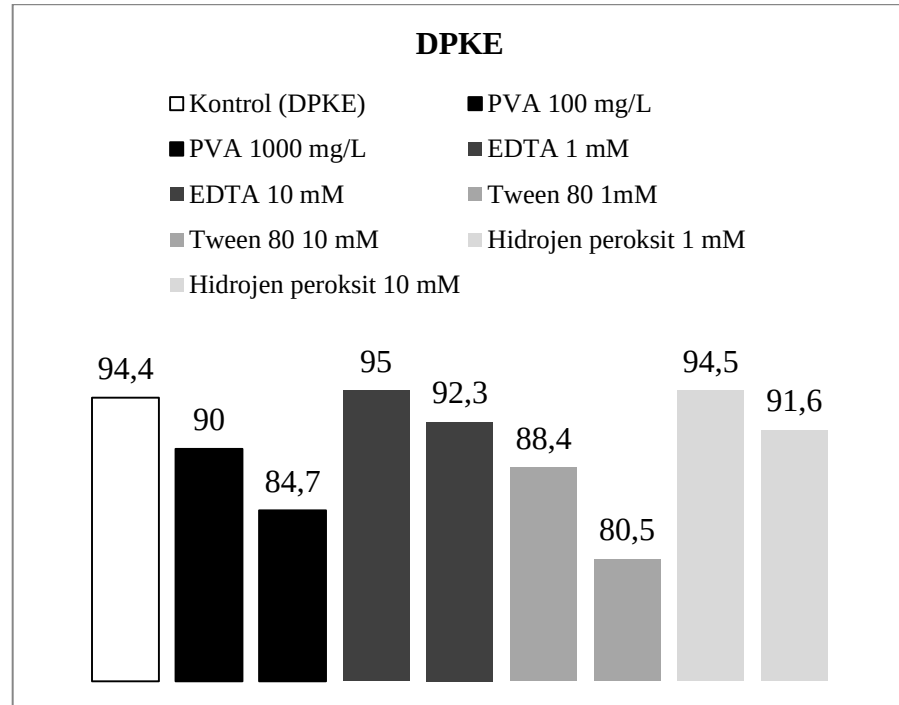
Şekil 4.35a. DASE'nin RY-15'in rengini giderme aktivitesine bazı kimyasalların etkisi



Şekil 4.35b. DPKE'nin RY-15'in rengini giderme aktivitesine bazı kimyasalların etkisi



Şekil 4.36a. DASE'nin RR-239'un rengini giderme aktivitesine bazı kimyasalların etkisi



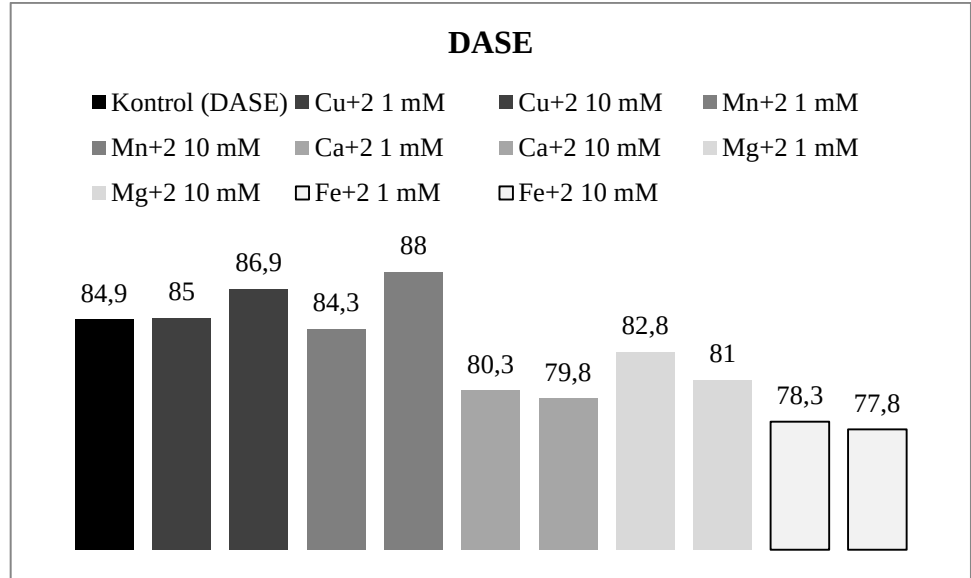
Şekil 4.36b. DPKE'nin RR-239'un rengini giderme aktivitesine bazı kimyasalların etkisi

4.8. İmmobilize Lakkaz Sistemleri (DASE ve DPKE) Tekstil BoyarmaddelerininRenk Giderimine Bazı Metal İyonlarının Etkisi

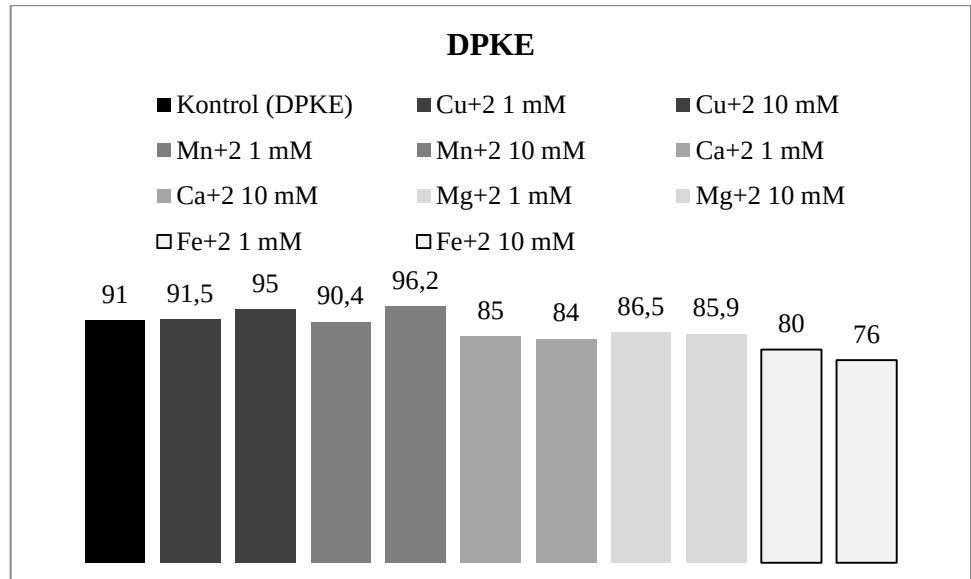
Bölüm 3.2.12.2’de belirtildiği şekilde gerçekleştirilen çalışmada, 0.1 M sitrat-disodyumfosfat tamponunda hazırlanan 1 ve 10 mM’lık CuCl_2 , MnCl_2 , CaCl_2 , MgCl_2 , FeCl_2 çözeltilerinin DASE ve DPKE’nin RB-19, RY-15, RR-239 boyarmaddelerinin renklerinin giderimine etkileri incelendi.

Çalışma, 3.2.10’da belirlenen optimum koşullara göre elde edilen renk giderme yüzdeleri baz alınarak değerlendirildi ve bu değerler ‘kontrol’ olarak ifade edildi.

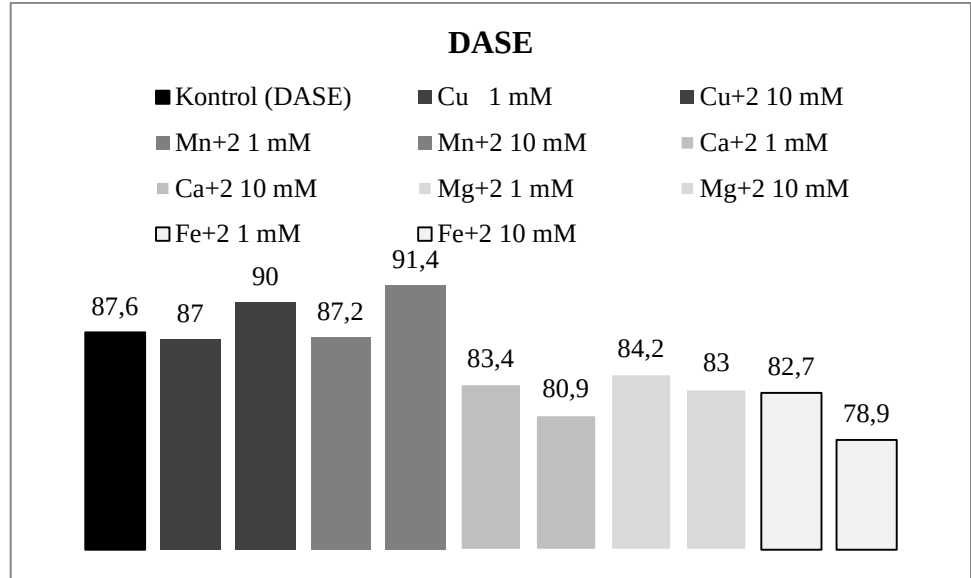
Yapılan değerlendirme sonucunda, DASE ve DPKE’nin renk giderme aktiviteleri, 1 ve 10 mM Ca^{+2} , Mg^{+2} ve Fe^{+2} iyonları varlığında azalmaktadır. İyon konsantrasyonlarındaki artış sistemlerin renk giderme etkisini daha da düşürmektedir. En yüksek inhibisyon etkisi, 10 mM Fe^{+2} iyonu varlığında belirlenmiştir. 10 mM Mn^{+2} ve Cu^{+2} iyonları ise immobilize sistemlerin renk giderme aktivitesini arttırmaktadır (Şekil 4.37a-b., 4.38a-b.,4.39a-b).



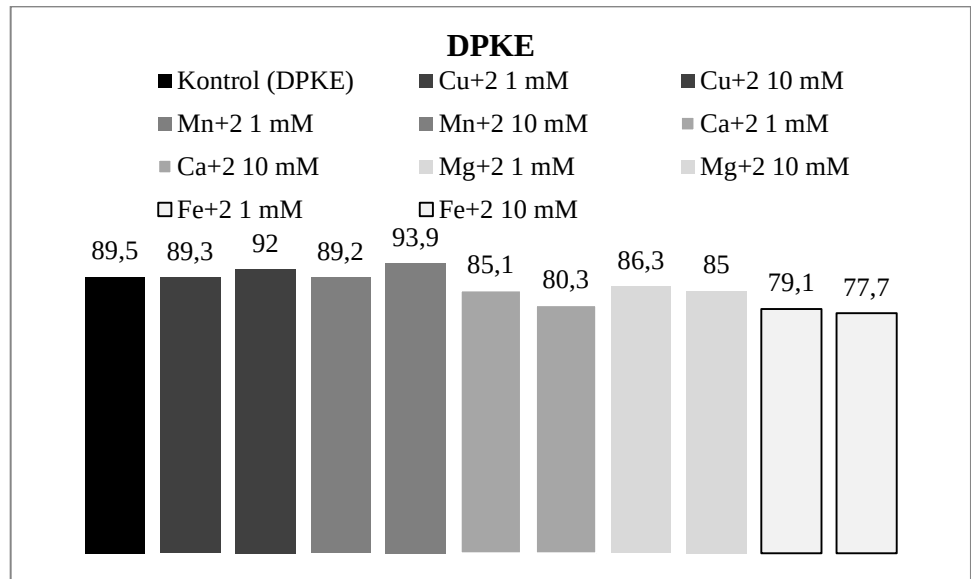
Şekil 4.37a. DASE'nin RB-19'un rengini giderme aktivitesine bazı metal iyonlarının etkisi



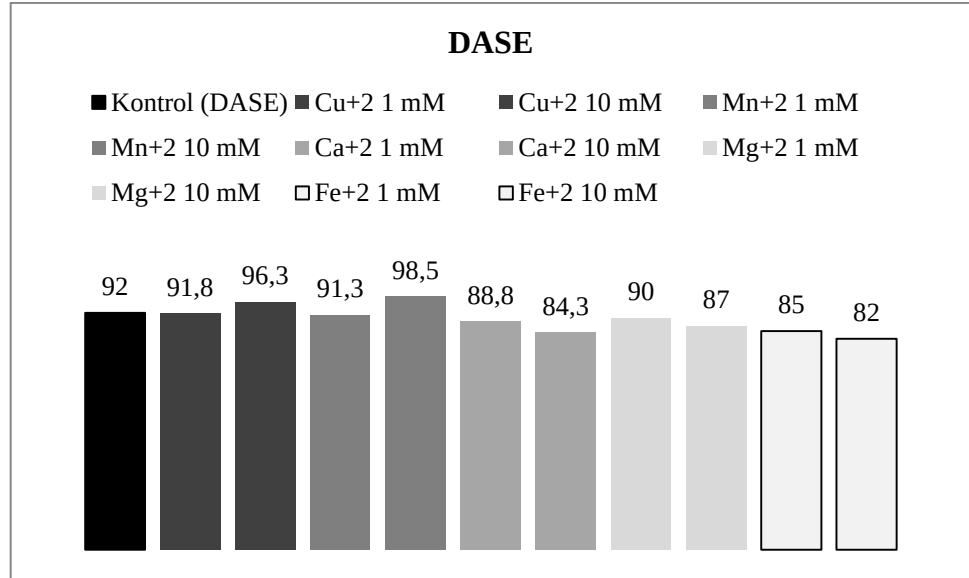
Şekil 4.37b. DPKE'nin RB-19'un rengini giderme aktivitesine bazı metal iyonlarının etkisi



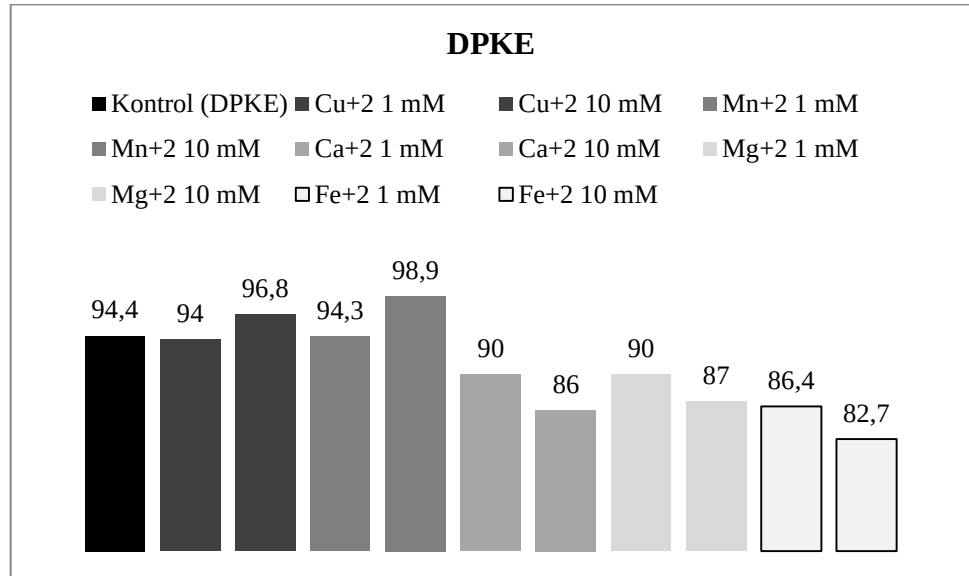
Şekil 4.38a. DASE'nin RY-15'in rengini giderme aktivitesine bazı metal iyonlarının etkisi



Şekil 4.38b. DPKE'nin RY-15'in rengini giderme aktivitesine bazı metal iyonlarının etkisi



Şekil 4.39a. DASE'nin RR-239'un rengini giderme aktivitesine bazı metal iyonlarının etkisi



Şekil 4.39b. DPKE'nin RR-239'un rengini giderme aktivitesine bazı metal iyonlarının etkisi

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

Lakkazlar, fenolik ve fenolik olmayan bileşikleri oksitleyebilme kapasiteleri nedeniyle endüstride ve çevresel kirliliklerin giderilmesi ile ilgili işlemlerde yaygın şekilde kullanılmaktadır. Lakkazların oksitleme mekanizmalarında elektron akseptörü olarak sadece atmosferik O_2 'ni kullanmaları, katalizledikleri tepkimelerde son ürünün H_2O olması, substrat aralıklarının geniş olması ve elde edildiği kaynaklarının doğada bol miktarda bulunması, bu enzimleri diğer oksitleyici enzimlerden daha avantajlı hale getirmektedir. Ayrıca, lakkaz-mediyatör sistemlerinin geliştirilmesi ile lakkazların fenolik bileşikler yanında fenolik olmayan bileşikleri de katalizleyebilmeleri uygulama alanlarını oldukça genişletmiştir.

Bölüm 2.5'te belirtildiği gibi lakkazlar, bitki, fungus, bakteri ve böceklerde farklı metabolik faaliyetler için katalizleyici görev üstlenmektedirler. Yapılan bilimsel çalışmalar incelendiğinde, lakkazların en çok çalışılan doğal kaynağının mantarlar olduğu görülmektedir. Literatürlerde en çok beyaz çürükçül funguslardan elde edilen lakkazlar ile ilgili çalışmalara rastlansa da şapkalı mantar türlerinden de lakkaz izolasyonu ve saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Lakkazlar, beyaz çürükçül funguslarda hücre dışı, şapkalı mantarların gövde ve şapkalarında ise hücre içinde lokalize haldedirler. Bu çalışma için, lakkaz kaynağı olarak ülkemizin kuzey bölgelerinde sıkça

yetişen *Boletus edulis* şapkalı mantarı seçildi. Mantarlar, Kırklareli-Demirköy çevresinden toplandı ve taze olarak kullanıldı.

Endüstriyel ve çevresel uygulamalar için kullanılan enzimler bol miktarda ve ucuz olarak elde edilebilmelidirler. Bu nedenle kullanılan klasik yöntemler yanında üçlü faz ayırma tekniği (TPP) gibi ham ekstrakta direkt uygulanabilen, ucuz ve ölçeklendirilebilir alternatif yöntemler proteinleri çöktürmek ve kısmi olarak saflaştırmak için geliştirilmektedir. Bu yöntem enzim aktivitesini % 100-1000 oranında arttırabilmektedir. TPP yönteminin sözü edilen avantajları ve literatür araştırmalarına göre bu amaçla kullanılan yeni bir teknik olması nedeniyle bu çalışmada lakkazın deriştirilmesi ve kısmi saflaştırılması TPP yöntemi ile gerçekleştirildi.

Boletus edulis mantarından lakkaz izolasyonu, Bölüm 3.2.1.'de belirtildiği şekilde mantarların şapka ve gövde kısmı 0.15 M NaCl, % 1'lik Triton X-100 çözeltisi ve PVP ile birlikte Waring blender'da homojenize edilerek gerçekleştirildi. Zhang ve arkadaşları ile Başoğlu ve Yağar, izolasyon için bu metodu kullanmışlardır [23, 31]. % 1'lik Triton X-100, hücre organellerine bağlı olası inaktif enzimin çözünürleştirilebilmesi için izolasyon ortamına ilave edilmiştir. PVP ise fenollerin iyonlaşmadığı nötral ya da asidik pH'da çok kuvvetli bir proton alıcısıdır ve fenolleri bağlaması için kullanılmaktadır [137].

Elde edilen ham ekstrakt, TPP yöntemi ile kısmi olarak saflaştırıldı [82, 103, 105]. İlk olarak, Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı şekilde ham ekstraktan alınan fraksiyonlara TPP'nin uygulanması için optimizasyon işlemleri gerçekleştirildi. Fraksiyonlara, % 20, % 40, % 40-60, % 40-80 amonyum sülfat çöktürmesi uygulandı. Amonyum sülfatlı fraksiyonlara yapılan protein ve aktivite tayinleri sonuçlarına göre öncelikle ham ekstraktın tamamına % 40 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi uygulanarak istenmeyen proteinler uzaklaştırıldı. Elde edilen süpernatanta, optimizasyon çalışmaları sonucu lakkazın çöktüğü belirlenen % 40-60 doygunluk aralığında amonyum sülfat çöktürmesi uygulandı. Santrifüjleme gerçekleştirilmeden, tuzlu ekstrakta Bölüm 3.2.2. başlığı altında belirlenen optimum şartlara göre amonyum sülfatlı protein ekstraktı: *t*-bütanol (v/v) oranı 1.0:1.0 olacak şekilde *t*-bütanol eklendi, iyice karıştırıldı ve 35 °C'de bir saat beklendi TPP uygulaması sonunda elde edilen proteince zengin orta faz diğer

fazlardan ayrılarak 0.1 M disodyum asetat tamponu (pH 4.5) ile çözüldü ve Bölüm 3.2.3’de belirtildiği şekilde dializ edildi.

Kırklareli-Demirköy çevresinden toplanan taze *Boletus edulis*’in izolasyonu sonucu elde edilen ham ekstraktın spesifik aktivitesi 20.46 U/mg’dır. Ham ekstraktın TPP ile deriştirilmesi sonucu elde edilen lakkazın spesifik aktivitesi 138.72 U/mg’dır ve ham ekstrakta oranla 6.78 kat daha saftır. 0.1 M disodyum asetat tamponu (pH 4.5) ile çözülen TPP orta faz çökelek (lakkazın bulunduğu faz) dializlendikten sonra spesifik aktivitesi 240 U/mg olarak ölçülmüştür ve saflaştırma faktörü 11.7 olarak belirlenmiştir (Tablo 4.1.). Bu çalışmada uygulanan izolasyon metodu, Zhang vd. [23] ve Başoğlu’nun [31] literatürlerinde uyguladığı izolasyon metodunun aynısıdır. Başoğlu, Tekirdağ-Saray çevresinden toplanan taze *Boletus edulis* mantarından lakkazın izolasyonunu gerçekleştirmiştir. Literatüre göre elde edilen ham ekstrakta, % 40-60 amonyum sülfatlama ve dializ işlemleri uygulanmıştır. Elde edilen ham ekstraktın spesifik aktivitesi 89.095 U/mg, dializatın ki ise 281.896 U/mg olarak belirlenmiştir [31]. Bu çalışmada uygulanan izolasyon metodunun belirlendiği literatür olan Zhang ve arkadaşlarının çalışmasında *Clitocybe maxima* lakkazının izolasyonunu gerçekleştirdikten sonra, % 80 amonyum sülfatlama, iyon değıştirici kromatografi DEAE-selüloz, SP-sepharoz, Q-sepharoz ve Superdex 75 kolonu ile jel kromatografisi işlemleri uygulanarak ham ekstrakta oranla lakkaz 16.8 kat daha saf halde edilmiştir [23]. TPP ile *Pleurotus ostreatus*’dan lakkazın saflaştırılması Kumar ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Ham ekstrakt, % 60 amonyum sülfat ile doyurulduktan sonra 1.0:1.8 (v/v) oranında *t*-bütanol eklenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda elde edilen lakkazın spesifik aktivitesi 90.93 U/mg’dır. Ham ekstrakt, TPP ile 27.8 kat daha saf hale gelmiştir [82]. Rajeeva ve arkadaşları *Ganoderma* sp. WR-1 kültüründen üretilen lakkazı TPP yöntemi ile çöktürürerek kısmi olarak saflaştırmışlardır. Yöntem iki basamakta gerçekleştirilmiştir. İlk basamakta ham ekstrakt % 20 oranında amonyum sülfat ile doygunluğa ulaştırıldıktan sonra 1.0:0.5 (v/v) oranında *t*-bütanol eklenmiştir. İkinci adımda lakkazın çoğunun bulunduğu en alt faza % 90 amonyum sülfat çöktürmesi uygulanmış ve ardından da tuzlu ekstrakt:*t*-bütanol oranı 1.0:0.5 (v/v) olacak şekilde *t*-bütanol eklenmiştir. Uygulanan basamaklar sonunda elde edilen lakkaz çözeltisi için saflaştırma faktörü 13.2’dir [105].

Yapılan çalışmaların sonuçları ile karşılaştırıldığında lakkazın izole edildiği kaynak farklılıkları enzimin spesifik aktivitesi ve saflaştırma faktöründeki farklılıkların nedeni olarak görülebilir.

Enzimlerin immobilizasyonu, bu spesifik katalizörlere tekrar kullanılabilirlik, ılımlı olmayan reaksiyon şartlarına karşı kararlılık, aktivite artışı gibi farklı özellikler kazandırmaktadır. Ayrıca sulu ortamda gerçekleştirilen prosedürler için, suda çözünmeyen enzim sistemleri immobilizasyon işlemi ile sağlanmaktadır. İmmobilize lakkazlar, birçok endüstriyel proste özellikle çevresel uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Çevresel kirlilikleri okside edebilme yetenekleri lakkazları çok iyi bir biyolojik iyileştirme ve temizleme ajanı yapmaktadır. Topraktaki ksenobiyotik maddelerin yok edilmesinde ve bazı su arıtma sistemlerinde kullanılmaktadırlar. Boyarmaddelerin degradasyonu ve buna bağlı olarak renklerinin giderilmesi için immobilize lakkaz sistemleri geliştirilmiştir. Bu alışmada *Boletus edulis* lakkazı, diğer yöntemlere göre daha basit ve daha ucuz olan adsorbsiyon yöntemi ile ayçiçek sapı ve pirinç kabuğuna immobilize edildi. Ayçiçek sapı, pirinç kabuğu, arpa artıkları gibi atıkların kimyasal yapılarında karboksil, hidroksil ve amino gibi bir çok fonksiyonel grup bulunması onları immobilizasyon için potansiyel destek yapmaktadır. Bu nedenle, seçilen desteklerin kimyasal yapısı adsorbsiyon tekniğine uygundur. Türkiye’de yağ, lif ve gıda endüstrileri için üretilen ayçiçeği, pirinç, buğday, arpa, şeker kamışı ve pamuk gibi tarım ürünlerinin işlenmesi sonucu arda kalan atık ürünleri hayvan yemi, gübre eldesi, enerji üretimi ve yüksek değerli endüstriyel ürünlerin eldesi için kullanılmaktadır. Bu tip atık ürünlerin tekrar kullanılabilirliğinin sağlanması için ekonomik ve çevresel ihtiyaçlar doğmuştur. Ülkemizde Trakya Bölgesi, ayçiçeği ve eltik üretiminde ilk sıralarda olmasından dolayı ayçiçek sapı ve pirinç kabukları kolay ulaşılabilir ürünlerdir. Ayçiçek sapı ve pirinç kabuğu gibi ligninoseölözik yapıların biyodegradasyonu zordur. Yapılarında bulunan selölöz, hücrede hemiselölöz, pektin ve proteinlerin dâhil olduğu matrikse gömülmüş haldedir. Lakkaz immobilizasyonu için destek olarak kullanılacak olan ligninoseölözik yapılı ayçiçek sapı ve pirinç kabukları birkaç ön işlemden geçirildi. Öncelikle ligninoseölözik yapının gevşetilmesi için derişik asit çözeltisi ile muamele edilen öğütölmüş ayçiçek sapı ve pirinç kabukları işlemin devamında kısmi olarak delignifiye edildiler. Bu işlem için NaOH çözeltisi kullanıldı. Çalışmada lakkaz enzimi, elde edilen modifiye desteklere fiziksel

adsorbsiyon yöntemi ile immobilize edildi ve immobilize enzim sistemlerinin (DASE ve DPKE) bazı özellikleri incelendi. Enzim kararlılığının korunması, inaktif enzimin desorpsiyonundan sonra desteğin tekrar kullanılabilmesi adsorbsiyon metodunun avantajlarından biridir.

Boletus edulis lakkazının immobilizasyonu için Bölüm 3.2.4'te anlatıldığı şekilde Branyik ve arkadaşlarının metoduna göre modifiye edilen ayçiçek sapları ve pirinç kabukları kullanıldı. Desteklerin modifikasyonları, HCl çözeltisi ile ayçiçek sapı ve pirinç kabuklarının asitlenmesi ve derişik NaOH ile kısmi olarak delignifiye edilmesi ile gerçekleştirildi [132]. Bu işlemler sonrasında elde edilen delignifiye ayçiçek sapı (DAS) ve delignifiye pirinç kabuğu (DPK) olarak adlandırıldı. Bölüm 3.2.5'te anlatıldığı şekilde delignifiye ayçiçek sapına ve delignifiye pirinç kabuklarına lakkaz enzimi adsorbsiyon yöntemi ile immobilize edildi [83, 128]. Elde edilen sistemler sırasıyla DASE ve DPKE olarak adlandırıldı. İmmobilizasyon işlemi için hazırlanan desteklere ne kadar miktarda protein yükleneceğinin belirlenmesi için yapılan çalışmalar sonucunda en yüksek lakkaz aktivitesinin görüldüğü Destek:Protein miktarı oranı DAS ve DPK için 1:2.7 (w/w) olarak belirlendi (Şekil 4.1a-4.1b). 18 saat süren immobilizasyon işlemi sonucunda elde edilen sistemlerin lakkaz aktivite tayinleri, süzüntü ve yıkama sularında protein tayini gerçekleştirildi. Protein tayini sonuçlarına göre immobilizasyon verimleri hesaplandı. DASE ve DPKE için yakın değerler elde edildi. DASE için hesaplanan spesifik aktivite, 44.9 U/mg protein; tutunma yüzdesi % 93'tür. DPKE için hesaplanan spesifik aktivite, 49.9 U/mg protein; tutunma yüzdesi % 95'tir (Tablo 4.4.). Sonuçlara bakıldığında tutunma yüzdeleri yüksek olmasına rağmen elde edilen spesifik aktivite değerlerinin düşük olması, enzimin desteğe aktif bölgesinden bağlanmış olabileceğini düşündürülebilir. Ayrıca desteklerin modifikasyonu sonucunda, destekte bulunan enzim ile etkileşecek kimyasal grupların tam olarak açığa çıkmamış olma ihtimalini destekleyebilir.

İzolasyon, kısmi saflaştırma, dializ basamaklarının her birinde elde edilen fraksiyonlar ve immobilizasyon işlemleri sonucunda süzüntülerin protein içeriğini belirlemek için gerçekleştirilen protein tayinleri Bradford metodu ile yapılmıştır. Bölüm 3.2.6'da anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen protein tayini, standart olarak sığır serum albümini kullanılarak çizilen BSA standart grafiğinden yararlanılarak hesaplandı [133].

Lakkazın izolasyonu, saflaştırılması ve desteklere immobilizasyonu sonucu elde edilen örneklerin tamamı, enzim aktivitesini belirlemek üzere lakkazın ABTS substratına karşı gösterdiği katalitik etki ölçümü spektrofotometrik olarak 420 nm’de gerçekleştirildi. Tayin, Shin ve Lee’nin yöntemi ile gerçekleştirildi [134]. Serbest lakkaz için “1 enzim ünitesi” U/mL olarak tanımlanırken immobilize lakkaz için U/g olarak tanımlandı. Spesifik aktivite ise mg protein başına düşen enzim ünitesi olarak tanımlandı [134]. İncelenen literatürlerde, lakkazın aktivite tayininde en çok ABTS çözeltisinin kullanıldığı belirlenmiştir [22-31, 82].

Yapılan literatür araştırmasında enzim immobilizasyonu için ayçiçek sapının destek olarak kullanıldığı herhangi bir çalışma bulunamamıştır. Ticari lakkaz immobilizasyonu için arpa kalıntıları [128] ve hindistan cevizi kabuğu [83], tripsin immobilizasyonu için arpa kalıntıları [127] ve invertaz immobilizasyonu için pirinç kabuğu [126] gibi çalışmamıza benzer literatürler incelenmiştir.

Cristovao vd. oda koşullarında, 0.033 g/mL’lik ticari lakkaz enziminin yeşil hindistan cevizi kabuğuna nötr ortamda 7 saatte gerçekleştirilen immobilizasyonu sonucunda, ABTS çözeltisine karşı elde edilen aktivite değerlerine bakıldığında immobilizasyon %’si % 75 olarak belirlenmiştir ve serbest enzime göre aktivitede 1.6 (U/kg taşıyıcı) artış olmuştur [83]. Silva vd. kısmi delignifiye edilen arpa artıklarına ticari lakkazın immobilizasyonunu adsorbsiyon metodu ile gerçekleştirmiştir. 400 U/g aktiviteye sahip ticari lakkaz:destek oranı 1.0:10 (v/w) olacak şekilde belirlenmiştir [128].

Zamora ve arkadaşları, Amberlit iyon değiştirici (IRA-400), imidazol ile modifiye edilen silika (SiIm), cam seramik materyale, karbodiimid/glutaraldehit ile modifiye edilen cam seramiğe, kile ve 3-aminpropiltrietoksilan ve glutaraldehit ile modifiye edilen kile *Trametes versicolor* lakkazını immobilize etmişlerdir. Elde ettikleri immobilize enzimleri boya giderme çalışmalarında kullanmışlardır. IRA-400 ile 20 ve SiIm ile 45 dakikada % 100 tutunma yüzdesi elde etmişler ve bu nedenle kullanılan desteklerin immobilizasyon için uygun olduğunu belirlemişlerdir. Cam seramik materyal ve karbodiimid/glutaraldehit ile modifiye edilen cam seramik ile gerçekleştirilen immobilizasyon sonucu 24 saatte % 45 tutunma oranı elde edilmiştir.

Kil ile % 16, 3-aminopropiltrietoksilan ve glutaraldehit ile modifiye edilen kil ile ise % 55 tutunma yüzdesi elde edilmiştir [76].

İmmobilizasyon sonucu elde edilen DASE ve DPKE'nin en yüksek lakkaz aktivitesini gösterdiği optimum koşullar (immobilize enzim miktarı, zaman, pH, sıcaklık) belirlendi. DASE ve DPKE için yapılan optimum çalışmalar sonucunda, 10 mg DASE veya DPKE kullanılarak 45 °C'de pH 3.5 değerli 0.1 M'lık disodyum-sitrat tamponunda hazırlanan 5 mM'lık ABTS çözeltisi ile 10 dakikalık inkübasyon sonucu en yüksek aktivite değerleri elde edildi (Tablo 4.5).

Ayrıca, DASE ve DPKE için Bölüm 3.2.9.5'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen kinetik çalışması sonucunda her iki sistemin Km ve Vmax değerleri çizilen Lineweaver-Burk grafikleri kullanılarak belirlendi (Şekil 4.7a-4.7b). Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde 0.1, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mM konsantrasyon değerlerinde hazırlanan ABTS çözeltileri ile immobilize enzimlerin aktivite tayinleri gerçekleştirildi. DASE için Km değeri 0.789 mM; DPKE için 1.616 mM olarak belirlendi. Vmax değeri DASE için 175.44 U/mg; DPKE için 153.85 olarak belirlendi. Arıca vd. Rhus vernicifera lakkazı ile yaptıkları çalışma sonucu immobilize enzim için Km değerini 0.47 mM; Vmax değerini 77.6 U/mg protein olarak belirlemişlerdir [107].

DASE ve DPKE için Bölüm 3.2.9.6'da anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen termal kararlılık çalışmasında 0.01 gram immobilize enzim örneklerinin 45, 50, 60 ve 70 °C sıcaklıklarda 30 ve 60 dakika bekletildikten sonra aktiviteleri ölçüldü. Immobilize enzimlerin 0. dakikadaki aktiviteleri % 100 kabul edilerek her bir sıcaklık için bağıl aktivite-zaman grafikleri çizildi (4.8a-4.8b.). Şekil 4.8a'da görüldüğü gibi DASE, 45 °C'de 30 dakikada bağıl aktivitesinin % 88.8'ini, 60 dakikada % 80.56'sını; 50 °C'de 30 dakikada bağıl aktivitesinin % 78.85'ini, 60 dakikada % 66.24'ünü; 60 °C'de 30 dakikada bağıl aktivitesinin % 72.54'ünü, 60 dakikada % 47.71'ini; 70 °C'de ise 30 dakikada bağıl aktivitesinin % 23.45'ini, 60 dakikada % 15.17' sini korumaktadır. Şekil 4.8b'de görüldüğü gibi DPKE, 45 °C'de 30 ve 60 dakikada bağıl aktivitesinin % 80.56'sını; 50 °C'de 30 dakikada bağıl aktivitesinin % 54.73'ünü, 60 dakikada % 45.5'ini; 60 °C'de 30 dakikada bağıl aktivitesinin % 37.2'sini, 60 dakikada % 36.75'ini; 70 °C'de ise 30 dakikada bağıl aktivitesinin % 14.38'ini, 60 dakikada % 8.95'ini korumaktadır. Sonuçlara bakıldığında her iki immobilize sistemin de sıcaklık

yükseldikçe aktivitelerinde düşüş gözlenmiştir. Bu çalışmada, DASE'nin termal kararlılığının DPKE'ye göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

DASE ve DPKE'nin tekrar kullanılabilirliği Bölüm 3.2.9.7'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. 0.01 gram DASE ve DPKE ile optimum koşullarda gerçekleştirilen aktivite tayini sonucu % 100 kabul edilerek her bir sistem için bağıl aktivite-döngü sayısı grafikleri çizildi (Şekil 4.9a-4.9b). Çizilen grafiklere göre, DASE; bağıl aktivitesinin % 71'ini 7. döngüye kadar korurken 14. döngüde ise % 27.36'sını koruduğu gözlenmiştir. DPKE ise bağıl aktivitesinin % 65.4' ünü 7. döngüye kadar korurken, 14. döngüde ise % 18.47'sini koruduğu gözlenmiştir.

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de tekstil endüstrisinin yoğun olduğu bölgelerde ciddi çevresel sorunlar yaşanmaktadır. Bu durum insan ve hayvan sağlığı açısından da büyük tehlike taşımaktadır. Tekstil fabrikalarında en çok kullanılan kimyasallardan biri sentetik boyarmaddelerdir. Renklendirme işlemlerinde kullanılan boyarmaddelerin fiksasyon oranları % 80'den daha düşüktür. Sentetik boyarmaddeler farklı ve kararlı kimyasal yapıları nedeniyle doğada kolaylıkla degrade olamazlar. Konvensiyonel fiziksel ve kimyasal prosesler sentetik boyarmaddelerin yapılarının bozunması için etkili olmayabilir. Hatta bazıları mikrobiyal ataklara karşı da dayanıklı oldukları için konvensiyonel biyolojik prosesler bile renk giderimi için yeterli olmayabilir. Üstelik atık sularda oluşturdukları renklenme, doğaya bırakıldıklarında karıştıkları sulara güneş ışınlarının girmesini engelleyerek sudaki canlı hayatını da tehlikeye atmaktadır. Yukarıda bahsedilen tüm bu nedenler ve çevre duyarlılığının giderek artması tekstil fabrikalarının sahip olduğu arıtma sistemlerinin geliştirilmesi için itici bir güç oluşturmaktadır. Biyoteknolojik alanda yapılan bilimsel çalışmaların artması ksenbiyotik bileşiklerin degradasyonu için ki bu işlemlere renk giderimi de dâhildir, yeni proseslerin geliştirilmesinin yolunu açmaktadır. Lakkazlar, boyarmaddelerin renk veren aromatik kromofor gruplarının yapısını bozarak onları renksizleştirir ve hatta toksik etkilerini yok ederler. Dolayısıyla boyarmaddeler de lakkazların substratlarıdır. Lakkazların etki edemediği boyarmaddeler ise son yıllarda geliştirilen lakkaz-mediyatör sistemleri ile degrade edilebilmektedir.

Bu çalışmada, antrokinon yapılı Reaktif Mavi-19 (RB-19) ve azo yapılı Reaktif Sarı-15 ile Reaktif Kırmızı-239 reaktif boyarmaddelerinin renk giderimine, immobilize

lakkaz sistemleri DASE ve DPKE'nin etkileri incelenerek en iyi renk giderme aktivitelerinin elde edildiği koşullar (pH, sıcaklık, boya konsantrasyonu, immobilize enzim miktarı) belirlendi. RB-19, tekstil endüstrisi için en önemli boyarmaddelerden biridir. Çünkü polimerik boyarmaddelerin üretiminde başlangıç materyali olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle de incelenen literatürlerde en çok çalışılan boyalardan biridir. Kunamneni ve arkadaşları [81]; Zamora ve arkadaşları [76], Palmieri ve arkadaşları [77], Kokol ve arkadaşları [78], Ramsay ve arkadaşları [79] RB-19'un renk giderimi ile ilgili çalışmalar yapmışlardır. RY-15 [78, 83] ve RR-239'un [83] renk giderimi için gerçekleştirilen çalışmalar da çeşitli literatürlerde yer almaktadır.

Modifiye ayçiçek sapı ve modifiye pirinç kabuğuna adsorbsiyon metodu ile immobilize edilen *Boletus edulis* lakkazı (DASE ve DPKE) ile RB-19, RY-15 ve RR-239 boyarmaddelerinin renk giderimi çalışmaları yapıldı. DASE ve DPKE sistemlerinin substratları şeklinde çalışılan RB-19, RY-15 ve RR-239 için renk gideriminin en iyi olduğu optimum koşullar Bölüm 3.2.10 başlığı altında ifade edildiği şekilde gerçekleştirilen çalışmalar ile belirlendi. Yapılan çalışmalarda, RB-19 için 592, RY-15 için 416, RR-239 için 542 nm'de gerçekleştirilen spektrofotometrik ölçümler ile elde edilen değerler kullanılarak renk giderimi %'leri hesaplandı.

Her bir immobilize sistemin her bir boyarmadde için en iyi renk giderimi %'sine sahip olduğu koşullara göre elde edilen sonuçlar;

- DASE ile optimum koşullarda (pH 3.5, 25 °C, 150 mg DASE, 50 mg/L boya konsantrasyonu) RB-19'un rengi 1 saat sonunda % 84.9 oranında giderilmiştir. DPKE ile optimum koşullarda (pH 3.5, 25 °C, 100 mg DPKE, 100 mg/L boya konsantrasyonu) RB-19'un rengi 1 saat sonunda % 91 oranında giderilmiştir.
- DASE ile optimum koşullarda (pH 3.0, 50 °C, 100 mg DASE, 200 mg/L boya konsantrasyonu) RY-15'in rengi 1 saat sonunda % 87.6 oranında giderilmiştir. DPKE ile optimum koşullarda (pH 4.0, 50 °C, 150 mg DPKE, 250 mg/L boya konsantrasyonu) RY-15'in rengi 1 saat sonunda % 89.5 oranında giderilmiştir.
- DASE ile optimum koşullarda (pH 2.0, 40 °C, 50 mg DASE, 100 mg/L boya konsantrasyonu) RR-239'un rengi 1 saat sonunda % 92 oranında giderilmiştir. DPKE ile optimum koşullarda (pH 2.5, 50 °C, 100 mg DPKE, 200 mg/L boya konsantrasyonu) RR-239'un rengi 1 saat sonunda % 94.4 oranında giderilmiştir.

Sonuçlara bakıldığında DPKE'nin boya giderme aktivitesinin DASE'ye göre biraz daha yüksek olduğu görülmektedir. En yüksek renk giderme etkisi RR-239 için elde edilmiştir. DASE ve DPKE'nin 40 ve 50 °C gibi yüksek sıcaklıklarda RY-15 ve RR-239 için iyi renk giderme özelliğine sahip olmaları, kullanılmaları amaçlanan tekstil atık sularının da yüksek sıcaklıklarda olması nedeniyle bir avantajdır. RB-19, RY-15 ve RR-239 boyarmaddelerinin renk giderimine, immobilize lakkazın renk giderme aktivitesinin yanında kullanılan modifiye ayçiçek sapı ve pirinç kabuklarının da (DAS ve DPK) boyarmaddeleri adsorblama yetenekleri nedeniyle katkıda bulundukları belirlenmiştir. Bu nedenle, yapılan tüm renk giderme çalışmalarında DASE ve DPKE sistemleri yanında DAS ve DPK'nın adsorblama nedeniyle sebep olduğu renk giderme %'leri belirlenmiştir. Optimum koşullar sağlanarak gerçekleştirilen renk giderme çalışmalarında, 15. dakikada DAS yüzeyi tarafından adsorlanma %'si RB-19 için % 58, RY-15 için % 54.2, RR-239 için % 34.8'dir. DPK yüzeyi tarafından adsorlanma %'si RB-19 için % 69.5, RY-15 için % 70, RR-239 için % 40.4'tür.

Optimizasyon şartları belirlendikten sonra, renk giderme sistemlerine farklı hacimlerde medyatör (1-hidroksibenzotriazol hidrat (HBT) ve violurik asit monohidrat (VA)), çeşitli metal iyonları (Cu^{+2} , Mn^{+2} , Ca^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+2}) ve bazı kimyasallar (polivinilalkol, EDTA, Tween 80, H_2O_2) eklenerek DASE ve DPKE'nin renksizleştirme aktivitelerine etkileri incelendi.

Literatürde RB-19, RY-15 ve RR-239'un renk giderimi çalışmaları incelendiğinde en çok RB-19 ile çalışıldığı görülmektedir. RB-19 gibi antrokinon yapılı boyarmaddeler lakkaz tarafından direkt okside edilebilen enzim substratıdır. Boyarmaddelerin benzen halkasına sübstitüye olan moleküller, hidroksil ve amino grupları enzim aktivitesini etkilerler. RY-15 ve RR-239 gibi azo boyarmaddeler ise genelde medyatörler varlığında lakkaz tarafından oksitlenebilirler. Çalışmamızda, RB-19, RY-15 ve RR-239'un DASE ve DPKE ile gerçekleştirilen renk giderimi çalışmalarına 25-500 µL farklı hacimlerde 5 mM HBT ve VA çözeltileri eklenerek medyatörlerin etkisi incelenmiştir. Medyatörlerin çalışılan boyarmaddelerinin renk giderimine katkıları % 0.3-7 arasında değişmektedir. Dolayısıyla, DASE ve DPKE immobilize sistemler ile medyatörsüz ortamda gerçekleştirilen antrokinon yapılı RB-19

ve azo yapılı RY-15 ve RR-239 için 1 saat sonunda etkili boya giderme %'leri elde edilmiştir.

Critovao vd. hindistan cevizi kabuğuna immobilize edilen *Aspergillus* ticari lakkazı ile RY-15 ve RR-239'un renk giderimini gerçekleştirmişlerdir. İmmobilize sistem RY-15'in renginin % 58'ini gidermiştir. Desteğin adsorblama özelliği, RY-15'in renk giderimine % 13 oranında katkıda bulunmuştur. RR-239'un rengi immobilize enzim tarafından % 51 oranında giderilirken hindistan cevizi kabuklarının adsorbans etkisi sadece % 1.7 oranındadır. Optimum boya giderme koşullarında, RY-15 için % 96, RR-239 için % 93'lere varan renk giderimi etkisi gözlenmiştir [83]. Başoğlu, yaptığı çalışmada *Boletus edulis* lakkazını serbest halde kullanarak RY-15, RR-239 ve RB-19 boyarmaddeleri için renk giderme etkilerini incelemiştir. Gerçekleştirdiği denemelerde, 24 saatin sonunda RB-19 için % 83, RY-15 için % 64, RR-239 için % 88, renk giderimi elde etmiştir. Çalışmada kullanılan 5 mM'lık HBT ve VA medyatörlerinin renk giderimine gözle görünür bir etkisinin olmadığı görülmüştür [31]. Kokol vd., *I. Resinosum* lakkazı ile (25 mU/L) 5 mM HBT ve VA varlığında ve yokluğunda RB-19 ve RY-15'in renk giderimi aktivitelerini incelemişlerdir. 25 °C'de gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda, RY-15'in renginin VA ile birlikte 24 saat sonunda % 95 oranında giderildiği; RB-19'un renginin 24 saat sonunda HBT varlığında sadece % 20'sinin giderildiği belirlenmiştir. En yüksek renk giderimi yüzdeleri pH 4-5 aralığında gerçekleştirilen çalışmalar ile elde edilmiştir [78]. Zamora ve arkadaşları, amberlit iyon değiştirici reçine (IRA-400), imidazol ile modifiye edilen silika (SiIm) ve cam seramik materyale *Trametes versicolor* lakkazını immobilize ederek RB-19'un rengini gidermedeki etkinliklerini incelemişlerdir. Lakkaz immobilizasyonu için yüksek kapasiteye sahip katı materyallerin (zayıf ve güçlü katyonik, anyonik iyon değiştiriciler) boyarmaddeleri adsorblama kapasitesi yüksek, buna karşılık inorganik desteklerin adsorblama kapasiteleri (cam-seramik materyaller vb.) düşüktür. Adsorblama kapasitesi daha düşük olduğu için RB-19'un renk giderimi Lakkaz-SiIm ile gerçekleştirilmiştir. HBT varlığında RB-19'un renk giderimi yüzdesinde değişiklik olmamıştır. 30 dakika sonunda HBT varlığında ve yokluğunda Lakkaz-SiIm sisteminin renk giderme aktivitesi % 45 olarak ölçülmüştür [76]. Khammuang vd. *Ganoderma sp.*'den saflaştırılan lakkazın RB-19'un rengini giderme etkisini incelemiştir. Serbest lakkaz, 30 °C'de, pH 5.5 ortamında 5 saat sonunda RB-19'un rengini % 80 oranında gidermiştir [24].

Palmieri vd., *Pleurotus ostreatus* fungusunun ürettiği iki tip lakkaz ile RB-19'un medyatörsüz ortamda renk giderimini gerçekleştirmiştir. En iyi renk giderimi sonucu asidik ortamda gerçekleşmiştir. RB-19'un lakkazın substratı olarak kullanıldığı bu çalışmada, 50 µM'lık RB-19 ile kültür ortamında elde edilen iki tip lakkazın (1:1 v/v) karışımının (10 U/mL;) 20 °C'de 100 dakika inkübasyonu sonucu boyarmaddenin renginin % 94 oranında giderildiği belirtilmiştir. Sıcaklık 40 °C'ye çıkarıldığında lakkazın termal inaktivasyonu nedeniyle boya giderme yüzdesi % 17'ye düşmüştür [77].

Bu çalışmada, Bölüm 3.2.10.5'te belirtildiği şekilde DASE ve DPKE sistemlerinin RB-19, RY-15 ve RR-239 için belirlenen optimum koşullara uygun olarak tekrar kullanılabilirlik özellikleri incelendi. DASE immobilize sistemi RB-19 için 8. döngüye kadar aktivitesinin % 80.6'sını; RY-15 için 7. döngüye kadar aktivitesinin % 81.3'ünü, RR-239 için 8. döngüye kadar aktivitesinin % 80.3'ünü korumaktadır. DPKE immobilize sistemi RB-19 için 6. döngüye kadar aktivitesinin % 81.4'ünü; RY-15 için 5. döngüye kadar aktivitesinin % 83.6'sını, RR-239 için 5. döngüye kadar aktivitesinin % 80.6'sını korumaktadır.

Çalışmamızda, Bölüm 3.2.10.6'da belirtildiği şekilde gerçekleştirilen denemeler ile DASE ve DPKE varlığında RB-19, RY-15 ve RR-239'un renk giderimi 200-800 nm arasındaki UV-VIS spektrumlarının görüntülenmesi ile boyarmaddelerin biyodönüşümü incelendi. İşlem görmemiş RB-19, RY-15 ve RR-239 boyarmaddelerinin UV-VIS spektrum görüntüleri ile karşılaştırıldığında sırasıyla 592, 416 ve 542 nm dalga boyunda görüntülenen maksimum piklerin renk giderimi işlemleri sonunda yok olduğu görüldü (Şekil 4.25-4.26-4.27). Bu durum boyarmaddelerin immobilize lakkaz enzimi ile degrade edildiğinin bir kanıtıdır. Ancak FTIR ve HPLC analizleri gerçekleştirilmediği için oluşan ürünlerin yapısı aydınlatılamamıştır.

Kumar ve arkadaşları, trimetilmetan bazlı bakırtaşı mavisi boyarmaddesinin TPP yöntemi ile saflaştırılan *P. Ostreatus* lakkazı ile biyodönüşümünü renk giderme işleminden önce ve sonra görüntülenen UV-VIS absorbans spektrumlarını inceleyerek kanıtlamışlardır. Ayrıca, FTIR ve HPLC analizleri ile bakırtaşı mavisinin biyodönüşümü sonunda hangi ürünlerin meydana geldiğini analiz etmişlerdir [82].

Çalışmada tekstilde kullanılan yardımcı kimyasalların DASE ve DPKE'nin RB-19, RY-15, RR-239 boyarmaddelerin renk giderme yüzdelere olası etkilerini incelendi. Çalışmada, kullanılacak olan PVA (100 mg/L ve 1000 mg/L), EDTA (1mM ve 10 mM), H₂O₂ (1mM ve 10 mM), Tween 80 (1mM ve 10 mM) çözeltileri 0,1 M sitrat-disodyumfosfat tamponunda hazırlandı. Şekil 3.1a.-3.1b.'de verilen sistemlerin her birine hazırlanan çözeltilerin farklı derişimlerinden 100'er µl eklenerek 60. dakika sonunda absorbans ölçümleri gerçekleştirildi. Yapılan aktivite tayinleri sonucu her bir sistemin RB-19, RY-15, RR-239 boyarmaddelerinin renk giderimi aktivitesine kimyasalların etkileri belirlendi.

Yapılan değerlendirmeler sonucunda, PVA ve Tween 80 çözeltilerinin DASE ve DPKE'nin renk giderme aktivitelerini kayda değer şekilde azalttığı görülmektedir. Bu çözeltilerin ortamdaki derişimlerinin artması DASE ve DPKE'nin aktivitelerini yaklaşık % 10 azaltmaktadır. 1 mM EDTA ve 1 mM H₂O₂ çözeltileri ise immobilize sistemlerin renk giderme aktivitesine net bir etkide bulunmazken 10 mM'lık EDTA ve H₂O₂ çözeltileri aktiviteyi düşürmektedir (Şekil 4.34a., 4.34b., 4.35a., 4.35b., 4.36a., 4.36b.).

Polivinil alkol (PVA), sentetik haşılayıcı ve sertlik kazandırıcı olarak kullanılır. H₂O₂, kumaşların ağartılmasında kullanılır. Tween 80, yüzey aktif maddedir. Emülsifiye etme ve dispersleme ajanı olarak kullanılır. EDTA, metal iyonlarını şelatlayıcı etkisi nedeniyle suların sertliğinin giderilmesi, ya da kumaşa leke bırakan ağır metal iyonlarının giderilmesi için kullanılır.

Çalışmada, DASE ve DPKE'nin RB-19, RY-15, RR-239 boyarmaddelerinin renklerinin giderimine etkilerini incelemek amacıyla 0.1 M sitrat-disodyumfosfat tamponunda hazırlanan 1 ve 10 mM'lık CuCl₂, MnCl₂, CaCl₂, MgCl₂, FeCl₂ çözeltileri kullanıldı. Şekil 3.1a-3.1b'de belirtilen deney ortamlarına farklı derişimlerindeki her bir metal çözeltisinden 100'er µL eklenerek renksizleştirme işlemleri uygulandı. Optimum koşullarda gerçekleştirilen işlemler sonucu 60. dakikalarda spektrofotometrik ölçümler yapıldı ve renk giderme aktiviteleri belirlendi. DASE ve DPKE sistemlerinin her bir boyarmadde için 3.2.10. başlığı altında belirlenen optimum koşullara göre gerçekleştirilen renksizleştirme işlemlerinde 60. dakikada elde edilen renk giderme %'leri baz alınarak değerlendirildi.

Yapılan değerlendirme sonucunda, DASE ve DPKE'nin renk giderme aktiviteleri, 1 ve 10 mM Ca^{+2} , Mg^{+2} ve Fe^{+2} iyonları varlığında azalmaktadır. İyon deşişimlerdeki artış sistemlerin renk giderme etkisini daha da dūřurmektedir. En yūksək inhibisyon etkisi 10 mM Fe^{+2} iyonu varlığında belirlenmiştir. 10 mM Mn^{+2} ve 10 mM Cu^{+2} iyonları ise immobilize sistemlerin renk giderme aktivitesini arttırmaktadır (şekil 4.37a., 4.37b., 4.38a., 4.38b., 4.39a., 4.39b.).

Gedikli vd. tarafından yapılan çalışmada, *Trametes versicolor* lakkazı (25.08 U/mL), 55 °C sıcaklıkta, 120 dakikada, pH'ın 4.0 olduğu ortamda 75 mg/l deşişimli kot boyarmaddesinin rengini % 68.02 oranında gidermiştir. Bu değer baz alındığında, ortama ilave edilen 1 mM deşişimli metal tuzları enzimatik renk giderimini arttırıcı etki yapmıştır. Metal iyonlarının deşişimi arttıķķa renk gideriminde önemli bir değişim gözlenmemiştir. Mn^{+2} ortamdaki deşişiminin artmasıyla renk giderme yūzdesini % 80.51 seviyesine ulşatırmıştır. EDTA ve H_2O_2 renk giderimini bir miktar arttırmakta ancak artan deşişimden etkilenmemektedir. Renk giderme ortamına eklenen 10 mM Tween 80 ise boya giderme yūzdesini % 54.68 değerine çekmiştir [84].

Tekstil atık sularına, Tween 80 ve PVA gibi kimyasal maddelerin karıřması engellenmeli ya da dūřūk deřiřimde olması saęlanmalıdır.

Sonuç olarak; bu tez kapsamında, *Boletus edulis* mantarından lakkaz enzimi izole edilerek ilk defa TPP yūntemi ile kısmi olarak saflařtırıldı. Dializ sonrasında elde edilen *Boletus edulis* lakkazı, kısmi olarak delignifiye edilen ayçiçek sapı ve pirinç kabuęuna adsorbsiyon yūntemi ile ilk kez immobilize edildi. Delignifiye ayçiçek sapı ve pirinç kabuęu adsorbsiyon yūntemi ile lakkaz enzimi immobilizasyonunda bu çalıřmayla destek olarak ilk defa kullanıldı. Substrat olarak ABTS kullanılarak DASE ve DPKE olarak adlandırılan immobilize lakkazların bazı özellikleri belirlendi. Elde edilen immobilize lakkaz sistemlerinin RB-19, RY-15 ve RR-239 tekstil boyarmaddeleri için en yūksək renk giderme yūzdelerinin gōrūldūęu optimum kořullar belirlendi. İmmobilize lakkaz sistemlerinin renk giderme aktivitelerine, çeřitli medyatōrlerin, tekstil atık sularında bulunan bazı kimyasalların ve bazı metal iyonlarının etkileri incelendi.

TPP yönteminin, *Boletus edulis*'ten izole edilen lakkazın kısmi saflaştırılması için kolay ve etkili bir yöntem olduğu sonucuna varıldı. Elde edilen lakkazın, delignifiye ayçiçek sapları ve delignifiye pirinç kabuklarına adsorbsiyon yöntemi ile immobilizasyon oranı yüksektir. Geliştirilen immobilize sistemler ile çalışmada kullanılan reaktif boyarmaddelerin renk giderimleri başarıyla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen immobilize sistemler, yüksek sıcaklık ve yüksek asitli tekstil atık suları için kullanılabilir niteliktedir. Ayrıca, geliştirilen kesikli immobilize sistemleri tekrar kullanılabilir özelliğe sahiptirler. Bu nedenle DASE ve DPKE immobilize sistemleri geliştirilerek sürekli hale getirilebilir.

KAYNAKLAR

- [1] T. Kudanga, G. S. Nyanhongo, G. M. Guebitz, S. Burton, ***Potential applications of laccase mediated coupling and grafting reactions: A review***, Enzyme and Microbial Technology 48, 195-208, (2011).
- [2] H. Yoshida, ***Chemistry of lacquer (urushi)***, Journal Chemistry Society 43, 472-486, (1883).
- [3] C. F. Thurston, ***The structure and function of fungal laccases***, Microbiology 140, 19-26, (1994).
- [4] A. M. Mayer, R. C. Staples, ***Laccase: new functions for and old enzyme***, Phytochemistry 60, 551-565, (2002).
- [5] U. N. Dwivedi, P. Singh, V. P. Pandey, A. Kumar, ***Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases***, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 68, 117-128, (2011).
- [6] S. Riva, ***Laccases: blue enzymes for green chemistry***, Trends in Biotechnology 24, 219-226, (2006).
- [7] M. Tuncer, ***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).

- [8] M. F. Fernandez, M. A. Sanroman, D. Moldes, ***Recent developments and applications of immobilized laccase, Biotechnology Advances*** (2011).
- [9] R. Bourbonnais, M. G. Paice, ***Oxidation of nonphenolic substrates-an expanded role for laccase in lignin biodegradation***, FEBS Letters, 267, 99-102, (1990).
- [10] H. Claus, ***Laccases: structure, reactions, distribution***, Micron 35, 93-96, (2004).
- [11] N. Duran, M. A. Rosa, A. D'Annibale, L. Gianfreda, ***Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review***, Enzyme and Microbial Technology 31, 907-931, (2002).
- [12] H. Claus, 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).
- [13] O. Sanchez, R. Sierra, C. J. Almeciga-Diaz, ***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).
- [14] S. Kawal, T. Umezawa, M. Shimada, T. Higuchi, ***Aromatic ring cleavage of 4,6-di(tert-butyl) guaiacol, a phenolic lignin model compound, by laccase of Coriolus versicolor***, Kyoto University Research Section of Lignin Chemistry, Wood Research Institute, 236, 2, 309-311, (1988).
- [15] A. M. Mayer, ***Polyphenoloxidases in plants: Recent progress***, Phytochemistry 26, 11-20, (1987).
- [16] J. W. R. Walker, R. F. McCallion, ***The selective inhibition of ortho and paradiphenol oxidases***, Phytochemistry, 19, 373-375, (1980).
- [17] V. Madhavi, S. S. Lele, ***Laccase: Properties and Applications***, BioResources 4(4), 1694-1717, (2009).

- [18] M. C. Kiefer-Meyer, V. Gomord, A. O'Connell, C. Halpin, L. Feye, ***Cloning and sequence analysis of laccase encoding cDNA clones from tobacco***, Gene 178, 205-207, (1996)
- [19] D. Caparros-Ruiz, S. Fornale, L. Civardi, P. Puigdomenech, J. Rigau, ***Isolation and characterisation of a family of laccases in maize***, Plant Science 171, 217-225, (2006)
- [20] B. Gavnholt, K. Larsen, S. K. Rasmussen, ***Isolation and characterisation of laccase cDNAs from meristematic and stem tissues of ryegrass (Lolium perenne)***, Plant Science 162, 873-885, (2002)
- [21] A. Sanchez-Amat, F. Solano, ***A pluripotent polyphenol oxidase from the melanogenic marine Alteromonas sp. Shares catalytic capabilities of tyrosinases and laccases***, Biochemical and Biophysical Research Communications 240, 787-792, (1997).
- [22] D. D. Hu, R. Y. Zhang, G. Q. Zhang, H. X. Wang, T. B. Ng, ***A laccase with antiproliferative activity against tumor cells from an edible mushroom, white common Agrocybe cylindracea***, Phytomedicine 18, 374-379, (2011).
- [23] G. Q. Zhang, Y. F. Wang, X. Q. Zhang, T. B. Ng, H. X. Wang, ***Purification and characterization of a novel laccase from an edible mushroom Clitocybe maxima***, Process Biochemistry 45, 627-633, (2010).
- [24] S. Khammuang, R. Sarnthima, ***Laccase activity from fruiting bodies of Ganoderma sp. MK05: Purification and Remazol Brilliant Blue R Decolorization***, Journal of Biological Sciences 9(1), 83-87, (2009).
- [25] H. X. Wang, T. B. Ng, ***A laccase from the medicinal mushroom Ganoderma lucidum***, Applied Microbiol Biotechnol 72, 508-513, (2006).
- [26] H. X. Wang, T. B. Ng, ***Purification of a laccase from fruiting bodies of the mushroom Pleurotus eryngii***, Applied Microbiol Biotechnol 69, 521-525, (2006).

- [27] H. X. Wang, T. B. Ng, ***A novel laccase with fair thermostability from the edible wild mushroom Albatrella dispansus***, Biochemical and Biophysical Research Communications 319, 381-385, (2004).
- [28] H. X. Wang, T. B. Ng, ***A new laccase from dried fruiting bodies of the monkey head mushroom Hericium erinaceum***, Biochemical and Biophysical Research Communications 322, 17-21, (2004).
- [29] H. X. Wang, T. B. Ng, ***Purification of a novel low-molecular-mass laccase with HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from the mushroom Tricholoma giganteum***, Biochemical and Biophysical Research Communications 315, 450-454, (2004).
- [30] T. B. Ng, H. X. Wang, ***A homodimeric laccase with unique characteristics from the yellow mushroom Cantharellus cibarius***, Biochemical and Biophysical Research Communications 313, 37-41, (2004).
- [31] E. Başoğlu, ***Mantar lakkazının alginat jellerde tutuklanması ve atık sularda boyarmadde giderilmesinde kullanılması***, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, (2013).
- [32] A. Kunamneni, S. Camarero, C. Garcia-Burgos, F. J. Plou, A. Ballesteros, M. Alcalde, ***Engineering and applications of fungal laccases for organic synthesis***, Microbial Cell Factories 7: 32, 1-17, (2008).
- [33] A. Givaudan, A. Effosse, D. Faure, P. Potier, M. L. Bouillant, R. Bally, ***Polyphenol oxidase in Azospirillum lipoferum isolated from rice rhizosphere: evidence for laccase activity in nonmotile strains of Azospirillum lipoferum***, FEMS Microbiology Letters 108, 205-210, (1993).
- [34] D. Faure, M. L. Bouillant, R. Bally, ***Isolation of Azospirillum lipoferum 4T Tn5 mutants affected in melanization and laccase activity***, Applied of Environmental Microbiology 60, 3413-3415, (1994).
- [35] G. Alexandre, I. B. Zhulin, ***Laccases are wide spread in bacteria***, Trends in Biotechnology 18, 41-42 (2000).

- [36] F. J. Enguita, L. O. Martins, A. O. Henriques, M. A. Carrondo, ***Crystal structure of a bacterial endospore coat component. A laccase with enhanced thermostability properties***, The Journal of Biological Chemistry 278, 19416-19425, (2003).
- [37] D. S. Arora, R. K. Sharma, ***Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications***, Application Biochemistry Biotechnology 160, 1760-1788, (2010).
- [38] S. Galai, F. Limam, M. N. Marzouki, ***A new Stenotrophomonas maltophilia strain producing laccase. use in decolorization of synthetic dyes***, Applied Biochemistry Biotechnology 158(2), 416-431, (2009).
- [39] S. Kalme, S. Jadhav, M. Jadhav, S. Govindwar, ***Textile dye degrading laccase from Pseudomonas desmolyticum NCIM 2112***, Enzyme and Microbial Technology 44, 65-71, (2009).
- [40] A. A. Telke, G. S. Ghodake, D. C. Kalyani, R. S. Dhanve, S. P. Govindwar, ***Biochemical characteristic of a textile dye degrading extracellular laccase from a Bacillus sp. ADR***, Bioresource Technology 102, 1752-1756, (2011).
- [41] R. Bourbonnais, M. G. Paice, ***Demethylation and delignification of kraft pulp by Trametes versicolor laccase in the presence of 2, 2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)***, Appl Microbiol Biotechnol 36, 823–827, (1992).
- [42] R. Bourbonnais, M. G. Paice, I. D. Reid, P. Lanthier, M. Yaguchi, ***Lignin oxidation by laccase isozymes from Trametes versicolor and role of the mediator 2, 2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization***, Appl. EnvironMicrobiol. 61, 1876–1880, (1992).
- [43] H. P. Call, ***Verfahren zur Veränderung, Abbau oder Bleichen von Lignin, ligninhaltigen Materialien oder ähnlichen Stoffen***, Patent (International) WO 94/29510, (1994).

- [44] S. R. Couto, J. L. T. Herrera, ***Industrial and biotechnological applications of laccases: A review***, Biotechnology Advances 24, 500–513, (2006).
- [45] A. I. Cañas, S. Camarero, ***Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes***, Biotechnology Advances 28, 694–705, (2010).
- [46] R. Bourbonnais, M. G. Paice, D. Leech, B. Freiermuth, ***Reactivity and mechanism of laccase mediators for pulp delignification***, Proc. TAPPI Biol. Sci. Symp. San Francisco, 19–23 October, 335–338, (1997).
- [47] S. Kawai, T. Umezawa, T. Higuchi, ***Oxidation of methoxylated benzyl alcohols by laccase Of Coriolus versicolor in the presence of syringaldehyde***, Wood Res. 76, 10–16, (1989).
- [48] R. Bourbonnais, D. Leech, M. G. Paice, ***Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds***, BBA Gen. Subj. 1379, 381–390, (1998).
- [49] M. Solis-Oba, V. M. U. Saldivar, I. Gonzalez, G. V. Gonzalez, ***An electrochemicalspectrophotometrical study of the oxidized forms of the mediator 2, 2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) produced by immobilized laccase***, J. Electroanal. Chem. 579, 59–66, (2005).
- [50] P. Baiocco, A. M. Barreca, M. Fabbrini, C. Galli, P. Gentili, ***Promoting laccase activity towards non-phenolic substrates: a mechanistic investigation with some laccase–mediator systems***, Org. Biomol. Chem. 1, 191–197, (2003).
- [51] C. Galli, P. Gentili, ***Chemical messengers: mediated oxidations with enzyme laccase***, J. Phys. Org. Chem. 17, 973–977, (2004).
- [52] M. G. Paice, R. Bourbonnais, I. Reid, F. S. Archibald, ***Kraft pulp bleaching by redox enzymes***, Proc. 9th Intern. Symp. Wood and Pulping Chemistry PL11-PL14. Montreal, 9–12 June, (1997).
- [53] E. Srebotnik, K. E. Hammel, ***Degradation of nonphenolic lignin by the laccase/1-hydroxybenzotriazole system***, J. Biotechnol. 81, 179–188, (2000).

- [54] F. Xu, J. J. Kulys, K. Duke, K. C. Li, K. Krikstopaitis, H-J. W. Deussen, E. Abbate, V. Galinyte, P. Schneider, ***Redox chemistry in laccase-catalyzed oxidation of N-hydroxy compounds***, Appl. Environ. Microbiol. 66, 2052–2056, (2000).
- [55] R. Bourbonnais, M. G. Paice, B. Freiermuth, E. Bodie, S. Borneman, ***Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds***, Appl. Environ. Microbiol. A(63), 4627–4632, (1997).
- [56] C. Crestini, L. Jurasek, D. S. Argyropoulos, ***On the mechanism of the laccase–mediator system in the oxidation of lignin***, Chemistry 9, 5371–5378, (2003).
- [57] K. C. Li, P. S. Horanyi, R. Collins, R. S. Phillips, K. E. L. Eriksson, ***Investigation of the role of 3-hydroxyanthranilic acid in the degradation of lignin by white-rot fungus Pycnoporus cinnabarinus***, Enzyme Microb. Technol. 28, 301–307, (2001).
- [58] P. J. Collins, M. J. J. Kotterman, J. A. Field, A. D. W. Dobson, ***Oxidation of anthracene and benzo[a] pyrene by laccases from Trametes versicolor***, Appl. Environ. Microbiol. 62, 4563–4567, (1996).
- [59] J. Kulys, A. Drungiliene, U. Wollenberger, K. Krikstopaitis, F. Scheller, ***Electroanalytical determination of peroxidases and laccases on carbon paste electrodes***, Electroanalysis 9, 213–218, (1997).
- [60] F. Trudeau, F. Daigle, D. Leech, ***Reagentless mediated laccase electrode for the detection of enzyme modulators***, Anal. Chem. 69, 882–886, (1997).
- [61] B. A. Kuznetsov, G. P. Shumakovich, O. V. Koroleva, 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***, Biosens Bioelectron 16, 73–84, (2001).
- [62] G. T. Palmore, H-H. Kim, ***Electro-enzymatic reduction of dioxygen to water in the cathode compartment of a biofuel cell***, J. Electroanal. Chem. 565, 110–117, (1999).

- [63] R. Lu, L-M. Xia, ***Advances in research and application of laccase mediator system***, Xianweisu Kexue Yu Jishu 12, 37–44, (2004).
- [64] H. Claus, G. Faber, H. König, ***Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases***, Appl. Microbiol. Biotechnol. 59, 672–678, (2002).
- [65] S. R. Couto, M. A. Sanroman, ***The effect of violuric acid on the decolcurization of recalcitrant dyes by laccase from Trametes hirsuta***, Dyes and Pigments 74, 123–126, (2007).
- [66] M. R. Hu, Y. P. Chao, G. Q. Zhang, Z. Q. Xue, S. J. Qian, ***Laccase–mediator system in the decolorization of different types of recalcitrant dyes***, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 36, 45–51, (2009).
- [67] E. Rodriguez, M. A. Pickard, R. V. Duhalt, ***Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi***, Curr. Microbiol. 38, 27–32, (1999).
- [68] A. P. M. Tavares, R. O. Cristovao, J. M. Loureiro, R. A. R. Boaventura, E. A. Macedo, ***Optimisation of reactive textile dyes degradation by laccase–mediator system***, J. Chem. Technol. Biotechnol. 83, 1609–1615, (2008).
- [69] Y. X. Wong, J. Yu, ***Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes***, Water Res. 33, 3512–3520, (1999).
- [70] S. Camarero, D. Ibarra, M. J. Martínez, A. T. Martínez, ***Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes***, Appl. Environ. Microbiol. 71, 1775–1784, (2005).
- [71] R. Campos, A. Kandelbauer, K. H. Robra, A. C. Paulo, G. M. Gübitz, ***Indigo degradation with purified laccases from Trametes hirsuta and Sclerotium rolfsii***, J. Biotechnol. 89, 131–139, (2001).
- [72] E. Dube, F. Shareck, Y. Hurtubise, M. Beauregard, C. Daneault, ***Decolourization of recalcitrant dyes with a laccase from Streptomyces coelicolor under alkaline conditions***, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 35, 1123–1129, (2008).

- [73] T. Robinson, B. Chandran, P. Nigam, ***Studies on the production of enzymes by white-rot fungi for the decolorization of textile dyes***, *Enzyme Microb. Technol.* 29, 575–579, (2001).
- [74] H. Zollinger, ***Colour chemistry-synthesis, properties of organic dyes and pigments***, (VCH, New York-ABD, 1987).
- [75] C. Novotny, P. Erbanova, T. Cajthaml, N. Rothschild, C. Dosoretz, V. Sasek, ***Irpex lacteus, a White rot fungus applicable to water and soil bioremediation***, *Application Microbiology and Biotechnology* 54, 850-853 (2000a).
- [76] P. P. Zamora, C. M. Pereira, E. R.L. Tiburtius, S. G. Moraes, M. A. Rosa, R. C. Minussi, N. Durán, ***Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase***, *Applied Catalysis B: Environmental* 42, 131–144, (2003).
- [77] G. Palmieri, G. Cennamo, G. Sannia, ***Remazol Brilliant Blue R decolourisation by the fungus Pleurotus ostreatus and its oxidative enzymatic system***, *Enzyme and Microbial Technology* 36, 17–24, (2005).
- [78] V. Kokol, A. Doliska, I. Eichlerov, P. Baldrian, F. Nerud, ***Decolorization of textile dyes by whole cultures of Ischnoderma resinsum and by purified laccase and Mn-peroxidase***, *Enzyme and Microbial Technology* 40, 1673–1677, (2007).
- [79] J.A. Ramsay, W. H. W. Mok, Y. S. Luu, M. Savage, ***Decoloration of textile dyes by alginate-immobilized Trametes versicolor***, *Chemosphere* 61, 956–964, (2005)
- [80] Salony, S. Mishra, V. S. Bisaria, ***Production and characterization of laccase from Cyathus bulleri and its use in decolourization of recalcitrant textile dyes***, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 646–653, (2006).
- [81] A. Kunamneni, I. Ghazi, S. Camarero, A. Ballesteros, F. J. Plou, M. Alcalde, ***Decolorization of synthetic dyes by laccase immobilized on epoxy-activated carriers***, *Process Biochemistry* 43, 169–178, (2008).

- [82] V. V. Kumar, V. Sathyaselvabala, M. P. Premkumar, T. Vidyadevi, S. Sivanesan, ***Biochemical characterization of three phase partitioned laccase and its application in decolorization and degradation of synthetic dyes***, Journal of molecular catalysis B: Enzymatic 74, 63-72, (2012).
- [83] R. O. Cristóvãoa, A. P. M. Tavaresa, A. I. Brígida, J. M. Loureiroa, R. A. R. Boaventuraa, E. A. Macedoa, M. A. Z. Coelhob, ***Immobilization of commercial laccase onto green coconut fiber by adsorption and its application for reactive textile dyes degradation***, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 72, 6–12, (2011).
- [84] S. Gedikli, P. Aytar, A. Çabuk, A. Ünal, N. Kolankaya, ***Lakkaz enzimi ile kot boyarmaddesinin dekolorizasyonu***, Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi 1, 59-70, (2010).
- [85] T. M. N. Mhiri, S. Sayadi, ***Remazol Brilliant Blue R decolourization by the laccase from Trametes trogii***, Chemosphere 64, 998–1005, (2006).
- [86] M. Zhang, F. Wu, Z. Wei, Y. Xiao, W. Gong, ***Characterization and decolorization ability of a laccase from Panus rudis***, Enzyme and Microbial Technology 39, 92-97, (2006).
- [87] A. A. Telke, G. S. Ghodake, D. C. Kalyani, R. S. Dhanve, S. P. Govindwar, ***Biochemical characteristics of a textile dye degrading extracellular laccase from Bacillus sp. ADR***, Bioresource Technology 102, 1752-1756, (2011).
- [88] S. Kalme, S. Jadhav, M. Jadhav, S. Govindwar, ***Textile dye degrading laccase from Pseudomonas desmolyticum NCIM 2112***, Enzyme and Microbial Technology 44, 65-71, (2009).
- [89] B. Arık, A. E. Körlü, K. Duran, ***Lakkaz enzimlerinin tekstilde kullanım alanları***, Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi 2, 17-22, (2008).
- [90] A. Telefoncu, M. K. Erbil, F. Zihnioğlu, A. Kılınç, ***Biyokimyada ve Moleküler Biyolojide Modern Teknikler***, (Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova-İzmir, 2007).

- [91] L. Zeithlmayr, ***Wild Mushrooms: An Illustrated Handbook***, (Garden City Press, Hertfordshire-Birleşik Krallık, 1976).
- [92] D. W. Grund, A. K. Harrison, ***Nova Scotian Boletes***, (Cramer, Lehre-Almanya, 1976).
- [93] http://en.wikipedia.org/wiki/Boletus_edulis, (2014).
- [94] E. E. Tylukti, ***Mushrooms of Idaho and the Pacific Northwest. Vol. 2. Non-gilled Hymenomycetes***, (The University of Idaho Press, Idaho-ABD, 1987).
- [95] Y. Wang, L. Sinclair, I. R. Hall, A. L. J. Cole, ***Boletus edulis sensu lato: a new record for New Zealand***, New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 23(2), 227–231, (1995).
- [96] A. Vizzini, A. Mello, S. Ghignone, C. Sechi, P. Ruiu, P. Bonfante, ***Boletus edulis complex: from phylogenetic relationships to specific primers***, Pagine di Micologia 30, 49–52, (2008).
- [97] C. Dennison, R. Lovrien, ***Three Phase Partitioning: Concentration and Purification of Proteins***, Protein Expression and Purification 11, 149-161, (1997).
- [98] R. N. Pike, C. Dennison, ***Protein Fractionation by Three Phase Partitioning (TPP) in Aqueous/ t-Butanol Mixtures***, Biotechnology and Bioengineering 33, 221-228, (1989).
- [99] B. H. Odegaard, P. C. Anderson, R. Lovrien, ***Resolution of the multienzyme cellulase complex of Trichoderma reesei QM9414***, J. App. Biochem. 6, 158-183, (1984).
- [100] R. Lovrien, C. Goldensoph, P. C. Anderson, B. Odegaard, ***Three phase partitioning (TPP) via t-butanol: Enzymes separations from crudes, in "Protein Purification: Micro to Macro"***, (A. R. Liss Inc., New York-ABD, 1987).

- [101] K. H. Tan, R. Lovrien, *Enzymology in aqueous-organic cosolvent mixtures*, J. Biol. Chem. 247, 3278-3285, (1972).
- [102] M. C. Pol, H. F. Deutsch, L. Visser, *Purification of soluble enzymes from erythrocyte hemolysates by three phase partitioning*, Int. J. Biochem. 22, 179-185, (1990).
- [103] A. Şen, M. Eryılmaz, H. Bayraktar, S. Önal, *Purification of α -galactosidase from pepino (*Solanum muricatum*) by three-phase partitioning*, Separation and Purification Technology 83, 130-136, (2011).
- [104] E. Akardere, B. Özer, E. B. Çelem, S. Önal, *Three-phase partitioning of invertase from Baker's yeast*, Separation and Purification Technology 72, 335-339, (2010).
- [105] S. Rajeeva, S. S. Lele, *Three-phase partitioning for concentration and purification of laccase produced by submerged cultures of Ganoderma sp. WR-1*, Separation and Purification Technology 54, 103-110, (2011).
- [106] B. Kat, S. Y. Keskin, *Üçlü faz sistemi ile saflaştırılan invertaz enziminin termal kararlılığının incelenmesi*, SAÜ. Fen. Bil. Der. 17(2), 291-294, (2013) .
- [107] M. Y. Arica, B. Altintas, G. Bayramoglu, *Immobilization of laccase onto spacer-arm attached non-porous poly (GMA-AGDMA) beads: application for textile dye degradation*, Bioresourance Technology 100, 665-669, (2009).
- [108] A. Telefoncu, *Temel ve Uygulamalı Enzimoloji, Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu Kitabı*, (Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 1986).
- [109] S. Georgieva, T. Godjevargova, M. Portaccio, M. Lepore, D. G. Mita, *Advantages in using non-isothermal bioreactors in bioremediation of water polluted by phenol by means of immobilized laccase from *Rhus vernicifera**, J. Molec. Catal. B(55), 177-84, (2008).
- [110] A. Rosevear, J. F. Kennedy, J. M. S. Cabral, *Immobilised enzymes and cells*, (IOP Publishing Ltd., Bristol-Birleşik Krallık, 1987).

- [111] D. Brady, J. Jordaan, *Advances in enzyme immobilisation*, Biotechnol. Lett. 31, 1639–50, (2009).
- [112] M. Klis, E. Maicka, A. Michota, J. Bukowska, S. Sek, J. Rogalski, R. Bilewicz, *Electroreduction of laccase covalently bound to organothiol monolayers on gold electrodes*, Electrochim. Acta 52, 5591–5598, (2007).
- [113] A. I. Ruiz, A. J. Malave, C. Felby, K. Griebenow, *Improved activity and stability of an immobilized recombinant laccase in organic solvents*, Biotechnol. Lett. 22, 229–233, (2000).
- [114] A. D’Annibale, S. R. Stazi, V. Vinciguerra, E. Di Mattia, G. G. Sermanni, *Characterization of immobilized laccase from Lentinula edodes and its use in olive mill wastewater treatment*, Process Biochem. 34, 697–706, (1999).
- [115] E. Abadulla, T. Tzanov, S. Costa, K. H. Robra, A. Cavaco-Paulo, G. M. Gubitz, *Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from Trametes hirsuta*, Appl. Environ. Microbiol. 66, 3357–3362, (2000).
- [116] A. I. Yaropolov, A. N. Kharybin, J. Emneus, G. Marko-Varga, L. Gorton, *Flow-injection analysis of phenols at a graphite electrode modified with co-immobilized laccase and tyrosinase*. Anal. Chim. Acta 308, 137–144, (1995).
- [117] M. J. R. Shannon, R. Bartha, *Selection of oxidative enzymes for immobilization of groundwater pollutants*, Proceedings of the International Conference on Physiochemical Biol. Detoxif Hazard Wastes 2, 681–692, (1989).
- [118] G. DeStefano, P. Piacquadio, V. Sciancalepore, *Metal-chelate regenerable carries in food processing*, Biotechnol. Tech. 10, 857–860, (1996).
- [119] P. Piacquadio, G. DeStefano, M. Sammartino, V. Sciancalepore, *Phenols removal from apple juice by laccase immobilized on Cu²⁺-chelate regenerable carrier*, Biotechnol. Tech. 11, 515–517, (1997).
- [120] M. Sammartino, P. Piacquadio, G. DeStefano, V. Sciancalepore, *Apple juice stabilization by conventional and innovative methods*, Ind. Bevande 27, 367–369, (1998).

- [121] P. Piacquadio, G. DeStefano, M. Sammartino, V. Sciancalepore, ***Apple juice stabilization by laccase (E.C. 1.10.3.2) immobilized on metal-chelate regenerable carriers***, Ind. Bevande 27, 378–383, (1998).
- [122] A. Zille, T. Tzanov, G. M. Gübitz, A. Cavaco-Paulo, ***Immobilized laccase for decolourization of Reactive Black 5 dyeing effluent***, Biotechnology Letters 25(17), 1473-1477, (2003).
- [123] P. Peralta-Zamora , C. M. Pereira, E. R. L. Tiburtius, S. G. Moraes, M. A. Rosa, R. C. Minussi, N. Durán, ***Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase***, Applied Catalysis B: Environmental 42(2), 131–144, (2003).
- [124] P. P. Champagne, J.A. Ramsay, ***Dye decolorization and detoxification by laccase immobilized on porous glass beads***, Bioresource Technology, 101(7), 2230–2235, (2010).
- [125] P. P. Champagne, J.A. Ramsay, ***Reactive blue 19 decolouration by laccase immobilized on silica beads***, Applied Microbiology and Biotechnology December 77(4), 819-823, (2007).
- [126] S. F. D’Souza, S. S. Godbole, ***Immobilization of invertase on rice husk using polyethylenimine***, J. Biochem. Biophys. Methods 52, 59-62, (2002).
- [127] C. Rocha, M. P. Gonçalves, J. A. Teixeira, ***Immobilization of trypsin on spent grains for whey protein hydrolysis***, Process Biochemistry 46, 505-511, (2011).
- [128] A. M. Da Silva, A. P. M. Tavares, C. M. R. Rocha, R. O. Cristovao, J. A. Teixeira, E. A. Macedo, ***Immobilization of commercial laccase on spent grain***, Process Biochemistry 47(7), 1095-1101, (2012).
- [129] A. Özerdem, N. Seventekin, ***Ekolojik Açıdan Boyarmaddeler***, Tekstil ve Konfeksiyon 4, (1998).
- [130] İ. Başer, Y. İnancı, ***Boyarmadde Kimyası***, (Marmara Üniversitesi Yayınları, İstanbul, 1990).

- [131] H. Temocin, *Tekstil atık sularının renginin giderilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, (2006).
- [132] T. Brányik, A. A. Vicente, J. M. Machado Cruz, J. A. Teixeira, *Spent grains-a new support for brewing yeast immobilization*, Biotechnol. Lett. 23, 1073-1078, (2001).
- [133] M. M. Bradford, *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*, Analytical Biochemistry, 72, 248-254, (1976).
- [134] K. S. Shin, Y. J. Lee, *Purification and Characterization of a New Member of the Laccase Family from the White-Rot Basidiomycete Coriolus hirsutus*, Archives of Biochemistry and Biophysics 384(1), 109–115, (2000).
- [135] K. Harazono, K. Nakamura, *Decolorization of mixtures of different reactive textile dyes by the white-rot basidiomycete Phanerochaete sordida and inhibitory effect of polyvinyl alcohol*, Chemosphere 59, 63–68, (2005).
- [136] N. Seventekin, E. Özdoğan, *Ekotekstiller Açısından Toksik Ağırmetaller*, Tekstil ve Konfeksiyon 1, (1998).
- [137] D. Leventer, *Enginaradan polifenol oksidaz enziminin izolasyonu, saflaştırılması ve bazı özelliklerinin incelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, (2005).
- [138] M. Nagai, M. Kawata, H. Watanabe, M. Ogawa, K. Saito, T. Takesawa, K. Kanda, T. Sato, *Important role of fungal intracellular laccase for melanin synthesis: purification and characterization of an intracellular laccase from Lentinula edodes fruit bodies*, Microbiology 149, 2455-2462, (2003).
- [139] V. Lettera, A. Piscitelli, G. Leo, L. Birolo, C. Pezzella, G. Sannia, *Identification of a new member of Pleurotus ostreatus laccase family from mature fruiting body*, Fungal Biology 114, 724-730, (2010).

ÖZGEÇMİŞ

24 Ocak 1981 tarihinde Uzunköprü’de doğdum. Gazi Mahmut İlkokulu ve II. Murat Ortaokulu’nda ilk ve orta öğrenimimi tamamladım. Edirne Anadolu Öğretmen Lisesi’nde lise öğrenimimi tamamladıktan sonra 1998 yılında Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü’nde lisans öğrenimime başladım.

2002 yılında lisansımı tamamlayarak hemen akabinde Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalı’nda yüksek lisansa başladım. Yüksek lisans tezimi Prof. Dr. Hülya YAĞAR danışmanlığında “Enginardan Polifenol Oksidaz Enziminin İzolasyonu, Saflaştırılması ve Bazı Özelliklerinin İncelenmesi” başlıklı çalışma ile 2005 yılında tamamladım. Ayrıca, 2003-2005 yılları arasında Trakya Üniversitesi, Eğitim Bilimleri Enstitüsü, Kimya Öğretmenliği Tezsiz Yüksek Lisans Programı’nda da öğrenim gördüm.

2004-2009 yılları arasında çeşitli dershanelerde kimya öğretmenliği yaptım.

2009 yılında Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalı’nda doktora eğitimime başladım. Aynı yıl, Trakya Üniversitesi Edirne Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu Tekstil, Giyim Ayakkabı ve Deri Bölümü Tekstil Teknolojisi Programı’nda öğretim görevlisi kadrosuna atanarak çalışmaya başladım.