

**TEKSTİL ENDÜSTRİSİNDE KULLANILAN  
EVERZOL BRİLLİANT BLUE R/SP BOYASININ  
*FUNALIA TROGII*  
KÜLTÜR FİLTRATI İLE  
RENGİNİN GİDERİLMESİ**

**KUDDİS BÜYÜKAKILLI**

128997

**Mersin Üniversitesi**

**Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Çevre Mühendisliği**

**Ana Bilim Dalı**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Tez Danışmanı**

**Yard. Doç. Dr. Ali İnyayar**

128557

T.C. YÜKSEK ÖĞRETİM  
DOKÜMANİSYON ENTEZAR

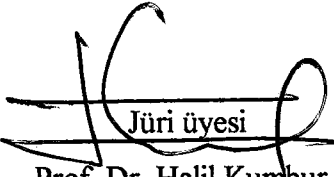
**MERSİN**

**KASIM 2001**

Bu tezin gerek bilimsel içerik, gerekse elde edilen sonuçlar açısından tüm gerekleri sağladığı kanaatine ulaşan aşağıda imzaları bulunan biz jüri üyeleri, sunulan tezi oy birliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul ediyoruz.

  
Tez Danışmanı

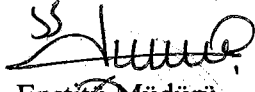
Yard. Doç. Dr. Ali Ünyayar

  
Jüri üyesi  
Prof. Dr. Halil Kumbur

Jüri Üyesi  
Prof. Dr. Hacı İbrahim Ekiz



Bu tezin Fen Bilimleri Enstitüsü yazım kurallarına uygun olarak yazıldığı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 26.103.1.2002 tarih ve 202.104-10 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

  
Enstitü Müdürü  
Prof. Dr. Özden Baştürk

Not: Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, çizelge ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

## ÖZ

Mono azo, bis azo ve antrakinon yapıdaki endüstriyel boyaları kapsayan sekiz farklı tip boya, renk giderimi için, *Funalia trogii* kültür filtratı ile muamele edilmiştir. Bu boyalardan üçü; Everzol Brilliant Blue R/SP (Reactive Blue 19 – C.I. No:61.200), Everzol Black B (Reactive Black 5 – C.I. No:20.505) ve Evercion Blue P-GR (Reactive Blue 15 – C.I. No:61.205:1) renk kaybına uğramıştır.

Everzol Brilliant Blue R/SP (EBBRSP) boyasının katı faz fermantasyon ortamında pH 5'de 30°C'de 10 gün inkübe edilerek üretilen *Funalia trogii* kültür filtratı ile renginin giderilmesi üzerinde etkili olan reaksiyon koşulları incelenmiştir. pH 3 ve 40°C sıcaklıkta, 75 mg/L boya ve 150 µL enzim ile maksimum renk giderimi sağlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Funalia trogii*, Everzol Brilliant Blue R/SP, Renk giderimi, Kinetik, Michaelis- Menten Bağıntısı.

## ABSTRACT

Eight different types of industrial dyes, including mono azo, bis azo and anthraquinone dyes, were treated, for decolorization by the culture filtrate from *Funalia trogii*. Three of the dyes, Everzol Brilliant Blue R/SP (Reactive Blue 19 – C.I. No:61.200), Everzol Black B (Reactive Black 5 – C.I. No:50.505) and Evercion Blue P-GR (Reactive Blue 15 – C.I. No:61.205:1) lost their color.

Reaction conditions of decolorization by *Funalia trogii* culture filtrate incubated at 30°C and pH 5 for 10 days in solid phase Everzol Brillinant Blue R/SP fermentation medium were investigated. Maximum decolorization rate occurs with 75 mg/L dye and 150 µL culture filtrate at incubation conditions are pH 3 and 40°C.

Key Words: *Funalia trogii*, Everzol Brilliant Blue R/SP, Decolorization, Kinetics, Michaelis- Menten Equation.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmada, bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren tez danıőmanım Yard. Doç. Dr. Ali Ünyayar'a, çok değerli yardımlarından dolayı Arő. Gör. Mehmet Ali Mazmancı'ya, her türlü olanağı sağladığı ve manevi desteği için Bölüm Başkanı Prof. Dr. Halil Kumbur'a, bilgi ve yardımlarını esirgemeyen Arő. Gör. Duygu Özsoy'a ve yüksek lisans öğrencisi Tayfun Deveci'ye, evre Mühendisliği bölümünün tüm öğretim üyelerine ve son olarak, gösterdiği sabır ve büyük desteğinden dolayı eőim Yard. Doç. Dr. Belgin Büyükakıllı'ya sonsuz teőekkürlerimi sunarım.



## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
<b>ÖZ</b> .....	i
<b>ABSTRACTS</b> .....	ii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	iii
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b> .....	iv
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	vii
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	viii
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	ix
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI</b> .....	5
<b>2.1. TEKSTİL ENDÜSTRİSİNDE KULLANILAN BOYARMADDELER ...</b>	5
2.1.1. Boyarmaddelerin Çözünürlüklerine Göre Sınıflandırılması .....	5
2.1.1.1. Suda çözünen boyarmaddeler .....	5
2.1.1.2. Suda çözünmeyen boyarmaddeler .....	6
2.1.2. Boyarmaddelerin Kullanım Özelliklerine Göre Sınıflandırılması .....	7
2.1.2.1. Direkt boyarmaddeler .....	7
2.1.2.2. Küp boyarmaddeler .....	8
2.1.2.3. Kükürt boyarmaddeler .....	8
2.1.2.4. İnkışaf boyarmaddeler .....	8
2.1.2.5. Reaktif boyarmaddeler .....	8
2.1.2.6. İngrain boyarmaddeler .....	10
2.1.2.7. Pigment boyarmaddeler .....	10
2.1.2.8. Bazik boyarmaddeler .....	10
2.1.2.9. Asid boyarmaddeler .....	11
2.1.2.10. Krom boyarmaddeler .....	11
2.1.2.11. Metal kompleks boyarmaddeler .....	11
2.1.2.12. Dispers boyarmaddeler .....	12
2.1.2.13. Mordan boyarmaddeler .....	12
2.1.3: Boyarmaddelerin Kimyasal Özelliklerine Göre Sınıflandırılması .....	12
2.1.3.1: Azo boyalar .....	12
2.1.3.2. Ftalosiyanın boyalar .....	15

	<u>Sayfa No</u>
2.1.3.3. Azoik boyarmaddeler .....	15
2.1.3.4. Nitro ve nitroso boyarmaddeleri .....	15
2.1.3.5. Polimetin boyarmaddeler .....	15
2.1.3.6. Arilmetin boyarmaddeler .....	16
2.1.3.7. Trifenilmetan boyarmaddeler .....	16
2.1.3.8. Difenilmetan boyarmaddeler .....	16
2.1.3.9. Akridin, ksanten ve fluoren boyarmaddeler .....	16
2.1.3.10. Kinonimin boyarmaddeleri .....	17
2.1.3.11. Azin, oksazin ve tiazin boyarmaddeleri .....	17
2.1.3.12. İndigo boyarmaddeler .....	17
2.1.3.13. Antrakinin boyarmaddeler .....	17
2.1.3.14. Kükürt boyarmaddeler .....	17
2.2. RENK GİDERİMİNDE KULLANILAN ENZİMLER .....	18
2.2.1. Peroksidazlar .....	21
2.2.1.1. Horseradish peroksidaz .....	21
2.2.1.2. Lignin peroksidaz .....	22
2.2.1.3. Diğer peroksidazlar .....	26
2.2.2. Polifenol oksidazlarlar .....	28
2.2.2.1. Tirosinaz .....	28
2.2.2.2. Lakkaz .....	29
2.3. ENZİM KİNETİĞİ .....	33
2.3.1. Enzimatik reaksiyonların hızı üzerine pH'nın etkisi .....	34
2.3.2. Enzimatik reaksiyonların hızı üzerine sıcaklığın etkisi .....	35
2.3.3. Enzimatik reaksiyonların hızı üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi .....	35
2.3.4. Enzimatik reaksiyonların hızı üzerine enzim miktarının etkisi .....	36
2.3.5. Michaelis-Menten Bağıntısı .....	36
2.3.6. İlk Hız ( $v$ ) .....	37
2.3.7. Michaelis-Menten Sabiti ( $K_m$ ) .....	38
2.3.8. Maksimum hız, ( $v_{maks}$ ) .....	39
2.3.9. Katalitik hız sabiti ( $k_{cat}$ ) .....	40
2.3.10. Özgül Substrat Konsantrasyonu [ $S'$ ] .....	42

	<b><u>Sayfa No</u></b>
2.3.11. Özgül Reaksiyon Hızı ( $v'$ ) .....	42
2.3.12. Katalitik (Kinetik) Verim .....	42
2.3.13. Fizyolojik Verim .....	43
2.4. ENZİMLERLE BOYALARIN RENGİNİN GİDERİLMESİ .....	44
2.5. ENZİMLERLE BOYALARIN YIKIM MEKANİZMALARI .....	49
<b>3. MATERYAL ve METOT .....</b>	<b>54</b>
3.1. MATERYAL.....	54
3.1.1. Renk Gideriminde Kullanılan Boyalar.....	54
3.1.2. <i>Funalia Trogu</i> Kültür Filtratını Elde Edilmesi .....	55
3.2. METOD.....	55
3.2.1. Renk Giderim Çalışmaları .....	55
3.2.1.1. Boyarmaddenin seçimi .....	55
3.2.1.2. EBBRSP boyasının renginin giderilmesi .....	56
3.2.2. Renk Gideriminde KOİ Değişiminin Ölçülmesi.....	57
<b>4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....</b>	<b>58</b>
4.1. BOYARMADDENİN SEÇİMİ.....	58
4.2. EBBRSP BOYASININ RENGİNİN GİDERİLMESİ .....	59
4.2.1. Renk Giderimine pH'nın ve Sıcaklığın Etkisi .....	59
4.2.2. Renk Giderimine Boya Konsantrasyonu ve Kültür Filtratı Miktarının Etkisi .....	62
4.3. RENK GİDERİMİNDE KOİ DEĞİŞİMİ .....	66
<b>5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....</b>	<b>68</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>72</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>84</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>85</b>



## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b><u>ÇİZELGE</u></b>	<b><u>Sayfa No</u></b>
Çizelge 2.1: Reaktif boyaların reaksiyon mekanizmalarına göre alt grupları .....	9
Çizelge 2.2: Boyarmaddelerin kimyasal yapıları ve Colour Index numaraları ....	14
Çizelge 2.3: Enzimler ve potansiyel uygulamaları .....	32
Çizelge 2.4: Hipotetik olarak bir enzimin kinetik parametrelerinin hesaplanması	43
Çizelge 2.5: Çeşitli enzim-substrat sistemlerinin kinetik parametreleri .....	46
Çizelge 3.1: Renk gideriminde kullanılan boyalar ve Colour Index numaraları ..	54
Çizelge 4.1: Boyaların renk giderme dereceleri .....	59
Çizelge 4.2: EBBRSP (100 mg/L)-kültür filtratı (100 µL) sisteminin değişik pH ve sıcaklıklardaki % renk giderim oranları .....	60
Çizelge 4.3: 40°C ve pH 3 koşullarında yıkılan boya miktarları .....	63
Çizelge 4.4: EBBRSP boyasının renk gideriminde KOİ değişimi .....	67

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b><u>ŞEKİL</u></b>		<b><u>Sayfa No</u></b>
Şekil 4.1:	EBBRSP boyasının 100 mg/L konsantrasyonda enzimatik renk gideriminde, 100 µL kültür filtratı ile değişik sıcaklıklarda pH'nın etkisinin grafiksel olarak gösterimi.....	61
Şekil 4.2:	EBBRSP boyasının 100 mg/L konsantrasyonda enzimatik renk gideriminde, 100 µL kültür filtratı ile değişik pH'larda sıcaklığın etkisinin grafiksel olarak gösterilmesi.....	61
Şekil 4.3:	EBBRSP boyasının renginin giderilmesinde boya konsantrasyonunun ve kültür filtratı miktarının etkisi (40°C ve pH 3').....	65
Şekil 4.4:	EBBRSP boyasının renginin giderilmesinde KOİ değişimi.....	67

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b><u>ŞEKİL</u></b>		<b><u>Sayfa No</u></b>
Şekil 4.1:	EBBRSP boyasının 100 mg/L konsantrasyonda enzimatik renk gideriminde, 100 µL kültür filtratı ile değişik sıcaklıklarda pH'nun etkisinin grafiksel olarak gösterimi.....	61
Şekil 4.2:	EBBRSP boyasının 100 mg/L konsantrasyonda enzimatik renk gideriminde, 100 µL kültür filtratı ile değişik pH'larda sıcaklığın etkisinin grafiksel olarak gösterilmesi.....	61
Şekil 4.3:	EBBRSP boyasının renginin giderilmesinde boya konsantrasyonunun ve kültür filtratı miktarının etkisi (40°C ve pH 3').....	65
Şekil 4.4:	EBBRSP boyasının renginin giderilmesinde KOİ değişimi.....	67

## SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

a	: Sabit sayı
A	: Absorbans
Abs.	: Absorbans
ABTS	: 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asid)
AQ 2	: 1-amino-4-metilamino-2-sodyum antrakinin sülfonat
b	: Sabit sayı
<i>B. adusta</i>	: <i>Bjekandera adusta</i>
Bm	: Boyarmadde
BOİ	: Biyokimyasal Oksijen İhtiyacı
C	: EBBRSP konsantrasyonu
CI	: Colour Index
KOİ	: Kimyasal Oksijen İhtiyacı
CSB	: Chicago Sky Blue
dA/dt	: Aktivite
dC/dt	: Reaksiyon hızı
DY 3	: Dispers Yellow 3
EBBRSP	: Everzol Brilliant Blue R/SP
F. Ver.	: Fizyolojik Verim
GSH	: Glutation
HBT	: 1-hidroksibenzotriazol
HRP	: Horseradish Peronsidaz
IP	: İyonizasyon Potansiyeli
Kat. Hız Sab.	: Katalitik Hız Sabiti
Kat. Ver.	: Katalitik Verim
$k_{cat}$	: Katalitik hız sabiti
$K_m$	: Michaelis-Menten Sabiti
LiP	: Lignin Peroksidaz
LMS	: Lakkaz-Mediatör Sistemleri
Maks. Hız	: Maksimum Hız
Menten Sab.	: Michaelis-Menten Sabiti

mg/L	: Miligram/Litre
MnP	: Manganez Peroksidaz
MnP I	: <i>B. Adusta</i> Mangan Peroksidazi
MnP II	: <i>B. Adusta</i> Mangan Peroksidazi
MnPL I	: <i>P. Eryngii</i> Mangan Peroksidazi
MnPL II	: <i>P. Eryngii</i> Mangan Peroksidazi
$\mu$ L	: Mikro Litre
NDY 3	: Dispers Yellow 3'ün naftol analogu
Öz. R. Hızı	: Özgül Reaksiyon Hızı
Öz. Sub. Kons.	: Özgül Substrat Konsantrasyonu
PAH	: Poli Aromatik Hidrokarbon
<i>P. chrysosporium</i>	: <i>Phanerochaete chrysosporium</i>
<i>P. eryngii</i>	: <i>Pleurotus eryngii</i>
PoP	: <i>Pleurotus ostreatus</i> peroksidaz
RB 5	: Reactive Blue 5
RB 5	: Reactive Black 5
RB 38	: Reactive Blue 38
RB 158	: Reactive Blue 158
RV 5	: Reactive Violet 5
RBBR	: Remazol Brilliant Blue B
[S]	: Substrat konsantrasyonu
[S]'	: Özgül substrat konsantrasyonu
SPH	: 4-sülfenilhidroperoksit
t	: Reaksiyon zamanı
$t_0$	: Reaksiyon başlangıç anı
$t_5$	: Reaksiyonun 5. dakikası
TOC	: Toplam Organik Karbon
v	: Reaksiyon başlangıç hızı
v'	: Özgül reaksiyon hızı
$v_{maks}$	: Reaksiyon maksimum hızı
VA	: Veratril alkol

## 1. GİRİŞ

Tekstil endüstrisinden deşarj edilen atık su hem hacım olarak ve hem de atık kompozisyonu olarak bütün endüstriyel sektörler arasında en kirletici atık olarak kabul edilir [1].

Boyalar medeniyetimizin gerekli bir parçasıdır, fakat boyarmadde endüstrisinin atıklarıyla çevresel kirlenmeye de neden olurlar [2]. Tekstil endüstrisi atık suyu bir çok kirletici madde içeren kompleks bir karışımdır. Bu kirletici maddelerin bir kısmı, organoklorür esaslı pestisitler, ağır metaller ve boyalardır [3].

Endüstriyel boyalar çevreye iki ana kaynaktan atılır: boya üretim tesisi atıklarından ve tekstil fabrikaları gibi boya kullanan endüstri dallarından. Boyama prosesinde kullanılan toplam boyanın % 10-15'inin atık suya verildiği tahmin edilmektedir [4]. Özellikle akıntı ve nehirlerde olmak üzere çevrede çok miktarda depolanırlar [5]. Bu boyaların pek çoğu ışığa, ısıya ve doğal biyolojik parçalanmaya dirençli bileşikler olduklarından mikrobiyal saldırılara karşı dirençlidirler. Nitro ve sülfonik gruplar gibi çeşitli kimyasal yapıları içeren sentetik boyalar klasik anaerobik proseslerde biyolojik renk gideriminde düzenli olarak çabuk bir şekilde etkilenmezler. Boyaların renginin giderilmesi amacı ile aerobik bakteri türleri geliştirmek için yapılan çalışmalar sık sık tek bir boyanın rengini giderme yeteneği gösteren çok spesifik organizmaların üretilmesi ile sonuçlanmaktadır [6].

Dünyada üretilen endüstriyel renklendiricilerin yaklaşık olarak % 50'si azo boyadır. Bunlar anaerobik koşullar altında renksiz aromatik aminler olan ve insanlara ve hayvanlara karşı toksik mutajenik ve/veya kanserojenik bileşiklere dönüşebilir. Bir azo boyanın kanserojenikliği boyanın kendisinden ya da redüktif transformasyon sırasında meydana gelen aril amin türevlerinden kaynaklanabilir. Bu boyalar hem aktif çamurda hem de akıntı sularda mikrobiyal oksidasyon prosesini inhibe eder. Azo boya toksisitesi nedeni ile sucul ekosistemdeki mikroorganizma kaybı organik bileşiklerin mikrobiyal mineralizasyonu faaliyetini azaltır. Aynı zamanda absorbe

edilen boya-mikroorganizma kompleksi üst organizmalar tarafından yenir ve besin zincirine girer. Memelilerde sitokrom P-450 redüktazı ve anaerobik bağırsak mikroflorası azo boyaları potansiyel olarak kanserojenik olan aromatik aminlere indirger [7]. Azo boyalar geniş bir uygulama alanına sahiptir ve doğal ve sentetik her elyafı boyamak için azo boya vardır. Azo boyaların çöktüntülerdeki ve sucul habitatdaki mikrobiyal popülasyonun büyüklüğünü ve aktivitesini etkilediği gösterilmiştir [5]. Azo boyalar çok sayıda renge sahip en geniş boya sınıfı olduğundan, araştırmalar çoğunlukla bu grup üzerine odaklanmıştır [8].

Yeryüzünde yılda  $7.10^5$  tondan fazla ve yaklaşık olarak 10.000 farklı boya ve pigment üretilmekte ve boya baskı endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunun yaklaşık olarak % 10'unun endüstriyel atıklara verildiği tahmin edilmektedir [9]. Endüstri çok çeşitli kimyasal yapıda sentetik boya kullanır; bu nedenle renk gidermede kullanılan bir biyokatalizatör çeşitli yapılardaki boyaları parçalayabilmelidir [10].

Boyalar genellikle aromatik ve heterosiklik bileşiklerdir ve genellikle doğal parçalanmaya dirençlidir. Bazıları toksik ve hatta kanserojeniktir. Bundan dolayı endüstriyel atıklardaki boyaların yıkımı ve renginin giderilmesi için yöntemler geliştirilmesi önemlidir [11]. Beyaz çürükçül fungusun bir çok ligninsel kültürünün çeşitli boyaları parçaladığı ve rengini giderdiği rapor edilmiştir [12-14].

Lignin biosferdeki biopolimerlerin ikinci büyük grubunu teşkil eder ve Lignin yıkım çalışmaları mümkün olabilen biyoteknolojik uygulamalar için büyük bir öneme sahiptir. Çünkü lignin polimerleri bir çok endüstriyel prosesinde lignoselülozik malzemenin verimli bir şekilde kullanılmasına en büyük engeldir. Ligninlerin yıkımı birinci derecede beyaz çürükçül fungusun faaliyet alanına girer; bundan dolayı bu ekolojik grup hatırı sayılır bir oranda araştırma konusu omaktadır. Fakat bu güne kadar bu mikroorganizmaların salgıladığı lignin peroksidaz (LiP) ve mangan peoksidaz (MnP)'ın kullanıldığı başarılı bir biyoteknolojik bir uygulama rapor edilmemiştir [15].

Lignin bir çok cazip kimyasal yapılar ve çeşitli reaktif fonksiyonel grupları olan bir polimer olarak bitki hücre duvarlarında oluşur. Fenolik gruplar, bir çok alkil aril eter bağları ve polimerizasyon derecesi gibi bir çok önemli özelliğe sahiptir [16].

Lignin parçalayan enzimler polisiklik aromatik hidrokrbonları, klorlanmış fenoller , diklor anilini, ve boyaları, yıkıma uğratabilir [11-14, 17]. Azo boyalar aerobik koşullar altında yıkıma uğratılmadığından [18], enzimatik oksidatif mineralizasyon büyük bir öneme sahiptir. Redüktif transformasyon renksiz fakat toksik ürünler meydana getirdiği için, bu durum özellikle önemlidir. *Phanerochaete chrysosporium* enzimlerinin azo boyaların sadece rengini gidermediği, aynı zamanda onları karbon dioksite mineralize ettiğine dair bazı ipuçları vardır [19]. Azo boyaların yıkıma uğratılması, LiP üretimi için de gerekli olduğundan, sadece sınırlı azot koşullarında verimli bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca *Phanerochaete chrysosporium*' un LiP'den başka ligninsel olmayan bir enzim sisteminin de boya yıkımına karıştığı sanılmaktadır [14].

Basidiomycetes grubundan beyaz çürükçül fungusun lignini tamamen parçalayan ve mineralize eden tek mikroorganizma grubu olduğu bilinmektedir [20]. Bunlar doğaya yabancı maddelerin oksidasyonunda hızlı değildir [21]. Beyaz çürükçül fungusun ligninsel kültürlerinin çeşitli kombinasyonlarda mangan peroksidaz (MnP), lignin peroksidaz (LiP), lakkaz ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşturan enzimler salgıladığı bilinmektedir [22]. Saflaştırılmış MnP ve LiP in vitro olarak ligninin kısmi depolimerizasyonunu katalizleme yeteneğine sahiptir. Bu enzimatik aktiviteler aynı zamanda çeşitli doğaya dirençli sentetik bileşiklerin parçalanmasında da etkilidir [23].

Beyaz çürükçül basidiomycete'ler bu enzimlerin üretiminde nitelik ve nicelik farklılıklar temelinde boyarmaddeleri parçalama yetenek ve kapasitelerinde farklılaşır [23]. Yarı-katı fermantasyon ile 20 günlük inkübasyon sonucu beyaz çürükçül funguslardan *Phanerochaete chrysosporium* % 22, *Funalia trogii* ise %



23 lignin yıkımına yol açmaktadır. *Funalia trogii*'nin oldukça yüksek lakkaz ve peroksidaz aktivitesi gösterdiği saptanmıştır [24]. Ayrıca fenol yıkımında *Funalia trogii* kullanımının mümkün olduğu gösterilmiştir ve %80 fenol giderimi başarılmıştır [25].

Azo boyalara benzeyen fakat farklı yapıdaki doğaya yabancı kimyasal maddeler olan antrakinon boyaların enzimatik yıkım çalışmaları az sayıda yapılmıştır. *Geotrichum candidum* Dec 1, azo ve antrakinon boyaların rengini giderebilmektedir. Bu mikroorganizma türünün hücre dışı peroksidaz-tipi enzimleri renk giderme olayına karışmaktadır [26].

Hidroksi-gruplu antrakinonlar ve antronlar, glikozidleri halinde doğada sık sık görülür. Dahası bazı antrakinon ve antron türevleri boyarmadde ara ürünleri olarak önemlidir ve bazı endüstriyel atık sularda çözünmüş kirleticiler olarak bulunurlar. Kültür ortamında fenolik bileşikler bulunduğu *Pleurotus spp.* sık sık çözünebilir bir lakkaz salgılaması ile cevap verir. Bu nedenle fungus gerçek bir fenolik bileşik gibi davranan bir hidroksi gruplu antrakinon ve antron ve boyarmadde hammaddesi olarak kullanılan antrakinon sülfonik asid içeren ortamda kültürlenebilir [27].

Bir antrakinon boya olan Remazol Brilliant Blue R (RBBR) endüstriyel olarak önemli bir boyadır ve polimerik boya üretiminde sık sık başlangıç maddesi olarak kullanılır. Yapı olarak ligninsel peroksidazların substratları olan polisiklik aromatik bileşiklere benzer. Vinilsülfon grubundan, antrakinon kimyasal yapısındaki bu boyanın rengi beyaz çürükçül fungus *Phanerochaete chrysosporium* tarafından giderilir [28]. Bu grupta yer alan boyarmaddeler boya baskı endüstrisinde çok yaygın olarak kullanılmakta ve piyasada pek çok türleri bulunmaktadır.

Bu çalışmada, RBBR ile aynı grupta yer alan ve tekstil endüstrisinde kullanılan Everzol Brilliant Blue RSP (EBBRSP) boyasının *Funalia trogii*'nin kültür filtratı ile renginin giderilmesi işlemleri yapılmıştır.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

### 2.1. TEKSTİL ENDÜSTRİSİNDE KULLANILAN BOYARMADELER

Kumaş, elyaf vb gibi tekstil malzemelerini renkli hale getirmek için kullanılan maddelere boyarmadde denir. Genellikle çözeltiler veya süspansiyonlar halinde çeşitli boyama yöntemleriyle uygulanırlar. Boyarmadde elyaf ile kimyasal veya fizikokimyasal bir ilişkiye girerek birleşir [29].

Renklendiriciler görünür ışığı absorbe etme yetenekleriyle karakterize edilirler (400-700 nm – görünür absorpsiyon) ve renkli görünürler. Renklendiriciler organik, anorganik; sentetik ve doğal kimyasal maddelerdir. Bunlar içerisinde yer alan pigmentler ortamda çözünmemeleriyle karakterize edilirler [30].

Direkt, asid ve reaktif boyalar anyonik, dispers boyalar katyonik ve diğerleri noniyonik karakterdedir. Parlak renkli, suda çözünen reaktif ve asid boyalar en problemli boyalardır [31].

Boyalar benzidin gibi kanserojenik ve diğer aromatik bileşiklerden üretilir. Antrakinon esaslı boyalar aromatik halka yapılarından dolayı biyolojik yıkıma en dirençli olanlardır [31].

Tekstil endüstrisinde kullanılan boyalar üç şekilde sınıflandırılır: çözünürlüklerine göre sınıflandırma, kullanım özelliklerine göre sınıflandırma ve kimyasal özelliklerine göre sınıflandırma [29].

#### 2.1.1 Boyarmaddelerin Çözünürlüklerine Göre Sınıflandırılması

##### 2.1.1.1. Suda çözünen boyarmaddeler

Boyarmadde molekülü en az bir tane tuz oluşturabilen grup taşır. Boyarmaddenin sentezi sırasında kullanılan başlangıç maddeleri suda çözüldürücü

grup içermiyorsa, bu grubu boyarmadde molekülüne sonradan eklemek suretiyle de çözünürlük sağlanabilir. Ancak tercih edilen yöntem, boyarmadde sentezinde başlangıç maddelerinin iyonik grup içermesidir. Suda çözünebilir boyarmaddeler tuz teşkil edebilen grubun karakterine göre üçe ayrılır [29].

Anyonik suda çözünen boyarmaddeler suda çözünen grup olarak en çok sülfonik ( $-\text{SO}_3\text{H}^-$ ), kısmen de karboksilik ( $-\text{COO}^-$ ) asitlerin sodyum tuzlarını içerirler ( $-\text{SO}_3\text{Na}$  ve  $-\text{COONa}$ ) [29].

Katyonik suda çözünen boyarmaddelerde moleküldeki çözünürlüğü sağlayan grup olarak bir bazik grup (örneğin  $-\text{NH}_2$ ), asitlerle tuz oluşturmuş halde bulunur. Asit olarak anorganik asitler ( $\text{HCl}$ ) veya organik asitler ( $\text{COOH}$ -) kullanılır [29].

Zwitter iyon karakterli boyarmaddeler moleküllerinde hem asidik hem de bazik grup bulundurlar. Bunlar bir iç tuz oluştururlar. Boyama sırasında bazik veya nötral ortamda anyonik boyarmadde gibi davranış gösterirler [29].

#### 2.1.1.2. Suda çözünmeyen boyarmaddeler

Tekstilde ve diğer alanlarda kullanılan ve suda çözünmeyen boyarmaddeleri çeşitli gruplara ayırmak mümkündür [29].

Substratta çözünen boyarmaddeler, suda çok ince süspansiyonlar halinde dağıtılarak hazırlanır ve özellikle sentetik elyaf üzerine uygulanan dispersiyon boyarmaddeleri bu sınıfa girer [29].

Organik çözücülerde çözünen boyarmaddeler her çeşit organik çözücüde çözünürler. Solvent boyarmaddeleri de denilen bu boyarmaddeler sprey veya lak halinde uygulanabilirler. Matbaa mürekkebi, vaks ve petrol ürünlerinin renklendirilmesinde kullanılırlar [29].

Geçici çözünürlüğü olan boyarmaddeler, çeşitli indirgeme maddeleri ile suda çözünebilir hale getirildikten sonra elyafa uygulanabilirler. Daha sonra elyaf içinde

iken yeniden yükseltgenerek suda çözünmez hale getirilirler. Küp ve kükürt boyarmaddeleri bu prensibe göre uygulanırlar [29].

Polikondensasyon boyarmaddeleri, son yıllarda geliştirilen ve elyaf üzerine uygulanırken veya uygulandıktan sonra birbiri ile veya başka moleküllerle kondanse olarak büyük moleküller oluşturan boyarmaddelerdir [29].

Elyaf içinde oluşturulan boyarmaddeler, iki ayrı bileşenden elyaf içinde kimyasal bir reaksiyonla oluşturulan boyarmaddelerdir. Bunlar suda çözünmeyen pigmentlerdir. Azoik boyarmaddeler ve ftalosiyaninler bu sınıfa girer [29].

Pigmentler elyafa ve diğer substratlara karşı afinitesi olmayan, boyarmaddelerden farklı yapıda bileşiklerdir [29].

## 2.1.2 Boyarmaddelerin Kullanım Özelliklerine Göre Sınıflandırılması

Boyarmaddelerin kimyasal yapılarına ve boyama özelliklerine göre sınıflandırılma şekilleri arasında çok az ilişki vardır [30]. Genellikle boyama uygulayıcıları boyarmaddenin kimyasal yapısı ile değil, onun hangi yöntemle elyafı boyayabildiğine bakarlar. Bu nedenle bu yöntemle göre boyarmaddeleri aşağıdaki şekilde sınıflandırırılar [29].

### 2.1.1.1. Direkt (Substantif) boyarmaddeler

Direkt boyarmaddeler suda çözünen bileşikler olup, selülozik elyafı nötral veya kalevi ortamda, sodyum klorür veya sodyum sülfat gibi bir elektrolit beraberliğinde, soğukta ya da kaynama temperatüründe boyarlar. Çözünürlük çoğu kez molekülde bulunan sülfon, bazen de karboksil grupları ile sağlanır. Bu gruplar sayesinde boyarmadde anyonik karakter kazanır [30].

Bu sınıf boyarmaddeler ucuzlukları, boyama işlemlerinin basit oluşu ve boyama esnasında elyafın yıpranmaması gibi üstünlüklere sahiptir [30].

Direkt boyarmaddeler azo, stilben, oksazin, tiazol ve ftalosiyenin kimyasal yapılarına sahiptir [30]. Bunlar genellikle sülfonik, bazen de karboksilik asidlerin sodyum tuzlarıdır [29].

#### 2.1.2.2. Küp boyarmaddeler

Selülozik ve protein elyafın boyanmasında ve baskısında kullanılan boyarmaddeler olup, moleküllerinde halkaya bağlı ve halka elektronlarıyla konjuge durumda olan en az iki oksijen atomu ve karbonil grubu içeren suda çözünmeyen renkli bileşiklerdir. Kimyasal yapıları indigoid ve antrakinoid şeklindedir [30].

#### 2.1.2.3. Kükürt boyarmaddeler

Kükürt boyarmaddeleri, pamuğu özellikle siyah, kahverengi, zeytin yeşili, haki ve lacivert gibi koyu renklere boyayabilen çok ucuz ve uygulama şekilleri çok basit olan boyarmaddelerdir [30].

#### 2.1.2.4. İnkişaf boyarmaddeleri

Bu sınıfta bulunan boyarmaddeler pamuk, ipek, asetat ipeği, naylon ve polyester elyafın boyanmasında kullanılır [30]. Elyaf üzerinde oluşturularak son şekline dönüştürülebilen bütün boyarmaddeler bu sınıfa girer. Azoik boyarmaddeler de denilen Naftol-As boyarmaddeleri ile ftalosiyenin boyarmaddeleri bu sınıftadır [29].

#### 2.1.2.5. Reaktif boyarmaddeler

Reaktif boyarmaddeler selülozik elyafın boya ve baskısına yarayan ve elyaf ile kimyasal reaksiyona giren çok önemli bir boyarmaddedir. Bütün reaktif boyarmaddelerde ortak olan özellik, hepsinin kromoforu taşıyan renkli bir grup yanında, bir reaktif ve bir de moleküle çözünürlük sağlayan grub içermesidir.

Çizelge 2.1: Reaktif Boyaların Reaksiyon Mekanizmalarına Göre Alt Grupları [8]

Reaktif Grup	Ticari Adı	Üretici Firma
Diklortriazinil	Procion MX	ICI
	Reacna	Acna
	Amaryl	Amar
	Ostazin S	Chemapol
	Helaktyn F	-
Monoklortriazinil	Procion H	ICI
	Procion HE	ICI
	Cibacron E	Ciba
	Cibacron A	Ciba
	Pront	-
	Reacna C	Acna
	Amaryl X	Amar
	Ostazin H	Chemapol
	Helaktyn D	-
	Intracron	-
	Basilen	BASF
	Drimaren P	Clariant
Monoflortriazinil	Cibacron F	Ciba
Triklorprimidin	Drimaren X	Clariant
	Drimaren Z	Clariant
	Cibacron TE	Ciba
	Cibacron TA	Ciba
	Reacton S	Gy
Monoklordiflorprimidin	Drimarene K	Clariant
	Drimarene R	Clariant
	Levafix E-A	Bayer
	Levafix P-A	Bayer
Diklorkinoksalin	Levafix E	Bayer
	Cavalite	DUP
Vinilsülfon	Remazol	Hoechst
	Rhodazol	-
	Primazin	BASF
	Reacna T	Acna

Kromoforu taşıyan moleküller çoğunlukla azo, antrakinin ve ftalosiyanın türevleridir. Boyarmaddenin reaksiyon yeteneğini ve reaksiyon hızını reaktif grup tayin eder [30].

Selülozun hidroksil grupları ile boyarmadde arasındaki reaksiyon, reaktif gruba bağlı olarak, ya selüloz esteri oluşturmak üzere nükleofilik substitüsyon, ya da selüloz eteri vermek üzere nükleofilik adisyon reaksiyonudur. Kalevi ortamda selülozun nükleofilik karakteri arttığından bu boyaları hepsi bazik ortamda fikse olur [30].

#### 2.1.2.6. Ingrain boyarmaddeleri

Boyarmadde karakterinde olmayan bileşiklerden elyaf üzerinde oluşturulan boyarmaddelerdir. Azoik, oksidasyon ve ftalosiyenin boyarmaddeleri bu guruba girer. Başlangıç maddelerine göre iki gruba ayrılır: Alcian boyarmaddeleri (ICI), ftalojen boyarmaddeleri (FBy), [30].

#### 2.1.2.7. Pigment boyarmaddeler

Tekstil malzemesinin renklendirilmesinde organik ve anorganik pigmentler de kullanılır. Bunlar suda çözünmediklerinden elyaf ile aralarında afinite söz konusu değildir. Ne kimyasal bağ, ne de kolloidal adsorbsiyon yapabilirler. Bu nedenle klasik anlamda bir boyama meydana getirmezler [30].

#### 2.1.2.8. Bazik (Katyonik) boyarmaddeler

Bazik boyarmaddeler çözünürleştirici grubu bulunmayan organik bazlardır. Ancak tuzları (organik bazların hidroklorürleri) şeklinde iken suda çözünebilirler. Tekstil boyacılığında kullanılanlar klorür veya asetat tuzu şeklindedir. Sulu çözeltide bulunan boyarmadde katyonu, elyafın anyonik gruplarıyla elyaf/boyarmadde tuzunu oluşturur. Bu nedenle protein ve anyonik modifiye poliakrilonitril elyafın boyanmasında kullanılırlar. Bu sınıfa giren kimyasal yapılar trifenilmetan, tiazin, oksazin, azin, ksanten ve azo boyarmaddelerdir [30].

#### 2.1.2.9. Asit boyarmaddeler

Asit boyarmaddeler protein elyafa karşı direkt afiniteye sahip olan önemli bir boyarmadde sınıfıdır. Poliamid elyaf da kimyasal yapı bakımından proteinlere benzediğinden asit boyarmaddelere karşı afinite gösterir. Hemen hepsi organik asitlerin sodyum tuzları (sülfonik asit tuzları) olup; renkli komponent, boyarmadde anyonudur. Asit boyarmaddelerin kimyasal yapıları trifenilmetan, ksanten, nitro, azo, antrakinin ve ftalosiyanın bileşikleridir [30].

Genel formülleri  $Bm-SO_3-Na^+$  (Bm: Boyarmadde, renkli kısım) şeklinde yazılabilen asit boyarmaddeleri, moleküllerinde bir veya birden fazla sülfonik asid ( $-SO_3H$ ) grubu veya Karboksilik asid grubu ( $-COOH$ ) içerirler [30].

#### 2.1.2.10. Krom boyarmaddeleri

Bu sınıf boyarmaddeler yün ve yün-naylon karışımlarının boyanmasında kullanılır. Bunlar asit boyarmaddelere benzemekle beraber, moleküllerinde bazı metal katyonlarıyla dayanıklı koordinasyon bileşikleri yapabilecek gruplar bulunur. Kimyasal olarak azo, antrakinin, trifenil metan ve ksanten yapıdadırlar [30].

#### 2.1.2.11. Metal-kompleks boyarmaddeler

Protein ve poliamid elyafın boyanmasında kullanılan bu sınıf boyarmaddeler, koordinasyon bileşikleridir. Boyarmadde molekülü ile metal iyonu arasında koordinat bağları vardır. Kimyasal yapıları bakımından asit boyarmaddelere benzer. Konstitüsyonları ve boyama özellikleri bakımından iki farklı grup altında toplanırlar. Bir  $Cr(II)$  iyonuna karşılık bir boyarmadde molekülü bulunduranlara 1:1 metal-kompleks boyarmaddeler; iki boyarmadde bulunduranlara 1:2 metal-kompleks boyarmaddeler denir [30].



#### 2.1.2.12. Dispers boyarmaddeler

Dispers boyaların kimyasal yapıları nitrodifenilenamin, monoazo, disazo, antrakinon, metin, naftilamid, naftakinonamin ve kinonftalen şeklindedir. Polyester elyafın boyanmasında kullanılır ve elyaf kimyaca aktif grup içermediği için boyarmadde anyon ve kationlarını bağlayamaz. Boyama işlemi, dispers boyanın polyester elyafın içine girmesi ile sağlanır. Boyanın elyaf içerisine girmesi ya yüksek sıcaklıkta ya da carrier denilen kimyasal maddelerin kullanımı ile sağlanır [30].

#### 2.1.2.13. Mordan boyarmaddeler

Mordan sözcüğü, boyarmaddeyi elyafa tesbit eden madde veya bileşim anlamını taşır. Bir çok doğal ve sentetik boyarmadde bu sınıfa girer. Bunlar asidik veya bazik fonksiyonel gruplar içerirler ve bitkisel ve hayvansal elyaf ile karasız bileşikler oluştururlar. Mordan olarak suda çözünmeyen hidroksitler oluşturan Al, Sn, Fe, Cr tuzları kullanılır [29].

#### 2.1.3. Boyarmaddelerin Kimyasal Özelliklerine Göre Sınıflandırılması

Boyarmaddelerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması tablo 4'de görülmektedir.

##### 2.1.3.1. Azo boyalar

Renklendiricilerin en büyük sınıfını azo grubu içeren boyalar oluşturur. En yaygın olarak kullanılan azo renklendirme maddelerinin karakteristik özelliği  $-N=N-$  azo grubunun bulunmasıdır. Buna genellikle auxochromic hidroksil veya amino grupları eşlik eder. Bu boyalar kinon hidrazonları ile benzenoit-kinonoit tautomerizm gösterir [8].

Azo boyalar geniş bir uygulama alanına sahiptir. Doğal ve sentetik her elyafı boyamak için azo boya vardır. Bundan dolayı azo boyaların yapısında bulunan azo

gruplarının sayısı ve düzenlenmesine göre mono azo, diazo, trisazo, tetrazo ve poli azo gibi alt sınıflara ayrılırlar [8].

Kenetlenme komponentleri şunlardır: Benzenoid monoaminler, benzenoid diaminler, asetoasetonil aminler, naftilaminler, fenoller, naftoller, aminonaftoller, N-alkil (veya aril) aminonaftoller, N-açilaminonaftoller, pirazolanlar ve diğer heterosiklik bileşikler [8].

Disazo komponentleri şunlardan türer: Anilinler, toluidinler ve homologları, anisidinler ve homologları, naftilaminler, aminofenoller ve aminonaftoller [8].

Azo boyalarda bulunan küçük gruplar ise  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{SO}_3\text{H}$ ,  $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ ,  $-\text{SO}_2\text{NHR}$ ,  $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{NHCOR}$ ,  $-\text{CNS}$ ,  $-\text{CONH}_2$ ,  $-\text{CONHR}$ ,  $-\text{CHO}$ ,  $-\text{SO}_2\text{R}$   $-\text{OSO}_2\text{R}$  ve halojenlerdir [8].

Azo boyaların parçalanması iki kademedede gerçekleşir. Birinci kademedede azo bağı koparılır ve ikinci kademedede ise ara ürünlerin mineralizasyonu sağlanır [32].

Ticari azo boyalar esas olarak aromatik primer aminleri diazolarak hazırlanır. Bir veya daha fazla azo bağı içerirler. Azo boya üretiminde benzidin, 2-naftolamin ve diğer aromatik aminler gibi kanserojenik veya toksik ara ürünler de meydana gelir [33]. Azo boyalar doğada meydana gelmez ve sadece kimyasal sentez ile üretilir [34].

Azo boya renklendiricilerinin kalitatif ve kantitatif karakteristikleri (a) azo gruplarının sayı ve pozisyonuna, (b) aromatik çekirdeğin yapısına (yani benzen, naftalen vb.) ve (c) bağlı grupların yapı ve pozisyonuna (yani halo, alkil, amino, hidroksil, karboksil, alkoksil, nitro ve özellikle sülfonat) bağlıdır [33].

Çizelge 2.2: Boyarmaddelerin Kimyasal Yapıları ve Colour Index Numaraları [8]

Kimyasal yapı	CI numarası
Nitroso	10000-10299
Nitro	10300-10999
Monoazo	11000-19999
Disazo	20000-29999
Trisazo	30000-34999
Poliazo	35000-36999
Azoik	37000-39999
Stilben	40000-40799
Karotenoid	40800-40999
Difenilmetan	41000-41999
Triarilmetan	42000-44999
Ksanten	45000-45999
Akridin	46000-46999
Kinolin	47000-47999
Metin	48000-48999
Tiazol	49000-49399
Indamin	49400-49699
Indofenol	49700-49999
Azin	50000-50999
Oksazin	51000-51999
Tiazin	52000-52999
Lakton	55000-55999
Aminokinon	56000-56999
Hidroksiketon	57000-57999
Antrakınon	58000-72999
Indigoid	73000-73999
Ftalosiyenin	74000-74999
Naturel	75000-75999
Oksidasyon	76000-76999
Anorganik pigmentler	77000-77999

#### 2.1.3.2. Ftalosiyenin boyalar

Ftalosiyenin grubu yeşil ve mavi renkte boyalar elde etmek için kullanılır [35]. Ftalosiyenin hemen hemen %90'ı pigment boyarmadde olarak kullanılır. Bazı ftalosiyeninler ise küp boyarmaddesi olarak kullanılırlar. Tekstilde inkişaf boyarmaddeleri olarak kullanılanları da vardır [29].

#### 2.1.3.3. Azoik boyarmaddeler

Elyaf üzerinde sentez edilip son şekline dönüştürülerek kullanılan azoik boyarmaddelerde elyaf üzerine çektirilen kenetleme bileşenlerine naftoller denir. Naftoller suda çözünmediklerinden, ancak suda çözünebilir sodyum tuzları şeklinde uygulanabilirler [29].

#### 2.1.3.4. Nitro ve nitroso boyarmaddeleri

Bu sınıf boyarmaddeler kimyasal yapılarında nitro veya nitroso grubu ile birlikte elektron veren bir grup ihtiva eder. Teknikde önemli olan bütün bir grup boyarmaddelerde nitro veya nitroso grubu ile elektron veren grup birbirine nazaran orto yerinde bulunur [29].

#### 2.1.3.5. Polimetin boyarmaddeler

Polimetin boyarmaddeleri renkli bileşikler içinde büyük bir grup oluşturur. Karboksilat anyonunun vinil homologları şeklinde olan anyonik polimetin boyarmaddelerine oksonol adı verilmektedir. Molekülünde iyonik grup içermeyen polimetin boyarmaddeleri nōtrosiyeninler veya merosiyeninler olarak isimlendirilir. Tekstil malzemelerinin boyanmasında polimetin boyarmaddelerinin kullanılması, çok zayıf ışık haslıkları dolayısıyla sınırlıdır [29].

#### 2.1.3.6. Arilmetin boyarmaddeler

Genel formülleri  $Ar - x = Ar$  şeklinde olan arilmetin ve polimetin boyarmaddelerinde x, -CH= veya -N= şeklinde olabilir. Bu tür boyarmaddelerin sayısız karakteristik reaksiyonları bu grubun elektrofil özelliğine dayanır. Moleküldeki metin grubunun sayısına göre değişik yapılar gösterirler [29].

#### 2.1.3.7. Trifenilmetan boyarmaddeler

Genellikle renksiz veya sarı renkte olan ve boyarmaddenin yükseltgenmesiyle elde edilen karbinol bazları oldukça karalıdır. Trifenilmetan boyarmaddeleri içerdikleri fonksiyonel gruplara göre üç sınıfa ayrılırlar: aminotrifenilmetan boyarmaddeleri, hidroksitrifenilmetan boyarmaddeleri ve karboksitrifenilmetan boyarmaddeleri[29].

#### 2.1.3.8. Difenilmetan boyarmaddeler

Aminofenilmetanol, diaminobenzohidrol ve benzofenoniminlerin tuzları difenilmetan boyarmaddelerindedir. Auramin O (Basic Yellow 2) kağıt, deri, jüt ve tanenlenmiş pamuğu sarı renge boyamada kullanılır. Ucuz fakat çabuk solan bir boyarmaddedir [29].

#### 2.1.3.9. Akridin, ksanten ve fluoren boyarmaddeler

Akridin boyarmaddeleri, di- ve trifenilmetan boyarmaddelerindeki iki halkanın arasına bir azot atomu bağlanmasıyla yeni bir halka oluşumu sonucu ortaya çıkan bileşiklerdir. Ksanten boyarmaddeleri de di- ve trifenilmetan boyarmaddelerindeki iki benzen halkasına oksijen bağlanması sonucu halka kapanması ile oluşur. Fluoren boyarmaddelerinde de, iki benzen halkası bir hetero atom olmaksızın doğrudan bağlıdır [29].

#### 2.1.3.10. Kinonimin boyarmaddeleri

Arilmetin boyarmaddelerinin aza analogları, kinonimin, azin, oksazin ve tiazin sınıflarına ayrılır. Kinonimin boyarmaddeleri tekstilde boyama amacıyla kullanılamaz. Çünkü kolayca bozunurlar. Bu bileşikler, daha çok indikatör olarak veya renkli fotoğrafçılıkta kullanılabilir [29].

#### 2.1.3.11. Azin, oksazin ve tiazin boyarmaddeleri

Azinler, Z grubu olarak -NR- , oksazinler -O- ve tiazinler -S- grubu taşırlar. Tiazin boyarmaddelerinin tipik örneği metilen mavisidir. Bu sınıf boyarmaddeler bu gün yeterli olmayan haslık özellikleri nedeniyle tekstil alanında nadiren kullanılır. Ayrıca tıp ve biyolojide kullanılmaktadır [29].

#### 2.1.3.12. İndigo boyarmaddeler

Bütün indigo boyarmaddeleri doğal kaynaklardan elde edilen mavi renkli indigolardan türemiştir [29].

#### 2.1.3.13. Antrakinin boyarmaddeler

Karbonil boyarmaddelerinin temel yapısına sahip antrakinin hafif sarı renklidir. Bu kimyasal yapıya sahip boyarmaddeler reaktif boyarmaddeler, küp boyarmaddeleri ve çözünür küp boyarmaddeleridir [29].

#### 2.1.3.14. Kükürt boyarmaddeler

Aromatik aminlerin ve fenollerin kükürt ve sodyum sülfür veya sodyum polisülfür ile reaksiyonundan meydana gelen, suda çözünmeyen, makromolekül yapılı ve renkli organik bileşikler kükürt boyarmaddeleri olarak adlandırılır. Bm-S-S-Bm şeklinde sembolize edilebilir [29].

## 2.2. RENK GİDERİMİNDE KULLANILAN ENZİMLER

Son 20 yılda atık su arıtılmasında enzim kullanımını öneren araştırmalarda büyük gelişmeler olmuştur. Bunun nedenlerini üç başlık altında toplamak mümkündür: (1) çevreye verilen, doğaya yabancı ve biyolojik parçalanmaya karşı dirençli organik kirleticilerin miktarındaki artış ve klasik kimyasal ve biyolojik prosesleri kullanarak bu kirleticilerin istenen oranda uzaklaştırılmasını sağlamak gittikçe zorlaşmaktadır; bundan dolayı mevcut proseslerden daha hızlı, daha ucuz, daha güvenilir ve daha basit alternatif araştırma metodlarının geliştirilmesine gereksinim vardır; (2) spesifik kirleticileri arıtmayı hedefleyen enzimlerin kullanılabilmesine artan bir gereksinim vardır; ve (3) son zamanlardaki biyoteknolojik ilerlemeler, enzimlerin daha iyi izole edilmeleri ve saflaştırılmaları proseslerine olanak vermiş ve böylece daha ucuz ve daha bol miktarda üretilmelerini sağlamıştır [6].

Atık su arıtma proseslerinin çoğu fiziko-kimyasal ya da biyolojik prosesler olarak karakterize edilebilir. Enzimatik işlem biyolojik katalizleme işlemine dayanan kimyasal prosesleri içerdiğinden bu iki klasik kategorinin arasında bir yer alır. Klasik işlem ile karşılaştırıldığında enzimatik işlemin olası avantajları şunlardır: biyolojik parçalanmaya dirençli bileşiklere uygulama; yüksek ve düşük kirletici konsantrasyonlarında işlem; geniş bir pH, sıcaklık ve tuzluluk aralığında çalışabilme; şok yükleme etkisi olmaması; biyokütlenin alıştırılmasında gecikmelerin olmaması; çamur miktarında azalma (biyokütle oluşmuyor) ve prosesin kolay ve basit kontrolü [6].

Bu potansiyel avantajların fark edilmesi üzerine, son araştırmalar atık suların, katı atıkların, tehlikeli atıkların ve çöplerin arıtılması için enzim proseslerinin geliştirilmesi üzerinde odaklanmıştır [6].

Fenoller ve aromatik aminleri içeren aromatik bileşikler kirleticilerin en büyük gruplarından birini oluşturur ve bir çok ülkede bu konuda ağır yasal düzenlemeler vardır. Bunlar kömür işletmeleri, petrol rafinerileri, reçine ve plastik

üretimi, mobilya ve koruma maddeleri, metal kaplama, boya ve diğer kimyasal maddeler, tekstil, maden ve kağıt gibi çok çeşitli endüstri dallarının atık suyunda bulunurlar. Bir çok aromatik bileşik toksiktir ve bunlar çevreye atılmadan önce atık sudan uzaklaştırılmalıdır. Enzimatik işlem, klasik yöntemlere potansiyel bir alternatif olarak araştırmacılar tarafından önerilmektedir. İlk olarak enzimler yüksek seçiciliğe sahiptir ve seyreltik atıkları bile etkili bir şekilde giderebilirler. İkinci olarak yaşayan organizmalara toksik olabilen maddeler tarafından daha az inhibe olurlar ve eğer ticari olarak sağlanan enzimler büyük miktarlarda üretilirse, maliyet diğer metodlardan daha düşük olabilir. Dahası enzimler geniş bir aromatik madde konsantrasyonları aralığında çalışır ve diğer arıtma metodlarına göre daha düşük bekleme zamanı gerektirir [6].

Lignin yıkımından iki tip hücre dışı oksidatif enzim sorumludur: peroksidazlar ve lakkazlar (fenol oksidazlar). Bir fungi her iki enzimi de üretebilir veya birini ya da diğerini üretebilir. Çoğu türlerde peroksidazlar ve lakkazlar bir çok izoenzim olarak ifade edilir. Ligninsel enzimlerin her iki tipi de stabiliteilerini arttırabilen glikoz ile kullanılır. Peroksidazlar hem-içeren enzimlerdir. Bunlar lignin ve lignin benzeri bileşikleri oksitlemek için ortamda hidrojen peroksite ihtiyaç duyarlar. Molekül ağırlıkları 35-47 kD ve izoelektrik noktaları 2,8-5,4'dür. Peroksidazlar çok çeşitli substratlara sahip olduğundan iki tipe ayrılırlar Bir tip, mangan peroksidaz (MnP)'dir ve Mn (II) en iyi indirgeme substratıdır. Diğer lignin peroksidazdır (LiP). LiP fenolik olmayan ve fenolik aromatik bileşikleri oksitler. Lakkazlar çok bakırlı fenol oksidazlardır. Bu enzimler fenolleri ve aromatik aminleri okside eder. Bunlar oksidant olarak hidrojen peroksitten çok dioksijen kullanarak dört elektron ile suya indirger. Lakkazlar 50-300 kD molekül ağırlığına, asidik izoelektrik noktalarına sahiptir [6].

Lakkaz, tirozinaz ve peroksidaz gibi oksidatif enzimler, fenolik bileşiklerin suda çözünmeyen oligomerik ve polimerik ürünlere dönüştürülmesini katalizler [36].

Ortamda farklı bileşikler bulunduğunda, fungus tarafından farklı izoenzimler üretildiği elektroforetik analizler ile gösterilmiştir [27].



Lignin parçalama yeteneği olan beyaz çürükçül fungusların en önemli enzimleri lignin peroksidaz, mangan peroksidaz ve lakkzdir. Bazı beyaz çürükçül funguslar bu enzimlerin tümünü, diğerleri ise sadece birini veya ikisini üretir[37].

Doğada beyaz çürükçül funguslara ait birkaç organizma lignin molekülüne saldırır ve parçalar. Hem selüloz ve hem de lignin oldukça sağlam organik polimerlerdir. Bu polimerler güçlü ve uzun süre dayanıklı olması için doğa tarafından yaratılmış ve sağlamlaştırılmıştır. Bu iki bileşii etkilemek için güçlü fizikokimyasal işlemler yapılmak zorundadır. [38]

İki en önemli lignin parçalayan mikroorganizma *Phanerochaete chrysosporium* ve *Trametes (Coriolus) versicolor*'dur [38].

Enzimler doğada yaygın olarak bulunan proteinlerdir. Onlar yaşamın en temel bir kısmıdır. Kimyasal olarak yüzlerce amino asidin bir veya daha fazla zincirli ve üç boyutlu yapıdaki oldukça kompleks bileşiklerdir. Üç boyutlu olması faaliyetleri için oldukça önemlidir. Bütün yaşayan organizmaların biyokimyasal reaksiyonlarında biyolojik katalizörler olarak davranırlar. Aynı zamanda bir çok teknik endüstri dalında da kullanılmaktadır. Bütün katalizörler gibi bir enzim biyokimyasal katalizör de bir kimyasal reaksiyonun hızını arttıran bir reaksiyon partneri olarak tanımlanır. Bütün prosesler sonunda değişmeden kalır. Bu tanım, tek bir enzim molekülünün faaliyeti esnasında binlerce substrat molekülünü değiştirmeye muktedir olduğunu vurgulamaktadır. Faaliyet süresi koşullara bağlıdır [38].

Enzimler sıradan kimyasal katalizörlerden (i) yüksek reaksiyon hızları, (ii) ılımlı reaksiyon koşulları (100°C'nin altında ısı, atmosferik basınç, 4-8 pH ve kuvvetli kimyasal maddelere ve solventlere ihtiyaç olmaması) ve (iii) yüksek reaksiyon özgülüğü gibi önemli farklılıklar gösterir [38].

Enzim ve substratının faaliyeti anahtar-kilit modeli ile açıklanır. Sadece bir substrat (anahtar) enzimin aktif merkezi olan katalitik merkeze (kilit) yaklaşabilir. Şüphesiz reaksiyonlar ayrıntılarda çok daha karmaşıktır ve sadece çok ayrıntılı modeller ile açıklanabilir [38].

### 2.2.1. Peroksidazlar

Peroksidazlar bir çok mikroorganizma ve bitki tarafından üretilen oksiredüktazlardır. Bunlar bir çok reaksiyonu katalizlerler, fakat aktive olmak için hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) gibi peroksitlerin ortamda bulunması gerekmektedir. Hidrojen peroksit önce enzimi oksitler, böylece enzim substratı oksitleyecek hale dönüşmüş olur. Çeşitli aromatik kirleticilerin laboratuvar ölçekli arıtılmasında kullanılan peroksidazlar horseradish peroksidaz, lignin peroksidaz ve farklı kaynaklardan elde edilen pek çok diğer peroksidazları içerir [6]. Peroksidazlar hemoproteinlerdir [39].

#### 2.2.1.1. Horseradish peroksidaz

Horseradish peroksidaz (HRP; EC 1.11.1.7) şüphesiz ki enzimatik atık gideriminin kısmen yeni olan bu alanında en çok çalışılan enzimlerden biridir. HRP, hidrojen peroksit ile aktive edildiğinde, fenoller, bifenoller, anilinleri, benzidinleri ve benzeri heteroaromatik bileşikler kapsayan çok çeşitli toksik aromatik bileşimin oksidasyonunu katalizler. Reaksiyon ürünleri, enzimatik olmayan bir reaksiyon ile suda çözünmeyen çöktürelere dönüşebilen polimerlerdir ve bunlar su veya atık sudan sedimentasyon veya filtrasyon ile kolaylıkla uzaklaştırılabilir. Aktivitesi geniş bir pH ve sıcaklık aralığında iyi olduğundan HRP özellikle atık su arıtılmasında uygundur. HRP faaliyetinin mekanizması görece olarak iyi anlaşılmış ve matematiksel olarak modellenmiştir [6].

Uygulamaların çoğu fenolik kirleticilerin üzerine odaklanmıştır. Benzidinler ve naftilaminler gibi hidrosikinolin ve arilamin kanserojenlerini kapsayan kirleticilerin arıtılması için HRP kullanımı aynı zamanda laboratuvar

gösterilmiştir. İlave olarak, HRP belirli bazı giderilmesi zor olan kirleticileri birlikte çöktürme özelliğine sahiptir. Bu fenomen genellikle bir çok farklı kirletici içeren atık sular için önemli bir pratik vurgulamaya sahiptir. Bu ilkenin tehlikeli atıklara olan uzantısı olarak çözümlerden fenollerle beraber poliklorlanmış bifenillerin uzaklaştırılmasında da gösterilmiştir [6].

Çeşitli solüsyonlardan HRP-katalizörlüğünde fenollerin uzaklaştırılmasını optimize etmeyi amaçlayan dikkate değer çalışmalar vardır. Enzimin yararlı ömründeki gelişmeler, ve böylece arıtma maliyetinin azalması sonucu: uygun bir reaktör konfigürasyonu seçimi, enzim immobilizasyonu, çökelen polimerlerde enzimi tuzaga düşmekten korumak için sodyum borat, jelatin ve polietilen glikol gibi katkı maddelerinin kullanımı, ve enzimin oksidasyon ürünleri ile inhibe edilmesini önleyen talk gibi absorbantların ilavesi gündeme gelmiştir [6].

#### 2.2.1.2. Lignin peroksidaz

Lignin peroksidaz (LiP) aynı zamanda ligninaz veya diarilpropan oksijenaz olarak bilinir ve ilk olarak 1983'de rapor edilmiştir. Beyaz çürükçül fungus *Phanerochaete chrysosporium*'un hücre dışı enzim sisteminin bir parçasıdır. LiP'in bir çok doğal parçalanmaya dirençli aromatik bileşiği mineralize ettiği ve pek çok polisiklik aromatik ve fenolik bileşiği okside ettiği gösterilmiştir. LiP'in ligninin depolimerizasyonundaki rolü de teyit edilmiştir. Mekanizması HRP'ninki ile oldukça benzerdir [6].

LiP düşük pH'larda hızlı bir şekilde aktivitesini kaybetmektedir. pH'nun artmasıyla, enzim konsantrasyonunun yükselmesiyle veya enzimin substratı olan veratril alkol ile inkübe etmekle enzimin stabilitesi artar. Fenolik bileşiklerin uzaklaştırılması için optimum koşullar yüksek enzim konsantrasyonu, 4'ün üzerinde bir pH ve kontrollü hidrojen peroksit ilavesidir. Bazı araştırmacılar çevreye dirençli aromatiklerin yıkımı için, gözenekli seramik üzerinde tutuklanan LiP'in stabilitesinin ters yönde etkilenmediğini ve iyi bir potansiyele sahip olduğunu göstermişlerdir.

Venkatadri ve Irvine [40] tehlikeli atıkların arıtılması ve LiP üretimi için bir silikon membran reaktörün kullanılmasını geliştirmişlerdir [6].

Lignin peroksidaz bileşiği azo boyaları okside eder ve sonra veratril alkol oksidasyonu ile tekrar orijinal lignin peroksidaz haline döner [5]. Peroksidaz enzimleri azo boya biyoparçalanma prosesinin ilk kademesi ile ilgilidir [41].

Düşük besin seviyesinde sekonder metabolik faz olarak ifade edilen *Phanerochaete chrysosporium*'un lignin parçalama sistemi lignin peroksidaz (LiP) ve mangan peroksidaz (MnP) olmak üzere iki hücre dışı peroksidaz üretir. Bu peroksidazlar lignin, klorofenoller, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, nitrotoluenler ve dibenzodioxinlerin yıkılması ile son derece ilgilidir. Hem LiP ve hem de MnP lignini depolimerize edebilir, klorofenollerin klorunu ayırabilir, nitrotoluen yıkımında meydana gelen ara ürünler olan nitrofenol veya nitroanilinden nitro gruplarını ayırabilir ve hidroksi- ve amino- benzen sülfonik asitten sülfonatu ayırabilir. Diğer peroksidazlara karşı LiP, polisiklik aromatik hidrokarbonları ve *p*-dibenzodioxin gibi fenolik olmayan kirleticileri de okside edebilir [35].

LiP ve MnP azo boya yıkımında kullanılır. Çünkü peroksidazlar azo boyaların, rengini giderir ve kültür ortamında peroksidazların üretimi ile boya yıkımında tüm kültürler ile uyumludur [31].

Ligninsel peroksidazlar diğer peroksidazlar gibi tipik bir enzimatik döngü karakteristiğine sahiptir. Doğal (demirsel) enzim ilk olarak hidrojen peroksit tarafından oksitlenerek enzimin bir, iki-elektronlu oksidasyon durumu yaratılır (bileşik I). Hidrojen peroksit tarafından demirsel enzimin oksidasyonu sırasında bir elektron  $Fe^{3+}$  den ve bir elektron da porphyrin halkadan çekilir ve sırasıyla,  $Fe^{4+}$  ve porphyrin katyon radikali meydana gelir. Bileşik I, eğer ortamda uygun bir indirgeme substratı varsa,  $Fe^{4+}$  vasıtasıyla iki adımda tekrar indirgenir. İlk iki reaksiyon (hidrojen peroksit ile demirsel enzim ve indirgeme substratı ile bileşik I) hızlıdır ve bileşik II reaksiyonu tipik bir şekilde 10 kat daha yavaştır. Bundan dolayı  $k_3$  kuvvetli bir şekilde enzim döngü değerini ( $k_{cat}$ ) etkiler. LiP ve MnP bileşik II'sinin reaksiyonu

substrat konsantrasyonuna bağlı olarak tipik bir şekilde hiperbolik bir eğri gösterir. Diğer reaksiyon ortamda aşırı hidrojen peroksit ve/veya etkili olmayan bir indirgeme substratı bulunduğunda meydana gelir. Bileşik II hidrojen peroksit ile peroksidazın daha az aktif bir şekli olan Bileşik III oluşturmak üzere reaksiyona girer [42].

LiP u ürün olarak benzilik alkoller aldehitler üretmek üzere fenolik olmayan lignin modeli dimerlerin propil yan zincirlerin  $C_\alpha$  ve  $C_\beta$  arasından kırar. Bunlar polimetoksillenmiş benzil alkollerini benzaldehite, alkoksibenzenleri benzokinon ve alkanollere oksitler [21].

İyonizasyon potansiyeli 7,35 eV'dan büyük olan benzantrasen, piren ve antrasen gibi PAH'lar LiP substratıdır, fakat penantren ve benzopren gibi iyonizasyon potansiyeli 7,3 eV'dan kk olan PAH'lar LiP substratı değildir [21].

MnP, Mn-bağımlı lipid peroksidasyonunu destekler ve in vitro olarak yavaş bir reaksiyonla penantreni difenik aside oksitler. Bu reaksiyon  $Mn^{2+}$ , oksijen ve doğunlaşmamış yağ asidi gerektirir [21].

LiP, veratril alkol gibi fenolik olmayan aromatik bileşiklerin oksidasyonunu da katalizler [43].

LiP tarafından kullanılan indirgeme substratları MnP'ninkilerden oldukça farklıdır. Bir bileşiğin bir enzimin substratı olup olmadığı iki faktöre bağımlı gibi gözükmektedir: Molekln büyüklüğü ve redoks potansiyeli. LiP'in oksitleyebildiği bileşikler büyüklük bakımından oldukça sınırlıdır. Lignin gibi büyük moleküllerde enzim kinetik parametrelerini belirlemek çok zordur. LiP diğer peroksidazlardan daha yüksek redoks potansiyeline sahiptir. Bu onu daha iyi bir PAH oksidantı yapar. Fakat bütün PAH'lar LiP ile yıkılamaz. Redoks potansiyeli 7,7 eV ve daha yüksek olan PAH'lar LiP tarafından oksitlenemez [61]. Dahası bileşik I'in oksitleme yeteneği bileşik II'den farklıdır. Bileşik I, bileşik II'nin ykseltediği substratların redoks potansiyelinden daha yüksek redoks potansiyeli olan substratları oksitler. İkinci bir substrat ilavesi, ilk substratın oksidasyonunu kolaylaştırır. Daha dirençli

substrat bileşik II için bir indirgen olarak hizmet eder. İyi bir ikincil substrat veratril alkoldür [42].

Beyaz çürükçül fungus, sekonder metabolit olarak veratril alkol (3,4-dimetoksibenzil alkol) üretir. Veratril alkol bileşik II kadar bileşik I için de asla ideal bir indirgeme substratı değildir. Veratril alkol ilavesi lignin, aromatik boyalar, anisil alkol (4-metoksibenzil alkol), guaikol, pentaklorfenol ve benzopren gibi bir çok değişik substratın oksidasyonunu teşvik eder [7, 44]. Bazı araştırmacılar veratril alkolün ligninsel sistemde bir mediatör olarak hizmet ettiğini belirtmişlerdir. Veratril alkolün katyon radikali uzak hedeflerin aktif tarafının oksitleme gücünü düzenler [42].

Çeşitli bileşiklerin oksidasyonunda veratril alkolün mediatörlüğü enzim kinetik çalışmaları tarafından da teyit edilmiştir. Ortamda veratril alkol bulunduğu 4-metoksimandelik asidin LiP tarafından gayet verimli bir şekilde okside edildiği gösterilmiştir. Veratril alkolün miktarının artması 4-metoksimandelik asidin başlangıç oksidasyon hızının artması ile sonuçlanır. Reaksiyon karışımından 4-metoksimandelik asidin kaybolması ile veratril alkolün veratraldehite oksidasyonu inhibe olur. Aynı fenomen 4-metoksimandelik asid yerine guaikol, kloropromazin, veya pentaklorfenol geldiğinde de gözlenmiştir [44]. Bu kinetik datalara göre veratril alkol bir mediatör olarak davranmaktadır. LiP aynı zamanda veratril alkolden daha yüksek redoks potansiyele sahip olan anisil alkolü de oksitler. Sisteme veratril alkol ilave edildiği zaman, anisaldehit oluşumu hızlanır. Bu durumda veratril alkolün teşvik etkisinin mediatörlük olmadığı gösterilmiştir. Kinetik deneyler anisil alkolün bileşik I'in nisbeten iyi bir substratı olduğunu fakat bileşik II ile okside edilemediğini göstermiştir. Az miktarda veratril alkol ilave edildiğinde anisaldehit oluşumu teşvik edilir, fakat daha fazla miktarlarda veratril ilavesi daha az anisaldehit oluşumu ile sonuçlanır. Eğer veratril alkol gerçek bir mediatör olarak rol oynasaydı, veratril alkolün artan miktarları, guaikol veya pentaklorfenol durumunda olduğu gibi artan miktarlarda anisaldehit üretilecekti [42]

Fenoller, LiP bileşikleri I ve II için iyi substratlardır ve guaikol ve pentaklorfenolde olduğu gibi veratril alkol ilavesi fenolik bileşiklerin oksidasyonunu arttırabilir. Veratril alkol LiP'in aktivitesinin kaybolmasını önlemektedir [42].

Ligninaz yine bu enzim tarafından üretilen hücre dışı hidrojen peroksit gerektirir [45].

Lignin peroksidazın izole edilen 15 izo enzim formu vardır. LiP glikoproteinlerdir ve molekül ağırlığı yaklaşık olarak 40.000'dir [46]. Bir çok izo enzim ortaklaşa olarak sık sık lignin peroksidaz olarak bilinir [47].

#### 2.2.1.3. Diğer peroksidazlar

*Caldario fumago*'dan elde edilen kloroperoksidaz (CPO; EC 1.11.1.10)'ın bir çok fenolik bileşiği okside ettiği bildirilmiştir. İlave olarak etanolün aset aldehite oksidasyonu veya klorür iyonlarının oksidasyonu gibi bazı oksijen transfer reaksiyonlarını katalizlediği de gösterilmiştir. Kloroperoksidaz içeren reaksiyon karışımına klorür iyonları ilave edildiği zaman, bu son reaksiyon daha toksik olabilen bir çok farklı ürün oluşmasına yol açabilir [6].

*Phanerochaete chrysosporium* tarafından üretilen mangan peroksidaz (MnP)'ın bir çok mono aromatik fenolü ve aromatik boyaları katalizlediği gözlenmiştir, fakat bu reaksiyonlar, ortamda hem 2 değerlikli mangan ve hem de farklı tipte tamponlar bulunduğu anda gerçekleşebilmektedir. MnP, ortamda Mn (III) stabilizleme elemanları olduğunda Mn (II)'nin Mn (III)'e oksidasyonunu katalizler. Daha sonra oluşan Mn (III) kompleksleri organik substratların oksidasyonunu sağlar. Şüphesiz ki yüksek konsantrasyonda Mn (III) gereksinimi atık su arıtım işlemleri için bir kullanılabilirlik sağlar [48]. MnP,  $Mn^{2+}$ 'yi  $Mn^{3+}$ 'e okside eder. *Phanerochaete chrysosporium*'un MnP'ı ile katalitik döngünün tamamlanması için  $Mn^{2+}$ 'ye ihtiyaç vardır [43].

MnP, indirgediği substratını Mn (II) kompleksi haline getirdiği için peroksidazlar arasında eşsizdir. MnP'nin bileşik I'i aynı zamanda çeşitli fenollerini oksitleme yeteneğine sahiptir (örneğin guaikol, 2,6-dimetoksifenol), fakat bunu Mn (II)'den çok daha düşük verimle yapar. Bileşik II'nin redüksiyonu Mn (II)'ye bir substrat olarak gereksinim duyar. Bir enzim döngüsü sırasında, iki Mn (II), Mn (III)'e oksitlenir. Mn (III) beyaz çürükçül fungus tarafından üretilen bir metabolit olan oksalat gibi organik asitlerle komplekslenir. Mn (III) oksalat kompleksi oldukça kararlıdır ve redoks potansiyeli kendisinden daha düşük olan çeşitli fenolik bileşiklerini oksitleyebilir [42].

MnP daha fazla substrat türüne sahiptir. Enzim, Mn (III) oksalatın sahip olduğu redoks potansiyeli sayesinde fenolik olmayan bileşiklerini ve PAH'ları oksitler [42].

*Nematolama frowardii*'nin MnP'ı, reaksiyon karışımına glutation (GSH) ilave edildiği zaman, antrasen, piren benzopren, benzoantrasen ve penantreni oksitler. HRP tarafından GSH'den thiyl radikali oluşumu veratril alkolün oksidasyonunu başlattığı gösterilmiştir ve veratril alkol HRP tarafından yalnız başına oksitlenemez. Thiyl radikali oluşumu aynı zamanda MnP- Mn (II) - GSH sistemi tarafından PAH'ın oksidasyonu için önerilmiştir. Diğer thio bileşiklerinin de aromatik substratların MnP-bağımlı oksidasyonunda böyle bir role sahip olabilmesi mümkündür [42].

*Coprinus macrohizus*'dan elde edilen bir mikrobiyal peroksidazın kullanımı, atık sudan aromatik bileşiklerini uzaklaştırılması için HRP'ye bir alternatif olarak son zamanlarda incelenmiştir. Belirgin bir şekilde kolayca aktivitesini kaybetmesine karşın HRP'nin katalizlediği reaksiyonları aynı performans ile yerine getirdiği saptanmıştır [6].

MnP bir çok monoaromatik fenollerini ve aromatik boyaların oksidasyonunu katalizler. MnP iki değerlikli mangan ve çeşitli tipte tamponlara bağımlıdır.



Serbest haldeki MnP fenoller ve boyalar üzerinde faaliyette bulunur. MnP *Lentinula edodes* ticari kültürlerinden izole edilir [39].

*Pleurotus ostreatus* bir hidrojen peroksit oluşturma sistemi gibi, diğer bir tip hücre dışı peroksidaz (PoP) ve glukoz oksidaz üretir. PoP reaktif ara ürünler vererek tek elektron reaksiyonu ile çeşitli lignin benzeri bileşiklerin oksidasyonunu hidrojen peroksit bağımlı olarak katalizler. Saflaştırılmış PoP'un kinetik ve biyofizik özellikleri belirlenmiştir. PoP'un substrat özellikleri, fenolik olmayan bileşikleri oksitleyemeyen MnP substrat özelliklerine benzer, fakat katalitik aktivite için manganze bağımlılık yoktur [49].

Yarı-katı kültür ortamına veratril alkol ve mangan IV oksit ilavesi MnP aktivitesini oldukça arttırmaktadır [50].

#### 2.2.2. Polifenol Oksidazlarlar

Polifenol oksidazlar fenolik bileşiklerin oksidasyon reaksiyonlarını katalizleyen oksiredüktazların diğer bir ailesidir. Bunlar iki alt sınıfa ayrılır: trosinazlar ve lakkazlar. Her iki enzim grubu da aktivite için bimoleküler oksijen gerektirir, fakat koenzimlere gerek yoktur [6].

##### 2.2.2.1. Tirozinaz

Tirozinaz (EC 1.14.18.1) polifenol oksidaz, fenolaz ya da katekolaz olarak da bilinir ve arka arkaya iki reaksiyonu katalizler: (1) o-difenolleri oluşturmak üzere moleküler oksijen ile monofenollerin hidroksilasyonu ve (2) o-kinonları oluşturmak üzere oksijen ile o-difenollerin dehidrojenasyonu. Kinonlar çoğunlukla karasızdır ve enzimatik olmayan bir polimerizasyon işlemiyle basit bir filtrasyon ile kolaylıkla uzaklaştırılabilen, suda çözünmeyen bileşikler oluştururlar [6].

Tirosinaz monofenollerin hidroksilasyonunu katalizler [39]. Bazı araştırmacılar, atık sularda 0,01-1,0 g/L konsantrasyonlardaki fenollerin başarılı bir şekilde uzaklaştırıldığını rapor etmişlerdir [6].

#### 2.2.2.2. Lakkaz

Lakkaz (benzendiol: oksijen oksidoredüktaz) (EC 1.10.3.2) bir çok fungi tarafından üretilir ve bir polimerizasyon prosesi ile fenolik bileşiklerin toksisitesini azaltma yeteneğine sahiptir. Lakkaz fenolik bileşikleri, oldukça reaktif olan ve bu fenolik bileşiklerin karşılığına gelen anyonik serbest radikallere okside edebilir [6].

Bollag ve arkadaşları [51] çalışmalarında *Rhizoctonia praticola* fungusundan elde edilen lakkazın test edilen bazı fenolik bileşiklerin toksisitesini giderme yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir [6]. Bir fenolün toksisitesinin giderilmesi, bileşiği transforme etmek için kullanılan enzimin yeteneğine bağımlıdır ve başlangıçtaki fenolün kaybolması ile gösterilir. Reaksiyon ürünleri tanımlanmamıştır [6].

Lakkazın fenolik substratları toksik olmayan fenolik kirleticilere transformasyonu yeteneği araştırılmıştır [6]. Lakkaz anilin ve fenol gibi aromatik kirleticileri oksijen varlığında okside eder. Bu reaksiyonda fenoksi radikalleri meydana getirmek üzere substratlar bir elektron ile okside edilir. Bu fenoksi radikali, azo bağındaki fenolik halkada bir karbon iyonu oluşturmak için enzim tarafından bir kez daha okside edilir. Suyun nükleofilik atağı ile 4-sülfonil diazin ve benzokinon oluşur. 4-sülfonildiazin oksijen varlığında kararsızdır ve fenildiazin radikaline oksitlenir Daha sonra moleküler azot kaybederek sülfonil radikali üretir. Sülfonil radikali de ortamdan oksijen alarak SPH'e dönüşür. Substrattan alınan elektronlar oksijene transfer edilir ve suya indirgenir. SPH sadece sülfone azo boyaların peroksidaz ile oksidasyonundan oluştuğu bilinen olağan dışı bir peroksit olarak bilinir. Organik peroksitler metal iyonları varlığında kararsız olmalarına karşın SPH karalıdır [24].

*Rhizoctonia praticola* lakkaz katalizörlü reaksiyonlarda fenoksi radikallerinin dimerizasyonu ve polimerizasyonu gözlemlenmiştir. *P. oryzae* lakkazının fenolik azo boyları polimerize etmediği görülmüştür [24]

Lakkaz oksidasyonu azo boyların toksikliğini giderir. Çünkü bu reaksiyon azo bağı kırılarak moleküler azot açığa çıkarır. Bu olay aromatik amin oluşumunu inhibe eder. Lakkaz ve peroksidazın azo boya oksidasyonu mekanizmaları birbirine benzemektedir [24].

Lakkazın klasik aksiyonu, bir elektron adımı ile oksijene bir elektron transfer ederek substratın oksidasyona uğratılmasıdır. Sonuçta fenollerin polimerizasyonu ve/veya kinon oluşumu sağlanır. Bu oksidasyon sisteminin dikkate değer bir faaliyeti aromatik metil grupların benzaldehitlere oksidasyonudur. Ayrıca üç halkalı polisiklik aromatik hidrokarbonlardan (PAH) antrasenin in vitro olarak *trametes versicolor* lakkazı ile oksidasyonu bildirilmiştir [52].

Hücre dışı fungus enzimleri arasında lakkaz, bileşikleri çok düşük bir redoks potansiyeli ile okside etmeye muktedir tek enzimdir. Bu durum, metoksibenzenin *P.chrysosporium* LiP'ı ve *T. Versicolor* HRP ve lakkazı ile olan reaksiyonlarında gösterilmiştir. Bundan dolayı lakkaz ile bir çok reaktif fonksiyonel grup içermeyen PAH'ın oksidasyonu şartıcıdır. Bu bileşiklerin halka sayısı ve reaktivitesi arasında göze çarpan bir ilişki yoktur. Bu durum bu reaksiyonlarda lakkazın belirli bir substrat spesifikliğini olmadığını göstermektedir [53].

Çizelge 2.1 yukarıda bahsedilen enzimlerin atık arıtmadaki potansiyel uygulamalarını özetlemektedir. PAH'ların LiP ile in vitro olarak oksidasyonu ve bu bileşiklerin iyonizasyon potansiyeli (IP) arasında bir ilişki önerilmektedir [54]; fakat elektrokimyasal oksidasyon potansiyeli ( $E_{1/2-ox}$ ) enzimatik oksidasyon reaksiyonlarını IP'nden doğrudan doğruya daha iyi karakterize eder. Lakkaz ile oksidasyon sistemlerinde bu konuda genel bir ilişki henüz bulunamamıştır [52].

Fungal lakkazların ve oksitlenebilir düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin, (mediatör de denilmektedir) normal olarak o enzimin substratı olmayan bileşiklerle birlikte imkübasyonu durumunda, bileşiğin oksidasyonunun sağlandığı tesbit edilmiştir. Bu sistem büyük bir ilgi çekmekte, şimdilik sadece kraft pulp ağartmasında kullanılmakta fakat gelecekte biyoteknolojik uygulamalar için ümit verici görünmektedir. Bu lakkaz-mediatör sistemleri (LMS) bir çok bileşiğin oksidasyonunda ve sentezinde uygulanabilir görünmektedir. LMS, PAH gibi çevresel kimyasalların yıkımında da ilgi çekmektedir. Uygun mediatör maddesinin seçimi sistemin genel uygulanabilirliği ve verimliliği üzerinde anahtar bir rol oynar. Genel olarak 100'den fazla olası mediatör bileşik tarif edilmiştir, fakat hala en yaygın olarak kullanılan 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asid) (ABTS) ve 1-hidroksibenzotriazol (HBT)'dir. HBT ve ABTS lakkaz tarafından (HBT<sup>•</sup>) radikaline ve (ABTS<sup>•+</sup>) katyon radikaline ve dikatyon (ABTS<sup>2+</sup>)'ye oksitlenir. Bu oksitlenmiş bileşiklerin rolü aromatik alkoller için uygun oksidantlar olarak önerilmiştir. Bütün bilinen etkili mediatörlerin en büyük dezavantajı ya yüksek fiyatlı ya da toksik oluşudur [55].

Lakkazların bir çok fenolik bileşiğin ve aromatik aminin oksidasyonunu katalizlediği, fakat lakkaz aktivitesinin genel olarak aromatik aminlerden çok, fenolik bileşiklerin oksidasyonu ile ilgili olduğu bilinmektedir. Lakkazların redoks potansiyeli 0,5-0,8 eV olmasına rağmen fenolik olmayan bileşiklerin oksidasyonunda iddialı değildir [56].

Fungal lakkazların kinetik özellikleri hakkında çok az şey bilinmektedir.Çoğu çalışmalar üç lakkaz ve diğer bakır içeren oksidazlar ile yapılmıştır [56].

Beyaz çürükçül fungus *Trametes trogii* molekül ağırlığı 70 kDa ve asidik izoelektrik noktası olan bir lakkaz salgılar. Saflaştırılan enzim bir çok fenolik ve fenolik olmayan bileşiği, sentetik aminleri ve tiollerini in vitro olarak oksitler [56].

Hücre dışı lakkaz üretimi beyaz çürükçül basidiomycetelerin genel bir özelliğidir [57]. Lakkaz tek başına ligninin fenolik olmayan kısımlarının yıkımında sınırlı bir etkiye sahiptir [58].

Lakkazlar bakırlı proteinlerdir. Genel olarak lakkazlar dört komşu bakır atomu olan bir yapı sergiler. Bakır atomlarının dağılımına göre üç tip lakkaz vardır. Son 20 yılda bir çok lakkaz izole edilmiş, özellikleri belirlenmiş ve hatta klonlanmıştır [59].

Lakkaz, Ascomycete'ler *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa* ve *Podospora anserina* tarafından da üretilir [60]. Lakkaz bir çok substratı oksitler: fenolik boyalar, fenoller, klorofenoller, lignin benzeri difenilmetanlar, benzoprenler ve organofosfatlar [39].

Çizelge 2.3: Enzimler ve potansiyel uygulamaları [6].

Enzimler	Kaynakları	Uygulamaları
Kloro-peroksidaz	<i>Caldariomyces fumago</i>	Fenolik bileşiklerin oksidasyonu
Siyanidaz	<i>Alcaligenes denitrificans</i>	Siyanür dekompozisyonu
Siyanür hidrotaz	<i>Gloeocercospora sorghi</i>	Siyanür hidrolizi
	<i>Stemphylium loti</i>	
Lakkaz	<i>Rhizoctonia praticola</i>	Fenollerin giderilmesi
	<i>Fomus annosus</i>	
	<i>Trametes versicolor</i>	
Lignin peroksidaz	<i>P. chrysosporium</i>	Fenollerin giderilmesi
Mn-peroksidaz	<i>P. chrysosporium</i>	Aromatik boyaların giderimi
Peroksidaz	<i>Coprinos macrohizus</i>	Aromatik aminlerin giderimi
Tirosinaz	Marul	Fenollerin giderilmesi

### 2.3. ENZİM KİNETİĞİ

Kimyasal kinetik, kimyasal reaksiyon hızlarını ve bu hızlara, proses değişkenlerinin etkilerini inceler. Proses değişkenleri ısı, basınç ve reaksiyona giren bileşiklerin derişimleridir [61].

Enzimlerle katalizlenen reaksiyonların hızlarını etkileyen etkenlerin incelenmesi enzim kinetiğinin konusudur ve en önemli etkenler enzim ve substrat konsantrasyonu, pH ve sıcaklıktır. Pratik amaçlar nedeniyle genellikle aktivite terimi yerine konsantrasyon kullanılır [62].

Enzimlerle boyaların renginin giderilmesinde başlangıç renk giderme hızları, boyaların fenolik halkalarındaki gruplara bağlıdır [63]. Spektral değişimlerdeki farklılıklar temelinde farklı kimyasal yapılardaki boyalar gayet benzer kinetik eğriler gösterir [64]. Katalizleme reaksiyonu substrattan bir elektron çekilmesi olayından ibaret olduğu için oksitlenen grubun elektron yoğunluğu seviyesi substratın oksidasyon hızını belirlemede anahtar bir rol oynar [56].

Moleküller yalnızca birbirlerine değdikleri durumlarda reaksiyona girebilirler. Bundan dolayı tepkimeye giren maddelerin derişimleri veya sıcaklığın artması gibi çarpışma hızını arttıran herhangi bir faktör reaksiyon hızını arttıracaktır. Ancak tüm çarpışan moleküller tepkimeye girmez. Bu sterik nedenlerle tüm çarpışmalar, moleküllerin belli gruplarının özellikle karmaşık tepkenler durumunda birbirine temas etmemesi ile açıklanabilir. Daha ileri ve önemli bir neden, çarpışan tüm moleküllerin tepkimeye girecek yeterlilikte enerji içermemeleridir. [65]

Bir tepkimenin yürütmesi için, çarpışan moleküller aktivasyon enerjisi olarak bilinen bir potansiyel engeli aşacak düzeyde enerji içermelidir [65]. Enzim aktivitesini ve stabilitesini etkileyen temel fiziksel faktörler pH ve ısıdır [66].

Bir katalizör, bir kimyasal tepkimeyi onun boyutunu değştirmeden hızlandırır ve tepkimenin son ürününden değışmemiş olarak uzaklaştırılabilir.

Katalizör hiçbir termodinamik etkiye sahip değildir. Çoğu durumlarda bir katalizör, aktivasyon enerjisini düşürecek şekilde rol alır [65].

Kinetik, tepkime hızlarını ve bunları etkileyen faktörlerin incelenmesidir. Bütün kinetik çalışmalar, kütlelerin etkisi yasası üzerine kurulmuştur. Pratik amaçlar için aktivite terimi yerine derişim terimi kullanılır [65].

Birinci dereceden bir tepkime, bu tepkenin derişimleriyle orantılı bir hızla yürüten bir tepkimedir. İkinci dereceden bir tepkime, iki tepkenin derişimi ile veya tek bir tepkenin derişiminin ikinci kuvvetiyle orantılı bir hızla yürüten bir tepkimedir. Sıfırncı dereceden bir tepkimede ise tepkimenin hızı reaksiyona giren maddelerin derişimlerinden bağımsızdır [65].

### 2.3.1. Enzimatik Reaksiyonların Hızı Üzerine pH'nın Etkisi

Enzimatik kataliz üzerinde pH'nın etkisini tam olarak açıklamak mümkün değildir. Enzimin aktif bölgesi, buraya substrat bağlanmasını ve reaksiyonun katalizlenmesini mümkün kılacak bir iyonik biçimde ya da iyonik gruplardan oluşacak bir düzenleme verecek bir şekilde oluşmuştur. pH'daki değişmeler bu iyonlaşabilen gruplarda ve dolayısıyla konformasyonel yapıda değişikliğe neden olarak katalizin hızını etkileyebilir. Bunun dışında substrat molekülü de iyonlaşabilen gruplar içerebilir, ya da substratın sadece bir iyonlaşabilen şekli enzime bağlanarak katalize uğrayabilir. Bu da reaksiyonun hızını etkiler. Katalitik mekanizmada işlevsel olan grupların iyonizasyonundaki değişiklikler mekanizmayı tamamen bozarak geri dönüşümsüz (irreversibl) inaktivasyonlara da neden olabilir [62].

Enzimler protein yapısında olduklarından pH amino asitlerin iyonizasyon durumunu etkilemekte ve bütün aktiviteyi kontrol etmektedir [66].

pH,  $v_{maks}$  üzerinde gerçek iki yönlü bir etki yapar. pH'daki bir değişim enzimin stabilitesini de etkileyebilir. Onun protein yapısını geri dönüşümsüz olarak denatüre eder ve böylece enzim aktivitesini kalıcı olarak kaybeder [66].

### 2.3.2. Enzimatik Reaksiyonların Hızı Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Kimyasal reaksiyonların çoğunun hızı sıcaklığın artması ile artar. Sıcaklıktaki artış reaktant moleküllere daha fazla kinetik enerji sağlar, bu da birim zamanda daha fazla sayıda üretken çarpışmayla sonuçlanır. Enzim katalizli reaksiyonlar da benzer tarzda davranırlar [62].

Enzimler kompleks protein molekülleridir ve bir enzimin tersiyer yapısının korunmasında öncelikle çok sayıda mevcut olan non-kovalent etkileşimler etkilidir. Pratik anlamda enzim molekülü çok yumuşak ve kırılabilir bir moleküldür. Eğer molekül çok enerji absorblarsa tersiyer yapı bozulur ve enzim molekülü denaturasyona uğrar, yani katalitik aktivitesini yitirir. Dolayısıyla sıcaklık artışıyla enzim ve substrat moleküllerinin çarpışmasının artması sonucu reaksiyon hızındaki artış denatürasyon hızındaki artma nedeniyle istenen düzeyde olmayacaktır [62].

Bir enzimin gerçek optimum sıcaklığı, enzimin farklı sıcaklıklarda arzulan deneme süresi kadar birkaç kez ön inkübasyondan sonra denatürasyona neden olmayacak kadar düşük bir sıcaklıkta aktivitesinin ölçülmesiyle tayin edilir [62].

### 2.3.3. Enzimatik Reaksiyonların Hızı Üzerine Substrat Derişiminin Etkisi

Sabit bir enzim konsantrasyonu için, reaksiyon ilerledikçe mevcut olan substrat, reaksiyon hızında yardımcı bir sınırlayıcı faktör olmaktadır. Böylece reaksiyonun ilk hızı üzerine substrat konsantrasyonunun etkisine bakmak önem kazanmaktadır. Başlangıç periyodundaki ilk hız ölçümü, ilk hız başlangıç substrat konsantrasyonunun bir fonksiyonu olduğundan bir eğri elde edilmesini sağlayacaktır. Bu eğrinin şekli çok önemlidir ve önemli bilgiler verir. Substrat konsantrasyonunun Menten sabitine eşit olduğu reaksiyon hızı  $1/2v_{maks}$ 'dir [48].



Enzim, substrat ile doyurulduğu zaman, yani yüksek substrat konsantrasyonunda maksimum reaksiyon hızı sağlanır. Fazla yüksek ya da fazla düşük olmayan substrat konsantrasyonlarında  $k_{cat} = K_m$  olur.  $K_m$  değerleri hızlı bir dönüşüm için en iyi substrat konsantrasyonunu belirlemeye yardımcı olur [48].

#### 2.3.4. Enzimatik Reaksiyonların Hızı Üzerine Enzim Miktarının Etkisi

Enzimatik reaksiyon hızı daima enzim konsantrasyonu ile ilgilidir. Düşük substrat konsantrasyonlarında enzim serbest durumda bulunur [48].

Reaksiyon başlangıç hızı enzim konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve artan substrat konsantrasyonu ile da bir maksimum sınır hıza kadar non-lineer olarak artar [62].

#### 2.3.5. Michaelis-Menten Bağlantısı

Michaelis-Menten hız bağlantısı, reaksiyonun başlangıç hızının enzim konsantrasyonu ile doğru orantılı olduğunu, fakat artan substrat konsantrasyonu ile da bir maksimum sınır hıza kadar lineer olmayan bir şekilde arttığını gösterir.

$$v = v_{maks} [S] / K_m + [S] \quad (1)$$

Bu denklemde [S]: substrat konsantrasyonu, v: başlangıç hızı (substratın % 5'inden daha fazla tüketilmediği hal için söz konusudur),  $v_{maks}$ : maksimum hız ve  $K_m$ : Michaelis (enzim kinetiği) sabitidir [62].

$$[S] = K_m \quad (2)$$

olduğunda

$$v = \frac{1}{2} v_{maks} \quad (3)$$

olur (62).

### 2.3.6. İlk Hız (v)

Reaksiyon hızı başlangıç anında sabit olabilir. Reaksiyon devam ettiği sürece reaktantların konsantrasyonlarının azalmasıyla azalır ve reaksiyon sonunda sıfıra iner [62]. Bu noktada ya bütün tepkenler ürüne çevrilir veya daha genel olarak ileri tepkimenin hızı geri tepkimenin hızına eşit olur. Bu durumda kimyasal dengeye ulaşılır. Reaksiyonun başında ürün mevcut olmayacağından geri tepkime yer almayacaktır. İlk hız reaksiyona giren maddelerin ilk derişimlerine bağlıdır [65]. Başlangıç hızı (v), t = 0 anındaki reaksiyon hızı olup, substrat konsantrasyonunun zamana göre değişimi grafiğinde çizilen eğride t = 0 noktasındaki teğetin eğimi ile belirlenir. Buna göre

$$v = dC / dt \quad (4)$$

İlk hızın önemi, reaksiyon için kinetik parametre olmasından ileri gelir. Başlangıç anında herhangi bir reaktantın konsantrasyonu ortama eklendiği miktar olarak bilinir. Bu anda henüz ürünler oluşmadığından tersinir bir reaksiyon da söz konusu olamaz. Başlangıç hızı reaktantların başlangıç konsantrasyonlarına bağlıdır. Reaksiyon başlangıç hızı maksimum hızı aşamaz [62].

İlk hız (v) ile substrat konsantrasyonu [S] arasında hiperbolik bir ilişki vardır. Artan [S] değerlerine karşılık gelen v değerleri bu hiperbol üzerinde üç farklı bölge oluşturur. Çok düşük substrat konsantrasyonlarına karşılık gelen bölgede hız substrat konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve bu bölge birinci dereceden kinetiğin geçerli olduğu bölgedir. Hız bağıntısı şöyledir:

$$d[S] / dt = v = (v_{maks} / K_m) \cdot [S] = k[S] \quad (5)$$

Burada k birinci derece hız sabitidir ve birimi dak<sup>-1</sup>'dir. Fiziksel anlamı birim zamanda ürüne dönüşen substrat fraksiyonunu belirlemesidir. Örneğin k = 0,02 dak<sup>-1</sup> ise herhangi bir anda mevcut substratın dakikada ürüne dönüşen miktarı %2'dir [62].

Çok büyük substrat konsantrasyonlarına karşılık gelen bölgede ise hız substrat konsantrasyonundan bağımsız olduğundan sıfırıncı dereceden kinetik vardır. Bunun hız bağıntısı ise şöyledir:

$$V = V_{maks} \quad (6)$$

Ara substrat konsantrasyonlarına karşılık gelen bölgede ise kinetik ne birinci ne de sıfırıncı derecedendir [62].

Sabit toplam enzim derişiminde artan substrat derişimleri ile maksimum ilk hızın elde edilmesi bütün enzimler için karakteristiktir. İlk hızı tesbit etmek için sabit bir sıcaklık ve pH'da tepkimenin yürüyüşü devamlı olarak otomatik bir şekilde izleyen yöntemlerle yapılır. Eğer belirli bir dalga boyunda substrat ve ürün arasında ışığın soğurulmasında bir fark varsa, spektrofotometrik teknikler kullanılabilir [65].

$V = v_{maks}$  olduğunda  $K_m = [S]$  olur. Bundan dolayı  $K_m$ ,  $1/2 v_{maks}$ 'a eşit ilk hızı veren  $[S]$  değeridir.  $V_{maks}$  ortamda mevcut olan enzim toplam derişimi ile değişir; fakat  $K_m$  enzim derişiminden bağımsızdır [65].

### 2.3.7. Michaelis-Menten Sabiti ( $K_m$ )

Enzim kinetiğinde  $K_m$ 'in nümerik değerinin belirlenmesi birkaç nedenden dolayı çok önemlidir.  $K_m$  değeri bir enzim için karakteristik bir sabittir, onun nümerik değeri enzimlerin farklı mikroorganizmalardan, ya da aynı organizmanın farklı dokularından olup olmadığı veya farklı gelişim kademelerindeki aynı dokulardan olup olmadığı hakkında fikir verir. Buna göre bir enzimin başka bir enzim ile özdeş olup olmadığı ya da aynı reaksiyonu katalizleyen farklı proteinler olup olmadığı belirlenebilir [62].

Eğer bir enzimin  $K_m$  değeri bilinirse deney koşulları belirlenebilir.  $K_m$  değeri belirli bir enzimin substrat özgülüğü hakkında fikir verir. En düşük  $K_m$  değerini

veren substrat enzim için en yüksek görünür aktiviteyi gösterir. Enzim için en iyi substrat  $v_{maks} / K_m$  oranı en yüksek olan substrattır [62].

Enzimatik işlemlerde substratın fizikokimyasal özelliklerini gösteren  $K_m$  değeri, Lineweaver-Burk diyagramından da bulunabilir [26].

$K_m$  bir substrata bir enzimin ilgisinin ölçüsüdür. Düşük bir  $K_m$  değeri yüksek ilgiyi ve yüksek bir  $K_m$  değeri düşük bir ilgiyi gösterir [48]

### 2.3.8. Maksimum hız. ( $v_{maks}$ )

$v_{maks}$  gerçek bir sabit değildir ve denemelerdeki enzim konsantrasyonuna bağlı olarak değişir [14, 34]. Aslında  $v_{maks}$ 'a sonsuz substrat derişiminde ulaşılır [65].

$K_m$  ve  $v_{maks}$  değerleri grafik olarak

$$1/v = (K_m + [S]) / [S] \quad (7)$$

bağıntısından hesaplanır. Bu bağıntı doğru denklemi şeklinde düzenlenirse

$$1/v = (K_m/v_{maks}) \cdot (1/[S]) + (1/v_{maks}) \quad (8)$$

bağıntısı elde edilir. Bu bağıntıda  $1/v$ 'ye karşı  $1/[S]$  grafiği çizildiğinde, eğimi  $K_m/v_{maks}$ ,  $1/v$  eksenini üzerindeki kesim noktası  $1/v_{maks}$  olan lineer bir doğru elde edilir. Doğrunun  $1/[S]$  eksenini üzerindeki kesim noktası  $-1/K_m$ 'dir. Bu denkleme Lineweaver-Burk Denklemi, diyagrama da Lineweaver-Burk Diyagramı denir. Bu diyagramın sağlıklı bir şekilde oluşturulması için  $[S]$  değerleri  $0,33-2,0 K_m$  arasında seçilmelidir. Eğer seçilen substrat konsantrasyonları  $K_m$ 'ye kıyasla çok yüksek ise (örneğin  $3,3-20 K_m$  gibi)  $1/v$ 'ye karşı  $1/[S]$  grafiği çok yatay olacaktır. Bu durumda  $v_{maks}$  belirlenebilir fakat diyagramın eğimi sifira yakın olduğundan  $K_m$  değerini duyarlı olarak belirlemek güçleşir. Substrat konsantrasyonu  $K_m$ 'ye göre çok küçük seçilirse (örneğin  $0,033-0,2 K_m$  gibi) doğru her iki eksende de orijine çok yakın yerlerde kesim noktaları verecektir. Bu durumda  $v_{maks}$  ve  $K_m$ 'nin duyarlı olarak tayini

güçleşecektir. Zira çok düşük substrat konsantrasyonlarında reaksiyon esasen birinci mertebededir ve enzimin substratla doygunluğunu andıran bir durum söz konusu değildir. Dolayısıyla  $v_{maks}$  ve  $K_m$  değerleri sonsuza yakın görünecektir [62].

Diğer taraftan, bir enzim-substrat sisteminin, bir  $[S]_1$  konsantrasyonundaki  $v_1$  hızı ve bir  $[S]_2$  konsantrasyonundaki  $v_2$  hızı biliniyorsa

$$K_m = [S]_2 \cdot [S]_1 \cdot (v_1 - v_2) / v_2 \cdot [S]_1 - v_1 \cdot [S]_2 \quad (10)$$

elde edilir. Bu şekilde bulunan  $K_m$  değeri,  $v_2$  ya da  $v_1$  için, Michaelis-Menten bağıntısında yerine konularak  $v_{maks}$  hesaplanır [62]. Bir mikroorganizmanın enzimlerinin bir substrat için  $K_m$  ve  $k_{cat}$  sabitleri bağıl oksidasyon hızları ile ilgili iyi bir göstergedir [56].

$$v_{maks} = v (K_m + [S]) / [S]$$

Kinetik sabitlerin belirlenmesinde, Hanes-Woolf, Woolf-Augustinsson-Hofstee ve Eadie-Scathard çizimleri de kullanılabilir [62].

Reaksiyon maksimum hızı, reciprocal  $v_{maks}$  – substrat konsantrasyonu diyagramından bulunabilir [26].

Maksimal reaksiyon hızı LiP aktivitesine sıkı sıkıya bağlı ve boya konsantrasyonuna bağlı değildir [64].

### 2.3.9. Katalitik Hız Sabiti ( $k_{cat}$ )

Katalitik hız sabitine, “turn-over” sayısı ya da moleküler aktivite de denir. Tanımlanması ise birim miktardaki enzim başına birim zamanda oluşan ürün miktarı şeklinde yapılır [62, 48]. Diğer bir deyişle  $k_{cat}$  her birim zamanda katalistin yeniden kullanım sayısını ifade eder ve bu enzim döngü sayısı olarak da bilinir. Yüksek döngü sayısı yüksek enzim aktivitesi demektir. Bu  $K_m$ 'in ve substrat

konsantrasyonunun değişik bir halidir.  $k_{cat}$  değerleri saniyede binlerle ifade edilcek kadar yüksek olabilir [48].

Enzimatik renk gideriminde substratların fizikokimyasal özelliklerini belirleyen bu sabit Lineweaver-Burk diyagramından bulunabilir [26].

Bu sabit, birim zamanda her enzim molekülünün ürüne çevirebildiği substrat moleküllerinin maksimum sayısını ifade eder. Çoğu enzimler için dönüşüm sayısı saniyede  $1-10^4$  aralığında yer alır [65].

Eğer enzim konsantrasyonu  $[E]$  biliniyorsa katalitik hız sabiti aşağıdaki bağıntılardan hesaplanır [62].

$$k_{cat} = K_m \cdot v / [E] \cdot [S] \quad (11)$$

$$k_{cat} = v_{maks} / [E] \quad (12)$$

Enzim preparasyonlarında enzimin etkin molar konsantrasyonu bilinmez. Bu nedenle mevcut olan enzim miktarı sadece enzim aktivitesi şeklinde ifade edilir. Uluslararası SI sisteminde enzim aktivitesi saniyede 1 mol substratın ürüne dönüşümünü katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlanır. Buna bir katal (kat) denir. 1 International Unit (IU) ise belirli koşullar altında 1 dakikada 1  $\mu$ mol ürün oluşumunu katalizleyen enzim miktarıdır [62].

$$1 \text{ katal} = 6.10^7 \text{ IU}$$

dur.

### 2.3.10. Özgül Substrat Konsantrasyonu [S']

Enzimatik bir reaksiyonun hızı substrat konsantrasyonundan çok onun  $K_m$ 'e olan oranına bağlıdır. Bu orana özgül (spesifik) substrat konsantrasyonu ya da indirgenmiş substrat konsantrasyonu veya normalize edilmiş substrat konsantrasyonu denir [62].

$$[S'] = [S] / K_m \quad (13)$$

Endüstriyel durumlarda ılımlı substrat konsantrasyonu veya dönüştürülen substrat için düşük afiniteli enzimler tercih edilir; diğer bir deyişle düşük bir  $[S] / K_m$  değerine sahip sistemler kullanılır [48].

### 2.3.11. Özgül Reaksiyon Hızı (v')

Herhangi bir  $[S]$  değerindeki başlangıç hızı ( $v$ ) maksimum hızın ( $v_{maks}$ ) bir fraksiyonu olarak ifade edilebilir. Bu fraksiyona özgül hız ya da bağıl hız denir [62]

$$v' = v / v_{maks} \quad (14)$$

### 2.3.12. Katalitik (Kinetik) Verim

Endüstriyel açıdan enzimin her ünite miktarı için en hızlı reaksiyon vermesi arzu edilir. Çünkü böylece katalistin ilave edilen minimum miktarı için maksimum etki sağlanır. Bu genellikle tüm proses için en iyi sonucu verir. Bu koşullar altında her ünite enzim aktivitesi için en hızlı enzim döngüsü ( $k_{cat}$ ) sağlanır. Endüstriyel durumlarda ılımlı substrat konsantrasyonu veya dönüştürülen substrat için düşük afiniteli enzimler tercih edilir; diğer bir deyişle düşük bir  $[S] / K_m$  değerine sahip sistemler kullanılır. Katalitik verime maksimum dönüşüm hızı da denir [48].

Alternatif substratlar için  $k_{cat} / K_m$  'in kıyaslanması bir enzimin özgüllüğünün bir ölçümü olarak da kullanılabilir [65]. Enzimin katalitik verimi

$$k_{cat} / K_m \quad (15)$$

orantısı ile hesaplanır [43, 48]

Lineweaver – Burk diyagramı çizilerek enzim döngüsü  $k_{cat}$  hesaplanır ve buradan kinetik verimlilik  $k_{cat} / K_m$  hesaplanabilir [35].

Bir enzim-substrat kinetik değerleri çizelge 2.5'deki hipotetik tablodan da bulunabilir [48].

### 2.3.13. Fizyolojik Verim [48]

$$v_{mak} / K_m \quad (16)$$

Enzim için en iyi substrat  $v_{maks} / K_m$  oranı en yüksek olan substrattır [62].

Çizelge 2.4. Hipotetik olarak bir enzimin kinetik parametrelerinin hesaplanması [48]

Enzim	$K_m$	$k_{cat}$	$k_{cat} / K_m$
A	0,5.[S]	X	2.[S]
B	0,5.[S]	2X	4.[S]
C	0,5.[S]	10X	20.[S]
D	0,25.[S]	X	4.[S]
E	0,25.[S]	2X	8.[S]
F	0,25.[S]	10X	40.[S]
G	0,05.[S]	X	20.[S]
H	0,05.[S]	2X	40.[S]
I	0,05.[S]	10X	200.[S]



## 2.4. ENZİMLERLE BOYALARIN RENGİNİN GİDERİLMESİ

Beyaz çürükçül fungusun ligninsel enzimlerinin keşfinden sonra, bu enzimlerin ve onlara eşlik eden fungusların spesifik olmayan aktivitelerinin biyolojik çözüme aday olacağını ileri sürülmüştür [42].

Ligninsel enzimler fungal hücrelerin hücre dışı ortamda substratlarının oksidasyonunu sağlamak için salgıladıkları hücre dışı maddelerdir. Lignin spesifik olmayan radikal esaslı bir oksidasyon ile yıkıldığı için, lignin yıkan funguslar çeşitli kirleticilerden oluşmuş bir karışımı parçalama yeteneğine sahiptirler. Bu özellik, kirletilmiş bölgelerin çoğunda çeşitli kirleticilerin karışımlar halinde bulunmasından dolayı, biyolojik yenilenmede beyaz çürükçül fungus kullanımının büyük bir avantajıdır [42].

Ligninsel funguslar ile yıkılabildiği bilinen bileşiklerin sayısı, devam eden araştırmalar ile artmaya devam etmektedir. Genel olarak kabul edilen teoriye göre aromatik kirleticilerin ilk atağı hücre dışı ligninsel enzimler ile yapılmıştır. Ligninsel enzimler bir tek-elektron oksidasyonu gerçekleştirirler ve böylece kirleticinin katyon radikallerini oluştururlar. Katyon radikaller kendiliğinden C-C kırılması veya hidroksilasyon gibi reaksiyonları oluşturarak daha hidrofilik ürünler meydana getirir [21]. Bu ürünler fungal hücreler tarafından tutulur ve uygun bir karbon kaynağı bulunması durumunda karbon dioksit kometabolize edilir. Bu halen oksidasyon, redüksiyon, metilasyon ve hidroksilasyon işlemlerini kapsayan kompleks bir süreçtir. Ligninsel enzimlerin oksidatif mekanizması üzerine çok sayıda araştırma yapılmasına rağmen, lignin yıkım mekanizması ve lignine benzer bileşiklerin oksidasyonu tam olarak anlaşılamamıştır. Hücre dışı ligninsel enzim reaksiyonu redoks mediatörü olarak hizmet edebilen çeşitli küçük molekül ağırlıklı kofaktörleri kapsayan gayet kompleks bir olaydır [42].

Renk giderme çalışmaları boyanın sadece kromofor grubunun transformasyonunu ifade eder; mineralizasyon ise boyanın karbon dioksit dönüşümü anlamına gelir [5].

Renk genellikle atık suda farkedilen ilk kirliliktir. Sudaki çok küçük miktardaki boya (10-50 mg/L) hemen fakedilir ve estetik duyguları, su geçirgenliğini ve gaz çözünürlüğünü etkiler. Azo, antrakinon ve indigo kimyasal yapılarındaki boyalar ticari boyalarda en çok rastlanan renk verici kimyasal gruplardır [67].

Ticari boyalar çok sayıda renge ve aynı zamanda, ışığa, ısıya, deterjanlara ve mikrobiyal saldırılara karşı yüksek stabiliteye sahiptir. Toksik değildirler ve endüstriyel atıklardaki renkleri çevresel ilgiye neden olur [9]. Kimyasal yapı olarak en geniş grup olan bir çok azo boya çevreye deşarj edildikten sonra anaerobik koşullar altında potansiyel olarak kanserojenik olan aminlere dönüşür [5].

Çok yönlü lignin yıkan beyaz çürükçül fungi, *Phanerochaete chrysosporium* ve *Trametes versicolor* doğadaki güçlü parçalayıcılardır ve klorofenoller, nitrotoluenler ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi çok çeşitli doğaya dirençli organik kirleticileri kısmen veya tamamen mineralize edebilirler.

*Phanerochaete chrysosporium* anaerobik koşullarda çeşitli boyaların yıkımında ümit verici görünmesine rağmen iki temel sorun ön plana çıkmaktadır. Birincisi endüstriyel atıklardaki sınırsız karbon ve azot kaynağı mikroorganizmanın enzim salgılamasını inhibe etmesi; ikincisi ise LiP ile boya renk gideriminde hatırı sayılır miktarda hidrojen peroksit ve veratril alkol tüketileceğinden, pek çok gerçek atıkta *Phanerochaete chrysosporium* tarafından LiP ile dengeli bir şekilde işlem yapılamamasıdır [67].

Işığı kırabilen kirleticiler, karbon ve azot gibi uygun besinlerin tamamlanmasından sonra ligninsel fungal kültürler ile parçalanırlar. Ligninsel kültürlerde iki tip hücre dışı peroksidaz – ligninaz (LiP) ve manganez bağımsız peroksidaz (MnP) – tespit edilmiştir. Hücre dışı hidrojen peroksit üretimine katılan bir enzim olan Gliksal oksidaz da, fungal hücreler tarafından üretilir. LiP ve MnP'nin katalitik mekanizmaları farklıdır ve bunların üretimleri fungal kültürlerdeki Mn (II) içeriğini ayarlayarak kontrol edilebilir [6]. Bu iki peroksidazın sentetik

Çizelge 2.5: Çeşitli enzim-substrat sistemlerinin kinetik parametreleri

Enzim	Substrat	$k_{cat}$ $s^{-1}$	$K_m$ $\mu M$	$K_{cat}/K_m$ $mM^{-1}s^{-1}$	Referans
<i>Pleurotus ostreatus</i> Lakkaz I Lakkaz II Lakkaz I Lakkaz II	ABTS ABTS RB 158 RB158	16 178 46 25	16 235 3500 3900	986 759 13 7	10
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> LiP 4.65 LiP 4.15 LiP 3.85 LiP 4.65 LiP 4.15 LiP 3.85	VA VA VA VA, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ile VA, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ile VA, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ile	58,6 21,4 28,9 58,5 21,8 29,2	325 333 123 235 198 127	180 640 240 249 110 230	13
<i>Geotrichum candidum</i> Peroksidaz DyP DyP DyP DyP HRP HRP	RB 5 RB 5, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ile AQ 2 AQ 2, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ile RB 5 RB 5, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ile	270 270 270 270 140 140	54 26 84 36 58 36	480 1010 320 760 240 380	26
<i>Trametes trogii</i> Lakkaz	Metoksifenol Dimetoksifenol Ferulik Asid ABTS	115 <sup>a</sup> 109 <sup>a</sup> 145 <sup>a</sup> 198 <sup>a</sup>	5,12 <sup>b</sup> 0,41 <sup>b</sup> 0,04 <sup>b</sup> 0,03 <sup>b</sup>	22 <sup>c</sup> 266 3625 6600	56
<i>B. adusta</i> MnP 1 <i>B. adusta</i> MnP 1 <i>B. adusta</i> MnP 1 <i>P. eryngii</i> MnPL 1 <i>P. eryngii</i> MnPL 1 <i>P. eryngii</i> MnPL 1 <i>P. eryngii</i> MnPL 2 <i>P. eryngii</i> MnPL 2 <i>P. eryngii</i> MnPL 2	RV 5 RB 5 RB 38 RV 5 RB 5 RB 38 RV 5 RB 5 RB 38	- - - - - - - - - -	11 6 6 16 4 8 12 4 7	- - - - - - - - -	35
<i>Bjerkandera adusta</i> Peroksidaz MnP İzoenzimleri	Dimetoksifenol (DMP)	-	160	-	43
<i>Bacillus gordonae</i> <i>Bacillus benzeovoreus</i> <i>Pseudomonas putida</i>	Tectilon Blue (TB4R)	-	5250 <sup>d</sup> 4000 <sup>d</sup> 600 <sup>d</sup>	-	79

<sup>a</sup>: dak<sup>-1</sup>, <sup>b</sup>: mM, <sup>c</sup>: mM<sup>-1</sup>.dak<sup>-1</sup>, <sup>d</sup>: mg/L

boyaları yıkmak için aynı yeteneğe sahip olup olmadığı bilinmemektedir. *Trametes versicolor* Lip ve MnP'a ilave olarak boyaları yıkmaya yeteneğine sahip olan lakkazı da üretebilir [68]. Bazı azo ve heterosiklik boyalar ligninsel solüsyonlarda *Phanerochaete chrysosporium* ile hemen hemen tamamen yıkılır fakat, ham ligninaz ile değişik oranlarda (%0-80) rengi giderilir [18].

Bir *Pycnoporus cinnabarinus* türü, endüstriyel atık suyun ve endüstriyel vinil sülfon boya RBBR'nin rengini giderir. Bir biyoreaktörde 25 gün süreyle *P. cinnabarinus* tarafından lakkaz salgılanması önemli ölçüde gerçekleştirilmiş ve bu enzim Chicago Sky Blue (CSB) kromoforunun ilk yıkımında kullanılmıştır [69].

Boyaların genel bir kural olarak LiP ile renginin giderilmesi, her çeşit boyaya uygulanabilir. *Phanerochaete chrysosporium* tarafından salgılanan LiP, elektrik yükü ile ilintisiz olarak farklı kimyasal yapı ve sınıflardaki boyaların rengini giderir. Bunlar aynı zamanda tekstil endüstrisinde kullanılan ve gayet kararlı olan bir çok antrakinin ve ftalosiyanın boyanın rengini gidermeye muktedirdir [64].

Beyaz çürükçül basidiomycete *P. Chrysosporium*'un lignin yıkan kültürlerinin endüstride kullanılan ve kanserojen olan Disperse Yellow 3 (DY 3) [2-(4'-asetamidofenilazo)-4-metilfenol]'ü karbon dioksite yıktığı gösterilmiştir. DY 3 ve onun naftol analogu 1-(4'-asetamidofenilazo)-2-naftol (NDY3)'ün lignin peroksidaz, horseradish peroksidaz ve Mn III-malonat kompleksi (bir manganez peroksidaz taklidi) ile yıkımı çalışılmıştır. Lignin ve manganez peroksidazlar *P. Chrysosporium*'un ligninsel kültürleri ile üretilen iki hücre dışı peroksidazdır ve bu fungus tarafından lignin ve diğer kirleticilerin yıkımında kullanılmaktadır [7].

*Trametes hirsuta* ve bu organizmadan saflaştırılan bir lakkaz, triarilmetan, indigo, azo ve antrakinin boyaları yıkmaya muktedirdir Hücre dışı lakkaz boyaların yıkımı için asıl sorumlu olarak görülmektedir [63].

*Pyricularia oryzae* lakkazı ile azo boya 2,6-dimetoksi-4-(4'-sülfenilazo)-fenolü substrat olarak kullanarak bu maddeyi 4-sülfenilhidroperoksit (SPH)'e ve

2,6-dimetil-1,4-benzokinona oksitler.2-metil veya 2-metoksi grubu içeren boyalar da SPH'e ve 2-metil veya 2-metoksi benzokinona oksitlemektedir. 2,6-dimetoksi grubu içeren boyanın lakkaz oksidasyonunda altı ürün meydana gelmektedir. Bunlardan üçü SPH, 4-hidroksibenzen sülfonik asid ve 2,6-dimetoksibenzokinon olarak tanımlanmıştır. Metil ve metoksi gruplarının bağlı bulunduğu yer önemlidir [34].

Lakkaz katalizörlüğünde boya dekompozisyon mekanizması boya yapısına bağlı olarak zordur. Antrasen boyalar lakkaz ile doğrudan doğruya okside edilen bir enzim substratıdır. Azo ve indigo boyaların renginin giderilmesi ise küçük moleküllere bölünmesi olayıdır. Azo ve indigo boyalar lakkazın substratları değildir ve boya ve enzim arasındaki küçük ara moleküllerden oluşmuş metabolitlerdir. Substrat olmayan boyaların renk giderme hızı, solüsyonlardaki lakkaz aktivitesinden çok ortamdaki bileşiklerin konsantrasyonları ile sınırlıdır. 2,2'-azinobis (3-etiltiazolin-6-sülfonat) (ABTS) ve antrakinin boyalar gibi bazı sentetik boyalar azo ve indigo boyaların renk giderimine aracılık edebilir [34].

Bir azo boya olan Congo Red'in LiP'in bir substratı olduğu gösterilmiştir. Ortamda ham LiP karışımları ve hidrojen peroksit bulunduğunda Congo Red boyasının % 54 oranında renginin giderildiği saptanmıştır [70].

Kahverengi çürükçül fungus *Polyporus ostreiformis* Congo Red boyasının rengini % 99 oranında gidermektedir. Bu mikroorganizma MnP, asid protoza,  $\alpha$ -amilaz ve LiP üretir. Beyaz çürükçül fungus ve kahverengi çürükçül fungus kültürleri karışımı biyolojik renk giderme için verimli bir şekilde kullanılabilir. Çünkü kahverengi çürükçül fungusun zincir koparma, demetilasyon ve demetoksilasyon yetenekleri beyaz çürükçül fungusun halka kırma yeteneğini tamamlayabilir ve böylece daha hızlı bir renk giderimi sağlanabilir [71].

Azo boyaların aromatik halkalarının bakteriyel peroksidazlar tarafından uygun bir şekilde modifiye edilmesi, daha kolay okside edebilmelerini sağlamaktadır [72].

Beyaz çürükçül fungus *Pycnopus cinnabarinus* ile endüstriyel olarak tüketilen Remazol Brilliant Blue R boyasının yıkımı sağlanmıştır. Çalışılan koşullar altında bu basidiomycete lakkaz üretmekte, fakat lignin peroksidaz tesbit edilememektedir [73].

Boya yıkan diğer funguslar *Hirschioporus lanneinus* ve *Inonotus hispordus*'dur [31].

Hem "Basidiomycotina" ve hem de "Ascomycotina" ile antrakinon esaslı mavi bir boya olan Poly B-411 boyasının renginin giderilmesi mükemmel bir indikatördür [74].

## 2.5. ENZİMLERLE BOYALARIN YIKIM MEKANİZMALARI

Beyaz çürükçül fungus *P. Chrysosporium* tarafından sekonder metabolik adım esnasında üretilen peroksidazların çok çeşitli organik bileşikleri okside ettiği bilinmektedir. Bu, çürümüş organik maddelerle beslenen organizmanın ligninaz ve manganez peroksidazı lignin yıkımında rol alırlar, fakat ileri araştırmalar bu peroksidazların, çevreye toksik ve zararlı olan bir çok sentetik organik bileşiğin de yıkımını başlattığını göstermiştir [12].

Doğal parçalanmaya dirençli kimyasal maddelerin yıkım mekanizması aydınlatılmıştır. *P. Chrysosporium* tarafından 2,4-diklorfenol, 2,4-dinitrotoluen ve 2,7-diklordibenzo-*p*-dioksin için yıkım mekanizmaları önerilmiştir. Klorür ve nitro grupları içeren bu bileşiklerin önerilen mekanizmaları birbirine benzemektedir ve halka kırılması meydana gelmeden önce uzaklaştırıldıkları gösterilmiştir. Aynı zamanda meydana gelen hidrokinonun metillendiği gözlemlenmiştir. Ligninaz ile yıkım çalışmasında kullanılan reaksiyon karışımı doğaya yabancı substratların yanında veratril alkol de içerdiğinden, bazı metillenmiş ürünler bu kaynaktan gelmiş olabilir. Nitro grupların amino gruplara indirgenmesi, 2-amino-4-nitrotoluenin, 4-nitro-1,2-kinona oksidasyonu ve kinonun, hidrokinona redüksiyonu olaylarını

gerçekleştirilen *P. Chrysosporium* tarafından trinitrotoluenin yıkımı için bir içiçe redüksiyon-oksidasyon mekanizması önerilmiştir [12]

Üç arilaminin (*p*-toluidin, 4-kloroanilin ve 3,4-dikloranilin) kloroperoksidaz ve bezelye tohumu peroksijenazı ile önce hidroksilamine ve sonra iki-elektron oksidasyonu vasıtasıyla aril nitroso ürünlere oksidasyonu için potansiyel mekanizmalar önerilmiştir. Aynı zamanda nitroso grubu oluşumu için oksijen kaynağının hidrojen peroksit olduğu rapor edilmiştir. Bu bulgular peroksidazların arilaminleri nitroso ürünlere okside edebildiklerini göstermektedir [12].

*Streptomyces spp.* de lignin çözme yeteneğine sahip hücre dışı peroksidazlar üretir. *Streptomyces* tarafından lignin oksidasyonu açıktır ki, peroksidaz-esaslı bir mekanizmadır. *Streptomyces* klasik aromatik katabolizma mekanizması yoluyla bir çok tek halkalı aromatik bileşiği yıkmaktadır. *Streptomyces viridosporus* dimerik lignin alt yapıdaki model bileşikleri oksidatif olarak parçalamaya muktedirdir. Bir  $\beta$ -aril eter dimeri karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilen *Thermomonospora mesophila* ve *Streptomyces budias* monomerik ürünler meydana getirebilir. Her iki türde de hücre dışı peroksidaz ve katalaz aktiviteleri tesbit edilmiştir [12].

Tekstil boyaları, 3,5-dimetil-4hidroksi-azobenzen-4'-sülfonik asit ve 3-metoksi-4-hidroksiazobenzen-4-sülfonamid'in *P. Chrysosporium* ve *Streptomyces chromofuscus*'dan elde edilen manganez peroksidaz ve ligninaz ile yıkım mekanizmaları şöyledir: Boyaların ilk oksidatif aktivitesinde, molekülleri suyun nükleofilik ataklarına karşı yaralı bir hale getiren katyonik türler oluşması ile sonuçlanır. İki tip hidrolitik kırılma gözlenmiştir. Asimetrik kırılmada kinon ve diazen türleri oluşur. Simetrik kırılmada ise kinon, monoimin ve nitroso türevleri oluşması ile sonuçlanır. Bu karasız ara ürünler daha ileri giderek redoks, oksidasyon, ve hidrolitik transformasyon meydana gelir [12].

Lignin peroksidaz ve lakkaz gibi fungal fenol oksidazlar fenolik azo boyaların azo bağlarını koparır ve moleküler azot açığa çıkar. Lakkaz su üreten bir fenol oksidazdır. Fenolik azo boyaların lignin peroksidaz ile oksidasyonu aktivitesine benzer bir mekanizma lakkaz ile bu boyaların yıkımı için de önerilmiştir. Önerilen

mekanizmada lakkaz arka arkaya iki tane tek elektron oksidasyonu reaksiyonlarını katalizler. İlk olarak bir fenoksi radikali meydana gelir ve son fenol halkasında bir karbon iyonu oluşur. Daha sonra suyun nükleofilik atağı ile bir diazin türevi ve bir kinon meydana gelir [69].

*P. Chrysosporium* kültürleri ile renk giderimi, bir çok boya sonuna kadar mineralize olduğu için tek adımlı bir oksidasyon prosesi değildir. Lignin peroksidaz gibi peroksidazlar tarafından azo boya oksidasyonunun mekanizması muhtemelen azo bağının olduğu karbondaki bir radikal oluşturmak için fenolik grubun oksidasyonu olayıdır. Sonra su bu fenolik karbona bağlanarak fenildiazin molekülü oluşturur. Fenildiazin azot oluşturarak bir tek elektron reaksiyonu ile indirgenebilir. Fenolik azo boyaların oksidasyonu için de benzer bir mekanizma önerilmiştir [64].

Azo boyanın renginin giderilmesi oranı, kimyasal yapıdaki halkanın durumuna bağlı olduğu gibi veratril alkol (VA) konsantrasyonuna da bağlıdır [19]. VA, LiP çevriminde üçüncü bir substrat gibi davranarak azo boya oksidasyonunu teşvik eder [64]. Diğer taraftan, bir tiazin boya olan Azure B ile yapılan çalışmalarda, VA konsantrasyonunun artması ile renk gideriminin inhibe olduğu gösterilmiştir [75]. Azo boyanın yapısına bir guaikol (3-metoksi-4-hidroksifenil) veya siringyl (3,5-dimetoksi-4-hidroksifenil) ünitesi sokulduğunda boyanın mineralizasyonu hızlanmaktadır [7]. Azo bağında *para* pozisyonunda bir hidroksil grubu olması LiP'lar ile renk gidermeyi daha başarılı yapmaktadır [41]. Fakat halen kimyasal yapı ve boya renk giderme arasında genel bir ilişki kurulması basit ve açık olmaktan uzaktır. Farklı kimyasal sınıflardaki bazı ticari boyaların *P. Chrysosporium*'un hücre dışı kültür sıvısı ile rengini gidermede, renk verici grup, bağlı gruplar ve bunların renk giderme oranı üzerindeki etkilerini karşılaştırmaya odaklanmış bir çalışmada şu bugular elde edilmiştir: Renk verici grubu tiazin olan boyalar daha fazla metil grubuna sahip olduklarında, özellikle bu metil gruplar amino azotuna bağlı ise renkleri daha hızlı giderilir. En düşük renk giderme hızı iki nitro grubu içeren bir boyada gözlenmiştir. Böylece elektron veren gruplar renk giderme hızını arttırabilir; oysa elektron alan gruplar onu engelleyebilir. Bu açıdan, renk giderme hızı üzerine boyaların iyonik etkisi de karşılaştırılabilir. Boya molekülündeki pozitif ve negatif



yükler, ister bölgesel, isterse genel olsun boya renk giderme hızı üzerinde bir etkiye sahip değil görünmektedir. Bundan dolayı kimyasal olarak benzer bir seri boya üzerinde odaklanan çalışmaların bile kimyasal yapının etkisini tarif eden basit ve açık bir model bulamamaları sürpriz değildir [4, 7]. Bazı yazarlar elektron dağılımı veya yük yoğunluğunu renk giderim hızlarındaki farklılıklarla ilişkilendirmişlerdir. Bütün gözlemler hep birlikte, kimyasal yapı ya da elektrik yükü değil fakat, diğer bir özellik, örneğin boya kimyasal yapısı içerisindeki bütün etkileşimlerin sonucu olarak iyonizasyon potansiyelinin önemli bir parametre olabileceğini belirtmişlerdir [64].

Peroksidazlar ile DY 3'ün oksidasyonunda son ürün olarak 4-metil-1,2-benzokinon, asetanilid ve DY 3'ün bir dimeri meydana gelir. NDY 3'ün oksidasyonunda ise son ürün olarak asetanilid ve 1,2-naftokinon meydana gelir. Bu sonuçlara göre azo boya yıkımı için şu mekanizma önerilmektedir: bir peroksidazın hidrojen peroksit ile oksitlenmiş formları, iki elektron ile, azo bağı karbon yatağında yer alan bir karbon iyonu meydana getirmek üzere DY 3'ün veya analoglarının fenol halkasını oksitler. Bu karbon iyonuna su saldırır ve kararsız olan ara ürünler meydana gelir. Kararsız ara ürünler de 1,2-naftakinon veya 4-metil-1,2-benzokinon ve 4-asetamidofenildiazen oluşturur. Oksijen, hidrojen peroksit ile oksitlenmiş peroksidaz veya bir metal iyonu ile ve bir elektron ile bir fenildiazen radikali üretmek üzere fenildiazeni oksitler. Bu radikal homoloğu kırılır ve 4-asetamidofenil radikali ve moleküler azot oluşur. Bundan sonra 4-asetamidofenil radikali asetanilid üretmek üzere çevreden bir hidrojen radikali alır. Sonuç olarak *P. Chrysosporium* tam kültürleri ile DY 3 yıkımında son ürün olarak asetanilid meydana gelir [7].

Fenolleri, fenoksi radikal oluşturarak diğer fenollere ve dimerlere çeviren HRP, LiP ve MnP hidrojen peroksit; lakkaz ise oksijen gerektirir [76].

Lakkazlar mono ve polifenolik substratların ve aromatik aminlerin *orto* ve *para* pozisyonlarındaki hidroksil gruplarından bir hidrojen atomunun uzaklaştırılmasını, daha ileri depolimerizasyon, repolimerizasyon, demetilasyon ve kinon oluşumunu sağlama kapasitesine sahip olan serbest radikaller meydana getirmek için, bir elektron absorpsiyonu ile katalizler [63].

Lignin yıkımının önemine rağmen yıkım mekanizması henüz tamamen tanımlanmamıştır. Literatürlere göre beyaz çürükçül fungus *Trametes (Coriolus, Polyporus) versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* ve *Phlebia radiata* en iyi lignin yıkan mikroorganizmalardır [77].

Odun bileşiklerinin biyolojik yıkımı bir enzimatik proses olarak çok iyi bilinmektedir. İzole edilmiş selüloz veya yarı selülozun monosakkaritlere transformasyonu nisbeten basit bir proses olarak uzun zamandır bilinmektedir [78].



### 3. MATERYAL ve METOD

#### 3.1. MATERYAL

##### 3.1.1. Renk Gideriminde Kullanılan Boyalar

Renk gideriminde, EVERLIGHT/TAYVAN firması tarafından üretilen ve Türkiye'de İLTEKS firması tarafından pazarlanan boyalardan yedi tanesi ile ORGANİK KİMYA tarafından pazarlanan bir boya kullanılmıştır. Bu boyalar ve colour index numaraları Çizelge 3.1'de gösterilmektedir. Boyaların kimyasal yapıları mono azo, dis azo ve antrakinon şeklindedir. Evercion Red P-3B (Reactive 45), Evercion Orange P-2R (Reactive Orange 13), Evercion Scarlet P-RN (Reactive Red 33), Evercion Yellow P-5G (Reactive Yellow 2) ve Polkative Orange P-2R (Reactive Orange 13) mono azo; Everzol Black B (Reactive Black 5) dis azo; Evercion Blue P-GR (Reactive Blue 5) ve Everzol B. Blue R/SP (Reactive Blue 19) antrakinon kimyasal yapıdadır.

Çizelge 3.1: Renk gideriminde kullanılan boyalar ve colour index numaraları [8].

Boya Adı	Colour Index No	Kimyasal Yapı No
Evercion Red P-3B	Reactive Red 45	18209 (Mono Azo)
Evercion Blue P-GR	Reactive Blue 15	61205:1 (Antrakinon)
Evercion Orange P-2R	Reactive Orange 13	18270 (Mono Azo)
Evercion Scarlet P-RN	Reactive Red 33	18280 (Mono Azo)
Evercion Yellow P-5G	Reactive Yellow 2	18972 (Mono Azo)
Everzol B. Blue R/SP	Reactive Blue 19	61.200 (Antrakinon)
Everzol Black B	Reactive Black 5	20505 (Dis Azo)
Polkative Orange P-2R	Reactive Orange 13	18270 (Mono Azo)

### 3.1.2. *Funalia Trogii* Kültür Filtratının Elde Edilmesi

Çalışmada, Çevre Mühendisliği Ana Bilim Dalı Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda üretilen *Funalia trogii* kültür filtratı kullanılmıştır. Kültür filtratının üretiminin şu şekilde gerçekleştirildiği bildirilmiştir: Besiyerinde substrat olarak buğday kepeği (900 g/kg) ve soya küspesi (100 g/kg) kullanılmış ve katı faz fermantasyon ortamında pH 5'de 30°C'de 10 günlük inkübasyon sonunda erlenlerde üretilmiş kültürler 45°C'de etüvde 24 saat bekletilerek besiyerinin nemini kaybederek kurutulması sağlanmıştır. Kuruyan materyal 2 dak. süreyle değirmende öğütülerek toz haline getirilmiş ve buzdolabında (+4 °C) saklanmıştır [79].

*Funalia trogii*'nin katı substrat üzerinde üremiş kültüründen, 2 g alınmış 20 mL pH 6 fosfat tamponu eklenerek oda sıcaklığında 15 dakika karıştırılmış ve çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra santrifüj edilerek (15 dakika 5000 rpm; Nüve santrifüj ile) süpernatant (dökelti), bu çalışmadaki kültür filtratı olarak kullanılmıştır.

## 3.2. METOD

### 3.2.1. Renk Giderim Çalışmaları

#### 3.2.1.1. Boyarmaddenin seçimi

Renk gideriminde kullanılan boyaların (Çizelge 3.1) renk açılma derecelerini tesbit etmek için, stok çözeltileri, saf su ile 1,0 g/L konsantrasyonda hazırlanmıştır. Bunlardan 0,5 mL alınarak 25 mL'ye tamamlanmış ve 20 mg/L'lik bir konsantrasyona ulaşılmıştır. Bu boyalardan 0,5 mL alınarak 0,1 M sodyum tartarat tamponu ile 2,5 mL'ye tamamlanmış ve pH 2,5'e ayarlanmıştır. Bunların üzerine 0,1 mL *Funalia trogii* kültür filtratı verilerek reaksiyon başlatılmış ve 40 °C'de 5 dakikalık bir reaksiyon süresi sonunda renk giderimi olup olmadığı gözlemlenmiştir.

### 3.2.1.2. Everzol Brilliant Blue R/SP boyasının renginin giderilmesi

Renk gideriminde pH'nın, sıcaklığın, özüt ve boya miktarındaki artışın etkisi araştırılmıştır. Boyanın renginin giderilmesi maksimum absorpsiyon gösterdiği dalga boyunda (591 nm) izlenmiştir. Spektrofotometrede absorbans okumaları 5 dakikalık inkübasyon süresince her 10 saniyede bir ölçüm yapılarak kaydedilmiştir. Çalışmalar iki bölüm halinde yapılmıştır:

*i. pH ve sıcaklığın etkisi:* Optimum pH ve sıcaklığın bulunabilmesi için 5 farklı pH'da (2,5; 3,0; 4,0; 5,0 ve 6,0) ve 3 farklı sıcaklıkta (30, 40 ve 50°C) çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmada kültür filtratı ve boya miktarı (100 mg/L boya ve 100 µL kültür filtratı) sabit tutulmuştur. Toplam hacmi 2,5 mL olan boya ve kültür filtratının, spektrofotometrik ölçümlerinden elde edilen absorbans değerlerinin azalmasından, yıkılan boyarmadde miktarı hesaplanarak, en verimli renk gideriminin koşulları olan optimum pH ve sıcaklık tesbit edilmiştir. Renk gideriminde pH 2,5 için, 0,1 M sodyum tartarat tamponu; pH 3-6 için, 0,1 M potasyum fosfat tamponu kullanılmıştır.

*ii. Kültür filtratı miktarı ve boya konsantrasyonunun etkisi:* Bu çalışmada optimum kültür filtratı miktarının ve boya konsantrasyonunun bulunabilmesi için, 4 farklı miktarda kültür filtratı (50, 100, 150, 200 µL) ve 3 farklı konsantrasyonda (50, 75, 100 mg/L) boya ile çalışılmıştır. Reaksiyon karışımı 2,5 mL hacminde olup deneylerde 5 dakikalık inkübasyon süresi boyunca her 10 saniyede bir absorbans düşmesi kaydedilmiştir. Kültür filtratı ve boya miktarlarının renk giderilmesine etkisi araştırılırken pH ve sıcaklık sabit tutulmuştur. Böylece optimum pH ve sıcaklıkta en uygun boya konsantrasyonu ve özüt miktarı ile maksimum renk gideriminin sağlandığı koşullar belirlenmiştir.

### 3.2.2. Renk Gideriminde KOİ Değişiminin Ölçülmesi

Bulunmuş olan optimum koşullarda (pH, sıcaklık, boya konsantrasyonu ve özüt miktarı) 5 dakikalık inkübasyon süresi başında ve sonunda Kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) ölçümü yapılmıştır.

KOİ analizleri Hack KOİ kitleri (0-15.000 aralığında, Cat: 24.159-25) kullanılarak Hack DR 2010 spektrofotometre ile spektrofotometrik olarak ölçülerek yapılmıştır.



#### 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Çeşitli fungal kaynaklardan elde edilen enzimlerin çeşitli boyarmaddeleri yıktığı rapor edilmiştir [1, 2, 13, 26, 35, 49, 63, 64]. Bu çalışmada *Funalia trogii* kültür filtratı ile EBBRSP boyasının renginin giderilmesinde enzim aktivitesine etki eden faktörler olan sıcaklık, pH, substrat miktarı ve enzim miktarı araştırılmış ve reaksiyon koşulları belirlenmiştir.

##### 4.1. BOYARMADDENİN SEÇİMİ

Yapılan çalışmalarda 40°C'de ve pH 3'de *Funalia trogii* kültür filtratı ile Evercion Red P-2B, (Reaktive Red 45, C.I. 18.209) Evercion Orange P-2R (Reactive Orange 13, C.I. 18.270), Evercion Scarlet P-RN (Reactive Red 33, C.I. 18.280), Evercion Yellow P-5G (Reactive Yellow 2, C.I. 18.972) ve Polkative Orange P-2R (reactive Orange 13, C.I. 18.270) boyalarında renk açılması gözlemlenmemiştir. Evercion Blue P-GR (Reactive Blue 5, C.I. 61.205:1), Everzol Blue R/SP (Reactive Blue 19, C.I. 61.200) ve Everzol Black B (Reactive Black 5, C.I. 20.505) boyalarında ise renk açılması olduğu görülmüştür. Boyaların renk açılma dereceleri Çizelge 4.1'de görülmektedir.

Renk açılmasının en fazla olduğu Everzol Brilliant Blue R/SP boyası ile maksimum renk giderilmesi koşulları olan optimum pH, sıcaklık, kültür filtratı miktarı ve boyarmadde konsantrasyonu tesbit çalışmaları yapıp reaksiyon koşulları ayrıntılı olarak incelenmiştir.

EBBRSP boyasının kimyasal formülü  $C_{22}H_{16}N_2O_{11}S_3Na_2$ 'dir ve molekül ağırlığı 626,5 g'dır. Everzol Brilliant Blue RSP boyasının maksimum absorbans gösterdiği 591 nm'de spektrofotometrik ölçümler yapılmıştır.

Çizelge 4.1: Boyaların renk giderilme dereceleri

Boyarmaddeler	Renk Giderilme Dereceleri
Everzol Blue R/SP (Reactive Blue 19, C.I. 61.200)	+++
Evercion Blue P-GR (Reactive Blue 5, C.I. 61.205:1)	++
Evercion Yellow P-5G (Reactive Yellow 2, C.I. 18.972)	-
Evercion Red P-2B, (Reaktive Red 45, C.I. 18.209)	-
Evercion Orange P-2R (Reactive Orange 13, C.I. 18.270)	-
Evecion Scarlet P-RN (Reactive Red 33, C.I. 18.280)	-
Polkative Orange P-2R (Reactive Orange 13, C.I. 18.270)	-
Everzol Black B (Reactive Black 5, C.I. 20.505)	+

- +++ : Yüksek renk giderimi
- ++ : Orta renk giderimi
- + : Düşük renk giderimi
- : Renk giderimi yok

## 4.2. EBBRSP BOYASININ RENGİNİN GİDERİLMESİ

### 4.2.1. Renk Giderimine pH ve Sıcaklığın Etkisi

EBBRSP boyasının enzimatik olarak maksimum renk giderimi için optimum pH ve sıcaklığı tesbit etmek amacı ile 100 mg/L boya, 100 µL kültür filtratı ile toplam reaksiyon karışımı hacmi 2,5 mL olmak üzere, değişik pH (2,5; 3,0; 4,0; 5,0 ve 6,0) ve sıcaklıklarda (30°C, 40°C ve 50°C) 5 dakika süre ile inkübe edilmiş ve yıkılan boya miktarları değerleri Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

EBBRSP boyasının renginin giderilmesi için yapılan çalışmanın bu bölümünde maksimum enzim aktivitesi sağlamak amacı ile optimum pH ve sıcaklık tesbit edilmiştir.



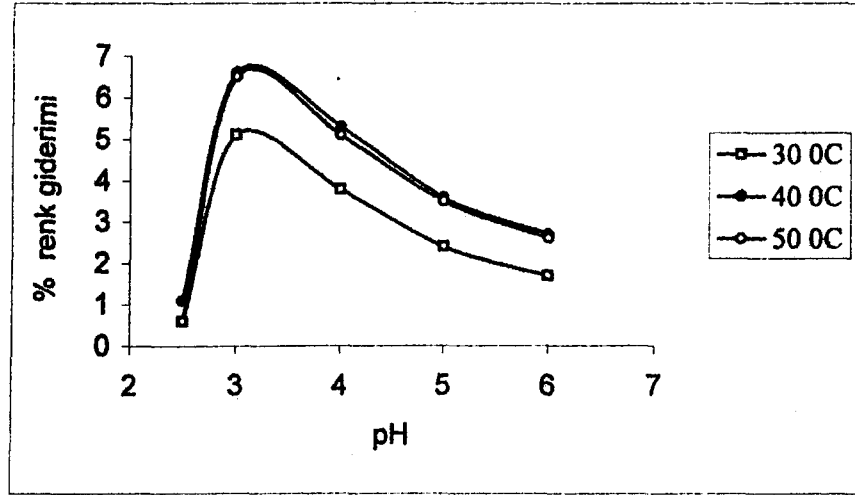
Çizelge 4.2'de görüldüğü gibi pH 2,5'da en düşük düzeyde aktivite, yani ihmal edilebilir renk giderimi gözlenmiştir. pH 3'de ise maksimum renk giderimine ulaşılmıştır. pH 4,0; 5,0 ve 6,0'da renk giderim oranlarında gittikçe azalan değerler gözlenmiştir. Bu sonuçlardan, en iyi renk giderim oranına pH 3 değerinde ulaşılabileceği saptanmıştır.

Çizelge 4.2: EBBRSP'nin renginin giderilmesinde pH ve sıcaklığın etkisi (100 mg/L EBBRSP boyası ve 100 µL özüt)

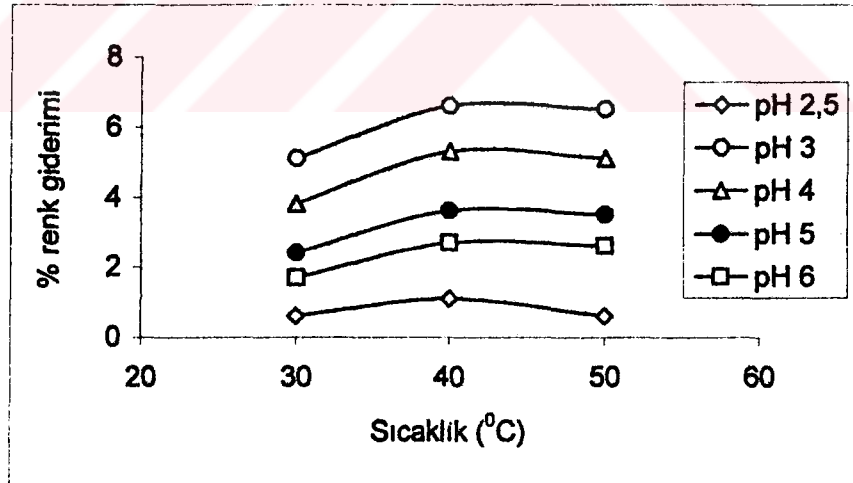
PH	Renk Giderim Oranı (%)		
	30°C	40°C	50°C
2,5	0,6	1,1	0,6
3,0	5,1	6,6	6,5
4,0	3,8	5,3	5,1
5,0	2,4	3,6	3,5
6,0	1,7	2,7	2,6

EBBRSP boyasının renginin giderilmesi için yapılan bu çalışmada maksimum kültür filtratı aktivitesi sağlamak amacı ile optimum sıcaklık tesbitinde 40°C'de en yüksek oranda boya giderildiği saptanmıştır. Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi 30°C ve 50°C sıcaklıklarda daha düşük oranda bir renk giderimi elde edilmiştir. EBBRSP boyasının *Funalia trogii* kültür filtratı ile renginin giderilmesinde optimum pH'nın ve sıcaklığın etkisinin 5 dakikalık inkübasyon süresi sonunda bulunan % renk giderimi ile grafik olarak gösterimi Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de yer almaktadır

Ek. 1'de 30°C'de 100 mg/L konsantrasyonda 100 µL kültür filtratı ile renk gideriminde 5 dakikalık inkübasyon süresince gözlenen absorbans değişimleri grafikleri ve 2. derceden kinetik bağıntıları görülmektedir. Ek. 2 ve Ek 3'de ise 40°C'de ve 50°C'de değişik pH'larda EBBRSP boyasının *Funalia trogii* kültür filtratı ile 5 dakikalık inkübasyon süresince gözlenen absorbans değişimlerinin grafiksel gösterimi ve 2. derceden kinetik bağıntıları yer almaktadır.



Şekil 4.1: EBBRSP boyasının 100 mg/L konsantrasyonda enzimatik renk gideriminde, 100 µL kültür filtratı ile değişik sıcaklıklarda pH'nın etkisinin grafiksel olarak gösterimi



Şekil 4.2: EBBRSP boyasının 100 mg/L konsantrasyonda renk gideriminde, 100 µL kültür filtratı ile değişik pH'larda sıcaklığın etkisinin grafiksel olarak gösterimi

Boyarmaddelerin renk giderimini katalizleyen enzimler lakkaz ve peroksidazlardır [2, 15, 63]. Maksimum renk giderim hızının saptandığı pH 3'de renk gideriminden sorumlu olan enzimler lakkaz, LiP ve MnP'dir [77].

*Pleurotus ostreatus* fungusunun kültür özütünden elde edilen ve RBBR yıkımından sorumlu olan peroksidaz enzimine sıcaklığın etkisi araştırılmış ve 30°C'nin üzerine çıkıldığında aktivite kaybı olduğu görülmüştür [49].

*Geotrichum candidum*'dan saflaştırılmış peroksidaz enzimi RBBR yıkımında kullanılmış ve optimum renk giderim sıcaklığı belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmada 30°C'de aktivite kaybı gözlenmiş ve 50°C'de aktivite kaybının % 90'a ulaştığı gözlenmiştir [26].

Optimum enzimatik yıkım pH'ı kullanılan substrata ve enzim kaynağına göre değişmektedir. Lakkaz enzimi çeşitli substratlarla pH 3-7,5 aralığında maksimum aktivite göstermektedir. *Trametes versicolor*'dan elde edilen lakkaz enziminin sinapik asidi pH 3,6'da, ferulik asidi pH 4,0'de ve syringaldazini pH 5,3'de maksimum oranda yıktığı belirtilmiştir [38, 60].

*Pycnoporus cinnabarinus*'dan saflaştırılan lakkaz enziminin guaikolu pH 4,0'de yıktığı rapor edilmiştir [15]. Guaikol substratı *Cerenna unicolor*'dan elde edilen lakkaz enziminin tayininde kullanılmış ve pH 5'de yıkıldığı bildirilmiştir [77].

#### 4.2.2. Renk Giderimine Kültür Filtratı Miktarı ve Boya Konsantrasyonunun Etkisi

En yüksek renk giderim oranına (%10,9), 75 mg/L EBBRSP boya konsantrasyonu ve 150 µL kültür filtratı miktarı ile yapılan çalışma ile ulaşılmıştır (Ek 5, 150 µL kültür filtratı). Elde edilen sonuçlardan enzim/substrat oranının da etkili olduğu saptanmıştır. Çünkü aynı konsantrasyondaki boya ve 50 µL, 100 µL ve 200 µL kültür filtratı ile yapılan inkübasyon çalışmalarında daha düşük oranlarda renk giderimi elde edildiği görülmüştür (Çizelge 4.3). Genel olarak kültür filtratı miktarı 150 µL'de doygunluğa ulaşmaktadır (Ek. 5).

**Çizelge 4.3: Değişik kültür filtratı miktarlarının farklı konsantrasyonlarındaki boyarmaddenin renk giderimine etkisi (40°C ve pH 3)**

Boya Konsantrasyonu	Kültür Filtratı (µL)	Aktivite	Yıkılan Boya Miktarı			Maks. Abs.
			mg/L	mM	%	
50 mg/L (0,0798mM) (79,8 µM)	50	54	2.6	4,15	% 5.2	0.506
	100	80	3.9	6,23	% 7.8	
	150	96	4.7	7,50	% 9.4	
	200	88	4.3	6,86	% 8.6	
75 mg/L (0,1197mM) (119,7 µM)	50	72	3.6	5,75	% 4.8	0.776
	100	132	6.4	10,22	% 8.5	
	150	166	8,2	13,09	% 10.9	
	200	162	7.9	12,61	% 10.5	
100 mg/L 0,1596 mM) (159,6 µM)	50	76	3.7	5,91	% 3.7	1.038
	100	144	7.1	11,33	% 7.1	
	150	180	8.8	14,05	% 8.8	
	200	178	8,7	13,89	% 8.7	

Young ve Yu (1977) yaptıkları çalışmada LiP enzimini çeşitli boya­ların gideriminde kullanmış ve LiP miktarının artışına bağlı olarak reaksiyon başlangıç hızının arttığını saptamışlardır [9].

Heinfling ve ark. (1998) renk gideriminde LiP kullanmış ve renk giderimine boya konsantrasyonunun etkisini araştırmışlardır. Reactive Violet 5, 5 µM; Reactive Black 5, 4 µM ve Reactive Blue 38, 10 µM konsantrasyon üzerinde kullanıldığında doygunluğa ulaşmıştır [35].

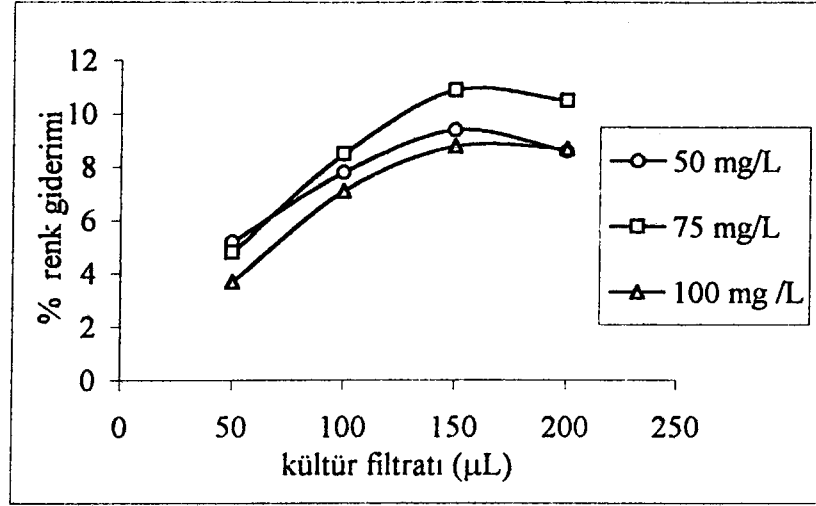
Renk gideriminde en yüksek aktiviteyi veren kültür filtratı / boya oranı, 150 µL özüt miktarı ve 100 mg/L boya konsantrasyonu olmasına karşın, giderilen boya oranı düşüktür. ( $dA/dt = 180$ ; yıkılan boya oranı = %8.8)

EBBRSP boyasının renk giderme oranı kültür filtratı miktarının artması ile orantılı olarak artmakta ve her boya konsantrasyonunda 150 µL seviyesinde bir maksimuma ulaşmaktadır.

RBBR boyasının enzimatik renk gideriminde de renk giderim oranı enzim miktarının artması ile orantılı olarak artmakta ve renk giderme aktivitesi Michael kinetiklerini sergilemektedir. RBBR renk giderme oranı 75-100.5 µM'a kadar boya konsantrasyonu ile artmakta; konsantrasyonun daha fazla artırılmasının renk giderme oranı üzerine etkisi olmamaktadır [2].

Şekil 4.3'de 40°C'de ve pH 3'de, EBBRSP boyasının renk gideriminde, kültür filtratı miktarı ve substrat konsantrasyonunun, boya yıkımı üzerindeki etkisinin, 5 dakikalık inkübasyon süresi sonunda bulunan, % renk giderimi olarak gösterimi yer almaktadır.

EBBRSP boyasının *Funalia trogii* kültür filtratı ile renginin giderilmesinde, renk giderim oranı enzim dozu ile lineer olarak artmakta ve maksimum verim 150 µL özüt miktarı ile sağlanmıştır. Fakat bu kültür filtratı miktarı 75 mg/L konsantrasyonundaki boya miktarı ile optimum bir noktaya ulaşmıştır. Aynı miktardaki kültür filtratı, 50 mg/L ve 100 mg/L boya konsantrasyonlarında daha düşük oranlarda renk giderimi sağlamıştır. Kültür filtratı dozajında, genellikle 150 µL seviyesinde maksimum renk giderimine ulaşılmış ve daha fazla kültür filtratı verilmesinin renk giderimini etkilemediği görülmüştür.



Şekil 4.3: EBBRSP boyasının renginin giderilmesinde, boya konsantrasyonunun ve kültür filtratı miktarının etkisi. (40°C ve pH 3).

Ek. 4'de 40°C'de ve pH 3'de 50 mg/L EBBRSP boyasına 50, 100, 150, 200 µL kültür filtratı ilave edilerek renginin giderilmesi işleminde 5 dakikalık inkübasyon süresince gözlenen absorbans değişimlerinin grafiksel gösterimi yer almaktadır.

Ek. 5'de 40°C'de ve pH 3'de 75 mg/L EBBRSP boyasına 50, 100, 150, 200 µL kültür filtratı ilave edilerek renginin giderilmesi işleminde 5 dakikalık inkübasyon süresince gözlenen absorbans değişimlerinin grafiksel gösterimi yer almaktadır.

Ek. 6'da 40°C'de ve pH 3'de 100 mg/L EBBRSP boyasına 50, 100, 150, 200 µL kültür filtratı ilave edilerek renginin giderilmesi işleminde 5 dakikalık inkübasyon süresince gözlenen absorbans değişimlerinin grafiksel gösterimi yer almaktadır.

Boyaların aynı enzimlerle farklı oranlarda renginin giderilmesi, boyaların kimyasal yapılarındaki farklılık nedeniyle açıklanmaktadır [80].

Genel olarak yüksek boya konsantrasyonu daha yavaş renk giderme hızına neden olmaktadır. Bir boya molekülü azo ve antrakinon gibi bir kromofora sahiptir ve sadece kromoforun kimyasal yapısı bozulduğu zaman renk kaybolur. Bir boya molekülünün kromoforunun kimyasal yapısını bozmak için LiP radikallerinin pek çok sayıda atağına gereksinim olabilir. Yüksek boya konsantrasyonu her boya molekülüne daha az sayıda LiP atağı demektir ve böylece daha yavaş renk giderme hızı gerçekleşir [81].

#### 4.3. RENK GİDERİMİNDE KOİ DEĞİŞİMİ

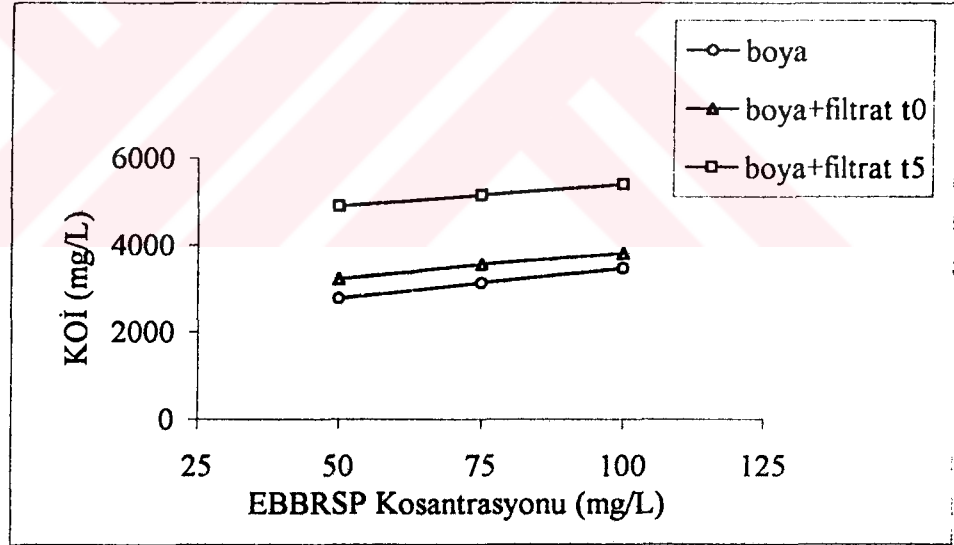
Ekolojik açıdan endüstriyel proseslerden kaynaklanan bütün atık suların biyolojik yıkılabilirliğini tayin etmek gereklidir. Biyoyıkılabilirliğin tesbit edilmesinde kullanılan ölçütlerden birisi, atığın KOİ değerlerinin ölçülmesidir [82].

Farklı konsantrasyonlarda EBBRSP boyası (50, 75 ve 100 mg/L) 150 µL kültür filtratı ile muamele edilmiştir. İşlem sonundaki KOİ değerleri ( $t_5$ ) başlangıçta ölçülen KOİ değerlerinden ( $t_0$ ) daha yüksek çıkmıştır. Ayrıca boya konsantrasyonu yükseldikçe KOİ değerleri yükselmektedir.

EBBRSP boyasının her konsantrasyonda 150 µL ö kültür filtratı ile muamelesi sonunda KOİ değerlerinin yükselmesi, boyarmaddenin kimyasal yapısındaki yan grupların koptuğunu ve açık uçların meydana geldiğini göstermektedir. Bu sonuç boyanın yıkıldığı fikrini vermektedir.

Çizelge 4.4: EBBRSP boyasının enzimatik renk gideriminde KOİ değişimi  
(Boya 50, 75 ve 100 mg/L, kültür filtratı 150 µL)

Boya (mg/L)	KOİ (mg/L)		
	Boya	Boya + Özüt (t <sub>0</sub> )	Boya + Özüt (t <sub>5</sub> )
50	2770	3220	4890
75	3120	3560	5140
100	3470	3800	5390



Şekil 4.7: EBBRSP boyasının renginin giderilmesinde KOİ değişimi (pH 3, sıcaklık 40°C)



## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Atık su arıtılmasında enzim kullanılmasının ana nedeni spesifik kirleticilerin çöktürülerek giderilmesi veya transformasyonu ile zararsız ürünlere dönüştürülmesi faaliyetidir. Kirleticilerin tamamen mineralizasyonu diğer transformasyon yöntemlerine tercih edilir, fakat amonyak oluşumu ve siyanürlü atıkların giderilmesi ya da organofosfat pestisitlerin parçalanarak kolaylıkla uzaklaştırılabilen ürünlere dönüştürülmesi de kabul edilebilir. Fakat bazı durumlarda enzimatik faaliyet ürünleri başlangıç maddesinden daha toksik olabilir ve böylece enzim kullanımı amacına ulaşamayabilir. Sonuç olarak, spesifik bir enzimatik işlemin uygulanabilirliğini geliştirmeden önce oluşan ürünlerin toksisitesini incelemek gereklidir. Ne yazık ki, bu sorunu araştırmak için çok az şey yapılmıştır. Çünkü, enzimatik reaksiyon ürünlerini tanımlamak zordur. Pek çok çalışma verilen bir kirleticinin çözüldüğü yok olması üzerine odaklanmıştır; fakat Aitken ve arkadaşları [80] ve Massey ve arkadaşları [81] çalışmalarında [6], enzimler ile fenolün oksidasyonu sonucunda oluşan reaksiyon ürünlerinin mutasyon durumunu araştırmışlardır. Araştırmacılar kloroperoksidaz, horseradish peroksidaz, lignin peroksidaz ve polifenol oksidaz ile fenollerin oksidasyonu sonucu oluşan reaksiyon ürünlerinden 17 tanesini test etmişlerdir. Genel olarak mutajenik ürünlerin oluştuğunu gözlemediklerini rapor etmişlerdir. Fakat lignin peroksidaz ile nitrofenolün oksidasyonu mutajenik ürünlerin meydana gelmesi ile sonuçlanmış ve manganez peroksidazın da lignin peroksidaz ile benzerliği göz önüne alınarak aynı etkiyi göstereceği kabul edilmiştir. Kloroperoksidaz da ortamda klorür iyonları bulunduğunda onları, okside edebilme kapasitesine sahip olduğu için, bazı toksik bileşikler oluşturabilir. Sonuç olarak kloroperoksidazın kullanımı sadece ortamda klorür iyonları bulunmadığı durumlarda tavsiye edilebilir [6].

Enzim esaslı bir işlemin başarılı bir şekilde yerine getirilebilmesi için, enzim maliyeti birinci derecede öneme sahiptir. Üzerinde araştırma yapılan enzimler izolasyon, saflaştırma ve üretim maliyetleri nedeniyle pahalıdır. Enzim kaynağı olarak doğrudan doğruya bitkilerin kullanılması potansiyel olarak ucuz olduğundan saflaştırılmış enzim kullanımına ilginç bir alternatif sunar [6].

olarak doğrudan doğruya bitkilerin kullanılması potansiyel olarak ucuz olduğundan saflaştırılmış enzim kullanımına ilginç bir alternatif sunar [6].

En uygun enzimlerin seçilmesi aynı zamanda enzimin özelliklerinin bir fonksiyonudur. Bu özellikler kofaktörlere ihtiyaç duyulması (hidrojen peroksit veya oksijen gibi) ve normal çalışma koşulları altında kabul edilebilir uzunlukta bir süre için aktivitesinin yeterli bir miktarda kalmasıdır. Enzimin spesifikliği özellikle seyreltik karışımlardaki özel kimyasalların uzaklaştırılmak istendiği durumlarda önemlidir. Çok geniş spesifikleri olan bir enzim verimliliği düşürebilir. Ucuz kofaktörler gerektiren ya da kofaktör kullanımı gerektirmeyen enzimler açıktır ki tercih edilir. (örneğin HRP için hidrojen peroksit gerektiği halde, polifenol oksidazlar için kofaktör olarak oksijen kullanılması gibi) Son olarak enzimlerin katalitik ömürlerinin geliştirilmesi (yani aktivitelerinin uzun bir süre korunması) katı taşıyıcılarda tutuklanması ile sağlanabilir. Gerçekten de, bir çok durumda, tutuklanmış enzimlerin serbest enzimlerden daha verimli olduğu bulunmuştur. Tutuklamanın avantajları stabilitenin gelişmesi, sürekli proses olanakları ve enzimin yeniden kullanılabilmesidir [6].

Bazı durumlarda enzim kullanımı çok avantajlı olmayabilir: örneğin, atıklar yüksek bir konsantrasyonda organik madde içeriyorsa veya atıklar çok çeşitli problemlili kimyasal maddeye sahip ise enzimatik işlem çok fazla miktarda enzim gereksinimi nedeniyle muhtemelen çok pahalı olacaktır. Aynı zamanda sıradan belediye aktif çamur atık su arıtma reaktörlerine enzim ilave edilmesi, çok ümit verici görünmemektedir. Çünkü bakteriyel popülasyon ile doğal olarak üretilen nisbeten daha pahalı katalistlerin hatırı sayılır miktarlarda ilave edilmeleri gerekecektir. Sonuç olarak bir çok atık arıtma alanında enzimler için büyük bir potansiyel olduğu görünmektedir [6].

Azo bileşiklerin renk giderme ve yıkım mekanizmalarını anlamak için, azo bağlarının ilk enzimatik transformasyonu hakkında ayrıntılı bilgiye ihtiyaç vardır. Bu bilgi ile birlikte bu sentetik boyaların yıkımını ve onların kimyasal yapılarının nasıl etkilendiğini anlamak, kolay yıkılabilen yeni bir jenerasyon boya geliştirmeye yardımcı olacaktır. Böyle araştırmalar aynı zamanda gelecekte, doğal parçalanmaya

daha az dirençli kimyasal maddelerin yeni bir jenerasyonunun üretilebileceğine örnek olabilir [12]. Çevre dostu boyalar üretmenin bir yolu da, bazı boyaların içerisine lignin alt grubu sokulmasıyla, beyaz çürükçül fungusun ürettiği ligninsel enzimler ve diğer mikroorganizmalarla parçalanmaya daha hassas hale getirilmesidir [41].

Boyaların, kalite gereksinimlerini karşılamak amacıyla yüksek bir kimyasal, fotolitik ve mikrobiyolojik stabiliteye sahip olmaları gerekir. Boya üreticileri kumaş üzerine boya fiksasyonunu geliştirmek için boyanın kimyasal yapısını değiştirerek biyolojik yıkımı daha iyi, üretim ve tüketim prosesleri daha kontrollü ve kumaşa tamamen çekilen ürünler geliştirilmesi ile ilgilidirler [82].

Yapılan bu çalışmada tekstil terbiye sektöründe yaygın olarak kullanılan antrakinin yapıdaki EBBRSP boyasının *Funalia trogii* kültür filtratı ile renginin belirli bir oranda giderilebileceği saptanmış ve bu reaksiyonun optimum koşulları belirlenmiştir.

EBBRSP boyasının renk gideriminde *Funalia trogii* kültür filtratı ile yapılan çalışmada elde edilen bulgular daha ileri araştırmalara ışık tutacaktır. Bu çalışmada kültür filtratı-boya sisteminin reaksiyon koşulları belirlenmiş ve bundan sonraki çalışmalarda kullanılarak, diğer boyalarla yapılacak çalışmaların sistematigi elde edilmiştir. Son olarak, çözeltide birden fazla boya bulunması durumunda, meydana gelecek kültür filtratı aktivitesi ve bunun koşullarının bulunması çalışmaları, uygulamada daha yararlı olacak ve gerçek bir endüstriyel atık sudaki renk giderimi sağlanacaktır. Çünkü bir tekstil terbiye işletmesi aynı anda çok sayıda değişik kimyasal yapılara sahip boyarmaddeleri kullanmakta ve atık suya vermektedir.

Enzimatik renk giderimi konusunda henüz teknolojik bir uygulama ve çalışma mevcut olmayıp bu konuda yapılan bilimsel araştırmalar gerekli bilgi birikimini sağlamaya yönelik durumdadır. Gelecekte önem kazanacak olan bu yeni uygulama yöntemi için gereken ilk bilgilerin küçük bir kısmının bu araştırma ile ortaya çıkarıldığını düşünmek umut verici bir gelişme olarak görülmeli ve daha

ayrıntılı ve daha ileri çalışmalar ile desteklenerek yeni çevresel teknolojilerin gelişimi sağlanmalıdır.



## KAYNAKLAR

- [1] Vandevivere, P. C., Bianchi, R. ve Verstraete, W., "Treatment and Reuse of Wastewater from the Textile Wet-Processing Industry : Review of Emerging Technologies.", *Chem. Technol. Biotechnol.*, **72** : 289-302, (1998).
- [2] Vyas, B.R.M., Molitoris, H.P., "Involvement of an Extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Dependent Ligninolytic Activity of the White Rot fungus *Pleurotus ostreatus* in the Decolorization of Remazol Brilliant Blue R", *Applied and Environmental Microbiology*, **61** (11) : 3919-3927, (1995).
- [3] Kirby, N., Merchant, R. Ve McMullan, G., "Decolourization of Synthetic Textile Dyes by *Phlebia tremellosa*.", *FEMS Microbiology Letters*, **188**: 93-96, (2000).
- [4] Rafii, F., Franklin, W ve Cerniglia, C.E., "Azoreductase Activity of Anaerobic Bacteria Isolated from Human Intestinal Microflora.", *Applied and Environmental Microbiology*, **56**:2146-2151, (1990).
- [5] Chung, K. T. ve Stevens, S. E. Jr., "Decolorization of Azo Dyes by Environmental Microorganisms and Helminths.", *Environmental Toxicology and Chemistry*, **12** (11): 2121-2132 (1993).
- [6] Karam, J. ve Nicell, A.J., "Potantial Applications of Enzymes in Waste Treatment.", *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **69**:141-153, (1997).
- [7] Paszczynski, A., Pasti, M.B., Goszczynski, S., Crawford, D.L. ve Crawford, R.L., "New Approach to Improve Degradation of Recalcitrant azo dDes by *Streptomyces spp* and *Phanerochaete chrysosporium*.", *Enzyme Microbiology and Technology*, **13**:378-384, (1991).

- [8] The Society of Dyers and Colourists and the American Association of Textile Chemists and Colourists, Colour Index, Cilt 4, Lund Humphries, Bradford, London, (1971).
- [9] Young, L., You, J., "Ligninase-Catalysed Decolorization of Synthetic Dyes." *Water Res.* **31**: 1187-1193, (1997).
- [10] Rodriguez, E., Pickard, M.A., Vasquez-Duhalt, R., "Industrial Dye Decolorization by Laccases from Lignimolytic Fungi.", *Current Microbiol.*, **38**:27-32, (1998).
- [11] Armenante, P. M., Pal, N. ve Andowski, G. L., "Role of Mycelium and Extacellular Protein in the Biodegradation of 2,4,6-Trichlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*.", *Applied and Environmental Microbiology*, **60**(6):1711-1718, (1994).
- [12] Goszczynski, S.A., Paszczynski, M.B., Pasty-Grygsby, R.L., Crawford, D.L. and Crawford, R.L., "New Pathway for Degradation of Sulfonated Azo Dyes by Microbial Peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*.", *J. Bacterial* **176**: 1339-1347, (1994).
- [13] Ollikka, P., Alhonmaki, K., Leppaen, V., Glumoff, T., Raijola, T. ve Suonimene, L., "Decolorization of Azo, Triphenyl Methane, Heterocyclic and Polimeric Dyes by Lignin pProxidase Isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*.", *Applied and Environmental Microbiology*, **59**(12): 4010-4016, (1993).
- [14] Spadaro, J. T., Gold, M. H. and Renganathan, V., "Degradation of Azo Dyes by the Lignin Degrading Fungus *Phanerochaete chrysosporium*.", *Applied and Environmental. Microbiology*, **58**: 2397-2401, (1992).

- [15] Eggert, C., Temp, U. ve Eriksson, K. E. L., "The Ligninolytic System of the White Rot Fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and Characterization of the Laccase.", *Applied and Environmental Microbiology*, **62** (4) : 1151-1158, (1996).
- [16] Milstein, O., Hüttermann, A., Majcherczyk, A. ve Schulze, K., "Transformation of Lignin-Related Compounds with Laccase in organic Solvents.", *Journal of Biotechnology*, **30** : 37-47, (1993).
- [17] Bogan, B.W. ve Lamar, R.T., "Polycyclic Aromatic Hydrocarbon- Degrading Capabilities of *Phanerochaete leavis* HHB-1625 and its Extracellular Ligninolytic Enzymes.", *Applied and Environmental Microbiology* **62**:1597-1603, (1996).
- [18] Cripps, C., Bumpus, J. A. ve Aust, S. D., "Biodegradation of Azo and Heterocyclic Dyes by *Phanerochaete chrysosporium*.", *Applied Environmental Microbiology*, **56** (4): 1114-1118, (1990).
- [19] Paszczynski, A., Pasti-Grigsby, M. B., Goszczynski, S., Crawford, R. L. ve Crawford, D. L., "Mineralization of Sulfonated Azo dyes and Sulfanilic acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*.", *Applied Environmental Microbiology*, **58**(11): 3598-3604, (1992).
- [20] Joshi, D. K. ve Gold, M. H., "Degradation of 2,4,5-Trichlorophenol by the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*.", *Applied and Environmental Microbiology*, **59**(6):1779-1785 , (1993).
- [21] Hammel, K. E., "Mechanism for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation by Ligninolytic Fungi.", *Environmental Health Perspectives*, **103**:41-43, (1995).

- [22] Orth, A.B., Royse, D.J. ve Tien, M., "Ubiquity of Lignin Degrading Peroxidases Among Various Wood-Degrading Fungi.", *Applied and Environmental Microbiology*, **59**:4017-4023, (1994).
- [23] Collins, P. J., Field, J. A., Teunissen, P. ve Dorson, A. D. W., "Stabilization of Lignin Peroxidases in White Rot Fungi by Tryptophan.", *Applied and Environmental Microbiology*, **63**(7):2543-2548, (1997).
- [24] Chivukula, M. ve Renganathan, V., "Phenolic Azo Dye Oxidation by Laccase from *Pyricularia oryzae*.", *Applied and Environmental Microbiology*, **61**(12):4374-4377, (1995).
- [25] Yeşilada, Ö., Fıskın, K. ve Yeşilada, E., "The Use of White Rot Fungus *Funalia trogii* (Malatya) for the Decolorization and Phenol Removal from Olive Mill Wastewater.", *Environmental Technology*, **16**: 95-100, (1995).
- [26] Kim, S. J. ve Shoda, M., "Purification and Characterization of a Novel Peroxidase from *Geotrichum candidum* Dec 1 Involved in Decolorization of Dyes.", *Applied and Environmental Microbiology*, **65** (3) : 1029-1035, (1999).
- [27] Sollai, F., Curreli, N., Porcu, M. C., Rescigno, A., Rinaldi, A. C., Rinaldi, A., Rossino, P., Soddu, G. ve Sanjust, E., "Effect of Substituted Anthraquinonensand Anthrons on Laccase Production in *Pleurotus sajor caju*.", *Biochemical Archives*, **12** :7-12, (1996).
- [28] Schliephake. K. ve Lonergan, G. T. "Laccase Variation During Dye Decolorization in a 200 L Packed-Bed Bioreactor.", *Biotechnology Letters*, **18** (8) : 881-886, (1996).



- [29] Başer, İ., İnanıcı, Y., “Boyarmadde Kimyası”, Marmara Üniv. Teknik Eğitim Fakültesi, Yayın no: 2, İstanbul, 207 s., (1990).
- [30] Özcan, Y., “Tekstil elyaf ve boyama tekniği”, Fatih Yayınevi Matbaası, İstanbul, 600 s., (1978).
- [31] Robinson, Tim., McMullan, G., Marchant, R. ve Nigam, P., “Remediation of Dyes in Textile Effluent: a Critical Review on Current Treatment Technologies with a Proposal Alternative.”, *Bioresource Technology*, **77** : 247-255, (2001).
- [32] Harmer, C. ve Bishop, P., “Transformation of Azo Dye AO-7 by Wastewater Biofilms.”, *Wat. Sci. Tech.*, **26** (3-4) : 627-636, (1992).
- [33] Levine, W. G., “Metabolism of Azo Dyes: Implication for Detoxication and Activation.”, *Drug Metabolism Reviews*, **23** (3 & 4) :153-309, (1991).
- [34] Chivukula, M. ve Renganathan, V., “Phenolic Azo Dye Oxidation by Laccase from *Pyricularia oryzae*.”, *Applied and Environmental Microbiology*, **61**(12):4374-4377, (1995).
- [35] Heinfling, A., Martinez, M. J., Martinez, A. T. , Bergbauer, M. Ve Szewzyk, U., “Transformation of Industrial Dyes by Manganase Peroxidases from *Bjerkandera adusta* ve *Pleurotus eryngii* in a Manganese-Independent Reaction.”, *Applied and Environmental Microbiology*, **64**(8): 2788-2793; (1998).
- [36] Krastanov, A., “Removal of Phenols from Mixtures by Co-immobilized Laccase/Tyrosinase and Polyclaradsorption.”, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **24**:383-388, (2000).

- [37] Arora, D. S. ve Gill, P. K., "Laccase Production by some White Rot Fungi Under Different Nutritional Conditions.", *Bioresource Technology*, **73** : 283-285, (2000).
- [38] Call, H. P. ve Mücke, I., "History, Overview and Applications of Mediated Liginolytic Systems, Especially Laccase-Mediator- Systems (Lignozym-Proses).", *Journal of Biotechnology*, **53** : 163-202, (1997).
- [39] Duran, N. ve Esposito, E., "Potential Applications of Oxidative Enzymes and Phenoloxidase-Like Compounds in Wastewater and Soil treatment: a Review.", *Applied Catalysis B: Environmental*, **28** : 83-99, (2000).
- [40] Venkatadri, R. ve Irvine, R. L., "Cultivation of *Phanerochaete chrysosporium* and Production of Lignin Peroxidase in Novel Biofilm Reactor Systems: Hollow Fiber Reactor and Silicone Membrane Reactor." *Water Research*, **27** : 591-596, (1993).
- [41] Pasti-Grigsby, M. B., Paszcynski, A., Goszczynski, S., Crawford, D. L. Ve Crawford, R.L., "Influence of Aromatic Substitution Patterns on Azo dye Degradability by *Streptomyces spp.* and *Phanerochaete chrysosporium.*", *Applied and Environmental Microbiology*, **58**(11): 3605-3613, (1992).
- [42] Mester, T. Ve Tien, M., "Oxidation Mechanism of Ligninolytic Enzymes Involved in the Degradation of Environmental Pollutants.", *International Biodeterioration & Biodegradation*, **46**:51-59, (2000).
- [43] Heinfling, A., Martinez, M. J., Martinez, A. T. , Bergbauer, M. Ve Szewzyk, U., "Purification and Characterization of Peroxidases from the Dye-decolorizing Fungus *Bjerkandera adusta.*", *FEMS Microbiology Letters*, **165**:45-50, (1998).

- [44] Koduri, R. S. ve Tien, M., "Oxidation of Guaiacol by Lignin Peroxidase – Role of Veratryl Alkol.", *The Journal of Biological Chemistry*, **270** (38): 22254-22258, (1995).
- [45] Faison, B. D. ve Kirk, T. K., "Factors Involved in the Regulation of a Ligninase Activity in *Phanerochaete chrysosporium*.", *Applied and Environmental Microbiology*, **49** (2) : 299-304, (1985).
- [46] Schmidt, H. W. H., Haemmerli, S. D., Schoemaker, H. E. ve Leisola, M. S. A., "Oxidative Degradation of 3,4-Dimetosibenzil Alkol ve Its Methil Ether by the Lignin Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*.", *Biochemistry*, **28** : 1776-1783, (1989).
- [47] Linko, S., "Production of *Phanerochaete chrysosporium*.", *Lignin peroxidase.*", *Biotech. Adv.*, **10** : 191-236, (1992).
- [48] Fullbrook, P. D., "Practical Applied Kinetics.", Godfrey, T. ve West, S., *Industrial Enzymology*, Second Edition, Stockton Press, New York, 483-500(1996).
- [49] Shin, K. S., Oh, I. K. ve Kim, C. J., "Production and Purification of Remazol Brilliant Blue R Decolorizing Peroxidase from the Culture filtrate of *Pleurotus ostreatus*.", *Applied and Environmental Microbiology*, **63**(5): 1744-1748, (1997).
- [50] Cauto S. R., Rivela, I., Munoz, M. R. ve Sanroman, A., "Stimulation of Ligninolytic Enzyme Production and the Ability to Decolorise Poly R-478 in Semi-Solid-State Cultures of *Phanerochaete chrysosporium*.", *Bioresource Technology*, **74** : 159-164, (2000).

- [51] Bollag, J. M., Shuttleworth, K. L. ve Anderson, D. H., "Laccase - Mediated Detoxification of Phenolic Compounds.", *Applied Environmental Microbiology*, **54** : 3086-3091, (1988).
- [52] Majcherczyk, A., Johannes, C. ve Hüttermann, A., "Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) by Laccase of *Trametes versicolor*.", *Enzyme and Microbial Technology*, **22**:335-341, (1998).
- [53] Kersten, P. J., Kalyanaraman, B., Hammel, K. E. ve Reinhammar, B., "Comparison of Lignin Peroxidase, Horseradish Peroxidase and Laccase in the Oxidation of Methoxibenzenes.", *Biochem J.*, **268**:475-480, (1990).
- [54] Hammel, K. E., Kalyanaraman, B. ve Kirk, T. K., "Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Dibenzo[*p*]-dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* Ligninase.", *The Journal of Biological Chemistry*, **261**(36):16948-16952, (1986).
- [55] Johannes, C. ve Majcherczyk, A., "Natural Mediators in the Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Laccase Mediator Systems.", *Applied and Environmental Microbiology*, **66**(2):524-528, (2000).
- [56] Garzillo, A. M. V., Colao, M. C., Caruso, C., Caporale, C., Celetti, D. ve Buonocore, V., "Laccase from the White Rot Fungus *Trametes trogii*.", *Applied Microbiology and Biotechnology*, **49** : 545-551, (1998).
- [57] Guillen, F., Munoz, C., Toribio, V. G., Martinez, A. T., "Oxygen Activation During Oxidation of Methoxyhydroquinones by Laccase from *Pleurotus eryngii*.", *Applied and Environmental Microbiology*, **66** : 170-175, (2000).
- [58] Ardon, O., Kerem, Z. ve Hadar, Y., "Enhancement of Lignin Degradation and Laccase Activity in *Pleurotus ostreatus* by Cotton Stalk Extract.", *Canadian Journal of Microbiology*, **44** : 676- 680, (1998).

- [59] Johannes, C. ve Majcherczyk, A., "Laccase Activity Tests and Laccase Inhibitors.", *Journal of Biotechnology*, **78** :193-199, (2000).
- [60] Bollag, J. M. ve Leonowicz, A., "Comparative Studies of Extracellular Fungal Laccases.", *Applied and Environmental Microbiology*, **48** (4) : 849-854, (1984).
- [61] Groggins, P. H., "Kimya Endüstrisinde Organik Prosesler 1 – Organik Sentezlerde Ünit Prosesler", İnkılap ve Aka Basımevi, İstanbul, 627 s, (1977).
- [62] Erarslan, A., *Enzim Kinetiği, Enzim Mühendisliğinde Temel Konular ve Uygulamalar*. TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi, (1997)
- [63] Abadulla, E., Tzanov, T., Costa, S., Robra, K. H., Paulo, A. C. Ve Gübitz, G. M., "Decolorization and Detoxification of Textile Dyes with Laccase from *Trametes hirsuta*.", *Applied and Environmental Microbiology*, **66** (8): 3357-3362, (2000).
- [64] Podgornik, H., Grgic, I. ve Perdih, A., "Decolorization Rate of Dyes Using Lignin Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*.", *Chemospher*, **38**: 1353-1359, (1999).
- [65] Palmer, T., "Enzim Bilgisi" Bilimsel ve Teknik Yayınları Çeviri Vakfı, İstanbul, 527 s, (1994).
- [66] Fullbrook, P. D., "Practical Limits and Prospects (Kinetics).", Godfrey, T. ve West, S., "Industrial Enzymology", Second Edition, Stockton Press, New York, 483-500(1996).
- [67] Wong, Y. ve YU, J., "Laccase-Catalysed Decolorization of Synthetic Dyes.", *Water Research*, **33**(16):3512-3520, (1999).

- [68] Rogalski, J., Lundell, T., Leonowicz, A. ve Hatakka A., "Production of Laccase, Lignin Peroxidase and Manganese- Dependent Peroxidase by Various Strains of *Trametes versicolor* Depending on Culture Conditions.", *Acta Microbial. Polon.*, **40**:221-234, (1991).
- [69] Schliephake, K., Mainwaring, D.E., Lonergan, G.T., Jones, I.K. ve Baker, W.L., "Transformation and Degradation of the Disazo Dye Chicago Sky Blue by Purified Laccase from *Pycnoporus cinnabarinus*." *Enzyme and Microbiol. Technology*, **27**: 100-107, (2000).
- [70] Tatarko, M. ve Bumpus, J. A., "Biodegradation of Congo Red by *Phanerochaete chrysosporium*.", *Water Research*, **32** (5) : 1713-1717, (1998).
- [71] Dey, S., Maiti, T. K. ve Bhattacharyya, B. C., "Production of Some Extracellular Enzymes by a Lignin Peroxidase-Producing Brown Rot Fungus *Polyporus ostreiformis*, and Its Comparative Abilities for Lignin Degradation and Dye Decolorization.", *Applied and Environmental Microbiology*, **60** (11) : 4216-4218, (1994).
- [72] Cao, W., Mahadevan, B., Crawford, D. L. ve Crawford, R. L., "Characterization of an Extracellular Azo Dye – Oxidizing Peroxidase from *Flavobacterium* sp ATCC 39723.", *Enzyme Microb. Technol.* **15** : 810-816, (1993).
- [73] Schliephake, K., Lonergan, G. T., Jones, C. L. ve Mainwaring, D. E., "Decolorization of a Pigment Plant Effluent by *Pycnoporus cinnabarinus* in a Packed-Bed Bioreactor.", *Biotechnology Letters*, **15** (11) : 1185-1188, (1993).
- [74] Cookson, L. J., "Reliability of Poly B-411 a Polymeric Anthraquinone-Based Dye, in Determining the Rot Type Caused by Wood-Inhabiting Fungi.", *Applied and Environmental Microbiology*, **61** (2) : 801-803, (1995).

- [75] Archibald, F.S., "A New Assay for Lignin-type Peroxidases Employing the Dye Azure B.", *Applied and Environmental Microbiology*, **58** (9): 3110-3116, (1992).
- [76] Kadhim, H., Graham, C., Baratt, P., Evans, C. S. ve Rastall, R. A., "Removal of Phenolic Compounds in Water Using *Coriolus versicolor* Grown on Wheat Bran.", *Enzyme and Microbial Technology*, **24**: 303-307, (1999).
- [77] Rogalski, J., Dawidowicz, A., Jozwik, E. ve Leonowicz, A., "Immobilization of Laccase from *Cerrene unicolor* on Controlled Porosity Glass.", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **6** : 29-39, (1999).
- [78] Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Zeigenhagen, D., Wasilewska, M. W., Cho, N. S. ve Hofrichter, M., "Biodegradarion of Lignin by White Rot Fungi.", *Fungal Genetics and Biology*, **27** : 175-185, (1999).
- [79] Deveci, T., "Lakkaz, Peroksidaz ve Katalaz Enzimlerinin Katı Faz Fermantasyon Tekniği ile Beyaz Çürükcül Funguslar Tarafından Üretilmesinin Araştırılması.", Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniv., Mersin, 112 s., (2001).
- [80] Morgan, P., Lewis, S.T. ve Watkinson, R.J., "Comparison of Abilities of White Rot Fungi to Mineralize Selected Xenobiotics Compounds.", *Applied Microbiology and Biotechnology*, **34**: 693-696, (1991).
- [81] Hoff, T., Liu, S. Y. Ve Bollag, j. M., "Transformation of Halogen-, Alkyl- and Alkoksyl- Substituted Anilines by a Laccase of *Trametes versicolor*.", *Applied and Environmental Microbiology*, **49** (5): 1040-1045, (1985).
- [82] Donlagic, J. ve Yevec, J., "Comparison of Catalysed and Noncatalysed Oxidation of Azo Dye and Effect on Biodegradability.", *Environmental Science & Technology*, **31** (9) : 1294-1302, (1998).

- [83] Aitken, M. D., Massey, I. J., Chen, T. ve Heck, P. E., "Characterization of Reaction Products from Enzyme Catalysed Oxidation of Phenolic Ollutants.", *Water Research*, **28** : 1879-1889, (1994).
- [84] Massey. I. J., Aitken, M. D., Ball, L. M. ve Heck, P. E., "Mutagenicity Screening of Reaction Products from the Enzyme-Catalysed Oxidation of Phenolic Pollutants.", *Environmental Toxicology and Chemistry*, **11** : 1743-1752, (1994).





## ÖZGEÇMİŞ

1956 yılında Adana'da doğdum. 1973'de Tarsus Endüstri Meslek Lisesi Kimya Bölümü'nden mezun oldum. 1973-1974 yıllarında Etibank Seydişehir Alüminyum Tesisleri'nde kimya teknisyeni olarak çalıştım. 1975 yılında Yıldız Teknik Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Kimya Mühendisliği eğitimine başladım ve 1979 yılında mezun oldum.

1980 yılında Çukobirlik Merkez Yağ Fabrikası'nda çalışmaya başladım. 1985 yılında Çukobirlik Boya Basma Fabrikası'na geçtim ve burada çeşitli görevlerde bulunduktan sonra 1997 yılında İşletme Müdürü iken istifa ederek, Alateks Tekstil Sanayi ve Ticaret A.Ş. Boya Apre Tesisleri'nde Fabrika Müdürü olarak çalışmaya başladım.

1998 yılında Park Tekstil Sanayi ve Ticaret A.Ş.'inde Boyama Müdürü, 1999'da ise Beybo Boya Sanayi A.Ş.'inde Boyama ve Proses Kontrol Müdürü olarak görev yaptım.

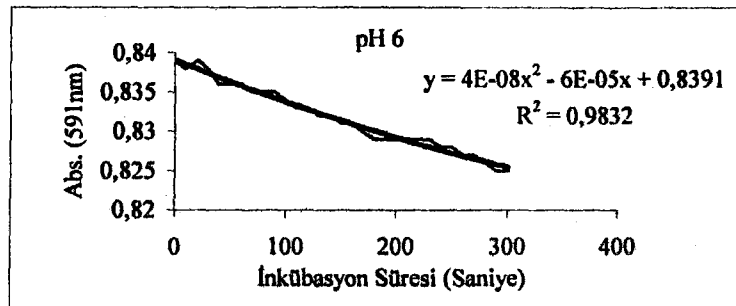
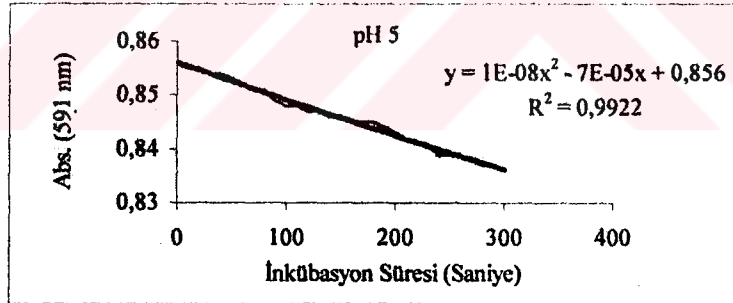
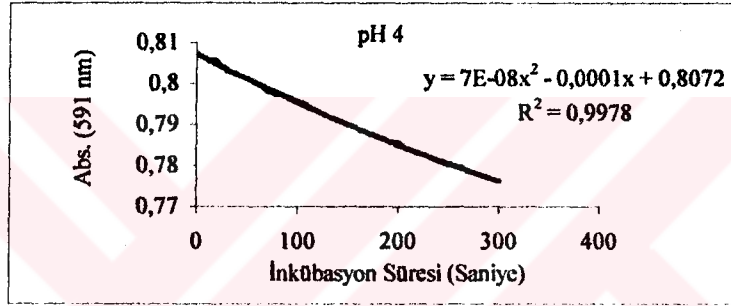
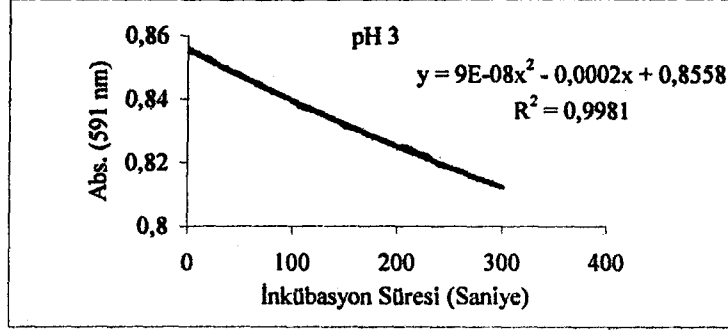
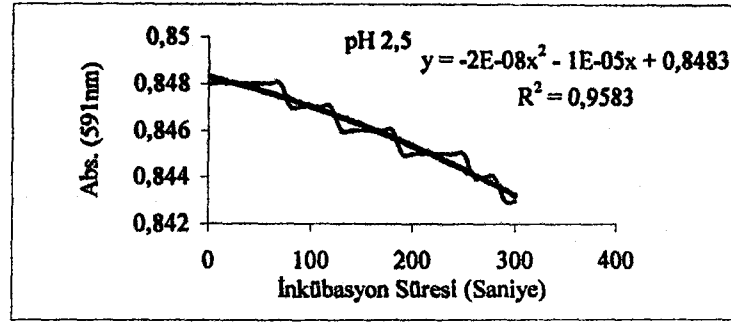
Halen Mersin Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Çevre Mühendisliği Bölümünde Yüksek Lisans yapmaktayım ve tez çalışmalarını yürütmekteyim.

1998 yılında Sosyal Sigortalar Kurumu'ndan emekli oldum. İyi derecede İngilizce bilmekteyim. Evli ve bir çocuk babasıyım.

## EKLER

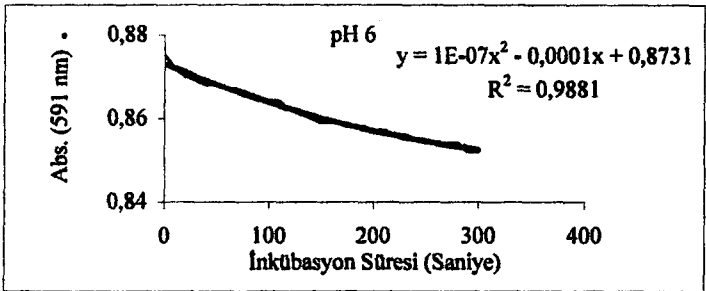
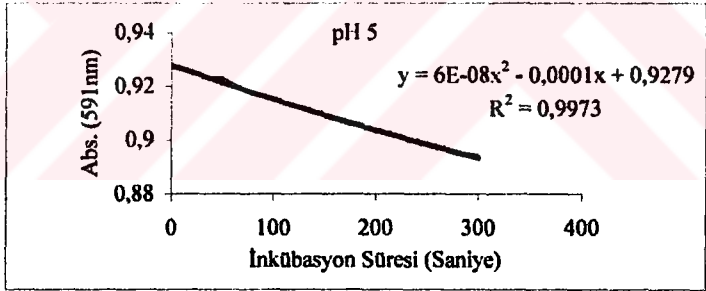
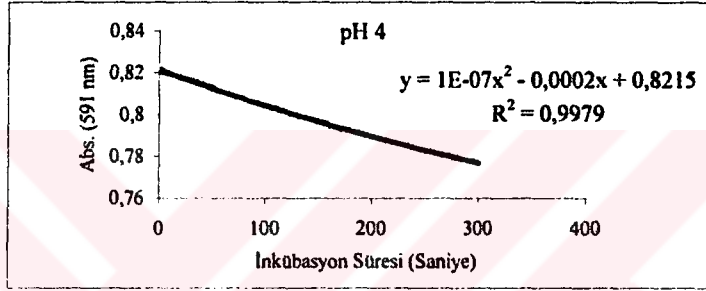
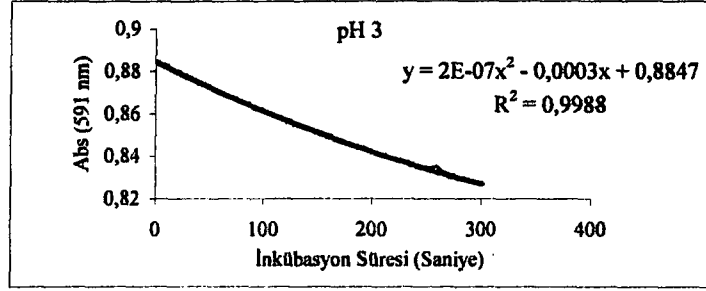
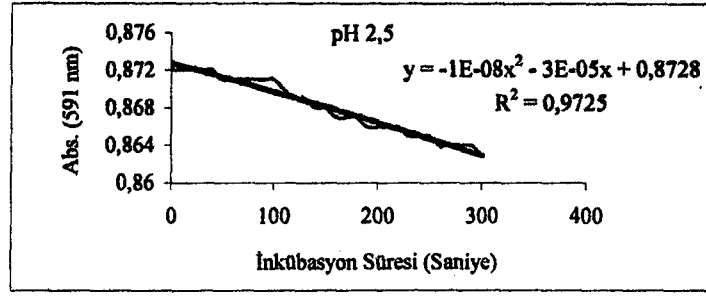
EK 1: EBBRSP'nin 30 <sup>0</sup> C'de farklı pH'larda (2,5, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0) renk gideriminde absorbans değişimi ve matematiksel ifadeleri (100 mg/L boyarmadde, 100 µL kültür filtratı).....	86
EK 2: EBBRSP'nin 40 <sup>0</sup> C'de farklı pH'larda (2,5, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0)renk gideriminde absorbans değişimi ve matematiksel ifadeleri (100 mg/L boyarmadde, 100 µL kültür filtratı).....	87
EK 3: EBBRSP'nin 50 <sup>0</sup> C'de farklı pH'larda (2,5, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0) renk gideriminde absorbans değişimi ve matematiksel ifadeleri (100 mg/L boyarmadde, 100 µL kültür filtratı).....	88
EK 4: Farklı miktarlarda kültür filtratının (50, 100, 150, 200 µL) EBBRSP boyarmaddesinin (50 mg/L) renk giderimi üzerine etkisi (pH 3, 40 <sup>0</sup> C).....	89
EK 5: Farklı miktarlarda kültür filtratının (50, 100, 150, 200 µL) EBBRSP boyarmaddesinin (75 mg/L) renk giderimi üzerine etkisi (pH 3, 40 <sup>0</sup> C).....	90
EK 6: Farklı miktarlarda kültür filtratının (50, 100, 150, 200 µL) EBBRSP boyarmaddesinin (100 mg/L) renk giderimi üzerine etkisi (pH 3, 40 <sup>0</sup> C).....	91

## EK 1



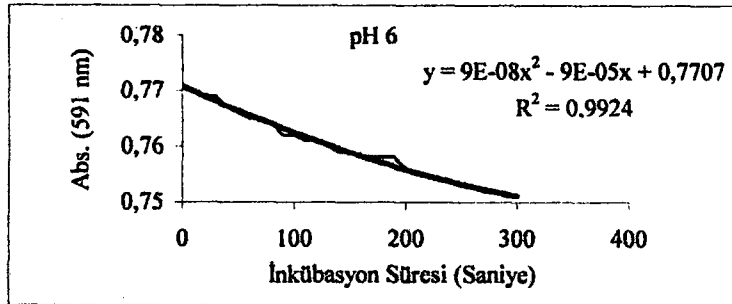
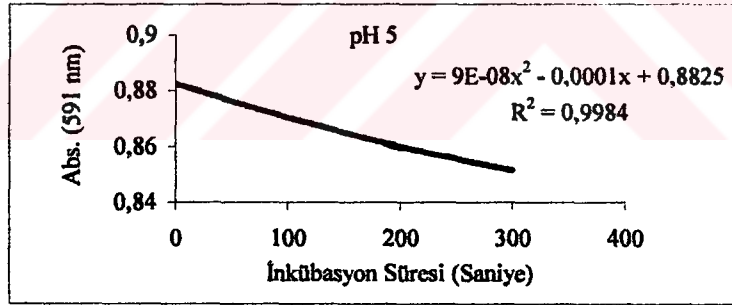
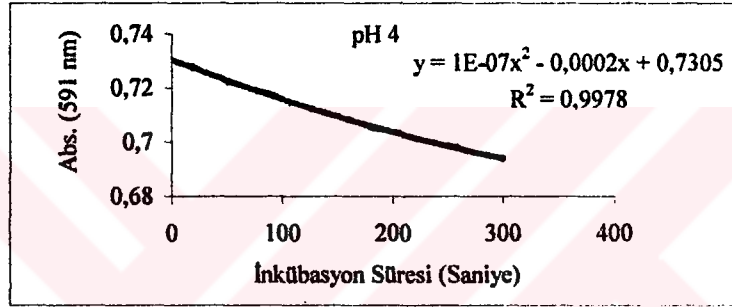
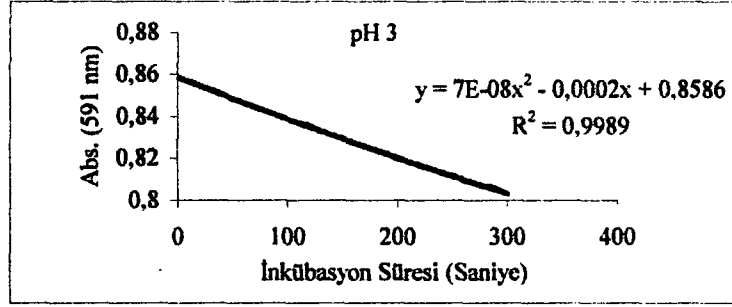
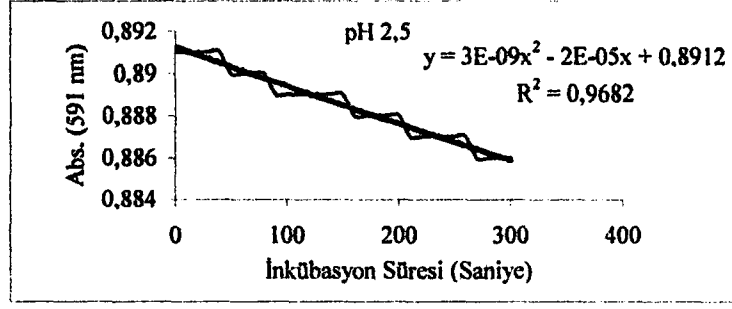
EBBRSP'nin 30°C'de farklı pH'larda (2,5, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0) renk gideriminde absorbanst değişimi ve matematiksel ifadeleri (100 mg/L boyarmadde, 100 µL kültür filtratı).

## EK 2



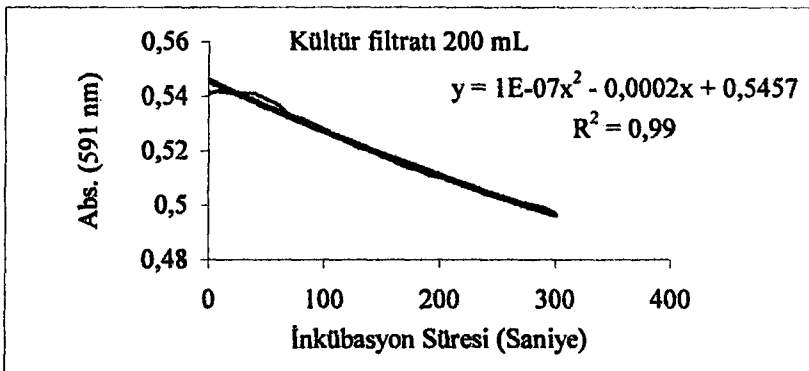
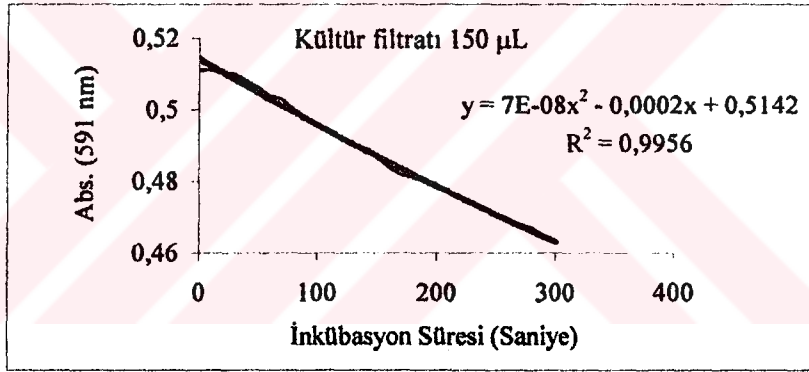
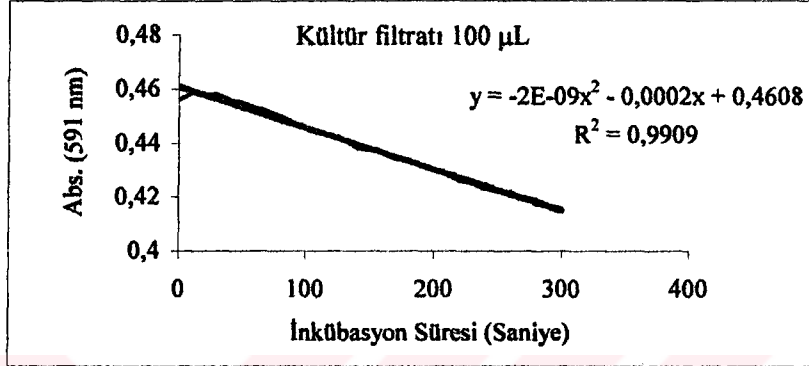
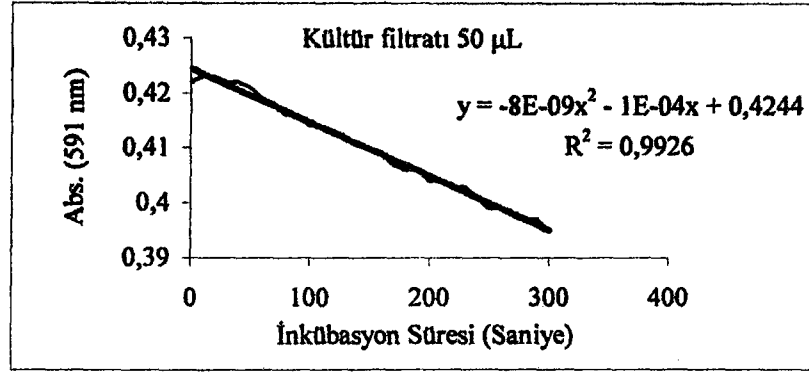
EBBRSP'nin 40°C'de farklı pH'larda (2,5; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0) renk gideriminde absorbans değişimi ve matematiksel ifadeleri (100 mg/L boyarmadde, 100 µL kültür filtratı).

EK 3



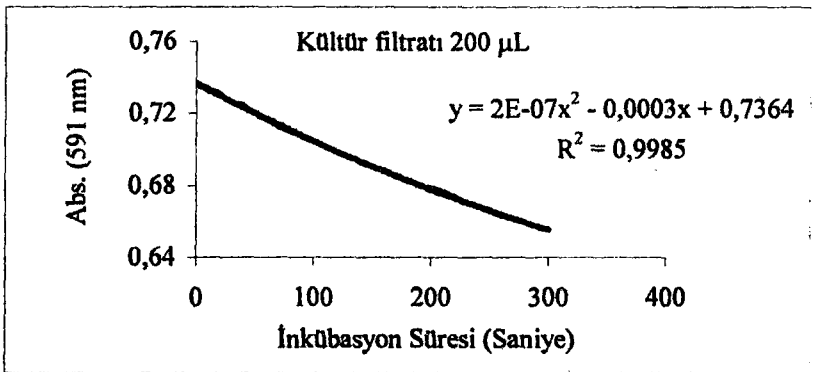
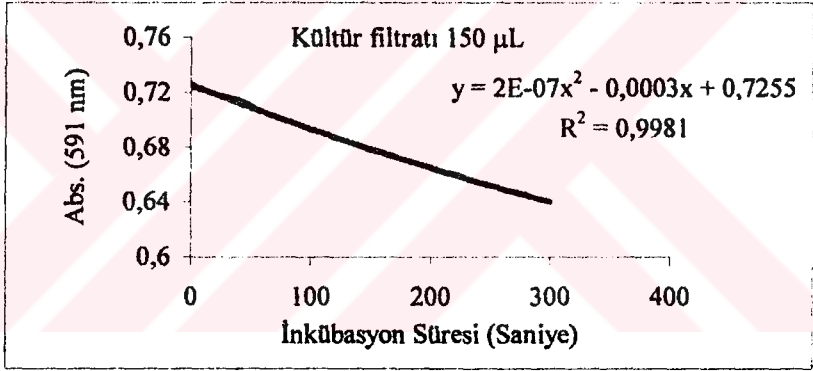
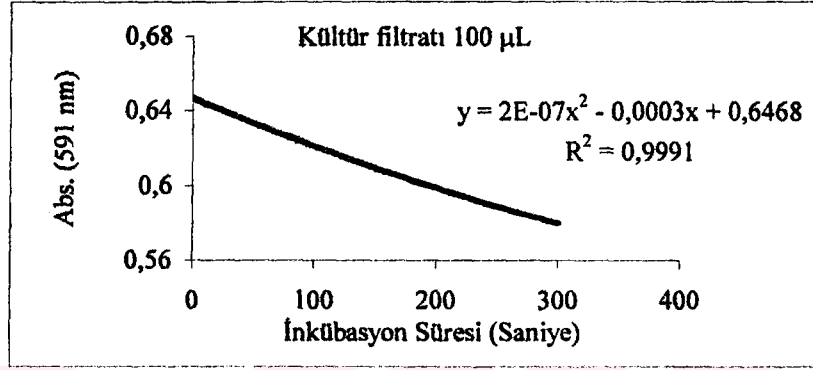
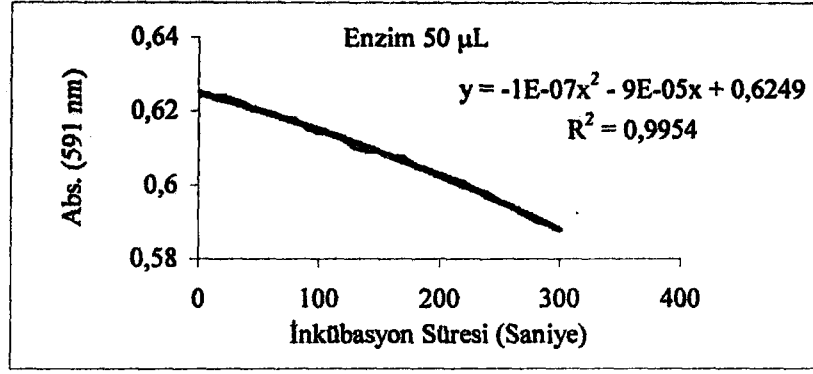
EBBRSP'nin 50°C'de farklı pH'larda (2,5; 3; 4; 5; 6) renk gideriminde absorbans değişimi ve matematiksel ifadeleri (100 mg/L bm., 100 µL kültür filtratı).

## EK 4

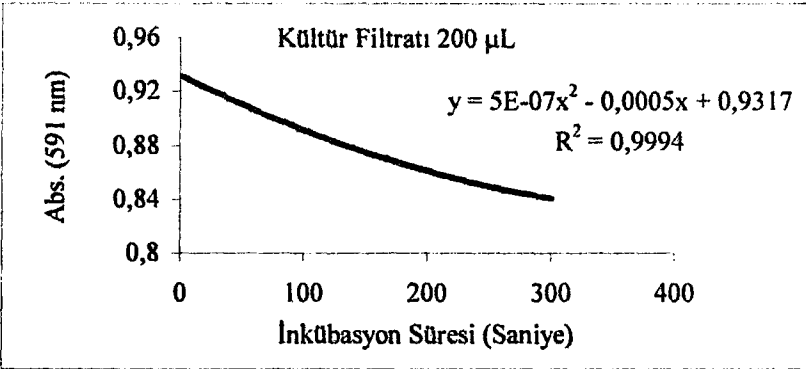
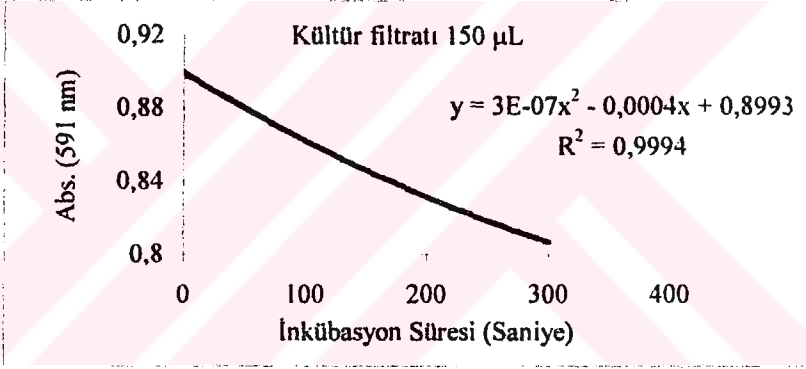
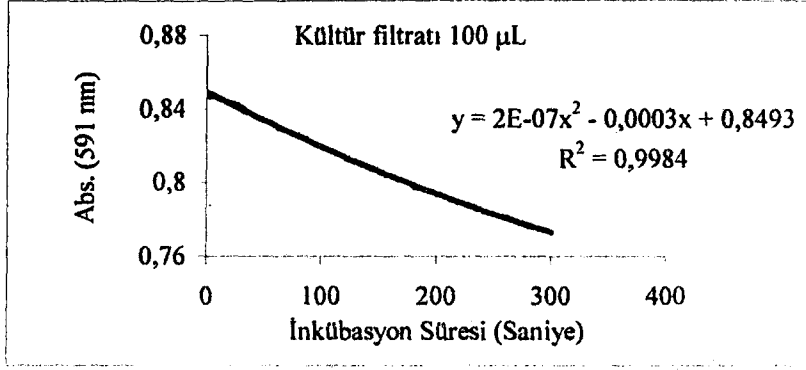
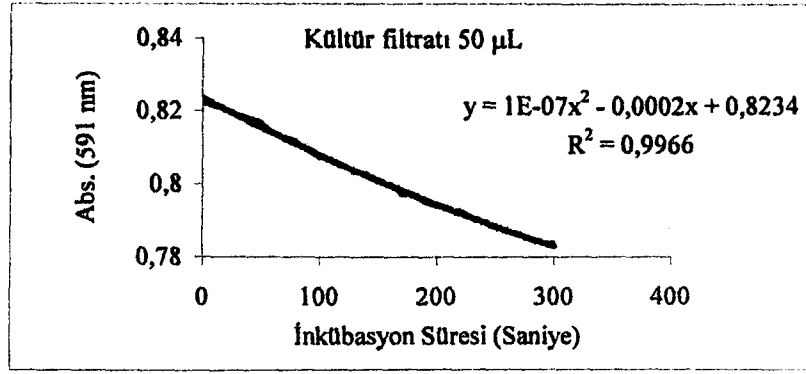


Farklı miktarlarda kültür filtratının (50, 100, 150, 200 µL) EBBRSP boyarmaddesinin (50 mg/L) renk giderimi üzerine etkisi ( pH 3, 40°C)

EK 5



Farklı miktarlarda kültür filtratının (50, 100, 150, 200  $\mu$ L) EBBRSP boyarmaddesinin (75 mg/L) renk giderimi üzerine etkisi (pH 3, 40°C)



Farklı miktarlarda kültür filtratının (50, 100, 150, 200 mL) EBBRSP boyarmaddesinin (100 mg/L) renk giderimi üzerine etkisi (pH 3, 40°C)