



**ATIK SULARDAN FENOLİK BİLEŞİKLERİN  
UZAKLAŞTIRILMASI İÇİN YENİ NESİL DESTEK  
MALZEMELERİ**

**PREPARATION OF NOVEL SUPPORT MATERIALS FOR  
REMOVAL OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM WASTE  
WATER**

**TUĞBA DOĞAN**

**Prof. Dr. Serap ŞENEL**  
**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim-Öğretim Sınav Yönetmeliğinin  
Kimya Anabilim Dalı için Öngördüğü  
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2014

**TUĞBA DOĞAN**'ın hazırladığı “**Atık sulardan fenolik bileşiklerin uzaklaştırılması için yeni nesil destek malzemeleri**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **KİMYA ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Başkan

.....

Prof. Dr. Serap ŞENEL

Danışman

.....

Prof. Dr. Nursel PEKEL BAYRAMGİL

Üye

.....

Prof. Dr. Tuncer ÇAYKARA

Üye

.....

Doç. Dr. Lokman UZUN

Üye

.....

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

*Canım aileme,*

## ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

02 / 01 / 2014

Tuğba DOĞAN

## ÖZET

# ATIK SULARDAN FENOLİK BİLEŞİKLERİN UZAKLAŞTIRILMASI İÇİN YENİ NESİL DESTEK MALZEMELERİ

**Tuğba DOĞAN**

**Yüksek Lisans, Kimya Bölümü**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Serap ŞENEL**

**Ocak 2014, 101 sayfa**

Atık su arıtımı, yasal sınırlamaların ötesinde, ekosistem ve insan sağlığını korumak için gereklidir. Demir-çelik, petro-kimya, boya, ilaç vb. endüstrilerde yaygın kullanım alanına sahip olması fenol ve türevlerini atık sular için başlıca kirleticilerden yapmaktadır. Sunulan çalışmada atık sulardan fenolik bileşiklerin enzimatik yükseltgeme yöntemi ile arıtımı hedeflenmiştir. Enzimatik yükseltgeme tekniğinde, elektron alıcısı olarak moleküler oksijeni kullanarak çeşitli fenolik bileşikleri yükseltgeyebilme yeteneğinden dolayı *Trametes versicolor* lakkazın kullanımı tercih edilmiştir. Üretim maliyetini düşürmesi, tekrar kullanılabilirliği, depolama kararlılığı ve tepkime sonunda ortamdaki kolaylıkla uzaklaştırılabilmesi gibi avantajlarından dolayı serbest enzim yerine immobilize enzim kullanımı tercih edilmiştir. Yığın polimerizasyonu tekniği ile sentezlenen makrogözenekli poli(glisidil metakrilat) [P(GMA)] kriyojeli lakkaz enzimi immobilizasyonunda kullanılmak üzere yeni bir destek malzemesi olarak hazırlanmıştır. Kriyojelin sentezi çapraz bağlayıcı EGDMA (etilenglikol dimetakrilat) varlığında, GMA (glisidil metakrilat) ve HEMA (2-hidroksietil metakrilat) komonomerlerine APS (amonyum persülfat) ve TEMED (N,N,N',N'-tetra-metiletildiamin) başlatıcı ve aktivatör

çiftlerinin ilave edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Destek malzemesi olarak kullanılmak üzere sentezlenen P(GMA) kriyojeline lakkaz immobilizasyonu, GMA epoksi gruplarına lakkaz amino gruplarının nükleofilik saldırısı sonucu kovalent bağlanma yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometresi (FTIR) ile enzim immobilizasyonu ile P(GMA) kriyojelinde meydana gelen yapısal değişiklikler saptanmıştır. Ayrıca makrogözenekli kriyojelik destek malzemesi, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve şişme testleri ile karakterize edilmiştir. 24 saat lakkaz ile inkübe edilen P(GMA) kriyojelinin şişme değeri % 572 olarak bulunmuştur. Lakkaz aktivite tayini substrat olarak kullanılan ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiyazdin-6-sulfonik asit)) sulu çözeltileriyle farklı ortam koşullarında kesikli sistemde belirlenmiştir. pH, tepkime süresi, sıcaklık, enzim derişimi, substrat derişimi ve depolama süresinin immobilize enzimin aktivitesi üzerine etkisi belirlenmiş ve serbest enzim ile karşılaştırılmıştır. Arrhenius eşitliğinden yararlanarak tepkime aktivasyon enerjisi ( $E_a$ ) serbest ve immobilize lakkaz için sırasıyla  $27.0 \text{ kJ.mol}^{-1}$  ve  $28.8 \text{ kJ.mol}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır. Serbest lakkaz için  $K_m$  ve  $V_m$  değerleri sırasıyla  $165.1 \text{ } \mu\text{M}$  ve  $55.2 \text{ } \mu\text{M.dak}^{-1}$ , immobilize lakkaz için ise  $K_m$  ve  $V_m$  değerleri sırasıyla  $156.0 \text{ } \mu\text{M}$  ve  $1.57 \text{ } \mu\text{M.dak}^{-1}$  olarak Lineweaver-Burk grafiği ile belirlenmiştir. Ayrıca immobilize enzimin 6 kez kullanım sonrası başlangıç aktivitesini % 82.5 oranında ve dört haftalık depolama periyodu sonunda aktivitesini % 72.0 oranında koruduğu saptanmıştır. Serbest enzim için ise dört haftalık depolama sonrası korunan aktivite başlangıç değerinin % 24.0'üdür. Çalışmanın son basamağında sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometresi (LCMS/MS) kullanılarak sulu çözeltideki model fenolik bileşiğin (3,5-dinitrosalisilik asit) lakkaz ile enzimatik yükseltgemesi sonrasındaki parçalanma ürünleri belirlenmiştir.

**Anahtar Sözcükler:** Fenol ve türevlerinin arıtımı, *Trametes versicolor* lakkaz, enzim immobilizasyonu, kriyojel, sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS).

## **ABSTRACT**

### **PREPARATION OF NOVEL SUPPORT MATERIALS FOR REMOVAL OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM WASTE WATER**

**Tuğba DOĞAN**

**Master of Science, Department of Chemistry**

**Thesis Advisor: Prof. Dr. Serap ŞENEL**

**January 2014, 101 pages**

Wastewater treatment, apart from the legal limitations, is essential for preservation of the ecosystem and human health. Phenol and its derivatives, with their intensive use in industries such as iron and steel, petrochemicals, dyes, medicines, etc. are the main constituents of pollution for wastewater. The present study aims at purification of phenolic compounds in wastewater by enzymatic oxidation method. *Trametes versicolor* laccase, due to its ability in oxidation of phenolic compounds through combining with molecular oxygen as an electron acceptor, was preferably used in enzymatic oxidation technique. Due to such advantages as low production cost, re-usability, storage stability and easy removal from the medium after the reaction, immobilized enzyme rather than free enzyme was used. Macroporous poly(glycidyl methacrylate) [P(GMA)] cryogel synthesized by bulk polymerization was prepared as a novel support material in laccase enzyme immobilization. Cryogel synthesis was realized in the presence of crosslinker EGDMA (ethylene glycol dimethacrylate) by the addition of APS (ammonium persulfate) and TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) initiator and activator couples onto GMA (glycidyl methacrylate) and HEMA (2-hydroxyethyl methacrylate) comonomers.



Laccase immobilization onto P(GMA) cryogel, synthesized as support material, was attained through covalent bonding method by the nucleophilic attack of laccase amino groups to GMA epoxy groups. The structural changes in P(GMA) cryogel due to enzyme immobilization was determined by Fourier transformed infrared spectrometer (FTIR). The macroporous cryogel support material was also characterized by scanning electron microscope (SEM), and swelling test. The swelling ratio of P(GMA) cryogel following an incubation period of 24h with laccase was determined to be 572%. Laccase activity was determined in batch system under different conditions using aqueous solutions of ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) as substrate. The effect of pH, reaction time, temperature, enzyme concentration, substrate concentration, and storage period on immobilized enzyme activity was determined and compared with those of free enzyme. Reaction activation energy ( $E_a$ ) was calculated using Arrhenius equation as  $27.0 \text{ kJ.mol}^{-1}$  and  $28.8 \text{ kJ.mol}^{-1}$  for free and immobilized laccase, respectively.  $K_m$  and  $V_m$  values were determined by Lineweaver-Burk diagrams as  $165.1 \text{ }\mu\text{M}$  and  $55.2 \text{ }\mu\text{M.min}^{-1}$  for free laccase and  $156.0 \text{ }\mu\text{M}$  and  $1.57 \text{ }\mu\text{M.min}^{-1}$  for immobilized laccase, respectively. Immobilized enzyme was determined to retain 82.5% of the original activity level following 6 repeated use and 72.0% following a storage period of 4 weeks. The free enzyme retained only 24.0% of its original activity following the same storage period. Lastly, decomposition products resulting from enzymatic oxidation of a model phenolic compound (3,5-dinitrosalicylic acid) by laccase in aqueous solution were identified by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).

**Key Words:** Phenol and its derivatives treatment, *Trametes versicolor* laccase, enzyme immobilization, cryogel, liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımın planlanması ve gerçekleştirilmesinde yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen, öneri, eleştiri ve rehberliğiyle ufkumu açan değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Serap Şenel'e

Yüksek lisans eğitimimde bana maddi ve manevi her türlü imkanı sağlayan ve engin bilgileriyle beni aydınlatan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Adil Denizli'ye

Deneylerim boyunca bilgi birikimleri ve imkanlarından çokça istifade ettiğim, yardımlarını benden esirgemeyerek her zaman yanımda olduğunu hissettiren hocam Sayın Doç. Dr. Lokman Uzun'a

Çalışmalarım sırasında dostane yaklaşımlarıyla yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Arş. Gör. Recep Üzek, Arş. Gör. Canan Armutcu, Bahar Ergün, Kazım Köse, Arş. Gör. Kemal Çetin, Arş. Gör. Fatma Kartal ve Arş. Gör. Demet Baykan'a

Tez çalışmalarımındaki yardımlarından dolayı hocalarım Doç. Dr. Handan Yavuz, Uzm. Dr. Nilay Bereli, Dr. Müge Andaç, Dr. Gözde Baydemir Peşint, Dr. Işık Perçin Demirçelik ve Dr. Deniz Türkmen ve çalışma arkadaşlarım Mitra Jalizadeh, Duygu Çimen, Türkan Mammadova, Gülsü Şener, Fatma Yılmaz, Mehmet Emin Çorman, Gizem Ertürk, Sevgi Aslıyüce Çoban, Ali Derazshamshir, İlker Koç, Ilgım Göktürk, Yeşeren Saylan, Semra Akgönüllü, Emel Tamahkar, Erdoğan Özgür, Esmâ Sarı, Seda Atay, Daryoush Majidi, Huma Sheikh, Sabina Hüseyinli, Erkut Yılmaz, Alper Türkoğlu, Kıvılcım Çaktü, Kadir Erol, Nihal Ermiş, Dilara Saçlıgil, Aykut Arif Topçu, Monireh Bakhshpour, Senem Çulha, Mehmet Lütfi Yola, Cemil Aydoğan ve Veyis Karakoç'a

Tezimin son aşamasında LC-MS/MS cihazı ile yapılan analizlere büyük katkıları olan Ant Teknik çalışanları Nadir Nuri Gür, Nuray Çetiz Can ve Engin Bayram'a

Tez çalışmam süresince ve her zaman varlığını ve desteğini yanımda hissettiğim Arman Alır'a

Her zaman olduğu gibi tüm öğrenim hayatım boyunca sabır, özveri, sevgi ve Őefkatle beni destekleyen, daima yanımda olan canım annem Havva Doğan ve babam Rıdvan Doğan'a ve manevi destekleriyle yanımdan hiĉ ayrılmayan sevgili abim Ahmet Doğan ile kardeŐim Elif Doğan'a

Sonsuz teŐekkürlerimi sunarım...

Tuğba Doğan

Ocak 2014, Ankara

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER.....	x
ŞEKİLLER .....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. Fenol ve Türevleri .....	4
2.1.1. Fenol ve Türevlerinin İnsan Sağlığına ve Çevreye Etkileri .....	6
2.1.2. Çevredeki Fenol ve Türevlerinin Oluşumu .....	6
2.2. Fenol ve Türevlerinin Arıtım Yöntemleri .....	7
2.2.1. Enzim Kullanımıyla Arıtım Yöntemi.....	8
2.3. Enzimler ve Genel Özellikleri.....	8
2.3.1. Lakkaz.....	10
2.3.1.1. Lakkazın Yapısı .....	10
2.3.1.2. Lakkazın Özellikleri.....	12
2.3.1.3. Lakkaz Kaynakları .....	14
2.3.1.4. Lakkazın Biyolojik Rollerini .....	14
2.3.1.5. Lakkazın Katalitik Rollerini.....	15
2.3.1.6. Lakkazın Uygulama Alanları .....	16
2.4. Enzim İmmobilizasyonu.....	16
2.4.1. İmmobilize Enzimlerin Kullanım Alanları .....	17
2.4.2. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri .....	17
2.4.2.1. Tutuklama.....	18
2.4.2.2. Kapsülleme.....	19
2.4.2.3. Adsorpsiyon.....	19
2.4.2.4. Kovalent Bağlanma .....	21
2.4.2.5. Öz İmmobilizasyon .....	22
2.4.3. İmmobilizasyon Yöntemi Seçimi .....	23
2.4.4. Destek Malzemeleri .....	23

2.4.5.	Kriyojeller.....	25
2.5.	Literatür Çalışmaları .....	27
3.	DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	30
3.1.	Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	30
3.2.	Kriyojelin Hazırlanması.....	31
3.2.1.	Poli(glisidil metakrilat) [P(GMA)] Kriyojelinin Hazırlanması.....	31
3.2.2.	P(GMA) Kriyojeline Lakkaz İmmobilizasyonu.....	34
3.3.	Kriyojelin Karakterizasyonu .....	34
3.3.1.	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometre Analizi (FTIR) .....	35
3.3.2.	Yüzey Morfolojisi (SEM) .....	35
3.3.3.	Şişme Deneyi .....	35
3.4.	Lakkazın Aktivite Tayini Deneyleri .....	36
3.4.1.	İmmobilize Lakkazın Aktivite Tayini .....	38
3.4.2.	Serbest Lakkazın Aktivite Tayini .....	38
3.5.	Lakkaz Aktivitesine Etki Eden Faktörlerin İncelenmesi .....	39
3.5.1.	pH Değişiminin Aktiviteye Etkisi.....	39
3.5.2.	Sıcaklığın Aktiviteye Etkisi .....	39
3.5.3.	Substrat Derişiminin Aktiviteye Etkisi .....	39
3.5.4.	Enzim Miktarının Aktiviteye Etkisi .....	40
3.5.5.	Tepkime Süresinin Aktiviteye Etkisi .....	40
3.5.6.	Tekrar Kullanım Sayısının Aktiviteye Etkisi .....	40
3.5.7.	Depolama Süresinin Aktiviteye Etkisi.....	40
3.6.	3,5-Dinitrosalisilik Asitin (DNS) Sulu Çözeltilerden Uzaklaştırılması .....	41
3.6.1.	İmmobilize Lakkaz ile DNS Uzaklaştırılması .....	41
3.6.2.	Serbest Lakkaz ile DNS Uzaklaştırılması .....	41
3.7.	Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) Analizi .....	41
4.	DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR.....	43
4.1.	P(GMA) Kriyojeline Lakkaz İmmobilizasyonu .....	43
4.1.1.	İmmobilize Lakkaz Miktarının Hesaplanması .....	43
4.2.	P(GMA) Kriyojelinin Karakterizasyonu.....	44
4.2.1.	FTIR Çalışmaları .....	44
4.2.2.	Şişme Özellikleri .....	47
4.2.3.	Yüzey Morfolojisi .....	47
4.3.	Lakkaz Aktivitesine Etki Eden Faktörlerin İncelenmesi .....	48
4.3.1.	pH Değişiminin Aktiviteye Etkisi.....	49
4.3.2.	Sıcaklığın Aktiviteye Etkisi .....	50
4.3.3.	Substrat Derişiminin Aktiviteye Etkisi .....	53

4.3.4.	Enzim Miktarının Aktiviteye Etkisi .....	57
4.3.5.	Tepkime Süresinin Aktiviteye Etkisi .....	58
4.3.6.	Tekrar Kullanım Sayısının Aktiviteye Etkisi .....	59
4.3.7.	Depolama Süresinin Aktiviteye Etkisi .....	60
4.4.	Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) Analizi .....	61
5.	YORUM .....	69
KAYNAKLAR .....		75
ÖZGEÇMİŞ .....		87

## ÇİZELGELER

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Sıvı ve katı halde olan fenolik bileşiklerden bazıları .....	5
Çizelge 2.2. Genel ve <i>Trametes versicolor</i> kaynaklı lakkazın fiziksel özellikleri	13
Çizelge 2.3. Enzim immobilizasyonunda kullanılan destek malzemeleri .....	24
Çizelge 2.4. <i>Trametes versicolor</i> lakkaz ile yapılan bazı çalışmalar .....	29
Çizelge 3.1. Farklı miktarlarda enzim immobilize edilen destek malzemelerin gösterimi .....	34
Çizelge 4.1. Kriyojellerin % şişme oranları ve % makrogözenek oranları gösterimi .....	47
Çizelge 4.2. Serbest ve immobilize lakkaz için hesaplanan Arrhenius denklemi parametreleri .....	53
Çizelge 4.3. Serbest ve immobilize lakkazın kinetik parametre değerlerinin gösterimi .....	57

## ŞEKİLLER

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Fenolün kimyasal yapısı .....	4
Şekil 2.2. 3,5-Dinitrosalisilik asitin kimyasal yapısı .....	5
Şekil 2.3. Lakkazın 3 redoks bölgesi ve 4 bakır atomunun gösterimi .....	10
Şekil 2.4. <i>Trametes versicolor</i> lakkazın üç boyutlu yapısı. ....	12
Şekil 2.5. Fiziksel etkileşimler ile enzim immobilizasyonu: Gözenekli katı bir destek malzemesi içinde enzimlerin tutulması .....	18
Şekil 2.6. Fiziksel etkileşimler ile enzim immobilizasyonu:Enzimlerin kapsüllemesi .....	19
Şekil 2.7. Kimyasal etkileşimler ile enzim immobilizasyonu: Destek malzemesine iyonik kuvvetler ile enzim adsorpsiyonu.....	20
Şekil 2.8. Kimyasal etkileşimler ile enzim immobilizasyonu: Enzimin nükleofilik gruplar ve destek arasında kovalent bağlanması .....	21
Şekil 2.9. Kimyasal etkileşimler ile enzim immobilizasyonu: Öz immobilizasyon; çapraz bağlı enzim agregatlarının (CLEAs) modeli .....	22
Şekil 3.1. (A) HEMA ve (B) GMA monomerlerinin kimyasal yapısı (C) EGDMA çapraz bağlayıcının kimyasal yapısı ve olası bağlanma noktaları ...	32
Şekil 3.2. Sodyum lauril sülfatın kimyasal yapısı .....	33
Şekil 3.3. P(GMA) kriyojelinin olası kimyasal yapısı .....	33
Şekil 3.4. ABTS'nin lakkaz tarafından katyonik radikale (ABTS <sup>+</sup> ) yükseltgenme mekanizması .....	37
Şekil 3.5. ABTS katyonik radikalinin kalibrasyon eğrisi .....	38
Şekil 3.6. LC-MS/MS cihazı.....	42
Şekil 4.1. Lakkazın P(GMA) kriyojeline kovalent bağlanmasının gösterimi .....	43
Şekil 4.2. Lakkazın kalibrasyon eğrisi.....	44
Şekil 4.3. P(GMA) ve lakkaz immobilize edilmiş P(GMA)'nın [L-P(GMA)] FTIR spektrumları.....	46
Şekil 4.4. P(GMA) kriyojelinin farklı oranlarda büyütülmüş SEM görüntüleri ....	48
Şekil 4.5. pH değerinin lakkaz aktivitesine etkisi .....	50
Şekil 4.6. Sıcaklık değerinin lakkaz aktivitesine etkisi .....	51
Şekil 4.7. İmmobilize ve serbest lakkaz için Arrhenius grafiği.....	52



Şekil 4.8. İmmobilize ve serbest lakkazın doygunluk eğrisi .....	54
Şekil 4.9. Michealis-Menten grafiği .....	55
Şekil 4.10. Serbest lakkaz için Lineweaver-Burk grafiği .....	56
Şekil 4.11. İmmobilize lakkaz için Lineweaver-Burk grafiği.....	56
Şekil 4.12. Enzim miktarının aktiviteye etkisi .....	58
Şekil 4.13. Tepkime süresinin immobilize lakkazın aktivitesine etkisi .....	59
Şekil 4.14. Tekrar kullanım sayısının immobilize lakkazın aktivitesine etkisi	60
Şekil 4.15. Depolama süresinin immobilize ve serbest lakkazın aktivitesine etkisi .....	61
Şekil 4.16. ABTS'nin pozitif iyon kromatogramı ve MS spektrumu .....	63
Şekil 4.17. ABTS'nin negatif iyon kromatogramı .....	63
Şekil 4.18. DNS'nin negatif iyon kromatogramı ve MS spektrumu .....	64
Şekil 4.19. Lakkaz immobilize membranla muamele edilmiş DNS çözeltisinin pozitif iyon kromatogramı ve ilgili piklerin MS spektrumları. (a) 1 nolu (ABTS); (b-e) 2, 3, 4 ve 5 nolu (ürün) pikler.....	65
Şekil 4.20. Lakkaz immobilize membranla muamele edilmiş DNS çözeltisinin negatif iyon kromatogramı ve ilgili piklerin MS spektrumları .....	66
Şekil 4.21. Serbest lakkaz ile muamele edilmiş DNS çözeltisinin pozitif iyon kromatogramı ve ilgili piklerin MS spektrumları. (a) 1 nolu (ABTS); (b-e) 2, 3, 4 ve 5 nolu (ürün) pikler.....	67
Şekil 4.22. Serbest lakkaz ile muamele edilmiş DNS çözeltisinin negatif iyon kromatogramı ve ilgili piklerin MS spektrumları .....	68

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

$\Delta A$	Absorbans değişimi
$\Delta c$	Derişim değişimi
$\Delta t$	Tepkime süresi
[S]	Substrat derişimi
A	Arrhenius sabiti
$E_a$	Aktivasyon enerjisi
$K_m$	Michealis-Menten sabiti
m/z	Kütle aralığı
pI	İzoelektrik nokta
rpm	Dakikadaki devir sayısı
T	Mutlak sıcaklık, K
U	Enzim aktiflik birimi
V	Tepkime hızı
$V_m$	Tepkimenin maksimum hızı
W	Polimer kütle, g

### Kısaltmalar

3D	Üç boyutlu
ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-etilbenzotiyazdin-6-sulfonik asit)
ABTS <sup>+</sup>	2,2'-Azino-bis-(3-etilbenzotiyazdin-6-sulfonik asit)'in katyonik radikali
APS	Amonyum persülfat
$C_7H_4N_2O_7$	3,5-Dinitrosalisilik asit
$C_6H_6O$	Fenol
CC	Karbon kriyojel
CLEAs	Çapraz bağlı enzim agregatları
Cys	Sistein
DNS	3,5-Dinitrosalisilik asit
EC	Enzim komisyonu

EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
EDX	Enerji dağılımı X-ışınları spektroskopisi
EGDMA	Etilenglikol dimetakrilat
US-EPA	Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı
EPR	Elektro paramagnetik rezonans
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometresi
GMA	Glisidil metakrilat
HEMA	2-Hidroksietil metakrilat
His	Histidin
HPLC	Yüksek basınç sıvı kromatografisi
LC-MS/MS	Sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometresi
L-P(GMA)	Lakkaz immobilize edilmiş poli(glisidil metakrilat)
NaN <sub>3</sub>	Sodyum azür
PBB	Polibromobifenil
PCB	Poliklorobifenil
P(GMA)	Poli(glisidil metakrilat)
PHEMAH	Poli(hidroksietilmetakrilat-n-metakriloil-(I)-histidin metilester)
Poli(MMA-ko-GMA)	Poli(metilmetakrilat-ko-glisidilmetakrilat)
PVA	Poli(vinilalkol)
RR	Rezonans raman
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SERS	Yüzey geliştirilmiş raman saçılma spektroskopisi
SLS	Sodyum lauril sülfat
TEMED	N,N,N',N'-tetra-metiletilendiamin

# 1. GİRİŞ

Nüfusun giderek artması, teknolojinin gelişmesi ve sanayileşmenin hızlanması gibi faktörler çevre kirliliği sorunlarını da artırmaktadır. Evsel, endüstriyel, tarımsal ve diğer uygulama alanları tarafından kullanılan maddelerin, atık olarak değerlendirilen kısımlarının arıtılmadan çevreye bırakılmasıyla “kirlilik” oluşmaktadır. Oluşan kirlilik sonucu atık suların yeraltı sularına, akarsu, göl ve denizlere ulaşmasıyla etki alanı artmakta ve besin zinciri döngüsünü ve insan sağlığını ciddi anlamda etkilemektedir [1]. Atık suların çevre için problem oluşturmasını önlemek için suyun kullanım standartlarına uygun olması, kirlenici miktarının izin verilebilir limit seviyesinde olduğunun kontrol edilmesi ve gerekli arıtma işlemlerinden geçirilmesi gerekmektedir.

Toprak, su ve havanın fiziksel veya kimyasal özelliklerinin tamamının veya bir kısmının, insan, hayvan ve bitki sağlığını olumsuz yönde etkileyecek biçimde bozulması fiziksel ve kimyasal kirliliğe, mikroorganizmalarca kirlenmesi ise biyolojik kirliliğe yol açmaktadır. Biyolojik kirlilik, patojenler, atıkları besin kaynağı olarak kullanarak üreyen algler, küfler ve bakterilerdir. Fiziksel kirlilik, renk, koku, tat, doku, sıcaklık, pH gibi fiziksel parametrelerin değişmesiyle oluşmaktadır. Kimyasal kirlilik ise, izin verilen limit aşımında toksik etki gösteren endüstriyel atıkların çevre sularında birikmesi ve canlı dokularında yoğunlaşması sonucu oluşmaktadır [2].

Atık sulardaki kimyasal kirliliğe sebep olan maddelerden bazıları, organik maddeler (fenoller, proteinler, karbonhidratlar, yağ, gres, yüzey aktif maddeler, pestisitler, klorlu bileşikler vb.), ağır metaller (antimon, arsenik, bor, bakır, baryum, çinko, kurşun, nikel, krom, kalay, kobalt, gümüş, magnezyum, molibden, kadmiyum, vb.), siyanür, poliklorobifenil (PCB), polibromobifenil (PBB), aromatik ve alifatik hidrokarbonlar, asbest, rafine etme ve distilasyon işlemleri sırasında oluşan maddeler ve parçalanmaya dirençli deterjanlardır. Kimyasal kirlilikler, geri dönüşümü olmayan bir şekilde ekolojik dengenin bozulmasına neden olabildiğinden dolayı, arıtımına özen gösterilmelidir [2, 3].

Çeşitli endüstriyel, tarımsal ve evsel faaliyetler sonucu oluşan fenol ve türevleri kimyasal kirliliğe sebep olan yüksek doz kirlenicilerdendir [4, 5]. Amerika Birleşik

Devletleri Çevre Koruma Ajansı (US-EPA) ve Avrupa Birliği tarafından birincil kirleticiler olarak sınıflandırılmış fenollerin insan sağlığı üzerinde ciddi etkileri vardır [6]. Fenol ve türevlerine maruz kalındığında şiddetli ağrılar, beyin, dolaşım ve sinir sisteminde bozukluklar gibi rahatsızlıklar ve hatta ölümler bile görülebilir [3, 7, 8]. Bu yüzden fenol ve türevlerinin uzaklaştırılmasına önem verilmelidir. Fenol ve türevlerinin arıtımında çeşitli kimyasal, fiziksel veya biyolojik yöntemler kullanılmaktadır. Biyolojik arıtma yöntemleri kimyasal bileşiklerin parçalanmasında kullanılan en ekonomik yöntemlerdir [3]. Enzimlerin kimyasal bileşiklerin seçimli olarak uzaklaştırılmasında kullanılan en uygun maddeler olduğu 1970'lerden bu yana bilinmektedir. Son yıllarda, tirozinaz, peroksidaz veya lakkaz enzimleri ile oluşturulan malzemeler fenol ve türevlerinin uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır [9].

Lakkaz (EC 1.10.3.2, p-difenol=dioksijen oksidoredüktaz) enzimi oksidazların mavi-bakır proteinler olarak adlandırılan grubuna aittir. Lakkaz, radikal katalizli tepkime mekanizması ile çeşitli aromatik ve aromatik olmayan bileşikleri, elektron alıcısı olarak moleküler oksijeni kullanarak, yükseltgeyebilme özelliğine sahiptir. Fenoloksidaz olarak da adlandırılan lakkaz enzimi, fenol ve türevlerini yükseltgeyerek uzaklaştırılmasını sağlamaktadır [10]. Lakkazın, kağıt, tekstil, gıda, ilaç endüstrilerinde biyokatalizör olarak kullanımı bilinmektedir [11]. Bu uygulamalarda lakkazın immobilize hali, saf ve izole halinin kullanımına dayalı işlemlere göre hem daha uzun ömürlü hem de daha düşük maliyetli olduğundan tercih edilmektedir [12, 13].

Enzim immobilizasyonunda tutuklama, kapsülleme, adsorpsiyon, kovalent bağlanma ve öz immobilizasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Sulu çözeltilerdeki çalışmalarda ve denatüre edici faktörlerin varlığında enzim sızması minimize edilip ürünün proteinle kirlenme olasılığı yok edildiğinden kovalent bağlanma daha çok tercih edilmektedir [14].

Enzim immobilizasyonunda anorganik, sentetik polimer veya doğal kökenli maddeler destek malzemesi olarak kullanılmaktadır. Enzim yüzeyindeki bağlanma bölgelerinin çok sayıda olmasından kaynaklanan denatürasyon ve enzimin konformasyonel değişim eğilimi ve olası spesifik olmayan etkileşimlerin immobilizasyon sırasında aşılması gerekmektedir [15, 16]. Kriyojel olarak adlandırılan hidrojel yapılarının polimerizasyonunun düşük sıcaklıkta

gerçekleşmesinden dolayı kriyojelleşme boyunca, enzim konformasyonu dinamikleri ve denatürasyon sorunları azalmaktadır [17]. Elde edilen kriyojel yapıları kullanıcılara süper makrogözenekli yapıları nedeniyle, önemli basınç düşüşü ve difüzyon direnci olmadan yüksek akış hızlarında çalışma olanağı sağlamaktadır [18].

Bu çalışmada, çevresel kirlenici olarak endüstriyel aktivitelerin önemli atıkları arasında yer alan fenolik bileşiklerin atık sularından uzaklaştırılması için *Trametes versicolor* lakkazın kullanımı hedeflenmiştir. Lakkaz kısmen donmuş monomer çözeltileri kullanılarak hazırlanan kriyojelle kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilmiştir. Sentezlenen makrogözenekli kriyojel, Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometresi (FTIR), taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve şişme testleri ile karakterize edilmiştir. Lakkaz aktivite tayini deneyleri farklı ortam koşullarında kesikli sistemde incelenmiştir. pH, tepkime süresi, sıcaklık, enzim derişiminin ve substrat derişiminin immobilize enzimin aktivitesi üzerine etkisi belirlenmiş ve serbest enzim ile karşılaştırılmıştır. Enzim immobilizasyonunun temel hedefi olan tekrar kullanılabilirlik deneyleri yapılmıştır. Ayrıca serbest ve immobilize enzimin depolama kararlılıkları incelenmiştir. Çalışmanın son basamağında sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) kullanılarak sulu çözeltideki model fenolik bileşiğinin (3,5-dinitrosalisilik asit) lakkaz ile enzimatik yükseltgeme sonrasındaki parçalanma ürünleri belirlenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Fenol ve Türevleri

Fenol, kömür katranından Friedlied Ferdinand tarafından 1834 yılında keşfedilmiş Fransız kimyager Auguste Laurent tarafından 1841 yılında saflaştırılmış ve 1843 yılında Fransız kimyacı Charles Gerhardt tarafından "fenol" adı ile ifade edilmiştir [19]. Fenolün, benzen fenol, benzenol, karbolik asit, hidroksi benzen, mono-hidrobenzen, fenol alkol, fenil-hidroksit ve fenilik asit gibi yaygın kullanılan eş anlamlı adlandırmaları bulunmaktadır [7].

Fenol kimyasal formülü  $C_6H_6O$  olan aromatik bir alkoldür (Şekil 2.1). Fenolün molekül ağırlığı 94.11 g/mol, erime noktası  $41.0^{\circ}C$ , kaynama noktası  $181.9^{\circ}C$  ve öz kütlesi 1.072 g/mL'dir [7]. Saf halde, renksiz veya açık pembe renkli bir katıdır.



Şekil 2.1. Fenolün kimyasal yapısı

Fenoller tatlımsı buruk bir kokuya sahiptir. Fenollerin havada kokusunu tespit limiti 0.021-20 g/L arasındadır. Su içerisindeki fenolün koku tespit değeri 7.9 mg/L ve tat tespit değeri ise 0.3 mg/L'dir. Buharlaşması su ile karşılaştırıldığında daha yavaştır. Sudaki çözünürlüğü orta dereceli olan yanıcı maddelerdir [3].

Çizelge 2.1. Sıvı ve katı halde olan fenolik bileşiklerden bazıları

Sıvı	Katı
m-kresol	p-kresol
2-klorofenol	3-klorofenol
2-bromofenol	2,4-bromofenol
Salisilaldehit	2-nitrofenol
2-etilfenol	Naftol
2,4-dimetilfenol	4-kloro-3-metilfenol
Metil salisilat	Katekol
3-metoksifenol	Resorkinol
2-metoksi-4-propenilfenol	2,6-dimetilfenol
	4-metoksifenol
	4-hidroksibenzelaldehit
	Salisilik asit
	3,5-dinitrosalisilik asit

Optimum koşullar altında enzim etkinliğinin belirlenmesinde model fenol türevi olarak kullanılan 3,5-dinitrosalisilik asit (DNS) kimyasal formülü  $C_7H_4N_2O_7$  olan bir monofenoldür (Şekil 2.2). DNS molekül ağırlığı 228.12 g/mol, erime noktası 168-174°C, kaynama noktası 387.2°C ve öz kütlesi 1.838 g/mL olan sarı renkli bir katıdır [20].



Şekil 2.2. 3,5-Dinitrosalisilik asitin kimyasal yapısı



### **2.1.1. Fenol ve Türevlerinin İnsan Sağlığına ve Çevreye Etkileri**

Su kirliliğinin ekonomi ve sağlık üzerindeki olumsuz etkilerini yok etmek için su kirliliğine sebep olan maddelerin arıtımı sağlanmalıdır. Su kirliliğine sebep olan maddeler arasında yüksek toksisite özelliği ile bilinen fenol ve türevleri bulunmaktadır [21]. Fenol ve türevleri yüksek toksisitesi, yüksek oksijen ihtiyacı (teorik olarak, 2.4 kg O<sub>2</sub>/kg fenol) ve düşük biyolojik parçalanma özelliğinden dolayı Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (US-EPA) ve Avrupa Birliği tarafından birincil kirleticiler olarak sınıflandırılmıştır [6].

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından fenoller için sularda izin verilebilir derişim 1 ppm ve izin verilebilecek maksimum derişim 2 ppm olarak belirlenmiştir. Fenoller 1 ppm gibi düşük derişimde bile içme suyunda karbolik kokularıyla koku ve tat problemleri yaratır ve protoplazmik zehirler olduklarından tüm canlı hücre türlerine zarar verebilmektedirler [22, 23].

Fenoller insanlar üzerindeki toksik etkisiyle biyokimyasal fonksiyonları etkilemektedir [23]. Fenol ve türevlerine maruz kalındığında boğazda şiddetli yanma, kusma, susama, mide kanaması, idrarda azalma, mide krampları, solunum durması, bayılma, vücut sıcaklığında azalma ve deri soyulması gibi belirtiler gelişir. İnsanlarda, fenol içeren su ve gıdaların vücuda alınması şiddetli ağrılara, beyin, dolaşım ve sinir sisteminde bozukluklara, böbrek yetmezliğine, görme kaybına, ağır sarsıntılara ve hatta ölümlere bile neden olabilmektedir [3, 7, 8]. 4.8 gramının 10 dakikada ölüme sonuçlandığı bildirilen en düşük doz olarak fenolün eşik değerini oluşturmaktadır [3].

Fenolik bileşiklerden 3,5-dinitrosalisilik asit (DNS) teneffüs edilmesi, deri ile teması ve yutulması halinde oldukça zararlı olan bir maddedir. DNS deride ciddi yanıklara ve gözde ciddi hasarlara neden olur. Yapılan hayvan deneyleri sonucunda yutulması halinde ölüme sebep olduğu bildirilmiştir [24].

### **2.1.2. Çevredeki Fenol ve Türevlerinin Oluşumu**

Fenoller hem doğal hem de endüstriyel işlemler ile oluşmaktadır. Lignoselülozik malzemenin ve hayvansal atıkların bozunması ve orman yangınları gibi doğa olaylarında toprak ve suya karışması sonucu doğada bulunmalarının yanısıra kömür, kağıt, reçine, odun, kauçuk, patlayıcı, plastik, kimya, ilaç, tekstil ve boya

Üretim sektörlerinden, mineral, metal işleme tesisleri ile petrol rafinerileri gibi çeşitli endüstriyel aktivitelere aıća çıkan endüstriyel atıklarda da bol miktarda fenol ve türevlerine rastlanmaktadır [4, 5, 25, 26].

Çevredeki fenol kaynaklarından biri de tarım zararlılarına karşı kullanılan herbisit, insektisit ve fungusit gibi kimyasallardır. Yapılarında bol miktarda fenol ve türevlerini bulunduran bu kimyasal maddeler yaćmur suları ve dićer faktörler sebebiyle çevredeki fenol miktarının artmasına sebep olmaktadır [27].

## **2.2. Fenol ve Türevlerinin Arıtım Yöntemleri**

Organik bileşiklerden tehlikeli kirleticiler olarak adlandırılan fenol ve türevlerinin su ortamlarına deşarj edilmeden önce arıtımının yapılması son derece önemlidir. Fenol ve türevlerinin nitelićine baćlı olarak (tanecik boyutu, uçucu veya uçucu olmaması, hidrofobik veya hidrofilik olması) eitli kimyasal, fiziksel veya biyolojik arıtım yöntemleri kullanılmaktadır [3]. Bu yöntemler özütleme, uygun adsorban kullanılarak adsorpsiyon, buhar destilasyonu, reaktifler ile kimyasal bozunma, membran işlemleri, biyosorpsiyon, iyon dećitirme, radyasyon ve elektrokimyasal yöntemlerdir [3, 5]. Bu yöntemlerde, yüksek maliyet, saflaştırma eksiklikleri, uygulama için sınırlı derişim aralıćı, düşük verimlilik ve uygulanabilirlik, zararlı yan ürünlerin oluşumu gibi eksiklikler ve kısıtlamalar oluşabilmektedir [5].

Günümüzde yüksek miktarda organik madde içeren ve arıtıma karşı dirençli endüstriyel atık suların arıtımında yükseltgeme işlemlerinden geniş oranda faydalanılmaktadır. Kimyasal yükseltgeme, ultraviyole ııćı ile yükseltgeme, elektro-yükseltgeme, ya hava yükseltgemesi, bakteriyel yükseltgeme, ozon ile yükseltgeme ve enzimatik yükseltgeme gibi çeşitli yükseltgeme işlemleri fenol ve türevlerinin uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır.

Kimyasal yükseltgeme toksik organik bileşiklerin tamamen bozulması için oldukça etkili bir yöntemdir. Fakat kimyasal yükseltgeme yöntemi ekonomik dećildir ve çevredeki kirlilik problemini tamamen ortadan kaldıramaz. Biyolojik arıtım yöntemleri organik maddelerin bozulmasında kullanılan en ekonomik yöntemlerdir [3]. Bu yüzden enzim kullanımıyla yükseltgeme işlemi gerçekleştirilmesinin düşük maliyette olması tercih edilme sebeplerinden biridir.

### **2.2.1. Enzim Kullanımıyla Arıtım Yöntemi**

Atık sularda arıtım için enzim kullanımı 1930'lu yıllara dayanır. Enzimlerin kimyasal bileşiklerin seçimli olarak uzaklaştırılmasında kullanılan en uygun maddeler olduğu 1970'lerden bu yana bilinmektedir. Bu bilgi ile fenolik bileşiklerin uzaklaştırılması ile ilgili yapılan çalışmaların büyük bir bölümü enzimlerin kullanıldığı biyolojik yöntemleri geliştirmeye yöneliktir [28, 29].

Geleneksel yöntemlerin çoğunda istenmeyen yan ürünlerin oluşması veya zararlı kimyasalların kullanımı gibi dezavantajlar vardır. Bu sebeple enzimatik yükseltgeme gibi yöntemler önem kazanır. Enzimatik yükseltgeme yönteminde enzimlerin özgül ve biyobozunabilir katalizörler olması, enzim tepkimelerinin ılımlı koşullarda yürütülebilmesi ve yöntemin çevre dostu ve pratik olması gibi pek çok avantaj bulunmaktadır [30].

Son yıllarda, tirozinaz, peroksidaz veya lakkaz enzimleri ile oluşturulan malzemeler fenol ve türevlerinin uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır. Bu malzemelerin kullanımı saf ve izole haldeki enzimlerin kullanımına dayalı işlemlere göre hem daha uzun ömürlü hem de daha düşük maliyetli olmaktadır [9].

### **2.3. Enzimler ve Genel Özellikleri**

Enzimler peptit bağlarıyla birbirine bağlanmış aminoasit zincirlerinden oluşan yüksek molekül ağırlıklı, çoklu fonksiyonel gruplara ve oldukça kararlı üç boyutlu yapıya sahip biyolojik bileşiklerdir. Canlı hücreler tarafından oluşturulurlar ve canlı hücrelerde gerçekleşen binlerce kimyasal tepkimeyi yürüten protein yapısında biyokatalizörlerdir [31].

Enzimlerin varlığı yüzyıllardır bilinmektedir. 1835 yılında yapılan ilk çalışmalar, enzimleri kimyasal katalizör olarak adlandıran İsveçli kimyager Jon Jakob Berzelius tarafından yürütülmüştür. İlk saf haldeki enzim Cornell Üniversitesi'nde James B. Sumner tarafından 1926 yılında elde edilmiştir. Sumner, fasulyeden üreaz enzimini izole ederek 1947 yılında Nobel ödülüne layık görülmüştür [32].

Enzimlerin en önemli özellikleri tepkime aktivasyon enerjisini düşürerek tepkimenin hızlı ve verimli olmasını sağlaması ve kararlı yapılarıyla herhangi bir kimyasal değişikliğe uğramadan tepkimeyi katalizlemesidir [33, 34]. Enzim katalizli

tepkimelerde enzimin aktif kısmına substrat bağlanması hidrojen bağları veya iyonik bağlar ile gerçekleşir.

Standart koşullarda bir dakikada 1 mikromol substrat dönüşümünü katalizleyen enzim miktarı 1 aktiflik birimi (U) olarak adlandırılır. Aktiflik değeri yaklaşık olarak saf enzimler için  $10^{-6}$ - $10^{-11}$  kg ve endüstriyel enzim preparatları için ise  $10^{-4}$ - $10^{-7}$  kg olarak belirtilebilir [35]. Bir enzim molekülü dakikada binlerce kez tepkime döngüsüne girip döngüyü yürütebilir.

Enzimlerin aktiviteleri, yapısını oluşturan aminoasitlerin dizilişine ve reaktifliklerine (nükleofilitesine) bağlıdır. Sıcaklık, pH, enzim ve substrat derişimi, inhibitör veya aktivatör varlığı gibi çeşitli faktörler de enzim aktivitesini etkiler [36].

Biyokatalizör olarak enzimlerin geleneksel kimyasal katalizörlere göre özgünlük ve seçicilik üstünlükleri vardır. Bu avantajları sadece belirli tepkimelerle sınırlı olmayıp etkinlik gösterdikleri moleküllerin benzer kısımlarını ayırt etmede (bölgesel özgüllük) veya optik izomerlerin ayırt edilmesinde (stereoözüllük) de geçerlidir [37]. İşlem süresinin kısalığı, geniş bir derişim aralığında ve seyreltik çözeltilerde bile etkin arıtım potansiyelleri diğer üstünlükleridir. Enzim izolasyon ve saflaştırma maliyetinin yüksekliği ve doğal ortamlarından uzaklaştırıldığında kararsız oluşları ise dezavantaj olarak belirtilebilir.

Enzimler, enzim komisyonu (EC) tarafından katalizledikleri tepkime türüne göre 6 ana gruba ayrılırlar:

1. Oksidoredüktazlar
2. Transferazlar
3. Hidrolazlar
4. Liyazlar
5. İzomerazlar
6. Ligazlar

Oksidoredüktaz olarak adlandırılan enzim grubu ise yükseltgenme-indirgenme tepkimelerine katılan enzimlerdir ve 4 gruba ayrılır:

1. Oksidazlar
2. Dehidrogenazlar

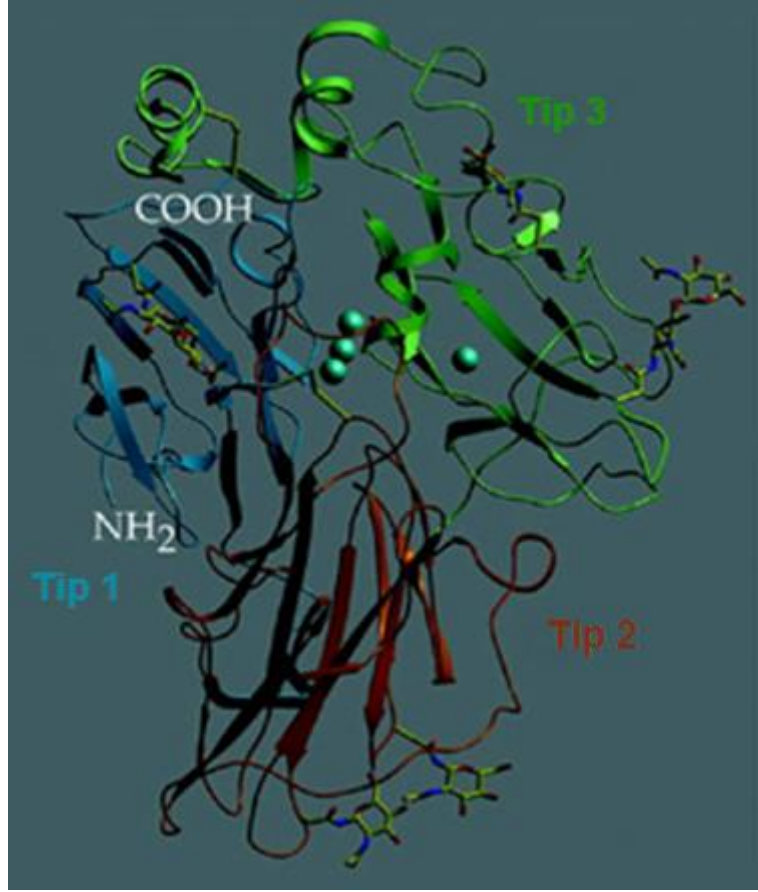


Tip 1 bakır enziminin 600 nm'de gözlenebilen mavi renginden sorumludur ve EPR ile belirlenebilir. Lakkaz enziminin karakteristik mavi renginden Tip 1 bakırın, sistein (Cys) aminoasidinin kükürt (S) grubu ile yaptığı bağ sorumludur. Tip 2 bakır bölgesi renksizdir. Görünür bölgede çok zayıf absorpsiyon vermesine karşın EPR ile belirlenebilir. Tip 3 bakır bölgesi iki çekirdekli yapıda bir çift bakır atomu içerir. Tip 3 bakırları yakın UV'de 330 nm'de verdiği zayıf absorpsiyon bandıyla karakterize edilirken EPR'da sinyal vermez. Tip 3 bakırları arasındaki kuvvetli antiferromanyetik bağlanma hidroksil köprüsü ile oluşur. Tip 2 ve Tip 3 bakır bölgeleri kapalıdır ve üç çekirdekli demet oluşturur (Şekil 2.3) [11].

Tip 1 bakır iki histidin aminoasidinin iki azotu ve biri sistein diğeri metiyonin aminoasidinden iki kükürt ile bağ yapmış durumdadır. Tip 2 bakır, su ve iki histidin ligandları ile Tip 3 bakırları ise hidroksit köprüsü ve üç histidin ligandı ile koordine edilir [41].

Lakkaz geometrisi bozulmuş üçgen bipiramit koordinasyon olarak adlandırılır. Tip 1 ve Tip 2 bakır atomlarının koordinasyon bölgesi arasında nadir olarak görülen ara ürün olarak lösin kalıntısı vardır. Fakat koordine olabilmek için çok uzaktır. Bu sebeple üç bakır atomu birbiri ile koordine edilir [42].

Lakkazın yapısında yer alan aminoasitlerin birbiri ile etkileşimleri (hidrojen bağları, van der Waals etkileşimleri, iyonik kuvvetler ve hidrofobik etkileşimler) domain adı verilen globüler birimler halinde katlanmış üç boyutlu yapının oluşmasını sağlar (Şekil 2.4) [43].



Şekil 2.4. *Trametes versicolor* lakkazın üç boyutlu yapısı [44]. Domainler farklı renklerle gösterilmiştir (Tip 1, Tip 2 ve Tip 3). Bakır iyonları mavi küreler halinde karbohidrat ve disülfid bağları çubuk modeller olarak yer almaktadır.

### 2.3.1.2. Lakkazın Özellikleri

Lakkazın önemli bir özelliği yapısında bulunan % 10-45 oranındaki karbohidrat kısmının enzime yüksek kararlılık sağlamasıdır [38]. Durgun halde UV-görünür spektrumunda yaklaşık 280 nm ve 600 nm civarında iki maksimum pik ve 330 nm yakınında bir omuz gözlenir [39].

Çizelge 2.2. Genel ve *Trametes versicolor* kaynaklı lakkazın fiziksel özellikleri [45]

Özellik	Lakkaz	<i>Trametes</i> Lakkaz	
Optimum pH	3.0 – 7.5	3.6 – 5.3	
Optimum Sıcaklık (°C)	40 – 80	60	
Molekül Ağırlığı (kDa)	60 – 390	60 – 65	
Molekül başına bakır içeriği	2 – 16	4	
Redoks potansiyeli (mV)	180 – 800	Tip 1: 785	Tip 3: 782
İzoelektrik nokta (pI)	2.6 – 7.8	3.1 – 3.3	4.6 – 6.8
Substratları	o- ve p- difenol; polifenol; aminofenol; klorofenol; askorbik asit; ferrosiyanyür		
İnhibitörleri	CN <sup>-</sup> ; N <sup>3-</sup> ; F <sup>-</sup> ; halojen ve anyonlar; pH; dietilkarbamik asit; tiyoglikolik asit; feniltiyüre; EDTA; koniferil alkol		
Katalizlediği Tepkimeler	Metil, metoksi ve karboksil giderimi; fenoksi radikallerinin oluşumu; Cα-Cβ parçalanması; aril-alkil parçalanması; Cα-yükseltgemesi		

Lakkazlar sadece metoksi bağlı monofenol, orto-/para-/difenol ve polifenollerin hidroksil grubundan hidrojen atomunun uzaklaştırılmasını değil, aynı zamanda aromatik aminler, anilinler, fenolik olmayan bileşikler ve bazı inorganik iyonları radikaller haline yükseltgeyebilme özelliğine de sahiptir [46, 47]. Buna ek olarak lakkazlar sadece fenolik ve metoksifenolik asitleri değil aynı zamanda dikarboksilik asitleri de metoksi gruplarına saldırarak (demetilasyon) yükseltgemektedir [48].

Enzimin aktif merkezine erişemeyecek kadar büyük ve oldukça yüksek redoks potansiyeli olan ya da lakkaz ile doğrudan yükseltgenemeyen substratlar için “kimyasal araçlar” kullanılarak yükseltgeme işlemi gerçekleştirilir. Bu türlerin yükseltgenmiş radikal formları substrat ile etkileşerek elektron aktarımına aracılık etmektedir [49].

Halojen, azit, siyanür ve hidroksit anyonları Tip 2 ve Tip 3 bakır atomlarına bağlanıp, elektron transfer sistemini bozarak enzim inhibisyonuna yol açarlar. Hidroksit inhibisyonu, genellikle substratların alkali pH değerlerinde katalizlenmesini önler. Bazı metal iyonları (Hg<sup>2+</sup> gibi), yağ asitleri, sülfidril grupları ve hidroksiglişin diğer inhibitörlerdir. İnhibitörler aminoasit birimlerini modifiye etmesi ve bakır atomları ile şelat oluşturmasıyla etkisini gösterir [49].



### 2.3.1.3. Lakkaz Kaynakları

19. yy'dan beri lakkaz enzimi ile ilgili dikkat çeken çalışmalar yapılmaktadır [10, 50]. Lakkaz enzimi Yoshida tarafından 1883 yılında ilk olarak Japon *Lacquer* (vernik) ağacı olan *Rhus vernicifera*'nın reçine kanal sıvılarından özütlenerek elde edilmiştir [51]. Lakkaz *Rhus vernicifera* dışında *Rhus succedanea*, *Lactarius piperatus*, *Prunus persica* gibi yüksek bitkilerde de bulunmuştur [52]. Lakkazın funguslar tarafından salgılanan bir enzim olduğu ise 1896 yılında Bertrand ve Labord tarafından bulunmuştur [53]. *Trametes versicolor*, *Trametes hirsuta*, *Trametes ochracea*, *Trametes villosa*, *Trametes gallica*, *Cerrena maxima*, *Coriolopsis polyzona*, *Lentinus tigrinus*, *Pleurotus eryngii*, *Dichomitus squalens*, *Junghuhnia separabilma*, *Phanerochaete cryosporium*, *Phlebia ochraceofulva*, *Phlebia radiata* ve *Rigidoporus lignosus* bu funguslardan bazılarıdır. Ek olarak lakkaz, gübre humifikasyonuna katılan *Myceliophthora thermophila* ve *Chaetomium thermophile* gibi çürükçül funguslar tarafından da üretilebilir [54]. *Azospirillum lipoferum* [55], *Marinomonas mediterraneanus* [56], *Streptomyces griseus* [57] ve *Bacillus subtilis* [58] gibi bazı bakterilerde de lakkaz aktivitesi olduğu rapor edilmiştir.

Bakteri, bitki ve böceklerde lakkaz oluşmasına rağmen literatürde bulunan çalışmalarda lakkazların büyük bir kısmı funguslardan izole edilmiştir. Lakkaz, lahana, şalgam, şeker pancarı, elma, şeftali, kuşkonmaz gibi birçok sebze ve meyvede bulunmuştur [10].

### 2.3.1.4. Lakkazın Biyolojik Roller

Fungal lakkazların çoğunluğunun biyolojik rolü hala belirsizdir. Fakat *Trametes versicolor*, *Lentinus edodes* ve *Pleurotus ostreatus* gibi fungal lakkazlar lignin degradasyonunda yer almaktadır [59-61]. Fungal lakkazların temelde üç fonksiyonu vardır. Bunlar pigment oluşumu, lignin bozulması ve detoksifikasyondur [40]. Yüksek bitkilerde, lakkazlar ksilem dokuları odunlaştırmaya katılırlar [62, 63]. Bakteriyel sistemde lakkazlar melanin üretimi, spor ceket direncinde ve morfogenezindeki katılmada rol alırlar [57, 58].

### 2.3.1.5. Lakkazın Katalitik Rollerini

Lakkaz, radikal katalizli tepkime mekanizması ile çeşitli aromatik ve aromatik olmayan bileşikleri yükseltgeyebilme özelliğine sahiptir. Yükseltgeme işleminde lakkaz elektron alıcısı olarak moleküler oksijen kullanmaktadır. Katalitik çevrimde bir oksijen molekülü iki su molekülüne indirgenirken 4 substrat molekülü 4 radikale yükseltgenir. Lakkaz katalizi, doğrudan degradasyon veya polimerizasyon olarak sonuçlanabilir.

Lakkaz katalizli tepkimeler üç ana basamakta gerçekleşir:

1. Tip 1 bakır indirgenirken substrat yükseltgenir.
2. Tip 1 bakır bölgesinde açığa çıkan elektron Tip 2 ve Tip 3 bakır bölgelerine transfer edilir.
3. Tip 2 ve Tip 3 bakır bölgesinde moleküler oksijen suya indirgenir.

Tip 1 ve Tip 2 bakır atomlarının elektron aldığını ve Tip 2 ile Tip 3 bakır atomlarının oksijen bağlanma işlevini içerdiğini kinetik, spektroskopik ve EPR verileri göstermiştir.

Tip 1 alanına substrattan elektron transferi olması hız belirleyici basamak olduğundan lakkazın katalitik etkinliği Tip 1 bakır bölgesinin redoks potansiyeline bağlıdır. Dolayısıyla Tip 1 bakır bölgesinin redoks potansiyeli ne kadar yüksekse katalitik etkinlikte o kadar yüksektir. Tip 1 bakırının sahip olduğu üç ligandın (2 histidin (His) ve 1 sistein (Cys)) trigonal piramidal geometrideki koordinasyonu sonucu yüksek redoks potansiyeli oluşur [64]. Redoks potansiyellerinin 430 mV - 780 mV aralığında değiştiği saptanmıştır [11].

*Trametes versicolor* kaynaklı lakkazdaki yüzey dağılım potansiyeli sonucu negatif yük baskınlığı ortaya çıkar ve asidik izoelektrik nokta (pI) değerine sahiptir. Enzim-substrat kompleksinin kristal yapısından belirlenen Tip 1 bakır bölgesinin yakınındaki negatif yükün işlevi katalitik döngü süresince oluşan radikalın kararlılığını sağladığından dolayı önemlidir [44].

### **2.3.1.6. Lakkazın Uygulama Alanları**

Lakkaz fenolik bileşikleri yükseltgeyebilme yeteneğinden dolayı 19.yy'dan beri endüstride kullanılmaktadır [54, 65]. Fenolik bileşikler yükseltgeyebilmesi lakkazın atık suların arıtımında, ksenobiyotiklerin bozunmasında ve boya renk gideriminde kullanımını uygun hale getirmektedir. Lakkazın, kağıt, tekstil, gıda, ilaç endüstrilerinde biyokatalizör olarak kullanımı bilinmektedir. Bunun yanında yakıt hücresi, biyosensör yapımı gibi çeşitli biyoteknolojik ve çevresel alanlarda da kullanımları bulunmaktadır [11].

Lakkaz kullanımı enerji ve kaynak tüketimindeki tasarrufu, yeni fonksiyonlar oluşturması ve çevre üzerindeki zararlı etkileri azalttığından tehlikeli ve pahalı kimyasallar yerine tercih edilmektedir [11].

### **2.4. Enzim İmmobilizasyonu**

Enzimlerin kararlılıklarını arttırmak için farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden en sık kullanılanlar, kimyasal modifikasyon ve çeşitli destek malzemeleri üzerine immobilizasyon yöntemleridir [66].

Enzim immobilizasyonu enzimin çözünmeyen destek malzemesine bağlanmasıdır [67]. Enzimin uygun bir destek malzemesine immobilizasyonu dört farklı yolla gerçekleşir.

1. İmmobilizasyondan önce enzim uygun bir tepkimeyle aktive edilir. Aktivasyon işleminde, molekül içi ve moleküller arası çapraz bağlanma olasılığı ve reaktif kimyasal bileşiklerin aktiviteyi değiştirme riski dikkate alınmalıdır.
2. Modifiye edilmiş destek malzemesi aktive edildikten sonra enzimin yüzeye kovalent bağ ile bağlanması sağlanır.
3. Biyoseçimli grup içeren protein eldesi için rekombinant DNA tekniği ile modifiye edilip, biyoafinite yöntemiyle uygun destek malzemesine adsorbe edilir.
4. Molekül içi ve moleküller arası çapraz bağlanmasına neden olabilecek çok fonksiyonlu birleştirme ajanlı destek malzemesi ile enzimin fonksiyonel grupları etkileştirilir.

İmmobilizasyon yöntemlerinin çoğu aktive edilmiş destek malzemesinin fonksiyonel gruplarına, amino gruplarının nükleofilik saldırısı ile gerçekleşir.

İmmobilizasyon işlemi, enzimi, üründen ve tepkime karışımından ayırma kolaylığı, enzimin tekrar kullanılabilirliği ve düşük maliyet gibi avantajlar sağlar [68]. İmmobilize enzimin konformasyonel ve fonksiyonel özellikleri korunur, ısı kararlılık, aktivitede inhibisyon ve denatüre edici ajanlara karşı yüksek duyarlılık gibi olumsuz etkilerin önüne geçilir [12, 67, 69, 70]. İmmobilize enzimler susuz sistemlerde, serbest enzimlerden daha yüksek derişimlerde ve sürekli sistemlerde kullanılabilir. İmmobilizasyon ile bazı enzimlerin ısı kararlılığı artırılabilir [71].

Enzim immobilizasyonu uygulamaları enzimlerin endüstriyel alanlarda kullanılmasına olanak sağlamaktadır çünkü immobilize enzimlerde depolama ve çalışma kararlılıkları iyileştirilmektedir [14].

#### **2.4.1. İmmobilize Enzimlerin Kullanım Alanları**

İmmobilize enzimler sürekli sistemlere olanak sağladığı için endüstriyel uygulamalarda kullanımı daha uygundur. İmmobilize enzimler heterojen biyokatalizörler ve seçimli adsorbanlar olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda immobilize enzimlerin katı faz protein kimyası ve kontrollü ilaç salınımı konularında uygulama alanları bulunmaktadır. Enzim immobilizasyonun, antibiyotik üretimi, tıp, gıda endüstrisi, biyosensör ve biyodizel üretimi ve tekstil endüstrisi gibi alanlardaki uygulamalarının yaygın olduğu rapor edilmiştir [72].

#### **2.4.2. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri**

Kavramsal olarak, enzim immobilizasyonunda enzim ve destek malzemesi arasında kimyasal veya fiziksel etkileşimlerin yer aldığı temel iki yöntem vardır. Fiziksel etkileşimler üç boyutlu bir matris içinde enzimin tutuklanması veya organik/inorganik bir polimer içinde kapsüllenmesi yöntemlerini; kimyasal etkileşimler ise adsorpsiyon, kovalent bağlanma veya öz immobilizasyon yöntemlerini içerir. Bu yöntemlerin her birinin avantaj ve dezavantajları vardır [14].

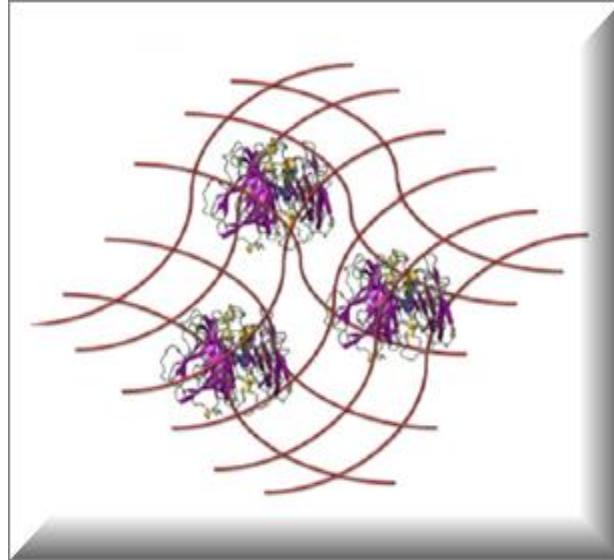
Daha önce de belirtildiği gibi, lakkaz biyoteknolojik ve çevresel uygulamalarda deneysel ya da doğal koşullarda karmaşık kimyasal işlemlerin gerçekleşmesini sağlayan, yüksek aktiviteye, seçiciliğe ve özgüllüğe sahip mükemmel bir

katalizördür [73]. Fakat küçük uygulamalar için lakkazın serbest halde kullanılması, düşük kararlılık ve yüksek üretim maliyetine bağlı olarak hala sınırlıdır [12, 13]. İmmobilizasyon ile lakkazda bazı özelliklerin olumlu yönde değişmesiyle bu sınırlamaların üstesinden geliriz [49]. Lakkaz immobilizasyon yöntemleri ve literatürde yer alan bazı çalışmalar aşağıdaki başlıklar altında açıklanmıştır.

#### 2.4.2.1. Tutuklama

Tutuklama poliakrilamid, kolajen, aljinat ya da jelatin gibi gözenekli katı destek malzemeleri içinde enzimlerin fiziksel etkileşimlerle tutulması olarak tanımlanır [74].

Enzim ilk olarak monomer çözeltisi içinde süspanse edilir ve daha sonra çevre ile doğrudan teması önlenerek polimerizasyon işleminde tutuklanır (Şekil 2.5). Polimerik yapı, enzim varlığında sentezlenmektedir.



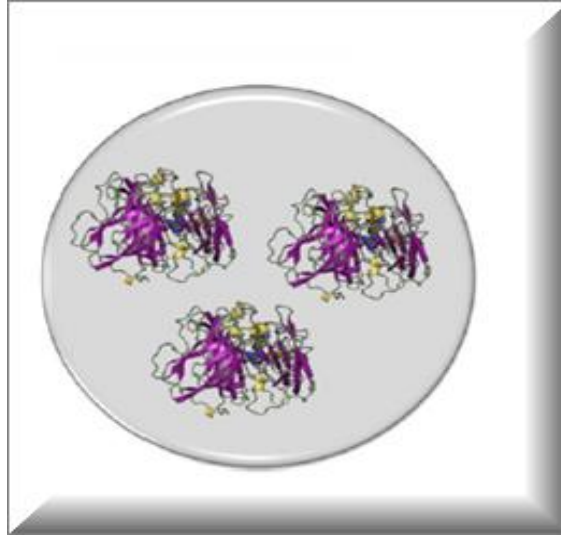
Şekil 2.5. Fiziksel etkileşimler ile enzim immobilizasyonu: Gözenekli katı bir destek malzemesi içinde enzimlerin tutulması

Tutuklama immobilizasyonu kolay bir yöntemdir ve enzimde hiç bir yapısal değişikliğe neden olmaz. Ancak, bu yöntemde kütle transferi sınırlamaları ve düşük enzim yükleme kapasitesi mevcuttur [75].

#### 2.4.2.2. Kapsülleme

Tutuklama yöntemiyle karşılaştırıldığında enzim kapsüllemesinde de benzer bir davranış gözlenmektedir. Çünkü enzim bu iki immobilizasyon yöntemiyle de ciddi sınırlamalar ile çevre ve kütle transferinden korunmuş durumdadır.

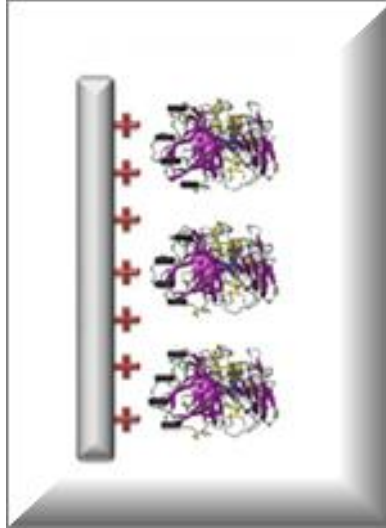
Kapsülleme yönteminin bir alternatifi ise mikrokapsülasyondur. Bu yöntemde biyolojik olarak aktif olan madde, yarı geçirgen malzemeden yapılmış mikron büyüklüğünde kürelerin merkezindedir. Mikrokapsülasyon edilmiş lakkaz polimer (polietilenimin vb.) veya inorganik maddeler ( $\text{SiO}_2$  vb.) gibi yarı geçirgen membranlar ile çevrelenir [76] (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Fiziksel etkileşimler ile enzim immobilizasyonu: Enzimlerin kapsüllemesi

#### 2.4.2.3. Adsorpsiyon

Bir destek malzemesi üzerine lakkaz adsorpsiyonu, iyonik ve/veya diğer zayıf kuvvetlerin etkileşimini esas almaktadır (Şekil 2.7). Adsorpsiyon lakkaz immobilizasyonu için ucuz, basit ve diğer yöntemlerden daha yüksek ticari potansiyele sahip bir yöntemdir [77].



Şekil 2.7. Kimyasal etkileşimler ile enzim immobilizasyonu: Destek malzemesine iyonik kuvvetler ile enzim adsorpsiyonu

İmmobilizasyon işlemi sırasında ortamın pH değeri, iyonik şiddeti ve destek malzemesi yüzeyinin hidrofobisitesi dikkate alınmalıdır [78].

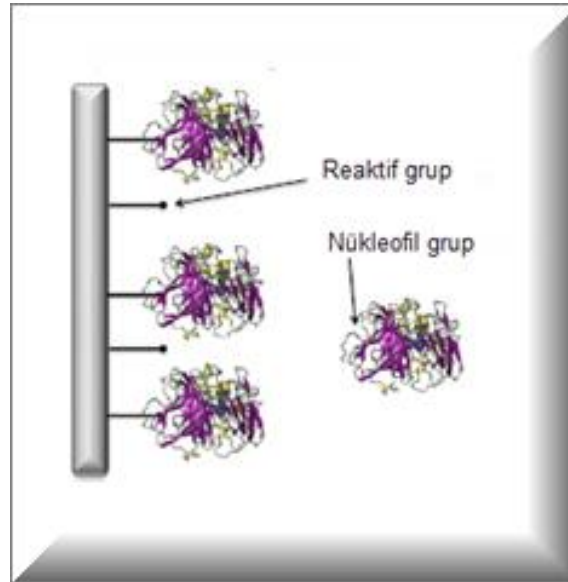
*Trametes versicolor* lakkaz ile adsorpsiyon yöntemiyle çeşitli immobilizasyon çalışmaları yapılmıştır. Huajun ve ark. [78] *Trametes versicolor* lakkazı elektrostatik adsorpsiyon ve kovalent bağlanma ile immobilize etmişlerdir. Lakkaz adsorpsiyonu için kullanılan temel malzemeler silika bazlı desteklerdir. Manyetik nano-tanecikli  $\text{Cu}^{2+}$  gibi metal tabanlı destek malzemeleri de metal-şelat adsorpsiyonunda kullanılmıştır. Örneğin *Trametes versicolor* lakkaz Cu-şelasyonu ile poli(hidroksietilmetakrilat-n-metakriloil-(I)-histidin metilester) (PHEMAH) nanoküreler üzerine immobilize edilmiştir [14]. Bu histidin içeren nanoküreler uygun bir adsorpsiyon kapasitesine sahiptir ve immobilize edilmiş lakkaz geniş bir pH ve sıcaklık aralığında serbest lakkazdan daha yüksek ısıl kararlılık ve aktiviteye sahiptir.

Lakkaz immobilizasyonu için önerilen başka bir adsorpsiyon yöntemi ise çeşitli fonksiyonel grup ve hareketli iyonlar ile dekstran, agaroz ve kitosan gibi iyon değişim reçineleri kullanımına dayanmaktadır [77, 79].

#### 2.4.2.4. Kovalent Bağlanma

Endüstriyel uygulamalarda lakkaz immobilizasyonu için en ilgi çeken yöntem kovalent bağlanmadır. Sulu çözeltilerdeki çalışmalarda ve denatüre edici faktörlerin varlığında enzim sızması minimize edilip ürünün proteinle kirlenme olasılığı yok edildiğinden kovalent bağlanma daha çok tercih edilmektedir.

Bu yöntemde, destek malzemesi yüzeyindeki kimyasal gruplar protein üzerindeki nükleofilik gruplar ile yer değiştirme tepkimesine girer (Şekil 2.8) [70]. Genellikle protein yüzeyinde çok sayıda bulunan yüksek reaktiviteli lizin amino grupları kullanılarak kovalent bağlanma gerçekleşir [80].



Şekil 2.8. Kimyasal etkileşimler ile enzim immobilizasyonu: Enzimin nükleofilik gruplar ve destek arasında kovalent bağlanması

Enzimin çok noktadan bağlanmasını sağlamak için seçilecek destek malzemesi kısa ayırıcı kollar ve yüksek yoğunlukta reaktif gruplar içermelidir. Kaolin veya gözenekli silika nanopartiküller gibi silika bazlı malzemeleri içeren pek çok destek kovalent bağlanma ile lakkaz immobilizasyonu için kullanılmıştır [13]. Eupergit ve Sepabeads gibi pek çok epoksi aktive reçine, grafit, gümüş, altın, cam ve karbon bazlı farklı pek çok elektrot da lakkaz immobilizasyonu için kullanılmıştır [12, 75]. Immobilizasyon işlemleri sırasında pürüzlü metal yüzeye kovalent olarak bağlanmasını veya tek bir molekül adsorplanmasını algılayabilen, yüzey duyarlılığı

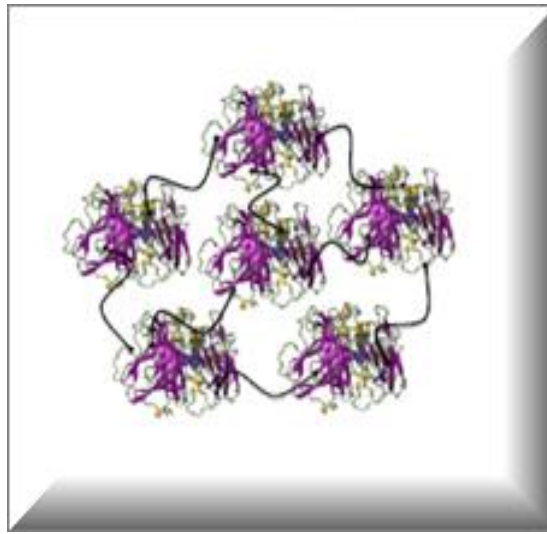


olan rezonans Raman (RR) ve yüzey geliştirilmiş Raman saçılma spektroskopisi (SERS) kullanılmıştır [81]. Çeşitli polimer ve fiberler de enzim ve destek malzemesi arasındaki bağlantılarıyla kovalent immobilizasyonda kullanılmıştır.

Son zamanlarda ise ilgi duyulan kriyojeller, lakkaz immobilizasyonu için kullanılmaktadır. Poli(vinilalkol) kriyojel partiküller (PVA) ticari lakkaz Roglyr Lite 1540 kovalent immobilizasyonu için kullanılmıştır. Gluteraldehit çapraz bağlayıcı ajan olarak ve  $\beta$ -alanin uzatma kolu olarak kullanılarak immobilize lakkazın, serbest enzimden yüksek bir spesifik aktivite sergilediği ve kararlılığında ve pH aralığında iyileşme gözlemlenmiştir [82].

#### 2.4.2.5. Öz Immobilizasyon

Katı destek malzemelerin kullanımı biyokatalizörün hacimsel aktivitesini ve özgüllüğünü azaltabilir. Bu sebeple katı destek içermeyen immobilize enzimin elde edilmesi enzim moleküllerinin birbirine bağlanarak kendi destek sistemini oluşturmasıyla mümkündür (Şekil 2.9). Enzim moleküllerinin birbirleriyle bağlanması ise gluteraldehit gibi çift fonksiyonlu bir reaktif kullanılarak enzimlerin çapraz bağlanmasıyla sağlanabilir [80]. Diğer çapraz bağlayıcılar karbodiimit tarafından aktive edilmiş dialdehidler, diimino esterler, diizosiyanatlar ve diaminlerdir [70].



Şekil 2.9. Kimyasal etkileşimler ile enzim immobilizasyonu: Öz immobilizasyon; çapraz bağlı enzim agregatlarının (CLEAs) modeli

### **2.4.3. İmmobilizasyon Yöntemi Seçimi**

İstenilen enzim için uygun yöntemin seçimi tepkime ve çevre koşullarına, destek malzemesi kullanımına, bağlı proteine, aktif enzim verimine ve kinetik parametrelere bağlıdır. Seçilen immobilizasyon yöntemi, enzimin aktif konformasyonunu ve katalitik etki yapan birimlerini korumalıdır. İmmobilizasyon tasarımında ayrıca enzim boyutu, izoelektrik noktası, konformasyonel esnekliği, yüzey yükü, yüzey fonksiyonel grupları, destek malzemesinin yüzey alanı, organik veya inorganik kökenli oluşu, hidrofilik ve hidrofobik karakterinin yanısıra spesifik olmayan çözünen destek etkileşimleri ve enzim inhibisyonu gibi parametreler dikkatlice incelenmelidir [29, 67, 83].

Sulu çözeltilerdeki çalışmalarda ve denatüre edici faktörlerin varlığında kovalent bağlanma ile immobilizasyon tercih edilmektedir. Çünkü enzim sızması minimize edilir ve ürünün proteinle kirlenme olasılığı azaltılır. Enzim ve destek malzemesi arasındaki çoklu kovalent bağlar, ısıtma ve konformasyonel esnekliğini azaltır. Bu sebeple hidrofobik veya hidrofilik destek malzemeleri tercih edilebilir.

Hidrofilik, yüzey alanı büyük olan enzimler hidrofilik destek malzemeleri ile, lipofilik yüzey alanı büyük olanlar hidrofobik destek malzemeleri ile adsorpsiyon yöntemi kullanılarak van der Waals kuvvetleri ve entropi değişimleri ile immobilize edilirler.

Tepkime sistemi seyreltik sulu çözelti olduğunda kovalent bağlanma, çapraz bağlanma veya kapsülleme; derişik viskoz organik/inorganik karışımlar için kovalent bağlanma veya çapraz bağlanma; seyreltik organik çözeltiler için ise belirtilen immobilizasyon tekniklerinden herhangi biri kullanılabilir.

### **2.4.4. Destek Malzemeleri**

İmmobilizasyonun gerçekleşmesi için uygun destek malzemelerinin, biyouyumlu, enzimlere karşı inert, mikrobiyal, kimyasal ve fiziksel etkilere karşı dirençli, düşük maliyetli ve tekrar kullanılabilir olması önemlidir. Ayrıca destek malzemelerinin seçiminde kimyasal özelliklerine (bileşim, hidrofilik ya da hidrofobik doğası, tepkime koşullarında kararlılığı, yüzeyindeki fonksiyonel gruplar, türevlendirme kolaylığı, vb.), geometrik özelliklerine (boyut, şekil, kalınlık, gözeneklilik, vb.), immobilize edilecek enzimin özelliklerine (kimyasal bileşim, fiziksel özellikler, yapı,

vb.) ve ekolojik ve biyolojik özelliklere (çevre ya da insanlar için toksik olmayan, kolayca bertaraf edilebilen) dikkat edilmelidir [80].

Buna ek olarak, destek malzemesi içinde substratın difüzyonu biyokatalitik tepkimeyi yürütmek için kolayca gerçekleştirilebilir olmalıdır. Bu nedenle gözenekliliği ve yüzey alanı tepkime koşulları için uygun olmalıdır [67].

**Çizelge 2.3. Enzim immobilizasyonunda kullanılan destek malzemeleri**

<b>Anorganik Polimerler</b>	<b>Doğal kökenli destekler</b>	<b>Sentetik Polimerler</b>
Cam	Selüloz	Vinil ve allil polimerler
Silikajel	Nişasta	Polistiren
Alümina	Dekstran	Poliakrilamid
Bentonit	Agaroz	Naylon
Hidroksiapatit	Aljinat	Polivinil alkol
Titan dioksit	Kitin	Oksiran
Zirkonyum dioksit	Kolajen gibi yapısal proteinler	Metakrilat
Nikel/ nikel oksit	Albümin gibi globular proteinler	İyon değiştirici reçineler
	Karbon	Maleik anhidrit
		Polipeptit yapılar

İmmobilizasyon öncesi destek malzemesinin hazırlanması, fonksiyonel (aktif) grup oluşturacak şekilde polimer iskeletinin aktivasyonu veya modifikasyonu şeklinde gerçekleşir. Buna molekül yüzey yükünün tiyol veya aminlerin karboksilik asitlere dönüştürülerek değiştirilmesi, karbodiimid aktivasyonu ile karboksilik asitlerin amine dönüştürülmesi gibi örnekler verilebilir. Fonksiyonel grupların immobilizasyon tepkimesine uyumu, komşu grupların sterik engellemesi ve çözücü molekülleri ile etkileşim gibi çevresel faktörlerden etkilenir.

Farklı kaynaklardan elde edilen lakkazların immobilizasyonunda ise doğal (kitin, kitosan, agaroz, selüloz ve türevleri) ve sentetik [nylon, polisiloksan, polianilin, polivinil alkol, poli(glisidil metakrilat)] polimerik destek malzemeleri kullanılmaktadır [29, 38, 84].

Ayrıca hindistan cevizi lifi düşük maliyeti nedeniyle lakkaz immobilizasyonunda destek malzemesi olarak kullanılmıştır [85]. Lakkazın aktif karbon [75, 86],

Eupergit C [75], kitosan [84], aljinat [74] gibi çeşitli destek malzemelerine immobilize edildiği bilinmektedir.

*Tratemes versicolor* kaynaklı lakkazın immobilizasyonunda kullanılan destek malzemeleri ise gözenekli cam, karbon elyaf, montmorillonit, sefaroze, osmiyum, reçine, *in vitro* seramik, redoks hidrojel, poliakrilamid, polivinil florür ve çeşitli jeller olduğu rapor edilmiştir [64].

#### **2.4.5. Kriyojeller**

Kriyojelleşme teknolojisi, homojen veya heterojen monomer/polimerlerin kısmen donmuş karışımı kullanılarak, kriyojel olarak adlandırılan üç boyutlu (3D) gözenekli polimerik destek malzemesini üretmek için kullanılan potansiyel bir yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır [87, 88].

Kriyojeller, yüksek difüzyon, kimyasal ve mekanik dayanıklılık özelliklerinin benzersiz bir bileşimini sunan, sıfırın altındaki sıcaklıklarda sentezlenen ve yüksek derecede birbirine bağlı gözenekli yapıya sahip olan özel bir hidrojel türüdür [89]. Kriyojeller, 10-100 mikron aralığında gözenek boyutu ile birbirine bağlı süper makrogözenekli yapılardır. Kriyojel yapılarının birbirine bağlı süper makrogözeneklerinin bulunması jel matrisin tıkanmasını önleyerek mikro, nano veya biyopartiküllerin kolaylıkla geçişine izin verir [87, 90].

Kriyojeller monolit, çubuk, levha, disk ve küresel parçacıklar gibi farklı şekillerde üretilir. Şekil, tepkime kabı, dağılım maddesi ve diğer sentez koşulları tarafından belirlenir [91, 92]. Çoğu uygulama için kriyojellerin geometrik şekli, kendi iç gözenekli yapısından daha az önemlidir.

İyonik şiddet, pH, dondurulma hızı, sıcaklık gradienti, çözünen monomer veya oligomerler, çapraz bağlanma koşulları, su ve organik çözücüler, kriyojellerin gözenek boyutu dağılımı ve gözenek duvarı kalınlığı gibi yapısal özelliklerinde ciddi anlamda değişiklikler meydana gelmesine sebep olurlar. Bu etkiler, buz kristallerinin su damlalarından (nano alan, küme) daha büyük bir özgül hacme sahip olmalarıyla, buz kristallerinin orijinal sulu çözeltiden daha fazla saf ve homojen olmalarıyla ilgilidir. Gözeneklerin şeklinin yuvarlak ve gözenek yapısının pürüzsüz olmasının sebebi çözücü ve polimerik yapı arasındaki yüzey gerilimidir [93, 94].

Yavaş dondurulma hızı, daha büyük buz kristallerinin oluşmasına sebep olurken gözenek duvarlarının parçalanmasına neden olabilir. Fakat çözeltinin dondurulma sıcaklığı arttırıldığında daha büyük buz kristalleri oluşması sonucunda daha geniş gözenekli kriyojeller elde edilir. Çözeltinin dondurulma sıcaklığı azaltıldığında ise gözenek yapıcı olarak kullanılan çözücü kristallerinin daha küçük yapıda daha fazla sayıda oluşumu ile yoğun gözenek yapısına sahip kriyojellerin elde edilmesine sebep olur [95]. Başlangıç monomer veya oligomer derişimi ne kadar fazlaysa o kadar yoğun ve kırılğan matriksler elde edilir. Başlangıç derişimi azaltıldıkça matriksler daha elastik ve süngerimsi bir yapı göstermeye başlarlar [96]. Süngerimsi kriyojeller içerisinde bulunan suyun büyük bir kısmı kapilerler içerisinde ve mekanik olarak sıkıştırma ile uzaklaştırılabilirler. Mekanik sıkıştırma ile kriyojelin içindeki toplam sıvının yaklaşık % 70'i uzaklaştırılabilir. Sıkıştırılmış kriyojeller bir dakikadan daha kısa bir süre içerisinde sıvı ile temas ettiğinde tekrar şişmeye başlar ve orijinal şekline geri döner. Kriyojeller hazırlanırken ne kadar az miktarda çapraz bağlayıcı kullanılırsa sıvıda şişme oranları o kadar fazladır [97].

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda HEMA, agaroz, dekstran, poliakrilamid, polivinil alkol ve polidimetilakrilamidden kriyojeller üretilmiştir [98, 99].

Kriyojeller sahip oldukları geniş gözenekler, kısa difüzyon yolu, düşük basınç kaybı ve çok kısa alıkonma süresi gibi pek çok avantajı ile kullanım alanını arttırmaktadır. Günümüzde kriyojeller kromatografi malzemeleri, moleküler elektroforez, immuno difüzyon ve katı kültür ortamları için jel destek malzemesi olarak çok çeşitli biyomedikal ve biyomühendislik uygulamalarda kullanılmaktadır [87, 88]. Kriyojellerin temel uygulama alanları ise hedef molekülün saflaştırılması için organellerin, virüslerin, mikrobiyallerin ve memeli hücrelerinin kromatografisinde, immobilize enzim ve hücrelerde üç boyutlu biyoayırma destek malzemesi olarak kullanımı şeklinde özetlenebilir [87].

## 2.5. Literatür Çalışmaları

Lakkaz, fenolik bileşikleri yükseltgeyebilme yeteneğinden dolayı 19.yy'dan beri çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanılmaktadır [54, 65].

Leontievsky ve ark. [100] tarafından yapılan çalışma ile *Cotiolus versicolor*'dan elde edilen lakkaz ile triklorofenolün daha az toksik 2,6-dikloro-1,4-hidrokinol ve 2,6-dikloro-1,4-benzokinona dönüştürüldüğü sonucuna ulaşılmıştır.

Ullah ve ark. [101] tarafından yapılan çalışma ile beyaz çürükçül fungustan elde edilen lakkaz sulu çözeltisi ile 50 ppm'lik 2,4-diklorofenolün 5 saat içinde tamamen uzaklaştırıldığı ve 50 ppm'lik başlangıç derişimindeki çözülden 24 saat içinde pentaklorofenolün % 75-80'inin uzaklaştırıldığı kaydedilmiştir.

Kim ve ark. [102] tarafından sulu çözeltilerdeki fenol ve reaktif boyaların (Black 5 ve Red E) adsorbanı olarak kontrollü gözenekli yapıya sahip karbon kriyojel mikrokürelerin (CC mikroküreler) kullanılması incelenmiştir.

Lakkazın immobilizasyonunda makrogözenekli kriyojellerin destek malzemesi olarak seçilmesiyle tez kapsamında yapılan çalışmaya en benzer çalışmalar Stanescu ve arkadaşları tarafından yürütülmüştür.

Stanescu ve ark. [82] tarafından ticari olan Roglyr Lite 1540 lakkazın immobilizasyonunu kovalent bağlanma yöntemiyle destek malzemesi olarak seçilen makrogözenekli poli(vinilalkol) kriyojel partiküllere gerçekleştirilmiştir. Çapraz bağlayıcı olarak glutraldehit ve uzatma kolu olarak  $\beta$ -alanin kullanılmıştır. Deneysel verilere bakıldığında ise immobilize lakkazın serbest enzimden daha yüksek aktivite sergilediği ve immobilize lakkazın kararlılığında ve çalışma pH aralığında artış olduğu gözlenmiştir.

Stanescu ve ark. [103] tarafından yürütülen başka bir çalışmada, substratların enzim merkezine difüzyonunu kolaylaştıran geniş gözenekli kriyojel tipi destek malzemesi kullanılarak Bromaminik asit ve Asit Blue 62 olarak adlandırılan antrazitkinon türevlerinin renk gideriminde lakkazın etkili olduğu kanıtlanmıştır. 24 saat sonra iki substratında % 80 üzerinde yükseltgendiği gözlenmiştir.

Stanescu ve ark. [104] tarafından yürütülen diğer bir çalışmada ise poli(vinilalkol) kriyojellerine immobilize edilen *Trametes pubescens* lakkaz ile elma suyundaki 4 fenol bileşiğinin (katekol, kaffeik ve klorojenik asit, ve katekin) kararlı durum kinetik

karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Enzim çözeltisinin protein miktarının azalmasıyla desteğe enzim yükleme oranı 5.2 mg/g kriyojel olarak hesaplanmıştır.

Uygun [105] tarafından lakkaz enzimi, radikal kriyopolimerizasyon yöntemi ile sentezlenen poli(metilmetakrilat-ko-glisidilmetakrilat) {poli(MMA-ko-GMA)} kriyojeline kovalent olarak immobilize edilmiş ve yedi farklı boyar maddenin renk gideriminde kullanılmıştır. Kriyojel, şişme çalışmaları, SEM ve EDX analizleri kullanılarak karakterize edilmiştir. Optimum pH, immobilize ve serbest haldeki lakkaz için 4.0 olarak bulunmuş, ardışık 10 tekrarlar immobilize lakkazın aktivitesinde azalma olmadığı gözlenmiştir. Ayrıca immobilize lakkazın ısı kararlılığının daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

*Trametes versicolor* lakkaz için seçilen immobilizasyon yöntemleri, destek malzemelerinin etkisi ve uygulama alanlarının incelenmesiyle ilgili bazı çalışmalar aşağıdaki Çizelge 2.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 2.4. *Trametes versicolor* lakkaz ile yapılan bazı çalışmalar [14]

<b>Tutuklama yöntemi</b>			
<b>Destek malzemeleri</b>	<b>Substrat</b>	<b>Uygulama Alanı</b>	<b>Kaynak</b>
Polipirol	ABTS	Biyoyakıt hücreleri	[106]
Digliserilsilan	Fenoller	Biyosensör	[107]
<b>Kapsülleme yöntemi</b>			
<b>Destek malzemeleri</b>	<b>Substrat</b>	<b>Uygulama Alanı</b>	<b>Kaynak</b>
Sol-jel silika	2,6-Diklorofenol		[108]
Alumina peletler	ABTS	Kağıt endüstrisi	[109]
<b>Adsorpsiyon yöntemi</b>			
<b>Destek malzemeleri</b>	<b>Substrat</b>	<b>Uygulama Alanı</b>	<b>Kaynak</b>
Grafit elektrot	Katekol	Biyosensör	[110]
Camsı elektrotlar üzerine nanogözenekli altın	2,6-Dimetoksifenol	Yakıt hücreleri	[111]
Poli(hidroksietilmetakrilat) film-glisidil metakrilat	Syringaldazin	Ksenobiyotik bozulması	[77]
Poli(hidroksietilmetakrilat-N-metakriloil-(L)-histidin metilester): PHEMA nanoküreler	ABTS		[79]
<b>Kovalent bağlanma yöntemi</b>			
<b>Destek malzemeleri</b>	<b>Substrat</b>	<b>Uygulama Alanı</b>	<b>Kaynak</b>
Glisidil metakrilat ile aşılınmış naylon membranlar	Bisfenol A	Ksenobiyotik bozulması	[112]
Manyetik makrogözenekli selüloz küreler	ABTS, syringaldazin	Boya renk giderimi	[113]
EDC ile aktive edilmiş petek yapısında kitosan inorganik seramik destekler	ABTS	Boya renk giderimi	[114]
Polipropilen membranlar	ABTS	Yakıt hücreleri	[115]
EDC ile aktive edilmiş kitosan	ABTS	Ksenobiyotik bozulması	[116]
<b>Öz immobilizasyon yöntemi</b>			
<b>Destek malzemeleri</b>	<b>Substrat</b>	<b>Uygulama Alanı</b>	<b>Kaynak</b>
Polietilen glikol ile CLEAs ve GLU veya N-oksi radikal TEMPO	Katekol	Ksenobiyotik bozulması	[117]



### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Tez çalışması kapsamında yapılan deneysel çalışmalar aşağıdaki şekilde sıralanmıştır:

- Destek malzemesi olarak kullanılan poli(glisidil metakrilat) [P(GMA)] kriyojelinin hazırlanması,
- P(GMA) kriyojeline lakkaz immobilizasyonu,
- İmmobilizasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve gerçekleştirilmemiş kriyojellerin karakterizasyonu,
- İmmobilize ve serbest lakkazın aktivite tayininin yapılması,
- Lakkaz aktivitesine etki eden pH, sıcaklık, substrat derişimi, enzim miktarı, tepkime süresi, tekrar kullanım sayısı, depolama süresi parametrelerinin incelenmesi,
- 3,5-Dinitrosalisilik asit model bileşiminin sulu çözeltilerden uzaklaştırılması için immobilize ve serbest lakkazın kullanılması ile oluşan parçalanma ürünlerinin LC-MS/MS cihazı ile belirlenmesi,

#### 3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Tez kapsamında yapılan deneysel çalışmalarda enzim olarak kullanılan *Trametes versicolor* kaynaklı lakkaz (EC 1.10.3.2), substrat olarak kullanılan 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiyazdin-6-sulfonik asit) (ABTS) ve 3,5-dinitrosalisilik asit (DNS) Sigma Aldrich (Sigma Chemical Co., ABD) ve inhibitör olarak kullanılan sodyum azür ( $\text{NaN}_3$ ) Merck AG (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Lakkaz ve ABTS 4.0°C'da ve ABTS bileşimi ışık almayacak koşullar altında muhafaza edilmiştir.

Hazırlanan kriyojelin temel bileşenleri olan 2-hidroksietil metakrilat (HEMA), etilenglikol dimetakrilat (EGDMA), N,N,N',N'-tetra-metiletildiamin (TEMED) sodyum lauril sülfat (SLS) ve amonyum persülfat (APS) Sigma Aldrich (Sigma Chemical Co., ABD) firmasından ve glisidil metakrilat (GMA) Fluka A.G. (Buchs, İsviçre) firmasından temin edilmiştir. Kimyasallar kullanılabildiği kadar 4.0°C'da

muhafaza edilmiştir. Kullanılan diğer bütün kimyasal maddeler analitik saflıkta olup, Merck AG (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir.

Deneylerde kullanılan su, yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnstead D2731) ile ters osmoz Barnstead (Dubuque, IA) ROpure LP® birimi ve ardından Barnstead D3804 NANOpure® organik/kolloid uzaklaştırma birimi ve iyon değiştirici dolgulu kolon sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen saf suyun (deiyonize su) direnci 18 MΩ/cm'dir.

## **3.2. Kriyojelin Hazırlanması**

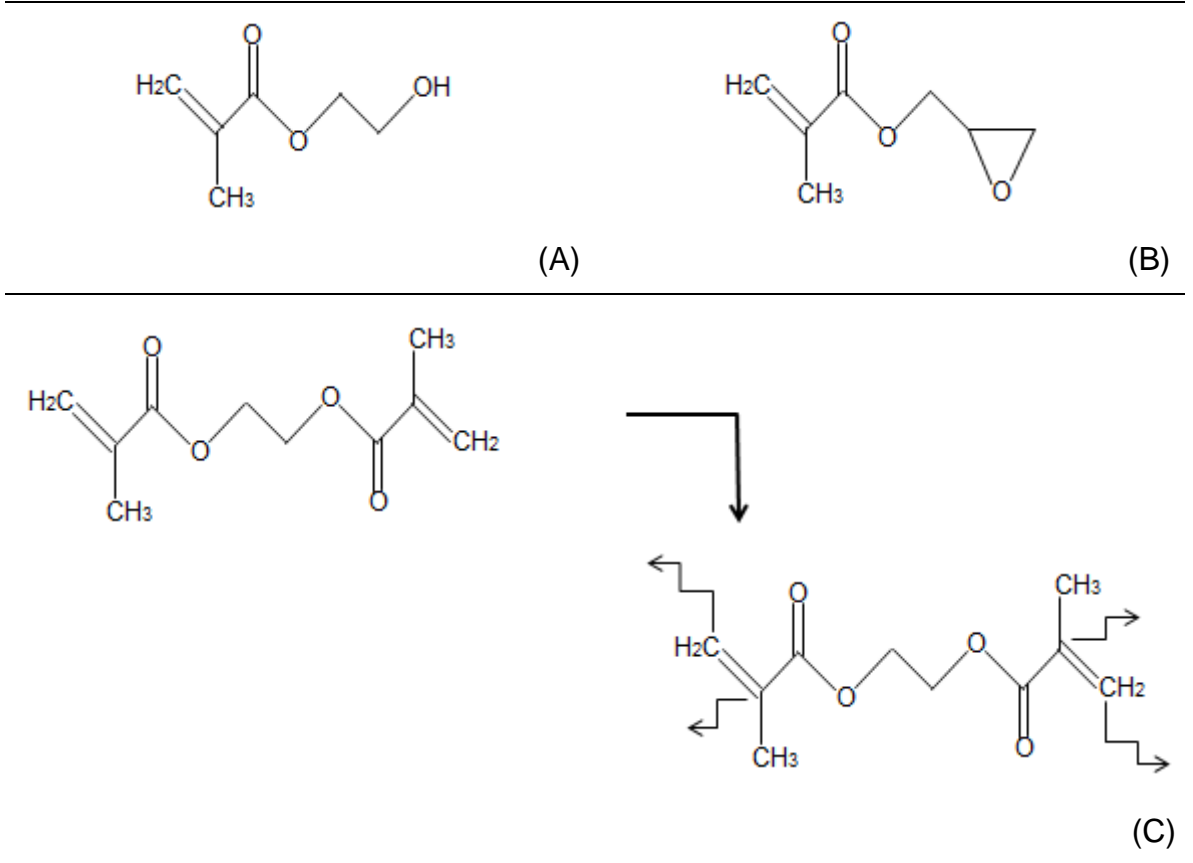
### **3.2.1. Poli(glisidil metakrilat) [P(GMA)] Kriyojelinin Hazırlanması**

Poli(glisidil metakrilat) [P(GMA)] kriyojeli, monomer içine uygun bir başlatıcı ilave edilmesiyle belli bir sıcaklıkta gerçekleştirilen yığın polimerizasyonu yöntemiyle sentezlenmiştir.

P(GMA) kriyojelinin hazırlanması için iki ayrı sıvı faz oluşturulmuştur. Birinci sıvı faz için, 555.0 µL GMA (glisidil metakrilat) ve 2.20 mL HEMA (2-hidroksietil metakrilat) monomerleri, 3.25 mL suda çözülmüştür. Diğer sıvı faz için, yüzey aktif madde olarak kullanılan 0.50 g SLS (sodyum lauril sülfat) 13.80 mL suda çözülmüş ve 1.20 mL EGDMA (etilenglikol dimetakrilat) çapraz bağlayıcısı eklenmiştir. Daha sonra her iki sıvı faz manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve buz banyosunda 20 dakika soğutulmuştur. Polimerleşme tepkimesinin gerçekleşmesi için 0.01 g APS (amonyum persülfat) ve 50.0 µL TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiamin) başlatıcı ve aktivatör çiftleri kullanılmıştır. Önce APS, buz banyosunda bekletilen monomer çözeltisi içerisinde çözülmüş ve hemen sonrasında TEMED eklenerek polimer çözeltisi cam plakalar arasına dökülmüş ve -12.0°C'da 24 saat bekletilerek polimerleştirilmiştir. Polimerizasyon sonrasında, cam plakalar arasında polimerleşen kriyojeller perforator ile dairesel olarak 6 mm çaplarında kesilmiştir. Elde edilen membran formundaki kriyojeller, tepkimeye girmemiş monomerlerin uzaklaştırılması için saf su ile birkaç defa yıkanmıştır.

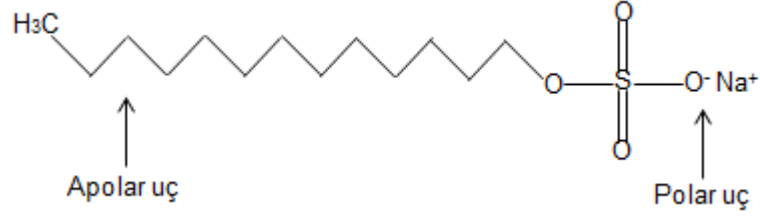
P(GMA) kriyojeli, epoksi ve akrilik gibi iki fonksiyonel gruba sahip glisidil metakrilat (GMA) monomeri, hidroksil fonksiyonlu akrilik polimerlerin sentezinde kullanılan ester yapılı 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) monomeri ve çift fonksiyonlu çapraz

bağlayıcı olan etilenglikol dimetakrilat (EGDMA) varlığında kovalent bağlanma ile oluşan üç boyutlu ağ yapısına sahip bir polimerdir. Polimerizasyon esnasında kullanılan monomerlerin ve çapraz bağlayıcının kimyasal yapıları ve EGDMA'nın olası bağlanma noktaları Şekil 3.1.'de verilmiştir.



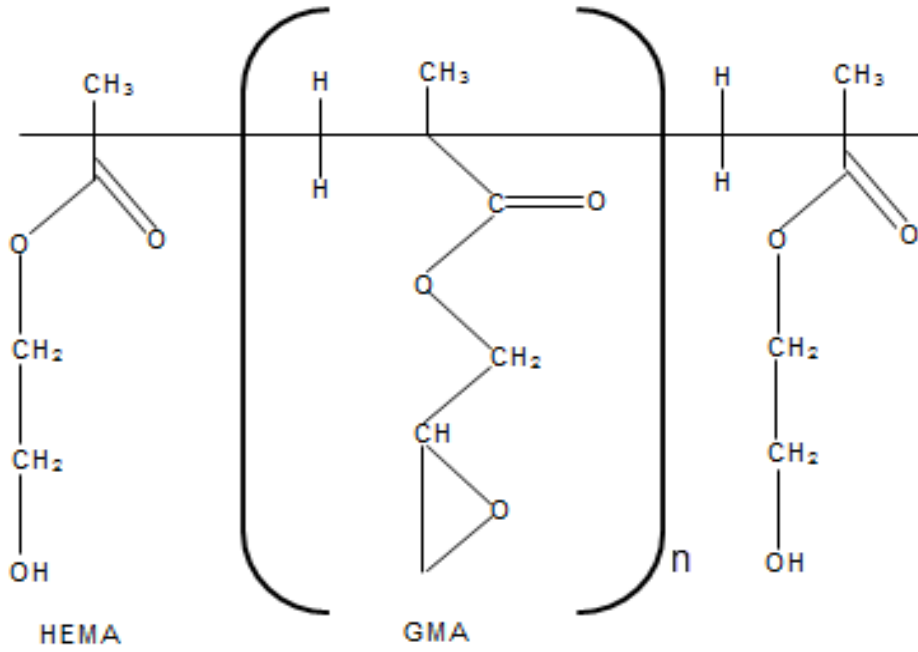
Şekil 3.1. (A) HEMA ve (B) GMA monomerlerinin kimyasal yapısı (C) EGDMA çapraz bağlayıcının kimyasal yapısı ve olası bağlanma noktaları

Polimerizasyonun sulu ortamda gerçekleşmesi hidrofobik çapraz bağlayıcı olarak bilinen EGDMA'nın çözünmesini zorlaştırır. Bu yüzden suyun yüzey gerilimini azaltarak EGDMA'nın polimerizasyona girmesini sağlayan anyonik yüzey aktif madde sodyum lauril sülfat (SLS) kullanılmıştır. SLS molekülü sülfat grubuna bağlı 12 karbonlu kuyruğa sahiptir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Sodyum lauril sülfatın kimyasal yapısı

Polimerizasyonda başlatıcı olarak, HEMA ve GMA'nın akrilik gruplarından polimerleşmesini sağlayan anorganik başlatıcı madde amonyum persülfat (APS) kullanılmıştır. Elde edilen polimerik yapının HEMA ile GMA monomerlerinin olası bağlanma durumu Şekil 3.3'te gösterilmiştir.



Şekil 3.3. P(GMA) kriyojelinin olası kimyasal yapısı

### 3.2.2. P(GMA) Kriyojeline Lakkaz İmmobilizasyonu

NaOH ile muamele edilen P(GMA) kriyojelleri immobilizasyon öncesi, 2 saat asetat tamponunda (1.0 M, pH 5.0) dengeye getirilmiştir. Dengeye getirilen 40 tane daire formundaki kriyojel membran, 1.0 M pH 5.0 asetat tamponunda hazırlanmış 2 mg/mL derişimine sahip 20 mL lakkaz çözeltisi içerisinde eklenerek 24 saat oda sıcaklığında 100 rpm hızla çalkalama sisteminde karıştırılmıştır. Gerçekleştirilen immobilizasyon işlemi öncesi ve sonrası lakkaz çözeltileri ayrılarak UV-görünür bölge spektrofotometresi kullanılarak 280 nm'de absorbans değerleri (A) ölçülerek immobilizasyon miktarı belirlenmiştir.

İmmobilizasyon işlemi sonrası tepkime ortamından uzaklaştırılan kriyojeller 1.0 M pH 5.0 asetat tamponu ile yıkanmıştır. Yıkama işlemine yıkama çözeltilerinin absorbans ölçümleri sıfıra yaklaşıncaya kadar devam edilmiştir. Farklı miktarlarda lakkaz immobilizasyonu gerçekleştirmek amacıyla aynı immobilizasyon işlemleri inkübasyon süreleri değiştirilerek (12, 6 ve 3 saat) kriyojellerin çalkalama sisteminde bekletilmesiyle uygulanmıştır (Çizelge 3.1). Hazırlanan kriyojeller 4.0°C'da 1.0 M pH 5.0 asetat tamponu çözeltisinde muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.1. Farklı miktarlarda enzim immobilize edilen destek malzemelerin gösterimi

Polimer Kodu	İnkübasyon Süresi (saat)	İmmobilize Lakkaz Miktarı (mg)
P-0	0	0
P-3	3	0.017
P-6	6	0.038
P-12	12	0.073
P-24	24	0.148

### 3.3. Kriyojelin Karakterizasyonu

### 3.3.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometre Analizi (FTIR)

P(GMA) kriyojelinin yığın yapısı FTIR (Spektrum One, Perkin Elmer, ABD) ile analiz edilmiştir. Analizden önce kriyojel vakum etüvünde 24 saat tutularak kurutulmuş ve havanda dövülerek toz haline getirilmiştir. Yapı analizinin elde edilmesi amacıyla 2.0 mg katı polimer örneği ile 98.0 mg KBr karıştırılarak havanda öğütülmüş ve hidrolik preste  $600 \text{ kg.cm}^{-2}$  basınçta 5 dakika bekletilerek ince bir tablet haline getirilmiştir. Hazırlanan tabletin  $4600\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$  dalga sayısı aralığında spektrumu FTIR cihazında alınmıştır.

### 3.3.2. Yüzey Morfolojisi (SEM)

P(GMA) kriyojelinin morfolojisini belirlemek için yüzey ve yığın yapısında yüksek oranda büyütme sağlayan taramalı elektron mikroskobu (SEM) (JEOL, JEM 5600, Tokyo, Japonya) kullanılmıştır. Gözeneklerinde su olan kriyojeller  $-60.0^{\circ}\text{C}$ 'da dondurulma işlemiyle liyofilizatörde (Chris Alpha 1-2 LD plus, M Christ GmbH, Almanya) kurutulmuştur. Kurumuş kriyojel parçaları iletken bir yapıştırıcıyla SEM örnek plakası üzerine sabitlenmiş ve örnek yüzeyi  $200 \text{ \AA}$  kalınlığında metalik altın ile vakum altında kaplanarak iletken hale getirilmiştir. Yerleştirilen kriyojel örneklerinin çeşitli büyütme oranlarında fotoğrafları çekilmiştir.

### 3.3.3. Şişme Deneyi

P(GMA) kriyojellerinin denge şişme oranlarının belirlenmesinde aşağıda açıklanan yöntem izlenmiştir. Kuru kriyojeller  $\pm 0.0001 \text{ g}$  duyarlılıkla tartılarak 50 mL saf su içeren bir behere konulmuştur.  $25.0^{\circ}\text{C}$  sabit sıcaklıkta 5 saniye ile 2 saat aralığında belirlenen sürelerde su ortamından alınan kriyojellerin süzgeç kağıdı yardımı ile yüzeyindeki su uzaklaştırılarak hassas terazi ile tartımı gerçekleştirilmiştir. Kuru ve ıslak ağırlıklar kaydedilmiş ve aşağıdaki eşitlik kullanılarak P(GMA) kriyojellerin şişme oranları belirlenmiştir.

$$\text{Şişme oranı (\%)} = [(W_s - W_0) / W_0] \times 100 \quad (3.1)$$

$W_0$  kriyojelin şişmeden önceki kütlesini (g),  $W_s$  ise kriyojelin şiştikten sonraki kütlesini (g) ifade etmektedir.

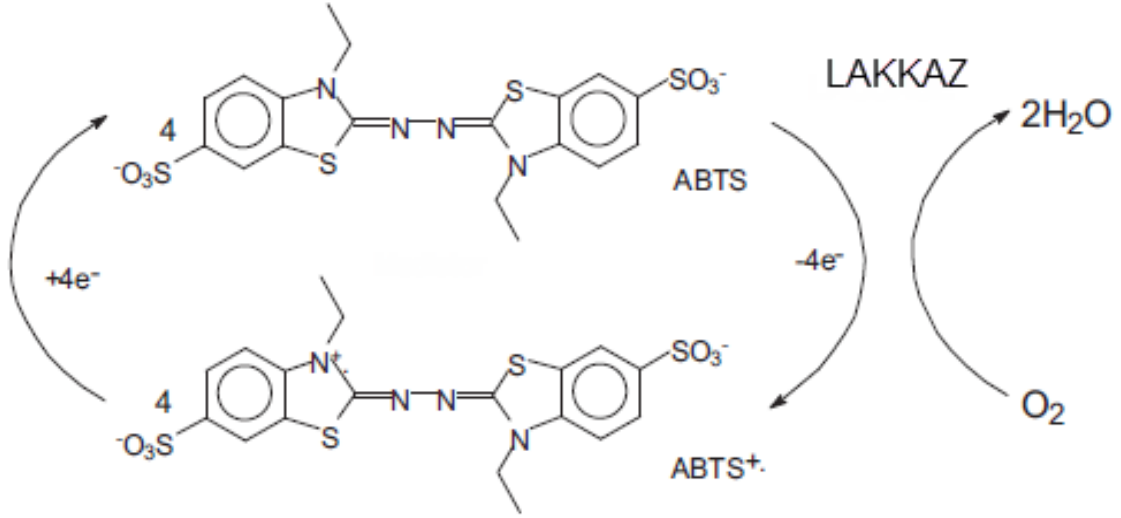
P(GMA) kriyojellerin makrogözenek miktarının belirlenmesi için ise aşağıda açıklanan yöntem uygulanmıştır. İlk olarak denge şişme oranına ulaşmış olan kriyojel örnekleri tartılmıştır. Daha sonra şişmiş kriyojel örnekleri makrogözeneklerinde bulunan suyun uzaklaştırılması için hassas bir şekilde sıkılmış ve suyu uzaklaştırılmış kriyojeller tartılmıştır. Uygulanan işlem sonrasında kriyojellerin sahip olduğu makrogözenek miktarı aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlenmiştir.

$$\text{Makrogözenek miktarı (\%)} = [(W_1 - W_2) / W_1] \times 100 \quad (3.2)$$

Bu eşitlikte  $W_1$  denge şişme oranına ulaşmış kriyojellerin kütlesini (g) ifade ederken,  $W_2$  denge şişme oranına ulaşmış kriyojellerin sıkıldıktan sonraki kütlesini (g) ifade etmektedir.

### 3.4. Lakkazın Aktivite Tayini Deneyleri

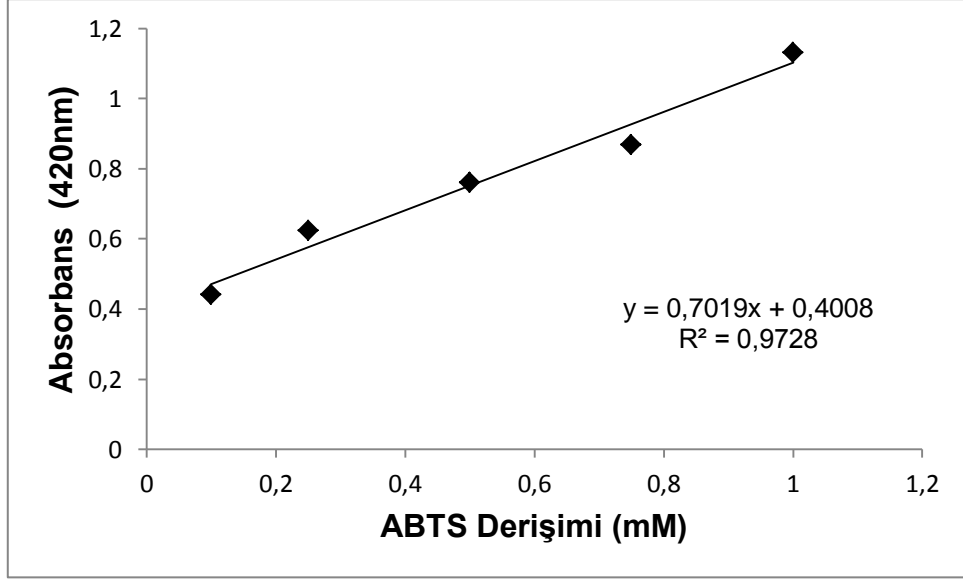
*Trametes versicolor* kaynaklı lakkazın aktivitesinin belirlenmesinde 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiyazdin-6-sulfonik asit) (ABTS) substrat olarak kullanılmıştır. Nonfenolik bir boya olan ABTS lakkazın çok tercih edilen substratlarından biridir. ABTS lakkaz tarafından kararlı yapıda olan katyonik radikale yükseltgenir (Şekil 3.4). Katyonik radikal hale yükseltgenmesiyle oluşan yeşil renk enzim aktivitesiyle doğru orantılıdır. Görünür bölgedeki bu renk yoğunluğu 420 nm'de spektrofotometrede okunur [118].



Şekil 3.4. ABTS'nin lakkaz tarafından katyonik radikale (ABTS<sup>+</sup>) yükseltgenme mekanizması [119]

Lakkaz aktivitesini belirleyebilmek için öncelikle enzimatik tepkime ürününün (ABTS<sup>+</sup>) kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Kalibrasyon eğrisi çizmek için asetat tamponunda (1.0 M, pH 5.0) farklı derişimlerde (0.1-1.0 mM) 4.5 mL ABTS çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilere 500 µL (0.148 mg) lakkaz eklenmiş ve enzimatik tepkime 25.0°C'da, 30 dakikada gerçekleştirilmiştir. Tepkime süresi dolduğu an lakkaz inhibitörü olan NaN<sub>3</sub> (20mM, 500 µL) ortama eklenmiştir (enzim/inhibitör v:v, 1:1). Enzimatik yükseltgeme sonucu oluşan yeşil renkli ürün UV-görünür bölge spektrofotometresinde (Shimadzu UV-1601, Japonya) 420 nm'de ölçülmüş ve kaydedilmiştir. ABTS derişimine karşı elde edilen absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (Şekil 3.5).





Şekil 3.5. ABTS katyonik radikalinin kalibrasyon eğrisi; Lakkaz miktarı: 0.148 mg; NaN<sub>3</sub> derişimi: 20 mM; enzim/inhibitör v:v, 1:1; zaman: 30 dak; T: 25.0°C; pH: 5.0.

### 3.4.1. İmmobilize Lakkazın Aktivite Tayini

Asetat tamponunda (1.0 M, pH 5.0) hazırlanmış 1.0 mM ABTS substrat çözeltisinin 5 mL'sine enzim immobilize edilmiş P-24 kodlu kriyojel membranlardan 2 tane eklenerek tepkime başlatılmıştır. Tepkime çalkalamalı sistemde 25.0°C'da 30 dakika devam ettirilmiş ve sonrasında tepkime çözeltisi içerisinde kriyojeller alınarak yeşil renkli tepkime sonrası çözeltisi elde edilmiştir. Tepkime öncesi ve sonrası çözeltilerinin 420 nm'deki absorbans değerleri farkından ve kalibrasyon grafiğinden ( $\Delta A_{420} / \Delta c$ ) faydalanılarak aşağıdaki eşitlik enzim aktivitesinin hesaplanması amacıyla oluşturulmuştur.

$$\text{Aktiflik} = \text{Hız (V)} = \Delta c / \Delta t = (\Delta A_{420} / \Delta t) \times (\Delta c / \Delta A_{420}) \quad (3.3)$$

$\Delta c$  ABTS'nin derişim değişimini (mM),  $\Delta t$  tepkime süresini (dak),  $\Delta A_{420}$  ABTS katyonik radikalinin 420 nm'deki absorbans değerleri değişimini ifade etmektedir.

### 3.4.2. Serbest Lakkazın Aktivite Tayini

Asetat tamponunda hazırlanmış (1.0 M, pH 5.0) 4.5 mL 1.0 mM ABTS substrat çözeltisine saf suda çözülmüş lakkaz çözeltisinden 500 µL (0.148 mg) eklenerek

enzimatik tepkime 25.0°C'da, 30 dakikada gerçekleştirilmiştir. Tepkime süresi dolduğu an lakkaz inhibitörü olan 20 mM 500 µL NaN<sub>3</sub> ortama eklenmiştir (enzim/inhibitör v:v, 1:1). Enzimatik yükseltgeme sonucu oluşan yeşil renkli ürün absorbansları 420 nm'de ölçülmüştür. Ölçülen absorbans değerlerindeki değişimden ve kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak enzim aktivitesi Eşitlik 3.3 kullanılarak hesaplanmıştır.

### **3.5. Lakkaz Aktivitesine Etki Eden Faktörlerin İncelenmesi**

#### **3.5.1. pH Değişiminin Aktiviteye Etkisi**

Lakkaz aktivitesine pH değerinin etkisini belirleyebilmek amacıyla farklı pH değerlerinde (pH 3.0-6.0) substrat çözeltileri hazırlanmıştır. Her bir pH değerinde immobilize lakkaz için Bölüm 3.4.1.'de anlatılan serbest lakkaz için ise Bölüm 3.4.2.'de anlatılan yöntemlere göre aktivite tayinleri gerçekleştirilmiştir.

Diğer parametreler sabit tutularak pH değerinin değiştirilmesiyle lakkaz aktivitesine pH değerinin etkisi incelenerek enzimin en yüksek aktivite gösterdiği pH değeri "optimum pH" olarak belirlenmiştir. Yürütülen diğer deneyler optimum pH değerinde gerçekleştirilmiştir.

#### **3.5.2. Sıcaklığın Aktiviteye Etkisi**

Lakkaz aktivitesine sıcaklığın etkisini belirleyebilmek amacıyla farklı sıcaklık değerlerinde (25.0-75.0°C) optimum pH değerindeki tamponla hazırlanmış substratın kullanımıyla immobilize lakkaz için Bölüm 3.4.1.'de serbest lakkaz için ise Bölüm 3.4.2.'de anlatılan yöntemlere göre aktivite tayini yapılmıştır.

#### **3.5.3. Substrat Derişiminin Aktiviteye Etkisi**

Lakkaz aktivitesine substrat derişiminin etkisini belirlemek için sabit hacimde ve optimum pH değerinde farklı derişimlerde (0.1-3.0 mM) ABTS çözeltileri hazırlanmıştır. Immobilize lakkaz için Bölüm 3.4.1.'de serbest lakkaz için ise Bölüm 3.4.2.'de anlatılan yöntemlere göre aktivite tayini yapılmıştır.

#### **3.5.4. Enzim Miktarının Aktiviteye Etkisi**

İmmobilize enzim miktarının aktiviteye etkisini incelemek amacıyla farklı miktarlarda immobilize enzim içermesi için değişik inkübasyon sürelerinde (3, 6, 12 ve 24 saat) sentezlenen P-3, P-6, P-12 ve P-24 kodlu kriyojeller kullanılarak Bölüm 3.4.1.'de anlatıldığı yöntemle enzim aktivitesi tayin edilmiştir.

Serbest enzim miktarının aktiviteye etkisini incelemek amacıyla ise asetat tamponunda hazırlanmış (1 mM, pH 5.0) enzim çözeltisinin 500 µL'sinde farklı miktarlarda (0.017, 0.038, 0.073, ve 0.148 mg) lakkaz içeren çözeltiler kullanılarak Bölüm 3.4.2.'de anlatıldığı gibi enzim aktivitesi tayin edilmiştir.

#### **3.5.5. Tepkime Süresinin Aktiviteye Etkisi**

Lakkaz aktivitesine tepkime süresinin etkisini incelemek amacıyla immobilize lakkaz için Bölüm 3.4.1.'de anlatılan yöntemle göre diğer parametreler değiştirilmeden sadece farklı tepkime süreleri (1-60 dakika) uygulanarak aktivite tayini yapılmıştır.

#### **3.5.6. Tekrar Kullanım Sayısının Aktiviteye Etkisi**

Lakkaz immobilize edilmiş kriyojelin tekrar kullanılabilirliğini, tekrar kullanım sayısının enzim kararlılığına ve aktivitesine etkisini belirlemek amacıyla Bölüm 3.4.1.'de anlatılan yöntem ile aynı kriyojel 8 defa kullanılarak lakkaz aktivite tayini gerçekleştirilmiştir. Sterilizasyon amacı ile kriyojel tekrar kullanılmadan önce sırasıyla 25.0°C'da 1.0 M pH 5.0 asetat tamponu ve su ile yıkanmıştır.

#### **3.5.7. Depolama Süresinin Aktiviteye Etkisi**

Lakkaz aktivitesine depolama süresinin etkisini incelemek için 4 hafta depolama süresi boyunca haftada bir olacak şekilde sulu çözeltide bekletilen lakkaz immobilize edilmiş membranlar kullanılarak immobilize lakkaz aktivitesi Bölüm 3.4.1.'de verilen yöntemle göre; serbest lakkaz aktivitesi ise su içerisindeki lakkaz stok çözeltisinden alınarak Bölüm 3.4.2.'deki yöntemle göre belirlenmiştir. 4 hafta depolama süresinden sonra kalan aktivite başlangıç aktivitesinin yüzdesi olarak ifade edilmiştir.

### **3.6. 3,5-Dinitrosalisilik Asitin (DNS) Sulu Çözeltilerden Uzaklaştırılması**

Model bileşik olarak seçilen 3,5-dinitrosalisilik asitin (DNS) sulu çözeltilerden uzaklaştırılması daha önceki deneysel çalışmalar ile belirlenen lakkazın en yüksek aktivite gösterdiği optimum koşullar altında gerçekleştirilmiştir. DNS parçalanma ürünleri, bir kimyasal aracı olarak da kullanılan ABTS varlığında oluşturulmuştur. Lakkaz ile tepkimesi sonucu oluşan ABTS'nin yükseltgenmiş radikal formu DNS ile etkileşerek elektron aktarımına aracılık etmiştir.

#### **3.6.1. İmmobilize Lakkaz ile DNS Uzaklaştırılması**

Asetat tamponunda (1.0 M, pH 5.0) hazırlanmış 1.0 mM DNS model bileşik çözeltisi (2.5 mL) ile kimyasal aracı olarak kullanılan 0.5 mM ABTS çözeltisi (2.5 mL) karıştırılmış ve oluşturulan çözeltiliye lakkaz immobilize edilmiş P-24 kodlu kriyojel membranlardan 2 tane eklenerek enzimatik tepkime başlatılmıştır. Tepkime sıcak su banyosunda 55.0°C'da 2 saat devam ettirilmiş ve sonrasında tepkime çözeltisi içerisinden kriyojeller alınarak tepkime sonrası çözeltisi elde edilmiştir. DNS'nin lakkaz ile enzimatik yükseltgeme sonrasındaki parçalanma ürünlerinin belirlenmesi amacıyla tepkime sonrası çözeltisinin 1.0 mL'si LC-MS/MS ölçümleri için cam viyale alınmıştır.

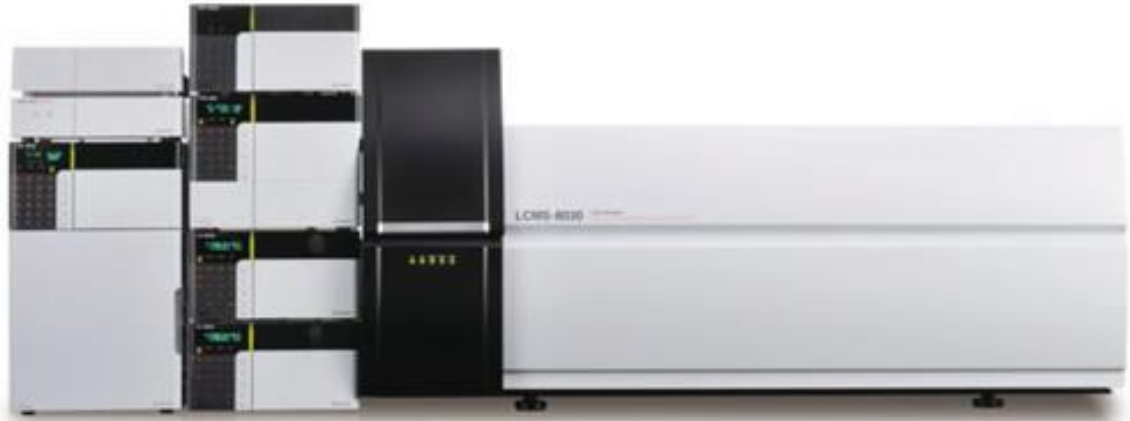
#### **3.6.2. Serbest Lakkaz ile DNS Uzaklaştırılması**

Asetat tamponunda (1.0 M, pH 5.0) hazırlanmış 1.0 mM DNS model bileşik çözeltisi (2.5 mL) ile kimyasal aracı olarak kullanılan 0.5 mM ABTS çözeltisi (2.0 mL) karıştırılmış ve oluşturulan çözeltiliye saf suda çözülmüş lakkaz çözeltisinden 500 µL (0.148 mg) eklenerek enzimatik tepkime sıcak su banyosunda 55.0°C'da, 2 saat gerçekleştirilmiştir. Tepkime süresi dolduğu an lakkaz inhibitörü olan 20 mM 500 µL NaN<sub>3</sub> ortama eklenmiştir (enzim/inhibitör v:v, 1:1). Oluşan son çözeltinin 1.0 mL'si LC-MS/MS ölçümlerinin gerçekleştirilmesi için cam viyale alınmıştır.

### **3.7. Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) Analizi**

Model bileşik olarak seçilen DNS'nin lakkaz ile enzimatik yükseltgeme sonrasındaki parçalanma ürünlerinin kromatografik ayrımı sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) ile analiz edilmiştir. Analiz Shimadzu

LCMS-8030 (Kyoto/Japonya) LC-MS/MS üçlü kuadropol sistemi ile Q3 scan modunda gerçekleştirilmiştir. Kullanılan LC-MS/MS cihazı LC-20ADXR pompası, SIL-20ACXR otomatik örnekleme ve CTO-20AC kolon fırını içermektedir. Kromatografik ayırma inertsil ODS-4 HPLC kolonu (150X2.1mm, 3µm) kullanılarak yapılmıştır. Analizde kullanılan A ve B hareketli fazları sırasıyla formik asit (pH 3.5) ve asetonitrildir. Analiz periyodunun ilk 13 dak'sında kullanılan % 10.0 A ve % 90.0 B hareketli faz gradient karışımları ardından sonraki 5 dak boyunca %80.0'lik A ve % 20.0'lik B hareketli faz gradient karışımları kullanılmıştır. Kromatografik ayırma doğrusal gradienti 0.3 mL/dak akış hızında ve 40°C fırın sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Analitik ayırma ESI-pozitif ve negatif iyon modunda, 3.5 kV prob voltajı, 75-250 m/z kütle aralığında ve 1250 u/sn tarama hızında gerçekleştirilmiştir.

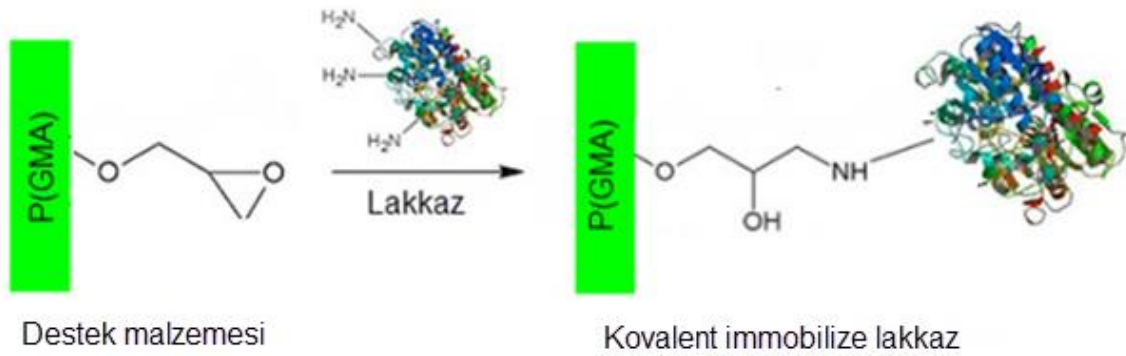


Şekil 3.6. LC-MS/MS cihazı (Shimadzu LCMS-8030, Kyoto,Japonya)

## 4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR

### 4.1. P(GMA) Kriyojeline Lakkaz İmmobilizasyonu

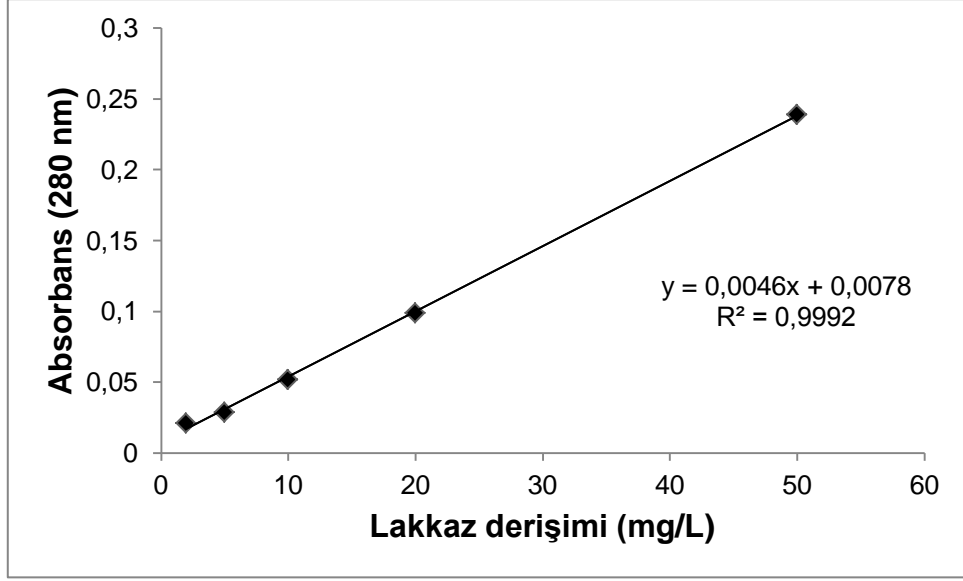
Destek malzemesi olarak kullanılmak üzere sentezlenen P(GMA) kriyojeline lakkaz immobilizasyonu, GMA epoksi gruplarına lakkaz amino gruplarının nükleofilik saldırısı ile gerçekleşmiştir. Lakkazdaki amino grubuna ait eşleşmemiş elektronunun epoksi halkasındaki karbona atak yapmasıyla epoksi halkasının açılarak tepkime vermesi sonucu kovalent bağlanma ile lakkaz P(GMA) kriyojeline immobilize edilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Lakkazın P(GMA) kriyojeline kovalent bağlanmasının gösterimi

#### 4.1.1. İmmobilize Lakkaz Miktarının Hesaplanması

P(GMA) kriyojeline immobilize edilen lakkaz miktarı spektrofotometrik yöntem kullanılarak tayin edilmiştir. Spektrofotometrik yöntemler protein derişimlerinin belirlenmesinde çok fazla kullanılmaktadır. Beer-Lambert yasasına göre absorbans değeri derişim ile orantılı olduğundan örnekteki protein miktarı 280 nm'de absorbans ölçülmesiyle belirlenir. İmmobilize lakkaz miktarını belirlemek amacıyla öncelikle lakkaz stok çözeltisinden seyreltmeler yapılarak bir seri çözelti hazırlanmıştır. Bunların absorbans değerleri derişime karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Lakkazın kalibrasyon eğrisi

Daha sonra çizilen kalibrasyon eğrisinden ( $y=0.0046x+0.0078$ ) yararlanılarak hesaplanan immobilizasyon öncesi çözeltinin lakkaz miktarından kriyojel destek malzemesinin immobilizasyon ortamından alındıktan sonraki geriye kalan çözeltideki lakkaz miktarı ile kriyojelin yıkama suyundaki lakkaz miktarının toplamının çıkarılması yoluyla 6 mm çapında 2 tane daire formundaki P(GMA) kriyojel membrana (30.5 mg) kovalent olarak bağlı olan lakkaz miktarı 0.148 mg olarak hesaplanmıştır.

## 4.2. P(GMA) Kriyojelinin Karakterizasyonu

Lakkaz immobilizasyonu için destek malzemesi olarak kullanılmak üzere sentezlenen P(GMA) kriyojeli, şişme testleri, Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometresi (FTIR) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) yöntemleri ile karakterize edilmiştir.

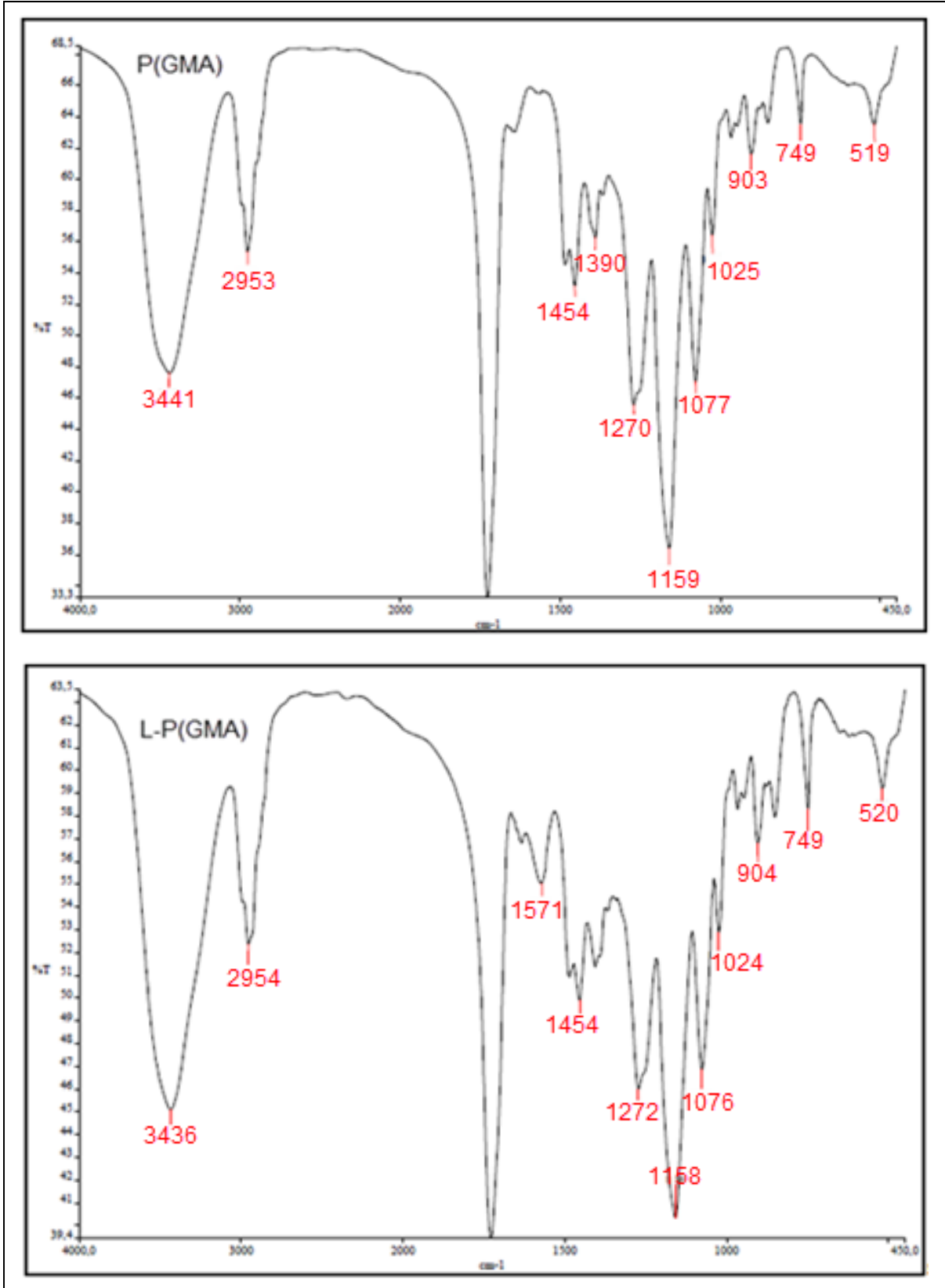
### 4.2.1. FTIR Çalışmaları

Sentezlenen P(GMA) ve lakkaz immobilize edilmiş P(GMA) [L-P(GMA)] kriyojellerinin kimyasal yapısını aydınlatmak için FTIR spektrumları alınmıştır. 4000-450  $\text{cm}^{-1}$  dalga sayısı aralığında alınan spektrumlar Şekil 4.3'te verilmiştir. Spektrumlarda 3440  $\text{cm}^{-1}$  civarında geniş OH gerilme bandı görülmektedir. 2950

$\text{cm}^{-1}$  civarındaki metilen titreşimi GMA ve HEMA monomerlerinin karakteristik titreşimleri arasında yer alır. Ayrıca  $1730 \text{ cm}^{-1}$  civarındaki titreşim her iki monomerinde ester konfigürasyonunu göstermektedir. Epoksi grupları ise  $900 \text{ cm}^{-1}$  civarında pik vermiştir.

Elde edilen spektrumlar karşılaştırıldığında L-P(GMA)'nın spektrumundaki OH gerilme bandının şiddetinin arttığı ve  $1570 \text{ cm}^{-1}$  civarında C-N bağına ait karakteristik piklerin oluştuğu görülmektedir. Bu sonuçlar lakkazın yapıya epoksi halka açılmasıyla karbon üzerinden bağlandığını ve epoksi halkasındaki oksijenin hidrojen ile bağ yapması sonucu yapıdaki OH fonksiyonel gruplarının arttığını göstermektedir. Yapılan FTIR analizi sonucunda lakkazın P(GMA) kriyojeline başarıyla immobilize edildiği anlaşılmaktadır.





Şekil 4.3. P(GMA) ve lakkaz immobilize edilmiş P(GMA)'nın [L-P(GMA)] FTIR spektrumları

#### 4.2.2. Şişme Özellikleri

Sentezlenen P(GMA) kriyojelleri, monomerik alt birimleri çapraz bağlar ile bağlı olduğundan suda çözünmeyip şişebilen üç boyutlu polimerik yapılardır. Su içerisine koyulan kriyojellere su molekülleri kapiler etki yaratarak yapının içine ilerleyip gözeneklerini açarak çok hızlı şişmesine ve hatta 1. dakikada en son şişmiş hallerine ulaşmalarına sebep olmuştur. Bu çalışmada sentezlenen P-0, P-3, P-6, P-12 ve P-24 kodlu kriyojellerin denge şişme oranları sırasıyla % 523, % 531, % 559, % 570 ve % 572 olarak bulunmuştur. Makrogözenek oranları ise sırasıyla % 54, % 55, % 58, % 59, % 61 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Kriyojellerin % şişme oranları ve % makrogözenek oranları gösterimi

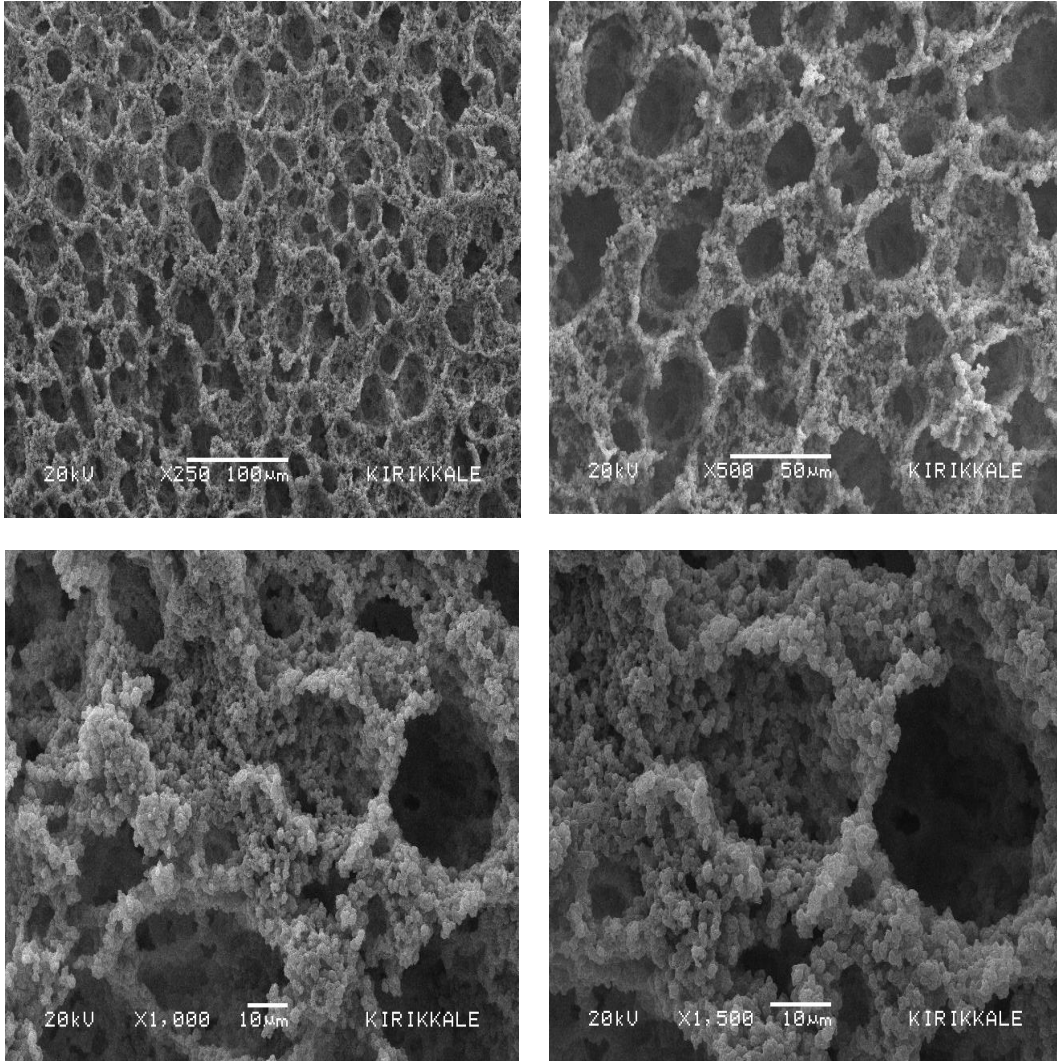
Kriyojel Kodu	Şişme Oranı (%)	Makrogözenek Oranı (%)
P-0	523	54
P-3	531	55
P-6	559	58
P-12	570	59
P-24	572	61

Çizelge 4.1'den görüldüğü gibi kriyojellerin denge şişme oranları oldukça yüksektir. Bu sonuçlar yapısındaki HEMA ve GMA monomerlerin hidrofilik fonksiyonel grup sayısının fazla olduğunu gösterir. Ayrıca immobilize olan lakkaz miktarı arttıkça da denge şişme oranlarının arttığı görülmektedir. Bu sonuç ise immobilizasyon ile birlikte artan yüzey alanı, lakkazın hidrofilik karakteri ve protein üzerindeki polar grupların olması ile açıklanabilir.

#### 4.2.3. Yüzey Morfolojisi

Lakkaz immobilizasyonunda destek malzemesi olarak kullanılan P(GMA) kriyojelinin yüzey morfolojisini incelenmek amacıyla taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntülemesi yapılmıştır. Gözenek yapısını kaybetmemesi için liyofilizatörde dondurularak kurutulan kriyojelin farklı oranlarda büyütülmüş SEM görüntüleri Şekil 4.4'te verilmiştir. Şekilden kriyojelin yüksek yüzey alanı sağlayan

birbiriyle bağlantılı yoğun gözenek yapısına sahip olduğu görülmektedir. Polimerizasyonda yüzey aktif madde olarak kullanılan sodyum lauril sülfatın yüzey gerilimini azaltması sonucu şekilden de görüldüğü gibi kriyojel gözenek yapısı yuvarlak olmasına rağmen biraz pürüzlüdür. Gözeneklerin boyutlarının yaklaşık olarak 20-50  $\mu\text{m}$  aralığında olduğu bulunmuştur. Bu gözenekli yapı substratın kolayca difüzyonuna olanak sağladığı için sentezlenen kriyojelin lakkaz immobilizasyonuna uygun destek malzemesi olduğunu gösterir.



Şekil 4.4. P(GMA) kriyojelinin farklı oranlarda büyütülmüş SEM görüntüleri

#### 4.3. Lakkaz Aktivitesine Etki Eden Faktörlerin İncelenmesi

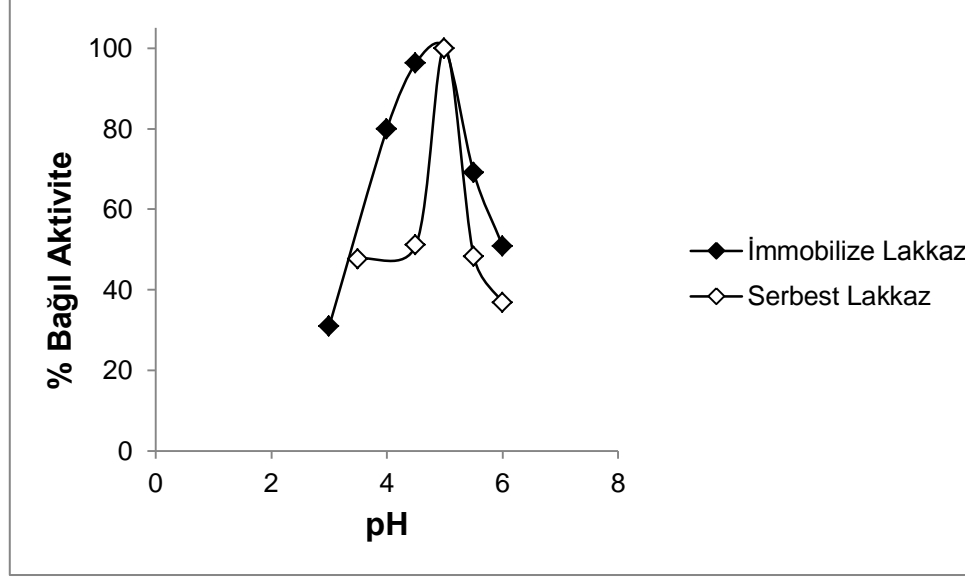
#### 4.3.1. pH Değişiminin Aktiviteye Etkisi

Enzimin aktif bölgesine etki ederek enzim aktivitesini değiştiren pH değeri incelenmesi gereken önemli bir faktördür. pH değeri aktif bölgenin iyonik yapısını, enzimin üç boyutlu yapısını, enzimatik tepkimenin doygun substrat derişiminde ulaşabileceği en yüksek hız değerini ( $V_m$ ), Michealis-Menten sabitini ( $K_m$ ), enzim kararlılığını, iyonik gruplar içeren substratın enzime olan afinitesini, enzim ve substrat fonksiyonel gruplarını etkiler. Enzimlerin üçüncül ve dördüncül yapılarının kararlılığını sağlayan elektrostatik etkileşimler, hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağları gibi ikincil kuvvetler ortamın pH değişiminden etkilenmektedir. Örneğin, pH 3.0 değeri altında enzimdeki karboksil grupları (-COOH), pH 10.0 değeri altında ise amino grupları (-NH<sub>2</sub>) protonlanır ve elektrostatik bağ oluşumu engellenip enzim aktivitesinde değişiklikler meydana gelir [120]. Böylelikle enzimler yüksek ve düşük pH değerlerinde (kuvvetli asidik ve kuvvetli bazik koşullarda) denatüre olacağından tepkime hızı tersinmez olarak azalır ve aktivite sıfıra kadar düşebilir.

Farklı substratlar için farklı pH değerlerinde aktif olan lakkazlar ABTS kullanıldığında pH 6.0'nın altında aktif olan asidik enzimlerdir [121]. Yapılan bazı çalışmalarla, fungal lakkazlar için en uygun pH değerlerinin 4.0 ile 6.0 arasında olduğu gösterilmiştir [122-124]. Yüksek alkali pH değerlerinde, hidroksit iyonu tarafından Tip 3 bakırı inhibe olur ve yüksek pH değerlerinde Tip 1 bakırı ile substrat arasındaki redoks potansiyel farkından dolayı lakkaz inaktif haldedir [125]. Bu nedenle lakkaz ile yapılan çalışmalar pH 4.0-6.0 aralığında gerçekleştirilmiştir.

Enzimlerin yüksek aktivite gösterdikleri bir pH değeri ve/veya pH aralığı vardır. Bunun belirlenmesi için immobilize ve serbest lakkazın farklı pH değerlerindeki (pH 3.0-6.0) aktiviteleri Bölüm 3.5.1.'de anlatılan yöntemle göre hesaplanmıştır. Hesaplanan aktivite değerleri kullanılarak % bağıl aktivite belirlenmiş ve pH değerine karşı grafiğe geçirilmiştir. P-24 kodlu P(GMA) kriyojeline immobilize edilmiş lakkazın ve serbest lakkazın pH değişiminin bağıl aktivitelerine etkisi Şekil 4.5'te gösterilmiştir. Hem immobilize hem de serbest lakkaz için en uygun değer pH 5.0 olduğu görülmüştür. Şekil incelendiğinde serbest lakkaz aktivitesinde pH 5.0'ten düşük ve yüksek değerlerde keskin bir şekilde azalma vardır. İmmobilizasyon ile pH değerinde herhangi bir değişiklik olmamıştır. Fakat Şekil 4.5'te görüldüğü gibi immobilize lakkazın aktivite gösterdiği pH aralığı daha

geniştir. Bu sonuç kovalent bağlı lakkaz enziminin immobilizasyon işlemi ile pH değerine karşı kararlılığındaki artışı açıkça göstermektedir.



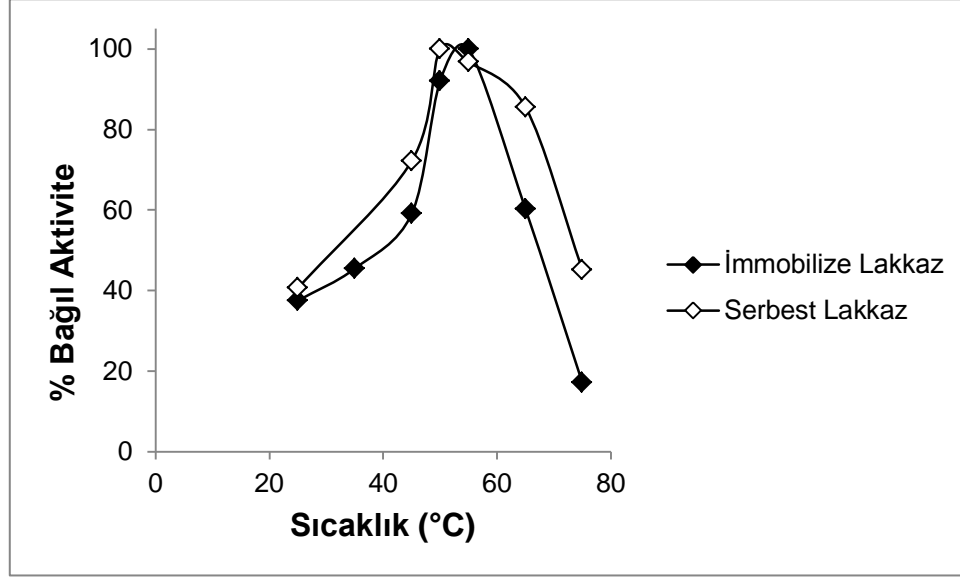
Şekil 4.5. pH değerinin lakkaz aktivitesine etkisi; Kriyojel kodu: P-24; lakkaz miktarı: 0.148 mg; NaN<sub>3</sub> derişimi: 20 mM; enzim/inhibitör v:v, 1:1; ABTS derişimi: 1.0 mM; zaman: 30 dak; T: 25.0°C.

#### 4.3.2. Sıcaklığın Aktiviteye Etkisi

Kimyasal tepkime hızı genellikle sıcaklık arttıkça artar. Enzim katalizli tepkime hızı ise belirli bir sıcaklık değerine kadar artar. Fakat bu sıcaklık değerinin üstüne çıktığında enzim denatüre olmaya başladığından dolayı tepkime hızı azalır. Yüksek sıcaklıklarda enzimler protein yapılarından dolayı aktivitelerini kaybederler.

Lakkaz aktivitesine sıcaklığın etkisini belirleyebilmek amacıyla lakkazın farklı sıcaklık değerlerindeki (25.0-75.0°C) aktiviteleri Bölüm 3.5.2.'de anlatılan yöntemle belirlenmiş ve bu değerlerden hesaplanan % bağıl aktivite değerleri sıcaklığa karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.6). Serbest ve immobilize lakkazın en yüksek aktivite değerlerinin gözlemlendiği optimum sıcaklık değerleri sırası ile 50.0 ve 55.0°C olarak belirlenmiştir. Optimum sıcaklık değerindeki bu kayma lakkazın immobilizasyon işlemi ile daha yüksek sıcaklıkta çalışabileceğini ve daha kararlı hale geldiğini göstermiştir. İmmobilize lakkaz aktivitesinde sıcaklık arttıkça orantılı bir artış göstermiş ve 55.0°C'da en yüksek aktivite değeri elde edilmiştir. Bu değerden

İtibaren sıcaklıktaki artışla beraber lakkaz aktivitesi % 17.0'ye kadar düşmüştür. Enzim aktivitesinin azalması ortamdaki enzimin denatüre olma olasılığı, çözülmüş oksijen derişiminin azalmasına ve aktif merkezin konformasyon değişimine bağlanabilir.



Şekil 4.6. Sıcaklık değerinin lakkaz aktivitesine etkisi; Kriyojel kodu: P-24; lakkaz miktarı: 0.148 mg; NaN<sub>3</sub> derişimi: 20 mM; enzim/inhibitör v:v, 1:1; ABTS derişimi: 1.0 mM; zaman: 30 dak; pH: 5.0.

Literatürde genel olarak fungal lakkazların aktivitesi için en uygun sıcaklık aralığı 30.0-60.0°C olarak belirtilmiş ve 60.0°C'in üzerinde hızla aktivitelerini kaybettikleri gösterilmiştir.

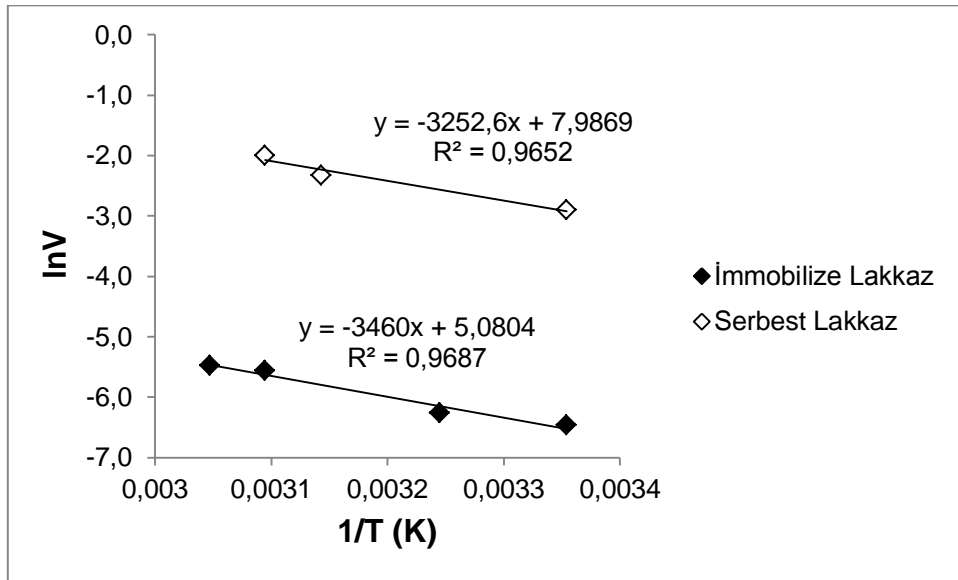
İmmobilize enzim için amino grupları vasıtasıyla kovalent bağ oluşturma sonucu konformasyonel esnekliği azaldığından substrata bağlanmak için uygun konformasyona gelmesinde ve tepkime sonrası yeniden düzenlenmesinde serbest enzime kıyasla daha yüksek bir aktivasyon enerjisi gereklidir. Bunu ispatlamak için Arrhenius eşitliğinden yararlanılarak tepkime aktivasyon enerjisi ve Arrhenius sabiti hesaplanmaktadır. Arrhenius eşitliğine göre tepkime hızının (enzim aktivitesinin) sıcaklıkla değiştii görülmektedir.

$$V = A \cdot e^{-E_a/RT} \quad (4.1)$$

Burada  $E_a$  aktivasyon enerjisini ( $\text{kJ.mol}^{-1}$ ),  $V$  tepkime hızını ( $\text{mM.dak}^{-1}$ ),  $R$  ideal gaz sabitini ( $\text{kJ.mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ ),  $T$  sıcaklığı (K),  $A$  ise Arrhenius sabitini ( $\text{mM.dak}^{-1}$ ) göstermektedir. Eşitlik 4.1 şu şekilde düzenlenebilir:

$$\ln V = \ln A - (E_a/R)(1/T) \quad (4.2)$$

$1/T$ 'ye karşı  $\ln V$  grafiğe geçirilirse, ordinat ekseni kesim noktası  $\ln A$ , eğimi  $-E_a/R$  olan bir doğru elde edilir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. İmmobilize ve serbest lakkaz için Arrhenius grafiği

$1/T$ 'ye karşı,  $\ln V$  değerleri ile oluşturulmuş Arrhenius grafiği Şekil 4.7'de gösterilmiştir. Arrhenius grafiğinden serbest ve immobilize lakkaz için 298-323 K arasındaki aktivasyon enerjileri sırasıyla  $27.0 \text{ kJ.mol}^{-1}$  ve  $28.8 \text{ kJ.mol}^{-1}$  olarak bulunmuştur. Arrhenius sabitleri ise sırasıyla  $2.9 \times 10^3 \text{ mM.dak}^{-1}$  ve  $1.6 \times 10^2 \text{ mM.dak}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar immobilize enzimin aktivasyon enerjisinin daha yüksek olduğunu ve immobilizasyon işlemi ile aktif merkez etrafında bir miktar sterik engel olduğunu belirtmektedir.

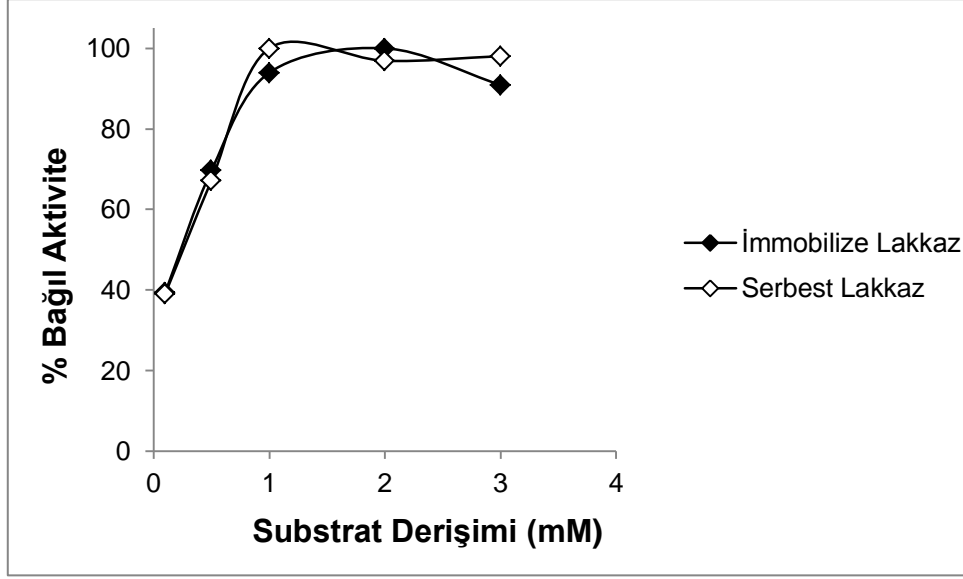
Çizelge 4.2. Serbest ve immobilize lakkaz için hesaplanan Arrhenius denklemi parametreleri

Enzim	Aktivasyon Enerjisi, kJ.mol <sup>-1</sup>	Arrhenius Sabiti (A) mM.dak <sup>-1</sup>
Serbest	27.0	2.9x10 <sup>3</sup>
İmmobilize	28.8	1.6x10 <sup>2</sup>

#### 4.3.3. Substrat Derişiminin Aktiviteye Etkisi

Enzim katalizli tepkimelerin hızı, sabit miktardaki enzim varlığında substrat derişimine bağılı olarak artmaktadır. Bu yüzden lakkaz aktivitesine yani tepkime hızına substrat derişiminin etkisini incelemek için optimum pH değerinde hazırlanmış farklı derişimlerdeki (0.1-3.0 mM) ABTS çözeltileri ile Bölüm 3.5.3.'te anlatılan deneyler yapılmıştır. Deneysel veriler kullanılarak lakkazın % bağılı aktivitesi, substrat derişimine karşı grafiğe geçirilmiş ve Şekil 4.8'deki gibi belirli bir substrat derişimine kadar artan sonrasında aktivite değerlerinde pek bir değişiklik olmayan hiperbolik bir eğri elde edilmiştir. Bu hiperbolik eğri enzim kinetiğinin Michealis-Menten denklemiyle açıklanan non-allosterik aktiviteyle uyumludur. Bir başka tanımla, enzimde substratın bağlanabileceği belirli sayıda aktif bölge bulunması ve aktif bölgelerin yüksek substrat derişiminde doyunluğa ulaşmasıdır.





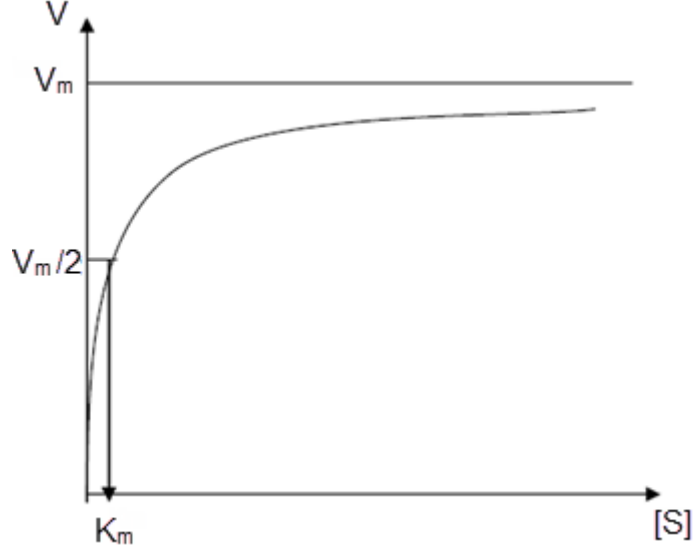
Şekil 4.8. İmmobilize ve serbest lakkazın doygunluk eğrisi; Kriyojel kodu: P-24; lakkaz miktarı: 0.148 mg;  $\text{NaN}_3$  derişimi: 20 mM; enzim/inhibitör v:v, 1:1; zaman: 30 dak; T: 25.0°C; pH: 5.0.

1913 yılında Michealis ve Menten bu doygunluk eğrisinin matematiksel olarak ifade edilmesinde kullanılan Eşitlik 4.3'ü önermişlerdir.

$$V = (V_m \times [S]) / (K_m + [S]) \quad (4.3)$$

$V_m$  enzimatik tepkimenin doymuş substrat derişiminde ulaşabileceği en yüksek hız değerini ( $\text{mM.dak}^{-1}$ ),  $K_m$  Michealis-Menten sabiti (mM) veya doygunluk sabiti olarak adlandırılan değeri,  $V$  tepkime hızını ( $\text{mM.dak}^{-1}$ ) ve  $[S]$  ise substrat derişimini (mM) ifade etmektedir.

Ayrıca  $K_m$  değeri, maksimum tepkime hızının yarısına karşılık gelen substrat derişimini de gösterir (Şekil 4.9). Michealis-Menten grafiği kullanılarak  $K_m$  ve  $V_m$  değerlerini belirlemek mümkündür. Fakat tam olarak tespit edilmesi zordur.



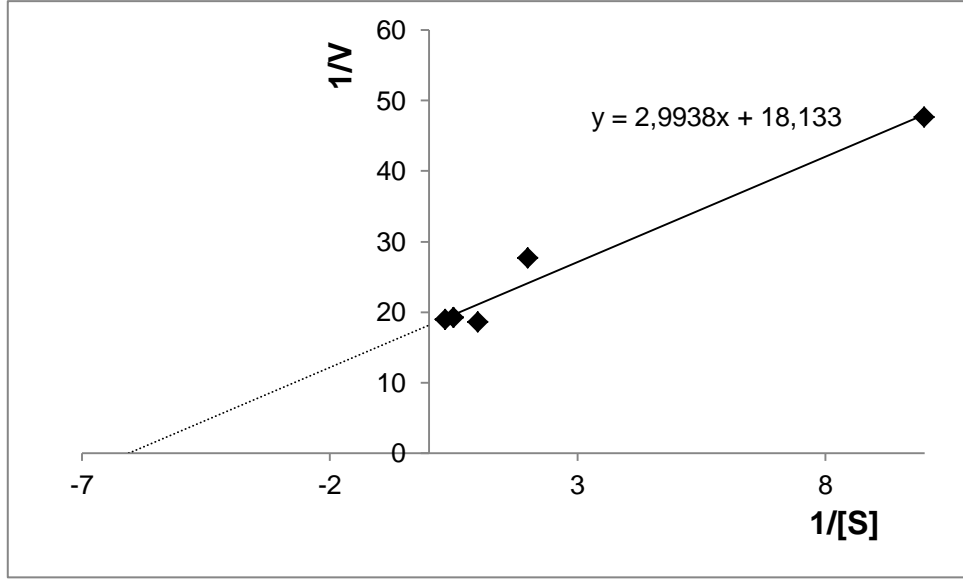
Şekil 4.9. Michealis-Menten grafiği

Bu yüzden  $K_m$  ve  $V_m$  değerlerinin belirlenmesinde Michaelis-Menten eşitliğinin düzenlenmesi ile elde edilen Lineweaver-Burk eşitliğinden yararlanılır.

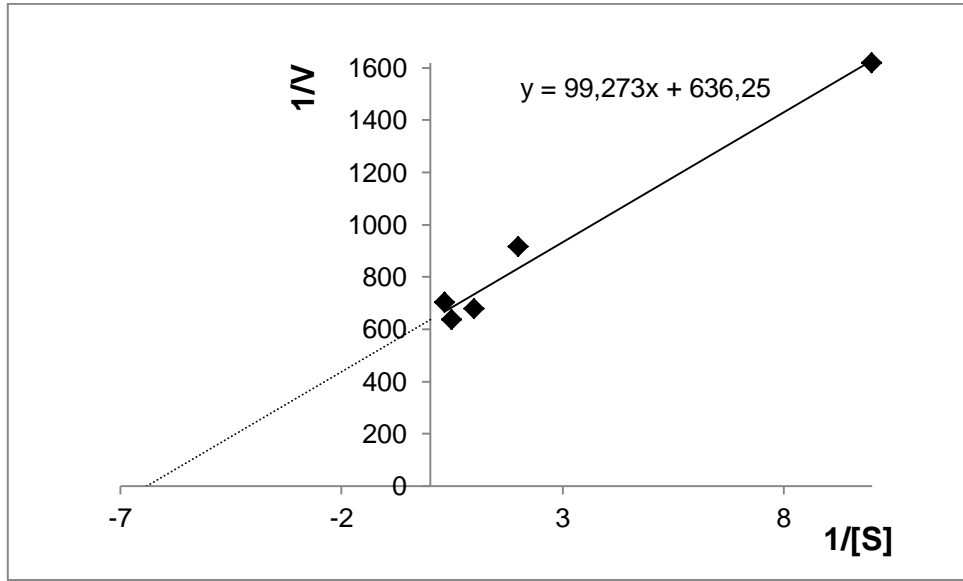
$$1/V = (K_m/V_m) \times (1/[S]) + (1/V_m) \quad (4.4)$$

$1/V$ ,  $1/[S]$ 'a karşı grafiğe geçirildiğinde; y eksenini kestiği nokta  $1/V_m$ , x eksenini kestiği nokta  $-1/K_m$  ve eğimi  $K_m/V_m$  değerlerini veren bir doğru elde edilir.

Lineweaver-Burk grafiğinden yararlanılarak  $1/[S]$ 'a karşı  $1/V$  grafiği çizilmiş ve lakkazın Michaelis-Menten sabiti ( $K_m$ ) ile doygun substrat derişimindeki en yüksek hız ( $V_m$ ) değerleri grafikte x ve y eksenini kestiği noktalardan hesaplanmıştır (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11).



Şekil 4.10. Serbest lakkaz için Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.11. İmmobilize lakkaz için Lineweaver-Burk grafiği

Yapılan hesaplamalar sonucunda serbest lakkaz için  $K_m$  ve  $V_m$  değerleri sırasıyla  $165.1 \mu\text{M}$  ve  $55.2 \mu\text{M.dak}^{-1}$  olarak belirlenmiştir. İmmobilizasyon sonrası lakkaz  $K_m$  ve  $V_m$  değerleri serbest lakkaza kıyasla azalmıştır. İmmobilize lakkaz için  $K_m$  ve  $V_m$  değerleri sırasıyla  $156.0 \mu\text{M}$ , ve  $1.57 \mu\text{M.dak}^{-1}$  olarak bulunmuştur (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Serbest ve immobilize lakkazın kinetik parametre değerlerinin gösterimi

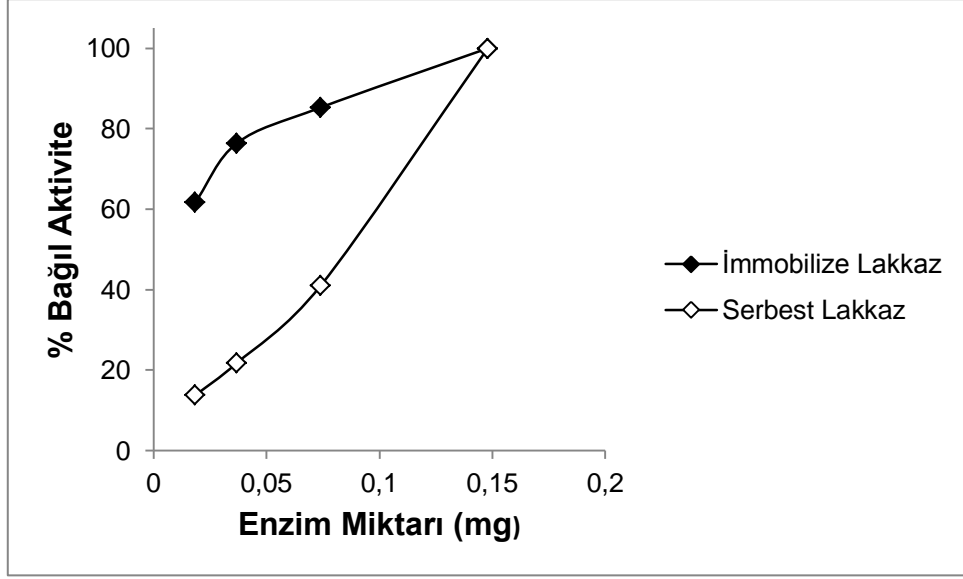
	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_m$ ( $\mu\text{M.dak}^{-1}$ )
<b>Serbest Lakkaz</b>	165.1	55.2
<b>İmmobilize Lakkaz</b>	156.0	1.57

Beklenildiği gibi, lakkazın P(GMA) kriyojeline immobilizasyonu sonrası  $K_m$  ve  $V_m$  değerleri değişiklik göstermiştir.  $K_m$  değeri enzimin substrata olan ilgisinin bir ölçüsüdür. Deney sonuçlarından immobilize lakkazın  $K_m$  değerinin azaldığı yani lakkazın ABTS'ye olan ilgisinin immobilizasyon işlemi ile arttığı görülmektedir. Lakkazın substratına olan ilgisinin artması immobilizasyonu için uygun destek malzemesinin seçildiğini belirtmektedir. Çünkü immobilizasyon için seçilen kriyojelin yüksek difüzyon kapasitesi ve makrogözenekli yapısı sayesinde substratın enzimin aktif bölgelerine ulaşması engellenmemiştir. Lakkaz, geniş bir substrat etkinliğine sahip olduğundan dolayı  $K_m$  değerleri oldukça geniştir. Ayrıca bu sonuç immobilizasyon esnasında enzimin aktif bölgelerinin kapatılmadığının önemli bir göstergesidir.

İmmobilizasyon işlemi sonrasında lakkazın  $V_m$  değerinde 35 kat azalma görülmüştür. Fakat bu azalma farklı pH değerine sahip tamponlarda, sıcaklık değerlerinde, substrat ve enzim derişimlerinde yürütülmüş tüm deneyler ile uyum içerisindedir. Serbest enzimin diğer yürütülen deneylerde de immobilize enzimden 15 ile 35 kat arasında daha aktif olduğu belirlenmiştir.

#### 4.3.4. Enzim Miktarının Aktiviteye Etkisi

Farklı miktarlarda serbest lakkaz içeren çözeltiler ve farklı miktarlarda kovalent olarak bağlanmış lakkaz içeren kriyojeller kullanılarak elde edilen deneysel veriler aktivite üzerine enzim miktarının etkisini incelemek için grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.12).

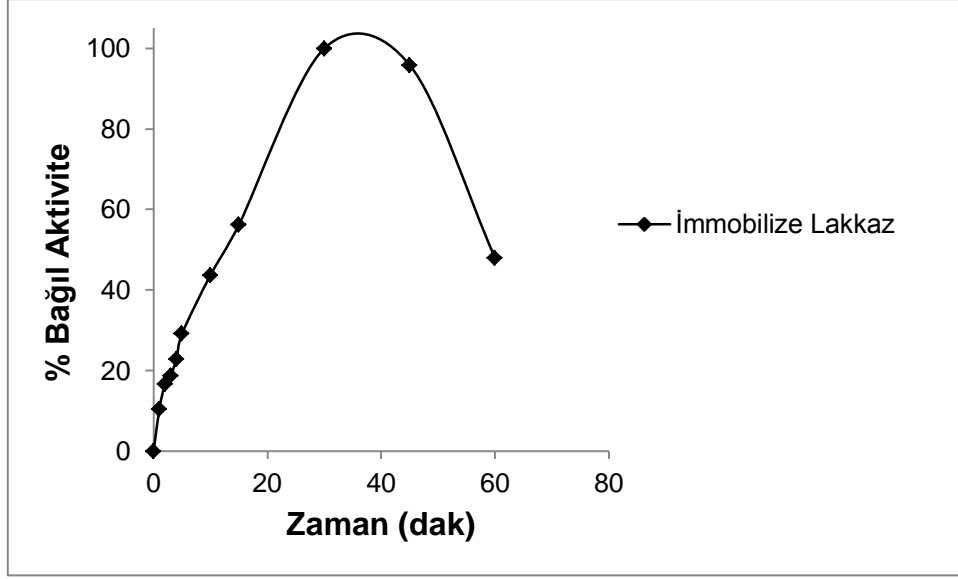


Şekil 4.12. Enzim miktarının aktiviteye etkisi; ABTS derişimi: 1.0 mM; zaman: 30 dak; T: 25.0°C; pH: 5.0.

Şekilden de görüldüğü üzere tepkime ortamlarında kullanılan enzim miktarının artmasıyla beraber % bağıl aktivite değerleri de paralel olarak artış göstermektedir. Serbest enzimdeki aktivite artışı enzim miktarındaki artış ile yaklaşık olarak birebir orantılıdır. Fakat immobilize lakkazın aktivitesindeki artış oranı enzim miktarının artış oranından daha azdır. Aktivite değerlerindeki artışın azalması destek malzemesine immobilize olan enzim miktarı arttıkça sterik engellemeler artacağından enzimin etkinliğini tam olarak gösteremediği ile açıklanabilir.

#### 4.3.5. Tepkime Süresinin Aktiviteye Etkisi

P(GMA) kriyojeline immobilize edilmiş lakkaz aktivitesinin zamana bağlı fonksiyonu Şekil 4.13'te verilmiştir. Tepkime ortamında lakkaz enziminin substratı (ABTS) ürüne dönüştürme hızının zamanla değişimi incelendiğinde aktivite değerinin 30. dakikaya kadar artarak devam ettiği bulunmuştur. Artan tepkime süresiyle ortamdaki substrat miktarı azaldığından dolayı lakkazın % bağıl aktivitesi 30. dakikadan sonra giderek düşmektedir ve 60. dakikada bağıl aktivitenin % 48.0'e düştüğü belirlenmiştir. Buna bağılı olarak diğer parametrelerin incelenmesinde etkileşim süresi 30 dakika olarak alınmıştır.

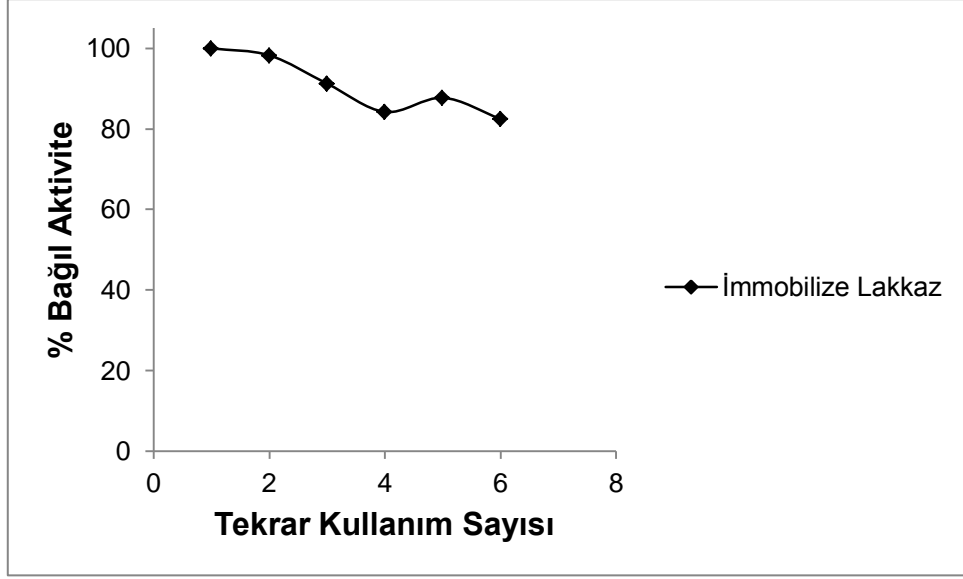


Şekil 4.13. Tepkime süresinin immobilize lakkazın aktivitesine etkisi; Kriyojel kodu: P-24; ABTS derişimi: 1.0 mM; T: 25.0°C; pH: 5.0.

#### 4.3.6. Tekrar Kullanım Sayısının Aktiviteye Etkisi

Enzim immobilizasyonundaki en önemli parametrelerden biride immobilize edilen destek malzemesinin enzim aktivitesinde önemli bir kayba sebep olmadan tekrar kullanılabilir olmasıdır. Serbest enzim bir kez kullanılabilir. Fakat enzim uygun bir destek malzemesine immobilize edildiğinde birden fazla kullanılabilir. Tekrar kullanılabilirlik enzim katalizli tepkime maliyetini önemli ölçüde azaltan bir faktördür. Bu amaçla P(GMA) kriyojeline kovalent bağlanma ile immobilize edilen lakkaz örneğinin tekrar kullanım kararlılığı Bölüm 3.5.6.'da anlatılan yöntem ile belirlenmiştir.

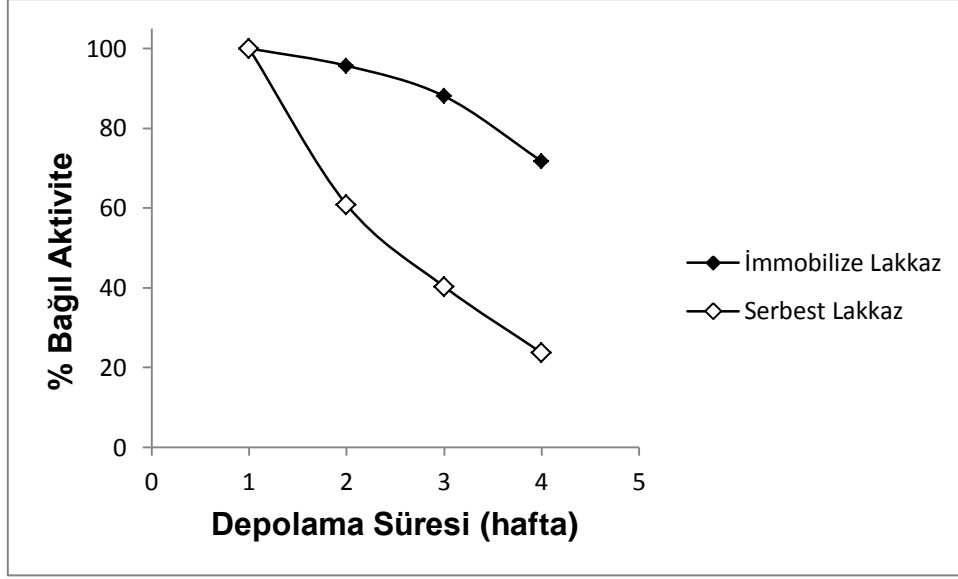
İmmobilize edilen lakkazın kesikli sistemde 6 kez kullanımı sonrasında % bağlı aktivitesi başlangıç aktivitesinin % 82.5'ini göstermektedir (Şekil 4.14). Bu sonuca göre P(GMA) kriyojelinin lakkaz immobilizasyonu için uygun bir destek malzemesi olduğu, lakkazın aktivitesinde önemli bir azalma olmadan tekrar tekrar kullanılabileceği (6 kez) ve enzim kararlılığını koruduğu söylenebilir. 8. kez kullanımı sonrasındaki % bağlı aktivitesi ise başlangıç aktivitesinin % 35.0'ini göstermektedir. Aktivitedeki bu azalma ise her işlem sonrası kriyojel yüzeyinde gerçekleşen renklenme ile açıklanabilir. Bu renklenme ABTS'nin yükseltgenmiş ürünü olan ABTS katyonik radikalının (ABTS<sup>+</sup>) kriyojel yüzeyine bağlanması ile gerçekleşmekte ve kısmen tersinmez enzim denatürasyonuna sebep olmaktadır.



Şekil 4.14. Tekrar kullanım sayısının immobilize lakkazın aktivitesine etkisi; Kriyojel kodu: P-24; ABTS derişimi: 1.0 mM; zaman: 30 dak; T: 25.0°C; pH: 5.0.

#### 4.3.7. Depolama Süresinin Aktiviteye Etkisi

Enzim immobilizasyonundaki maliyeti etkileyen önemli parametrelerden bir diğeri de destek malzemesine immobilize edilen enzimin depolama kararlılığıdır. Yapısında immobilize lakkaz bulunduran P(GMA) kriyojelinin enzim kararlılığını belirlemek amacıyla Bölüm 3.5.7.'de anlatılan yöntemle göre yapılan deneyde elde edilen sonuçlar Şekil 4.15'te gösterilmiştir.



Şekil 4.15. Depolama süresinin immobilize ve serbest lakkazın aktivitesine etkisi;  
 Kriyojel kodu: P-24; lakkaz miktarı: 0.148 mg;  $\text{NaN}_3$  derişimi: 20 mM;  
 enzim/inhibitör v:v, 1:1; ABTS derişimi: 1.0 mM; zaman: 30 dak; T: 25.0°C; pH:5.0.

Şekilden de görüldüğü gibi immobilizasyon işlemi enzimin depolama kararlılığını arttırmıştır. 4 haftalık depolama periyodu boyunca immobilize lakkazın başlangıç aktivitesinin % 72.0'sini korurken, serbest lakkazın % 24.0'ünü koruduğu belirlenmiştir. Serbest lakkazın bağlı aktivitesinin kademeli olarak azalması, lakkazın sulu çözeltide depolanma sırasında kararlı olmadığını göstermektedir.

#### 4.4. Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) Analizi

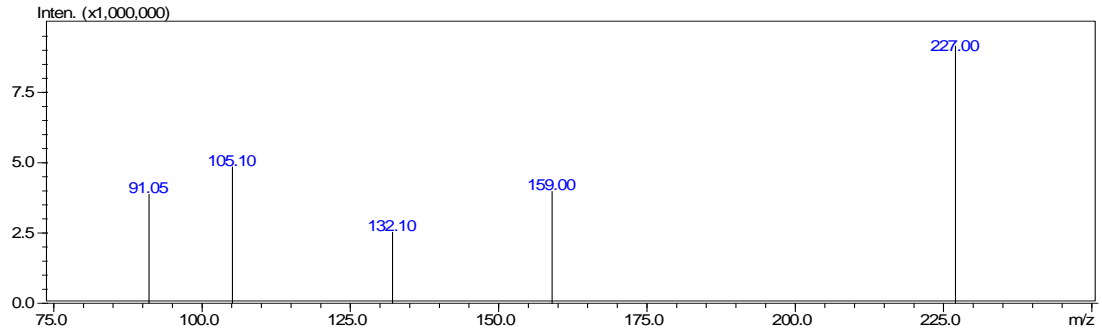
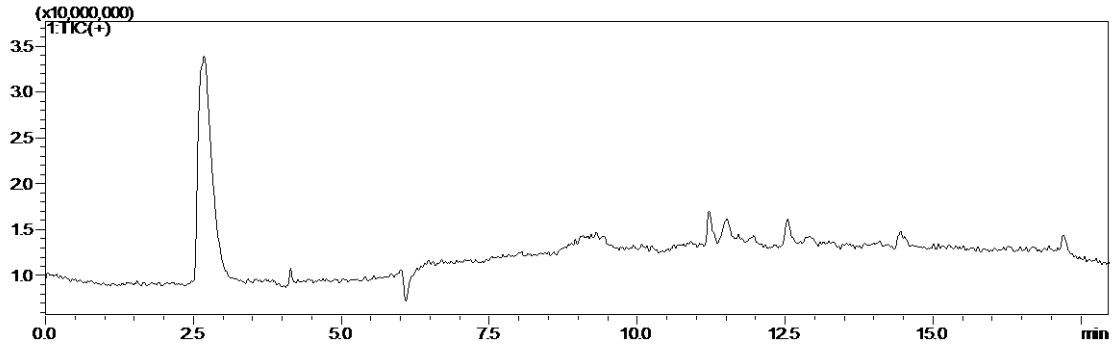
Model bileşik olarak seçilen DNS'nin immobilize ve serbest lakkaz ile kimyasal aracı (ABTS) varlığında enzimatik yükseltgeme sonrasındaki parçalanma ürünlerinin kromatografik ayrımı sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) ile analiz edilmiştir. Enzimatik tepkime etkinliğini anlamak için tepkime de kullanılan maddelerin standart çözeltileri ile tepkime sonrası oluşan çözeltiler kolona verilmiş ve iki aşamalı kütle analizi ile MS spektrumları alınmıştır. Analizden elde edilen verileri yorumlayabilmek için standart DNS ve ABTS çözeltilerinde okuma yapılarak oluşturdukları pikler ve alıkonma zamanları belirlenmiştir. ABTS negatif iyon taramasında sonuç vermezken pozitif iyon taramasında alıkonma zamanı 2.75 dak'dır (Şekil 4.16 ve Şekil 4.17). DNS ise negatif iyon taraması ile sonuç vermiştir ve alıkonma zamanı 8.5 dak'dır (Şekil



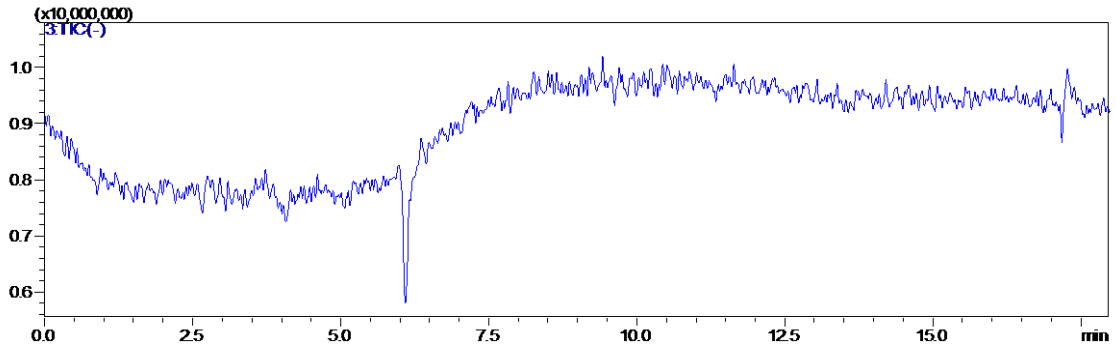
4.18). DNS ve ABTS'nin MS spektrumları karşılaştırıldığında ikisininde kütle/yük oranlarını yaklaşık olarak 227.00 nolu pikler ile benzerlik göstermektedir (Şekil 4.16 ve Şekil 4.18).

İmmobilize lakkaz ile muamele edilmiş DNS çözeltisinin pozitif iyon kromatogramı ile standart çözeltisinin kromatogramı karşılaştırıldığında farklı alıkonma zamanlarında farklı piklerin olduğu görülmektedir (Şekil 4.19). Standart çözeltisiyle aynı alıkonma zamanında ve MS spektrumunda aynı kütle/yük oranlarıyla belirlenen 1 nolu pik ABTS' ye aittir. Farklı alıkonma zamanlarında belirlenmiş 2, 3, 4 ve 5 nolu piklerin MS spektrumları farklı olarak sırasıyla 184.20, 200.25, 225.25 ve 228.30 m/z oranlarında ürünler oluştuğunu göstermektedir. Bu ürünlerin ise MS spektrumlarından elde edilen kütle/yük verilerinin incelenmesiyle 2, 3, 4 ve 5 nolu pikler için sırasıyla yapıdan karbondioksit (CO<sub>2</sub>) ayrılması, aldehit ayrılması (C=O), yapıda kinon oluşumu ve yapının protonlanması ile oluştuğu söylenebilir. İmmobilize lakkaz ile muamele edilmiş DNS çözeltisinin negatif iyon kromatogramı incelendiğinde ise çözeltide hala DNS'nin bulunduğu fakat aynı alıkonma süresinde oluşan DNS pikinin alanındaki azalma ile çözeltideki DNS miktarında azalma olduğu görülmektedir (Şekil 4.20). MS spektrumu ise standart çözeltisi ile benzerdir (Şekil 4.20).

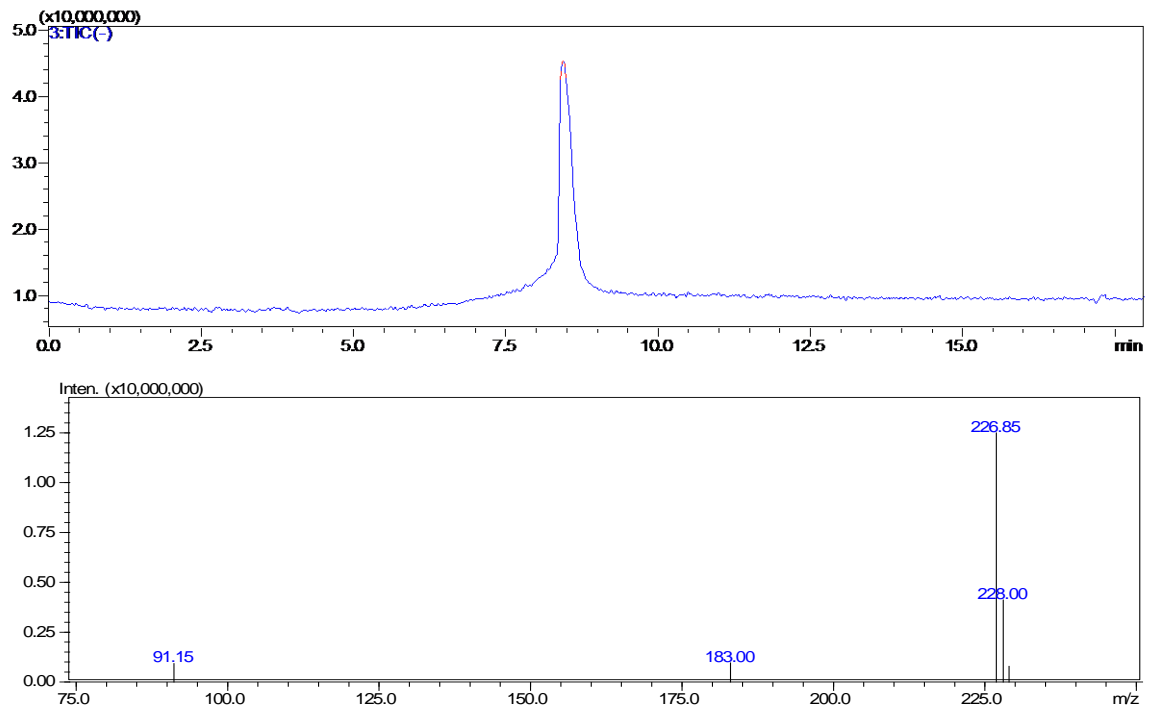
İmmobilize ve serbest lakkaz ile muamele edilmiş DNS çözeltilerinin pozitif iyon kromatogramları karşılaştırıldığında aynı alıkonma sürelerinde 5 farklı pikin oluştuğu ve bu piklerin MS spektrumları incelendiğinde aynı m/z oranlarında ürünlere ait olduğu görülmektedir (Şekil 4.21). Ayrıca serbest lakkaz ile muamele edilmiş DNS çözeltisinin negatif iyon kromatogramı ve MS spektrumu ile immobilize lakkaz ile muamele edilen DNS çözeltisinininkilerinin aynı olduğu görülmektedir (Şekil 4.22). Bu kromatogram ve spektrum verilerine göre immobilize ve serbest lakkazın etkinliğinin aynı olduğu sonucuna ulaşılmaktadır. İmmobilize lakkaz ile serbest lakkazın aynı etkinlikte çalışmaları kriyojelin enzim immobilizasyonu için uygun bir destek malzemesi olduğunu ve immobilizasyonun başarıyla gerçekleştirildiğini bir kez daha ortaya koymuştur. Bu sonuçlara ek olarak oldukça zararlı bir fenolik bileşik olan DNS'nin lakkaz ile enzimatik yükseltgeme tepkimesi sonucu farklı ürünlere dönüştürülerek uzaklaştırıldığı gözlenmiştir.



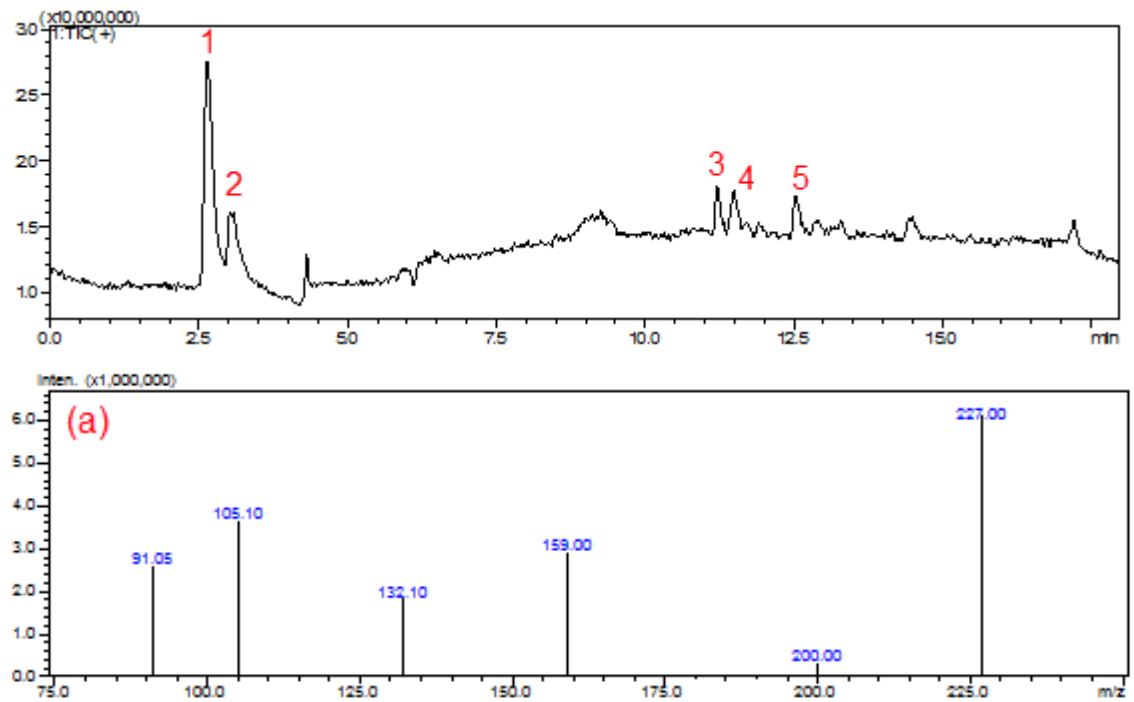
Şekil 4.16. ABTS'nin pozitif iyon kromatogramı ve MS spektrumu

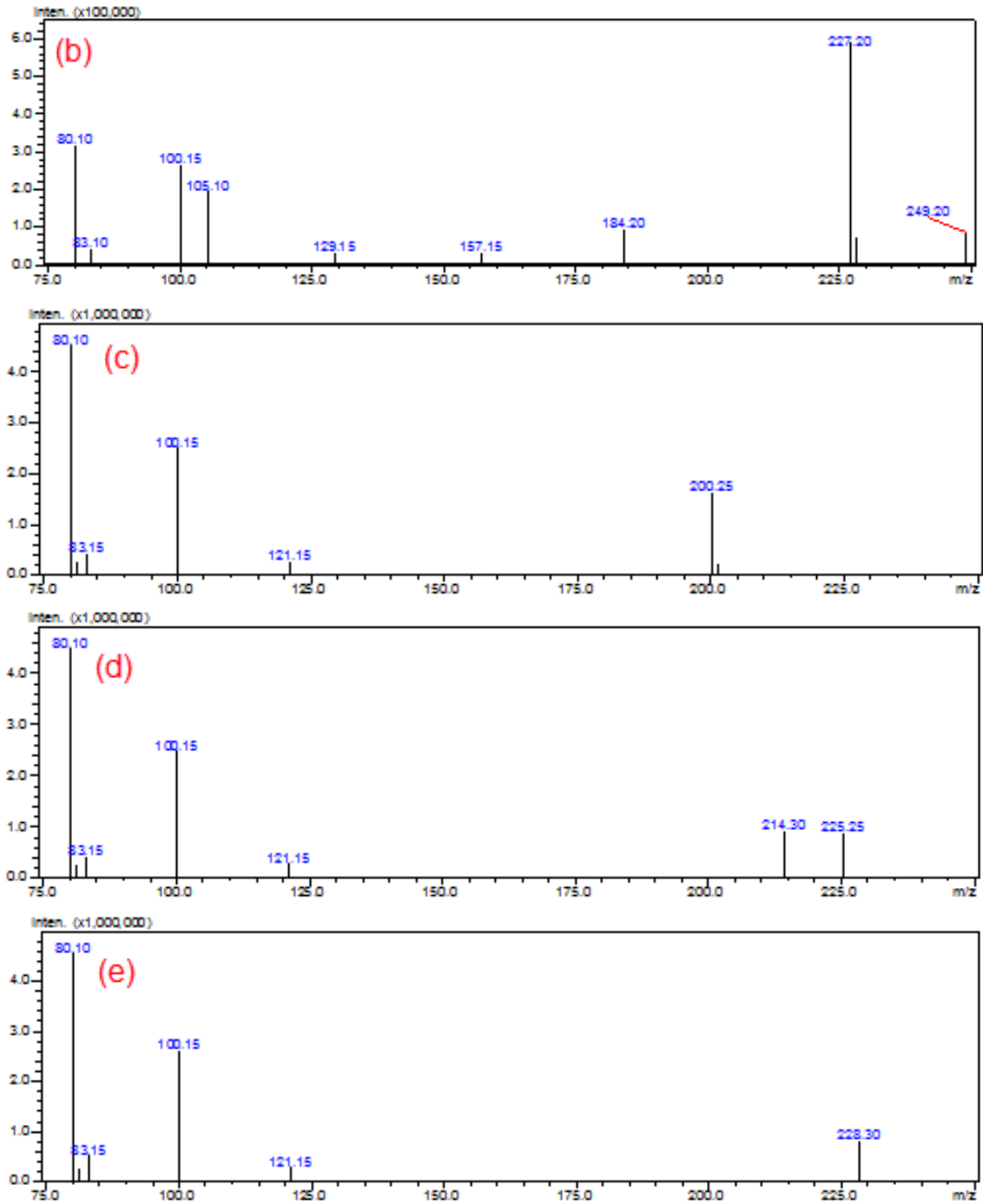


Şekil 4.17. ABTS'nin negatif iyon kromatogramı

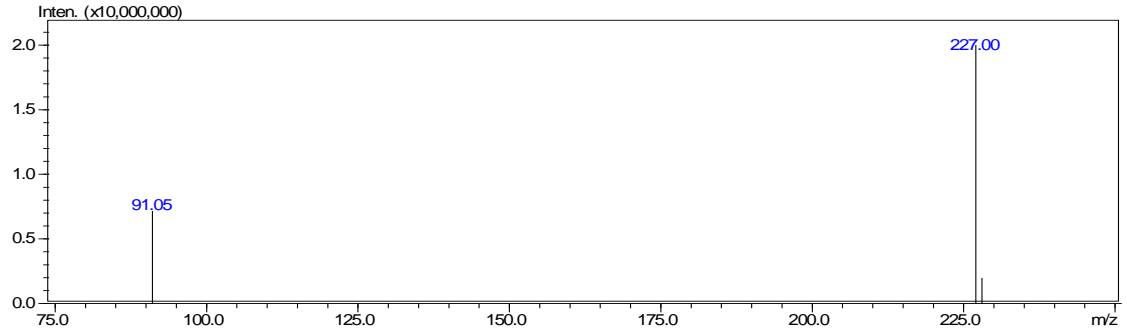
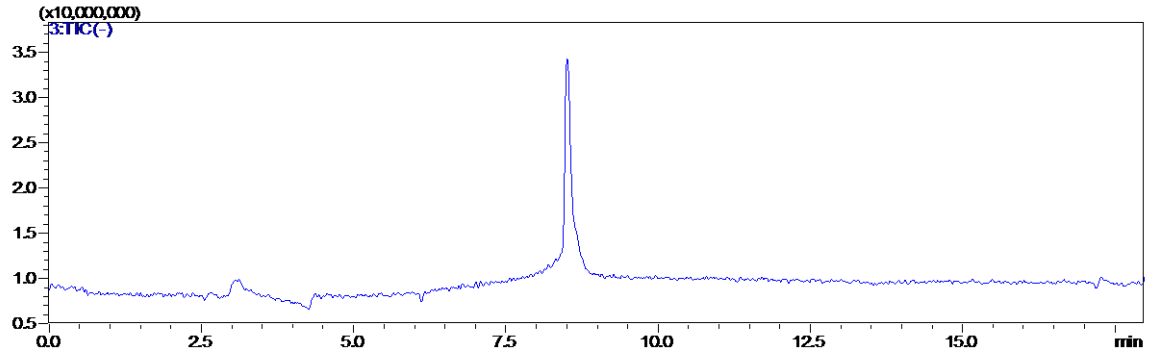


Şekil 4.18. DNS'nin negatif iyon kromatogramı ve MS spektrumu

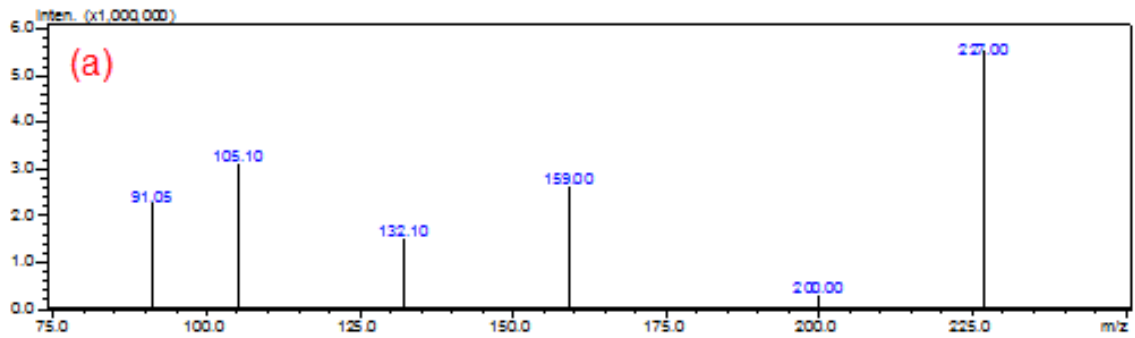
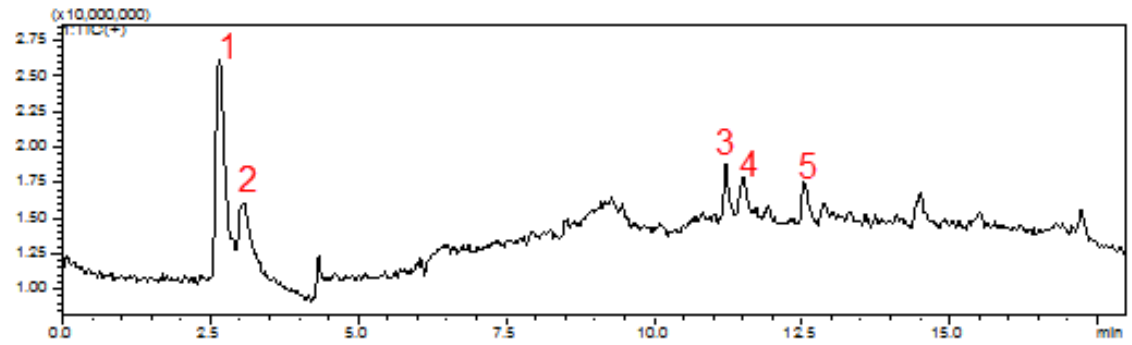


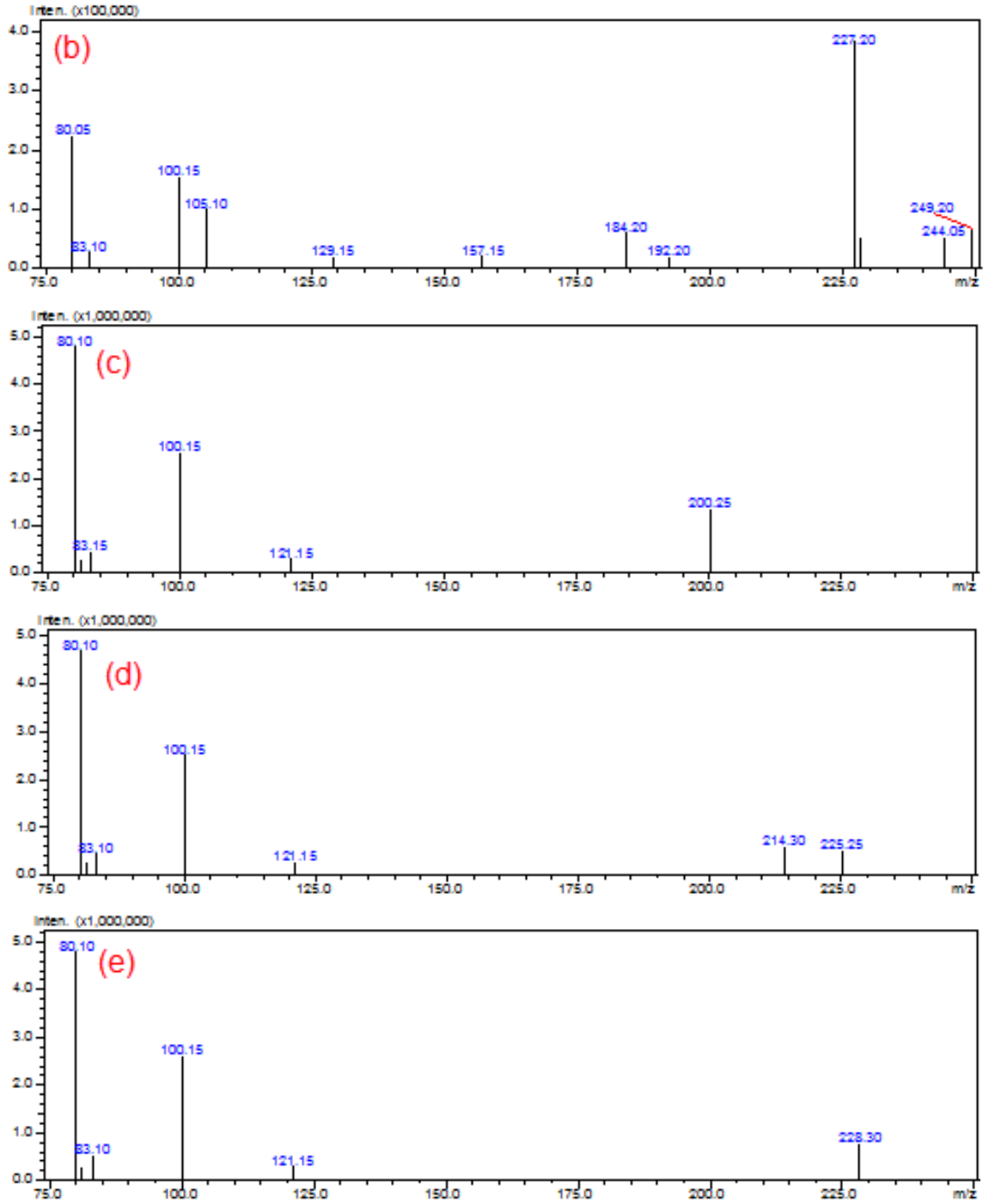


Şekil 4.19. Lakkaz immobilize membranla muamele edilmiş DNS çözeltisinin pozitif iyon kromatogramı ve ilgili piklerin MS spektrumları. (a) 1 nolu (ABTS); (b-e) 2, 3, 4 ve 5 nolu (ürün) pikler

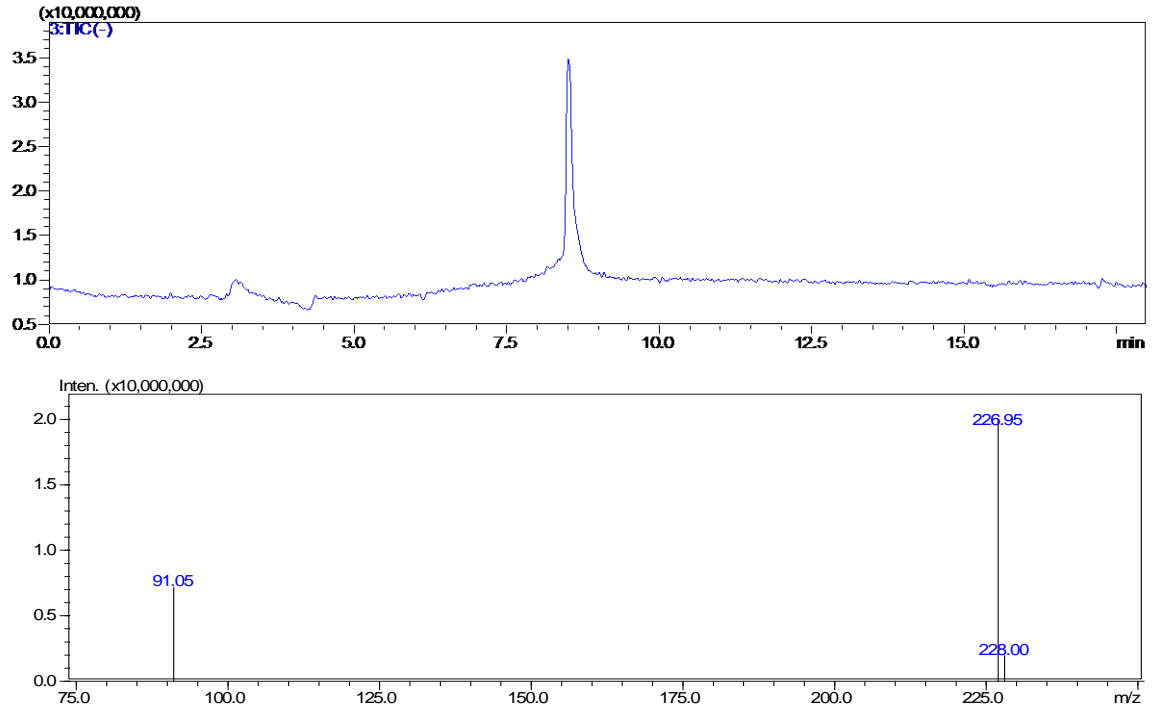


Şekil 4.20. Lakkaz immobilize membranla muamele edilmiş DNS çözeltisinin negatif iyon kromatogramı ve ilgili piklerin MS spektrumları





Şekil 4.21. Serbest lakkaz ile muamele edilmiş DNS çözeltisinin pozitif iyon kromatogramı ve ilgili piklerin MS spektrumları. (a) 1 nolu (ABTS); (b-e) 2, 3, 4 ve 5 nolu (ürün) pikler



Şekil 4.22. Serbest lakkaz ile muamele edilmiş DNS çözeltisinin negatif iyon kromatogramı ve ilgili piklerin MS spektrumları

## 5. YORUM

- Poli(glisidil metakrilat) [P(GMA)] kriyojeli, monomer içine uygun bir başlatıcı ilave edilmesiyle belli bir sıcaklıkta gerçekleştirilen yığın polimerizasyonu yöntemiyle sentezlenmiştir. Çapraz bağlayıcı EGDMA (etilenglikol dimetakrilat) varlığında, GMA (glisidil metakrilat) ve HEMA (2-hidroksietil metakrilat) komonomerleri kullanılarak lakkaz enzimi immobilizasyonunda kullanılmak üzere makrogözenekli yapıda P(GMA) kriyojeli yeni bir destek malzemesi olarak hazırlanmıştır.
- Destek malzemesi olarak kullanılmak üzere sentezlenen P(GMA) kriyojeline lakkaz immobilizasyonu, GMA epoksi gruplarına lakkaz amino gruplarının nükleofilik saldırısı sonucu kovalent bağlanma yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. P(GMA) kriyojeline immobilize edilen lakkaz miktarı spektrofotometrik yöntem kullanılarak tayin edilmiştir. 6 mm çapında 2 tane daire formundaki P(GMA) kriyojel membrana (30.5 mg) kovalent olarak bağlı olan lakkaz miktarı 0.148 mg olarak hesaplanmıştır.
- Sentezlenen P(GMA) ve lakkaz immobilize edilmiş P(GMA) [L-P(GMA)] kriyojellerinin karakterizasyonu FTIR ile yapılmıştır. Spektrumlarda  $3440\text{ cm}^{-1}$  civarında geniş OH gerilme bandı görülmektedir.  $2950\text{ cm}^{-1}$  civarındaki metilen titreşimi GMA ve HEMA monomerlerinin karakteristik titreşimleri arasında yer alır. Ayrıca  $1730\text{ cm}^{-1}$  civarındaki titreşim her iki monomerinde ester konfigürasyonunu göstermektedir. Epoksi grupları ise  $900\text{ cm}^{-1}$  civarında pik vermiştir. Elde edilen spektrumlar karşılaştırıldığında L-P(GMA)'nın spektrumundaki OH gerilme bandının şiddetinin arttığı ve  $1570\text{ cm}^{-1}$  civarında C-N bağına ait karakteristik piklerin oluştuğu görülmektedir. Bu sonuçlar lakkazın yapıya epoksi halka açılmasıyla karbon üzerinden bağlandığını ve epoksi halkasındaki oksijenin hidrojen ile bağ yapması sonucu yapıdaki OH fonksiyonel gruplarının arttığını göstermektedir. Yapılan FTIR analizi sonucunda lakkazın P(GMA) kriyojeline başarıyla immobilize edildiği anlaşılmaktadır.
- Farklı inkübasyon süreleri ile sentezlenen P-0, P-3, P-6, P-12 ve P-24 kodlu kriyojellerin denge şişme oranları sırasıyla % 523, % 531, % 559, % 570 ve



% 572 olarak bulunmuştur. Makrogözenek oranları ise sırasıyla % 54, % 55, % 58, % 59, % 61 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar yapısındaki HEMA ve GMA monomerlerin hidrofilik fonksiyonel grup sayısının fazla olduğunu gösterir. Ayrıca immobilize olan lakkaz miktarı arttıkça da denge şişme oranlarının arttığı görülmektedir. Bu sonuç ise immobilizasyon ile birlikte artan yüzey alanı, lakkazın hidrofilik karakteri ve protein üzerindeki polar grupların olması ile açıklanabilir.

- P(GMA) kriyojelinin yüzey morfolojisini incelenmek amacıyla taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntülemesi yapılmıştır. SEM görüntüleri ile kriyojelin yüksek yüzey alanı sağlayan birbiriyle bağlantılı yoğun gözenek yapısına sahip olduğu belirlenmiştir. Gözeneklerin boyutları yaklaşık olarak 20-50 µm aralığında olduğu bulunmuştur. Bu gözenekli yapı substratın kolayca difüzyonuna olanak sağladığı için sentezlenen kriyojelin lakkaz immobilizasyonuna uygun destek malzemesi olduğunu gösterir.
- Enzimlerin yüksek aktivite gösterdikleri bir pH değeri ve/veya pH aralığı vardır. Bunun belirlenmesi için immobilize ve serbest lakkazın farklı pH değerlerindeki (pH 3.0-6.0) % bağıl aktiviteleri hesaplanmıştır. Hem immobilize hem de serbest lakkaz için en uygun değer pH 5.0 olduğu görülmüştür. Immobilizasyon ile pH değerinde herhangi bir değişiklik olmamıştır. Fakat immobilize lakkazın aktivite gösterdiği pH aralığının daha geniş olduğuna ulaşılmıştır. Bu sonuç kovalent bağlı lakkaz enziminin immobilizasyon işlemi ile pH değerine karşı kararlılığındaki artışı göstermektedir.
- Lakkaz aktivitesine sıcaklığın etkisini belirleyebilmek amacıyla lakkazın farklı sıcaklık değerlerindeki (25.0-75.0°C) % bağıl aktiviteleri hesaplanmıştır. Serbest ve immobilize lakkazın en yüksek aktivite değerlerinin gözlemlendiği optimum sıcaklık değerleri sırası ile 50.0 ve 55.0°C olarak belirlenmiştir. Optimum sıcaklık değerindeki bu kayma lakkazın immobilizasyon işlemi ile daha yüksek sıcaklıkta çalışabileceğini ve daha kararlı hale geldiğini göstermiştir. Immobilize lakkaz aktivitesinde sıcaklık arttıkça orantılı bir artış göstermiş ve 55.0°C'da en yüksek aktivite değeri elde edilmiştir. Bu değerden itibaren sıcaklıktaki artışla beraber lakkaz aktivitesi % 17.0'ye kadar düşmüştür. Enzim aktivitesinin azalması

ortamdaki enzimin denatüre olma olasılığı, çözülmüş oksijen derişiminin azalmasına ve aktif merkezin konformasyon değişimine bağlanabilir.

- İmmobilize enzim için amino grupları vasıtasıyla kovalent bağ oluşturması sonucu konformasyonel esnekliği azaldığından substrata bağlanmak için uygun konformasyona gelmesinde ve tepkime sonrası yeniden düzenlenmesinde serbest enzime kıyasla daha yüksek bir aktivasyon enerjisi gereklidir. Bunu ispatlamak için Arrhenius eşitliğinden yararlanılarak tepkime aktivasyon enerjisi ve Arrhenius sabiti hesaplanmıştır. Serbest ve immobilize lakkaz için 298-323 K arasındaki aktivasyon enerjileri sırasıyla  $27.0 \text{ kJ.mol}^{-1}$  ve  $28.8 \text{ kJ.mol}^{-1}$  olarak bulunmuştur. Arrhenius sabitleri ise sırasıyla  $2.9 \times 10^3 \text{ mM.dak}^{-1}$  ve  $1.6 \times 10^2 \text{ mM.dak}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar ile immobilize enzimin aktivasyon enerjisinin daha yüksek olduğu gösterilmektedir.
- Lakkaz aktivitesine substrat derişiminin etkisini incelemek için farklı derişimlerdeki (0.1-3.0 mM) ABTS çözeltileri ile yapılan deneyler sonucu elde edilen verilerin grafiğe geçirilmesiyle belirli bir substrat derişimine kadar artan sonrasında aktivite değerlerinde pek bir değişiklik olmayan hiperbolik bir eğri elde edilmiştir. Bu hiperbolik eğri enzim kinetiğinin Michealis-Menten denklemiyle açıklanan non-allosterik aktiviteyle uyumludur.
- Lineweaver-Burk grafiğinden yararlanılarak lakkazın Michaelis-Menten sabiti ( $K_m$ ) ile doğgun substrat derişimindeki en yüksek hız ( $V_m$ ) değerleri hesaplanmıştır. Serbest lakkaz için  $K_m$  ve  $V_m$  değerleri sırasıyla  $165.1 \text{ } \mu\text{M}$  ve  $55.2 \text{ } \mu\text{M.dak}^{-1}$  olarak belirlenmiştir. İmmobilizasyon sonrası lakkaz  $K_m$  ve  $V_m$  değerleri serbest lakkaza kıyasla azalmıştır ve  $K_m$   $156.0 \text{ } \mu\text{M}$  ve  $V_m$   $1.57 \text{ } \mu\text{M.dak}^{-1}$  olarak bulunmuştur. Sonuçlardan immobilize lakkazın  $K_m$  değerinin azaldığı yani lakkazın ABTS'ye olan ilgisinin immobilizasyon işlemi ile arttığı görülmektedir. Lakkazın substratına olan ilgisinin artması immobilizasyonu için uygun destek malzemesinin seçildiğini belirtmektedir. Çünkü immobilizasyon için seçilen kriyojelin yüksek difüzyon kapasitesi, makrogözenekli yapısı sayesinde substratın enzimin aktif bölgelerine ulaşması engellenmemiştir. Ayrıca bu sonuç immobilizasyon esnasında enzimin aktif bölgelerinin kapatılmadığının önemli bir göstergesidir.

- Tepkime ortamlarında kullanılan enzim miktarının artmasıyla beraber % bağıl aktivite değerleri de paralel olarak artış göstermektedir. Serbest enzimdeki aktivite artışı enzim miktarındaki artış ile yaklaşık olarak birebir orantılıdır. Fakat immobilize lakkazın aktivitesindeki artış oranı enzim miktarının artış oranından daha azdır. Aktivite değerlerindeki artışın azalması destek malzemesine immobilize olan enzim miktarı arttıkça sterik engellemeler artacağından enzimin etkinliğini tam olarak gösteremediği ile açıklanabilir.
- Tepkime ortamında lakkaz enziminin substratı (ABTS) ürüne dönüştürme hızının zamanla değişimi incelendiğinde % bağıl aktivite değerinin 30. dakikaya kadar artarak devam ettiği bulunmuştur. Artan tepkime süresiyle ortamdaki substrat miktarı azaldığından dolayı lakkazın % bağıl aktivitesinin 30. dakikadan sonra düştüğü gözlenmiştir.
- Tekrar kullanılabilirlik enzim katalizli tepkime maliyetini önemli ölçüde azaltan bir faktördür. Bu amaçla P(GMA) kriyojeline kovalent bağlanma ile immobilize edilen lakkaz örneğinin tekrar kullanım kararlılığı incelenmiştir. İmmobilize edilen lakkazın kesikli sistemde 6 kez kullanımı sonrasında % bağıl aktivitesi başlangıç aktivitesinin % 82.5'ini göstermektedir. Bu sonuca göre P(GMA) kriyojelinin lakkaz immobilizasyonu için uygun bir destek malzemesi olduğu, lakkazın aktivitesinde önemli bir azalma olmadan tekrar tekrar kullanılabilmesi ve enzim kararlılığını koruduğu söylenebilir.
- Enzim immobilizasyonundaki maliyeti etkileyen önemli parametrelerden bir diğeri de destek malzemesine immobilize edilen enzimin depolama kararlılığıdır. Bu amaçla 4 haftalık depolama periyodu boyunca deneysel incelemeler yapılmış ve immobilize lakkazın başlangıç aktivitesinin % 72.0'sini korurken, serbest lakkazın % 24.0'ünü koruduğu belirlenmiştir. Serbest lakkazın % bağıl aktivitesinin kademeli olarak azalması, lakkazın sulu çözeltide depolanma sırasında kararlı olmadığını göstermektedir.
- Model bileşik olarak seçilen DNS'nin immobilize ve serbest lakkaz ile enzimatik yükseltgeme sonrasında parçalanma ürünlerinin kromatografik ayrımı sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) ile analiz edilmiştir. Standart DNS ve ABTS çözeltilerinde okuma

yapılarak oluşturdukları pikler ve alıkonma zamanları belirlenmiştir. ABTS negatif iyon taramasında sonuç vermezken pozitif iyon taramasında alıkonma zamanı 2.75 dak'dır. DNS ise negatif iyon taraması ile sonuç vermiştir ve alıkonma zamanı 8.5 dak'dır. DNS ve ABTS'nin MS spektrumları karşılaştırıldığında ikisinde kütle/yük oranlarını yaklaşık olarak 227.00 nolu pikler ile benzerlik göstermektedir.

- İmmobilize lakkaz ile muamele edilmiş DNS zeltisinin pozitif iyon kromatogramı ile standart zeltisinin kromatogramı karşılaştırıldığında farklı alıkonma zamanlarında farklı piklerin olduğu görülmektedir. Standart zeltisiyle aynı alıkonma zamanında ve MS spektrumunda aynı kütle/yük oranlarıyla belirlenen 1 nolu pik ABTS' ye aittir. Farklı alıkonma zamanlarında belirlenmiş 2, 3, 4 ve 5 nolu piklerin MS spektrumları farklı ürünlerin oluştuğunu göstermektedir. Bu rnlerin ise MS spektrumlarından elde edilen kütle/yük verilerinin incelenmesiyle 2, 3, 4 ve 5 nolu pikler için sırasıyla yapıdan karbondioksit (CO<sub>2</sub>) ayrılması, aldehit ayrılması (C=O), yapıda kinon oluşumu ve yapının protonlanması ile oluştuğu söylenebilir. İmmobilize lakkaz ile muamele edilmiş DNS zeltisinin negatif iyon kromatogramı incelendiğinde ise zeltide hala DNS'nin bulunduğu fakat aynı alıkonma süresinde oluşan DNS pikinin alanındaki azalma ile zeltideki DNS miktarında azalma olduğu görülmektedir.
- İmmobilize ve serbest lakkaz ile muamele edilmiş DNS zeltilerinin pozitif iyon kromatogramları karşılaştırıldığında aynı alıkonma sürelerinde 5 farklı fikin oluştuğu ve bu piklerin MS spektrumları incelendiğinde aynı m/z oranlarında ürünlere ait olduğu görülmektedir. Ayrıca serbest lakkaz ile muamele edilmiş DNS zeltisinin negatif iyon kromatogramı ve MS spektrumu ile immobilize lakkaz ile muamele edilen DNS zeltisinininkilerinin aynı olduğu görülmektedir. Bu kromatogram ve spektrum verilerine göre immobilize ve serbest lakkazın etkinliğinin aynı olduğu sonucuna ulaşılmaktadır. İmmobilize lakkaz ile serbest lakkazın aynı etkinlikte çalışmaları kriyojelin enzim immobilizasyonu için uygun bir destek malzemesi olduğunu ve immobilizasyonun başarıyla gerçekleştirildiğini bir kez daha ortaya koymuştur. Bu sonuçlara ek olarak oldukça zararlı bir

fenolik bileşik olan DNS'nin lakkaz ile enzimatik yükseltgeme tepkimesi sonucu farklı ürünlere dönüştürülerek uzaklaştırıldığı gözlenmiştir.

- Çalışmadan elde edilen bulgular P(GMA) kriyojelik destek malzemesinin lakkazın immobilizasyonu için uygun olduğunu ve atık su endüstrilerinde fenolik bileşiklerin uzaklaştırılması için kullanılmak üzere düşük maliyetli alternatif bir yöntemin başarıyla geliştirildiğini göstermektedir.

## KAYNAKLAR

- [1] Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği Suda Tehlikeli ve Zararlı Maddeler Tebliği, *Resmi Gazete*, 4 Eylül, Sayı 19919, **1988**.
- [2] Karaer, Y., *Atık Suların Elektrokimyasal Yöntemle Arıtılması*, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, **2007**.
- [3] Sreekanth, D., *Biodegradation of Phenolic compounds by using lab scale up flow anaerobic sludge blanket reactor (UASB)*, Faculty of Environmental Science and Technology, Jawaharlal Nehru Technological University, India, 150, **2012**.
- [4] Schie, P.M.V., Young, L.Y., Isolation and Characterization of phenol degrading denitrifying bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, 64(7), 2432-2438, **1998**.
- [5] Stanisavljević, M., Nedić, L., Removal of phenol from industrial wastewaters by horseradish (*Cochlearia armoracia L*) peroxidase, *Working and Living Environmental Protection*, 2(4), 345-349, **2004**.
- [6] EPA, Phenol ambient water quality criteria, Office of the planning and standards. *Environmental Protection Agency*, Washington, DC., 296-786, **1979**.
- [7] Nair, C.I., Jayachandran, K., Shashidhar, S., Biodegradation of phenol, *African Journal of Biotechnology*, 7 (25), 4951-4958, **2008**.
- [8] Yener, J., Aksu, Z., Atıksulardaki fenol ve klorofenollerin aktif karbon ve kurutulmuş aktif çamura adsorpsiyonu, *Turkish Journal of Engineering and Environmental Science*, 23, 93–104, **1999**.
- [9] Freire, R.S., Durán, N., Kubota, L.T, Effects of fungal laccase immobilization procedures for the development of a biosensor for phenol compounds, *Talanta*, 54, 681–686, **2001**.
- [10] Thurston, C.F., The Structure and Function Of Fungal Laccases, *Microbiology*, 140, 19–26, **1994**.
- [11] Xu, F., Damhus, T., Danielsen, S., Østergaard, L.H., Catalytic Applications of Laccase. *Modern Biooxidation Enzymes, Reactions and Applications*, (eds: Schmid, R.D., Urlacher V.B.), WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 43-76, **2007**.

- [12] Rekuć, A., Jastrzemska, B., Liesiene, J., Bryjak, J., Comparative studies on immobilized laccase behaviour in packed-bed and batch reactors, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 57, 216-223, **2009**.
- [13] Hu, X., Zhao, X., Hwang, H., Comparative study of immobilized *Trametes versicolor* laccase on nanoparticles and kaolinite, *Chemosphere*, 66, 1618-1626, **2007**.
- [14] Fernández-Fernández, M., Sanromán, M.A., Moldes, D., Recent developments and applications of immobilized laccase, *Biotechnology Advances*, 18, **2012**.
- [15] Ge, Y., Turner, A.P.F., To large to fit? Recent development in macromolecular imprinting, *Trends in Biotechnology*, 26, 218–224, **2008**.
- [16] Erturk, G., Uzun, L., Tumer, M.A., Say, R., Denizli, A., F<sub>ab</sub> fragments imprinted SPR biosensor for real-time human immunoglobulin G detection, *Biosensors and Bioelectronics*, 28, 97-104, **2011**.
- [17] Bereli, N., Andac, M., Baydemir, G., Say, R., Galaev, I.Y., Denizli, A., Protein recognition via ion-coordinated molecularly imprinted supermacroporous cryogels, *Journal of Chromatography A*, 1190, 18-26, **2008**.
- [18] Bereli, N., Sener, G., Altintas, E.B., Yavuz, H., Denizli, A., Poly(glycidyl methacrylate) beads embedded cryogels for pseudo-specific affinity depletion of albumin and immunoglobulin G, *Materials Science and Engineering C*, 30, 323-329, **2010**.
- [19] Nguyen, M.T., Kryachko, E.S., Vanqickenborne, L.G., General and theoretical aspects of phenols. *The Chemistry of Phenols*, (eds: Rappoport, Z.), John Wiley & Sons, Jerusalem, 3-199, **2003**.
- [20] Guidechem, What is 3,5-Dinitrosalicylic acid, <http://www.guidechem.com/dictionary/en/609-99-4.html> (Eylül, **2013**).
- [21] Aksu, Z., Bülbül, G., Determination of the effective diffusion coefficient of phenol in Ca-alginate-immobilized *P. putida* beads, *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 344-348, **1999**.
- [22] Ghadhi, S.C., Sangodkar, U.M.X., Potentials of *Pseudomonas cepacia* PAA in bioremediation of aquatic wastes containing phenol, *Proceedings of National Symposium Frontiers in Applied and Environmental Microbiology*, Cochin, 11-13, **1995**.

- [23] Nuhoglu, A., Yalcin, B., Modelling of phenol removal in a batch reactor, *Process Biochemistry*, 40, 1233-1239, **2005**.
- [24] Santa Cruz Biotechnology, 3,5-Dinitrosalicylic acid, Material Safety Data Sheet, <http://www.scbt.com/datasheet-214181-3-5-dinitrosalicylic-acid.html> (Eylül, **2013**).
- [25] Dobbins, D.C., Thornton, M.J., Jones, D.D., Federle, T.W., Mineralization potential for phenol in subsurface soils, *Journal of Environmental Quality*, 16, 54–58, **1987**.
- [26] Patterson, J.W., Industrial Wastewater Treatment Technology, *Butterworth Publishers*, **1985**.
- [27] Environment Canada, *Priority substances list supporting document for the environmental assessment of phenol*, Canadian Environmental Protection Act, Commercial Chemicals Evaluation Branch, Hull, Quebec, 1–7, **1998**.
- [28] Ghiourelotis, M., Nicell, J.A., Assessment of soluble products of peroxidase catalysed polymerisation of aqueous phenol, *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 185-193, **1999**.
- [29] Silva, A.M., Tavares, A.P.M., Rocha, C.M.R., Cristóvão, R.O., Teixeira, J.A., Macedo, E.A., Immobilization of commercial laccase on spent grain, *Process Biochemistry*, 47, 1095-1101, **2012**.
- [30] Couto, S.R., Herrera, J.L.T., Industrial and Biotechnological Applications of Laccases: A Review, *Biotechnology Advances*, 24, 500–513, **2006**.
- [31] Özer, N., Biyokimya 1, *Palme Yayıncılık*, Ankara, **2000**.
- [32] Manual of Clinical Enzyme Measurements, Freehold, NJ: *Worthington Biochemical Corporation*, 8, 1-56, **1972**.
- [33] Harper, H.A., Enzyme Review of Physiological Chemistry, *Los Atlos, California*, 16, 1-681, **1977**.
- [34] Lehninger, A.L., Enzymes Principles of Biochemistry, *Worth Publishers Inc.*, New York, **1982**.
- [35] Nandane, A.S., Prasad, R.V., Enzymes: Some Basic Concepts and Applications in Food Industry, *Journal of Engineering*, 3(1), 66-71, **2006**.
- [36] Bernhard, S., The Structure and Function of Enzyme, *W.A. Benjamin Inc.*, New York, **1968**.



- [37] Krajewska, B., Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review, *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 126–139, **2004**.
- [38] Durán, N., Rosa, M.A., D'annibale, A., Gianfreda, L., Applications Of Laccases And Tyrosinases (Phenoloxidases) Immobilized On Different Supports: A Review, *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 907-931, **2002**.
- [39] Madhavi, V., Lele, S.S., Laccase: properties and applications, *BioResources*, 4(4), 1694–1717, **2009**.
- [40] Octavio, L.C., Pérez, P., Irma, M.C., Rodríguez, B., Ricardo, J., Francisco, O.V., Laccases. *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*, (eds: Guevara-González, R.G., Torres-Pacheco, I.), Research Signpost, Kerala, India, 323–340, **2006**.
- [41] Vandertol-Vanier, H.A., *The Role of Laccase From Coriolopsis Gallica in Polycyclic Aromate Hydrocarbon Metabolism*, Department of Biological Sciences, University of Alberta, Edmonton, Alberta, **2000**.
- [42] Ducros, V., Brzozowski, A.M., Wilson, K.S., Brown, S.H., Ostergaard, P., Schneider, P., Yaver, D.S., Pedersen, A.H., and Davies, G.J., Crystal Structure Of The Type-2 Copper Depleted Laccase from *Coprinus cinereus* At 2.2 Å Resolution, *Nature Structural Biology*, 5, 310-316, **1998**.
- [43] Kaal, E.E.J., Jong, E., Field, J.A., Stimulation of Ligninolytic Peroxidase Activity by Nitrogen Nutrients in The White Rot Fungus *Bjerkandera Sp.* Strain Bos55, *Applied and Environmental Microbiology*, 59(12), 4031-4036, **1993**.
- [44] Piontek, K., Antorinis, M., Choinowski, T., Crystal Structure of A Laccase from the Fungus *Trametes versicolor* At 1.90-Å Resolution Containing A Full Complement Of Coppers, *The Journal of Biological Chemistry*, 277(40), 37663-37669, **2002**.
- [45] Call, H., Mucke, L., History, Overview and Applications of Mediated Lignolytic Systems, Especially Laccase-Mediator-Systems (Lignozym process), *Journal of Biotechnology*, 53, 163-202, **1997**.
- [46] Li, K., Xu, F., Eriksson, K.E.L., Comparison of Fungal Laccases and Redox Mediators in Oxidation of a Nonphenolic Lignin Model Compound, *Applied and Environmental Microbiology*, 65(6), 2654-2660 **1999**.

- [47] Bourbonnais, R., Paice, M.G., Freiermuth, B., Bodie, E., Borneman, S., Reactivities Of Various Mediators and Laccases with Kraft Pulp and Lignin Model Compounds, *Applied and Environmental Microbiology*, 63(12), 4627-4632, **1997**.
- [48] Gianfreda, L., Xu, F., Bollag J.M., Laccases: A Useful Group Of Oxidoreductive Enzymes, *Bioremediation Journal*, 3(1), 1-26, **1999**.
- [49] Kunamneni, A., Plau, F.J., Ballesteros, A., Alcalde, M., Laccases and their applications: A patent review, *Recent Pat Biotechnology*, 2(1), 10-24, **2008**.
- [50] Levine, W.G., Laccase, A Review In: The Biochemistry Of Copper, *Academic Press Inc.*, New York, 371-385, **1965**.
- [51] Yoshida, H., Chemistry of lacquer (*urushi*), *J. Chem. Soc.*, 43, 472-486, **1883**.
- [52] Gardiol, A.E., Hernandez, R.J., Harte, B.R., Device for detecting oxygen with oxidase, *United States Patent*, No.5,804,401, **1998**.
- [53] Bertrand, G., Sur Le Latex De L'arbre À Laque, *C.R. Hebd Seances Acad Sci, Paris*, 118, 1215-1218, **1894**.
- [54] Morozova, O.V., Shumakovich, G.P., Shleev, S.V., Yaropolov, Y.I., Laccase-mediator systems and their applications: a review, *Applied Biochemistry Microbiology*, 43(5), 523–535, **2007**.
- [55] Alexandre, G., Bally, R., Emergence of laccase-positive variant of *Azospirillum lipoferum* occurs via a two-step phenotypic switching process, *FEMS Microbiology Letters*, 174, 371–378, **1999**.
- [56] Sánchez-Amat, A., Lucas-Elió, P., Fernández, E., García-Borrón, J.C., Solano, F., Molecular cloning and functional characterization of a unique multipotent polyphenol oxidase from *Marinomonas mediterranea*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1547, 104–116, **2001**.
- [57] Endo, K., Hosono, K., Beppu, T., Ueda, K., A novel extracytoplasmatic phenol oxidase of *Streptomyces*: its possible involvement in the onset of morphogenesis, *Microbiology*, 148, 1767–1776, **2002**.
- [58] Hullo, M.F., Moszer, I., Danchin, A., Martín-Verstraete, I., CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase, *Journal of Bacteriology*, 183(18), 5426–5430, **2001**.

- [59] Ardon, O., Kerem, Z., Hadar, Y., Enhancement of lignin degradation and laccase activity in *Pleurotus ostreatus* by cotton stalk extract, *Canadian Journal of Microbiology*, 44, 676-680, **1998**.
- [60] Crestini, C., Argyropoulos, D.S., The early oxidative biodegradation steps of residual kraft lignin models with laccase, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 6, 2161-2169, **1998**.
- [61] Goodell, B., Yamamoto, K., Jellison, J., Nakamura, M., Fujii, T., Takabe, K., Laccase immunolabelling and microanalytical analysis of wood degraded by *Lentinus edodes*, *Holzforschung*, 52, 345–350, **1998**.
- [62] Dean, J.F.D., Eriksson, K.E., Laccase and the deposition of lignin in vascular plants, *Holzforschung*, 18, 21–33, **1994**.
- [63] LaFayette, P.R., Eriksson, K.E.L., Dean, J.F.D., Characterization and heterologous expression of laccase cDNA from xylem tissues of yellow-poplar (*Liriodendron tulipifera*), *Plant Molecular Biology*, 40, 23–35 **1999**.
- [64] Zille, A., *Laccase Reactions for Textile Application*, PhD thesis, Textile Engineering, Faculty of Engineering, University of Minho, Italy, **2005**.
- [65] Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S., Sannia, G., Laccases: a never ending story, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67, 369–385, **2010**.
- [66] Türkoglu, N., *Tekstil Endüstrisinde Kullanılan Selulaz, Lakkaz ve Peroksidaz Enzimlerinin Funguslardan Üretiminin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Mersin, **1999**.
- [67] Arica, M.Y., Altintas, B., Bayramoglu, G., Immobilization of laccase onto spacer-arm attached non-porous poly(GMA/EGDMA) beads: application for textile dye degradation, *Bioresource Technology*, 100, 665-669, **2009**.
- [68] Polizzi, K.M., Bommarius, A.S., Broering, J.M., Chaparro-Riggers, J.F., Stability of biocatalysts, *Current Opinion in Chemical Biology*, 11, 220–225, **2007**.
- [69] Kunamneni, A., Ghazi, I., Camarero, S., Ballesteros, A., Plou, F.J., Alcalde, M., Decolorization of synthetic dyes by laccase immobilized on epoxy-activated carriers, *Process Biochemistry*, 43, 169-178, **2008**.
- [70] Arroyo, M., Immobilized enzymes: Theory, methods of study and applications, *Ars Pharmaceutica*, 39(2), 23–39, **1998**.

- [71] Twyman, R.M., Enzymes: Immobilized Enzymes. *Encyclopedia of Analytical Science*, (eds: Worsfold, P., Townshend, A., Poole, C.), Elsevier Science, 2, 523-529, **2005**.
- [72] Khan, A.A., Alzohairy, M.A., Recent Advances and Applications of Immobilized Enzyme Technologies: A Review, *Research Journal of Biological Sciences*, 5(8), 565-575, **2010**.
- [73] Mateo, C., Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Guisan J.M., Fernandez-Lafuente, R., Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques, *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1451-1463, **2007**.
- [74] Niladevi, K.N., Prema, P., Immobilization of laccase from *Streptomyces psammoticus* and its application in phenol removal using packed bed reactor, *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 24, 1215-1222, **2008**.
- [75] Brandi, P., D'Annibale, A., Galli, C., Gentili, P., Pontes, A.S.N., In search for practical advantages from the immobilisation of an enzyme: the case of laccase, *Journal of Molecular Catalysis B*, 41, 61-69, **2006**.
- [76] Rochefort, D., Kouisni, L., Gendron, K., Physical immobilization of laccase on an electrode by means of poly(ethyleneimine) microcapsules, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 617, 53–63, **2008**.
- [77] Bayramoglu, G., Arica, M.Y., Immobilization of laccase onto poly(glycidyl methacrylate) brush grafted poly(hydroxyethyl methacrylate) films: enzymatic oxidation of phenolic compounds, *Materials Science and Engineering C*, 29, 1990-1997, **2009**.
- [78] Qiu, H., Xu, C., Huang, X., Ding, Y., Qu, Y., Gao, P., Immobilization of laccase on nanoporous gold: comparative studies on the immobilization strategies and the particle size effects, *The Journal of Physical Chemistry C*, 113, 2521-2525, **2009**.
- [79] Çorman, M.E., Öztürk, N., Bereli, N., Akgöl, S., Denizli, A., Preparation of nanoparticles which contains histidine for immobilization of *Trametes versicolor* laccase, *Journal of Molecular Catalysis B*, 63, 102-107, **2010**.
- [80] Brady, D., Jordaan, J., Advances in enzyme immobilisation, *Biotechnology Letters*, 31, 1639-1650, **2009**.

- [81] Michota-Kaminska, A., Wrzosek, B., Bukowska, J., Resonance Raman evidence of immobilization of laccase on self-assembled monolayers of thiols on Ag and Au surfaces, *Applied Spectroscopy*, 60(7), 725-757, **2006**.
- [82] Stanescu, M.D., Fogorasi, M., Shaskolskiy, B.L., Gavrilas, S., Lozinsky, V.I., New potential biocatalysts by laccase immobilization in PVA cryogel type carrier, *Applied Biochemistry Biotechnology*, 160, 1947-1954, **2010**.
- [83] Champagne, P.P., Ramsay, J.A., Reactive blue 19 decolouration by laccase immobilized on silica beads, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77, 819–823, **2007**.
- [84] Zhang, J., Xu, Z., Chen, H., Zong, Y., Removal of 2,4-dichlorophenol by chitosanimmobilized laccase from *Coriolus versicolor*, *Biochemical Engineering Journal*, 45, 54-59, **2009**.
- [85] Cristóvão, R.O., Tavares, A.P.M., Brígida, A.I., Loureiro, J.M., Boaventura, R.A.R., Macedo, E.A., Coelho, M.A.Z., Immobilization of commercial laccase onto green coconut fiber by adsorption and its application for reactive textile dyes degradation, *Journal of Molecular Catalysis B*, 72, 6–12, **2011**.
- [86] Davis, S., Burns, R.G., Covalent immobilisation of laccase on activated carbon for phenolic effluent treatment, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37(4), 474-479, **1992**.
- [87] Lozinsky, V.I., Galaev, I.Y., Plieva, F.M., Savina, I.N., Jungvid, H., Mattiasson, B., Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest, *Trends in Biotechnology*, 21(10), 445–451, **2003**.
- [88] Lozinsky, V.I., Plieva, F.M., Galaev, Y.I., Mattiasson, B., The potential of polymeric cryogels in bioseparation, *Bioseparation*, 10, 163–188, **2006**.
- [89] Tripathi, A., Kathuria, N., Kumar, A., Elastic and macroporous agarose–gelatin cryogels with isotropic and anisotropic porosity for tissue engineering, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 90, 680–694, **2009**.
- [90] Yao, K., Yun, J., Shen, S., Wang, L., He, X., Characterization of a novel continuous supermacroporous monolithic cryogel embedded with nanoparticles for protein chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1109, 103-110, **2006**.

- [91] Lozinsky, V.I., Cryogels on the basis of natural and synthetic polymers: preparation, properties and applications, *Russian Chemical Reviews*, 71(6), 489-511, **2002**.
- [92] Kumar, A., Bansal, V., Nandakumar, K.S., Galaev, I.Y., Roychoudhury, P.K., Holmdahl, R., Mattiasson, B., Integrated Bioprocess for the Production and Isolation of Urokinase from Animal Cell Culture using Supermacroporous Cryogel Matrices, *Biotechnology Bioengineering*, 93(4), 636-646, **2006**.
- [93] Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., Production and Properties of Cryogels by Radical Polymerization. *Macroporous Polymers Production Properties and Biotechnological/Biomedical Applications*, (eds: Mattiasson, B., Kumar, A., Galaev, I.Y.), CRC Press, 23-48, **2009**.
- [94] Cui, Z., Medical Biotechnology and Healthcare. *Comprehensive Biotechnology*, (ed: Moo-Young, M.), Elsevier, Ontario, Canada, 5(2), **2011**.
- [95] Lozinsky, V.I., Domotenko, L.V., Vainerman, E.S., Mamtsis, A.M., Titova, E.F., Belavtseva, E.M., Rogozhin, S.V., Study of cryostructurization of polymer systems. VII. Structure formation under freezing of poly(vinyl alcohol) aqueous solutions, *Colloid and Polymer Science*, 264, 19–24, **1986**.
- [96] Arvidsson, P., Plieva, F.M., Lozinsky, V.I., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized metal affinity chromatography on a continuous supermacroporous adsorbent, *Journal of Chromatography A*, 986, 275–290, **2003**.
- [97] Daniak, M.B., Kumar, A., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., Detachment of affinity-captured bioparticles by elastic deformation of a macroporous hydrogel, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(4), 849-854, **2006**.
- [98] Lozinsky, V., Plieva, F.M., Poly(vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization. 3. Overview of recent research and developments, *Enzyme and Microbial Technology*, 23, 227–242, **1998a**.
- [99] Plieva, F.M., Karlsson, M., Aguilar, M.R., Gomez, D., Mikhalovsky, S., Galaev, Y.I., Pore structure in supermacroporous polyacrylamide based cryogels, *Soft Matter*, 1, 303-309, **2005**.

- [100] Leontievsky, A.A., Myasoedova, N.M., Baskunov, B.P., Evans, C.S., Golovleva, L.A., Transformation of 2,4,6-trichlorophenol by the white rot fungi *Panus tigrinus* and *Coriolus versicolor*, *Biodegradation*, 11, 331–340, **2000**.
- [101] Ullah, M.A., Bedford, C.T., Evans, C.S., Reactions of pentachlorophenol with laccase from *Coriolus versicolor*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53, 230–234, **2000**.
- [102] Kim, S.I., Yamamoto, T., Endo, A., Ohmori, T., Nakaiwa, M., Adsorption of phenol and reactive dyes from aqueous solution on carbon cryogel microspheres with controlled porous structure, *Microporous and Mesoporous Materials*, 96, 191–196, **2006**.
- [103] Stanescu, M.D., Sanislav, A., Ivanov, R.V., Hirtopeanu, A., Lozinsky, V.I., Immobilized laccase on a new cryogel carrier and kinetics of two anthraquinone derivatives oxidation, *Applied Biochemistry Biotechnology*, 165, 1789–1798, **2011**.
- [104] Stanescu, M.D., Gavrilas, S., Ludwing, R., Haltrich, D., Lozinsky, V.I., Preparation of immobilized *Trametes pubescens* laccase on a cryogel-type polymeric carrier and application of the biocatalyst to apple juice phenolic compounds oxidation, *European Food Research and Technology*, 234(4), 655-662, **2012**.
- [105] Uygun, M., Preparation of Laccase Immobilized Cryogels and Usage for Decolorization, *Journal of Chemistry*, 1-7, **2013**.
- [106] Merle, G., Brunel, L., Tingry, S., Cretin, M., Rolland, M., Servat, K., Electrode biomaterials based on immobilized laccase, Application for enzymatic reduction of dioxygen, *Materials Science and Engineering C*, 28, 932–938, **2008**.
- [107] Montereali, M.R., Seta, L.D., Vastarella, W., Pilloton, R., A disposable laccase–tyrosinase based biosensor for amperometric detection of phenolic compounds in must and wine, *Journal of Molecular Catalysis B*, 64, 189–194, 2010.
- [108] Mohidem, N.A., Mat, H., The catalytic activity of laccase immobilized in sol–gel silica, *Journal of Applied Sciences*, 9(17), 3141–3145, **2009**.

- [109] Crestini, C., Perazzini, R., Saladino, R., Oxidative functionalisation of lignin by layer-by-layer immobilised laccases and laccase microcapsules, *Applied Catalysis A*, 372, 115–123, **2010**.
- [110] Portaccio, M., Martino, S.D., Maiuri, P., Durante, D., Luca P., Lepore, M., Biosensors for phenolic compounds: the catechol as a substrate model, *Journal of Molecular Catalysis B*, 41, 97-102, **2006**.
- [111] Qiu, H., Xu, C., Huang, X., Ding, Y., Qu, Y., Gao, P., Adsorption of laccase on the surface of nanoporous gold and the direct electron transfer between them, *Journal of Physical Chemistry C*, 112, 14781–14785, **2008**.
- [112] Diano, N., Grano, V., Fraconte, L., Caputo, P., Ricupito, A., Attanasio A., Non-isothermal bioreactors in enzymatic remediation of waters polluted by endocrine disruptors: BPA as a model of pollutant, *Applied Catalysis B*, 69, 252–261, **2007**.
- [113] Rotková, J., Šuláková, R., Korecká, L., Zdražilová, P., Jandová, M., Lenfeld, J., Laccase immobilized on magnetic carriers for biotechnology applications, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 321, 1335–1340, **2009**.
- [114] Plagemann, R., Jonas, L., Kragl, U., Ceramic honeycomb as support for covalent immobilization of laccase from *Trametes versicolor* and transformation of nuclear fast red, *Applied Microbiol Biotechnology*, 90, 313–320, **2011**.
- [115] Georgieva, S., Godjevargova, T., Mita, D.G., Diano, N., Menale, C., Nicolucci, C., Nonisothermal bioremediation of waters polluted by phenol and some of its derivatives by laccase covalently immobilized on polypropylene membranes, *Journal of Molecular Catalysis*, 66, 210–218, **2010**.
- [116] Cabana, H., Ahamed, A., Leduc, R., Conjugation of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor* to chitosan and its utilization for the elimination of triclosan, *Bioresource Technology*, 102, 1656–1662, **2011**.
- [117] Matijošyte, I., Arends, I.W.C.E., Vries, S., Sheldon, R.A., Preparation and use of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of laccases, *Journal of Molecular Catalysis B*, 62, 142-148, **2010**.



- [118] Cancel, A.M., Orth, A.B., Tien, M., Lignin and Veratryl Alcohol are not Inducers of the Ligninolytic System of *Phanerochaete chrysosporium*, *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 2909-2913, **1993**.
- [119] Matilainen, K., Hamalainen, T., Savolainen, A., Sipilainen-Malm, T., Peltonen, J., Erho, T., Smolander, M., Performance and penetration of laccase and ABTS inks on various printing substrates, *Colloids and Surfaces B*, 90, 119–128, **2012**.
- [120] Whitaker, J.R., Enzyme Catalyzed Reactions: Experimental Factors that Affect Rates, *Handbook of Food Enzymology* (eds; Whitaker, J.R., Voragen, A.G.J. Wong D.W.S.), Marcel Dekker, New York, 31-65, **2003**.
- [121] Binz, T., Canevascini, G., Purification and Partial Characterization of the Extracellular Laccase From *Ophiostoma novo-ulmi*. *Current Microbiology*, 35, 278–281, **1997**.
- [122] Holker, U., Dohse, J., Hofer, M., Extracellular laccases in *ascomycetes Trichoderma atroviride* and *Trichoderma harzianum*, *Folia Microbiologica*, 47(4), 423–427, **2002**.
- [123] Robles, A., Lucas, R., Martinez-Canamero, M., Omar, N.B., Perez, R., Galvez, A., Characterisation of laccase activity produced by the *hyphomycete Chalara* (*syn. Thielaviopsis*) *paradoxa* CH 32, *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 516–522, **2002**.
- [124] Koroljova-Skorobogat'ko, O.V., Stepanova, E.V., Gavrilova, V.P., Morozova, O.V., Lubimova, N.V., Dzchafarova, A.N., Purification and characterization of the constitutive form of laccase from the *basidiomycete Coriolus hirsutus* and the effect of inducers on laccase synthesis, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 28, 47–54, **1998**.
- [125] Xu, F., Effect of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases, *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 924–928, **1997**.

# ÖZGEÇMİŞ

## Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Tuğba DOĞAN  
Doğum Yeri : Tekirdağ  
Medeni Hali : Bekar  
E-posta : [tugbadogan@hotmail.it](mailto:tugbadogan@hotmail.it)  
Adresi : Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Biyokimya ABD,  
06800, Beytepe, Ankara/TÜRKİYE

## Eğitim

Lise : Çorlu Ticaret Borsası Süper Lisesi, Tekirdağ (2001-2005)  
Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü (2005-2010)  
Y. Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü (2011-2014)

## Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce - İyi

## İş Deneyimi

2014 - ----- : Kimyager, Gümrük ve Ticaret Bakanlığı

## Deneyim Alanları

## Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

## Tezden Üretilmiş Yayınlar

## Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar