**T.C.**

**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇEVRE SAĞLIĞI DİSİPLİNLERARASI YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**GÜMÜŞ KAPLI MANYETİK NANOPARTİKÜLLERE İMMOBİLİZE EDİLMİŞ LAKKAZ ENZİMİNİN BİYOREMEDİYASYON POTANSİYELİNİN İNCELENMESİ**

**BURCU ÇAĞATAY**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Deniz AKTAŞ UYGUN**

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi trafından FEF-20010 proje numarası ile desteklenmiştir.

**AYDIN–2021**

**KABUL VE ONAY**

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Çevre Sağlığı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Burcu Çağatay tarafından hazırlanan “Gümüş Kaplı Manyetik Nanopartiküllere İmmobilize Edilmiş Lakkaz Enziminin Biyoremediyasyon Potansiyelinin İncelenmesi ” başlıklı tez, aşağıdaki jüri üyeleri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 16/12/2021

Üye (T.D) : Prof. Dr. Deniz AKTAŞ UYGUN Aydın Adnan Menderes ...............

Üniveristesi

Üye: Prof. Dr. Cafer TURGUT Aydın Adnan Menderes ...............

Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Sinan AKGÖL Ege Üniversitesi ..............

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisanüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün ........................... tarih ve ............................ sayılı oturumunda alınan ..................................... numaralı Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Süleyman AYPAK

Enstitü Müdürü V.

**TEŞEKKÜR**

“Gümüş Kaplı Manyetik Nanopartiküllere İmmobilize Edilmiş Lakkaz Enziminin Biyoremediyasyon Potansiyelinin İncelenmesi” konulu tez çalışması Adnan Menderes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam boyunca engin bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, öğrenim hayatım boyunca örnek alacağım değerli hocam Prof. Dr. Deniz AKTAŞ UYGUN’a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımda benden desteğini ve bilgisini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Murat UYGUN’a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımda ve tez yazım aşamalarında desteğini esirgemeyen, her anlamda yardımcı olan değerli hocam Arş. Gör. Dr. Rukiye YAVAŞER, Doktora öğrencileri Baha ÖNDEŞ ve Sinem Evli’ye, bu çalışmayı FEF-20010 No’lu araştırma projesi olarak destekleyen Adnan Menderes Üniversitesi Rektörlüğü’ne teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak bana olan maddi ve manevi desteğini esirgemeyen çok kıymetli aileme teşekkürlerimi sunarım.

Burcu ÇAĞATAY

**İÇİNDEKİLER**

KABUL VE ONAY i

TEŞEKKÜR ii

İÇİNDEKİLER iii

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ vi

ŞEKİLLER DİZİNİ vii

RESİMLER DİZİNİ viii

TABLOLAR DİZİNİ ix

ÖZET x

ABSTRACT xi

1. GİRİŞ 1

1.1. Remediyasyon Teknikleri 2

1.2. Biyoremediyasyon 2

1.3. Enzimatik Biyoremediyasyon 5

1.4. Lakkaz 5

1.5. İmmobilizasyon 9

1.6. İmmobilizasyon Yöntemleri 10

1.6.1. Adsorpsiyon 11

1.6.2. Kovalent Bağlanma 11

1.6.3. Hapsetme 11

1.6.4. Çapraz Bağlanma 12

1.7. Manyetik Nanopartiküller 12

2. GENEL BİLGİLER 16

3. GEREÇ VE YÖNTEM 23

3.1. Gereç 23

3.1.1. Cihazlar 23

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler 23

3.2. Yöntem 23

3.2.1. Gümüş Kaplı Manyetik Nanopartiküllerin Sentezlenmesi 23

3.2.2. Gümüş Kaplı Manyetik Nanopartiküllerin 11-merkaptoundekanoik asit (MUA) ile Modifikasyonu 24

3.2.3. Lakkaz Enziminin MUA ile Modifiye Edilmiş Gümüş Kaplı Manyetik Nanopartiküllere İmmobilizasyonu 24

3.2.4. Gümüş Kaplı Manyetik Nanopartiküllerin Karakterizasyonu 25

3.2.5. Lakkaz Aktivite Tayini 25

3.2.6. Serbest ve İmmobilize Lakkaz Aktivitesine pH’ın Etkisinin İncelenmesi 26

3.2.7. Serbest ve İmmobilize Lakkaz Aktivitesine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi 26

3.2.8. Serbest ve İmmobilize Lakkaz Aktivitesine Substrat Derişiminin Etkisinin İncelenmesi 26

3.2.9. Serbest ve İmmobilize Lakkaz Enziminin Isıl Kararlılığının İncelenmesi 27

3.2.10. İmmobilize Lakkaz Enziminin İşlemsel Kararlılığının İncelenmesi 27

3.2.11. Lakkaz İmmobilize Edilmiş Gümüş Kaplı Manyetik Nanopartiküllerin Elektrokimyasal Davranışının İncelenmesi 27

3.2.12. İmmoblize Lakkaz Enziminin Boyar Maddelerin Gideriminde Kullanılması 28

3.2.13. İmmobilize Lakkaz Enziminin Fenolik Bileşiklerin Gideriminde Kullanılması 28

4. BULGULAR 30

4.1. Gümüş Kaplı Manyetik Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu 30

4.2. Gümüş Kaplı Manyetik Nanopartiküllere Lakkaz İmmobilizasyonu ve Aktiviteye Etki Eden Faktörlerin İncelenmesi 33

4.3. Serbest ve İmmobilize Lakkazın Isıl ve İşlemsel Kararlılığının İncelenmesi 35

4.4. Lakkaz İmmobilize Edilmiş Gümüş Kaplı Manyetik Nanopartiküllerin Elektrokimyasal Davranışının İncelenmesi 36

4.5. İmmobilize Lakkazın Boyar Madde Gideriminde Etkinliğinin İncelenmesi 38

4.6. İmmobilize Lakkazın Fenolik Bileşiklerin Gideriminde Etkinliğinin İncelenmesi 39

5. TARTIŞMA 42

5.1. Gümüş Kaplı Manyetik Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu 42

5.2. Gümüş Kaplı Manyetik Nanopartiküllere Lakkaz İmmobilizasyonu ve Aktiviteye Etki Eden Faktörlerin İncelenmesi 43

5.3. Serbest ve İmmobilize Lakkazın Isıl ve İşlemsel Kararlılığının İncelenmesi 44

5.4. Lakkaz İmmobilize Edilmiş Gümüş Kaplı Manyetik Nanopartiküllerin Elektrokimyasal Davranışının İncelenmesi 45

5.5. İmmobilize Lakkazın Boyar Madde Gideriminde Etkinliğinin İncelenmesi 45

5.6. İmmobilize Lakkazın Fenolik Bileşiklerin Gideriminde Etkinliğinin İncelenmesi 45

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 47

KAYNAKLAR 49

BİLİMSEL ETİK BEYANI 55

ÖZ GEÇMİŞ 56

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

**ABTS :** 2,2’-azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonat)

**AgNO3 :** Gümüş nitrat

**Co :** Kobalt

**EDC :** 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid

**EDX :** Enerji Dağılımlı X-Işını Analizi

**ESR :** Elektron Spin Rezonans

**Fe2+ :** Demir(II)

**Fe3+ :** Demir (III)

**Fe3O4 :** Magnetit

**FeCl2.4H2O :** Demir (II) klorür tetrahidrat

**FeCl3.6H2O :** Demir( III) klorür hekzahidrat

**FTIR :** Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi

**K3Fe(CN)6 :** Potasyum ferrisiyanür

**Km :** Michaelis-Menten Sabiti

**MUA :** 11-merkaptoundekanoik asit

**NaHCO3 :** Sodyum bikarbonat

**NH3 :** Amonyak

**NHS :** N-hidroksisüksinimid

**OCP :** Organoklorlu Pestisitler

**PAH :** Poliaromatik Hidrokarbonlar

**PCB :** Poliklorlanmış Bifeniller

**TEM :** Geçirimli Elektron Mikroskobu

**Vmax :** Maximum Hız

**γ-Fe2O3 :** Maghemit

**ŞEKİLLER DİZİNİ**

**Şekil 1.** Remediyasyon tekniklerinin gösterimi. 2

**Şekil 2.** Biyoremediyasyonun çeşitleri ve uygulanma stratejileri 4

**Şekil 3.** Lakkazların su arıtımında ve biyoremediyasyonundaki olası uygulamaları 7

**Şekil 4.** *Trametes versicolor* lakkazının üç boyutlu yapısı 8

**Şekil 5.** Lakkaz oksidasyonunun basit şematik gösterimi. 9

**Şekil 6.** Enzim immobilizasyonu metotları 10

**Şekil 7.** Multifonksiyonel nanopartiküllerin şematik gösterimi 13

**Şekil 8.** Manyetik nanopartiküllerin çeşitli kabuklarla modifikasyonu 15

**Şekil 9.** Gümüş kaplı manyetik nanopartiküllere lakkaz enziminin immobilizasyonu. 30

**Şekil 10.** Serbest ve immobilize lakkaz aktivitesine pH’ın etkisi. 33

**Şekil 11.** Serbest ve immobilize lakkaz aktivitesine sıcaklığın etkisi. 34

**Şekil 12.** Serbest ve immobilize lakkaz için Lineweaver-Burk grafiği. 34

**Şekil 13.** Serbest ve immobilize lakkaz aktivitesinin 60°C’de zamana bağlı değişimi. 35

**Şekil 14.** İmmobilize lakkazın işlemsel kararlılığının incelenmesi. 36

**Şekil 15.** a) yalın ve manyetik nanopartiküllerle, b) serbest ve immobilize lakkaz ile, c) boş ve enzim bağlı manyetik nanopartiküllerle modifiye edilmiş SPE’lerin CV sonuçları. 37

**Şekil 16.** İmmobilize lakkazın Congo Red’i zamana bağlı giderimi. 38

**Şekil 17.** İmmobilize lakkazın Sunset Yellow’u zamana bağlı giderim. 38

**Şekill 18.** İmmobilize lakkazın Brillant Blue’yu zamana bağlı giderimi. 39

**Şekil 19.** İmmobilize lakkazın Orange-G’yi zamana bağlı giderimi. 39

**Şekil 20.** İmmobilize lakkazın fenol gideriminde zamana bağlı etkinliği. 40

**Şekil 21.** İmmobilize lakkazın 2,4-dikolorofenol gideriminde zamana bağlı etkinliği. 40

**Şekil 22.** İmmobilize lakkazın Guaiakol gideriminde zamana bağlı etkinliği. 41

**RESİMLER DİZİNİ**

**Resim 1.** a) MUA bağlı, b) lakkaz bağlı gümüş kaplı manyetik nanopartiküllerin FTIR spektrumu. 31

**Resim 2.** Lakkaz bağlı manyetik nanopartiküllerin TEM analizi (a) ve EDX analizi (b). 32

**Resim 3.** Manyetik nanopartiküllerin ESR spektrumu. 32

**TABLOLAR DİZİNİ**

**Tablo 1**. Serbest ve immobilize lakkazın kinetik parametreleri. 34

**ÖZET**

**GÜMÜŞ KAPLI MANYETİK NANOPARTİKÜLLERE İMMOBİLİZE EDİLMİŞ LAKKAZ ENZİMİNİN BİYOREMEDİYASYON POTANSİYELİNİN İNCELENMESİ**

**Çağatay, B. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Çevre Sağlığı Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2021.**

**Amaç:** Bu tezde lakkaz enziminin gümüş kaplı manyetik nanopartiküllere immobilize edilmesi ve biyoremediyasyon potansiyelinin incelenmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Gümüş kaplı manyetik nanopartiküller sentezlenmiş ve MUA ile kaplanarak lakkaz enziminin kovalent immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Karakterizasyonu için FTIR, TEM, EDX ve ESR tekniklerinden yararlanılmıştır. Serbest ve immobilize lakkaz enziminin aktivitesi incelenmiş, optimum pH ve optimum sıcaklık, kinetik sabitler, ısıl ve işlemsel kararlılıkları belirlenmiştir. Ayrıca immobilize lakkazın elektrokimyasal davranışı ile fenolik bileşik ve boyar madde giderimindeki etkinliği değerlendirilmiştir.

**Bulgular:** Serbest ve immobilize enzim için optimum pH 3,0, sıcaklıklar ise sırasıyla 45°C, 55°C olarak tespit edilmiştir. Km ve Vmax değerlerinin immobilizasyon işlemi sonunda azaldığı görülmüştür. Isıl kararlılık incelendiğinde immobilize enzimin serbest enzime göre daha yüksek kararlılık gösterdiği bulunmuştur. İmmobilize enzimin ard arda 10 kez kullanım sonunda başlangıç aktivitesinin %58,13’ünü koruduğu görülmüştür. İmmobilize enzimin elektrokimyasal aktivitesi ile boyar madde ve fenolik bileşiklerin giderimindeki etkinliğinin literatür ile karşılaştırılabilir olduğu bulunmuştur.

**Sonuç:** Bu tezde lakkaz enzimi başarılı bir şekilde manyetik nanopartiküllere immobilize edilmiş ve bazı toksik maddelerin gideriminde etkili olduğu görülmüştür.

**Anahtar kelimeler:** Lakkaz, immobilizasyon, manyetik nanopartikül, boyar madde, biyoremediyasyon

**ABSTRACT**

**INVESTIGATION OF BIOREMEDIATION POTENTIAL OF LACCASE ENZYME IMMOBILIZED ON SILVER COATED MAGNETIC NANOPARTICLES**

**Çağatay, B. Aydın Adnan Menderes University, Graduate School of Health Science, Enviromental Health Interdisciplinary Master, Master Thesis, Aydın, 2021.**

**Objective:** In this thesis, it is aimed to immobilize the laccase enzyme onto silver-coated magnetic nanoparticles and to investigate its bioremediation potential.

**Material and Methods:** Silver-coated magnetic nanoparticles were synthesized, coated with MUA, and covalently immobilized with laccase enzyme. FTIR, TEM, EDX and ESR techniques were used for characterization. The activity of free and immobilized laccase enzyme was investigated, optimum pH, optimum temperature, kinetic constants, thermal and operational stabilities were determined. Additionally electrochemical behavior of immobilized laccase and phenolic compound and dye removal efficiency of the immobilized laccase was evaluated.

**Results:** The optimum pH for free and immobilized enzyme was found to be 3,0 while the optimum temperatures were 45°C and 55°C, respectively. It was observed that the Km and Vmax values decreased at the end of the immobilization process. When thermal stability was investigated, it was found that, immobilized enzyme showed higher stability than the free. It was found that the immobilized enzyme retained %58.13 of its initial activity after 10 consecutive uses. It was found that the effectiveness of the dye and phenolic compound removal of the immobilized enzyme was comparable with literature.

**Conclusion:** In this thesis, the laccase enzyme was successfully immobilized onto magnetic nanoparticles, and it was observed that immobilized laccase was effective for removal of some toxic matters.

**Keywords:** Laccase, immobilization, magnetic nanoparticule, dye, bioremediation

**1. GİRİŞ**

Su kirliliği, nüfus, şehirleşme ve endüstrileşmedeki hızlı artış sebebiyle son yıllarda artan bir endişe kaynağı olmuştur. Su kirliliğinin temel sebeplerinden birisi, büyük miktarlardaki endüstriyel atıkların yeterli temizleme yapılmadan sulara verilmesidir. Çevresel kirliliğe en çok sebep olan endüstriler tekstil, plastik, ilaç, gıda ve kozmetik endüstrileridir. Fenol ve türevleri, en temel çevresel kirleticiler olarak ele alınır. Aromatik bileşikler petrol rafinerisi, ilaç, metal kaplama, kömür, plastik üretimi, tekstil ve kağıt gibi çeşitli endüstriyel işlemlerin atıklarında bulunurlar (Jun ve diğerleri, 2019).

Mikrokirleticiler, doğa ve insan ekosistemine çok fazla toksik kimyasal vererek, dünya çapında çevresel olarak kirlenmeye neden olur. Tarım, endüstriyel ve kentsel atık sularında bulunan poliaromatik hidrokarbonlar (PAH’lar), organoklorlu pestisitler (OCP’ler), poliklorlanmış bifeniller (PCB’ler), dioksinler ve bazı organometalik bileşiklerden (organik civa, organotin gibi) kaynaklanan çoğu mikrokirletici genellikle suda mikrogram veya daha düşük düzeylerde bulunur. Zor biyobozunurluğu, ekolojik güvenlik sorunu ve insan sağlığı üzerine uzun vadeli potansiyel negatif etkilerinden dolayı, bu organik bileşiklerin çevreye verilmeden önce su ve atık sulardan giderilmesi zorunludur (Zhou ve diğerleri, 2021).

Sentetik bileşiklerin üretimindeki karmaşık artış ile çeşitli organik bileşikler gibi istenmeyen ve zor bozunur atıkların salımı ortaya çıkmıştır. Bu sentetik bileşikler atmosfere verilen çevresel kirliliklerin önemli bir kısmını oluşturur. Bunlar boya üretimi, petrol rafineri, deri, plastik, kok ve kömür dönüşümü, kimyasal, tekstil ve ilaç endüstrileri, döküm, kağıt ve kağıt hamuru tesislerini içeren çeşitli endüstriyel işlemlerden sulu ortama salınırlar. Kirleticilerin tüm tipleri, insan sağlığı ve ekosistem üzerine doğrudan ya da dolaylı olarak önemli etkiler oluşturur (Bilal ve diğerleri, 2019).

Çevreye salınan istenmeyen herhangi bir bileşik “kirletici” olarak adlandırılır. Kirleticiler tarafından oluşturulan zararlı etkiler veya hasarlar, kirliliğe sebep olur. Kirlilikler çok eski zamanlardan beri vardır ve tanımladığımız dünya üzerindeki yaşam, bu kirliliklerle beraber süregelmiştir. Her gün 100 ton organik toz oluşturan jeotermal ve volkanik aktiviteler, kuyruklu yıldızlar ve uzay tozlarından meydana gelen kirletici anologları ile dünyamız her zaman kirletilen bir gezegen olmuştur. Endüstrileşme öncesi dönemlere göre, günümüz endüstrileri ve kimyasal bileşiklerin yoğun kullanımı çevresel kirliliği arttırmaktadır. İnsan kaynaklı kimyasal bileşikler, büyük ölçekli kirlilikler ve az da olsa doğal bileşiklerden kaynaklanan kirlilikler, küresel bir endişe kaynağıdır (Megharaj ve diğerleri, 2011).

**1.1. Remediyasyon Teknikleri**

Kirleticilerin arıtılması için remediyasyon teknikleri, kirleticilerin doğasına ve konsantrasyonuna, kirliliğin derinliğine ve derecesine, bulunduğu yere, arıtma yönteminin maliyetine, sürecin nihai ürününe ve çevre politikalarına göre değişir. Bununla birlikte, bir remediyasyon tekniğinin seçiminde maliyet ana kriter değildir. Coğrafi konum, jeolojik faktörler ve insan sağlığı üzerindeki etkisi birincil faktörler olarak ele alınmaktadır. Sıvı, gaz ve katı olarak karakterize edilen tarımsal, endüstriyel, tıbbi ve evsel atıklardan salınan kirlilikler ve kirleticiler, su (yer ve yüzey), hava ve topraktaki kirliliği önlemek için çevreye verilmeden önce arıtılmaktadır. Remediyasyon için kullanılan biyolojik ve fizikokimyasal işlemlerin genel kategorileri Şekil 1’de gösterilmektedir (Kumar ve Bharadvaja, 2019).

**Şekil 1.** Remediyasyon tekniklerinin gösterimi.

**1.2. Biyoremediyasyon**

Biyoremediyasyon, doğal biyolojik aktiviteleri kullanarak, çeşitli zararlı kirlilikleri parçalamak ve zararsız hale getirmek üzere imkanlar sunan bir yöntemdir. Diğer metodlarla karşılaştırıldığında biyoremediyasyon kirlenmiş toprak ve suyun temizlenmesinde umut vaat etmektedir ve daha ucuz bir yoldur.

Biyoremediyasyon kirlenmiş toprak ve suyu temizlemek için temel olarak maya, fungus ya da bakteri gibi mikroorganizmaları içeren biyolojik ajanları kullanır. Kirlenmiş toprağı temizlemek veya kontrol etmek üzere canlı organizmaları kullanan biyoremediyasyon, yeni bir teknolojidir. Biyoremediyasyon biyolojik işlemler kullanılarak kirleten ya da bulaşan bileşiklerin giderilmesi, azaltılması veya dönüştürülmesi olarak tanımlanır. Biyoremediyasyon sistemlerinin çoğu, aerobik koşullar altında yürür, fakat anaerobik koşullardaki sistemler dayanıklı moleküllerin parçalanmasına izin verir.

Biyoremidasyondaki önemli parametreler:

1. Kirleticilerin doğası,
2. Toprağın yapısı, pH, nem içeriği ve hidrojeolojisi,
3. Besin durumu, bölgenin mikrobiyal çeşitliliği,
4. Sıcaklık ve yükseltgenme-indirgenme.

Bioremediyasyonda, mikroorganizmalar kirleticileri besin veya enerji kaynağı olarak kullanılır (Shukla ve diğerleri, 2010).

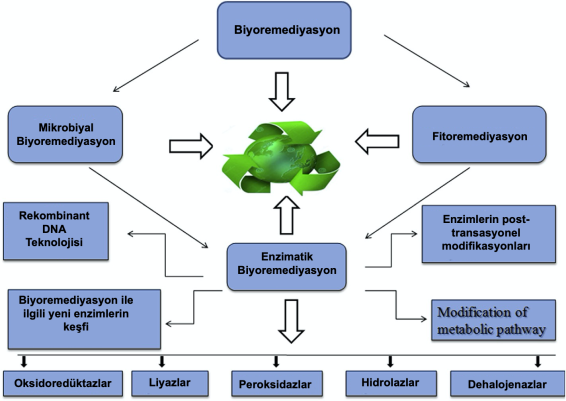
Biyoremediyasyonun avantajları:

* Doğal bir süreçtir, az zaman alır, toprak gibi kontamine olmuş materyaller için kabul edilebilir bir atık arıtma işlemidir.
* Az çaba gerektirir ve normal aktivitelerini kaybetmeden belirli bir bölgede uygulanabilir.
* Tehlikeli atıkların temizlenmesinde geleneksel yöntemlere göre maliyeti daha uygundur.
* Kirleticilerin tamamen yok edilmesine yardımcı olur, tehlikeli bileşikleri zararsız ürünlere dönüştürür, bu özellik aynı zamanda gelecekte kontamine bileşiğin yok edilmesi veya azaltılması ihtiyacını ortadan kaldırır.
* Tehlikeli kimyasallar kullanılmaz.
* Çevre dostu ve sürdürülebilirdir.
* Kirleticiler yok edilir, farklı çevresel ortamlara taşınmaz (Abatenh ve diğerleri, 2017).

Biyoremediyasyonun dezavantajları:

* Biyolojik olarak parçalanabilen bileşikler sınırlıdır. Bütün bileşikler hızlı ve tam parçalanmaya uygun değildir.
* Bazı bileşiklerin parçalanma ürünleri kendinden daha toksik olabilmektedir.
* Biyolojik süreçler oldukça seçicidir. Uygun mikroorganizmayı bulmak, uygun çevreyi sağlamak ve besin maddelerini temin etmek zor olabilir.
* Pilot ölçekli çalışmalardan büyük ölçekli çalışmalara geçiş zor olabilir (Abatenh ve diğerleri, 2017).

Biyoremediyasyonun çeşitleri ve uygulanma stratejileri Şekil 2’de verilmiştir (Sharma ve diğerleri, 2018).



**Dehalojenazlar**

**Hidrolazlar**

**Peroksidazlar**

**Liyazlar**

**Oksidoredüktazlar**

**Rekombinant DNA Teknolojisi**

**Biyoremediyasyon ile ilgili yeni enzimlerin keşfi**

**Enzimatik Biyoremediyasyon**

**Mikrobiyal Biyoremediyasyon**

**Enzimlerin post-transasyonel modifikasyonları**

**Fitoremediyasyon**

**Biyoremediyasyon**

**Metabolik yolla modifikasyon**

**Şekil 2.** Biyoremediyasyonun çeşitleri ve uygulanma stratejileri (Sharma ve diğerleri, 2018).

**1.3. Enzimatik Biyoremediyasyon**

Mikroorganizmaların yardımıyla kirleticilerin ayrıştırılması, gerçek örneklerde biyoremediyasyonun uygulanabilirliğini azaltan yavaş bir süreçtir. Son birkaç yıldır, hücrelerden saflaştırılan mikrobiyal enzimler, bu sınırlamanın üstesinden gelmek üzere tam hücrelerin yerine kullanılmaktadır. Enzimler, kirletici bozunma yollarını içeren bir dizi biyokimyasal reaksiyon için katalizör olarak davranan kompleks biyolojik moleküllerdir.

Enzimler, tepkimelerin aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyonların hızını arttırabilirler. Biyoremediyasyonda biyoparçalama kabiliyetlerine göre enzimler temel olarak mikrobiyal oksidoredüktazlar ve mikrobiyal hidrolazlar şeklinde sınıflandırılabilirler (Sharma ve diğerleri, 2018).

1. Mikrobiyal Oksidoredüktazlar: Oksidatif eşleşme yoluyla çeşitli bakteriler, mantarlar ve gelişmiş bitkiler ile toksik organik bileşiklerin detoksifikasyonuna oksidoredüktazlar aracılık eder. Mikroplar, kimyasal bağları parçalamak ve indirgenmiş bir organik substratın (verici) başka bir kimyasal bileşiğe elektron transferine yardımcı olmak için bu enzimlerin aracılık ettiği enerji veren biyokimyasal reaksiyonlar yolu ile enerji elde ederler. Böylesi yükseltgenme-indirgenme reaksiyonları sırasında, kirlilikler zararsız bileşiklere oksitlenirler. Mikrobiyal oksidoredüktaz enzimlerine örnek olarak oksigenazlar, lakkazlar ve peroksidazlar örnek olarak verilebilir (Kariger ve Rao, 2011).
2. Mikrobiyal Hidrolazlar: Mikrobiyal hidrolazlar toksik moleküllerdeki kimyasal bağları hidroliz yoluyla parçalayan ve toksisitenin ortadan kaldırılmasına neden olan enzimlerdir. Hidrolaz aynı zamanda kondenzasyon ve alkolizi içeren çeşitli reaksiyonları katalizler. Bu enzimler petrol sızıntısı, insektisitler ve pestisitlerin biyoremediyasyonunda sıkça kullanılmışlardır. Bu sınıftaki enzimelere örnek olarak lipazlar, selülazlar ve proteazlar örnek olarak verilebilir (Kariger ve Rao, 2011).

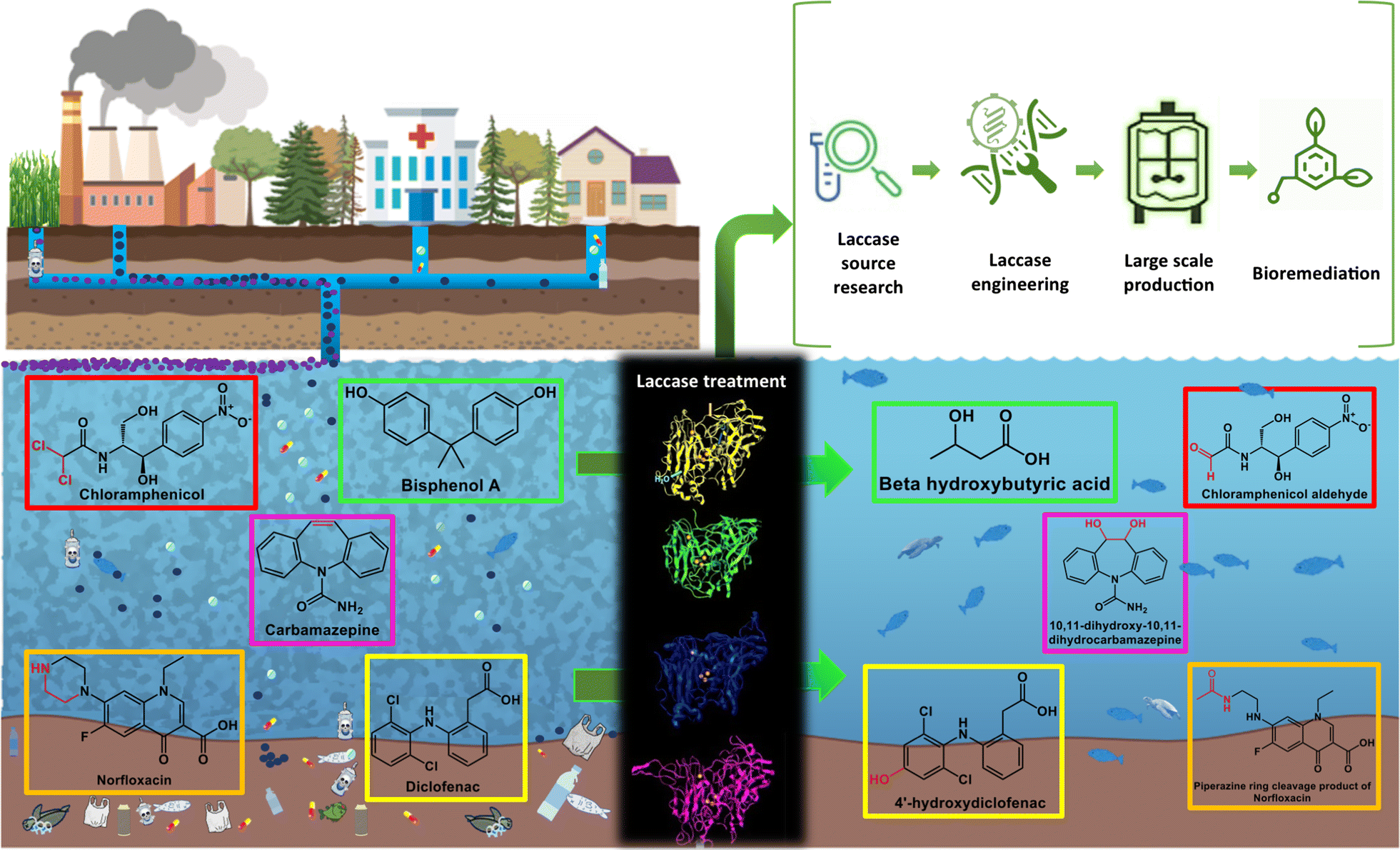
**1.4. Lakkaz**

Lakkaz (EC 1.10.3.2, p-difenol:dioksijen oksidoredüktaz), 19. yüzyıldan beri çalışılan birkaç enzimden biridir. Yoshida ilk olarak 1883’de Japon cila ağacı (*Rhus vernicifera*) sızıntılarından ekstrakte ederek tanımlamıştır. 1886 yılında Bertrand ve Laborde tarafından ilk kez fungal bir enzim olduğu gösterilmiştir. Fungusların lakkazları, polimerik lignin ve hümik maddeleri içeren çeşitli fenolik bileşiklerin dönüşümüne olan katkıları nedeniyle büyük ilgi çekmiştir. Çoğu lignolitik fungal türleri, esas olarak en az bir lakkaz izoenzimi üretir ve toprak ortamındaki lignolitik enzimler arasında baskındır. Ayrıca, lakkaz aracılı delignifikasyon, hayvan yemi veya toprak gübresi için tarım-sanayi yan ürünlerinin besin değerini arttırmaya izin verir (Viswanath ve diğerleri, 2014).

Lakkazlar, doğada yaygın olarak bulunan enzimlerdir ve bitkilerde ve mantarlarda olduğu kadar bazı bakteri ve böceklerde de bulunmaktadır. Şimdiye kadar karakterize edilen lakkazların büyük çoğunluğu, lignin parçalayıcılar olarak etkili olan beyaz çürükçül mantar kaynaklıdırlar. Birçok fungus çeşitli lakkaz kodlayan genleri içerir fakat onların biyolojik rolleri çoğunlukla çok iyi anlaşılmamıştır. *Agaricus bisporus*, *Botrytis cinerea*, *Coprinus cinereus*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus ostreatus* ve *Trametes versicolor*, lakkaz üreten basidiomisetlerin bazı örnekleridir (Viswanath ve diğerleri, 2014).

Beyaz çürükçül mantarlardan *Trametes versicolor*’un olağanüstü bir lakkaz üreticisi olduğu rapor edilmiştir ve *Trametes versicolor*’dan lakkaz üretimine ilişkin yapılan çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Wang ve diğerleri, 2013). Lakkaz üretmek için, beyaz çürükçül mantarlar belirli koşullar altında kültürlenmek zorundadır. İki tip kültür tekniği çok kullanılmaktadır: Katı hal fermantasyonu (SSF) ve batık fermantasyon (SmF). SSF, katı bir destek olarak inert veya doğal bir substrat kullanarak, sıvının yokluğunda veya azlığında meydana gelen bir fermantasyon işlemi olarak tanımlanır. SSF, konsantre metabolitlerin eldesinde avantajlıdır ve saflaştırma işlemleri uygundur. SFF’de mikroorganizmalar, doğal ortamlarına yakın koşullar altında büyürler. Bu, SmF’de genellikle üretilemeyen veya sadece düşük bir verimle üretilebilecek olan belirli enzimleri ve metabolitleri üretmelerine izin verebilir. Bu nedenle, sürecin başarı için uygun desteğin seçimi önemlidir (Stoilova ve diğerleri, 2010). Spesifik olarak *Trametes versicolor*’dan üretilen lakkazlar yüksek redoks potansiyeline sahiptirler. Oksidazların bir çeşidi olarak lakkaz, özel katalitik bir performansa sahiptir ve lignin, boya, klorofenol bileşikleri, polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve endokrin bozucular gibi çoklu substratların parçalanması için uygulanabilirdir (Hongyan ve diğerleri, 2019).

Lakkazların olağanüstü katalitik özellikleri ve geniş substrat özgüllükleri onları suların arıtımında umut verici aday yapmıştır (Arregui ve diğerleri, 2019). Şekil 3’de lakkazların su arıtımında ve biyoremediyasyonundaki olası uygulamaları görülmektedir. Bununla birlikte lakkazların endüstriyel uygulamaları, düşük kararlılıkları, kısa yaşam ömürleri, tekrar kullanılabilirliklerinin zorluğu ve yüksek maliyetleri nedeniyle sınırlıdır. Bu sınırlamaların üstesinden gelmek için çeşitli desteklere lakkaz enzimlerinin immobilizasyonu gerçekleştirilmiş ve su arıtma sistemlerinde kullanılmıştır (Zhou ve diğerleri, 2021).



Norfloksasinin bölünme ürünü piperazin halkası

4-hidroksidiklofenak

**Biyoremediyasyon**

**Yüksek ölçekli üretim**

**Lakkaz mühendisliği**

**Lakkaz kaynaklarının araştırılması**

Kloramfenikol

Bisfenol A

Karbamazepin

Norfloksasin

Diklofenak

Lakkaz Uygulamaları

Beta hidroksi butirik asit

Kloramfenikol aldehit

10,11-dihidroksi-10,11-dihidrokarbamezapin

**Şekil 3.** Lakkazların su arıtımında ve biyoremediyasyonundaki olası uygulamaları (Arregui ve diğerleri, 2019).

Lakkazlar çeşitli yapılarda bulunurlar. Çoğu monomerik olmakla birlikte homodimerik, heterodimerik ve multimerik formları da mevcuttur. Tipik fungal lakkazların izoelektrik noktası pH 4.0 civarında ve molekül kütleleri 60 ile 70 kDa arasında olmakla birlikte organizmaya bağlı olarak molekül kütleleri 50-140 kDa aralığında değişmektedir. Fungal lakkazlar, kütlelerinde % 15-25’lik artışla glikozillenmiş olarak bulunurlar hatta bazı lakkazlar % 30’un üzerinde kütle artışı ile glikozillenmiş olarak bulunmaktadırlar. Lakkazların karbohidrat kısmının, korformasyonel kararlılığı sağladığı ve enzimi proteolizden ve inaktivasyondan koruduğu gösterilmiştir (Arregui ve diğerleri, 2019).

Piontek ve diğerleri (2002) *Trametes versicolor*’dan lakkaz enzimini saflaştırarak, kristalize etmişler ve yapısını aydınlatmışlardır. Elde edilen kristalografik yapıda dört bakır atomu ve beş farklı N-glikozilasyon bölgesinde 7 adet N-asetil glukozamin birimi içeridiğini rapor etmişlerdir. Şekil 4’de üç adet β-fıçı yapısı içerdiği ve monomer başına 4 bakır atomu içerdiği görülmektedir. Lakkaz enziminin aktivite gösterebilmesi için bu bakır atomlarına ihtiyacı vardır (Yavaşer, 2019).



**Şekil 4.** *Trametes versicolor* lakkazının üç boyutlu yapısı (Piontek ve diğerleri, 2002).

Lakkazlar, mono-, di- ve poli- fenoller, aminofenoller, metoksifenoller, aromatik aminler ve askorbatı kapsayan orto ve para difenol gruplarına karşı, oksijenin 4 elektronlu suya indirgenmesine eşlik ederek aktivite gösterirler. Bu katalitik mekanizma T1 bakır bölgesinden substrata bir elektron verilmesi ile başlar ve bunu indirgenmiş T1 bölgesinden T2 ve T3 bölgelerine iç elektron transferi izler. T3 bakırı, T2 bakırın varlığının gerekli olduğu aerobik oksidatif işlemde iki elektron alıcısı olarak fonksiyon görür. Oksijenin suya indirgenmesi T2 ve T3 kümesinde gerçekleşir (Şekil 5) (Rodriguez-Delgado ve diğerleri, 2015).



**Lakkaz**

**Şekil 5.** Lakkaz oksidasyonunun basit şematik gösterimi.

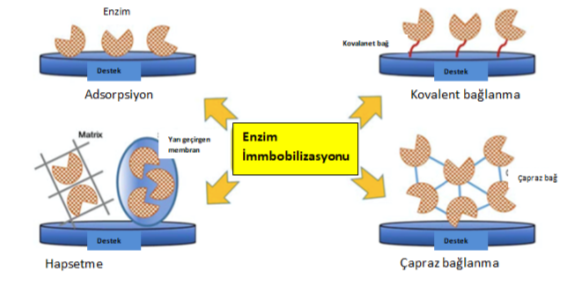
**1.5. İmmobilizasyon**

Enzimler birçok sebepten dolayı immobilize edilebilir; ama en önemlisi kararlılıklarını arttırıp uygulama alanlarını genişletmektir. İmmobilizasyonun bulunuşundan beri, immobilizasyon yöntemleri çok değişmemekle birlikte yeni destek mateyallerinin geliştirilmesi söz konusu olmuştur. Destek materyalleri olarak borosilikatlar, aluminyumsilikatlar ve titanyum oksit, nanomateryaller, hidrofobik matrikste reaktif kovalent epoksi grupları içeren destekler ve kitosan gibi yaygın olarak kullanılan polisakkarit bazlı taşıyıcılar ön plana çıkmıştır.

Ucuz, güvenli, yenilenebilir immmobilizasyon destek materyallerine ihtiyaçla birlikte mikrobiyal enzimlere olan ilgi de artmıştır. Enzimler yüksek aktivite ve özgüllüğe sahip, uygun reaksiyon koşullarında etkinlik gösteren katalizörlerdir. Bu da onları diğer kimyasal katalizörlerden farklı yapmaktadır. Enzimatik uygulamalar gıda endüstrisinde, bioremediyasyonda, antibiyotik ve biyodizel üretiminde, biyoyakıt geliştirmede, tarım-sanayi uygulamalarında, ilaç üretimi ve biyosensör uygulamalarında yer bulmuştur. Bu tarz yaygın uygulamalar ticari enzim pazarının büyümesine sebep olmuştur. Bazı uygulamalarda enzimlerin serbest halde çözünür olarak bulunmasında bazı engeller vardır. Bunlar; yüksek maliyet, düşük kararlılık, tekrar kullanım imkanının olmaması ve enzimin üründen ayrılmasında yaşanan zorluktur. Bu sınırlamalar immobilizasyon teknolojisi ile ortadan kaldırılabilmektedir. Enzim immobilizasyonu, çözünebilir biyokatalizörün çözünemeyen katı destek materyale bağlanmasıyla oluşur ve yüksek sıcaklık, uç pH değerleri ve organik çözücüler gibi zor çevresel koşullara karşı yüksek katalitik aktivite ve artan kararlılık ile enzimlerin yeniden kullanılabilir olmasını amaçlar. İmmobilize enzim ile serbest enzime göre enzim ve ürünü birbirinden kolaylıkla ayrılabilir, immobilize enzimin yüksek aktivite, yüksek özgüllük ve seçicilik, yüksek işlemsel kararlılık, sürekli olan enzimatik süreçlerde uygulama kolaylığı, enzimin tekrar kullanılabilirliği, düşük işlem maliyeti gibi avantajları bulunmaktadır. İmmobilizasyonun başarısı, destek materyalinin ve immobilizasyon metodunun seçimine bağlıdır. Son yıllarda çoğu çalışmada enzimleri immobilize etmek için kitosan, mezogözenekli yapılar, silika, aljinat mikroküreler, polistiren materyaller, nanopartiküller ve nanolifler gibi destekler yoğun olarak kullanılmıştır (Ugwuodo ve diğerleri, 2021).

**1.6. İmmobilizasyon Yöntemleri**

Enzim immobilizasyon yöntemleri dört farklı sınıfta toplanabilir. Bunlar Şekil 6’da şematik olarak gösterilmiştir (Nguyen ve diğerleri, 2017).



**Şekil 6.** Enzim immobilizasyonu metotları (Nguyen ve diğerleri, 2017).

**1.6.1. Adsorpsiyon**

Adsorpsiyon yoluyla immobilizasyon en çok kullanılan immobilizasyon yöntemlerinden biridir. Adsorpsiyon mekanizmaları van der walls kuvvetleri, elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler gibi zayıf bağlara dayanmaktadır. Enzim bir çözelti içinde çözünür ve enzim aktivitisinin korunacağı koşullar altında enzim çözeltisi belirli bir süre destek materyali ile temas ettirilir. Adsorbe olmayan enzim molekülleri yüzeyden tampon çözelti ile yıkanarak uzaklaştırılır. Adsorpsiyon ile immobilizasyon reaktif içermemesi, düşük maliyet, enzim aktivitesine zararı olmaması nedeniyle basit ve ekonomik bir süreçtir (Nguyen ve diğerleri, 2017).

**1.6.2. Kovalent Bağlanma**

Bu yöntemde kovalent bağlar yardımıyla destek materyali ve enzim arasında güçlü etkileşimler oluşturulur. Destek materyallerindeki karboksil, amino, hidroksil, sülfidril, imidazol, epoksi, indol, tiyol grupları ve enzim moleküllerinin lizin, sistein, aspartik asit ve glutamik asit amino asitlerinin yan zincirlerindeki gruplar kovalent bağlanma için uygundurlar. Kovalent bağlanma enzimin destek maddesinden sızmasını engelleyerek enzimin kararlılığını artırır. Ancak bağlanmanın aktif merkez üzerinden gerçekleşmesi durumunda enzim aktivitesinde kayıplar olabilir. Bu sebeple kovalent bağlanma stratejisinin doğru planlanması önemlidir (Facin ve diğerleri, 2019).

**1.6.3. Hapsetme**

Hapsetme, enzimlerin gözenekli jelde sınırlı hareketine karşın çözeltide serbest moleküller olarak hareket etmesi olarak tanımlanabilir. Jel ya da lifler içinde enzimlerin hapsedilmesi düşük molekül ağırlıklı substratlar ve ürünler için uygun bir yöntemdir. Bununla birlikte yüksek molekül kütleli substratları olan enzimlerin, substratlarının aktif bölgeye ulaşmalarındaki zorluk nedeniyle bu yöntemle immobilizasyonları uygun değildir. Hapsetme işlemi yalnızca kafes içinde tutulmayı veya kovalent bağlanmayı içerebilir. Enzimler sıcaklık dönüşümlü polimerizasyon ile agar, agaroz ve jelatin gibi doğal polimerlerde hapsedilebilirler. Polivinil alkol hidrojeli ve poliakrilamid gibi çok sayıda sentetik polimer hapsetme yöntemi için kullanılmıştır (Ahmad ve Sardar, 2015).

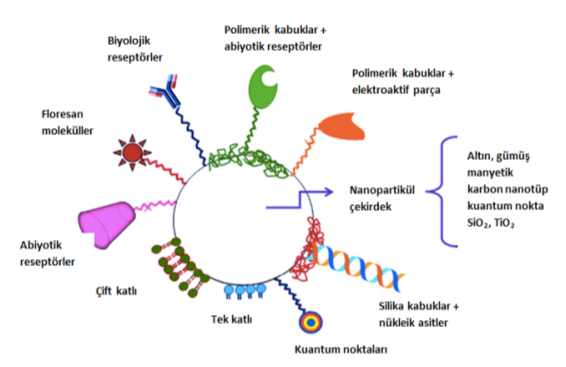
**1.6.4. Çapraz Bağlanma**

Proteinin diğer protein molekülleri ile veya çözünmeyen bir desteğin fonksiyonel grupları ile moleküller arası çapraz bağlanması ile oluşan immobilizasyon çeşididir. Bir enzimin fiziksel veya kimyasal yöntemlerle moleküller arası çapraz bağlanması, üç boyutlu bir yapı oluşturur. Bu yöntemde enzim molekülleri çapraz bağlanmak için birleştirici ajanlara gereksinim duyarlar. Poliaminler, polietilenimin, polistiren sülfonatlar ve çeşitli fosfatlar topaklaştırıcı olarak yaygın olarak kullanılmıştır. Çapraz bağlanmada gluteraldehit dikarboksilik asidi veya toluen diizosiyanat gibi bir veya multifonksiyonel ajanlar kullanılarak enzimler arasında kovalent bağ oluşması sağlanmıştır. Gluteraldehit ticari ölçekli işlemler için ucuz ve başarılı bir çapraz bağlayıcıdır. Çapraz bağlanma düşük aktiviteye, zayıf tekrar üretilebilirliğe, düşük mekanik kararlılığa ve kullanımda zorluklara neden olabilir. Bu sorunlar çapraz bağlı enzim kristalleri ve çapraz bağlı enzim kümeleri kullanılarak aşılabilir (Thangaraj ve Solomon, 2019).

**1.7. Manyetik Nanopartiküller**

Son birkaç on yıldır, belirgin kimyasal, fiziksel ve biyolojik özellikleri nedeniyle nanoboyutlu partiküller çok ilgi çekmektedir. Organik dendrimerler, lipozomlar, altın, karbon yarı iletkenler, silikadan demir okside kadar farklı malzemelerden yapılmış küre, tüp, boru ve kafes şeklindeki çok çeşitli nanoboyutlu partiküller kimya, malzeme bilimleri, fizik, tıp ve elektronik alanlarındaki birçok bilim dalında üretilmiş ve üzerinde çalışılmıştır. Nano-skaladaki maddelerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri kuantum boyut etkisi nedeniyle bulk yapıları ile karşılaştırıldığında oldukça farklılıklar göstermektedir (Simon de Dios ve Diaz-Garcia, 2010).

Monofonksiyonel nanopartiküller tek bir fonksiyonu yerine getirebilirler. Örneğin, bir kuantum dot yüksek floresans özellik sergiler ancak bir manyetik alan kullanılarak ortamdan uzaklaştırılamaz. Monofonksiyonel nanopartiküller yerine multifonksiyonel nanopartiküller hazırlanarak, birden fazla özelliğe sahip olan sistemler hazırlanabilir. Bu sistemlerde, özgün hedefe ulaşma, optik, elektriksel ve/veya manyetik özellikleri sağlama ve analiz yeteneğini ortaya çıkartmak için değişik stratejiler kullanılır. Bu stratejiler Şekil 7’de özetlenmiştir (Simon de Dios ve Diaz-Garcia, 2010).



**Şekil 7.** Multifonksiyonel nanopartiküllerin şematik gösterimi (Simon de Dios ve Diaz-Garcia, 2010).

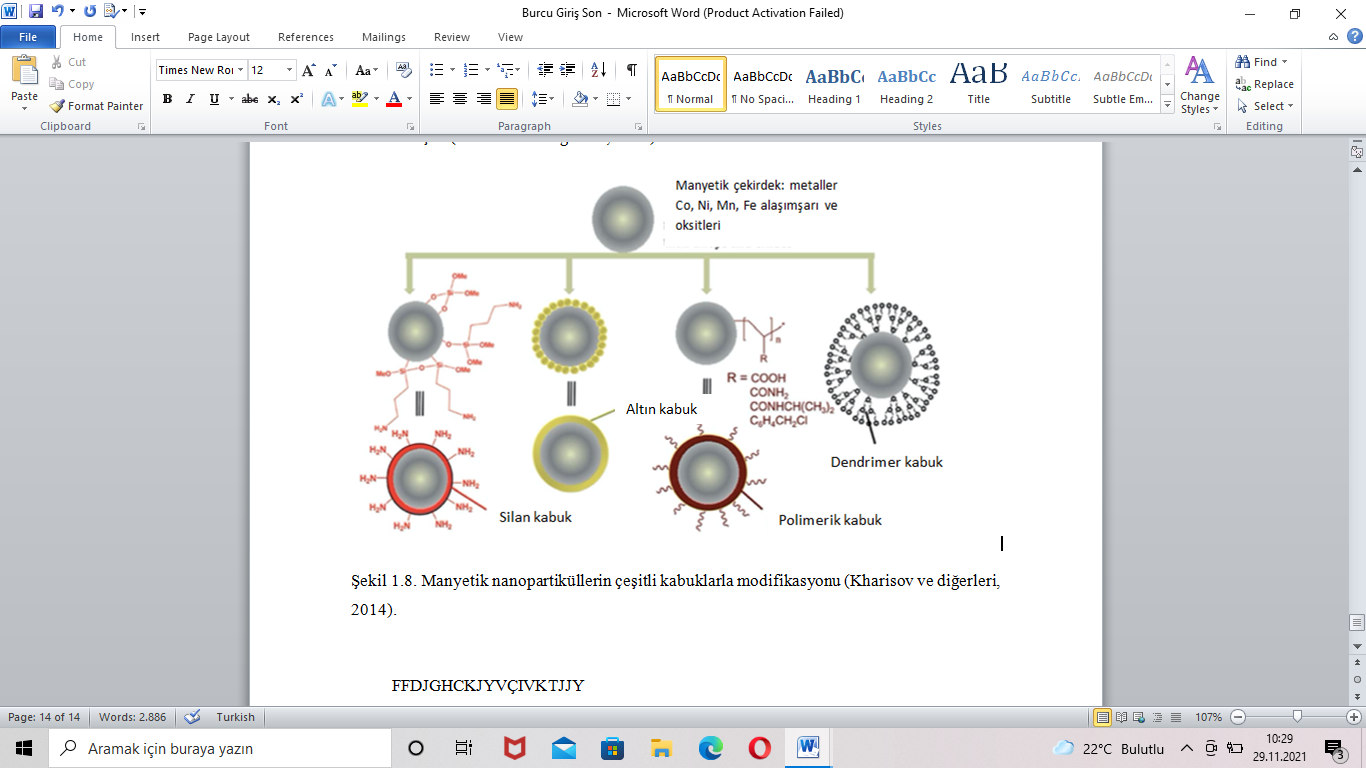
Nanopartiküller içerisinde özellikle manyetik nanopartiküller benzersiz optik, elektronik, manyetik ve fizikokimyasal özellikleri nedeniyle sıkça kimya, çevre ve tıp uygulamalarında çok ilgi çekmektedir. Özellikle, manyetik nanopartiküllerin kirlilikleri uzaklaştırma ve toksisite azaltma, su arıtma ve saflaştırma işlemleri ile ilaç salımı çalışmalarında başarılı bir şekilde kullanıldığı farklı araştırmacılarca gösterilmiştir (Mohammed ve diğerleri, 2017). Manyetik nanopartiküllerin birçok uygulaması partikül manyetik momenti ve alan gradientinin etkinliğine bağlı olarak manyetik nanopartiküllerin özelliklerini manipüle etmek için manyetik alanın kullanımına dayanır. Tek çekirdekli süperparamanyetik nanopartiküllere uygulanan kuvvet, küçük çapları ve manyetik momentleri nedeniyle daha az etkilidir. Bununla birlikte, çok çekirdekli kompozitler durumunda, uyarılmış manyetik alanlar ılımlı alan yoğunluğu ve gradienti değerlerini kullanarak manyetik hedeflemeye izin vermek için yeterlidir (Mohammed ve diğerleri, 2017).

Çözünür manyetik nanopartiküllerin özel bir formu, su, mineral yağı, sönümleme yağı, parafin, kerosen ve benzeri sıvı taşıyıcılar içinde süspanse olan ve sürfaktanlar ile kaplanmış tek bölgeli manyetik nanopartiküllerin kararlı kollaidal sistemi olan manyetik akışkanlardır (örneğin, Fe3O4, γ-Fe2O3, Co, MnFe2O4 gibi). Manyetik akışkanların özellikleri, teknik ve biyomedikal uygulamalar için geniş kullanım alanları sunan bir dışsal manyetik alan ile etkili bir şekilde kontrol edilebilir. En yaygın kullanılan ferrofluid, bir apolar çözgende dağılmış halde tipik olarak 10 nm boyutunda küresel manyetik partikülleri içerir. Bu partiküllerin çökelmesi, onları dağılmış halde tutan Brownian hareketleri tarafından etkili bir şekilde engellenir. Ayrıca, nanopartiküllerin çökelmesini engellemek için kolloidler tek tabakalı oleik asit gibi ince tabakalı bir sürfaktan ile kaplanabilir (Kharisov ve diğerleri, 2014).

Manyetik nanopartiküller fiziksel, kimyasal ve biyolojik metotlar ile sentezlenebilirler. Bunlar: i) Gaz fazı biriktirme ve elektron ışını litografi gibi fiziksel metotlar; ii) Sol-jel sentezi, oksidasyon metodu, kimyasal ko-çöktürme, hidrotermal reaksiyonlar, akış enjeksiyon sentezi, elektrokimyasal metot, aerosol/buhar fazı metodu, sonokimyasal parçalanma reaksiyonları, süperkritik akışkan metodu, nanoreaktörlerde sentez gibi ıslak kimyasal hazırlama teknikleri; iii) Mikrobiyal metotlar (Xu ve diğerleri, 2014).

Manyetik metalik nanopartiküller süpermanyetizmaları, yüksek yüzey alanı, geniş alan/hacim oranları, dışsal manyetik alan altında kolay ayrılmaları gibi eşsiz özelliklerinden dolayı protein/enzim immobilizasyonlarında kullanılmışlardır. Manyetik nanopartiküller gibi nanopartiküllerin diğer önemli bir avantajı, immobilize protein/enzimin yönlendirilmesine imkan vermeleridir. Gözenekli destekler ile karşılaştırıldığında böylesi gözeneksiz nanopartiküller dış difüzyon problemlerine sahip değillerdir ve böylece onların büyük ölçekli uygulamalarda daha uygun destekler olmaları söz konusudur (Xu ve diğerleri, 2014).

Sergiledikleri üstün özelliklerden dolayı demir oksit nanopartikülleri Amerika Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından klinik kullanımı uygun bulunmuş tek manyetik nanopartikül çeşididir. Demir oksit nanopartiküller Fe2+ ve Fe3+’ün alkali ko-çöktürmesi ile tek adımlı olarak sentezlenebilir, fizyolojik koşullarda kimyasal olarak kararlıdır ve altın, polimer, silan ve dendrimer gibi çeşitli kabuklar ile demir çekirdeğinin yüzeyi kaplanarak kimyasal olarak modifiye edilebilirler (Şekil 8). Düşük toksisiteleri, onların yaygın olarak kullanımlarına izin vermiştir (Kharisov ve diğerleri, 2014).



**Şekil 8.** Manyetik nanopartiküllerin çeşitli kabuklarla modifikasyonu (Kharisov ve diğerleri, 2014).

Bu tezde çevre dostu bir enzim olan lakkazın immobilizasyonu amaçlanmıştır. Bu amaçla “nasıl bir destek materyali seçilmeli ve immobilizasyon ne şekilde olmalıdır?” araştırma sorularından yola çıkılarak literatürde lakkaz enziminin immobilizasyonunda daha önce kullanılmamış bir destek materyali olarak gümüş kaplı manyetik nanopartiküller hazırlanmış ve EDC/NHS kimyası ile lakkaz enziminin bu destek materyaline kovalent immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. İmmobilize lakkaz enziminin kararlılığı ataştırılarak ve bazı toksik maddeleri gidermedeki etkinliği değerlendirilmiştir.

**2. GENEL BİLGİLER**

Yeşil kimya, insan sağlığına ve çevreye zararlı maddelerin kullanımını ve üretimi azaltmak veya elimine etmek için kimyasal işlemlerin ve ürünlerin dizaynı, geliştirilmesi ve uygulanması olarak tanımlanır. Biyokatalizörler (enzimler veya tam hücreler) geleneksel organik sentezlere alternatif sunar ve bu şekilde ılımlı reaksiyon koşulları altında, düşük enerji gereksiniminde ve izomerizasyon ve yeniden düzenleme problemlerini minimize eden koşullarda doğal ve sentetik maddelerin endüstriyel dönüşümü için uygun araçlar sağlar (Alcade ve diğerleri, 2006).

Tarihsel olarak bakıldığında biyoremediyasyonda en çok çalışılmış enzimler, bakteriyel mono ve di oksigenazlar, redüktazlar, dehalojenazlar, sitokrom P450 monooksigenazlar, beyaz çürükçül funguslardan elde edilen lignin metabolizmasında yer alan enzimler (lakkazlar, lignin ve mangan peroksidazlar gibi) ve bakteriyel fosfotriesterazlardır.

Oksidoredüktazlar biyolojik sistemlerde elektron transfer reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Lakkaz (benzendiol: oksijen oksidoredüktaz EC 1.10.3.2) moleküler oksijenin suya indirgenmesine eşlik eden geniş çeşitlilikteki fenolik ve aromatik substratların oksidasyonunu katalizleyen bazı bitki, mantar, böcek ve bakteriler tarafından üretilen oksidoredüktaz sınıfı bir enzimdir (Karigar ve Rao, 2011). Lakkazlar, bir çok aromatik bileşiğin tehlikesiz ve daha az toksik ürünlere oksidasyonunu katalizlemesi nedeniyle yeni ve zorlu dekontaminasyon programları için yaygın olarak araştırılmıştır. Gerçekten de karasal ve sulu çevrelerdeki fenoller, triklorofenoller, organofosforlu pestisitler, azo boyar maddeler ve ilginç bir şekilde yüksek oranda mutajenik ve karsinojenik zenobiyotiklerin bir sınıfı olan benzo[α]piren gibi PAH’ların detoksifikasyonunu gerçekleştirmektedir (Samanta, 2002).

Fenolik bileşiklerin ve boyar maddelerin gideriminde önemli olan lakkaz enzimi özellikle atık su arıtım sistemlerinde kullanılmaları durumunda reaksiyon sırasında kararlı olmaması, azalan katalitik aktivitesi ve yeniden kullanılma potansiyeli sergilememesi gibi dezavantajlara sahiptir (Barrios-Estrada ve diğerleri, 2018). Bu dezavantajların üstesinden gelmek için lakkaz enzimleri çözünmeyen bir destek maddesi üzerine immobilize edilerek kullanılır ve bu durumda enzimin işlemsel kararlılığı artar ve immobilize lakkaz tekrar tekrar kullanılabilir ve maliyetin de düşmesi söz konusu olur.

Atık sulardaki boyar maddelerin ve bazı fenolik bileşiklerin giderilmesi amacıyla lakkaz enzimlerinin bir destek materyaline immobilizasyonuna ilişkin literatürde yapılmış bir çok çalışma bulunmaktadır. Bu destek materyalleri içinde manyetik nanopartiküller, bir manyetik alana cevapta eşsiz özellikler sunarlar. Farklı materyaller ve demir oksitlerin bir araya gelmesiyle hazırlanan manyetik nanomalzemeler yüksek özgüllük, spesifik yüzey kimyası, özel optik özellikler ve manyetik özellikler sunarak geniş kullanım alanları bulmuştur. İmmobilize enzim desteği olarak manyetik nanomalzemeleri kullanmak i) daha fazla miktarda enzim bağlanmasına izin veren yüksek spesifik alan, ii) daha düşük kütle transfer direnci ve daha az kirlenme, iii) bir manyetik alan uygulayarak reaksiyon karışımından immobilize enzimin kolayca ayrılması gibi önemli avantajlar sunar (Huang ve Juan, 2011). Literatürde lakkaz enziminin manyetik nanomalzemelere immobilizasyonuna ilişkin yapılmış çalışmalara örnekler olarak şunlar verilebilir:

Liu ve diğerleri (2012), yeni bir manyetik olarak ayrılabilen lakkaz immobilize sistemini, çift modlu karbon bazlı mezo gözenekli manyetik kompozitlere lakkazı adsorbe ederek hazırlamışlardır. İmmobilize lakkaz serbest enzime göre daha büyük adsorpsiyon kapasitesi (491,7 mg/g), üstün aktivite verimi (%91,0) ve daha geniş pH ve sıcaklık profili sergilemiştir. Termal kararlılığı büyük çapta artmış ve işlemsel kararlılığı bir dereceye kadar yükselmiştir. Kinetik parametrelerdeki kayma, enzim ve substrat arasındaki afinite değişimini göstermiştir. Fenol ve p-klorofenol’ün uzaklaştırılmasında immobilize sistemin uygulanması, kesikli sistemde araştırılmıştır. İmmobilize lakkaz sistemi ile 12 saatin sonunda fenol ve p-klorofenol sırasıyla %78 ve %84 oranlarında uzaklaştırılmıştır. Araştırıcılar manyetik çift modlu mezo gözenekli karbonun hem lakkaz immobilizasyonunda hem de fenol gideriminde umut verici bir destek olduğunu rapor etmişlerdir.

Kalkan ve diğerleri (2011), magnetit (Fe3O4) nanopartiküllerine lakkaz enzimini immobilize etmişler ve defalarca kullanmışlardır. Bu amaçla Fe3O4 nanopartiküllerini kitosan ile kaplayarak fonksiyonelleştirmişler ve *Trametes versicolor* kaynaklı lakkaz enzimini kitosan kaplı manyetik nanopartiküllere adsorpsiyon yoluyla veya karbodiimid veya siyanürik klorür ile kitosanın hidroksil gruplarını aktive ettikten sonra kovalent bağlama yoluyla immobilize etmişlerdir. Kitosan kaplı manyetik nanopartiküller için kitosan tabakasının kalınlığı TEM analizi ile 1,0-4,8 nm olarak tahmin edilmiş, zeta potansiyel ölçümleri ile izoelektrik noktası 6,86 olarak belirlenmiş ve doygunluk manyetizasyonunu VSM ile 25,2 emu g-1 olarak hesaplanmıştır. Serbest ve immobilize lakkazın optimum pH, sıcaklık ve kinetik parametreleri belirlenmiş ve immobilize sistemin tekrar kullanıma karşılık aktivitesinde değişim araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar immobilize lakkazın kesikli sistemde 30 kez kullanıldığında başlangıç aktivitesinin %71’inden fazlasını sergilediğini göstermiştir.

Park ve diğerleri (2012), *Trametes versicolor* kaynaklı lakkaz enzimi çok duvarlı karbon nanotüpler, karboksillenmiş çok duvarlı karbon nanotüpler ve grafen oksit içeren karbon nanomateryallerine bir çapraz bağlama ajanı kullanmadan fiziksel adsorpsiyon yoluyla immobilize etmişlerdir. Elde edilen sonuçlar immobilize edilen lakkaz miktarına, immobilizasyon karışımının sulu tampon çözeltisinin pH’ının etkisinin yüksek olduğunu göstermiştir. Bu destek materyalleri içerisinde immobilizasyon verimi ve aktivite verimi açısından en yüksek sonuçları grafen oksit sergilemiştir.

Mogharabi ve diğerleri (2012), aljinat-jelatin jel karışımını kristal viyoleyi içeren bazı sentetik boyaların renksizleştirilmesi için lakkaz enziminin immobilizasyonunda kullanmışlardır. İmmobilizasyon işleminde enzimi içeren jelatin çözeltisi içine aljinat eklemişler ve ardından bu karışımı karışmakta olan CaCl2 çözeltisi içine bir damlalık yardımıyla ilave etmişlerdir. Elde edilen sonuçlar hem immobilize hem de serbest enzim kristal viyoleyi gidermedeki optimum sıcaklığını 50°C ancak immobilize enzimin serbest enzime göre daha yüksek termal kararlılık sergilediğini göstermiştir. İmmobilize lakkaz optimum renksizleştirme potansiyelini pH 8,0’de sergilemiştir. İmmobilize enzimin tekrar kullanılabilirliği çalışılmış ve 5 kez art arda kullanımda başlangıç aktivitesinin %85’ni korunduğu görülmüştür. Bu immobilize sistem ile yedi farklı sentetik boyanın giderimi incelenmiş ve en iyi giderim Amido Blok 10B ile elde edilmiştir.

Patel ve diğerleri (2014), gluteraldehit ile fonksiyonel olarak aktive edilmiş SiO2 nanopartiküllere lakkaz enzimini immobilize etmişler ve immobilizasyon verimini %75,8 ve immobilizasyon etkinliğini %92,9 olarak rapor etmişlerdir. İmmobilize lakkazın optimum pH’ını 3,0 ve optimum sıcaklığını 40°C, serbest lakkazın optimum pH’ını 3,5 ve optimum sıcaklığını 45°C olarak bulmuşlardır. İmmobilize lakkaz, daha geniş pH ve sıcaklık aralığında daha yüksek aktivite sergilemiştir. İmmobilizasyon ile lakkazın Vmax değeri 1,890’dan 1,630 µmol.min-1/mg proteine düşmüş ve Km değeri 29,3’den 45,6’ya artmıştır. Araştırıcılar bu sistemin biyoteknolojik uyugulamalarda etkili olarak kullanılabileceğini rapor etmiştir.

Zheng ve diğerleri (2016), *Trametes pubescens* beyaz çürükçül fungusdan saflaştırdıkları lakkaz enzimini (Tplac), gluteraldehit çapraz bağlayıcısı ile kitosan küreciklerine enkapsüle etmişlerdir. Bu amaçla çapraz bağlayıcı derişimi, çapraz bağlama süresi, enzim hacmi ve immobilizasyon süresi gibi parametrelerin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. İmmobilize lakkazın serbest lakkaz ile karşılaştırıldığında pH ve sıcaklık değişimine ve depolama süresine daha az duyarlı olduğunu ve daha yüksek kararlılık ve bir çok kullanım sergilediğini rapor etmişlerdir. İmmobilize Tlpac’ın katalitik performansı, çeşitli sentetik boyaları parçalamasıyla değerlendirilmiş ve Acid Black 172’yi giderim etkinliği (%68,84), serbest lakkazdan 1,22 kat daha yüksek olarak bulunmuştur. Bu çalışma immobilizasyonun bir çok endüstriyel uygulamada lakkazların konformasyonel kararlılığını arttırmak için uygun bir yol olduğunu ortaya koymuştur.

Pang ve diğerleri (2016), partikül boyutu yaklaşık olarak 200 nm olan mikro-mezo gözenekli Zr metali organik çerçevelerini hazırlamışlar ve bu malzemeleri karakterize ederek lakkazın fiziksel adsorpsiyon yoluyla immobilizasyonunda kullanmışlardır. İmmobilize sistem büyük adsorpsiyon kapasitesi ( 221,83 mg/g), serbest enzime göre geniş pH ve sıcaklık profili, daha iyi kararlılık ve tekrar kullanılabilirlik sergilemiştir. İmmobilize lakkaz 3 hafta 4°C’de depolandığında başlangıç aktivitesinin %55,45’ni göstermiştir. Elde edilen sonuçlar lakkaz immobilizasyonu için bu desteğin yararlı olduğunu ve biyoteknolojik uygulamalar için önemli avantajlar sunduğunu göstermiştir.

Jaiswal ve diğerleri (2016), papayadan saflaştırılmış lakkaz enzimini tutuklama yöntemi ile kitosan küreciklere immobilize etmişler ve etkinliğini serbest enzim ile karşılaştırmışlardır. İmmobilize enzimin serbest enzime göre optimum sıcaklığı 10°C yükselmiş termal kararlılığı 3 kat artmış ve optimum pH’ı 8,0’den 10,0’a kaymıştır. İmmobilizasyon metal iyonları ve çeşitli organik çözeltilere karşı toleransı arttırmıştır. İmmobilize lakkaz 50 µg/mL derişimindeki indigo karmin sentetik boyasının dekolorizasyonunu hızlandırmış ve 8 saatte tamamen renksizleştirilmesini sağlamıştır. Araştırıcılar bu immobilizasyon sisteminin endüstriyel uygulamalarda yararlı olabileceğini vurgulamışlardır.

Skoronski ve diğerleri (2017), *Aspergillus oryzae* kaynaklı lakkaz enzimini fiziksel adsorpsiyon ve kovalent bağlama yoluyla grafen nanotabakalara immobilize etmişlerdir. Grafen tabakaların morfolojik özellikleri, TEM analizi ile incelenmiştir. Adsorpsiyon, grafen ve lakkaz enzim çözeltisi arasında gerçekleşmiş ve Freundlich izoterm modelini sergilemiştir. Lakkazın kovalent immobilizasyonu grafenin nitrolanması, sodyum borhidrür ile indirgenmesi ve gluteraldehit ile çapraz bağlanması ile gerçekleştirilmiştir. Her iki yöntemde de serbest enzim, immobilize enzimle kıyaslandığında aktivite gösterdiği pH aralığı artmıştır. Bununla birlikte adsorpsiyonla immobilizasyon, tekrar eden reaksiyon döngülerinde kararlılık sergilememiştir. Bu bağlamda kovalent immobilizasyon enzimin bir çok kullanılmasına olanak sağlayan işlemsel kararlılığında başarılı sonuçlar sunmuştur.

Gonzalez-Coronel ve diğerleri (2017), *Pyconoporus sanguineus* CS43 kaynaklı lakkazı Immobead-150 ve Eupergit-C’ye kovalent bağlama yöntemiyle ve LentiKats’a tutuklama yöntemiyle immobilize etmişlerdir. En yüksek immobilizasyon verimini %97,1 oranı ile Immobead-150 ile elde ederken, LentiKats ile %89,0 ve Eupergit-C ile %83,2’lik immobilizasyon verimi elde edilmiştir. Bu çalışmada tüm immobilize enzim sistemleri, serbest enzime göre artan termokararlılık ve daha iyi mekanik özellikler sergilemiştir. Dahası bu sistemlerin 5 kez tekrar kullanımları ile başlangıç lakkaz aktivitelerinin %90’ı korunmuştur. Immobead-150 ve LentiKats sistemleri, biyoparçalama ve adsorpsiyon işlemlerinde m-krezolün giderilmesinde yüksek etkinlik göstermiştir. İlaveten araştırıcılar, atık su arıtımında bu immobilizasyon sistemlerinin önemli potansiyelleri olduğunu vurgulamıştır.

Taheran ve diğerleri (2017), poliakrilonitril (PAN) ve biyolojik kömür içeren nanolifler elektro eğirme tekniği ile sentezlenmiş ve bu yapıya lakkaz enzimi kovalent olarak immobilize edilmiştir. Hazırlanan immobilizasyon sistemi klorotetrasiklin (CTC), karbamazepin (CBZ), diklofenak (DCF) ilaçlarının sulu çözeltilerden uzaklaştırılmasında kullanılmıştır. Sekiz saatin sonunda DCF, CTC ve CBZ’nin parçalanma etkinliği %72,7, %63,3 ve %48,6 olarak bulunmuştur.

Drozd ve diğerleri (2018), yaptıkları bir çalışmada lakkaz immobilizasyonu için bakteriyel selüloz kullanmışlardır. Lakkaz immobilizasyon verimini pH 4,0’da %70’den yüksek bulmuşlardır. Lakkaz bağlı taşıyıcıların, serbest lakkaza göre termal kararlılığının yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir. Sekiz döngü boyunca kullandıkları lakkaz immobilize sisteminin aktivitesini önemli ölçüde koruduğunu rapor etmişlerdir. Araştırıcılar bu bakteriyel selülozun lakkaz immobilizasyonu için iyi bir taşıyıcı olduğunu ifade etmişlerdir.

Mohammadi ve diğerleri (2018), epoksi ile fonksiyonelleştirilmiş silika partiküller üzerine lakkaz immobilizasyonu için yeni bir metod geliştirmişlerdir. *Myceliophthora thermophila* kaynaklı lakkaz, desteğin epoksi grubuna lakkazın amino gruplarının nükleofilik saldırısıyla kovalent olarak immobilize edilmiştir. Desteğe enzim yüklemesi optimum koşullarda (pH 4,5, 24h) yaklaşık olarak 30 mg/g olarak bulunmuştur. İmmobilize enzimin aktivitesine pH, sıcaklık ve organik çözgenin etkisi incelenmiş ve serbest enzim ile karşılaştırılmıştır. İmmobilize enzimin kararlılığı, serbest enzimden daha yüksek bulunmuştur. Hazırlanan imobilize biyokatalizörün performansı fenol, p-klorofenol ve katekol içeren fenolik bileşiklerin parçalanmasında kullanılmış ve immobilize lakkaz katekolün giderim etkinliği 2 saatin sonunda yaklaşık %95 olarak bulunmuştur.

Amin ve diğerleri (2018), manyetik özellikte gözenekli nanokompozit Fe3O4 @SiO2@KIT-6 yapılarını sentezlemişler ve bu yapılara lakkaz enzimini kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Araştırıcılar immobilize lakkazın hidrofobik iyonik sıvılarda artan bir kararlılığa sahip olduğunu göstermiş ve hem prina delignifikasyonu hem de prinadaki fenolik ekstraktların parçalanması için bu sistemin kullanılabileceğini rapor etmişlerdir. İmmobilize lakkaz ile 6 saat inkübasyondan sonra, lignin ve fenol degredasyon hızı sırasıyla %77,3 ve %76,5 olarak bulunmuştur. Bu sistemin lignin ve fenolün enzimatik degredasyonunu içeren endüstriyel işlemlerde başarılı bir şekilde kullanılabileceği ifade edilmiştir.

Chao ve diğerleri (2018), lakkaz enziminin, enzim kararlılığını ve tekrar kullanılabilirliğini arttırmak için hallosit nanotüpleri (HNTs) içeren polivinil alkol (PVA) küreciklere immobilize etmişlerdir. PVA/HNTs küreciklerin gözenekli yapısı, enzim tutuklanmasına ve enzimin sızmasının engellenmesine izin vermiştir. PVA/HNTs kürecikleri yüksek lakkaz immobilizasyon kapasitesi (23,0 mg/g) ve %79,15 oranında aktivite verimi sergilemiştir. Ayrıca serbest lakkaz ile karşılaştırıldığında, pH toleransı, termal kararlılığı ve depo kararlılığı yüksek bulunmuştur. Araştırıcılar bu desteğin çevresel uygulamalarda kullanılma potansiyelinin yüksek olduğunu vurgulamıştır.

Bilal ve diğerleri (2019), gluteraldehit ile çapraz bağlanmış kitosan küreciklerine *Trametes versicolor* lakkaz enzimini kovalent olarak immobilize etmişler ve enzim bağlı ve enzim içermeyen kitosan küreciklerinin SEM fotoğraflarını karşılaştırmışlardır. İmmobilize lakkaz sistemi serbest enzime göre yüksek katalitik etkinlik göstermiştir. Kitosan temelli bu biyolatalitik sistem sulu çözeltilerde 150 dakikada bisfenol A’nın neredeyse tamamının giderimini sağlamıştır.

Zhang ve diğerleri (2020), lakkaz enzimini nanoboyutlu manyetik biyolojik kömür üzerine adsorpsiyon, çöktürme ve çapraz bağlama adımlarını izleyerek immobilize etmişler ve bifenol (BPA) A’nın yüksek performanslı olarak gideriminde kullanmışlardır. Hazırlanan immobilize enzim sistemi yüksek miktarda enzim immobilizasyonuna izin vermiş ve 20 saniyede sulu çözeltiden manyetik olarak ayrılabilmiştir. İmmobilize enzimle BPA uzaklaştırma etkinliğinin yedi kez kullanımdan sonra bile %85 olduğu bulunmuştur. Araştırıcılar hazırlanan immobilizasyon sisteminin yüksek kararlılığı ve etkili tekrar kullanılabilirliği nedeniyle çevresel su örneklerinde BPA’nın gideriminde etkili olarak kullanılma potansiyelini taşıdığını rapor etmişlerdir.

Zofair ve diğerleri ( 2020), *Trametes versicolor* kaynaklı lakkaz enzimi antikor bağlı sepharaz desteğine immobilize etmişler ve fenol kırmızısının renksizleştirilmesinde kullanmışlardır. İmmobilizasyon verimini %83,4 olarak bulmuşlar ve 10 kez kullanımdan sonra immobilize enzim başlangıç aktivitesinin %44’ünü koruduğunu rapor etmişlerdir. İmmobilize lakkaz ile 50 °C’de 6 saatin sonunda fenol kırmızısı giderim oranını %80 olarak bulmuşlardır. Araştırıcılar bu immobilizasyon sisteminin endüstriyel uygulamalarda kullanılabileceğini ifade etmişlerdir.

Qiu ve diğerleri (2021), ABTS’den kaynaklanan kirlilikleri gidermek için biyokatalizörlerin etkinliğini arttırmak üzere lakkaz ve ABTS’nin koimmobilizasyonunu araştırmışlardır. Lakkaz enzimi, ABTS içeren amino grubu fonksiyonelleştirilmiş iyonik sıvı ile modifiye edilmiş manyetik kitosan nanopartiküllere Cu şelasyonu yoluyla immobilize edilmiştir. Hazırlanan bu taşıyıcı FTIR, TGA ve X-Ray analizleri ile karakterize edilmiş ayrıca elektron paramanyetik rezonans, taşıyıcı üzerinde ABTS’nin varlığını doğrulamış ve elektron iletimindeki rolünü göstermiştir. İmmobilize enzim 25°C’de 2,4-diklorofenolün %100’ünün etkili bir şekilde uzaklaştırıldığını göstermiştir. İlaveten bu immobilize enzim sistemi bisfenol A, indol ve antresen için sırasıyla %100, %70,5 ve %93,3 oranında katalitik etkinlik sergilemiştir.

**3. GEREÇ VE YÖNTEM**

**3.1. Gereç**

**3.1.1. Cihazlar**

Deneylerde, Shimadzu (UV-1601) UV-Visible spektrofotometre, Sigma (3-30KS) santrifüj cihazı, WiseBath su banyosu, Velp (multistirrer 15) çoklu karıştırıcı, Heidolph Reax top vorteks, Radwag (AS220 C/2) hassas terazi, Memmert (Beschicung-Loading Model 100-800) etüv, GFL (2001/4) saf su cihazı, Hanna (pH 211) pH metre, Beko buzdolobı, Isolab otomatik pipetler, Ultrasonic (LC30) ultrasonik banyo kullanılmıştır.

**3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler**

*Trametes versicolor’*dan saflaştırılmış lakkaz enzimi, gümüş nitrat (AgNO3), sodyum borhidrür (NaBH4), 11-merkaptoundekanoik asit (MUA), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC), N-hidroksisüksinimid (NHS), 2,2’-azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonat (ABTS), 2,4-diklorofenol, Guaiakol, Congo Red, Brillant Blue, Sunset Yellow, Orange-G Sigma-Aldrich (Steinheim-Almanya)’dan temin edilmiştir. FeCl3.6H2O, FeCl2.4H2O Merck (Darmstadt-Almanya)’den satın alınmıştır. % 24’lük NH3, İsolab’tan, fenol Riedel-de Haen (Seelze- Almanya)’den temin edilmiştir.

**3.2. Yöntem**

**3.2.1. Gümüş Kaplı Manyetik Nanopartiküllerin Sentezlenmesi**

1,04 g FeCl3.6H2O ve 0,386 g FeCl2.4H2O tartılıp, ayrı beherlerde 100’er mL saf su içinde hafifçe ısıtıldı ve karıştırılarak çözüldü. Daha sonra bu iki çözelti karıştırılarak üzerine 20 mL NH3 eklenip manyetik karıştırıcıda 1 saat karışmasına izin verildi. Hazırlanan nanopartiküllerin manyetik özelliği bir mıknatıs yardımı ile kontrol edildi. Ardından saf su ile 3 kez yıkama işlemi yapıldı ve 100 mL saf su ile disperse edildi. Manyetik nanopartiküllerin gümüş ile kaplanması için 0,086 g AgNO3 100 mL saf suda çözüldü ve hazırlanan çözelti 100 mL saf sudaki manyetik nanopartiküllerin üzerine ilave edildi. Daha sonra karışıma 10 mg NaBH4 eklenip 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve saf su ile yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işleminden sonra gümüş kaplı manyetik nanopartiküllerin manyetik özelliği kontrol edildi ve 100 ml saf su ile disperse edildi.

**3.2.2. Gümüş Kaplı Manyetik Nanopartiküllerin 11-merkaptoundekanoik asit (MUA) ile Modifikasyonu**

Gümüş kaplı manyetik nanopartiküllerin 11-merkaptoundekanoik asit (MUA) ile modifikasyonu için gümüş kaplı manyetik nanopartiküller %2,5’lik amonyak çözeltisinde çözünmüş 1,0 mM MUA ile 24 saat muamele edildi. Daha sonra MUA ile modifiye edilmiş gümüş kaplı nanopartiküller mıknatıs yardımıyla ayrılıp, saf su ile yıkandı ardından pH 5,5 fosfat tamponu ile hacim 50 mL’ye tamamlandı.

**3.2.3. Lakkaz Enziminin MUA ile Modifiye Edilmiş Gümüş Kaplı Manyetik Nanopartiküllere İmmobilizasyonu**

MUA ile modifiye edilmiş gümüş kaplı manyetik nanopartiküllere lakkaz enziminin kovalent immobilizasyonunun gerçekleştirilmesi için EDC ve NHS kimyası kullanıldı. Bu amaçla belirli hacimde nanopartiküller alınarak üzerine 400 mM EDC ve 100 mM NHS çözeltileri eklendi ve ardından karışıma mL’de 2 mg olacak şekilde lakkaz enzimi ilave edilerek 24 saat boyunca +4°C’de manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı. Bu süre sonunda ortamda kalan protein miktarı tayin edildi. Bu amaçla UV-spektrofotometrede serbest lakkaz enziminin farklı derişimlerdeki çözeltilerinin 280 nm’de absorbans değerleri ölçülerek standart grafik çizildi. Başlangıçtaki ve bağlanma sonundaki absorbans değerleri kullanılarak standart grafik yardımıyla manyetik nanopartiküllere kovalent olarak bağlanan lakkaz miktarı hesaplandı. Lakkaz bağlı manyetik nanopartiküller tampon çözelti ile yıkanarak, kullanılmak üzere +4°C’de saklandı.

**3.2.4. Gümüş Kaplı Manyetik Nanopartiküllerin Karakterizasyonu**

Hazırlanan gümüş kaplı manyetik nanopartiküllerin karakterizayonu için TEM, EDX ve ESR tekniklerinden yararlanıldı. Bu amaçla TEM, EDX ve ESR analizleri Selçuk Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi’nden hizmet alımı yoluyla gerçekleştirildi. Ayrıca manyetik nanopartiküllerin MUA ile modifikasyonu ve enzim immobilizasyonu, FTIR tekniği ile belirlendi. Bu amaçla Celal Bayar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü’nde bulunan FTIR spektrofotometresi (BX Perkin Elmer) kullanıldı.

**3.2.5. Lakkaz Aktivite Tayini**

Serbest ve immobilize lakkaz aktivitesi ABTS substratı kullanılarak, ABTS substratının açık yeşil renginin koyulaşmasına bağlı olarak 420 nm’deki absorbans artışı izlenerek kaydedildi. Bir ünite lakkaz aktivitesi reaksiyon koşulları altında 1 dakikada 1 mikromol ABTS’nin oksidasyonu için gerekli enzim miktarı olarak tanımlandı. Aktivite Bourbonnais ve Paice (1992)’ye göre belirlendi. Bu amaçla kör küvetine 2,95 mL tampon çözeltisi ve 50 µL ABTS, örnek küvetine ise 2,93 ml tampon çözelti, 50 µL ABTS ve 20 µLserbest enzim ilave edildi. Daha sonra 5 dakika boyunca 420 nm’deki absorbans değişimi izlendi. İmmobilize enzim ile aktivite tayininde 2 mL enzim bağlı nanopartikül çöktürüldü ve üzerine 2,95 mL tampon çözelti ve 50 µL ABTS eklendi. Belirli süre sonunda enzim bağlı manyetik nanopartiküller ayrıldı ve 420 nm’deki absorbans okundu.

Eşitlik 3.1 Aktivite hesaplama eşitliği

**3.2.6. Serbest ve İmmobilize Lakkaz Aktivitesine pH’ın Etkisinin İncelenmesi**

Serbest ve immobilize lakkaz aktivitesine, pH etkisinin incelenmesi için enzim ve substrat çözeltileri pH 2,5-3,0 sitrat-fosfat tamponu, pH 4,0-5,0 asetat tamponu, pH 6,0-7,0-8,0 fosfat tamponu ve pH 9,0 karbonat tamponlarında hazırlandı. Hazırlanan pH’lardaki aktivite ölçümleri Bölüm 3.2.5’de anlatıldığı gibi kör ve örnek küvetleri hazırlanarak 420 nm’de absorbansların okunmasıyla belirlendi. Eşitlik 3.1 kullanılarak farklı pH’larda serbest ve immobilize enzimlerin aktivite değerleri hesaplandı. Elde edilen en yüksek aktivite değeri %100 kabul edilip % aktivite değerleri hesaplandı ve pH değerlerine karşılık gelen % aktivite değerleri grafiğe aktarıldı. Böylece serbest ve immobilize lakkaz için optimum pH değeri saptandı.

**3.2.7. Serbest ve İmmobilize Lakkaz Aktivitesine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi**

Serbest ve immobilize lakkaz aktivitesine sıcaklığın etkisinin incelenmesi için farklı sıcaklıklarda (4, 15, 25, 35, 45, 55, 65°C) serbest ve immobilize lakkaz çözeltileri hazırlandı. Belirlenen sıcaklıklarda hazırlanan serbest ve immobilize lakkaz çözeltileri için aktivite ölçümleri Bölüm 3.2.5’de anlatıldığı şekilde kör ve örnek küvetler hazırlanarak 420 nm’deki absorbasların takibi ile belirlendi. Eşitlik 3.1 yardımıyla, serbest ve immobilize enzimin aktivite değerleri hesaplandı. Ulaşılan en yüksek aktivite değeri %100 kabul edilerek % aktivite değerleri hesaplandı ve sıcaklık değerlerine karşılık gelen % aktivite değerleri grafiğe aktarıldı. Serbest ve immobilize lakkaz için optimum sıcaklık değerleri belirlendi.

**3.2.8. Serbest ve İmmobilize Lakkaz Aktivitesine Substrat Derişiminin Etkisinin İncelenmesi**

Serbest ve immobilize lakkazın aktivitesi üzerine substrat derişiminin etkisi incelendi. Serbest ve immobilize enzim için optimum pH olan pH 3,0 sitrat-fosfat tamponunda farklı derişimlerde (1, 2, 3, 4, 5, 7,5, 10 mM) substrat (ABTS) çözeltileri hazırlandı. Serbest lakkaz için optimum sıcaklık olan 45°C’de, immobilize lakkaz için optimum sıcaklık olan 55°C’de Bölüm 3.2.5’de anlatıldığı gibi kör ve örnek küvetler hazırlanarak 420 nm’de absorbanslar ölçülerek aktivite belirlendi. Aktivite değerleri Eşitlik 3.1 kullanılarak hesaplandı. Serbest ve immobilize enzim için Lineweaver- Burk grafikleri çizildi ve grafikler kullanılarak Km ve Vmax değerleri hesaplandı.

**3.2.9. Serbest ve İmmobilize Lakkaz Enziminin Isıl Kararlılığının İncelenmesi**

Serbest ve immobilize lakkazın ısıl kararlılığının saptanabilmesi için 60°C’ye ayarlanan su banyosunda serbest lakkaz 60 dk, immobilize enzim için ise 190 dk bekletilerek belirli zaman aralıklarında, bölüm 3.2.5’da anlatıldığı gibi kör ve örnek küvetleri hazırlanıp 420 nm’deki absorbans değerleri kaydedildi. Eşitlik 3.1 kullanılarak aktivite değerleri hesaplandı ve zamana karşı aktivite değerleri grafiğe aktarıldı.

**3.2.10. İmmobilize Lakkaz Enziminin İşlemsel Kararlılığının İncelenmesi**

İmmoblize enzimin işlemsel kararlılığının belirlenmesi için immobilize enzim ile art arda aktivite ölçümleri yapıldı ve bu ölçümler 10 kez tekrar edildi. Bölüm 3.2.5’de anlatıldığı gibi kör ve örnek kuvetler hazırlanarak 420 nm’de absorbans değerleri kaydedildi. Yapılan her ölçüm sonrasında immobilize lakkaz pH 3,0 sitrat fosfat tamponu ile yıkandı. Eşitlik 3.1 ile aktivite değerleri hesaplandı. Aktivite ölçümleri tekrar sayısına karşı % aktivite değeri olarak grafiğe aktarıldı.

**3.2.11. Lakkaz İmmobilize Edilmiş Gümüş Kaplı Manyetik Nanopartiküllerin Elektrokimyasal Davranışının İncelenmesi**

Lakkaz immobilize edilmiş gümüş kaplı manyetik nanopartiküllerin biyosensör çalışmalarında kullanılabilirliğini göstermek için elektrokimyasal davranışları incelendi. Bu amaçla karbon perde baskılı elektrotlar (SPE) kullanıldı. Elektrotlar sırasıyla, modifiye edilmemiş yalın, gümüş kaplı manyetik nanopartiküller ile modifiye (1 mg/mL), serbest lakkaz (1 mg/mL) ile modifiye ve lakkaz immobilize edilmiş gümüş kaplı manyetik nanopartiküller ile modifiye edilmiş (1 mg/mL) olarak damlatma tekniği ile hazırlandı ve her bir elektrodun etkin elektroaktif yüzey alanını karekterize etmek için döngüsel voltemetri (CV) tekniği kullanıldı. Her bir elektrot için, pH 5,0 asetat tampon çözeltisinde 50 µM katekol varlığında CV ölçümleri gerçekleştirildi ve böylece lakkaz enziminin yükseltgenme ve indirgenme akımlarını ne kadar değiştirdiği gözlemlendi. Bu amaçla serbest lakkaz enzimi, gümüş kaplı manyetik nanopartiküller ve lakkaz immobilize edilmiş gümüş kaplı manyetik nanopartiküllerden SPE üzerine 5’er µL damlatılarak hazırlanan elektrotlar yaklaşık 30 dakika oda sıcaklığında kurutuldu. Bu sürenin sonunda hazırlanan nafyon çözeltisinden (%1’lik pH 5,0 asetat tamponu) her bir SPE üzerine 5 µL damlatılarak yaklaşık 20 dakika oda sıcaklığında kurutuldu ve her bir elektrot saf su ile yıkandı.

**3.2.12. İmmoblize Lakkaz Enziminin Boyar Maddelerin Gideriminde Kullanılması**

İmmobilize lakkaz enziminin bir uygulaması olarak literatürde tekstil fabrikası atığı olarak ifade edilen Congo Red, Brillant Blue, Sunset Yellow, Orange-G boyar maddelerinin gideriminde kullanımı araştırıldı. Bu amaçla boyar maddeler seyreltilip immobilize lakkaz ile muamele edildikten sonra UV-spektrofotometrede Congo Red için 498 nm’de, Sunset Yellow için 482 nm, Brillant Blue için 553 nm, Orange-G için 479 nm’de belirli zaman aralıklarında alınan absorbans değerleriyle % giderimleri hesaplandı ve grafiğe aktarıldı.

**3.2.13. İmmobilize Lakkaz Enziminin Fenolik Bileşiklerin Gideriminde Kullanılması**

İmmobilize lakkaz enziminin atık sularda bulunabilen fenol, 2,4-diklorofenol ve fenolik lignin bileşiği olan guaiakol gideriminde kullanımı araştırıldı. Bu amaçla UV- spektrofometrede fenol için 510 nm, 2,4-diklorofenol için 510 nm, guaiakol için 470 nm’de farklı derişimlerde absorbans değerleri okunarak standart grafikler oluşturuldu. Standart grafiklere göre; fenol için 0,2 mM, 2,4-diklorofenol için 0,3 mM, Guaiakol için 0,2 mM derişimleri seçildi. Fenol ve 2,4-dikolorofenol için; kör küvetine 0,1 mL K3Fe(CN)6 (83,4 mM), 0,1 mL 4-aminoantipirin (20 mM), 0,8 mL NaHCO3 (250mM), örnek küvetine ise 0,1 mL K3Fe(CN)6 (83,4 mM), 0,1 mL 4-aminoantiripin (20 mM), 0,8 mL lakkaz ile muamele edilmiş fenolik bileşik eklendi ve belirlenen dalga boylarında belirli zaman aralıklarında absorbansları okunarak % giderim değerleri hesaplandı (Quintanilla-Guerrero ve diğerleri, 2008; Wu ve diğerleri, 2019). Hu ve diğerleri (2015)’de anlatıldığı gibi Guaiakol için belirlenen derişimde hazırlanıp immobilize enzim ile belirli süre muamele edilip immobilize enzim mıknatıs yardımıyla uzaklaştırılıp belirlenen dalga boyunda absorbanslar okunarak % giderim değeri hesaplandı.

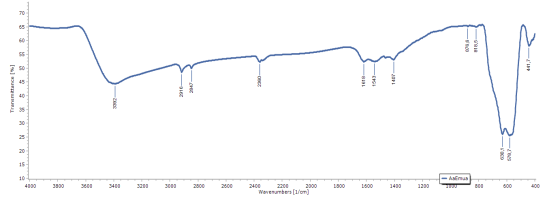
**4. BULGULAR**

**4.1. Gümüş Kaplı Manyetik Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu**

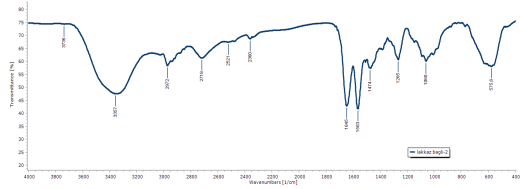
Bu tezde gümüş kaplı manyetik nanopartiküller kimyasal indirgenme yöntemi ile sentezlenmiş ve MUA ile kaplanarak, lakkaz enziminin kovalent immobilizasyonda kullanılmıştır. İmmobilizasyon işlemi sonucunda manyetik nanopartiküllere kovalent olarak bağlanan lakkaz miktarı 167,64 mg/g nanopartikül olarak hesaplanmıştır. Bu senteze ilişkin şema Şekil 9’da sunulmuştur. Enzim bağlı manyetik nanopartiküllerin karakterizasyonu için FTIR ve TEM tekniklerinden yararlanılmıştır. Resim 1’de a ve b’de MUA bağlı manyetik gümüş nanopartiküllerin ve lakkaz bağlı manyetik gümüş nanopartiküllerin FTIR spektrumları görülmektedir. Resim 2 a ve b’de ise sentezlenen enzim bağlı manyetik nanopartiküllerin TEM ve EDX analizlerine ilişkin sonuçları verilmiştir. Hazırlanan nanopartiküllerin manyetik özelliği bir mıknatıs ile kontrol edilmiş ayrıca ESR tekniği kullanılarak gösterilmiştir ve elde edilen grafik Resim 3’de sunulmuştur.



**Şekil 9.** Gümüş kaplı manyetik nanopartiküllere lakkaz enziminin immobilizasyonu.



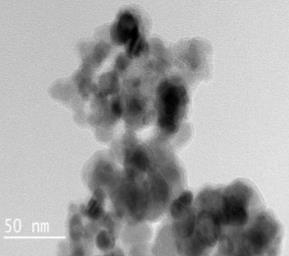
**a)**



**b)**

**Resim 1.** a) MUA bağlı, b) lakkaz bağlı gümüş kaplı manyetik nanopartiküllerin FTIR spektrumu.

metin, açık hava içeren bir resim

Açıklama otomatik olarak oluşturuldu

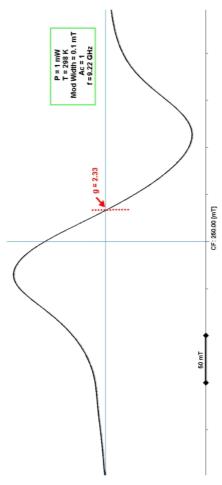
**a)**

metin, ağaç, yeşil içeren bir resim

Açıklama otomatik olarak oluşturuldu

**b)**

**Resim 2.** Lakkaz bağlı manyetik nanopartiküllerin TEM analizi (a) ve EDX analizi (b).



**Resim 3.** Manyetik nanopartiküllerin ESR spektrumu.

**4.2. Gümüş Kaplı Manyetik Nanopartiküllere Lakkaz İmmobilizasyonu ve Aktiviteye Etki Eden Faktörlerin İncelenmesi**

Bu tezde MUA ile modifiye edilmiş gümüş kaplı manyetik nanopartiküllere EDC ve NHS kimyası kullanılarak lakkaz enziminin kovalent immobilizasyonu gerçekleştirildi.

Serbest ve İmmobilize lakkaz aktivitesine pH’ın etkisi pH 2,5 ve pH 9,0 arasında farklı tampon çözeltileri kullanılarak incelendi ve elde edilen sonuçlar Şekil 10’da gösterilmiştir. Buradan serbest ve immobilize enzimin optimum pH’nın 3,0 olduğu tespit edilmiştir.

pH

% Aktivite

**Şekil 10.** Serbest ve immobilize lakkaz aktivitesine pH’ın etkisi.

Serbest ve immobilize lakkaz aktivitesine sıcaklığın etkisi 4°C ve 65°C aralığında incelenmiş ve sonuçlar Şekil 11’de gösterilmiştir. Serbest lakkaz enzimi için optimum sıcaklık 45°C, immobilize enzim için optimum sıcaklık ise 55°C olarak saptanmıştır.

Sıcaklık(°C)

% Aktivite

**Şekil 11.** Serbest ve immobilize lakkaz aktivitesine sıcaklığın etkisi.

Serbest ve immoblize lakkaz aktivitesine substrat derişiminin etkisi Şekil 12’de gösterilmiş ve bu grafiklerden hesaplanan Km ve Vmax değerleri Tablo 1’de sunulmuştur.

1/ [S]

1/V

**Şekil 12.** Serbest ve immobilize lakkaz için Lineweaver-Burk grafiği.

**Tablo 1.** Serbest ve immobilize lakkazın kinetik parametreleri.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | **Km(mM)** | **Vmax (µmol/dk)** |
| Serbest Enzim | 19,16 | 0,11 |
| İmmobilize Enzim | 5,025 | 0,011 |

**4.3. Serbest ve İmmobilize Lakkazın Isıl ve İşlemsel Kararlılığının İncelenmesi**

Serbest ve immobilize lakkazın ısıl kararlılığı 60°C’de zamana bağlı olarak izlenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 13’de verilmiştir. Serbest enzim 60 dakikanın sonunda başlangıç aktivitesinin %3,76’sını, immobilize enzim 190 dakika sonunda başlangıç aktivitesinin %21,75’ni göstermiştir.

Zaman (dk)

% Aktivite

**Şekil 13.** Serbest ve immobilize lakkaz aktivitesinin 60°C’de zamana bağlı değişimi.

İmmobilize lakkazın işlemsel kararlılığının belirlenmesi için lakkaz bağlı gümüş kaplı manyetik nanopartiküller art arda 10 kez kullanılmış ve 10 kez kullanım sonunda immobilize lakkaz başlangıç aktivitesinin %58,13’nü korumuştur.

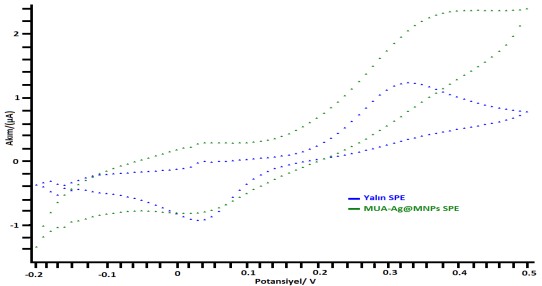
Tekrar sayısı

% Aktivite

**Şekil 14.** İmmobilize lakkazın işlemsel kararlılığının incelenmesi.

**4.4. Lakkaz İmmobilize Edilmiş Gümüş Kaplı Manyetik Nanopartiküllerin Elektrokimyasal Davranışının İncelenmesi**

Lakkaz immobilize edilmiş gümüş kaplı manyetik nanopartiküllerin elektrokimyasal davranışını değerlendirmek için yalın ve manyetik nanopartiküllerle modifiye edilmiş SPE’lerin CV analizi yapılarak Şekil 15 a’da, serbest ve immobilize lakkaz kullanılarak elde edilen modifiye SPE’lerin CV sonuçları Şekil 15 b’de ve boş manyetik nanopartiküller ve enzim bağlı nanopartiküllerin CV sonuçları Şekil 15 c’de verilmiştir.

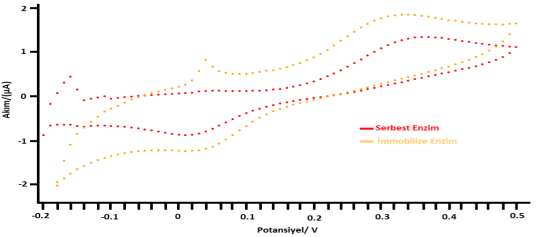


**(b)**

**(a)**

Yalın SPE

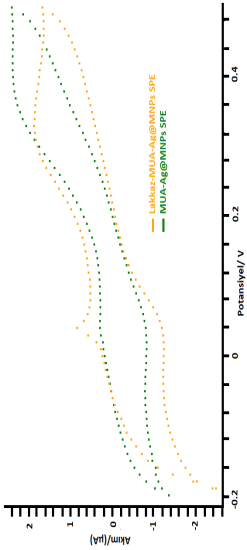
Manyetik nanopartiküllerle modifiye SPE



**(c)**

Serbest enzim

İmmobilize enzim



Enzim bağlı manyetik nanopartiküller ile modifiye SPE

Boş manyetik nanopatilüller ile modifiye SPE

**Şekil 15.** a) yalın ve manyetik nanopartiküllerle, b) serbest ve immobilize lakkaz ile, c) boş ve enzim bağlı manyetik nanopartiküllerle modifiye edilmiş SPE’lerin CV sonuçları.

**4.5. İmmobilize Lakkazın Boyar Madde Gideriminde Etkinliğinin İncelenmesi**

İmmobilize lakkazın boyar madde giderimindeki etkinliğinin değerlendirilmesi için Congo Red, Sunset Yellow, Brillant Blue ve Orange-G boyaları kullanılmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 16, Şekil 17, Şekil 18, Şekil 19’da sunulmuştur.

Zaman (dk)

Congo Red miktarı (%)

**Şekil 16.** İmmobilize lakkazın Congo Red’i zamana bağlı giderimi.

Sunset Yellow miktarı (%)

Zaman (dk)

**Şekil 17.** İmmobilize lakkazın Sunset Yellow’u zamana bağlı giderimi.

Zaman (dk)

Brillant Blue miktarı (%)

**Şekill 18.** İmmobilize lakkazın Brillant Blue’yu zamana bağlı giderimi.

Orange-G mikatrı (%)

Zaman (dk)

**Şekil 19.** İmmobilize lakkazın Orange-G’yi zamana bağlı giderimi.

**4.6. İmmobilize Lakkazın Fenolik Bileşiklerin Gideriminde Etkinliğinin İncelenmesi**

İmmobilize lakkazın fenolik bileşiklerden fenol, 2,4-diklorofenol ve guaiakol giderimindeki etkinliğini değerlendirmek için 180 dakika boyunca immobilize lakkaz fenol bileşikleri ile muamele edilmiş ve % giderim değerleri hesaplanarak sırasıyla Şekil 20, Şekil 21, Şekil 22’de gösterilmiştir.

Zaman (dk)

Fenol miktarı (%)

**Şekil 20.** İmmobilize lakkazın fenol gideriminde zamana bağlı etkinliği.

Zaman (dk)

2,4-diklorofenol mikttarı (%)

**Şekil 21.** İmmobilize lakkazın 2,4-dikolorofenol gideriminde zamana bağlı etkinliği.

Zaman (dk)

Guaiakol miktarı (%)

**Şekil 22.** İmmobilize lakkazın Guaiakol gideriminde zamana bağlı etkinliği.

**5. TARTIŞMA**

**5.1. Gümüş Kaplı Manyetik Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu**

Nanoteknolojideki gelişmeler, spesifik morfolojilerde manyetik nanopartiküllerin üretilmesini ve özel uygulamalar için yüzeylerinin modifiye edilmesini mümkün kılmıştır. Manyetik nanopartiküller kontrollü bir büyüklük ve biyoözgüllük sunan ve dışarıdan yönlendirilebilme kabiliyeti olan iyi tasarlanmış nanomalzemelerdir. İnorganik manyetik nanopartiküllerin fonksiyonelleştirilmesi, biyoetiketleme, biyoayırma ve kataliz gibi biyouygulamalarda oldukça yararlıdır. İnorganik maddeler silika, metaller, ametaller, metal oksitler ve sülfürlerdir. Silika (SiO2), altın ve gümüş çekirdek-kabuk yapısı oluşturmak ve manyetik nanopartiküllerin kararlılığını sağlamak üzere manyetik nanopartiküllerin yüzeyinin modifikasyonunda yaygın olarak kullanılır. Böylece bu çekirdek-kabuk yapılı manyetik nanopartiküller, fonksiyonel gruplarla işlevselleştirilerek çeşitli biyolojik moleküllerin bağlanmasında oldukça başarılı sonuçlar sunar (Bohara ve diğerleri, 2016).

Bu tezde de manyetik özelliği olan Fe3O4 çekirdek yapıları hazırlanarak, yüzeyleri gümüş ile kaplanmış ve MUA ile modifiye edilerek lakkaz enziminin immobilizasyonunda kullanılmıştır. Karakterizasyonu için FTIR, TEM, EDX ve ESR tekniklerinden yararlanılmıştır. Resim 1 a ve b’de sırasıyla MUA ve lakkaz bağlı manyetik gümüş nanopartiküllerin FTIR spektrumları verilmiştir. Her iki spektrumda 3300 cm-1 civarında C-H gerilmeleri görülmektedir. Resim 1 b’de 1645 cm-1, 1563 cm-1, 1265 cm-1’deki bantlar proteinlerin peptit bağlarından kaynaklanan Amid Ⅰ (C=O gerilme), Amid Ⅱ (CN gerilme, NH bükülme) ve Amid Ⅲ (CN gerilme, NH bükülme) bantlarıdır. Resim 2’de hazırlanan lakkaz bağlı manyetik partiküllerin TEM fotoğrafları görülmektedir. Bu fotoğraflardan enzim bağlı manyetik partiküllerin küresel ve 10-20 nm aralığında boyuta sahip olduğu görülmektedir. Resim 2 b’deki EDX analizi manyetik nanopartiküllerin Fe ve Ag içerdiğini ayrıca lakkaz enziminden kaynaklanan Cu elementini de bulundurduğunu ortaya koymuştur. Hazırlanan nanopartiküllerin manyetik özelliği ESR analizi ile araştırılmış, dış manyetik alan artışı ile yerel manyetik olan şiddetinin artışı sinüs eğrilerine benzer bir grafik ile gösterilmiştir. Bu spektrumda 2,33 olarak görülen g faktörü (Fe3+’ün g değerleri düşük spin kompleksleri için 1,4-3,1 ve yüksek spin kompleksleri için 2,0-9,7) hazırlanan nanopartiküllerin manyetik özellik gösterdiğini ortaya koymuştur.

**5.2. Gümüş Kaplı Manyetik Nanopartiküllere Lakkaz İmmobilizasyonu ve Aktiviteye Etki Eden Faktörlerin İncelenmesi**

Literatürde lakkaz immobilizasyonu ile ilgili çok fazla çalışma bulunmaktadır. Bu tezde diğer çalışmalardan farklı olarak lakkaz immobilizasyonu için yeni bir destek materyali olarak gümüş kaplı manyetik nanopartiküller hazırlanarak yüzeyi MUA ile kaplanmış ve EDC-NHS kimyası ile lakkaz enziminin kovalent immobilizasyonunda kullanılmıştır. Gümüş kaplı manyetik nanopartiküllere bağlanan lakkaz miktarı 167,64 mg/g nanopartikül olarak bulunmuştur. Chao ve diğerleri (2018), gözenekli polivinil alkol hallosit hibrid kürelere lakkaz enzimini immobilize etmişler ve bağlanan lakkaz miktarı 237,02 mg/g olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada elde edilen lakkaz bağlanma miktarı, literatür ile yarışabilir düzeydedir. Bu tezde serbest ve immobilize lakkaz için optimum pH değeri 3,0 olarak bulunmuştur. Ancak immobilize lakkazın daha genişleyen bir grafik modeli sergilediği ve bazik bölgeye doğru olan pH’larda daha yüksek aktivite gösterdiği görülmüştür. Benzer sonuçlar diğer araştırmacılarca yapılan çalışmalarda da rapor edilmiştir. Örneğin; Taharen ve diğerleri (2017), nanoliflere immobilize ettikleri *Trametes versicolor* lakkaz enziminin optimum pH değerlerini araştırmışlar ve serbest lakkazın optimum pH’ını 4,0 ile 5,0 arasında, immobilize lakkazın optimum pH’ını 3,0 ile 4,0 arasında bulmuşlardır. Qiu ve diğerleri (2021), amino grubu fonksiyonelleştirilmiş iyonik sıvı ile modifiye manyetik kitosan nanopartiküllere lakkaz enzimini immobilize etmişler ve serbest lakkaz için optimum pH değerini 3,0 ve immobilize enzimlerin optimum pH değerini 3,0-2,5 olarak bulmuşlardır. Liu ve diğerleri (2012), çift modlu karbon bazlı mezogözenekli manyetik kompozitlere lakkaz enzimini immobilize etmişler ve serbest ve immobilize lakkazın optimum pH’larını sırasıyla 3,0 ve 4,0 olarak rapor etmişlerdir.

Bu tezde hazırlanan serbest ve immobilize lakkaz enzimlerinin optimum sıcaklık değerleri 4-65°C arasında araştırılmış ve her iki enzim formunun optimum sıcaklığı 55°C olarak bulunurken, immobilize lakkazın serbest lakkaza göre 65°C’de daha yüksek aktivite sergilediği görülmüştür. Patel ve diğerleri (2014), lakkaz enzimini SiO2 nanopartiküllere immobilize etmişler ve serbest lakkazın optimum sıcaklığını 40°C ve immobilize lakkazın optimum sıcaklığını 45°C olarak rapor etmişlerdir. Zhang ve diğerleri (2020), lakkaz enzimini nano boyutlu manyetik biyolojik kömür üzerine immobilize ettiklerinde, serbest lakkaz için optimum sıcaklığı 40°C ve immobilize lakkaz için 45°C olarak bulmuşlardır. İmmobilizasyonla enzimlerin daha yüksek sıcaklıklarda aktivitelerini korumaları, genellikle görülen bir durumdur.

Serbest ve immobilize lakkazın aktivitelerine substrat derişiminin etkisi incelenerek, Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiş ve kinetik parametreleri hesaplanarak Tablo 1’de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlar immobilize lakkaz enziminin Km değerinin (5,025 mM), serbest lakkaz enziminin Km değerinden (19,16 mM) daha düşük olduğunu yani enzimin substrata ilgisinin arttığını göstermiştir. İmmobilizasyonla Km’de düşüş gözlenen bir durumdur (Pang ve diğerleri, 2016). Maksimum hız değerleri karşılaştırıldığında ise immobilize lakkazın maksimum hızının 10 kat azaldığı görülmüştür.

**5.3. Serbest ve İmmobilize Lakkazın Isıl ve İşlemsel Kararlılığının İncelenmesi**

İmmobilize bir enzimin ısıl kararlılığının yüksek olması endüstriyel alanlarda kullanım etkinliğini arttırdığı için önemli bir parametredir. Bu tezde serbest ve immobilize lakkazın ısıl kararlılığı 60°C’de araştırılmıştır. Bu sıcaklıkta 60. dakikanın sonunda serbest enzim aktivitesini neredeyse tümüyle kaybederken, immobilize enzim başlangıç aktivitesinin yarısından fazlasını korumaktadır. Benzer şekilde yüksek sıcaklıkta immobilize lakkazın, serbest lakkaza göre daha yüksek aktivite gösterdiği çeşitli araştırıcılarca rapor edilmiştir (Qiu ve diğerleri ,2021; Chao ve diğerleri, 2018).

İmmobilize enzimlerin en önemli avantajlarından biri tekrar tekrar kullanılabilmeleridir. Bu kullanımlar sırasında aktivitenin olabildiğince korunması önemlidir. Bu tezde hazırlanan immobilize lakkaz art arda 10 kez kullanılmış ve aktivitesinin yaklaşık olarak %50’si korunmuştur. Mohammadi ve diğerleri (2018) epoksi grubu ile fonksiyonelleştirilmiş silika partiküllere lakkaz enzimini immobilize etmişler ve 10 kez kullanımdan sonra aktivitesinin yaklaşık olarak %20’sinin korunduğunu göstermişlerdir. Bu tezde elde edilen sonuçlar literatür ile yarışabilir durumdadır.

**5.4. Lakkaz İmmobilize Edilmiş Gümüş Kaplı Manyetik Nanopartiküllerin Elektrokimyasal Davranışının İncelenmesi**

Lakkaz immobilize edilmiş gümüş kaplı manyetik nanopartiküllerin elektrokimyasal davranışı CV analizi ile değerlendirilmiş ve karşılaştırma amaçlı olarak yalın elektrot, sadece manyetik nanopartiküllerle modifiye edilmiş elektrot, serbest enzim ve immobilize enzim içeren elektrotlar kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde lakkaz içeren manyetik nanopartiküllerin yüzey alanını arttığı ve biyosensör uygulamalarında yararlı olabileceği görülmüştür. Benzer şekilde Li ve diğerleri (2014) manyetik nanopartiküller ile hazırladıkları lakkaz biyosensörünün başarılı bir şekilde çalıştığını rapor etmişlerdir.

**5.5. İmmobilize Lakkazın Boyar Madde Gideriminde Etkinliğinin İncelenmesi**

İmmobilize lakkaz Congo Red, Sunset Yellow, Brillant Blue ve Orange-G boyalarının gideriminde kullanılmış ve 240 dakika boyunca bu boyaları giderim oranları takip edilmiştir. İmmobilize lakkazın 240 dakika sonunda Congo Red’i %63,46, Sunset Yellow’u %72,96, Brillant Blue'yu’ %43,94 ve Orange-G’yi %92,50 oranında giderdiği görülmüştür. Bayraktaroğlu ve diğerleri (2020) lektin modifiye kriyojellere lakkaz enzimini immobilize ederek, immobilize lakkazı Brillant Blue R, Brillant Green, Orange-G, Procion Red, Congo Red ve Sunset Yellow boyalarının gideriminde kullanmışlardır. Bu tezde elde edilen boya giderim sonuçları, Bayraktaroğlu ve diğerleri (2020) tarafından elde edilen sonuçlar ile yarışabilir seviyededir.

**5.6. İmmobilize Lakkazın Fenolik Bileşiklerin Gideriminde Etkinliğinin İncelenmesi**

İmmobilize lakkazın atık sularda bulunabilecek fenol, 2.4-diklorofenol, guaiakol bileşiklerinin giderimindeki etkinliği 180 dakika boyunca izlenmiş ve sırasıyla giderim oranları %24,70, %52,17, %46,56 olarak bulunmuştur. Bu sürelerde elde edilen % giderim oranları düşük olmakla birlikte, literatüre bakıldığında benzer fenolik bileşiklerin gideriminde 12 saat gibi yüksek sürelerin kullanıldığı görülmüştür. Örneğin; Liu ve diğerleri (2012), fenol ve p-klorofenol uzaklaştırılması için lakkaz içeren çift modlu karbon bazlı mezo gözenekli manyetik kompozitler kullanmışlar ve 1. saatin sonunda bu fenolik bileşiklerin giderim oranlarını %25 olarak belirlemişlerdir. Araştırıcılar 6. saatin sonunda yaklaşık %60 ve 12. saatin sonunda yaklaşık %80 giderim oranları elde ettiklerini rapor etmişlerdir.

**6. SONUÇ VE ÖNERİLER**

Bu tezde lakkaz enziminin kovalent immobilizasyonu için gümüş kaplı manyetik nanopartiküller üretilmiş ve FTIR, TEM, EDX ve ESR teknikleri ile karakterize edilmiştir. Serbest ve immobilize lakkaz aktivitesine pH’ın etkisi pH 2,5 ve pH 9,0 arasında incelenmiş ve serbest ve immobilize enzimin optimum pH’ının 3,0 olduğu tespit edilmiştir. Serbest ve immobilize lakkaz aktivitesine sıcaklığın etkisi 4-65°C aralığındaki sıcaklıklarda incelenmiş ve serbest lakkazın optimum sıcaklığı 45°C iken immobilize lakkazın optimum sıcaklığı 55°C olarak bulunmuştur. Serbest ve immobilize lakkaz aktivitesine substrat derişiminin etkisi incelenmiş ve Km değerleri sırasıyla 19,16 mM ve 5,025mM olarak ve Vmax değerleri ise sırasıyla 0,11µol/dk ve 0,011 µmol/dk olarak bulunmuştur. Km ve Vmax değerlerinin immobilizasyon işlemi sonunda azaldığı görülmüştür. Serbest ve immobilize lakkazın 60°C’deki ısıl kararlılığı zamana bağlı olarak incelenmiş ve serbest enzim 60 dakika sonunda başlangıç aktivitesinin sadece %3,76’sını korururken, immobilize enzimin 190 dakika sonunda başlangıç aktivitesinin % 21,75’ini koruduğu görülmüştür. İmmobilize lakkaz art arda 10 kez kullanılmış ve bu kullanımlar sonunda immobilize enzim başlangıç aktivitesinin % 58,13’ünü korumuştur.

Lakkaz bağlı manyetik nanopartiküllerin elektrokimyasal davranışı CV ölçümleri ile değerlendirilmiş ve biyosensör uygulamaları için gelecek vaat ettiği görülmüştür.

İmmobilize lakkazın boya giderimindeki etkinliği incelenmiş ve 240 dakikanın sonunda Congo Red, Sunset Yellow, Brillant Blue ve Orange- G boyalarının % giderim değerleri sırasıyla % 63,46, % 72,96, % 43, 94 ve % 92,5 olarak bulunmuştur. İmmobilize lakkazın fenolik bileşiklerin giderimindeki etkinliği değerlendirildiğinde ise 180 dakikanın sonunda fenol, 2,4-diklorofenol ve guaiakol bileşiklerinin % giderim değerleri sırasıyla % 24,7, % 52,17 ve % 46,56 olarak bulunmuştur.

Bu tezde çevre dostu bir enzim olan lakkaz, manyetik nanopartiküllere immobilize edilmiş ve bazı boyar maddeler ile fenolik bileşiklerin laboratuvar ortamındaki giderim etkinlikleri araştırılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Hazırlanan enzim immobilize sisteminin çevredeki gerçek atık su örneklerinde kullanılabilirliğinin araştırılması oldukça önemlidir ve gelecekte yapılması planlanan çalışmalardandır. Ayrıca hazırlanan lakkaz bağlı manyetik nanopartiküllerin gelecekte bir biyosensör tasarımında kullanılması ve çevre sularındaki bazı toksik maddelerin tayinindeki etkinliğinin araştırılması çevre sağlığı alanına ciddi katkılar sağlayacak potansiyel çalışmalardan biri olarak görülmektedir.

**KAYNAKLAR**

Abatenh, E., Gizaw, B., Tsegaye, Z., Wassie, M. (2017). The role of microorganisms in bioremediation- a review. *Open Journal of Enviromental Biology,* 2 (1), 038-046. doi:[10.17352/ojeb](https://dx.doi.org/10.17352/ojeb)

Ahmad, R., Sardar, M. (2015). Enzyme immobilization: an overview on nanoparticles as ımmobilization matrix. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 4 (2), 1-8. doi: 10.4172/2161-1009.1000178

Alcade,M., Ferre, M., Plou, F.J., Ballesteros, A. (2006). Enviromental biocatalysis: from remediation with enzyme to novel green processes. *Trends in Biotechnology*, 24 (6), 1-58. doi: [10.1016/j.tibtech.2006.04.002](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.04.002)

Amin, R., Khorshidi, A., Shojaei, A., Rezaei, S., Faramarzi, M. (2018). Immobilization of laccase on modified fe3o4@sio2@kit-6 magnetite nanoparticles for enhanced delignification of olive pomace bio-waste*. International Journal of Biological Macromolecules,* 114, 106-113. doi: [10.1016/j.ijbiomac.2018.03.086](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.086)

Arregui, L., Ayala, M., Gomez-Gil, X., Gutierrez-Soto, G., Hernandez-Luna, C., Santos, M., ... Valdez-Cruz, N. (2019). Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation. *Microbial Cell Factories,* 18:200, 1-33. doi: [10.1186/s12934-019-1248-0](https://doi.org/10.1186/s12934-019-1248-0)

# Bayraktaroğlu, M., Husein, İ., Aktaş Uygun, D., Uygun, M. (2020). Lectin-modified cryogels for laccase ımmobilization: a decolorization study. *Water Air Soil Pollut,* 231 (31), 1-13. [doi: 10.1007/s11270-020-4395-3](https://doi.org/10.1007/s11270-020-4395-3)

Barrios-Estrada, C., Rostro-Alanis, M. de J., Munoz-Gutierrez, B.D., Iqbal, H.M.N., Kannan, S., Parra-Saldivar, R. (2018). Emergent contaminants: Endocrine disruptors and their laccase-asisted degradation- Arewiev. Science of the Total Enviroment, 612, 1516-1531. doi: [10.1016/j.scitotenv.2017.09.013](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.013)

Bilal, M., Rasheed, T., Nabeel, F., Iqbal, H., Zhao, Y. (2019). Hazardous contaminants in the environment and their laccase-assisted degradation- a review. *Journal of Enviromental Management,*234, 253-264. [doi: 10.1016/j.jenvman.2019.01.001](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.01.001)

Bohara, R., Thorat, N., Pawar, S. (2016). Role of functionalization: strategies to explore potential nano-bio applications of magnetic nanoparticles. *The Royal Society of Chemistry,* 6, 43989-44012. doi: 10.1039/c6ra02129h

Bourbonnais, R., Paice M.G. 1992. Demethylation and delignification of kraft pulp by *Trametes* laccase. Applied Microbiology and Biotechnology, 36: 823–827.

Chao, C., Guan, H., Zhang, J., Liu, Y., Zhao, Y., Zhang, B. (2018). Immobilization of laccase onto porous polyvinyl alcohol/ halloysite hybrid beads for dye removal*. Water Science & Technology,* 809-818. doi: 10.2166/wst.2017.594

Drozd, R., Rakoczy, R., Wasak, A., Junka, A., Fijałkowski, K. (2018). The application of magnetically modified bacterial cellulose forimmobilization of laccase. *International Journal of Biological Macromolecules,* 108, 462-470. [doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.12.031](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.031)

Facin, B. R., Melchiors, M. S., Valério, A., Oliveira, J. V., Oliveira, D. D. (2019). Driving immobilized lipases as biocatalysts: 10 years state of the art and future prospects. *Industrial &amp; Engineering Chemistry Research*, 58(14), 5358-5378. doi: 10.1021/acs.iecr.9b00448

Gonzalez-Coronel, L., Cobas, M., Rostro-Alanis, M., Parra-Saldívar, R., Hernandez-Luna, C., Pazos, M., Sanromán, M. (2017). Immobilization of laccase of Pycnoporus sanguineus CS43. *New Biotechnology,* 39, 141-149. [doi: 10.1016/j.nbt.2016.12.003](http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2016.12.003)

Hongyan, L., Zexiong, Z., Shiwei, X., He, X., Yinian, Z., Haiyun, L., Zhongsheng, Y. (2019). Study on transformation and degradation of bisphenol A by Trametes versicolor laccase and simulation of molecular docking. *Chemosphere,* 224, 743-750. [doi:10.1016/j.chemosphere.2019.02.143](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.143)

Huang, S-H., Juang, R-S. (2011). Biochemical and biomedical applications of multifunctional magnetic nanoparticles: a rewiev. *Journal of Nanoparticle Research,* 13, 4411-4430. doi:10.1007/s11051-011-0551-4

Hu, J., Yuan, B., Zhang, Y., & Guo, M. (2015). Immobilization of laccase on magnetic silica nanoparticles and its application in the oxidation of guaiacol, a phenolic lignin model compound. *RSC advances*, *5*(120), 99439-99447.

Jaiswal, N., Pandey, V., Dwivedi, U. (2016). Immobilization of papaya laccase in chitosan led to improvedmultipronged stability and dye discoloration. *International Journal of Biological Macromolecules,* 86, 288-295. [doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.01.079](http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.079)

Jun, L., Yon, L., Mubarak, N., Bing, C., Pan, S., Danquah, M., ...Khalid, M. (2019). An overview of immobilized enzyme technologies for dye and phenolic removal from wastewater*. Journal of Environmental Chemical Engineering,* 7, 1-14. [doi:10.1016/j.jece.2019.102961](https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.102961)

Kalkan, N., Aksoy, S., Aksoy, E., Hasirci, N. (2011). Preparation of chitosan-coated magnetite nanoparticles and application for ımmobilization of laccase. *Journal of Applied Polymer Science,* 123, 707-716. doi: 10.1002/app

Karigar, C., Rao, S.(2011). Role ofmicrobial enzymes in the bioremediation of pollutants: a review*. Enzyme Research,* 1-11. doi:10.4061/2011/805187

[Kharisov](https://pubs.rsc.org/en/results?searchtext=Author%3ABoris%20I.%20Kharisov), B., [Rasika Dias](https://pubs.rsc.org/en/results?searchtext=Author%3AH.%20V.%20Rasika%20Dias), H., [Kharissova](https://pubs.rsc.org/en/results?searchtext=Author%3AOxana%20V.%20Kharissova), O., [Vázquez](https://pubs.rsc.org/en/results?searchtext=Author%3AAlejandro%20V%C3%A1zquez), A., [Peña](https://pubs.rsc.org/en/results?searchtext=Author%3AYolanda%20Pe%C3%B1a), Y., [Gómez](https://pubs.rsc.org/en/results?searchtext=Author%3AIdalia%20G%C3%B3mez), I. (2014). Solubilization, dispersion and stabilization of magnetic nanoparticles in water and non-aqueous solvents: recent trends. *RSC Advences*, 4, 45354-45381. doi: 10.1039/c4ra06902a

Kumar, L., Bharadvaja, N. (2019). Enzymatic bioremediation: a smart tool to fight enviromental pollutants. P. Bhatt (Ed), Smart bioremediation technologies, microbial enzymes (pp 99-118). Academic Press.

# Li, D., Pang, Z., Ding, L., Wang, Q., Ke, C., Huang, F., Wei, Q. (2014). Novel phenolic biosensor based on a magnetic polydopaminelaccase-nickel nanoparticle loaded carbon nanofiber composite. *ACS Applied Materials & Interfaces,* 6, 5144−5151. doi:10.1021/am500375n

Liu, Y., Zeng, Z., Zeng, G., Tang, L., Pang, Y., Li, Z., ... Xie, G. (2012). Immobilization of laccase on magnetic bimodal mesoporous carbon and the application in the removal of phenolic compounds. *Bioresource Technology,* 115, 21-26. doi:10.1016/j.biortech.2011.11.015

Megharaj, M., Ramakrishnan, B., Venkateswarlu, K., Sethunathan, N., Naidu, R., (2011). Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. *Environment International,* 37, 1362-1375. doi:10.1016/j.envint.2011.06.003

Mogharabi, M., Nassiri-Koopaei, N., Bozorgi-Koushalshahi, M., Nafissi-Varcheh, N., Bagherzadeh, G., Faramarzi, M. (2012). Immobilization of laccase in alginate-gelatinmixed gel and decolorization of synthetic dyes. *Bioinorganic Chemistry and Applications,* 1-6. doi:10.1155/2012/823830

Mohammadi, M., As’habi, M., Salehi, P., Yousefi, M., Nazari, M., Brask, J. (2018). Immobilization of laccase on epoxy-functionalized silica and itsapplication in biodegradation of phenolic compounds*. International Journal of Biological Macromolecules,* 109, 443-447. [doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.12.102](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.102)

Mohammed, L., Gomaa, H., Ragab, D., Zhu, J. (2017). Magnetic nanoparticles for environmental and biomedical applications: A review, [*Particuology*](https://www.sciencedirect.com/science/journal/16742001)*, 30, 1-14.* [doi:10.1016/j.partic.2016.06.001](https://doi.org/10.1016/j.partic.2016.06.001)

Nguyen, H., Kim, M. (2017). An overview of techniques in enzyme ımmobilization*. Applied Science Convergence Technoogy,* 26(6), 157-163. [doi:10.5757/ASCT.2017.26.6.157](http://dx.doi.org/10.5757/ASCT.2017.26.6.157)

Pang, S., Wu, Y., Zhang, X., Li, B., Ouyang, J., Ding, M. (2016). Immobilization of laccase via adsorption onto bimodal mesoporousZr-MOF. *Process Biochemistry,* 51, 229-239. [doi:10.1016/j.procbio.2015.11.033](http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2015.11.033)

Park, J., Xue, H., Jung, J., Ryu, K. (2012). Immobilization of laccase on carbon nanomaterials. *Korean Journal of Chemical Engineering,* 29(10), 1409-1412. doi: 10.1007/s11814-012-0024-1

Patel, S., Kalia, V., Choi, J., Haw, J., Kim, I., Lee, J. (2014). Immobilization of laccase on SiO2nanocarriers ımproves ıts stability and reusability. *Journal of Microbiology and Technology,* 24(5), 639-647. [doi:10.4014/jmb.1401.01025](http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1401.01025)

Piontek, K., Antorini§,M., Choinowski, T. (2002). Crystal Structure of a Laccase from the Fungus Trametes versicolor at 1.90-Å Resolution Containing a Full Complement of Coppers*, The Journal Of Bıologıcal Chemıstry,* 277 (40), 37663-37669. doi: 10.1074/jbc.M204571200

Quintanilla-Guerrero, F., Duarte-Vázquez, M., García-Almendarez, B., Tinoco, R., Vazquez-Duhalt, R., Regalado, C. (2008). Polyethylene glycol improves phenol removal by immobilized turnip peroxidase. *Bioresource Technology,* 99, 8605–8611

Qiu, X., Wang, S., Miao, S., Suo, Xu, H., Hu, Y. (2021). Co-immobilization of laccase and ABTS onto amino-functionalized ionic liquid-modified magnetic chitosan nanoparticles for pollutants removal. *Journal of Hazardous Materials,* 401, 1-11. [doi:10.1016/j.jhazmat.2020.123353](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123353)

Rodríguez-Delgado, M., Alemán-Nava, G., Rodríguez-Delgado, J., Dieck-Assad, G., Martínez-Chapa, S., Barceló, D., Parra, R. (2015). Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds. *Trends in Analytical Chemistry,* 74, 21-45. [doi:10.1016/j.trac.2015.05.008](http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2015.05.008)

Sharma, B., Dangi, A., Shukla, P. (2018). Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: A review. *Journal of Enviromental Management,* 210, 10-22. [doi:10.1016/j.jenvman.2017.12.075](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.12.075)

Samanta, S., Singh, O., Jain, R. (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons: enviromental pollution and bioremediation. *Trends in Biotechnology*, 20 (6), 243-248. doi: [10.1016/S0167-7799(02)01943-1](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(02)01943-1)

Shukla, K., Singh, N., Sharma, S. (2010). Bioremediation: developments, current practices and perspectives. *Genetic Engineering and Biotechnology Journal,* 3, 1-21.

Simón de Dios,A., Díaz-García, M. (2010). Multifunctional nanoparticles: Analytical prospects. *Analytica Chimica Acta,* 666, 1-22. doi:10.1016/j.aca.2010.03.038

Skoronski, E., Souza, D., Ely, C., Broilo, F., Fernandes, M., Junior, A., Ghislandi, M. (2017). Immobilization of laccase from Aspergillus oryzae on graphenenanosheets. *International Journal of Biological Macromolecules,* 99, 121-127. [doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.02.076](http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.076)

Stoilova, I., Krastanov, A., Stanchev, V. (2010). Properties of crude laccase from Trametes versicolor produced by solid-substrate fermentation. *Advances in Bioscience and Biotechnology,* 1, 208-215. doi:10.4236/abb.2010.13029

Taharen, M., Naghdi, M., Brar, S., Knystautas, E., Verma, M., Surampalli, R. (2017). Covalent Immobilization of Laccase onto Nanofibrous Membrane for Degradation of Pharmaceutical Residues in Water. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering,* 5, 10430-10438. doi: 10.1021/acssuschemeng.7b02465

Thangaraj, B., Solomon, P. (2019). Immobilization of Lipases – A Review. Part I: Enzyme Immobilization. *ChemBioEng Review,* 6 (5), 157-166. [doi:10.1002/cben.201900016](https://doi.org/10.1002/cben.201900016)

Ugwuodo, C., Nwagu, T. (2021). Stabilizing enzymes by immobilization on bacterial spores: A review of literature*. International Journal of Biological Macromolecules,* 166, 238-250. [doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.10.171](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.171)

Viswanath, B., Rajesh, B., Janardhan, A., Kumar, A., Narasimha, G. (2014). Fungal laccases and their applications in bioremediation*. Enzyme Research,* 1-21. [doi:10.1155/2014/163242](http://dx.doi.org/10.1155/2014/163242)

Wang, F., Ma, A., Guo, C., Zhuang, G., Liu, C. (2013). Ultrasound-intensified laccase production from Trametes versicolor. *Ultrasonics Sonochemistry,* 20, 118-124. [doi:10.1016/j.ultsonch.2012.05.003](http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.05.003)

Wu, E., Li, Y., Huang, Q., Yang, Z., Wei, A., Hu, Q. (2019). Laccase immobilization on amino-functionalized magnetic metal organic framework for phenolic compound removal. *Chemosphere,* 233, 327-335. doi:10.1016/j.chemosphere/2019.05.150

Xu, J., Sun, J., Wang, Y., Sheng, J., Wang, F., Sun, W. (2014). Application of ıron magnetic nanoparticles in protein ımmobilization. *Molecules,* 19, 11465-11486. doi:10.3390/molecules190811465

Yavaşer, R. (2019). *Poliakrilamid-aljinat kriyojellere lakkaz immobilizasyonu ve uygulamalarının araştırılması.* Doktora Tezi, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.

Zhang, Y., Piao, M., He, L., Yao, L., Piao, T., Liu, Z., Piao, Y. (2020). Immobilization of laccase on magnetically separable biochar for highly efficient removal of bisphenol A in water. *Royal Society of Chemistry,* 10, 4795-4804. doi: 10.1039/c9ra08800h

Zheng, F., Cui, B., Wu, X., Meng, G., Liu, H., Si, J. (2016). Immobilization of laccase onto chitosan beads to enhance its capability to degrade synthetic dyes*. International Biodeterioration & Biodegradation,* 110, 69-78. [doi:10.1016/j.ibiod.2016.03.004](http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.03.004)

Zhou, W., Zhang, W., Gai, Y. (2021). Laccase immobilization for water purification: A comprehensive review. *Chemical Engineering Journal,* 403, 1-15. [doi:10.1016/j.cej.2020.126272](https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.126272)

Zofair, S., Arsalan, A., Khan, M., Alhumaydhi, F., Younus, H. (2020). Immobilization of laccase on Sepharose-linked antibody support for decolourization of phenol red. *International Journal of Biological Macromolecules*, 161, 78-87. [doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.06.009](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.009)

**T.C.**

**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİLİMSEL ETİK BEYANI**

“Gümüş Kaplı Manyetik Nanopartiküllere İmmobilize Edilmiş Lakkaz Enziminin Biyoremediyasyon Potansiyelinin İncelenmesi” başlıklı Yüksek Lisans tezimdeki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Burcu Çağatay

….. / …. / 2021

**ÖZ GEÇMİŞ**

|  |  |
| --- | --- |
| **Soyadı, Adı** | **:** ÇAĞATAY, Burcu |
| **Uyruk** . | **:** T.C. |
| **Doğum yeri ve tarihi** | **:** Malatya, 1990 |
| **Telefon** | **:** 05543444359 |
| **E-posta** | **:** brccgty2408@gmail.com |
| **Yabancı dil** | **:** İngilizce |

**EĞİTİM**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Derece** | **Kurum** | **Mezuniyet tarihi** |
| Y. Lisans | Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Çevre Sağlığı Bölümü |  |
| Lisans | Doğu Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi Hemşirelik Bölümü | 2018 |
| Lisans | Pamukkale Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü | 2012 |

**İŞ DENEYİMİ**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Yıl** | **Yer/Kurum** | **Ünvan** |
| 2018-devam | Adnan Menderes Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi | Hemşire |