

***Trametes versicolor* TARAFINDAN SENTEZLENEN  
BİYOPOLİMERE TUTUKLU LAKKAZ ENZİMİNİN BAZI  
ENDÜSTRİYEL UYGULAMALARININ ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF SOME INDUSTRIAL APPLICATIONS  
OF THE LACCASE ENZYME IMMOBILIZED ON THE  
BIOPOLYMER SYNTHESIZED BY *Trametes versicolor***

**ASİYE EVREN ÇAMUR**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin  
BİYOLOJİ (BİYOTEKNOLOJİ) Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

DOKTORA TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2010

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **BİYOLOJİ (BİYOTEKNOLOJİ) ANABİLİM DALI'nda DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan :.....  
(Prof. Dr. Nilüfer AKSÖZ)

Üye (Danışman) :.....  
(Prof. Dr. Nazif KOLANKAYA)

Üye :.....  
(Prof. Dr. Emir CANSUNAR)

Üye :.....  
(Prof. Dr. Münevver ARISOY)

Üye :.....  
(Prof. Dr. Aysun ERGENE)

ONAY

Bu tez ...../...../..... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Adil DENİZLİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

# ***Trametes versicolor* TARAFINDAN SENTEZLENEN BİYOPOLİMERE TUTUKLU LAKKAZ ENZİMİNİN BAZI ENDÜSTRİYEL UYGULAMALARININ ARAŞTIRILMASI**

**Asiye Evren ÇAMUR**

## **ÖZ**

Toplumlar, gerek refah seviyelerini arttırmak gerekse endüstriyel alanda sahip oldukları rekabet gücünü kaybetmemek amacıyla hem daha ucuz hem daha kaliteli ürünler üretmek zorundadırlar. Bu amaçla, günümüzde daha hızlı, ucuz, güvenilir ve basit teknolojilerin geliştirilmesi ve endüstride uygulanabilirliğinin araştırılması büyük bir önem taşımaktadır.

Günümüzde pek çok sanayi tarafından doğal ortama verilen poliaromatik fenollü bileşikler, azoboyalar, klorofenoller gibi toksik ve çevre açısından büyük öneme sahip bileşikler yeryüzünde her geçen gün kullanım oranlarındaki artışa bağlı olarak birikim yaratmaktadır. Artan nüfusun da etkisiyle böyle potansiyel kirleticilerin ortamdaki uzaklaştırılması artık ciddi bir sorun haline almıştır. Fenol oksidaz grubu enzimlerden olan lakkaz, tüm bu zararlı maddelerle mücadelede başarılı bir şekilde denenmiş ve uygulanmış bir enzimdir.

Bu tez kapsamında, *Trametes versicolor*'dan üretilen,  $\beta$ -glukan bağ yapılı ekstraselüler polisakkarit yapısındaki biyopolimere tutuklanmış lakkaz enziminin fenol ve boya kökenli kirleticilerin arıtımında kullanılabilirliği araştırılmıştır. İlk kez laboratuvarlarımızda üretimi gerçekleştirilmiş olan bu ekstraselüler biyopolimer, lakkaz enziminin doğal destek materyali olarak işlev görmektedir. Bu amaçla gerçekleştirilen optimizasyon deneyleri sonucunda, lakkaz enzimi için optimum koşullar olan 37<sup>0</sup>C'de ve 140 rpm çalkalama hızında 5,3U enzim aktivitesine sahip serbest lakkaz enzimi 6 saatlik inkübasyonun sonunda 100ppm fenolü %65 oranında, polimere tutuklu lakkaz enzimi (0,34mg protein/g polimer) 24 saatlik inkübasyonun sonunda 50 ppm fenolü %48 oranında yıkıma uğratmıştır.

Optimizasyon çalışmalarımızda, optimize koşullarda 37<sup>0</sup>C'de, 24 saatlik inkübasyonun ardından 2ppm Indigo carmine, Methyl red, Congo red, Orange G ve Orange II boyası 15,28 U enzim aktivitesine sahip serbest lakkaz enzimiyle sırasıyla %85, %66, %50, %55 ve %81 oranlarında dekolorize olmuştur. Biyopolimere tutuklanmış enzimle gerçekleştirilen 2 günlük inkübasyon sonucunda

ise 37<sup>0</sup>C'de 1ppm konsantrasyonundaki boyların sırasıyla %69, %48, %45, %46 ve %50 oranlarında dekolorize olduğu gözlenmiştir.

Elde ettiğimiz bu sonuçlar biyopolimere tutuklu halde üretimi gerçekleştirilen lakkaz enzimi ile etkili ve düşük maliyetle fenol ve renk gideriminin sağlanabileceği gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Trametes versicolor*, Lakkaz; Biyopolimer; Tutuklanmış enzim; Fenol yıkımı; Renk giderimi.

**Danışman:** Prof.Dr. Nazif KOLANKAYA, Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

# **INVESTIGATION OF SOME INDUSTRIAL APPLICATIONS OF THE LACCASE ENZYME IMMOBILIZED ON THE BIOPOLYMER SYNTHESIZED BY *Trametes versicolor***

**Asiye Evren ÇAMUR**

## **ABSTRACT**

Societies have to produce cheaper products having more quality in order to enhance their comfort and not to lose market share of their industries. Today, for this purpose, development and application of technologies which are faster, cheaper, safe and simple is getting more important.

Today, compounds that are toxic and having environmental importance such as polyaromatic phenolics, azodyes, and chlorophenols are produced and released to the natural environment by so many industrial facilities and they are accumulated depending on their increasing utilization more and more. Through the growing population the removal of these potential contaminants becomes a serious environmental problem. Laccase, a phenol-oxidase enzyme, is successfully tested and applied in this warfare against these hazardous contaminants.

This thesis includes the investigation of removal of contaminants like phenolics and dyes from wastewaters with the laccase enzyme immobilized on the biopolymer, which has  $\beta$ -glucan bound structure and an extracellular polysaccharide, synthesized by *Trametes versicolor*. This new extracellular biopolymer contains immobilized laccase enzyme and serves as a natural support material. The immobilization of laccase enzyme occurs in the growth medium of *Trametes versicolor* by adsorption of the enzyme on natural biopolymer formed by the organism extracellularly.

The optimization experiments showed that, after 6 hours of incubation in rotationally shaking incubator adjusted to 140 rpm shaking speed and 37°C temperature, 65% of phenol was degraded with 5,3U of free laccase. With immobilized laccase enzyme (0,34mg protein/g polymer) %48 of phenol at 50 ppm was degraded after 24 hours of incubation.

In optimum conditions, at 37°C temperature and after 24 hours of incubation, 2ppm of Indigo carmine, Methyl red, Congo red, Orange G and Orange II showed 85%, %66, %50, %55, and %81 decolorization rates respectively with 15,28U of free laccase enzyme. For the immobilized laccase enzyme on biopolymer (0,3mg protein/g polymer), incubation after 2 days at 37°C temperature, 1ppm of dyes were found to be %69, %48, %45, %46 and %50 decolorized respectively.

These results suggest that cost effective and efficient removal of phenol and color can be achieved by production of laccase enzyme immobilized on a biopolymer.

**Keywords:** *Trametes versicolor*; Laccase; Biopolymer; Immobilized enzymes; Phenol degradation; Decolorization.

**Advisor:** Prof.Dr. Nazif KOLANKAYA, Hacettepe University, Science Faculty, Department of Biology, Division of Biotechnology

## TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının planlanması ve gerçekleşmesindeki yardımlarının yanı sıra, akademik hayatımın başından bugüne kadar esirgemediği desteğiyle her zaman yanımda olan değerli hocam, Sayın **Prof. Dr. Nazif KOLANKAYA**'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımıdaki yardımlarından ve değerli dostluklarından dolayı sevgili arkadaşlarım **Doç Dr. Ahmet ÇABUK**, **Dr. Dilek CANDAN**, **Dr. Mesut ŞAM** ve **Dr. Özgür KEBABCI**'ya ve ayrıca destekleriyle yanımda olan anabilim dalımızdaki diğer hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Beni bugünlere getiren canım annem **Bilge EKEN** ve babam **Mustafa EKEN**'e ve manevi desteğiyle yanımdan hiç ayrılmayan sevgili kardeşim **Fulden EKEN**'e minnettarlıklarımı sunarım.

Akademik çalışma hayatım boyunca yardımları ve desteği ile her zaman yanımda olan sevgili eşim **Koray ÇAMUR**'a ve tabii ki, yaşam kaynağım, canım kızım **Ayça ÇAMUR**'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezim, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından **06D03601003** No'lu destek projesi olarak desteklenmiştir. Bu desteklerinden dolayı üniversitemizin Bilimsel Araştırmalar Birimi'ne teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER DİZİNİ

## Sayfa

ÖZ .....	ii
ABSTRACT .....	iv
TEŞEKKÜR .....	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ .....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	x
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİ .....	3
2.1. Lakkaz (E.C.1.10.3.2) .....	3
2.1.1. Lakkaz enziminin endüstriyel ve biyoteknolojik uygulama alanları .....	6
2.1.1.1. Endüstriyel-teknik uygulamalar .....	8
2.1.1.2. Nanobiyoteknoloji .....	12
2.1.1.3. Çevre koruma uygulamaları .....	13
2.1.1.4. Organik bileşiklerin sentezi .....	15
2.1.1.5. Tıbbi ve kişisel bakım ürünleri .....	15
2.2. Tutuklanmış Lakkaz Enzimi .....	17
2.3. Biyopolimerler .....	18
2.3.1. Fungal biyopolimerler ve kullanım alanları .....	21
2.3.1.1. Schizophyllan .....	22
2.3.1.2. Pullulan .....	22
2.3.1.3. Lentinan .....	23
2.3.1.4. <i>Trametes versicolor</i> Proteoglikanları .....	23
2.4. Beyaz Çürükçül Funguslarla Boya Dekolorizasyonu .....	24
2.5. Çalışmada Kullanılan Boyaların Sınıflandırılması .....	28
2.5.1. Azo boyalar .....	28
2.5.1.1. Congo Red (Kongo Kırmızısı) .....	28
2.5.1.2. Orange II .....	29
2.5.1.3. Acid red 2 .....	29
2.5.1.4. Orange G .....	30
2.5.2. İndigo Boyalar .....	30
2.5.2.1. Indigo carmin .....	31
2.6. Günümüzde Boyaların Dekolorizasyonunda Kullanılan Teknolojiler .....	31
2.6.1. Aktif karbon .....	31
2.6.2. Flokülasyon ve elektro-koagülasyon .....	32
2.6.3. Fenton ayırıcı .....	32
2.6.4. Ozonizasyon .....	32
2.6.5. Aktif çamurla boya dekolozasyonu .....	33
2.6.6. Anaerobik boya dekolozasyonu .....	33
2.7. Beyaz Çürükçül Funguslarla fenol Degradasyonu .....	33
2.7.1. Fenol Bileşikleri .....	33
3. YÖNTEM VE GEREÇLER .....	35
3.1. Çalışmalarda Kullanılan Mikroorganizma .....	35
3.2. Lakkaz Üretimi İçin Besiyerinin Hazırlanması .....	35
3.3. Ekim ve Kültürasyon .....	35
3.4. Biyopolimerlerin Kültür Ortamından Elde Edilmesi .....	36
3.5. Lakkaz Aktivitesinin Ölçülmesi .....	38



3.6. Lakkaz Enzimi İle Bazı Endüstriyel Boyaların Dekolorizasyonu.....	39
3.6.1. Boya çözeltilerinin hazırlanması .....	39
3.6.2. İnkübasyon süresinin serbest enzimle dekolozasyon üzerine etkisi .....	39
3.6.3. Serbest Enzim miktarının dekolozasyon üzerine etkisi .....	40
3.6.4. Başlangıç boya konsantrasyonunun serbest enzimle dekolozasyon üzerine etkisi .....	40
3.7. Tutuklanmış Lakkaz Enzimiyle Bazı Endüstriyel Boyaların Dekolorizasyonu	41
3.7.1. Boya çözeltilerinin hazırlanması .....	41
3.7.2. İnkübasyon süresinin tutuklanmış enzimle dekolozasyon üzerine etkisi	41
3.7.3. Tutuklanmış enzim miktarının dekolozasyon üzerine etkisi .....	42
3.7.4. Başlangıç boya konsantrasyonunun tutuklanmış enzimle dekolozasyon üzerine etkisi .....	42
3.8. Serbest Lakkaz Enzimi ile Fenol Yıkımı .....	42
3.8.1. Fenol stok çözeltilisinin hazırlanması .....	42
3.8.2. Toplam fenol miktarının ölçülmesi.....	42
3.8.3. İnkübasyon süresinin serbest enzimle fenol yıkımına etkisi.....	43
3.8.4. Serbest enzim miktarının fenol yıkımına etkisi.....	44
3.8.5. Başlangıç fenol konsantrasyonunun serbest enzimle fenol yıkımına etkisi	44
3.9. Tutuklanmış Lakkaz Enzimiyle Fenol Yıkımı .....	45
3.9.1. Fenol stok çözeltilisinin hazırlanması .....	45
3.9.2. İnkübasyon süresinin tutuklanmış enzimle fenol yıkımına etkisi .....	45
3.9.3. Tutuklanmış enzim miktarının fenol yıkımına etkisi.....	45
3.9.4. Başlangıç fenol miktarının tutuklanmış enzimle fenol yıkımına etkisi .....	46
3.10. Biyopolimere Tutuklu Enzim Stabilitesinin Saptanması .....	46
4. SONUÇLAR .....	47
4.1. Lakkaz Enzimi ile Bazı Endüstriyel Boyaların Dekolorizasyonu .....	47
4.1.1. İnkübasyon süresinin serbest enzimle dekolozasyon üzerine etkisi .....	47
4.1.2. Serbest enzim miktarının dekolozasyon üzerine etkisi .....	48
4.1.3. Başlangıç boya konsantrasyonunun serbest enzimle dekolozasyon üzerine etkisi .....	49
4.2. Biyopolimere Tutuklu Enzim Miktarının Ölçülmesi .....	51
4.3. Tutuklanmış Lakkaz Enzimi ile Bazı Endüstriyel Boyaların Dekolorizasyonu	52
4.3.1. İnkübasyon süresinin tutuklanmış enzimle dekolozasyon üzerine etkisi	52
4.3.2. Tutuklanmış enzim miktarının dekolozasyon üzerine etkisi .....	53
4.4. Serbest Enzim ve Tutuklu Enzim (Polimere Tutuklu) ile Renk Gideriminin Karşılaştırılması .....	56
4.5. Serbest Lakkaz Enzimiyle Fenol Yıkımı .....	57
4.5.1. İnkübasyon süresinin serbest enzimle fenol yıkımına etkisi.....	57
4.5.2. Serbest enzim miktarının fenol yıkımına etkisi.....	58
4.5.3. Başlangıç fenol konsantrasyonunun serbest enzimle fenol yıkımına etkisi .....	59
4.6. Tutuklanmış Lakkaz Enzimiyle Fenol Yıkımı .....	60
4.6.1. İnkübasyon süresinin tutuklanmış enzimle fenol yıkımına etkisi .....	60
4.6.2. Tutuklanmış enzim miktarının fenol yıkımına etkisi.....	61
4.6.3. Başlangıç fenol miktarının tutuklanmış enzimle fenol yıkımına etkisi .....	62
4.7. Serbest ve Tutuklu Enzim ile Fenol Yıkımının Karşılaştırılması .....	63
4.8. Biyopolimere Tutuklu Enzim Stabilitesinin Saptanması .....	64
5. TARTIŞMA .....	66
KAYNAKLAR .....	70
ÖZGEÇMİŞ .....	80

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 2.1. Congo Red'in kimyasal yapısı .....	29
Şekil 2.2. Orange II boyasının kimyasal yapısı.....	29
Şekil 2.3. Acid Red 2'nin kimyasal yapısı .....	30
Şekil 2.4. Orange G boyasının kimyasal yapısı .....	30
Şekil 2.5. İndigo carmin boyasının kimyasal yapısı .....	31
Şekil 2.6. Fenolün kimyasal yapısı .....	33
Şekil 3.1. Süpernatant ortamındaki jel formunda biyopolimer .....	36
Şekil 3.2. Liyofilizatörde kurutulmuş blok formundaki polimer .....	37
Şekil 3.3. Liyofilizatörde kurutulduktan sonra toz hale getirilmiş biyopolimer .....	38
Şekil 4.1. İnkübasyon süresinin dekolorizasyon üzerine etkisi .....	48
Şekil 4.2. Enzim Miktarının Dekolorizasyon Üzerine Etkisi.....	49
Şekil 4.3. Boya Konsantrasyonunun Dekolorizasyon Üzerine Etkisi .....	50
Şekil 4.4. Serbest Enzimle Optimum Koşullarda Gerçekleştirilen Dekolorizasyon ....	51
Şekil 4.5. Protein miktarı-Lakkaz Aktivitesi korrelasyon eğrisi .....	52
Şekil 4.6. İnkübasyon süresinin dekolorizasyon üzerine etkisi .....	53
Şekil 4.7. Tutuklu Enzim Miktarının Dekolorizasyon Üzerine Etkisi .....	54
Şekil 4.8. Boya Miktarının Dekolorizasyon Üzerine Etkisi .....	55
Şekil 4.9. Tutuklu lakkaz enzimiyle optimum koşullarda dekolorizasyon .....	56
Şekil 4.10. Serbest Enzim ve İmmobilize Enzim (Polimere Tutuklu) ile Renk Gideriminin Karşılaştırılması.....	57
Şekil 4.11. İnkübasyon süresinin fenol degradasyonu üzerine etkisi.....	58
Şekil 4.12. Enzim Miktarının Fenol Degradasyonu Üzerine Etkisi .....	59
Şekil 4.13. Fenol Miktarının Degradasyon Üzerine Etkisi.....	60
Şekil 4.14. İnkübasyon süresinin fenol degradasyonu üzerine etkisi .....	61
Şekil 4.15. İmmobilize enzim miktarının fenol degradasyonu üzerine etkisi.....	62
Şekil 4.16. Boya Miktarının Fenol Degradasyonu Üzerine Etkisi.....	63
Şekil 4.17. Serbest Enzim ve İmmobilize Enzim (Polimere Tutuklu) ile Fenol Degradasyonunun Karşılaştırılması.....	64
Şekil 4.18. Biyopolimerin İmmobilizasyon Stabilitesine Kullanım Sayısının Etkisi .....	65

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa

Çizelge 2.1. Lakkazın Farklı Uygulama Alanları .....	6
Çizelge 2.2. Biyopolimerlerin Fizyolojik Olarak Sınıflandırılması.....	19
Çizelge 2.3. <i>Trametes versicolor</i> tarafından dekolorize edilen sentetik boyalar .....	26

## 1. GİRİŞ

Geçtiğimiz yüzyılda enzimlerin atık arıtımında kullanılabilirliğine ilişkin çok sayıda yeni çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu araştırmaların sebebi öncelikle ksenobiyotik ve rekalsitrant organik kirleticilerin çevreye verilme oranının her geçen gün daha da artması ve bu kirleticilerin verildikleri ortamdan geleneksel kimyasal ve biyolojik süreçler kullanılarak uzaklaştırılma verimlerinin yeterli olmamasıdır. Bu nedenle de, daha hızlı, ucuz, güvenilir ve basit alternatif arıtım yöntemlerinin geliştirilmesi ihtiyacı ortaya çıkmıştır. Enzimlerin spesifik kirletici hedeflerin arıtımında kullanımına ilişkin artan bir inanış söz konusudur. Son biyoteknolojik gelişmeler de daha ucuz ve iyi izolasyon ve saflaştırma yöntemleri sayesinde çok daha kullanışlı enzimlerin üretimini mümkün kılmaktadır.

Birçok atık arıtım prosesi fizikokimyasal veya biyolojik prosesler olarak karakterize olmaktadır. Enzimatik prosesler ise bu iki geleneksel uygulamanın arasında yer almaktadır. Enzimatik arıtımın diğer geleneksel yöntemler üzerine avantajlarını inceleyecek olursak:

- rekalsitrant materyallere uygulanabilir olmaları;
- yüksek ve düşük kontaminant konsantrasyonlarında işlev görmeleri;
- geniş pH, sıcaklık ve tuzluluk aralıklarında işlev görebilmeleri;
- yüksek reaksiyon hızına sahip olmaları;
- seçilen belli bir kirleticinin uzaklaştırılmasına olanak tanınmaları;
- enzimatik prosesin kontrolünün basit olmasıdır.

Tüm bu söz konusu avantajlarına dayanarak enzimatik arıtım yöntemlerinin atıksularda, katı atıklarda, tehlikeli atıklarda ve toprakta uygulanabilirliğine ilişkin araştırmalar her geçen gün daha da artmaktadır (Karam and Nicell, 1997; Duran and Esposito, 2000).

Atık arıtımında kullanılabilirliği çalışılan enzimler arasında özellikle peroksidazlar ve fenol oksidazlar fenollerin ve aromatik aminlerin arıtımında üzerlerinde en fazla çalışma yürütülen enzimler arasında yer alırlar. Ekstraselüler fungal peroksidazlar

ve lakkazlar, enzimin ayrılıp saflaştırılmasının daha kolay olması sebebiyle bitkilerden elde edilen enzimlere göre çevresel uygulamalar için çok daha kullanışlıdır. Ayrıca biyoreaktörlerde üretilebilmeleri ve böylece büyük miktarlarda elde edilmelerinin sağlanması da ekstraselüler enzimlerin avantajları arasında yer almaktadır. Fenolik kirleticilerin dışında bu enzimler poliklorlu bifeniller (PCBs), polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAHs), sentetik boyalar ve pestisitler gibi ksenobiyotik kirleticilerin yıkımında da oldukça etkilidir. Mikrobiyoloji ve biyoteknolojideki son gelişmelerde de bu fungal enzimlerin atık arıtımı ve detoksifikasyonunda uygulanabilirliği araştırılmaktadır. Özellikle düşük maliyetli kaynaklar kullanılarak daha yüksek miktarlarda enzim üretiminin sağlanması, reaksiyon ürünlerinin karakterizasyonu ve verilecekleri ortam üzerine olası etkileri, bu yönde yapılan çalışmalar arasındadır (Ikehata et al., 2004).

Bu tez kapsamında başta tekstil endüstrisi, kağıt endüstrisi, kozmetik endüstrisi olmak üzere pek çok endüstriyel faaliyet sonucu çevreye verilen azoboyalar ve indigo boyalar gibi toksik maddeleri içeren endüstriyel atıkların dekolorizasyonu ve fenol giderimi üzerinde lakkaz enziminin etkinliği incelenmiştir. Çalışmalarımızda, azo boyalardan Congo Red, Acid Red 2 (Methyl Red), Orange II, Orange G ve indigo boyalardan Indigo Carmin boyaları ile fenolün *Trametes (Coriolus) versicolor* (ATCC 200801) tarafından laboratuvarlarımızda üretilen polimere tutuklu lakkaz enzimiyle renk giderimleri (dekolorizasyonları) ve yıkımı araştırılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİ

Atık arıtımında çalışılan enzimler arasında özellikle peroksidazlar ve fenol oksidazlar fenollerin ve aromatik aminlerin arıtımında en fazla çalışılan enzimler arasında yer alır. Fenol oksidaz grubu enzimlerden olan lakkaz, tüm bu zararlı maddelerle mücadelede başarılı bir şekilde denenmiş ve uygulanmış bir enzimdir. Lakkaz, gıda, kağıt-hamuru üretimi ve tekstil gibi endüstri dallarında gerek süreç sırasında gerekse atık arıtımında toksik, kanserojenik ve mutajenik etkinliği bilinen rekalsitrant ve ksenobiyotik organik bileşiklerin yıkımı, dekolorizasyonu ve detoksifikasyonunda başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Ancak, enzimlerin kirli alanların detoksifikasyonunda kullanımlarını sınırlayıcı bazı durumlar söz konusudur. Serbest enzimler, toprakta veya atıksularda bazı olumsuz koşullar altında inaktive veya denatüre olabilmektedir. Bu tip reaksiyonlar sonucunda stabilite düşmekte ve enzimlerin katalitik aktiviteleri oldukça azalmaktadır. Fiziksel ve kimyasal teknikler aracılığıyla enzimlerin çeşitli destek materyalleri üzerine tutuklanması bu tip sınırlamaların önüne geçebilmekte ve stabil, uzun süreler boyunca kullanılabilen katalizörlerin ortaya çıkmasında yardımcı olmaktadır.

### 2.1. Lakkaz (E.C.1.10.3.2)

Enzimatik oksidasyon teknikleri, kağıt, tekstil ve gıda gibi endüstri alanlarında oldukça büyük bir öneme sahiptir. Özellikle, elektron alıcısı olarak moleküler oksijeni kullanan enzimler en ilgi çekici olanlardır. Lakkaz (benzendiol: oksijen oksidoredüktaz; EC 1.10.3.2), çok bakırlı, özellikle fenoller ve anilinler gibi çeşitli aromatik bileşiklerin oksidasyonunu katalizleyen, fenol oksidaz grubunda yer alan bir oksidoredüktaz enzimidir. Lakkaz molekülü, dimerik veya tetramerik yapıda bir glikoproteindir ve genellikle her bir monomerinde üç adet redoks bölgesine dağılmış halde dört tane demir atomu içerir. Orto ve paradifenoller, aminofenoller, polifenoller, poliaminler, ligninler ve aril diaminler ile moleküler dioksijenin suya indirgenmesini gerçekleştiren bazı inorganik iyonların oksidasyon reaksiyonlarını katalizlerler (Couto and Herrera, 2006).

Lakkaz enziminin redoks potansiyeli fenolik olmayan bileşiklerden daha düşük olarak rapor edilmiştir, bu nedenle bu enzimler bu tür bileşikleri okside edemezler. Ancak, elektron transfer medyatörleri olarak davranabilen bazı küçük moleküllerin varlığında lakkazların fenolik olmayan bileşikleri de okside edebildikleri

gösterilmiştir. Bu durum, lakkaz enzimiyle okside olabilen bileşiklerin çeşitliliğini arttırmaktadır (Bourbonnais and Paice, 1990; Call and Mücke, 1997). Bu tür aracı (medyatör) bileşiklerin kullanıldığı sistemler kağıt hamurunun delignifikasyonu, organik kirleticilerin oksidasyonu, biyosensörlerin veya biyoyakıt hücrelerinin geliştirilmesi gibi çok sayıda işlemde kullanılabilir. Bu amaçla çok sayıda organik ve inorganik bileşik etkili medyatörler olarak rapor edilmiştir. Bunlar arasında tiyol ve fenol aromatik türevleri, N-hidroksi bileşikleri ve ferrosiyanür bulunmaktadır. Bu sistemlerin, boya dekolorizasyonu ve lakkaza dirençli bazı boyaların dekolorizasyonunu da güçlendirdiği gösterilmiştir (Couto and Herrera, 2006).

Fenol oksidazlar fenolik bileşikleri oksitleyebilen ve bir polimerizasyon prosesini başlatabilen enzimlerdir. Bu oksidasyon reaksiyonu sırasında moleküler oksijen suya indirgenir. Bu oksidoredüksiyon reaksiyonu humik maddeler, ligninler, tanninler, melaninler ve alkaloidler gibi doğal olarak meydana gelen komplekslerin sentezinde çok önemlidir. Aynı zamanda bu reaksiyon çifti çok çeşitli tarımsal ve endüstriyel kimyasalların transformasyonlarında da yer almaktadır; aromatik bileşiklerin hidroksil gruplarından bir proton ve elektronun ayrılması ile serbest radikal formlar oluşmaktadır (Gianfreda et al., 1999).

Lakkazlar doğada geniş çaplı bir dağılım gösterirler. Lakkaz aktivitesi, 60'dan fazla farklı fungus suşlarında, çeşitli yüksek yapılı bitkilerde ve son olarak da bakterilerde gözlenmiştir. Lakkaz sentezinden sorumlu çok sayıda fungus olmakla birlikte bunların büyük bir bölümü beyaz çürükçüller olarak bilinen *Basidiomycetes* grubuna giren fungus ailesi tarafından sentezlenmektedir. Bu funguslar lignin yıkımında rol oynarlar ve yıkım sırasında lignini tamamen mineralize ederler (Gianfreda et al., 1999; Thurston, 1994; Yarapolov et al., 1994).

Lakkaz, lignin dışında pek çok sayıda substratı da oksitleyebilme yeteneğine sahiptir. Bunlar arasında: fenolik boyalar, fenoller, klorofenoller, ligninle ilişkili difenilmetanlar, benzopirenler, N-dallanmalı p-fenilendiaminler, organofosforlar ve fenolik olmayan beta-O-lignin model dimerleri yer almaktadır. Özellikle fenolik bileşikler doğada çok yaygın olarak bulunmaktadır. Bu bileşiklerin oksidasyonları hücresel oksidasyon, hücre duvarının korunması, meyvelerin kahverengileşmesi, meyvesuları ve şarap prosesleri, kağıt hamurunun

delignifikasyonu, kumaşların dekolorizasyonu, toprakların dekontaminasyonu ve su kirliliği kontrolü gibi prosesler açısından büyük önem taşımaktadır (Duran and Esposito, 2000).

Ekstraselüler lakkaz enzimleri üzerinde çalışma yapılmış funguslar arasında *Agaricus sp.*, *Botryosphaeria sp.*, *Cerrena maxima*, *Chalara paradoxa*, *Coniothyrium minitans*, *Corioloropsis gallica*, *C. rigida*, *Cyathus bulleri*, *C. stercoreus*, *Flavodon flavus*, *Fomes sclerodermeus*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes*, *Marasmius quercophilus*, *Nematoloma frowardii*, *Pleurotus florida*, *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. sajor-caju*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *P. sanguineus*, *Trametes versicolor*, *T. cingulata*, *T. elegans*, *T. hirsuta*, *T. modesta*, *T. multicolour*, *T. pubescens*, *T. trogii* bulunmaktadır (Bollag and Leonowicz, 1984; Munoz et al., 1997). Bu funguslar arasında özellikle *Trametes* türleri lakkaz üretimleri bakımından oldukça fazla çalışılmıştır. Bunun sebebi bu fungusun dünyanın çok sayıdaki bölgesinde oldukça yaygın olarak bulunması ve doğada odunun çürütülmesinden sorumlu en güçlü mikroorganizmalar arasında yer almasıdır.

Lakkaz üretimi çok sayıda faktör tarafından etkilenmektedir. Bunlar arasında üreme ortamının içeriği, pH, Karbon:Azot oranı, sıcaklık ve havalandırma oranı yer almaktadır. Bununla beraber *T. versicolor* ve diğer beyaz çürükçül funguslar tarafından lakkaz üretiminin besiyeri ortamına aromatik bir bileşik veya  $Cu^{2+}$  iyonunun eklenmesiyle arttığı veya indüklendiği gösterilmiştir. Söz konusu aromatik bileşikler arasında veratril alkol, vanilik asit, 2,5-ksilidin, ferulik asit, syringaldazine ve guaiacol bulunmaktadır (Eggert et al., 1996; Collins and Dobson, 1997; Koroljova-Skorobogat'ko et al., 1998).

Fungal lakkazlar doğada çok sayıda fizyolojik roller üstlenmektedir. Bunlar arasında morfogenez, bitki patojenitesi, interspesifik fungal etkileşimler ve ligninolizis yer almaktadır. Üstlendikleri bu roller arasında özellikle ligninolizis'in mekanizması çok önemlidir. Bunun sebebi, günümüzde fenolik akıntıların dekolorizasyonu, ksenobiyotiklerin yıkımı ve detoksifikasyonu gibi çevresel uygulamalarda kullanılan lignolitik enzimlerin, lignin yıkımını gerçekleştirirken sahip oldukları güçlü oksidatif yetenekden kaynaklanmaktadır (Ikehata et al., 2004).



### 2.1.1. Lakkaz enziminin endüstriyel ve biyoteknolojik uygulama alanları

Oksidoredüktazlar arasında yer alan bazı enzimler tekstilden gıdaya ve daha birçok endüstri dalında uygulama alanı bulmuştur. Bu enzimlere yenilerini eklemek amacıyla da günümüzde pek çok araştırma gerçekleştirilmektedir. Oksidoredüktazlar arasında yer alan lakkaz enzimi de çok çeşitli uygulama alanlarına sahiptir (Çizelge 2.1). Bunlar genel olarak 5 temel başlık altında incelenebilir (Xu, 2005):

- 1) Endüstriyel-teknik uygulamalar (Kağıt, tekstil, deterjan ve gıda endüstrileri)
- 2) Nanobiyoteknoloji
- 3) Çevre koruma uygulamaları
- 4) Organik bileşiklerin sentezi
- 5) Tıbbi ve kişisel bakım ürünleri

Çizelge 2.1. Lakkazın Farklı Uygulama Alanları (Couto and Herrera, 2006)

Uygulama Alanı	Lakkaz Kaynağı
Boya Dekolorizasyonu	<i>Aspergillus (genetik olarak modifiye)</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Cerrena unicolor</i> <i>Corioloopsis gallica</i> <i>Corioloopsis rigida</i> <i>Funalia trogii</i> <i>Irpex lacteus</i> <i>Myceliophthora thermophila</i> <i>Polyporus pinsitus</i> <i>Trametes versicolor</i> <i>Pleurotus eryngii</i> <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> <i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Sclerotium rolfsii</i> <i>Trametes hirsuta</i> <i>Streptomyces cyaneus</i> <i>Trametes modesta</i> <i>Trametes trogii</i> <i>Trametes villosa</i>
Ksenobiyotiklerin Yıkımı	<i>Chaetomiaceae familyasına ait suş 1-4</i> <i>Cladosporium sphaerospermum</i> <i>Coprinus cinereus</i> <i>Myceliophthora thermophila</i> <i>P. pinsitus</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>C. gallica</i>

	<p><i>Coriolus hirsutus</i>  <i>Coriolus versicolor</i>  <i>Myceliophthora thermophyla</i>  <i>Trametes pubescens</i>  <i>Panus tigrinus</i>  <i>P. ostreatus</i>  <i>T. versicolor</i>  <i>P. cinnabarinus</i>  <i>Pyricularia oryzae</i>  <i>P. oryzae</i>  <i>Rhus vernicifera</i>  <i>T. hirsuta</i>  <i>T. hirsuta D10</i>  <i>Trametes sp.</i>  <i>T. villosa</i>  <i>Trichophyton sp. LKY-7</i></p>
Biyosensörler	<p><i>Agaricus bisporus</i>  <i>A. niger</i>  <i>T. versicolor</i>  <i>R. vernicifera</i>  <i>Rigidoporus lignosus</i>  <i>Aspergillus oryzae</i>  <i>Myceliophthora thermophila</i>  <i>P. pinsitus</i>  <i>C. unicolor</i>  <i>C. hirsutus</i>  <i>R. vernicifera</i>  <i>P. ostreatus</i>  <i>P. oryzae</i>  <i>R. vernicifera</i></p>
Atık Arıtımı	<p><i>C. gallica</i>  <i>Gliocladium virens</i>  <i>Lentinula edodes</i>  <i>L. edodes</i>  <i>P. tigrinus</i>  <i>P. ostreatus</i>  <i>Pleurotus spp.</i>  <i>Pycnoporus coccineus</i>  <i>R. vernicifera</i>  <i>Trametes sp. suş AH28-2</i>  <i>T. versicolor</i></p>
Biopulping	<p><i>Fomes fomentarius</i>  <i>Ganoderma collosum</i>  <i>Lentinus edades</i>  <i>Merulius tremellosus</i>  <i>Phlebia radiata</i>  <i>P. ostreatus</i>  <i>T. versicolor</i>  <i>Peniophora sp.</i>  <i>Pycnoporus sanguineus</i>  <i>T. hirsuta</i></p>
Organik Sentezler	<p><i>C. hirsuta</i>  <i>C. hirsutus</i>  <i>P. cinnabarinus</i></p>

Gıda Endüstrisi	<i>P. coccineus</i> <i>P. oryzae</i> <i>T. versicolor</i> <i>T. villosa</i>  <i>Chinese rhus lacquer</i> <i>Myceliophthora thermophili</i> <i>P. pinsitius</i> <i>P. cinnabarinus</i> <i>Trametes hirsuta</i> <i>Trametes versicolor</i>
Biyoağartma (Biobleaching)	<i>P. eryngii</i> <i>P. cinnabarinus</i> <i>T. versicolor</i>
Kot Kumaşların Ağartılması	<i>T. versicolor</i>

### **2.1.1.1. Endüstriyel-teknik uygulamalar**

Bu uygulama alanında lakkaz enzimi tehlikeli ve pahalı kimyasallar yerine daha avantajlı biyokatalizörler olarak işlev görmektedir. Aynı zamanda enerji ve kullanılan kaynakların tüketimini de azaltmakta ve çevrede meydana gelebilecek olumsuz etkileri azaltmaktadır.

#### **Lignoselülozik transformasyonlar**

Endüstride kağıt üretimi kağıt hamurundaki ligninin ayrılması ve yıkımı ile gerçekleştirilir. Kağıt hamurunun geleneksel yöntemlerle delignifikasyonu klor veya oksijen bazlı kimyasal oksidantlar tarafından gerçekleştirilmektedir. Kimyasal oksidasyona bağlı bu yöntemler her ne kadar oldukça etkili yöntemler olsalar da oluşan son ürünler çevreye verildiklerinde ciddi problemlere yol açmaktadır. Bu bakımdan enzimatik delignifikasyon sistemleri etkileyici alternatifler olarak önem kazanmaktadır. Çok sayıdaki lakkaz enziminin gerek doğal gerekse sentetik ligninin yıkımını gerçekleştirdiği araştırmalar tarafından gösterilmiştir (Sigoillot et al., 2004; Leonowicz et al., 2001). Enzim tarafından ya ligninin yapısında bulunan fenolik bileşikler ya da uygun bir redoks indükleyici ajanının bulunması halinde dolaylı olarak heterojen fenolik ve fenolik olmayan kısımların yıkımı gerçekleşmektedir. Sonuç olarak lignin içerisinde oluşan radikaller alifatik ve aromatik C-C bağının kırılmasını ve depolimerizasyonu gerçekleştirmektedir.

Geleneksel polimerizasyon yöntemlerinde kullanılan kimyasal ajanlardan olan üre, formaldehit, isosiyanat ve petrokimyasal resinler tehlikeli maddelerdir. Lakkazın bu kimyasal maddelerin yerine kullanımı bu enzimin lignin-oksidasyon özelliği sayesinde mümkün olmaktadır. Lakkazın çapraz bağlanma etkinliğini başlatıcı veya güçlendirici olarak kullanım şekilleri:

- doğrudan odun veya kağıt hamuru partiküllerini oksitleyerek çapraz bağ oluşumu için radikalleri oluşturur,
- odun veya kağıt hamuru partiküllerini çapraz bağlayıcı ajanlar olarak davranacak daha küçük bileşiklere (aromatik, karboksil, isosiyanat veya akrilamid maddeleri gibi) dönüştürür,
- izole haldeki lignin, nişasta, fenolik polisakkaritler veya proteinleri radikalce zengin ve toksik olmayan bileşiklere dönüştürürler.

Lakkazın bu şekildeki uygulamaları, bu enzimin hem toksik veya daha pahalı olan kimyasal maddelerin yerine geçmesini sağlamakta hem de lignin gibi kağıt endüstrisi atıklarının daha değerli ürünler haline dönüşmesine olanak tanımaktadır (Xu, 2005).

Kağıt hamurunda gerçekleştirilen biyoağartma çalışmaları dışında, bazı özel kağıtların üretiminde kullanılan ve ağaçtan elde edilmeyen hamurlar üzerinde lakkaz enziminin etkinliği üzerinde de az da olsa çalışmalar mevcuttur. Camarero et al. (2004), yaptıkları çalışmada yüksek kalitedeki keten hamurunda renk oluşumundan sorumlu olan lignin türevi ürünlerin lakkaz enzimiyle uzaklaştırılabildiğini göstermişlerdir. Araştırmacılar, bu çalışmayla oldukça pahalı olan bu kağıtların üretiminde lakkaz enzimi ve medyatörlerinin klorür içeren ajanların yerine kullanılabileceğini göstermişlerdir.

Lakkaz enziminin ligninde reaktif radikaller oluşturma kabiliyeti ayrıca ağaç liflerinin modifikasyonunda da kullanılabilir. Örneğin, lakkaz enzimiyle sunta gibi lignoselüloz yapıdaki kompozit materyallerin üretiminde kullanılan liflerin birbirlerine yapışması sağlanabilir. Lakkaz enzimi, kompozitlerin üretimi sırasında, liflere bağlı lignini aktive ederek toksik sentetik zamklara olan ihtiyacı ortadan kaldırmaktadır (Couto and Herrera, 2006).

## Tekstil Endüstrisindeki Uygulamalar

Tekstil endüstrisi, tüm boya pazarının üçte ikisini elinde tutmakta ve özellikle tekstil kumaşlarının ıslatılma işlemi için çok yüksek hacimlerde su ve kimyasal tüketimine yol açmaktadır. Kullanılan kimyasal maddelerin kimyasal yapıları inorganik bileşiklerden polimerlere ve organik ürünlere kadar farklılık göstermektedir. Her yıl üretilen  $7 \times 10^5$  tonluk boya içerisinde 100.000'den fazla ticari olarak uygun boya bulunmaktadır. Kimyasal yapıları nedeniyle, boyalar, ışığa, suya ve farklı kimyasallara maruz kalmaya dirençlidirler ve birçoğu sentetik orijinleri nedeniyle oldukça zor dekolorize olurlar (Couto and Herrera, 2006).

Lakkaz, tekstil endüstrisinde pamuk ipliklerinin ağartılmasında, kumaşa yanmazlık, kırışmazlık gibi son özelliklerinin kazandırıldığı boyamanın son aşamasında ve atık arıtımında kullanılmaktadır. Son yapılan bir çalışmada lakkaz enzimiyle beraber peroksidaz enzimi de kullanılarak pamuk ipliğinin ağartıldığı rapor edilmiştir. Böyle bir uygulama sayesinde kimyasal madde, enerji ve su kullanım miktarında azalma sağlanmıştır (Tzanov et al., 2003). Lakkazla katalizlenen tekstil boyalarının ağartımı süreci özellikle boyamanın son aşamasında çok kullanışlı olmaktadır. Bu sayede hipoklorür gibi kimyasal oksidantlar kullanılmaksızın indigo boyanın ağartımı gerçekleştirilebilmekte ve kumaşta istenilen görünüm sağlanmaktadır.

Lakkaz enzimi ayrıca boya öncülerini in situ olarak çok daha etkili ve iyi bir boyamayı sağlayacak bir şekle dönüştürmekte kullanılabilir. Bu uygulamada iplikler öncelikle boya öncüleriyle muamele edilir. Lakkazın ilavesi boyanın ipliklere güçlü bir şekilde bağlanmasını ve dolayısıyla boyanmasını sağlar. Böylelikle kimyasal fiksasyon ajanlarının kullanımı büyük ölçüde azaltılmış olmaktadır (Xu, 2005).

Lakkaz enziminin tekstil endüstrisinde kullanımı her geçen gün hızla artmaktadır. Tekstil kumaşlarının ağartımında kullanılmak üzere 1996 yılında Novozyme (Novo Nordisk, Danimarka) tarafından yeni bir endüstriyel uygulama alanı olarak kot kumaşlarının ağartım işlemi lakkaz enzimi ve medyatör bir molekülden oluşan DeniLite isimli ilk ağartım sistemi geliştirilmiştir. Ayrıca 2001 yılında, Zytex firması (Zytex Pvt. Ltd., Mumbai, Hindistan) tarafından geliştirilen bir formülasyonla lakkaz

ve medyatör sistemi ile indigo boya oldukça özgül bir yöntemle degrade edilmektedir. Bu ürünün ticari ismi Zylite'tir (Couto and Herrera, 2006).

### Deterjanlardaki Uygulamalar

Elbise kumaşlarındaki boya lekelerinin büyük bir kısmı ile bulaşıklar üzerindeki maddeler biyolojik orijinlidir. Lakkaz enzimi, diğer pek çok enzimle birlikte normal yıkama koşulları altında giderilmesi zor olan boya lekelerinin ağartılması işlemlerinde çalışılmıştır. Enzimatik bir ağartma işlemi kimyasal bir yöntemle kıyasla daha başarılı olmaktadır. Bunun sebebi enzimlerin kumaş boyası üzerinde yer alan lekeleri spesifik olarak seçerek işlev görmesidir (Galante and Formantici, 2003; Kirk et al., 2002).

### Gıda Endüstrisindeki Uygulamalar

Karbonhidratlar, doymamış yağ asitleri, fenolikler ve tiyol içeren proteinler çeşitli gıda maddelerinin ve sebzelerin önemli bileşenleri arasındadır. Bu maddeler aynı zamanda lakkaz gibi oksidoredüktaz enzimlerinin de substratları arasında yer almaktadır. Bu enzimler sayesinde gıda maddelerinin kalitesinin arttırımı ve maliyetlerinin azaltılması gibi olanaklar sağlanabilmektedir.

Gıda Maddelerinin Geliştirilmesi: Lakkaz enzimi çeşitli süreçlere uygulanmak suretiyle sebze ve meyvelerin renginin modifikasyonunda veya güçlendirilmesinde kullanılabilir. Yapılan bir çalışmada, lakkaz enzimi, olgunlaşmış zeytinlerin işlenmesinde kullanılan kimyasal çözeltilerin yerine kullanılarak çok sayıdaki fenol bileşiğini oksidatif olarak polimerize etmiştir ve sonuç olarak rengin koyulaşmasını ve acı tat oluşumunun ortadan kalkmasını sağlamıştır (Xu, 2005).

Lakkaz enzimi aynı zamanda biyopolimerleri çapraz bağlama yeteneği sebebiyle de fırıncılıkta kullanım alanına sahiptir. Selinheimo et al. (2006), çalışmasında beyaz çürükçül funguslardan *Trametes hirsuta*'dan elde edilen lakkaz enzimiyle hamurun maksimum direncinin arttığını ve uzama kabiliyetinin azaltıldığını hem un hem de gluten hamurunda göstermiştir.

Şarap, Meyve Suları ve Biracılıktaki Uygulamalar: Meyve suları, şarap ve biranın gerek üretilmesi gerekse depolanması sırasında bu sıvıların kahverengileşmesi, bulanık bir görüntü oluşması ve yoğunlaşması endüstride karşılaşılan en temel

sorunlardandır. Tüm bu oluşumlara fenolik bileşiklerin sebep olduğuna inanılmaktadır. Bu tip içeceklerde yer alan çok sayıdaki fenolik bileşikler (coumaric asit, falavanlar ve antosiyaninler gibi) renkte bozulma, bulanıklık, koku ve tatta değişimlere neden olmaktadır (Cantarelli et al., 1989). Geleneksel yöntemler kullanılarak, istenmeyen fenolik bileşikler jelatin, bentonit gibi ajanlar kullanılarak adsorbe edilmekte ve uzaklaştırılmaktadır. Bu ajanlar genellikle düşük spesifikiteye sahip, sıvının aroma ve rengini etkileyebilen ve deşarj problemlerine neden olabilen maddelerdir. Lakkaz gibi oksidoredüktazlar gıda endüstrisinde probleme neden olan bu tip fenol bileşiklerinin uzaklaştırılmasında veya modifikasyonunda kullanılabilen ve meyve suları ya da alkollü içeceklerdeki berraklık, renk, koku, aroma ve tat gibi parametreleri düzenleyebilmektedir. Bu içeceklerin lakkazla muamelesi sonucunda istenmeyen fenol bileşikleri okside olarak polimerize olmakta (veya çökelmekte) ve ardından filtrasyon gibi yöntemlerle ortamdan uzaklaştırılabilmektedir (Minussi et al., 2002). Ayrıca çeşitli meyve sularında tannaz ve peroksidazla birlikte lakkazın güçlü bir stabilizatör olduğu belirtilmektedir (Cantarelli et al., 1989).

#### **2.1.1.2. Nanobiyoteknoloji**

Geçtiğimiz yüzyılda biyoelektrokimyaya olan ilgi oldukça artmıştır. Biyoelektrokimya konusundaki ilerlemeler klinik ve çevresel analizlerde dedektörler olarak işlev gören biyosensörler gibi analitik uygulamalarla birleşmiştir. Lakkaz enzimleri, kofaktörlere ihtiyaç göstermeksizin elektron transfer reaksiyonlarını katalizlediklerinden, biyosensörlerde çeşitli fenolik bileşiklerin ve oksijen orazitlerin ortaya çıkarılması amacıyla kullanımları çalışılmıştır. Ayrıca, morfin, kodein, kateşolaminler ve bitki flavonoidlerinin tespit edilebilmesi için de biyosensörlerle çalışmalar yapılmıştır. Nanoteknoloji, farklı yüzey tiplerinde mikro ve nanometre boyutlarına ulaşan biyomoleküllerin özgül adsorpsiyonu ve kontrollü birikimiyle daha küçük ve daha etkili biyosensörlerin geliştirilmesine katkıda bulunmaktadır (Couto and Herrera, 2006).

Lakkaz enzimi optik, elektrik veya diğer fiziksel ölçümlere elverişli olan ve birlikte cereyan eden kimyasal veya enzimatik reaksiyonlar için reaktant/substratlar üretebilme yeteneğine sahiptir. Bu sebeple bu enzimler biyosensörler olarak kullanılabilir.

Lakkaz enzimi, O<sub>2</sub>'nin, fenol ve anilinler gibi geniş çeşitlilikteki indirgeyici substratların tespitinde oldukça kullanışlı biyosensörlerdendir. Biyosensörün yüzeyine tutuklanan lakkaz enzimi kullanılarak O<sub>2</sub> redüksiyonunu ölçen modifiye bir oksijen elektrodu yardımıyla biyosensör tarafından elektrik akımı ve voltajdaki değişimler tespit edilmektedir (Xu, 2005).

Lakkaz enzimleri, küçük verici sistemler gibi güç sağlayan biyoyakıt hücrelerinin katodları üzerine de tutuklanabilir. Biyoyakıt hücreleri, çevre koruma anlamında oldukça büyük öneme sahiptir. Çünkü elektrik enerjisi yakıt yanmaksızın oluşmakta ve böylece daha temiz bir enerji kaynağı sağlanmaktadır (Couto and Herrera, 2006).

### **2.1.1.3. Çevre koruma uygulamaları**

Birçok mikroorganizma polisiklik aromatik hidrokarbonları, klorlu bileşikleri ve diğer pekçok kirleticiyi kendi karbon, azot ve enerji kaynağı olarak kullanabilir. Metabolizmalarının önemli bir parçasını oluşturan oksidoredüktaz enzimleri elektron transferi, hidrojen ekstraksiyonu, oksijen katılımı gibi reaksiyonları katalizleyerek halkanın açılması, depolimerizasyon, mineralizasyon ve diğer pekçok transformasyonları gerçekleştirmektedir (Xu, 2005).

### **Biyodegradasyon (Biyoyıkım)**

İstenmeyen kirleticiler, son ürünler veya atılmış materyaller lakkaz enzimiyle yıkılabilmektedir. Lakkaz enziminin trilinolein ve metil linoleat gibi lipidleri yıkabildiği bir başka çalışma sonucu gösterilmiştir. Bu doymamış yağlı bileşikler tipik lakkaz substratları değildir ancak bu reaksiyonun özelliği odunda ve gıda maddelerinde gözlenen yağlı bileşiklerin aynı zamanda lakkaz enzimiyle katalizlenen delignifikasyon ve gıda maddelerinin modifikasyonunda da yer almasıdır (Zhang et al., 2002; Karlsson et al., 2002).

Lakkaz enzimi kullanılarak boyaların oksidasyonu işlemi sonucunda söz konusu boyanın ağartılması, yıkımı veya polimerizasyonu gerçekleşerek daha sonra uygulanacak adsorpsiyon gibi fiziksel arıtım yöntemlerinin başarısı arttırılmaktadır. Bu enzimler aynı zamanda kağıt hamuru ve pamuk fabrikalarının, gıda ve meyve



işleyen veya içecek üreten tesislerin çıktı sularının arıtılmasında da kullanılabilmektedir (Shaffiqu et al., 2002).

Lakkaz, olefin içeren plastik atıklara da uygulanabilmektedir. Enzim tarafından olefin birimlerinin oksidasyonu sonucunda redoks indükleyicilerinin de yardımıyla radikal zincir reaksiyonları başlamakta ve plastiğin ayrılıp dağılmasını sağlamaktadır. Lakkaz enzimi ayrıca tehlikeli kömür atıklarının, özellikle de kükürt içeren kısımlarının yıkımında da kullanılmaktadır. Bu durum özellikle kömür madenleri ve santrallerin yakınlarında asit yağmurlarına neden olan emisyonların sebep olduğu kirliliğin kontrolünü sağlamak açısından önem taşımaktadır (Xu, 2005).

### Biyodetoksifikasyon ve Biyodekontaminasyon

Birçok pestisit, ksenobiyotik ve kömür atıkları ile polisiklik, aromatik, halojenli hidrokarbonlar ve diğer organik bileşiklerden türeyen endüstriyel ürünler oldukça tehlikeli çevre kirletici ajanlar arasındadır. Endüstriyel atıklarda, kontamine toprak ve sularda yer alan bu bileşiklerin transformasyonunda da lakkaz enzimi kullanılmaktadır. Genel olarak redoks potansiyeli oldukça yüksek olan bu bileşiklerin lakkaz enzimi tarafından elektron transferiyle doğrudan oksidasyonu zor olsa da bazı indükleyici ajanların ortama ilavesiyle bu zorluk giderilmektedir. Lakkaz katalizi ya doğrudan yıkım ya da polimerizasyon/immobilizasyon şeklinde gerçekleşmektedir. Doğrudan yıkımın gerçekleştiği reaksiyonlar arasında klorofenollerin deklorasyonu, aromatik halkanın kırılması ve polisiklik aromatik hidrokarbonların mineralizasyonu bulunmaktadır. Polimerizasyon ise ya kirleticilerin kendi aralarında ya da toksik olmayan başka bileşiklerle (humik materyaller gibi) kopolimerizasyonu şeklinde gerçekleşmektedir. Polimerize kirleticiler, çözünmeyen veya immobilize maddeler haline dönüşerek adsorpsiyon, sedimentasyon veya filtrasyon gibi yöntemler aracılığı ile ortamdan kolayca uzaklaştırılabilecek formlar haline gelirler (Minussi et al., 2002).

Bir fenoloksidaz enzimi olan lakkaz, diğer başka enzimlerle birlikte humik materyalin oluşumunda rol oynamaktadır. Bu enzim, humik maddelerin oluşumuna neden olurken aynı zamanda da ksenobiyotik maddelerin humik materyal içerisine katılımını da gerçekleştirmektedir. Bu durum, enzimin fenolik bileşiklerin ve fenolik

türevlerin oksidasyonu üzerine etki ederek bu bileşiklerin daha az çözünür ve daha fazla stabil haldeki polimerik agregatlara dönüşümünü katalizlemesiyle gerçekleşmektedir (Gianfreda et al., 1999). Lakkazın fenoller ve aromatik bileşikler suda çözünmeyen polimerlere dönüştürme yeteneği yeraltı sularının ve atıksulardan kaynaklanan kirliliğin kontrolünde oldukça önemli bir araç olarak karşımıza çıkmaktadır. Akdeniz bölgesinde, zeytin kara suyunda bulunan çeşitli fenollerin (kateşol, metillateşol, tiyrosol ve hidrokstiyrosol gibi) *Cerrena unicolor* tarafından sentezlenen lakkaz enzimiyle neredeyse tamamen giderilebildiği rapor edilmiştir (Gianfreda et al., 1998).

Çeşitli kirliticilerin, kalıntı veya polimerik agregatlara bağlanmaları sonucunda toksisitelerinin daha önceki hallerine göre artıp artmadığının belirlenmesi çok önemlidir. Bir bileşiğin humik asitlere veya diğer toprak materyallerine bağlanmasının ardından toksisitesinin azaldığı deneylerle kanıtlanmıştır (Bollag and Bollag, 1990). Lakkaz enzimiyle yapılan diğer çalışmalarda çok sayıdaki fenolik azo boyanın oksidasyonu sonucunda kinonların sentezlendiği ve moleküler azotun açığa çıktığı ve toksik aromatik aminlerin oluşumunun önüne geçildiği bildirilmektedir (Chivukula and Renganathan, 1995).

#### **2.1.1.4. Organik bileşiklerin sentezi**

Radikallerin oluşumunu sağlayan lakkaz enzimi, polimer sentezi için potansiyel biyokatalizörlerdendir. Bir fenol oksidaz olarak özellikle monomerik fenollerden (kateşol gibi) polifenolik polimerlerin sentezini gerçekleştirirler.

Lakkaz enzimi ayrıca sefalosporin antibiyotikleri, vinblastin, penisilin dimerleri, tiadiazinler gibi çeşitli kompleks tıbbi ajanların sentezinde de kullanılabilir. Bununla beraber, özgül mekanik/elektriksel/optik özelliklere sahip polimerler, tekstil boyaları, kozmetik pigmentler, koku verici ajanlar ve pestisitler gibi fonksiyonel organik bileşiklerin de sentezinde kullanılabilir (Ose et al., 2003).

#### **2.1.1.5. Tıbbi ve kişisel bakım ürünleri**

Lakkaz enzimi tarafından sentezlenen birçok ürün antimikrobiyal, detoksifiye edici veya aktif kişisel bakım ajanları olarak kullanılabilir özelliktedir. Özgül ve biyolojik yapıda olmaları bu enzimlerin bu amaçla kullanılmalarının araştırılmasına olanak tanımıştır.

## Dezenfeksiyon

Lakkaz enzimi ile oldukça geniş kullanıma sahip bir dezenfektan olan iyot üretimi in situ olarak gerçekleştirilmektedir. Lakkaz–iyot tuzunun dezenfeksiyonda kullanımı sadece iyotun kullanımına oranla çok sayıda avantaja sahiptir. İlk olarak, iyot tuzu gerek depolama gerekse taşıma ve kullanım açısından daha stabil ve güvenilirdir. Ayrıca, Lakkaz–iyot sisteminden iyotun serbest kalması lakkazın konsantrasyonunu ayarlamak suretiyle kolaylıkla kontrol edilebilmektedir. Bu sistem çeşitli endüstriyel, tıbbi, evsel ve kişisel bakım uygulamaları sırasında içme suları ile yüzme havuzlarının dezenfeksiyonunda kullanılabilir (Xu, 2005).

## Cilt Bakımı

Kateşol türevi bir toksin olan uruşıyol'ün neden olduğu bir cilt hastalığı (poison ivy dermatitis) lakkaz enzimi kullanılarak tedavi edilebilmektedir. Uruşıyol oksidasyonu sonucunda toksik olmayan bir o-kinon türevi oluşmaktadır. Lakkaz enzimi ise uruşıyol'ü oksitleyerek, polimerize ve detoksifiye etmekte ve böylelikle bu hastalığın etkilerini azaltmaktadır (Xu, 2005).

## Saç Bakımı

Günümüzde kullanılan saç boyaları ve saç şekillendirici işlemler sıklıkla oksidatif veya katkılı kimyasallar içermektedir. Bu kimyasallar cilde zarar verici ve tahriş edici özelliklere sahiptirler. Lakkaz enzimiyle bu zararlı kimyasallar ortamdaki uzaklaştırılarak olumsuz etkileri önlenmektedir. Fenoller ve anilinleri içeren çeşitli öncü maddelerin lakkazla katalizlenen oksidasyon, transformasyon ve çapraz bağ oluşumları reaksiyonları ile boyama ve şekillendirme işlemleri başarıyla gerçekleştirilmektedir. Ayrıca lakkaz enzimiyle birlikte kullanılan çeşitli kimyasal maddelerin kozmetik etkisinin de geliştirilmesi mümkündür (Xu, 2005).

## Diğer Sağlık ve Hijyen Uygulamaları

Lakkaz enzimi, kişisel hijyen ürünleri olan deodorantlar, diş macunları, sakız, deterjan, sabun, çocuk bezi gibi ürünler içerisinde de uygulama alanına sahiptir. Örneğin, lakkaz, çok sayıda tiyol, sülfür, amonyak ve amin bileşiklerini oksitleyerek çeşitli rahatsızlıkların (halitosis, bromhidrosis ve hiperhidrosis) oluşumunu engellemektedir. Normalde kullanılan deodorantların gösterdiği kötü kokuyu

giderici etkinin dışında enzimatik sistem zararlı molekülleri yıkmakta ve hatta bu molekülleri sentezleyen mikroorganizmaları yok etmektedir (Xu, 2005).

## 2.2. Tutuklanmış Lakkaz Enzimi

Lakkaz enziminin toksik bileşiklerin daha güvenli metabolitler haline dönüştürülmesi amacıyla kullanımı yukarıda belirtilen örneklerden de görüldüğü üzere çevre kirliliğini önlemede oldukça önemli alternatifler arasında yer almaktadır. Ancak, enzimlerin kirli alanların detoksifikasyonunda kullanımlarını sınırlayıcı bazı durumlar söz konusudur. Serbest enzimler, toprakta veya atıksularda bazı olumsuz koşullar altında inaktive veya denatüre olabilmektedir. Bu tip reaksiyonlar sonucunda stabilite düşmekte ve enzimlerin katalitik aktiviteleri oldukça azalmaktadır. Fiziksel ve kimyasal teknikler aracılığıyla enzimlerin çeşitli destek materyalleri üzerine tutuklanması bu tip sınırlamaların önüne geçebilmekte ve stabil katalizörlerin ortaya çıkmasını sağlamaktadır (Gianfreda et al., 1999).

İyi tutuklanmış enzim aktivitesi için en önemli kriterler arasında mekanik özellikler (sertlik ve dayanıklılık), fiziksel form (granüller, levhalar, iç tüp duvarları gibi), kimyasal ve mikropsal ataklara karşı dirençlilik, materyalin hidrofilitesi, maliyeti ve uygunluğu bulunmaktadır. Lakkaz enzimi, Sepharose (agaroz), Sephadex (dekstran), selüloz bazlı materyaller gibi jellere tutuklanmakta ve bu materyallerin oldukça hidrofilik özellikte olmaları nedeniyle de aktivite kaybı çok az olmaktadır. Ancak bu jeller sıkışmaya veya şişmeye eğilimli olmaları nedeniyle dolgu yataklı reaktörlerde kullanılamamaktadır. Lakkaz enzimleri, alümin ve silika gibi inorganik destek materyalleri ile akrilik taşıyıcı maddelere de tutuklanmaktadır. Akrilik destek materyallerinin mekanik ve kimyasal stabiliteleri yüksek olup oldukça hidrofilik özellikte olabilmektedirler (Champagne, 2009).

Yapılan bir çalışmada, çok sayıda fenolik bileşik *Trametes versicolor*'dan elde edilen lakkaz enziminin porlu cam boncuklara tutuklanması ile başarılı bir şekilde ortamdaki giderilmiştir. Enzimin tutuklanması %100 olarak gerçekleşmiş ve reaksiyon sonunda başlangıçtaki enzim aktivitesinin %90'ı elde edilmiştir (Leonowicz et al., 1988). Bunun dışında tutuklamalarda enzim destek materyali olarak kireçtaşı, toprak gibi doğal örnekler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerle tutuklanan enzimin oldukça yüksek aktivitede ve stabil kalabildiği gözlenmiştir (Gianfreda and Bollag, 1994).

Silika jel üzerine tutuklanmış lakkaz ile şaraptan fenolik bileşiklerin giderimi çalışılmış ve %100 tutuklama oranıyla %13'lük fenol giderimi gerçekleştirilmiştir (Lante et al., 1992). Silika jelin dışında bu amaçla agarozlu matriksler de kullanılmaktadır (De Stefano et al., 1996).

Fenolik bileşikler içeren endüstriyel atıklarda destek materyali olarak aktif karbon kullanılarak renk giderimi gerçekleştirilmiştir (Davis and Burns, 1992). Kağıt endüstrisi atık sularında renk giderimi oldukça yüksek oranlarda gerçekleştirilmiştir.

*Trametes modesta*'dan elde edilen lakkaz enzimi aluminaya tutuklanarak ticari olarak kullanılan 41 adet azo, trifenil metan, indigo ve heterosiklik boyaların dekolorizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu boyalardan 36 tanesi %65-100 arasında dekolorize olmuş, 5 boya ise adsorbe olmuş ve yıkıma uğramamıştır (Kandelbauer et al., 2004a).

Çalışmamızda kullandığımız *T. versicolor*, toksik, kanserojenik ve mutajenik etkinliği bilinen organoklorlu fenolik bileşiklerin deklorasyonu ve buna bağlı detoksifikasyonu ve özellikle tekstil endüstrisi atık sularındaki azo ve indigo boyalar gibi kirleticilerin dekolorizasyonunu gerçekleştirebilen lakkaz enzimini potent olarak sentezleyebilmektedir. Bunun yanısıra, bu organizma, uygun fizyolojik koşullar sağlandığında, polisakkarit yapıda sentezlediği biyopolimeri de üreme ortamında ekstraselüler olarak oluşturabilmektedir. Burada önemli olan, bu biyopolimer sentezlenirken fungusa ait olan enzimleri de (özellikle de Lakkaz) yapısında tutuklanmış halde bulundurmasıdır. Yani bir bakıma, fungus tutuklanmış enzim sentezi yapabilmektedir. Böylece, aljinat gibi ayrıca bir destek materyali kullanılmadan ve in vitro olarak başka bir ilave işlem yapılmaksızın, kültür ortamından uygun yöntemlerle izole edilebilecek doğal polimere tutuklu lakkaz enzimi eldesi mümkün olmaktadır. Bunun sonucunda ekonomik bir kazanç da söz konusu olmaktadır.

### **2.3. Biyopolimerler**

Bu teze konu olan lakkaz enzimi tutuklanmış biyopolimer, terimsel olarak biyolojik olarak yıkılabilen polimerler olarak tanımlanmaktadır. ASTM (American Society for Testing and Materials)'nin yaptığı tanıma göre biyopolimerler, bakteri, alg ve

fungus gibi mikroorganizmaların doğal faaliyetleri sonucu tamamen yıkılabilen doğal materyallerdir. Bu tanımdan yola çıkılarak, biyopolimerlerin fosil yakıtlar, selüloz, şeker ve nişasta gibi doğal hammaddelerden üretilebileceğini söyleyebiliriz (Visch, 2002).

Biyopolimerlerin özellikleri üretildikleri hammaddelerin cinsine bağlı olduğu kadar, üretildikleri ortamların fizyolojik koşullarında yapılacak olan kimyasal modifikasyonlardan da etkilenmektedir. Bu etkileşimleri, biyopolimerlerin bazı çok belirgin özellikleri (nem, su direçliliği, saydamlık, yüksek ısıya karşı dirençlilik gibi) yönünden oldukça belirleyici olabilmektedir. Biyopolimerlerin bu sayılan karakteristik özellikleri, bu materyallerin nasıl bir uygulamada hangi süreçte kullanılabileceğini belirlemektedir (Seviour and Kristiansen, 1983). Biyokimya literatüründe biyopolimerler, fizyolojik aktiviteleri ve kimyasal yapıları temel alınarak, üç temel grup altında sınıflandırılmışlardır:

- Polisakkaritler
- Proteinler
- Polinükleotidler

Çizelge 2.2’de, bu üç sınıfta toplanan biyopolimerler ve bu yapıların bileşenleri ile ticari uygulamaları verilmektedir.

Çizelge 2.2. Biyopolimerlerin Fizyolojik Olarak Sınıflandırılması (Stevensen, 1999).

<b>Polimer</b>	<b>Yapısal Tanım</b>	<b>Ticari Uygulama Alanları</b>
Polisakkaritler	Monosakkaritlerin poliasetal ve/veya poliketal organizasyonları	Gıda maddeleri, fiberik yapı, yapısal materyaller, yapıştırıcı, kaplama
Proteinler	A-aminoasitlerin poliamidleri	Gıda maddeleri, fiberik yapı, tıbbi ajan
Polinükleotidler	Nükleositlerin ve fosforik asitin poliesterleri	Genetik mühendisliği (Tıbbi ajan, tarım kimyasalları, vs.)

Bu tez çalışmasına konu olan fungal biyopolimer polisakkarit yapıdadır. Polisakkarit yapıdaki biyopolimerler, farklı canlı türlerinde farklı oranlarda karşımıza çıkmaktadır. Selüloz ve nişasta doğada en yaygın olan polisakkaritik polimerdir. Her ikisinin de temel monomerik birimi D-glukoz'dur. Ancak, bu iki biyopolimer de doğada bitkisel kaynaklarda mevcuttur. Oysa ki, bitkiler dışında hayvan ve mikroorganizma yapısı da incelendiğinde, polisakkarit yapısında polimerlere oldukça sık rastlanılmaktadır. Örneğin, kitin ve kitosan polimeri, kabuklu hayvanların kabuk yapısında ve böceklerin dış iskeletinde temel yapısal bileşen olarak yer almakla beraber ökaryotik mikroorganizmalar olan fungusların hücre duvarı yapısına da katılmaktadır (Münzberg et al., 1995).

Doğada kendiliğinden canlı organizmalar tarafından sentezlenen bu doğal polimerik yapılar, sentetik polimerlerle beraber günümüzde pek çok endüstri sahasında kullanım alanı bulmakta ve ticari olarak büyük kazançlar sağlamaktadırlar. Son zamanlarda, özellikle mikroorganizmalar aracılığıyla üretilen polisakkarit yapıdaki biyopolimerler (mikrobiyal polimerler), tıp alanı başta olmak üzere, biyoteknolojik araştırmaların en ilgi çekici konusu olmuştur (Jeong et al., 2004).

Biyoteknolojik araştırmalarda ve buna bağlı olarak da endüstriyel uygulamalarda biyopolimer üretimi için *Basidiomycetes* familyasında funguslar tercih edilmektedir (Bergbauer et al., 1991). Basidiomycetes'lerin saf kültürleri, lignin ve rekalsitrant maddelerin yıkımı, toprak biyoremediasyonu, yenilebilir fungal gıda ürünleri ve metabolit üretimi gibi biyoteknolojik proseslerde başarı ile kullanılmaktadır (Krcmar and Ulrich, 1998). Basidiomycetes'lerin yıkım kapasiteleri oldukça ayrıntılı çalışılmıştır. Beyaz çürükçül fungusların oldukça önemli miktarlarda ürettikleri ekstraselüler polisakkaritlerin (mikrobiyal polimerler) her geçen gün daha fazla sayıda önemli uygulama alanlarında kullanıldıkları görülmektedir (Burns et al., 1994). Bu çalışmada kullanılan *Trametes versicolor*, biyoteknolojik araştırmalarda oldukça sık kullanılan bir fungus türüdür. Özellikle Japonya ve Çin'de, *T. versicolor*'ın farklı izolatlarından veya genetik olarak modifiye edilmiş suşlarından elde edilerek, ticari ürün olarak dünya pazarında önemli bir yeri olan eksopolisakkarit yapıdaki biyolojik polimerler, farklı kullanım amaçlarına (immun sistem destekleyicisi, antikanser ajanı, antiaging ajanı, gıda katkı maddesi, vs.)

hizmet etmek üzere milyon dolarlık hasılatlarla satılmaktadırlar. Bu pazar, her geçen gün artmakta olan fungal polisakkaritler üzerine yapılan biyokimyasal ve biyomedikal araştırmalardan alınan olumlu sonuçlarla daha da gelişmeye aday görünmektedir (Cui and Chisti, 2003).

Bu eksopolisakkaritler genel olarak “glukanlar” olarak tanımlanır. Glukanlar, funguslarda en bol bulunan polisakkaritler olup, çeşitli derecelerde monosakkaritlerin daha çok  $\beta$ -1,3 zincirlerinin  $\beta$ -1,6 dallanmalarını içeren yüksek molekül ağırlıklı polimerlerdir. Bu reaksiyon glukan sentetaz olarak adlandırılan bir enzim tarafından katalizlenmektedir. Glukan sentetazın en önemli özelliği fungusun türüne ve gelişmişlik düzeyine bağlı olarak önemli farklılıklar göstermesidir (Herrera, 1991).

Mikroorganizmaların büyük bir bölümü, eksopolisakkaritlerden oldukça önemli miktarlarda üreterek kendileri için bazı avantajlar elde ederler. Çünkü bu polimerik yapılar mikroorganizmlarda önemli roller üstlenmektedirler. Bunlar:

1. Mikroorganizmanın yüzeylere kolayca tutunarak çevreden ihtiyacı olan maddeleri alabilmesini sağlarlar.
2. Su kaybını azaltarak diğer zararlı çevresel şartlardan canlının en az oranda zarar görmesini sağlarlar.
3. Polisakkarit yapıda olmaları nedeniyle, besin azlığı gibi ekstrem koşullarda, yine kendilerinin sentezlediği ve kendilerinin yıkımından sorumlu glukanaz enzimleri vasıtasıyla yıkılarak harcanmak üzere, depo-besin maddesi olarak kullanılırlar.
4. Eksoenzimlerin tutuklanmasında doğal destek materyali olarak kullanılırlar. (Bes et al., 1987; Bohn and BeMiller, 1995).

### **2.3.1. Fungal biyopolimerler ve kullanım alanları**

Mikroorganizmlar ekstraselüler polisakkaritleri kendilerine avantaj sağlamak üzere üretirken, biyoteknoloji endüstrisi bu polimerlerin, kullanılabilir fiziksel özelliklere sahip olanlarından bazılarını insan kullanımına kazandırmıştır. Bu tip ticari



kullanımları olan biyopolimerlerden birkaç tanesi hakkında kısa bilgiler aşağıda verilmektedir.

### **2.3.1.1. Schizophyllan**

Bu eksopolisakkarit, *Schizophyllum commune* ATCC 38548 beyaz çürükçül fungusu tarafından üretilmektedir. Moleküler ağırlığı, 450.000 dalton'dur. Yapısında,  $\beta$ -1,3 bağlanmalarını içeren zincire,  $\beta$ -1,6 bağlı glukoz residularını içerir. Schizophyllan'ın viskoz solüsyonu, yüksek termal stabilite özelliği göstermektedir. Bu özellik bu polimere ticari yönden önem katmaktadır. Örneğin, krem ve losyonlarda yoğunluk arttırıcı olarak ve deri yaşlanmasının yanısıra depigmentasyonu da geciktirici olarak, sağlıklı cilt başlığı altında kozmetikte kullanılmaktadır. Bunlara ilave olarak Schizophyllan, deri hücrelerinin proliferasyonunu indükleyerek, kollajen biyosentezini artırma özelliği nedeniyle güneş yanığı tedavilerinde kullanılmaktadır (Rau, 2001).

Antitümör ajanı olarak, anti-HIV ve anti-viral ajan olarak klinikte kas içine enjeksiyon yöntemiyle uygulanmaktadır. Ayrıca  $\beta$ -1,3 bağlanmaları içerdiğinden, herhangi bir başka tipteki bağ tipine sahip olanlara kıyasla çok daha fazla makrofaji uyatabilmektedir (Mueller et al., 2000). Tüm bu özellikleri nedeniyle, Schizophyllan, pek çok ticari şirket tarafından üretilmekte ve patent altına alınan ticari bir ürün olarak pazara sunulmaktadır (Rau, 2001).

### **2.3.1.2. Pullulan**

*Aureobasidium pullulans* tarafından sentezlenen pullulan, maltotrioz ile bunların az sayıda  $\alpha$ -1,6 bağlanmalarından oluşan lineer bir polimerdir. Moleküler ağırlığı  $10^3$  ile  $3 \times 10^6$  dalton arasındadır ve bu değer üreme ortamının fizyolojik şartlarına ve kullanılan suşa bağlı olarak verilen aralıkta değişmektedir (Reeslev et al., 1996). Pullulan, yüksek oranda suda çözünebilirlik özelliğine sahiptir. Pullulanın uygulamada kullanım önerilerinden birisi, bu polimerin yağa rezistans ve suda çözünebilir olmasının yanısıra düşük oksijen geçirgenliği özelliğinde olması nedeniyle, yiyeceklerin daha uzun süre taze ve lezzet kaybına uğramadan saklanabilmesi için paket materyali olarak kullanılabilceği yönündedir (Sutherland, 1996).

### **2.3.1.3. Lentinan**

Shiitake mantarı olarak da bilinen *Lentinus edodes*'ten sentezlenen lentinan, bir  $\beta$ -1,3 ve  $\beta$ -1,6-D-glukan'dır. Molekül ağırlığı 400.000-1.000.000 dalton aralığındadır. Lentinanın gastrik ve kolorektal kanserlerde yaşam süresini uzattığına ve immün sistemi güçlendirdiğine yönelik elde edilen bulgular, klinikte kullanımını yaygınlaştırmıştır (Minato et al., 2001).

### **2.3.1.4. *Trametes versicolor* Proteoglikanları**

Funguslar tarafından sentezlenen polisakkarit-peptidler veya proteoglikanlar üzerine polisakkarit  $\beta$ -D-glukan zincirlerinin sıkıca bağlanmış polipeptid zincirleri ya da küçük proteinlerdir. *Trametes versicolor* (*Polyporus versicolor*, *Coriolus versicolor* ya da Japonya'daki *Kawaratake* ve Çin'de *Yun Zhi*:bulut fungusu gibi isimler alır) beyaz çürükçül fungusu, bu tip peptid bağlı polisakkaritik yapıları sentezleme kabiliyetine sahip bir mikroorganizmadır. Nitekim, 1965 yılında Japonya'da bir kimya mühendisi, *Trametes versicolor*'ın antikanser etkisini araştırırken, sonradan PSK (polisakkaroid krestin) olarak isimlendirilen ve patenti alınan polisakkaropeptid yapıdaki biyopolimeri izole etmeyi başarmıştır. 1983 yılında ise Çin'de bir araştırmacı, yapı olarak PSK'ya çok benzeyen ve yine *Trametes versicolor*'dan izole edilen PSP (polisakkaropeptid)'i tanımlamıştır (Kidd, 2000).

**PSK:** Ticari adı Krestin olup, *Trametes versicolor*'ın CM-101 suşundan elde edilmektedir. Yapısal bileşiminin yaklaşık %62'si polisakkarit ve %38'i protein olmakla beraber bu oranlar küçük aralıklarla değişim gösterebilmektedir. PSK'nın glukan kısmı,  $\beta$ -1,4 ana zinciri ve  $\beta$ -1,3 yan zincirleri ile o- veya N-glikozidik bağlarıyla polipeptid kısmına bağlanmış  $\beta$ -1,6 yan zincirlerini içerir. Polipeptid kısım, aspartik asit, glutamik asit ve diğer asidik aminoasitlerce oldukça zengindir. PSK, moleküler ağırlığı 94 bin ile 100 bin dalton arası değişen bir moleküller dizisidir. Özellikle mide, özofagus, nazofarinks, kolon, rektum ve akciğer kanserlerinde yapılan denemeler sonucunda, kanser vakalarında ömrü uzatma (5 ile 15 yıl arası) ve kemoterapiden kaynaklanan sıkıntıları azaltma yönünde olumlu etkileri gözlenmiştir (Kidd, 2000).

**PSP:** *Trametes versicolor*'ın Cov-1 suşundan elde edilmektedir. PSP, PSK'ya yapı olarak büyük benzerlik göstermekle beraber sakkarit yapısında PSK'da yer alan fruktoz yerine arabinoz ve ramnoz içermektedir. PSP'deki polisakkarit zincirler tam bir  $\beta$ -glukan yapı özelliğindedir. Moleküler ağırlığı 100 bin daltondur. 1983'de izole edildiğinden beri gerçekleştirilen klinik araştırmalar hızla yol almış ve kanser araştırmalarındaki faz-I, faz-II ve faz III ile insanlardaki denemeler tamamlanmıştır. PSP'nin toksik olmadığı, kanser hastalarında yaşam süresi ve kalitesinin artırıcı yani immünderestekleyici bir kapasitesi olduğu kanıtlanmıştır (Kidd, 2000).

Biyolojik kökenli polimerik materyaller konusundaki gelişmeler pek çok faktöre bağlı olmakla beraber, bunlardan en önemlisi üretim maliyetleridir. Bu tip polimerik yapıların sundukları hizmet kadar, üretim maliyetleri de tercihlerinde büyük rol oynamaktadır. Bazı polimerlerin kendilerine has birtakım özellikleri olmakta ve bu özellikler onlara belirli bir pazar payı hakkı imkanı sunmaktadır. Örneğin, üretimi çok pahalı olmasına karşın, bakteriyel kökenli Hiyaluronikasitin yerini çoğu uygulamada başka polimerik yapılar alamamaktadır. Bunun aksi ancak, ökaryotik bir kaynaktan üretilecek olan bir polimerin varlığı ile mümkün olabilir. Yine bir başka örnek olarak, bu tez çalışmasında hedeflenen konulardan biri olan ve daha önce literatürde benzer bir çalışmaya rastlanmayan, fungal biyopolimere tutuklu enzim eldesi verilebilir. Çalışmamızda kullandığımız mikroorganizma olan *T. versicolor*, uygun fizyolojik koşullar altında, polisakkarit yapıdaki biyopolimeri üreme ortamında oluşturmakta ve bu biyopolimer sentezlenirken fungusa ait olan enzimleri de (özellikle de Lakkaz) yapısında tutuklanmış durumda bulundurmaktadır. Bu şekilde fungus tarafından gerçekleştirilen tutuklanmış enzim senteziyle ekonomik bir kazanç elde edilmiş olmaktadır.

Bu şekilde vazgeçilmez özellikler sunup, üretim maliyeti düşük biyopolimerler keşfedildikçe, bu tip biyopolimerlere olan talep artacaktır. Bu süreç eğer gerçekleşirse, kirlenme karşıtı teknolojiye olan eğilimle birlikte, yenilenebilir kaynaklardan elde edilen biyopolimerlerin sentetik polimerlerin yerini alması hiç de şaşırtıcı olmayacaktır (Schuster et al., 1993).

#### **2.4. Beyaz Çürükçül Funguslarla Boya Dekolorizasyonu**

İlk ticari sentetik boya, bir tesadüf sonucu William Henry Perkin tarafından 1856 yılında keşfedilmiştir. 19. Yüzyılın sonuna gelindiğinde 10.000 yeni sentetik boya

geliştirilmiş ve satışa sunulmuştur. Günümüzde boya tüketimi yılda yaklaşık 600 bin tonu bulmaktadır (Wesenberg et al., 2003). Endüstriyel boyaların çevreye salınımı 2 temel kaynaktan gerçekleşmektedir:

- 1) fabrikalardaki üretimden kaynaklanan akıntılar;
- 2) tekstil fabrikaları gibi boya kullanan endüstriler.

Boyama işlemleri sırasında kullanılan boyaların yaklaşık %10-15'inin atıksulara karıştığı tahmin edilmektedir. Bu boyaların büyük bir kısmı ışık, sıcaklık gibi çevresel ajanlara ve mikrobiyal ataklara karşı stabildir. Dolayısıyla bu bileşikler rekalsitrant bileşikler olarak tanımlanmaktadır (Rodriguez et al., 1999).

Beyaz çürükçül funguslar kullanılarak, çeşitli tekstil boyalarının dekolorizasyonunda uzun yıllardır çalışılmaktadır. Lignin yıkımını gerçekleştiren enzimleriyle çok sayıda boyayı dekolorize eden beyaz çürükçül türlerine her geçen gün bir yenisi eklenmektedir. Funguslar, üreme ortamlarında karbon, azot, kükürt ve fosfor kaynakları sınırlandırıldığında sekonder metabolizma ürünleri olarak lignin peroksidaz (LiP), mangan peroksidaz (MnP) ve lakkaz enzimlerini sentezlemektedir. İlk boya dekolorizasyonu, Tien ve Kirk (1983)'ün *Phanerochaete chrysosporium* ile yaptıkları bir çalışma sonucunda gerçekleşmiştir. Wesenberg et al. (2003), boya dekolorizasyonunu gerçekleştiren 29 adet beyaz çürükçül fungusla çalışmıştır. *Trametes versicolor*'da boya dekolorizasyonundan sorumlu olan en önemli enzimler mangan peroksidaz ve lakkazdır.

Tüm dünyada üretilen endüstriyel renklendiricilerin yaklaşık %50'sini azo boyalar oluşturmaktadır. Tekstil endüstrisinde indigo boyaların kullanımı da büyük bir yer kaplamaktadır. Bu boyalar anaerobik koşullar altında kanserojen bileşiklere dönüşmektedir (Rodriguez et al., 1999). Özellikle beyaz çürükçüler içerisinde *Trametes versicolor* tarafından sentetik boyaların dekolorizasyonuna ait çalışmalar ve dekolorizasyondan sorumlu enzimler Tablo 2.3'de özetlenmektedir.

Çizelge 2.3. *Trametes versicolor* tarafından dekolorize edilen sentetik boyalar (Wesenberg et al., 2003).

Organizma	Lignin modifiye edici enzim	Boya
<i>Trametes (Coriolus) versicolor</i>	Lakkaz, Lignin peroksidaz, Mangan peroksidaz	Everzol Turquoise Blue GPC, Everzol Yellow 4GL, Everzol Red RBN, Orange K-GL, Everdirect Supra Yellow PG, Acid Green 27PAQ, Copper phtalocyanine tetrasulphonic acid tetrasodium saltMC, Indigo Carmine, Neutral RedHC, Acid Red 106N = N, Mordant Yellow 10N =N, Brilliant YellowN = N, ChrysophenineN =N, Chlorazol YellowN = N, Cibacron Brilliant Yellow 3G-P (Reactive Yellow 2)N = N; HC, Cibacron Brilliant Red 3B –A (Reactive Red 4)N = N; HC, Orange IIN = N, Crystal VioletTPM, Brilliant Gren TPM AmaranthN =N, Remazol BlackN = N, Remazol Brilliant BluePAQ, Reactive Blue 15PC, TropaeolinN =N,

		Remazol OrangeN =N, Remazol Brilliant Red BBN =N Reactive Orange 96 N = N, Reactive Violet 5 N =N, Reactive Black 5 N = N, Reactive Blue 15PC, Reactive Blue 38PC Remazol Brilliant Blue RPAQ, Poly R-478PAQ
--	--	---

Azo boyalar gibi bazı sentetik boyalar, anaerobik koşullar altında aril aminlere dönüşerek çok daha toksik bileşikler haline gelebilmektedir (Ramsay and Nguyen, 2002). Boya içeren endüstriyel atık sularının arıtımıyla ilgili çalışmalarda, özellikle boyaların yıkımı ve dekolorizasyonunda biyolojik sistemler günümüzde büyük bir önem kazanmıştır. Özellikle tekstil, gıda ve kozmetik endüstrilerinin atık sularında yüksek miktarlarda boya bulunur. Ancak bu endüstrilerin arıtımda kullandığı anaerobik teknolojilerin oluşturduğu toksik aminler, sucul habitatların daha fazla kirlenmesine neden olmaktadır. Beyaz çürükçül fungusların sahip oldukları ligninaz, Mn-peroksidaz ve lakkaz gibi enzimler ise yüksek oksidatif kabiliyetleri ile kirlilik kaynağı olan boyaların aerobik olarak yıkımı ve dekolorizasyonunda umut vaat edici ajanlar olarak karşımıza çıkmaktadır. *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *T. hirsuta*, *T. villosa*, *T. modesta*, *Pleurotus ostreatus* gibi beyaz çürükçül funguslar ile azo boyalar, heterosiklik boyalar, trifenil metan boyaları, indigo boyalar, polimerik boyalar, reaktif boyalar gibi alıcı ortamlarda kirliliğe neden olan pek çok boyanın yıkımı ve dekolorizasyonu çeşitli araştırmacılar tarafından gerçekleştirilmiştir (Yeşilada and Özcan, 1998; Tauber et al., 2005; Zille et al., 2005; Abadulla et al., 2000; Kandelbauer et al., 2004b; Asgher et al., 2006; Sani et al., 1998; Nilsson et al., 2006).

Bu tez çalışmasında azo boyalardan Congo Red, Orange II, Orange G ve Methyl Red ile indigo boyalardan Indigo Carmin boyalarının *T. versicolor* tarafından üretim ortamına sentezlenen biyopolimer üzerine tutuklu lakkaz enzimiyle

dekolorizasyonu çalışılmıştır. Aşağıda, çalışmada kullanılan boyalar hakkında kısaca bilgi verilmektedir.

## **2.5. Çalışmada Kullanılan Boyaların Sınıflandırılması**

### **2.5.1. Azo boyalar**

Azo boyalar, sentetik boyalar içerisinde bilinen en geniş grubu oluşturmaktadır. Yapılarında buldukları azot grubu sayılarına göre mono-, di-, tri- ve poliazo boyalar olarak adlandırılmaktadırlar. Ticari olarak kullanılan boyaların yaklaşık %50'sini, tekstil uygulamalarında kullanılan boyaların ise %60-70'ini azo boyalar oluşturmaktadır. Bu boyalar genellikle 2 aromatik radikale bağlı durumda sahip oldukları azo bağlarıyla (-N=N-) karakterize olurlar. Aromatik halkaları ve azo bağları kromojeni oluşturur (Champagne, 2009). Bu boyaların geniş ve yoğun bir kullanıma sahip olmalarının pek çok sebebi vardır. İlk olarak oldukça hızlı bir şekilde boyama özelliğine sahiptirler ve birçoğu oldukça ucuz ve kolaylıkla elde edilebilen başlangıç materyallerinden sentezlenebilirler. Ayrıca tipik olarak yapısal modifikasyonlara karşı uyumludurlar ve doğal ve sentetik tekstil ipliklerine bağlanabilirler.

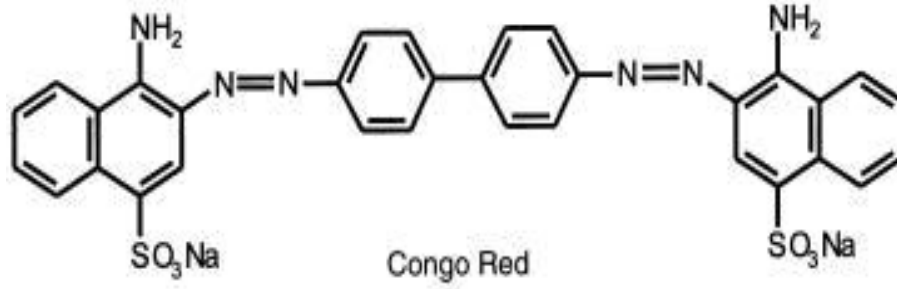
Azo boyalar aynı zamanda çevreye en fazla verilen sentetik boyalardır. Yaygın kullanım alanları, çoğu biyolojik arıtım sistemi tarafından yıkılamayan bu boyaların çevrede birikmesine ve önemli bir çevre problemi haline gelmesine neden olmaktadır.

Azo boyalar her ne kadar çevreye verilmekte olan pek çok kimyasal madde arasında oldukça küçük bir yüzdeye sahip olsa da bu maddelerin renkli olmaları bu boyalarla kontamine olan bölgeleri kolaylıkla görünür bir hale getirmektedir. Bu durum özellikle yer altı ve yüzey sularında büyük bir problem yaratmaktadır. Tüm azo boyalar toksik olmamakla birlikte bazı azo boyaların toksik, kanserojen ve mutajenik özelliğe sahip olduğu bilinmektedir (Bumpus, 1995).

#### **2.5.1.1. Congo Red (Kongo Kırmızısı)**

Congo red, benzidindiazo-bis-1-naftilamin-4-sülfonik asitin sodyum tuzudur. ( $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$ ). Molekül ağırlığı 696,66 g/mol'dür. Yapısında iki adet azot grubu bulunması sebebiyle diazo grubu boyalar arasında yer alır. Suda

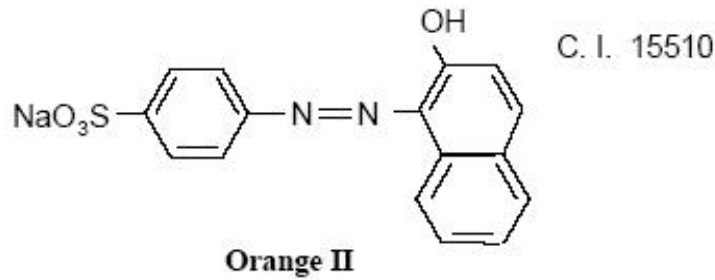
çözündüğünde kırmızı renkte bir çözelti oluşturur. Organik çözücülerden etanol içerisinde de iyi çözünmektedir. Selüloz ipliklerine karşı güçlü bir non-kovalent afiniteye sahiptir ancak toksik özelliği sebebiyle selüloz endüstrileri arasında yer alan pamuk tekstili, kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi gibi alanlarda çoğunlukla yasaklanmıştır. Şekil 2.1'de Congo Red'in kimyasal yapısı verilmektedir ([http://en.wikipedia.org/wiki/Congo\\_red](http://en.wikipedia.org/wiki/Congo_red)).



Şekil 2.1. Congo Red'in kimyasal yapısı

### **2.5.1.2. Orange II**

Molekül formülü  $C_{15}H_{11}N_2Na_1O_4S_1$  olan bu boya yapısında bir azot molekülü içermesi nedeniyle mono azo boyalar arasında yer almaktadır. Moleküler ağırlığı 350,32 g/mol'dür. Katı halde sarı-turuncu renkte toz olarak bulunmaktadır. Kağıt, yün ve deri endüstrisinde kullanılır, suda çözündüğünde sarı-turuncu bir renkte bir çözelti oluşur. Şekil 2.2'de Orange II boyasının kimyasal yapısı verilmektedir (<http://en.wikipedia.org/wiki/Orangell>).



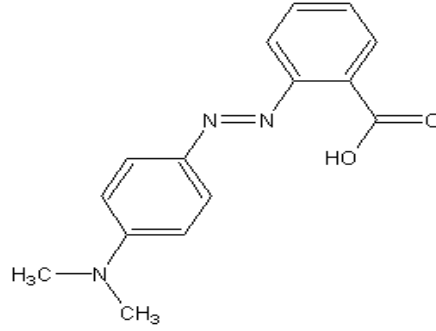
Şekil 2.2. Orange II boyasının kimyasal yapısı

### **2.5.1.3. Acid red 2**

Acid Red 2, aynı zamanda Methyl Red olarak da bilinmektedir. Moleküler ağırlığı 269,3 g/mol'dür. Asidik çözeltiler içerisinde (pH 4,4'ün altında) kırmızı, bazik



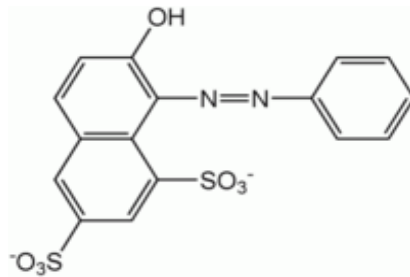
çözeltiler içerisinde (pH 6,2'nin üzerinde) ise sarı renk veren indikatör bir boyadır. Formülü  $C_{15}H_{15}N_3O_2$  olan Acid Red 2, yapısında bir azot grubu bulunması sebebiyle mono azo grubu boyalardandır. Şekil 2.3.'de Acid Red 2 boyasının kimyasal yapısı verilmektedir ([http://en.wikipedia.org/wiki/Methyl\\_red](http://en.wikipedia.org/wiki/Methyl_red)).



Şekil 2.3. Acid Red 2'nin kimyasal yapısı

#### **2.5.1.4. Orange G**

Orange G, (Acid Orange 10 veya C.I. 16230), sentetik bir azo boyadır. Moleküler ağırlığı 452,38 g/mol'dür. Histolojide ve sitolojide boyama amaçlı olarak kullanılır. Turuncu renkte kristaller veya toz şeklinde bulunur. Agaroz jel elektroforezinin görüntülenmesinde renk markörü olarak kullanılabilir. Nötral ve asidik pH'larda turuncu, bazik pH'larda ise kırmızı renk verir. Kimyasal yapısı Şekil 2.4.'de verilmektedir. Endüstriyel olarak özellikle tekstilde ve gıda sanayinde kullanılmaktadır ([http://en.wikipedia.org/wiki/Orange\\_G](http://en.wikipedia.org/wiki/Orange_G)).



Şekil 2.4. Orange G boyasının kimyasal yapısı

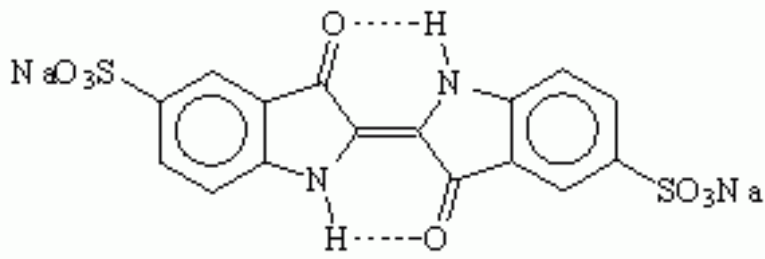
#### **2.5.2. İndigo Boyalar**

İlk indigo boyalar Çinliler, Hintliler ve Endonezyalılar tarafından *Indigofera tinctoria* isimli bir bitkiden fermentasyon yoluyla elde edilmiştir. Bu boyalar doğal yollarla elde edilen boyaların en eski sınıfını oluşturmaktadır. Parlak mavi renkte

oluşturdukları şekillerle tanınırlar. Günümüzde ise özellikle kot pantolon ve ceketlerin boyanması amacıyla sentezlenmektedirler. Indigo carmin bu sınıf içerisinde en fazla bilinen boyalardandır (Champagne, 2009).

### **2.5.2.1. Indigo carmin**

Kimyasal formülü  $C_{16}H_8N_2Na_2O_8S_2$  ve moleküler ağırlığı 466,36 g/mol olan indigo carmin,  $300^{\circ}C$ 'nin üzerinde erime sıcaklığına sahip, suda çözünebilen bir boyadır. pH indikatörü olarak kullanılır, pH 11,4'de mavi, pH 13'de ise sarı renk verir. Özellikle solunması solunum yollarına zarar verir, ayrıca göz ve cilt üzerinde de tahriş edici özelliği vardır. Kimyasal yapısı Şekil 2.5.'de verilmektedir. Endüstriyel olarak özellikle tekstilde kumaşların boyanması amacıyla kullanılmaktadır ([http://en.wikipedia.org/wiki/Indigo\\_carmin](http://en.wikipedia.org/wiki/Indigo_carmin)).



Şekil 2.5. İndigo carmin boyasının kimyasal yapısı

## **2.6. Günümüzde Boyaların Dekolorizasyonunda Kullanılan Teknolojiler**

Bütün boya sınıflarını dekolorize edebilecek bir teknoloji günümüzde mevcut değildir. Boyalar, kimyasal, fiziksel veya biyolojik yollardan dekolorize olabilmektedirler. Boyalar, moleküler yıkımın gerçekleşmediği durumlarda fiziksel olarak aktif karbonla adsorpsiyon yoluyla uzaklaştırılabilir. Boyaların yıkımında, renkten sorumlu kısım olan kromofor, kimyasal reaksiyonlar sonucunda modifiye olmaktadır. Biyolojik dekolorizasyonda ise hücre zarına sorpsiyon veya biyokatalizörler aracılığıyla biyokimyasal yıkım gerçekleşebilmektedir (Champagne, 2009).

### **2.6.1. Aktif karbon**

Aktif karbon yöntemi, daha çok asidik boyaların uzaklaştırılmasında kullanılır ancak reaktif boyalarda kullanılmaz. Her ne kadar düşük maliyetli aktif karbon ile

dekolorizasyonun geliştirilmesine yönelik raporların sayısı artsa da, bunlar genellikle düşük boya konsantrasyonuna sahip atık sularda kullanılmaktadır (Champagne, 2009).

### **2.6.2. Flokülasyon ve elektro-koagülasyon**

Flokülasyonda, elektrosatetik yüklerine göre toplanan partiküller, kireç, şap, demir tuzları veya poli elektrolitler gibi çöktürücüler ile nötralize olur. Elektro-koagülasyonda ise, elektrik akımıyla, anottan çöktürücü ajanlar meydana gelmektedir. Bu işlemler boyaların ve pigment agregatlarının tekstil atık sularından uzaklaştırılması için kullanılmaktadır. Ancak bu teknolojiler beraberinde yüksek hacimlerde çamur oluşmasına da yol açmaktadırlar ve bu sebeple de yeterli miktarda geniş alana ve dejarj kapasitesine ihtiyaç göstermektedirler (Champagne, 2009).

### **2.6.3. Fenton ayıracı**

Fenton ayıracı, solüsyon içerisinde hidrojen peroksiti ve ferröz demiri birleştirir ve çok sayıda boyanın dekolorizasyonunu sağlayabilir. Bu ayıraç, özellikle mikrobiyal bir konsorsiyumun gelişimine engel olabilecek toksik atıksular için uygundur. Ancak bu yöntemde de, flokülasyon sonucu ortaya çıkan yüksek hacimlerdeki asılı haldeki katı maddeler nedeniyle yer ve kapasite ihtiyacı doğmaktadır (Champagne, 2009).

### **2.6.4. Ozonizasyon**

Ozonizasyon tekniği ile boya çözeltilerinin başarılı bir şekilde dekolorize edildiğine dair çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Ozon, klorür ve hidrojen peroksite kıyasla çok daha güçlü bir oksitleyici ajandır ve çok sayıda boyanın yımını gerçekleştirebilmektedir. Ozonizasyon, genellikle arıtım işleminin sonlarına doğru kullanılmaktadır. Bunun sebebi, ham haldeki tekstil atıksularının arıtımında etkinliğinin zayıf olmasındandır. Bu teknoloji, diğer yöntemlere kıyasla daha yüksek bir maliyete sahip olduğundan yüksek boya konsantrasyonlarına sahip atık sularda uygulanmaktadır (Champagne, 2009).

### 2.6.5. Aktif çamurla boya dekolorizasyonu

Aktif çamurla tekstil atık sularının dekolorizasyonu özellikle azo boyalar için anaerobik koşullar altında çalışılmıştır. Kullanılan kimyasallar ve boyaların toksisitesi aktif çamurla gerçekleştirilen arıtım işlemini zorlaştırmaktadır. Geleneksel olarak gerçekleştirilen aktif çamur işleмиyle, basit boyalar hücre zarına adsorpsiyon yoluyla ortamdaki uzaklaştırılabilmektedir. Bu yöntem, yüksek miktarlarda reaktif ve asit boyaları içeren evsel atık sularının arıtımında etkili değildir (Champagne, 2009).

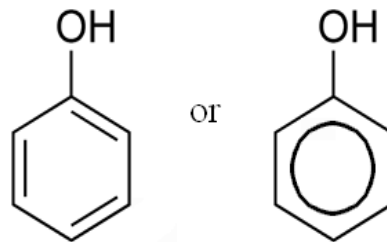
### 2.6.6. Anaerobik boya dekolorizasyonu

Çok sayıda bakteri türü anaerobik koşullar altında azo boyaları dekolorize edebilmektedir. Dekolorizasyon, azo bağının anaerobik redüktif olarak kırılması ile başlar ve kanserojen olan renksiz aromatik aminlerin oluşumunu sağlar. Boya molekülü azoredüktaz enzimi ile veya azoredüktazlar gibi davranan spesifik olmayan sitoplazmik enzimler ile indirgenir (Champagne, 2009).

## 2.7. Beyaz Çürükçül Funguslarla fenol Degradasyonu

### 2.7.1. Fenol Bileşikleri

Fenoller, aromatik hidrokarbon grubuna doğrudan bağlanmış bir hidroksil (-OH) grubuna sahip kimyasal bileşiklerdir. Fenolün kimyasal formülü  $C_6H_5OH$  şeklindedir (Şekil 2.6.). Aromatik halkalarının oksijene sıkı bağlanması sebebiyle yüksek asiditeye sahiptirler. Aromatik halkalarına iki ya da daha fazla sayıda bağlanmış halde hidroksil grupları bulunur. Bazı fenoller dezenfektanların formülasyonunda kullanılır. Laboratuvar süreçleri, kimya endüstrisi, kimya mühendisliği süreçleri, ağaç endüstrisi ve plastik endüstrisinde önemli bir ham madde ve katkı maddesidir (<http://en.wikipedia.org/wiki/Phenols>).



Şekil 2.6. Fenolün kimyasal yapısı

Fenol bileşikleri tüm canlılar için toksiktir. Fenol, US EPA tarafından öncelikli kirletici (kod U188) olarak listelenmiştir. İnsanlar için letal dozu  $5-10 \text{ mg kg}^{-1}$  vücut ağırlığı olarak rapor edilmiştir. Fenolün yüzey sularına karışması kağıt, deri, polimer, yağ rafinerisi, kömür gibi pek çok endüstri tarafından gerçekleştirilmektedir. Fenol atıkları çok sayıda fizikokimyasal yöntemler kullanılarak arıtılmaktadır. Bu yöntemler arasında ozonizasyon, adsorpsiyon, ters osmoz, elektrolitik oksidasyon, fotokataliz gibi yöntemler bulunmaktadır. Ancak tüm bu yöntemlerin kendine özgü zorlukları vardır. Örneğin, elektrokimyasal ve foto kimyasal yöntemler ile ters osmoz ve ozonizasyon oldukça yüksek maliyetli yöntemlerdir. Fiziksel adsorpsiyonda ise oluşan çamurun ortamdan uzaklaştırılması sorun teşkil etmektedir. Çok sayıda endüstriyel atığın içinde yer alan fenol ve türevlerinin yüksek toksisitelerinin yanında pek çok mikroorganizma bu bileşikler ortamda düşük konsantrasyonlarda bulunmaları halinde yıkabilmektedir. Fiziko kimyasal yöntemlerin pahalı olması ve mikroorganizmaların fenol yıkımındaki yetenekleri bu atıkların arıtımında biyoremediasyon sürecinin önemini arttırmıştır. Lakkaz gibi ekstraselüler fenol oksidazlar, kompleks bir fenol bileşiği olan ligninin yıkımında kullanılmaktadır (Udayasoorian and Prabu, 2005).

Fenol ve türevi birleşikler, çeşitli endüstriyel faaliyetler sırasında dış ortama yüksek miktarlarda verilmelerinden ötürü çevresel açıdan büyük öneme sahiptirler. Bu endüstriyel faaliyetler arasında özellikle, plastik, boyalar, ilaçlar ve antioksidantların üretimi ile kağıt ve kağıt hamuru üretimi sırasında ortaya çıkan atık sular bulunmaktadır. Son yıllarda, tirozinaz, peroksidaz veya lakkaz enzimleri ile geliştirilen biyosensörler fenol tespitinde kullanılmaktadır. Bu yöntem, saf veya izole haldeki enzime dayalı işlemlere göre hem daha uzun ömürlü hem de daha düşük maliyetli olmaktadır (Renato et al., 2001).

### 3. YÖNTEM VE GEREÇLER

#### 3.1. Çalışmalarda Kullanılan Mikroorganizma

Deneyisel çalışmalarımızda kullanılan beyaz-çürükçül fungus, *Trametes (Coriolus) versicolor* (ATCC 200801), özellikle fenol oksidaz grubu enzimlerden olan lakkaz aktivitesi bakımından oldukça potent bir suş olup, İnönü Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden temin edilmiştir.

Mikroorganizmanın stok kültürlerinin sürekliliğini sağlamak amacıyla, fungus üretimi için uygun olan, Malt Extract Agar (Difco) katı besiyeri ortamı kullanıldı. Stok fungus kültürleri, her 3 haftada bir yatık malt extract agarlara transfer edildi ve 30<sup>0</sup>C'de 4 günlük inkübasyondan sonra çalışmalarda kullanılmak üzere +4<sup>0</sup>C'de buzdolabında saklandı.

#### 3.2. Lakkaz Üretimi İçin Besiyerinin Hazırlanması

*T. versicolor*'dan lakkaz enzimi üretimi için modifiye edilmiş Vogel'in Minimal Sıvı Besiyeri kullanıldı (Horowitz et al., 1970; Lerch, 1984; Rajan and Virkar, 1987). Bu amaçla, iz element stok çözeltisi (g/100 ml): Sitrik asit.1H<sub>2</sub>O: 2,5; ZnSO<sub>4</sub>: 2,5; Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. 6H<sub>2</sub>O: 0,5; CuSO<sub>4</sub>. 5H<sub>2</sub>O: 0,125; MnSO<sub>4</sub>. 1H<sub>2</sub>O:0,025; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>: 0,025; H<sub>3</sub>P(Mo<sub>3</sub>O<sub>10</sub>). H<sub>2</sub>O: 0,025 olacak şekilde hazırlandı. Vogel ana stok çözeltisi (g/100 ml): Sodyum sitrat: 15, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 25, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>: 10, MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O: 1, CaCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O: 0,5 kullanılarak hazırlandı. Stok iz element çözeltisi %1; glukoz (Merck) ise ortamlara %2 oranında eklendi ve hazırlanan ortamın pH'sı konsantre HCl ile 4,7'ye ayarlandı.

Hazırlanan modifiye vogel sıvı besiyerleri otoklavda (110<sup>0</sup>C'de 1,5 atm. basınç altında 25 dakika) sterilize edildi. Önceden milipor filtreden geçirilerek sterilize edilmiş %0,1'lik Thiamin stok çözeltisinden ortamlara yine %0,1 (v/v) olacak şekilde ilave edildi. Hazırlanan bu besiyerleri mikroorganizma üremesi, lakkaz enzimi üretimi ve aynı zamanda biyopolimer üretimi için kullanıldı.

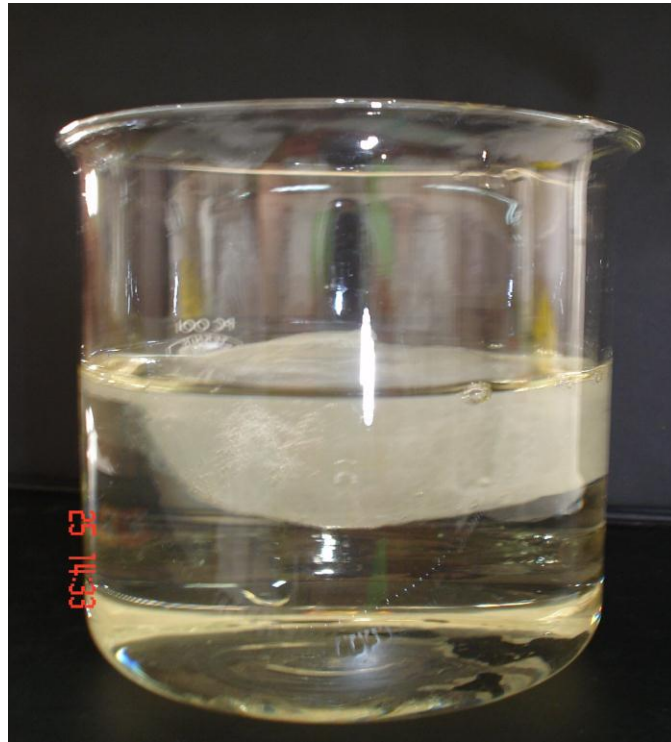
#### 3.3. Ekim ve Kültürasyon

Önceden yatık malt agarlı besiyerlerinde üretilen *Trametes versicolor* stok kültürleri, 5 ml steril distile su içerisinde süspanse edilerek içinde 100 ml'lik Malt Extract (Difco Co.) sıvı besiyeri içeren 250 ml hacimli Erlen Meyere aktarıldı.

Kültürler 3 gün süreyle 140 rpm, 30<sup>0</sup>C'ye ayarlanmış çalkalamalı etüvde (New Brunswick Co. U.S.A) inkübe edildi. Daha sonra kültür ortamlarında oluşan fungal biyokitle homojenize (Virtis-research equipment) edildi. Elde edilen miselyum homojenatından 2 ml/100 ml kültür ortamı şeklinde ortamlara ekim yapıldı. Ekim yapılan kültürler aksi belirtilmedikçe çalkalamalı inkübatörde 140 rpm çalkalama hızında, 30<sup>0</sup>C'de 10 gün süreyle inkübe edildi.

#### 3.4. Biyopolimerlerin Kültür Ortamından Elde Edilmesi

İnkübasyon süreleri tamamlanan *Trametes versicolor* suşlarının biyokütlesi sıvı kültür ortamlarından çift katlı tülbent yardımıyla süzülerek uzaklaştırıldı. Elde edilen kültür filtratı daha sonra bir gece -20<sup>0</sup>C'de soğutucuda bekletildi. Donmuş filtrat oda sıcaklığında çözülmeye bırakıldığında eriyen sıvı ortamın yüzeyinde yüzen jel halinde polimer elde edildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Süpernatant ortamındaki jel formunda biyopolimer

Jelin kurutulması liyofilizatörde (Edwards-Modulyo) gerçekleştirilen liyofilizasyon işlemiyle yapıldı. Liyofilize edilecek jel önce -20<sup>0</sup>C'de tutularak donduruldu. Daha sonra, donmuş haldeki örnek liyofilizatöre yerleştirilerek 72 saat yüksek basınçta

ve  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de kurumaya bırakıldı. Kuruyan polimer, hassas terazide tartılarak okunan ağırlık değeri *gram polimer/L besiyeri* olacak şekilde hesaplandı.

Bu tip kurutma sonucunda poliüretan köpük görünümünde polimerik bir malzeme (blok polimer) elde edildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Liyofilizatörde kurutulmuş blok formundaki polimer

Yukarıda anlatıldığı şekilde elde edilen kuru blok polimer, Retsch (Type=ASTM) marka ve 0,150 mm gözenek çapına sahip özel elekten seramik havan yardımıyla geçirilerek tamamının çapı 0,150 mm'den küçük olan toz polimer elde edildi (Şekil 3.3). Bu toz haldeki polimer kitlesi, ağızlarında nem tutucu tabletleri olan küçük renkli cam şişelere konularak daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere oda sıcaklığında saklandı.





Şekil 3.3. Liyofilizatörde kurutulduktan sonra toz hale getirilmiş biyopolimer

### 3.5. Lakkaz Aktivitesinin Ölçülmesi

Bölüm 3.2 ve 3.3'de anlatıldığı şekilde hazırlanan *Trametes versicolor* kültürlerinin 10 günlük inkübasyonu sonrasında biyokitle ortamdan Bölüm 3.4'de anlatıldığı şekilde uzaklaştırıldı. Elde edilen kültür filtratındaki serbest enzim aktivitesi, Taşpınar and Kolankaya (1998) tarafından kullanılan yöntemle ölçüldü.

Polimere tutuklu enzim aktivitesinin ölçümü için ise, ilk olarak kültür filtratının soğutucuda bir gece dondurulmasını takiben polimer oluşumu gerçekleştikten sonra geriye kalan ortamdan yine aynı yöntemle lakkaz enzimi aktivitesi ölçüldü. Daha sonra polimer öncesi ve sonrası ortamlardaki lakkaz enzimi aktivitesi arasındaki fark hesaplanarak polimere tutuklu halde bulunan lakkaz enzimi aktivitesi bulundu.

Enzim miktarlarının protein cinsinden değerlendirilmesi Lowry yöntemi (Lowry et al., 1951) kullanılarak gerçekleştirildi. Protein cinsinden polimere tutuklu enzim miktarı; polimerleşme öncesi kültür filtratındaki protein miktarından, polimerleşme sonrası filtratta oluşan polimer ortamdan alındıktan sonra geriye kalan sıvıdaki protein miktarının çıkarılmasıyla hesaplandı.

### **3.6. Lakkaz Enzimi İle Bazı Endüstriyel Boyaların Dekolorizasyonu**

#### **3.6.1. Boya çözeltilerinin hazırlanması**

Orange II (Aldrich), Orange G (Merck), Methyl Red (Merck), Congo Red (Sigma) ve Indigo Carmin (Aldrich) boya için stok boya çözeltileri hazırlanırken 100 ml pH 4,5, 50mM Na-Asetat tamponuna 0,1g boya tartılarak eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakika kadar karıştırılarak kullanıma hazır hale getirildi.

#### **3.6.2. İnkübasyon süresinin serbest enzimle dekolozasyon üzerine etkisi**

Orange II, Orange G, Methyl Red, Congo Red ve Indigo Carmin boya için reaksiyon ortamları 100 ml'lik Erlen Meyerler içerisine toplam 20 ml hacimlerde olacak şekilde hazırlandı. Tampon olarak 50 mM'lık Na-Asetatın (pH 4,5) yer aldığı reaksiyon ortamlarına substrat olarak son konsantrasyonu 2 ppm olacak şekilde ilgili boya ve 7,64 U/ml'lik stok enzim kaynağından (biyokitlenin uzaklaştırılmasının ardından geride kalan kültür filtratı) 15,28 U enzim aktivitesine sahip lakkaz enzimi eklendi. Kontrol gruplarına ise kaynatılarak denatüre edilmiş enzim kaynağı ilave edildi.

İndikatör bir boya olan Congo Red asidik pH'larda mor, nötral pH'larda ise kırmızı renkte bir çözelti oluşturmaktadır. Dolayısıyla deneyde farklı saatlerde alınan örnekler ilk olarak 1M NaOH çözeltisinden ilave edilerek nötral pH'ya getirildi.

Enzimatik dekolozasyonda kullanılan boya maksimum absorbans gösterdiği dalga boyunu bulmak için 100 mg/l boya çözeltisi hazırlandı ve dalga boyu taraması spektrofotometrede (Jenway 6105 UV/Vis) yapıldı. En yüksek absorbans değeri Orange G boyası için 485nm; Methyl red boyası için 535nm; Congo red boyası için 500nm; Orange II boyası için 468nm ve Indigo carmin boyası için ise 610 nm olarak saptandı.

Inkübasyon zamanına bağlı enzimatik renk giderimi çalışmalarında her bir boya örneği için hazırlanan reaksiyon ortamları lakkaz enzimi için optimum sıcaklık olan 37<sup>0</sup>C'ye ayarlanmış çalkalamalı su banyosunda (Memmert Co.) inkübe edilerek farklı saatlerde örnekler alındı. Spektrofotometrik okumalar, her bir boya için ayrı ayrı saptanan maksimum absorbans değerlerinde gerçekleştirildi. Boya örneklerinde zamana bağlı olarak değişen dekolorizasyon miktarı yüzde olarak aşağıda verilen Eş. 3.1. kullanılarak hesaplandı:

$$\% \text{ Dekolorizasyon} = \frac{OD_0 - OD_1}{OD_0} \times 100 \quad (3.1)$$

OD<sub>0</sub> = Denatüre enzim kaynağı içeren kontrol grubunun distile suya karşı okunan OD değerini,

OD<sub>1</sub> = Lakkaz enzimiyle muamele edilmiş boya örneğinin distile suya karşı okunan OD değerini ifade etmektedir.

Zamana bağlı olarak hesaplanan % dekolorizasyon değerlerine göre renk gideriminin doğrusal artış gösterdiği bir saat aralığında bundan sonraki optimizasyon deneyleri gerçekleştirildi.

### **3.6.3. Serbest Enzim miktarının dekolorizasyon üzerine etkisi**

50mM Na-Asetat Tamponu (pH 4,5) içinde 20 ml hacminde hazırlanan reaksiyon ortamlarına, 2 ppm Orange G, Orange II, Congo Red, Metil Red ve Indigo carmin boyalarından ve 7,64 U/ml'lik stok enzim kaynağından sırasıyla 3,82; 7,64; 15,28; 22,92; 30,56 U enzim içeren reaksiyon ortamları 37<sup>0</sup>C'ye ayarlanmış çalkalamalı su banyosunda 18 saat süreyle inkübe edildi. Kontrol gruplarına ise kaynatılarak denatüre edilmiş enzim kaynağı ilave edildi. Dekolorizasyon yüzdeleri bölüm 3.6.2'de belirtilen Eş. 3.1. yardımıyla hesaplandı.

### **3.6.4. Başlangıç boya konsantrasyonunun serbest enzimle dekolorizasyon üzerine etkisi**

50mM Na-Asetat Tamponu (pH 4,5) içinde 20 ml hacminde hazırlanan reaksiyon ortamlarına boyalar için hazırlanan stoklardan son konsantrasyonları sırasıyla 1ppm; 2ppm, 3ppm, 4ppm ve 5ppm olacak şekilde eklenerek farklı boya konsantrasyonlarında lakkaz enziminin dekolorizasyon üzerindeki etkinliği araştırıldı. 15,28U enzim aktivitesine sahip reaksiyon ortamları 37<sup>0</sup>C'ye ayarlanmış

çalkalamalı su banyosunda 18 saat süreyle inkübe edildi. Kontrol gruplarına ise kaynatılarak denatüre edilmiş enzim kaynağı ilave edildi. Dekolorizasyon yüzdeleri Bölüm 3.6.2'de belirtilen eş. 3.1. yardımıyla hesaplandı.

### **3.7. Tutuklanmış Lakkaz Enzimiyle Bazı Endüstriyel Boyaların Dekolorizasyonu**

#### **3.7.1. Boya çözeltilerinin hazırlanması**

İmmobilize lakkaz enzimiyle Orange II, Orange G, Methyl Red, Congo Red ve İndigo Carmin boyaalarının dekolozizasyon çalışmaları için kullanılacak stok boya çözeltileri Bölüm 3.6.1'de anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır.

#### **3.7.2. İnkübasyon süresinin tutuklanmış enzimle dekolozizasyon üzerine etkisi**

Orange II, Orange G, Methyl Red, İndigo Carmin ve Congo Red boyaaları için reaksiyon ortamları 100ml'lik Erlen Mayerler içeresine toplam 20ml hacimlerde olacak şekilde hazırlandı, tampon olarak 50mM'lık Na-Asetat Tamponu (pH 4,5) kullanıldı. Reaksiyon ortamlarına liyofilizasyon sonrasında toz haline getirilmiş polimerden 0,2 g (0,3mg protein/g polimer); Orange II, Orange G, İndigo Carmin, Congo Red ve Methyl Red boyaalarından ise 1 ppm ilave edildi. Kontrol gruplarına ise kaynatılarak denatüre edilmiş enzim kaynağı ilave edildi.

Her bir boya örneği için hazırlanan reaksiyon ortamları lakkaz enzimi için optimum sıcaklık olan 37<sup>0</sup>C'e ayarlanmış çalkalamalı su banyosunda (Mommert Co) inkübe edildi. Reaksiyon ortamları her 24 saatte bir alınarak 10 dakika, 7200 rpm'de santrifüj edildikten sonra süpernatant spektrofotometrede (Jenway 6105 UV/Vis) her bir boya için ayrı tespit edilen maksimum absorbans değerlerinde okundu (Bkz. Bölüm 3.6.2.). Elde edilen süpernatant, Congo Red boyasının asit pH'larda mor, bazik pH'larda ise kırmızı renkte çözelti oluşturması nedeniyle ilk olarak 1N NaOH çözeltisi ile nötral pH'ya ayarlandı. Boya örneklerinde zamana bağlı olarak değişen dekolozizasyon miktarı yüzde olarak Bölüm 3.6.2'de verilen Eş. 3.1. kullanılarak hesaplandı.

Zamana bağlı olarak hesaplanan % dekolozizasyon değerlerine göre renk gideriminin doğrusal artış gösterdiği bir zaman aralığında bundan sonraki optimizasyon deneyleri gerçekleştirildi.

### **3.7.3. Tutuklanmış enzim miktarının dekolorizasyon üzerine etkisi**

50mM Na-Asetat Tamponu (pH 4,5) içinde 20ml hacminde hazırlanan reaksiyon ortamları, 0,3 mg protein/g polimer içeren kuru polimerden sırasıyla 0,1g; 0,2g ve 0,3g tartılarak hazırlandı. Reaksiyon ortamları, Orange G, Orange II, Indigo carmin, Congo red ve Methyl red boyalarından 1 ppm içerecek şekilde 37<sup>0</sup>C'ye ayarlanmış çalkalamalı su banyosunda 2 gün süreyle inkübe edildi. Kontrol gruplarına ise kaynatılarak denatüre edilmiş enzim kaynağı ilave edildi. Dekolorizasyon yüzdeleri Bölüm 3.6.2'de belirtilen Eş. 3.1. yardımıyla hesaplandı.

### **3.7.4. Başlangıç boya konsantrasyonunun tutuklanmış enzimle dekolorizasyon üzerine etkisi**

50mM Na-Asetat Tamponu (pH 4,5) içinde 20 ml hacminde hazırlanan reaksiyon ortamları, 1ppm; 2ppm; 3ppm ve 4ppm boya; 0,2g polimer (0,3 mg protein/g polimer) içerecek şekilde hazırlandı. Reaksiyon ortamları 37<sup>0</sup>C'ye ayarlanmış çalkalamalı su banyosunda 2 gün süreyle inkübe edildi. Kontrol gruplarına ise kaynatılarak denatüre edilen enzim kaynağı ilave edildi. İnkübasyon sonrasında alınan örnekler 10 dakika, 7200 rpm'de santrifüj edildi. % Dekolorizasyon hesaplamaları Bölüm 3.6.2'de belirtilen Eş. 3.1. yardımıyla yapıldı.

## **3.8. Serbest Lakkaz Enzimi ile Fenol Yıkımı**

### **3.8.1. Fenol stok çözeltisinin hazırlanması**

Stok fenol çözeltisi 100ml distile su içerisinde 1ml'de 50 ppm fenol içerecek şekilde hazırlandı.

### **3.8.2. Toplam fenol miktarının ölçülmesi**

Toplam fenol miktarı Folin-Ciocaltaeu Metodu kullanılarak kolorimetrik olarak tayin edildi (Slinkard and Singleton, 1977). Bu amaçla aşağıda belirtilen kimyasal çözeltiler hazırlandı:

#### 1) Gallik Asit Stok Çözeltisi:

Standart olarak kullanılan gallik asit çözeltisi, 0,5g gallik asitin 10ml etanolde çözülerek 100ml distile suya tamamlanmasıyla hazırlandı.

Hazırlanan gallik asit çözeltisinden 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ml alınarak herbiri distile su ile 100ml'ye tamamlandı. Bu çözeltilerin fenol konsantrasyonu sırasıyla 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 mg/L gallik asit oldu.

## 2) Sodyum Karbonat Çözeltisi

200gr sodyum karbonat 800ml distile suda çözülerek ısıtıcıda kaynatıldı ve ardından soğumaya bırakıldı. 24 saat sonra süzüldü ve distile suyla 1L'ye tamamlandı.

Örneklerin toplam fenol miktarının ölçülmesinde her bir reaksiyon ortamından 20µL alındı ve 1,58 mL saf su eklendi. Daha sonra 100µL folin ilave edilerek karıştırıldı. 30 saniye ile 8 dakika arası beklendikten sonra üzerine 300µL sodyum karbonat çözeltisinden ilave edildi. Daha sonra 20°C'de 2 saat beklendi ve 765 nm'de okundu. Toplam fenol miktarı gram ekstrede mg gallik asite eşdeğer olacak şekilde hesaplandı.

Kör: 20µL saf su + 1,58mL saf su + 100µL folin + 300µL sodyum karbonat çözeltisi

Örnek: 20µL örnek + 1,58mL saf su + 100µL folin + 300µL sodyum karbonat çözeltisi

### **3.8.3. İnkübasyon süresinin serbest enzimle fenol yıkımına etkisi**

Reaksiyon ortamları 100ml'lik Erlen Mayerler içerisine toplam 20ml hacimlerde olacak şekilde hazırlandı. Çözücü faz olarak 50mM'lık Na-Asetat tamponu (pH 4,5) kullanıldı. Reaksiyon ortamları 200ppm konsantrasyonunda fenol ve 1ml 5,33 U/ml'lik lakkaz enzimi ilave edilerek hazırlandı. Kontrol gruplarına ise kaynatılarak denatüre edilmiş enzim kaynağı ilave edildi.

Reaksiyon ortamları lakkaz enzimi için optimum sıcaklık olan 37°C'ye ayarlanmış çalkalamalı su banyosunda (Memmert Co.) inkübe edildi. Farklı saatlerde alınan örneklerin Bölüm 3.8.2'de anlatılan toplam fenol miktarının ölçümü yöntemine göre Jenway 6105 UV/Vis marka spektrofotometrede OD değerleri okundu. Reaksiyon ortamlarında zamana bağlı olarak değişen yıkım miktarı yüzde olarak aşağıda verilen Eş. 3.2. kullanılarak hesaplandı:

$$\% \text{ Yıkım} = \frac{OD_0 - OD_1}{OD_0} \times 100 \quad (3.2)$$

OD<sub>0</sub> = Denatüre enzim kaynağı içeren kontrol grubunun distile suya karşı okunan OD değerini,

OD<sub>1</sub> = Lakkaz enzimiyle muamele edilmiş fenol örneğinin distile suya karşı okunan OD değerini ifade etmektedir.

Zamana bağlı olarak hesaplanan % yıkım değerlerine göre fenol gideriminin doğrusal artış gösterdiği bir saat aralığında bundan sonraki optimizasyon deneyleri gerçekleştirildi.

#### **3.8.4. Serbest enzim miktarının fenol yıkımına etkisi**

50mM Na-Asetat Tamponu (pH 4,5) içinde 20ml hacminde hazırlanan reaksiyon ortamları 5,33 U/ml lakkaz enzimi içeren stok enzim kaynağından sırasıyla 2,67; 5,33; 8,0; 10,66; 13,3; 15,9U lakkaz aktivitesi içerecek şekilde hazırlandı. Reaksiyon ortamlarına 200 ppm fenol ilave edildi ve 37<sup>0</sup>C'ye ayarlanmış çalkalamalı su banyosunda 6 saat süreyle inkübe edildi. Kontrol gruplarına ise kaynatılarak denatüre edilmiş enzim kaynağı ilave edildi. Farklı saatlerde alınan örnekler Bölüm 3.8.2'de anlatılan toplam fenol miktarı ölçüm yöntemine göre Jenway 6105 UV/Vis marka spektrofotometrede okundu ve OD değerleri elde edildi. % Yıkım hesaplamaları Bölüm 3.8.3'de belirtilen Eş. 3.2. yardımıyla yapıldı.

#### **3.8.5. Başlangıç fenol konsantrasyonunun serbest enzimle fenol yıkımına etkisi**

50mM Na-Asetat Tamponu (pH 4,5) içinde 20ml hacminde hazırlanan reaksiyon ortamlarına 1 ml lakkaz enziminden (5.33 U/mL) ve fenol stok çözeltisinden sırasıyla 50ppm; 100ppm; 200ppm, 300ppm ve 400ppm ilave edilerek farklı fenol konsantrasyonlarında lakkaz enziminin substrat yıkımı üzerindeki etkinliği araştırıldı. Reaksiyon ortamları 37<sup>0</sup>C'ye ayarlanmış çalkalamalı su banyosunda 6 saat inkübe edildi. Kontrol gruplarına ise kaynatılarak denatüre edilmiş enzim kaynağı ilave edildi. Farklı saatlerde alınan örnekler Bölüm 3.8.2'de anlatılan toplam fenol miktarı ölçüm yöntemine göre Jenway 6105 UV/Vis marka spektrofotometrede OD değerleri okundu. % Yıkım hesaplamaları Bölüm 3.8.3'de belirtilen Eş. 3.2. yardımıyla yapıldı.

### **3.9. Tutuklanmış Lakkaz Enzimiyle Fenol Yıkımı**

#### **3.9.1. Fenol stok çözeltisinin hazırlanması**

Stok fenol çözeltisi Bölüm 3.8.1’de belirtildiği şekilde hazırlandı.

#### **3.9.2. İnkübasyon süresinin tutuklanmış enzimle fenol yıkımına etkisi**

Reaksiyon ortamları 100ml’lik Erlen Mayerler içerisinde toplam 20ml hacimlerde olacak şekilde hazırlandı, tampon olarak 50mM’lık Na-Asetat Tamponu (pH 4,5) kullanıldı. Reaksiyon ortamlarına liyofilizasyon sonrasında toz haline getirilmiş polimerden 0,4g (0,34mg protein/g polimer) ilave edildi. Hazırlanan fenol stok çözeltisinden reaksiyon ortamlarına 100ppm ilave edildi. Kontrol gruplarına ise kaynatılarak denatüre edilmiş enzim kaynağı konuldu.

Reaksiyon ortamları lakkaz enzimi için optimum sıcaklık olan 37<sup>0</sup>C’ye ayarlanmış, çalkalamalı su banyosunda inkübe edildi. Reaksiyon ortamları her 6 saatte bir alınarak 10 dakika, 7200 rpm’de santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatantda Bölüm 3.8.2’de anlatılan toplam fenol miktarı ölçüm yöntemine göre Jenway 6105 UV/Vis marka spektrofotometrede OD değerleri okundu. Zamana bağlı olarak değişen yıkım miktarları yüzde cinsinden Bölüm 3.8.3’de verilen Eş. 3.2. kullanılarak hesaplandı.

Zamana bağlı olarak hesaplanan % yıkım değerlerine göre fenol gideriminin doğrusal olarak artış gösterdiği bir saat aralığında bundan sonraki optimizasyon deneyleri gerçekleştirildi.

#### **3.9.3. Tutuklanmış enzim miktarının fenol yıkımına etkisi**

50mM Na-Asetat Tamponu (pH 4,5) içinde 20ml hacminde hazırlanan reaksiyon ortamlarına 0,34 mg protein/g polimer içeren polimerden sırasıyla 0,1g; 0,2g; 0,3g; 0,4g tartılarak ilave edildi. Reaksiyon ortamlarına 100ppm fenol konularak 37<sup>0</sup>C’ye ayarlanmış çalkalamalı su banyosunda 24 saat süreyle inkübe edildi. Kontrol gruplarına ise kaynatılarak denatüre edilmiş enzim kaynağı ilave edildi. İnkübasyon sonrasında alınan örnekler 10 dakika, 7200 rpm’de santrifüj edildi. Alınan örneklerin Bölüm 3.8.2’de anlatılan toplam fenol miktarları ölçüm yöntemine göre Jenway 6105 UV/Vis marka spektrofotometrede O.D değerleri okundu. Yıkım yüzdeleri Bölüm 3.8.3’de belirtilen Eş. 3.2. yardımıyla hesaplandı.



#### **3.9.4. Başlangıç fenol miktarının tutuklanmış enzimle fenol yıkımına etkisi**

50mM Na-Asetat Tamponu (pH 4,5) içinde 20ml hacminde hazırlanan reaksiyon ortamlarına, sırasıyla 50ppm; 100ppm; 150ppm; 200ppm fenol ve 0,4g polimer (0,34mg protein/g polimer) ilave edilerek tutuklu lakkaz enziminin değişen substrat konsantrasyonlarındaki etkinliği araştırıldı. Reaksiyon ortamları 37<sup>0</sup>C'ye ayarlanmış çalkalamalı su banyosunda 24 saat inkübe edildi. Kontrol gruplarına ise kaynatılarak denatüre edilmiş enzim kaynağı ilave edildi. İnkübasyon sonrasında alınan örnekler 10 dakika, 7200 rpm'de santrifüj edildi. Alınan örneklerin Bölüm 3.8.2'de anlatılan toplam fenol miktarı ölçüm yöntemine göre Jenway 6105 UV/Vis marka spektrofotometrede OD değerleri okundu. Yıkım yüzdeleri Bölüm 3.8.3'de belirtilen Eş. 3.2. yardımıyla hesaplandı.

#### **3.10. Biyopolimere Tutuklu Enzim Stabilitesinin Saptanması**

Biyopolimerin, gerek dekolorizasyon gerekse fenol yıkımında da, enzim kaynağı olarak tekrar tekrar ve değişmeyen yüksek verimlilikte kullanımının mümkün olup olmayacağı, tutuklu enzimin stabilitesiyle ilgilidir. Bu amaçla, boyalardan Indigo Carmin'de dekolorizasyon ve fenol yıkımı deneyleri aynı polimerle 4'er kere tekrarlanmak suretiyle yapıldı. Dekolorizasyon çalışmasında optimum koşullar olan 1 ppm boya ve 0,3 g protein/g polimer konularak 2 gün boyunca 37<sup>0</sup>C'de inkübasyon gerçekleştirildi. Fenol yıkımında ise 100 ppm fenol ve 0,4 g polimer (0,34mg protein/g polimer) ile 24 saat boyunca 37<sup>0</sup>C'de inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonu takiben reaksiyon ortamlarındaki biyopolimer santrifüj yoluyla ayrılarak distile suyla yıkanmış ve reaksiyon ortamlarında Indigo Carmin için dekolorizasyon fenol için ise degradasyon miktarı spektrofotometrede okunarak hesaplanmıştır. Distile suyla yıkanan biyopolimer 2. reaksiyon ortamına ilave edilmiş ve inkübasyon aynı koşullar altında tekrar gerçekleştirilmiştir. Çalışma 4. reaksiyon ortamlarındaki dekolorizasyon ve degradasyon miktarlarının hesaplanmasıyla sonlandırılmıştır.

## **4. SONUÇLAR**

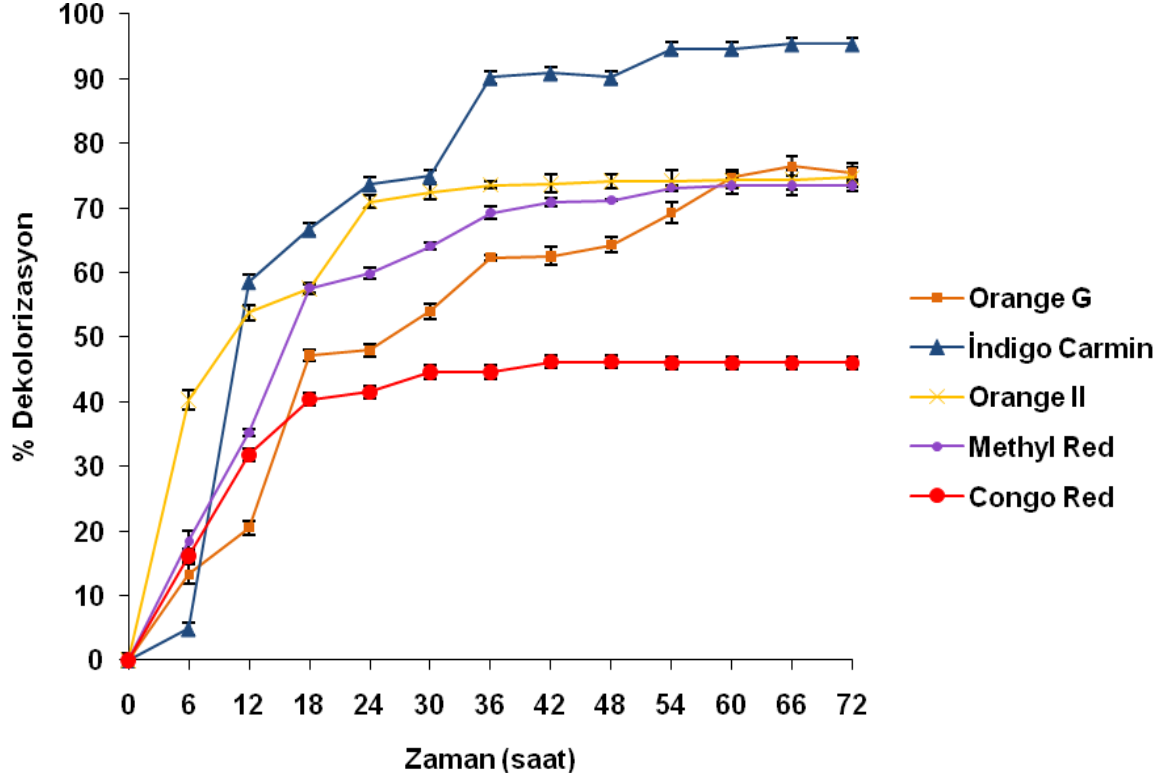
### **4.1. Lakkaz Enzimi ile Bazı Endüstriyel Boyaların Dekolorizasyonu**

#### **4.1.1. İnkübasyon süresinin serbest enzimle dekolozasyon üzerine etkisi**

Azo boyalardan Congo Red, Orange II, Orange G, Methyl Red (Acid Red 2) ve indigo boyalardan İndigo carmin boylarıyla 72 saat boyunca gerçekleştirilen dekolozasyon deneylerinin sonuçları Şekil 4.1'de verilmektedir. Şekilden anlaşılacağı üzere, Orange II ve Congo Red boylarının lakkaz enzimiyle dekolozasyonu inkübasyonun 24. saatine kadar artarak devam etmektedir. Bu sürenin sonunda dekolozasyon değerleri Orange II için %70,94'e, Congo Red için %45'e ulaşmaktadır. 24. saatten itibaren dekolozasyon oranında yavaşlama görülmektedir. Orange II için dekolozasyon %74, Congo Red için yaklaşık %50 oranında durmaktadır.

Methyl red ve Orange G boyları 18. saate kadar hızlı bir şekilde dekolozize olmuştur. Bu sürenin sonunda yıkım yüzdeleri Methyl red için %57,61, Orange G için %47,2 olmuştur. Tüm boylar için dekolozasyon 54. saatten sonra yavaşlamaya başlamış ve %75 değerinde durmuştur. İndigo Carmin boyası ise 12. saate kadar hızla dekolozize olmuştur (%58,6). 36. saatten sonra dekolozasyon durmaya başlamış ve %95 civarında kalmıştır.

Elde edilen bu sonuçlara göre boyların 6-24. saatler arasında hızla artan bir oranda dekolozize olduğu gözlenmiş ve bundan sonraki optimizasyon çalışmaları 18 saatlik inkübasyonlarda gerçekleştirilmiştir.

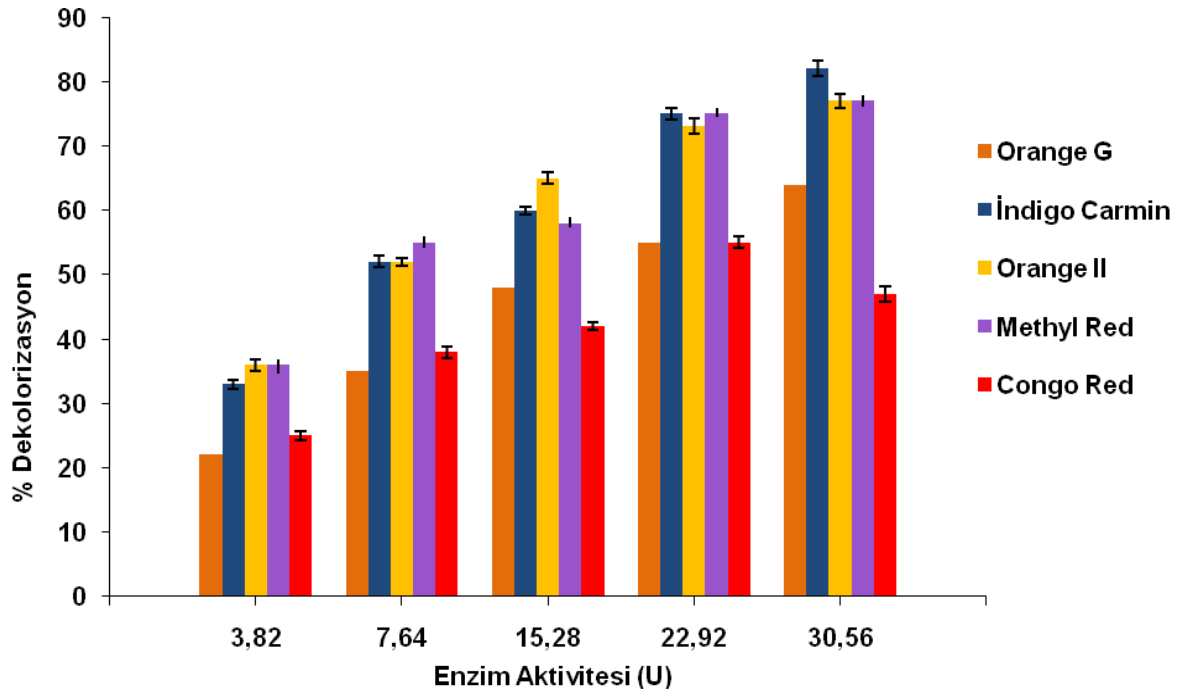


Şekil 4.1. İnkübasyon süresinin dekolorizasyon üzerine etkisi

Reaksiyon ortamları (20 ml): başlangıç boya konsantrasyonu 2ppm; 15,28U enzim aktivitesine sahip lakkaz enzimi, inkübasyon sıcaklığı 37°C, inkübasyon süresi 72 saat, 150 rpm çalkalama hızı. (Değerler 3 çalışmanın ortalamasıdır. Grafik değerlerindeki çubuklar standart sapmaları ifade etmektedir).

#### 4.1.2. Serbest enzim miktarının dekolorizasyon üzerine etkisi

Azo boyalardan Congo Red, Orange II, Orange G, Methyl Red (Acid Red 2) ve indigo boyalardan Indigo Carmin boya ile 7,64 U/ml'lik stok enzim kaynağından sırasıyla 3,82; 7,64; 15,28; 22,92; 30,56U enzim içeren reaksiyon ortamlarının 18 saat süreyle inkübe edilmesi sonucu elde edilen % dekolorizasyon değerleri Şekil 4.2'de verilmektedir.



Şekil 4.2. Enzim Miktarının Dekolorizasyon Üzerine Etkisi

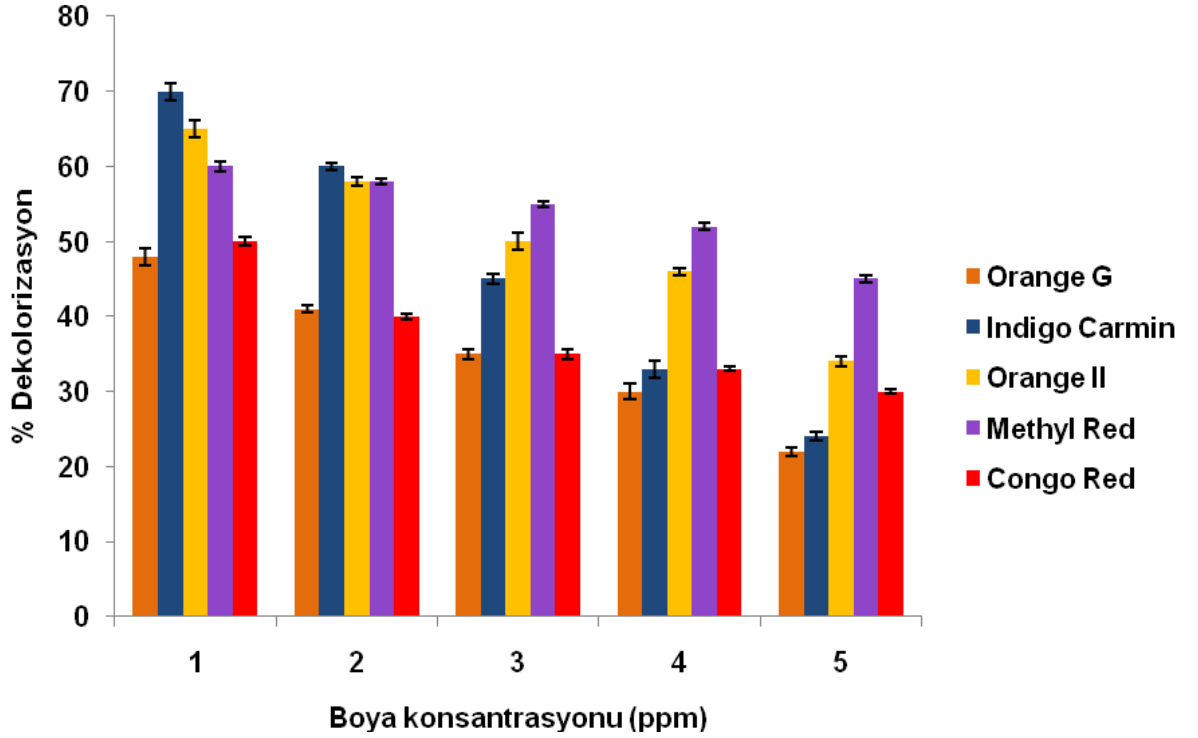
Reaksiyon ortamları (20 ml): başlangıç boya konsantrasyonu 2ppm; 7,64 U/ml'lik stok enzim kaynağından sırasıyla 3,82; 7,64; 15,28; 22,92; 30,56U lakkaz enzimi, inkübasyon sıcaklığı 37<sup>0</sup>C, inkübasyon süresi 18 saat, 150 rpm çalkalama hızı. (Değerler 3 çalışmanın ortalamasıdır. Grafik değerlerindeki çubuklar standart sapmaları ifade etmektedir).

Şekilden de görüldüğü üzere reaksiyon ortamlarında kullanılan enzim miktarının artmasıyla beraber kullanılan boya renklerinin dekolore oranı da artış göstermektedir. Bundan sonraki optimizasyon çalışmalarında 15,28U enzim aktivitesine sahip reaksiyon ortamları kullanılmıştır. 15,28U lakkaz enzimi içeren ortamlarda gerçekleştirilen deneyler sonucunda, Orange G, %48; Indigo carmin, %60; Orange II, %65; Methyl red, %58 ve Congo red, %42 oranında dekolore olmuştur.

#### 4.1.3 Başlangıç boya konsantrasyonunun serbest enzimle dekolore üzerine etkisi

Azo boyalardan Congo Red, Orange II, Orange G, Methyl Red (Acid Red 2) ve indigo boyalardan İndigo carmin boya renkleriyle başlangıç boya konsantrasyonu sırasıyla 1ppm; 2ppm; 3ppm; 4ppm; 5ppm olan reaksiyon ortamlarının 18 saat süreyle inkübe edilmesi sonucu elde edilen % dekolore oranları Şekil

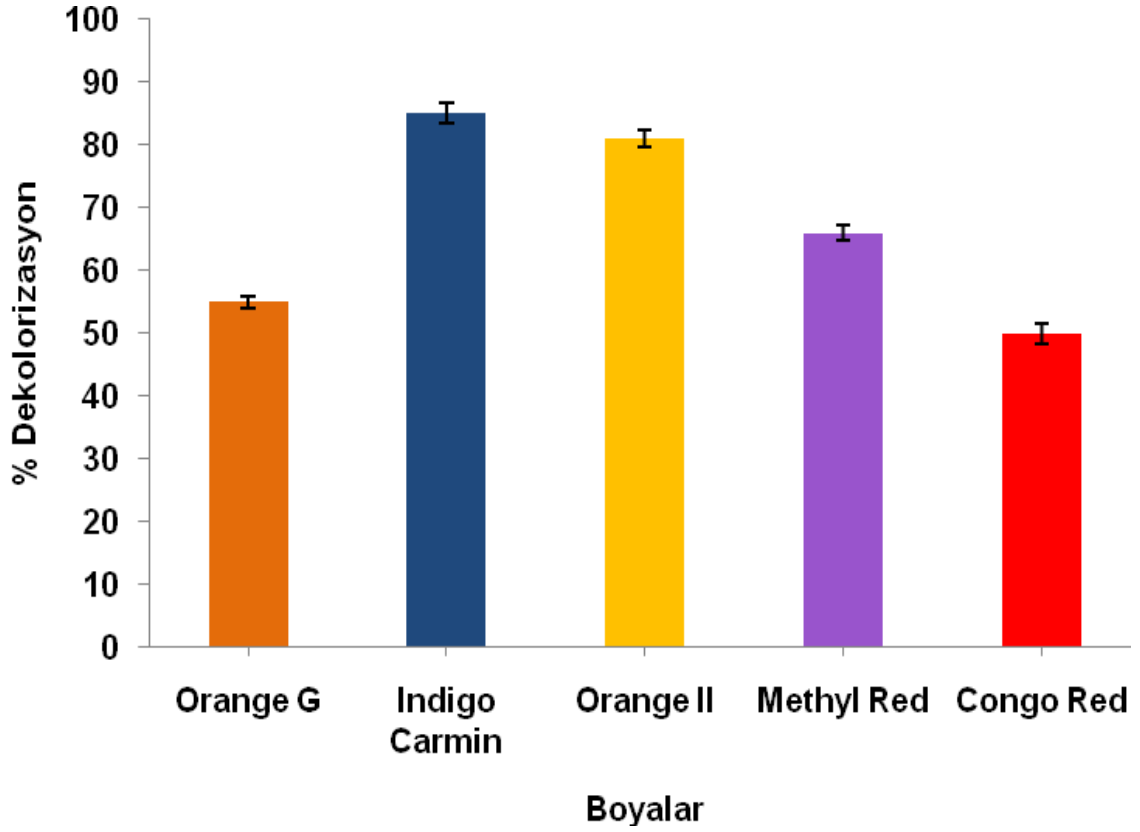
4.3'de verilmektedir. Şekilden de anlaşılacağı üzere reaksiyon ortamlarında kullanılan boya konsantrasyonları arttıkça lakkaz enzimi tarafından gerçekleştirilen dekolorizasyon oranı azalmaktadır. En fazla dekolorizasyon oranı 1ppm ve 2ppm boya içeren ortamlardan elde edilmiştir. 2 ppm boya içeren ortamlarda gerçekleştirilen deneyler sonucunda, Orange G, %41; Indigo carmin, %60; Orange II, %58; Methyl red, %58 ve Congo red, %40 oranında dekolorize olmuştur.



Şekil 4.3. Boya Konsantrasyonunun Dekolorizasyon Üzerine Etkisi

Reaksiyon ortamları (20 ml): başlangıç boya konsantrasyonu 1ppm; 2ppm; 3ppm; 4ppm; 5ppm; 15,28U lakkaz enzimi, inkübasyon sıcaklığı 37<sup>0</sup>C, inkübasyon süresi 18 saat, 150 rpm çalkalama hızı. (Değerler 3 çalışmanın ortalamasıdır. Grafik değerlerindeki çubuklar standart sapmaları ifade etmektedir.)

Optimizasyon çalışmaları sonucunda söz konusu boyalar ile belirlenen optimum koşullarda dekolorizasyon deneyi gerçekleştirilmiştir. Bu deneylerin sonuçları Şekil 4.4'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre maksimum dekolorizasyon değerleri Congo red için %50; Orange II için %81; Methyl red için %66; Orange G için %55; Indigo carmin için ise %85 oranlarında bulundu.



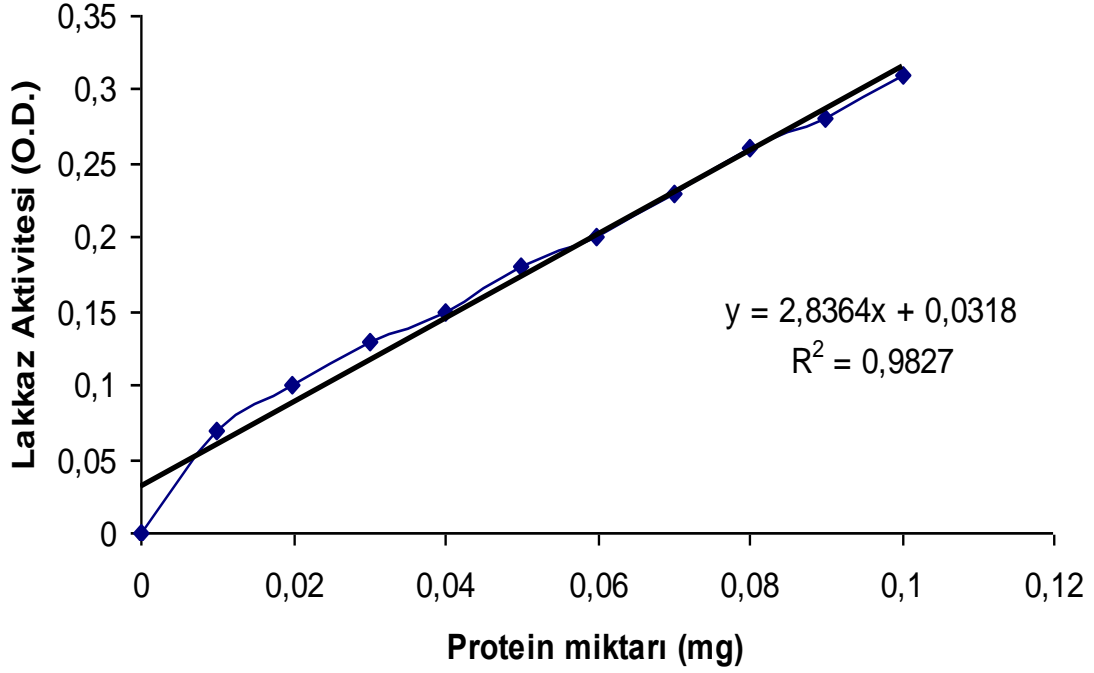
Şekil 4.4. Serbest Enzimle Optimum Koşullarda Gerçekleştirilen Dekolorizasyon

Reaksiyon ortamları (20 ml): başlangıç boya konsantrasyonu 2ppm; 15,28U lakkaz enzimi, inkübasyon sıcaklığı 37°C, inkübasyon süresi 24 saat, 150 rpm çalkalama hızı.(Değerler 3 çalışmanın ortalamasıdır. Grafik değerlerindeki çubuklar standart sapmaları ifade etmektedir).

#### 4.2. Biyopolimere Tutuklu Enzim Miktarının Ölçülmesi

Bölüm 3.8'de anlatıldığı gibi Lowry yöntemi kullanılarak elde edilen protein miktarı ile lakkaz aktivitesi korelasyon eğrisi Şekil 4.5'de verilmektedir. Bu eğriden hareketle, polimerdeki immobilize enzim yüzdesi; polimerleşme öncesi süpernatandaki protein miktarından, polimerleşme sonrası süpernatanda oluşan jel haldeki polimer ortamdaki protein miktarından alındıktan sonra geriye kalan sıvıdaki protein miktarının çıkarılmasıyla bulunarak "immobilize enzim miktarı" hesaplandı. Daha sonra, hesaplanan immobilize enzim miktarının, polimerleşme öncesi süpernatandaki enzim miktarına bölünmesiyle de "% immobilize enzim miktarı" elde edildi. "% immobilizasyon değeri" boyalar için kullanılan polimerde % 59; fenol için kullanılan polimerde ise % 62,5 olarak bulundu

Polimerleşme öncesi ve sonrası süpernatanda Lakkaz aktivitesi ölçülerek, bağlı lakkaz aktivitesi (tutuklu lakkaz) boyalar için gerçekleştirilen deneylerde kullanılan polimerde 7,3 U/g polimer; fenol için kullanılan polimerde ise 6,6 U/g polimer olarak hesaplandı.



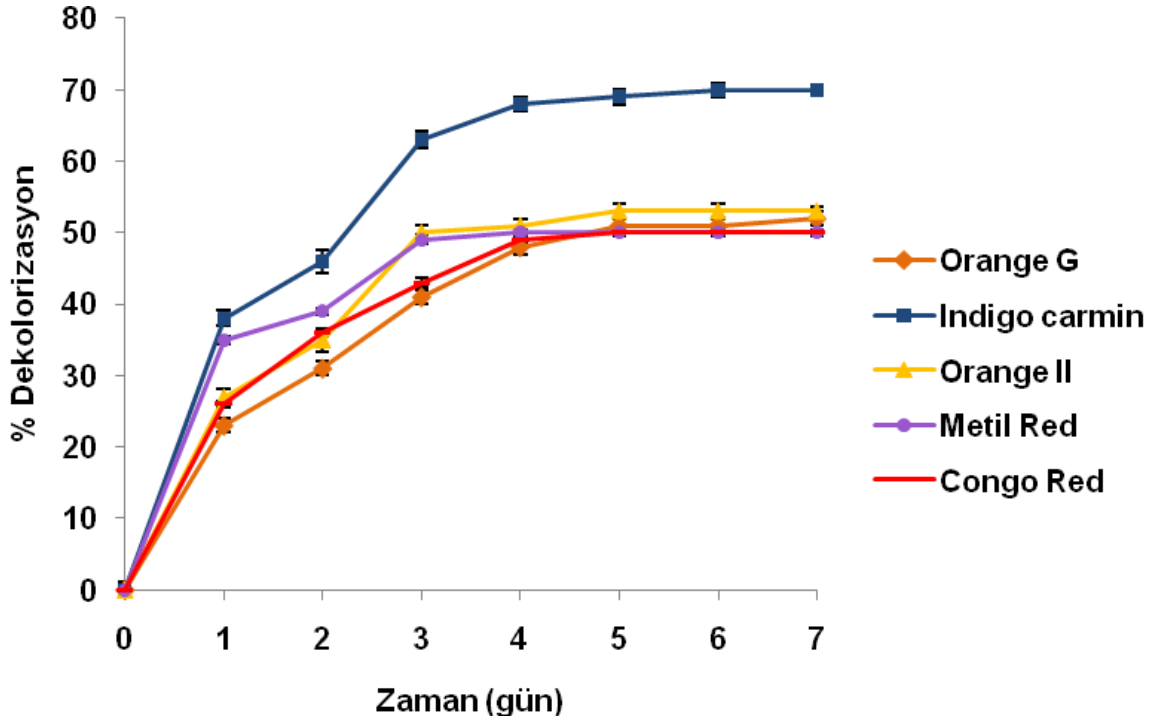
Şekil 4.5. Protein miktarı-Lakkaz Aktivitesi korrelasyon eğrisi

### 4.3 Tutuklanmış Lakkaz Enzimi ile Bazı Endüstriyel Boyaların Dekolorizasyonu

#### 4.3.1. İnkübasyon süresinin tutuklanmış enzimle dekolozasyon üzerine etkisi

Orange G, Orange II, Methyl red, Congo red ve Indigo carmin boylarıyla immobilize enzim kullanılarak 7 gün boyunca gerçekleştirilen dekolozasyon deneylerinin sonuçları Şekil 4.6'da verilmektedir.

Şekilden anlaşılacağı üzere, en yüksek dekolozasyon yüzdesi Indigo carmin boyasında gözlemlendi. 2. günün sonunda bu boya %46 oranında dekolozize olurken 6. gün sonunda boyanın %76'sı dekolozize oldu. İnkübasyonun 2. günü sonunda Orange G %31; Orange II %35; Congo Red %36 ve Methyl red'in %39 oranında dekolozize olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.6. İnkübasyon süresinin dekolorizasyon üzerine etkisi

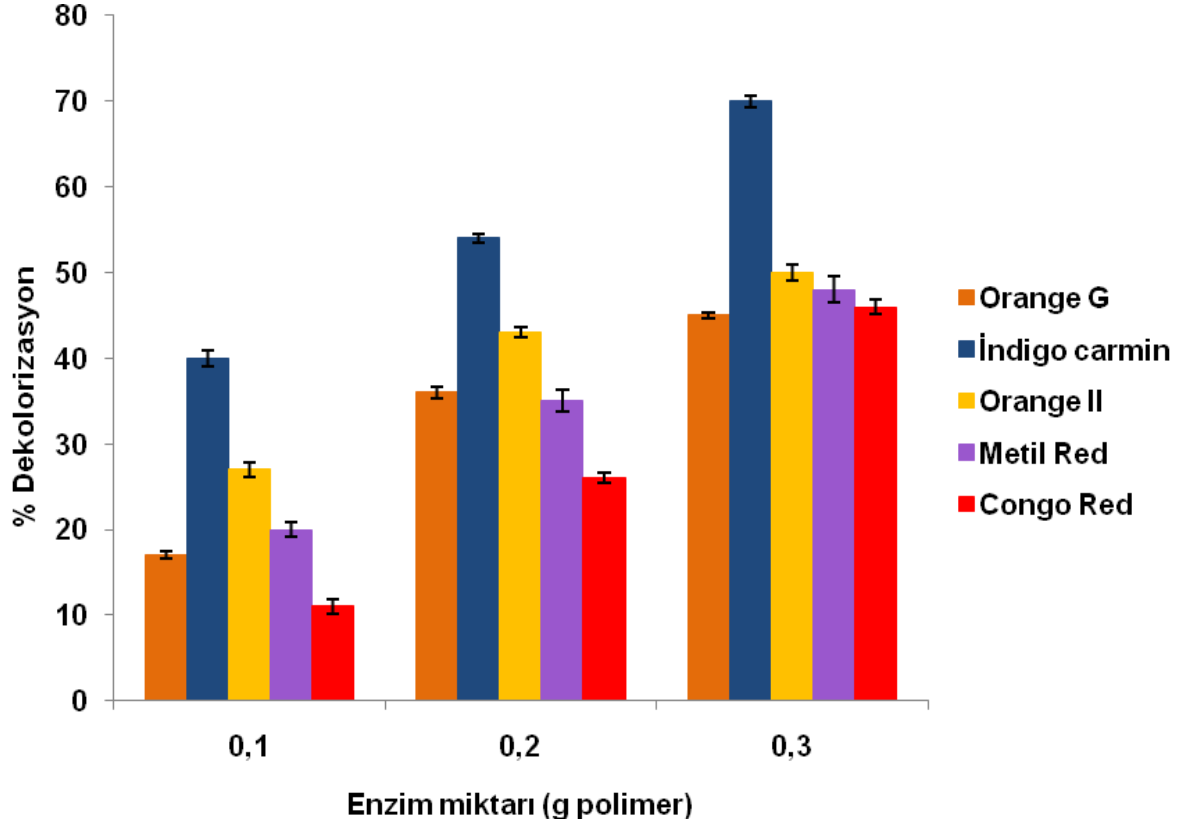
Reaksiyon ortamları (20 ml): başlangıç boya konsantrasyonu 1ppm; 0,2g polimer (tutuklu enzim), inkübasyon sıcaklığı 37°C, inkübasyon süresi 7 gün, 150 rpm çalkalama hızı. (Değerler 3 çalışmanın ortalamasıdır. Grafik değerlerindeki çubuklar standart sapmaları ifade etmektedir).

#### 4.3.2. Tutuklanmış enzim miktarının dekolorizasyon üzerine etkisi

0,1g; 0,2g ve 0,3g polimer kullanılarak hazırlanan reaksiyon ortamlarından elde edilen dekolorizasyon sonuçları Şekil 4.7'de verilmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi polimer miktarının artmasıyla birlikte, artan tutuklu enzim miktarına bağlı olarak boyalarda dekolorizasyon oranı da artış göstermektedir.

En iyi dekolorizasyon yüzdesi Indigo carmin boyasıyla elde edildi. 0,3g polimer içeren reaksiyon ortamlarında boyanın %70 oranında dekolorize olduğu görüldü. Bu miktardaki polimerle diğer boyalar için hazırlanan reaksiyon ortamlarında ise dekolorizasyon yüzdesi %45-50 arasında gerçekleşti.





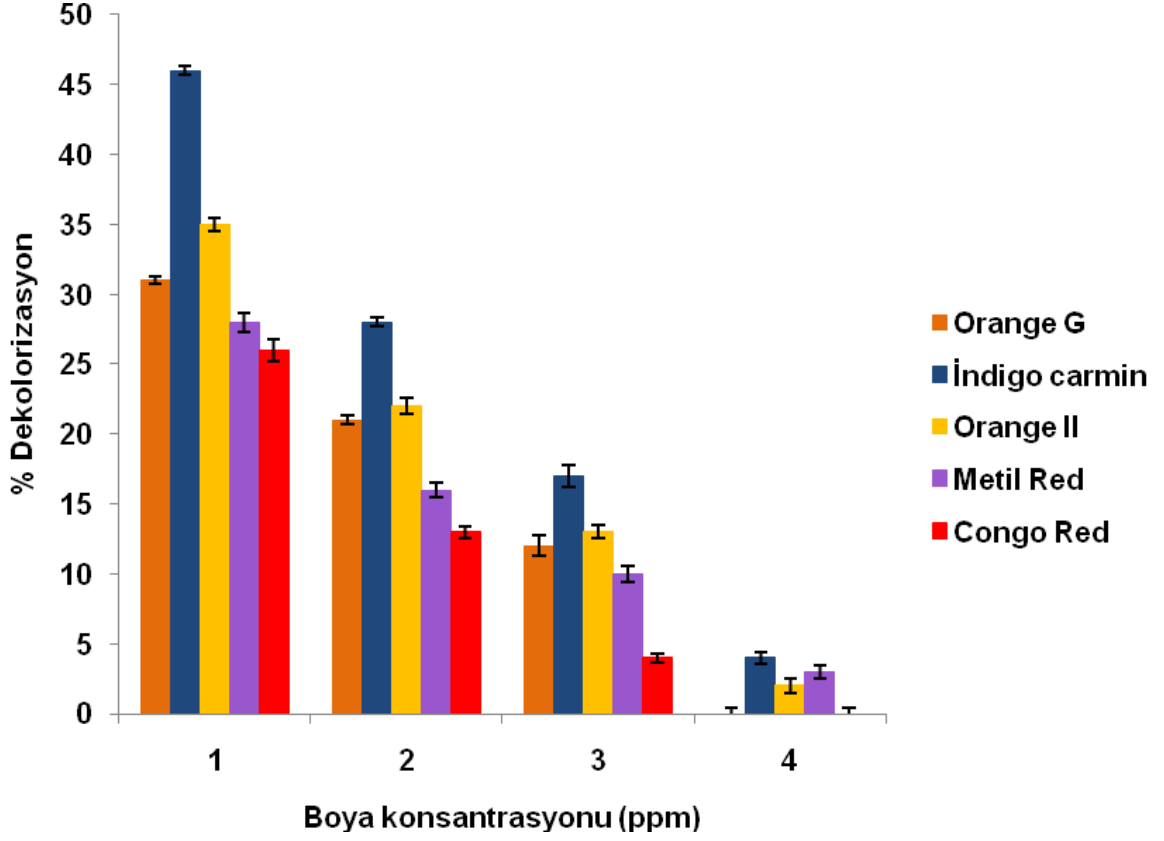
Şekil 4.7. Tutuklu Enzim Miktarının Dekolorizasyon Üzerine Etkisi

Reaksiyon ortamları (20 ml): başlangıç boya konsantrasyonu 1ppm; 0,1g; 0,2g ve 0,3g polimer (tutuklu enzim), inkübasyon sıcaklığı 37<sup>0</sup>C, inkübasyon süresi 2 gün, 150 rpm çalkalama hızı.(Değerler 3 çalışmanın ortalamasıdır. Grafik değerlerindeki çubuklar standart sapmaları ifade etmektedir).

#### 4.3.3. Başlangıç boya konsantrasyonunun tutuklanmış enzimle dekolorizasyon üzerine etkisi

Farklı boya konsantrasyonlarında hazırlanan reaksiyon ortamlarında gerçekleştirilen deneylerin sonuçları Şekil 4.8'de verilmektedir. Şekilden de anlaşılacağı üzere reaksiyon ortamlarında kullanılan boya miktarları arttıkça polimere tutuklu haldeki lakkaz enzimi tarafından gerçekleştirilen dekolorizasyon oranı da azalmaktadır. 1ppm boya içeren örneklerde Indigo carmin %46, Methyl red %28, Orange II %35, Congo red %26, Orange G %31 oranında dekolorize olmuştur.

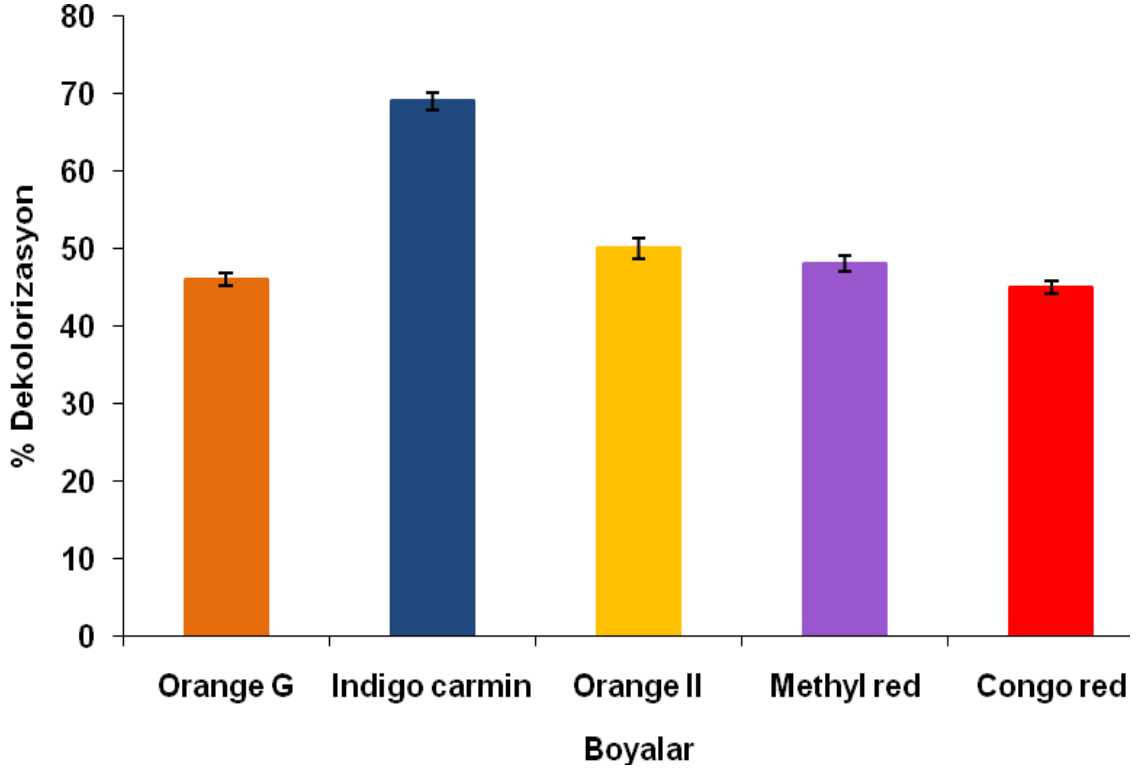
4ppm boya içeren reaksiyon ortamlarında ise Orange G ve Congo red dekolorize olmazken, Indigo carmin %4; Orange II %2 ve Methyl red %3 oranlarında dekolorize olmuştur.



Şekil 4.8. Boya Miktarının Dekolorizasyon Üzerine Etkisi

Reaksiyon ortamları (20 ml): başlangıç boya konsantrasyonu 1ppm; 2ppm; 3ppm ve 4ppm; 0,2g polimer (tutuklu enzim), inkübasyon sıcaklığı 37C<sup>0</sup>, inkübasyon süresi 2 gün, 150 rpm çalkalama hızı. (Değerler 3 çalışmanın ortalamasıdır. Grafik değerlerindeki çubuklar standart sapmaları ifade etmektedir).

Optimizasyon çalışmaları sonucunda söz konusu boyalar ile tutuklanmış enzim (biyopolimer) kullanılarak belirlenen optimum koşullarda dekolorizasyon deneyi gerçekleştirildi. Bu deneylerin sonuçları Şekil 4.9'da verildi. Bu sonuçlara göre Congo red %45; Orange II %50; Methyl red %48; Orange G %46; Indigo carmin ise %69 oranlarında dekolorize oldu.



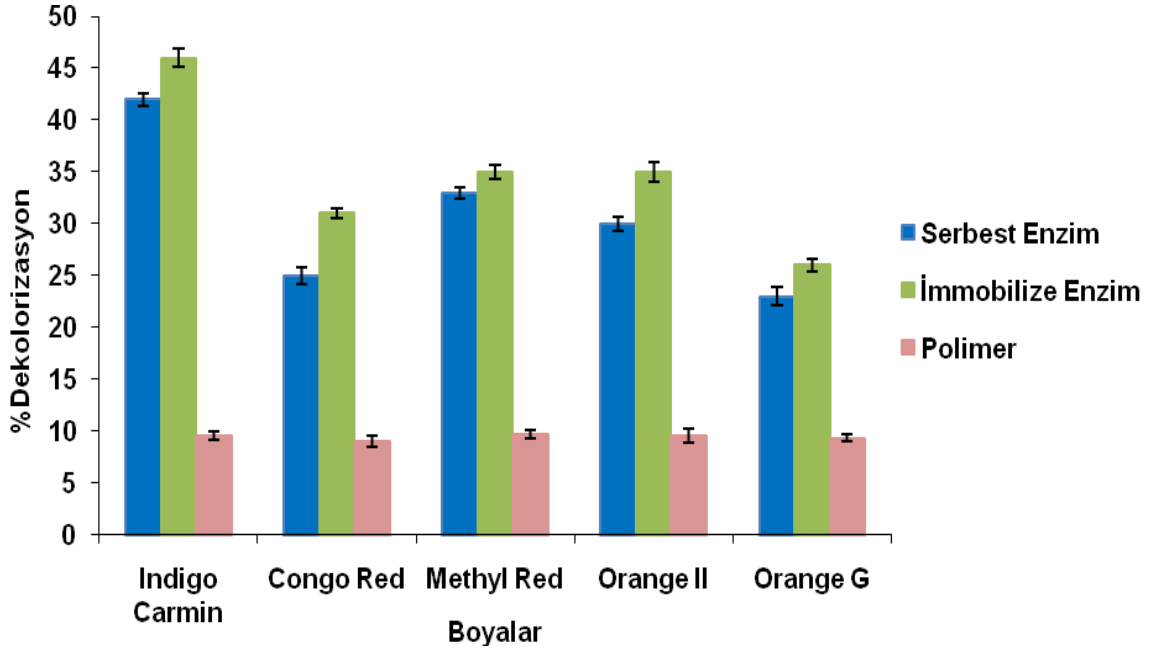
Şekil 4.9. Tutuklu lakkaz enzimiyle optimum koşullarda dekolorizasyon

Reaksiyon ortamları (20 ml): başlangıç boya konsantrasyonu 1ppm; 0,3g polimer (tutuklu enzim), inkübasyon sıcaklığı 37°C, inkübasyon süresi 2 gün, 150 rpm çalkalama hızı. (Değerler 3 çalışmanın ortalamasıdır. Grafik değerlerindeki çubuklar standart sapmaları ifade etmektedir).

#### 4.4. Serbest Enzim ve Tutuklu Enzim (Polimere Tutuklu) ile Renk Gideriminin Karşılaştırılması

1ppm boya ve 0,1mg protein (2,3UA enzim) içeren ve serbest enzim ve polimere tutuklu haldeki enzimle ayrı ayrı hazırlanan reaksiyon ortamları ile gerçekleştirilen dekolorizasyon deneylerinin sonuçları Şekil 4.10'da verilmektedir. İnkübasyon sonrasında aynı miktarda enzim içeren ortamlardaki dekolorizasyon yüzdelerinin karşılaştırılması yapıldı. Bu sonuçlara göre polimere tutuklu haldeki enzimle gerçekleştirilen deneylerde dekolorizasyon yüzdelerinin daha yüksek oranlarda olduğu gözlemlendi. Bunun sebebinin reaksiyon ortamlarındaki boyanın bir kısmının polimerin kendi yapısına adsorpsiyonundan olduğu görüldü. Sadece polimerin dekolorizasyon üzerindeki etkinliğinin araştırılması amacıyla ortama 1mM sodyum azür ilave edilerek lakkaz enziminin inaktive edilmesiyle gerçekleştirilen deneylerde de 2 günlük inkübasyonun sonrasında boyaların sırasıyla %9,5; 9; 9,7;

9,5 ve 9,3 oranında polimerin yapısına absorbe olduğu gözlemlendi. 0,3g polimerle (tutuklu enzim) gerçekleştirilen deneylerde yaklaşık %10 oranında polimere absorpsiyon gerçekleştiği gözlemlendi. Ancak tutuklu enzim ve serbest enzimle dekolorizasyon yüzdeleri karşılaştırıldığında aradaki farkın %10'dan daha az olduğu görüldü. Bu durum da tutuklu enzim kullanıldığında dekolorizasyon işleminin serbest enzime göre daha yavaş gerçekleşmesinden kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.10. Serbest Enzim ve Tutuklu Enzim (Polimere Tutuklu) ile Renk Gideriminin Karşılaştırılması

Reaksiyon ortamları (20 ml): başlangıç boya konsantrasyonu 1ppm; 2,3U enzim aktivitesine sahip serbest ve tutuklu lakkaz enzimi, inkübasyon sıcaklığı 37°C, inkübasyon süresi 2 gün, 150 rpm çalkalama hızı. (Değerler 3 çalışmanın ortalamasıdır. Grafik değerlerindeki çubuklar standart sapmaları ifade etmektedir).

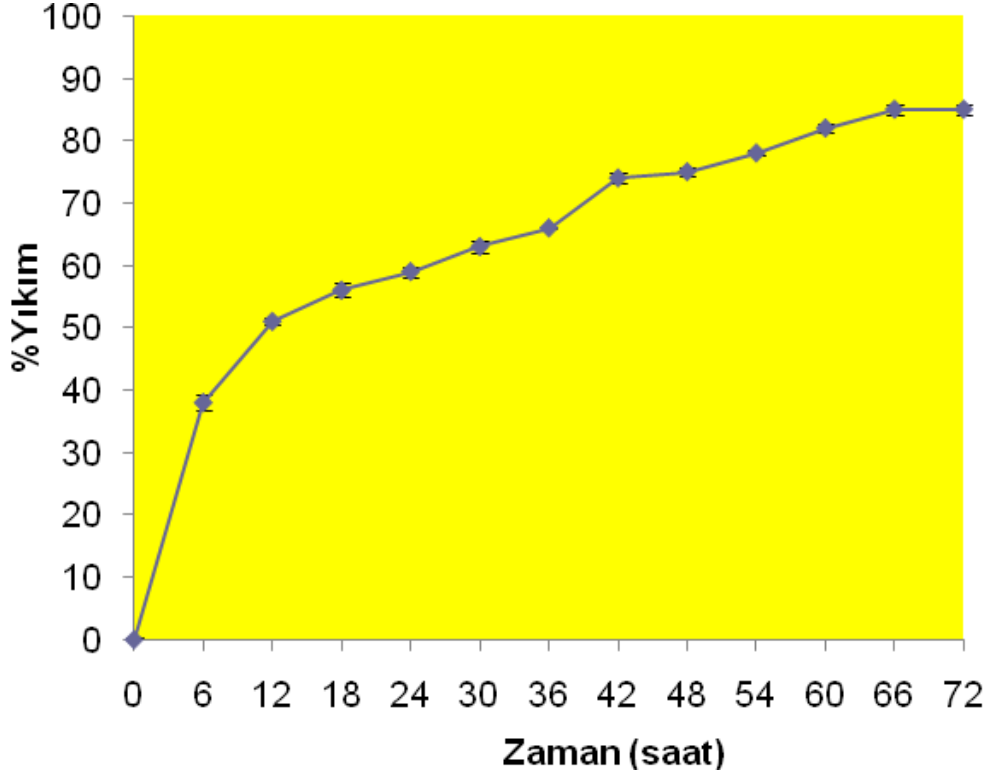
#### 4.5. Serbest Lakkaz Enzimiyle Fenol Yıkımı

##### 4.5.1. İnkübasyon süresinin serbest enzimle fenol yıkımına etkisi

Serbest haldeki lakkaz enzimiyle fenol yıkımını incelemek amacıyla hazırlanan reaksiyon ortamlarında 72 saat boyunca gerçekleştirilen deney sonuçları Şekil 4.11'de verilmektedir.

Şekilden anlaşılacağı üzere, yıkım hızında inkübasyon süresinin ilk 18 saati boyunca oldukça hızlı bir artış olmuş daha sonra da bir yavaşlama gözlenmiştir.

İnkübasyonun 72. saati sonunda fenolün % 85 oranında yıkıldığı gözlemlendi. Bundan sonraki optimizasyon deneylerinde reaksiyon ortamları 6 saat inkübe edildi.

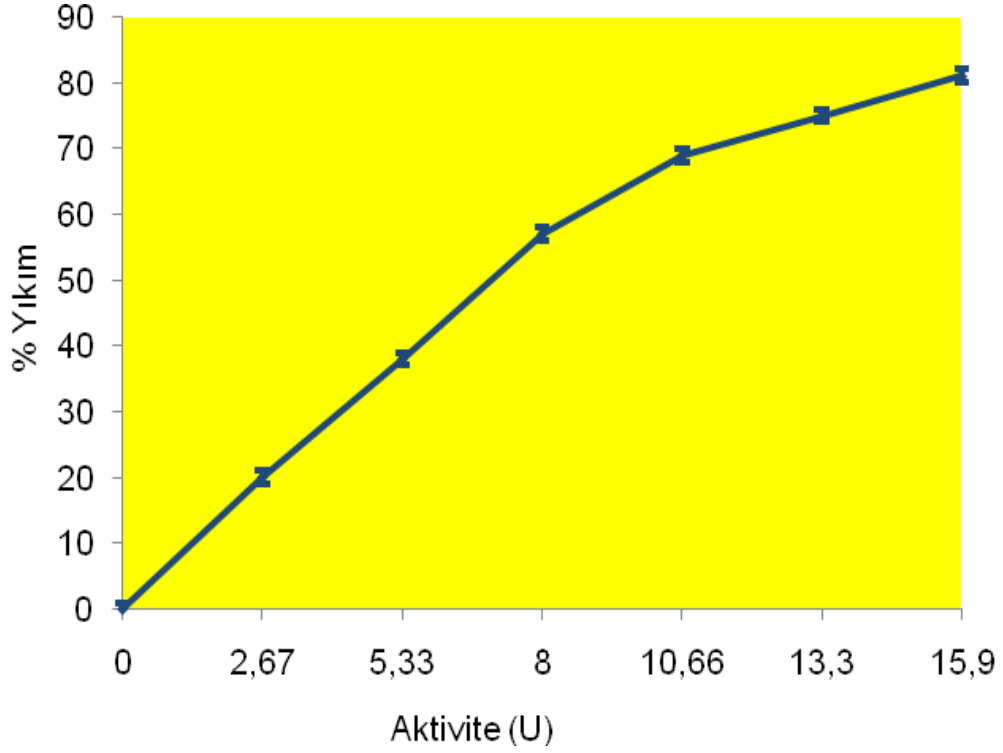


Şekil 4.11. İnkübasyon süresinin fenol yıkımına etkisi

Reaksiyon ortamları (20 ml): başlangıç fenol konsantrasyonu 200ppm; 5,33U enzim aktivitesine sahip lakkaz enzimi, inkübasyon sıcaklığı 37<sup>0</sup>C, inkübasyon süresi 72 saat, 150 rpm çalkalama hızı. (Değerler 3 çalışmanın ortalamasıdır. Grafik değerlerindeki çubuklar standart sapmaları ifade etmektedir).

#### 4.5.2. Serbest enzim miktarının fenol yıkımına etkisi

Fenol yıkımı üzerinde farklı enzim miktarlarının etkisini incelemek amacıyla hazırlanan reaksiyon ortamlarından elde edilen sonuçlar Şekil 4.12'de verilmektedir. Hazırlanan reaksiyon ortamları 5,33 U/ml lakkaz enzimi içeren stok enzim kaynağından sırasıyla 2,67; 5,33; 8,0; 10,66; 13,3; 15,9U lakkaz aktivitesi içermektedir. Şekilden de anlaşılacağı üzere reaksiyon ortamlarında kullanılan enzim miktarları arttıkça fenolün yıkım yüzdesi de artmaktadır. 10,66U enzim aktivitesine sahip ortamlarda fenol yıkımı %70'dir. 15,99U enzim aktivitesine sahip reaksiyon ortamında ise bu oran %80'e ulaşmaktadır.

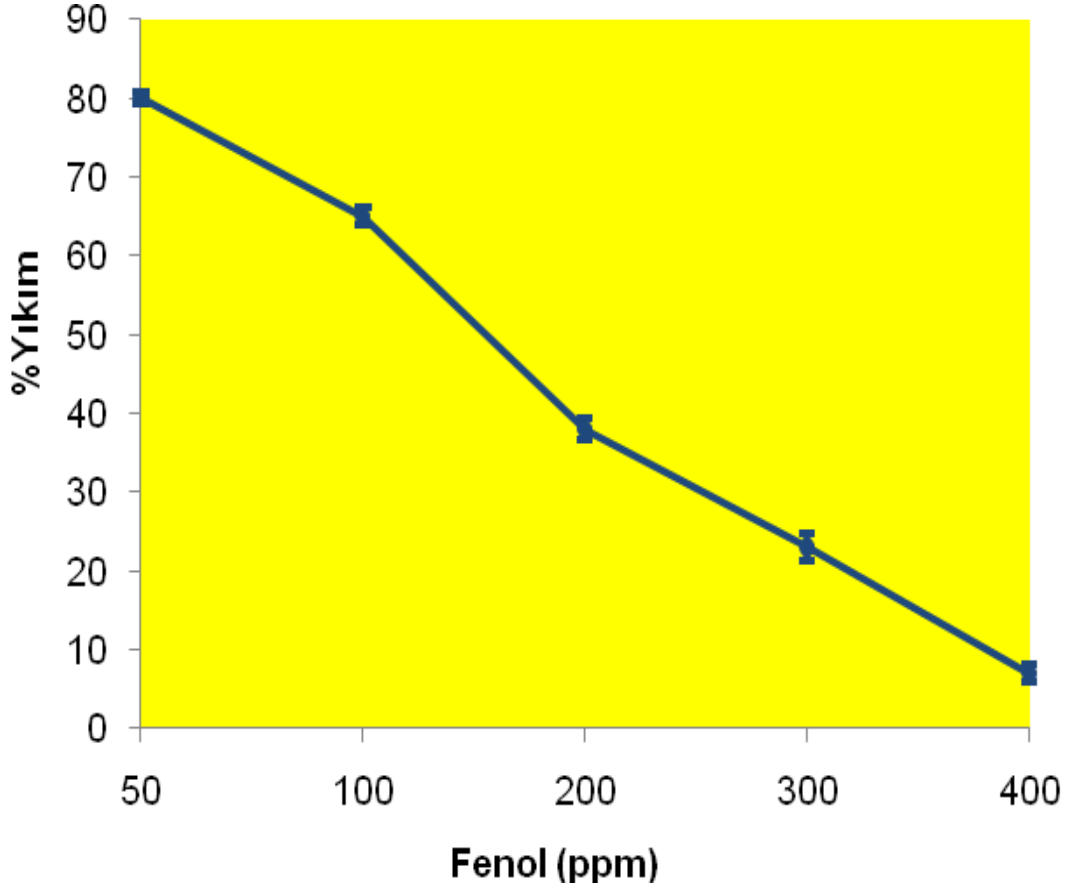


Şekil 4.12. Enzim Miktarının Fenol Yıkımına Etkisi

Reaksiyon ortamları (20 ml): başlangıç fenol konsantrasyonu 200ppm; 5,33U/ml stok enzim kaynağından 2,67; 5,33; 8,0; 10,66; 13,3; 15,9U lakkaz enzimi, inkübasyon sıcaklığı 37°C, inkübasyon süresi 6 saat, 150 rpm çalkalama hızı. (Değerler 3 çalışmanın ortalamasıdır. Grafik değerlerindeki çubuklar standart sapmaları ifade etmektedir).

#### 4.5.3. Başlangıç fenol konsantrasyonunun serbest enzimle fenol yıkımına etkisi

Başlangıç fenol miktarının fenol yıkımı üzerindeki etkisini incelemek amacıyla hazırladığımız reaksiyon ortamlarından elde edilen sonuçlar Şekil 4.13'de verilmektedir. Ortamlar sırasıyla 50ppm; 100ppm; 200ppm; 300ppm; 400ppm fenol içermektedir. Şekilde görüldüğü gibi fenol miktarının artmasıyla yıkım oranında azalma meydana gelmektedir. 50ppm fenol, lakkaz enzimiyle muamele edildiğinde %80 oranında yıkılırken, 400ppm fenol yaklaşık %15 oranında yıkılmaktadır. Bu nedenle sonraki çalışmalarda fenol konsantrasyonu 200ppm olarak belirlenmiştir. Bu konsantrasyonda yıkım oranı %45 oranında gerçekleşmektedir.



Şekil 4.13. Fenol Miktarının Yıkım Üzerine Etkisi

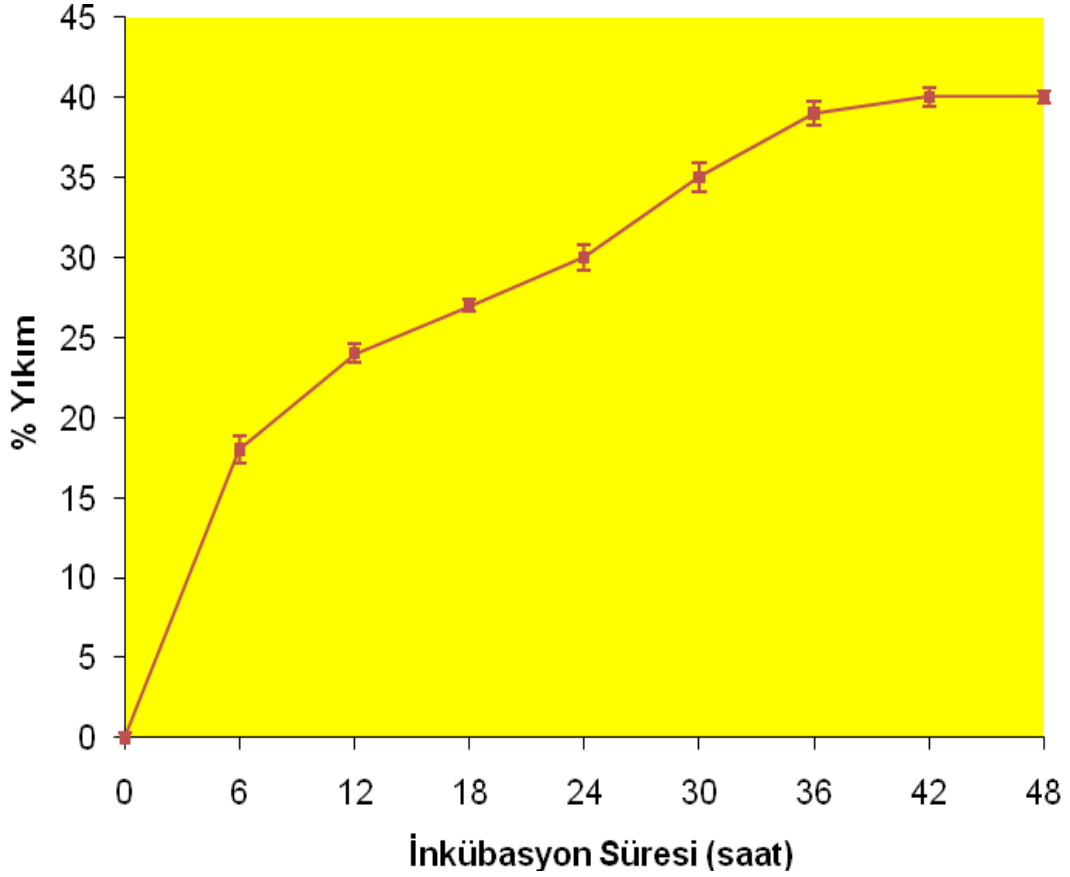
Reaksiyon ortamları (20 ml): başlangıç fenol konsantrasyonu sırasıyla 50ppm; 100ppm; 200ppm; 300ppm; 400ppm; 5,33U enzim aktivitesine sahip lakkaz enzimi, inkübasyon sıcaklığı 37°C, inkübasyon süresi 6 saat, 150 rpm çalkalama hızı. (Değerler 3 çalışmanın ortalamasıdır. Grafik değerlerindeki çubuklar standart sapmaları ifade etmektedir).

#### 4.6. Tutuklanmış Lakkaz Enzimiyle Fenol Yıkımı

##### 4.6.1. İnkübasyon süresinin tutuklanmış enzimle fenol yıkımına etkisi

Polimere tutuklanmış lakkaz enzimiyle fenol yıkımını incelemek amacıyla hazırlanan reaksiyon ortamlarında 48 saat boyunca gerçekleştirilen deney sonuçları Şekil 4.14'de verilmektedir.

Şekilden anlaşılacağı üzere, yıkım yüzdesi 36. saate kadar artmakta daha sonra ise yavaşlamaktadır. 48 saatin sonunda fenolün % 40 oranında yıkıldığı gözlemlendi. Bu nedenle sonraki optimizasyon deneylerinde reaksiyon ortamları 24 saat inkübe edildi.



Şekil 4.14. İnkübasyon süresinin fenol yıkımına etkisi

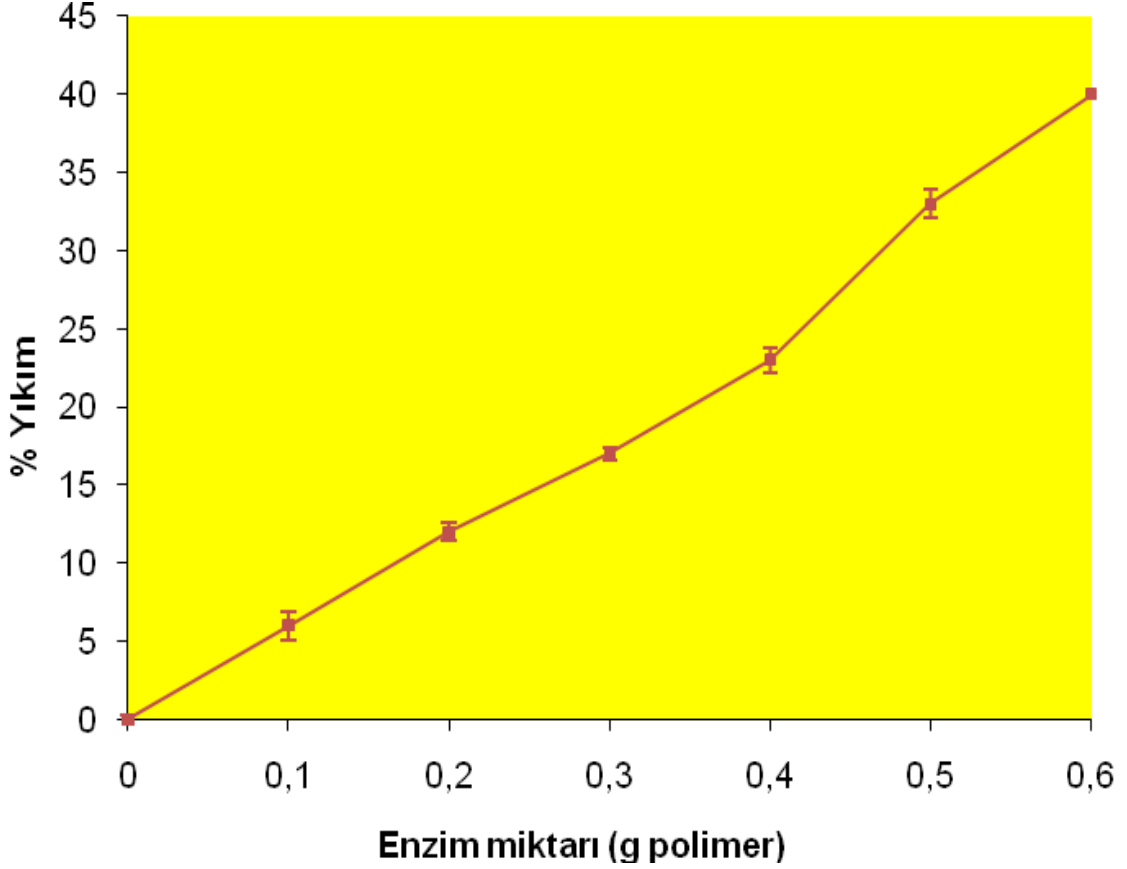
Reaksiyon ortamları (20 ml): başlangıç fenol konsantrasyonu 100ppm; 0,4g polimer (tutuklu enzim); inkübasyon sıcaklığı 37<sup>0</sup>C, inkübasyon süresi 48 saat, 150 rpm çalkalama hızı. (Değerler 3 çalışmanın ortalamasıdır. Grafik değerlerindeki çubuklar standart sapmaları ifade etmektedir).

#### 4.6.2. Tutuklanmış enzim miktarının fenol yıkımına etkisi

Değişen tutuklu enzim miktarlarının fenol yıkımına etkisini araştırmak amacıyla hazırlanan reaksiyon ortamlarında 24 saat boyunca gerçekleştirilen inkübasyon sonrasında elde edilen deney sonuçları Şekil 4.15'de verilmektedir.

Şekilde görüldüğü üzere, polimer miktarının artmasıyla içerdiği tutuklu haldeki enzim miktarı da arttığından, buna bağlı olarak da fenol yıkımında artış gözlenmektedir. 0,4g polimerle gerçekleştirilen çalışmada fenol yıkımı yaklaşık %25 oranında, 0,6g polimerde ise %45 oranında gerçekleşmiştir.





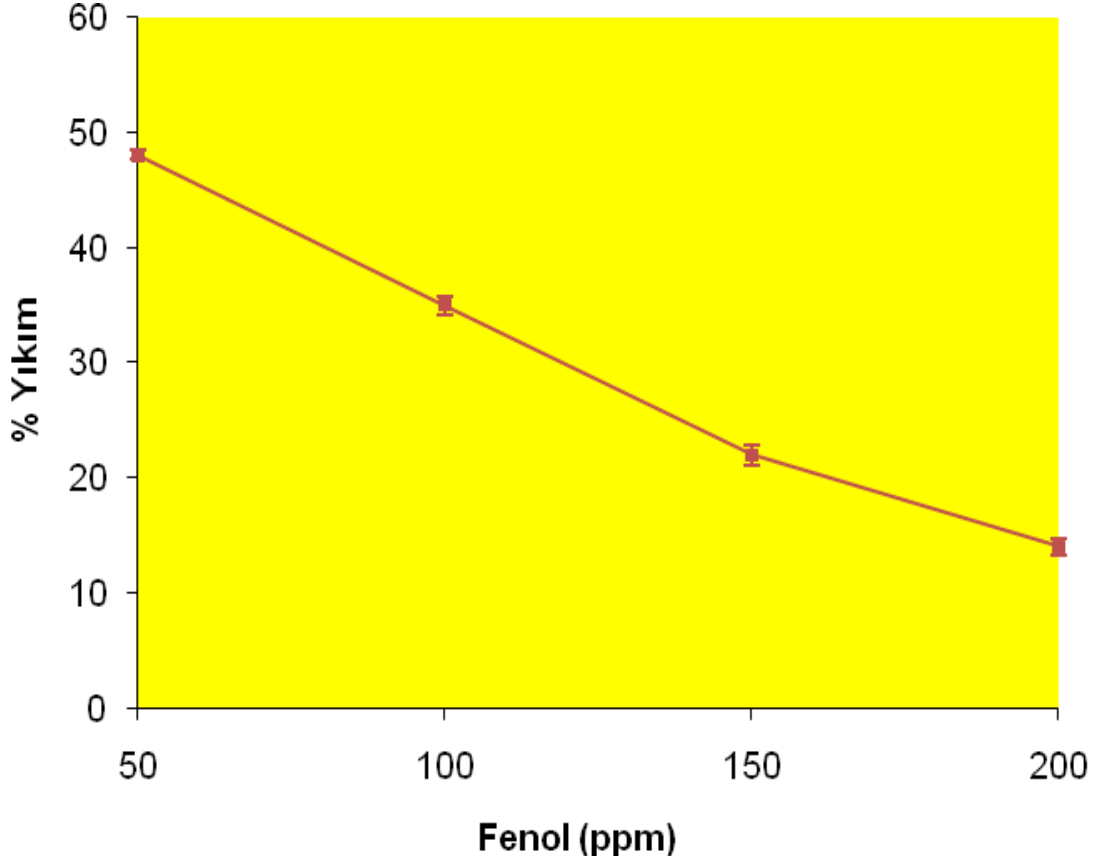
Şekil 4.15. Tutuklu enzim miktarının fenol yıkımına etkisi

Reaksiyon ortamları (20 ml): başlangıç fenol konsantrasyonu 100ppm; 0,1g; 0,2g; 0,3g; 0,4g; 0,5g; 0,6g polimer (0,3 mg protein/g polimer); inkübasyon sıcaklığı 37°C, inkübasyon süresi 24 saat, 150 rpm çalkalama hızı. (Değerler 3 çalışmanın ortalamasıdır. Grafik değerlerindeki çubuklar standart sapmaları ifade etmektedir).

#### 4.6.3. Başlangıç fenol miktarının tutuklanmış enzimle fenol yıkımına etkisi

Başlangıç fenol miktarının fenol yıkımına etkisini araştırmak amacıyla hazırlanan reaksiyon ortamlarında 24 saat boyunca gerçekleştirilen inkübasyon sonucu elde edilen değerler Şekil 4.16'da verilmektedir.

Şekilden anlaşılacağı üzere, fenol konsantrasyonunun artmasıyla fenol yıkımı yavaşlamaktadır. 50ppm fenol %48, 100ppm fenol %36 oranında yıkılmaktadır.



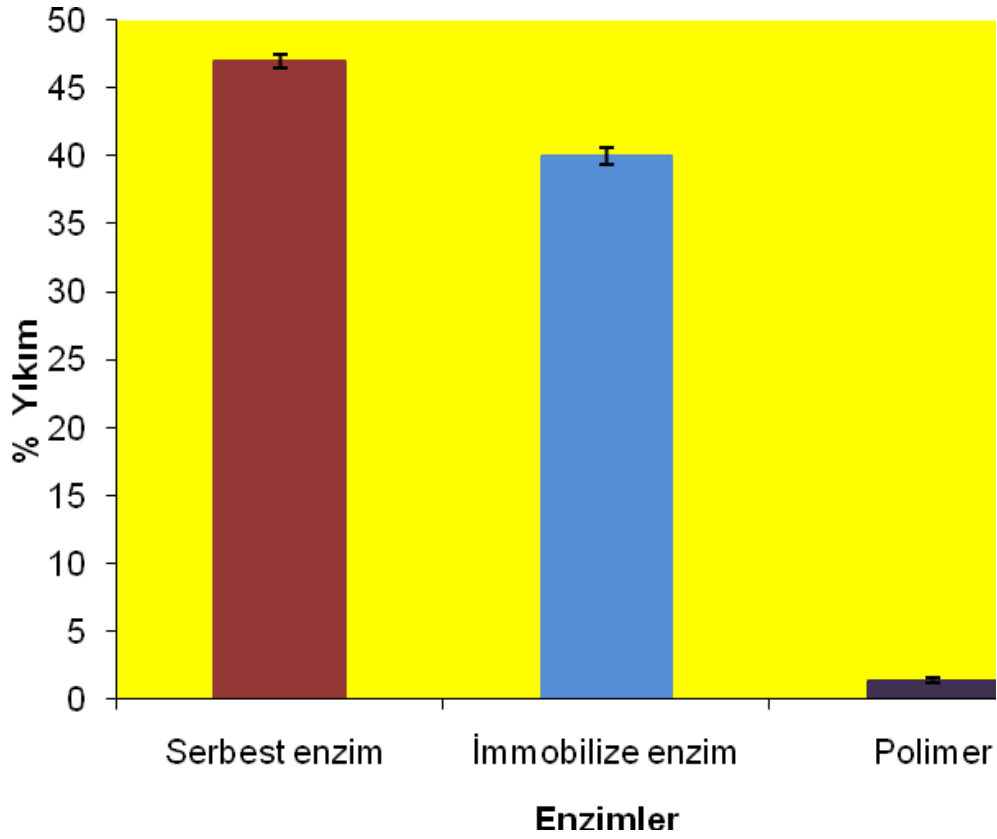
Şekil 4.16. Boya Miktarının Fenol Yıkımına Etkisi

Reaksiyon ortamları (20 ml): Başlangıç fenol konsantrasyonu 50ppm; 100ppm; 150ppm; 200ppm; 0,4g polimer (0,3mg protein/g polimer); inkübasyon sıcaklığı 37°C, inkübasyon süresi 24 saat, 150 rpm çalkalama hızı. (Değerler 3 çalışmanın ortalamasıdır. Grafik değerlerindeki çubuklar standart sapmaları ifade etmektedir).

#### 4.7. Serbest ve Tutuklu Enzim ile Fenol Yıkımının Karşılaştırılması

Renk giderimi çalışmalarında olduğu gibi fenol yıkımı çalışmalarında da eşit miktarda enzim miktarına sahip reaksiyon ortamları hazırlanarak fenol yıkımı üzerinde serbest ve tutuklu haldeki enzim etkinliği ayrı ayrı karşılaştırıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.17'de verilmektedir.

Şekilden de görüldüğü üzere eşit miktarlarda enzime sahip serbest enzim ve tutuklu enzim içeren reaksiyon ortamları karşılaştırıldığında serbest enzimle fenol %47 tutuklu enzimle %40 oranında yıkılmaktadır. Lakkaz enzimi inaktive edilmiş polimerle gerçekleştirilen çalışma sonucunda ise polimerin yapısına fenolün adsorbe olmadığı gözlemlendi (%1,3).

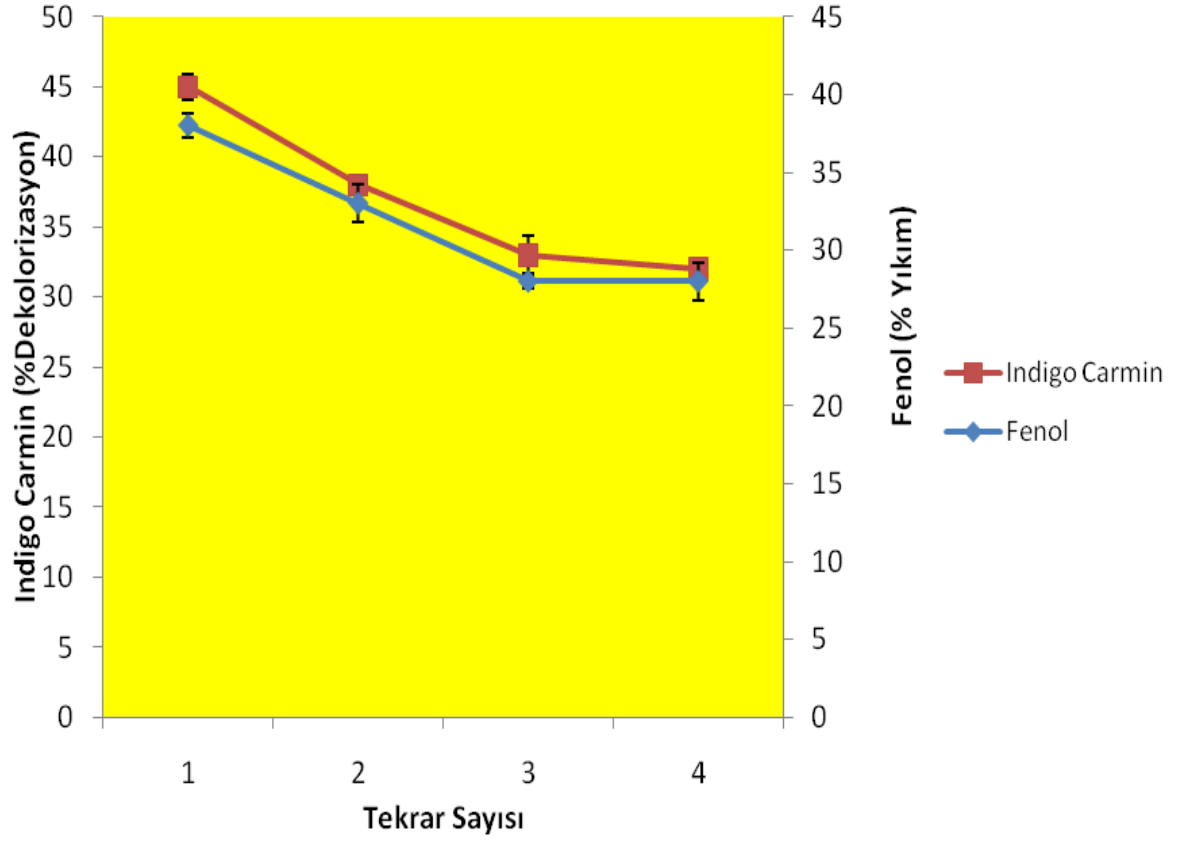


Şekil 4.17. Serbest ve Tutuklu Enzim (Polimere Tutuklu) ile Fenol Yıkımının Karşılaştırılması

Reaksiyon ortamları (20 ml): başlangıç fenol konsantrasyonu 100ppm; 2,64 U enzim aktivitesine sahip serbest ve polimere tutuklu enzim; inkübasyon sıcaklığı 37°C, inkübasyon süresi 24 saat, 150 rpm çalkalama hızı. (Değerler 3 çalışmanın ortalamasıdır. Grafik değerlerindeki çubuklar standart sapmaları ifade etmektedir).

#### 4.8. Biyopolimere Tutuklu Enzim Stabilitesinin Saptanması

Yapısında tutuklu enzim bulunan biyopolimerin enzim stabilitesini belirleyebilmek amacıyla Bölüm 3.15'de anlatılan yöntemle yapılan çalışmada alınan sonuçlar Şekil 4.18'de verilmektedir.



Şekil 4.18. Tutuklu Enzim Stabilitesine Kullanım Sayısının Etkisi

(Grafik değerlerindeki çubuklar standart sapmaları ifade etmektedir).

Indigo carmin boyası için dekolorizasyon oranı 1. reaksiyon ortamında %45 iken bu oran 4. tekrarda %32'ye kadar düşmüştür. Fenol yıkımında baktığımızda ise ilk reaksiyon ortamında %38; 4. tekrarda ise %28 oranında yıkım meydana gelmiştir.

Bu sonuçlara göre, en hızlı aktivite kaybı birinci ve ikinci tekrarlarda gerçekleşmiş, 3. ve 4. tekrarlarda yaklaşık olarak aynı oranlarda dekolorizasyon ve yıkım meydana gelmiştir.

## 5. TARTIŞMA

Bu tez kapsamında Candan, (2005) tarafından *Trametes versicolor*'dan üretilen, optimizasyonu gerçekleştirilen  $\beta$ -glukan bağ yapılı ekstraselüler polisakkarit yapısındaki biyopolimere tutuklanmış lakkaz enziminin çeşitli endüstriyel uygulama alanlarındaki kullanılabilirliği araştırılmıştır. İlk kez laboratuvarlarımızda üretimi gerçekleştirilmiş olan bu ekstraselüler biyopolimer, lakkaz enziminin doğal destek materyali olarak işlev görmektedir. Dolayısıyla lakkaz enziminin tutuklanması *Trametes versicolor*'ın üreme ortamında doğal koşullar altında gerçekleşmekte ve dışarıdan herhangi bir destek materyali kullanılmasına gerek kalmamaktadır.

Günümüzde pek çok sanayi tarafından doğal ortama verilen poliaromatik fenollü bileşikler, azoboyalar, klorofenoller gibi toksik ve çevre açısından büyük öneme sahip bileşikler yeryüzünde her geçen gün kullanım oranlarındaki artışa bağlı olarak birikim yaratmaktadır. Artan nüfusun da etkisiyle böyle potansiyel kirleticilerin ortamdaki uzaklaştırılması artık ciddi bir sorun haline almıştır. Özellikle fenolün ve çeşitli endüstriler tarafından doğal ortama verilen azo boyalar ve indigo boyaların giderimi araştırmamızın temelini oluşturmaktadır. Lakkaz enzimi tüm bu zararlı maddelerle mücadelede başarılı bir şekilde denenmiş ve uygulanmış bir enzimdir.

Çalışmamızda *Trametes versicolor* tarafından ekstraselüler olarak sentezlenen lakkaz enzimiyle gerçekleştirilen fenol yıkımında 5,3U/ml lakkaz enzimiyle 6 saatlik inkübasyon sonucunda 100ppm fenol % 65, 200ppm fenol %40 oranında yıkıldı. Munari et al. (2007), *Pleurotus sajor-caju* ile üreme ortamında yaptığı bir çalışmada  $225\text{mgL}^{-1}$  polifenol bileşikleri içeren bir atık suyunda 2 gün sonunda %58,9 oranında fenol giderimi rapor etmiştir.

*T. versicolor*'un üreme ortamına sentezlediği biyopolimere tutuklanmış haldeki lakkaz enzimiyle gerçekleştirdiğimiz optimizasyon deneyleri sonucunda ise 0,5 mg protein içeren biyopolimerle (tutuklu lakkaz enzimi) 24 saatin sonunda 100 ppm fenol %36, 50 ppm fenol ise %48 oranında yıkıldı. Rodriguez ve arkadaşları, 2004(a) yılında yaptıkları bir çalışmada, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ostreatus*, *P. pulmonarius* ve *P. sajor-caju*'nun üreme ortamlarında 100 $\mu\text{M}$  2-4 Diklorofenölü 6 saatte %60 oranında yıktığını rapor etmiştir. Martirani ve arkadaşları 1996 yılında,

zeytin kara suyunda *P. ostreatus*'dan izole edilen lakkaz enzimiyle yaptığı çalışmalarında fenolik bileşiklerin önemli miktarda azaldığını bildirmişlerdir. Karigar ve arkadaşları (2006), çalışmalarında *Arthrobacter citreus*'un aljinat ve agara tutuklu hücreleriyle fenol yıkımını 22mM seviyesine kadar gerçekleştirdiğini, daha üst konsantrasyonların ise hücreleri inhibe ettiğini bildirmiştir.

Fenolle gerçekleştirdiğimiz yıkım çalışmaları sonucunda biyopolimerin oldukça etkili bir destek materyali olarak işlev gördüğünü belirledik.

Çalışmamızın bir diğer konusu olarak da azo boyalar ve indigo boyaların serbest ve polimere tutuklu haldeki lakkaz enzimiyle dekolorizasyonu incelenmiştir.

Sarnthima ve Khammuang (2008), yaptıkları bir çalışmada, *P. sajor-caju*'dan elde edilen lakkaz enzimiyle bir indigo boya olan Indigo carmin'in dekolorizasyonunu incelemiştir. Araştırmacıların elde ettiği sonuçlara göre Indigo carmin 180 dakikada %90 dekolorize olmuştur. Araştırmacılar İndigo carmin boyasının 100µM'ın altında 90 dakika içerisinde %80'den fazla oranda dekolorize olduğunu rapor etmişlerdir. Başka bir çalışmada, *T. villosa*'dan elde edilen lakkaz enziminin Indigo carmini 1 saatte %20 oranında dekolorize ettiği bildirilmiştir (Basto et al., 2007). *T. hirsuta* ile 1L'lik bir biyoreaktör sisteminde pazlanmaz çelik süngere tutuklanmış lakkaz enzimi 3 günde Indigo carmin boyasının tamamını yıkıma uğratmıştır (Rodriguez et al., 2004b). Başka bir çalışmada aljinat boncuklarına tutuklanmış haldeki lakkaz enzimi 30 saatin sonunda boyanın tamamını dekolorize etmiştir (Dominguez et al., 2005). Indigo carmin boyasının etkin bir şekilde dekolorize olması bizim çalışmalarımızla örtüşmektedir. Optimizasyon çalışmalarımızda araştırdığımız 5 renk içerisinde İndigo carmin boyası serbest lakkaz enzimiyle, optimum koşullar altında, 24 saat sonunda %85, immobilize enzimle 48 saat sonunda %69 oranında dekolorize olmuştur. Bir azo boyası olan Metil red, Sarnthima ve Khammuang (2008)'in çalışmasında %3,5 oranında oldukça düşük seviyelerde dekolorize olmuştur. Bizim çalışmamızda ise Metil red, optimum koşullar altında serbest enzimle %48, immobilize enzimle %39 oranında dekolorize olmuştur. Bazı azo boyaların düşük oranlarda dekolorizasyonunun gözlemlendiği çalışmalar literatürde mevcuttur (Selvam et al., 2003). Buna göre Orange G %19, Congo red ise %12 oranında lakkaz enzimiyle dekolorize olmuştur. Ancak biyoreaktör sistemlerinin boyaların daha etkili bir şekilde dekolorizasyonunu sağladığı bildirilmiştir.

Literatürdeki bu çalışmaların aksine bizim çalışmamızda Congo red serbest enzimle %45, polimere tutuklu enzimle %36; Orange G ise serbest enzimle %46, polimere tutuklu enzimle %31 oranında dekolorize olmuştur.

*Streptomyces ipomoea*'dan elde edilen rekombinant lakkaz enzimiyle azo boyalardan Orange II'nin dekolorizasyonunun araştırıldığı bir çalışmada (Molina-Guijarro et al., 2009) 50 µM boyanın ortamda medyatör olarak acetosyringone varlığında %90 oranında dekolorize olduğu ancak medyatörsüz ortamda Orange II boyasında bir dekolorizasyon görülmediği bildirilmiştir. Çalışmamızda, Orange II boyası optimum koşullar altında serbest enzimle %50, polimere tutuklu enzimle %35 oranında dekolorize olmuştur.

Çalışmalarımızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre *Trametes versicolor*'dan elde ettiğimiz lakkaz enzimi özellikle Indigo carmin boyasında etkili bir dekolorizasyon sağlamaktadır. Dolayısıyla bu tip boyaları içeren endüstriyel atıklarda başarılı bir arıtım sistemi olarak kullanılabilir. Çeşitli redoks medyatörlerinin ortama ilavesiyle de dekolorizasyon etkinliğinin artırılması mümkündür. Congo red, Orange II, Orange G ve Metil red boyalarıyla da dekolorizasyon deneylerinde başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Eşit miktarda enzim kaynağı içeren ortamlardaki dekolorizasyon ve fenol yıkımı yüzdelerinin karşılaştırılmasını yaptığımızda, polimere tutuklu haldeki enzimle gerçekleştirilen deneylerde dekolorizasyon yüzdelerinin daha yüksek oranlarda olduğu gözlemlendi. Sadece polimerin dekolorizasyon üzerindeki etkinliğinin araştırılması amacıyla ortama 1mM sodyum azür ilave edilerek polimere tutuklu haldeki lakkaz enziminin inaktive edilmesiyle gerçekleştirilen deneylerde 2 günlük inkübasyonun sonrasında 0,3g polimerle (tutuklu enzim) boyaların yaklaşık % 10 oranında polimerin yapısına adsorbe olduğu gözlemlendi. Ancak tutuklu enzim ve serbest enzimle dekolorizasyon yüzdeleri karşılaştırıldığında aradaki farkın %10'dan daha az olduğu görüldü. Bu durum, tutuklu enzim kullanıldığında dekolorizasyon işleminin serbest enzime göre daha yavaş gerçekleşmesinden ve polimerin yapısına tutuklanmış haldeki lakkaz enzimiyle reaksiyon süresinin daha uzun olmasından kaynaklanmaktadır. Fenol yıkımı için eşit miktarda serbest enzim ve tutuklu enzim içeren reaksiyon ortamları karşılaştırıldığında serbest enzimle fenol %47 tutuklu enzimle %40 oranında yıkılmaktadır. Lakkaz enzimi inaktive

edilmiş polimerle gerçekleştirilen çalışma sonucunda ise polimerin yapısına fenolün adsorbe olmadığı gözlenmiştir (%1,3).

Literatür çalışmalarında da görüldüğü üzere özellikle tutuklanmış enzim sistemleri kullanılarak dekolorizasyon çok daha etkin bir şekilde gerçekleşmekte, çoğu durumda ortamda toksik yan ürünlerin oluşumu bu yolla önlenabilmektedir. Özellikle bu tez çalışmasında, enzim kendi üretim ortamında polimere tutuklu halde elde edildiğinden bu durum uygulama kolaylığı da sağlamaktadır. Serbest enzim uygulamalarının oldukça pahalı bir yöntem olduğu günümüzde, enzimin kendi üretim ortamında tutuklanmasının sağlanması ve bu koşullar altında uygulama alanı bulmasıyla bu çalışma ekonomik değer de taşımaktadır.



## KAYNAKLAR

- Abadulla E., Tzanov T., Costa S., Robra KH., Cavaco-Paulo A., and Gübitz GM., 2000, Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*, *Applied and Environmental Microbiology*, 66:8, 3357-3362.
- Asgher M., Shah SAH., Ali M., and Legge RL., 2006, Decolorization of some reactive textile dyes by white rot fungi isolated in Pakistan, *World Journal of Microbiology&Biotechnology*, 22:89-93.
- Basto C., Silva C.J. and Cavaco-Paulo A., 2007, Stability and decolorization ability of *Trametes villosa* laccase in liquid ultrasonic fields, *Ultrasonics Sonochemistry*, 14, 355-362.
- Bergbauer M., Eggert C., and Kraepelin G., 1991, Degredation of chlorinated lignin compounds in a bleach plant effluent by white-rot fungus *T. versicolor*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 35, 105-109.
- Bes, B., Pettersson, B., Lennholm, H., Iversen, T. and Eriksson, K.E., 1987, Synthesis, structure and enzymatic degradation of an extracellular glucan produced in nitrogen-starved cultures of the white-rot fungus *P. chrysosporium*, *Biotech. And Appl. Biochem.*, 9, 310-318.
- Bohn, J.A. and BeMiller, J.N., 1995, (1-3)- $\beta$ -D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationship, *Carbohydrate Polymers*, 28, 3-14.
- Bollag JM. and Leonowicz A., 1984, Comparative studies of extracellular fungal laccases, *Appl. Environ. Microbiol.* 48(4), 849-854.
- Bollag JM., and Bollag WB., 1990, A model for enzymatic binding of pollutants in the soil, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 39, 147-157.
- Bourbonnais R. and Paice MG., 1990, Oxidation of non-phenolic substrates: an expanded role of laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett*; 267:99102.

- Bumpus JA., 1995, Microbial degradation of azo dyes, *Progress in Industrial Microbiology*, Vol. 32, 157-176.
- Burns PJ., Yeo P., Keshavaz T. Roller S., and Evans CS., 1994, Physiological studies of exopolysaccharide production from the Basidiomycete *Pleurotus sp. florida*, *Enzyme Microb. Technol.*, 16, 566-572.
- Call HP. and Mücke I., 1997, History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator systems (LignozymR process), *J. Biotechnol*; 53:163–202.
- Camarero S, Garcia O, Vidal T, Colom J, del Rio JC, Gutierrez A, et al., 2004, Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system, *EnzymeMicrob Technol*;35:113–20.
- Candan D., 2005, *Trametes versicolor*'dan biyopolimer üretiminin optimizasyonu ve karakterizasyonu, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi.
- Cantarelli C., Brenna O., Giovanelli G., and Rossi M., 1989, Beverage stabilization through enzymatic removal of phenolics, *Food Biotechnology*, 3, 203-213.
- Champagne PP., 2009, Dye decolorization by immobilized laccase and impact of auxiliary chemicals on dye decolourization, PhD Thesis, Queen's University, Kingston, Ontario, Canada, 201p.
- Chivukula M., and Renganathan V., 1995, Phenolic azo dye oxidation by laccase from *Pyricularia oryzae*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 4374-4377.
- Collins PJ., and Dobson ADW., 1997, Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*, *Appl. Environ. Microbiol.* 63(9), 3444-3450.
- Couto SR., and Herrera JLT., 2006, Industrial and biotechnological applications of laccases: a review, *Biotechnology Advances*, 24, 500-513.
- Cui, J. and Chisti, Y., 2003, Polysaccharopeptide from *Coriolus versicolor* has potential use against human immunodeficiency virus type-1 infection, *Life Science*, Vol. 60, 25: 383-387.

- Davis S., and Burns RG., 1992, Covalent immobilization of laccase on activated carbon for phenolic effluent treatment, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37, 474-479.
- De Stefano G., Piacqadio P., and Sciancalepore V., 1996, Metal-chelate regenerable carriers in food processing, *Biotechnol. Techniques*, 10, 857-860.
- Dominguez A., Couto S.R. and Sanroman M.A., 2005, Dye decolorization by *Trametes hirsuta* immobilized into alginate beads, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 21, 405-409.
- Duran N. and Esposito E., 2000, Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment : a review. *Applied Catalysis B: Environmental* 28, 83-99.
- Eggert C., Temp U., and Eriksson K., 1996, The ligninolytic system of the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase, *Appl. Environ. Microbiol.* 62(4), 1151-1158.
- Galante YM. and Formantici C., 2003, Enzyme Applications in Detergency and in Manufacturing Industries, *Curr. Org. Chem.*, 7, 1399-1422.
- Gianfreda L., Sannino F., Filazzola MT., and Leonowicz A., 1998, Catalytic behavior and detoxifying ability of a laccase from the fungal strain *Cerrena unicolor*, *J. Mol. Cat B: Enzymatic*, 4, 13-23.
- Gianfreda L., Xu F. and Bollag JM., 1999, Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes, *Bioremediation Journal*, 3(2), 1-26.
- Gianfreda L., and Bollag JM., 1994, Effect of soils on the behavior of immobilized enzymes, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 58, 1672-1681.
- Herrera JR., 1991,  $\beta$ -glucans in fungi, *Antonie van Leeuwenhoek*, 60, 73-81.
- Horowitz, N.H., Fking, M. And Horn, G., 1970, Tyrosinase (*Neurospora crassa*), *Methods in Enzimology*, 17A, 615-620.

- Ikehata K., Buchanan ID., and Smith DW., 2004, Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment, *J. Environ. Eng. Sci.* 3, 1-19.
- Jeong, S.C., Yang, B.K., Ra, K.S., Maiti, T.K., Gu, Y.A. and Song, C.H., 2004, Characteristics of anti-complementary biopolymers extracted from *Coriolus versicolor*, *Carbohydrate Polymers*, <http://www.elsevier.com/located/carbpol>.
- Kandelbauer A, Maute O, Kessler RW, Erlacher A, Guebitz GM. 2004a, Study of dye decolorization in an immobilized laccase enzyme-reactor using online spectroscopy, *Biotechnol Bioeng* **87**(4): 552–563.
- Kandelbauer, A; Erlacher, A.; Cavaco-Paulo, A.; Guebitz, G., 2004b, Laccase-Catalyzed Decolorization of the Synthetic Azo Dye Diamond Black PV 200 and of Some Structurally Related Derivatives, *Biocatal. Biotransform.*, 22, 331-339.
- Karam J. and Nicell JA., 1997, Potential applications of enzymes in waste treatment. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 69, 141-153.
- Karigar C., Mahesh A., Nagenahalli M. and Yun DJ, 2006, Phenol degradation by immobilized cells of *Arthrobacter citreus*, *Biodegradation*, 17:1, 47-55.
- Karlsson S., Holmbom B., Spetz P., Mustranta A., and Buchert J., 2002, Reactivity of *Trametes* laccases with fatty and resin acids, *Appl Microbiol Biotechnol* 55, 317-320.
- Kidd, M.P., 2000, The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment, *Alternative Medicine review*, 5(1), 4-27.
- Kirk O., Borchert TV., and Fuglsang CC., 2002, Industrial enzyme applications, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13, 345-351.
- Koroljova-Skorobogat'ko OV., Stepanova EV., Gavrilova VP., Morozova OV., Lubimova NV., Dzchafarova AN., Jaropolov AI., and Makower A., 1998, Purification and characterization of the constitutive form of laccase from

- the basidiomycete *Coriolus hirsutus* and effect of inducers on laccase synthesis, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 28, 47-54.
- Krcmar, P. and Ulrich, R., 1998, Degradation of polychlorinated biphenil mixture by the lignin-degradation fungus, *P. chrysosporium*, *Folia Microbiol.*, 43(1):79-84.
- Lante A., Crapisi A., Pasini G., Zamorani A., and Spettoli P., 1992, Enzyme engineering XI., *Ann. NewYork Acad. Sci.*, 672, 558-562.
- Leonowicz A. Cho N., Luterek J., Wilkolazka A., Wojtas-Wasilewska M., Matuszewska A., Hofrichter M., Wesenberg D. and Rogalski J., 2001, Fungal laccase: properties and activity on lignin, *J. Basic Microbiol.* 41, 185-227.
- Leonowicz A., Sarkar JM., and Bollag JM., 1988, Improvement in stability of an immobilized fungal laccase, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 29, 129-135.
- Lerch, K., 1984, Monophenol Monooxygenase from *Neurospora crassa*, *Methods in Enzimology*, 142,165-169.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ., 1951, Protein measurement with the folin phenol reagent, *J Biol Chem*, 193:265-75.
- Martirani L., Giardina p., Marzullo L. And Sannia G., 1996, Reduction of phenol content and toxicity in olive mill waste waters with the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*, *Water Research*, 30:8, 1914-1918.
- Minato, K., Mizuno, M., Kawakami, S., Taysuoka, S., Denpo, Y., Tokimato, K. and Tsuchida, H., 2001, Changes in immunomodulating activities and content of antitumor polysaccharides during growth of two mushrooms, *Lentinus edodes* and *Grifola frondosa*, *Int. J. Med. Mushrooms*, 3:1-7.
- Minussi RC., Pastore GM and Duran N., 2002, Potential applications of laccase in the food industry, *Trends Food Sci Technol.*, 13, 205-216.
- Molina-Guijarro José M., Juana Pérez, José Muñoz-Dorado, Francisco Guillén, Raquel Moya, Manuel Hernández and M. Enriqueta Arias, 2009,

- Detoxification of azo dyes by a novel pH-versatile, salt-resistant laccase from *Streptomyces ipomoea*, *International Microbiology*, 12: 13-21.
- Mueller, A., Raptis, J., Rice, P.J., Kalbfleisch, J.H., Stout, R.D., Ensley, H.E., Browder, W. And Williams, D.L., 2000, The influence of glucan polymer structure and solution conformation on binding to (1→3)beta-D-glucan receptors in a human monocyte-like cell line, *Glycobiology*, 10:339-346.
- Munari FM., Gaio TA. and Dillon AJP, 2007, Phenol degradation and color removal in submerged culture of *Pleurotus sajor-caju* with paper mill effluents, *Biocatalysis and Biotransformation*, 25(1),24-28.
- Munoz C., Guillen F., Martinez AT. and Martinez MJ., 1997, Induction and characterization of laccase in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*, *Curr. Microbiol.*, 34, 1-5.
- Münzberg, J., Rau, U. and Wagner, F., 1995, Investigations on the regioselective hydrolysis of a branched  $\beta$ -1,3-glucan, 27:271-276.
- Nilsson, I.; Moller, A.; Mattiasson, B.; Trubindamayugi, M. S. T. And Welander, U., 2006, Decolorization of synthetic and real textile wastewater by the use of white-rot fungi. *Enzyme Microb. Tech.*, 38 (1-2), 94-100.
- Ose T., Watanabe K., Mie T., Honma M., Watanabe H., Yao M., Oikawa H. and Tanaka I., 2003, Insight into a natural Diels–Alder reaction from the structure of macrophomate synthase, *Nature*, 422, 185-189.
- Ramsay JA. and Nguyen T., 2002, Decoloration of textile dyes by *Trametes versicolor* and its effect on dye toxicity," *Biotechnol. Lett.* 24, 1757-1761.
- Rajan, J.S. and Virkar, P.D., 1987, Induced pelletized growth of *N. crassa* for tyrosinase biosynthesis in air lift fermenters, *Biotechnology and Bioengineering*, 29, 770-772.
- Rau, U., 2001, Schizophyllan, *Biopolymers-Polysaccharides II (Vol.6)*, 61-92.
- Reeslev, M., Jorgensen, B.B. and Jorgensen, D.B., 1996, Exopolysaccharide production and morphology of *A. pullulans* grown in continous cultivation

with varying ammonium-glucose ratio in the growth medium, *Journal of Biotech.*, 51, 131-135.

Renato S. Freire, Nelson Dura'n and Lauro T. Kubota, 2001, Effects of fungal laccase immobilization procedures for the development of a biosensor for phenol compounds" *Talanta*, 54 (2001) 681–686.

Rodriguez E., Nuero O., Guillen F., Martinez AT. And Martinez MJ., 2004(a), Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* species ; the role of laccase and versatile peroxidase, *Soil Biology and Biochemistry*, Vol 36, Issue 6, 909-916.

Rodriguez C.S., Sanroman M.A., Hofer D. And Gübitz G.M., 2004(b), Stainless steel sponge : A novel carrier for the immobilisation of the white-rot fungus *Trametes hirsuta* for the decolorization of textile dyes, *Bioresource Technology*, 95, 67-72.

Rodriguez E., Pickard A.M., and Vaquez-Duhalt R., 1999, Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi, *Current Microbiology*, 38, 27-32.

Sani RK., Azmi W., and Banarjee UC., 1998, Comparison of static and shake culture in the decolorization of textile dyes and dye effluents by *Phanerochaete chrysosporium*, *Folia Microbilol.*, 43(1), 85-88.

Sarnthima R., and Khammuang S., 2008, Evaluation of dyes decolorization by the crude enzyme from *Pleurotus sajor-kaju* grown on sorghum seed media, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11(1), 62-67.

Schuster, R., Wenzig, E. and Mersman, A., 1993, Production of the fungal exopolysaccharide pullulan by batch-wise and continuous fermentation, *Appl. Microbiol.*, 39, 155-158.

Selinheimo E, Kruus K, Buchert J, Hopia A, Autio K., 2006, Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheological properties of wheat doughs, *J Cereal Sci*,43:152–9.

- Selvam K., Swaminathan K. and Keo-Sang C., 2003, Decolorisation of azo dyes and a dye industry effluent by white rot fungus *Thelephora sp.*, *Biores. Technol.*, 88, 115-119.
- Seviour R.J., and Kristiansen B., 1983, Effect of ammonium ion concentration on polysaccharide production by *Aureobasidium pullulans*, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 17, 178.
- Shaffiqu TS, Roy JJ., Nair RA., and Abraham TE., 2002, Degradation of Textile Dyes Mediated by Plant Peroxidases, *Appl Biochem Biotechnol.*, 102-103, 315-326.
- Sigoillot C., Record E., Belle V., Robert J.L., Levasseur A., Punt P.J., Hondel CAMMJ., Fournel A., Sigoillot J.C., Asther M., 2004, Natural and recombinant fungal laccases for paper pulp bleaching, *Appl. Microb. Biotechnol.*, 64, 346-352.
- Slinkard, K. and Singleton, V.L., 1977, Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods, *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 49-55.
- Stevensen, M.P., 1999, *Polymer chemistry an introduction*, Oxford University Press, New York, 551 s.
- Sutherland, I.W., 1996, Microbial biopolymers from agricultural products: production and potential, *Int. Biodeterioration and Biodegradation*, 249-261.
- Taşpınar A. and Kolankaya N., 1998, Optimization of enzymatic chlorine removal from kraft pulp, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 61, 15-21.
- Tauber M.M., Guebitz G.M., and Rehorek A., 2005, Degradation of azo dyes by laccase and ultrasound treatment, *Applied and Environmental Microbiology*, 71:5, 2600-2607.
- Tien M. and Kirk T.K., 1983, Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Science* 221:661-663.



- Thurston CF. 1994, The structure and function of fungal laccases, *Microbiol.*, 140, 19-26.
- Tzanov T., Basto C., Gübitz GM., and Cavaco-Paulo A., 2003, Laccases to Improve the Whiteness in a Conventional Bleaching of Cotton, *Macromol Mater Eng.*, 288, 807-810.
- Udayasoorian C. and Prabu PC., 2005, Biodegradation of phenols by ligninolytic fungus *Trametes cersicolor*, *Journal of Biological Sciences*, 5(6): 824-827.
- Yaropolov Al., Skorobogat'ko OV., Vartanov SS. and Varfolomeyev SV., 1994, Laccase properties, catalytic mechanism and applicability, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 49, 257-280.
- Yeşilada, Ö. and Özcan, B., 1998, Decolorization of Orange II Dye with the Crude Culture Filtrate of White Rot Fungus *Coriolus versicolor*, *Turkish Journal of Biology*. 22: 463-476.
- Wesenberg Dirk, Kyriakides Irene and Agathos Spiros N., 2003, White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents, *Biotechnology Advances*, 22, 161-187.
- Xu F., 2005, Applications of oxidoreductases: recent progress. *Industrial Biotechnology*, 1:1, 38-50.
- Visch SM., 2002, Biopolymer; what is their place in future society in relation with sustainable design?, <http://www.proterra.nl/biopolymers.html>.
- Zhang X., Eigendorf G., Stebbing D.W. Mansfield S.D., and Saddler J.N., 2002, Arch Degradation of trilinolein by laccase enzyme, *Biochem Biophys* 405, 44-54.
- Zille A., Gornacka B., Rehorek A., and Cavaco-Paulo A., 2005, Degradation of azo dyes by *Trametes villosa* laccase over long periods of oxidative conditions, *Applied and Environmental Microbiology*, 71:11, 6711-6718.
- [http://en.wikipedia.org/wiki/Congo\\_red](http://en.wikipedia.org/wiki/Congo_red)

<http://en.wikipedia.org/wiki/Orangell>

[http://en.wikipedia.org/wiki/Methyl\\_red](http://en.wikipedia.org/wiki/Methyl_red)

[http://en.wikipedia.org/wiki/Orange\\_G](http://en.wikipedia.org/wiki/Orange_G)

[http://en.wikipedia.org/wiki/Indigo\\_carmine](http://en.wikipedia.org/wiki/Indigo_carmine)

<http://en.wikipedia.org/wiki/Phenols>

## ÖZGEÇMİŞ

### **ASİYE EVREN ÇAMUR**

Hilal Mah. 4. Cad. 688. Sokak 6/5 PK :06550 Çankaya, Ankara

Ev: (312) 440 13 76, İş: (312) 458 24 74, Cep: (536) 955 78 40

E-mail: evreneken@gmail.com

### **KİŞİSEL BİLGİLER**

Uyruğu : T.C  
Doğum Yeri : Ankara  
Doğum Tarihi : 08/10/1977  
Medeni Durum : Evli

### **EĞİTİM**

1989 – 1995 : Ankara Atatürk Anadolu Lisesi  
1995 – 1999 : Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü  
1999 – 2003 : Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji ABD, Yüksek Lisans.  
2003 – 2010 : Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji ABD, Doktora.

### **İŞ DENEYİMİ**

1999 – 2003 : Biyolog, ENSR International Danışmanlık ve Müh. Ltd. Şti.  
2003 – 2009 : Araştırma Görevlisi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi Dekanlığı, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji ABD.  
2009 – 2010 : Veri Hazırlama ve Kontrol İşletmeni, Başbakanlık Yüksek Öğrenim Kredi ve Yurtlar Kurumu Genel Müdürlüğü

Haziran 2010- : Veri Hazırlama ve Kontrol İşletmeni, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü, Parazitoloji ve Bakteriyel Zoonozlar Referans ve Araştırma Laboratuvarı.

## **YABANCI DİL**

İngilizce: İleri düzeyde (KPDS Puanı : 82)

## **BİLGİSAYAR**

Windows NT, Microsoft Office 2003, Internet

## **YÜKSEK LİSANS TEZ KONUSU**

Mikropsal Enzim Kullanılarak Toksikite Testi Geliştirilmesi (1999 - 2003).

## **DOKTORA TEZ KONUSU**

*Trametes versicolor* Tarafından Sentezlenen Biyopolimere Tutuklu Lakkaz Enziminin Bazı Endüstriyel Uygulamalarının Araştırılması (2003 - 2010).

## **YAYINLAR**

Eken, A. Evren, Kolankaya Nazif: *Bacillus sp.*'de B- galaktozidaz enziminin sentezini kontrol eden fizyolojik koşulların optimizasyonu. XIII. Biyoteknoloji Kongresi, Enzim Biyoteknolojisi, 25-29 Ağustos 2003, Çanakkale.

## **TECRÜBE ALANLARI**

- Toksikite Testleri
- Mikrobiyal Ekim Teknikleri
- Enzim Optimizasyonu
- Moleküler Teknikler
- Çevresel Etki Değerlendirmeleri