

Lakkaz Ve Lakkaz Aracılı Sistemler Kullanılarak Boyarmadde Dekolorizasyonu

Samet Şaşmaz

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Nisan, 2009

Dye Decolorization Using Laccase And Laccase Mediaor System

Samet Sasmaz

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

April, 2009

Lakkaz Ve Lakkaz Aracılı Sistemler Kullanılarak Boyarmadde Dekolorizasyonu

Samet Şaşmaz

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Genel Biyoloji Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Doç. Dr. Ahmet Çabuk

Nisan 2009

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Samet Şaşmaz'ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Lakkaz Ve Lakkaz Aracılı Sistemler Kullanılarak Boyarmadde Dekolorizasyonu" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Ahmet Çabuk

İkinci Danışman : -

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye : Prof. Dr. Nazif KOLANKAYA

Üye : Prof. Dr. Münevver ARISOY

Üye : Doç. Dr. Tamer AKAR

Üye : Doç. Dr. Mustafa YAMAÇ

Üye : Doç. Dr. Ahmet Çabuk

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve
sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Nimetullah BURNAK

Enstitü Müdürü

ÖZET

Dünya nüfusu arttıkça kirleticilerin miktarı ve yoğunluğu da günden güne artış göstermektedir. Tekstil endüstrisinde kullanılan büyük miktarda boyar madde üretim sonunda doğal yaşam ortamına deşarj edilmekte bu da çevre ve insan sağlığı ile ilgili tehlikeler meydana getirmektedir. Yetkili kişiler önlem almadıkça doğayı özellikle sucul sistemi olumsuz yönde etkileyen bu boyalı atık sular, toksik ve potansiyel kanserojen maddeleri çevreye salmak suretiyle ciddi anlamda çevre kirliliği problemleri oluşturmaya devam edecektir. Bu tez çalışması kapsamında kirleticilerin arıtımında önemli bir potansiyele sahip olduğu bilinen lakkaz enzimi ile Reaktif Red 198, Rem Blue RR, Dylon Navy 17, Rem Red RR ve Rem Yellow RR boyarmaddelerinin dekolorizasyonları hedeflenmiştir. Bu boyarmaddelerden Rem Blue RR ve Dylon Navy 17 için sadece lakkaz enzimi kullanılarak dekolorizasyon gerçekleştirilmiş ve optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Reaktif Red 198 ve Rem Red RR boyarmaddeleri lakkaz enzimi ile birlikte ortama ilave edilen çeşitli aracılı sistemler kullanıldığında dekolorizasyonun gerçekleştiği görülmüştür. Denenen lakkaz aracılı sistemlerden en etkilisinin vanilin olduğu görülmüştür. Rem Yellow RR, boyarmaddesi için her hangi bir dekolorizasyon elde edilmemiştir. Elde edilen optimum değerlerde yapılan dekolorizasyon çalışmaları ile birlikte boyarmaddelerin toksisitelerindeki değişimler *Artemia salina* canlı bireyleri kullanılarak takip edilmiştir. Ayrıca çalışmalarda enzim kaynağı olarak kullanılan lakkaz aktivitesi yüksek kültür süpernatantı katalaz ile muamele edilerek, dekolorizasyondan sorumlu enzimin lakkaz olduğu desteklenmiştir. Rem Blue RR boyar maddesi için belirlenen optimum koşullarda lakkaz aktivitesi yüksek kültür süpernatantı kullanılarak % 62,83'lük bir dekolorizasyon değerine ulaşılırken; Daylon Navy 17 için dekolorizasyon yüzdesi 72,15 seviyesindedir. Reaktif Red 198 boyarmaddesi için belirlenen optimum koşullarda vanilin ilavesi ile elde edilen dekolorizasyon değeri % 64,69 olarak belirlenirken, Rem Red RR için dekolorizasyon yüzdesi 68,04 düzeyinde elde edilmiştir. Çalışmada kullanılan Rem Red RR, Dylon Navy 17 ve Reaktif Red 198 boyar maddelerinde dekolorizasyonla beraber detoksifikasyonda sağlanmıştır.

Anahtar kelimeler: lakkaz, boyarmaddede, lakkaz aracılı sistem, vanilin, dekolorizasyon

SUMMARY

While world population goes up, pollutants increase gradually in quantities or intensities day by day. Large quantities of dyes used in the textile industry are discharged to natural life at the end of manufacturing and processing operations which turn out much hazard related to environment and human health. Unless the government takes measurements, these colored dye effluents will keep on create severe environmental pollution problems by releasing toxic and potential carcinogenic substances which affect negatively nature, especially aquatic system. At this thesis study, decolorization of Reactive Red 198, Rem Blue RR, Dylon Navy 17, Rem Red RR and Rem Yellow RR are aimed with laccase known that have an important potential at remediation of pollutants. Among of these dyestuffs, decolorization of Rem Blue RR and Dylon Navy 17 are achieved and performed optimization studies. When mediator systems with laccase were run during experiments, Reactive Red 198 and Rem Red RR were decolorized. Of all these mediators, vanillin was observed the best mediator. However, Rem Yellow RR was not obtained any result concerned with decolorization. Furthermore, changes of toxicities of dyestuffs were followed by observing living individual of *Artemia salina*. Besides, culture supernatant with high laccase activity as enzyme source was treated with catalase, in this way, hypothesis that laccase was the enzyme responsible for decolorization was supported. For Rem Blue RR, 62.83% decolorization was acquired at the optimum conditions determined while Dylon Navy 17 was decolorized 72.15%. By using laccase plus vanillin Reactive Red 198 and Rem Red RR were decolorized 64.69% and 68.04%, respectively. Rem Red RR, Dylon Navy 17 and Reactive Red 198 were obtained detoxification as well as decolorization.

Key word(s): laccase, dyestuff, laccase mediator systems, vanillin, decolorization.

TEŞEKKÜR

Laboratuar çalışmalarında, gerek derslerimde ve gerekse tez çalışmalarında, bana danışmanlık ederek, beni yönlendiren ve her türlü olanağı sağlayan danışmanım Doç. Dr. Ahmet Çabuk hocama çok teşekkür ederim.

Çalışmamın başarılı olmasına katkısı olan değerli hocalarım Doç. Dr. Tamer Akar ve Arş. Gör. Tuğrul Öntürk'e;

Tezimin her aşamasında bana yardımını esirgemeyen, maddi manevi her türlü olanağı ile yanımda olan dostum Gökhan Güngörmedi' ye;

Yıllardır birlikte çalıştığım, bana çok büyük katkıları olan arkadaşlarım Serap Gedikli, Özge Tabak ve Pınar Aytar'a;

Hayatımın her anında olduğu gibi bu tez çalışmasında bana cesaret ve güven veren Elif Öztürk'e ve Aileme,

Sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Boya ve Boyarmadde	4
2.2. Boyarmadde Tarihçesi	4
2.3. Boyarmaddelerin Sınıflandırılması	6
2.3.1. Boyarmaddelerin çözünürlüklerine göre sınıflandırılması	6
2.3.2. Boyama özelliklerine göre sınıflandırma	7
2.3.3. Kimyasal yapılarına göre boyarmaddeler	7
2.4. Boyarmadde Haslıkları	8
2.5. Boyarmaddelerin Özellikleri	8
2.5.1. Asit boyarmaddeler	8
2.5.2. Reaktif boyarmaddeler	8
2.5.3. Metal kompleks boyarmaddeler	9
2.5.4. Direkt boyarmaddeler	9
2.5.5. Bazik boyarmaddeler	10
2.5.6. Mordant boyarmaddeler	10
2.5.7. Dispers boyarmaddeler	10
2.5.8. Pigment boyarmaddeler	11
2.5.9. Vat boyarmaddeler	11
2.5.10. Anyonik ve ingrain boyarmaddeler	11

İÇİNDEKİLER(Devam)

	Sayfa
2.5.11. Sülfür boyarmaddeler	11
2.5.12. Solvent boyarmaddeler	12
2.5.13. Florasan renklendiriciler	12
2.6. Tekstil Endüstrisinin Atık Su İçeriği	12
2.7. Oksidoredüktaz Grubu Enzimler	15
2.8. Oksijenazlar	15
2.9. Fenoloksidazlar ve Peroksidazlar	19
2.10. Lakkaz	20
2.10.1. Lakkaz enziminin biyokimyasal özellikleri	23
2.10.2. Lakkazın katalitik mekanizması	25
2.10.3. Lakkaz substrat ve inhibitörleri	26
2.11. Lakkaz Aracılı Sistemler-LAS, (Lakkaz Mediator Sistemler-LMS)	33
2.11.1. 2,2'-azino-bis(3-etilbenziltiazolin-6-sülfonik asit) aracılı sistem	40
2.11.2. 2 1-hidroksibenzotriazol (HBT) aracılı sistem	43
2.12. Biyoteknolojide Lakkaz Aracılı Sistemleri	54
2.13. Lakkaz Enzimlerinin ve Lakkaz Aracılı Sistemlerin Tekstilde Kullanım Alanları	57
2.13.1. Lakkazların tekstil ürünlerinin ağartılmasında kullanımı	57
2.13.2. Lakkazların kot yıkamada kullanımı	58
2.13.3. Lakkazların kaynatma işleminde kullanımı	60
2.13.4. Lakkazların tekstil atık sularının biyolojik parçalanması ve renksizleştirilmesinde kullanımı	60
3.YÖNTEM VE GEREÇLER	63
3.1. Besiyeri Ortamının Hazırlanması ve Mikroorganizmaların Kültürasyonu ...	63
3.1.1. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar	63
3.1.2. Lakkaz üretimi için kullanılan besiyeri ve hazırlanması	63
3.1.3. Lakkaz aktivitesinin ölçümü	64

İÇİNDEKİLER(Devam)

	Sayfa
3.2. Dekolorizasyon Çalışmaları.....	64
3.2.1. Dekolorizasyon çalışmalarında kullanılan boyarmaddeler	64
3.2.2. Tarama çalışması	65
3.2.3. Lakkaz enzimi ile yapılan dekolorizasyon çalışmaları.....	65
3.2.3.1. Rem Blue RR ve Dylon Navy 17 Boyar maddelerinin lakkaz enzim aktivitesi yüksek kültür süpernatantı ile dekolorizasyonu için optimum koşulların belirlenmesi	65
3.2.3.1.1. Ortam pH değerinin enzimatik dekolorizasyona etkisi	66
3.2.3.1.2. Başlangıç boya konsantrasyonunun enzimatik dekolorizasyona etkisi	66
3.2.3.1.3. Enzim miktarının enzimatik dekolorizasyona etkisi	66
3.2.3.1.4. Ortam sıcaklığının enzimatik dekolorizasyona etkisi	67
3.2.3.1.5. İnkübasyon süresinin enzimatik dekolorizasyona etkisi	67
3.2.4. Lakkaz enzimi ile birlikte aracı kullanılarak yapılan dekolorizasyon çalışmaları	68
3.2.4.1. Reaktif Red 198 ve Rem Red RR boyarmaddelerinin lakkaz enzim aktivitesi yüksek kültür süpernatantı ile dekolorizasyonu için optimum koşulların belirlenmesi	68
3.2.4.1.1. Ortam pH değerinin enzimatik dekolorizasyona etkisi	69
3.2.4.1.2. Aracı konsantrasyonunun enzimatik dekolorizasyona etkisi.....	69
3.2.4.1.3. Başlangıç boya konsantrasyonunun enzimatik dekolorizasyona etkisi	69
3.2.4.1.4. Enzim miktarının enzimatik dekolorizasyona etkisi	70
3.2.4.1.5. Ortam sıcaklığının enzimatik dekolorizasyona etkisi	70
3.2.4.1.6. İnkübasyon süresinin enzimatik dekolorizasyona etkisi	70
3.2.4.1.7. Aracı miktarının enzimatik dekolorizasyona etkisi.....	71
3.2.5. Toksikite çalışmaları	71
3.2.6. Katalaz muamelesi	72

İÇİNDEKİLER(Devam)

	Sayfa
4. BULGULAR	74
4.1. Rem Blue RR nin Lakkaz Enzimi ile Dekolorizasyonu	74
4.1.1. Ortam pH değerinin enzimatik dekolorizasyona etkisi	74
4.1.2. Başlangıç boya konsantrasyonunun enzimatik dekolorizasyona etkisi ...	75
4.1.3. Enzim miktarının enzimatik dekolorizasyona etkisi	76
4.1.4. İnkübasyon sıcaklığının enzimatik dekolorizasyona etkisi	77
4.1.5. İnkübasyon süresinin enzimatik dekolorizasyona etkisi	78
4.2. Dylon Navy 17' nin Lakkaz Enzimi ile Dekolorizasyonu	79
4.2.1. Ortam pH değerinin enzimatik dekolorizasyona etkisi	79
4.2.2. Başlangıç boya konsantrasyonunun enzimatik dekolorizasyona etkisi ...	80
4.2.3. Enzim miktarının enzimatik dekolorizasyona etkisi	81
4.2.4. İnkübasyon sıcaklığının enzimatik dekolorizasyona etkisi	82
4.2.5. İnkübasyon süresinin enzimatik dekolorizasyona etkisi	83
4.3. Dekolorizasyon Çalışmalarında Aracılı Sistemlerin Etkisi	84
4.4. Reaktif Red 198' nin Lakkaz Aracılı Sistem (Vanilin) Kullanılarak Dekolorizasyonu	85
4.4.1. Ortam pH değerinin enzimatik dekolorizasyona etkisi	85
4.4.2. Aracı konsantrasyonunun enzimatik dekolorizasyona etkisi	86
4.4.3. Başlangıç boya konsantrasyonunun enzimatik dekolorizasyona etkisi ...	87
4.4.4. Ortam sıcaklığının enzimatik dekolorizasyona etkisi	88
4.4.5. İnkübasyon süresinin enzimatik dekolorizasyona etkisi	89
4.4.6. Enzim miktarının enzimatik dekolorizasyona etkisi	90
4.4.7. Aracı miktarının enzimatik dekolorizasyona etkisi	91
4.5. Rem Red RR' nin Lakkaz Aracılı Sistem (Vanilin) Kullanılarak Dekolorizasyonu	92
4.5.1. Ortam pH'nın enzimatik dekolorizasyona etkisi	92
4.5.2. Aracı konsantrasyonunun enzimatik dekolorizasyona etkisi	93
4.5.3. Başlangıç boya konsantrasyonunun enzimatik dekolorizasyona etkisi ...	94
4.5.4. Ortam sıcaklığının enzimatik dekolorizasyona etkisi	95

İÇİNDEKİLER(Devam)

	Sayfa
4.5.5. İnkübasyon süresinin enzimatik dekolorizasyona etkisi	96
4.5.6. Enzim miktarının enzimatik dekolorizasyona etkisi	97
4.5.7. Aracı miktarının enzimatik dekolorizasyona etkisi	98
4.6. Toksikite Denemeleri Sonuçları	99
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	103
5.1. Lakkaz Enzim İle Rem Blue RR Boyar Maddesi Dekolorizasyonu	103
5.2. Lakkaz Enzim İle Dylon Navy 17 Boyar Maddesi Dekolorizasyonu	105
5.3. Lakkaz Aracılı Sistem Kullanılarak Reactive Red 198 Dekolorizasyonu	106
5.4. Lakkaz Aracılı Sistem Kullanılarak Rem Red RR Dekolorizasyonu	108
5.5. Toksikite Çalışmaları	110
6.KAYNAKLAR DİZİNİ	113

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>		<u>Sayfa</u>
2.10.1.1	<i>Melanocarpus albomyces</i> lakkaz yapısında T1 ve T2/T3 bölgelerinde 4 bakır atomunun geometrisi.....	24
2.11.1.	Ligninin fenolik gruplarının lakkaz katalizli oksidasyon (yükseltgenme) reaksiyonu	34
2.11.2.	Kimyasal aracı moleküllerin yokluğunda (a) ve varlığında (b ve c) substrat oksidasyonu için lakkazın katalizlediği redoks döngüsünün şeması	36
2.11.3.	Bazı lakkaz aracı molekülleri	36
2.11.4.	Lakkaz aracılı oksidasyon sisteminin katalitik döngüsü	38
2.11.1.1	Lakkaz ile beyazlatma işlemi görmemiş kağıt hamurunun çapraz bağlı fiberleri arasındaki etkileşime bir örnek.....	40
2.11.1.2	Lakkaz varlığı ile ABTS'nin oksidasyonu.....	41
2.11.2.1.	>N-OH tipinde bazı organik lakkaz mediatörlerinin yapısal formülleri.....	47
2.11.2.2.	Nitroksil radikali ile fenolik olmayan lignin yapıları arasındaki etkileşim mekanizması.....	48
2.11.2.3.	Radikal (1) ve elektron taşıma mekanizmasına (2) göre lakkaz mediatörleri tarafından fenolik olmayan lignin model bileşiklerinin oksidasyonu.....	49
2.11.2.4.	Lakkaz ve TMPO ile substrat oksidasyonu için önerilen mekanizma.....	50
2.11.2.5.	Lakkaz aracılı olarak kullanılan nitroso bileşikleri ve fenotiyazin türevleri.....	51
2.11.2.6.	Potansiyel lakkaz mediatörleri olduğu düşünülen organik yapıların yapısal formülleri.....	53
3.2.5.1.	<i>A. salina</i> üretimi için gerekli düzenek.....	72
4.1.1.1	Rem Blue RR'nin Enzimatik dekolorizasyonda ortam pH' sının etkisi.....	74
4.1.2.1	Rem Blue RR'nin enzimatik dekolorizasyonuna Başlangıç boya konsantrasyonunun enzimatik etkisi.....	75
4.1.3.1	Rem Blue RR'nin enzimatik dekolorizasyonuna Enzim miktarının etkisi.....	76
4.1.4.1	Rem Blue RR'nin enzimatik dekolorizasyonuna İnkübasyon sıcaklığının etkisi.....	77
4.1.5.1.	Rem Blue RR'nin enzimatik dekolorizasyonuna İnkübasyon süresinin etkisi.....	78
4.2.1.1	Dylon Navy 17' nin enzimatik dekolorizasyonuna ortam pH' sının etkisi.....	79

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>		<u>Sayfa</u>
4.2.2.1.	Dylon Navy 17' nin enzimatik dekolorizasyonuna Başlangıç boya konsantrasyonunun etkisi.....	80
4.2.3.1.	Dylon Navy 17' nin enzimatik dekolorizasyonuna Enzim miktarının etkisi.....	81
4.2.4.1.	Dylon Navy 17'nin enzimatik dekolorizasyonuna İnkübasyon sıcaklığının etkisi.....	82
4.2.5.1.	Dylon Navy 17'nin enzimatik dekolorizasyonuna İnkübasyon süresinin etkisi.....	83
4.3.1.	Reaktive Red 198, Rem Red RR ve Rem Yellow boyarmaddelerinin dekolorizasyonunda ortama ilave edilen aracı sistemlerin etkisi.....	84
4.4.1.1	Reactive Red 198'in lakkaz aracılı sistem kullanılarak enzimatik dekolorizasyonuna ortam pH'nın etkisi.....	85
4.4.2.1.	Reactive Red 198'in lakkaz aracılı sistem kullanılarak enzimatik dekolorizasyonuna aracı konsantrasyonunun etkisi.....	86
4.4.3.1.	Reactive Red 198'in lakkaz aracılı sistem kullanılarak enzimatik dekolorizasyonuna başlangıç boya konsantrasyonunun etkisi.....	87
4.4.4.1.	Reactive Red 198'in lakkaz aracılı sistem kullanılarak inkübasyon sıcaklığının enzimatik dekolorizasyonuna etkisi.....	88
4.4.5.1.	Reactive Red 198'in lakkaz aracılı sistem kullanılarak enzimatik dekolorizasyonuna inkübasyon süresinin etkisi.....	89
4.4.6.1.	Reactive Red 198'in lakkaz aracılı sistem kullanılarak enzimatik dekolorizasyonuna enzim miktarının etkisi.....	90
4.4.7.1.	Reactive Red 198'in lakkaz aracılı sistem kullanılarak enzimatik dekolorizasyonuna aracı miktarının etkisi.....	91
4.5.1.1.	Rem Red RR'nin lakkaz aracılı sistem kullanılarak enzimatik dekolorizasyonuna ortam pH'nın etkisi.....	92
4.5.2.1.	Rem Red RR'nin lakkaz aracılı sistem kullanılarak enzimatik dekolorizasyonuna aracı konsantrasyonunun etkisi.....	93
4.5.3.1.	Rem Red RR'nin lakkaz aracılı sistem kullanılarak enzimatik dekolorizasyonuna başlangıç boya konsantrasyonunun etkisi....	94
4.5.4.1.	Rem Red RR'nin lakkaz aracılı sistem kullanılarak enzimatik dekolorizasyonuna inkübasyon sıcaklığının etkisi.....	95
4.5.5.1.	Rem Red RR'nin lakkaz aracılı sistem kullanılarak enzimatik dekolorizasyonuna inkübasyon süresinin etkisi.....	96
4.5.6.1.	Rem Red RR'nin lakkaz aracılı sistem kullanılarak enzimatik dekolorizasyonuna enzim miktarının etkisi.....	97

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>		<u>Sayfa</u>
4.5.7.1.	Rem Red RR'nin lakkaz aracılı sistem kullanılarak enzimatik dekolorizasyonuna aracı miktarının etkisi.....	98

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.6.1. Tekstil atık suyunun içeriği.....	13
2.6.2. Boyama prosesinde en sık kullanılan yardımcı kimyasallar.....	14
2.7.1. Oksidoredüktazların sınıflandırılması.....	16
2.10.1. Bazı lakkazların kinetik parametreleri.....	22
2.10.3.1. Fungal lakkazların substratları ve inhibitörleri.....	28
2.11.1. LAS sistemlerde doğal ve sentetik aracı moleküller.....	37
4.6.1 <i>Artemia salina</i> ile yapılan Rem Blue RR toksisite çalışması sonuçları.....	99
4.6.2 <i>Artemia salina</i> ile yapılan Dylon navy 17 toksisite çalışması sonuçları....	100
4.6.3 <i>Artemia salina</i> ile yapılan Reactive Red 198 toksisite çalışması sonuçları.	101
4.6.4 <i>Artemia salina</i> ile yapılan Rem Red RR toksisite çalışması sonuçları.....	102

1. GİRİŞ

Son yıllarda dünyanın nüfus artışına koşut olarak gerekli olan iş gücü ve ekonomik gereksinimler endüstri kuruluşlarının sayısını ve çeşidini arttırmıştır. Ancak endüstrilerin bu hızlı artışı ile birlikte işletmelerin doğaya bıraktığı kirletici miktarı da beklendiği gibi artış göstermiştir. Buna nazaran arıtım teknolojilerinin daha yavaş gelişmesi veya arıtım teknolojilerinin kullanımının yaygın olmaması nedeniyle çevrede kirleticiler birikmiş ve olumsuz etkileri görülmüştür. Bu birikim zamanla büyük boyutlara ulaşmış ve doğa üzerine olan etkileri tolere edilebilir sınırların çok ötesine geçmiştir.

Endüstri kuruluşlarının çok büyük bir kısmı atık maddelerini çevredeki su kaynaklarını kullanarak uzaklaştırmaktadır. Jeolojik açıdan, yeryüzündeki akarsular oluşumlarından beri karalardan aldıkları maddeleri deniz ve okyanuslara taşımaktadırlar (Uslu ve Türkman, 1987).

Tekstil, kağıt ve matbaa gibi endüstrilerin vazgeçilmez unsuru olan boyarmaddeler, genellikle yakın çevrede bulunan sulara atılarak işletmeden uzaklaştırılmaktadır. Su kaynağına karışan bu boyarmaddeler yayılmakta ve içerisinde yaşayan canlı popülasyonuna büyük zararlar vermektedir. İlk gözle görülebilir etkisi suyun renginde meydana gelen değişme ve buna bağlı olarak su içerisindeki fotosentez olayının durmasına ya da çok azalmasıdır. Ayrıca bazı boyarmaddelerin mutajenik, kanserojenik etkileri vardır (Aksu ve Çağatay, 2006; Kumar vd., 2006). Fotosentezin olmaması suyun içerisindeki çözünmüş oksijen miktarının çok azalmasına ve aerobik mikroorganizmaların yerini anaerobik mikroorganizmaların almasına, ortamda anaerobik mikroorganizmaların çoğalması da kötü kokulu bileşiklerin oluşmasına sebep olmaktadır. Oluşan kötü koku yakın çevrede yaşayanları çok rahatsız edici seviyelere ulaşabilmektedir. Ayrıca, oksijene gereksinimi olan diğer canlıların yaşamları içinde ciddi oranda tehlikede oluşturabilmektedir (Aksu ve Çağatay, 2006; Kumar vd., 2006).

Tekstil boyalarının arıtımında kimyasal ve biyolojik sistemler kullanılmaktadır. Ancak arıtımda biyolojik sistemlerin daha çok kullanılması gereği de bir gerçektir. Çünkü kimyasal arıtım sırasında ya da sonrasında toksik özellikte maddeler oluşabilir.

Ayrıca biyolojik sistemler kimyasal sistemlere nazaran daha ekonomiktir. Biyolojik sistemler renkli atıkların arıtımında geleneksel işlemlere göre potansiyel alternatif yol olarak görülmektedir (Kumar vd., 2006).

Boyarmaddelerin gideriminde kimyasal sistemler yerine biyolojik sistemlerin kullanılmasının öneminin artması bu süreçlerde çalışmaların büyük kısmını mikroorganizmalar üzerine yoğunlaştırmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda funguslar içerisinde Basidiomycetes grubuna giren beyaz çürükçül funguslar içerdiği enzimler ve biyo yıkım yetenekleri ile öne çıkmıştır. Bu çalışmalar bu fungus türünün sentezlediği lakkaz enzimine dikkati çekmektedir.

Lakkazlar, moleküler oksijeni suya indirgemek suretiyle özellikle fenol ve anilinler gibi bir çok aromatik bileşiğin oksidasyonunu katalizleyebilen çok bakırlı enzimlerdir. Bu nedenle lakkazlar endüstriyel uygulamalarda en fazla umut veren enzimler arasında yer almaktadır. Uluslararası Biyokimya Birliği tarafından kurulan komisyonun yaptığı sınıflandırmaya göre lakkaz; oksidoredüktazlar grubunda yer almaktadır (Gienfreda vd, 1999). Lakkazlar, geniş substrat aralığında, elektron oksidasyonlarına olanak tanıyan geniş spesifiteye sahip çok bakırlı oksidaz grubunun bir üyesidir. Bu enzim; çevre için yıkıma dirençli lignin benzeri yapılar olan fenolik ve fenolik olmayan bileşikleri okside edebildiği için birçok araştırmacı tarafından ilgi görmüştür. Bu enzim substrat spesifitesi göstermemesi nedeni ile çevre kirliliğinin giderilmesinde sürekli çalışılan ve vazgeçilmeyen bir enzim olmuştur (Saparrat vd., 2007).

Lakkazın bu avantajlı özellikleri aracılı maddeler kullanılarak genişletilebilmektedir. Lakkaz aracılı sistemlerde (LAS) kullanılan aracı madde lakkazın aktivitesini ve buna bağlı olarak okside edebileceği substrat miktarını arttırmaktadır. Aracılı sistem bu etkisini büyük oranda substrat ile lakkaz arasındaki redoks potansiyel farkını düşürerek gerçekleştirir. LAS çalışmalarında 2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolin-6-sulfonat) (ABTS) ve 1-hidroksibenzotriazol (HBT) düşük molekül ağırlığına sahip ve lakkazın tek başına yapamayacağı reaksiyonları yüksek oranda sağlamaktadır (Morozova vd, 2007).

İndükleyici olarak buğday kepeği ilave edilen PDB besiyerinde *Trametes versicolor* ATCC 200801 ile en yüksek lakkaz üretim değerine ulaşılmıştır. Bu yüksek aktivitedeki lakkaz enziminin çevresel açıdan uygulanabilirliğini belirlemek için tekstil endüstrisinde kullanılan Rem Blue RR, Dylon Navy 17, Reaktif Red 198, Rem Red RR ve Rem Yellow RR boyarmaddeleri kullanılmıştır. Çalışmada Reaktif Red 198, Rem Red RR boyar maddelerinin gideriminde LAS uygulanmış ve aracı olarak vanilin kullanılmıştır (Gedikli vd., 2008).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Boya ve Boyarmadde

Cisimlerin renklendirilmesi boyamak kelimesi ile ifade edilir. Cisimlerin yüzeyinin ya dış tesirlerden korunması ya da güzel bir görünüm sağlanması için renkli hale getirilmesinde kullanılan maddelere boya denir. Konuşma dilinde çoğu kez boya ve boyarmadde kelimelerini birbiri yerine kullanılır. Bu iki sözcük eş anlamlı değildir. Boyalar bir bağlayıcı ile karışmış fakat çözünmemiş karışımlardır. Boyalar genelde anorganik bileşiklerdir. Ancak organik de olabilirler. Uygulandıkları yüzeyde hiçbir değişiklik yapmazlar. Kazımakla yüzeyden büyük parçalar halinde uzaklaştırılabilirler (Başer ve İnanıcı, 1990).

Cisimlerin (kumaş, elyaf vb.) kendilerini renkli hale getirmede uygulanan maddelere ise boyarmadde denir. Ancak her renk veren ve ya renkli olan madde boyarmadde değildir. Boyarmaddelerle yapılan renklendirme boyalarla yapılan renklendirme işlemine benzemez. Genellikle çözeltiler veya süspansiyonlar halinde çeşitli boyama yöntemleri ile uygulanırlar. Bütün boyarmaddeler organik bileşiklerdir. Boyanacak cisimler boyarmadde ile devamlı ve dayanıklı bir şekilde birleşerek cismin yüzeyini yapı bakımından değiştirirler. Genellikle boyarmadde, cismin yüzeyi ile kimyasal veya fizikokimyasal bir ilişkiye girerek birleşmişlerdir. Boyanın yüzey kazıma, silme, yıkama gibi fiziksel işlemlerle başlangıçtaki renksiz durumunu alamaz (Başer ve İnanıcı, 1990).

2.2. Boyarmadde Tarihçesi

İnsanlar ilk çağlardan beri çevresinden faydalanmış, onu güzelleştirmeye ve korumaya çalışmıştır. Süslenme içgüdüğü nedeniyle doğadan birçok boyarmadde elde etmiştir. Bunu taş devri zamanında bile görmek mümkündür. İsa' dan yüzlerce yıl öncesine ait Dordogne (Fransa) ve Altamiria (İspanya)' da bulunan mağara duvarlarındaki resimler ve eşyalar bunların kanıtıdır. Buralarda bulunan ölü kemiklerin kırmızı renkli olması çok ilgi çekicidir (Başer ve İnanıcı, 1990).

İlk kullanılan boyalar metaloksit karışımı, killi toprak ve bazı bitki özsuvarıdır. Bunların su ile karıştırılarak boyanacak yere sürüldüğü sanılmaktadır. Eski Mısırlılar boyalara sağlamlık ve parlaklık vermek için zamk karıştırmışlardır. Bu tip boyalara Mısır mumyalarında rastlanmıştır. Boyaların hava tesirinden ve nemden korunması için de üzerlerini mum tabakasıyla kaplamışlardır (Başer ve İnanıcı, 1990) .

Genellikle boya olarak isimlendirdiğimiz maddeler anorganik, tekstilde kullanılan boyarmaddeler ise organik yapıdadır. Anorganik doğal boyalara örnek olarak Fe_2O_3 , Cr_2O_3 , Pb_3O_4 , HgS , grafit v.b. maddeleri gösterebiliriz. Boyarmaddeler ise doğal kökenli olanların yanında büyük çoğunlukla sentetiktir. Doğal boyarmaddeler genellikle hayvanların deri ve salgı bezlerinden, bitkilerin kök, kabuk, tohum, meyva gibi kısımlarından ve maya gibi mikroorganizmalardan basit kimyasal işlemler sonucu elde edilirler (Başer ve İnanıcı, 1990) .

1856 yılında W.H. PERKİN daha 17 yaşında üniversite öğrencisi olduğu sıralarda kinin elde etmek için çalışmalar yaparken, toluidin içeren anilinden Mauvein (anilin moru) elde etti. Bu madde ilk sentetik ve teknik öneme sahip olan boyarmadde olarak kabul edilir. Ertesi yıl Perkin, babası ve erkek kardeşiyle birlikte Londra yakınlarında Greenford Green' de benzenden başlayarak nitrobenzen, anilin ve anilinin oksitlenmesiyle Mauvein' in elde edildiği boyarmadde fabrikasını kurdu (Başer ve İnanıcı, 1990).

Gerçekte ilk sentetik organik boyarmaddeyi Woulfe' un elde etmesine rağmen W. II. Perkin' in Mauvein'i sentezi, organik boyarmadde endüstrisinin ilk başlangıcı kabul edilir. Bu durum hem o zamanlarda ilkel maddelerle teknik açıdan ilgi çekici bir ürünün saf elde edilmesi ve hem de işletme olgunluğuna kadar geliştirilmesi açısından doğrudur (Başer ve İnanıcı, 1990).

1856–1849 yıllarında J. Natanson, A.W. Hoffman, E. Verguin fuksin üzerinde çalışmalar yaptılar. Natanson bu maddeyi anilin vinilklorürden elde etti. Diğer iki araştırmacı da fuksin için iki ayrı sentez yolu buldular. Sonraları bu çalışmalar başka araştırmacılar tarafından pratiğe uygulandı (Başer ve İnanıcı, 1990).

1862 yılı P. Griess' in azo boyarmaddelerinin sentezinin başlangıç yılıdır.

1863 yılında H. Caro ve J. Dale indülini buldular.

1867 yılında Coupier tarafından nigrosin bulundu.

1868 de C. Graebe ve C. Liebermann 1,2 dibromoantrakinon' dan sentetik alizarini elde ettiler. Bu madde yapısı hakkında belli bir öneri ileri sürülen ilk organik boyarmaddedir (Başer ve İnanıcı, 1990).

1873 yılında kükürtlü boyarmaddeler de elde edildi.

1878 yılında A. V. Baeyer indigonun sentezini yaptı. Kekule, M. Bullerow, E. Erlenmeyer ve diğer araştırmacılar tarafından 1857 yılından beri çalışan kimyasal yapıların gerçek bilimsel açıklanmasının sonuçlarının alınmasının başlamasıyla, sentetik boyarmaddelerin bilimsel olarak oluşturulması da mümkün olmuştur (Başer ve İnanıcı, 1990).

1876 da O.N. Witt gözlemlerine dayanarak, kromofor ve oksokrom gruplara ait ilk renk teorisini ileri sürdü.

Aynı yıl H. Caro sentezini yaptığı metilen mavisinin, patentini aldı.

1911 senesi indigosollerin elde edildiği yıldır.

1927 yılında tamamen yeni bir boyarmadde sınıfı olan ftalosiytaninler keşfedildi.

1956 reaktif boyarmaddelerin bulunduğu yıldır.

Daha sonraki yıllarda boyarmadde endüstrisi hızla ilerleyerek sayısız madde sentez edildi. Bunların içinde ticari önemi olan ancak 1500-2000 kadar organik boyarmadde vardır (Başer ve İnanıcı, 1990).

2.3. Boyarmaddelerin Sınıflandırılması

Boyarmaddeler birkaç şekilde sınıflandırılabilirler. Sınıflandırmada çözünürlük, kimyasal yapı, boyama özellikleri, kullanılış yerleri gibi çeşitli karakteristikler göz önüne alınabilirler. Boyarmadde kimyası esas teşkil ettiğinden kimyasal yapılara göre sınıflandırma temel alınmaktadır (Başer ve İnanıcı, 1990).

2.3.1. Boyarmaddelerin Çözünürlüklerine Göre Sınıflandırılması:

1. Suda çözünen boyarmaddeler

a) Anyonik suda çözünen boyarmaddeler

- b) Katyonik suda çözünen boyarmaddeler
- c) Zwitter iyon karakterli boyarmaddeler
- 2. Suda çözünmeyen boyarmaddeler
- 3. Substratta çözünen boyarmaddeler
- 4. Organik çözücülerde çözünen boyarmaddeler
- 5. Geçici çözünlüğü olan boyarmaddeler
- 6. Polikondensasyon boyarmaddeleri
- 7. Elyaf içinde oluşturulan boyarmaddeler
- 8. Pigmentler

2.3.2. Boyama Özelliklerine Göre Sınıflandırma:

1. Bazik boyarmaddeler
2. Asit boyarmaddeler
3. Direkt boyarmaddeler
4. Mordan boyarmaddeler
5. Reaktif boyarmaddeler
6. Küpe boyarmaddeleri
7. İnkişaf boyarmaddeleri
8. Metal-kompleks boyarmaddeler
9. Dispersiyon boyarmaddeleri
10. Pigment boyarmaddeleri

2.3.3. Kimyasal Yapılarına Göre Boyarmaddeler:

1. Azo boyarmaddeleri
2. Nitro ve nitrozo boyarmaddeleri
3. Polimetin boyarmaddeleri
4. Arilmetin boyarmaddeleri
5. Aza [18] boyarmaddeleri
6. Karbonil boyarmaddeleri

7. Kükürt boyarmaddeleri

2.4. Boyarmadde Haslıkları

Haslık, bir tekstil malzemesinin üretim ve kullanım esnasında karşılaştığı çeşitli etkenlere karşı gösterdiği dayanıklılık derecesidir. Kullanılma esnasında istenilen haslıklar ışık, yıkama, sürtünme, deniz suyu, ter, ütü, çözücülerdir. Üretim esnasında istenilenler ise asit, alkol, soda, klor, karbonizasyon, su vb. haslıklardır (Sabit, 2001).

2.5. Boyarmaddelerin Özellikleri

Dünya çapında her yıl yaklaşık olarak 10^9 kg boyarmadde üretilmektedir. Üretilen bu boyarmaddelerin yaklaşık olarak %20–25' i atık olarak doğal ortamlara verilmektedir. Boyarmadde molekülleri kromofor ve oksokromlardan oluşur. Kromoforlar çift bağla elektron sisteme bağlanıp onu delokalize ederek boyarmaddeye rengini verirler. Oksokromlar ise elektron sisteminin enerjisini değiştirerek ipliğe daha sıkı bağlanmasını sağlarlar (Başer ve İnanıcı, 1990).

2.5.1. Asit Boyarmaddeler

Asit boyarmaddeler Colour Indeks (C.I) deki en büyük sınıf olup 2000 den fazla boyarmadde içermektedir. Asit boyarmaddeler yün, ipek, poliamid, modifiye akril gibi nitrojen içeren dokuları boyamak için kullanılan anyonik bileşiklerdir. Dokumaların –NH₄ iyonlarına katyonik olarak bağlanırlar. Asit boyalar içinde ticari öneme sahip en önemli 3 grup azo, antrokinonlar ve triarilmetanlardır. Bu boyarmaddeler 39 derecenin üstündeki sıcaklıklarda sıvı şekilde uygulanır. Moleküler ağırlıkları 200'den 900'e kadar değişir (Başer ve İnanıcı, 1990).

2.5.2. Reaktif Boyarmaddeler

Reaktif boyarmaddeler dokumalardaki –OH, -NH ve –SH grupları ile kovalent bağ oluştururlar. Reaktif boyaya bağlanma prensibi ise heterosiklik aromatik zincirler klor ve flor moleküllerinin yerlerine geçerler. Reaktif boyalar ilk olarak 1956’ da üretilmiş olup 1980 de marketlerde 66 çeşit reaktif boyaya rastlanmıştır. Bu sayı iki yılda 139’a çıkmış ve 1990’ lar da yaklaşık olarak yılda 19,7 milyon kg reaktif boya üretilmeye başlanmıştır. Reaktif boyalarla boyama sürecinde reaktif grupların hidrolizi istenmeyen yan ürünlerin oluşmasını sağlar ve bu da fiksasyon derecesini düşürür. Fiksasyon derecesini yükseltmek amacı ile yüksek oranlarda tuz eklenmesine rağmen %10-50’si dokumalarla reaksiyona girmeyip su ortamında kalmaktadır (Başer ve İnanıcı, 1990).

Tekstil atık su renk gideriminde reaktif boyalara yoğunlaşmasının sebepleri; reaktif boyalar toplam boya pazarında %20–30 pay içermektedir. Özellikle pamuğu boyamak için kullanılırlar ve pamuk dünya iplik üretiminin yarısını içerir. İkinci sebep ise boyama sırasında boyanın %10–50’ si dokumaya bağlanmayıp atık suya verilmektedir. Sonuç olarak boyahane atık suları 0,6–0,8 dm⁻³ boya içermektedir (Başer ve İnanıcı, 1990).

2.5.3. Metal Kompleks Boyarmaddeler

Colour Indeks’ de yer alan asit ve reaktif boyaların bir çoğu metal kompleks boyarmaddelerdir. Bir metal atomunun (krom, bakır, kobalt veya nikel) bir veya iki boya molekülü ile güçlü kompleksler oluşturması ile meydana gelirler. Metal kompleks boyarmaddeleri genel olarak azo bileşiklerdir. Colour Indeks’ de listelenmiş olan azo boyalarının 1/6’sı metal komplekstir (Başer ve İnanıcı, 1990).

2.5.4. Direkt Boyarmaddeler

Direkt boyar maddeler genellikle sülfonik asitlerin, bazen de karboksilik asitlerin sodyum tuzlarıdır. Yani renkli kısmı oluşturan iyon anyon şeklindedir. Pek çoğu yapı bakımından azo boyarmaddeleri grubuna girer. Liflere Van der Waals

kuvvetleri ile bağlanırlar. Direkt boyarmaddeler ucuzlukları, boyama işlemlerinin çok basit oluşu ve boyama sırasında elyafın yıpranmaması gibi üstünlükleri nedeni ile önemlerini korumaktadırlar. Genellikle, selülozik elyafın boyanmasında kullanılan bu boyarmaddelerin bazıları kağıt, deri, yün, ipek, naylon ve basit elyafın boyanmasında da kullanılır (Karaca, 2006).

2.5.5. Bazik Boyarmaddeler

Bazik boyalar katyonik bileşiklerdir. Liflerin asit gruplarına bağlanırlar. Bazik boyarmaddeler organik bazların klorürü veya asetat tuzları şeklindedir. Yün, ipek ve pamuk üzerinde ışığa ve yıkamaya karşı haslıkları çok düşüktür. Bugün reaktif boyarmaddeler ile pamuk üzerinde oldukça parlak renkler elde edildiğinden bazik boyalar pamuk boyacılığında önemini kaybetmişlerdir. Ancak poliakrilonitril üzerinde ışığa dayanıklılıkları iyi olduğundan orlon boyanmasında geniş ölçüde kullanılırlar (Karaca, 2006).

2.5.6. Mordant Boyarmaddeler

Mordant boyarmaddeler mordantların ilavesi ile dokumalar fiske olurlar. Mordant boyama en eski boyama yöntemlerinden biri olmasına rağmen kullanım oranı %23 olup Colour Indeks' de bu gruba ait yaklaşık 600 boya bulunmaktadır. Yün, deri, ipek, kağıtların boyanmasında kullanılır (Başer ve İnanıcı, 1990; Karaca, 2006).

2.5.7. Dispers Boyarmaddeler

Dispers boyar maddeler amino grup ve hidroksil grupları ihtiva eden, düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Boyama esnasında elyaf ile boyar maddedeki amino grup ve hidrosil grupları arasında hidrojen bağları meydana gelmekte ve dolayısıyla Van der Waals kuvvetleri önemli rol oynamaktadır. Polyester elyaf hidrofobi özellik gösterdiğinden büyük moleküllü boyar maddeler elyaf içine kolay nüfus edemezler. Bu

nedenle polyesterin boyanmasında en çok kullanılan boyarmaddeler dispers boyar maddelerdir. 1400 farklı boy bulunmaktadır (Başer ve İnanıcı, 1990; Karaca, 2006).

2.5.8. Pigment Boyarmaddeler

Pigment boyarmaddeler küçük bir grup olup hızla artış göstermektedir. Colour Indeks' de isimlendirilen boyarmaddelerin %25'i pigment boyalardır. Çözünmez boyalardır (Karaca, 2006).

2.5.9. Vat Boyarmaddeler

Vat boyarmaddeler suda çözünmeyen ve selüloz fiberlerini boyamak için kullanılan boyalardır. Sodyum ditiyonit ile indirgenmiş boyalar çözülebilir ve dokulara emdirilebilir özelliindedir. Bir sonraki aşamada, oksidasyonla boya yeniden çözünmez forma dönüştürülür. Vat boyaların hemen hemen tümü antrakuinon veya indigodur. İndigolar vat boyaların en eski gruplarından olup yaklaşık 5000 yıllık bir tarihe sahiptir (Başer ve İnanıcı, 1990; Karaca, 2006).

2.5.10. Anyonik ve İngrain Boyarmaddeler

Anyonik ve ingrain boyarmaddeler bağlanma bileşikleri ile reaksiyona giren suda çözünmeyen boyalardır. Bu reaksiyon dokuma üzerinde uygulanır (Başer ve İnanıcı, 1990; Karaca, 2006).

2.5.11. Sülfür Boyarmaddeler

Heterosiklik S içeren bağlarla oluşmuş polimerik aromatik komplekslerdir. Sülfür boyaları ile boyama vat boyalarında olduğu gibi indirgenme ve yükseltgenme içerir. Genel olarak selüloz dokumaları boyamak için kullanılır (Başer ve İnanıcı, 1990; Karaca, 2006).

2.5.12. Solvent Boyarmaddeler

Solvent boyarmaddeler non-iyonik boyalardır ve plastik gibi eriyebilir malzemeleri boyamak için kullanılırlar. Tekstil endüstrisinde yaygın olarak kullanılmamalarına rağmen diğer alanlarda artan şekilde kullanılmaktadır. Çoğu solvent boya diazo bileşikleridir ve bazı moleküler düzenlemelere maruz kalırlar (Başer ve İnanıcı, 1990; Karaca, 2006).

2.5.13. Florasan Renklendiriciler

Genel düşünceye göre boyarmadde olarak kabul edilmezler çünkü düşük renk yoğunluğuna sahiptirler. Kimyasal yapılarına bağlı olarak farklı sınıflara ayrılmaktadırlar. Birçok florasan renklendiriciler triazinil birimleri ve suda çözünebilen gruplar içerirler (Karaca, 2006).

2.6. Tekstil Endüstrisinin Atık Su İçeriği

Tekstil endüstrileri, yaş dokuma süreçleri için çok büyük miktarlarda su ve kimyasal tüketmektedirler. Gerek boyamada gerekse diğer işlemlerde kullanılan bu organik ve inorganik formdaki bileşiklerin çeşitliliğine bağlı olarak, ortaya çıkan atıksuların özellikleri de farklı olmaktadır. Alıcı sulara verilen renkli atıksular su ortamındaki ışık geçirgenliğini azaltır ve fotosentetik aktiviteyi olumsuz yönde etkiler. Ayrıca boyarmaddelerin bazı sucul organizmalarda birikmesi toksik ve kanserojenik ürünlerin meydana gelme riskini de beraberinde getirmektedir. Bu bağlamda boyarmadde içeren tekstil endüstrisi atıksularının renk giderim süreçleri ekolojik açıdan önem kazanmaktadır. Ancak kompleks kimyasal yapılarına ve sentetik kökenlerine bağlı olarak, boyarmaddelerin giderilmesi oldukça zor bir işlemdir (Kocaer vd., 2002).

Tekstil endüstrisinde boyama işlemi kumaşa renk vermek için yapılır. Boyalı atıksuların karakterizasyonu, boyaların kimyasal yapısındaki farklılıklardan ve boyama sürecinin değişim göstermesinden dolayı oldukça zordur. Çizelge 1.1 'de farklı

boyaların kullanıldığı ve farklı elyafların boyandığı boyahane atıksularının karakterizasyonuna ilişkin bazı değerler görülmektedir (Kocaer vd., 2002).

Çizelge 2.6.1. Tekstil atık suyunun içeriği (Kocaer vd., 2002)

Boya türü	Elyaf çeşidi	Renk ADMI	BOİ mg/l	TOK mg/l	AKM mg/l	ÇKM mg/l	pH
Asit	Poliamid	4000	240	315	14	2028	5.1
1:2 metal kompleks	Poliamid	370	570	400	5	3945	6.8
Bazik	Akrilik	5600	210	255	13	1469	4.5
Direkt	Viskoz	12500	15	140	26	2669	6.6
Reaktif, kesikli	Pamuklu	3890	0	150	32	12500	11.2
Reaktif sürekli	Pamuklu	1390	102	230	9	691	9.1
Vat	Pamuklu	1910	294	265	41	3945	11.8
Dispers, yüksek sıcaklıkta	Poliester	1245	198	360	76	1700	10.2

ADMI: Amerikan Boya İmalatçıları Renk Birimi

BOİ: Biyolojik Oksijen İhtiyacı

TOK: Toplam Organik Karbon

AKM: Askıda Katı Madde

ÇKM: Çözülmüş Katı Madde

Boyarmaddeler genellikle iki ana bileşenden oluşan küçük moleküllerdir. Bunlar rengi veren kromofor ve boyayı ipliğe bağlayan fonksiyonel gruptur. Literatürde kimyasal yapısına göre veya uygulandığı ipliğin tipine göre sınıflandırılmış yüzlerce çeşit boyarmadde mevcuttur. Boyarmaddenin iplik üzerine adsorbe olması tekstil ipliğine ve boyarmaddenin tipine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Adsorbsiyonun derecesi zaman, sıcaklık, pH ve yardımcı kimyasallar gibi çeşitli faktörlerin de etkisi altındadır. Boyama prosesinde sıkça kullanılan yardımcı kimyasallar Çizelge 2.5.2. de listelenmiştir (Kocaer vd., 2002). Çizelge 2.5.2., boyama prosesi çıkış sularında boyarmaddeler haricinde çok sayıda farklı bileşiklerin de bulunacağını göstermektedir. Tek bir boyama işlemi için farklı kimyasal sınıftaki boyarmaddelerin birlikte kullanılabilir olması çıkış suyu bileşimini daha da karmaşık

hale getirmektedir. Boyama süreci çıkış sularındaki kimyasal yük, sürecin kimyasının yanı sıra boyama işleminin kesikli ya da sürekli olmasına bağlı olarak da farklılıklar göstermektedir.

Çizelge 2.6.2. Boyama prosesinde en sık kullanılan yardımcı kimyasallar (Kocaer vd., 2002).

Kimyasal madde	Bileşim	Fonksiyon
Tuzlar	Sodyum klorür - Sodyum sülfat	Elyafın zeta potansiyelini nötralize edici, yavaşlatıcı
Asitler	Asetik asit - Sülfirik asit	pH kontrolü
Bazlar	Sodyumhidroksit- Sodyumkarbonat	pH kontrolü
Tamponlar	Fosfat	pH kontrolü
Kompleks yapıcılar	EDTA	Kompleks yapma,
Dispers edici/düzenleştirici ve yüzey aktif maddeler	Anyonik, katyonik ve noniyonik	Boyaları dağıtma, boya uygulamasını düzene sokma
Okside edici maddeler	Hidrojen peroksit-Sodyum nitrit	Boyaları çözünemez yapma
İndirgeyici maddeler	Sodyum hidrosülfid Sodyum sülfid	Boyaları çözünebilir yapma, reaksiyona girmemiş boyaların uzaklaştırılması
Taşıyıcılar	Fenil fenollar-Klorlu benzenler	Adsorbsiyonun artırılması

Parlak renkli olan ve suda çözünebilir reaktif ve asit boyarmaddeler konvensiyonel arıtma sistemlerinden etkilenmeden çıktıkları için çevresel açıdan en sorunlu boyalar olarak kabul edilirler. Bu boyaların belediye arıtma sistemlerindeki aerobik gideriminin yetersiz kaldığı bilinmektedir (Kocaer vd., 2002).

2.7. Oksidoredüktaz Grubu Enzimler

Oksidoredüktazlardan fenol oksidazlar ve peroksidazlar; fenoller, anilinler poliaromatik hidrokarbonlu bileşikler gibi birçok aromatik bileşiğin yanı sıra alkanlar gibi aromatik olmayan bileşikleri de okside edebilir. Bazı oksidoredüktazların potansiyel olarak kirletici bileşiklere ya da onların türevlerine karşı aktif olduğu kanıtlanmıştır. Bu esnada oluşan reaksiyonlar genelde, enzimatik olmayan transformasyon ile kararlı olmayan substrat katyon radikallerinin oluşumunda da olduğu gibi aromatik halkanın ayrılması ve polimerizasyon reaksiyonlarıdır. Oksidatif bir ajan olarak hidrojen peroksit veya oksijenin olması gerekir. Bu enzimlerin ortak bir özelliği, bazı olaylarda, kararlı olmayan ilk ürünlerin kimyasal dekompozisyonun bir sonucu olarak halojenlenmiş bileşiklerin dehalojenasyon şeklinde ilerleme yetenekleridir. Pratik uygulamalar için bu enzimlerin potansiyel kullanımı, katalitik ve biyokimyasal özellikleri çok çalışılmıştır (Gedikli, 2008) (Çizelge 2.6.1).

2.8. Oksijenazlar

Mono ve dioksijenazlar, birçok toksik bileşiğin metabolik parçalayıcı yol izinin önemli basamaklarını katalizler. Alkanlar, aromatikler, klorofenoller, nitrofenoller, poliaromatik hidrokarbonlu bileşikler; bakterilerin ya spesifik ya da spesifik olmayan oksijenazları aracılığıyla oksidatif olarak yıkılır. Birkaç oksijenaz onları üreten organizmalardan izole edilmiştir, moleküler ve kinetik özellikleri karakterize edilmiştir.

Oksijenazlar genellikle en az 2 en çok 6 enzimatik bileşenden oluşan multimerik enzimlerdir. Yalnız başına hiçbir komponent, substratı okside edemez. Bir koenzim olan NADPH veya FADH₂'ye kofaktör olarak da demir ve oksijene ihtiyaç duyulur. Bu enzimler genellikle geniş bir substrat spesifikliğine sahiptir ve nötr pH'larda daha iyi işlev görürler. Daha sonra *in vivo* koşullarda, oksijenaz destekli reaksiyon ürünü daha basit ürünlere transformasyon şeklinde ilerler veya CO₂ ve H₂O'ya tamamıyla mineralize olur (Burns ve Dick, 2002).

Çizelge 2.7.1. Oksidoredüktazların sınıflandırılması (Gedikli, 2008)

EC kodu	Adlandırılması	Model enzim
<u>EC 1.1</u>	Alkol oksidoredüktazlar	<u>Akseptörü; NAD/NADP (EC 1.1.1)</u> Karbohidrat dehidrogenaz <u>Alkol dehidrogenaz</u> Gliserol-3-fosfat dehidrogenaz L-ksiluloz redüktaz Aldoz redüktaz Laktat dehidrogenaz 3-hidroksiaçil CoA dehidrogenaz Malat dehidrogenaz İzositrat dehidrogenaz Fosfoglukonat dehidrogenaz Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz HMG-CoA redüktaz B-ketoaçil ACP redüktaz <u>IMP dehidrogenaz</u> <u>DXP redüktoizomeraz</u> <u>L-treonin dehidrogenaz</u> <u>Akseptörü; sitokrom (EC 1.1.2)</u> <u>Mannitol dehidrogenaz</u> <u>D-laktat dehidrogenaz</u> <u>Akseptörü; oksijen (EC 1.1.3)</u> <u>Glukoz oksidaz</u> <u>Ksantin oksidaz</u>
<u>EC 1.1</u>	Alkol oksidoredüktazlar	<u>Akseptörü; disülfid (EC 1.1.4)</u> <u>Vitamin K epoksid redüktaz</u> <u>Akseptörü; quinon vb. (EC 1.1.5)</u> <u>Quinoprotein glukoz dehidrogenaz</u>
<u>EC 1.2</u>	Aldehit/okso oksidoredüktazlar	<u>Akseptörü; NAD veya NADP (EC 1.2.1)</u> <u>Aldehid dehidrogenaz: Asetaldehit dehidrogenaz (ALDH₂)</u> <u>Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz</u> <u>Akseptörü; disülfid (EC 1.2.4)</u> <u>Oksoglutarat dehidrogenaz</u> <u>Piruvat dehidrogenaz</u>
<u>EC 1.3</u>	CH-CH oksidoredüktazlar	<u>Akseptörü; NAD veya NADP (EC 1.3.1)</u> <u>Enol-açil taşıyıcı protein redüktaz/Enol ACP redüktaz</u> <u>7-Dehidrokolesterol redüktaz</u> <u>Biliverdin redüktaz</u> <u>2,4 Dienol-CoA redüktaz</u> <u>Akseptörü; oksijen (EC 1.3.3)</u>

Çizelge 2.7.1. Oksidoredüktazların sınıflandırılması (Gedikli, 2008) (devam)

EC kodu	Adlandırılması	Model enzim
<u>EC 1.3</u>	CH-CH oksidoredüktazlar	Coproporfirinojen III oksidaz Protoporfirinojen oksidaz Akseptörü; quinon (EC 1.3.5) Suksinat dehidrogenaz Diğer akseptörler Fumarat redüktaz Butiril CoA dehidrogenaz
<u>EC 1.4</u>	CH-NH ₂ oksidoredüktazlar	Akseptörü; NAD/NADP (EC 1.4.1) Glutamat dehidrogenaz (GLUD1) Akseptörü; oksijen (EC 1.4.3) D-amino asit oksidaz Amin oksidaz Lizil oksidaz Monoamin oksidaz Akseptörü; disülfid (EC 1.4.4) Glisin dekarboksilaz kompleksi Diğer akseptörler D-amino asit dehidrogenaz Amin dehidrogenaz
<u>EC 1.5</u>	CH-NH oksidoredüktazlar	Akseptörü; NAD veya NADP (EC 1.5.1) Dihidrofolat redüktaz Metilenetetrahidrofolat redüktaz Akseptörü, oksijen (EC 1.5.3) Dihidrobenezofenantridin oksidaz <u>Sarkosin oksidaz</u> <u>Pirolin oksidaz</u> Akseptörü; quinon (EC 1.5.5) <u>Elektron transfer eden flavoprotein dehidrogenaz</u>
<u>EC 1.6</u>	<u>NADH</u> veya <u>NADPH</u> oksidoredüktazlar	<u>Methemoglobin redüktaz</u> <u>NADPH oksidaz (P91-PHOX)</u> <u>NADH dehidrogenaz</u>
<u>EC 1.7</u>	Donörü azot olan oksidoredüktazlar	<u>GMP redüktaz</u> <u>Ürat oksidaz</u>
<u>EC 1.8</u>	Kükürt oksidoredüktazlar	<u>Dihidrolipoamid dehidrogenaz</u> <u>Glutatyon redüktaz</u> <u>Tiyoredoksin redüktaz</u> <u>Sülfid oksidaz</u>
<u>EC 1.9</u>	Donörü hem grubu olan oksidoredüktazlar	
<u>EC 1.10</u>	Difenol ailesi oksidoredüktazlar	<u>Koenzim Q - sitokrom c redüktaz</u> Katekol oksidaz <u>LAKKAZ</u>

Çizelge 2.7.1. Oksidoredüktazların sınıflandırılması (Gedikli, 2008) (devam)

EC kodu	Adlandırılması	Model enzim
<u>EC 1.11</u>	Peroksidazlar	<u>Katalaz</u> Sitokrom c peroksidaz <u>Eozinofil peroksidaz</u> <u>Glutasyon peroksidaz</u> At kuyruğu peroksidazı <u>Laktoperoksidaz</u> Mangan peroksidaz Lignin peroksidaz
<u>EC 1.12</u>	Donörü hidrojen olan oksidoredüktazlar	
<u>EC 1.13</u>	Monooksijenazlar	Katekol dioksijenaz Sistein dioksijenaz <u>Indolamin 2,3-dioksijenaz</u> <u>Lipoksijenaz (5)</u>
<u>EC 1.14</u>	Dioksijenazlar (Stereoid hidroksilazları kapsar)	<u>Prolil hidroksilaz</u> <u>Lizil hidroksilaz</u> <u>Flavin-içeren monooksijenaz</u> Kolesterol 7 alfa-hidroksilaz <u>Metan monooksijenaz</u> <u>Tirozin hidroksilaz</u> <u>Triptofan hidroksilaz</u> <u>Dopamin beta hidroksilaz</u>
<u>EC 1.15</u>	Alıcısı süperoksit olan oksidoredüktazlar	Süperoksit dismutaz
<u>EC 1.16</u>	Metal iyonlarını oksitleyen oksidoredüktazlar	Seruloplasmin
<u>EC 1.17</u>	CH ya da CH ₂ grupları üzerinde rol oynayan oksidoredüktazlar	Ksantin oksidaz <u>Ribonükleotid redüktaz</u> <u>4-hidroksi-3-metilbut-2-enil difosfat redüktaz</u>
<u>EC 1.18</u>	Donörü demir-kükürt proteinleri olan oksidoredüktazlar	Nitrojenaz
<u>EC 1.19</u>	Donörü flavodoksin olan oksidoredüktazlar	
<u>EC 1.20</u>	Donörü fosfor ya da arsenik olan oksidoredüktazlar	

Çizelge 2.7.1. Oksidoredüktazların sınıflandırılması (Gedikli, 2008) (devam)

EC kodu	Adlandırılması	Model enzim
<u>EC</u> <u>1.21</u>	X-Y bağı oluşturmak için X-H ve Y-H üzerinde rol oynayan oksidoredüktazlar	
<u>EC</u> <u>1.22</u>	Diğer oksidoredüktazlar	

2.9. Fenoloksidazlar ve Peroksidazlar

Fenoloksidazlar ve peroksidazlar, birçok canlı (mikroorganizma, bitki ve hayvan) hücre tarafından üretilen 2 grup oksidoredüktazdır. Onlar bazen oksijenazların içinde de sınıflandırılır, fakat kendine has özelliklerinden dolayı ayrı şekilde sınıflandırılırlar. Her iki grubunda ana üreticileri, lignin transformasyonunda bu enzimlerin ilk rolünü üstlenen beyaz çürükçül funguslardır (Burns ve Dick, 2002).

Tirozinaz ve lakkazları içeren fenol oksidazlar aktivite için moleküler oksijen gerektirir oysaki atkuyruğundan (HRP) elde edilen peroksidaz, ligninaz (lignin- ve mangan peroksidaz) ve kloroperoksidazdan oluşan peroksidazlar, hidrojen peroksida gereksinim duyar. Bazılarında örneğin mangan peroksidazda reaksiyon, bivalent (+2 yüklü) mangan ve belli tipteki tamponlar gibi diğer bileşenlerin varlığına bağlıdır. Farklı mekanizmalarla her iki grup enzim de, polimerik ürünlerin oluşumuyla sonuçlanan oksidatif reaksiyon aracılığıyla fenolik ve fenolik olmayan aromatik bileşiklerin oksidasyonunu katalizler. Polifenoloksidazlar, tirozinazlar ve lakkazlar olmak üzere 2 alt sınıfa ayrılır.

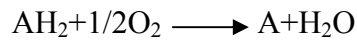
Tirozinazlar; polifenoloksidazlar, fenolazlar veya katekolazlar olarak isimlendirilen bakır içeren monoksijenazlardır.

Lakkazlar funguslar tarafından üretilen çok bakırlı proteinlerdir. Bu enzimler bakteri ve bitkiler tarafından da sentezlenirler. Bu grup enzimler literatürde çok çalışılmıştır. Lakkazların orijinleri hakkındaki bilgi daha çok yüksek oranda onların üretimi için gereken ihtiyaçları, özellikleri ve moleküler karakterizasyonu, kinetik özellikleri üzerinedir (Burns ve Dick, 2002).

Peroksidazlar, fenoloksidaz ve yaygın oksijenazlardan farklı olarak bir diğer oksijenaz grubudur. Çünkü onlar koenzime ihtiyaç duymaz ve hidrojen peroksida bağımlıdır. Metil peroksit veya etil peroksit gibi alkil hidroperoksidazlar, düşük spesifite ile hidrojen akseptörü olarak rol oynar. Peroksidazlar mikroorganizmalarda, bitkilerde ve hayvanlarda yaygındır, polimerik ürünleri oluşturan doğal ve sentetik substratların oksidasyonunu katalizler. En çok çalışılmış peroksidaz, atkuyruğundan (HRP) üretilmesine rağmen lignin ve mangan peroksidaz gibi diğer fungal peroksidazlar da mevcuttur (Burns ve Dick, 2002)

2.10. Lakkaz

Lakkaz hidrojen peroksida gereksinim duyulmadan moleküler oksijeni aşağıdaki denklige göre suya indirgeyen bakır içeren bir oksidazdır (Morozova vd, 2007).



İlk olarak Schoenbein 1856 yılında, *Boletus luciferus* adlı bir mantarın ekstratında mavi bir pigment oluşumunu bildirmiş ve bundan 30 yıl sonra Yoshida (1886), lak ağacının lateksinde lakkazın varlığını gözlemiştir. Bu enzim ayrıca, Bertrand (1896) tarafından birkaç mantar varyetesinde de tanımlanmıştır. Bourquelot and Bertrand (1895, 1896) tarafından yürütülen daha sonraki çalışmalarda, bazı mantar varyetelerinin, *Russula fortens* ve *R. nigricans* ekstratlarının renginin oksidasyon sürecinde önce kırmızıya, daha sonra koyu kahverengi ve siyaha dönüştüğünü gözlemlemişlerdir (Morozova vd., 2007). Bu araştırmacılar, yaptıkları daha sonraki araştırmalarda *R. nigricans*' in ekstratından, ekstrattaki bir oksidaz sisteminin varlığında melanin benzeri ürünler oluşturan bir maddeyi kristalize etmişlerdir. Bu madde, Bertrand (1896) tarafından tirozin amino asidi olarak olarak tanımlanmıştır. Lakkaz

tirozine karşı inaktif olduğundan Bertrand (1896) daha sonra tirozinaz olarak adlandırılan p-hidroksifenil amin, p-hidroksifenil metil amin, p-kresol ve fenolü de içeren çeşitli monohidroksi fenolik bileşiklerin aerobik oksidasyonlarını katalizleyen yeni bir oksidaz sistemi keşfettiğini anlamıştır (Bertrand, 1896)

Lakkaz için indirgenen substrat spektrumu geniştir. İnorganik/ organik metal kompleksleri, ferrosiyaniür, anilin, benzenetiol, fenolik bileşikler, diğer redoks inorganik, organik ve biyolojik bileşikler bunlar arasında yer alır. Lakkazlar genellikle düşük spesifiteye sahiptir. Bununla birlikte oksijen için de güçlü bir ilgiye sahiptir. Şekil 2.9.1 de, belli başlı fenolik substratları oksidasyona uğratmak için çeşitli lakkazların uygun pH, K_m ve k_{cat} değerlerini göstermektedir (Gienfreda vd, 1999).

Çizelge 2.10.1. Bazı lakkazların kinetik parametreleri (Tabak, 2008).

Türler	Substrat	pH _{opt}	K _m (mM)	k _{cat} (dakika)	Referans
<i>Armillaria mellea</i>	<i>p</i> -fenildiamin	3.5	1.7		Rehman ve Thurston, 1992
<i>Botrytis cinerea</i>	2,6-dimetilfenol	3.5	0.1		Slomczynski vd, 1995
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i> I, II	Guaiakol	3.5	1.6, 0.44	52, 66	Fukushima ve Kirk, 1995
<i>Cryphonectria parasitica</i>	2,6-dimetilfenol	2.5		2000	Rigling ve Van Alfen, 1993
<i>Myceliophthora thermophila</i>	Syringaldazin	7	0.01	370	Xu vd, 1996
<i>P. ostreatus</i> I, II	Syringaldazin	6.5, 6.5		192, 107	Youn vd, 1995b
<i>PM1</i>	Guaiakol	4.5	0.5		Coll vd, 1993
<i>Podospora anserina</i>	Dopamin	5.5, 7.5	3.3		Minuth ve ar, 1978
<i>P.cinnabarinus</i>	Guaiakol	4	0.75		Eggert vd, 1995
<i>Rhizoctonia praticola</i>	2,6-dimetilfenol	6.8	0.26		Leonowicz vd, 1984
<i>Rhizoctonia solani</i>	Syringaldazin	7	0.017	1900	Xu vd, 1996
<i>Rhus vernicifera</i>	Syringaldazin	9	0.043	600	Xu vd, 1996
<i>Rigidoporus lignosus</i>	Syringaldazin	6.0		1200	Galliano vd, 1991
<i>Scytalidium thermophilum</i>	Syringaldazin	7	0.001	290	Xu vd, 1996
<i>Trametes hirsutus</i>	Guaiakol		0.75		Eggert vd, 1995
<i>Trametes versicolor</i> I, II	Katekol	4.6	0.02-0.09		Milstein vd, 1989;
<i>Trametes villosa</i> I	Syringaldazin	5	0.058	2700	Xu vd, 1996

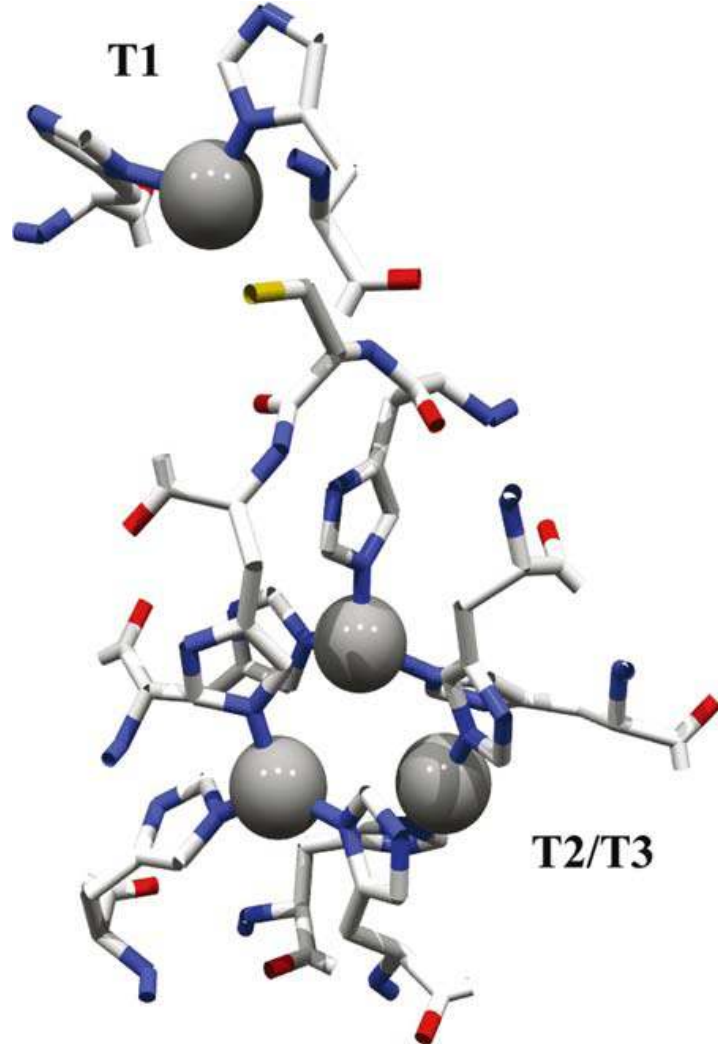
Lakkazın substrata olan afinitesi çeşitlilik göstermektedir. Oksidasyonu proton değişimi içermeyen substratlar için lakkaz aktivitesi genelde pH artıka azalır. Ancak oksidasyonu proton değişimi içeren substratlar (fenol gibi) için lakkaz aktivitesi, pH değerinin substrattan daha çok lakkaza bağı olduğu bir profil sergileyebilir. Fenoller için fungal lakkazlarda uygun pH aralığı 3-7 arası iken bitkisel kaynaklı lakkazlarda 9'a kadar yükselebilir. pH aktivitesindeki bu farklılık 2 zıt etkinin dengesinden kaynaklanıyor olabilir: Birincisi indirgenen substrat ile lakkazın Tip 1 bakırı arasındaki redoks potansiyel farkı üretmesi, ikincisi de bir hidroksid anyonunun lakkazın Tip2/Tip 3 bakıra bağlanmasıdır. Dönüşüm şartlarında substrat oksidasyonu, hız sınırlayıcı faktör olurken geçici ya da anaerobik şartlarda iç elektron transferi, hız sınırlayıcı olabilmektedir (Gienfreda vd, 1999).

2.10.1. Lakkaz Enziminin Biyokimyasal Özellikleri

Lakkaz enzimi yapısal olarak bir glikoproteindir. Enzimin karbonhidrat içeriği, protein molekülünün ağırlıkça %15-45'ini oluşturur. Enzimin içerdiği karbonhidratlar, heksozamin, glikoz, mannoz, galaktoz, fruktoz ve arabinozdur. Değişik kaynaklardan elde edilen lakkazın molekül ağırlığı geniş bir aralıkta değişir (Yarapolov et al., 1994).

Lakkaz, moleküler oksijeni suya indirgemek suretiyle fenoller gibi bir çok aromatik bileşimin oksidasyonunu katalizleyebilen ve bakır içeren bir enzimdir. Bünyesinden birbirinden farklı tipte dört bakır atomu içerir. 4 bakır atomu, elektro paramanyetik rezonans (EPR) sinyalleri yönünden birbirinden farklılık göstermektedir. İki Tip 3 bölgesine güçlü bir şekilde bağlıdır bu nedenle EPR sinyalleri de genelde güçlü anyon bağlanması ile aktifleştirilmektedir. Tip 1 ve Tip 2 bakır ise güçlü elektronik adsorbsiyona sahiptir (Gienfreda vd, 1999). Ducros ve arkadaşları *Coprinus cinereus* lakkazının kristalizasyonu ve X ışını ile yapı tayinini gerçekleştirmişlerdir. *Zucchini* askorbat oksidazı ve insan serum seruloplazminin kristal yapılarında da olduğu gibi yapılan çeşitli fiziksel karakterizasyonlar, lakkazdaki Tip 2 ve Tip 3 bakırın; indirgenen substrattan gelen elektronların su oluşturmak için enzimatik olarak oksijene transfer edildiği trinükleer grubu oluşturduğunu göstermiştir (Ducros vd, 1998).

Deneysel veriler, asimetrik aktivasyonun işlenmesi için oksijen molekülünün öncelikle Tip 2 ve Tip 3 bakıra bağlandığı şemayı desteklemektedir.



Şekil 2.10.1.1. *Melanocarpus albomyces* lakkaz yapısında T1 ve T2/T3 bölgelerinde 4 bakır atomunun geometrisi (Hakulinen vd., 2002).

2.10.2. Lakkazın Katalitik Mekanizması

Lakkaz katalitik reaksiyonun 3 ana basamakta olduğu düşünülmektedir (Gienfreda vd, 1999):

- 1) İndirgeyici substratlar ile Tip 1 bakır redüksiyonu
- 2) Tip 1 bakırdan Tip 2 ve Tip 3 bakır trinükleer (3 çekirdekli) gruba elektron transferi
- 3) Tip 2 ve Tip 3 bakırında oksijen molekülünün suya indirgenmesi.

Lakkazlardaki elektron transfer mekanizması ve suya oksijenin indirgenmesi tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Fakat bilinen bazı gerçekler mevcuttur.

- 1) Lakkazlar bir elektronun çıkarılması şeklinde T1 Cu^{+2} tarafından indirgenen substratı okside etme reaksiyonunu gerçekleştirirler. Sonuç olarak serbest (katyonik) bir radikal oluşturulur. Bu radikal, lakkazın katalizlediği oksidasyon ya da enzimatik olmayan reaksiyonlarla (hidrasyon veya polimerizasyon vb) ilerde kullanılabilir.
- 2) Bir elektron substrat oksidasyonu, oksijenin 4 elektron indirgenmesine eşlik ettiğinde reaksiyon mekanizması tamamen açıklanamaz. Lakkazlar moleküler oksijeni indirgemek için tek oksidasyon reaksiyonlarından elektronları depolayan bir pil gibi düşünülebilir. Bu nedenle 4 tane indirgenen substrat molekülünün oksidasyonu, moleküler oksijenin suya tamamen okside edilmesi için gereklidir.
- 3) T1 bölgesinde 4 monoelektronik oksidasyondan ekstra kte edilen her bir elektron O_2 'nin bağlandığı üç çekirdekli gruba transfer edilir. Bu nedenle T2 ve T3 bölgeleri, moleküler oksijenin indirgendiği ve suyun serbest kaldığı lokasyonlardır.

Lakkaz için yeni substratların bağlanması olmadan önce ürünlerin salındığı anlamına gelen 2 bölge Ping-Pong Bi-Bi reaksiyon mekanizması önerilmiştir. Mavi bakır oksidazların solvent kanalları; üç çekirdekli gruba dioksijen moleküllerinin hızlı

girişine ve sonuçta da suyun kolayca açığa çıkmasına olanak veren uygunluktur. Bunun için birçok katalitik mekanizma önerilmesine rağmen döngünün indirgeyici kısmı çok iyi bilinmemektedir (Alcalde, 2007).

Lakkazların pH ve sıcaklık değişkenleri de elde edildikleri kaynakları açısından farklılık göstermektedir. *Rhus vernicifera* lakkazının optimum pH'ı nötral değerlerde gözlenirken bazı koşullarda daha düşük aktivite sergilemiştir. Elektron verici substratları için aktivitenin pH profili fungal lakkazlarınkine benzerdir. Hidrojen atomlarının organik donörleri substrat olarak kullanıldığında fungal lakkazların optimum pH'ı 3.5 ile 5 arasında değişmektedir. Fenolik bileşiklerin oksidasyonunda lakkaz aktivitesinin böyle bir profil sergilemesi 2 etkiye neden olmaktadır. Bir yandan çözelti iyonizasyonun pH'ındaki artış ile fenolat anyonunun üretiminin bir sonucu olarak fenolik bileşiklerin potansiyeli düşer. Diğer yandan lakkazın katalizlediği enzimatik reaksiyonlarının hızı çözeltinin pH'ındaki artış ile azalır. Lakkaz enziminin sıcaklık sınırları genellikle 50- 70 °C arasında değişebilmektedir. Yine bu enzimin yarı-inaktivasyon süresi; 50°C'de birkaç dakikadan (*B.cinerea*'dan elde edilen bir örneğinde) 3 saatte 75°C'ye (*Pycnoporus sanguineus*'den üretilen enzimde) kadar farklılık gösterebilir (Morozova vd, 2007).

2.10.3. Lakkaz Substrat ve İnhibitörleri

Lakkazlar genel olarak fenolik bileşikler üzerinde çok etkin olmalarının yanında okside edebildikleri substrat aralığı çok geniştir. Lakkazlar *o*- ve *p*-difenoller, aminofenoller, metoksi ile yer değiştirmiş fenoller, polifenoller, benzenetiyoller, hidroksi indoller, poliaminler, bazı aril diaminler başka bileşiklere dönüştürme yeteneğine sahiptir. Organik / inorganik metal bileşikler de lakkazın substratları arasında yer almaktadır. Hidrokinon ve katekol gibi basit difenoller genel olarak iyi substratlardır fakat guaikol ve 2,6-dimetoksifenol çok daha iyi substratlar olarak bilinmektedir (Çizelge 2.8.3.1.). *p*-fenilen daimin, sıklıkla kullanılan substratlar arasındadır. Syringaldizin (N, N'-bis(3,5-dimetoksi-4-hidroksibenziliden hidrazin; $\epsilon_{525}=65000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) iyi bir substrattır fakat lignin parçalayan bir çok basidiyomisetler tarafından üretilen mangan peroksit tarafından da syringaldizin okside edildiği için

hidrojen peroksidin tamamen olmaması durumunda kullanılmak zorundadır (Polaina and MacCabe., 2007).

Lakkazlar çeşitli reaktiflerle çok güçlü bir şekilde inhibe edilebilir. Azid, halid, siyanür, tiyosiyandır, flor ve Tip2-Tip3 bakıra bağlı hidroksid gibi küçük anyonlar; iç elektron transferini bozarak enzim aktivitesinin inhibisyonuna neden olmaktadır (Baldrian, 2006).

Çizelge 2.10.3.1. Fungal lakkazların substratları ve inhibitörleri. Parantez içindeki rakamlar Michaelis sabiti (Km, μM) veya hız sabitini (kcat, s⁻¹) göstermektedir. Çoklu sayılar aynı enzimin izozimlerini ifade etmektedir. Redoks aracı molekül olmaksızın transformasyon yapan bileşikler substrat olarak listede yer almıştır (Gedikli, 2008).

Substrat	Türler
(3,4-dimetoksifenil)metanol (veratril alkol)	Ts, Tv
(4-hidroksi-3-metoksifenil)asetik asit	Pe
1,2,4,5-tetrametoksibenzen	Cs (Km:6900), Cs (Km:900; kcat:3360)
1,2,4-benzenetriol	Bc
1,2-benzenediol (katekol)	Ab, Am, Bc, Cf (Km:85; kcat:90), Ch, Cm (Km:120; kcat:320), Cn, Cr, Ds, Gg (Km:250), Gl (Km:55), Le (Km:22400), Lp, Mi, Mq, Pc, Pe (Km:2200), Pe (Km:4100), Pr, Rl, Sr, Th (Km:142; kcat:390), To (Km:110; kcat:80), Tp (Km:470; kcat:27600), Ts, Tt
1,3-dihidroksibenzen (resorsinol)	Cn, Ts
1,4-benzohidroquinon	Am, Bc, Cf (Km:68; kcat:110), Ch, Cn, Cm (Km:100; kcat:290), Cr, Ct (Km:36), Ds, Gl (Km:29), Lp, Le (Km:110), Pc, Pe (Km:2500), Pe (Km:4600), Pi, Pn, Rl, Th (Km:61; kcat:450), To (Km:74; kcat:110), Tp (Km:390; kcat:19200), Ts, Tt
1-naftol	Ab, Bc, Gl
2-(3,4-dihidroksifenil)-3,5,7-trihidroksi-4H-kromen-4-on	Am
2-klorofenol	Tv
2,2'-Azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit)	Al (kcat 21), Cr (kcat:4680), Cr (kcat:5760), Cs (kcat:6060), Po (kcat:16000), Po (kcat:350000), Po (kcat:90000), Rl (kcat (34700), Tp (kcat41400), tr (kcat:41520), Tt (kcat:198)
2,3-diklorofenol	Tv
2,3-dimetoksifenol	Ds
2,3,6-triklorofenol	Tv
2,4,6-triklorofenol	Ds
2,4,6-trimetilfenol	Tv
2,4-diklorofenol	Tv
2,5-dihidroksibenzoik asit	Pe
2,6-diklorofenol	Tt, Tv
2,6-dimetoksi-1,4-benzohidroquinon	Pi
	Tt, Tv
	Cr (Km:107; kcat:8580), Cr (Km:89; kcat:11220)

Çizelge 2.10.3.1 Fungal lakkazların substratları ve inhibitörleri (devam)

Substrat	Türler
2,6-dimetoksifenol	Al (kcat:15), Cr (kcat:6360), Cr (kcat:5640), Cs (kcat:1380), Cs (kcat:4560), Po (kcat:100), Po (kcat:250), Po (kcat:360000), Rl (kcat:2800), Rl (kcat:2000), Tp (kcat:24000), Tr (kcat:4860), Tt (kcat:109) Rl
2,7-diaminofloren	Am, Cn, Ct, (Km:100), Le (Km:650), Lp, Ma, Pa (Km:3300), Ts, Tv (Km:15600)
2-amino-3-(3,4-dihidroksifenil) propanoik asit	Pa
2-amino-3-hidroksibenzoik asit	Pc
2-amino-4-metilfenol	Tt
2-amino-4-nitrofenol	Tt
2-aminofenol	Tt
2-aminofenilamin	Cn
2-klorobenzen-1,4-diol	Tt
2-klorofenol	Le (Km:1350), Mq, Tt
2-metoksi-1,4-benzohidroquinon	Cr (Km:216; kcat:7620), Cr (Km:229; kcat:6300), Pe
2-metoksi-4-[prop-1-enil]fenol	Ts
2-metoksi-4-metilfenol	Tt
2-metoksianilin	Tt
2-metoksifenol (guaiakol)	Al (kcat:159), Cf (kcat:95), Cm (kcat:160), Cs (kcat:3120), Cs (kcat:3960), Po (kcat:150), Th (kcat:430), To (kcat:90), Tp (kcat:10800), Tr (kcat:4140), Tt (kcat:115) Pe
2-metoksi-1,4-benzohidroquinon	Pe (Km:1600), Pe (Km:2100)
2-metil-1,4-benzohidroquinon	Cg (kcat:0.082)
2-metilantrasen	Bc, Tt
2-metilfenol	Bc, Gl
2-naftol	Mq
2,4-diklorofenol	
2,4,6-triklorofenol	Am, Bc, Cs, Le (Km:40), Mi, Mq, Ts, Tt
3-(3,4-dihidroksifenil) akrilik asit (kaffeik asit)	Cf (Km:21, kcat:140), Cm (Km:24; kcat:330), Cs, Ff, Le (Km:110), Pn, Pr, Rl, Th (Km:24; kcat:580), To (Km:11; kcat:170), Tv
3-(4-hidroksi-3,5-dimetoksifenil) akrilik asit	Am, Cf (Km:20), Ch, Cs, Ct (Km:270), Ff, Le (Km:240), Le (Km:2860), Mi, Mq, Pc, Pn, Pr, Rl, Sr, Tt (Km:40; kcat:145), Tv
3-(4-hidroksi-3-metoksifenil) akrilik asit (ferulik asit)	Le (Km:240), Pn, Rl, Tt
3-(4-hidroksifenil) akrilik asit	

Çizelge 2.10.3.1 Fungal lakkazların substratları ve inhibitörleri (devam)

Substrat	Türler
3,3'-dimetoksi-1,1'-bifenil-4,4'-diamin	Mi (Km:25), Pr,Tc
3,4,5-Trihidroksibenzoik asit (gallik asit)	Ab,Am, Bc, Ct (Km:130), Le (Km:130=, Mq, Nc, On
3,4-dihidroksibenzoik asit	Cr, Mi, Mq, Pe, Tt
3,5-sikloheksadien-1,2-diol	Pe
3,5-dimetoksi-hidroksi-benzaldazin	Bc
3- {[3-(3,4-dihidroksifenil) prop-2-enol]oksi}-	Am, Ct
1,4,5-trihidroksisikloheksankarboksilik asit	
3-amino-4-hidroksibenzenesulfonik asit	
3-metoksifenol	Tt
4-(hidroksimetil)-2-metoksifenol	Pr
	Cs (Km:1600;kcat:2820), Cs (Km:610; kcat:2220), Pe
4-[3-hidroksiprop-1-enil]-2,6-dimetoksifenol	Mq
4-[3-hidroksiprop-1-enil]-2-metoksifenol (koniferil alkol)	Pe, Rl
4-[3-hidroksiprop-1-enil]-fenol	
4-amino-2,6-diklorofenol	
4-aminofenol	Mq
4-aminofenilamin	Bc, Tt
	Pe (Km:1000), Pe (Km:800), Tt
4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzaldehit	Am (Km:1690), Bc, Cn, Gl, Lp, Le (Km:256), Pe, Tc, Ts
4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzaldehit [(4-hidroksi-3,5-dimetoksifenil)metilen] hidrazon (syringaldazin)	Cr
4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzoik asit (syrinjik asit)	Al, (kcat:5), Po (kcat:23000), Po (kcat:28000), Po (kcat:20000), Tp (kcat:16800)
	Cr, Cs (Km:100; kcat:4680), Cs (Km:130; kcat:1860), Ds, Ff (Km:30), mi, Pe, Pr, Tv (Km:60)
4-hidroksi-3-metoksibenzaldehit	Cr, Cs (Km:6300; kcat:1560), Cs (Km:9000, kcat:600), Pe
4-hidroksi-3-metoksibenzoik asit (vanillik asit)	Cf (Km:160), Cs (Km:1000; kcat:3960), Cs (Km:1100; kcat:2220), Ct (Km:150), Ff (Km:970), Mi, Pe, Pr, Tt, Tv (Km:130)
4-hidroksibenzoik asit	Mi
4-hidroksiindol	Ch, Pc
4-klorofenol	Le (Km:1740), Tt
4-metoksianilin	Cr, Mi, Pe (Km:3100), Pe (Km:3300), Tp (Km:1600; kcat:7800), Tt
4-metoksifenol	Cr, Le (Km:330), Pe (Km:800), Pe (Km:900), Pr, Tt
4-metilbenzen-1,2-diol	Am, Bc, Ch, Cy, Le (Km:170), Mq, Pc, Rl
4-metilfenol	Bc, Le (Km:2200), Tt
4-nitrobenzen-1,2-diol	Tt

Çizelge 2.10.3.1 Fungal lakkazların substratları ve inhibitörleri (devam).

Substrat	Türler
5-(1,2-dihidroksietil)-3,4-dihidroksifuran-2-on (askorbik asit)	Ab, Am, Bc, Lp, Mi, Nc, Pa (Km:190)
9-metilantrasen	Cg (kcat:4)
Asenaften	Cg (kcat:0.167)
Antrasen	Cg (kcat:0.087), Po, Tv
Benzkateşin	Pa (Km:2270)
Benzen-1,2,3-triol (pyrogallol)	Ab, Bc, Ch, Cy, Gg (Km:310), Gl, Le (Km:30), Le)Km:417), Lp, Nc, Pc, Rl, Sr, Ts, Mi
Benzen-1,3,5-triol (floroglukinol)	Cg (kcat:1.38)
Benzo[a]piren	Cg (kcat:0.063)
Bifenilen	Po
Floroanten	Am (Km:1720), Cf (Km:170; kcat:130), Cm (Km:115; kcat:450), Lp, Pa (Km:1030), Pi, Th (Km:180; kcat:400), To (Km:96; kcat:150), Tp (Km:43; kcat:51000)
K ₄ [Fe(CN) ₆]	St, Tv (Km:186)
Mn ⁺²	Ab, Am, Bc, Cf, Pc
N,N'-dimetilbenzen-1,4-diamin	Gl (Km:402)
o-tolidin	Cf (Km:3900)
o-vanillin	Tv (Km:3000; kcat:0.023)
Pentaklorofenol	Cg (kcat:0.013)
Fenantren	Rl
Fenilhidrazin	Le
Inhibitör	Dq, Le
Ca ⁺²	Dq
Cd ⁺²	Ct, Po, Lp, Tc
Co ⁺²	Ct, Dq, Le, Pu
Fe ⁺²	Dq, Pu
Mg ⁺²	Le
Mn ⁺²	Le
Rb ⁺	Le, Po
Sn ⁺²	Ct
Zn ⁺²	Ct
1-fenil-2-tioüre	Ct, Pu, Te
2-merkaptobenzotiazol	Le
2-merkaptoetanol	Pz
3-(4-hidroksifenil) akrilik asit	Lp, Te
4-nitrofenol	Ct, Tc
8-hidroksiquinolin	Ab
Askorbik asit	Ab, Tc
Setilpiridinium bromid	
Setiltriamonyum bromid	

Çizelge 2.10.3.1 Fungal lakkazların substratları ve inhibitörleri (devam).

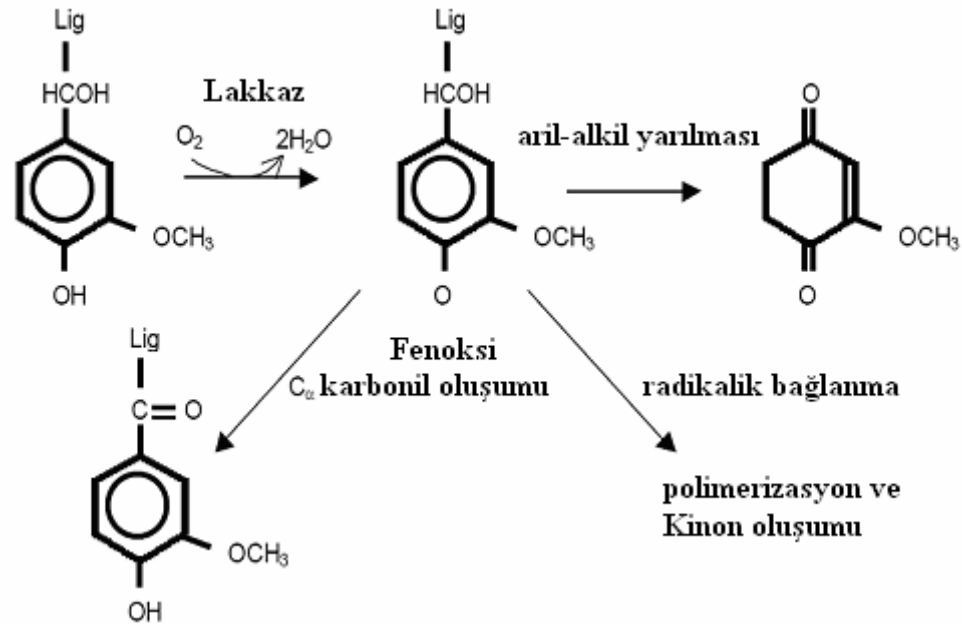
İnhibitör	Türler
CN ⁻	Ab, Bc, Ct, Gl, Lp, Ma, Me, Mi, Pn, Po, Pz, Rl, Tg, Tr, Ts
Sistein	Ct, Ch, Dq, Gl, Le, Mq, Pc, Py, Sr, Te, Vv
Dietilditiyokarbamik asit	Bc, Ch, Gl, Lp, Mi, Pp, Pc, Ps, Sr
Ditiyotireitol	Ch, Dq, Le, Pc, Py, Vv
EDTA	Ct, Ma, Mq*, Vv
Glutatyon	Dq, Gl
Humik asit	Pt
Hidroksilamin	Po
KCl	Le
Kojik asit	Dq, Le, Po
NaCl	Sr
NaF	Ds, Me, Sr, Tt
NaN ₃	Ab, Bc, Ch, Ct, Dq, Ds, Gl, Le, Ma, Me, Mi, Pa, Pc, Po, Pp, Pr, Ps, Pu, Pz, Sr, Tc, Te, Tg, Tr, Ts, Vv
Salisilaldoksin	Gl
SDS	Ds, Mq*, Pu, Tr
Tiamin	Sr
Tiyoglikolik asit	Ct, Mi, Po, Pr, Sr, Vv
Tiyöüre	Ct, Dq
Trifloroasetik asit	Tr
Tropolen	Ch, Le, Pc

Ab, *Agaricus bisporus* (Wood, 1980); Al, *Agaricus blazei* (Ullrich vd., 2005); Am, *Armillaria mellea* (Rehman ve Thurston, 1992; Curir vd., 1997); Bc, *Botrytis cinerea* (Zouari vd., 2002); Cf, *Corioloopsis fulvocinnerea* (Smirnov vd., 2001; Shleev vd., 2004); Cg, *Corioloopsis gallica* (Pickard vd., 1999); Ch, *Coriolus hirsutus* (Eggert vd., 1996); Cm, *Cerrena maxima* (Shleev vd., 2004); Cn, *Cryptococcus neoformans* (Williamson, 1994); Cr, *Corioloopsis rigida* (Saparrat vd., 2002); Cs, *Ceriporiopsis subvermispora* (Fukushima ve Kirk, 1995; Salas vd., 1995); Ct, *Chaetomium termophilum* (Chefetz vd., 1998; Ishigami vd., 1998); Cy, *Cyathus stercoreus* (Sethuraman vd., 1999); Dq, *Daedalea quercina* (Baldrian, 2004); Ds, *Dichomitus squalens* (Perie vd., 1998); Ff, *Fomes fomentarius* (Rogalski vd., 1991); Gg, *Gaeumannomyces graminis* (Edens vd., 1999); Gl, *Ganoderma lucidum* (Lalitha ve Sirsi, 1972; Ko vd., 2001); Le, *Lentinula edodes* (D'Annibale, 1999; Nagai vd., 2002); Lp, *Lactarius piperatus* (Iwasaki vd., 1967); Ma, *Mauginiella* sp. (Palonen vd., 2003); Me, *Melanocarpus albomyces* (Kiiskinen vd., 2002); Mi, *Monocillium indicum* (Thakker vd., 1992); Mq, *Marasmius quercophilus* (Dedeyan vd., 2000; Farnet vd., 2004); Nc, *Neurospora crassa* (Froehner ve Eriksson, 1974); On, *Ophiostoma novo-ulmi* (Binz ve Canevascini, 1997); Pa, *Podospora anserina* (Molitoris ve Esser, 1970); Pc, *Pycnoporus cinnabarinus* (Eggert vd., 1996; 1995); Pe, *Pleurotus eryngii* (Munoz vd., 1997); Pi, *Polyporus anisoporus* (Vaitkyavichyus vd., 1984); Pn, *Phellinus noxius* (Geiger vd., 1986); Po, *Pleurotus ostreatus* (Palmieri vd., 1997; Giardina vd., 1999; Pozdnyakova vd., 2004; Das vd., 2000); Pp, *Panaeolus papilionaceus* (Heinzkill vd., 1998); Pr, *Phellinus ribis* (Min vd., 2001); Ps, *Panaeolus sphinctricus* (Heinzkill vd., 1998); Pt, *Panus tigrinus* (Zavarzina vd., 2004); Pu, *Pleurotus pulmonarius* (De Souza ve Peralta, 2003); Py, *Pycnoporus coccineus* (Oda vd., 1991); Pz, *Pyricularia oryzae* (Neufeld vd., 1958); Rl, *Rigidoporus lignosus* (Geiger vd., 1986; Bonomo vd., 1998; Cambria vd., 2000); Sr, *Sclerotium rolfsii* (Ryan vd., 2003); St, *Stropharia rugosoannulata* (Schlosser ve Höfer, 2002); Tc, *Trichoderma* sp. (Assavanig vd., 1992); Te, *Thelephora terrestris* (Kanunfre ve Zancan, 1998); Tg, *Trametes gallica* (Dong ve Zhang, 2004); To, *Trametes ochracea* (Shleev vd., 2004); Tp, *Trametes pubescens* (Galhaup vd., 2002); Ts, *Trametes sanguinea* (Nishizawa vd., 1995); Tr, *Trametes* sp.AH28-2 (Xiao vd., 2003); Tt, *Trametes trogii* (Garzillo vd., 1998); Tv, *Trametes versicolor* (Bourbonnais ve Paice, 1990; Rogalski vd., 1991; Salas vd., 1995; Johannes vd., 1996; Collins vd., 1996; Dawel vd., 1997; Höfer ve Schlosser, 1999; Itoh vd., 2000; Leontievsky vd., 1997); Vv, *Volvariella volvacea* (Chen vd., 2004).

2.11. Lakkaz Aracılı Sistemler-LAS, (Lakkaz Mediatör Sistemler-LMS)

Biyokatalitik teknolojiler çevresel güvenilirliklerinden dolayı giderek artan bir ilgi görmektedir. Endüstriyel proseslerde proteaz, lipaz, ksilanaz, hidrolaz, izomeraz, oksidoredüktaz vb. çeşitli enzimler kullanılmaktadır. Oksidoredüktaz grubu enzimler arasından yer alan lakkaz enzimi ise oldukça geniş substrat aralığına sahiptir. Bununla birlikte enzimin substratı olan lakkaz aracı maddeler sayesinde substrat aralığını genişletmek mümkündür (Morozova vd., 2007).

Lakkazın katalizlediği reaksiyonlarda substrat moleküllerinin çok büyük bir kısmının lakkaz tarafından $1e^-$ oksidasyonu ile bir serbest radikal oluşturduğu gözlenmektedir. Substratın $1e^-$ oksidasyonu, oksijenin $4e^-$ indirgenmesi ile tamamlanır ancak bu mekanizma tam olarak açıklanamamaktadır. İlk ürün stabil değildir ve ikinci ürün de enzimatik oksidasyon, enzimatik olmayan hidrasyon veya polimerizasyon gibi reaksiyonlar sonunda oluşabilir. Lakkazın doğal substratı olan ligninin bağları lakkaz tarafından yarılr. Bu yarıma $C\alpha$ oksidasyonu ile ($C\alpha - C\beta$ bağının yarıması ve aril-alkil yarıması) ligninin fenolik alt birimlerine atak yapması ile olur (Şekil 2.11.1.). Moleküler oksijen son elektron alıcısı olarak davranır ve böylece iki molekül su (H_2O) indirgenir (Dizge, 2007).



Şekil 2.11.1. Ligninin fenolik gruplarının lakkaz katalizli oksidasyon (yükseltgenme) reaksiyonu (Dizge, 2007).

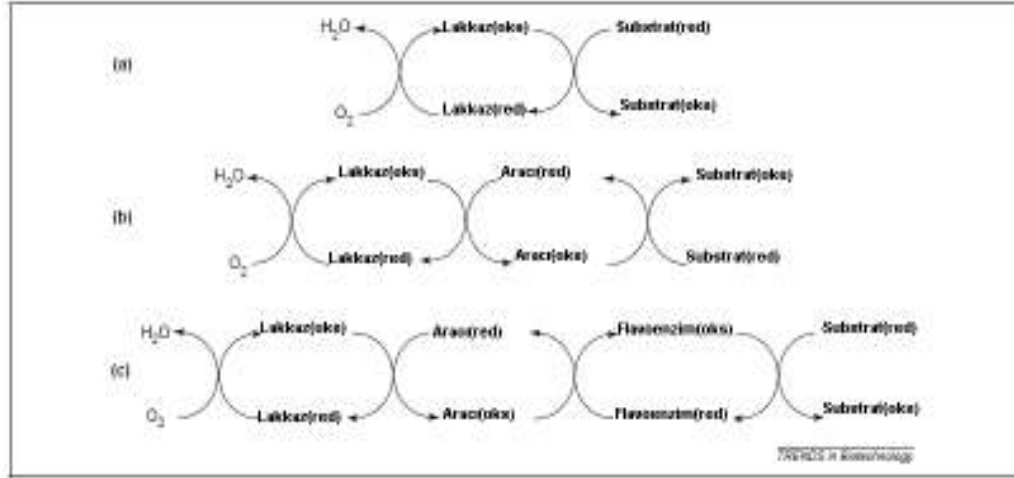
Lakkazın fenolik bileşikleri okside etmesinin yanı sıra fenolik olmayan bileşikler üzerinde de etkili olması bazı aracı moleküllerle sağlanmıştır. 1990 yılında ABTS'nin diamonyum tuzlarının lakkaza farklı substratı okside edebilen yeteneğini kazandırmada önemli rol oynadığının bulunmasıyla bu enzimle ilgili çalışmalar farklı bir boyut kazanmıştır. Aracı molekül olarak ABTS ve remazol Blue ile birlikte kullanılan *T.hirsuta* lakkazı veratril alkol ve 1-(3,4-dimetoksifenil)-2-(2-metoksifenoksi) propan-1,3-diol gibi yüksek redoks potansiyeline sahip olan bileşikler parçalayarak veratraldehit ve benzaldehit ürünlerini vermiştir (Morozova vd, 2007).

İdeal bir redoks aracı molekül iyi bir lakkaz substratı olmalıdır, onların okside edilmiş ve indirgenmiş formları stabil olmalıdır fakat enzimatik reaksiyonla inhibe olmamalıdır. Bununla birlikte siklik (halkasal) olmalıdır. Özellikle son 10 yılda lakkazın substrat aralığı lakkaz aracılı sistemler (LMS) aracılığıyla genişletilmiştir. 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) (ABTS) veya 1-hidroksibenzotriazol

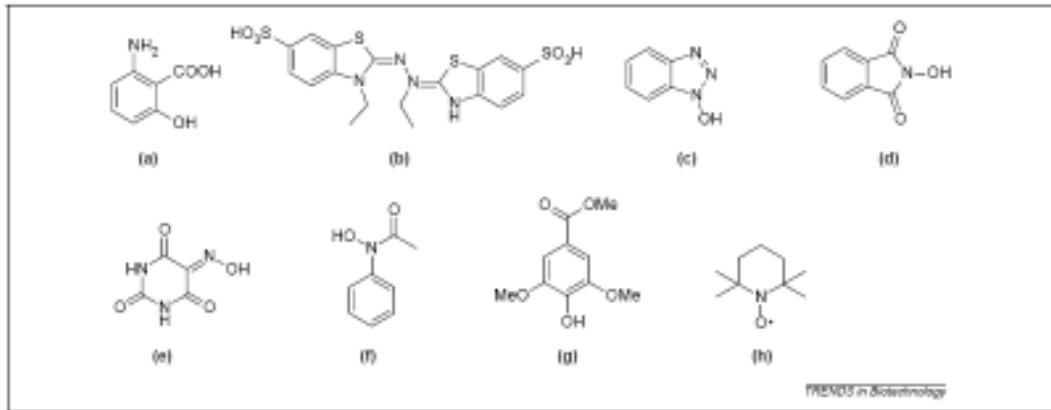
(HBT) gibi düşük molekül ağırlığına sahip moleküllerle enzimlerin kombinasyonu hem bilinen substratların dönüşümünde yüksek verimlilik sağlamak hem de portföyüne lakkazın tek başına yapamayacağı yeni reaksiyonları eklemektedir. Şekil 2.11.2, kimyasal aracı moleküllerin yokluğunda (a) ve varlığında (b ve c) substrat oksidasyonu için lakkazın katalizlediği redoks döngüsünü göstermektedir. Kağıt hamuru beyazlatma endüstrisinde veya zararlı ksenobiyotiklerin (polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi) uzaklaştırılması, LMS ile yapılan deneylerle desteklenmiştir. Genellikle tüm aracı moleküller (örneğin syringaldizin) lakkazın substratlarıdır. Onlar T1 bölgesinde kolayca okside edilebilir. Bu mekanizmada aracı molekül, lignin gibi yüksek molekül ağırlıklı substratların okside edilebilmesine izin veren difüze edilebilir bir elektron taşıyıcısı olarak rol oynamaktadır. Lakkaz molekülü ile elde edilen elektronlar sonunda su oluşturması için oksijene transfer edilir (T2/T3 üç çekirdekli grupta). Bir aracı molekülün çalışması avantajlıdır çünkü bu lakkazın iki hedefi gerçekleştirmesini sağlar:

- i) Sterik engel problemlerini aşarak polimerlerin oksidasyonunu sağlamak
(enzim ve polimer direkt olarak birbirini etkilememek zorundadır)

ii) Substrat aralığını genişletmek. Etkili bir aracı molekül, lakkazından daha yüksek bir redoks potansiyeline sahip olmamalıdır. Substratından daha yüksek bir potansiyel ve serbest difüze edilebilme yeteneği genelde daha önemlidir. Karışık aracı moleküllerin sinerjik etkisi ile lakkazın gerçekleştirdiği oksidasyon geliştirebilir. Şekil 2.11.3 de bazı lakkaz aracı moleküllerin kimyasal yapıları verilmiştir. Fakat kimyasal araçlar çok daha toksiktir, pahalıdır ve stabil değildir. Bundan başka onlar yan ürün oluşumuna neden olmaktadır ve enzimi inaktive etmektedirler. Bunun üstesinden gelmek için lakkazın yönlendirilmiş evrimi veya tirozin gibi doğal aracı moleküller için arayışlarda bulunmak gibi yeni yaklaşımlar geliştirilmektedir (Alcalde vd., 2007).



Şekil 2.11.2. Kimyasal aracı moleküllerin yokluğunda (a) ve varlığında (b ve c) substrat oksidasyonu için lakkazın katalizlediği redoks döngüsünün şeması (Riva vd., 2006).

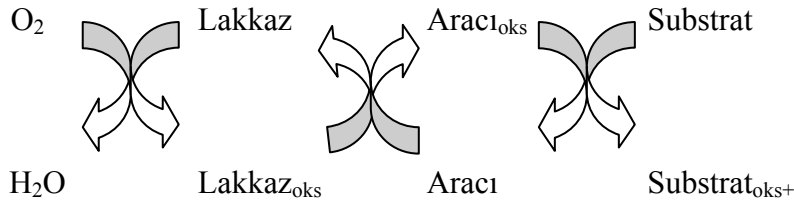


Şekil 2.11.3. Bazı lakkaz aracı molekülleri (a) Hidroksiantranilik asit (HAA); (b) ABTS; (c) N-hidroksibenzotriazol (HBT); (d) N-hidroksifitamid (HPI); (e) violurik asit (VLA); (f) N-hidroksiasetanilid (NHA); (g) syringik asit; (h) TEMPO (Riva vd., 2006).

Çizelge 2.11.1. LAS sistemlerde doğal ve sentetik aracı moleküller

Aracı Moleküller	Mikroorganizma	Referans
<p>Doğal aracı moleküller Mn⁺³</p> <p>Organik asitler (malonat, oksalat)</p> <p>Veratril alkol</p> <p>3-hidroksiantranilik asit (3-HAA)</p> <p>2-kloro-1,4-dimetoksi benzen (2Cl-14DMB)</p>	<p><i>Phanerochaete chrysosporium</i> (MNP)</p> <p><i>Armillaria mellea</i>, <i>Fomes annosus</i>, <i>Pleurotus ostreatus</i>, <i>Phanerochaete chrysosporium</i>, <i>Phlebia radiata</i>, <i>Cenporiopsis subvermispora</i>, <i>Nematooma frowardii</i> (LiP, MnP)</p> <p><i>Phanerochaete chrysosporium</i> (LiP)</p> <p><i>Pycnoporus cinnabarinus</i> (Lac)</p> <p><i>Trametes versicolor</i> (LiP)</p>	<p>Wariishi vd, 1992</p> <p>Galkin vd, 1998; Hofrichter vd, 1999; Takao, 1965</p> <p>Lundquist ve Kirk, 1978</p> <p>Eggert vd, 1996; 1997</p> <p>Teunissen ve Field, 1998</p>
<p>Sentetik aracı moleküller 1-hidroksibenzotriazol (1-HBT)</p>	<p><i>Trametes versicolor</i>, <i>Trametes villosa</i>, <i>Pycnoporus cinnabarinus</i>, <i>Botrytis cinerea</i>, <i>Myceliophthora themophila</i>, <i>Coriolopsis gallica</i>, <i>Pleurotus ostreatus</i>, <i>Trametes versicolor</i>, <i>Trametes villosa</i>, <i>Pycnoporus cinnabarinus</i>, <i>Botrytis cinerea</i>, <i>Myceliophthora themophila</i>, <i>Coriolopsis gallica</i>, <i>Pleurotus ostreatus</i> (Lac)</p>	<p>Bourbonnais vd, 1996; Crestini ve Argyropoulos, 1998; Li vd, 1999; Pickard vd, 1999</p>
<p>Sentetik aracı moleküller Violurik asit</p> <p>2,2'-azinobis (3- etilbenziazolin-6-sülfonat) (ABTS)</p>	<p><i>Trametes villosa</i>, <i>Pycnoporus cinnabarinus</i>, <i>Botrytis cinerea</i>, <i>Myceliophthora themophila</i> (Lac)</p> <p><i>Trametes versicolor</i>, <i>Coriolopsis gallica</i>, <i>Pleurotus ostreatus</i>,</p>	<p>Li vd, 1999</p> <p>Bourbonnais vd, 1996, Chrestini ve Argyrpoulos, 1998; Pickard vd, 1999.</p>

Substratlar büyüklüklerinden dolayı enzimatik pakete direkt giremediklerinden küçük birer molekül olan aracı moleküller devreye girer. Aracılar, bir çeşit elektron mekiği (electron shuttle) olarak davranan bir moleküldür. Enzim tarafından yükseltildiğinde oldukça kuvvetli yükseltgen (oksidan) bir ara bileşik (ko-aracı-Medox) oluşur. Enzimatik paketten difüz edildiğinde herhangi bir substratı kolaylıkla oksitleyebilmektedir (Şekil 2.11.4.) (Dizge, 2007).



Şekil 2.11.4. Lakkaz aracılı oksidasyon sisteminin katalitik döngüsü

Lakkazların en önemli indisleri 3 bakır merkezinin sahip olduğu standart redoks potansiyelidir. T1 potansiyeli 430-780 mV arasında değişkenlik gösterir. Enzimin T3 potansiyeli nispeten yüksektir (*R.vernicifera*'da 460 mV, *T.versicolor*'da 785 mV). Tüm bakır oksidazlar için T1 potansiyelleri 3 alt grupta sınıflandırılabilir: Düşük, orta ve yüksek potansiyelli lakkazlar. Lakkazlar normal şartlarda, T1 bakır iyonunun redoks potansiyellerini aşmayan iyonizasyon potansiyellerine sahip bileşikler oksidasyona uğratabilirler (Reinhammar, 1972).

Fenolik olmayan bileşikler yıkımda enzimin yeteneğini belirlemede ana özelliğin T1 merkezinin redoks potansiyeli olduğu düşünülmektedir. Veratril alkol, 1,2-dimetoksibenzen gibi fenolik olmayan lignin yapılarının iyonizasyon potansiyelleri yüksektir (>1.4 V). O nedenle bu bileşikler ancak yüksek potansiyelli enzimlerin (lignin peroksidaz gibi) substratları olabilirler. Lakkaz (<800 mV) substratı olarak düşünülecekse, redoks potansiyelini yükseltecek aracı molekülün kullanılması şarttır (Solomon, 1996; Li, 1999).

İdeal olarak bir redoks aracı molekülü yan reaksiyonlar olmadan degradasyon da meydana getirmeden birçok döngüyü gerçekleştirebilir. Yükseltgenecek substratın redoks potansiyeli ile T1 bakır iyonlarının potansiyeli arasındaki fark reaksiyonu zorlamaktadır. Fakat lakkaz redoks potansiyeline yakın potansiyele sahip bileşikler lakkaz substratı değilse termodinamik ve kinetik faktörler hesaba katılmalıdır (Morozova vd, 2007).

Doğru bir redoks aracı molekülü redoks sürecinde çoklu reaksiyon döngülerinin gereksinimlerini karşılayabilen bileşiklerdir. Bunlar geçiş elementlerinin çeşitli kompleksleri (potasyum oktosiyanomolibdat ve oktosiyanotungstat), o-fenantrolin ve 4,4'-dimetilbi-piridinli Fe^{II} kompleksleri bunun yanı sıra ABTS ve 2,2,6,6-terametil-1-piperidiniloksil (TEMPO) gibi lakkaz substratlarıdır. Bu bileşikler yeterince yüksek redoks potansiyeline sahiptir ve kimyasal parçalanma olmaksızın birçok döngüyü gerçekleştirebilir. Yukarda sözü edilen geçiş metal kompleksleri reaksiyon karışımında küçük miktarda bulunarak fenolik olmayan bileşikleri direkt olarak okside edebilirler. Fakat bu bileşikler endüstriyel kullanım açısından bazı dezavantajlara sahiptir. Ayrıca bu komplekslerin yüksek maliyeti de göze çarpmaktadır (Morozova vd, 2007).

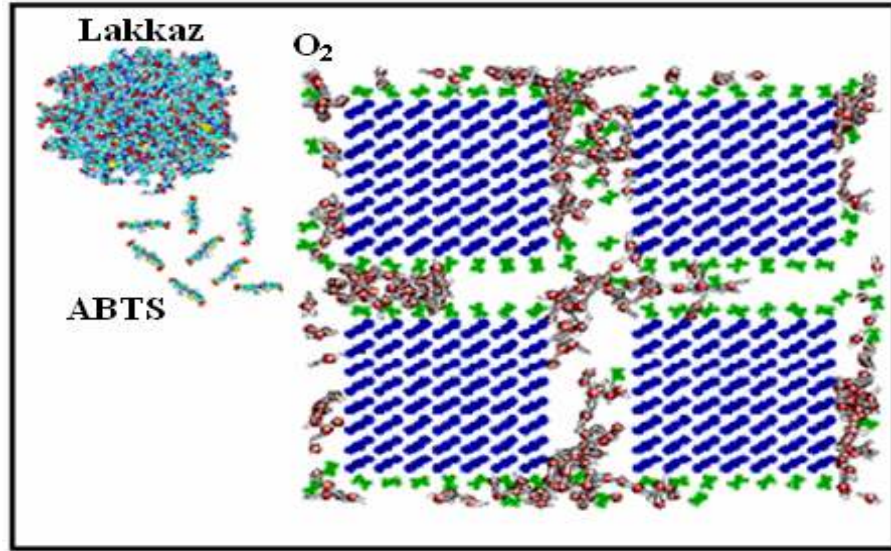
Doğru bir redoks aracı molekülü redoks prosesinde çoklu reaksiyon döngülerinin gereksinimlerini karşılayabilen bileşiklerdir. Bunlar geçiş elementlerinin çeşitli kompleksleri (potasyum oktosiyanomolibdat ve oktosiyanotungstat), o-fenantrolin ve 4,4'-dimetilbi-piridinli Fe^{II} kompleksleri bunun yanı sıra ABTS ve 2,2,6,6-terametil-1-piperidiniloksil (TEMPO) gibi lakkaz substratlarıdır. Bu bileşikler yeterince yüksek redoks potansiyeline sahiptir ve kimyasal parçalanma olmaksızın birçok döngüyü gerçekleştirebilir. Yukarda sözü edilen geçiş metal kompleksleri reaksiyon karışımında küçük miktarda bulunarak fenolik olmayan bileşikleri direkt olarak okside edebilirler. Fakat bu bileşikler endüstriyel kullanım açısından bazı dezavantajlara sahiptir. Ayrıca bu komplekslerin yüksek maliyeti de göze çarpmaktadır (Fabbrini, 2002).

Organik bileşikler arasında en iyi aracı molekül ABTS olarak bilinmektedir. Önceleri ABTS, fenolik olmayan bileşikleri okside edebilen enzimatik oksidasyonla meydana gelen bir katyon radikali olarak bilinmekteydi. Fakat daha sonra yapılan

özellikle elektrokimyasal ve spektroeletrokimyasal çalışmalar prosesin başka bir mekanizma olduğunu göstermiştir. Lakkaz aracılı ABTS oksidasyonunun 2 aşamada meydana geldiği gösterilmiştir. Hızlı gerçekleşen ilk basamak $ABTS^+$ katyon radikalinin oluşumudur. İkinci ve yavaş gerçekleşen basamak ise katyon radikalinin $ABTS^{+2}$ dikatyonuna oksidasyonudur (Morozova vd,2007).

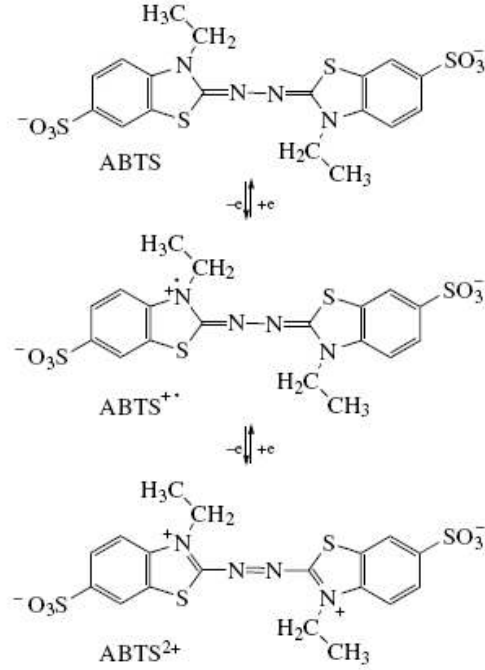
2.11.1. 2,2'-azino-bis(3-etilbenziltiazolin-6-sülfonik asit) Aracılı Sistem

Lakkaz enzimi 2,2'-azino-bis(3-etilbenziltiazolin-6-sülfonik asit)'i (ABTS) serbest radikaller aracılığıyla stabil bir katyon radikaline oksitler. Oluşan katyon radikalini yoğun rengi de enzim aktivitesiyle ilişkilidir. ABTS'nin kağıt hamurundan lignin giderimindeki rolü henüz tam olarak anlayamamakla birlikte ABTS'nin oluşan katyon radikali kraft pulp'un fiber duvarlarındaki lignin rezüdüleri ve fiber duvarlardan içeri giremeyen büyük lakkaz molekülü arasında elektron taşıyıcı olarak davranır (Şekil 9) (Archibald vd, 1997).



Şekil 2.11.1.1 Lakkaz ile beyazlatma işlemi görmemiş kağıt hamurunun çapraz bağlı fiberleri arasındaki etkileşime bir örnek (Paice vd, 1995).

Azinlerin redoks döngüsündeki ara oksidasyon basamağınının ara ürünü katyon radikaller olarak tanımlanır. İkinci elektronun ayrılması ve oksidasyonun devamı sırasında uygun dikatyonlar gözlenebilir. Öyleki $ABTS^{+\bullet}$ ve $ABTS^{2+}$ katyonlarının redoks potansiyelleri sırasıyla 0.680 V ve 1.09 V olarak hesaplanmıştır (Scott vd, 1993).



Şekil 2.11.1.2. Lakkaz varlığı ile ABTS'nin oksidasyonu

ABTS'nin elektrokimyasal oksidasyonu ABTS katyon radikali ($ABTS^{+\bullet}$) ve ABTS dikatyonu ($ABTS^{2+}$) üretir. Siklik voltametre çalışmaları ABTS redoks durumunun stabil ve reversibl olduğunu, Ag/AgCl referans elektroduna karşı ABTS/ $ABTS^{+\bullet}$ çifti için 0.472 V redoks potansiyeline, $ABTS^{+\bullet}$ / $ABTS^{2+}$ çifti için 0.885 V'ye sahip olduğunu göstermektedir. Veratril alkolün varlığı ile $ABTS^{2+}$ dikatyonu elektrooksidasyonu üzerinde katalitik bir rol sergilemektedir. Fakat ABTS katyon radikalinin oluşumu ile ilgili potansiyel aralıkta bu lignin örneğinin elektrooksidasyonu meydana gelmemiştir. $ABTS^{2+}$ 'nin varlığı ile veratril alkolün elektrooksidasyonu, cam-

karbon elektrodunda veratril alkolün elektrooksidasyonun başlangıç potansiyeline kıyasla çok küçük voltajda meydana gelmiştir. $ABTS^{+2}$ dikatyonu ile veratril alkolün homojen oksidasyonu; $170 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ hız sabiti ile 2.denge kinetikleri gösterir (Bourbonnais, 1999).

Cam karbon elektrodunda elektrokimyasal olarak üretilen $ABTS^{+2}$ dikatyonu ile yumuşak kraft ligninini elektrooksidasyonunda benzer katalitik olay gözlemlenmiştir. $ABTS$ 'nin varlığı ile arttırılan lignin fenol gruplarının oksidasyonu ile ilgili lakkaz aktivitesinin $ABTS$ varlığı ile arttığını göstermiştir. Bu bileşikler $ABTS$ olmadan lakkaz ile okside edilemez. $ABTS^{+}$ katyon radikali vanillil alkolle yoğun bir şekilde etkileşime girerken, $ABTS$ katalitik olay süresince elektrot üzerinde tamamen etkileşime giremez. $ABTS^{+}$ sadece lignin fenolik bileşiklerle etkileşime girebilirken $ABTS^{+2}$ fenolik olmayan lignin bileşiklerinin parçalanmasını gerektirir .

Aracılı sistemlerle yapılmış olan ilk çalışma S^{+} Katyon radikalının tek başına veratril alkolü ya da bazı dimerik ve fenolik olmayan lignin model bileşiklerini okside edemeyeceğini gösteren bir çalışmadır. Bu proses sadece hem lakkaz hem de aracı molekülün varlığında gerçekleşebilir. Lakkaz- $ABTS$ sistemi ile fenolik olmayan lignin yapılarının oksidasyonu süresince, enzim mediatörün dikatyon oksidasyonunu katalizler. *T.versicolor* lakkazı yüksek potansiyelli bir lakkazdır. Bu enzimin standart hidrojen elektroduna karşı, T1 bakır merkezinin potansiyeli 785 mV 'dir iken $Ag/AgCl$ elektroduna karşı 585 mV 'dur. $ABTS^{+}/ABTS^{+2}$ çiftinin redoks potansiyeli yaklaşık 300 mV 'dur. Çalışmayı yapan araştırmacılar sistemin redoks potansiyeli ile ilgili olan Nernst eşitliğini $E=E^0+2.3RT/nF\log(c_{ox}/c_{red})$ uygulamışlardır. Çiftin redoks potansiyeli ve redoks bileşiğinin okside edilmiş formu ile indirgenmiş formu arasındaki oran, lakkazın $ABTS$ 'yi $ABTS^{+2}$ 'ye okside edebileceğini göstermiştir böylelikle fenolik olmayan lignin yapılarının oksidasyonu yavaş yavaş gerçekleşir. Veratril alkol gibi fenolik olmayan bileşikler gibi yüksek potansiyelli substratların ilk oksidasyon basamağında bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması aktif bir radikal üretir en sonunda da aldehide okside edilir (Reinhammar, 1972).

Enzimatik $ABTS$ oksidasyonunun son çalışmaları reaksiyonun bu mekanizmasının henüz tam olarak anlaşılmadığını ortaya koymaktadır. Spektrometrik,

elektrokimyasal ve enzimatik metotların birlikte kullanımı ile gerçekleştirilen çalışmalar ile ABTS⁺ katyon radikalinin 214, 394, 414, 646 ve 728 nm gibi elektron spektrasında 5 maksimum absorpsiyona sahip olduğu gösterilmiştir. 728 nm'de katyon radikalinin spektrumu ile ilk ABTS ya da dikatyonunun spektrası üzerinde binişme olmamıştır. ABTS'nin ABTS⁺² dikatyonuna tamamıyla oksidasyonu çözeltiyi renksizleştirir. *M.thermophila*'dan elde edilen fungal lakkaz ilk substrat ile stabil ABTS⁺ katyon radikalinin karışımına ABTS oksidasyonunu katalizler, bu aşamada ABTS⁺² dikatyonu da oluşur. Fakat bu lakkazın T1 bakır merkezinin redoks potansiyeli düşüktür (Ag/AgCl elektroduna karşı 0,3-0,4 V). Bu nedenle enzimatik ABTS oksidasyonu süresince yüksek potansiyelli ABTS⁺/ ABTS⁺² çiftinin oluşumu ile ilgili sorular halen yanıt beklemektedir. Yüksek potansiyelli lakkazların kullanımının daha sonra fenolik olmayan lignin modelleri ile etkileşime giren dikatyon oluşumu ile sonuçlanacağı düşünülmektedir. Bu konuda yapılan diğer araştırmalar da sonuçta oluşan ABTS⁺² katyon radikalinin indigo gibi bazı organik boya parçalamaya aracılık edebileceğini göstermiştir (Solis-Oba, 2005).

Lakkaz/ABTS sistemi ile fenolik olmayan bileşiklerinin parçalanması konusunda birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen prosesin mekanizması tamamen anlaşılabilmiş değildir. Fenolik olmayan bu lignin bileşiklerinin oksidasyonunun enzimatik ABTS oksidasyonu ile oluşturulan ara ürünler sayesinde gerçekleştiği önerilmektedir.

2.11.2. 2 1-hidroksibenzotriazol (HBT) Aracılı Sistem

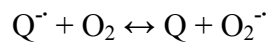
HBT, N-heterosiklik (heterohalkalı) bileşiklerin N-OH grubu taşıyan aracı moleküllerine aittir. Oksijen harcayan HBT enzim tarafından aktif ara ürüne çevrilir. Bu ara ürün bir reaktif radikale (R-NO) oksitlenir. Lakkaz / HBT sistem kağıt hamurunun beyazlatılması için yapılan denemelerde iyi sonuçlar vermiş ve aynı zamanda β -1 bağlı dimerler gibi ligninde β -O-4 bağlı fenolik içermeyen alt birimlerin oksidasyonu için de yeterli olduğu görülmüştür (Dizge, 2007).

Lakkaz aracı molekül olarak bilinen hidroksibenzotriazolün (HBT) redoks

özellikleri de epey çalışılmıştır. Düşük potansiyel tarama hızında HBT'nin siklik voltametik eğrisi 878 mV'de sadece tek oksidasyon piki ile 463 mV'de zayıf olarak addedilebilecek maksimum katot göstermektedir. HBT oksidasyonunun pikleri ile ürün indirgenmesi ile arasındaki büyük farklılık ve katot değerleri ile anot değerleri arasındaki fark HBT elektrooksidasyonu ile gerçekleştirilen radikalın stabil olmadığını göstermektedir: HBT, elektrokimyasal olarak inaktif bileşiklere ayrışır. HBT ile veratril alkolün hücreye eklenmesi veratril alkol oksidasyonunun katalitik akışına sebebiyet verir. HBT'nin elektrokimyasal oksidasyonunun benzotriazol-1-oksil radikali ürettiği önerilmektedir. HBT ile veratril alkol arasındaki reaksiyonun 2. hız sabiti $2.5 \text{ MM}^{-1}\text{s}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Bu yayın da öncelikle aracı molekül olarak ABTS ve HBT örnekleri üzerinden giderek bileşiklerin siklik voltametik testinin olasılığını tartışmıştır (Morozova, 2007).

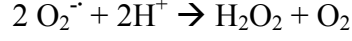
Balakshin ve arkadaşları (2001) ile Gamelas ve arkadaşlarının (2005) yaptıkları çalışmalarda özellikle kuvvetli asidik çözeltilerde stabil olan poliokso metaller tespit edilmiştir. Poliokso metaller $[\text{SiW}_{11}\text{V}_1\text{O}_{40}]^{5-}$ nötral ve zayıf asidik pH değerlerinde stabildir fakat tekrardan oksidasyonu süresince oksijenle hızlı bir şekilde inaktive edilmektedir. Fakat yine de $[\text{SiW}_{11}\text{V}_1\text{O}_{40}]^{5-}$ lakkazla tekrardan aktive edilebilmektedir. Bu nedenle lakkaz aracı molekülü olarak lignin degradasyonunda rol oynayabilir. Poliokso metal grubu lakkaz aracılı molekülardan en etkili olanlardan biri $[\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}(\text{H}_2\text{O})\text{O}_{39}]^{5-}$ dir. Lignoselüloz degradasyonu için kullanımı kimyasal ve enzimatik olmak üzere iki aşamadan oluşur. Bu araçlarla lignin oksidasyonu $110 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de meydana gelir, lakkazla tekrardan oksidasyonu ise $45 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de gerçekleşir. Bu örneklerdeki lignin degradasyon derecesi %50'ye ulaşır (Balakshin, 2001; Gamelas, 2005).

P. eryngii'den elde edilen lakkazla guaikol ve siringil lignin yapılarına model olabilecek 2-metoksi-1,4-benzohidroquinon ve 2,6-dimetoksi-1,4-benzohidroquinonun katalitik oksidasyonu bir semiquinonun oluşumuna aracılık eder. Dioksijen ile semiquinonların otooksidasyonu süperoksit radikali üretir:

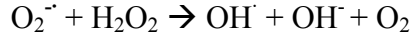


Süperoksit anyon radikali bir elektron alıcısı ya da vericisi olabilir. Ayrıca hidrojen

peroksit üretir.



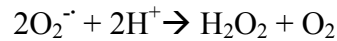
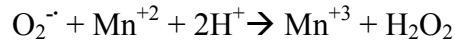
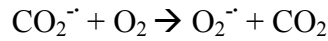
Demir iyonlarının varlığında Haber-Weiss reaksiyonu;



fenolik olmayan lignin yapıları ile reaksiyona girebilen yüksek reaktif OH radikalini üretir. Mn^{+2} ile süperoksit anyon radikali hidrojen perokside indirgenir:



Bu proste şelatlanmış Mn^{+3} , fenolik olmayan lignin yapılarını parçalayan enzimatik olmayan olaylar dizisine katılır. Şelatlayıcı ajanlar olarak dikarboksilik asitlerle (oksalik, malonik veya tartarik asit) iki değerlikli mangan iyonları; dioksijeni Mn^{+3} 'e okside edebilen lakkaz substratlarıdır. Üç değerlikli mangan iyonları aşağıdaki reaksiyon serisini izlemek suretiyle hidrojen peroksit oluşturmak için daha sonra dikarboksilik asitle reaksiyona girebilir (Schlosser, 2002; Shleev, 2004).

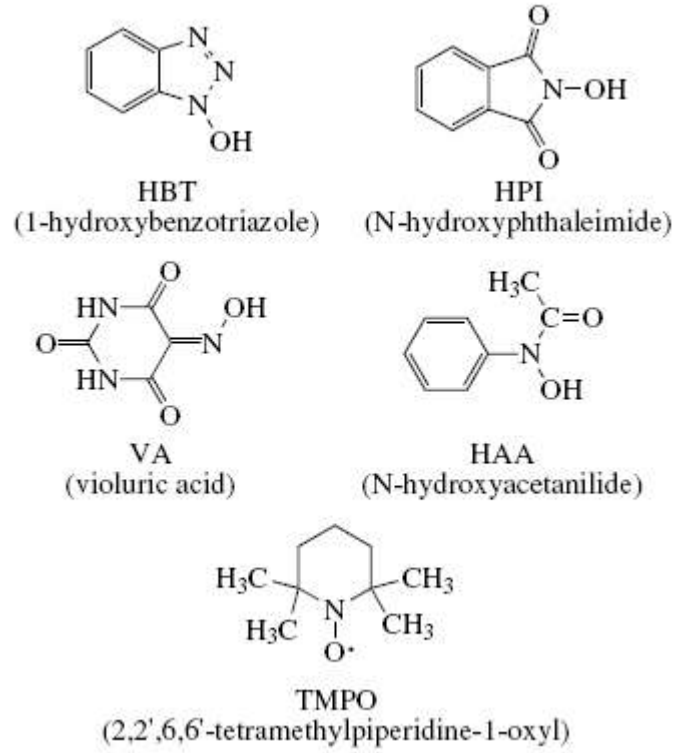


Sonuçta oluşan hidrojen peroksit yukarda bahsedilen hidroksil radikalini üretebilir. Bununla birlikte hidrojen peroksit, basidiyomisetlerin lignin parçalayan diğer önemli enzimlerinin de (MnP ve LiP) substratıdır. Böylelikle lakkaz, peroksidazla katalizlenen reaksiyonlara da öncülük edebilir. Standart hidrojen elektroduna karşı $\text{Mn}^{+2}/\text{Mn}^{+3}$ çiftinin redoks potansiyeli 1.51 V'dir. Bu nedenle lakkaz ile Mn^{+2} oksidasyonu termodinamik olarak mümkün değildir. Fakat doğal örneklerde de bol

bulunabilen dikarboksilik anyon gibi şelatlayıcı doğal ajanların varlığı mangan iyonları ile dikarboksilik asitlerin redoks potansiyelini düşürür bunu da lakkazla dioksijen tarafından Mn^{+2} 'nin enzimatik oksidasyonunu takip eder. Dikarboksilik asitlerle ilişkili oluşan Mn^{+3} iyonları yüksek redoks potansiyeline sahiptir ve fenolik olmayan lignin yapılarını (veratril alkolün veratril aldehide oksidasyonu vb) direk olarak okside edebilir. Böylelikle Mn iyonları lakkaz redoks aracılığı olarak çalışmaktadır (Morozova, 2007).

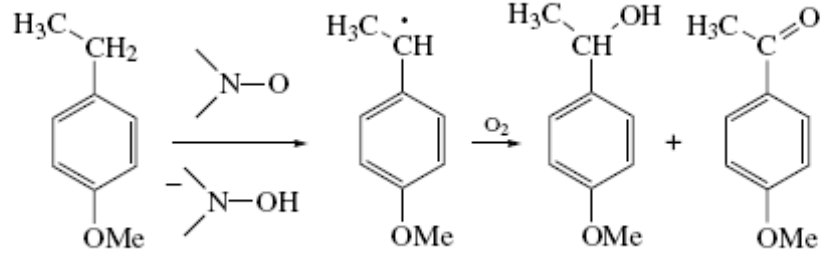
Redoks aracı molekülleri olarak tanımlanan bileşiklerin tamamı gerçekte aracı molekül değildir ya da çok önemsenecek kadar etkili değildir. Bu şekilde düşünülmesi enzimatik reaksiyon esnasında oluşturulan ara ürünlerin düşük stabilitesi ve sonuç olarak fenolik olmayan bileşiklerin katalitik oksidasyonu süresince az sayıda redoks döngüsü gerçekleştirmesinden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle bu konuda lakkazın katalitik işlevi ile alakalı olarak “enhansır” terimi türetilmiştir. Birçok döngü boyunca korunan ve enzimatik oksidasyon ürünlerinin yüksek potansiyele sahip olduğu doğru redoks aracılığı hariç, “enhansır” terimi; oksidasyonu aktif bir radikal oluşumuna neden olan bileşikleri betimlemektedir (Bourbonnais, 1990; Fabbrini, 2002).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar yeni lakkaz enhansırlarına ve onların işleyiş mekanizmalarına yoğunlaşmıştır. Bu yolla elde edilen lakkazlar toksik ve pahalı olmamalı ve etkin olmalıdır. Bunlardan birçoğu doğru redoks aracı molekülü değildir çünkü onlar bir ya da iki döngü sonrası sekonder kimyasal transformasyonlarla reaksiyondan elemine edilmektedir. En yaygın kullanılan enhansırlar, >N-OH veya >N-O yapısal grupları içeren bileşiklerdir. Bunlar da HBT, TMPO, N-hidroksifitalimid (HPI), violurik asit (VA) ve N-hidroksiasetanilid (HAA)'dır (Şekil 2.11.2.1).



Şekil 2.11.2.1. >N-OH tipinde bazı organik lakkaz araçlarının yapısal formülleri
(Morozova 2007)

T. villosa lakkazı ve >N-OH tipi 4 enhansır (HBT, HPI; VA ve HAA) ile yapılan deneyler HBT'nin en etkili lakkaz enhansırı olduğunu göstermiştir. Lakkaz, fenolik bileşiklerle fenoksi radikallere okside ettiği için >N-OH bileşiklerinin enzimatik oksidasyonu; bir elektronu uzaklaştırılması ve bunu takiben bir proton açığa çıkmasından dolayı yüksek derecede aktif nitroksil radikalinin (>N-O[•]) oluşumuna aracılık etmektedir. ABTS kation radikali gibi nitroksil radikali bir benzil radikal oluşturmak için yüksek potansiyelli substrattan bir hidrojen atomu uzaklaştırabilir (Şekil 2.11.2.2.). Bu basamak reaksiyon hızını sınırlar. Daha sonra benzil radikali oksidasyon ürünleri oluşturmak için dioksijenle okside edilir.



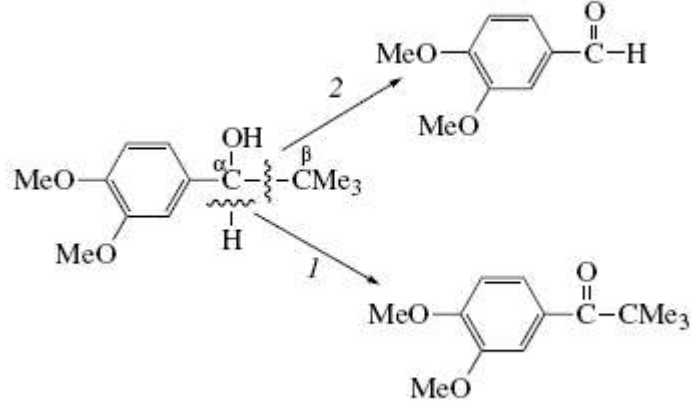
Şekil 2.11.2.2. Nitroksil radikali ile fenolik olmayan lignin yapıları arasındaki etkileşim mekanizması

Xu ve arkadaşlarının (2002) yaptıkları bir çalışmada; 7 fungal lakkazla lignin model bileşiklerinin oksidasyonunda $>N-OH$ tipindeki HBT, VA ve HAA gibi 3 aracı (pH 4'te standart hidrojen elektroduna karşı sırası ile redoks potansiyelleri 1.1, 0.91 ve 0.83 V) değerlendirilmiştir. pH 4-10 aralığında HBT'nin redoks potansiyeli hemen hemen sabit kalırken VA'nınki 100 mV'a kadar HAA'nınki 200 mV'ye kadar azalmıştır. Çeşitli $>N-OH$ bileşiklerinin katalitik oksidasyonunun etkinliği $>N-OH$ bileşiğinin redoks potansiyeli ile lakkazın T1 bakırının potansiyeli arasındaki farklılığa bağlı olarak $\log(k_{cat}/K_m)$ olarak ifade edilmektedir (Xu, 2002).

HBT ve VA'nın varlığı ile fenolik olmayan lignin modellerinin oksidasyonu ile ilgili çeşitli fungal lakkazların kıyaslamaları Li ve arkadaşları (1999) tarafından yapılmıştır. 1-(3,4-dimetoksifenil)-2-2(2-metoksifenoksi)propan-1,3-diol dimeri fenolik olmayan, Fenol Blue ise fenolik lignin model bileşiği olarak kullanılmıştır. Hem HBT hem de VA ile lakkaz aracıyla dimer oksidasyon hızı; *T. villosa* > *Pycnoporus cinnabarinus* > *Botrytis cinerea* > *M. thermophila* şeklinde olmuştur. Reaksiyon süresince HBT ve VA inaktive edilmiştir çünkü radikallerin bir kısmı proteinin amino asitleri ile etkileşime girmiştir ve bu etkileşimin oranı VA kadar yüksek olmuştur. Reaksiyon karışımındaki Fenol Blue dimerinin varlığı, enzimatik reaksiyonda enhansır aktivasyonunu azaltmıştır (Li, 1999).

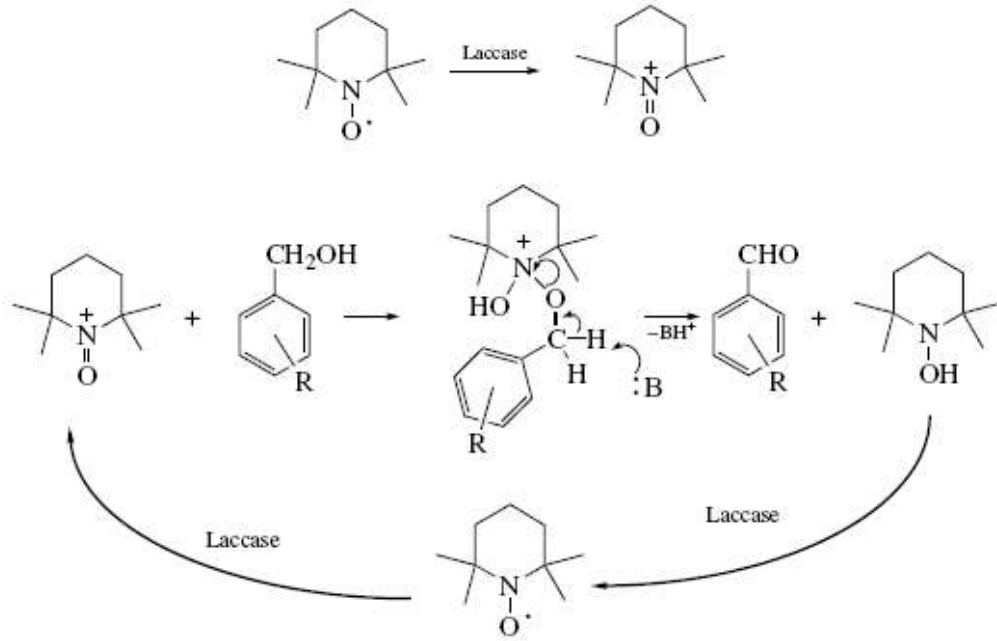
Fabbrini vd., (2002) tarafından *T. villosa* lakkazı ve çeşitli araçlarla bir lignin model bileşiği olan 4-metoksibenzil alkolün oksidasyon mekanizması çalışılmıştır.

Çeşitli lakkaz araçları ile bu modelin oksidasyonunun radikal ve elektron transportu gibi 2 mekanizma ile gerçekleştiği gösterilmiştir (Şekil 2.11.2.3) (Fabbrini, 2002).



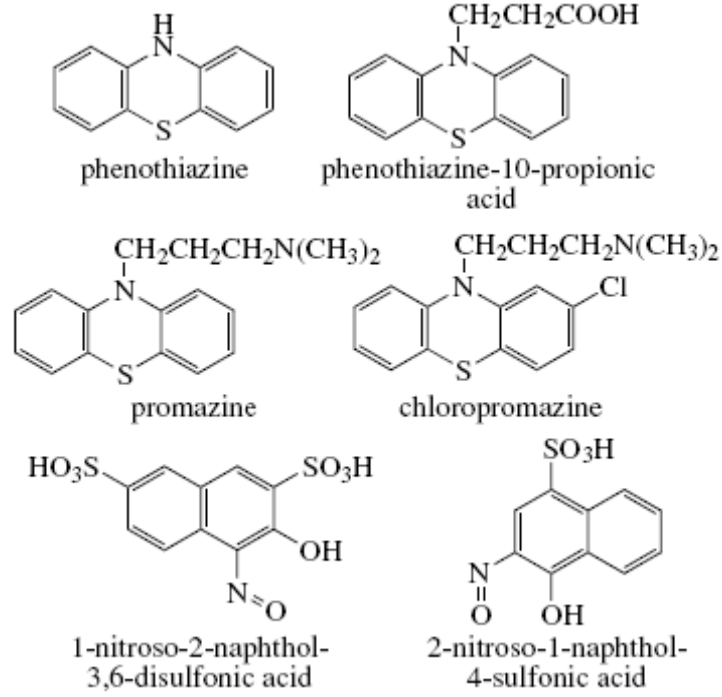
Şekil 2.11.2.3. Radikal (1) ve elektron taşıma mekanizmasına (2) göre lakkaz araçları tarafından fenolik olmayan lignin model bileşiklerinin oksidasyonu (Fabbrini vd, 2002).

>N-OH tipindeki bileşikler (HBT ve HPI) fenolik olmayan yapılardan ilgili ketonları üretmek için ilk mekanizmayı takip etmektedir. Elektron taşıma mekanizmasında fenolik olmayanların oksidasyonu katyon radikallerinin oluşumuna aracılık eder. Sonra da son ürün olarak bir aldehit oluşturmak için C_α-C_β bağlarının ayrılması gerçekleşir. Bu mekanizma ile fenolik olmayan lignin yapılarını okside eden araçlar TMPO, ABTS ve ilgili transisyon metallere dir. TMPO; ABTS, HBT, VA, HPI'dan daha etkili olmuştur. TMPO aracı molekülü; lakkaz olmadan bile bazı yüksek potansiyelli substratların ilk modifikasyonlarını gerçekleştirebilen nispeten stabil olan N-oksil radikal formunda solusyonda bulunmaktadır. Lakkaz; substratla reaksiyona giren okso-amonyum iyonu üretmek için TMPO'yu okside etmektedir. Proton uzaklaştırılması ile ürün oksidasyona uğrar ve TMPO indirgenir. İndirgenmiş TMPO da lakkaz ile okside forma daha sonra da oksoamonyum iyonuna dönüştürülür (Şekil 2.11.2.4.).



Şekil 2.11.2.4. Lakkaz ve TMPO ile substrat oksidasyonu için önerilen mekanizma (Fabbrini vd, 2002)

Nitroso bileşikler ve fenotiyazin türevleri (Şekil 2.10.2.5) gibi diğer organik bileşikleri de lakkaz enhansırları olarak kullanılmaktadır.



Şekil 2.11.2.5. Lakkaz araçları olarak kullanılan nitroso bileşikleri ve fenotiyazin türevleri (Morozova, 2007)

Fenotiyazin türevlerinden biri olan fenotiyazin-10-propiyonik asit; indigo boyaların dekolorizasyonu için kullanılan ve Novozime (Danimarka) tarafından üretilen ticari bir formülasyon olan DeniLite®'de lakkaz aracı olarak bulunmaktadır (Morozova, 2007).

Yüksek potansiyelli *T.versicolor* lakkazının enhansırları fenoller ve aromatik aminlerdir. Fenol, anilin, p-hidroksibenzil alkol gibi böyle araçlar, ABTS veya HBT kadar etkili olacak şekilde bu enzimle birlikte işbirliği içindedir. Oksidasyon etkinliği bir aracının redoks potansiyeli ile lineer olarak artar. Metiyonin, sistein ve indirgenmiş glutatyon da *T.versicolor* lakkazının etkili enhansırlarıdır (Johannes, 2000).

Benzoik ve 3-hidroksiantranilik asit gibi doğal metabolitler aracı olabilir. Beyaz çürükçül fungusların ürettiği 3-hidroksiantranilik asit, *P.cinnabarinus* lakkazının fenolik olmayan lignin yapılarının okside edebilmesi için etkili bir araçtır. İndikatör fenol kırmızısı ve onun türevlerinin (özellikle diklorofenol kırmızısı) *P.pinsitus* lakkazının

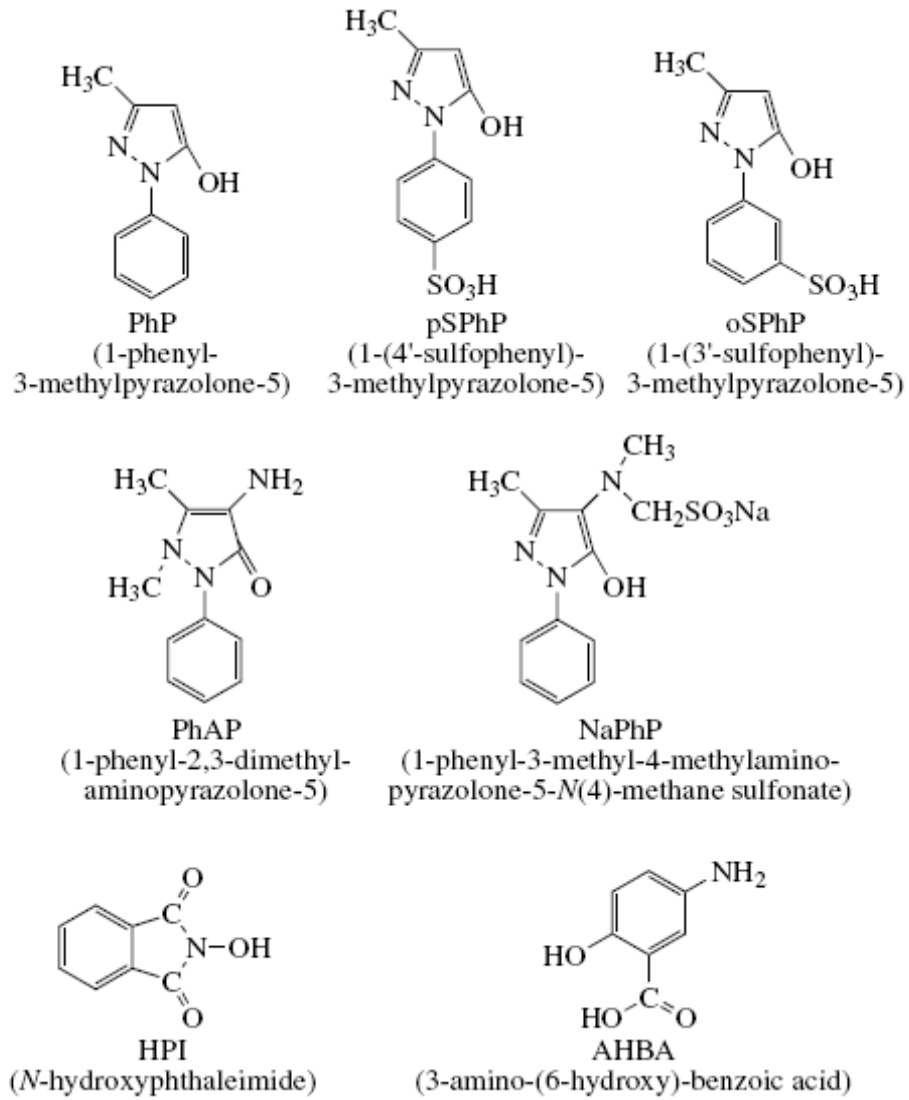
aracıları olduğu bilinmektedir. Fenolik olmayan 4-metoksibenzil alkol bileşiğinin oksidasyonunda bu araçların etkinliği doğal lakkaz araçları olan 3-hidroksiantranilik asidin gerçekleştirdiği etkinlikten 10 kat daha yüksektir (Jong de, 1994; d'Acunzo, 2003).

Doğal lignoselüloz substratları üzerinde büyüyen lakkazlarda tanımlanmamış bileşikler tespit edilmiştir. Homojen konsantre solüsyonlarının rengi sarı-kahverengi olduğu için bu lakkazlar “sarı” olarak adlandırılmıştır. Böyle bir lakkaz ilk kez, buğday kepeği üzerinde *Panus tigrinus* fungusunun katı faz büyüme üzerine yapılan deneylerde multipl formda tespit edilmiştir. Sıvı ortamda bu fungusun batık kültürü ile, bilinen “mavi” lakkaz elde edilmektedir. Her iki enzim de benzer molekül ağırlığına sahiptir, izoelektrik noktaları yakındır ve fenolik substrat oksidasyonunun reaksiyon kinetik göstergeleri de benzerdir. Fakat sarı lakkazların solüsyonları mavi lakkazlarda olduğu gibi 600 nm’de absorpsiyon bandı vermez. Bu lakkazlar herhangi bir redoks enhansırı olmadan fenolik olmayan lignin yapılarını (veratril alkol veya dimerik bileşikler) okside edebilir. *Pleurotus ostreatus*’un katı faz büyümesi; sarı lakkazın antraquinon üretmek için bir aracı olmadan antraseni okside edebileceğini göstermiştir. Katı faz büyüme ile doğal lakkaz araçlarının enzimatik oksidasyon gerçekleştiği önerilmektedir. Böylece protein globülünün aminoasitleri ile etkileşime giren radikallere radikal oluşumuna yol açtığı bunun da enzimi modifiye ettiği düşünülmektedir. Fakat fenolik olmayan lignin yapılarının oksidasyonunda düşük molekül ağırlıklı modifiye ediciler ve onların etkinlikleri ile ilgili fazla bilgi mevcut değildir (Morozova, 2007).

Aday lakkaz araçlarının seçim metodu 4 aşamadan oluşur: (1) yapısal formüllerinin (heterosiklik atonlar, OH grupları ve NH₂ gruplarının varlığı) düşünüldüğü bileşiklerin seçimi (2) lignin model bileşikleri ile ve bu bileşikler olmadan seçilen bileşiklerin siklik voltametik eğrilerinin analizi (3) lakkazla katalizlenen homojen reaksiyonlarda bileşiklerin katalitik indislerinin belirlenmesi (4) aracı/lakkaz sistemi ile lignin model oksidasyonunun ürün analizlerini içeren deneyler. Bu metot yeni sınıf bir lakkaz aracısını ortaya koymuştur: 1-fenil-3-metil-pirazolon-5. Bu bileşikler, metil ve fenil grupları gibi iki elektron verici substitiyelerini içeren heterosiklik bileşiklerdir. Bunlar solusyonda 2 tautomerik formda meydana gelirler. Bu sınıfın 2 bileşiği (NaPhP ve mSPhP) spektral ve elektrokimyasal metotlarla çalışılmıştır.

Yüksek potansiyelli ara ürünler oluşturan bu bileşiklerin elektrokimyasal ve enzimatik oksidasyonu, model lignin bileşiği olan veratril alkolü oksidasyona uğratabilir (Morozova, 2007).

Heterosiklik, >N-OH bileşikleri ve benzoik asit türevleri gibi yaklaşık 20 kadar farklı yapıda bileşik Shumakovich vd., (2006) tarafından çalışılmıştır. Bunlardan 1-fenil-3-metil-pirazolon-5 (PhP), bunun sülfö (mSPhP ve pSPhP) ve amino (PhAP ve NaPhP) türevleri, HPI ve 3-amino-(6-hidroksi)-benzoik asit (AHBA)'nın lakkaz substratı olduğu kanıtlanmıştır. Bu yapısal formüller Şekil 2.10.6 da gösterilmiştir.



Şekil 2.11.2.6. Potansiyel lakkaz araçları olduğu düşünülen organik yapıların yapısal formülleri (Morozova, 2007)

Lakkazla 1-fenil-3-metil-pirazolonun sülfö ve amino türevlerinin oksidasyonunun kinetik indisi ABTS oksidasyonunun indisi ile karşılaştırılabilir fakat HPI'nın enzimatik oksidasyon hızı daha düşüktür. Elektrokimyasal çalışmalar 1-fenil-3-metil-pirazolon türevlerinin oksidasyonunun veratril alkole okside olabilen yüksek potansiyelli ara ürünler verdiğini göstermektedir (Morozova, 2007).

2.12. Biyoteknolojide Lakkaz Aracılı Sistemleri

Biyoteknolojide lakkazlar ile LAS'nin birlikte kullanımı konusunda çok sayıda yayın ve patent mevcuttur. Bir Danimarka şirketi olan Novozymes, lakkaz ve araçlardan oluşan ticari formülasyonlar geliştirmiştir: kumaş beyazlatma için DeniLite®, mantar tapa modifikasyonu için Suberash®, kağıt pulp delignifikasyonu için Novozymes® 51003 (Morozova, 2007).

Odundan ligninin uzaklaştırılması da birçok çalışmanın konusu olmuştur. Bunlardan ilki yılda çok büyük miktarda lignoselüloz maddenin üretildiği odun-pulp ve kağıt endüstrisi için proses ile ilgilidir. Kağıt üretim teknolojisinde selüloz hamurunun klorla beyazlatılma tekniğinin kısmen değiştirilmesini sağlayan, buna alternatif olabilecek enzimler kullanılmaktadır. Glikozil hidrolizin yanı sıra lignoselüloz delignifikasyonu için redoks enzimlerin kullanılmasında girişimde bulunulmuştur. LMSs ile kağıt hamurunun delignifikasyonu günümüzde pilot ölçekli tesislerde de gerçekleştirilmektedir. Bu yaklaşımın ticari boyutunun ileride daha da artacağı düşünülmektedir. Böyle tesisler özellikle Almanya, Kanada, Finlandiya, Amerika gibi ülkelerde geliştirilmeye çalışılmaktadır (Call, 1997)

LAS ile lignoselüloz maddenin ağartılması ve delignifikasyon şartlarını optimize etmek için yıllardır birçok çalışma yapılmaktadır. Call ve arkadaşlarının (1997) yaptıkları bir çalışmada *T.versicolor* lakkazı biyokatalist olarak, >N-OH grubu bileşikler de aracı olarak kullanılmıştır. En iyi sonuçlar HBT aracı ile elde edilmiştir. Prosesin optimum teknolojik parametreleri; sıcaklık, 40-65 °C, hava basıncı 10-14 bar, kalış süresi 1-4 saat, aracı konsantrasyonu pulpun % ağırlığının 0.1-2'si kadar, enzim miktarı 20 U/g pulp olarak bulunmuştur (Call, 1997)

Bir Amerikan şirket olan Codexis Inc. selülozu etkili bir şekilde ağartan ve lakkazla kombine olan ikili aracı sistemlerin patentini almıştır. Bu formülasyon *Aspergillus* lakkazı, prooksidant ve prodegradant içermektedir. Prodegradant olarak üre, tiyoüre, sülfaminik asit, sülfamid, guanidin, metilsülfonik asit ve onların karışımı kullanılmıştır. Bu maddeler tek başlarına lakkaz enhansırları değildir. Askorbik, salisilik ve nikotinik asit, bunların tuzları; lignin sülfonatları ve bu maddelerin karışımları prooksidant olarak patentlenmiştir. Bu maddeler tek başlarına hem bazı boyaların (Chicago blue gibi) oksidasyonu hem de kağıt hamurunun delignifikasyonunda etkili birer lakkaz enhansırlarıdır. Fakat prooksidant ve prodegradantların aynı anda kullanımı kağıt hamuru delignifikasyon prosesini daha etkin kılmaktadır (Morozova, 2007)

Transisyon metallerinin küçük miktarda koordinasyon bileşikleri de pulp delignifikasyonu için lakkaz-aracı sistemlerinde redoks aracı molekülü olarak kullanılabilir. Bu araçlarla lignin oksidasyonu >N-OH bileşikleri ile elektron mekanizmasını takip etmektedir. Bu araçlar lakkaz substratlarıdır ve bunlar redoks döngüsünde tekrardan geri kazanılabilir bu nedenle delignifikasyon prosesi, bu maddelerin yüksek konsantrasyonda olmasını istemez. Yumuşak odun hamurunun ağartılmasında en iyi sonuçlar potasyum oktosiyanomolibdat ile sağlanmıştır. Lakkaz-aracı kompleksi ile yapılan uygulamadan sonra kontrol örneğinde %19,2'ye kıyasla %36,9'a kadar ulaşmıştır. Organik enhansırlarda bu araçların önemli bir avantajı; lignin oksidasyon döngüsünde tekrar tekrar bunların kullanılabilmesidir (Morozova, 2007).

Lakkaz ve LMS'nin bir diğer uygulaması lignin, lignoselüloz veya lignoselülozik maddelere yeni özellikler kazandırmak üzere modifiye edilmeleridir. Selülozun 6-hidroksimetilen gruplarının lakkazla birlikte karbonil ve karboksil gruplarına seçici oksidasyonu patentli bir çalışmadır. Üzerinde aktif gruplar taşıyan son madde daha sonra amino veya diğer grupları taşıyabilen bileşiklere dönüştürülebilir.

Lignoselülozik maddenin yüzey yükü artırılabilir ve kağıt ya da selüloz lifinin yüzeyi lakkaz ve LMS kullanılarak hidrofobik hale getirilebilir.

LAS'nin kullanımı ile çevre dostu prosesler pulpun klorla ağartma teknolojisinin yerini alabilir. Pulp delignifikasyonu için LAS'nin ticari kullanımı yönünde büyük umut beslenmesine rağmen aracı ve enzimin yüksek maliyeti şimdilik bunu engellemektedir (Morozova 2007).

Dokuma sanayisinde ticari olarak kullanılan ilk lakkaz formülasyonu DeniLite®'dir. Özellikle kot sektöründe indigo boyaların degradasyonunda kullanılmaktadır. Bu preparasyon, genetiği modifiye edilmiş bir *Aspergillus* türünün sıvı kültürde büyütülmesinden elde edilen lakkazdan ibarettir. Enzimin yanı sıra fenotiyazin-propiyonat gibi bir redoks enhansı ve iyonik olmayan sürfektanlar içermektedir (Morozova 2007).

Çeşitli araçlarla desteklenen ham lakkaz preparasyonları özellikle Rusya'da keten beyazlatılmasında oldukça umut vericidir. *P.tigrinus* lakkazı ve aracı uygulamasına dayanan keten lifini beyazlatma metotları geliştirilmiştir. Lifin delignifikasyon başarısı %70-75'e ulaşmıştır (Morozova 2007).

Lakkaz ve araçlarla (ABTS, HBT, 1-naftaso-2-naftol-3,6-disulfonik asit) kül ve toprakta dioksinleri biyolojik olarak parçalama metodu geliştirilmiştir (Morozova 2007).

Birçok insektisit ve sinir gazında bulunan fosforlu organik bileşikler oldukça toksiktir. Enzimatik olmayan yolla parçalanmaları ise çok yavaştır. ABTS'nin varlığı ile *P.ostreatus* lakkazı; sinir gazları VX ve Rus VX ile diizopropilamiton insektisidinin hem hızlı hem de tamamen oksidatif degradasyonunu gerçekleştirebilmiştir. Lakkaz aracılı sistemler ile poliüretan ve poliolefin degradasyon metotları da patentli çalışmalardır (Morozova 2007).

Lakkaz ve LAS'nin başka uygulamaları da keratin liflerinin boyanması, dış minesinin beyazlatılması, biyolojik olarak polimerlerin üretimi için bir bağlayıcı olarak, enzimatik sentez ile sentetik ve polimerik maddelerin modifikasyonudur (Morozova 2007).

Sonuç olarak lakkaz enhansırları ya da redoks aracı molekülü olarak kullanılacak yeni bileşiklerden söz edilmektedir. 1990 yılında lakkaz araçlarının

keşfinden sonra ideal araçları etkileyen gereksinimler araştırılmaktadır. Lakkaz redoks aracı molekülleri olarak patenti alınan bileşiklerin sayıları da giderek artmaktadır. Ancak bunlardan sadece birkaçı ticari açıdan değer taşımaktadır (Morozova 2007).

2.13. Lakkaz Enzimlerinin ve Lakkaz Aracılı Sistemlerin Tekstilde Kullanım Alanları

Tekstil sanayi, toplam boyarmadde pazarının üçte ikisini oluşturmakta ve tekstil yaş işlemleri için büyük hacimlerde su ve kimyasal tüketmektedir. Kullanılan kimyasal maddeler, inorganik bileşenlerden polimerlere ve organik ürünlere kadar değişen çeşitli kimyasal yapılardadır. Kimyasal yapıları nedeniyle boyarmaddeler, ışık, su ve farklı kimyasallar etkisinde solmaya karşı dirençlidir ve bunların çoğu sentetik esaslı olduğundan renksizleştirilmeleri zordur. Ancak çevresel nedenlerle boyarmaddelerin endüstriyel atıklardan uzaklaştırılmaları gerekmektedir. Bu yüzden lakkaz esaslı yöntemlerin geliştirilmesi, lakkazların tekstil sanayinde sürekli kullanılan sentetik boyarmaddeler de dahil olmak üzere çeşitli kimyasal yapıdaki boyarmaddeleri parçalayabilme potansiyelleri nedeniyle uygun bir çözüm gibi görünmektedir.

Lakkazlar, tekstil sanayinde tekstil atık sularının renksizleştirilmesinin yanı sıra tekstillerin ağartılmasında, kaynatılmasında, denim yıkamada ve hatta boyarmaddelerin sentezinde de kullanılmaktadır (Couto vd., 2006).

2.13.1 Lakkazların Tekstil Ürünlerinin Ağartılmasında Kullanımı

Novozyme (Novo Nordisk, Danimarka) 1996'da kot ağartmada lakkaz enziminin endüstriyel uygulamasını başlatmıştır. DeniLite, ilk endüstriyel lakkaz ve araçlar yardımıyla hareket eden ilk ağartıcı enzimdir. Ayrıca 2001'de Zytex şirketi (Zytex Pvt. Ltd., Hindistan), ticari adı Zylite olan ve indigoyu çok spesifik bir şekilde parçalayabilen lakkaz aracılı sisteme dayanan bir formülasyon geliştirmiştir (Couto vd., 2006).

Lakkazlar, selülozik liflerde bulunan yağlar, mumlar, pektinler, proteinler ve pigmentler gibi doğal renklendirici maddelerin uzaklaştırılması ve bu sayede boyama, baskı ve bitim gibi işlemlere hazırlanması amacıyla kullanılmaktadır. Tekstillerin ağartılması işlemi klasik olarak asidik ve bazik koşullarda, geniş sıcaklık aralığında ve farklı yükseltgen maddelerle yapılmaktadır. Yüksek beyazlık dereceleri istendiğinde ard arda oksidasyon işlemleri uygulanmaktadır. Ağartma maddeleri, liflere aşırı miktarlarda verilmekte, bu da ileriki işlemlerin düzgün yapılabilmesini olumsuz yönde etkileyen zararlı atıklara neden olmaktadır. Bu nedenle tekrarlı yıkamalar gerekmektedir. Tzanov ve arkadaşları, 2003'te yaptıkları çalışmada kısa süreli lakkaz ön işleminin pamuklu kumaşların beyazlığını geliştirdiğini ve sonraki ağartma işleminde kullanılan hidrojen peroksitin konsantrasyonunu önemli derecede azalttığını belirtmişlerdir (Tzanov vd., 2003., Basto vd., 2007).

Basto ve arkadaşları, pamuğun klasik kimyasal ağartma sürecine bir alternatif olarak ultrasonun lakkazın ağartma yeteneği üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Çalışmada pamuk, 20 kHz ve 7 W gücündeki ultrasonik ortamda 30 dk'lık işlem görmüştür. Pamuklu kumaşların lakkaz ile ön işleminde ultrason uygulamasıyla peroksit ağartmasındaki beyazlık etkisi artmıştır. Artan ağartma etkisi, enzimin sıvı fazdan lif yüzeyine ve tekstil yapısının içerisine difüzyonunun artmasına bağlanmıştır. Çalışmada biyokatalizörler ve ultrasonun ağartma açısından birlikte hareket ettiği, ancak ultrason işleminin gücünün artırılmasıyla lakkazın etkisini yitirdiği gözlenmiştir. Diğer taraftan 20 kHz ve 7 W gücünde işlem uygulandığında enzim etkisini önemli sayılabilecek seviyede kaybetmemektedir. Yine de enzim daha sonra %10 (ağırlık/hacimce) polivinilalkol kullanılarak stabilize edilmiştir. PVA, stabilizasyon etkisinin yanı sıra tekstil substratının oksidasyonunu engelleyici etki de göstermiştir. Bu yüzden enzimin stabilizasyonunun 30 dakikaya kadar olan nispeten kısa işlem süreleri için gereksiz olduğu ifade edilmiştir (Basto vd., 2007).

2.13.2. Lakkazların Kot Yıkamada Kullanımı

Lakkazlar, kot yıkamada taşlama işleminde ponza taşlarının yerine kullanılabilir. Kot yıkamada taşlama işleminin esası, ponza taşı ile istenilen

aşındırmanın sağlanması için ürünlerin yıkanmasıdır. Yıkamanın ardından ürünler, sodyum hipoklorit ile kısmen ağartılmakta, nötralize edilmekte ve tekrar yıkanmaktadır. Bu işlemlerin tümü büyük çevresel kirliliğe yol açtığından enzim uygulamaları da yapılmaktadır. Örneğin selülazlar, lif yüzeyini aşındırıcı etkiye sahip olduklarından tas yıkama görüntüsünü elde etmek için ponza taslarının yerini kısmen alabilmektedir. Bununla birlikte lakkazlar da indigo boyalı denim giysileri daha acık tonlara ağartabilme etkisine sahiptir (Pazarlıoğlu vd., 2005).

Lakkazlar, kot üzerindeki indigoyu renksizleştirme açısından tek baslarına yeterli olamadıkları için indigodan moleküler oksijene elektron transferi sağlayan aracılı sistemler de geliştirilmiştir. Lakkaz ve aracılı sistem, atkı ipliklerini etkilemeden yalnızca indigoyu parçaladığı için işlem sonucu gri nüanslı kot elde edilmektedir. Kotun klasik hipoklorit ağartması ucuz, hızlı ve etkilidir. Ancak çevreye ve kota zarar vermektedir. Oysaki lakkaz ve aracılı sistem ile ağartma, ılıman koşullar altında yapılabilen ve çok daha kolay kontrol edilebilmektedir. Ayrıca bu sistemde ağartma etkisi fenol bileşiklerine özgü olduğundan elastikiyeti etkilememekte ve hipoklorit ağartması gibi elastomer ipliğine de zarar vermemektedir. Lakkaz aracılı sistemler, kot yıkama uygulamalarında geri boyamayı azaltmakta, aşınma seviyelerini geliştirmekte ve indigoyu ağartmaktadır (Yoon, 2005; Auterinen, 2006).

Pazarlıoğlu ve arkadaşları, lakkazların kot yıkamada kullanımına ilişkin yaptıkları çalışmada, aktifleştirilmemiş ve fenol ile aktifleştirilmiş koşullarda yetiştirilen beyaz çürükçül fungus olan *Trametes versicolor*'u, lakkaz (TvLac), lignin peroksidaz (LiP), mangan peroksidaz (MnP), arilalkol oksidaz (AAO) ve polifenol oksidaz (PPO) üretimi amacıyla test etmişlerdir. PPO, LiP ve AAO kültür süzüntülerinde gözlenmez iken, TvLac ve MnP aktiviteleri sırasıyla inkübasyonun dördüncü ve beşinci gününde tespit edilmiştir. Fenol ile aktifleştirilmiş kültürlerde maksimum enzim aktivitesi, kontrol kültürlerine göre yaklaşık 20 kat gelişmiştir. Optimum fenol konsantrasyonunda lakkaz üretimi; enzim aktivitesi, protein içeriği, glikoz tüketimi ve biyokütle görüntülenerek incelenmiş ve lakkaz üretiminin *Trametes versicolor*'un yetiştirilme koşulları ile ilişkili olmadığı belirlenmiştir. Enzimin optimum pH'ı 4,5 olarak bulunmuştur. TvLac'ın kinetik sabitleri, K_m değeri 0,61 mM ve V_{max} 8264 U/L ($R^2=0,99$) olarak belirlenmiştir. *T.versicolor*'dan izole edilen lakkaz, aracısız

olarak kot yıkama için kullanılmıştır. Çalışmada TvLac'ın, aracılı ticari lakkazdan daha verimli olduğu ve kot yıkamada kullanılabileceği belirtilmiştir (Pazarlıoğlu vd., 2005).

2.13.3. Lakkazların Kaynatma İşleminde Kullanımı

Kaynatma işlemleri, çeşitli kimyasal maddelerle yapılmakta ve çevresel acıdan kirlilik oluşturmaktadır. Bu nedenle daha ekolojik bir proses olan enzimatik kaynatma tercih edilmektedir. Enzimatik kaynatma işlemlerinde daha çok pektinaz kullanılmakta olup ksilanaz, proteaz, lakkaz, lipaz ve selülaz gibi enzimlerle de denemeler yapılmıştır.

Ossola ve Galante, yaptıkları çalışmada, ketene enzimatik kaynatma işleminin etkilerini incelemişlerdir. Bu amaçla ham keten liflerine endüstriyel enzimler uygulanmıştır. Kaynatma sonrası, ağartma ve yaş mekanik eğirme yapılmıştır. Eğirmeden sonra tüm ilgili iplik parametreleri ölçülmüş ve direnç, gerilme gibi parametreler değerlendirilmiştir. Verimlilik; pektinaz > ksilanaz = galaktomannaz = proteaz > lipaz > veya = lakkaz şeklinde sıralanmıştır. Buna göre lakkazların kaynatma amacıyla da kullanılabileceği ancak pektinazlar kadar verimli olmadığı görülmüştür (Ossola, 2004).

2.13.4. Lakkazların Tekstil Atık Sularının Biyolojik Parçalanması ve Renksizleştirilmesinde Kullanımı

Azo, trifenil metan ve ftalosiyenin gibi farklı kromofor grupların varlığı, boyarmaddelerin yapısal çeşitliliğini sağlamaktadır. Görsel etki ve kimyasal oksijen ihtiyacı (COD) açısından yan etkilerinin yanı sıra çoğu sentetik boyarmaddeler, toksik, kanserojen ve genotoksik etkiler de göstermektedir. Mevcut atık su sistemleri ise, bu tip atıklardan yıkıma dirençli boyarmaddeleri ve diğer organik kalıntıları tamamen uzaklaştırmakta yetersiz kalmaktadırlar (Parshetti, 2007).

Boyama atık sularının arıtılması, adsorpsiyon, koagülasyon, oksidasyon, filtrasyon ve iyonlaştırıcı radyasyon gibi kimyasal ve fiziksel yöntemler gerektirmektedir. Bu yöntemlerin tümü farklı renksizleştirme yeteneğine, sermaye

maliyetine ve operasyon hızına sahiptir. Bu yöntemler arasından koagülasyon ve adsorpsiyon yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bunlar büyük miktarlarda atığa yol açmaktadır. Bu nedenle biyolojik işlemler, düşük maliyet ve az çamur oluşturmaları nedeniyle giderek önem kazanmaktadır (Park, 2007).

Parshetti ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada *Aspergillus ochraceus* NCIM-1146'nın miselyumu tarafından tekstil boyarmaddesi Reactive blue-25 (0.1g/l)'in renksizleştirilmesi ve parçalanmasını incelemiştir. Reactive blue-25, kromofor olarak bakır ftalosiyanın (Cu PC) ve reaktif kısım olarak monoklortriazin içeren reaktif bir boyarmadde olup tekstil sanayinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışmanın esas amacı, bu boyarmaddenin renksizleştirilmesini, biyolojik parçalanmasını ve parçalanma ürünlerinin tanımlanmasını incelemek ve bunun yanı sıra renksizleştirme prosesi esnasında kültür süzütüsündeki lakkaz, trosinaz ve lignin peroksidaz gibi hücre dışı enzimleri belirlemektir. Yapılan spektrofotometrik ve görsel incelemeler, renksizleştirilenin fungal adsorpsiyonu takip eden parçalanma sayesinde olduğunu göstermiştir. Çalışmada statik koşullar ile kıyaslandığında çalkalamalı koşulların, Reactive blue-25 boyarmaddesinin tamamen ve hızlı adsorpsiyonu (7 saat) ve renksizleştirilmesinde (20 gün) daha etkili olduğu bulunmuştur. Ortamda glikozun bulunması ise, daha hızlı bir adsorpsiyon (4 saat) ve renksizleştirme (7 gün) sağlamıştır. Renksizleştirme sonrası süzütüde lignin peroksidaz, lakkaz ve trosinaz gibi oksidatif enzimlerin varlığı, Reactive blue-25'in ftalimid ve *diiso*- butil ftalat gibi iki büyük metabolite parçalanma işleminden sorumlu olduğunu göstermiştir (Parshetti, 2007).

Kunamneni ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada *Myceliophthora thermophila*'dan elde edilen lakkaz enzimi, epoksi grupları ile aktifleştirilmiş polimetakrilat esaslı polimerler üzerine kovalent olarak immobilize edilmiştir. Bu şekilde elde edilen enzimin yüksek bir aktivite (203 U/g) ve pH, sıcaklık ve depolama süresi karşısında iyileştirilmiş dayanıklılık gösterdiği ancak organik çözücülere karşı artan bir dayanıklılık göstermediği bulunmuştur. Ayrıca biyokatalizörün iyi operasyonel dayanıklılık gösterdiği, 17 kullanım sonrasında ilk aktivitesinin %84'ünü koruduğu görülmüştür. Immobilize lakkaz, altı sentetik boyarmaddenin (Reactive Black 5, Acid Blue 25, Methyl Orange, Remazol Brilliant Blue B, Methyl Green ve Acid Green 27) renginin giderilmesinde uygulanmıştır. Çalışmada, bu biyokatalizörlerin yüksek

mekanik dayanıklılık ve suda şişmeme gibi özelliklerinin, tekstil sanayinde boyarmaddelerin renginin giderilmesinde uygulama açısından elverişli olduğu belirtilmiştir (Kumanneni vd, 2008).

Lakkaz enzimleri, teknolojik ve endüstriyel alanlarda çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Tekstil sanayi, lakkaz enzimlerinin kullanım alanları arasında yer almaktadır. Tekstil sanayinde, tekstil atık sularındaki boyarmaddelerin renksizleştirilmesi, ağartma, kaynatma ve kot yıkama gibi işlemlerde, kimyasal işlemlere alternatif oluşturmaları ve ekolojik olmaları nedeniyle, lakkaz enzimlerinin kullanımı ilginçtir. Lakkazların bilinen redoks potansiyelleri, fenolik olmayan bileşiklerin potansiyellerinden düşük olduğundan bu enzimler, bu tür maddeleri oksitleyememektedirler. Bu nedenle elektron transfer araçları olarak hareket edebilen küçük moleküller ile lakkaz enzimi birleştirilerek lakkaz aracılı sistemler geliştirilmiş ve böylece lakkazların, fenolik olmayan yapıları da oksitleyebilmesi sağlanmıştır. Lakkaz aracılı sistemler, tekstil sanayinde özellikle kot üzerindeki indigoyu renksizleştirme amacıyla uygulanmakta olup bu sistemler sayesinde geri boyama azalmakta, aşınma seviyeleri gelişmekte ve indigo ağartılabilmektedir (Arık vd, 2008).

3. YÖNTEM VE GEREÇLER

3.1. Besiyeri Ortamının Hazırlanması ve Mikroorganizmaların Kültürasyonu

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar

Çalışmada enzim üreticisi olarak *Trametes versicolor* ATCC 200801 kullanılmıştır. Gedikli, 2008 tarafından yapılan yüksek lisans tez çalışmasında *T. versicolor*, denenen funguslar arasında en yüksek aktivitede lakkaz üreticisi olarak bildirilmiştir (Gedikli, 2008). Bu nedenle bu çalışma kapsamında yapılacak çevresel uygulamalar için de bu organizmadan elde edilen lakkaz aktivitesi yüksek kültür süpernatantı kullanılmıştır. Çalışma süresince ve sonrasında kültürler potato dekstroz agar (PDA) besiyerinde +4 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.1.2. Lakkaz Üretimi İçin Kullanılan Besiyeri ve Hazırlanması

Trametes versicolor hücreleri %3 (w/v) buğday kepeği ilave edilmiş Potato Dekstroz Broth (PDB) besiyerinde 12 gün süre ile inkübe edildiğinde en yüksek lakkaz aktivite değerine ulaşıldığı bildirilmiştir (Gedikli, 2008). Bu tez çalışmasında üretim için bu koşullar kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan Potato Dekstroz Broth besiyeri hazır preparasyon halinde temin edilmiştir (Acumedia). Dehidre besiyeri (gr/ml); potato infusion solids 4, dekstroze 200 bileşenlerinden oluşmakta ve pH değeri 5.1’dir. Bu besiyerinden litreye 24 gr olacak şekilde tartılıp gerekli miktarda saf su içerisinde çözülmüştür. Hazırlanan 30 g/l buğday kepeği ilave edilerek besiyeri otoklavda 121 °C’de 15 dakika süreyle sterilize edilmiştir.

Yatık PDA besiyerinde 10 gün süre ile 30°C’de geliştirilmiş *T. versicolor* hücreleri, steril distile su içerisinde homojenize (Heidolph, SilentCrucher M) edilmiştir. Elde edilen homojenize süspansiyon daha sonraki çalışmalarda besiyerlerini inokule etmek amacı ile kullanılmıştır. Aseptik koşullar altında bu hücre süspansiyonundan 3 ml alınarak buğday kepeği ilaveli PDB besiyerine (100ml/250 ml Erlenmayer) ilave

edilmiştir. Kùltürler çalkalamalı inkübatörde 150 rpm çalkalama hızında, 30°C sıcaklıkta ve 12 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, filtrasyon yapılarak biyokütle ile kùltür süpernatantı birbirinden ayrılmıştır. Kùltür süpernatantı enzim kaynağı olarak kullanılarak, lakkaz aktivitesi ölçülmüştür.

3.1.3. Lakkaz Aktivitesinin Ölçümü

Lakkaz aktivitesi ölçümü için tepkime tüplerinde toplam hacim 5 ml olacak şekilde substrat olarak 4.9 ml ve 1 mM Guaiakol içeren 50 mM Sodyum-Asetat tamponu (pH 4.5) ve enzim kaynağı olarak 0.1 ml kùltür süpernatantı kullanılmıştır. 37 °C’de 15 dakika inkübasyondan sonra 465 nm dalga boyunda spektrofotometrede (JascoV530 UV-Vis spectrophotometer) absorbans ölçülmüştür (Taşpınar ve Kolankaya, 1998).

Çalışmada, 37 °C, 1 dakikada, 465 nm dalga boyunda absorbansı 0.1 birim artıran enzim aktivitesi 1 Unit aktivite olarak tanımlanmıştır.

3.2. Dekolorizasyon Çalışmaları

3.2.1. Dekolorizasyon Çalışmalarında Kullanılan Boyarmaddeler

Dekolorizasyon çalışmalarında tekstil endüstrisinde sıklıkla kullanılan ve ticari preparasyonlar halinde satılan Reaktif Red 198, Rem Blue RR, Dylon Navy 17, Rem Red RR ve Rem Yellow RR boyarmaddeleri kullanılmıştır.

Kullanılacak her bir boyarmaddenin öncelikle en yüksek absorbans değerini verdiği dalga boyunu belirlemek için bir spektrum taraması yapılmıştır. Yapılan spektrum taraması çalışması sonucunda elde edilen en yüksek absorbans değerleri, bundan sonraki çalışmalarda sabit tutularak ölçümler yapılmıştır. Elde edilen bu absorbans değerlerinde, her bir boyar madde için farklı konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanarak standart eğriler çizilmiştir.

3.2.2. Tarama Çalışması

Reaktif red 198, Rem Blue RR, Dylon Navy 17, Rem red RR ve Rem Yellow RR boyarmaddelerinin her biri için ayrı ayrı 3.2.1.'de anlatıldığı biçimde üretilen lakkaz enzimi ile dekolorizasyon denemeleri yapılmıştır. Tarama çalışmasında her bir boya için 50 mg/l boya konsantrasyonunda, pH 5.0, sıcaklık 35 °C, 1 ml enzim kaynağı ilave edilerek toplam 10 ml hacimde çalışılmıştır. Çalışmalar birbirinden bağımsız ve en az 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.

Tarama çalışmaları sonucunda Rem Blue RR ve Dylon Navy 17 boyar maddelerinin lakkaz aktivitesi yüksek kültür süpernatantı tarafından dekolorize edildiği, diğer denenen 3 boyarmadde de ise her hangi bir dekolorizasyonunun gerçekleşmediği görülmüştür. Bu nedenle bundan sonraki çalışmalar iki grup halinde planlanmıştır. Birinci grup çalışmalarda, tarama çalışmasında lakkaz enzimi ile dekolorize edilebildiği görülen Rem Blue RR ve Dylon Navy 17 boyları için ortam şartlarının optimizasyonunu yapılmıştır. İkinci grup çalışmalarda ise lakkaz aktivitesi yüksek kültür süpernatantı ile dekolorize edilemediği görülen Reaktif red 198, Rem red RR ve Rem Yellow RR boyarmaddelerinin lakkaz aracılı sistemleri kullanılarak dekolorizasyonlarının yapılıp yapılamayacağı araştırılmıştır. Dekolorizasyonu gerçekleştirilen boyarmaddeler için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır.

3.2.3. Lakkaz Enzimi ile Yapılan Dekolorizasyon Çalışmaları

3.2.3.1. Rem Blue RR ve Dylon Navy 17 Boyar Maddelerinin Lakkaz Enzim Aktivitesi Yüksek Kültür Süpernatantı ile Dekolorizasyonu için Optimum Koşulların Belirlenmesi

Rem Blue RR ve Dylon Navy 17 boyar maddelerinin enzimatik dekolorizasyonda optimum koşullarının belirlenmesi için; pH, başlangıç boya konsantrasyonu, enzim miktarı, inkübasyon süresi ve sıcaklık parametreleri çalışılmıştır. Enzimatik dekolorizasyon için kullanılan enzim kaynağı, *Trametes versicolor*

ATCC200801'in buğday kepeği ilave edilmiş PDB besiyerinde inkübe edilerek elde edilen ve lakkaz aktivitesi yüksek olan kültür süpernatantıdır.

3.2.3.1.1. Ortam pH Değerinin Enzimatik Dekolorizasyona Etkisi

Bu çalışmada ortam pH değerinin enzimatik dekolorizasyona etkisini belirlemek için 3 - 3.5 - 4 - 4.5 - 5- 5.5 - 6 - 7 - 8 pH değerleri denenmiştir. pH 3-5.5 için 0.2 M asetat tamponu, pH 6-8 için 0.2 M fosfat tamponu kullanılmıştır. Çalışma tepkime tüplerinde toplam hacim 10 ml olacak şekilde belirtilen pH değerlerinde hazırlanmış 50 mg/l konsantrasyondaki boya çözeltilisinden 9 ml ve 1ml 24,4 U/ml lakkaz aktivitesine sahip enzim kaynağı ilave edilerek yapılmıştır. İnkübasyon süresi 30 dk, inkübasyon sıcaklığı ise 35 °C' dir. Sonuçlar 604 nm (Rem Blue RR için) ve 586 nm (Dylon Navy 17 için) dalga boyunda spektrofotometrede okunmuştur. Kontrol grubu olarak diğer koşullar sabit tutulup enzim yerine denatüre enzim ve boya çözeltilisi kullanılmıştır.

3.2.3.1.2. Başlangıç Boya Konsantrasyonunun Enzimatik Dekolorizasyona Etkisi

Başlangıç boya konsantrasyonunun enzimatik dekolorizasyona etkisini belirlemek amacıyla 3.2.3.1.' de yapılan çalışmanın sonucuna göre belirlenen pH 5 de ve 5-150 mg/l arasında hazırlanan konsantrasyonlardaki boya çözeltileri ile çalışılmıştır. Çalışmada diğer koşullar; tepkime tüplerinde toplam hacim 10 ml olacak şekilde; 9 ml belirtilen konsantrasyonlarda ve pH da hazırlanmış boya çözeltilisi, 1ml 24.4 U/ml enzim aktivitesine sahip lakkaz enzimi ilave edilmiştir ve inkübasyon süresi 30 dk ve sıcaklığı 35°C'de sabit tutulmuştur. Sonuçlar 604 nm (Rem Blue RR için) ve 586 nm (Dylon Navy 17 için) dalga boyunda spektrofotometrede okunmuştur. Kontrol grubu olarak diğer koşullar sabit tutulup enzim yerine denatüre enzim ve boya çözeltilisi kullanılmıştır.

3.2.3.1.3. Enzim Miktarının Enzimatik Dekolorizasyona Etkisi

Enzim miktarının enzimatik dekolorizasyona etkisini belirlemek amacıyla 0.5-4 ml arasında değişen miktarlarda ve 24.4 U/ml aktivitede enzim kullanılmıştır. Çalışma

koşulları pH 5, 50 mg/l başlangıç boya konsantrasyonu, inkübasyon süresi 30 dk ve inkübasyon sıcaklığı 35°C' dir. Sonuçlar 604 nm (Rem Blue RR için) ve 586 nm (Dylon Navy 17 için) dalga boyunda spektrofotometrede okunmuştur. Kontrol grubu olarak diğer koşullar sabit tutulup enzim yerine denatüre enzim ve boya çözeltisi kullanılmıştır.

3.2.3.1.4. Ortam Sıcaklığının Enzimatik Dekolorizasyona Etkisi

Ortam sıcaklığının enzimatik dekolorizasyona etkisini belirlemek için 20-45°C arası sıcaklıklar denenmiştir. Diğer çalışma koşulları pH 5, 50 mg/l boya konsantrasyonu, 1 ml 25,3 U/ml aktiviteye sahip enzim ve inkübasyon süresi 30 dk' dır. Sonuçlar 604 nm (Rem Blue RR için) ve 586 nm (Dylon Navy 17 için) dalga boyunda spektrofotometrede okunmuştur. Kontrol grubu olarak diğer koşullar sabit tutulup enzim yerine denatüre enzim ve boya çözeltisi kullanılmıştır.

3.2.3.1.5. İnkübasyon Süresinin Enzimatik Dekolorizasyona Etkisi

İnkübasyon süresinin enzimatik dekolorizasyona etkisini belirlemek amacıyla 5.-15-30-45-60-120 dk ve 12 - 24 saatler denenmiştir. Daha önce belirlenen parametreler sabit tutularak denemeler yapılmıştır. Çalışma koşulları pH 5, 50 mg/l başlangıç boya konsantrasyonu, 1ml 25,3 U/ml enzim aktivitesine sahip enzim ve inkübasyon sıcaklığı 30 °C' dir. Sonuçlar 604 nm (Rem Blue RR için) ve 586 nm (Dylon Navy 17 için) dalga boyunda spektrofotometrede okunmuştur. Kontrol grubu olarak diğer koşullar sabit tutulup enzim yerine denatüre enzim ve boya çözeltisi kullanılmıştır.

Tüm optimizasyon çalışmaları bir birinden bağımsız ve en az 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Elde edilen çalışma sonuçları bu tekrarlı denemelerin ortalama değerleri olarak hesaplanmıştır.

3.2.4. Lakkaz Enzimi ile Birlikte Aracı Kullanılarak Yapılan Dekolorizasyon Çalışmaları

Çalışma kapsamında 3.2.2.'de belirtilen tarama çalışmasının sonucunda Reaktif Red 198, Rem Red RR ve Rem Yellow RR boyarmaddelerinin lakkaz enzim aktivitesi yüksek kültür süpernatantı ile dekolorizasyonunun yapılamadığı görülmüştür. Ancak, literatür bilgisine dayanarak aracılı sistem kullanılarak lakkaz enziminin substrat çeşitliliğinin artırılabilceği bilinmektedir. Bu nedenle, çalışma sürecinde lakkaz aktivitesi yüksek kültür süpernatantının tek başına dekolorize edemediği Reaktif Red 198, Rem Red RR ve Rem Yellow RR boyarmaddelerinin dekolorizasyonunda çeşitli araçlar kullanılarak, lakkaz aracı sistemlerin kullanılabilirliği incelenmiştir. Bu amaçla dimetoksyphenol (DMP), fenol, vanilin, guiacol, veratril alkol, L-tirozin reaksiyon ortamına ilave edilerek aracı olarak etkinlikleri araştırılmıştır.

Lakkaz aracılı sistemlerinin etkinliğini araştırmak üzere yapılan çalışmalarda 3.2.2.'de belirtilen koşullar sabit tutulmuştur. Tarama çalışmasında her bir boya için 50 mg/l boya konsantrasyonunda, pH 5.0, sıcaklık 35 °C, 1 ml enzim ve 1 ml aracı ilave edilerek toplam 10 ml hacimde çalışılmıştır. Çalışmalar birbirinden bağımsız ve en az 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Çalışma sonucunda en etkin aracı madde olarak vanilin belirlendiği için, bundan sonraki optimizasyon çalışmalarında sadece vanilin kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan 3 boyarmaddeden Reaktif Red 198, Rem Red RR aracı etkinliği denenen hemen hemen tüm aracı maddeler ile dekolorize edilebildiği ve ancak Rem Yellow RR, boyar maddesinin hiçbir aracı madde ilavesi ile dekolorize edilemediği görülmüştür. Bu nedenle bundan sonraki optimizasyon çalışmaları Reaktif Red 198, Rem Red RR ile yapılmıştır.

3.2.4.1. Reaktif Red 198 ve Rem Red RR Boyar Maddelerinin Lakkaz Aracılı Sistem Kullanılarak Dekolorizasyonu için Optimum Koşulların Belirlenmesi

Reaktif Red 198 ve Rem Red RR boyar maddelerinin enzimatik dekolorizasyonunun optimum koşullarının belirlenmesi için; pH, başlangıç boya konsantrasyonu, enzim miktarı, inkübasyon süresi, sıcaklık ve aracı konsantrasyonu

parametreleri çalışılmıştır. Enzimatik dekolorizasyon için kullanılan enzim kaynağı, *Trametes versicolor* ATCC200801'in buğday kepeği ilave edilmiş PDB besiyerinde inkübe edilerek elde edilen ve lakkaz aktivitesi yüksek olan kültür süpernatantıdır.

3.2.4.1.1. Ortam pH Değerinin Enzimatik Dekolorizasyona Etkisi

Bu çalışmada ortam pH değerinin enzimatik dekolorizasyona etkisini belirlemek için 3 - 3.5 - 4 - 4.5 - 5 - 5.5 - 6 - 7 - 8 pH değerleri denenmiştir. pH 3-5.5 için 0.2 M asetat tamponu, pH 6-8 için 0.2 M fosfat tamponu kullanılmıştır. Çalışma tepkime tüplerinde toplam hacim 10 ml olacak şekilde belirtilen pH değerlerinde hazırlanmış 50 mg/l konsantrasyondaki boya çözeltisinden 8 ml, 1ml 24.4 U/ml enzim aktivitesine sahip enzim ve aracı olarak 1 ml vanilin ilave edilerek yapılmıştır. İnkübasyon süresi 30 dk, inkübasyon sıcaklığı ise 35 °C' dir. Sonuçlar 525 nm (Reaktif Red 198 için) ve 521 nm (Rem Red RR için) dalga boyunda spektrofotometrede okunmuştur. Kontrol grubu olarak diğer koşullar sabit tutulup enzim yerine denatüre enzim ve boya çözeltisi kullanılmıştır.

3.2.4.1.2. Aracı Konsantrasyonunun Enzimatik Dekolorizasyona Etkisi

Aracı konsantrasyonunun enzimatik dekolorizasyona etkisini belirlemek amacıyla, daha önce belirlenen koşullar sabit tutularak, aracı konsantrasyonu 25-1000 µM arasındaki derişimler kullanılarak çalışılmıştır. Çalışma, pH 6.0, başlangıç boyar madde konsantrasyonu 10 mg/l, 1ml 25,5 U/ml enzim aktivitesine sahip lakkaz içeren kültür süpernatantı ve aracı olarak belirtilen derişimlerde hazırlanan 1 ml vanilin kullanılarak sıcaklık 30 °C'de sabit tutulmuş ve deneme 30 dakika sürdürülmüştür.

3.2.4.1.3. Başlangıç Boya Konsantrasyonunun Enzimatik Dekolorizasyona Etkisi

Başlangıç boya konsantrasyonunun enzimatik dekolorizasyona etkisini belirlemek amacıyla kısım 3.2.4.1.1.' de yapılan çalışmanın sonucuna göre belirlenen pH 5 de ve 5-150 mg/l arasında hazırlanan konsantrasyonlardaki boya çözeltileri ile

çalışılmıştır. Çalışmada diğer koşullar; tepkime tüplerinde toplam hacim 10 ml olacak şekilde; 8 ml belirtilen konsantrasyonlarda ve pH da hazırlanmış boya çözeltisi, 1ml 24.4 U/ml enzim aktivitesine sahip lakkaz enzimi, aracı olarak 1 ml vanilin ilave edilmiştir ve inkübasyon süresi ve sıcaklığı 30 dk ve 35 °C’de sabit tutulmuştur. Sonuçlar 525 nm (Reaktif Red 198 için) ve 521 nm (Rem Red RR için) dalga boyunda spektrofotometrede okunmuştur. Kontrol grubu olarak diğer koşullar sabit tutulup enzim yerine denatüre enzim ve boya çözeltisi kullanılmıştır.

3.2.4.1.4. Enzim Miktarının Enzimatik Dekolorizasyona Etkisi

Enzim miktarının enzimatik dekolorizasyona etkisini belirlemek amacıyla 0.5-4 ml arasında değişen miktarlarda ve 24,4 U/ml aktivitede enzim kullanılmıştır. Çalışma koşulları pH 5, 50 mg/l başlangıç boya konsantrasyonu, inkübasyon süresi 30 dk ve inkübasyon sıcaklığı 35°C’ dir. Sonuçlar 525 nm (Reaktif Red 198 için) ve 521 nm (Rem Red RR için) dalga boyunda spektrofotometrede okunmuştur. Kontrol grubu olarak diğer koşullar sabit tutulup enzim yerine denatüre enzim ve boya çözeltisi kullanılmıştır.

3.2.4.1.5. Ortam Sıcaklığının Enzimatik Dekolorizasyona Etkisi

Ortam sıcaklığının enzimatik dekolorizasyona etkisini belirlemek için 20-70 °C arası sıcaklıklar denenmiştir. Diğer çalışma koşulları pH 5, 50 mg/l boya konsantrasyonu, 1 ml 25,3 U/ml aktiviteye sahip enzim ve inkübasyon süresi 30 dk’ dır. Sonuçlar 525 nm (Reaktif Red 198 için) ve 521 nm (Rem Red RR için) dalga boyunda spektrofotometrede okunmuştur. Kontrol grubu olarak diğer koşullar sabit tutulup enzim yerine denatüre enzim ve boya çözeltisi kullanılmıştır.

3.2.4.1.6. İnkübasyon Süresinin Enzimatik Dekolorizasyona Etkisi

İnkübasyon süresinin enzimatik dekolorizasyona etkisini belirlemek amacıyla 5.-15-30-45-60-120 dk ve 12 - 24 saatler denenmiştir. Daha önce belirlenen parametreler sabit tutularak denemeler yapılmıştır. Çalışma koşulları pH 5, 50 mg/l başlangıç boya konsantrasyonu, 1ml 25,3 U/ml enzim aktivitesine sahip enzim ve inkübasyon sıcaklığı 30 °C' dir. Sonuçlar 525 nm (Reaktif Red 198 için) ve 521 nm (Rem Red RR için) dalga boyunda spektrofotometrede okunmuştur. Kontrol grubu olarak diğer koşullar sabit tutulup enzim yerine denatüre enzim ve boya çözültisi kullanılmıştır.

3.2.4.1.7. Aracı miktarının enzimatik dekolorizasyona etkisi

Bu çalışmada aracı miktarının enzimatik dekolorizasyona etkisini belirlemek amacı ile aracı konsantrasyonunda belirlenen optimum değerde 05-3 ml arasında miktarla çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar uygun absorbans değerlerinde spektrofotometre cihazında okunmuştur.

Tüm optimizasyon çalışmaları bir birinden bağımsız ve en az 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Elde edilen çalışma sonuçları bu tekrarlı denemelerin ortalama değerleri olarak hesaplanmıştır.

3.2.5. Toksikite Çalışmaları

Toksikite çalışmaları *Artemia salina* larvaları kullanılarak Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen-Edebiyat fakültesi Biyoloji Bölümü Palaemonates Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır.

Deneme için gerekli *A. salina* üretimleri için gerekli düzenek şeffaf, silindirik, 5 litrelik cam kavanozlar, termostatlı ısıtıcı, havalandırma pompası, ışık kaynağı ve hava taşıdan oluşmaktadır. Üretim için gerekli düzenek Şekil 3.2.5.1'de verilmiştir. *A. salina* üretimi için öncelikle 4 ayrı su tankı 35 g/l tuz konsantrasyonunda 3'er litre olarak hazırlanmıştır. Deneyde 4 çıkışlı standart hava motoru kullanılmıştır. Tüm tanklara 4g/l olacak şekilde kistler ilave edilmiştir. Önceden hazırlanan, su yüzeyine 20 cm yükseklikte bulunan elektrik sistemine 75W'lık ampuller takılmış ve tüm tanklar

yan yana birbirine değmeyecek şekilde yerleştirilmiştir. 24 saatlik inkübasyon süresi uygulanmıştır.



Şekil 3.2.5.1. *A. salina* üretimi için gerekli düzenek

Toksisite denemelerinde farklı konsantrasyonda hazırlanan boyarmaddeler enzim ile işlem görmeden önce ve sonra olmak üzere 2 farklı deney grubu oluşturularak toksisitedeki değişimler canlı *Artemia salina* sayımları ile 24 saat sürede 6 saat aralıklarla takip edilmiştir. Her bir boyar madde için hazırlanan farklı konsantrasyondaki çözeltilere 10'ar adet canlı *A. salina* konarak canlılıklarındaki değişimler binoküler mikroskop (Olympus) ile sayılarak takip edilmiştir.

3.2.6. Katalaz Muamelesi

Lakkaz enzimi aktivitesi yüksek kültür süpernatantı ile Rem Blue RR, Dylon Navy 17, Reaktif Red 198 ve Rem Red RR boyarmaddelerinin dekolorizasyon çalışmalarında ortamda bulunabilecek olan lignin peroksidaz ve mangan peroksidazın dekolorizasyona olası katkısını engellemek amacı ile çalışma ortamından H_2O_2 'nin uzaklaştırılması için katalaz ilave edilmiştir. Bu denemede, pH 7,2 olan 0,25 M KH_2PO_4 tamponuna % 0,2 (v/v) oranında katalaz ilave edilerek hazırlanan enzim preparasyonundan lakkaz aktivitesi yüksek kültür süpernatantına ilave edilerek

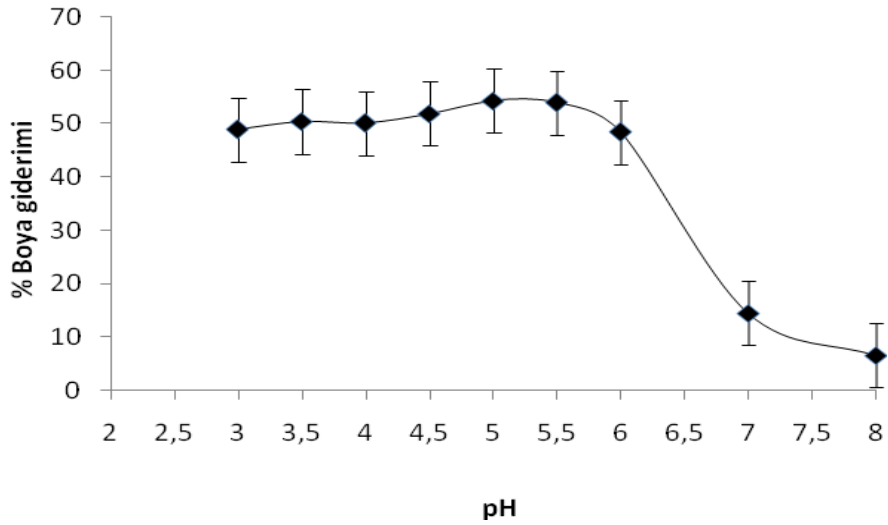
kullanılmıştır. Katalaz ilave edilmiş kültür süpernatantı, Rem Blue RR, Dylon Navy 17, Reaktif Red 198 ve Rem Red RR boyarmaddelerinin her biri için belirlenen optimum koşullarda deney ortamına ilave edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Rem Blue RR nin Lakkaz Enzimi ile Dekolorizasyonu

4.1.1. Ortam pH Değerinin Enzimatik Dekolorizasyona Etkisi

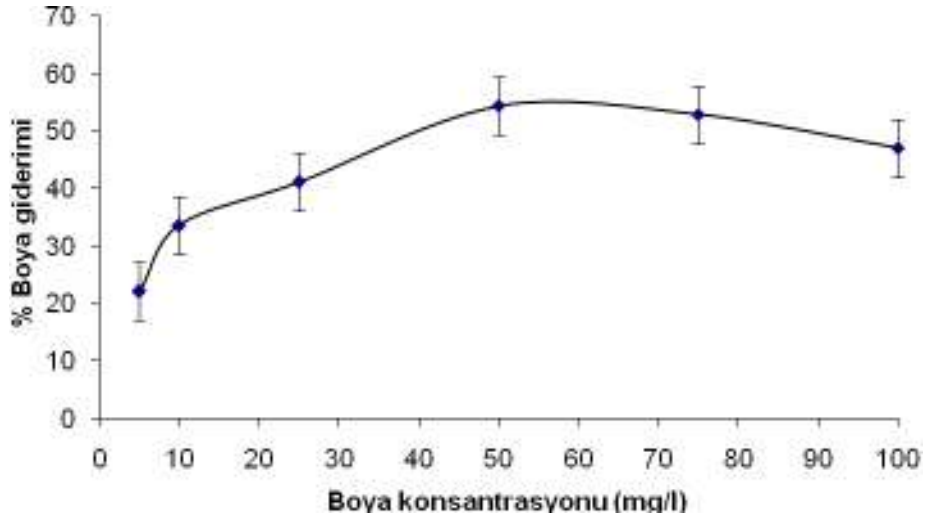
Enzimatik dekolorizasyonda ortam pH değerinin etkisini araştırmak amacıyla pH 3-8 arası boya çözeltileri ile çalışılmış ve en uygun değer pH 5 olarak saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.1.1.1' de gösterilmiştir.



Şekil 4.1.1.1 Enzimatik dekolorizasyonda ortam pH' sının etkisi. (Çalışma koşulları: başlangıç boya konsantrasyonu 50 mg/l, inkübasyon süresi 30dk., 1 ml 24,4 U/ml aktiviteye sahip enzim, inkübasyon sıcaklığı 35 °C)

4.1.2. Başlangıç Boya Konsantrasyonunun Enzimatik Dekolorizasyona Etkisi

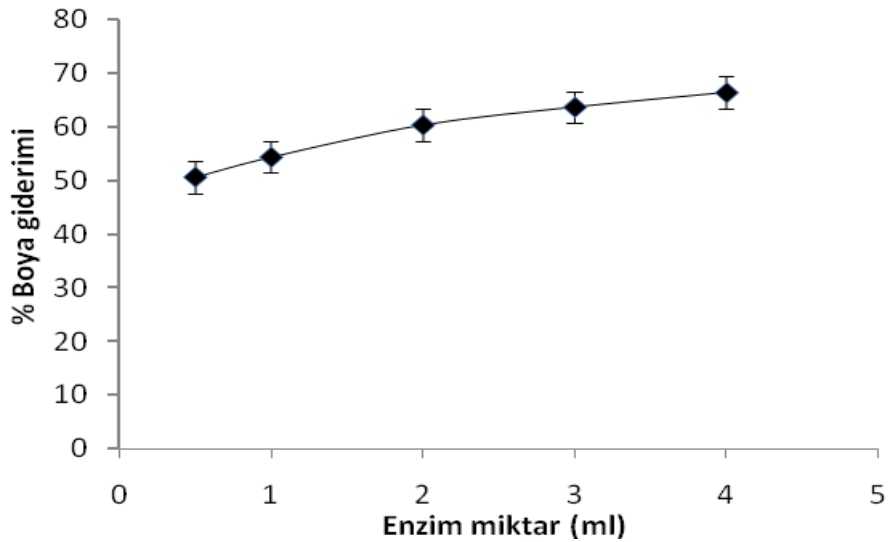
Başlangıç boya konsantrasyonunun enzimatik dekolorizasyona etkisini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada en uygun konsantrasyon 50 mg/l olarak bulunmuştur. Çalışma sonuçları Şekil 4.1.2.1.' de verilmiştir.



Şekil 4.1.2.1. Başlangıç boya konsantrasyonunun enzimatik dekolorizasyona etkisi. (Çalışma koşulları: pH 4, inkübasyon süresi 30dk, 1 ml 24,4 U/ml aktiviteye sahip enzim, inkübasyon sıcaklığı 35 °C)

4.1.3. Enzim Miktarının Enzimatik Dekolorizasyona Etkisi

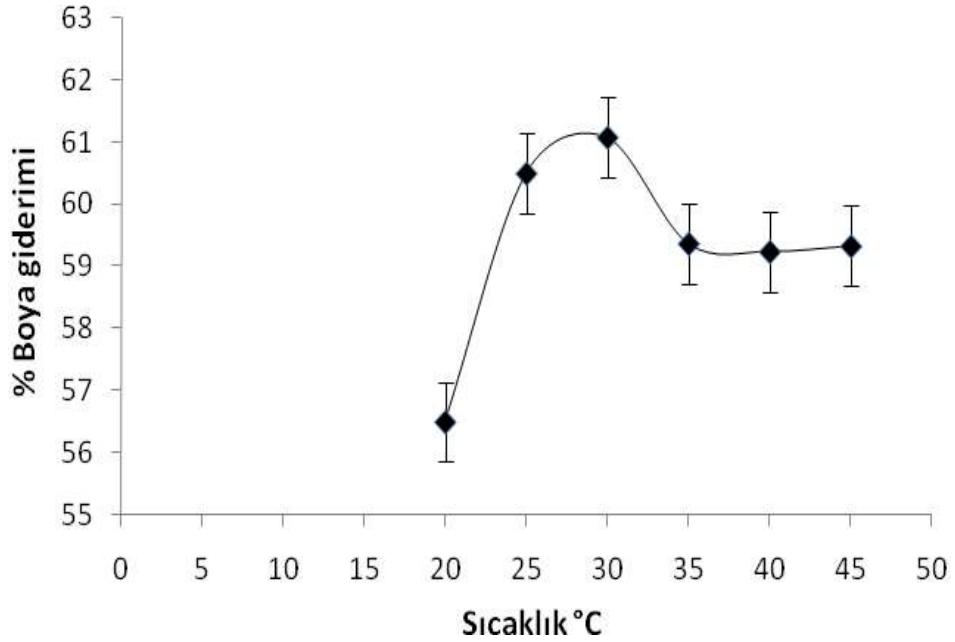
Enzim miktarının enzimatik dekolorizasyona etkisini belirlemek için 0,5-4 ml arasında değerler çalışılmıştır. Enzim miktarı artıkça % boya gideriminin arttığı görülmüştür. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.1.3.1' de verilmiştir.



Şekil 4.1.3.1. Enzim miktarının enzimatik dekolorizasyona etkisi. (Çalışma koşulları: pH 5, inkübasyon süresi 30dk, inkübasyon sıcaklığı 35 °C, başlangıç boya konsantrasyonu 50mg/l, 24,4 U/ml aktiviteye sahip enzim).

4.1.4. İnkübasyon Sıcaklığının Enzimatik Dekolorizasyona Etkisi

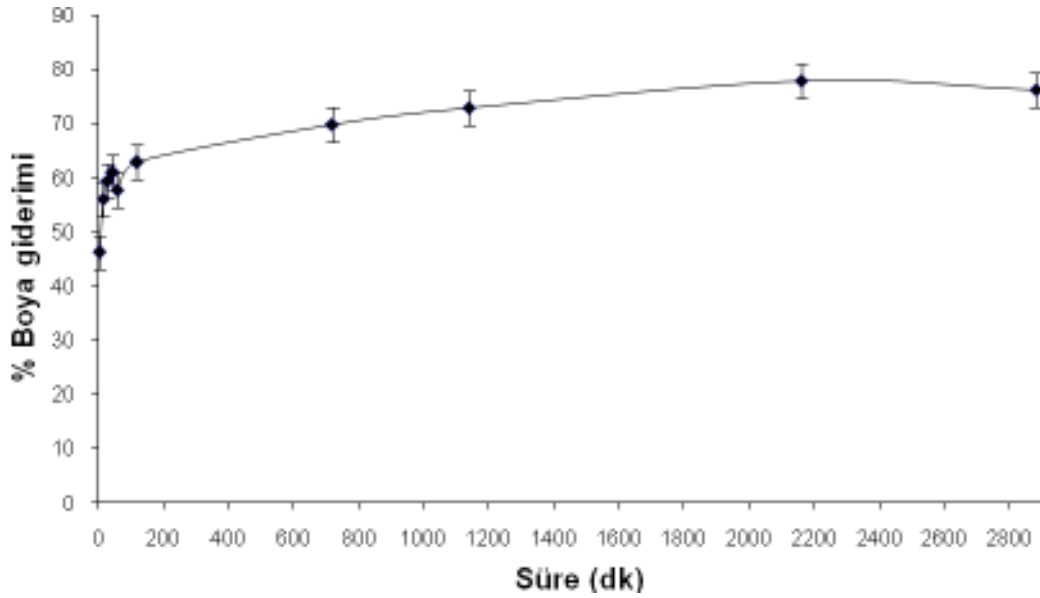
İnkübasyon sıcaklığının enzimatik dekolorizasyona etkisini belirlemek amacıyla 20-45 °C arası sıcaklık değerleri çalışılmış ve uygun inkübasyon sıcaklığı 30 °C olarak belirlenmiştir. Çalışma sonuçları 4.1.4.1.' de verilmiştir



Şekil 4.1.4.1 İnkübasyon sıcaklığının enzimatik dekolorizasyona etkisi (Çalışma koşulları: pH 5, enzim miktarı 1ml 25,3 U/ml aktiviteye sahip enzim, inkübasyon süresi 30 dk, başlangıç boya konsantrasyonu 50 mg/l)

4.1.5. İnkübasyon Süresinin Enzimatik Dekolorizasyona Etkisi

İnkübasyon süresinin enzimatik dekolorizasyon etkisini belirlemek amacıyla yapılan çalışmaya göre en uygun süre 36 saat seçilmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen sonuçlar şekil 4.1.5.1' de verilmiştir.

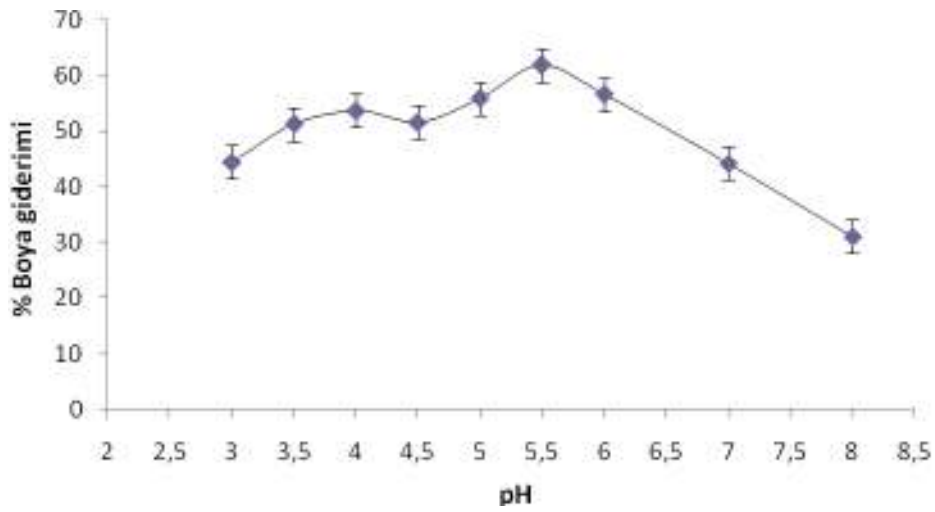


Şekil 4.1.5.1 İnkübasyon süresinin enzimatik dekolorizasyona etkisi. (Çalışma koşulları: pH 5, enzim miktarı 1ml 25,3 U/ml aktiviteye sahip enzim, inkübasyon sıcaklığı 30 °C, başlangıç boya konsantrasyonu 50 mg/l)

4.2. Dylon Navy 17' nin Lakkaz Enzimi ile Dekolorizasyonu

4.2.1. Ortam pH Değerinin Enzimatik Dekolorizasyona Etkisi

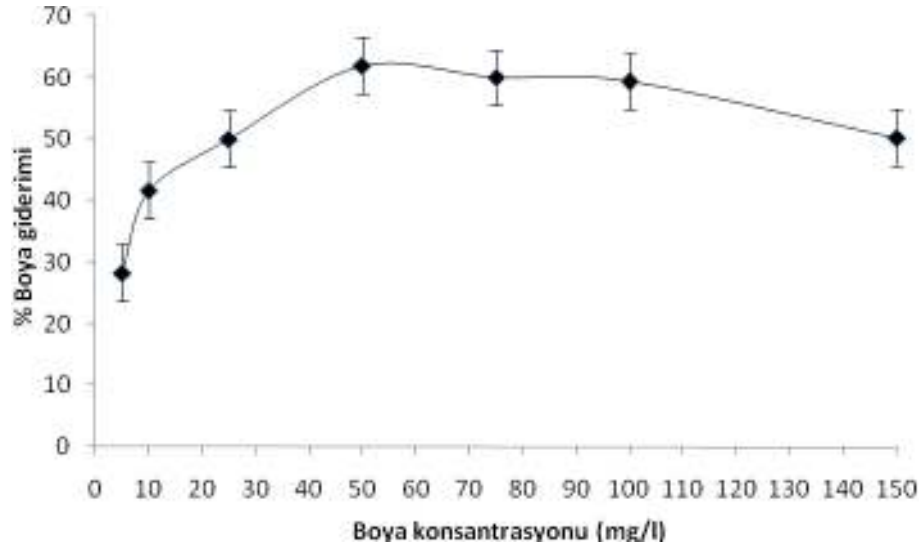
Enzimatik dekolorizasyonda ortam pH' sının etkisini araştırmak amacıyla pH 3-8 arası boya çözeltileri ile çalışılmış ve en uygun değer pH 5,5 olarak seçilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.2.1.1' de gösterilmiştir.



Şekil 4.2.1.1 Enzimatik dekolorizasyonda ortam pH değerinin etkisi. (Çalışma koşulları: başlangıç boya konsantrasyonu 50 mg/l, inkübasyon süresi 30dk., 1 ml 25,3 U/ml aktiviteye sahip enzim, inkübasyon sıcaklığı 35 °C)

4.2.2. Başlangıç Boya Konsantrasyonunun Enzimatik Dekolorizasyona Etkisi

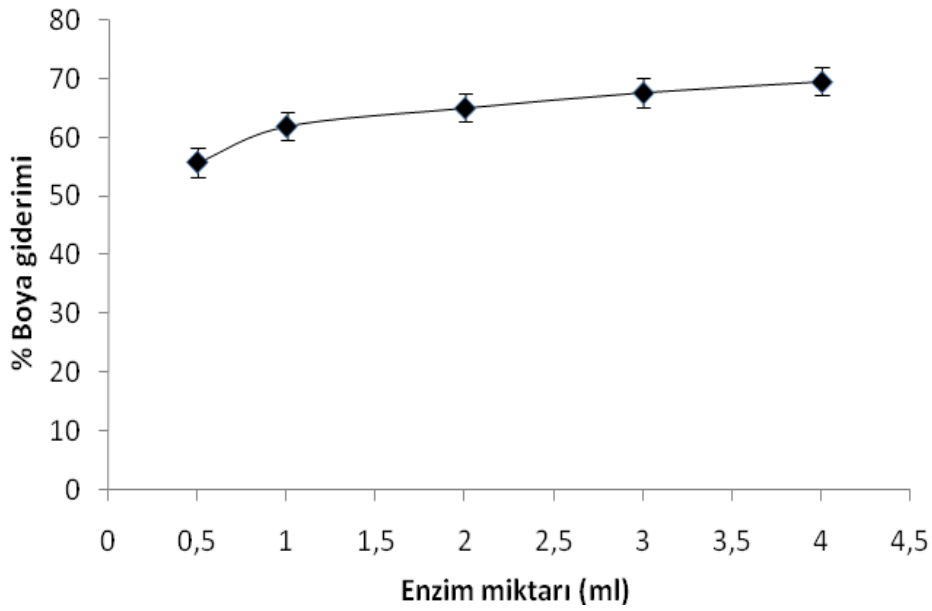
Başlangıç boya konsantrasyonunun enzimatik dekolorizasyona etkisini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada en uygun konsantrasyon 50 mg/l olarak bulunmuştur. Çalışma sonuçları Şekil 4.2.2.1.' de verilmiştir.



Şekil 4.2.2.1. Başlangıç boya konsantrasyonunun enzimatik dekolorizasyona etkisi. (alışma koşulları: pH 5,5, inkübasyon süresi 30dk, 25,34 U/ml aktiviteye sahip enzim, inkübasyon sıcaklığı 35 °C)

4.2.3. Enzim Miktarının Enzimatik Dekolorizasyona Etkisi

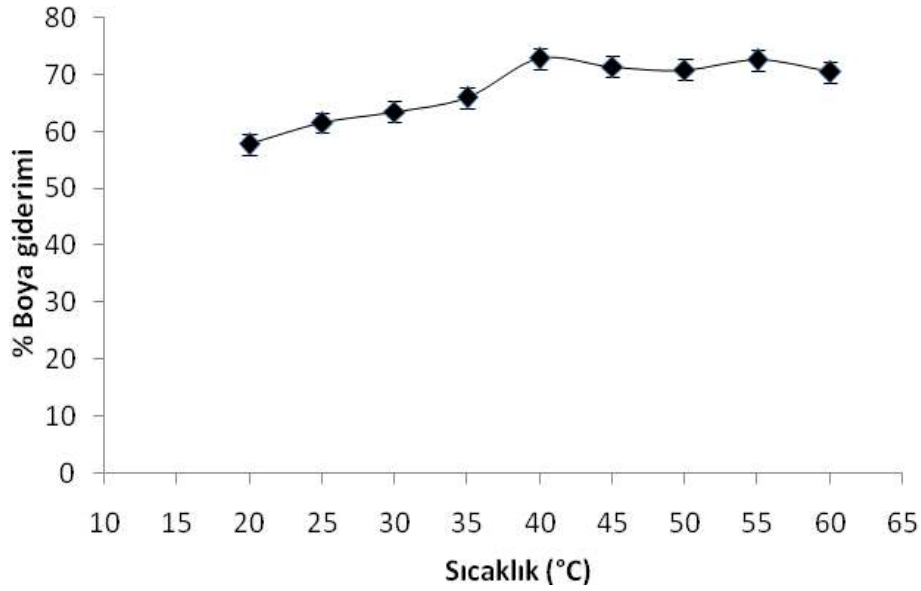
Enzim miktarının enzimatik dekolorizasyona etkisini belirlemek için 0,5-4 ml arasında değerler çalışılmıştır. Enzim miktarı artıkça % boya gideriminin arttığı görülmüştür. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.2.3.1' de verilmiştir.



Şekil 4.2.3.1. Enzim miktarının enzimatik dekolorizasyona etkisi. (Çalışma koşulları: pH 5,5, inkübasyon süresi 30dk, inkübasyon sıcaklığı 35°C, başlangıç boya konsantrasyonu 50mg/l, 1 ml 25,3 U/ml aktiviteye sahip enzim).

4.2.4. İnkübasyon Sıcaklığının Enzimatik Dekolorizasyona Etkisi

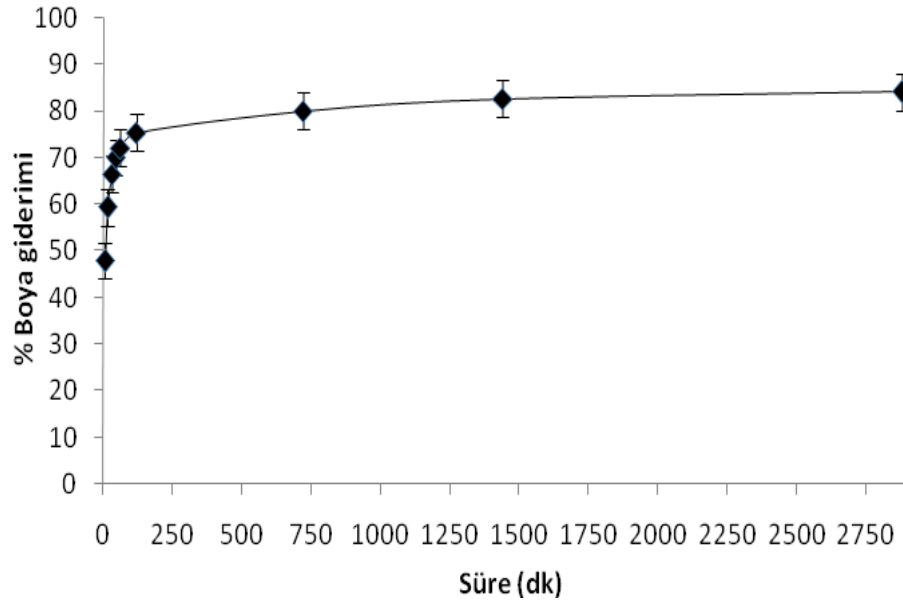
İnkübasyon sıcaklığının enzimatik dekolorizasyona etkisini belirlemek amacıyla 20-45 °C arası sıcaklık değerleri çalışılmış ve uygun inkübasyon sıcaklığı 30 °C olarak belirlenmiştir. Çalışma sonuçları 4.2.4.1.' de verilmiştir



Şekil 4.2.4.1 İnkübasyon sıcaklığının enzimatik dekolorizasyona etkisi (Çalışma koşulları: pH 5.5, enzim miktarı 1ml 25.3 U/ml aktiviteye sahip enzim, inkübasyon süresi 30 dk, başlangıç boya konsantrasyonu 50 mg/l)

4.2.5. İnkübasyon Süresinin Enzimatik Dekolorizasyona Etkisi

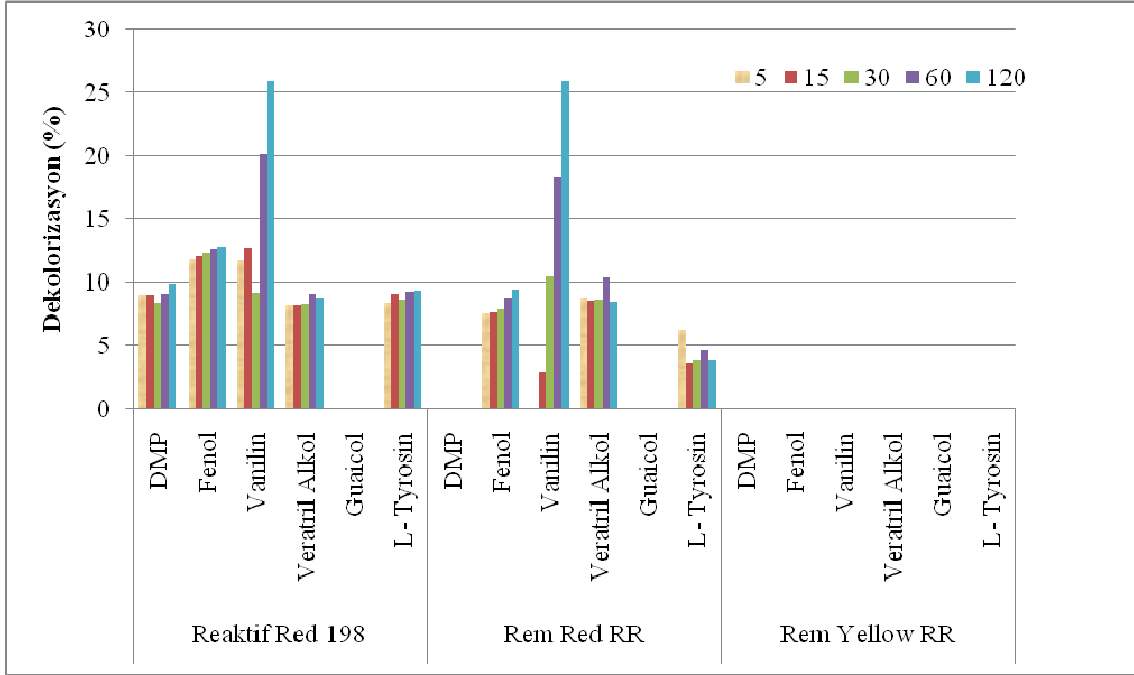
İnkübasyon süresinin enzimatik dekolorizasyon etkisini belirlemek amacıyla yapılan çalışmaya göre en uygun süre 120dk seçilmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen sonuçlar Şekil 4.2.5.1' de verilmiştir.



Şekil 4.2.5.1 İnkübasyon süresinin enzimatik dekolorizasyona etkisi. (Çalışma koşulları: pH 5,5, enzim miktarı 1ml 26,04 U/ml aktiviteye sahip enzim, inkübasyon sıcaklığı 45 °C, başlangıç boya konsantrasyonu 50 mg/l)

4.3. Dekolorizasyon Çalışmalarında Aracılı Sistemlerin Etkisi

Lakkaz aracılı sistemler olarak dimetoksyfenol (DMP), fenol, vanilin, guaiacol, veratril alkol, L-tirozin reaksiyon ortamına ilave edilerek etkinlikleri araştırılmıştır. Elde edilen veriler Şekil 4.3.1’de verilmiştir.

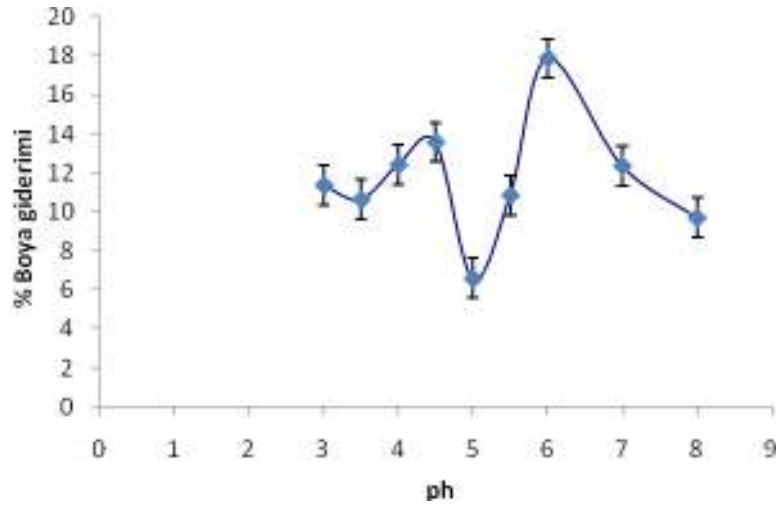


Şekil 4.3.1. Reaktif Red 198, Rem Red RR ve Rem Yellow RR boyarmaddelerinin dekolorizasyonunda ortama ilave edilen aracılı sistemlerin etkisi

4.4. Reaktif Red 198' nin Lakkaz Aracılı Sistem (Vanilin) Kullanılarak Dekolorizasyonu

4.4.1. Ortam pH Değerinin Enzimatik Dekolorizasyona Etkisi

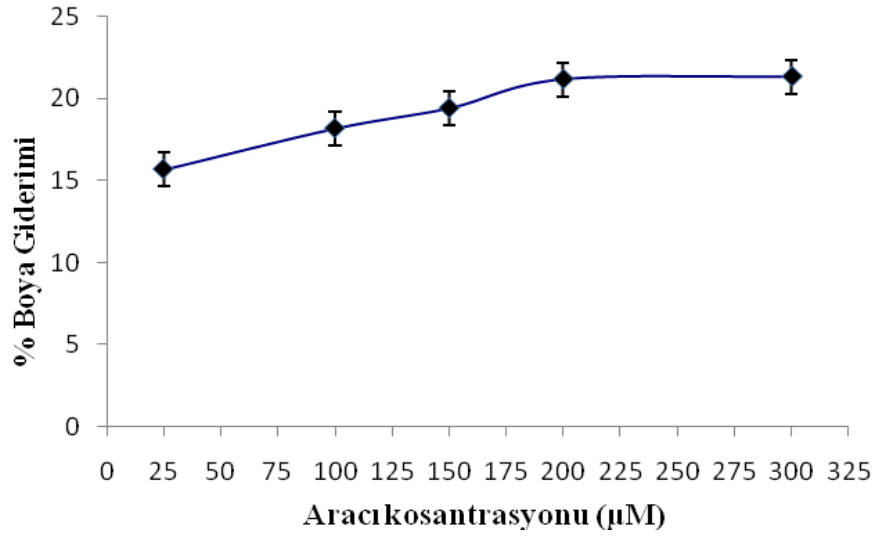
Enzimatik dekolorizasyonda ortam pH' sının etkisini araştırmak amacıyla pH 3-8 arası boya çözeltileri ile çalışılmış ve en uygun değer pH 6 olarak seçilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.4.1.1' de gösterilmiştir.



Şekil 4.4.1.1 Enzimatik dekolorizasyonda ortam pH değerinin etkisi. (Çalışma koşulları: başlangıç boya konsantrasyonu 10 mg/l, inkübasyon süresi 30dk., 1 ml 26,4 U/ml aktiviteye sahip enzim, 1 ml 100 µM aracı, inkübasyon sıcaklığı 35 °C)

4.4.2. Aracı Konsantrasyonunun Enzimatik Dekolorizasyona Etkisi

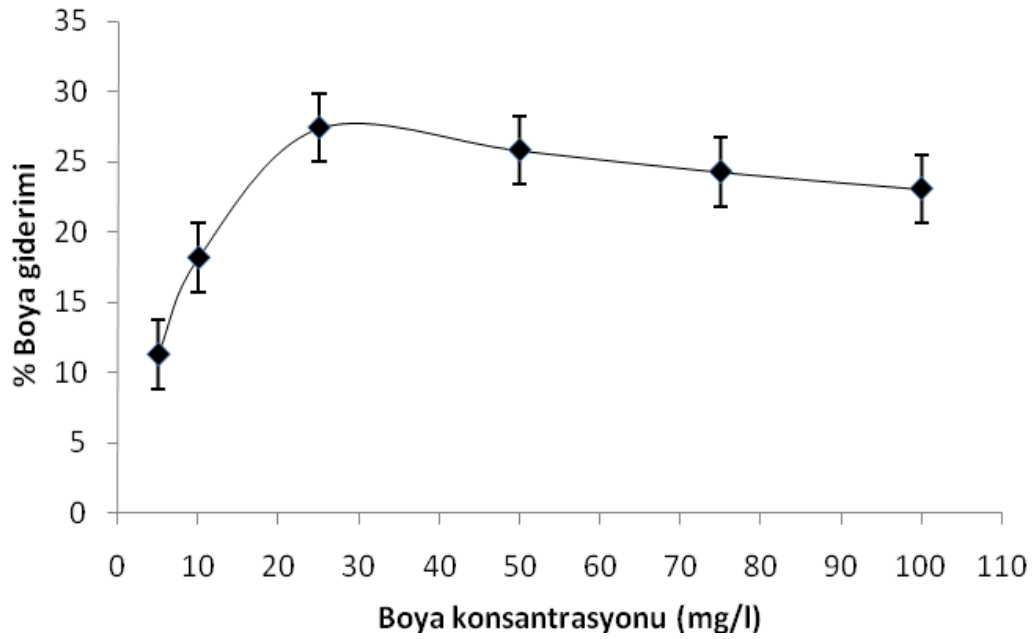
Aracı konsantrasyonunun enzimatik dekolorizasyona etkisini belirlemek amacı ile 25 μ M – 300 μ M arasındaki derişimlerde çalışmalar yapılmış ve en uygun derişim olarak 200 μ M belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.4.2.1. de gösterilmiştir.



Şekil 4.4.2.1 Enzimatik dekolorizasyonda aracı konsantrasyonunun etkisi (Çalışma koşulları: pH 6, başlangıç boya konsantrasyonu 10 mg/l, inkübasyon süresi 30dk., 1 ml 26 U/ml aktiviteye sahip enzim, aracı olarak 1 ml, inkübasyon sıcaklığı 35 °C)

4.4.3. Başlangıç Boya Konsantrasyonunun Enzimatik Dekolorizasyona Etkisi

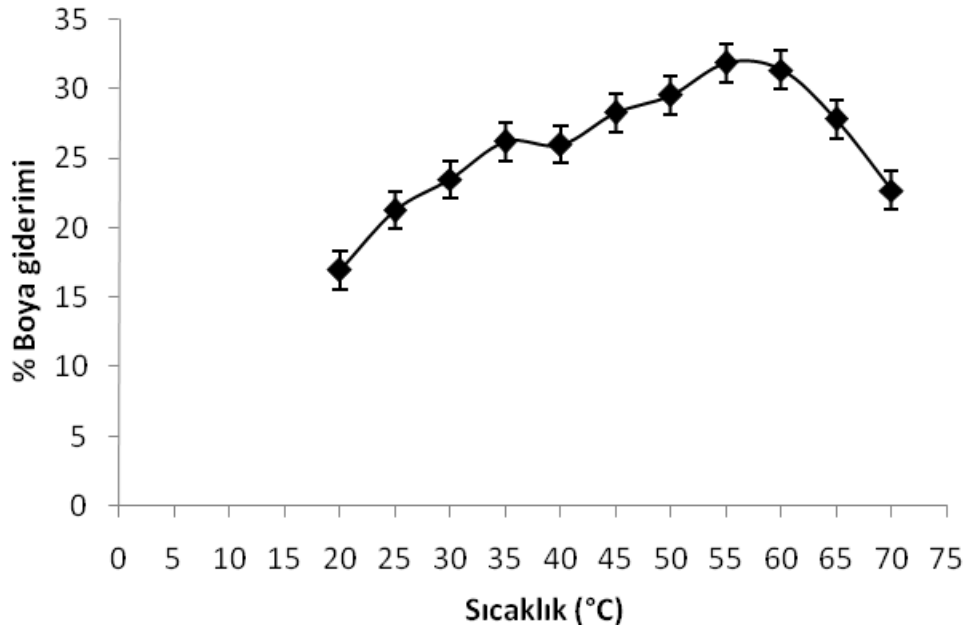
Başlangıç boya konsantrasyonunun enzimatik dekolorizasyona etkisini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada en uygun konsantrasyon 25 mg/l olarak bulunmuştur. Çalışma sonuçları Şekil 4.4.3.1.' de verilmiştir.



Şekil 4.4.3.1. Başlangıç boya konsantrasyonunun enzimatik dekolorizasyona etkisi. (Çalışma koşulları: pH 6, inkübasyon süresi 30dk, 1 ml 26,4 U/ml aktiviteye sahip enzim, 1ml 200 μ M aracı, inkübasyon sıcaklığı 30°C)

4.4.4. Ortam Sıcaklığının Enzimatik Dekolorizasyona Etkisi

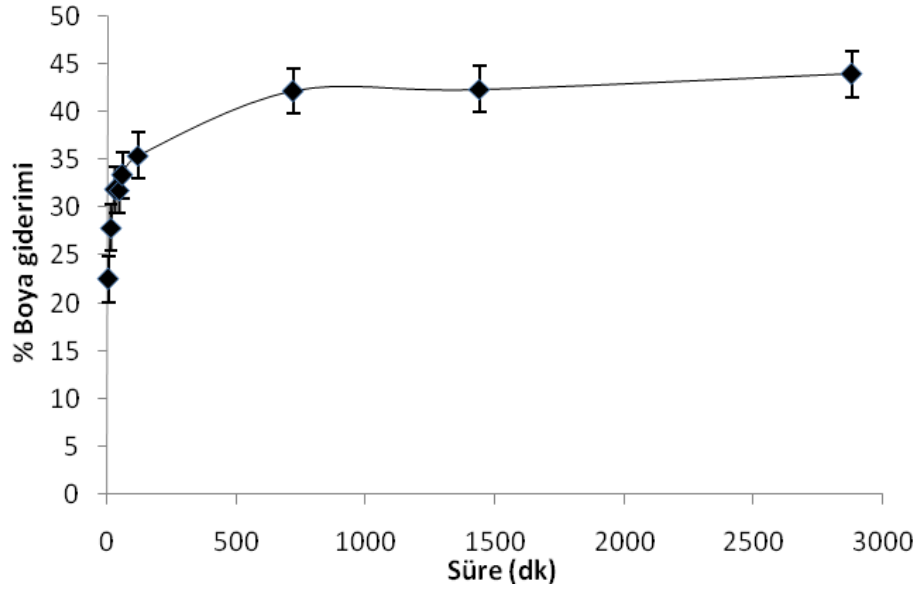
İnkübasyon sıcaklığının enzimatik dekolorizasyona etkisini belirlemek amacıyla 20-70 °C arası sıcaklık değerleri çalışılmış ve uygun inkübasyon sıcaklığı 55 °C olarak belirlenmiştir. Çalışma sonuçları Şekil 4.4.4.1.' de verilmiştir



Şekil 4.4.4.1 İnkübasyon sıcaklığının enzimatik dekolorizasyona etkisi (Çalışma koşulları: pH 6, enzim miktarı 1ml 25,3 U/ml aktiviteye sahip enzim, 1 ml 200 µM aracı, inkübasyon süresi 30 dk, başlangıç boya konsantrasyonu 25 mg/l)

4.4.5. İnkübasyon Süresinin Enzimatik Dekolorizasyona Etkisi

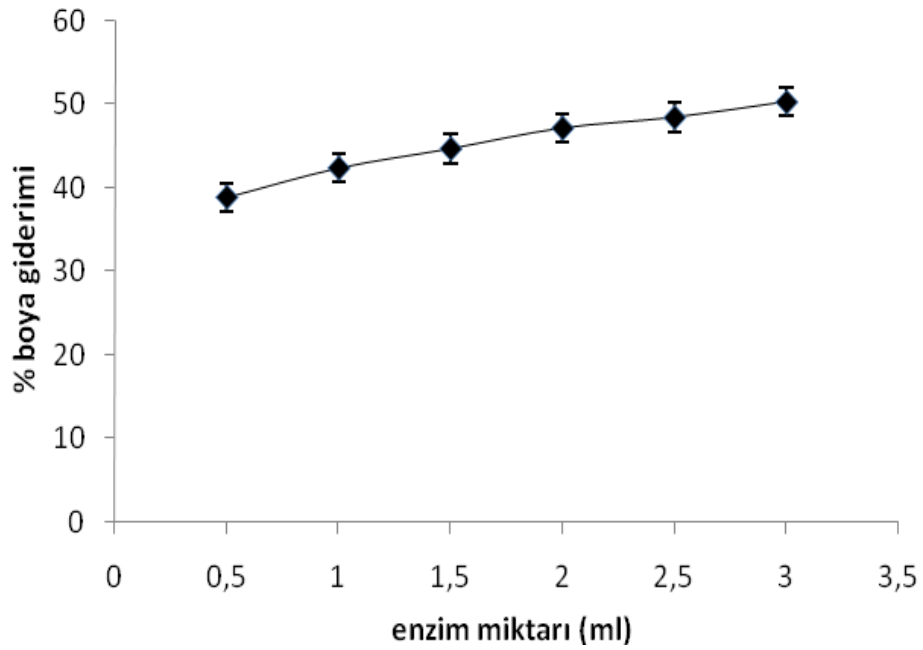
İnkübasyon süresinin enzimatik dekolorizasyon etkisini belirlemek amacıyla yapılan çalışmaya göre en uygun süre 12 saat seçilmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen sonuçlar Şekil 4.4.5.1’ de verilmiştir.



Şekil 4.4.5.1 İnkübasyon süresinin enzimatik dekolorizasyona etkisi. (Çalışma koşulları: pH 6, enzim miktarı 1ml 24,5 U/ml aktiviteye sahip enzim, 1 ml 200 μ M aracı, inkübasyon sıcaklığı 55 $^{\circ}$ C, başlangıç boya konsantrasyonu 25 mg/l)

4.4.6. Enzim Miktarının Enzimatik Dekolorizasyona Etkisi

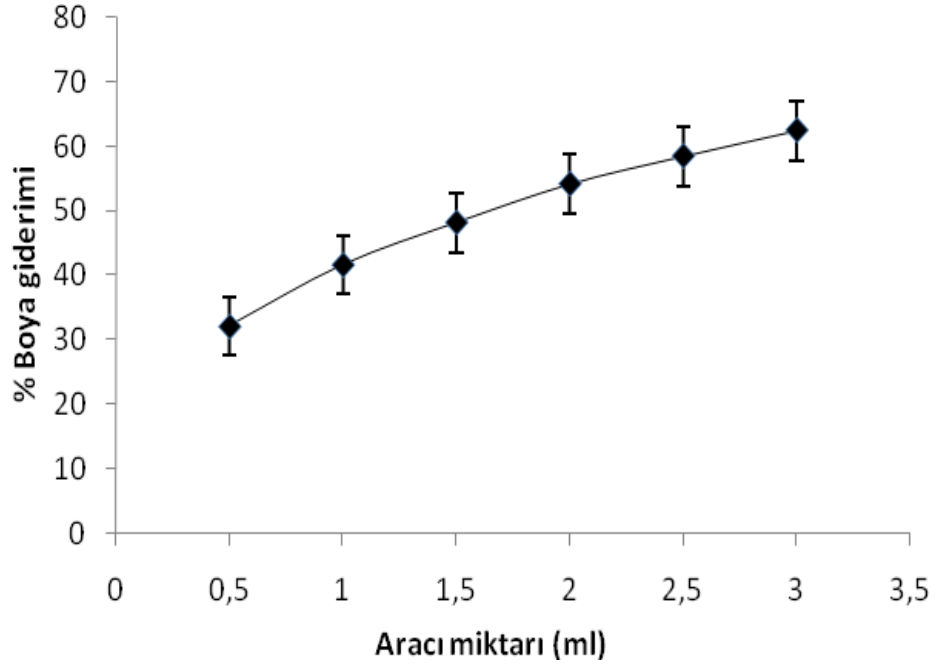
Enzim miktarının enzimatik dekolorizasyona etkisini belirlemek için 0,5-3 ml arasında değerler çalışılmıştır. Enzim miktarı artıkça % boya gideriminin artığı görülmüştür. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.4.6.1' de verilmiştir.



Şekil 4.4.6.1 Enzim miktarının enzimatik dekolorizasyona etkisi. (alışma koşulları: pH 6, inkübasyon süresi 12 h, inkübasyon sıcaklığı 55 °C, başlangıç boya konsantrasyonu 25 mg/l, 25,5 U/ml aktiviteye sahip enzim, 1 ml 200μM aracı).

4.4.7. Aracı Miktarının Enzimatik Dekolorizasyona Etkisi

Aracı miktarının enzimatik dekolorizasyonuna etkisini belirlemek için 0,5-3 ml arasındaki miktarlarda çalışıldı ve aracı miktarı arttıkça % boya gideriminin arttığı görülmüştür. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.4.7.1 de gösterilmektedir.

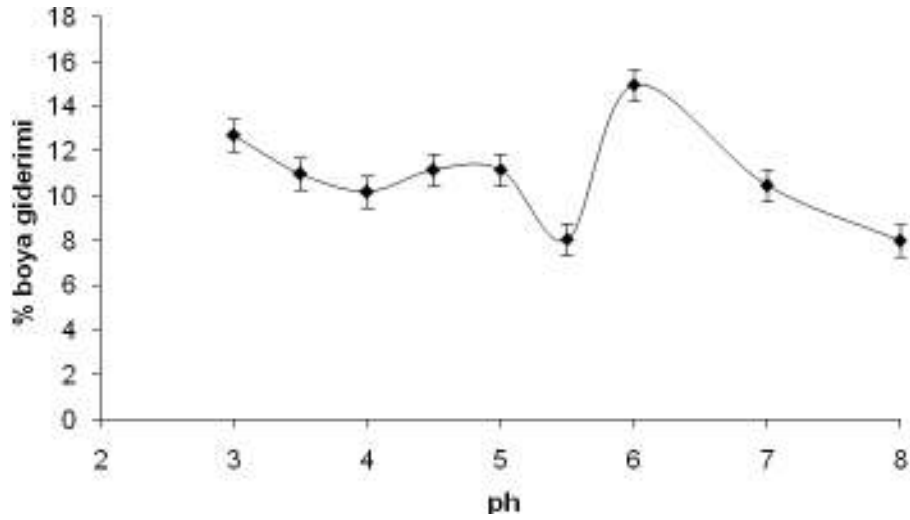


Şekil 4.4.7.1 Aracı miktarının enzimatik dekolorizasyona etkisi (Çalışma koşulları: pH 6, inkübasyon süresi 12 h, inkübasyon sıcaklığı 55 °C, başlangıç boya konsantrasyonu 25 mg/l, 1 ml 26,3 U/ml aktiviteye sahip enzim, 200µM aracı).

4.5. Rem Red RR' nin Lakkaz Aracılı Sistem (Vanilin) Kullanılarak Dekolorizasyonu

4.5.1. Ortam pH'nın Enzimatik Dekolorizasyona Etkisi

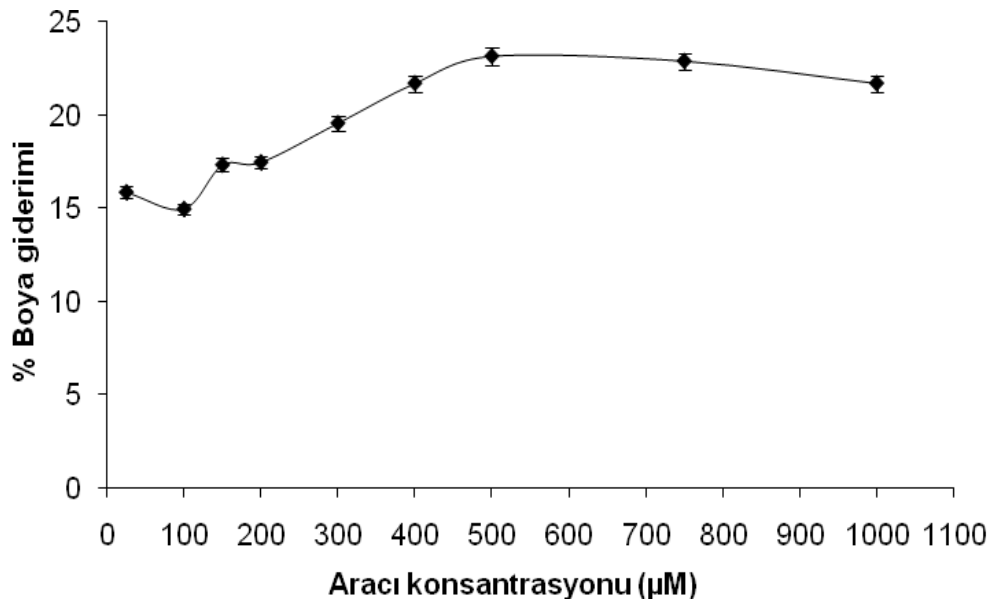
Enzimatik dekolorizasyonda ortam pH' sının etkisini araştırmak amacıyla pH 3-8 arası boya çözeltileri ile çalışılmış ve en uygun değer pH 6 olarak seçilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.5.1.1' de gösterilmiştir.



Şekil 4.5.1.1 Enzimatik dekolorizasyonda ortam pH' sının etkisi. (Çalışma koşulları: başlangıç boya konsantrasyonu 10 mg/l, inkübasyon süresi 30dk., 1 ml 25,5 U/ml aktiviteye sahip enzim, 1 ml 100 µM aracı, inkübasyon sıcaklığı 35 °C)

4.5.2. Aracı Konsantrasyonunun Enzimatik Dekolorizasyona Etkisi

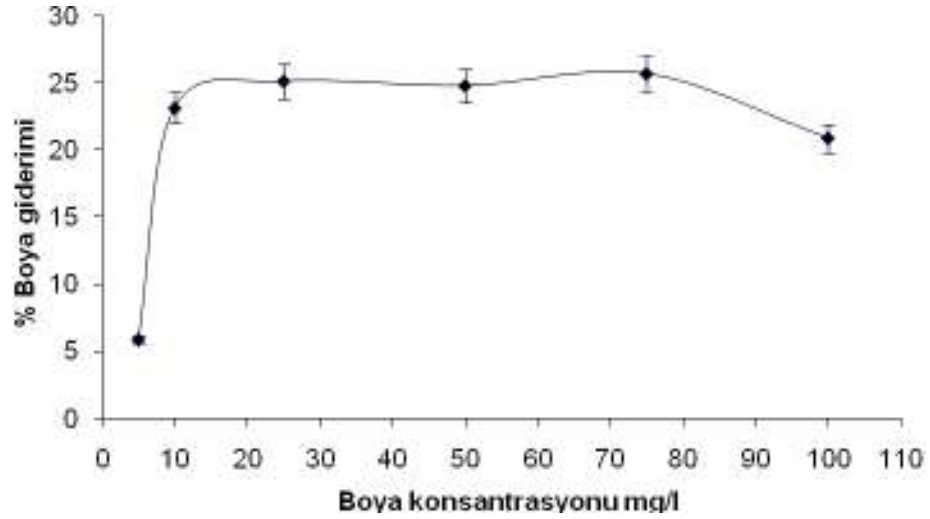
Aracı konsantrasyonunun enzimatik dekolorizasyona etkisini belirlemek amacıyla 25 μ M – 1000 μ M arasındaki derişimlerde çalışmalar yapılmış ve en uygun derişim olarak 500 μ M belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.5.2.1. de gösterilmiştir.



Şekil 4.5.2.1 Enzimatik dekolorizasyonda aracı konsantrasyonunun etkisi (Çalışma koşulları: pH 6, başlangıç boya konsantrasyonu 10 mg/l, inkübasyon süresi 30dk., 1 ml 25,5 U/ml aktiviteye sahip enzim, 1 ml aracı, inkübasyon sıcaklığı 35 °C)

4.5.3. Başlangıç Boya Konsantrasyonunun Enzimatik Dekolorizasyona Etkisi

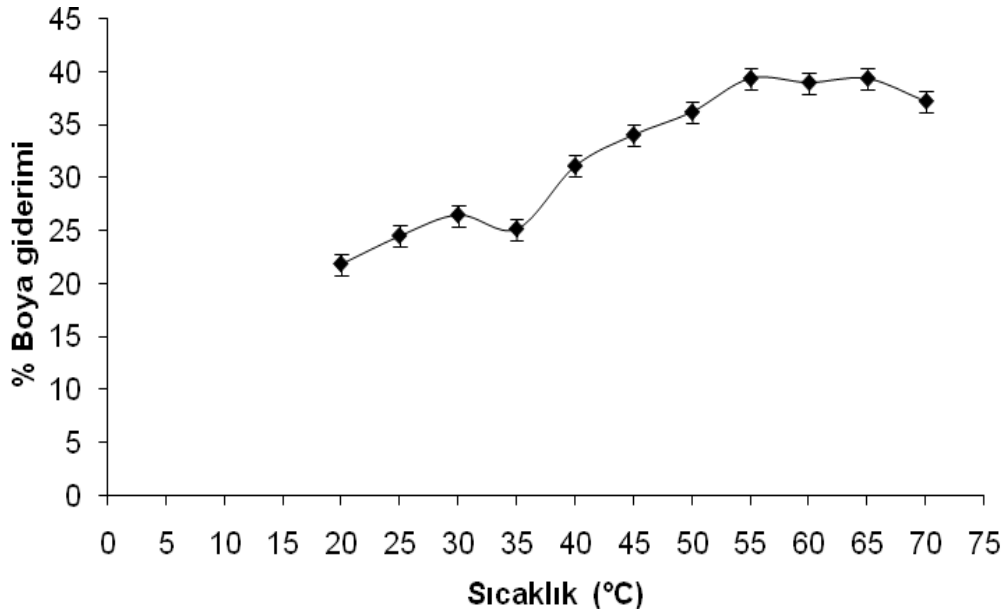
Başlangıç boya konsantrasyonunun enzimatik dekolorizasyona etkisini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada en uygun konsantrasyon 25 mg/l olarak bulunmuştur. Çalışma sonuçları Şekil 4.5.3.1.' de verilmiştir.



Şekil 4.5.3.1. Başlangıç boya konsantrasyonunun enzimatik dekolorizasyona etkisi. (Çalışma koşulları: pH 6, inkübasyon süresi 30dk, 1 ml 26,8 U/ml aktiviteye sahip enzim, 1ml 500 μ M aracı, inkübasyon sıcaklığı 35 °C)

4.5.4. Ortam Sıcaklığının Enzimatik Dekolorizasyona Etkisi

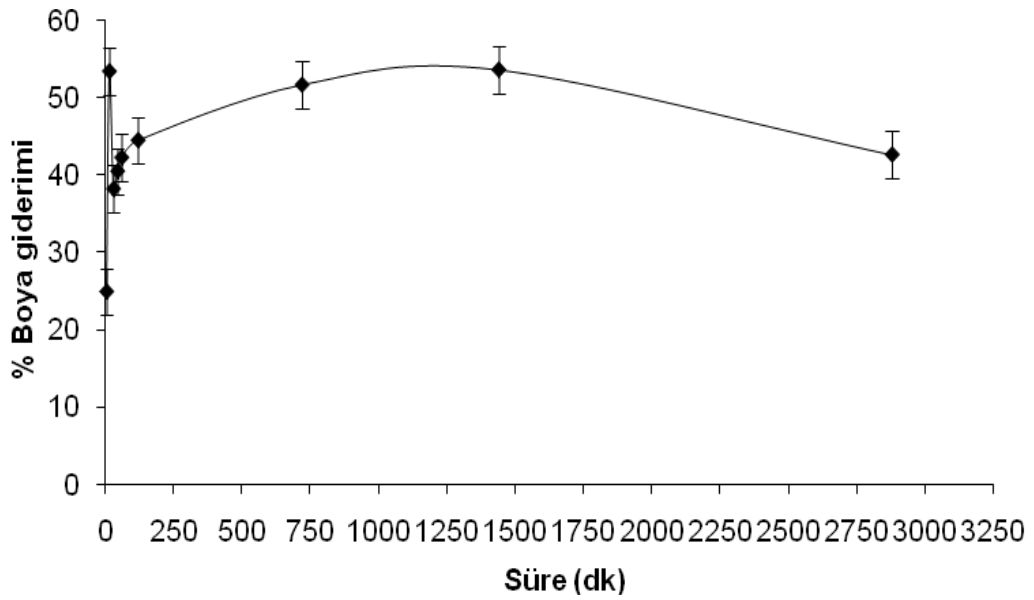
İnkübasyon sıcaklığının enzimatik dekolorizasyona etkisini belirlemek amacıyla 20-70 °C arası sıcaklık değerleri çalışılmış ve uygun inkübasyon sıcaklığı 55 °C olarak belirlenmiştir. Çalışma sonuçları Şekil 4.5.4.1.' de verilmiştir



Şekil 4.5.4.1 İnkübasyon sıcaklığının enzimatik dekolorizasyona etkisi (Çalışma koşulları: pH 6, enzim miktarı 1ml 26,8 U/ml aktiviteye sahip enzim, 1 ml 500 µM aracı, inkübasyon süresi 30 dk, başlangıç boya konsantrasyonu 25 mg/l)

4.5.5. İnkübasyon Süresinin Enzimatik Dekolorizasyona Etkisi

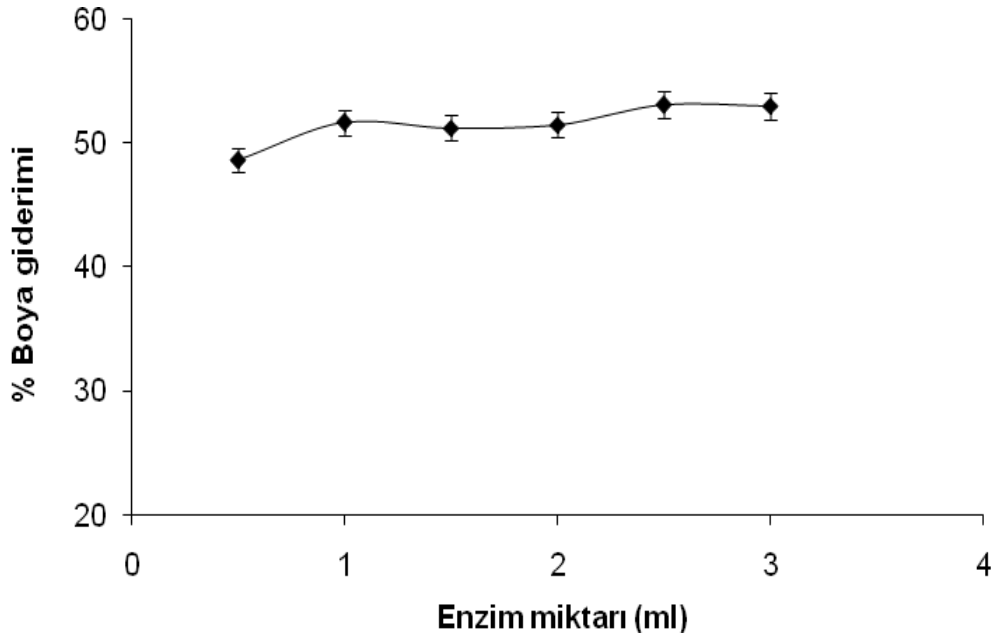
İnkübasyon süresinin enzimatik dekolorizasyon etkisini belirlemek amacıyla yapılan çalışmaya göre en uygun süre 12 saat seçilmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen sonuçlar Şekil 4.5.5.1’ de verilmiştir.



Şekil 4.5.5.1 İnkübasyon süresinin enzimatik dekolorizasyona etkisi. (Çalışma koşulları: pH 6, enzim miktarı 1ml 26,4 U/ml aktiviteye sahip enzim, 1 ml 500 μ M aracı, inkübasyon sıcaklığı 55 $^{\circ}$ C, başlangıç boya konsantrasyonu 25 mg/l)

4.5.6. Enzim Miktarının Enzimatik Dekolorizasyona Etkisi

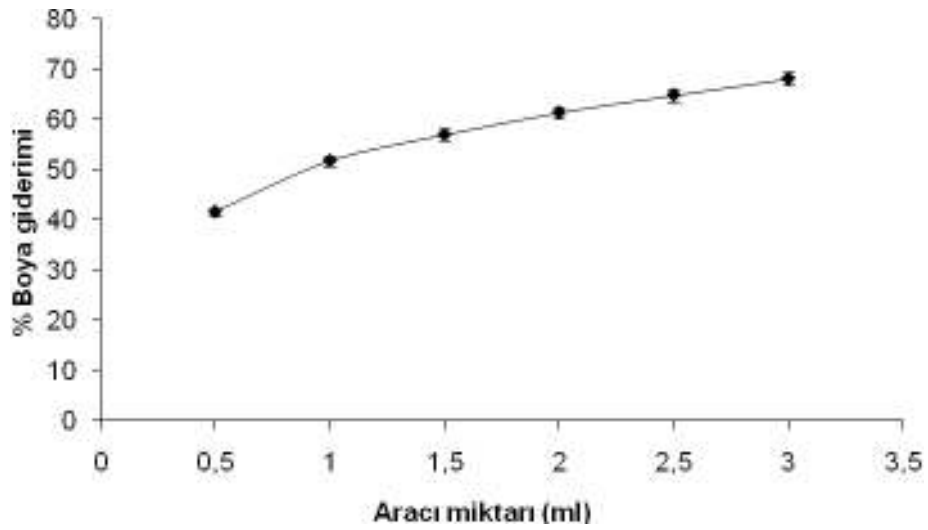
Enzim miktarının enzimatik dekolorizasyona etkisini belirlemek için 0,5-3 ml arasında değerler çalışılmıştır. Enzim miktarı artıkça % boya gideriminin arttığı görülmüştür. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.5.6.1' de verilmiştir.



Şekil 4.5.6.1 Enzim miktarının enzimatik dekolorizasyona etkisi. (Çalışma koşulları: pH 6, inkübasyon süresi 12 h, inkübasyon sıcaklığı 55 °C, başlangıç boya konsantrasyonu 25 mg/l, 27,1 U/ml aktiviteye sahip enzim, 1 ml 500µM aracı).

4.5.7. Aracı Miktarının Enzimatik Dekolorizasyona Etkisi

Aracı miktarının enzimatik dekolorizasyonuna etkisini belirlemek için 0,5-3 ml arasındaki miktarlarda çalışıldı ve aracı miktarı arttıkça % boya gideriminin arttığı görülmüştür. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.5.7.1 de gösterilmektedir.



Şekil 4.5.7.1 Aracı miktarının enzimatik dekolorizasyona etkisi (Çalışma koşulları: pH 6, inkübasyon süresi 12 h, inkübasyon sıcaklığı 55 °C, başlangıç boya konsantrasyonu 25 mg/l, 1 ml 25,25 U/ml aktiviteye sahip enzim, 500µM aracı).

4.6. Toksikite Denemeleri Sonuçları

Bu çalışmada kullanılan boyaların toksisitelerinin belirlenmesi için yapılan çalışmada *Artemia salina* organizması kullanılmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen sonuçlar çizelge 4.4.8.1, çizelge 4.4.8.2., çizelge 4.4.8.3 ve çizelge 4.4.8.4.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.6.1. *Artemia salina* ile yapılan Rem Blue RR toksisite çalışması sonuçları

	SÜRE	Ortamda Kalan Canlı Sayısı*			
		6. saat	12. saat	18. saat	24. saat
Başlangıç boyarmadde konsantrasyonu (mg/l)	10 (kontrol)	2	-	-	-
	10 (deney grubu)	2	-	-	-
	25 (kontrol)	-	-	-	-
	25 (deney grubu)	-	-	-	-
	50 (kontrol)	1	-	-	-
	50 (deney grubu)	-	-	-	-
	75 (kontrol)	-	-	-	-
	75 (deney grubu)	-	-	-	-
	100 (kontrol)	-	-	-	-
	100 (deney grubu)	-	-	-	-

*Başlangıçta her bir petride 10 adet canlı *Artemia salina* bulunmaktadır. Deney grubuna belirtilen boyarmadde konsantrasyonunda çalışılmış ve her bir ortama 1ml lakkaz ilave edilmiştir. Kontrol grubu, denatüre edilmiş lakkaz ilave edilerek oluşturulmuştur.

Çizelge 4.6.2. *Artemia salina* ile yapılan Dylon navy 17 toksisite çalışması sonuçları

	SÜRE	Ortamda Kalan Canlı Sayısı*			
		6. saat	12. saat	18. saat	24. saat
Başlangıç boyarmadde konsantrasyonu (mg/l)	10 (kontrol)	9	4	2	0
	10 (deney grubu)	9	5	2	1
	25 (kontrol)	9	5	2	0
	25 (deney grubu)	10	5	1	1
	50 (kontrol)	9	4	2	0
	50 (deney grubu)	9	7	2	2
	75 (kontrol)	9	7	5	0
	75 (deney grubu)	9	7	2	1
	100 (kontrol)	10	7	3	0
	100 (deney grubu)	10	7	4	2

*Başlangıçta her bir petride 10 adet canlı *Artemia salina* bulunmaktadır. Deney grubuna belirtilen boyarmadde konsantrasyonunda çalışılmış ve her bir ortama 1ml lakkaz ilave edilmiştir. Kontrol grubu, denatüre edilmiş lakkaz ilave edilerek oluşturulmuştur

Çizelge 4.6.3. *Artemia salina* ile yapılan Reactive Red 198 toksisite çalışması sonuçları

	SÜRE	Ortamda Kalan Canlı Sayısı*			
		6. saat	12. saat	18. saat	24. saat
Başlangıç boyarmadde konsantrasyonu (mg/l)	10 (kontrol)	3	2	1	0
	10 (deney grubu)	6	4	2	2
	25 (kontrol)	3	1	1	1
	25 (deney grubu)	7	6	6	4
	50 (kontrol)	4	2	2	1
	50 (deney grubu)	8	4	4	2
	75 (kontrol)	6	2	2	1
	75 (deney grubu)	9	4	4	2
	100 (kontrol)	6	1	4	0
	100 (deney grubu)	8	5	4	3

*Başlangıçta her bir petride 10 adet canlı *Artemia salina* bulunmaktadır. Deney grubuna belirtilen boyarmadde konsantrasyonunda çalışılmış ve her bir ortama 1ml lakkaz ilave edilmiştir. Kontrol grubu, denatüre edilmiş lakkaz ilave edilerek oluşturulmuştur

Çizelge 4.6.4. *Artemia salina* ile yapılan Rem Red RR toksisite çalışması sonuçları

	SÜRE	Ortamda Kalan Canlı Sayısı*			
		6. saat	12. saat	18. saat	24. saat
Başlangıç boyarmadde konsantrasyonu (mg/l)	10 (kontrol)	4	3	2	0
	10 (deney grubu)	6	3	1	1
	25 (kontrol)	3	2	2	0
	25 (deney grubu)	7	5	5	5
	50 (kontrol)	6	5	1	0
	50 (deney grubu)	7	5	5	5
	75 (kontrol)	4	4	4	0
	75 (deney grubu)	8	3	3	3
	100 (kontrol)	4	3	3	0
	100 (deney grubu)	6	3	2	2

*Başlangıçta her bir petride 10 adet canlı *Artemia salina* bulunmaktadır. Deney grubuna belirtilen boyarmadde konsantrasyonunda çalışılmış ve her bir ortama 1ml lakkaz ilave edilmiştir. Kontrol grubu, denatüre edilmiş lakkaz ilave edilerek oluşturulmuştur

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Endüstrileşmenin doğal sonuçlarından birisi olan çevresel kirleticilerin ortamda bulunmaları ne yazık ki çeşitli sorunlarla karşımıza çıkmaktadır. Bu süreçte gerekli tedbirlerin alınmaması veya geç kalınması durumlarında, daha ciddi sorunlar canlıların geleceğini tehdit eder boyutlara da ulaşabilmektedir. Çevresel kirleticiler arasında önemli bir grubu oluşturan ve tekstil endüstrisinin atığı olan tekstil boyarmaddelerinin kullanımı ve alıcı ortamlardaki konsantrasyonları her geçen gün artmaktadır. Bu nedenle çeşitli tekstil boyarmaddelerinin arıtımı üzerine pek çok araştırmacı çalışmalar yapmaktadır. Bu tez çalışması kapsamında, kirleticilerin arıtımında önemli bir potansiyele sahip olduğu bilinen lakkaz enzimi ile Reaktif Red 198, Rem Blue RR, Dylon Navy 17, Rem Red RR ve Rem Yellow RR boyarmaddelerinin dekolorizasyonları hedeflenmiştir. Bu boyarmaddelerden Rem Blue RR ve Dylon Navy 17 için sadece lakkaz enzimi kullanılarak dekolorizasyon gerçekleştirilmiş ve optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Reaktif Red 198 ve Rem Red RR boyarmaddeleri lakkaz enzimi ile birlikte ortama ilave edilen çeşitli aracılı sistemler kullanıldığında dekolorizasyonun gerçekleştiği görülmüştür. Denenen lakkaz aracılı sistemlerden en etkilisi vanilindir. Lakkaz enzimi ve aracılı sistem olarak vanilin ile Reaktif Red 198 ve Rem Red RR boyarmaddeleri için optimum koşullar belirlenmiştir. Rem Yellow RR, boyarmaddesi için her hangi bir dekolorizasyon elde edilmemiştir. Elde edilen optimum değerlerde yapılan dekolorizasyon çalışmaları ile birlikte boyarmaddelerin toksisitelerindeki değişimler *Artemia salina* canlı bireyleri kullanılarak takip edilmiştir. Ayrıca çalışmalarda enzim kaynağı olarak kullanılan lakkaz aktivitesi yüksek kültür süpernatantı katalaz ile muamele edilerek, dekolorizasyondan sorumlu enzimin lakkaz olduğu desteklenmiştir.

5.1. Lakkaz Enzim İle Rem Blue RR Boyar Maddesi Dekolorizasyonu

Ortam pH değerinin enzimatik dekolorizasyona etkisini incelemek için pH 3 ile 8 arasında çalışılmıştır. Çalışmada kullanılan enzim 24,4 U/ml aktiviteye sahiptir. Elde edilen sonuçlara göre en uygun pH değeri 30 dakika sonunda pH 5 olarak belirlenmiştir.

Bu çalışmada elde edilen lakkaz beyaz çürükçül funguslardan elde edilmiştir. Beyaz çürükçül funguslarından elde edilen lakkaz için pH aralığı 3-7,5 aralığındadır. Ancak lakkaz enzimi için en uygun pH kullanılan substrata göre değişmektedir (Birhanlı, 2003). Mechichi vd., *Trametes trogii*' den elde ettikleri 0.2 U/ml lakkaz ile Remazol Brilliant Blue R boyasının degradasyonunda pH 5 de % 97 oranında giderim bildirmişlerdir (Mechichi vd., 2006). Enzimatik dekolorizasyonda ortam pH değerinin etkisi kullanılan boyanın özelliğine göre farklılık göstermektedir.

Başlangıç boya konsantrasyonunu belirlemek için 5-100 mg/l arasındaki konsantrasyonlarda çalışılmıştır. 50 mg/l konsantrasyona kadar dekolorizasyonda artış olmuş ve en yüksek değer % 54 olarak 50 mg/l olarak tespit edilmiştir. Bu değerden sonra boya gideriminin de azalma görülmektedir.

Enzimatik dekolorizasyona en uygun enzim miktarının belirlenmesi için yapılan çalışmada beklendiği gibi enzim miktarı arttıkça boya giderimi de artmaktadır. Ancak, çalışma hacminin 10 ml olduğundan dolayı daha fazla dilüsyon oluşturmamak için bundan sonraki denemelerde 1 ml enzim eklenerek çalışmalara devam edilmiştir.

İnkübasyon sıcaklığının enzimatik dekolorizasyona etkisini belirlemek amacıyla 20 - 45°C arası çalışılmıştır. 30 °C'ye kadar sıcaklık artışına paralel olarak boya giderimi de artmıştır. En uygun sıcaklık olarak 30 °C seçilmiştir. Beyaz çürükçül funguslardan elde edilen lakkaz enzimi kullanılarak yapılan boyarmadde dekolorizasyon çalışmalarında farklı sıcaklık değerleri elde edilebilmektedir. Bu grupta elde edilen enzim için optimum sıcaklık değerleri genelde 30-80°C arasındadır. Bu boyar maddenin türüne ve lakkazın elde edildiği türe göre de farklılık gösterebilmektedir. Ancak yüksek sıcaklıklarda elde edilen yüksek verimler çevresel uygulamalar için bir dezavantajdır. Dolayısıyla bu çalışmaların kinetik çalışmalar ile desteklenmesi gereği açıktır. Bu çalışmalardan elde edilecek veriler belki de bu dezavantajı ortadan kaldıracaktır.

İnkübasyon süresinin enzimatik dekolorizasyona etkisini incelemek amacıyla 5.-15-30-45.-60.-120. dakikalarda ve 12-24-36 ve 48 saatlerde örnekler alınmıştır. Sonuçlarda da görüldüğü gibi süre arttıkça boya giderimi de artmaktadır. Çalışma sonunda en uygun inkübasyon süresi olarak 36 saat seçilmiştir ve boya giderimi

%77,86'dir. Michniewicz vd., (2007) de yaptıkları çalışmada *Cerrana unicolor*' dan elde ettikleri lakkaz ile Acid Blue 62, Reactive Blue 81., Acid Red 27 degradasyonunda en uygun sürenin Acid Blue 62 için 12,5 dk, Reactive Blue 81 için 20 dk ve Acid Red 27 daha uzun bir süre olarak 24 saati belirlemişlerdir (Michniewicz vd., 2007). Bu süre değişimleri çalışmada kullanılan boyar maddelerin türüne ve özelliklerine göre değişmekle beraber lakkazın elde dildiği türe ve aktivitesine göre değişebilmektedir.

5.2. Lakkaz Enzim İle Dylon Navy 17 Boyar Maddesi Dekolorizasyonu

Ortam pH değerinin enzimatik dekolozizasyona etkisini incelemek için pH 3 ile 8 arasında çalışılmıştır. Çalışmada kullanılan enzim 25,3 U/ml aktiviteye sahiptir. Elde edilen sonuçlara göre en uygun pH, 30 dakika sonunda pH 5,5 olarak belirlenmiştir. Literatürde beyaz çürükçül funguslardan elde edilen lakkaz enzimi ile boya giderimi için optimum pH aralığı 3-5 arasındadır. Bu durum bazen kullanılan boyarmaddenin türüne, kimyasal yapısına ve çalışılan fungus türüne göre değişebilmektedir. Michniewicz vd., (2007) de yaptıkları çalışmada lakkazın farklı iki izoenzimi ve ham lakkaz ile yaptıkları çalışmada Acid Blue 62, Acid Blue 40, Reactive Blue 81, Direct Black 22 ve. Acid Red 27 dekolozizasyonunda en uygun pH değerinin 3,5 olduğunu belirlemişlerdir (Michniewicz vd., 2007).

Başlangıç boya konsantrasyonunu belirlemek için 5-100 mg/l arasındaki konsantrasyonlarda çalışılmıştır. 50 mg/l konsantrasyona kadar dekolozizasyonda artış olmuş ve en yüksek değer % 61,92 olarak 50 mg/l olarak tespit edilmiştir. Bu değerden sonra boya gideriminin de azalma görülmektedir. Çalışmada kullanılan enzim 25,34 U/ml aktifliğe sahiptir.

Enzimatik dekolozizasyona en uygun enzim miktarının belirlenmesi için yapılan çalışmada enzim miktarı arttıkça boya gideriminin de artmaktadır. Buna bağlı olarak en yüksek giderim 4 ml enzim varlığında sağlanmıştır. Benzer durum Rem Blue RR boyarmaddesi için elde edilen sonuçlarda da açıklandığı gibi, çalışmalara 1 ml enzim ile tercih edilmiştir.

İnkübasyon sıcaklığının enzimatik dekolorizasyona etkisini belirlemek amacıyla 20-45 °C arası çalışılmıştır. 30 °C a kadar sıcaklık artışına paralel olarak boya giderimi de artmıştır. En uygun sıcaklık olarak 30°C seçilmiştir. Beyaz çürükçül funguslardan elde edilen lakkaz enzimi kullanılarak yapılan boyar madde dekolorizasyon çalışmalarında farklı sıcaklık değerleri elde edilebilmektedir. Bu gruptal elde edilen enzim için optimum sıcaklık değerleri genelde 30-80 °C arasındadır. Bu boyar maddenin türüne ve lakkazın elde edildiği türe göre de farklılık gösterebilmektedir.

İnkübasyon süresinin enzimatik dekolorizasyon etkisini belirlemek amacıyla 5 dakika ile 24 saat arasında değişen sürelerde çalışılmış ve en uygun süre 120 dakika olarak belirlenmiştir.

5.3. Lakkaz Aracılı Sistem Kullanılarak Reactive Red 198 Dekolorizasyonu

Enzimatik dekolorizasyonda ortam pH'ının etkisini araştırmak amacıyla pH 3-8 arası boya çözeltileri ile çalışılmış ve en uygun değer pH 6 olarak seçilmiştir. Ortam pH değeri sadece lakkaza değil, aracı ile lakkazın beraber çalışması üzerine etkilidir. Camarero vd., 2004 ligninden türeyen doğal ve sentetik maddeleri aracı olarak kullanmış ve farklı tipteki yıkıma dirençli boyar maddeler üzerinde kullanmışlardır. Burada doğal aracı olarak kullandıkları acetosyringone diğer sentetik ve doğal aracılara karşın en yüksek boya giderimini pH 3 de sağlamıştır. Çalışma sonunda bu araçlar ile % 90 a varan boyar madde giderimi gerçekleştirmişlerdir. Sonuçta görüldüğü gibi aracı olarak kullanılan bazı maddeler asidik pH larda da etkili olabilmektedir. Aynı çalışmada sentetik aracı olarak kullandıkları promazine ile % 90 lara varan boya giderimine pH 5 de ulaşmışlardır. Doğal aracı olarak kullandıkları vanilin ile de yine pH 5 değerinde en yüksek % 25 boya giderimine ulaşmışlardır (Camarero, 2004).

Aracı konsantrasyonunun enzimatik dekolorizasyona etkisini belirlemek amacı ile 25µM – 300 µM arasındaki derişimlerde çalışmalar yapılmış ve en uygun derişim olarak 200 µM belirlenmiştir. Aracı konsantrasyonu arttıkça yüzde boya giderimi de artmıştır. Lakkazların bilinen redoks potansiyelleri, fenolik olmayan bileşiklerin potansiyellerinden düşüktür. Bu yüzden bu enzimler, bu tür maddeleri oksitleyemezler. Ancak elektron transfer araçları olarak hareket edebilen küçük moleküllerin varlığında

lakkazlar fenolik olmayan yapıları oksitleyebilmektedir. Enzimatik dekolorizasyon için gereken aracı konsantrasyonu gerekli lakkazın substratı oksitleyebilmesi için gerekli olan redoks potansiyeli ile doğrudan ilişkilidir. Camarero vd., 2004 yılında yaptıkları çalışmada konsantrasyonu 25 μ M olan vanilin ile en fazla % 25 boya giderimi gerçekleştirmişlerdir.

Başlangıç boya konsantrasyonunun enzimatik dekolorizasyona etkisini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada en uygun konsantrasyon 25 mg/l olarak bulunmuştur. Bu değerden sonra % boya gideriminin de azalma görülmektedir.

İnkübasyon sıcaklığının enzimatik dekolorizasyona etkisini belirlemek amacıyla 20-70 °C arası sıcaklık değerleri çalışılmış ve uygun inkübasyon sıcaklığı 55 °C olarak belirlenmiştir.

İnkübasyon süresinin enzimatik dekolorizasyon etkisini belirlemek amacıyla yapılan çalışmaya göre en uygun süre 12 saat olarak seçilmiştir. Fenolik ve ya fenolik olmayan substratların lakkaz tarafından oksidasyonunda sınırlayıcı faktör substrattan T1 bakırına ilk elektron transferinin yapılmasıdır. Bu durum enzim ile substrat arasındaki farklı redoks potansiyelinden kaynaklanmaktadır. Aracıların bu farklılığı değiştirme yeteneğine göre de inkübasyon süresi değişebilmektedir (Camarero vd., 2005). Camarero vd., 2005 de yaptığı Azure B boyar maddesinin dekolorizasyonunu üzerine yaptıkları çalışmada lakkaz tek başına bu boyar maddeyi oksitleyememiştir. Aracı olarak 100 μ M acetosyringone and p-coumaric acid kullandıklarında sırasıyla 15 dakikada % 40 ve 2 saatte %60 renk giderimi sağlamışlardır.

Enzimatik dekolorizasyona en uygun enzim miktarının belirlenmesi için yapılan çalışmada enzim miktarı arttıkça boya giderimi de artmaktadır. Buna bağlı olarak en yüksek giderim 4 ml enzim varlığında sağlanmıştır. Ancak bu değere rağmen çalışmada 1 ml enzim kullanılmıştır. Bunun nedeni toplam çalışma hacmi 10 ml olduğu için 4 ml enzimle çalışıldığında reaksiyon hacminin %40 oranında seyreltilmiş olacağı düşüncesidir.

Aracı miktarının enzimatik dekolorizasyonuna etkisini belirlemek için 0,5-3 ml arasındaki miktarlarda çalışıldı ve aracı miktarı arttıkça % boya gideriminin arttığı

görülmüştür. En yüksek giderim 3 ml v anilin ilave edildiğinde sağlanmıştır. Toplam reaksiyon hacmi 10 ml dir. Bu hacmin 1 ml'sinin enzim olduğu düşünüldüğünde ortama ilave edilecek aracı miktarı doğrudan dilüsyona da neden olacağı için daha yüksek değerlerde çalışma yapılmamıştır.

5.4. Lakkaz Aracılı Sistem Kullanılarak Rem Red RR Dekolorizasyonu

Enzimatik dekolorizasyonda ortam pH' sının etkisini araştırmak amacıyla pH 3-8 arası boya çözeltileri ile çalışılmış ve en uygun değer pH 6 olarak seçilmiştir. Çalışmada kullanılan lakkaz enziminin aktivitesi 25.5 U/ml olarak belirlenmiştir. Lakkaz enziminin Rem Red RR giderimindeki etkisini arttırmak için deney ortamına aracı olarak 100µM 1 ml vanilin eklenmiştir. Soares ve arkadaşlarının 2000 de yaptıkları çalışmada Remazol brilliant blue R boyar maddesinin gideriminde 11 mM 1-hydroxybenzotriazole aracı olarak kullanmış ve pH 5,5 da %50 giderim almışlardır. (Soares, 2000). Farklı organizmalardan elde edilen lakkazların optimum pH değerindeki değişme onların T1 bölgesindeki bakır iyonunun redoks potansiyelinden kaynaklanmaktadır (Garzillo, 2001). Lakkaz ile substrat arasındaki redoks potansiyel farkını düşürmek için ortama konulan aracı redoks potansiyel değerinde değişikliğe sebep olduğundan dolayı farklı pH değerlerinin ortaya çıkmasına neden olduğu düşünülebilir.

Aracı konsantrasyonunun enzimatik dekolorizasyona etkisini belirlemek amacı ile 25µM – 1000 µM arasındaki derişimlerde çalışmalar yapılmış ve en uygun derişim olarak 500 µM belirlenmiştir. Görüldüğü gibi aracı konsantrasyonu arttıkça % boya gideriminin arttığı gözlenmiştir. Camarero ve arkadaşları 2005 yılında Aniline Blue üzerine yaptıkları çalışmada tek başına lakkaz ile 6 saatte %35 boya giderimi gerçekleştirmişlerdir. Çalışma ortamına 100 µM ethyl vanilin ilave ettiklerinde % 70 oranında dekolorizasyon sağlamışlardır (Camarero, 2005).

Başlangıç boya konsantrasyonunun enzimatik dekolorizasyona etkisini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada 5-100 mg/l arasındaki konsantrasyonlarda çalışılmış ve en uygun konsantrasyon 25 mg/l olarak belirlenmiştir.

Enzim miktarının enzimatik dekolorizasyona etkisini belirlemek amacı ile 0,5-3 ml arasındaki miktarlarda lakkaz aktivitesi yüksek kültür süpernatantı kullanılmıştır. Ayrıca ortama 1 ml aracı ilave edilmiştir. Enzim miktarındaki artışa bağlı olarak yüzde dekolorizasyon miktarının arttığı gözlenmiştir. Ancak yüksek miktarda lakkaz ilavesi çalışma ortamını seyrelteceğinden çalışmaya 1 ml ile devam edilmiştir.

İnkübasyon sıcaklığının enzimatik dekolorizasyona etkisini belirlemek amacıyla 20-70 °C arası sıcaklık değerleri çalışılmış ve uygun inkübasyon sıcaklığı 55 °C olarak belirlenmiştir. Sıcaklık arttıkça boya giderimi de artmıştır. Lakkaz enziminin 60 °C'ye kadar sıcaklık artışlarından etkilenmediği ve hatta yüksek sıcaklık değerlerinde düşük sıcaklık değerlerine kıyasla daha stabil olduğu bilinmektedir (Monteiro ve Carvalho, 1998). Yüksek sıcaklıkta elde edilen yüksek dekolorizasyon değeri lakkaz enziminin stabilitesindeki artış ile açıklanabilir.

İnkübasyon süresinin enzimatik dekolorizasyon etkisini belirlemek amacıyla 5-15-30-45-60-120. dakikalarda ve 12-24 ve 36. saatlerde örnekler alınmıştır. Çalışmada en uygun süre %51,65 boya giderimi ile 12 saat olarak belirlenmiştir. Ciullini ve arkadaşları 2008 yılında yaptıkları çalışmada Acid blue 324 boyar maddesinin giderimi üzerine yaptıkları çalışmada aracı olarak HBT kullanmışlar ve 4 saat sonunda % 85 giderim sağlamışlardır (Ciullini, 2008).

Aracı miktarının enzimatik dekolorizasyonuna etkisini belirlemek için 0,5-3 ml arasındaki miktarlarda çalışılmış ve aracı miktarı arttıkça % boya gideriminin arttığı görülmüştür. 3 ml aracı miktarında daha fazla boyar madde giderimi elde edilmiştir.

Bu çalışma sonucunda elde edilen verilere ve yapılan literatür taramasına göre lakkaz enzimi ile Dylon Navy 17, Rem Blue RR ve Rem Red RR boyar maddelerinin dekolorizasyonu için literatüre ilk kez katkı sağlandığı ve ayrıca lakkaz aracılı sistemlerin de bu boyarmaddelerin dekolorizasyonunda kullanılabilirliği gösterilmiştir.

5.5. Toksikite Çalışmaları

Artemia salina canlı hücreleri kullanılarak yapılan çalışmalarda dekolorizasyon ile birlikte detoksifikasyonun olup olmadığı araştırılmıştır. Her bir boyar madde için 10- 100 mg/l başlangıç boyarmadde konsantrasyonları aralığında çalışmalar yapılmıştır. Toksikite çalışmalarında 25 ml boyarmadde ve 10 adet canlı *A. salina* bireylerinden 10 adet, canlılıkları mikroskopla kontrol edilerek bir petri kabına konulmuştur. Toksikite çalışması sürecinde 6 saat aralıklarla *A. salina* bireylerinin canlılıkları takip edilmiş elde edilen sayım sonuçları Çizelge 4.6.1.- 4.6.4'te verilmiştir. Denemede kullanılan boyarmaddelerden Rem Blue RR en yüksek toksisiteye sahip boyarmadde olarak belirlenmiştir. Toksikite çalışmasında 6. saatten itibaren hem deney hem de kontrol gruplarında hiçbir canlı birey kalmamıştır. Bu nedenle Rem Blue RR boyarmaddesi için dekolorizasyonun gerçekleştiği ancak detoksifikasyonun oluşmadığı söylenebilir. Dylon navy 17 boyarmaddesi için Rem Blue RR'den farklı olarak bir detoksifikasyondan söz edebiliriz. Denenen tüm başlangıç boyarmadde konsantrasyonlarında kontrol gruplarında 24 saat süre sonucunda ortamda hiç canlı birey kalmadığı, ancak deney gruplarında ise ortamda canlı bireylerin olduğu görülmüştür. Bu durum dekolorizasyon ile birlikte detoksifikasyonun gerçekleştiğini göstermiştir. Benzer bir durum Reaktif Red 198 ve Rem Red RR içinde görülmüştür. Denenen tüm konsantrasyonlarda detoksifikasyon gözlenmiştir.

Bu tez çalışması kapsamında yapılan tüm denemelerde Gedikli (2008) tarafından bildirildiği biçimde *Trametes versicolor* hücreleri buğday kepeği ilave edilmiş potato dekstroz broth besiyerinde geliştirilmiştir (Gedikli, 2008). İnkübasyon süresinin sonunda lakkaz aktivitesi yüksek olan kültür süpernatantı ham enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Dekolorizasyondan lakkaz enziminin sorumlu olduğunun belirlenebilmesi için ortamda bulunma olasılığı yüksek olan ve dekolorizasyona da katkısının olabileceği düşünülen Lignin peroksidaz ve Mangan peroksidaz enzimlerinin aktivitelerinin sınırlandırılması için kültür süpernatantı katalaz ile muamele edilmiştir. Böylece LiP ve MnP'nin olası aktiviteleri için ortamdaki H₂O₂ tamamen uzaklaştırılmıştır. Elde edilen optimum koşullarda katalaz ilave edilmiş kültür süpernatantı ile yapılan denemelerde tüm boyarmaddeler için herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Sonuç olarak elde edilen dekolorizasyondan lakkaz enziminin sorumlu olduğu düşünülmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında *T. versicolor* hücrelerinden elde edilen yüksek lakkaz aktivitesine sahip kültür süpernatantının Rem Blue RR ve Dylon Navy 17 boyarmaddelerini her hangi bir aracılı sisteme gereksinim duymaksızın dekolorize edebildiği, ancak Reaktif Red 198 ve Rem Red RR boyarmaddeleri için aracılı sistemlere gereksinim duyduğu görülmüştür. Rem Yellow RR boyarmaddesi için hem lakkaz aktivitesi yüksek kültür süpernatantı ve hem de aracılı sistemlerin ilavesi ile herhangi bir dekolorizasyona ulaşılamamıştır.

Rem Blue RR boyar maddesi için belirlenen optimum koşullarda lakkaz aktivitesi yüksek kültür süpernatantı kullanılarak % 62,83'lük bir dekolorizasyon değerine ulaşılırken; Daylon Navy 17 için dekolorizasyon yüzdesi 72,15 seviyesindedir.

Lakkaz aktivitesi yüksek kültür süpernatantı ile dekolorize edilememesine rağmen aracılı sistemlerin ilavesi ile Reaktif Red 198 ve Rem Red RR boyarmaddeleri için Rem Blue RR ve Daylon Navy 17 ile kıyaslanabilir deklorizasyon değerlerine ulaşıldığı görülmüştür. Reaktif Red 198 ve Rem Red RR boyarmaddeleri için ortama lakkaz aracılı sistem olarak kullanıldıkları bilinen çeşitli maddeler ilave edilmiştir. Bu amaçla dimetoxyphenol (DMP), fenol, vanilin, guiacol, veratril alkol, L-tirozin reaksiyon ortamına ilave edilerek aracı olarak etkinlikleri araştırılmıştır. Her iki boyarmadde için de aracılı sistem olarak vanilin ilavesinin uygun olduğu görülmüştür. Reaktif Red 198 boyarmaddesi için belirlenen optimum koşullarda vanilin ilavesi ile elde edilen dekolorizasyon değeri % 64,69 olarak belirlenirken, Rem Red RR için dekolorizasyon yüzdesi 68,04 düzeyinde elde edilmiştir.

Bu çalışmada elde edilen dekolorizasyona kültür süpernatantı içinde lakkaz enzimi dışında bulunması muhtemel olan ve katalizör olarak H_2O_2 ' e ihtiyacı olan Lignin peroksidaz ve Mangan peroksidaz enzimlerinin olası etkilerini belirlemek için katalaz ilavesi ile yapılmıştır. Bu deneme Rem Blue RR, Dylon Navy 17, Reaktif Red 198 ve Rem Red RR boyarmaddelerinin her biri için belirlenen optimum koşullarda gerçekleştirilmiş ve enzim kaynağı olarak katalaz ilave edilmiş süpernatant kullanılmıştır. Katalaz ilavesinden sonra beklenen ortamdaki olası H_2O_2 varlığı ile oluşabilecek herhangi bir gaz çıkışı gözlenmemiştir. Gerek katalaz ilave edilmiş süpernatant ve gerekse katalaz ilave edilmemiş süpernatant ile yapılan optimum

koşullardaki çalışmalar sonucunda elde edilen yüzde dekolorizasyon değerleri arasında bir farklılık gözlenmemiştir. Bu da dekolorizasyon işleminden ortamda yüksek aktivitede bulunan lakkaz enziminin sorumlu olduğu fikrini desteklemektedir.

6. KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aksu, Z. ve Çağatay, Ş.Ş., 2006, Investigation of biosorption of Gemazol Turquoise Blue-G reactive dye by dried *Rhizopus arrhizus* in batch and continuous systems, Sep. Purif. Technol., 48, 1, 24-35p.
- Alcalde M., 2007, Laccases: Biological functions, molecular structure and industrial applications, industrial enzymes structure, function and applications, J. Poliana, AP. MacCabe (Eds), Springer, Netherlands, 461-70.
- Archibald F.S., Bourbonnais R., Jurasek L, Paice M.G. and Reid ID., 1997, Kraft pulp bleaching and delignification by *Trametes versicolor*, J Biotechnol, 53:215–36p.
- Arik B., Körlü A.E. ve Duran K., 2008, Lakkaz enziminin tekstilde kullanım alanları, Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi, 17-22s.
- Assavanig A., Amornkitticharoen B., Ekpaisal N., Meevootisom V. and Flegel TW., 1992, Isolation, characterization and function of laccase from *Trichoderma*. Appl Microbiol Biotechnol., 38: 198–202p.
- Auterinen A.L., 2006, White biotechnology & modern textile processing, Textile World,. 40–44p.
- Balakshin M., Chen C.L., Gratzl J.S., Kirkman A.G. and Jakob H., 2001, Biobleaching of pulpwith dioxygen in laccase-mediator system effect of variables on the reaction kinetics, J. Mol. Catal. B. Enzyme, 16:205–15p.
- Baldrian P., 2004, Purification and characterization of laccase from the white-rot fungus *Daedalea quercina* and decolorization of synthetic dyes by the enzyme, Appl Microbiol Biotechnol., 63: 560–563p.
- Baldrian P., 2006, Fungal laccases occurrence and properties, Fems Microbiol Rev., 30: 215-242p.
- Basto C., Tzanov T., and Cavaco-Paulo A., 2007, Combined ultrasound-laccase assisted bleaching of cotton, Ultrasonics Sonochemistry,14:. 350–354.
- Başer, İ., İnanıcı, Y., 1990, Boyarmadde Kimyası, Marmara Üniversitesi Yayınları 7-10.
- Binz T., and Canevascini G., 1997, Purification and partial characterization of the extracellular laccase from *Ophiostoma novo-ulmi*, Curr. Microbiol., 35: 278–281.
- Birhanlı, E., 2003,Mikroorganizmaların lakkaz üretimine çeşitli faktörlerin etkisi, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya, 37-44.

- Bonomo R.P., Boudet A.M., Cozzolino R., Santoro E., Rizzarelli A.M., Sterjiades R., and Zapalla R., 1998, A comparative study of two isoforms of laccase secreted by the "white-rot" fungus *Rigidoporus lignosus*, exhibiting significant structural and functional differences, *J. Inorg. Biochem.* 71: 205–211.
- Bourbonnais, R. and Paice, M.G., 1990, Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett.*, 267, 99-102.
- Bourbonnais R. and Paice M.G., 1996, Enzymatic delignification of kraft pulp using laccase and a mediator, *TAPPI J.*, 79, 199-204p.
- Burns R.G., Dick R.P., 2002, *Enzymes in the environment, activity, ecology and applications*, Copyright Marcel Dekker p-515-525.
- Call H.P. and Mücke I., 1997, History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator systems (Lignozym® process), *J. Biotechnol.*, 53:163–202p.
- Camarero S., Ibarra D., Martinez M.J. and Martinez A.T., 2005, Lignin-Derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes, *Applied And Environmental Microbiology* 71:1175-1784p.
- Cambria M.T., Cambria A., Ragusa S. and Rizzarelli E., 2000, Production, purification, and properties of an extracellular laccase from *rigidoporus lignosus*,- protein expression and purification, *Protein Expression and Purification* vol. 18, iss. 2, p.141-147.
- Chefetz B., Kerem Z., Chen Y. and Hadar Y., 1998, Isolation and partial characterization of laccase from a thermophilic composted municipal solid waste, *Soil Biol. Biochem.* 30: 1091–1098.
- Chen S., Ge W. and Buswell J.A., 2004, Biochemical and molecular characterization of a laccase from the edible straw mushroom *Volvariella volvacea*. *Eur. J. Biochem.*, 271: 318–328.
- Ciullini I., Tilli S., Scozzafava A. and Brigandi F., 2008, Fungal laccase, cellobiose dehydrogenase, and chemical mediators: combined actions for the decolorization of different classes of textile dyes, *Bioresource Technology* 99: 7003-7010.
- Coll, P. M., Fernández-Abalos, J. M., Villanueva J. R., Santamaría, R. and Pérez P., 1993, Purification and characterization of a phenoloxidase (laccase) from the lignin-degrading basidiomycete PM1 (CECT 2971), *Applied and Environmental Microbiology*, 59:2607-2613.

- Collins P.J., Kotterman M.J.J., Field J.A. and Dobson A.D.W., 1996, Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by laccase from *Trametes versicolor*, Applied Environmental Microbiolgy, 62:4563-67
- Couto S.R. and Herrera J.L.T., 2006, Industrial and biotechnological applications of laccases, Biotechnology Advances, 24:500–513.
- Crestini C. and Argyropoulos D.S., 1998, The early oxidative biodegradation steps of residual kraft lignin models with laccase, Bioorg. Med. Chem., 6:2161–9
- Curir P., Thurston C.F., Daquila F., Pasini C. and Marchesini A., 1997, Characterization of a laccase secreted by *Armillaria mellea* pathogenic for Genista, Plant Physiol. Biochem., 35:147–153.
- D'Acunzo F., Galli, C., Masci, B., 2003, First evidence of catalytic mediation by phenolic compounds in the laccaseinduced oxidation of lignin models, European Journal of Biochemistry, 270, 3634–3640
- D'Annibale A., Stazi S.R., Vinciguerra V., Di Mattia E. and Sermanni G.G., 1999, Characterization of immobilized laccase from *Lentinula edodes* and its use in olive mill wastewater treatment, Process. Biochem., 34:697–706
- Das N., Chakraborty T.K. and Mukherjee M., 2000, Purification and characterization of laccase-1 from *Pleurotus florida*. Folia. Microbiol. 45: 447–451.
- Dawel G., Kästner M., Michels J., Poppitz W., Günther W. and Fritsche W., 1997, Structure of a laccase-mediated product of coupling of 2,4-diamino-6-nitrotoluene to guaiacol, a model for coupling of 2,4,6-trinitrotoluene metabolites to a humic organic soil matrix, Appl. Environ. Microbiol., 63, 2560-2565
- Dedeyan B., Klonowska A., Tagger S., Tron T., Iacazio G., Gil G. and Le Petit J., 2000, Biochemical and molecular characterization of a laccase from *Marasmius quercophilus*, Appl. Environ. Microbiol., 66:925-29p.
- De Souza C.G.M., Peralta R.M., 2003, Purification and characterization of the main laccase produced by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state medium, J. Basic. Microbiol, 43:278–286.
- Dizge Goksel M., 2007, *Trametes versicolor* beyaz curukcul fungusundan lakkaz enziminin saflastırılması ve kısmi nitelendirilmesi, GYTE Muhendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Dong J.L. and Zhang Y.Z., 2004, Purification and characterization of two laccase isoenzymes from a ligninolytic fungus *Trametes gallica*, Prep. Biochem. Biotechnol., 34, 179–194.

- Ducros V., Brzozowki A.M., Wilson K.S., Brown S.H., Ostegaard P., Schneider P., Yaver D.S., Pedersen A.H. and Davies G.J., 1998, Crystal structure of the type-2-cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 angstrom resolution. *Nat. Struct. Biol.* 5, 310-6p.
- Edens W.A., Goins T.Q., Dooley D, Henson J.M., 1999, Purification and characterization of a secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis var. tritici*, *Applied Environmental Microbiology*, 65, 3071–3074.
- Eggert C., Temp U., Dean JF. and Eriksson K.E., 1995, Laccase-mediated formation of the phenoxazinone derivative, cinnabarinic acid, *FEBS Lett.*, 376, 202-206
- Eggert C., Temp U. and Eriksson K.E.L., 1996, The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 1151–1158.
- Eggert C., Temp U. and Eriksson K.E., 1997, Laccase is essential for lignin degradation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *FEBS Lett.*, 407, 89-92.
- Fabbrini M., Gali C. and Gentili P., 2002, Radical or electron-transfer mechanism of oxidation with some laccase/mediator systems, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 18, 169–171
- Farnet A.M., Criquet S., Cigna M., Gil G. and Ferre E., 2004, Purification of a laccase from *Marasmius quercophilus* induced with ferulic acid: reactivity towards natural and xenobiotic aromatic compounds, *Enzyme. Microb. Technol.*, 34, 549–554.
- Froehner S.C. and Eriksson K.E.L., 1974, Purification and properties of *Neurospora crassa* laccase, *J. Bacteriol.*, 120, 458–465.
- Fukushima Y. and Kirk T.K., 1995, Laccase component of the *Ceriporiopsis subvemispora* lignin degrading system, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 872–876.
- Galhaup C., Goller S., Peterbauer C.K., Strauss J. and Haltrich D., 2002, Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions, *Microbiology* 148, 2159–2169.
- Galkin S., Vares T., Kalsi M. and Hatakka A., 1998, Production of organic acids by different white-rot fungi as detected using capillary zone electrophoresis, *Biotechnol. Techniques.*, 12, 267-271.
- Galliano, H., Gas, G., Seris, J.L. and Boudet, A.M., 1991, Lignin degradation by *Rigidoporus lignosus* involves synergistic action of two oxidizing enzymes: Mn peroxidase and laccase, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 13(6) ;478-482.
- Gamelas, J.A.F., Tavares, A.P.M., Evtuguin, D.V., and Xavier, A.M.B., 2005, Oxygen bleaching of kraft pulp with polyoxometalates and laccase applying a novel multi-stage process, *J. Mol. Catal. B: enzym.*, 33, 57–64.

- Garzillo, A.M.V., Colao, M.C., Caruso, C., Caporale, C., Celletti, D., Buonocore, V., 1998, Laccase from the white-rot fungus *Trametes trogii*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 49: 545–551.
- Garzillo, A.M., Calao, M.C., Buonocore, V., Oliva, R., Falcigno, L., Saviano, M., Santoro, A.M., Zappala, R., Bonomo, R.P., Bianco, C., Giardina, P., Palmieri, G. and Sannia, G., 2001, Structural and kinetic characterization of native laccases from *Pleurotus ostreatus*, *Rigidoporus lignosus*, and *Trametes trogii*, Journal of Protein Chemistry, 20, 545-551.
- Gedikli S., 2008, Çeşitli makrofungus izolatlarının lakkaz üretim yetenekleri açısından değerlendirilmesi ve dekolorizasyon uygulamalarında kullanılabilirliği, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi.s1-20.
- Geiger, J.P., Rio, B., Nandris, D. and Nicole, M., 1986, Laccases of *Rigidoporus lignosus* and *Phellinus noxius*, Applied Biochemical Biotechnology, 12:121–133.
- Gianfreda, L., Xu, F. and Bollag, J., 1999, Laccase: A useful group of oxidoreductive enzymes, CRC Pres LLC,
- Giardina, P., Palmieri, G., Scaloni, A., Fontanella, B., Faraco, V., Cennamo, G. and Sannia G., 1999, Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*, Biochem. J., 341:655–663.
- Hakulinen, N., Kiiskinen, L.L., Kruus, K., Saloheimo, M., Paananen, A., Koivula, A., and Rouvinenn, J., 2002, Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site., Nature Struct Biol., 9:601-5.
- Heinzkill, M., Bech, L., Halkier, T., Schneider, P. and Anke, T., 1998, Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (family Coprinaceae), Appl. Environ. Microbiol., 64:1601–1606.
- Hofrichter, M., Vares, T., Kalsi, M., Galkin, S., Scheibner, K., Fritsche, W. and Hatakka, A., 1999. Production of manganese peroxidase and organic acids and mineralization of ¹⁴C-labelled lignin (14C-DHP) during solid-state fermentation of wheat straw with the white rot fungus *Nematoloma frowardii*, Appl. Environ. Microbiol., 65, 1864-1870.
- Höfer, C. and Schlosser, D., 1999, Novel enzymatic oxidation of Mn²⁺ to Mn³⁺ catalyzed by a fungal laccase, FEBS Lett, 451:186–190.
- Ishigami, T., Hirose, Y. and Yamada Y., 1998, Characterization of polyphenol oxidase from *Chaetomium thermophile*, a thermophilic fungus, J. Gen Appl. Microbiol. 34:401-7.

- Itoh, K., Fujita, M., Kumano, K., Suyama, K. and Yamamoto, H., 2000, Phenolic acids affect transformations chlorophenols by a *Coriolus versicolor* laccase, *Soil Biol Biochem*, 32:85-91.
- Iwasaki, H., Matsubara, T. and Mori, T., 1967, A fungal laccase, its properties and reconstitution from its protein and copper, *J. Biochem.*, 61: 814–816.
- Johannes, C., Majcherczyk, A. and Hüttermann A., 1996, Degradation of anthracene by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of different mediator compounds, *Apl. Microbiol. Biotechnol.*, 46:313-7.
- Johannes, C. and Majcherczyk, A., 2000, Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66; 524–528.
- Jong de, E., Field, J.A. and Bont de, J.A.M., 1994, Aryl alcohols in the physiology of ligninolytic fungi, *FEMS Microbiol.*, vol. 13, nos. 2–3, pp. 153–187.
- Kanunfre, C.C. and Zancan, G.T., 1998, Physiology of exolaccase production by *Thelephora terrestris*, *FEMS Microbiol Lett*, 161: 151–156.
- Karaca, H., 2006, Tekstil Boyarmaddelerinin Mikrobiyal Renk Giderimim, Anadolu Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, s 1-25.
- Kiiskinen, L.L., Viikari, L. and Kruus, K., 2002, Purification and characterisation of a novel laccase from the ascomycete *Melanocarpus albomyces*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59:198–204.
- Ko, E.M., Leem, Y.E. and Choi, H.T., 2001, Purification and characterization of laccase isozymes from the white-rot basidiomycete *Ganoderma lucidum.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 57:98–102.
- Kocaer, F.O. ve Alkan, U., 2002, Boyarmadde İçeren Tekstil Atıksularının Arıtım Alternatifleri, Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi, cilt 7, sayı 1, 47-55s.
- Kummanni, A., Ghazi, I., Camarero, S., Ballesteros, A., Plou, F.J. and Alcalde, M., 2008, Decolorization of synthetic dyes by laccase immobilized on epoxy-activated carriers, *Process Biochemistry*, 43:169–178.
- Kumar, K.V., Ramamurthi, V. and Sivanesan, S., 2006, Biosorption of malachite green, a cationic dye onto *Pithophora sp.* a fresh water algae, *Dyes Pigments*. 69:74-79.

- Lalitha Kumari, H. and Sirsi, M., 1972, Purification and properties of laccase from *Ganoderma lucidum*, Arch. Microbiol., 84:350–357.
- Leontievsky, A., Myasoedova, N., Pozdnyakova, N. and Golovleva, L., 1997, Yellow laccase of *Panus tigrinus* oxidizes non-phenolic substrates without electrontransfer mediators, FEBS Lett., 413:446–448.
- Li, K., Xu, F. and Eriksson, K.E., 1999, Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound, Appl. Environ. Microbiol., 65:2654-2660.
- Lundquist, K. and Kirk, T.K., 1978, De Novo synthesis and decomposition of veratryl alcohol by a lignin-degrading Basidiomycete, Phytochemistry, 17:1676.
- Mechichi, T., Mhiri, N. and Sayadi, S., 2006, Remazol Brilliant Blue R decolourization by laccase from *Trametes trogii*, Chemosphere, 64:998-1005.
- Michniewicz, A., Ledakowicz, S., Ullrich, R. and Hofrichter, M., 2007, Kinetics of the enzymatic decolorization of textile dyes by laccase from *Cerrena unicolor*, Dyes And Pigments, 77:295-302.
- Milstein, O., Nicklas, B. and Hüttermann, A., 1989, Oxidation of aromatic compounds in organic solvents with laccase from *Trametes versicolor*, Applied Microbiology and Biotechnology, 31:70-74.
- Min, K.L., Kim, Y.H., Kim, Y.W., Jung, H.S. and Hah, Y.C., 2001, Characterization of a novel laccase produced by the wood-rotting fungus *Phellinus ribis*, Arch. Biochem. Biophys., 392: 279–286.
- Minuth, W., Esser, K., and Klischies, M., 1978, The Phenoloxidases of the Ascomycete *Podospora anserina* Structural Differences between Laccases of High and Low Molecular Weight, Journal of Biochemistry, 90:73-82
- Molitoris, H.P. and Esser, K., 1970, The phenoloxidases of the ascomycete *Podospora anserina* V. Properties of laccase I after further purification, Arch. Mikrobiol., 72: 267–296.
- Morozova, O.V., Shumakovich, G.P., Shleev, S.V. and Yaropolov, Y.I., 2007, Laccase-mediator systems and their applications, Applied Biochemistry and Microbiology, vol:43, 5:523-35.
- Monteiro, M.C. and Carvalho, M.E.A., 1998, Pulp bleaching using laccase from *Trametes versicolor* under high temperature and alkaline conditions, Appl. Biochem. Biotechnol., 70-72, 983-993
- Munoz, C., Guillen, F., Martinez, A.T. and Martinez M.J., 1997, Induction and characterization of laccase in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*, Curr. Microbiol., 34:1–5.

- Nagai, M., Sato, T., Watanabe, H., Saito, K., Kawata, M. and Enei, H., 2002, Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes*, and decolorization of chemically different dyes, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 60:327–335.
- Neufeld, H.A., Latterell, F.M., Green, L.F. and Weintraub, R.L., 1958, Oxidation of meta-polyhydroxyphenols by enzymes from *Piricularia oryzae* and *Polyporus versicolor*, *Arch. Biochem.*, 76:317-27.
- Nishizawa, Y., Nakabayashi, K. and Shinagawa, E., 1995, Purification and characterization of laccase from white-rot fungus *Trametes sanguinea* M85-2, *J. Ferment. Bioeng.*, 80:91–93.
- Oda, Y., Adachi, K., Aita, I., Ito, M., Aso, Y. and Igarashi, H., 1991., Purification and properties of laccase excreted by *Pycnoporus coccineus*, *Agric. Biol. Chem.*, 55:1393–1395.
- Ossola, M. and Galante, Y.M., 2004, Scouring of flax rove with the aid of enzymes, *Enzyme and Microbial Technology*, 34;177–186p.
- Paice, M.G., Bourbonnais, R., Reid, I.D., Archibald, F.S. and Jurasek, L., 1995 Oxidative bleaching enzymes, *Journal of Pulp and Paper Science*, 21 (8): 280-284.
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Scaloni, A., Capasso, A., and Sannia, G., 1997, A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*, *J. Biol. Chem.*, 272: 31301–31307.
- Palonen, H., Saloheimo, M., Viikari, L. and Kruus, K., 2003, Purification, characterization and sequence analysis of a laccase from the ascomycete *Mauginiella* sp, *Enzyme Microb. Technol.*, 33:854–862.
- Park, C., Lee, M., Lee, B., Kim S.W., Chase, H.A., Lee, J., and Kim, S., 2007, Biodegradation and biosorption for decolorization of synthetic dyes by *Funalia trogii*, *Biochemical Engineering Journal*, 36; 59–65.
- Parshetti, G.K., Kalme, S.D., Gomare, S.S., and Govindwar, S.P., 2007, Biodegradation of Reactive blue-25 by *Aspergillus ochraceus* NCIM-1146, *Bioresource Technology*, 98; 3638–3642.
- Pazarlıoğlu, N.K., Sarınsık, M., ve Telefoncu, A., 2005, Laccase: production by *Trametes versicolor* and application to denim washing, *Process Biochemistry*, 40:1673–1678.

- Peralta-Zamora, P., Pereira, C., Tiburtius, E.R.L., Moraes, S. G., Rosa, M.A., Rosana C.M. and Durán, N., 2003, Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase, *Applied Catalysis B: Environmental*, 42; 131-144.
- Perie, F.H., Reddy, G.V.B., Blackburn, N.J. and Gold M.H., 1998, Purification and characterization of laccases from the white-rot basidiomycete *Dichomitus squalens*, *Arch. Biochem. Biophys*, 353:349–355.
- Pickard, M., Roman, A.R., Tinoco, R. and Vazquez-Duhalt R., 1999, Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Coriopsis gallica* UAMH 8260 laccase, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65:3805-9.
- Polaina, J., and MacCabe, A.P., 2007, *Industrial enzymes: structure, function and applications*, Kluwer Academic Publishers Group, 654p.
- Pozdnyakova, N.N., Rodakiewicz-Nowak, J. and Turkovskaya, O.V., 2004, Catalytic properties of yellow laccase from *Pleurotus ostreatus* D1., *J. Mol. Catal*, 30:19-24.
- Rehman, A.U. and Thurston, C.F., 1992, Purification of laccase-I from *Armillaria mellea*, *J. Gen. Microbio.*, 138: 1251–1257.
- Reinhammar, B.R.M., 1972, Oxidation-Reduction potentials of the electron acceptors in laccases and stellacyanin, *Biochim. Biophys. Acta.*, vol. 275, 2, pp. 245–259.
- Rigling, D. and Van Alfen, N.K., 1993, Extra- and intracellular laccases of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*, *Applied and Environmental Microbiology*, 59:3634-3639.
- Riva, S., 2006, Laccases: Blue enzymes for green chemistry, *Trends In Biotechnology*, 24:5,219-26
- Rogalski, J., Wojtas-Wasilewska, M., Apalovic, R. and Leonowicz, A., 1991, Affinity chromatography as a rapid and convenient method for purification of fungal laccases, *Biotechnol. Bioeng.*, 37: 770–777
- Ryan, S., Schnitzhofer, W., Tzanov, T., Cavaco-Paulo, A. and Gubitz, G.M., 2003, An acid-stable laccase from *Sclerotium rolfsii* with potential for wool dye decolorization, *Enzyme Microb. Technol*, 33: 766–774.
- Sabit, C., 2001., *Tekstil endüstrisinde kullanılan boyarmaddeler ve boyama yöntemleri*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Dergisi.,
- Saparrat, M.C.N., Guillen, F., Arambarri, A.M., Martinez, A.T. and Martinez, M.J., 2002, Induction, isolation, and characterization of two laccases from the white rot Basidiomycete *Coriopsis rigid*, *Appl. Environ. Microbiol*, 68:1534–1540.

- Saparrat, M.C.N., Mocchiutti, P., Liggieri, C.S., Aulicino, M.B., Caffini, N.O., Balatti, P.A. and Martinez M.J., 2007, Ligninolytic Enzyme ability and potential biotechnology applications of the white-rot fungus *Grammothele subargentea* LPSC No: 436 Strain, *Proces Biochemistry* 43: 368-375.
- Salas, C., Lobos, S., Larrain, J., Salas, L., Cullen, D. and Vicuna, R., 1995, Properties of laccase isoenzymes produced by the basidiomycetes *Ceriporiopsis subvermispora*, *Biotechnol Lett.*, 8:797-800.
- Scott, S.L., Chen, W.J., Bakac, A. and Espenson, J.H., 1993, Spectroscopic parameters electrode potentials, acid ionization constants, and electron exchange rates of the 2,2-Azinobis(3-Ethylbenzothi- Azolone-6-Sulfonate) radicals and ions, *J. Phys. Chem.*, 1993:6710-6714.
- Schlosser, D. and Höfer, C., 2002, Laccase-catalyzed oxidation of Mn^{2+} in the presence of natural Mn^{3+} chelators as a novel source of extracellular H_2O_2 production and its impact on manganese peroxidase, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 3514–3521.
- Sethuraman, A., Akin, D.E. and Eriksson, K.E.L., 1999, Production of ligninolytic enzymes and synthetic lignin mineralization by the bird's nest fungus *Cyathus stercoreus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52: 689–697.
- Shleev, S.V., Gvon, KhanI., Gazaryan, I.G., Morozova, O.V., and Yaropolov, A.I., 2003, Novel laccase redox mediators: spectral, electrochemical, and kinetic properties, *Appl. Biochem. Biotech.*, vol. 111, no. 3, pp. 167–183.
- Shleev, S.V., Morozova, O., Nikitina, O., Gorshina, E.S., Rusinova, T., Serezhenkov, V.A., Burbaev, D.S., Gazaryan, I.G. and Yaropolov, A.I., 2004, Comparison of physico-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes, *Biochimie.*, 86: 693–703.
- Shleev, S.V., Khan, I.G., Morozova, O.V., Mazhugo, Yu.M., Khalunina, A.S., and Yaropolov, A.I., 2004,, Phenyl pyrazolones-novel oxidoreductase redox-mediators for degradation of xenobiotics, *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, vol. 40, no. 2, pp. 165–172.
- Slomczynski, D., Nakas, J.P. and Tanenbaum, S.W., 1995, Production and characterization of laccase from *Botrytis cinerea* 61–34, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 907–912.
- Smirnov, S.A., Koroleva, O.V., Vavrilova, V.P., Belova, A.B. and Klyachko, NL., 2001, Laccases from basidiomycetes: physicochemical characteristics and substrate specificity towards methoxyphenolic compounds, *Biochemistry (Mosc)*, 66: 774–779.

- Soares, G.M.B., de Amorim, M.T.P. and Costa-Ferreira, M., 2000, Use of laccase together with redox mediators to decolourize Remazol Brilliant Blue R, *Journal of Biotechnology*, 89;123-129.
- Solis-Oba, M., Ugalde-Saldivar, V.M., Gonzalez, I., and Viniegra-Gonzalez, G., 2005, An electrochemical–spectrophotometrical study of the oxidized forms of the mediator 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) produced by immobilized laccase, *Electroanal. Chem*, vol. 579;9–66.
- Solomon, E.I., Sundaram, U.M., and Machonkin, T.E., 1996, Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.*, vol. 96, no. 7, pp. 2563–2606.
- Takao, S., 1965, Organic acid production by basidiomycetes. I. Screening of acid-production strains, *Appl. Microbiol.*, 13, 732-737.
- Taspinar, A. and Kolankaya N., 1998, Optimization of enzymatic chlorine removal from kraft pulp, *Bull. of Environ. Contamin. and Toxicol.*, 61:15-21.
- Teunissen, P.J. and Field, J.A., 1998, 2-Chloro-1,4-dimethoxybenzene as a mediator of lignin peroxidase catalyzed oxidations, *FEBS Lett.*, 439:219–23.
- Thakker, G.D., Evans, C.S., Rao, K.K., 1992, Purification and characterization of laccase from *Monocillium indicum Saxena*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37: 321–323.
- Tzanov, T., Basto, C., Guebitz, G. and Cavaco-Paulo, A., 2003, Laccases to improve the whiteness in a conventional bleaching of cotton, *Macromol. Mater. Eng.*, 288, pp. 807–810.
- Ullrich, R., Huong, L.M., Dung, N.L. and Hofrichter, M., 2005, Laccase from the medicinal mushroom *Agaricus blazei*: production, purification and characterization, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 67: 357–363.
- Uslu, O. ve Türkman, A., 1987, Su Kirliliği ve Kontrolü, T.C. Başbakanlık Çevre Genel Müd.Yayımları, Eğitim Dizisi 1, 364 p.
- Vaitkyavichyus, R.K., Belzhite, V.A., Chenas, N.K., Banis, R.G. and Kulis, Y.Y., 1984, Isolation and kinetic parameters of laccase from *Polyporus anisoporus*, *Biochemistry (Mosc)*, 49: 859–863.
- Wariishi, H., Valli, K. and Gold, M.H., 1992. Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, kinetic mechanism and role of chelators, *J. Biol. Chem.*, 267:23688-23695.

- Williamson, P.R., 1994, Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*– identification as a laccase, *J. Bacteriol.*, 176: 656–664.
- Wood, D.A., 1980, Production, purification and properties of extracellular laccase of *Agaricus bisporus*, *J. Gen. Microbiol.*, 117:327–338.
- Xiao, Y.Z., Tu, X.M., Wang, J., Zhang, M., Cheng, Q., Zeng, W.Y. and Shi, Y.Y., 2003, Purification, molecular characterization and reactivity with aromatic compounds of a laccase from basidiomycete *Trametes sp.* strain AH28-2, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 60: 700–707.
- Xu, F., Li, K., and Elder, T.J, 2002., N-Hydroxy mediated laccase biocatalysis: recent progress on it's mechanism and future prospect of it's application *Progress Biotechnol.*, vol. 21, pp. 89–104.
- Yarapolov, A.I., Skorobogatko, O.V., Vartanov, S.S. and Varfolomeyev, S.D., 1994, Laccase properties, catalytic mechanism and applicability, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 49, 257-279.
- Yoon, M.Y., 2005, Denim finishing with enzymes-biobleaching with laccase and mediator, *International Dyer*, pp. 1–3.
- Yoshida, H., 1886, Chemistry of Lacquer (Urushi), *J. Chem. Soc.*, 43:472-486.
- Youn, H.D., Hah, Y.C. and Kang S.O., 1995, Role of laccase in lignin degradation by white-rot fungi, *Microbiology Letters*, 132;183-188.
- Zavarzina, A.G., Leontievsky, A.A., Golovleva, L.A. and Trofimov, S.Y., 2004, Biotransformation of soil humic acids by blue laccase of *Panus tigrinus*, *Soil Biol. Biochem*, 36:359-69.
- Zouari, H., Labat, M. and Sayadi, S., 2002, Degradation of 4-chlorophenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* in free and immobilized cultures, *Biores. Technol.*, 84:145-50.