T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

Peroksidaz-Cu^{2+} Hibrit Nano Çiçeklerin Hazırlanması, Karakterizasyonu ve Bazı önemli Endüstriyel Boyaların Giderilmesi Amacı ile Kullanılabilirliğinin Araştırılması

Proje No: FBA-2015-6115

Normal Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Yrd. Doç. Dr. Nalan Özdemir
Fen Fakültesi Kimya Bölümü, Biyokimya ABD

Araştırmacıların Adı Soyadı
Yrd. Doç. Dr. İsmail Öçsoy
Dr. Cevahir Altınkaynak
Süreyya Tavlaşoğlu

Aralık 2016
KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Proje kapsamında yeni bir enzim immobilizasyon yöntemi kullanılarak peroksidaz enziminden hibrit nano çiçekler (HRP-Cu2+, LiP-Cu2+ ve MnP-Cu2+) hazırlanmış, morfolojileri karakterize edilmiş ve endüstriyel boyaların gideriminde kullanılmıştır. Proje kapsamında yapılan çalışmalarda maddi desteği ile yardımcı olan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Birimine teşekkürlerimi sunarım.

Proje Yürütücüsü:
Yrd. Doç. Dr. Nalan ÖZDEMİR

Aralık, 2016

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR 3
TABLOLAR DİZİNİ 7
ŞEKİLLER DİZİNİ 8
ÖZET 12
ABSTRACT 13
1 GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM 14
2 GENEL BİLGİLER 17
3 GEREÇ VE YÖNTEM 23
3.1 Çiçek şekilli hibrit nano yapıların sentezi 23
3.2 Bradford yöntemi ile protein tayini 23
3.3 Çiçek şekilli HRP-Cu^{2+} hibrit nano yapıların aktivitesinin ve kararlılığının test edilmesi 24
3.4 Çiçek şekilli LiP-Cu^{2+} hibrit nano yapıların aktivitesinin ve kararlılığının test edilmesi 24
3.5 Çiçek şekilli MnP-Cu^{2+} hibrit nano yapıların aktivitesinin ve kararlılığının test edilmesi 25
3.6 Çiçek şekilli hibrit nano yapıların karakterizasyonları 25
3.7 Çiçek şekilli hibrit nano yapıların boya giderimi amacıyla kullanılabilirliği 26
3.8 Çiçek şekilli hibrit nano yapıların boya giderimi amacıyla tekrar kullanılabilirliğinin tespiti 26
4 BULGULAR 27
1.1 Çiçek şekilli hibrit nano yapıların sentezi 27
4.1.1 Sentez pH' sının ve sıcaklığının hibrit nano yapıların oluşumu üzerine etkisi .. 28
4.1.2 Enzim derişiminin hibrit nano yapıların oluşumu üzerine etkisi 32
4.1.3 Cu^{2+} iyon derişiminin hibrit nano yapıların oluşumu üzerine etkisi 33
4.2 Çiçek şekilli hibrit nano yapıların enkapsülasyon veriminin belirlenmesi 34
4.3 Çiçek şekilli hibrit nano yapıların karakterizasyonları 35
4.4 Enzim Aktivite Ölçümleri 39
4.6.1 HRP-Cu^{2+} hibrit nano yapıların ve serbest HRP enziminin aktivite ölçümleri .. 39
4.6.2 LiP-Cu^{2+} hibrit nano yapıların ve serbest LiP enziminin aktivite ölçümleri 39
4.6.3 MnP-Cu^{2+} hibrit nano yapıların ve serbest MnP enziminin aktivite ölçümleri .. 40

4.7 Çiçek şekilli hibrit nano yapıların boya gideriminde kullanılabilirliği 41
4.7.1 Chicago sky blue (CSB) giderimi 41
4.7.2 Evans blue (EB) giderimi 48
4.7.3 Malachite green (MG) giderimi 54
4.8 Çiçek şekilli hibrit nano yapıların boya gideriminde tekrar kullanılabilirliği 60
5 TARTIŞMA VE SONUÇ 62
6 KAYNAKLAR 65
7 EKLER 71

KISALTMALAR

HRP	Yaban turpu peroksidaz (horse radish peroxidase)
LiP	Lignin peroksidaz (lignin peroxidase)
MnP	Mangan peroksidaz (manganese peroxidase)
HRP-Cu^{2+}	Çiçek şekilli HRP-Cu^{2+} hibrit nano yapı
LiP-Cu^{2+}	Çiçek şekilli LiP-Cu^{2+} hibrit nano yapı
MnP-Cu^{2+}	Çiçek şekilli MnP-Cu^{2+} hibrit nano yapı
EDX	Energy Dispersive X-Ray
XRD	X-Ray Diffraction
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
SEM	Scanning Electron Microscopy
CSB	Chicago sky blue
EB	Evans blue
MG	Malachite green
PBS	Fosfat tampon

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 4.1 Optimum koşullarda sentezlenen hibrit nano yapıların enkapsülasyon oranları..... 34

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Atık su arıtma yöntemlerinin sınıflandırılması (Saratale vd., 2011)..... 18
Şekil 3.1 Hibrit nano yapıların tekrar kullanılabilirliği şematize edilmiştir..... 26
Şekil 4.1 Çiçek benzeri hibrit nano yapının oluşum mekanizması, Sarı renkli bakır iyonları enzimdeki amin gruplarına bağlanmaktadır. (Somturk vd., 2015)..... 27
Şekil 4.2 Hibrit nano yapı oluşum mekanizması..... 28
Şekil 4.3 Sentez pH' sının ve sıcaklığının HRP-Cu^{2+} hibrit yapıların oluşumu üzerine etkisi; Sıcaklık: +4°C; A) pH:6, C) pH:7, E) pH: 8, G) pH:9, I) pH:10, Sıcaklık: RT; B) pH:6, D) pH:7, F) pH: 8, H) pH:9, J) pH:10 ([HRP]=0,02 mg/mL, [Cu^{2+}] = 0,8 mM, Zaman:3 gün.).. 29
Şekil 4.4 Sentez pH' sının ve sıcaklığının LiP-Cu^{2+} hibrit yapıların oluşumu üzerine etkisi; Sıcaklık: +4°C; A) pH:5, C) pH:6, E) pH: 7, G) pH:8, I) pH:9 K) pH:10, Sıcaklık: RT; B) pH:5, D) pH:6, F) pH: 7, H) pH:8, J) pH:9 L) pH:10 ([LiP]=0,02 mg/mL, [Cu^{2+}] =0,8mM, Zaman:3 gün.) 30
Şekil 4.5 Sentez pH' sının ve sıcaklığının MnP-Cu^{2+} hibrit yapıların oluşumu üzerine etkisi; Sıcaklık: +4°C; A) pH:5, C) pH:6, E) pH: 7, G) pH:8, I) pH:9 K) pH:10, Sıcaklık: RT; B) pH:5, D) pH:6, F) pH: 7, H) pH:8, J) pH:9 L) pH:10 ([MnP]=0,02 mg/mL, [Cu^{2+}]=0,8mM, Zaman:3 gün) 31
Şekil 4.6 Enzim derişiminin sentezlenen hibrit yapıların oluşumu üzerine etkisi [HRP]=A)0.01, B)0.02, C)0.05, D)0.5, E)1 mg/mL; [LiP]= F)0.01, G)0.02, H)0.05, I)0.5, J)1 mg/mL; [MnP]= K)0.01, L)0.02, M)0.05, N)0.5, O)1 mg/mL; pH:7, [Cu^{2+}]= 0,8 mM, Sıcaklık: +4°C, Zaman: 3 gün)..... 32
Şekil 4.7 Cu^{2+} konsantrasyonunun HRP-Cu^{2+} hibrit yapıların oluşumu üzerine etkisi; [Cu^{2+}] = (A) 0,8 mM (B) 8 mM (C) 80 mM Sıcaklık: +4°C, pH:7, [HRP]=0,02 mg/mL, Zaman: 3 gün 33
Şekil 4.8 Cu^{2+} konsantrasyonunun LiP-Cu^{2+} hibrit yapıların oluşumu üzerine etkisi; [Cu^{2+}] = (A) 0,8 mM (B) 8 mM (C) 80 mM Sıcaklık: +4°C, pH:7, [LiP]=0,02 mg/mL, Zaman: 3 gün 33
Şekil 4.9 Cu^{2+} konsantrasyonunun MnP-Cu^{2+} hibrit yapıların oluşumu üzerine etkisi; [Cu^{2+}] = (A) 0,8 mM (B) 8 mM (C) 80 mM Sıcaklık: +4°C, pH:7, [MnP]=0,02 mg/mL, Zaman: 3 gün 33
Şekil 4.10 Sentezlenen HRP-Cu^{2+} hibrit nano yapıların EDX spektrumu 35
Şekil 4.11 Sentezlenen HRP-Cu^{2+} hibrit yapıların XRD spektrumu. (JCPDS card no: 00-022-0548, $Cu_3(PO_4)_2 \cdot 3H_2O$ 35

Şekil 4.12 (A) Serbest HRP ve (B) HRP-Cu^{2+} hibrit yapının FTIR spektrumları 36
Şekil 4.13 Sentezlenen LiP-Cu^{2+} hibrit nano yapıların EDX spektrumu 36
Şekil 4.14 Sentezlenen LiP-Cu^{2+} hibrit yapıların XRD spektrumu. (JCPDS card no: 00-022-0548, $Cu_3(PO_4)_2 \cdot 3H_2O$ 37
Şekil 4.15 (A) Serbest LiP ve (B) LiP-Cu^{2+} hibrit yapıların FTIR spektrumları 37
Şekil 4.16 Sentezlenen MnP-Cu^{2+} hibrit nano yapıların EDX spektrumu 38
Şekil 4.17 Sentezlenen MnP-Cu^{2+} hibrit yapıların XRD spektrumu. (JCPDS card no: 00-022-0548, $Cu_3(PO_4)_2 \cdot 3H_2O$ 38
Şekil 4.18 (A) Serbest MnP ve (B) MnP-Cu2+ hibrit yapının FTIR spektrumları 39
Şekil 4.19 Sentezlenen HRP ve HRP-Cu^{2+} hibrit yapının aktivite karşılaştırması 39
Şekil 4.20 Sentezlenen LiP ve LiP-Cu^{2+} hibrit yapının aktivite karşılaştırması 40
Şekil 4.21 Sentezlenen MnP ve MnP-Cu^{2+} hibrit yapının aktivite karşılaştırması 40
Şekil 4.22 Boya giderimi için kullanılan boyalar 41
Şekil 4.23 HRP-Cu^{2+} hibrit nano yapı kullanılarak yapılan CSB giderimine ortam pH'ının etkisi ([HRP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [CSB]=0.066 mg mL-1, λ=618 nm, 130. dakika, 25°C) 42
Şekil 4.24 HRP-Cu^{2+} kullanılarak yapılan CSB giderimine ortam sıcaklığının etkisi ([HRP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [CSB]=0.066 mg mL-1, λ=618 nm, 130.dakika, PBS pH 5) 43
Şekil 4.25 Optimum koşullarda HRP-Cu^{2+} kullanılarak yapılan CSB giderimi ([HRP-Cu^{2+}] = 1 mg mL-1, [HRP] = 0,1 mg mL-1, [CSB]=0.066 mg mL-1, λ=618 nm, T=25°C, PBS pH 5) 44
Şekil 4.26 LiP-Cu^{2+} hibrit nano yapı kullanılarak yapılan CSB giderimine ortam pH'ının etkisi ([LiP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [CSB]=0.066 mg mL-1, λ=618 nm, 130.dakika, 25°C) 44
Şekil 4.27 LiP-Cu^{2+} kullanılarak yapılan CSB giderimine ortam sıcaklığının etkisi ([LiP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [CSB]=0.066 mg mL-1, λ=618 nm, 130.dakika, PBS pH 5) 45
Şekil 4.28 Optimum koşullarda LiP-Cu^{2+} kullanılarak yapılan CSB giderimi ([LiP-Cu^{2+}] = 1 mg mL-1, [LiP] = 0,1 mg mL-1, [CSB]=0.066 mg mL-1, λ=618 nm, T=25°C, PBS pH 5) ... 46
Şekil 4.29 MnP-Cu^{2+} hibrit nano yapı kullanılarak yapılan CSB giderimine ortam pH'ının etkisi ([MnP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [CSB]=0.066 mg mL-1, λ=618 nm, 130.dakika, 25°C) 46
Şekil 4.30 MnP-Cu^{2+} kullanılarak yapılan CSB giderimine ortam sıcaklığının etkisi ([MnP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [CSB]=0.066 mg mL-1, λ=618 nm, 130.dakika, PBS pH 4) 47
Şekil 4.31 Optimum koşullarda MnP-Cu^{2+} kullanılarak yapılan CSB giderimi ([MnP-Cu^{2+}] = 1 mg mL-1, [MnP] = 0,1 mg mL-1, [CSB]=0.066 mg mL-1, λ=618 nm, T=50°C, PBS pH 4) 47

Şekil 4.32 HRP-Cu^{2+} hibrit nano yapı kullanılarak yapılan EB giderimine ortam pH'ının etkisi ([HRP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [EB]=0.0333 mg mL-1, λ=611 nm, 130.dakika, 25°C) 48
Şekil 4.33 HRP-Cu^{2+} hibrit nano yapı kullanılarak yapılan EB giderimine ortam sıcaklığının etkisi ([HRP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [EB]=0.0333 mg mL-1, λ=611 nm, 130.dakika, PBS pH 4) 49
Şekil 4.34 Optimum koşullarda HRP-Cu^{2+} hibrit nano yapı kullanılarak yapılan EB giderimi ([HRP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [HRP] = 0,1 mg mL-1, [EB]=0.0333 mg mL-1, λ=611 nm, T=25°C, PBS pH 4)..... 50
Şekil 4.35 LiP-Cu^{2+} hibrit nano yapı kullanılarak yapılan EB giderimine ortam pH'ının etkisi (LiP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [EB]=0.0333 mg mL-1, λ=611 nm, 130.dakika, 25°C)..... 50
Şekil 4.36 LiP-Cu^{2+} hibrit nano yapı kullanılarak yapılan EB giderimine ortam sıcaklığının etkisi ([LiP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [EB]=0.0333 mg mL-1, λ=611 nm, PBS pH 9)..... 51
Şekil 4.37 Optimum koşullarda LiP-Cu^{2+} hibrit nano yapı kullanılarak yapılan EB giderimi ([LiP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [LiP] = 0,1 mg mL-1, [EB]=0.0333 mg mL-1, λ=611 nm, T=25°C, PBS pH 9)..... 52
Şekil 4.38 MnP-Cu^{2+} hibrit nano yapı kullanılarak yapılan EB giderimine ortam pH'ının etkisi (MnP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [EB]=0.0333 mg mL-1, λ=611 nm, 130.dakika, 25°C)..... 52
Şekil 4.39 MnP-Cu^{2+} hibrit nano yapı kullanılarak yapılan EB giderimine ortam sıcaklığının etkisi ([MnP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [EB]=0.0333 mg mL-1, λ=611 nm, PBS pH 4)..... 53
Şekil 4.40 Optimum koşullarda MnP-Cu^{2+} hibrit nano yapı kullanılarak yapılan EB giderimi ([MnP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [MnP] = 0,1 mg mL-1, [EB]=0.0333 mg mL-1, λ=611 nm, T=25°C, PBS pH 4)..... 54
Şekil 4.41 HRP-Cu^{2+} hibrit nano yapı kullanılarak yapılan MG giderimine ortam pH'ının etkisi (HRP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [MG]= 0.03 mg mL-1, λ=618 nm, 130.dakika, 25°C)..... 54
Şekil 4.42 HRP-Cu^{2+} hibrit nano yapı kullanılarak yapılan MG giderimine ortam sıcaklığının etkisi ([HRP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [MG]= 0.03 mg mL-1, λ=618 nm, PBS pH 8) 55
Şekil 4.43 Optimum koşullarda HRP-Cu^{2+} hibrit nano yapı kullanılarak yapılan MG giderimi ([HRP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [HRP] = 0,1 mg mL-1, [MG]=0.03 mg mL-1, λ=618 nm, T=60°C, PBS pH 8)..... 56
Şekil 4.44 LiP-Cu^{2+} hibrit nano yapı kullanılarak yapılan MG giderimine ortam pH'ının etkisi (LiP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [MG]= 0.03 mg mL-1, λ=618 nm, 130.dakika, 25°C)..... 56
Şekil 4.45 LiP-Cu^{2+} hibrit nano yapı kullanılarak yapılan MG giderimine ortam sıcaklığının etkisi ([LiP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [MG]= 0.03 mg mL-1, λ=618 nm, PBS pH 10) 57

Şekil 4.46 Optimum koşullarda LiP-Cu^{2+} hibrit nano yapı kullanılarak yapılan MG giderimi ([LiP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [LiP] = 0,1 mg mL-1, [MG]=0.03 mg mL-1, λ=618 nm, T=60°C, PBS pH 10)..... 58
Şekil 4.47 MnP-Cu^{2+} hibrit nano yapı kullanılarak yapılan MG giderimine ortam pH'ının etkisi (MnP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [MG]= 0.03 mg mL-1, λ=618 nm, 130.dakika, 25°C)..... 58
Şekil 4.48 MnP-Cu^{2+} hibrit nano yapı kullanılarak yapılan MG giderimine ortam sıcaklığının etkisi ([MnP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [MG]= 0.03 mg mL-1, λ=618 nm, PBS pH 10) 59
Şekil 4.49 Optimum koşullarda MnP-Cu^{2+} hibrit nano yapı kullanılarak yapılan MG giderimi ([MnP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [MnP] = 0,1 mg mL-1, [MG]=0.03 mg mL-1, λ=618 nm, T=60°C, PBS pH 10)..... 60
Şekil 4.50 Çiçek şekilli hibrit nano yapıların CSB gideriminde tekrar kullanılabilirliği..... 60
Şekil 4.51 Çiçek şekilli hibrit nano yapıların EB gideriminde tekrar kullanılabilirliği 61
Şekil 4.52 Çiçek şekilli hibrit nano yapıların MG gideriminde tekrar kullanılabilirliği..... 61

ÖZET

Boyar madde içeren atıksuların renk giderimin de suyun ve kirliliğin çeşidine göre çok farklı fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler kullanılmaktadır. Biyolojik arıtma mikroorganizma ve enzimler yoluyla olmaktadır. Enzimlerin özellikle endüstriyel biyokatalizörler olarak pratikte kullanılabilmeleri etkinliklerinin, aktivitelerinin, kararlılıklarının ve geri kazanımlarının arttırılması gerekmektedir.

Son zamanlarda, farklı bir enzim immobilizasyon yaklaşımı kullanılarak enzimlerin aktivitesinin ve kararlılığının yükseltilmesi hedeflenmektedir. Bu amaçla bazı enzim ve metal iyonları kullanılarak çiçek şekilli hibrit yapıların sentezi literatürde rapor edilmiştir. Bu hibrit yapılardaki enzimlerin aktivitesinin ve kararlılığının serbest enzimlere göre dikkat çekici ölçüde arttığı gözlenmiştir.

Çalışmamızda, yeni bir enzim immobilizasyon yaklaşımı kullanılmış, böylelikle aktivitesi ve kararlılığı artırılmış çiçek benzeri görünüme sahip HRP, LiP ve MnP hibrit yapılar sentezlenmiş, karakterizasyonları yapılmış ve ilk defa tekstilde kullanılan çeşitli boyaların gideriminde kullanılmıştır. Hibrit yapı sentez aşamasında; sıcaklık, pH enzim ve metal derişimi gibi deneysel parametreler sistematik olarak irdelenmiştir. Optimum şartlarda sentezlenen hibrit nano yapılar oldukça homojen bir yapıya sahip olup, serbest enzimlerine göre yüksek aktivite göstermektedirler. Ayrıca, sentezlenen hibrit nano yapıların bazı boyaların giderimindeki optimum şartları sistematik olarak irdelenmiş ve son derece ekonomik bir biyokatalizör olarak peroksidaz içeren hibrit nano yapıların başarılı sonuçları rapor edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: HRP, LiP, MnP, hibrit yapılar, Cu^{2+}, enzimatik aktivite, morfoloji, nano çiçekler, boya giderimi

ABSTRACT

The method used is changed based on the type of waste water and pollution and for this purpose, many different physical and /or chemical methods have been used. Biological treatment is through microorganisms and enzymes. The activity, stability and reusability of enzymes should be increased in order to effectively use them as industrial biocatalysts in practice.

Recently, it is aimed that to increase the activity and stability of enzymes using a different enzyme immobilization approach. For this purpose, the synthesis of flower-like hybrid structures using some enzymes and metal ions has been reported in the literature. It was observed that the activity and stability of the enzymes in these hybrid structures were increased remarkably compared to the free enzymes.

In our study, a new enzyme immobilization approach was used, and flower-like HRP, LiP and MnP hybrid structures with enhanced activities and stabilities were synthesized, characterized and they were used for dye decolorization for the first time. In the synthesis step of hybrid structures; experimental parameters such as temperature, pH, enzyme and metal concentration were systematically investigated. The hybrid nano structures whic were synthesized under optimum conditions, have highly homogeneous structures and exhibit higher activities than the free enzymes. In addition, optimum conditions for the removal of some dyes using with the synthesized hybrid nano structures have been systematically investigated and the successful results of hybrid nano-structures containing peroxidase have been reported as highly economical biocatalyst.

Keywords: HRP, LiP, MnP**,** hybrid nanostructures, Cu^{2+}, enzymatic activity, morphology, nanoflower, removal of dye.

1 GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Sanayileşme, hızlı nüfus artışı, kimyasal gübreler, zirai mücadele ilaçları ve benzeri pek çok unsur çevre kirliliğine özellikle su kirliliğine neden olmaktadır. Sayılan bu faktörler arasında sanayi kuruluşlarının çevre üzerine olumsuz etkisi sayılan diğer unsurlardan çok daha fazladır. Atık su oluşturan tekstil, gıda, kâğıt ve selüloz, kimya, kömür madenleri, petrol, metal, sentetik kauçuk/plastik ve benzeri pek çok işletme arasında tekstil endüstrisi diğer sektörlere nazaran deşarj hacmi ve oluşturduğu atık su kompozisyonu göz önüne alındığında çevreyi en çok kirleten endüstri olarak nitelendirilmektedir. Boyalar su kirliliğinin en belirgin sinyalleridir ve bazı boyalar çok düşük derişimlerde (0.005 mg/L) bile görülebilmektedir. Endüstriyel faaliyetlerin sonucu olarak çevreye verilen boyar maddeler, atık sularda tanımlanmış ilk kirleticidir. Bu boyar maddeleri içeren atık sular herhangi bir doğal bir su ortamına karıştıkları zaman; suyun görünüm, ışık geçirgenliği, gaz çözünürlüğü gibi pek çok önemli özelliğini değiştirirler. Bu durum fotosentez-solunum dengesini bozarak, çözünmüş oksijen seviyesini azaltmakta, sudaki dengeyi bozmakta ve aerobik organizmaları olumsuz yönde etkilemektedirler. Ayrıca bazı boyalar veya bozulma ürünleri canlılar için toksik, mutajenik ve kanserojenik etki gösterebilmektedir. Bu gibi nedenlerden endüstriyel atık suların akarsu, deniz veya diğer herhangi bir alıcı ortama verilmeden önce mutlaka en uygun yöntemler kullanılarak arıtılması, renginin giderilmesi ve daha sonra alıcı ortama verilmesi gerekmektedir.

Atık suların renk giderimi amacı ile kullanılan tek bir yöntem yoktur. Atık suyun ve kirliliği oluşturan boyanın çeşidine göre kullanılacak yöntem değişir, atık suların arıtılması için başlıca fiziksel, kimyasal ve biyolojik arıtma olmak üzere üç başlık altında toplanabilecek birbirinden çok farklı yöntemler geliştirilmiştir. Atık sularda boyar madde giderimi amacı ile en çok kullanılan yöntemler fiziksel ve kimyasal yöntemlerdir. Ancak bu yöntemlerin pek çok dezavantajı (maliyetinin yüksek olması, bazılarının uygulanması sırasında aşırı kimyasal kullanımının ikincil bir çevre kirliliği problemine neden olması, aşırı miktarda enerji tüketimi vb) vardır. Bu nedenle özellikle büyük hacimli atık sulardaki boyar maddelerin etkili ve ekonomik bir şekilde giderilebilmesi için biyolojik yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Atık suların biyolojik arıtımında başlıca bakteriler, mantarlar ve algler kullanılmaktadır. Literatürde rapor edilen çalışmalarda boya gideriminde fungusların özellikle ligninolitik enzimlerinin rol aldığı belirtilmiştir. Bu nedenle fiziksel ve/veya kimyasal yöntemlere alternatif olarak enzimatik yöntemler, boya giderimi uygulamalarında son yıllarda büyük ilgi görmektedir. Enzimatik yöntemin klasik yöntemlere pek çok üstünlüğü vardır. Bunlar

arasında; enzimlerle yapılan çalışmalarda yöntemin 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 gibi avantajlar sayılabilir. Ayrıca ticari olarak sağlanan enzimlerin büyük miktarlarda üretilmeleri, maliyeti diğer metotlarla karşılaştırıldığında daha da düşürebilir.

Ancak enzimlerin serbest (çözünür) formları kısa bir yaşam süresine sahiptir ve serbest enzimin, reaksiyon ortamından ayrılması ve tekrar kullanılması konuları sıkıntılıdır. Serbest enzimlerin geri kazanımlarının mümkün olmaması bunların büyük ölçekli kullanımlarının göreceli olarak pahalı olmasına neden olur. Bu gibi dezavantajlar çözünür enzimlerden büyük ölçekli olarak yararlanılmasını engeller ve enzimlerin çok daha farklı alanda uygulamalarını sınırlamaktadır. Özellikle endüstriyel biyokatalizörler olarak enzimlerin pratikte kullanılabilmeleri için etkinliklerinin, aktivitelerinin, kararlılıklarının ve geri kazanımlarının arttırılması gerekmektedir. Bu amaçla enzim immobilizasyonu yoğun olarak çalışılmaktadır. Enzimlerin bir destek (sabit) materyal üzerine tutturularak hareketsizleştirilmesi "immobilizasyon" (sabitleştirme, hareketsizleştirme) şeklinde ifade edilmektedir. İmmobilizasyon, enzimlerin katı bir destek üzerine tutturulması ya da içerisine hapsedilmesi şeklinde gerçekleştirilebilir. İmmobilizasyon işlemi ile enzim kararlılığındaki artma enzimin ekonomik olarak sonraki pratik uygulamalarda kullanılmasını mümkün kılmaktadır. Ancak immobilizasyon çalışmalarında bazı nedenlerden dolayı immobilize edilen enzimlerin serbest enzime göre kararlılıklarının artmasına rağmen aktivitelerinin düştüğü görülmüştür. İmmobilize enzimlerde enzimatik aktivitenin düşmesi biyo katalitik sistemlerin uygulamalarını sınırlamaktadır. 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 (özellikle Cu^{2+}) inkübasyonu ile çiçek şekilli hibrit yapıların sentezi literatürde rapor edilmiştir. Rapor edilen bu çalışmalarda, çiçek şekilli hibrit nano yapılar şeklinde sentezlenen enzimlerin aktivitesinin ve kararlılığının serbest enzimlere göre dikkat çekici ölçüde arttığı belirtilmiştir.

Zare ve arkadaşları, inorganik bileşen olarak Cu^{2+} iyonu ve organik bileşen olarak çeşitli protein ve enzimleri (laktalbumin, lakkaz, karbonik anhidraz, lipaz ve BSA) kullanarak nano yapraklardan (nanopatels) oluşan çiçek benzeri (flower-like) şekillere sahip protein-inorganik hibrit yapıların oluşum yöntemini rapor etmişlerdir. İlk defa Zare ve arkadaşları tarafından

sentezlenen çiçek şekilli hibrit yapılar mikrometre (sentez koşullarına gore değişen) boyutlarında olmasına ragmen, nano metre boyutlu yapraklardan (nanopatels) oluşmaları nedeni ile “nanoflowers” olarak ilk defa yine bu grup tarafından adlandırılmıştır. Araştırmacılar inorganik bileşen olarak Cu^{2+} iyonu ve organik bileşen olarak çeşitli protein ve enzimleri kullanarak nano yapraklardan (nanopatels) oluşan çiçek benzeri (flower-like) şekillere sahip protein-inorganik hibrit yapıların diğer çalışmalar ile karşılaştırıldığında kararlılığının ve aktivitesinin serbest enzimlere ve diğer immobilizasyon teknikleri uygulanan enzimlere göre dikkat çekici ölçüde arttığını göstermişlerdir.

Atık sulardaki organik kirliliklerin oksidoreduktaz enzimler ile giderilmesi fikri 1980'lerin başında ortaya atılmıştır. Enzimler uygun koşullarda çok farklı yapılardaki kirlilik oluşturacak bileşikleri parçalayabilmektedirler ve atık sulardaki boyaların renk gideriminde yaygın olarak çalışılan enzimler oksidoredüktaz sınıfından peroksidaz enzimleridir. Yapılan literatür çalışmasında hibrit “nanoflower" olarak adlandırılan nano çiçeklerin boya giderimi amacı ile kullanılabilirliğinin henüz araştırılmadığı görülmüştür. Bu nedenle önerilen bu projede, çiçek benzeri şekillere sahip HRP-Cu^{2+}, LiP-Cu^{2+} ve MnP-Cu^{2+} hibrit yapılar sentezlenmiş, farklı deneysel şartlarda morfolojileri araştırılmış, seçilen substratlara karşı aktiviteleri tespit edilmiş ve bu yapıların bazı önemli endüstriyel boyalarının gideriminde kullanılabilirlikleri araştırılmıştır.

2 GENEL BİLGİLER

Sanayileşme, hızlı nüfus artışı, kimyasal gübreler, zirai mücadele ilaçları ve benzeri pek çok unsur çevre kirliliğine özellikle su kirliliğine neden olmaktadır. Sayılan bu faktörler arasında sanayi kuruluşlarının çevre üzerine olumsuz etkisi sayılan diğer unsurlardan çok daha fazladır. Atık su oluşturan gıda, kâğıt ve selüloz, kimya, kömür madenleri, petrol, metal, sentetik kauçuk/plastik ve benzeri pek çok işletme arasında tekstil endüstrisi diğer sektörlere nazaran deşarj hacmi ve oluşturduğu atık su kompozisyonu göz önüne alındığında çevreyi en çok kirleten endüstri olarak nitelendirilmektedir (Şen ve Demirer, 2003; Dos Santos vd., 2007).

Boyalar su kirliliğinin en belirgin sinyalleridir ve bazı boyalar çok düşük konsantrasyonlarda (0.005 mg/L) bile görülebilmektedir (O'Neill vd., 1999). Dünya çapında yılda 7.10^5 ton, yaklaşık 10.000 farklı ticari boya ve pigment üretilmektedir (Yousefi ve Kariminia, 2010; Tilli vd., 2011; Cristóvão vd., 2011). Boyama işlemi sırasında boyanın yaklaşık %10-15'nin atık suya geçtiği rapor edilmiştir (Gomez vd., 2007; Yousefi ve Kariminia, 2010). Endüstriyel faaliyetler sonucu çevreye verilen boyar maddeler, atık sularda tanımlanmış ilk kirleticidir ve bu boyar maddeleri içeren atık sular herhangi bir doğal bir su ortamına karıştıkları zaman; suyun görünüm, ışık geçirgenliği, gaz çözünürlüğü gibi pek çok önemli özelliğini değiştirirler. Bu durum fotosentez-solunum dengesini bozarak, çözünmüş oksijen seviyesini azaltmakta, sudaki dengeyi bozmakta ve aerobik organizmaları olumsuz yönde etkilemektedirler (Kocaer ve Alkan, 2002; Si ve Cui, 2013). Ayrıca bazı boyalar veya bozulma ürünleri canlılar için toksik, mutajenik ve kanserojenik etki gösterebilmektedir (Robinson vd., 2001; Hunger, 2003; Seesuriyachan vd., 2007; Tilli vd., 2011). Bu gibi nedenlerden dolayı atık suların akarsu, deniz veya diğer herhangi bir alıcı ortama verilmeden ön önce mutlaka en uygun yöntemler kullanılarak arıtılması, renginin giderilmesi ve daha sonra alıcı ortama verilmesi gerekmektedir (Banat vd., 1996; Hu ve Wu, 2001; Si ve Cui, 2013).

Atık suların renk giderimi amacı ile kullanılan kabul görmüş tek bir yöntem yoktur. Atık suyun ve kirliliği oluşturan boyanın çeşidine göre kullanılacak yöntem değişmektedir (Robinson vd., 2001). Bu nedenle atık su arıtımı amacı ile fiziksel, kimyasal ve biyolojik arıtma olmak üzere üç başlık altında toplanabilecek çok farklı yöntemler geliştirilmiştir. (Robinson vd., 2001; Saratale vd., 2011; Zeng vd., 2012; Si ve Cui, 2013). Şekil 1'de atık su arıtma yöntemleri verilmiştir.

Şekil 2.1 Atık su arıtma yöntemlerinin sınıflandırılması (Saratale vd., 2011)

Yukarıda verilen listede boyar madde giderimi amacı ile kullanılan yöntemler arasında fiziksel ve kimyasal yöntemler daha çok kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemlerin maliyeti oldukça yüksektir ve ortaya çıkan büyük miktardaki konsantre çamurun bertaraf edilmesi problemlere neden olmaktadır. Ayrıca bazılarının uygulanması sırasında aşırı kimyasal kullanımının ikincil bir çevre kirliliği problemine neden olması, aşırı miktarda enerji tüketimi, farklı özelliklerdeki tüm atık sulara adapte edilememe gibi dezavantajları bu yöntemlerin uygulamasını kısıtlamaktadır (Robinson vd., 2001; Stolz, 2001; Xianchun ve Ning, 2013; Abdel-Aty vd., 2013; Si ve Cui, 2013). Bu nedenle özellikle büyük hacimli atık sulardaki boyar maddelerin etkili ve ekonomik bir şekilde giderilebilmesi için biyolojik yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır çünkü atık suların biyolojik arıtımının çevreye en az zarar veren yöntem olduğu düşünülmektedir (Kocaer ve Alkan, 2002; Rai vd., 2005). Atık suların biyolojik arıtımında başlıca bakteriler, mantarlar ve algler kullanılmaktadır (Banat vd, 1996; Stolz vd., 2001; Kumar vd, 2006). Literatürde özellikle tekstil atık sularından boya giderimin de fungusların kullanımı ile ilgili pek çok çalışma bulunmaktadır (Rodríguez vd., 1999; Ünyayar vd., 2005; Eichlerova vd., 2006; Gou vd., 2009; Zeng vd., 2012). Rapor edilen çalışmalarda boya gideriminde fungusların özellikle ligninolitik enzimlerinin rol aldığı belirtilmiştir (Rodríguez vd., 1999; Nyanhongo vd., 2002; Rodríguez vd., 2004). Bu nedenle fiziksel ve/veya kimyasal yöntemlere alternatif olarak enzimatik yöntemler, boya giderimi uygulamalarında son yıllarda büyük ilgi görmektedir. Enzimatik yöntemin klasik yöntemlere alternatif olarak önerilmesinin pek çok sebepleri vardır (Karam ve Niceli, 1997). Bunlar arasında; 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 gibi avantajlar sayılabilir. Ayrıca ticari olarak sağlanan enzimlerin büyük miktarlarda üretilmeleri, maliyeti diğer metotlarla karşılaştırıldığında daha da düşürebilir.

Biyokatalizörler olarak enzimler, yüksek katalitik verimlilik ve yüksek seçicilik, düşük toksisite ve suda çözünme gibi eşsiz özellikleri ile kimyasal katalizörlere alternatif olup biyokimya, biyomedikal, ilaç, gıda, kimya, çeşitli endüstriyel uygulamalar gibi alanlarda oldukça yoğun şekilde kullanılmaktadır (Vasileva vd, 2009; Fritzen-Garcia vd, 2013). Bununla birlikte, enzimlerin serbest (çözünür) formları kısa bir yaşam süresine sahiptir. Ayrıca serbest enzimin, reaksiyon ortamından ayrılması ve tekrar kullanılması pek mümkün değildir. Serbest enzimlerin geri kazanımlarının zor olması bunların büyük ölçekli kullanımlarının göreceli olarak pahalı olmasına neden olur (Mohamed vd, 2013). Bunun gibi dezavantajlar çözünür enzimlerden büyük ölçekli olarak yararlanılmasını engeller ve enzimlerin çok daha farklı alanda uygulamalarını sınırlamaktadır (Kulshrestha ve Husain, 2006; Kim ve Grate, 2006).

Özellikle endüstriyel biyokatalizörler olarak enzimlerin pratikte kullanılabilmeleri için etkinliklerinin, aktivitelerinin, kararlılıklarının ve geri kazanımlarının arttırılması gerekmektedir. Bu amaçla enzim immobilizasyonu son yıllarda yoğun olarak çalışılmaktadır. Enzimlerin bir destek (sabit) materyal üzerine tutturularak "hareketsizleştirilmesi" "immobilizasyon" (sabitleştirme, hareketsizleştirme) şeklinde ifade edilmektedir. İmmobilizasyon, enzimlerin katı bir destek üzerine tutturulması ya da içerisine hapsedilmesi şeklinde gerçekleştirilebilir. Enzim immobilizasyonunda kovalent bağlama, çapraz bağlama, adsorpsiyon, tutuklama ve enkapsüle etme şeklinde beş farklı yaklaşım vardır (Sassolas vd., 2012). İmmobilizasyon işlemi ile enzim kararlılığındaki artma enzimin ekonomik olarak sonraki pratik uygulamalarda kullanılmasını mümkün kılmaktadır (Kim ve Grate, 2006). Ancak immobilizasyon çalışmalarında bazı nedenlerden dolayı immobilize edilen enzimlerin serbest enzime göre kararlılıklarının artmasına rağmen aktivitelerinin düştüğü görülmüştür (Wang vd., 2013; Netto vd., 2013). Bu nedenler arasında; immobilizasyon sırasında kullanılan çözücülerin enzimi denature etmesi, immobilize enzimler için kayda değer bir kütle transferinin olmaması, immobilizasyon sırasında protein ile destek malzeme arasında kimyasal bir reaksiyonun oluşması ve enzimin yapısal değişikliğe uğraması, gibi nedenler sayılabilir.

Yukarıda belirtilen nedenlerden dolayı immobilize enzimlerde enzimatik aktivitenin düşmesi biyo katalitik sistemlerin uygulamalarını sınırlamaktadır. 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 (özellikle Cu^{2+}) inkübasyonu ile çiçek şekilli hibrit yapıların sentezi literatürde rapor edilmiştir (Ge vd, 2012; Zian vd., 2014; Somtürk vd, 2015; Öçsoy vd., 2015). Rapor edilen bu çalışmalarda, sentezlenen hibrit nano çiçek formundaki enzimlerin aktivitesinin ve kararlılığının serbest enzimlere göre dikkat çekici ölçüde arttığı belirtilmiştir (Ge vd, 2012; Zian vd., 2014; Somtürk vd, 2015; Öçsoy vd., 2015). Çiçek benzeri şekillere sahip protein-inorganik hibrit yapılar ilk defa Stanford üniversitesinden Zare ve arkadaşları tarafından önerilmiştir (Ge vd., 2012). Zare ve arkadaşları, inorganik bileşen olarak Cu^{2+} iyonu ve organik bileşen olarak çeşitli protein ve enzimleri (laktalbumin, lakkaz, karbonik anhidraz, lipaz ve BSA) kullanarak nano yapraklardan (nanopatels) oluşan çiçek benzeri (flower-like) 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 (nanopatels) oluşmaları ve enzimin nanometre boyutlarına hapsedilmesi nedeni ile "nanoflowers" olarak ilk defa bu grup tarafından adlandırılmıştır (Ge vd., 2012). Araştırmacılar bahsedilen çalışmalarında, geleneksel immobilizasyon teknikleri ile karşılaştırıldığında çiçek benzeri şekillere sahip enzim-inorganik hibrit yapıların (nanoflowers) kararlılığının ve aktivitesinin serbest enzimlere ve diğer immobilizasyon teknikleri uygulanan enzimlere göre dikkat çekici ölçüde arttığını göstermişlerdir (Ge vd., 2012). Sentezlenen protein-inorganik hibrit yapıların aktivitelerinin artmasının, muhtemel sebepleri olarak şunları belirtmişlerdir (Ge vd, 2012); oluşan yapıların çok küçük (nano metre boyutlu) yaprakçıklardan oluşması nedeni ile çok geniş bir yüzey alanına sahip olması, ki bu durumda önemli bir kütle transfer sınırlaması yoktur, nano ölçekte hapsedilmiş enzim moleküllerinin kooperatif etkisi, denenen enzimlerin metaloenzimlerden olması yani yapılarında metal iyonu içermesi.

Atık sulardaki organik kirliliklerin enzimler ile giderilmesi fikri ilk olarak 1980'lerin başında ortaya atılmıştır. Endüstriyel atık sulardaki boyaların renk gideriminde yaygın olarak çalışılan enzimler oksidoredüktaz sınıfı enzimler olan peroksidazlardır (Rodríguez vd, 1999, Nyanhongo vd., 2002; Rodríguez vd., 2004). Peroksidazlar (POD) [E.C: 1.11.1.x], doğada (hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalarda) yaygın olarak bulunan ve hidrojen atomlarını verme eğiliminde olan bileşikler ile bu atomları alıcı durumunda olan H2O2 bileşiği

arasındaki reaksiyonu katalizleyen oksidoredüktaz sınıfı enzimlerdir (Mohsina ve Khalil-ur, 2009; Kalın vd., 2014; Somtürk vd., 2014). Bu grup enzimler, hidrojen peroksiti kullanarak organik ve inorganik substratların oksidasyonunu, fenoller, hidrokinonlar, hidrokinonid aminler gibi çok sayıda aromatik bileşiklerin dehidrogenasyonu reaksiyonlarını katalizler (Shaffiqu vd., 2002; Jun vd., 2006).Peroksidaz enzimi tarafından katalizlenen reaksiyonlar oldukça karışıktır ancak aşağıda verildiği şekilde özetlenebilir (Van Huystee, 1987). Peroksidaz enzimi peroksit karşısında gualiakol, pirogalol, klorogenik asit, katekin ve katekol gibi birçok fenolik bileşikleri de yükseltgeyebilir (Onsa vd., 2004).

$$H_2O_2 + AH_2 \xrightarrow{\text{Peroksidaz}} 2H_2O + A$$

Horseradish peroxidase (HRP, EC 1.11.1.7), mangan peroksidaz (MnP, EC 1.11.1.13) ve lignin peroksidaz (LiP, EC 1.11.1.14) oksidoretüktaz sınıfına ait enzimlerdir. Bitkisel peroksidaz enzimleri 200 den fazla çok çeşitli kaynaklardan saflaştırılmaktadır, ancak ticari olarak yabanturpu ((karaturp) Horseradish peroxidase (HRP)) köklerinden saflaştırılmaktadır (Veitch, 2004). HRP enzimi onlarca yıldır çalışılan ve dolayısı ile peroksidaz ailesinin en iyi karakterize edilmiş bir üyesidir. Peroksidaz enziminin ticari uygulamalarında ve çoğunluk araştırma amaçlı kullanımlarında HRP enzimi tercih edilmektedir. Lignin peroksidaz (LiP) (1,2-bis(3,4-dimetoksifenil) propan-1,3-diol:hidrojen-peroksit oksidoredüktaz), bazı fungus türleri tarafından üretilen, lignin yıkımından sorumlu hücre dışı bir enzimdir. Farklı kaynaklardan elde edilen LiP enziminin, rekalsitrant aromatik bileşiklerin çeşitli türlerini mineralize ettiği ve fenolik bileşiklerin ve polisiklik aromatiklerin bir grubunu okside ettiği görülmüştür (Durán and Esposito 2000). Mangan peroksidaz (MnP) (Mn(II): hidrojen peroksit oksidoredüktaz), ligninolitik funguslar tarafından salgılanan, oksidoredüktaz sınıfına ait hücre dışı bir enzimdir. MnP enzimi, dikkat çekici bir parçalama potansiyeline sahiptir. Ligninle birlikte çeşitli organik kirlilikleri oksitler ve lignin sülfonik asitlerinin uzaklaştırılması için atık su arıtımı gibi biyoteknolojik uygulamalarda, yünden bitki atıklarını uzaklaştırmada, tehlikeli kimyasalların eliminasyonunda kullanılır (Nüske et al. 2002).

Peroksidaz enzimi geniş katalitik aktivite, yüksek hassasiyet ve yaygın substrat spesifikliğine sahip, önemli bir enzimdir (Kalın vd., 2014; Somtürk vd., 2014; Mohamed vd., 2013). Ayrıca enzimin aktivite tayini spektrofotometrik olarak kolaylıkla ve yüksek doğrulukla ölçülebilmektedir. Peroksidaz enziminin sayılan bu özellikleri enzimi mikroanalitik, biyomedikal ve endüstriyel uygulamalarda kullanışlı hale getirmektedir (Ngo,

2010; Farhadi vd., 2011; Pandey ve Dwivedi, 2011). Peroksidaz enzimi ticari olarak, biyosensör yapımında (Pandey ve Dwivedi, 2011; Ryan, 2006), tıbbi tanı kitlerinin bir bileşeni olarak (Leon vd., 2002; Deepa ve Arumughan, 2002; Mohsina ve Khalil-ur, 2009), organik bileşiklerin biyo-tranformasyonunda (Dordick vd., 1987; Adam vd., 1999; Veitch, 2004) ve atık suların arıtılmasında (fenoller, aromatik aminlerin, bifenil ve bisfenoller gibi çeşitli kirleticilerden) (Mohamed vd., 2013; Kulshrestha ve Husain, 2006; Ikehata vd., 2005; Lai ve Lin, 2005) kullanılmaktadır. Ayrıca çok farklı alanlarda peroksidaz enzimi için yeni uygulamalar önerilmektedir. Önerilen bu uygulamalar arasında; fenolik kirletici maddelerin ve bunlarla ilgili bileşiklerin uzaklaştırılması, sentetik boyaların renklerinin giderilmesi, organik ve polimer sentezi sayılabilir (Mohsina ve Khalil-ur, 2009).

Seçilen bu enzimlerin çok farklı şekillerde (farklı yüzeylere immobilizasyonu veya direk kültür ortamında) hazırlanarak boya giderimi amacı ile kullanılabilirliği ile ilgili pek çok çalışma mevcuttur (Ferreira-Leitão vd., 2003; Akhtar vd., 2005; Yu vd., 2006; Alam vd., 2009; Pirillo vd., 2010; Dawkar vd., 2010; Yousefi ve Kariminia, 2010; Rauf ve Ashraf, 2012; Si ve Cui, 2013). İmmobilizasyon çalışmalarında birbirinden çok farklı yüzeyler kullanılmış ve boya giderme etkinlikleri de her bir çalışma için farklı bulunmuştur. Ancak yapılan literatür araştırmasında hibrit “nanoflower" olarak adlandırılan nano çiçeklerin boya giderimi amacı ile kullanılabilirliğinin henüz çalışılmadığı görülmüştür. Yaptığımız ön denemelerde hazırlanan HRP-Cu^{2+} hibrit nano çiçeklerin boya giderimi amacı ile etkili bir şekilde kullanılabileceği görülmüştür. Bu nedenle önerilen bu projede, çiçek benzeri şekillere sahip HRP-Cu^{2+}, LiP-Cu^{2+} ve MnP-Cu^{2+} hibrit yapılar sentezlenerek, farklı deneysel şartlarda morfolojileri araştırılacak, enzimatik aktivitelerinin artma mekanizmasının nasıl gerçekleştiği açıklanmaya çalışılacak ve bu yapıların seçilen bazı önemli endüstriyel boyalarının gideriminde kullanılabilirlikleri araştırılacaktır.

Boyar maddeler; çözünürlük, kimyasal yapı, boyama özellikleri gibi çeşitli karakteristikleri göz önüne alınarak sınıflandırılır (Kurbanova vd., 1998; Selvam vd., 2003; Rauf ve Ashraf, 2012). Çok çeşitlilik gösteren endüstriyel boyalarından seçilerek çalışılacaktır. Genel bir sınıflandırma yapmak gerekirse boyar maddeler üç grupta incelenebilir (Mishra ve Tripathy, 1993).

1. Katyonik boyar maddeler: Bazik boyar maddeler
2. Anyonik boyar maddeler: Direkt, asit ve reaktif boyar maddeler
3. İyonik olmayan boyar maddeler: Dispers boyar maddeler

3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Çiçek şekilli hibrit nano yapıların sentezi

Hibrit nano yapıların sentezinde organik kısım olarak HRP, LiP, MnP ve inorganik kısım olarak ($CuSO_4.5H_2O$) kullanıldı. Sentez için belirli derişimde $CuSO_4$ çözeltisi, belirli konsantrasyonda enzim içeren 10 mM fosfat tampon (PBS) çözeltisine eklendi ve oluşan karışım hızlıca vortekslenerek oda sıcaklığında 3 gün boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, reaksiyon kabında oluşan mavi renkli çökelek santrifüj edildi, 3 defa saf suda yıkandı ve kurutularak sonraki uygulamalar için saklandı.

Reaksiyon koşullarının (sentez çözelti pH' sı, sentez sıcaklığı, enzim derişimi ve metal iyon derişimi gibi) sentezlenen hibrit nano yapıların morfolojisi üzerine etkileri detaylı olarak incelendi. Hibrit yapı sentezi için ortam pH' sı 4-10 aralığında değiştirilirken sentez sıcaklığı +4°C ve oda sıcaklığı olarak test edildi. Enzim derişimi ise 0.01 ve 1 mg mL^{-1} aralığında çalışıldı. Metal iyon derişimi ise 0.8, 8 ve 80 mM olarak test edildi. Optimum şartlar tespit edildikten sonra sentezlenen hibrit nano yapıların protein içerikleri (enkapsülasyon verimi) belirlendi.

3.2 Bradford yöntemi ile protein tayini

Yöntem organik boyaların, proteinlerin asidik ve bazik gruplarıyla etkileşerek renk oluşturmasını esasına dayanır. Boya-bağlama temelli yöntemlerin en yaygını, Bradford tarafından geliştirilen ve Coomassie Brillant Blue G-250 boyasının kullanıldığı metottur. Yöntem oldukça duyarlıdır (5-100 µg protein/mL). Renk oluşumunda proteinin aminoasit bileşiminin (özellikle arginin gibi bazik amino asitler ile aromatik amino asitler) reaksiyon üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. Reaksiyon yüksek oranda tekrarlanabilir ve hızlı cereyan eder.

Nano yapıya geçen protein miktarının tespit edilebilmesi için inkübasyon sonrası süpernatanta protein tayini yapıldı. Protein tayini için kalibrasyon eğrisi BSA ile elde edildi. 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,0625 mg/ml derişimlerde BSA proteini içeren standartlar elde edildi. Örnek:boya oranı 1:49 olacak şekilde standartlar ve boya karıştırıldı. Örneklerin ve standartların 595 nm dalga boyunda saf su ve boyadan oluşan köre karşı absorbans değerleri okundu. Elde edilen sonuçlardan absorbans değerlerine karşılık gelen mg protein değerleri standart grafik haline getirildi. Bu standart grafik kullanılarak protein miktarları belirlendi. Süpernatantta bulunan serbest enzimin ne kadarının nano yapıya geçtiği "enkapsülasyon verimi" ile saptandı.

3.3 Çiçek şekilli HRP-Cu^{2+} hibrit nano yapıların aktivitesinin ve kararlılığının test edilmesi

Sentezlenen çiçek-şekilli HRP-Cu^{2+}hibrit yapıların aktivite tayinlerinde substrat olarak guaiakol kullanıldı. Aktivite ölçümü, Somturk ve arkadaşlarının (2014) uyguladığı yönteme göre spektrofotometrik olarak gerçekleştirildi. Yöntem H_2O_2 tarafından guaiakol kromojenik substratın yükseltgenmesi ve oluşan renkli bileşiğin (3,3'-dimetoksi-4,4'-bifenokinon) meydana getirdiği absorbans artışının 470 nm'de izlenmesi esasına dayanmaktadır. Reaksiyon enzim çözeltisinin ilavesiyle başlar ve belirli aralıklarda bekletilen inkübasyon süresi sonunda santrifüj edilerek süpernatantın absorbans artışı 470 nm' de oda sıcaklığında spektrofotometre ile 1 cm ışık yoluna sahip küvet kullanılarak takip edilir.

Peroksidaz enziminin aktivitesini belirlemek için aşağıdaki formül kullanıldı.

$A = Ɛ.b.c$

$c = A/Ɛ.b$

$V = c.Df$

A = Absorbans (1 dakika sonunda okunan absorbans)

b = Işığın geçtiği mesafe (1 cm)

c = Konsantrasyon (µmol/mL)

$Ɛ_{470}$ = Ekstrinksiyon kat sayısı (26600mM^{-1} x cm^{-1})

Df = Seyreltme katsayısı

V = Reaksiyon hızı (µmol x dak./mL)

3.4 Çiçek şekilli LiP-Cu^{2+} hibrit nano yapıların aktivitesinin ve kararlılığının test edilmesi

Sentezlenen çiçek-şekilli LiP-Cu^{2+}hibrit yapıların aktivite tayinlerinde substrat olarak Veratril alkol (4 mM) kullanıldı. Yöntem H_2O_2 (1mM) varlığında Veratril alkol substratının Verataldehite dönüşümünü esas alır, meydana gelen absorbans değişimi 310 nm'de okunur. Reaksiyon enzim çözeltisinin (1 mg/mL) ilavesiyle başlar ve belirli aralıklarda bekletilen inkübasyon süresi sonunda santrifüj edilerek süpernatantın absorbansı 310 nm' de oda sıcaklığında spektrofotometre ile 1 cm ışık yoluna sahip küvet kullanılarak takip edilir.

Lignin Peroksidaz enziminin aktivitesini belirlemek için aşağıdaki formül kullanıldı.

$A = Ɛ.b.c$

$c = A/Ɛ.b$

$V = c.Df$

A = Absorbans (1 dakika sonunda okunan absorbans)

b = Işığın geçtiği mesafe (1 cm)

c = Konsantrasyon (µmol/mL)

ε_{310} = Ekstrinksiyon kat sayısı (9300mM^{-1} x cm^{-1})

Df = Seyreltme katsayısı

V = Reaksiyon hızı (µmol x dak./mL)

3.5 Çiçek şekilli MnP-Cu^{2+} hibrit nano yapıların aktivitesinin ve kararlılığının test edilmesi

Sentezlenen çiçek-şekilli MnP-Cu^{2+} hibrit yapıların aktivite tayinlerinde substrat olarak Mn^{+2} (0,5 mM Mangan sülfat) ve tampon olarak 50 mM sodyum malonat, pH 4.5 kullanıldı. Yöntem H_2O_2 (0,3 mM) varlığında Mn^{+2}'nin Mn^{+3}'e yükseltgenmesini esas alır, meydana gelen absorbans değişimi 270 nm'de okunur. Reaksiyon enzim çözeltisinin (1 mg/mL) ilavesiyle başlar ve belirli aralıklarda bekletilen inkübasyon süresi sonunda santrifüj edilerek süpernatantın absorbansı 270 nm' de oda sıcaklığında spektrofotometre ile 1 cm ışık yoluna sahip küvet kullanılarak takip edilir.

Lignin Peroksidaz enziminin aktivitesini belirlemek için aşağıdaki formül kullanıldı.

$A = \varepsilon.b.c$

$c = A/\varepsilon.b$

$V = c.Df$

A = Absorbans (1 dakika sonunda okunan absorbans)

b = Işığın geçtiği mesafe (1 cm)

c = Konsantrasyon (µmol/mL)

ε_{270} = Ekstrinksiyon kat sayısı (11590 mM^{-1} x cm^{-1})

Df = Seyreltme katsayısı

V = Reaksiyon hızı (µmol x dak./mL)

3.6 Çiçek şekilli hibrit nano yapıların karakterizasyonları

Sentezlenen hibrit yapıların morfolojisi SEM (Scanning Electron Microscopy) ile karakterize edildi. EDX (Energy Dispersive X-Ray) ölçümleri ile elementel analizi yapıldı, sentezlenen hibrit yapılardaki Cu metalinin varlığı belirlendi ve XRD (X-Ray Diffraction) ile kristal yapıları aydınlatıldı. Ayrıca FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) analizi yapıldı.

3.7 Çiçek şekilli hibrit nano yapıların boya giderimi amacıyla kullanılabilirliği

Enzimatik renk giderimi için belirli derişimlerde boya çözeltileri hazırlandı ve bu çözeltilerinin maximum absorpsiyon gösterdiği dalga boyları tespit edildi. Enzimatik renk giderimi için pH, inkübasyon süresi ve sıcaklık gibi parametreler taranarak optimum koşullar tespit edildi. Hibrit nano yapılar ve serbest enzimler belirli sürelerde boya çözeltisi ile ayrı ayrı inkübe edildi ve süre bitiminde santrifüj edildikten sonra süpernatant kısımlarının absorbans değerleri okundu. Bu spektrofotometrik ölçümler sonrasında aşağıdaki eşitlik kullanılarak % boya giderimi hesaplandı.

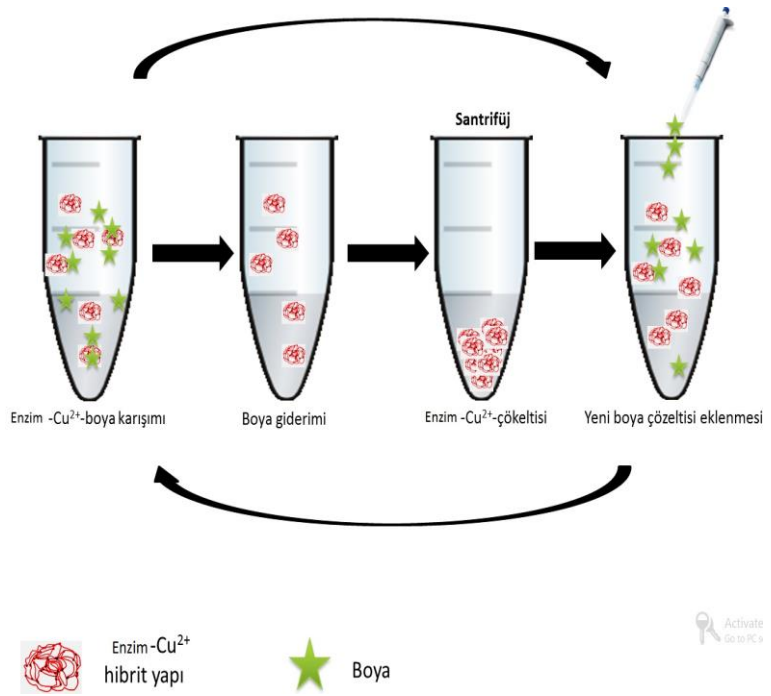
% boya giderimi= (Ai-Af) x100÷Ai

Ai: belirli derişimde hazırlanan boyanın başlangıç absorbansı

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

3.8 Çiçek şekilli hibrit nano yapıların boya giderimi amacıyla tekrar kullanılabilirliğinin tespiti

Sentezlenen çiçek-şekilli hibrit yapıların tekrar kullanılabilirliğinin tespiti **Şekil …**'de gösterildiği gibi yapıldı. Bu amaçla ortamdan santrifüj ile ayrılan hibrit nano yapılar saf su ile 3 defa yıkandıktan sonra tekrar kullanıma hazır hale getirildi.

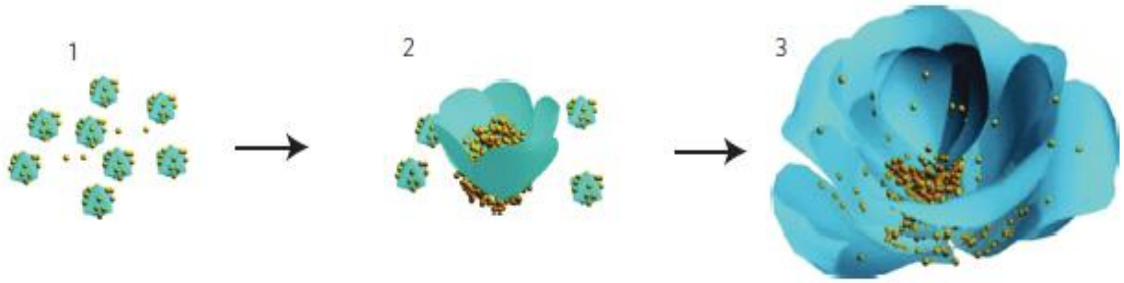


Şekil 3.1 Hibrit nano yapıların tekrar kullanılabilirliği şematize edilmiştir.

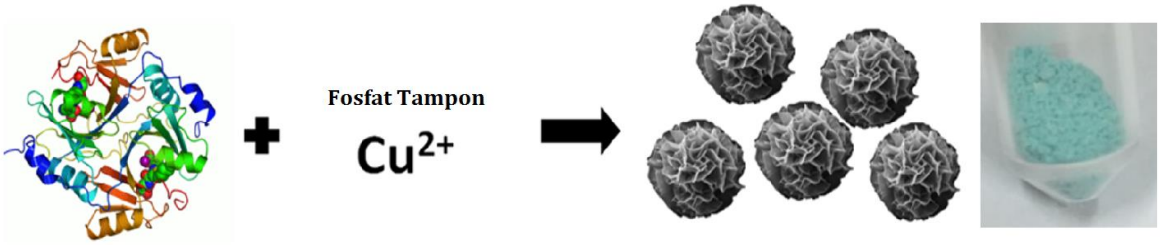
4 BULGULAR

1.1 Çiçek şekilli hibrit nano yapıların sentezi

Hibrit nano yapılar Bölüm 3.1.' de anlatıldığı şekilde sentezlendi. Hibrit nano yapıların sentezinde organik bileşen olarak ayrı ayrı HRP, Lignin peroksidaz ve Manganez peroksidaz enzimi ve inorganik bileşen olarak Cu^{2+} iyonları kullanıldı. Bu yöntem de çiçek şekilli nano yapılar, fosfat tamponu ile Cu^{2+} nin oluşturduğu yapıyla proteinlerin kompleks oluşturması esasına dayanır. **Şekil 4.1**' de gösterildiği gibi ilk olarak birincil bakır fosfat kristalleri oluşur. Bu aşamada protein molekülleri baskın olarak Cu(II) iyonları ile özellikle protein omurgasındaki amin gruplarının koordinasyonu sayesinde kompleksler oluştururlar. Oluşan bu kompleksler bakır fosfat birincil kristallerin çekirdeklenme alanları haline gelir. İkincil büyüme aşamasında (**Şekil 4.1**), protein molekülleri ve primer kristaller iri topaklar haline gelir. Bakır fosfat kristallerinin kinetik olarak kontrolü agregatların yüzeyindeki bireysel bakır bağlayıcı bölgelerden kaynaklanır ki bu da ayrı ayrı yaprakların oluşmasına neden olur. Son aşamada anizotropik büyüme dallı ve çiçek-benzeri bir yapının oluşması ile sonuçlanır. Bu büyüme sürecinde, protein yaprak skafoldların oluşturulması için bakır fosfat kristalleri çekirdeklenmeyi indükler ve yaprakları birbirine bağlamak için bir "tutkal" olarak görev yapar. Nano boyuttaki bu yaprak şekilli yapılar bir araya gelerek birbirine bağlanırlar ve çiçek benzeri şekillere sahip yapılar oluştururlar. Bu nedenle sentezlenen yapılar "çiçek benzeri hibrit yapı-NANOFLOWER" olarak adlandırılmıştır. Çiçek benzeri hibrit nano yapıların oluşumu **Şekil 4.2**'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 Çiçek benzeri hibrit nano yapının oluşum mekanizması, Sarı renkli bakır iyonları enzimdeki amin gruplarına bağlanmaktadır. (Somturk vd., 2015)



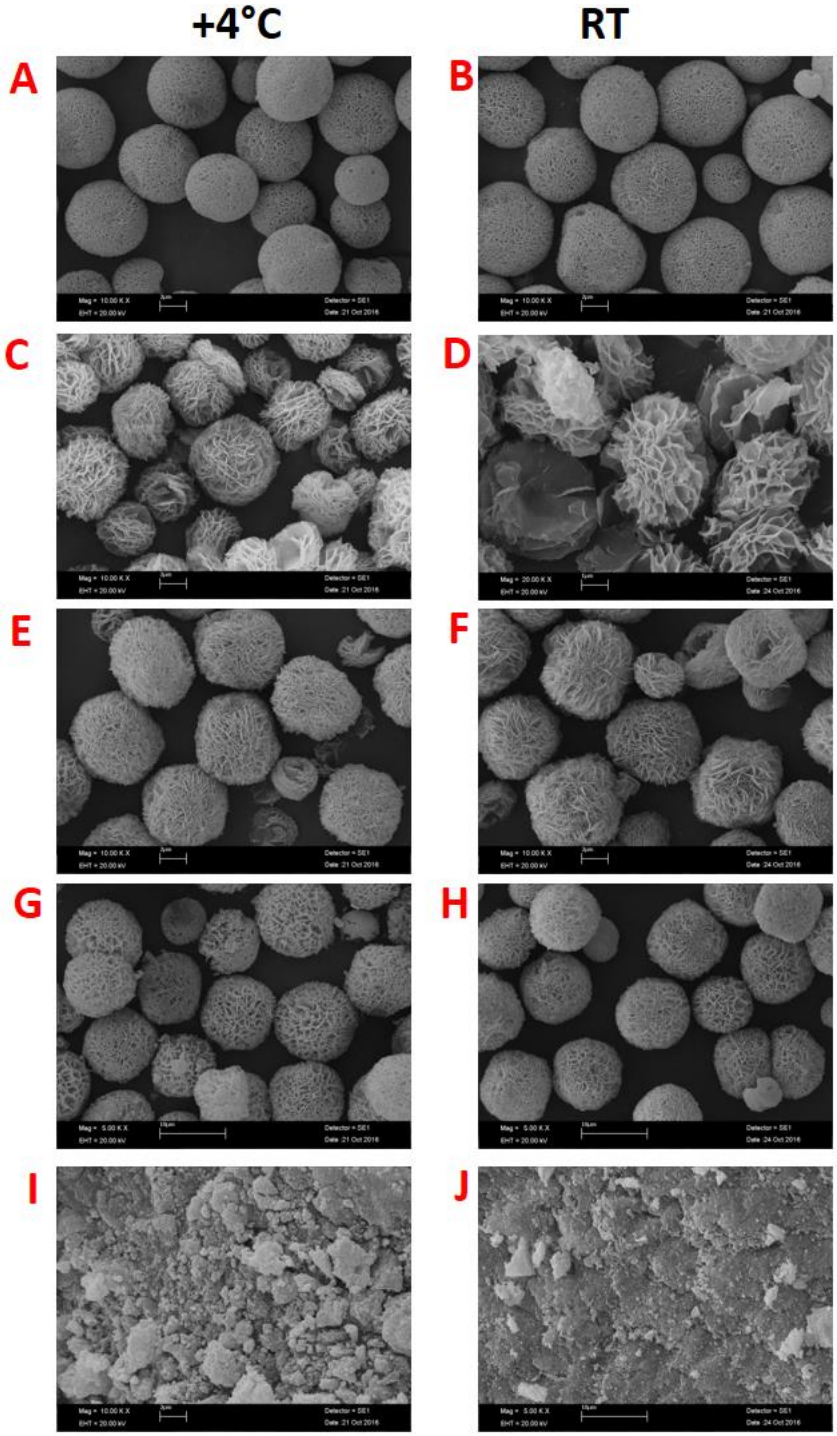
Şekil 4.2 Hibrit nano yapı oluşum mekanizması

4.1.1 Sentez pH' sının ve sıcaklığının hibrit nano yapıların oluşumu üzerine etkisi

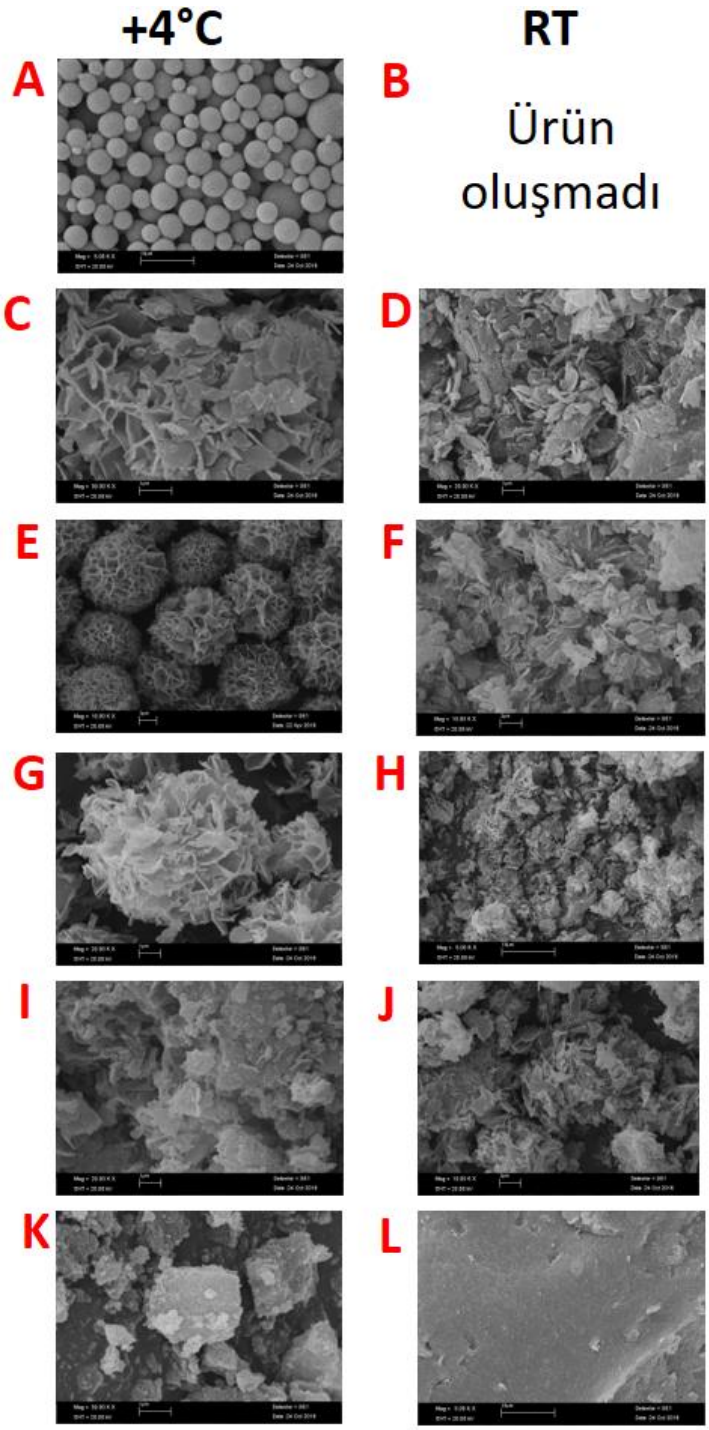
HRP-Cu^{2+} hibrit yapıların morfolojisi üzerine farklı pH ve sıcaklığın etkisi araştırıldı. **Şekil 4.3**'de görüldüğü üzere pH 10'da gerçekleştirilen sentez dışında tüm pH' larda çiçek şeklinde morfoloji oluşmuştur. Her iki sıcaklıkta pH 6 tamponunda gerçekleştiren sentezde elde edilen morfoloji küre şeklinde, büyük ve yapraklar çok sıkı paketlenmiştir. pH 8 ve 9'da gerçekleştiren sentezlerde çiçek yapılar sıkı paketlenmemesine rağmen homojen bir morfoloji elde edilememiştir. Oda sıcaklığında pH 7'de yapılan sentez sonucu dağılmış çiçek yapılar görünmektedir. +4°C ve pH 7'de yapılan sentezde en düzgün ve homojen çiçek yapı elde edilmiştir. Her iki sıcaklıkta pH 5' te gerçekleştirilen sentezlerden ürün elde edilememiştir.

LiP-Cu^{2+} hibrit yapıların morfolojisi üzerine farklı pH ve sıcaklığın etkisi araştırıldı. **Şekil 4.4**'de görüldüğü üzere her iki sıcaklıkta pH 6, 8, 9 ve 10'da gerçekleştirilen sentezlerde çiçek şeklinde morfoloji oluşmamıştır. +4°C ve pH 5'de yapılan sentezde elde edilen morfoloji küre şeklinde, homojen olmayan, büyük ve yapraklar çok sıkı paketlenmekte iken oda sıcaklığında gerçekleştirilen sentezden ürün elde edilememiştir. +4°C ve pH 7'de yapılan sentezde en düzgün ve homojen çiçek yapı elde edilmiştir.

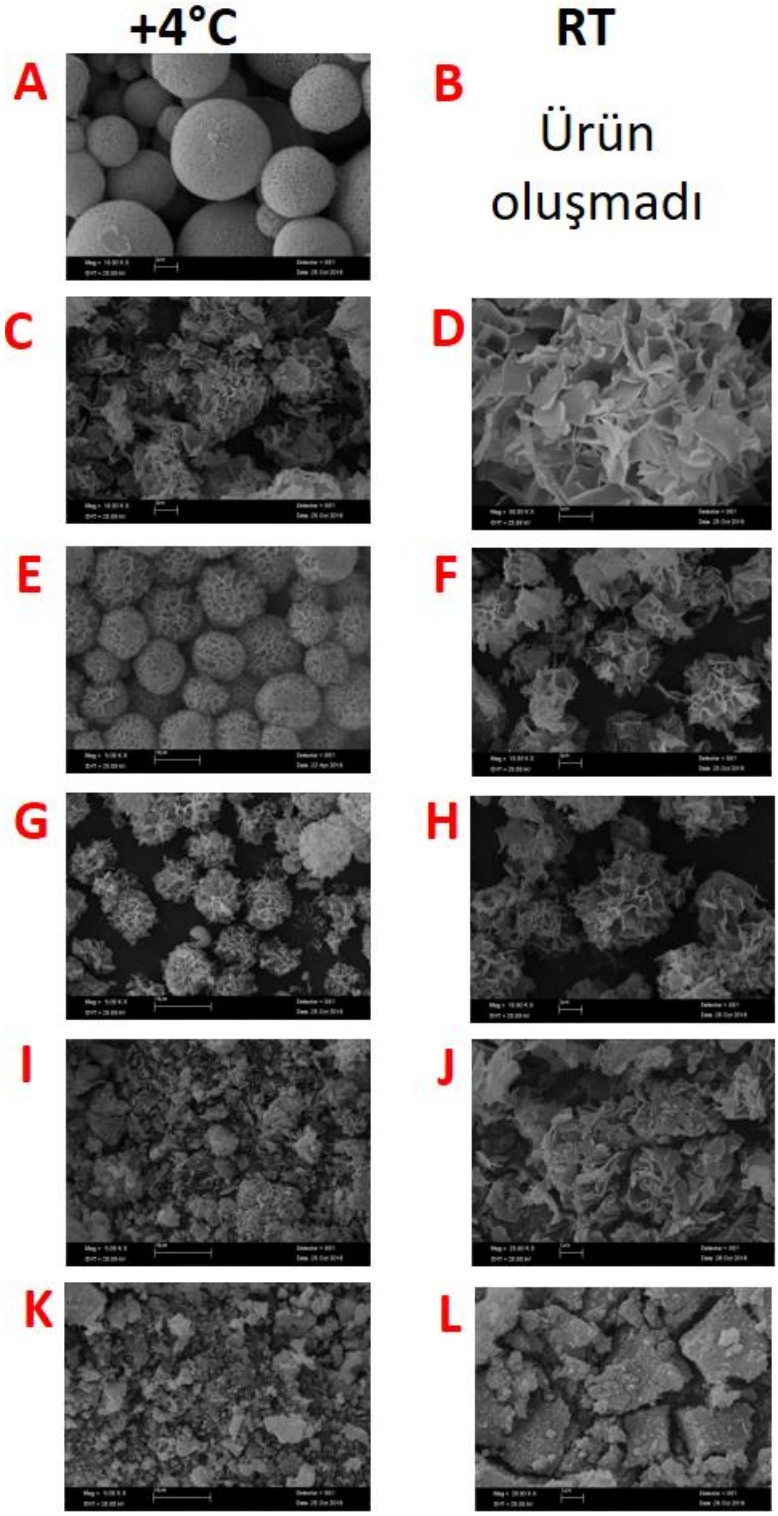
MnP-Cu^{2+} hibrit yapıların morfolojisi üzerine farklı pH ve sıcaklığın etkisi araştırıldı. **Şekil 4.5**'de görüldüğü üzere her iki sıcaklıkta pH 6, 8, 9 ve 10'da gerçekleştirilen sentezlerde çiçek şeklinde morfoloji oluşmamıştır. +4°C ve pH 5'de yapılan sentezde elde edilen morfoloji küre şeklinde, homojen olmayan, büyük ve yapraklar çok sıkı paketlenmekte iken oda sıcaklığında gerçekleştirilen sentezden ürün elde edilememiştir. +4°C ve pH 7'de yapılan sentezde en düzgün ve homojen çiçek yapı elde edilmiştir.



Şekil 4.3 Sentez pH' sının ve sıcaklığının HRP-Cu^{2+} hibrit yapıların oluşumu üzerine etkisi; Sıcaklık: +4°C; A) pH:6, C) pH:7, E) pH: 8, G) pH:9, I) pH:10, Sıcaklık: RT; B) pH:6, D) pH:7, F) pH: 8, H) pH:9, J) pH:10 ([HRP]=0,02 mg/mL, [Cu^{2+}] = 0,8 mM, Zaman:3 gün.)

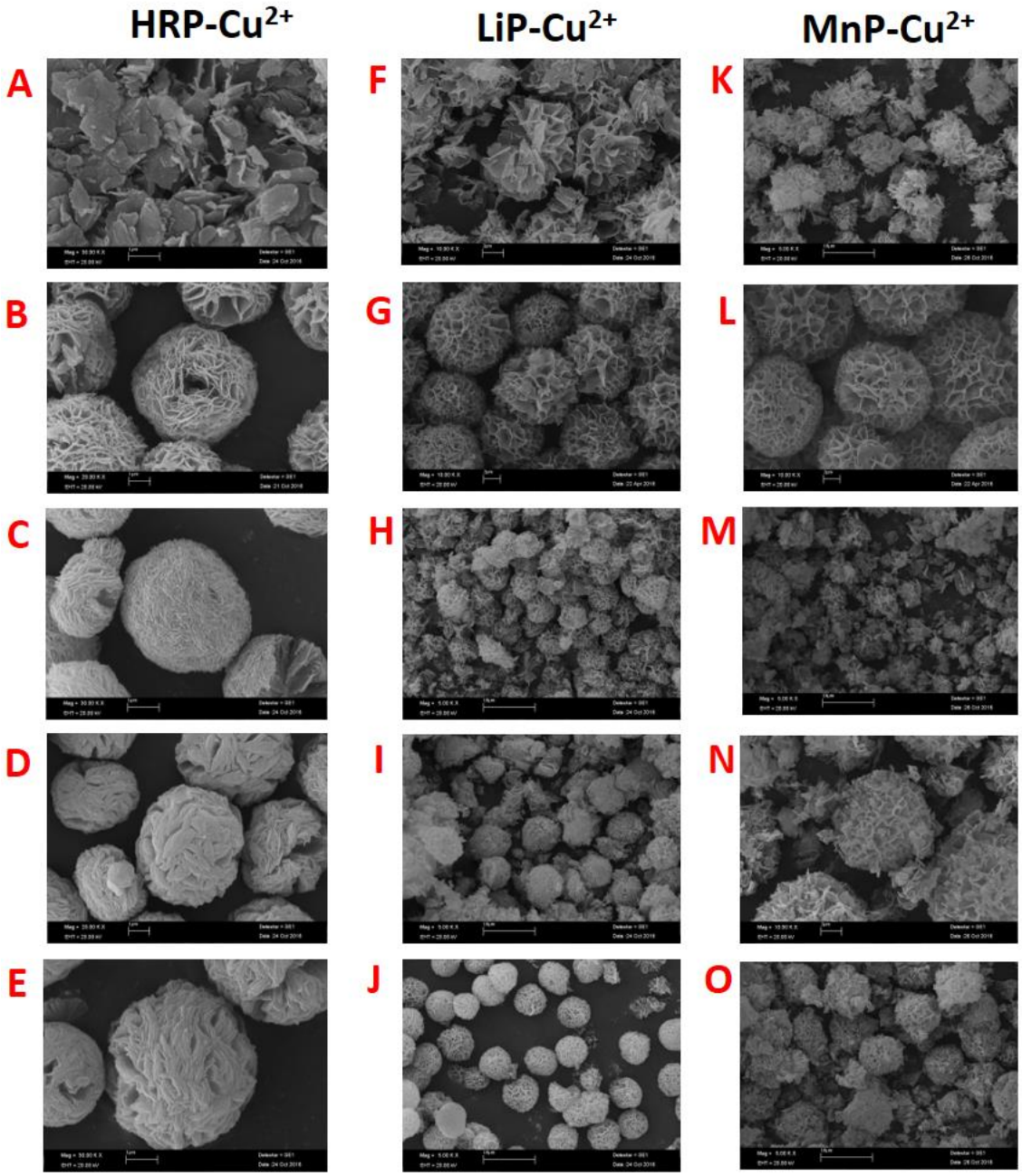


Şekil 4.4 Sentez pH' sının ve sıcaklığının LiP-Cu^{2+} hibrit yapıların oluşumu üzerine etkisi; Sıcaklık: +4°C; A) pH:5, C) pH:6, E) pH: 7, G) pH:8, I) pH:9 K) pH:10, Sıcaklık: RT; B) pH:5, D) pH:6, F) pH: 7, H) pH:8, J) pH:9 L) pH:10 ([LiP]=0,02 mg/mL, [Cu^{2+}] =0,8mM, Zaman:3 gün.)



Şekil 4.5 Sentez pH' sının ve sıcaklığının MnP-Cu^{2+} hibrit yapıların oluşumu üzerine etkisi; Sıcaklık: +4°C; A) pH:5, C) pH:6, E) pH: 7, G) pH:8, I) pH:9 K) pH:10, Sıcaklık: RT; B) pH:5, D) pH:6, F) pH: 7, H) pH:8, J) pH:9 L) pH:10 ([MnP]=0,02 mg/mL, [Cu^{2+}]=0,8mM, Zaman:3 gün)

4.1.2 Enzim derişiminin hibrit nano yapıların oluşumu üzerine etkisi

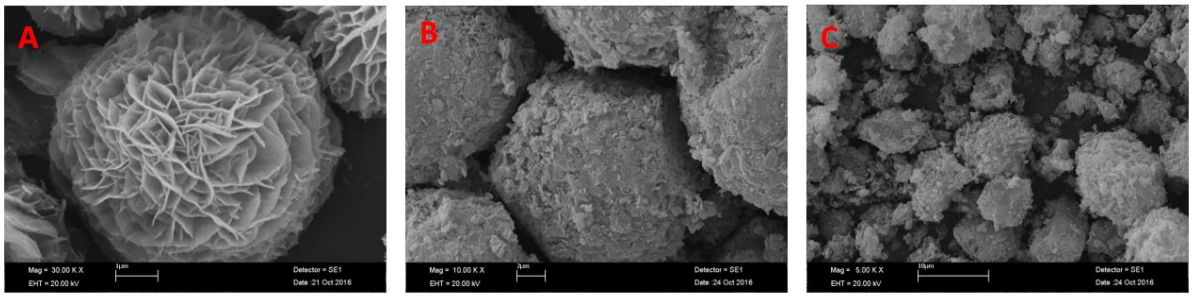


Şekil 4.6 Enzim derişiminin sentezlenen hibrit yapıların oluşumu üzerine etkisi [HRP]=A)0.01, B)0.02, C)0.05, D)0.5, E)1 mg/mL; [LiP]= F)0.01, G)0.02, H)0.05, I)0.5, J)1 mg/mL; [MnP]= K)0.01, L)0.02, M)0.05, N)0.5, O)1 mg/mL; pH:7, [Cu^{2+}]= 0,8 mM, Sıcaklık: +4°C, Zaman: 3 gün)

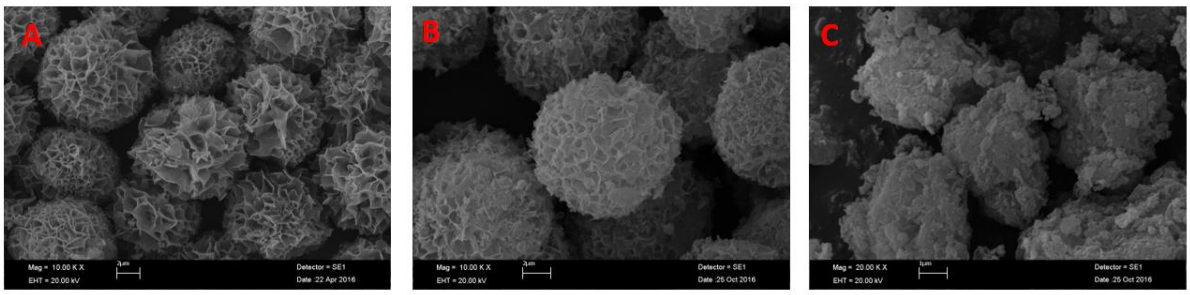
Şekil 4.6'dan da görüldüğü üzere enzim konsantrasyonu arttıkça HRP için çiçek morfoloji dağılmadan daha sıkı yapraklar meydana gelmiştir. LiP ve MnP için ise morfoloji

dağılmaktadır. Enzim konsantrasyonu her üç enzim içinde azaltıldığında çiçek yapı oluşumu görülmemektedir.

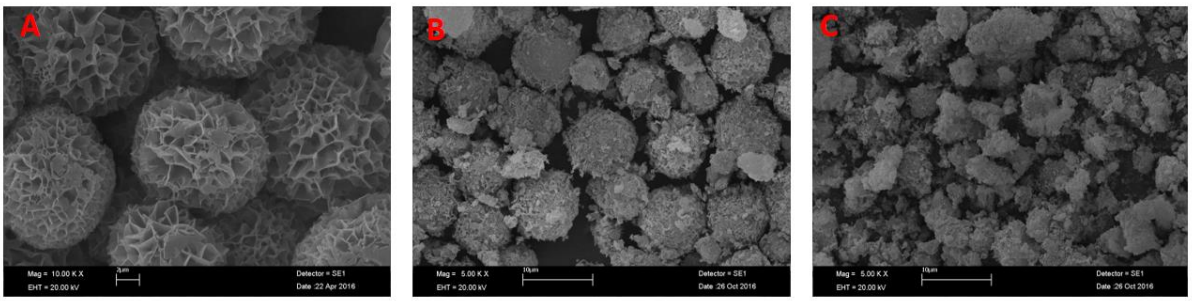
4.1.3 Cu^{2+} iyon derişiminin hibrit nano yapıların oluşumu üzerine etkisi



Şekil 4.7 Cu^{2+} konsantrasyonunun HRP-Cu^{2+} hibrit yapıların oluşumu üzerine etkisi; [Cu^{2+}] = (A) 0,8 mM (B) 8 mM (C) 80 mM Sıcaklık: +4°C, pH:7, [HRP]=0,02 mg/mL, Zaman: 3 gün



Şekil 4.8 Cu^{2+} konsantrasyonunun LiP-Cu^{2+} hibrit yapıların oluşumu üzerine etkisi; [Cu^{2+}] = (A) 0,8 mM (B) 8 mM (C) 80 mM Sıcaklık: +4°C, pH:7, [LiP]=0,02 mg/mL, Zaman: 3 gün



Şekil 4.9 Cu^{2+} konsantrasyonunun MnP-Cu^{2+} hibrit yapıların oluşumu üzerine etkisi; [Cu^{2+}] = (A) 0,8 mM (B) 8 mM (C) 80 mM Sıcaklık: +4°C, pH:7, [MnP]=0,02 mg/mL, Zaman: 3 gün

Reaksiyon sırasında ortamda bulunan metal iyon konsantrasyonu oluşacak hibrit yapı morfolojisi üzerine etkisi büyüktür. Metal konsantrasyonu artırıldığında çiçek yapı **Şekil 4.7, 4.8** ve **4.9**'dan da görüldüğü üzere dağılmaktadır.

4.2 Çiçek şekilli hibrit nano yapıların enkapsülasyon veriminin belirlenmesi

Sentezlenen çiçek-şekilli hibrit yapıların protein içeriklerinin belirlenmesi için sentez sonrası hibrit yapılar santrifüjle ortamdan ayrıldı ve süpernatantta kantitatif protein tayini Bradford yöntemiyle belirlendi. Standart grafik Bölüm 3.2.'de anlatıldığı gibi hazırlandı. Enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini bu standart grafikten faydalanılarak bulundu (**Ekler Şekil E1**).

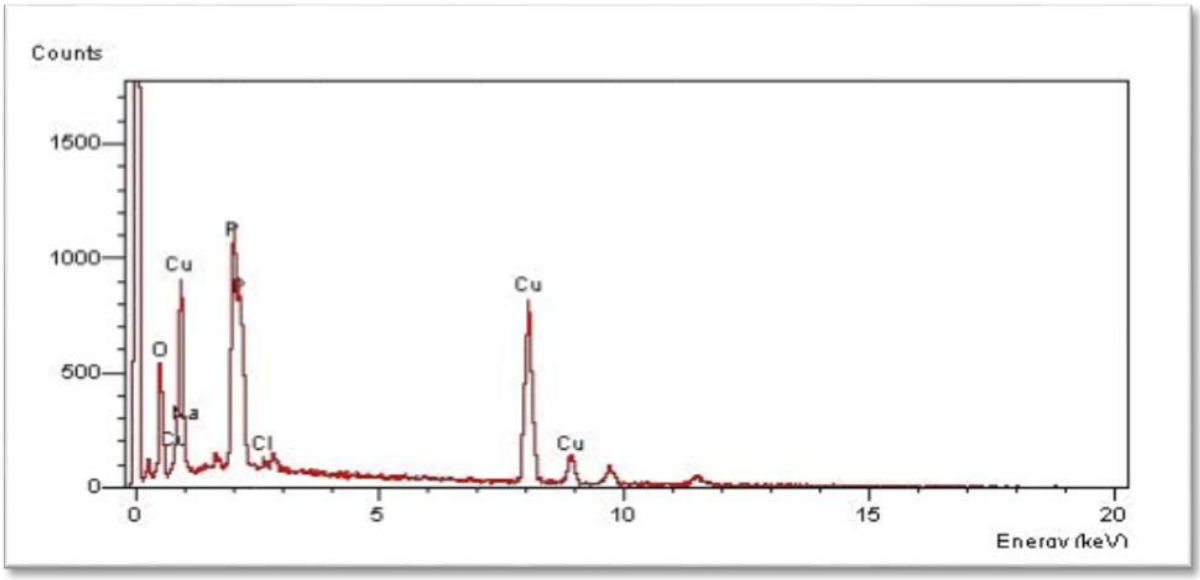
Sentezlenen çiçek-şekilli HRP-Cu2+, LiP-Cu2+ ve MnP-Cu2+ hibrit nano yapıların protein enkapsülasyon oranları **Tablo 4.1**' de verilmiştir. Optimum koşulda (0,02 mg/mL enzim, 0.8 mM Cu^{2+}, ve PBS pH 7, +4°C, 3 gün inkübasyon) 50 mL'lik bir sentezde reaksiyon ortamına 0,02 mg/ml HRP enzimi ilave edilmektedir. Süpernatantta kalan protein miktarı 0,0003 mg/ml olduğuna göre 0,0197 mg/ml protein hibrit yapı içerisinde enkapsüle edilmiştir. Optimum şartlarda gerçekleştirilen bir reaksiyon sonucu elde edilen ürün miktarımız ~10 mg'dır. 10 mg ürünün içerisinde 0,985 mg saf HRP enzimi bulunmaktadır ve ağırlık verimimiz %9,85'dır. Buna göre her 1 mg HRP hibrit yapı 0,0985 mg serbest HRP enzimine denk gelmektedir. Sonuç olarak; HRP enzimi hibrit nano yapı haline dönüştürüldüğünde elde edilen son ürünün neredeyse %10' u saf enzimdir. Bu nedenle deneylerde hibrit yapılar ile serbest enzimlerin eş miktarda kullanımı esas alınarak karşılaştırma yapılmıştır.

Tablo 4.1 Optimum koşullarda sentezlenen hibrit nano yapıların enkapsülasyon oranları

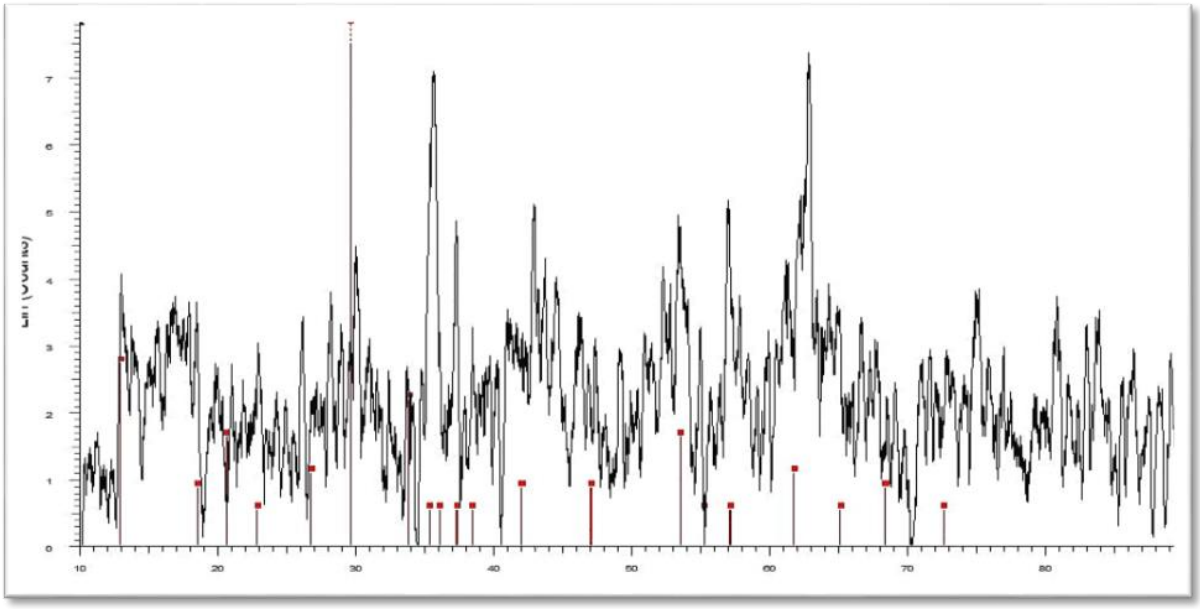
	Protein Konsantrasyonu (mg mL^{-1})		**Enkapsülasyon Verimi (%)**
	Başlangıç	**İnkübasyon sonrası**	
HRP-Cu^{2+}	0,02	0,0003	98,5
LiP-Cu^{2+}	0,02	0,0025	87,5
MnP-Cu^{2+}	0,02	0,0028	86

4.3 Çiçek şekilli hibrit nano yapıların karakterizasyonları

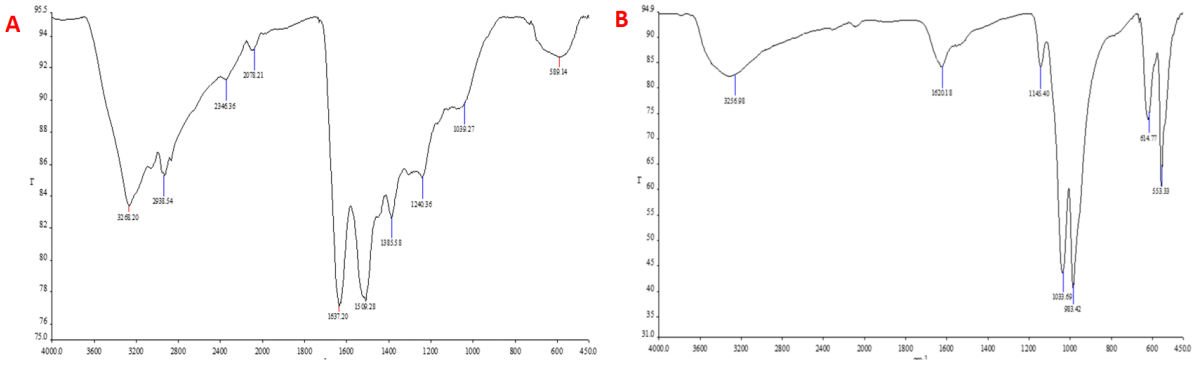
Sentezlenen hibrit nano yapıların EDX, XRD ve FTIR sonuçları sırasıyla aşağıdaki şekillerde verilmiştir.



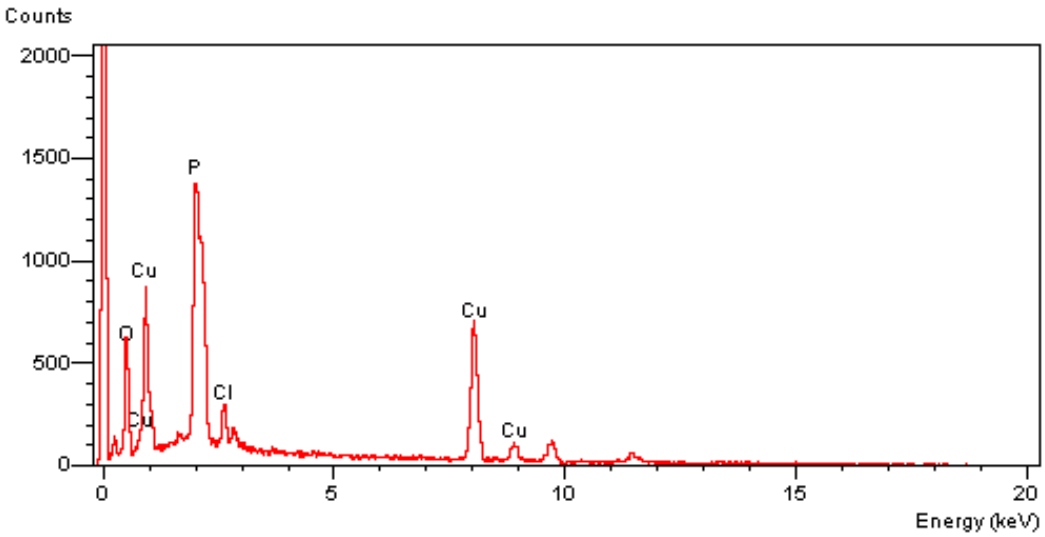
Şekil 4.10 Sentezlenen HRP-Cu^{2+} hibrit nano yapıların EDX spektrumu



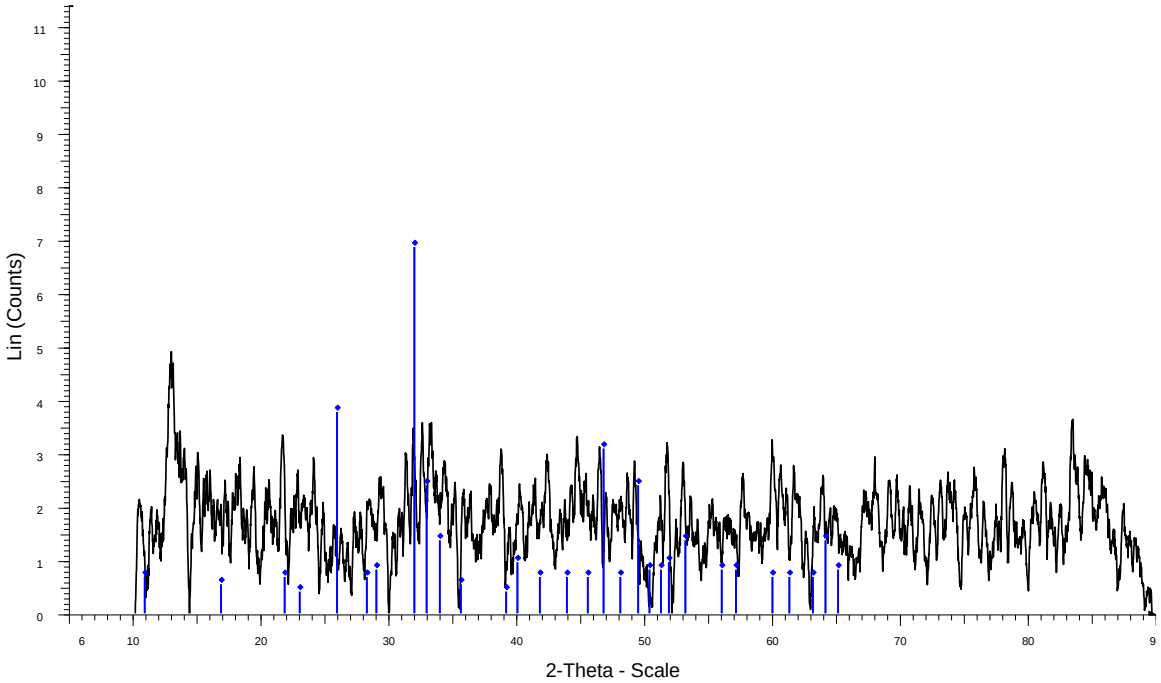
Şekil 4.11 Sentezlenen HRP-Cu^{2+} hibrit yapıların XRD spektrumu. (JCPDS card no: 00-022-0548, $Cu_3(PO_4)_2 \cdot 3H_2O$



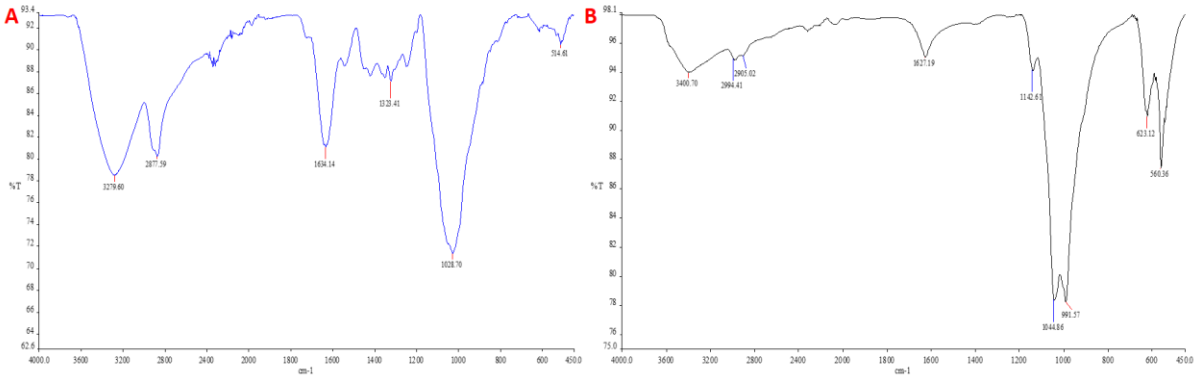
Şekil 4.12 (A) Serbest HRP ve (B) HRP-Cu^{2+} hibrit yapının FTIR spektrumları



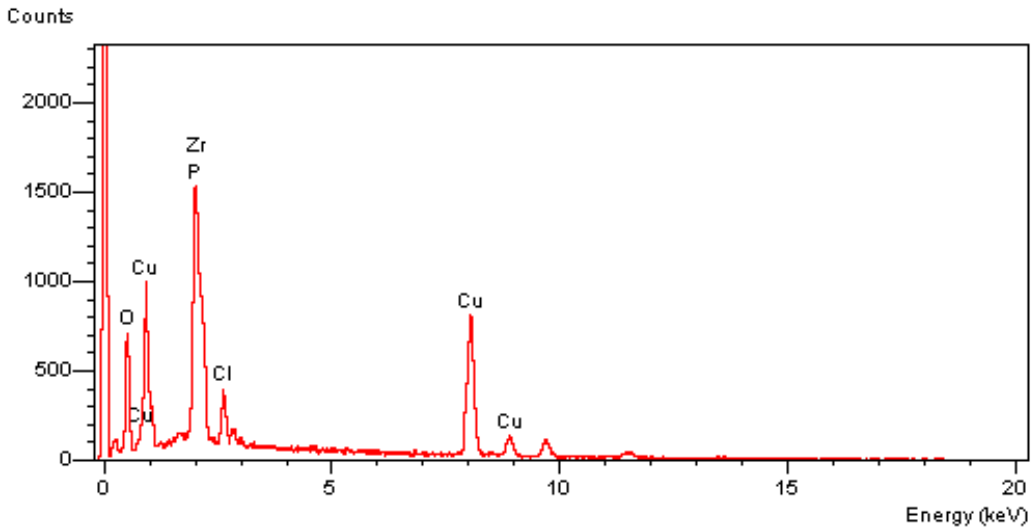
Şekil 4.13 Sentezlenen LiP-Cu^{2+} hibrit nano yapıların EDX spektrumu



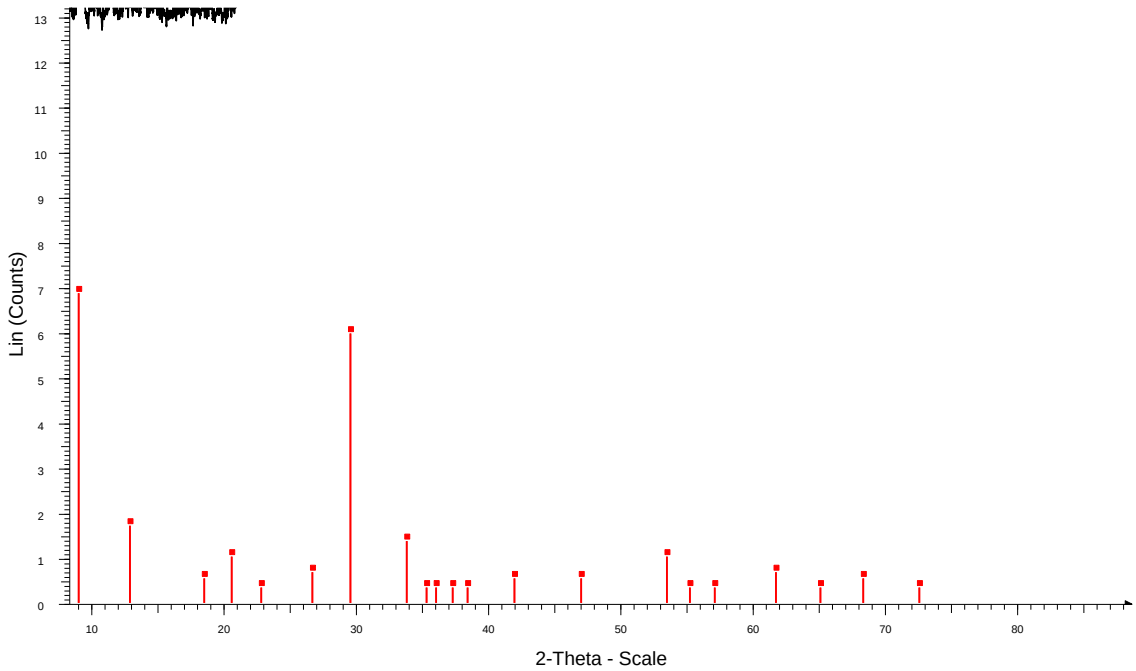
Şekil 4.14 Sentezlenen LiP-Cu^{2+} hibrit yapıların XRD spektrumu. (JCPDS card no: 00-022-0548, $Cu_3(PO_4)_2 \cdot 3H_2O$



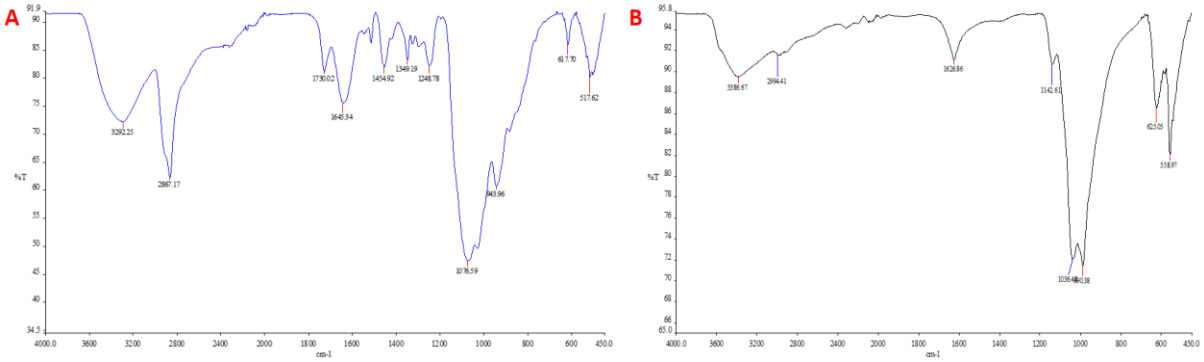
Şekil 4.15 (A) Serbest LiP ve (B) LiP-Cu^{2+} hibrit yapıların FTIR spektrumları



Şekil 4.16 Sentezlenen MnP-Cu^{2+} hibrit nano yapıların EDX spektrumu



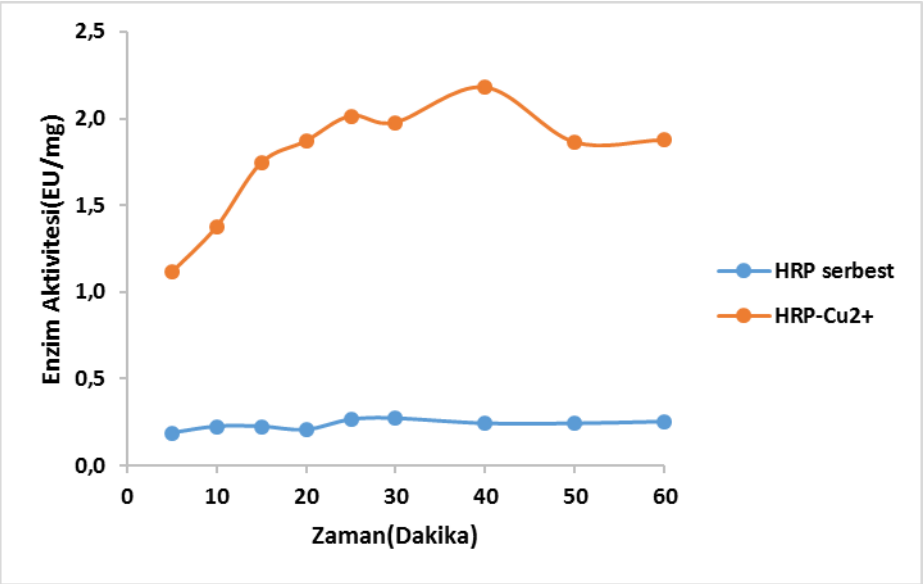
Şekil 4.17 Sentezlenen MnP-Cu^{2+} hibrit yapıların XRD spektrumu. (JCPDS card no: 00-022-0548, $Cu_3(PO_4)_2 \cdot 3H_2O$



Şekil 4.18 (A) Serbest MnP ve (B) MnP-Cu2+ hibrit yapının FTIR spektrumları

4.4 Enzim Aktivite Ölçümleri

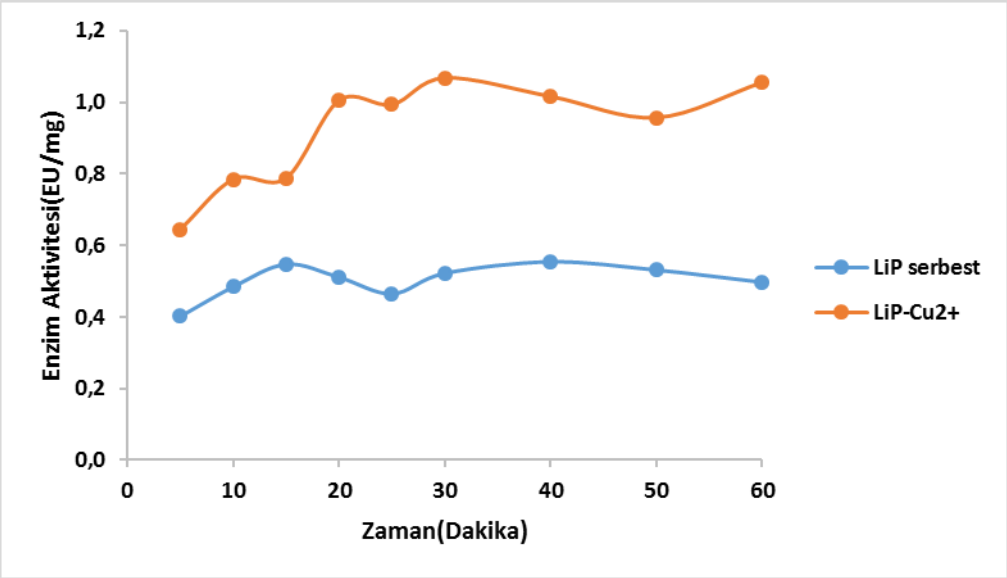
4.6.1 HRP-Cu^{2+} hibrit nano yapıların ve serbest HRP enziminin aktivite ölçümleri



Şekil 4.19 Sentezlenen HRP ve HRP-Cu^{2+} hibrit yapının aktivite karşılaştırması

Serbest HRP enzimi 60 dakika sonunda 0,253 EU aktivite gösterirken HRP-Cu^{2+} hibrit yapısı 1,876 EU aktivite göstermiştir. Nano yapı 7,4 kat daha fazla aktivite göstermektedir.

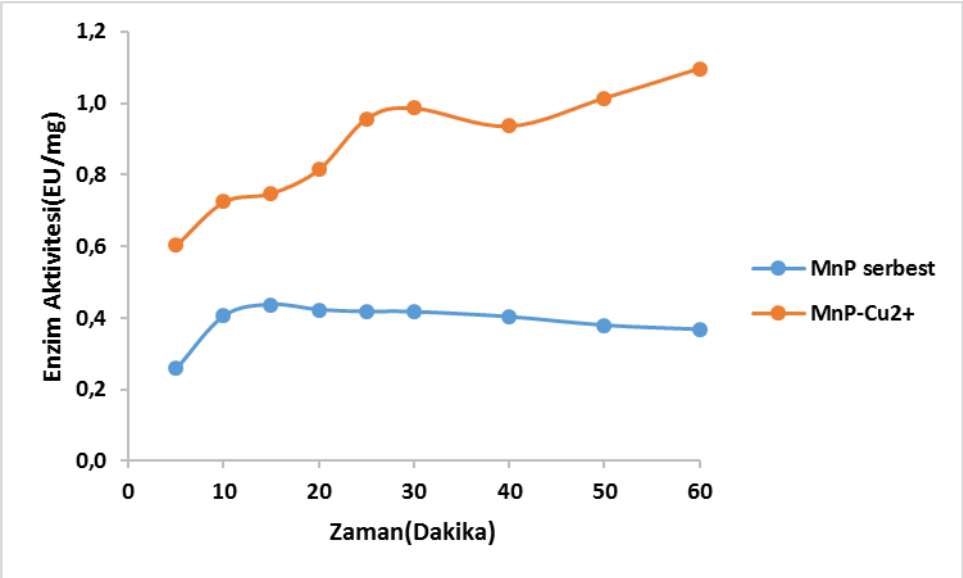
4.6.2 LiP-Cu^{2+} hibrit nano yapıların ve serbest LiP enziminin aktivite ölçümleri



Şekil 4.20 Sentezlenen LiP ve LiP-Cu^{2+} hibrit yapının aktivite karşılaştırması

Serbest LiP enzimi 60 dakika sonunda 0,498 EU aktivite gösterirken LiP-Cu^{2+} hibrit yapısı 1,056 EU aktivite göstermiştir. Nano yapı 2,1 kat daha fazla aktivite göstermektedir.

4.6.3 MnP-Cu^{2+} hibrit nano yapıların ve serbest MnP enziminin aktivite ölçümleri



Şekil 4.21 Sentezlenen MnP ve MnP-Cu^{2+} hibrit yapının aktivite karşılaştırması

Serbest MnP enzimi 60 dakika sonunda 0,368 EU aktivite gösterirken MnP-Cu^{2+} hibrit yapısı 1,097 EU aktivite göstermiştir. Nano yapı 2,98 kat daha fazla aktivite göstermektedir.

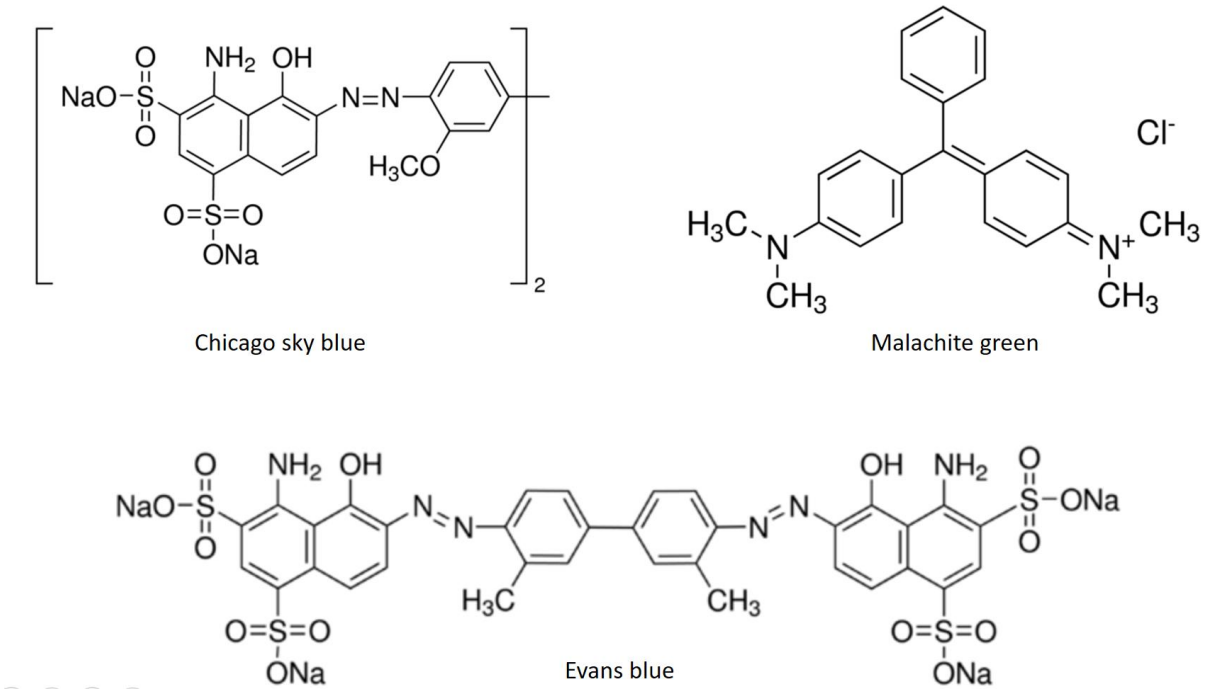
4.7 Çiçek şekilli hibrit nano yapıların boya gideriminde kullanılabilirliği

Boya giderimi için endüstriyel olarak sıklıkla kullanılan üç farklı boya seçilmiştir. Bunlar; Chicago sky blue, Evans blue ve Malachite green boyalarıdır ve kimyasal yapıları **Şekil 4.22'** de gösterilmiştir.

Chicago sky blue boyası; endüstriyel olarak Direct blue 1 olarak da bilinir. Azo grubu boyalardan olup, kanserojendir. Maksimum absorbsiyon gösterdiği dalga boyu λmax=618 nm' dir.

Evans blue azo grubu bir boyadır. Maksimum absorbsiyon gösterdiği dalga boyu λmax=611 nm' dir.

Malachite green triaril metan grubu bir boyadır, yün, deri ve kağıt boyamada sıklıkla kullanılır. Maksimum absorbsiyon gösterdiği dalga boyu λmax=618 nm' dir.

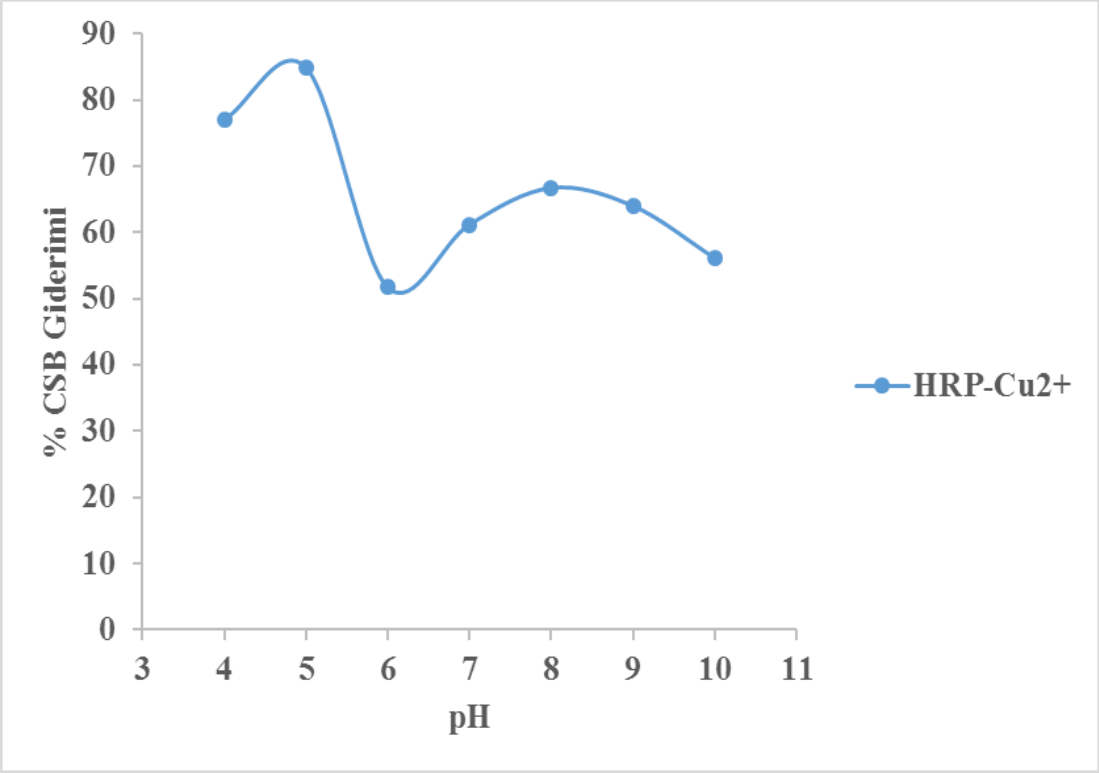


Şekil 4.22 Boya giderimi için kullanılan boyalar

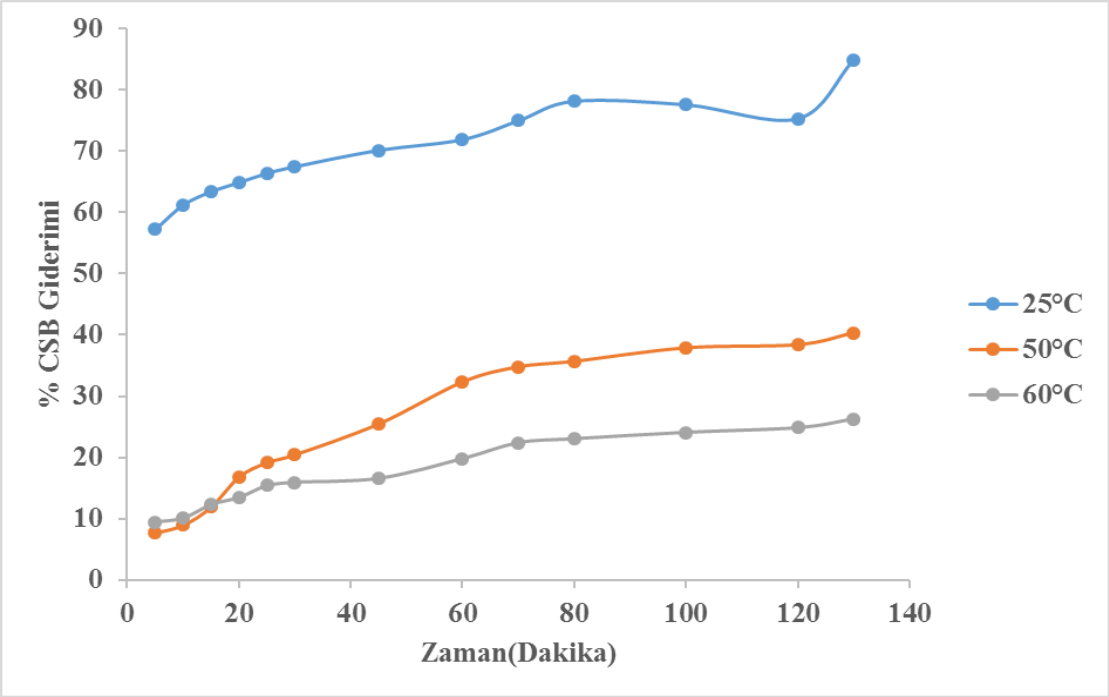
4.7.1 Chicago sky blue (CSB) giderimi

Sentezlenen HRP-Cu^{2+}, LiP-Cu^{2+} ve MnP-Cu^{2+} hibrit nano yapıların CSB gideriminde optimum pH koşulunun tespit edilebilmesi için pH 4-10 aralığında PBS tamponları kullanılarak boya giderimi ayrı ayrı gerçekleştirildi.

Farklı pH değerlerine sahip tampon ortamında yapılan giderim sonrası HRP-Cu^{2+} için **Şekil 4.23**'de görüldüğü üzere optimum pH değeri 5 ve % CSB giderimi 84,95 olarak tespit edilmiştir.

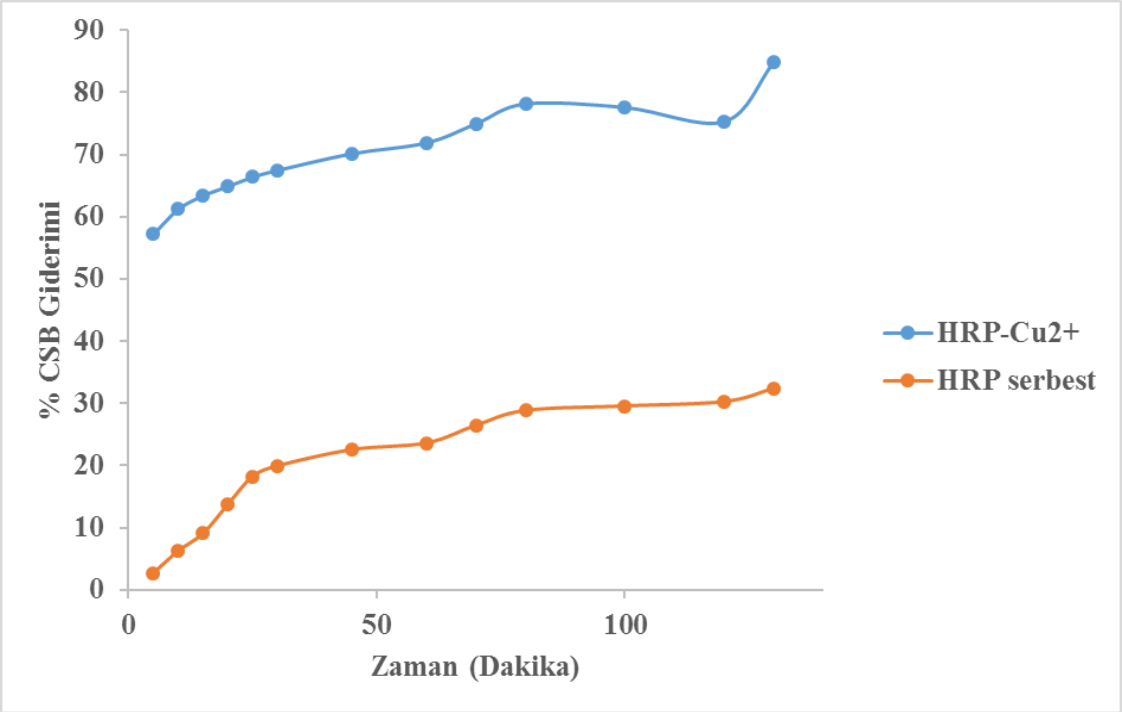


Şekil 4.23 HRP-Cu^{2+} hibrit nano yapı kullanılarak yapılan CSB giderimine ortam pH'ının etkisi ([HRP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [CSB]=0.066 mg mL-1, λ=618 nm, 130. dakika, 25°C)



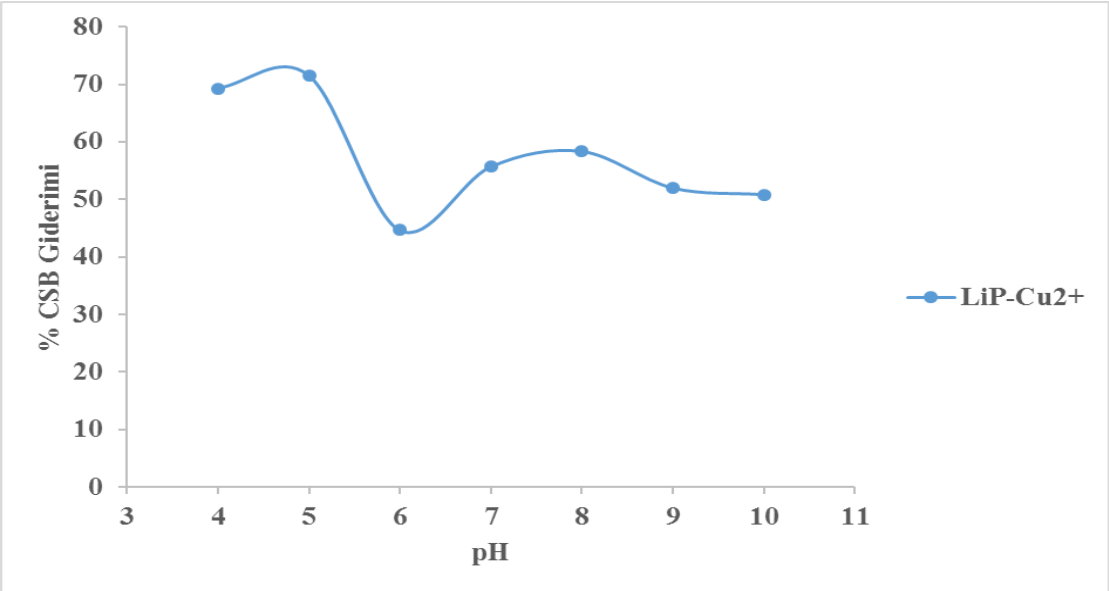
Şekil 4.24 HRP-Cu^{2+} kullanılarak yapılan CSB giderimine ortam sıcaklığının etkisi ([HRP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [CSB]=0.066 mg mL-1, λ=618 nm, 130.dakika, PBS pH 5)

Optimum pH tespit edildikten sonra optimum reaksiyon sıcaklığının tespit edilebilmesi için üç farklı sıcaklık test edildi. **Şekil 4.24**'de görüldüğü üzere oda sıcaklığında gerçekleştirilen boya gideriminde HRP-Cu^{2+} hibrit yapısı 130. dakikada %84,95 oranında CSB giderirken sıcaklık yükseltildiğinde giderim azalmış %40 ve 26'ya düşmüştür. HRP-Cu^{2+} için CSB gideriminde optimum sıcaklık oda sıcaklığı kabul edilen 25°C olarak tespit edilmiştir.



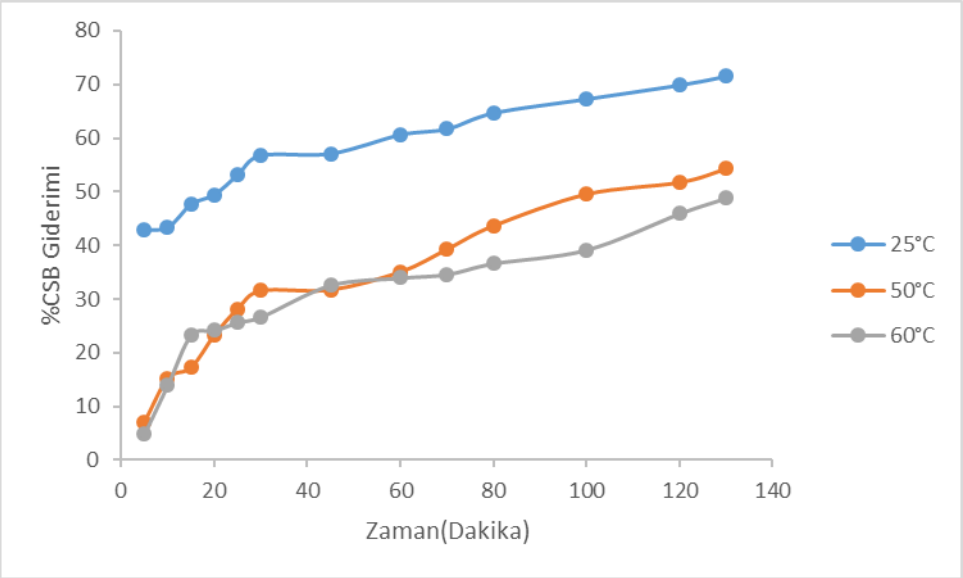
Şekil 4.25 Optimum koşullarda HRP-Cu^{2+} kullanılarak yapılan CSB giderimi ([HRP-Cu^{2+}] = 1 mg mL-1, [HRP] = 0,1 mg mL-1, [CSB]=0.066 mg mL-1, λ=618 nm, T=25°C, PBS pH 5)

Optimum pH ve sıcaklık tespit edildikten sonra HRP-Cu^{2+} ve serbest enzimin karşılaştırmalı olarak CSB giderimi zaman kontrollü olarak gerçekleştirildi (**Şekil 4.25).** 130. dakikada serbest HRP %32,38, HRP-Cu^{2+} ise %84,94 oranında CSB boyasını gidermiştir.



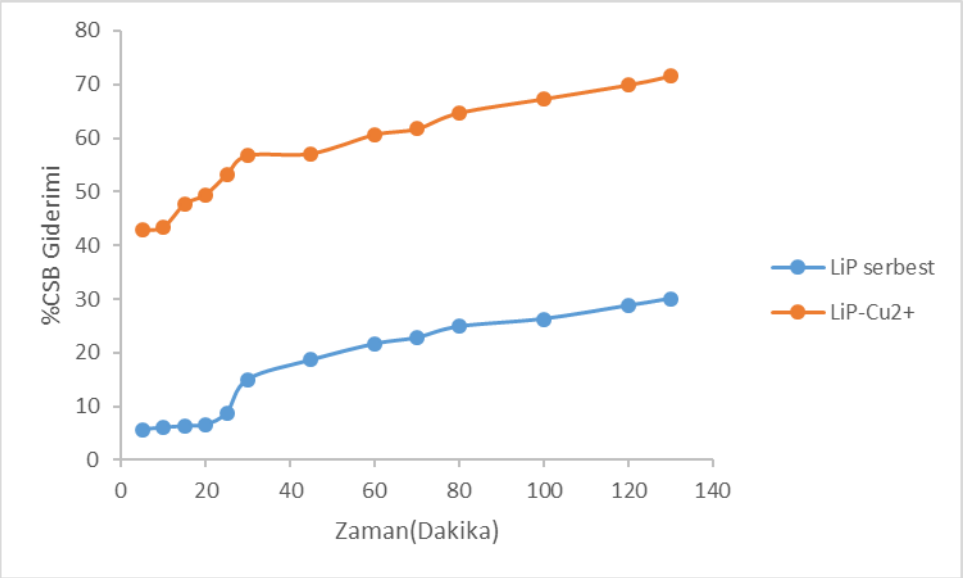
Şekil 4.26 LiP-Cu^{2+} hibrit nano yapı kullanılarak yapılan CSB giderimine ortam pH'ının etkisi ([LiP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [CSB]=0.066 mg mL-1, λ=618 nm, 130.dakika, 25°C)

Farklı pH değerlerine sahip tampon ortamında yapılan giderim sonrası LiP-Cu^{2+} için **Şekil 4.26**'da görüldüğü üzere optimum pH değeri 5 ve % CSB giderimi 71,55 olarak tespit edilmiştir.



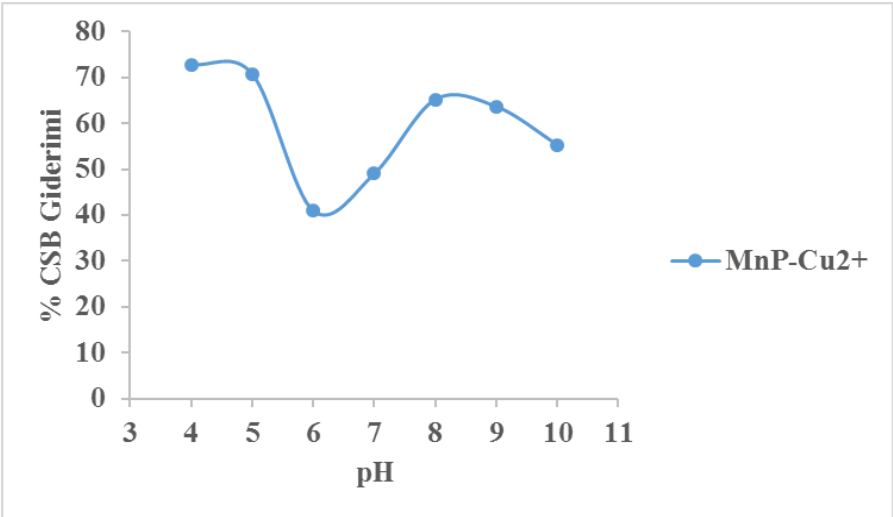
Şekil 4.27 LiP-Cu^{2+} kullanılarak yapılan CSB giderimine ortam sıcaklığının etkisi ([LiP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [CSB]=0.066 mg mL-1, λ=618 nm, 130.dakika, PBS pH 5)

Optimum pH tespit edildikten sonra optimum reaksiyon sıcaklığının tespit edilebilmesi için üç farklı sıcaklık test edildi. **Şekil 4.27'**de görüldüğü üzere oda sıcaklığında gerçekleştirilen boya gideriminde LiP-Cu^{2+} hibrit yapısı 130. dakikada %71,55 oranında CSB giderirken sıcaklık yükseltildiğinde giderim azalmış %54 ve 48'e düşmüştür. LiP-Cu^{2+} için CSB gideriminde optimum sıcaklık oda sıcaklığı kabul edilen 25°C olarak tespit edilmiştir.



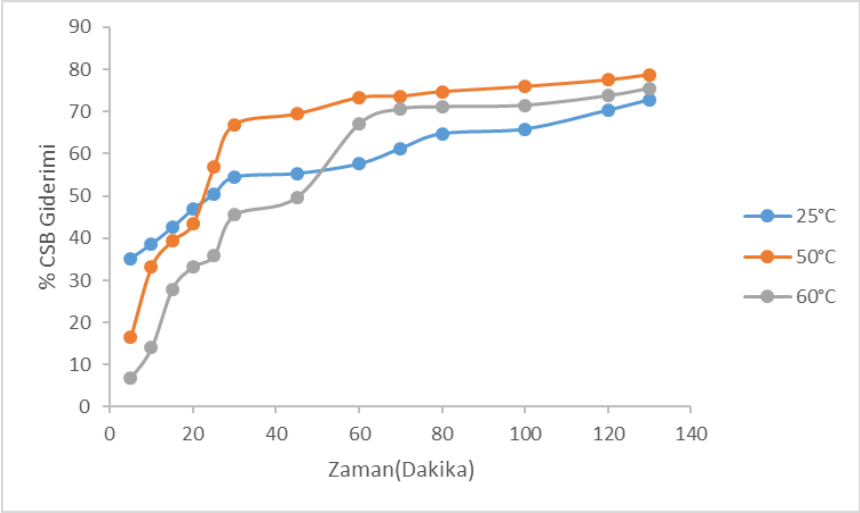
Şekil 4.28 Optimum koşullarda LiP-Cu^{2+} kullanılarak yapılan CSB giderimi ([LiP-Cu^{2+}] = 1 mg mL-1, [LiP] = 0,1 mg mL-1, [CSB]=0.066 mg mL-1, λ=618 nm, T=25°C, PBS pH 5)

Optimum pH ve sıcaklık tespit edildikten sonra LiP-Cu^{2+} ve serbest enzimin karşılaştırmalı olarak CSB giderimi zaman kontrollü olarak gerçekleştirildi (**Şekil 4.28)** 130. dakikada serbest LiP %30, LiP-Cu^{2+} ise %71,5 oranında CSB boyasını gidermiştir.



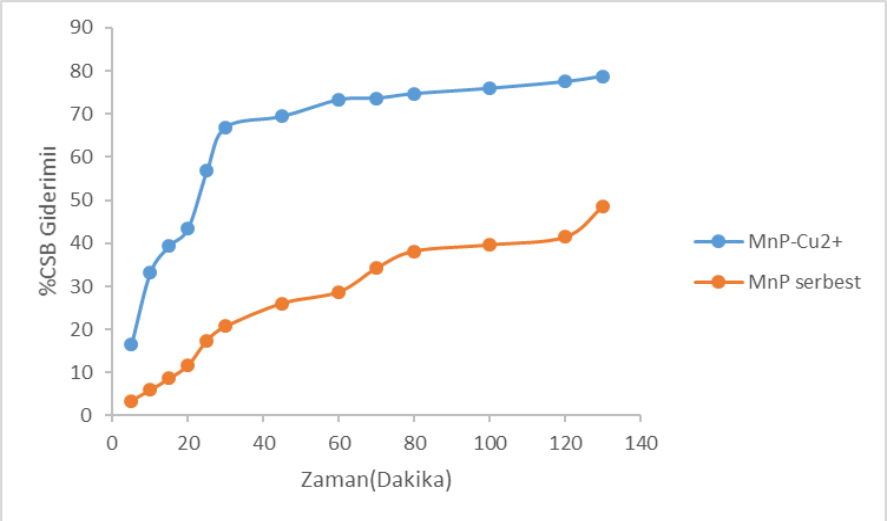
Şekil 4.29 MnP-Cu^{2+} hibrit nano yapı kullanılarak yapılan CSB giderimine ortam pH'ının etkisi ([MnP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [CSB]=0.066 mg mL-1, λ=618 nm, 130.dakika, 25°C)

Farklı pH değerlerine sahip tampon ortamında yapılan giderim sonrası MnP-Cu^{2+} için **Şekil 4.29**'da görüldüğü üzere optimum pH değeri 4 ve % CSB giderimi 72,79 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.30 MnP-Cu^{2+} kullanılarak yapılan CSB giderimine ortam sıcaklığının etkisi ([MnP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [CSB]=0.066 mg mL-1, λ=618 nm, 130.dakika, PBS pH 4)

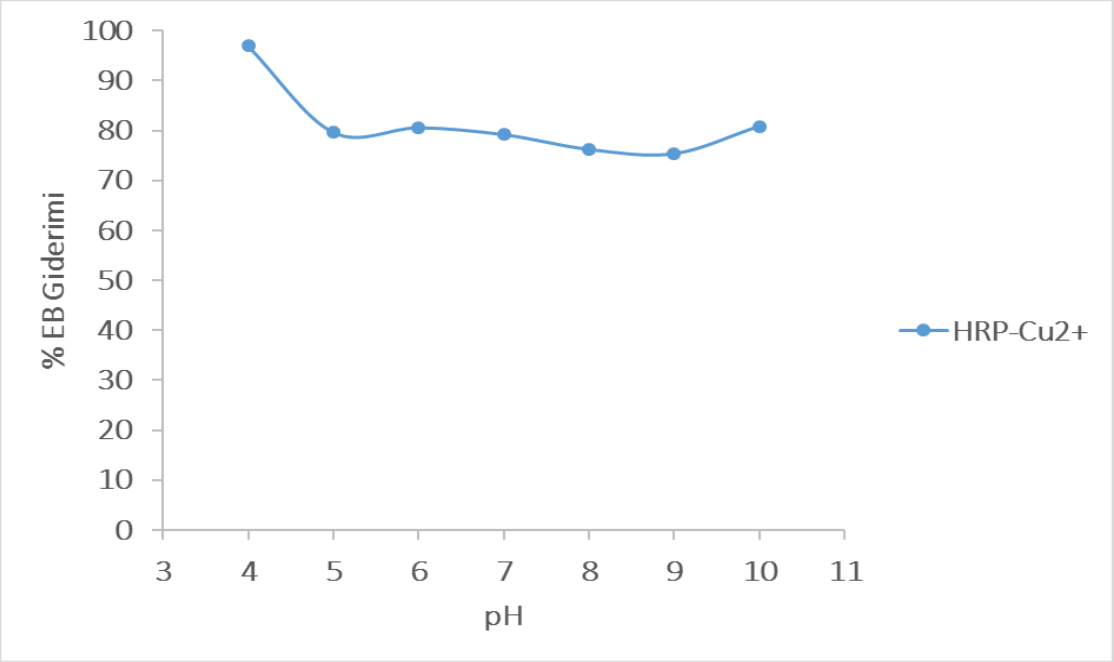
Optimum pH tespit edildikten sonra optimum reaksiyon sıcaklığının tespit edilebilmesi için üç farklı sıcaklık test edildi. **Şekil 4.30**' de görüldüğü üzere oda sıcaklığında gerçekleştirilen boya gideriminde MnP-Cu^{2+} hibrit yapısı 130.dakikada %71 oranında CSB giderirken sıcaklık yükseltildiğinde giderim artmış ve %78 ve 75'e çıkmıştır. MnP-Cu^{2+} için CSB gideriminde optimum sıcaklık 50°C olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.31 Optimum koşullarda MnP-Cu^{2+} kullanılarak yapılan CSB giderimi ([MnP-Cu^{2+}] = 1 mg mL-1, [MnP] = 0,1 mg mL-1, [CSB]=0.066 mg mL-1, λ=618 nm, T=50°C, PBS pH 4)

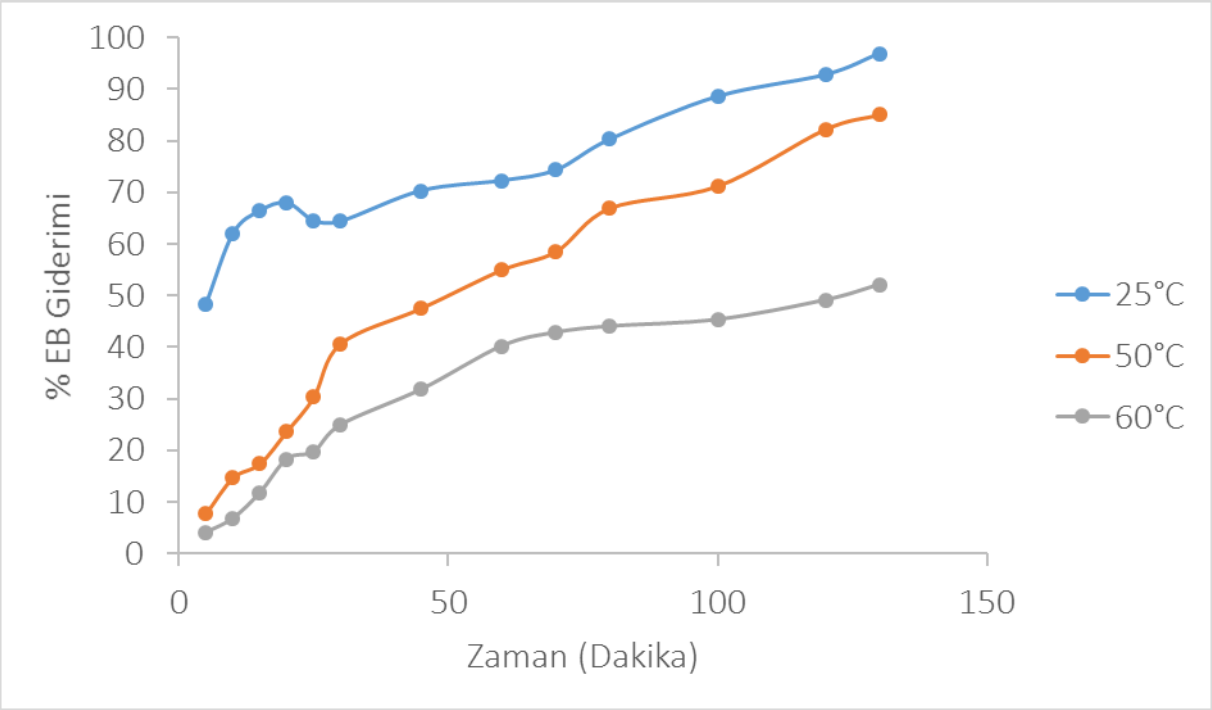
Optimum pH ve sıcaklık tespit edildikten sonra MnP-Cu^{2+} ve serbest enzimin karşılaştırmalı olarak CSB giderimi zaman kontrollü olarak gerçekleştirildi (**Şekil 31**) 130. dakikada serbest MnP %48,66, MnP-Cu^{2+} ise %78,73 oranında CSB boyasını gidermiştir.

4.7.2 Evans blue (EB) giderimi



Şekil 4.32 HRP-Cu^{2+} hibrit nano yapı kullanılarak yapılan EB giderimine ortam pH'ının etkisi ([HRP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [EB]=0.0333 mg mL-1, λ=611 nm, 130.dakika, 25°C)

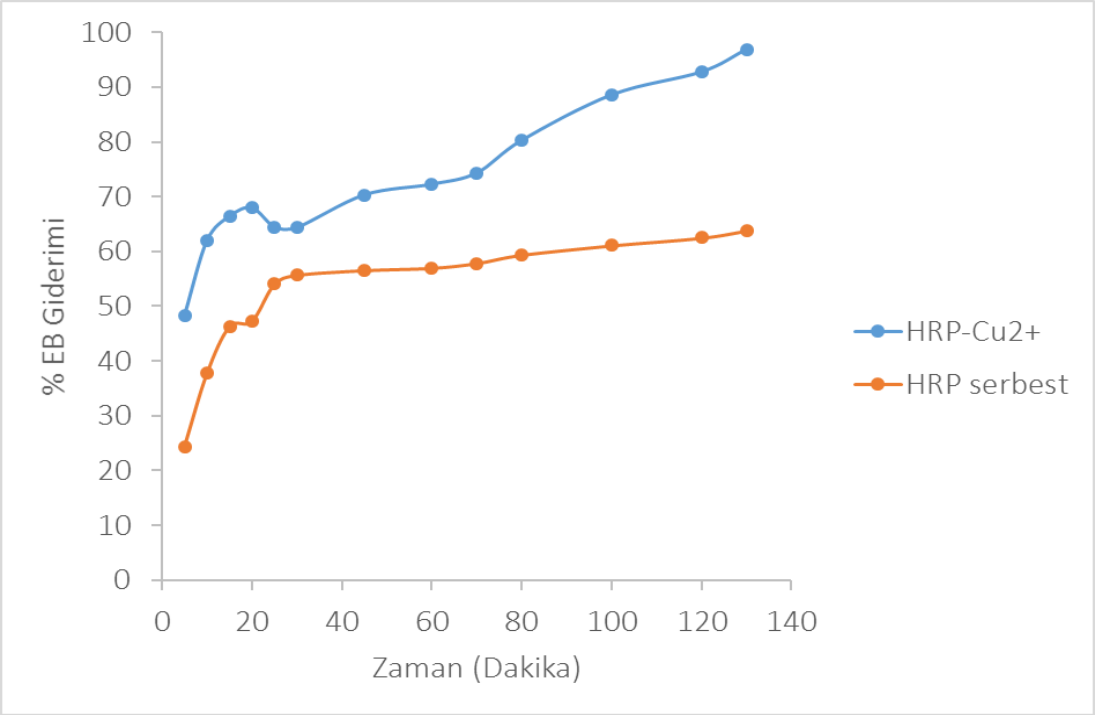
Farklı pH değerlerine sahip tampon ortamında yapılan giderim sonrası HRP-Cu^{2+} için **Şekil 4.32**'de görüldüğü üzere optimum pH değeri 4 ve % EB giderimi 96,92 olarak tespit edilmiştir.



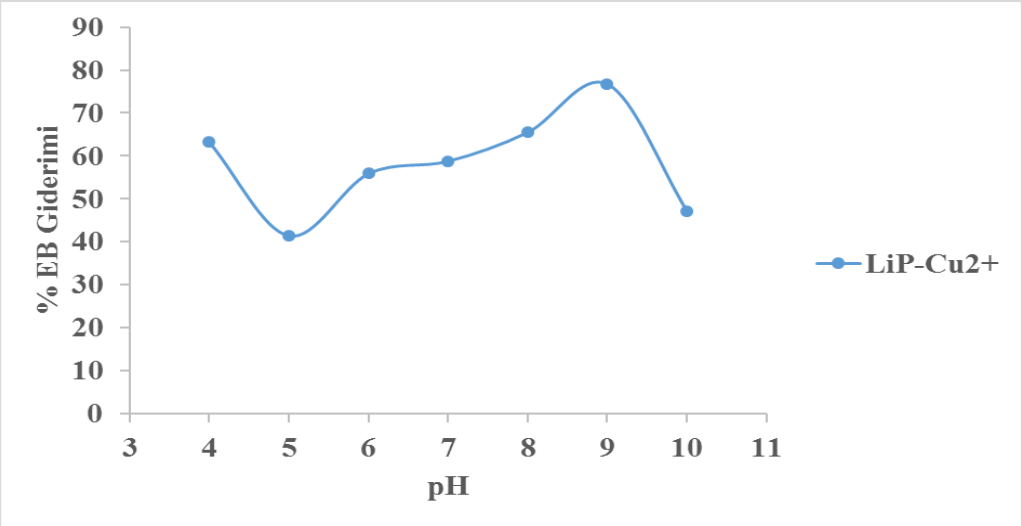
Şekil 4.33 HRP-Cu^{2+} hibrit nano yapı kullanılarak yapılan EB giderimine ortam sıcaklığının etkisi ([HRP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [EB]=0.0333 mg mL-1, λ=611 nm, 130.dakika, PBS pH 4)

Optimum pH tespit edildikten sonra optimum reaksiyon sıcaklığının tespit edilebilmesi için üç farklı sıcaklık test edildi. **Şekil 4.33**' de görüldüğü üzere oda sıcaklığında gerçekleştirilen boya gideriminde HRP-Cu^{2+} hibrit yapısı 130.dakikada %96,92 oranında EB giderirken sıcaklık yükseltildiğinde giderim azalmış ve %85 ve 52'ye düşmüştür. HRP-Cu^{2+} için EB gideriminde optimum sıcaklık 25°C olarak tespit edilmiştir.

Optimum pH ve sıcaklık tespit edildikten sonra HRP-Cu^{2+} ve serbest enzimin karşılaştırmalı olarak EB giderimi zaman kontrollü olarak gerçekleştirildi (**Şekil 4.34**) 130. dakikada serbest MnP %63,78, HRP-Cu^{2+} ise %96,92 oranında EB boyasını gidermiştir.

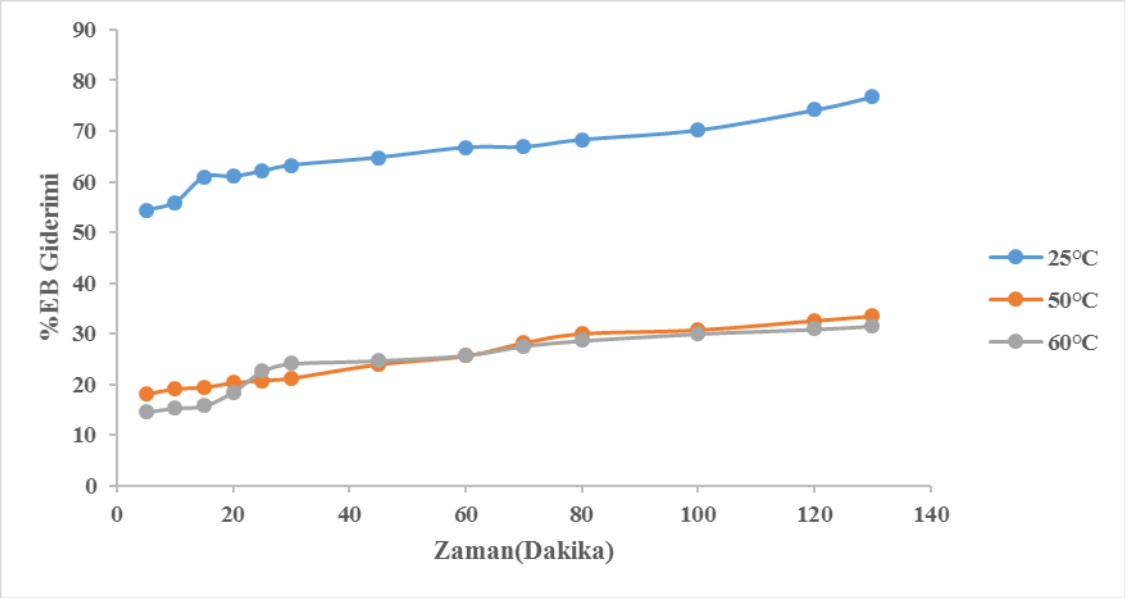


Şekil 4.34 Optimum koşullarda HRP-Cu^{2+} hibrit nano yapı kullanılarak yapılan EB giderimi ([HRP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [HRP] = 0,1 mg mL-1, [EB]=0.0333 mg mL-1, λ=611 nm, T=25°C, PBS pH 4)



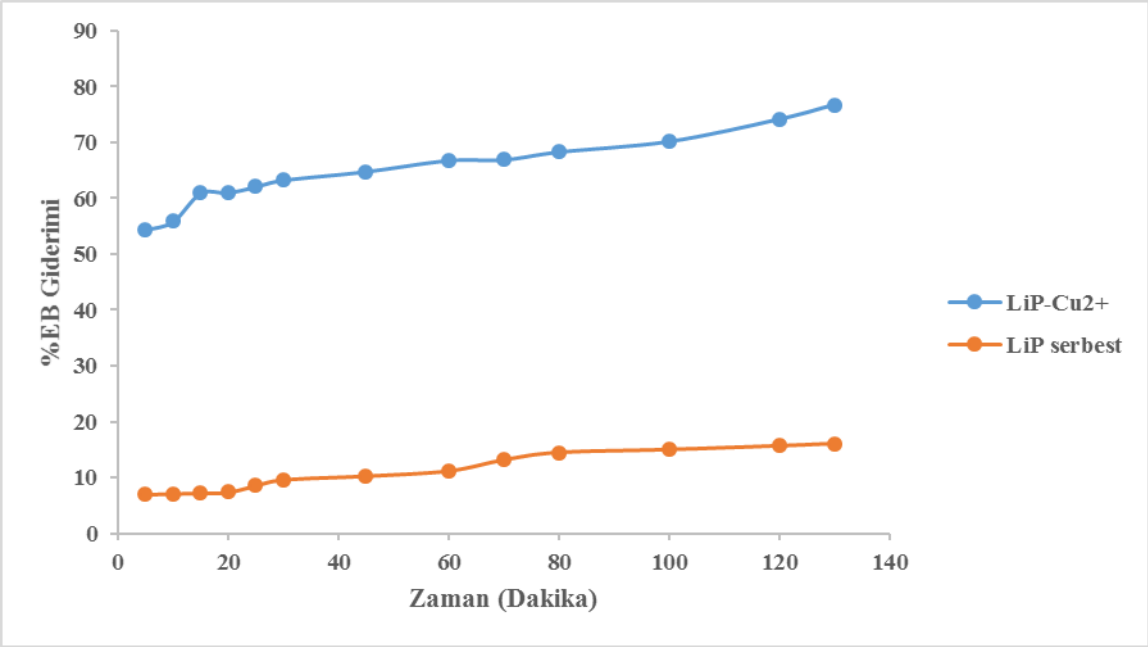
Şekil 4.35 LiP-Cu^{2+} hibrit nano yapı kullanılarak yapılan EB giderimine ortam pH'ının etkisi (LiP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [EB]=0.0333 mg mL-1, λ=611 nm, 130.dakika, 25°C)

Farklı pH değerlerine sahip tampon ortamında yapılan giderim sonrası LiP-Cu^{2+} için **Şekil 4.35**'de görüldüğü üzere optimum pH değeri 9 ve % EB giderimi 76 olarak tespit edilmiştir.



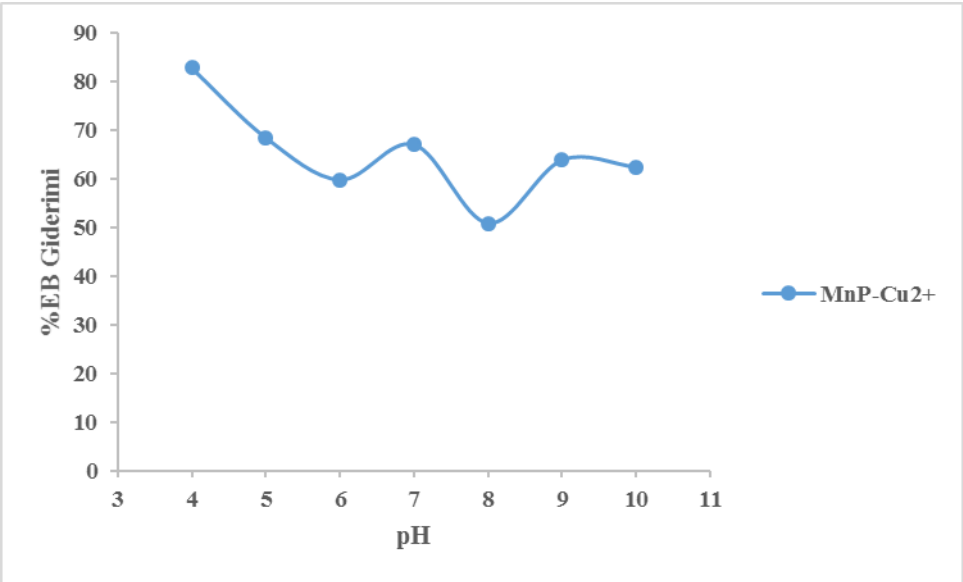
Şekil 4.36 LiP-Cu^{2+} hibrit nano yapı kullanılarak yapılan EB giderimine ortam sıcaklığının etkisi ([LiP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [EB]=0.0333 mg mL-1, λ=611 nm, PBS pH 9)

Optimum pH tespit edildikten sonra optimum reaksiyon sıcaklığının tespit edilebilmesi için üç farklı sıcaklık test edildi. **Şekil 4.36**'da görüldüğü üzere oda sıcaklığında gerçekleştirilen boya gideriminde LiP-Cu^{2+} hibrit yapısı 130.dakikada %76 oranında EB giderirken sıcaklık yükseltildiğinde giderim azalmış %31 ve 33'e düşmüştür. LiP-Cu^{2+} için EB gideriminde optimum sıcaklık oda sıcaklığı kabul edilen 25°C olarak tespit edilmiştir.



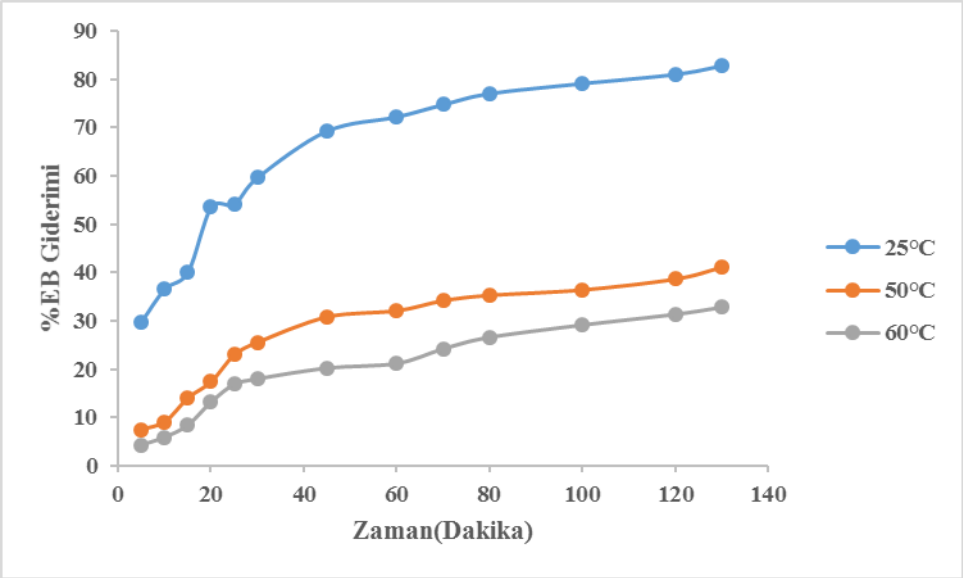
Şekil 4.37 Optimum koşullarda LiP-Cu^{2+} hibrit nano yapı kullanılarak yapılan EB giderimi ([LiP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [LiP] = 0,1 mg mL-1, [EB]=0.0333 mg mL-1, λ=611 nm, T=25°C, PBS pH 9)

Optimum pH ve sıcaklık tespit edildikten sonra LiP-Cu^{2+} ve serbest enzimin karşılaştırmalı olarak EB giderimi zaman kontrollü olarak gerçekleştirildi (**Şekil 4.37**) 130. dakikada serbest LiP %16, LiP-Cu^{2+} ise %76 oranında EB boyasını gidermiştir.



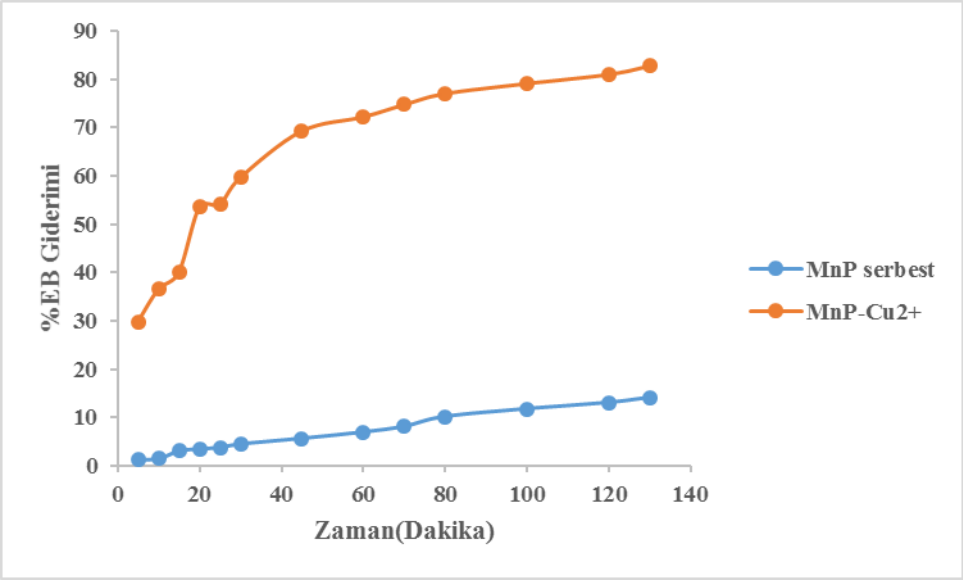
Şekil 4.38 MnP-Cu^{2+} hibrit nano yapı kullanılarak yapılan EB giderimine ortam pH'ının etkisi (MnP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [EB]=0.0333 mg mL-1, λ=611 nm, 130.dakika, 25°C)

Farklı pH değerlerine sahip tampon ortamında yapılan giderim sonrası MnP-Cu^{2+} için **Şekil 4.38**'de görüldüğü üzere optimum pH değeri 4 ve % EB giderimi 82 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.39 MnP-Cu^{2+} hibrit nano yapı kullanılarak yapılan EB giderimine ortam sıcaklığının etkisi ([MnP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [EB]=0.0333 mg mL-1, λ=611 nm, PBS pH 4)

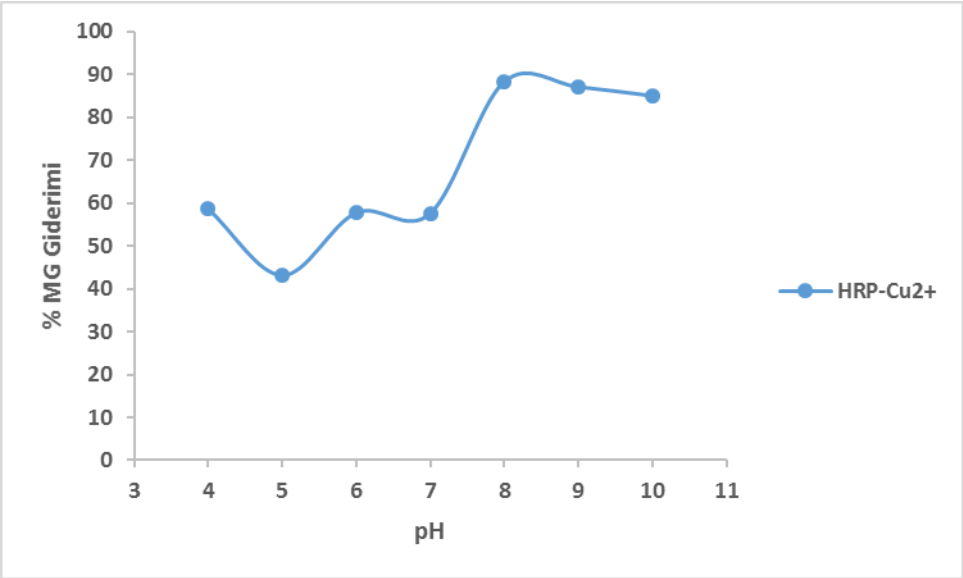
Optimum pH tespit edildikten sonra optimum reaksiyon sıcaklığının tespit edilebilmesi için üç farklı sıcaklık test edildi. **Şekil 4.39**'da görüldüğü üzere oda sıcaklığında gerçekleştirilen boya gideriminde MnP-Cu^{2+} hibrit yapısı 130. dakikada %82 oranında EB giderirken sıcaklık yükseltildiğinde giderim azalmış %40 ve 32'e düşmüştür. MnP-Cu^{2+} için EB gideriminde optimum sıcaklık oda sıcaklığı kabul edilen 25°C olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.40 Optimum koşullarda MnP-Cu^{2+} hibrit nano yapı kullanılarak yapılan EB giderimi ([MnP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [MnP] = 0,1 mg mL-1, [EB]=0.0333 mg mL-1, λ=611 nm, T=25°C, PBS pH 4)

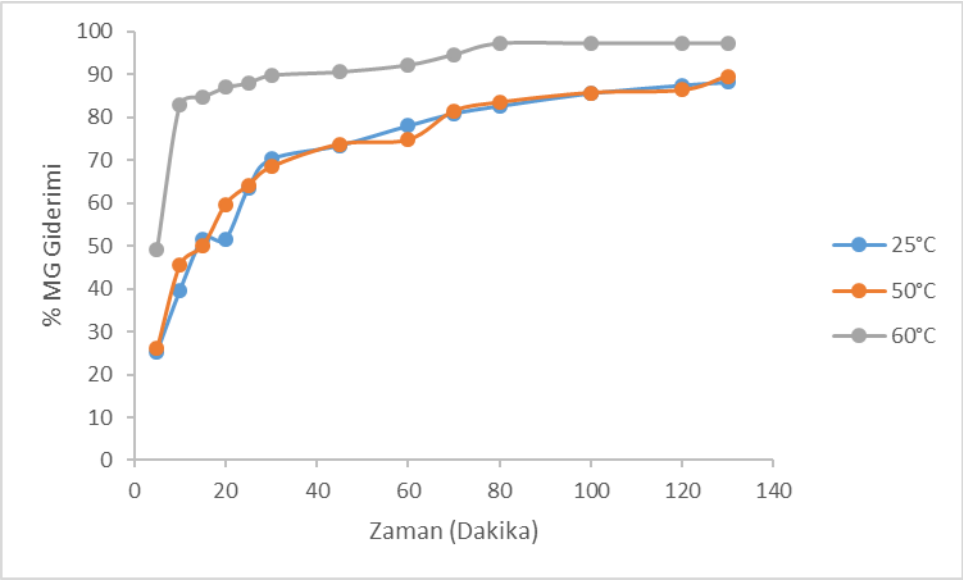
Optimum pH ve sıcaklık tespit edildikten sonra MnP-Cu^{2+} ve serbest enzimin karşılaştırmalı olarak EB giderimi zaman kontrollü olarak gerçekleştirildi (**Şekil 4.40)** 130. dakikada serbest LiP %14, MnP-Cu^{2+} ise %82 oranında EB boyasını gidermiştir.

4.7.3 Malachite green (MG) giderimi



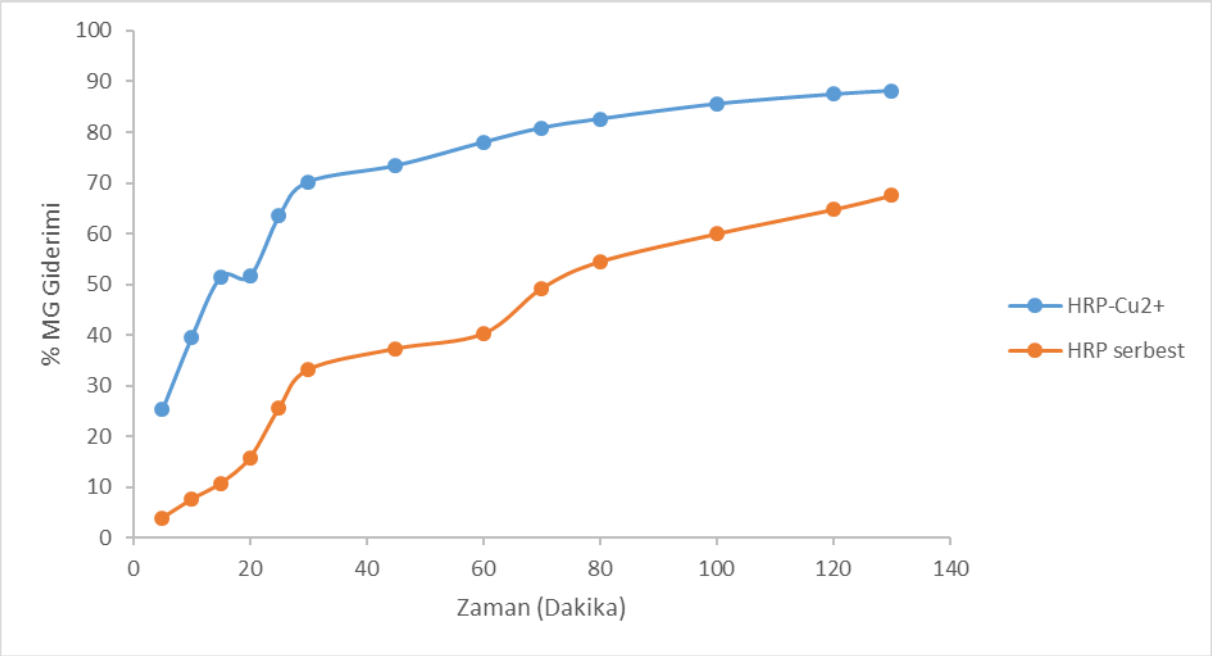
Şekil 4.41 HRP-Cu^{2+} hibrit nano yapı kullanılarak yapılan MG giderimine ortam pH'ının etkisi (HRP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [MG]= 0.03 mg mL-1, λ=618 nm, 130.dakika, 25°C)

Farklı pH değerlerine sahip tampon ortamında yapılan giderim sonrası HRP-Cu^{2+} için **Şekil 4.41**'de görüldüğü üzere optimum pH değeri 8 ve % MG giderimi 88 olarak tespit edilmiştir.



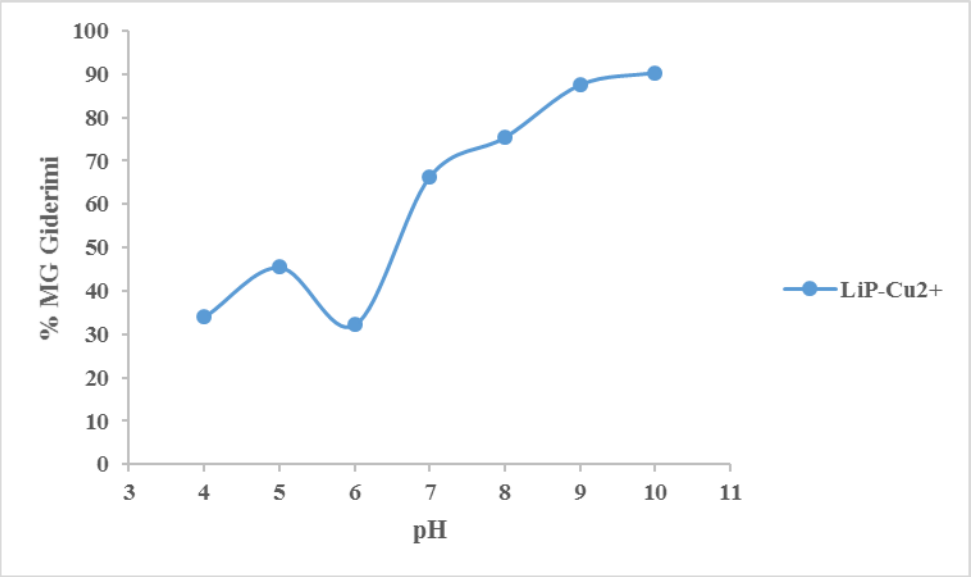
Şekil 4.42 HRP-Cu^{2+} hibrit nano yapı kullanılarak yapılan MG giderimine ortam sıcaklığının etkisi ([HRP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [MG]= 0.03 mg mL-1, λ=618 nm, PBS pH 8)

Optimum pH tespit edildikten sonra optimum reaksiyon sıcaklığının tespit edilebilmesi için üç farklı sıcaklık test edildi. **Şekil 4.42**'de görüldüğü üzere sıcaklık artırıldıkça boya giderimi artmıştır. HRP-Cu^{2+} için MG gideriminde optimum sıcaklık 60°C olarak tespit edilmiştir.



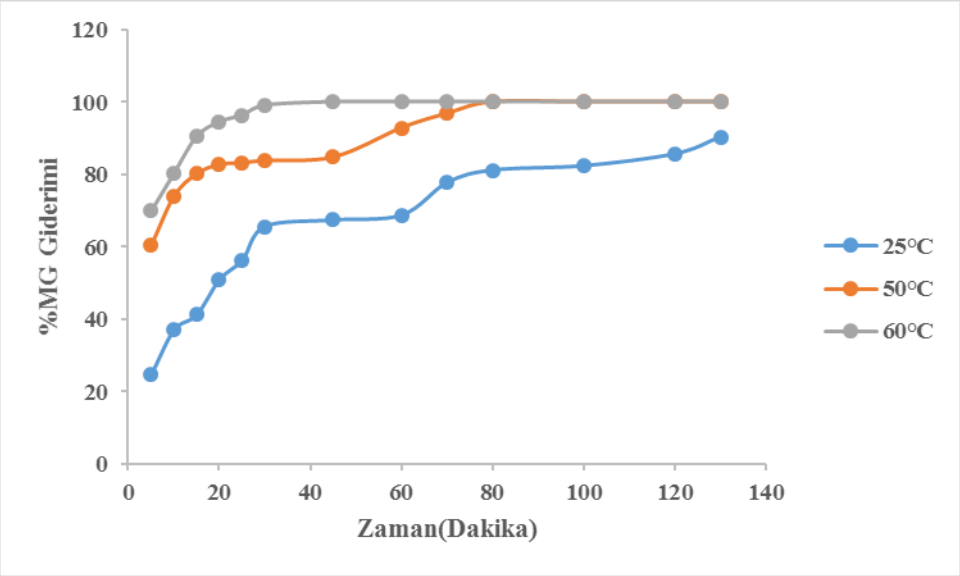
Şekil 4.43 Optimum koşullarda HRP-Cu^{2+} hibrit nano yapı kullanılarak yapılan MG giderimi ([HRP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [HRP] = 0,1 mg mL-1, [MG]=0.03 mg mL-1, λ=618 nm, T=60°C, PBS pH 8)

Optimum pH ve sıcaklık tespit edildikten sonra HRP-Cu^{2+} ve serbest enzimin karşılaştırmalı olarak MG giderimi zaman kontrollü olarak gerçekleştirildi (**Şekil 4.43**) 130. dakikada serbest HRP %67, HRP-Cu^{2+} ise %88 oranında MG boyasını gidermiştir.



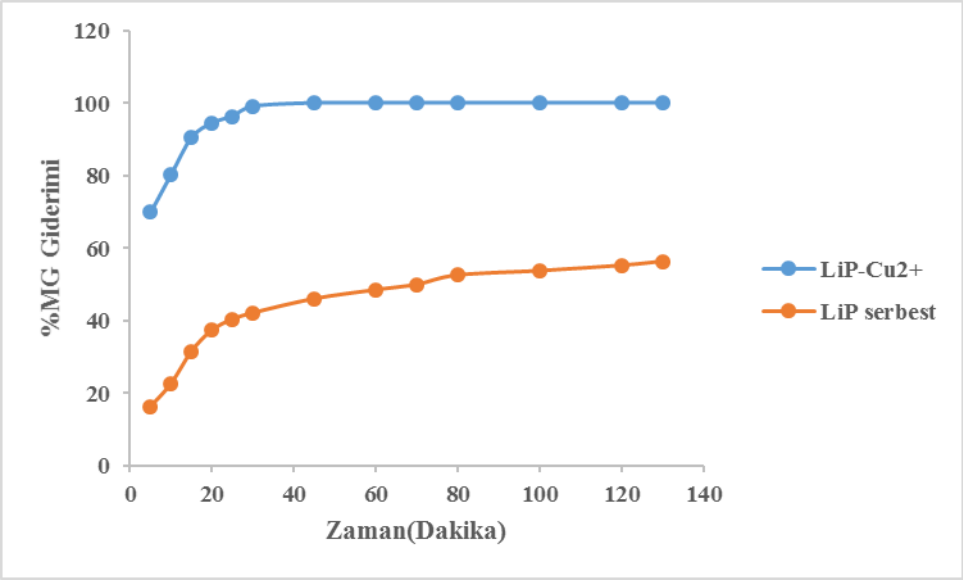
Şekil 4.44 LiP-Cu^{2+} hibrit nano yapı kullanılarak yapılan MG giderimine ortam pH'ının etkisi (LiP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [MG]= 0.03 mg mL-1, λ=618 nm, 130.dakika, 25°C)

Farklı pH değerlerine sahip tampon ortamında yapılan giderim sonrası LiP-Cu^{2+} için **Şekil 4.44**'de görüldüğü üzere optimum pH değeri 10 ve % MG giderimi 90 olarak tespit edilmiştir.



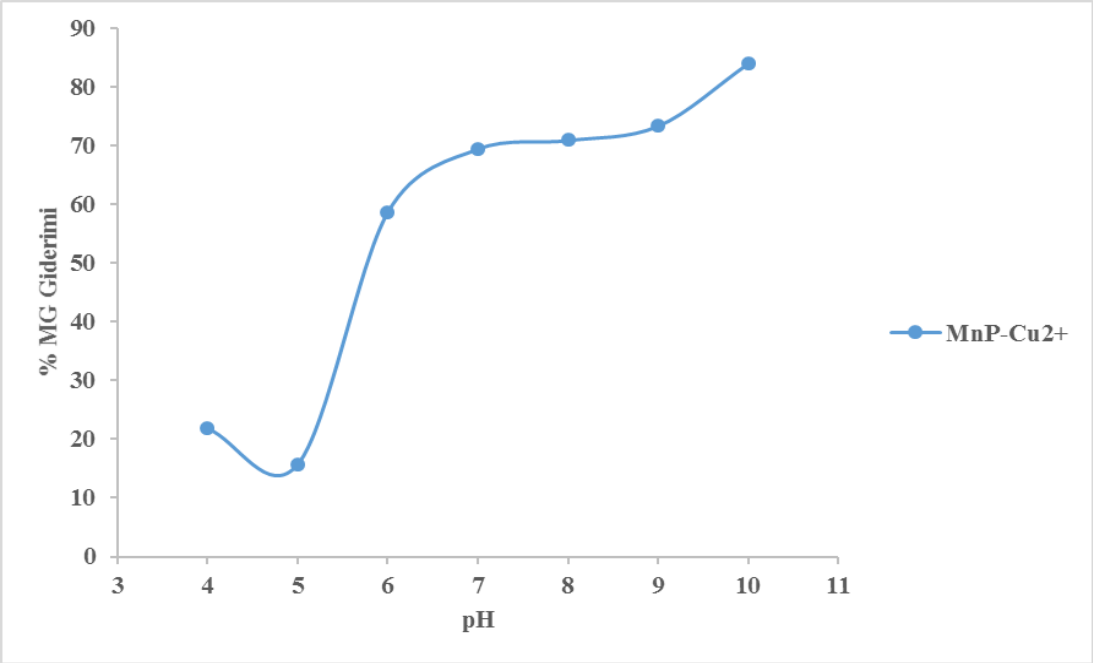
Şekil 4.45 LiP-Cu^{2+} hibrit nano yapı kullanılarak yapılan MG giderimine ortam sıcaklığının etkisi ([LiP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [MG]= 0.03 mg mL-1, λ=618 nm, PBS pH 10)

Optimum pH tespit edildikten sonra optimum reaksiyon sıcaklığının tespit edilebilmesi için üç farklı sıcaklık test edildi. **Şekil 4.45**' de görüldüğü üzere sıcaklık artırıldıkça boya giderimi artmıştır. LiP-Cu^{2+} için MG gideriminde optimum sıcaklık 60°C olarak tespit edilmiştir.



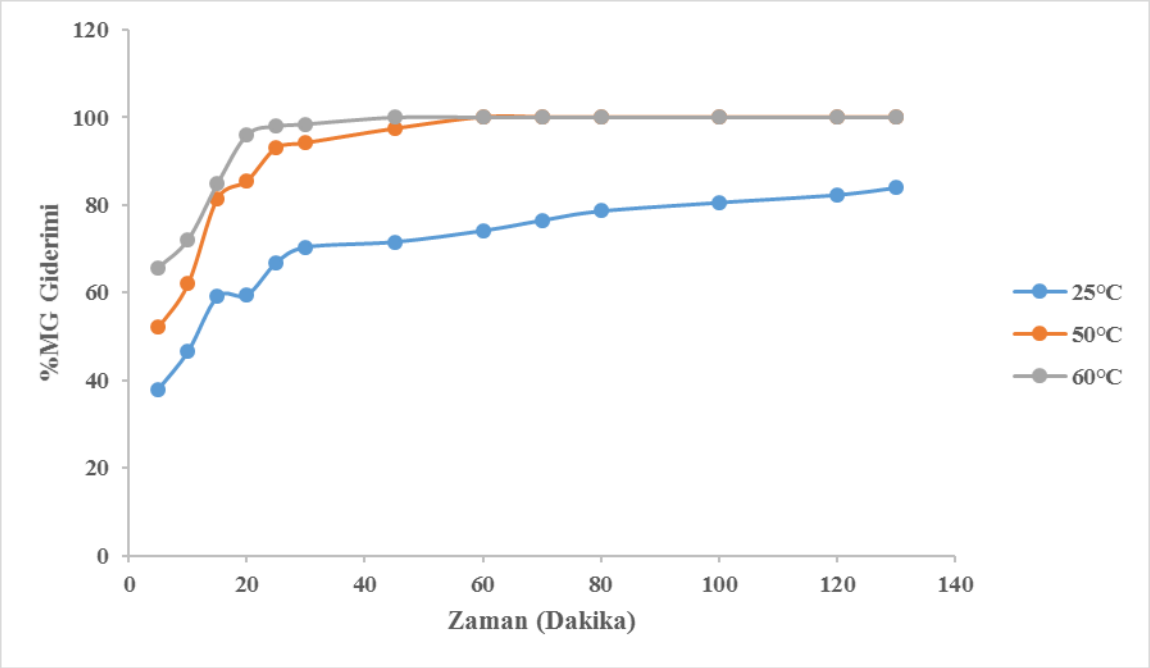
Şekil 4.46 Optimum koşullarda LiP-Cu^{2+} hibrit nano yapı kullanılarak yapılan MG giderimi ([LiP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [LiP] = 0,1 mg mL-1, [MG]=0.03 mg mL-1, λ=618 nm, T=60°C, PBS pH 10)

Optimum pH ve sıcaklık tespit edildikten sonra LiP-Cu^{2+} ve serbest enzimin karşılaştırmalı olarak EB giderimi zaman kontrollü olarak gerçekleştirildi (**Şekil 4.46)** 130. dakikada serbest LiP %56, LiP-Cu^{2+} ise %100 oranında MG boyasını gidermiştir.



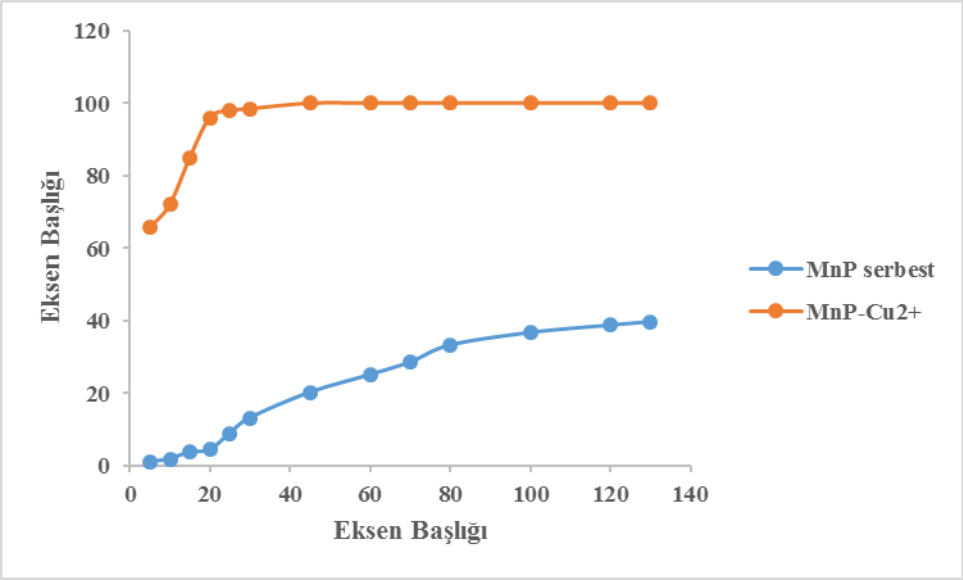
Şekil 4.47 MnP-Cu^{2+} hibrit nano yapı kullanılarak yapılan MG giderimine ortam pH'ının etkisi (MnP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [MG]= 0.03 mg mL-1, λ=618 nm, 130.dakika, 25°C)

Farklı pH değerlerine sahip tampon ortamında yapılan giderim sonrası MnP-Cu^{2+} için **Şekil 4.47**'de görüldüğü üzere optimum pH değeri 10 ve % MG giderimi %83,98 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.48 MnP-Cu^{2+} hibrit nano yapı kullanılarak yapılan MG giderimine ortam sıcaklığının etkisi ([MnP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [MG]= 0.03 mg mL-1, λ=618 nm, PBS pH 10)

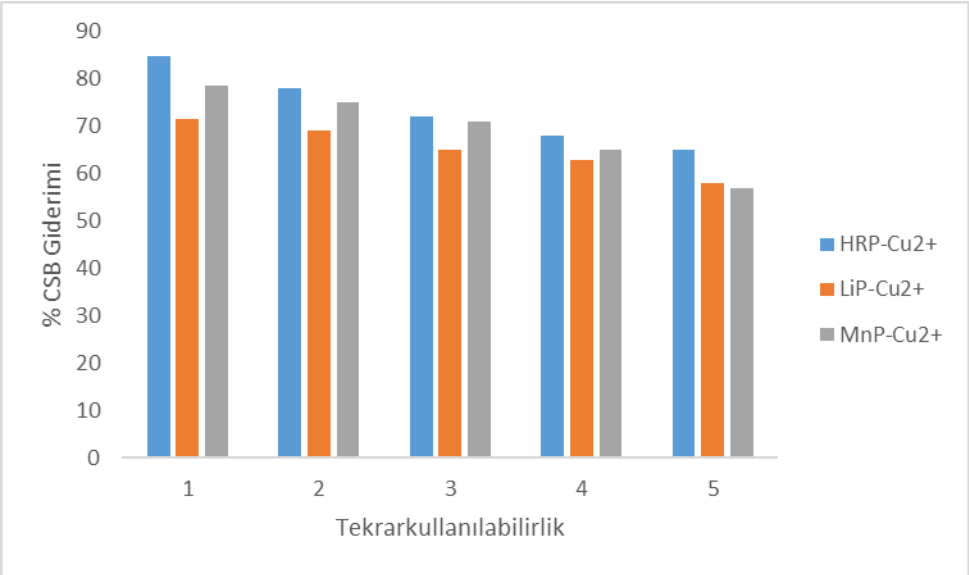
Optimum pH tespit edildikten sonra optimum reaksiyon sıcaklığının tespit edilebilmesi için üç farklı sıcaklık test edildi. **Şekil 4.48**'de görüldüğü üzere sıcaklık artırıldıkça boya giderimi artmıştır. MnP-Cu^{2+} için MG gideriminde optimum sıcaklık 60°C olarak tespit edilmiştir.



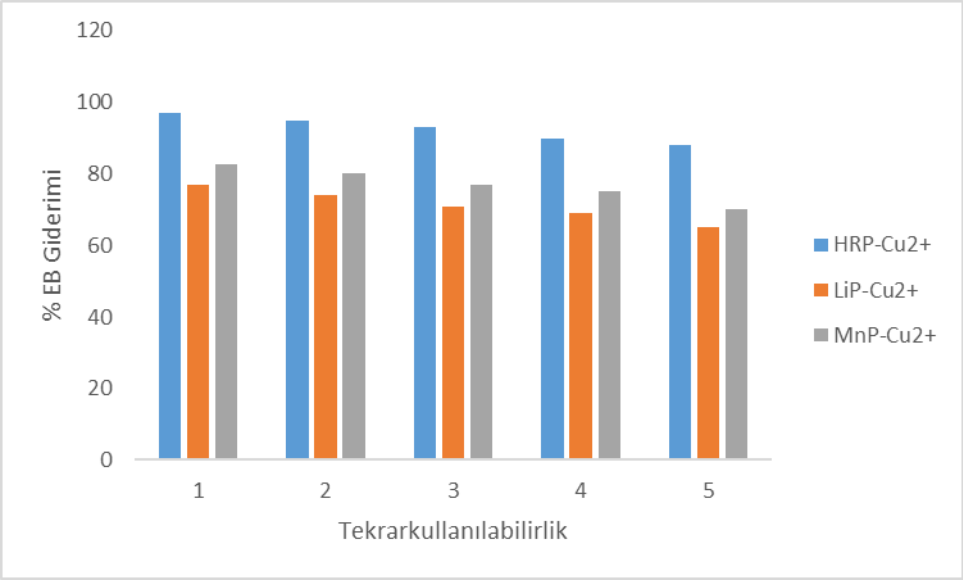
Şekil 4.49 Optimum koşullarda MnP-Cu^{2+} hibrit nano yapı kullanılarak yapılan MG giderimi ([MnP-Cu^{2+}] =1 mg mL-1, [MnP] = 0,1 mg mL-1, [MG]=0.03 mg mL-1, λ=618 nm, T=60°C, PBS pH 10)

Optimum pH ve sıcaklık tespit edildikten sonra MnP-Cu^{2+} ve serbest enzimin karşılaştırmalı olarak MG giderimi zaman kontrollü olarak gerçekleştirildi (**Şekil 4.49**) 130. dakikada serbest MnP %39, MnP-Cu^{2+} ise %100 oranında MG boyasını gidermiştir.

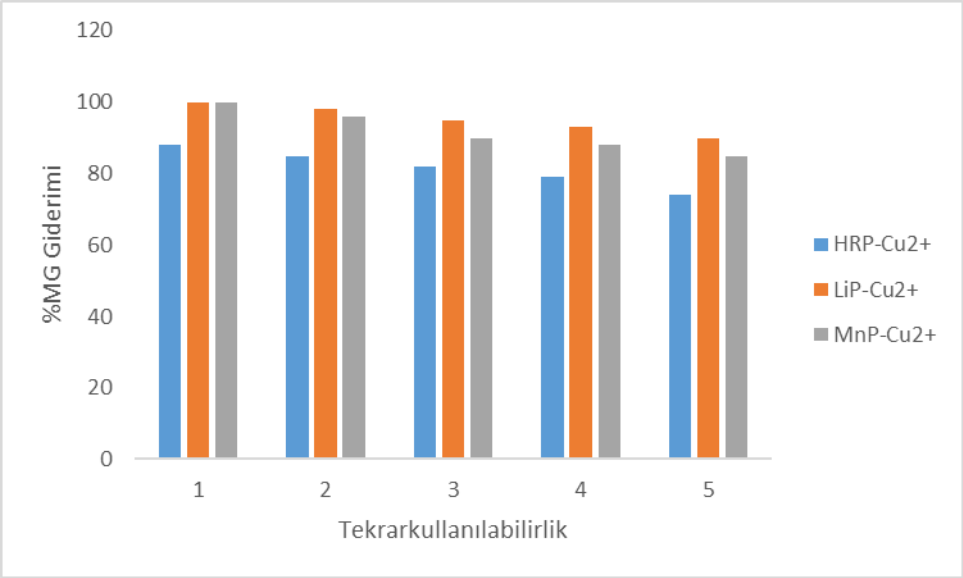
4.8 Çiçek şekilli hibrit nano yapıların boya gideriminde tekrar kullanılabilirliği



Şekil 4.50 Çiçek şekilli hibrit nano yapıların CSB gideriminde tekrar kullanılabilirliği



Şekil 4.51 Çiçek şekilli hibrit nano yapıların EB gideriminde tekrar kullanılabilirliği



Şekil 4.52 Çiçek şekilli hibrit nano yapıların MG gideriminde tekrar kullanılabilirliği

5 TARTIŞMA VE SONUÇ

Enzimlerin (katalizörlerin) pahalı ve ortam koşullarına karşı dayanıksız olması, bilim adamlarını enzimlerin daha ekonomik ve kullanışlı hale getirilme olanaklarının araştırılmasına yöneltmiştir. Bu amaçla etkinliklerinin, aktivitelerinin, kararlılıklarının ve geri kazanımlarının arttırılması gerekmektedir. Son birkaç yıldır farklı bir enzim immobilize yaklaşımı kullanılarak enzimlerin aktivitesinin ve kararlılığının yükseltilmesi hedeflenmektedir. Bu amaçla Dr. Richard Zare ve arkadaşları (2012) tarafından bazı enzim ve metal iyonların reaksiyonları sayesinde çiçek benzeri şekillere (nanoflower) sahip hibrit yapıların sentezi literatürde rapor edilmiştir. Sentezlenen bu çiçek-şekilli hibrit yapılardaki enzimlerin aktivitelerinin ve kararlılıklarının serbest enzimlere ve diğer klasik immobilizasyon yöntemlerine göre dikkat çekici ölçüde arttığı gözlemlenmiştir.

Önerilen bu projede, çiçek benzeri şekillere sahip HRP, LiP ve MnP-Cu^{2+} hibrit nano yapılar sentezlenmiş, morfolojileri SEM, EDX, XRD ve FTIR analizleri ile karakterize edilmiştir. Sentez sırasında optimum pH, sıcaklık, enzim ve metal derişimi gibi parametreler araştırılmış ve optimum koşullar tespit edilmiştir. Substratlarına karşı sentezlenen hibrit nano yapılar ve serbest enzimlerin aktivitesi karşılaştırmalı olarak irdelenmiş ve hibrit yapılardaki enzimlerin aktivitelerinin ve kararlılıklarının serbest enzimlere ve diğer klasik immobilizasyon yöntemlerine göre dikkat çekici ölçüde arttığı gözlemlenmiştir. Yüksek katalitik aktivite ve kararlılığa sahip çiçek şekilli enzim-Cu^{2+} hibrit yapıların boya gideriminde kullanılabilirliği seçilmiş bazı tekstil boyalarına karşı test edilmiştir. Boya giderimi için optimum şartlar her bir boya için ayrı ayrı belirlenmiştir.

Proje çalışmalarından elde edilen bilimsel ve teknik sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

- Çiçek-şekilli hibrit yapıların oluşumu ilk 6 saatte başlamakta ve 3 gün içinde tamamlanmaktadır.
- Sentez için optimum koşul tespitinde pH ve sıcaklık son derece etkilidir. Enzim izoelektrik noktasının altında pozitif yüklüdür ve bu nedenle enzim molekülleri ile Cu^{2+} iyonları arasında pozitif itme meydana gelir, böylelikle hibrit yapıyı oluşturamazlar. Ayrıca asidik pH değerlerinde $CuSO_4$'ın çözünürlüğünün az olması sentez gerçekleşmemesinin sebeplerindendir. Sentez sıcaklığının hibrit yapı oluşumu üzerine etkisi incelendiğinde +4°C' de gerçekleştirilen sentezde elde edilen yapı oda

sıcaklığında gerçekleştirilen sentezden elde edilen yapıya göre daha kompakt ve yapraklar arasındaki mesafe daha sıkıdır. Kompakt bir yapı eldesi enzim aktivitesinde azalmaya neden olabilmektedir ayrıca hibrit yapının bulunduğu reaksiyon ortamındaki çözünürlüğünü azaltmaktadır. Hibrit yapı sentezi için düzgün ve homojen bir morfoloji optimum koşul olarak tespit edilmiş ve her bir enzim için şu şekildedir.

Hibrit yapı sentezi için optimum şartlar					
Enzim türü	**pH**	**Sıcaklık**	**Enzim [X]**	**Cu [X]**	**Süre**
HRP	7	+4°C	0.02 mg/mL	0.8 mM	3 gün
LiP	7	+4°C	0.02 mg/mL	0.8 mM	3 gün
MnP	7	+4°C	0.02 mg/mL	0.8 mM	3 gün

- Hibrit yapıların karakterizasyonları EDX, XRD ve FTIR ile gerçekleştirilmiştir. EDX spektrumlarında Cu metaline karşılık gelen pikler açıkça görülmektedir. Hibrit yapıların pik pozisyonları $Cu_3(PO_4)$ nano kristallerin kırınım pikleri JCPDS kart (00-022-0548) ile uyum içindedir. FTIR spektrum analizlerinde ise serbest enzim ve hibrit yapıların karakteristik pik pozisyonları açıkça görülmektedir.
- Sentezlenen hibrit yapılar ve serbest enzimlerin aktiviteleri karşılaştırıldığında hibrit yapıların daha yüksek aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir. HRP-Cu^{2+} hibrit yapısı serbest enzime göre 7,4 kat daha yüksek aktivite göstermiştir. LiP-Cu^{2+} hibrit yapısı serbest enzime göre 2,1 kat daha yüksek aktivite göstermiştir. MnP-Cu^{2+} hibrit yapısı serbest enzime göre 2,98 kat daha yüksek aktivite göstermiştir. Verilerin özeti şu şekildedir;

60.dk	**Enzim Aktivitesi (EU/mg)**	**Serbest enzimi (EU/mg)**	**Kat**
HRP-Cu^{2+}	1,876	0,253	7,4
LiP-Cu^{2+}	1,056	0,498	2,1
MnP-Cu^{2+}	1,097	0,368	2,98

- Hibrit nano yapılar ve serbest enzimler karşılaştırmalı olarak endüstride sık kullanılan boyaların gideriminde kullanıldı. Her bir boya için optimum çalışma koşulları tespit edildi. Bu sonuçlar aşağıdaki tabloda özetlenmiştir. Veriler irdelendiğinde peroksidaz enzimlerinin boya gideriminde etkin şekilde kullanılabilirlikleri görülmektedir. Ve bu yeni immobilizasyon yöntemi ile immobilize edildiklerinde etkinlikleri son derece artmıştır.

Boya giderimi için optimum şartlar ve serbest enzimle karşılaştırmalı boya giderim verimleri				
	Chicago sky blue			
130.dk	*Optimum pH*	*Optimum T*	*%Giderim*	*Serbest enzim*
HRP-Cu2+	5	25	84,94	32,38
LiP-Cu2+	5	25	71,5	30
MnP-Cu2+	4	50	78,73	48,66
	Evans blue			
130.dk	*Optimum pH*	*Optimum T*	*%Giderim*	*Serbest enzim*
HRP-Cu2+	4	25	96,91	63,78
LiP-Cu2+	9	25	76,76	16,05
MnP-Cu2+	4	25	82,75	14,04
	Malachite green			
130.dk	*Optimum pH*	*Optimum T*	*%Giderim*	*Serbest enzim*
HRP-Cu2+	8	60	88,19	67,5
LiP-Cu2+	10	60	100	56,36
MnP-Cu2+	10	60	100	39,71

- **Şekil 4.50**, **4.51** ve **4.52'**de görüldüğü üzere çiçek şekilli hibrit nano yapılar 5. kez kullanımda dahi etkinlikle kullanılabilirler.

6 KAYNAKLAR

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.

Adam, W., Lazarus, M., Saha-Möller, C. R., Weichold, O., Hoc, U., Häring, D., Schreier, P. 1999. Biotransformations with peroxidases, Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology, 63, 73-108.

Altinkaynak C., Yilmaz, I. Koksal, Z., Özdemir, H., Ocsoy,I, Özdemir, N., Preparation of lactoperoxidase incorporated hybrid nanoflower and its excellent activity and stability. Int. J. Biol. Macromol. 84 (2016) 402-409.

Akhtar, S., Khan, A. A., Husain, Q. 2005. Partially purified bitter gourd (Momordica charantia) peroxidase catalyzed decolorization of textile and other industrially important dyes, Bioresource Technology 96 1804–1811.

Alam, Z., Mariatul F. Mansor, K. ve Jalal, K.C.A. 2009. Optimization of decolorization of methylene blue by lignin peroxidase enzyme produced from sewage sludge with *Phanerocheate chrysosporium*, Journal of Hazardous Materials 162, 708–715.

Banat, I. M., Nigam, P., Singh, D. ve Marchant, R. 1996. Microbial decolorization of textile dye containing effluents: A review. Bioresource Technology 58, 217-227.

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.

Dawkar, V. V., Jadhav, U. U., Tamboli, D. P., Govindwar, S. P. 2010, Efficient industrial dye decolorization by Bacillus sp. VUS with its enzyme system, Ecotoxicology and Environmental Safety 73, 1696–1703.

Deepa, S. S., Arumughan, C. 2002. “Purification and characterization of soluble peroxidase from oil palm (*Elaeis guineensis Jacq.*) leaf”, Phytochemistry, *61*, 503–511.

Dordick, J. S., Marletta, M. A., Klibanov, A. M. 1987. “Polymerization of phenols catalyzed by peroxidase in non aqueous media”, Biotechnology and Bioengineering, 1, 31–36.

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.

Duran, N.;Esposito, E., 2000, Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review, Applied Catalysis B: Environmental, 28, 2, 83-99.

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.

Farhadi, S., Haghbeen, K., Marefatjo, M.-J., Hoor, M. G., Zahiri, H. S., Rahimi, K. 2011. Anionic peroxidase production by Arnebia euchroma callus, Biotechnology and Applied Biochemistry, 58, 456–463.

Ferreira-Leitão, V. S., Godinho da Silva, J. ve Bon, E. P. S. 2003. Methylene blue and azure B oxidation by horseradish peroxidase: a comparative evaluation of class II and class III peroxidases, Applied Catalysis B: Environmental 42, 213–221.

Fritzen-Garcia, M. B., Monteiro, F. F., Cristofolini, T., Acuna, J. J. S., Zabetti-Ramos, B. G., Oliveira, I. R. W. Z., Soldi, V., Pasa, A. A. ve Creczynski-Pasa, T. B. 2013. Characterization of horseradish peroxidase immobilized on PEGylated polyurethane nanoparticles and its application for dopamine detection, Sensors and Actuators B, 182, 264–272.

Ge, J., Lei, J. ve Zare, R. N., 2012. Protein–inorganic hybrid nanoflowers, Nature Nanotechnology, july, 428-432.

Gomez, V., Larrenchi, M.S. ve Callao, M.P. 2007. Kinetik and Adsorption Study of Acid Dye Removal Using Activated Carbon. Chemosphere, 69, 1151-1158.

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.

Htawy, R. M. 2013. Horseradish peroxidase and chitosan: Activation, immobilization and comparative results, International Journal of Biological Macromolecules, 60, 295–300.

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.

Hunger, K., 2003. Industrial Dyes: Chemistry, Properties and Applications. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Ikehata, K., Buchanan, l. D., Pickard, M. A. ve Smith, D. W. 2005. Purification, characterization and evaluation of extracellular peroxidase from two Coprinus species for aqueous phenol treat ment, BioresourceTechnology, 96, 1758–1770.

Jina, X. ve Ning, Y. 2013. Laccase production optimization by response surface methodologywith Aspergillus fumigatus AF1 in unique inexpensive medium anddecolorization of different dyes with the crude enzyme or fungalpellets, Journal of Hazardous Materials 262, 870– 877.

Jun, C., Shao, M. Y., Peng, Z. 2006. “Horseradish peroxidase immobilized on aluminum-pillared interlayered clay for the catalytic oxidation of phenolic wastewater”, Water Research, 40, 283 – 290.

Kalın, R., Atasever, A., Özdemir, H. 2014. The single-step purification of peroxidaseby 4-aminobenzohydrazide from turkish black radish (*Raphanus sativus L.*) and turnip (*Brassica rapa L.*) roots, Food Chemistry, *150*, 335–340.

Karam, J. ve Niceli, A. J., 1997. Potantial Applications of Enzymes in Waste Treatment, Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 69:141-153.

Kim, J., Grate, J. W. ve Wang, P. 2006. Nanostructures For Enzyme Stabilization, Chemical Engineering Science, 61, 1017–1026.

Kocaer, F.O. ve Alkan, U. 2002. Boyarmadde içeren tekstil atık sularının arıtım alternatifleri. Uludağ Üniversitesi Mühendislik- Mimarlık Fakültesi Dergisi 7(1), 47-55.

Kulshrestha, Y. ve Husain, Q., 2006. Direct immobilization of peroxidase on DEAE cellulose from ammonium sulphate fractionated proteins of bitter gourd (Momordicacharantia), Enzyme and Microbial Technology 38, 470–477.

Kumar, K. V., Ramamurthi, V. ve Sivanesan, S. 2006. Biosorption of malachite green, a cationic dye onto *Pithophora sp*., a fresh water algae. Dyes and Pigments 69, 74- 79.

Kurbanova, R., Mirzaoğlu, R., Ahmedova, G., Şeker, R. ve Özcan, E. 1998. Boya ve Tekstil Kimyası ve Teknolojisi. Selçuk Üni. Fen- Edeb. Fak. Yay. No: 34, Konya, 264.

Lai, Y. C., Lin, S. C. 2005. Application of immobilized horseradish peroxidase for the removal of p-chlorophenol from aqueous solution, Process Biochemistry, *40*, 1167–1174.

Leon, J. C., Alpeeva, I. S., Chubar, T. A., Galaev, I. Y., Csoregi, E., Sakharov, I. Y. 2002. "Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers", Plant Science, *163*, 1011-1019.

Mishra, G. ve Tripathy, M. 1993. A critical review of the treatment for decolourization of textile effluent. Colourage, 40, 35–8.

Mohamed, S. A., Al-Malki, A. L., Kumosani, T. A. and El-Shishtawy, R. M. 2013. Horseradish Peroxidase and Chitosan: Activation, Immobilization and Comparative Results, International Journal of Biological Macromolecules,60, 295-300

Mohsina, H., Khalil-ur- R. 2009. "Potential applications of peroxidases", Food Chemistry, 115, 1177–1186.

Netto, C. G. C., Toma, H. E. ve Andrade, L. H. 2013. Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 85–86, 71– 92.

Ngo, T. T. 2010. Peroxidase in chemical and biochemical analysis, Analytical Letters, 43: 1572–1587.

Nüske H, Bräse S, Kozhushkov SI, Noltemeyer M, Es-Sayed M, De Meijere A., 2002, A new highly efficient three-component domino Heck-Diels-Alder reaction with bicyclopropylidene: rapid access to spiro[2.5]oct-4-ene derivatives. Chemistry. May 17;8(10):2350-69.

Nyanhongo, G. S., Gomes, J., Guebitz, G. M., Zvauya, 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.

O'Neill, C., Hawkes, F., Hawkes, D., Lourenco, N., Pinheiro, H. ve Delee, W. 1999. Colour in textile effluents-sources, measurement, discharge consents and simulation: a review, Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 74 , 1009–18.

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.

Onsa, G. H., Saari, N., Selamat, J., Bakar, J. 2004. Purification and characterization of membrane bound peroxidases from metroxylon sagu, Food Chemistry, 85, 365–376.

Pandey, V.P. ve Dwivedi, U.N. 2011. Purification and characterization of peroxidase from *Leucaena leucocephala*, a tree legume", Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, *68*, 168–173.

Pirillo, S., Einschlag, F. S. G., Ferreira, M. L., ve Rued, E. H. 2010. Eriochrome Blue Black R and Fluorescein degradation by hydrogen peroxide oxidation with horseradish peroxidase and hematin as biocatalysts, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 66, 63–71.

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.

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.

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.

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.

Rodriguez, E., Pickard, M.A. ve Vazquez- Duhalt, R. 1999. Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. *Curr. Microbiol.* 38, 27–32.

Ryan, B. J., Carolan, N., O´ 'Fa´ga´ in, C. 2006. Horseradish and soybean peroxidases: comparable tools for alternative niches?, Trends in Biotechnology, 24, 355-363.

Saratale, R.G., Saratale, G.D., Chang, J.S. ve Govindwar, S.P. 2011. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review, Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers 42, 138‑157.

Sassolas, A., Blum, L. J. ve Leca-Bouvier, B. D. 2012. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors, Biotechnology Advances, 30, 489–511.

Seesuriyachan, P., Takenaka, S., Kuntiya, A., Klayraung, S., Murakami, S. ve Aoki, K. 2007. Metabolism of azo dyes by *Lactobacillus casei* TISTR 1500 and effects of various factors on decolorization. Water research, 41, 985-992.

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.

ShaffIqu, T. S., Roy, J. J., Nair, R. A., Abraham, T. E. 2002. Degradation of textile dyes mediated by plant peroxidases, Applied Biochemistry and Biotechnology, 102–103, 315-326.

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.

Somturk, B., Hancer, M., Ocsoy, I., Özdemir, N., Synthesis of copper ion incorporated horseradish peroxidase-based hybrid nanoflowers for enhanced catalytic activity and stability. Dalton Trans. 44 (2015) 13845-13852.

Somturk, B., Yilmaz, I., Altinkaynak, C., Karatepe, A., Özdemir, N., Ocsoy, I., Synthesis of urease hybrid nanoflowers and their enhanced catalytic properties. Enzyme. Microb. Tech. Available online 14 September 2015.

Somtürk, B., Kalın, R. ve Özdemir, N. 2014. Purification of peroxidase from red cabbage (*Brassica oleracea var. capitata f. rubra*) by affinity chromatography, Applied Biochemistry Biotechnology, *173*, 1815–1828.

Stolz, A. 2001. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. Applied Microbiology and Biotechnology. 56, 69-80.

Şen, S. ve Demirer, G.N. 2003. Anaerobic Treatment of Real Textile Wastewater With a Fluidized Bedreactor. Water Research, 37, 1868-1878.

Tilli, S., Ciullini, I., Scozzafava, A. ve Briganti, F. 2011. Differential decolorization of textile dyes in mixtures and the joint effect of laccase and cellobiose dehydrogenase activities present in extracellular extracts from Funalia trogii, Enzyme and Microbial Technology 49, 465– 471.

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 Microbology and Technology 36, 10–16.

Van Huytstee, R. B. 1987. Some molecular aspect of plant peroxidase biosynthetic studies, Annual Review in Plant Physiology, 38, 205.

Vasileva, N., Godjevargova, T., Ivanova, D. ve Gabrovska, K. 2009. Application of immobilized horseradish peroxidaseontomodified acrylonitrile copolymer membrane in

removing of phenolfromwate', International Journal of Biological Macromolecules, 44, 190–194.

Veitch, N. C. 2004. "Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme", Phytochemistry, 65, 249–259.

Wang, L-B., Wang, Y-C., He, R., Zhuang, A., Wang, X., Zeng, J. ve Hou, J. G. 2013. A new nanobiocatalytic system based on allosteric effect with dramatically enhanced enzymatic performance, Journal of the American Chemical Society, 135, 1272−1275.

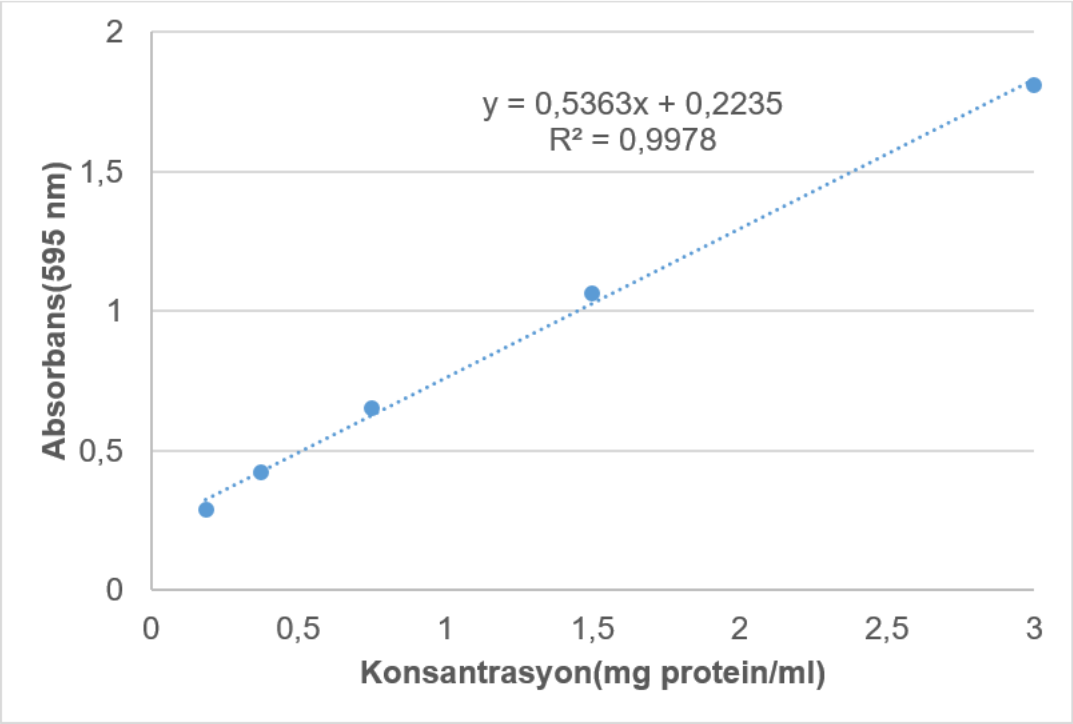
Yousefi, V. ve Kariminia, H.R., 2010. Statistical analysis for enzymatic decolorization of Acid Orange 7 by Coprinus cinereus peroxidase. International Biodeterioration and Biodegradation 64, 245-252.

Yu, G., Wen, X., Li, R. ve Qian, Y. 2006. In vitro degradation of a reactive azo dye by crude ligninolytic enzymes from nonimmersed liquid culture of Phanerochaete chrysosporium, Process Biochemistry 41, 1987–1993.

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.

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.

7 EKLER



Şekil Ek1. Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik.