

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



**Lakkaz Enziminden Farklı Yüzey Yüklü Çiçek Şekli Hibrit Nano
Yapıların Sentezlenmesi, Karakterizasyonu, Anyonik ve Katyonik Azo
Boyalarının Gideriminde Kullanılması**

Proje No: FHD-2017-7156

Proje Türü: Hızlı Destek Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Doç. Dr. İsmail Öçsoy
Eczacılık Fakültesi/Analitik Kimya

Proje Araştırmacıları:

Lisans Öğrencisi: Didar Taşdemir
Lisans Öğrencisi: Çağla Çelik
Eczacılık Fakültesi

Ağustos 2017

KAYSERİ

TESEKKÜR

FHD-2017-7156 numaralı projemiz Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Projemize finansal desteklerinden dolayı Erciyes Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimine teşekkürü bir borç bilirim. Projenin çalışma süresince araştırmacı olarak önemli katkıları olan, Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Lisans Öğrencileri Didar Taşdemir ve Çağla Çelik'e teşekkür ederiz. Projemiz kapsamında hizmet alımı Erciyes Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (ERÜ-TAUM) laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
ABSTRACT	6
1. GİRİŞ	7
2.GENEL BİLGİLER	9
3.GEREÇ VE YÖNTEM	11
3.1. Titanyumdioksit/Gümüş (TiO_2/Ag), Titanyumdioksit/Çinko (TiO_2/Zn) ve Titanyumdioksit/Bakır (TiO_2/Cu) Bimetalik Nanopartiküllerin Sentezi	
3.2. Bimetalik Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	
4.BULGULAR	13
4.1. Bimetalik Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	17
6.KAYNAKLAR	18

ÖZET

Önerilen bu projede, çiçek benzeri şekillere sahip Lakkaz-Cu²⁺ hibrit nanoyapılar sentezlenerek onların farklı deneysel şartlardaki morfolojileri araştırılmıştır (pH ve sıcaklık gibi). Enzimatik aktivitenin artma mekanizmasının nasıl gerçekleştiği farklı pH ve sıcaklıkta açıklanmıştır. Bu yapıların seçilen bazı önemli endüstriyel boyaların (acid orange 7 (AO7) ve malachite green) gideriminde kullanılabilirlikleri araştırılmıştır. Basit bir yöntemle ve düşük bir maliyetle sentezlenen Lakkaz-Cu²⁺ hibrit nano yapıların yüksek katalitik aktivite ve kararlılığa sahip olması kullanılacak enzim miktarını azaltacaktır. Bu durum sentezlenecek Lakkaz-Cu²⁺ hibrit yapıların endüstriyel veya biyoteknolojik alanlarda daha geniş bir uygulama alanı bulmasını sağlayacaktır.

ABSTRACT

In this proposed project, the Laccase-Cu²⁺ hybrid nanostructures with flower-like shapes were synthesized to investigate their morphology in different experimental conditions (pH values and temperatures). How the mechanism of the increase of enzymatic activity in the different pH values and temperature) was explained. Dye removal property of these structures was investigated towards some selected industrial dyes (acid orange 7 (AO7) and malachite green) which are synthesized with a simple method and at a low cost, have high catalytic activity and stability, which reduced the amount of enzyme. This can allow the Laccase-Cu²⁺ hybrid structures to find a wider application area in industrial or biotechnological fields.

1. GİRİŞ

Bu projenin amacı; yeni bir enzim immobilizasyon yöntemi kullanılarak Lakkaz-Cu²⁺ hibrit nano yapıların sentezlenmesi, karakterize edilmesi ve bazı önemli endüstriyel boyaların (acid orange 7 (AO7) ve malachite green) kısa sürede verimli bir şekilde ve de az bir maliyet ile biyolojik olarak giderilmesi amacıyla kullanılabilirliğinin araştırılmasıdır. Lakkaz enzimi farklı formlarda hazırlanarak (farklı yüzeylere immobilize edilerek veya kültür ortamlarında direkt) boya giderimi amacı ile kullanılabilirliği daha önce üzerinde çalışılmış bir konudur.

Dr. Zare ve ark katalize ürünler sayesinde toksik ve tehlikeli bazı maddelerin (örn ;fenol) tayinleri üzerinde çiçek şekilli Lakkaz-Cu²⁺ hibrit nanoyapılar ile çalışmışlar ve bunların biyosensör, biyoanalitik cihazlar, biyoyakıt hücreleri ve endüstriyel biyokataliz gibi alanlarda önemli uygulamalara sahip olabileceğini rapor etmişlerdir (30). Bir başka çalışma Zhang ve ark tarafından yapılmıştır ve doğal lakkazın (Lac) üzerine polietilenimin (PEI) yerleştirerek bunu takiben glutaraldehitte çapraz bağlamışlar ve yeni bir biyokatalizör (LacPG) imal etmişlerdir. Elde edilen LacPG'nin stabilitesi oldukça yüksek çıkmıştır ve pH-sıcaklık değişimlerine karşı daha dayanıklı olduğu görülmüştür. Anyonik bir boya olan Acid Orange 7 (AO7) içeren suyun renksizleştirilmesi için yapılan deneylerde; LacPG'nin renk giderme oranının Lac'inkinden yaklaşık 3 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar, LacPG üzerindeki PEI kaplamasının AO7'deki bozunmayı hızlandırdığı ve LacPG'nin renk giderme verimliliğini artırdığı düşündürmektedir. Ancak katyonik bir boya olan Malachite green (MG) içeren suyun renksizleştirilmesi için yapılan çalışmalarda AO7 için elde edilen sonuçların aksine, Lac kullanılarak yapılanlara kıyasla LacPG kullanılarak yapılanlar yavaş yavaş renk giderme kinetiği ve daha düşük renk giderme verimi göstermiştir. Bu durumun nedeni ise şöyle açıklanmıştır; LacPG ,lakkaz enzimine göre boyut, moleküler ağırlık, zeta potansiyel , izoelektrik nokta (PI) gibi değişikliklere ek olarak PEI kaplamadan dolayı oldukça pozitif yüklü gruplara sahiptir. LacPG'nin yüzey kimyası değişikliği, anyonik substratın, anyonik azo boya içeren suyun renk giderme için elverişli olan gelişmiş elektrostatik çekim vasıtasıyla LacPG ile reaksiyona girmesine daha fazla fırsat tanımaktadır (27).

Yapılan bu çeşitli çalışmalardan farklı olarak önerilen proje kapsamında organik kısım olarak lakkaz enzimi -inorganik kısım olarak Cu²⁺ iyonu kullanılarak fosfat tamponu ortamında(PBS) çiçek benzeri Lakkaz-Cu²⁺ hibrit nano yapılar sentezlenecektir ve boya giderimi amacı ile kullanılabilirlikleri araştırılacaktır. Sentezlediğimiz enzim-hibrit

nanoyapıların serbest enzimlere göre gösterdiği yüksek aktivite ve kararlılıktan yararlanılacaktır. Ayrıca farklı pH'larla sentezlenecek olan hibrit nano yapıların hem anyonik hem de katyonik boya içeren sularda etkili olması beklenmektedir.

Çevresel su arıtımında boyaları ortadan kaldırmak muazzam bir mücadeledir. Boyar madde içeren bu atık suların herhangi bir alıcı ortama verilmeden önce uygun yöntemlerle mutlaka arıtılması gerekmektedir. Bütün atık suların arıtımı için uygun tek bir yöntem yoktur. Lakkaz enzimi kirleticileri benzersiz bir şekilde bozabilen, çevre dostu ve verimli bir biyokatalisttir. Bununla birlikte, kirleticilerin bozunmasında lakkaz kullanımı çevresel değişikliklere duyarlılığı ve zayıf yeniden kullanılabilirliği nedeniyle oldukça sınırlıdır. Proje kapsamında basit bir yöntemle Lakkaz-Cu²⁺ hibrit nanoyapılar sentezlenerek endüstriyel açıdan önemli bazı boyar maddelerin düşük maliyetli ve kısa sürede biyolojik olarak arıtılması amaçlanmaktadır. Bu bilgiler ışığında proje kapsamında;

- 1- Lakkaz enzimi ile Cu²⁺ metal iyonları kullanılarak fosfat tamponu(PBS) ortamında, enzimdeki amin grupları ile Cu²⁺ iyonları arasındaki koordinasyon sonucu çiçek şekilli hibrit nano yapılar sentezlenecektir.
- 2- pH, sıcaklık, enzim ve metal iyonları derişimi gibi parametrelerin sentezlenecek hibrit nano yapıların morfolojisi üzerine etkisi incelenecektir.
- 3- Farklı deneysel şartlarda sentezlenen Lakkaz-Cu²⁺ hibrit nano yapıların protein enkapsülasyon oranları hesaplanacaktır.
- 4- Farklı deneysel şartlarda sentezlenen farklı morfolojiye sahip Lakkaz-Cu²⁺ hibrit nano yapıların aktivite tayinleri yapılacak ve aktivite ölçümleri için en ideal pH ve sıcaklık değerleri belirlenecektir. Ayrıca K_M ve V_{max} gibi bazı kinetik değerleri hesaplanacaktır.
- 5- Lakkaz-Cu²⁺ hibrit nano yapıların morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve taramalı tünelleme mikroskobu (STM) ile karakterize edilecektir. Lakkaz-Cu²⁺ hibrit nano yapıların X-ışını kırınım (XRD) ile kristal yapıları ve FTIR ile kimyasal yapıları açığa kavuşturulurken, dinamik ışık saçılımı (DLS) ile etkin yarıçapları ve Zeta potansiyel ile yüzey yüklerin türü ve şiddeti ölçülecektir. Bradford yöntemi ile sentezlenen Lakkaz-Cu²⁺ hibrit nano yapıların enzim içeriği saptanacaktır.
- 6- En yüksek aktivite gösteren Lakkaz-Cu²⁺ hibrit nano yapının morfolojisi tespit edilerek, anyonik bir boya olan Acid Orange 7 (AO7) ve katyonik bir boya olan Malachite green (MG) 'in giderilmesinde kullanılacak ve ideal boya giderme şartları belirlenecektir. Ayrıca, Lakkaz-

Cu^{2+} hibrit nano yapının yüzey yüklerinin anyonik ve katyonik bir boyaları giderilme performansları incelenecektir.

2. GENEL BİLGİLER

Endüstriyel faaliyetlerin sonucu olarak çevreye verilen boyar maddeler, atık sulara tanımlanmış ilk kirleticilerdir. Su kirliliğinin en bariz göstergesi olan boyalardan bazıları çok düşük konsantrasyonlarda bile görülebilmektedir. Bu boyar maddeleri içeren atık sular herhangi bir doğal bir su ortamına karıştıkları zaman; suyun tadını, kokusunu, görüntüsünü bozabilir, gaz çözünürlüğü gibi pek çok özelliğini değiştirebilir. Bu durum sudaki dengeyi bozmakta ve canlılar için tehdit oluşturmaktadır. Bu ve benzeri nedenlerden dolayı endüstriyel atık suların çevredeki herhangi bir alıcı ortama verilmeden önce mutlaka en uygun yöntemler kullanılarak arıtılması, renginin giderilmesi ve daha sonra alıcı ortama verilmesi gerekmektedir.

Azo, trifenil metan ve ftalosiyenin gibi farklı kromofor grupların varlığı, boyar maddelerin yapısal çeşitliliğini sağlamaktadır. Çoğu sentetik boyar maddeler toksik, karsinojen ve genotoksik etkiler de göstermektedir. Mevcut atık su sistemleri ise, bu tip atıklardan inatçı boyar maddeleri ve diğer organik kalıntıları tamamen uzaklaştırmakta yetersiz kalmaktadırlar. Boyama atık sularının arıtılması için adsorpsiyon, koagülasyon, oksidasyon, filtrasyon ve iyonlaştırmacı radyasyon gibi kimyasal ve fiziksel yöntemler gerekmektedir. Bu yöntemlerin tümü farklı renksizleştirme yeteneğine, sermaye maliyetine ve operasyon hızına sahiptir. Bu yöntemler arasında koagülasyon ve adsorpsiyon yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bunlar büyük miktarlarda atığa yol açmaktadır. Bu nedenle biyolojik prosesler, düşük maliyet ve az çamur oluşturmaları nedeniyle giderek önem kazanmaktadır. Atık suların biyolojik arıtımında başlıca bakteriler, mantarlar ve algler kullanılmaktadır. Literatürde ki çalışmalarda boya gideriminde fungusların özellikle ligninolitik enzimlerin rol aldığı belirtilmiştir. Bu nedenle enzimatik yöntemler, boya giderimi uygulamalarında son yıllarda büyük ilgi görmektedir. Enzimatik yöntemlerin diğer yöntemlere göre pek çok üstünlüğü vardır. Örneğin; enzimlerin seçiciliği yüksektir, enzimler çevresel değişikliklere dayanıklıdır (geniş bir pH, sıcaklık ve tuzluluk aralığında çalışabilirler), enzimlerle yapılan çalışmaların kontrolü basittir ve seyreltik atıkları bile etkili bir şekilde giderebilirler. Ayrıca ticari olarak sağlanan enzimlerin büyük miktarlarda üretilmeleri, diğer metotlarla karşılaştırıldığında maliyeti daha da düşürebilir.

Ancak serbest enzimlerin yaşam süreleri kısa ve reaksiyon ortamından ayrılmalari ve tekrar kullanimlari zordur ve belli bir maliyet gerektirir. Pratikte özellikle endüstriyel biyokatalizörler olarak kullanilmalari için, enzimlerin etkinliklerinin, aktiviteilerinin, kararlılıklarının ve geri kazanimlarının arttırılması gerekmektedir. Bu amaçla enzim immobilizasyonu, enzim modifikasyonu ve protein mühendisliği gibi bazı yaklaşımlar geliştirilmektedir. Ancak immobilizasyon çalışmalarında, birkaç enzim hariç, immobilize (sabitleştirme) edilen enzimlerin serbest enzime göre kararlılıklarının artmış fakat aktiviteilerinin düşmüş olduğu gözlenmiştir. İmmobilize enzimlerin aktiviteilerinin düşmesinin başlıca sebepleri;

- immobilizasyon işleminde sırasında enzimi inaktif hale getiren çözücüler kullanılması
- sabitleşen enzimler için anlamlı bir kütle transferinin olmaması
- immobilizasyon sırasında protein ile destek malzeme arasında kimyasal bir reaksiyonun oluşması ve enzimin yapısal değişikliğe uğraması sayılabilir.

Bu durum biyokatalitik sistemlerin geniş bir uygulama alanına sahip olmasını engellemektedir. Dr.Zare ve arkadaşları tarafından yakın bir zaman önce, etkinliği arttırılmış yeni ve farklı bir immobilize enzim uygulaması önerilmiştir. Çalışmada hem organik (protein) hem de inorganik (Cu(II)fosfat) kısımlardan oluşan hibrit nano yapılar sentezlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada, lakkaz enzimi ile oluşturulan hibrit yapıların aktivitesinin serbest enzime göre 4.5/6.5 kat arttığı ve serbest enzim aktivitesinin %50 sini 10 gün sonra kaybederken aynı şartlarda lakkaz hibrit yapıların başlangıç aktiviteilerinin %95'ini 2 ay boyunca koruduğu belirtilmiştir. Diğer enzimler için de benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Atık sulardaki boyaların renk gideriminde yaygın olarak üzerinde çalışılan enzimler oksidoredüktaz enzimleridir. Ancak yapılan çalışmalar içinde enzim yerine enzim-hibrit nano yapıların boya giderimi amacı ile kullanılabilirliğinin henüz araştırılmadığı görülmüştür. Bu nedenle önerilen bu projede, çiçek benzeri şekillere sahip Lakkaz-Cu²⁺ hibrit nano yapılar sentezlenerek, farklı deneysel şartlarda morfolojileri araştırılacak, enzimatik aktivitenin artma mekanizmasının nasıl gerçekleştiği açıklanmaya çalışılacak ayrıca ideal pH-sıcaklık, pH stabilitesi, termal stabilite gibi bazı özellikleri ve K_M ve V_{max} gibi kinetik özellikleri seçilen substratlara (guaiakol, veratil alkol, 2,6 dimetoksi fenol gibi) karşı belirlenecek ve bu yapıların anyonik bir boya olan Acid Orange 7 (AO7) ve katyonik bir boya olan Malachite

green (MG) 'in giderilmesinde kullanılabilirlikleri araştırılacaktır. Çalışma sonuçları lakkaz enzimi ve LacPG ile yapılan çalışmalar ile karşılaştırılacaktır.

Sanayileşme, tarım ilaçları, hızlı nüfus artışı, kimyasal gübreler ve benzeri pek çok unsur çevre kirliliğine özellikle su kirliliğine neden olmaktadır. Sanayi kuruluşlarının çevre üzerine olumsuz etkisi sayılan diğer unsurlardan çok daha fazladır. Atık su oluşturan gıda, kâğıt ve selüloz, kömür madenleri, petrol, metal, kauçuk/plastik ve benzeri pek çok işletme arasında tekstil endüstrisi diğer sektörlerle göre oluşturduğu atık su durumu göz önüne alındığında çevreyi en çok kirleten endüstri olarak nitelendirilmektedir (1).

Dünya genelinde yılda 7.10^5 ton, yaklaşık 10.000 farklı ticari boya ve pigment üretilmektedir (2). Boyama işlemi sırasında boyanın yaklaşık %10-15'nin atık suya geçtiği rapor edilmiştir (3). Atık sularda tanımlanmış ilk kirleticiler; endüstriyel faaliyetler sonucu çevreye verilen boyar maddelerdir ve bu atık sular herhangi bir doğal bir su ortamına karıştıkları zaman; suların birçok önemli özelliğini değiştirirler. Bu da sudaki dengeyi bozmakta, fotosentez-solunum dengesini değiştirerek çözünmüş oksijen seviyesini azaltmakta ve aerobik organizmaları olumsuz yönde etkilemektedir (4). Üstelik bazı boyalar canlılar için toksik hatta karsinojeniktir. Bu etkenler göz önüne alındığında suların arıtılması sadece çevre kirliliğini önlemede değil insan ve diğer canlıların hayatını koruma noktasında büyük öneme sahiptir (5).

Atık suların renk giderimi için kullanılan tek bir yöntem yoktur. Atık suyun ve kirliliği oluşturan boyanın çeşidine göre kullanılacak yöntem değişmektedir (7). Bu yöntemler fiziksel, kimyasal ve biyolojik arıtma olmak üzere 3 kısımdır (6,7,8). Genellikle fiziksel ve kimyasal yöntemler daha çok kullanılmaktadır. Fakat bu yöntemler hem ekonomik değildir hem de fazla miktarda ki kirleri arıtmak için ideal değildir. Üstelik bazılarının uygulanması sırasında aşırı kimyasal kullanımının ikincil bir çevre kirliliğine neden olması, aşırı miktarda enerji tüketimi, farklı özelliklerdeki tüm atık sulara adapte edilememe gibi dezavantajları bu yöntemlerin uygulamasını kısıtlamaktadır (7,14). Bu dezavantajlardan dolayı biyolojik yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır çünkü biyolojik yöntemlerle yapılan arıtmanın çevreye daha duyarlı olduğu düşünülmektedir (4,10). Literatürde özellikle tekstil atık sularından boya gideriminde fungusların kullanımı ile ilgili pek çok çalışma bulunmaktadır (12,13,16,17).

Yapılan çalışmalara göre boya gideriminde fungusların özellikle ligninolitik enzimlerinin rol aldığı belirtilmiştir (11,12,15). Enzimatik yöntemlerin çeşitli üstünlükleri vardır (18). Bunlara; enzimlerle yapılan çalışmalarda prosesin kolay ve kontrolünün basit olması, enzimlerin geniş bir pH, sıcaklık ve tuzluluk aralığında çalışabilmesi, yüksek seçiciliğe sahip olmaları ve seyreltik atıkları bile etkili bir şekilde giderebilmeleri sayılabilir. Ayrıca enzimler çevreye zarar vermezler, toksik etki potansiyelleri düşüktür, suda yüksek çözünürlük gösterirler, substratlarla kompleks halinde katalitik aktiviteleri yüksektir, kendilerine has substratlarla kompleks oluşturmazlar ve girdikleri tepkimelerde istenmeyen ürün oluşturmazlar (19). Bu avantajların yansısı serbest enzimler dezavantaj ve sınırlamaları da beraberinde getirir. Örneğin; suda çözünmüş halde dayanıklı değildirler, pahalı biyoaktivatörlerdir, organik çözücü varlığında kolayca denatüre olurlar, sıcaklık artışı ve pH değerindeki değişimlere aşırı duyarlıdır, kullanılan enzimin yeniden kullanılması ve çözümden tekrardan elde edilmesi mümkün değildir. Serbest enzimlerin birçok araştırmaya konu olması ve hala da popüler bir araştırma konusu olması araştırmacıları bu dezavantajları tolere etmeye ve enzimleri farklı şekillerde kullanmaya yöneltmiştir.

Enzimlerin daha etkin bir şekilde kullanılması amacıyla geliştirilen tekniklerden bazıları immobilizasyon ve kimyasal modifikasyondur. Kimyasal modifikasyon yöntemi ile enzimin katalitik aktivasyonu kısmi artış gösterse de enzim stabilizasyonunda azalma görülmüştür. Bunun yanısıra pahalı olması, veriminin düşük olması, zaman alıcı ve uzmanlık gerektiren bir işlem olması gibi dezavantajları nedeniyle kimyasal modifikasyon yöntemine karşın enzim immobilizasyonu yöntemi yaygın olarak kullanılır (20). Enzimleri katı desteklerin yüzeyine ya da içerisine yerleştirirken kovalent, kovalent olmayan, kapsülleme ve çapraz bağlama gibi yollara gidilir. Örneğin; enzimler kovalent ve kovalent olmayan bağlarla organik ve inorganik nano malzemelerin üzerlerine yerleştirilirken; nano ve mikro gözenekli nano malzemeler içerisine; sol-gel malzemeler ve fosfolipid kökenli zarlar içerisinde tutulmuş ve bazı polimer zincirlerine ve matrislerine çapraz bağlanmıştır (21).

Enzim immobilizasyonlarında nano malzemelerin destek olarak kullanılmasının sebepleri, nano malzemelerin geniş yüzey alanına sahip olması ve enzimlerin kolayca yüzey alanına bağlanabilmesi, boyutun ve şeklin kolaylıkla kontrol edilebilir olması gibi örnekler verilebilir. Geniş yüzey alanına sahip nano malzemeler çok sayıda enzimin yüzeye bağlanmasına olanak vermiştir. Bu sayede enzimlerin yüksek katalitik aktivite ve kararlılık göstermeleri üzerine

çalışılmıştır. Ancak bir çalışma dışında, immobilize edilen enzimlerin kararlılığının ve çevresel şartlara direncinin artmasına rağmen katalitik aktivitesinin düştüğü görülmüştür. İmmobilize enzim aktivasyonunun arttığı nadir örneklerden biri olan Ackerman ve arkadaşlarının organofosfor hidrolaz enzimini karbonil, metil-ve aminopropil ile fonksiyonelleştirerek 30 nm boyutunda gözeneklere sahip olan mikro boyutlu silika parçacıkların içerisinde tutmak suretiyle serbest enzime göre %200 daha yüksek enzim aktivitesi gözlemişlerdir (22). Ancak immobilize enzimlerin katalitik aktivitelerinin düşük olması uygulamalarına sınırlama getirmektedir. Bu nedenle, geliştirilmiş enzimatik etkinliğe sahip enzimlerin hazırlanması için basit, verimli ve yeni bir yaklaşımın geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Son bir kaç yıldır, farklı bir enzim immobilizasyon yaklaşımı kullanılarak enzimlerin aktivitesinin ve kararlılığının yükseltilmesi hedeflenmektedir. Bu amaçla bazı protein (enzim) ve metal iyonlarının inkübasyonu ile çiçek şekilli hibrit yapıların sentezi literatürde rapor edilmiştir. Serbest enzimlere göre sentezlenen hibrit nano yapı formundaki enzimlerin aktivitesinin ve kararlılığının dikkat çekici ölçüde arttığı belirtilmiştir (23,24,25,26).

Çiçek benzeri şekillere sahip hibrit nano yapılar ilk defa Dr. Zare ve arkadaşları tarafından önerilmiştir. Zare ve arkadaşları, inorganik bileşen olarak Cu^{2+} iyonu ve organik bileşen olarak çeşitli protein ve enzimleri kullanarak nano yapraklardan oluşan çiçek benzeri şekillere sahip protein-inorganik hibrit yapıların oluşum yöntemini rapor etmişlerdir. Sentezlenen çiçek şekilli hibrit yapılar mikrometre (μm) boyutlarında olmasına rağmen, nano metre (nm) boyutlu yapraklardan oluşmaları ve enzimin nanometre boyutlarına hapsedilmesi nedeni ile “nanoflowers” olarak ilk defa bu grup tarafından adlandırılmıştır. Araştırmacılar bahsedilen çalışmalarında, geleneksel immobilizasyon teknikleri ile karşılaştırıldığında çiçek benzeri şekillere sahip enzim-inorganik hibrit yapıların kararlılığının ve aktivitesinin serbest enzimlere ve diğer immobilizasyon teknikleri uygulanan enzimlere göre dikkat çekici ölçüde arttığını göstermişlerdir (24).

Lakkaz çeşitli bitkiler ve fungus türleri tarafından salgılanan çok uçlu bir oksidoredüktazdır, fenolik kısımları ve amin bileşiklerini okside edebilir. Lakkazın oksidasyon aralığı, ABTS (2,2'-azinobis (3-etil-benzotiazolin 6 sulfonat)), HBT (1-hidroksibenzotriazol) ve doğal mediatörler gibi redoks mediatörleri ile kombinasyon yoluyla fenolik olmayan substratlara genişletilebilir. Lakkazın boyalar içeren atıklarda dahil olmak üzere atık su arıtımında kullanılması ilgi çekmektedir. Bununla birlikte, atık su arıtımında lakkazın doğrudan

kullanımı, cazip bir seçenek değildir, çünkü enzim pahalıdır ve yeniden kullanılabilirliği zayıftır, doğrudan çözünürlüğü yüksektir ve düşük kararlılığa sahiptir. Ayrıca çevresel koşullardaki (pH ve sıcaklık) ve uzun saklama süresindeki değişikliklerin, bu enzimi deaktif ettiği bilinmektedir. Pratik uygulamalarda lakkazı uygulamak için, kararlı ve tekrar kullanılabilir lakkaz türevleri hazırlanmalıdır. Lakkazın katı desteğin içine sabitlenmesi, mevcut en iyi hazırlanma stratejilerinden biridir. Beklendiği gibi, immobilizasyon lakkazın stabilitesini artırır. Lakkaz basit bir katı-sıvı ayırma veya manyetik ayırma kullanılarak kolaylıkla geri dönüştürülebilir. Ne yazık ki, substratların yüksek dağılma sınırları nedeniyle ve immobilizasyon sonrasında kullanılamayan fazla miktarda lakkaz nedeniyle ciddi bir enzimatik aktivite kaybı meydana gelir. Çözünür formdaki enzimlerin stabilizasyonu son zamanlarda katı konakçı tarafından enzimlerin stabilize edilmesine umut verici bir alternatif olarak geliştirilmiştir (27). Ancak bizim kullanacağımız teknik bu yöntemlerden çok daha üstündür. Bu çalışmada geleneksel immobilizasyon yöntemleri yerine yeni bir immobilizasyon tekniği kullanılarak Lakkaz-Cu²⁺ hibrit nanoyapılar sentezledik ve atık su arıtımında membran tekniklerinin yaygın olarak kullanılmasını göz önüne alarak, basit bir enzimatik membran reaktörü tasarlamayı düşündük. Elde edilen Lakkaz-Cu²⁺ ayrıştırılması ve geri dönüştürülmesi için bir ultrafiltrasyon uygulayarak anyonik ve katyonik azo boyalarının suda renk açma işleminde kullanılması araştırılacaktır.

Boyar maddeler; çözünürlük, kimyasal yapı, boyama özellikleri gibi çeşitli karakteristikleri göz önüne alınarak sınıflandırılır (28,29). Boyar maddeler üç grupta incelenebilir;

1. Katyonik boyar maddeler: Bazik boyar maddeler (örn: MG)
2. Anyonik boyar maddeler: Direkt, asit ve reaktif boyar maddeler (örn:AO7)
3. İyonik olmayan boyar maddeler: Dispers boyar maddeler

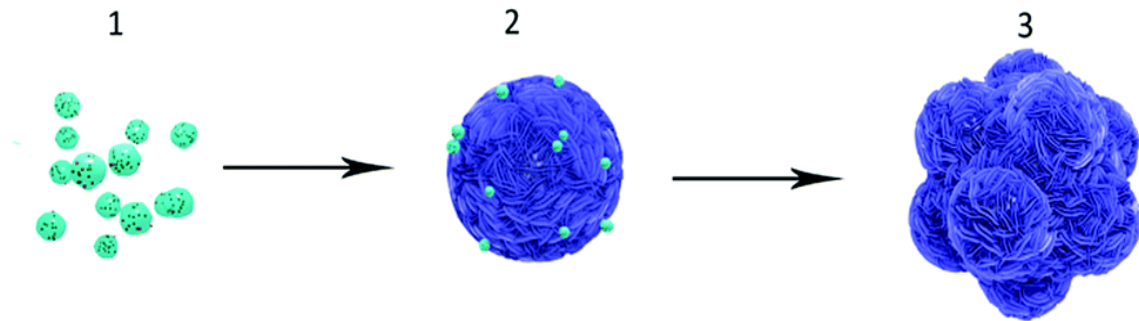
Yaptığımız ön deneylerde hazırlanan Lakkaz-Cu²⁺ hibrit nano çiçeklerin boya giderimi amacı ile etkili bir şekilde kullanılabileceği görülmüştür. Bu nedenle önerilen bu projede, çiçek benzeri şekillere sahip Lakkaz-Cu²⁺ hibrit yapılar sentezlenerek, farklı deneysel şartlarda morfolojileri araştırılacak, enzimatik aktivitelerinin artma mekanizmasının nasıl gerçekleştiği açıklanmaya çalışılacak ve bu yapıların anyonik bir boya olan Acid Orange 7 (AO7) ve katyonik bir boya olan Malachite green (MG) 'in giderilmesinde kullanılabilirlikleri araştırılacaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

1.Lakkaz-Cu²⁺ hibrit nano yapıların sentezi

Çalışmada enzim-inorganik hibrit nano yapıların sentezinde organik kısım olarak Lakkaz enzimi, inorganik kısım olarak (CuSO₄.5H₂O) kullanılacaktır. Belli konsantrasyonda suda çözünmüş CuSO₄ belli konsantrasyonda Lakkaz enzimi içeren 10 mM fosfat tamponlu tuz çözeltisine (pH 7.4) eklenir. Oluşan çözelti hızlıca vorteks edilir ve oda sıcaklığında 3 gün boyunca inkübe edilir. İnkübasyon sonrası, oluşan mavi renkli çökelek, çiçek şekilli hibrit yapıların oluştuğunu gösterir. Oluşan ürün santrifüj edilir ve elde edilen katı suda çözülür ve tekrar santrifüj edilir. Elde edilen mavi renkli çökelek etüvde kurutulur ve sonraki uygulamalar için saklanır.

Hibrit nano yapıların sentezi Şekil 1’ de gösterildiği gibi; ilk olarak bakır ve fosfat bir araya gelerek [Cu₃(PO₄)₂] nanokristalleri oluşur. Bu aşamada protein molekülleri çoğunlukla Cu(II) iyonları ile özellikle proteinin yapısındaki amin gruplarının koordinasyon bağı ile bağlanmasıyla agregatlar oluştururlar. Bakır fosfat nano kristallerinin çekirdeklenme alanlarının oluşmasını bu agregatlar sağlar. Sonrasında ise protein molekülleri ve primer kristaller iri topaklar meydana getirirler. Bakır fosfat kristallerinin kinetik olarak kontrolü, agregatların yüzeyindeki bakır bağlayıcı bölgelerden kaynaklanır bu sayede ayrı ayrı yapraklar oluşur. Nano boyuttaki bu yaprak şekilli yapılar bir araya gelerek birbirine bağlanırlar ve anizotropik büyüme ile çiçek benzeri şekillere sahip yapılar oluştururlar.



Şekil 1. Enzim-Cu²⁺ hibrit nano yapıların sırası ile 1 günlük, 2 günlük ve 3 günlük inkübasyonları sonucu morfolojileri yer almaktadır.

2.Lakkaz-Cu²⁺ hibrit nano yapıların protein içeriğinin belirlenmesi

Sentezlenecek enzim-inorganik hibrit yapıların protein içeriği Bradford (1976) metoduna göre belirlenecektir. Bu yöntemde boya olarak kullanılan Coomassie Brilliant Blue G-250, negatif bir yüke sahiptir ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Boyanın kırmızı ($\lambda_{\max}=465$ nm) ve mavi ($\lambda_{\max}=595$ nm) formu mevcuttur. Proteinin bağlanması, kırmızı formun mavi forma dönüşümünü sağlar. Bu yöntemin bozucu faktörlere karşı hassasiyeti oldukça azdır (1- 100 μ g arası). Reaksiyon yüksek oranda tekrarlanabilir ve hızlı cereyan eder, iki dakikada tamamlanır. Bradford yöntemi ile protein tayini şu şekilde gerçekleştirilecektir: 1 mL'sinde 1 mg protein ihtiva eden bovine serum albumin (BSA) çözeltisinden deney tüplerine belli miktarlarda konur ve saf su ile bütün tüplerin hacmi 0,1 mL'ye tamamlanır ve 4,9 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisi ilave edilerek vorteks ile karıştırılır. Daha sonra 595 nm'de 3 mL'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okunur. Kör olarak, 0,1 mL enzim numunesinin içinde bulunduğu tampondan ve 4,9 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisinden oluşan karışım kullanılır. Elde edilen sonuçlardan absorbans değerlerine karşılık gelen μ g protein değerleri standart grafik haline getirilir. Bu standart grafik kullanılarak protein miktarları belirlenir.

Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi (proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti): 100 mg coomassie brilliant blue G-250, 50 mL %95'lik etanolde çözülür, bu çözeltiye %95'lik 100 mL fosforik asit ilave edilerek çözeltinin hacmi saf su ile 1 L'ye tamamlanır. Hazırlanan çözelti karanlık ortamda muhafaza edilir.

3.Lakkaz-Cu²⁺ hibrit nano yapıların karakterizasyonu

Sentezlenecek olan Lakkaz-Cu²⁺ hibrit nano yapıların morfolojisi SEM ve STM ile karakterize edilecektir. EDX (Energy dispersive X-Ray; Enerji dağılımlı X-ışınları analizi) ölçümleri ile Cu²⁺ metalinin varlığı belirtilecektir. XRD (X-Ray Diffraction; X-ışını Kırınımı) ölçümleri ile Lakkaz-Cu²⁺ hibrit nano yapıların kristal yapıları aydınlatılacak, DLS (Dynamic Light Scattering) ölçümleri ile hibrit yapıların etkin yarıçapları ve Zeta potansiyel ile yüzey yüklerin türü ve şiddeti ölçülecektir.

4.Lakkaz-Cu²⁺ hibrit nano yapıların aktivitesinin ve kararlılığının test edilmesi

Sentezlenecek olan Lakkaz-Cu²⁺ hibrit nano yapıların katalitik aktivitesinin ve kararlılığının nasıl değişim gösterdiği sistematik olarak incelenecektir. Bu amaçla Lakkaz-Cu²⁺ hibrit nano yapıların ideal pH ve sıcaklık, pH stabilitesi, termal stabilitesi gibi bazı özellikleri ile çiçek

şekilli hibrit yapıların morfolojisini nasıl etkilediği açığa çıkarılacak ve böylece oluşum mekanizmasının açıklanması sağlanacaktır.

5.Lakkaz-Cu²⁺ hibrit nano yapıların bazı tekstil boyalarının giderimi amacıyla kullanılabilirliği

Enzimatik renk gideriminde optimum koşullarının belirlenmesi için; pH, başlangıç boya konsantrasyonu, enzim miktarı, inkübasyon süresi, sıcaklık gibi parametreler ile çalışılacaktır. Enzimatik dekolizasyon için kullanılacak Lakkaz-Cu²⁺ hibrit nano yapılar daha önce yapılan enzim aktivite çalışmalarının sonucunda elde edilen en iyi aktivite şartlarına sahip sentezlenmiş yapılar olacaktır. Sentezlenen bu hibrit nano yapıların seçilen bazı tekstil boyalarının gideriminde kullanılabilirliğinin belirlenmesi amacıyla seçilen her bir boyanın gideriminde Lakkaz-Cu²⁺ hibrit nano yapılar için optimum şartlar (optimum pH, optimum sıcaklık vb) belirlenecektir. Bu amaçla belirli derişimlerde boya çözeltileri hazırlanacak ve hazırlanan bu boya çözeltilerinin maximum absorpsiyon gösterdiği dalga boylarında başlangıç absorbans değerleri belirlenecektir. Daha sonra belirli şartlarda (pH, sıcaklık vb) serbest lakkaz enzimi ve Lakkaz-Cu²⁺ hibrit nano yapılarla belirli süreler inkübe edilecek ve belirli zaman aralıklarında Lakkaz-Cu²⁺ hibrit nano yapılar santrifüj edildikten sonra supernatant kısımlarının absorbans değerleri okunacaktır. Bu spektrofotometrik ölçümler sonrasında aşağıdaki eşitlik kullanılarak her bir boya için % Boya giderimi hesaplanacaktır.

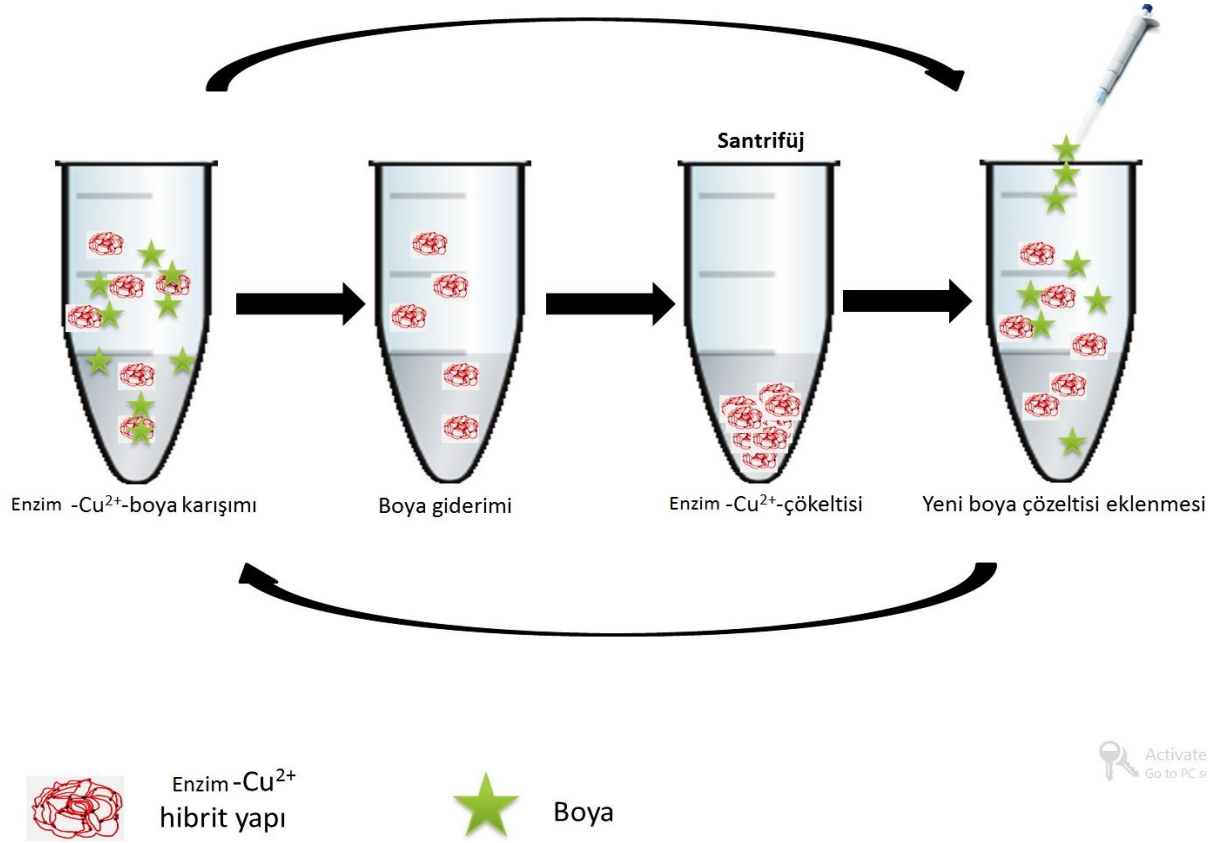
$$\% \text{ Boya giderimi} = (A_i - A_f) / A_i \times 100$$

Burada; A_i : belirli derişimde hazırlanan boyanın başlangıç absorbansı

A_f : belirli derişimde hazırlanan boyanın belirli bir süre enzimle inkübe edildikten sonraki absorbansı

Absorbans ölçümleri seçilen her bir boya için max absorpsiyon yaptığı spesifik dalga boyunda yapılacaktır. Önerilen proje kapsamında seçilen boyalar; anyonik bir boya olan Acid Orange 7 (AO7) ve katyonik bir boya olan Malachite green (MG) özellikleri farklı endüstriyel boyalardır.

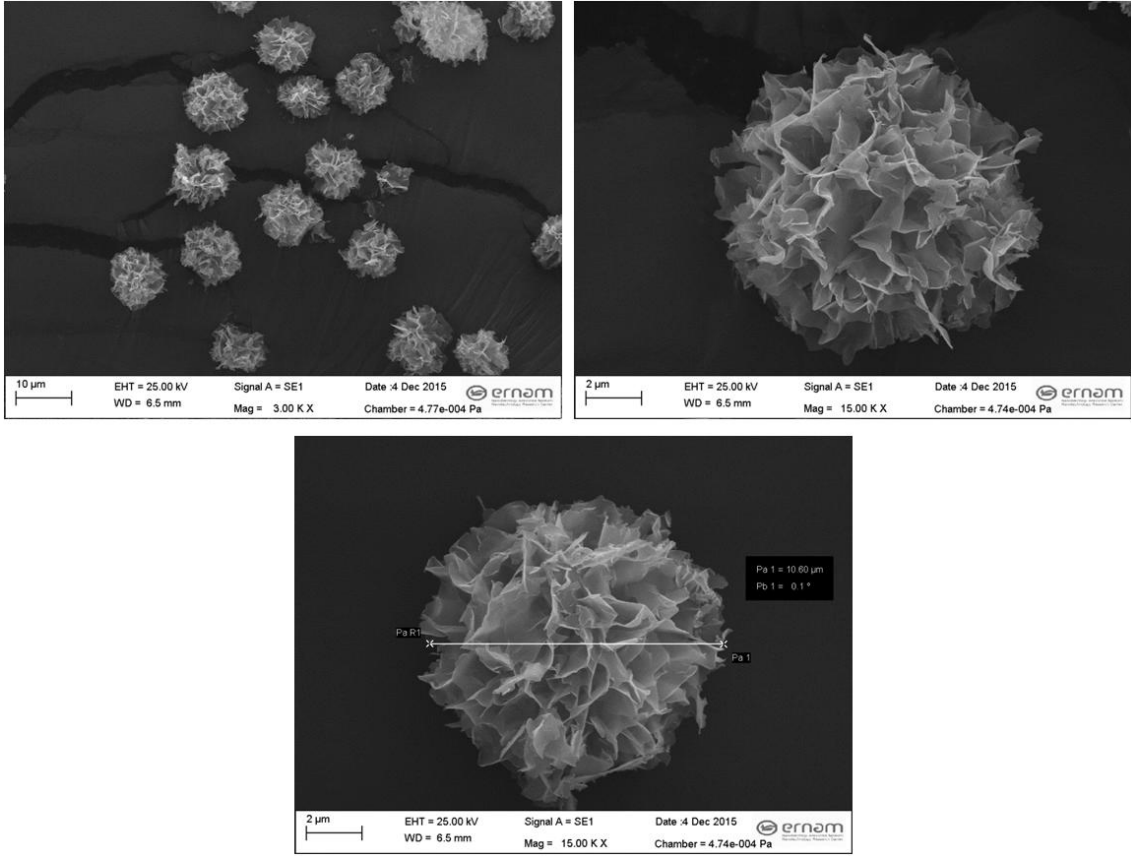
6. Lakkaz-Cu²⁺ hibrit yapıların boya gideriminde tekrar kullanılabilirliği



Şekil 3. Lakkaz-Cu²⁺ hibrit nano yapıların boya gideriminde tekrar kullanılabilirliği

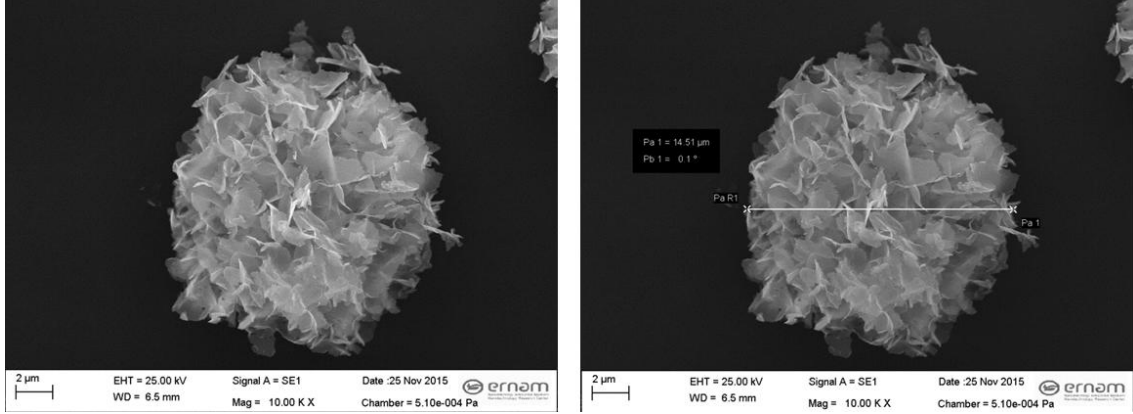
Lakkaz-Cu²⁺ hibrit nano yapıların boya gideriminde tekrar kullanılabilirliği Şekil 3’de gösterilmiştir. Her bir boya giderimi için % Boya giderim değeri hesaplanacak ve sentezlenen bu hibrit yapıların tekrar kullanılabilirliği test edilecektir.

4. BULGULAR



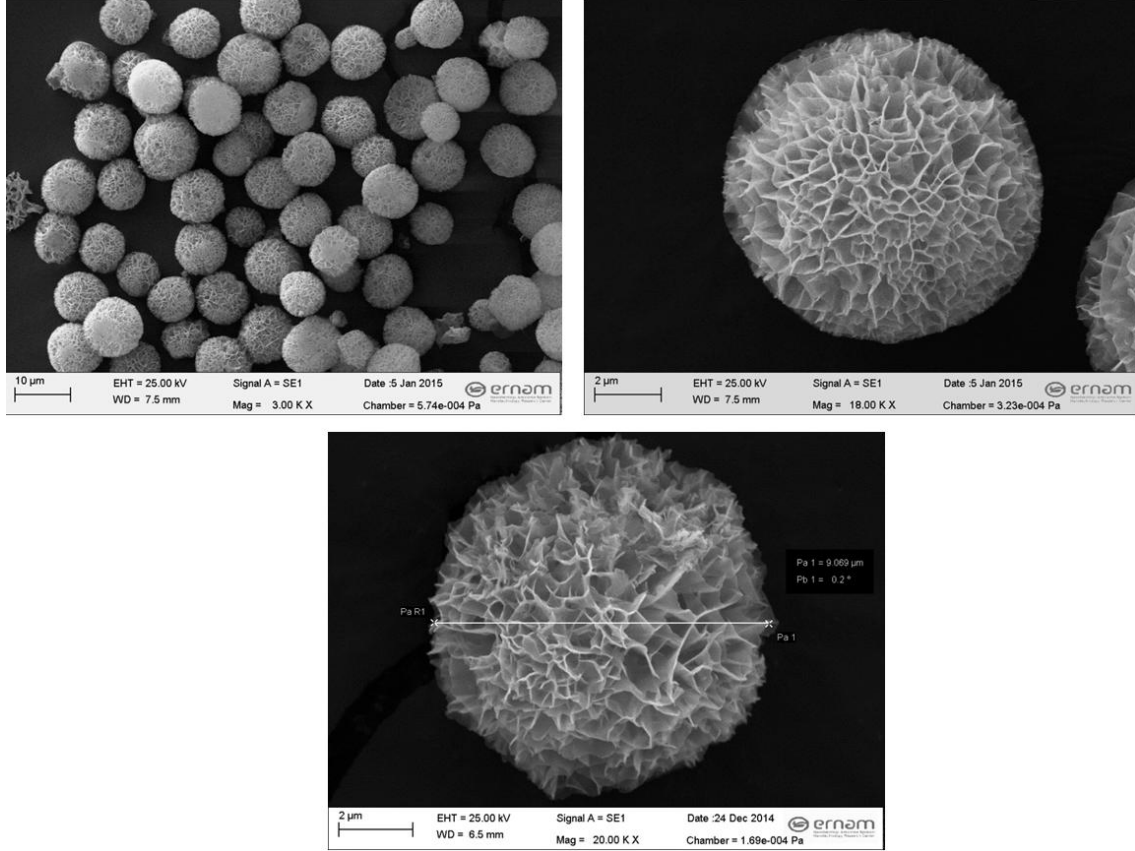
Şekil 1. Lakkaz-Cu²⁺ hibrit nano çiçeklerin SEM resimler (0.1 mg mL⁻¹ lakkaz kullanılarak PBS içerisine önce metal iyonu eklendiğinde).

Şekil 2 de ise 0.02 mg mL^{-1} lakkaz kullanılarak PBS içerisinde enzimden sonra metal iyonu Cu^{2+} eklendiğinde oda sıcaklığında elde edilen Lakkaz- Cu^{2+} hibrit nano çiçeklerin resimleri verilmektedir. Nano çiçekler $14 \mu\text{m}$ civarındadır.



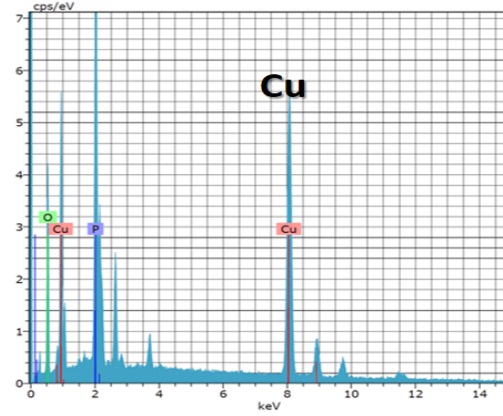
Şekil 2. Lakkaz- Cu^{2+} hibrit nano çiçeklerin SEM resimler (0.02 mg mL^{-1} lakkaz kullanılarak içerisinde enzimden sonra metal iyonu Cu^{2+} eklendiğinde).

Şekil 3 de ise 0.02 mg mL^{-1} lakkaz kullanılarak PBS içerisine enzimden sonra metal iyonu Cu^{2+} eklendiğinde $+4^\circ\text{C}$ elde edilen Lakkaz- Cu^{2+} hibrit nano çiçeklerin resimleri verilmektedir. Nano çiçekler oldukça düzenli olmakla beraber $9\mu\text{m}$ civarındadır. $+4^\circ\text{C}$ sentezlenen çiçek şekilli nano yapılar oda sıcaklığında sentezlenenlere göre çok daha düzenli, küresel ve kompakt olarak üretilmiştir.



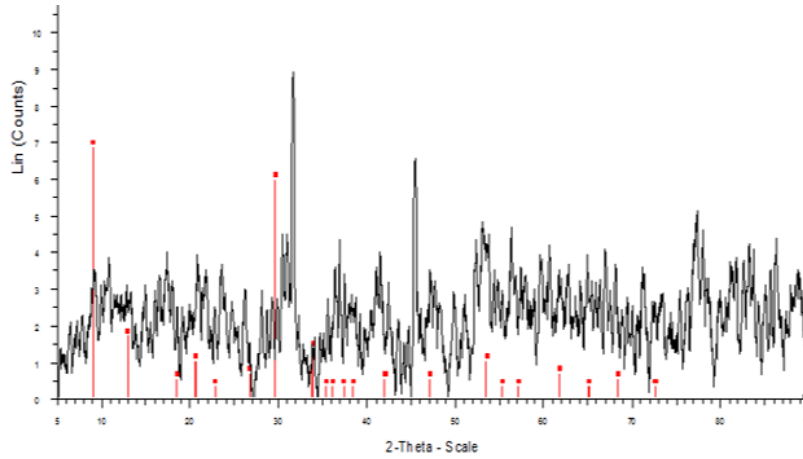
Şekil 3. Lakkaz- Cu^{2+} hibrit nano çiçeklerin SEM resimler (0.02 mg mL^{-1} lakkaz kullanılarak içerisine enzimden sonra metal iyonu Cu^{2+} eklendiğinde ve $+4^\circ\text{C}$ de).

Şekil 4’ de Cu metalinin lakkaz hibrit nano yapılarının varlığının kanıtlanması için Enerji yayımlı X-Işını Analizi (EDX) tekniği ile analizi yapılmıştır.



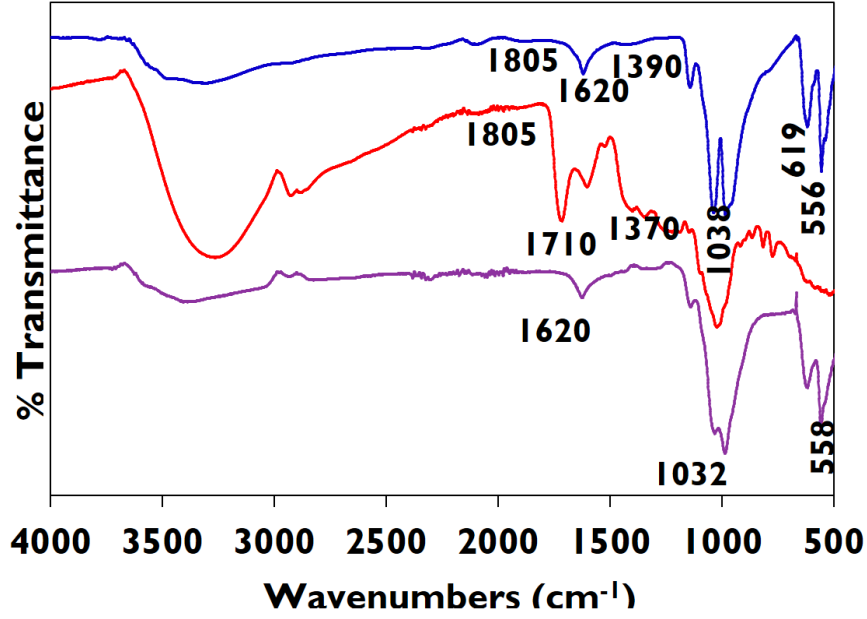
Şekil 4. Lakkaz-inorganik hibrit nano yapılarda Cu metalinin varlığı.

Şekil 5’te Lakkaz-inorganik hibrit nano yapıların kristal yapıları X-Işını Kırınım yöntemi (XRD) sonuçları gösterilmiştir.

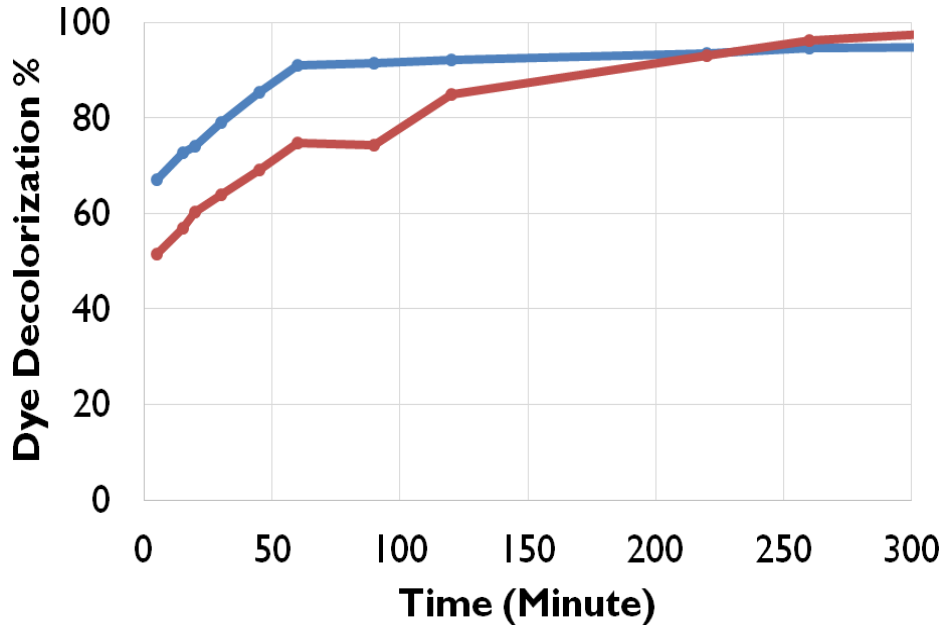


Şekil 5. Lakkaz-inorganik hibrit nano yapılarda kristal yapısı açıklanmıştır. XRD paternler: Enzim ÇHNY ve (siyah), Cu₃(PO₄)₂·3H₂O (JPSCD 00-022-0548) (kırmızı)

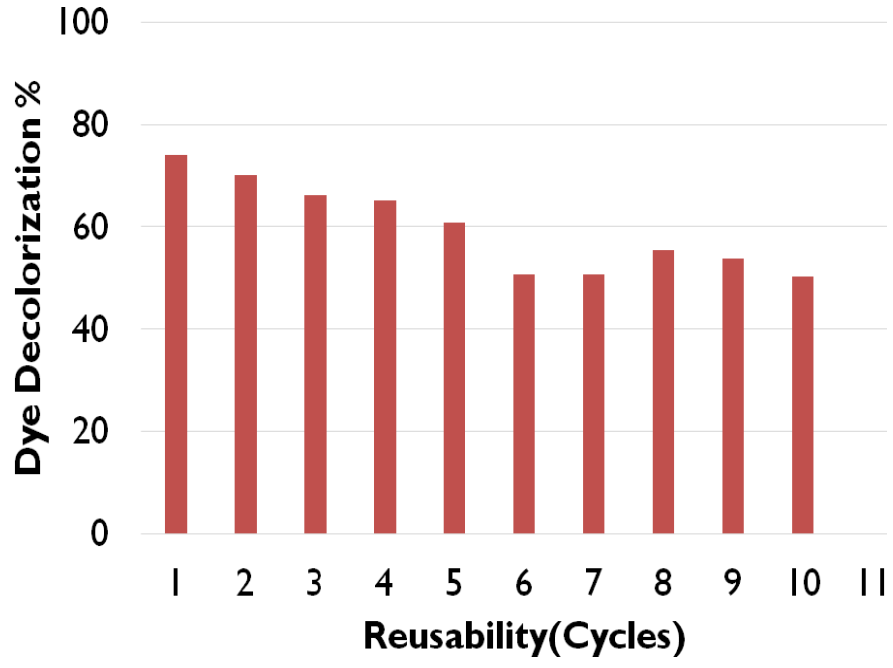
Şekil 6’te Lakkaz-inorganik hibrit nano yapıların oluşumu Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometre (FTIR) ile aydınlatılmıştır. 1032 cm^{-1} ve 618 ve 556 cm^{-1} PO_4 ’ün titreşimleri (mavi ve mor) ve 1805 ve 1390 cm^{-1} Enzim titreşimler (mavi ve kırmızı).



Şekil 6. Lakkaz-inorganik hibrit nano yapıların oluşumu Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometre (FTIR) ile aydınlatılmıştır.



Şekil 7. Lakkaz-inorganik hibrit nano yapıların boyaların (acid orange 7 (AO7) ve malachite green) gideriminde verimli bir şekilde kullanılmıştır. Anyonik bir boya olan Acid Orange7 (AO7) (kırmızı çizgi) ve katyonik bir boya olan Malachite green (MG) (mavi çizgi) ile gösterilmiştir.



Şekil 8. Lakkaz-inorganik hibrit nano yapıların tekrar kullanabilirliği katyonik bir boya olan Malachite green (MG) boyasına karşı kullanılmıştır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Enzimlerin serbest halde kullanımlarının başlıca dezavantajları sırasıyla

- ✓ *Pahalı*
- ✓ *Kısa ömürlü*
- ✓ *Hızlı bozunma*
- ✓ *Çoğu soğuk zincir ile taşınır*
- ✓ *Düşük aktivite ve kararlılık (geniş pH ve sıcaklık aralığında)*
- ✓ *Tekrar kullanılabilirlikten yoksun olması*

Olarak özetlene bilir. Yeni bir enzim immobilizasyon tekniği ile elde edilen enzim-metal iyonların reaksiyonları sayesinde çiçek benzeri şekillere (nanoflower) sahip hibrit yapıların sentezi ile serbest enzimlerin pek çok dezavantajları giderilmiştir. Örneğin, proje kapsamında üretilen lakkaz-inorganik hibrit nano yapılar ile yüksek katalitik aktivite ve stabilite elde edilmiştir. Ayrıca, enzimler tekrar kullanılabilirlik kazanmıştır.

Önerilen bu projede, lakkaz-inorganik hibrit nano yapılar morfolojileri ve yapıları SEM, EDX, XRD ve FTIR analizleri ile karakterize edilmiştir. Sentez sırasında bazı deneysel parametreler, Cu^{2+} iyonu ekleme zamanı, sıcaklık gibi, araştırılmış ve optimum koşullar tespit edilmiştir. Yüksek katalitik aktivite ve kararlılığa sahip çiçek şekilli lakkaz- Cu^{2+} hibrit yapıların boya gideriminde kullanılabilirliği seçilmiş azo boyalara karışı (anyonik bir boya olan Acid Orange7 (AO7) ve katyonik bir boya olan Malachite green (MG)) başarı ile test edilmiştir.

6. KAYNAKLAR

1. Dos Santos, A.B., Cervantes, F.J. ve Van Lier, J.B., 2007. Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: perspectives for anaerobic biotechnology. *Bioresource Technology* 98, 2369-2385.
2. Cristóvão, R. O., Tavares, A. P. M., Iraidy Brígida, A., Loureiro, J. M., Rui A. R. ve Coelho, M. A. Z. 2011. Immobilization of commercial laccase onto green coconut fiber by adsorption and its application for reactive textile dyes degradation, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 72, 6– 12.
3. Yousefi, V. ve Kariminia, H.R., 2010. Statistical analysis for enzymatic decolorization of Acid Orange 7 by *Coprinus cinereus* peroxidase. *International Biodeterioration and Biodegradation* 64, 245-252.
4. Kocaer, F.O. ve Alkan, U. 2002. Boyarmadde içeren tekstil atık sularının arıtım alternatifleri. *Uludağ Üniversitesi Mühendislik- Mimarlık Fakültesi Dergisi* 7(1), 47-55.
5. Hu, T. L. ve Wu, S. C. 2001. Assessment of the effect of dye RP2B on the growth of a nitrogen fixing cyanobacterium – *anabaena* sp. *Bioresource Technology*, 77: 93-95.
6. Si, J. Ve Cui, B.K. 2013. A new fungal peroxidase with alkaline-tolerant, chloride-enhancing activity and dye decolorization capacity, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 89, 6– 14.
7. Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R. ve Nigam, P. 2001. Remediation of dyes in textile effluents: A critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology* 77, 247-255.
8. Zeng, X., Cai, Y., Liao, X. ve Zeng, X., Luo, S. ve Zhang, D. 2012. Anthraquinone dye assisted the decolorization of azo dyes by a novel *Trametes trogii* laccase, *Process Biochemistry* 47, 160–163.
9. Abdel-Aty, A. M., Hamed, M. B., Fahmy, A. S. ve Mohamed, S. A. 2013. Comparison of the potential of *Ficus sycomorus* latex and horseradish peroxidases in the decolorization of synthetic and natural dyes, *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 11, 95–102.
10. Rai, H.S., Bhattacharyya, M.S. , Singh, J., Bansal, T.K. Vats, P. ve Banerjee, U.C.. 2005. Removal of dyes from the effluent of textile and dyestuff manufacturing industry: A review of emerging techniques with reference to biological treatment". *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 35: 219-238.

11. Rodriguez, C. S., Sanromán, M. A., Hofer, D. ve Gübitz, G. M. 2004. Production of laccase by *Trametes hirsuta* grown in an immersion bioreactor and its application in the decolorization of dyes from a leather factory. *Engineering in Life Science* 4(3), 233-238.
12. Rodriguez, E., Pickard, M.A. ve Vazquez- Duhalt, R. 1999. Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. *Curr. Microbiol.* 38, 27–32
13. Ünyayar, A., Mazmanci, M.A., Atacag, H., Erkurt, E.A. ve Coral, G. 2005. A Drimaren Blue X3LR dye decolorizing enzyme from *Funalia trogii* one step isolation and identification. *Enzyme Microbiology and Technology* 36, 10–16.
14. Stolz, A. 2001. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 56, 69-80.
15. Nyanhongo, G. S., Gomes, J., Guebitz, G. M., Zvaunya, R., Read, J. ve Steiner, W. 2002. Decolorization of textile dyes by laccases from a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Water Research* 36, 1449–1456.
16. Eichlerova, I., Homolka, L. ve Nerud, F. 2006. Ability of industrial dyes decolorization and ligninolytic enzymes production by different *Pleurotus* species with special attention on *Pleurotus calyptratus*, strain CCBAS 461, *Process Biochemistry* 41, 941–946.
17. Gou, M., Qu, Y., Zhou, J., Ma, F. ve Tan, L. 2009. Azo dye decolorization by a new fungal isolate, *Penicillium* sp. QQ and fungal-bacterial cocultures, *Journal of Hazardous Materials*, 170, 314–319.
18. Karam, J. ve Niceli, A. J., 1997. Potantial Applications of Enzymes in Waste Treatment, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 69:141-153.
19. P. Wang, Nanoscale biocatalyst systems, *Curr. Opin. Biotechnol.* 17 (2006) 574–579
20. Davis BG, Shang X, DeSantis G, Bott RR, Jones JB. The controlled introduction of multiple negative charge at single amino acid sites in subtilisin *Bacillus lentus*. *Bioorg Med Chem* 1999;7:2293–301.
21. W. Aehle, *Enzymes in Industry*, Wiley-VCH VerlagGmbH&Co. KGaA, Weinheim, 2004.
22. Lei, C., Shin, Y., Liu, J. & Ackerman, E. J. Entrapping enzyme in a functionalized nano porous support. *J. Am. Chem. Soc.*124, 11242–11243 (2002)
23. Zian, L., Yun, X., Yuqing, Y., Wenli, H., Wei, L. ve Huanghao, Y. 2014. Facile synthesis of enzyme-inorganic hybrid nanoflowers and its application as a colorimetric platform for visual detection of hydrogen peroxide and phenol, *ACS Applied Materials and Interfaces*, 6, 10775–10782

24. Ge, J., Lei, J. ve Zare, R. N., 2012. Protein–inorganic hybrid nanoflowers, *Nature Nanotechnology*, july, 428-432.
25. Somtürk, B., Hancer, M., Ocsoy, I. Ve Özdemir, N. 2015. Synthesis of Copper Ion Incorporated Horseradish Peroxidase-Based Hybrid Nanoflower for Enhanced Catalytic Activity and Stability, *Dalton Transactions*, , DOI: 10.1039/C5DT01250C.
26. Ocsoy, I., Dogru, Esra ve Usta, S., 2015. A new generation of flowerlike horseradish peroxides as a nanobiocatalyst for superior enzymatic activity, *Enzyme and Microbial Technology* 75–76 (2015) 25–29.
27. Xiaolin Zhang, Ming Hua, Lu Lv & Bingcai Pan . Ionic Polymer-Coated Laccase with High Activity and Enhanced Stability: Application in the Decolourisation of Water Containing AO7 (2015)
28. Selvam, K., Swaminathan, K. ve Chae, K. S. 2003. Decolorization of azo dyes and a dye industry effluent by a white rot fungus *Thelephora sp.* *Bioresource Technology* 88(2), 115–119.
29. Rauf, M. A ve Ashraf, S. S. 2012. Review, Survey of recent trends in biochemically assisted degradation of dyes. *Chemical Engineering Journal* 209, 520-530.
30. Lin Zhu, Lu Gong, Yifei Zhang, Rui Wang, Jun Ge, Zheng Liu, Richard N. Zare, *Chem.-J. Asian* . Rapid detection of phenol using a membrane containing laccase nanoflowers. 2013, 8, 2358– 2360
31. Somtürk, B., Kalın, R., Özdemir, N. 2014. “Purification of peroxidase from red cabbage (*Brassica oleracea var. capitata f. rubra*) by affinity chromatography”, *Applied Biochemistry Biotechnology*, 173, 1815–1828.