

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

TRAMETES VERSICOLOR LAKKAZ ENZİMİNİN ÜRETİMİ,
SAFLAŞTIRILMASI, İMMOBİLİZASYONU VE BOYAR MADDE
GİDERİMİNDE KULLANIMI

SEMİH IŞIK

KOCAELİ 2024

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

***TRAMETES VERSICOLOR* LAKKAZ ENZİMİNİN ÜRETİMİ,
SAFLAŞTIRILMASI, İMMOBİLİZASYONU VE BOYAR MADDE
GİDERİMİNDE KULLANIMI**

SEMİH IŞIK

Doç.Dr. Yonca YÜZÜGÜLLÜ KARAKUŞ
Danışman, Kocaeli Üniversitesi

.....

Doç.Dr. Başar UYAR
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniversitesi

.....

Dr. Öğr. Üyesi Zeynep BETTS
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniversitesi

.....

Doç.Dr. Asuman DEVECİ ÖZKAN
Jüri Üyesi, Sakarya Üniversitesi

.....

Dr. Öğr. Üyesi Yeliz ELALMIŞ
Jüri Üyesi, Yıldız Teknik Üniversitesi

.....

Prof. Dr. Üyesi Sevil YÜCEL
Eş Danışman, Yıldız Teknik Üniversitesi

Enstitü Yönetim Kurulunun
29/12/2021 tarih ve 2021/45 nolu
toplantısında II. tez danışmanı
olarak atanmıştır.

Tezin Savunulduğu Tarih: 28.06.2024

ETİK BEYAN VE ARAŞTIRMA FONU DESTEĞİ

Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez/proje çalışmada,

- Bu tezin/projenin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu,
- Çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı,
- Bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi,
- Bu çalışmanın Kocaeli Üniversitesi'nin abone olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun olduğunu,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Tezin/Projenin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez/proje çalışması olarak sunmadığımı, beyan ederim.

Bu tez/proje çalışması kapsamında üretilen veri ve bilgiler Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinatörlüğü 2507 no'lu genel araştırma projesi desteği ile gerçekleştirilmiştir.

Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

.....

Semih IŞIK

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI

Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/projemin tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda belirtilen koşullarla kullanıma açma izninin Kocaeli Üniversitesi'ne verdiğimi beyan ederim. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet hakları bende kalacak, tezimin/projemin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki makale, kitap, tebliğ, lisans, patent gibi çalışmalarda kullanımı, danışmanımın isim hakkı saklı kalmak koşuluyla ve her iki tarafın bilgisi dâhilinde bana ait olacaktır. Tezin/projenin kendi özgün çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin/projenin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim kurulu tarafından yayınlanan “*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricinde YÖK Ulusal Tez Merkezi/ Kocaeli Üniversitesi Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- ☐ Enstitü yönetim kurulu kararı ile tezimin/projemin erişime açılması mezuniyet tarihinden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.
- ☒ Enstitü yönetim kurulu gerekçeli kararı ile tezimin/projemin erişime açılması mezuniyet tarihinden itibaren 6 ay ertelenmiştir.
- ☐ Tezim/projem ile ilgili gizlilik kararı verilmemiştir.

.....

Semih IŞIK

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması, *Trametes versicolor* lakkazının üretimi, saflaştırılması ve biyokimyasal karakterizasyonu, ardından yüksek aktivite geri kazanımla elde edilen lakkazın, üretimi yapılan üç çeşit silika bazlı destek materyallerine iki farklı bağlama metodu ile immobilizasyonu ve karakterizasyonu, serbest ve immobilize formdaki enzimin boyar madde giderim kapasitesinin test edilmesi üzerine gerçekleştirilmiştir.

Doktora eğitim sürecimin her aşamasında bana yol gösteren, farklı bakış açıları edinmeme imkan veren ve en önemlisi düşüncelerimi sınırlandırmayan, her koşulda maddi-manevi desteğini esirgemeyen danışmanım Sayın Doç. Dr. Yonca YÜZÜGÜLLÜ KARAKUŞA'a ve laboratuvarının tüm imkanlarından istifa etmemi sağlayan, farklı bir disiplinde ufkumun açılmasına olanak tanıyan eş danışmanım Sayın Prof. Dr. Sevil YÜCEL'e teşekkür ve sonsuz saygılarımı sunarım. Tez çalışmama katkı sağlayan Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinatörlüğü'ne, laboratuvarında çalışma imkanı tanıyan Prof. Dr. Özlem AKSOY'a, Prof. Dr. Halim Aytekin ERGÜL'e, Doç. Dr. Arda ACEMİ'ye ve fikirleri ile bana katkı sağlayan Dr. Öğr. Üyesi Yeliz ELALMIŞ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Bu uzun yolculukta her daim yanımda olan kıymetli eşim Aslı IŞIK'a, beni bugünlere erdiren değerli annem Zarf İŞIK ve rahmetli babam Abdul Kadir IŞIK'a, her daim yanımda olan kardeşlerim Burak ve Samet IŞIK'a, eşleri Betül ve Esra IŞIK'a, kayınbabam Erol YILDIRIM'a, birlikte çalışmaktan her daim keyif aldığım değerli arkadaşım Arş. Gör. Elif KALE BAKIR'a, laboratuvar arkadaşlarım Simge ÇOLAK, Ayşe TÜRKMENÖĞLU, Tuğçe KARABULUT, Zeynep KARAKÖSE, Buse ÇÖKMEZ, Zülbiye DEMİRTÜRK, Famil YUSUFOĞLU ve Arş. Gör. Cem ÖZEL'e ve can dostlarım Günce GÖÇ ve Doğukan Salih KUTLUTÜRK'e ve son olarak bu zorlu süreçteki katkısını hiçbir zaman unutmayacağım çok kıymetli Seyide YÜZÜGÜLLÜ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Haziran 2024

Semih IŞIK

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN VE ARAŞTIRMA FONU DESTEĞİ.....	i
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI	ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Endüstriyel Atık Sular ve Boyar Maddeler.....	4
2.2. Endüstriyel Enzimler	5
2.3. Enzim Kaynağı Olarak Beyaz Çürükçül Mantarlar	6
2.4. Lakkazlar	7
2.5. İmmobilize Enzimler ve Kullanım Alanları	9
2.6. Üçlü-Faz Ayırma Tekniği.....	11
2.7. İmmobilizasyon	12
2.8. İmmobilizasyonda Kullanılan Taşıyıcılar.....	14
2.8.1. Aerojeller	15
2.8.2. Sol-Jel Üretim Aşamaları ve Çeşitleri	16
2.8.2.1. Jel Oluşumu	17
2.8.2.2. Yaşlandırma	19
2.8.2.3. Kurutma	19
2.8.2.4. Sol-Jel Çeşitleri.....	20
2.8.3. Aerojellerin Fonksiyonelleştirilmesi.....	21
3. MATERYAL-METOT	24
3.1. Malzemeler	24
3.2. Mikroorganizma Kültürü ve Saklama.....	24
3.3. Kalitatif Lakkaz Tayini	25
3.4. Lakkaz Aktivite ve Protein Miktar Tayini	25
3.5. Lakkaz Üretimi için Optimum Koşulların Belirlenmesi.....	26
3.6. Lakkaz Enziminin ÜFA Yöntemi ile Saflaştırılması	27
3.7. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroföresi (SDS-PAGE)	28
3.8. Doğal Poliakrilamid Jel Elektroföresi (PAGE) ve Aktivite Boyaması	29
3.9. Lakkaz Enziminin Karakterizasyonu	30
3.9.1. Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi	30
3.9.2. Sıcaklığın Lakkaz Aktivitesi ve Stabilitesine Etkisi.....	30
3.9.3. pH'nın Lakkaz Aktivitesi ve Stabilitesine Etkisi.....	30
3.9.4. İnhibitörlerin ve Metal İyonlarının Lakkaz Aktivitesine Etkisi.....	31
3.9.5. Sürfaktanların Lakkaz Aktivitesine Etkisi	31
3.9.6. Organik Çözücülerin Lakkaz Aktivitesine Etkisi	32
3.10. Silika Aerojel, Magnezyum Silika Aerojel ve Bakır Silika Aerojel Üretimi	32
3.11. Hazırlanan Aerojel Malzemelerinin Karakterizasyonu	34

3.11.1. Silika Aerojel, Magnezyum Silika Aerojel ve Bakır Silika Aerojellerin 3-(aminopropil)trioksosilan (APTES) ile Yüzey Modifikasyonu (Fonksiyonelleştirilmesi)	34
3.11.2. Brunauer-Emmett-Teller (BET) Yüzey Alanı, Gözenek Boyutu ve Gözenek Hacmi.....	34
3.11.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) Spektroskopisi Ölçümleri.....	34
3.11.4. Aerojellerin Partikül Boyut Analizi	35
3.11.5. Taramalı Elektron Mikroskopu (TEM) Analizi	35
3.11.6. X Işını Floresans Spektroskopisi (X-IFS/XRF) Analizleri.....	35
3.11.7. Zeta Potansiyel Analizi	35
3.12. Lakkaz Enziminin İmmobilizasyonu	36
3.13. İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu	36
3.14. İmmobilize Lakkazın Karakterizasyonu	37
3.15. Boya Renklerinin Giderilmesinde Serbest ve İmmobilize Lakkaz Uygulaması	37
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	39
4.1. Lakkazın Kalitatif Tayini.....	39
4.2. Lakkazın <i>T. versicolor</i> 'dan Üretimi.....	39
4.3. Lakkazın Saflaştırılması	41
4.4. Elektroforez Bulguları	42
4.5. ÜFA ile Saflaştırılan Lakkaz Enziminin Karakterizasyonu	43
4.5.1. Kinetik Parametreler.....	43
4.5.2. Sıcaklığın Lakkaz Aktivitesi ve Kararlılığı Üzerine Etkisi	45
4.5.3. pH'nın Lakkaz Aktivitesi ve Kararlılığı Üzerine Etkisi	48
4.5.4. İnhibitör ve Metal İyonlarının Lakkaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	50
4.5.5. Sürfaktanların Lakkaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	53
4.5.6. Organik Çözücülerin Lakkaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	53
4.6. Hazırlanan Aerojel Malzemelerinin Karakterizasyonu	55
4.6.1. Silika Aerojel, Magnezyum Silika Aerojel ve Bakır Silika Aerojellerin 3-(aminopropil)trioksosilan (APTES) ile Yüzey Modifikasyonu (Fonksiyonelleştirilmesi) Sonrası FT-IR Analizi	55
4.6.2. Brunauer-Emmett-Teller (BET) Yüzey Alanı, Gözenek Boyutu ve Gözenek Hacmi.....	58
4.6.3. Aerojellerin Partikül Boyut Analizi	63
4.6.4. Taramalı Elektron Mikroskopu (TEM).....	63
4.6.5. X Işını Floresans Spektroskopisi (X-IF) Analizleri.....	67
4.6.6. Zeta Potansiyel Analizi	69
4.7. İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu	70
4.7.1. Lakkaz İmmobilizasyonunda Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi.....	70
4.7.2. Lakkaz İmmobilizasyonunda Optimum pH'nın Belirlenmesi	73
4.7.3. Lakkaz İmmobilizasyonunda Optimum Glutaraldehit Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	77
4.7.6. Lakkaz İmmobilizasyonunda Optimum Protein Miktarının Belirlenmesi.....	79
4.7.7. Lakkaz İmmobilizasyonunda Optimum Zamanın Belirlenmesi.....	81
4.7.8. Optimum Koşullarda İmmobilize Edilmiş Lakkaz Enziminin Tekrar Kullanım Sayısı.....	83

4.7.9. İmmobilize Lakkazın Karakterizasyonu.....	86
4.7.9.1. Sıcaklığın İmmobilize Lakkaz Aktivitesi ve Stabilitesine Etkisi.....	86
4.7.9.2. pH'nın İmmobilize Lakkaz Aktivite ve Stabilitesine Etkisi.....	88
4.7.9.3. İmmobilize Lakkazın Kinetik Parametreleri	90
4.8. İmmobilize Lakkaz Enziminin Boyar Madde Giderimde Kullanımı	92
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	97
KAYNAKLAR.....	100
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER.....	127
ÖZGEÇMİŞ.....	128



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Lakkaz bakır merkezleri.....	8
Şekil 2.2.	Lakkaz oksidasyonunun temel gösterimi	9
Şekil 2.3.	Üçlü faz ayırma tekniğinin aşamaları.....	12
Şekil 2.4.	İmmobilizasyon yöntemleri.....	14
Şekil 2.5.	İmmobilizasyonda kullanılan destek materyalleri.....	15
Şekil 2.6.	(a) Hidroliz, (b) Alkol yoğunlaşması, (c) Su yoğunlaşması (c)	18
Şekil 2.7.	Aerojel üretim aşamaları	19
Şekil 2.8.	Amino-fonksiyonelleştirilmiş silikanın sentezinin şematik gösterimi.....	23
Şekil 3.1.	<i>T. versicolor</i> 'un (a) doğadaki ve (b) YpSs'de geliştirilmiş stok kültürlerine ait görüntüsü	24
Şekil 3.2.	Protein miktar tayini için kullanılan standart doğru.....	26
Şekil 3.3.	(a) Silika aerojellerin vakum altından nuçeden süzülmesi, (b) Bakır silika aerojelin jel benzeri yapısı, (c) Magnezyum silika aerojelin jel benzeri yapısı.....	33
Şekil 4.1.	Guakol (5 mM) içeren ortamda kalitatif lakkaz tayini. (a): negatif kontrol, (b): <i>T. versicolor</i>	39
Şekil 4.2.	Farklı inkübasyon ortamlarında (no 1-5, Tablo 3.1) büyütülen <i>T. versicolor</i> 'un fermentasyon sıvısında ölçülen lakkaz aktivite grafiği	40
Şekil 4.3.	Lakkaz numunelerinin elektroforetik analizi.	43
Şekil 4.4.	Lakkaz enziminin (a) guakol, (b) ABTS ve (c) 2,6-DMP substratlarına ait Michaelis-Menten grafikleri	43
Şekil 4.5.	Lakkaz enziminin (a) guakol, (b) ABTS ve (c) 2,6-DMP substratlarına ait Lineweaver-Burk grafikleri	44
Şekil 4.6.	Sıcaklığın lakkaz aktivitesi (a) ve stabilitesi (b, c & d) üzerine etkisinin farklı substratlar varlığında ölçülen grafikleri	46
Şekil 4.7.	pH'nın lakkaz aktivitesi (a) ve stabilitesi (b, c & d) üzerine etkisinin farklı substratlar varlığında ölçülen grafikleri	49
Şekil 4.8.	Silika aerojelin APTES öncesi ve sonrasına ait FT-IR spektrumları.....	56
Şekil 4.9.	Mg-silika aerojelin APTES öncesi ve sonrasına ait FT-IR spektrumları.....	57
Şekil 4.10.	Cu-silika aerojelin APTES öncesi ve sonrasına ait FT-IR spektrumları.....	57
Şekil 4.11.	Aerajellerin azot (N ₂) adsorbsiyon/desorpsiyon izotermi.....	62
Şekil 4.12.	Silika aerojel TEM analizi.....	64
Şekil 4.13.	Mg-silika aerojel TEM Analizi	64
Şekil 4.14.	Cu-Silika Aerojel TEM analizi	65
Şekil 4.15.	Fonksiyonelleştirme sonrası silika aerojel TEM analizi	65
Şekil 4.16.	Fonksiyonelleştirme sonrası Mg-silika aerojel TEM analizi	66
Şekil 4.17.	Fonksiyonelleştirme sonrası Cu-silika aerojel TEM analizi	66
Şekil 4.18.	Fonksiyonelleştirme sonrası (a) silika, (b) Mg-silika ve (c) Cu-silika aerajellerin EDS sonuçları.....	67

Şekil 4.19.	(a) Silika aerojele ve (b) Mg-silika aerojele (c) Cu-silika aerojele kovalent bağlama metodu ile immobilize edilen lakkazın sıcaklık optimizasyonu	72
Şekil 4.20.	(a) Silika aerojele ve (b) Mg-silika aerojele (c) Cu-silika aerojele adsorpsiyon metodu ile immobilize edilen lakkazın sıcaklık optimizasyonu	72
Şekil 4.21.	(a) Silika aerojele, (b) Mg-silika aerojele ve (c) Cu-silika aerojele kovalent bağlama metodu ile immobilize edilen lakkazın pH optimizasyonu	75
Şekil 4.22.	(a) Silika aerojele, (b) Mg-silika aerojele ve (c) Cu-silika aerojele adsorpsiyon metodu ile immobilize edilen lakkazın pH optimizasyonu	76
Şekil 4.23.	(a) Silika aerojel, (b) Mg-silika aerojel ve (c) Cu-silika aerojel kullanılarak yapılan lakkaz immobilizasyonunda gluteralehit konsantrasyonunun belirlenmesi	78
Şekil 4.24.	Cu-silika aerojele (a) kovalent bağlama ve (b) adsorpsiyon ile immobilize edilen lakkazın protein miktarının optimizasyonu.....	81
Şekil 4.25.	Cu-Silika aerojele kovalent bağlama (a) ve adsorpsiyon (b) ile immobilize edilen lakkazın optimum zamanının belirlenmesi	82
Şekil 4.26.	Cu-Silika aerojele kovalent bağlama metodu ile optimum koşullarda immobilize edilen lakkazın tekrar kullanım sayısı	84
Şekil 4.27.	İmmobilize lakkaz enziminin (a) optimal sıcaklık profili ve (b) sıcaklık stabilitesi	87
Şekil 4.28.	İmmobilize lakkaz enziminin (a) optimal pH profili ve (b) pH stabilitesi	89

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1.	Boya çeşitleri ve sınıfları.....	4
Tablo 3.1.	Lakkaz üretimi için kullanılan farklı inkübasyon koşulları	27
Tablo 3.2.	SDS-PAGE’de kullanılan çözeltiler ve hacimleri	28
Tablo 3.3.	Doğal Poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler ve hacimleri	29
Tablo 4.1.	ÜFA sistemiyle lakkaz enziminin saflaştırma bulguları	41
Tablo 4.2.	ÜFA yöntemiyle saflaştırılan lakkaz enziminin farklı substratlara ait K_m ve V_{max} değerleri	44
Tablo 4.3.	İnhibitörlerin <i>T. versicolor</i> lakkaz enzimi üzerindeki etkisi	50
Tablo 4.4.	Metal iyonlarının <i>T. versicolor</i> lakkaz enzimi üzerindeki etkisi.....	52
Tablo 4.5.	Bazı sürfaktanların <i>T. versicolor</i> lakkaz enzimi üzerindeki etkisi	53
Tablo 4.6.	Organik çözücülerin <i>T. versicolor</i> lakkaz enzimi üzerindeki etkisi	54
Tablo 4.7.	Aerojellerin FT-IR spektrum pikleri ve bağ karşılıkları	58
Tablo 4.8.	Hazırlanan aerojellerin BET analizi sonuçları	59
Tablo 4.9.	%1 APTES ile fonksiyonelleştirilmiş aerojellerin BET analizi sonuçları	59
Tablo 4.10.	%5 APTES ile fonksiyonelleştirilmiş aerojellerin BET analizi sonuçları	59
Tablo 4.11.	%10 APTES ile fonksiyonelleştirilmiş aerojellerin BET analizi sonuçları	60
Tablo 4.12.	Hazırlanan aerojellerin partikül boyutları.	63
Tablo 4.13.	Silika aerojel X-IF sonuçları	68
Tablo 4.14.	Mg-silika aerojel X-IF sonuçları	68
Tablo 4.15.	Cu-silika aerojel X-IF sonuçları	68
Tablo 4.16.	Saf ve %10 APTES ile fonksiyonelleştirilmiş destek materyallerinin zeta potansiyelleri	69
Tablo 4.17.	Optimum immobilize lakkaz enzimi verim değerlerinin immobilizasyon metoduna göre karşılaştırılması.....	83
Tablo 4.18.	Serbest lakkaz ve immobilize lakkaz enziminin kinetik sabitlerinin karşılaştırılması	91
Tablo 4.19.	Boya çeşitleri ve sınıfları.....	92
Tablo 4.20.	Serbest ve immobilize lakkazın farklı sürelerde renk giderim yüzdeleri	93
Tablo 4.21.	Cu-silika aerojel destek materyalinin farklı sürelerde renk giderim yüzdeleri.....	93

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	: Yüzde
=	: Eşittir
<	: Daha küçük
>	: Daha büyük
μ l	: Mikrolitre
μ M	: Mikromolar
μ m	: Mikrometre
g	: Gram
kV	: Kilovolt
l	: Litre
M	: Molar
mg/ml	: Miligram/mililitre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
°C	: Santigrat derece
U/mg	: Unit/miligram
U/mL	: Unit/mililitre
s	: Saniye
μ mol/ml/dk	: Unit/mililitre/dakika
mA	: Miliamper
ϵ	: Epsilon
m ²	: Metrekare
cm ³	: Santimetre küp
β	: Beta
K	: Kelvin
V	: Volt
Dk	: Dakika
w/w	: Ağırlık/Ağırlık
λ	: Lamda
g/L	: Gram/litre
w/v	: Ağırlık/hacim
U/L	: Ünite /litre

Kısaltmalar

ABTS	: 2,2'-Azino-Bis(3-Etilbenzotiazolin-6-Sülfonik Asit
APS	: Amonyum Persülfat
APTES	: 3-Aminopropyl)Triethoxysilane
AS	: Amonyum Sülfat
BCA	: Sığır Serum Albumin
BET	: Brunauer Emmett ve Teller Teorisi
BJH	: Kümülatif Desorpsiyon Por Hacmi
BUT	: t-Bütanol
D.M	: Destek Materyali
DMOP	: 2,6-Dimetoksifenol
EDS	: Enerji Dispersiv Spektrum

EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
FT-IR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GK	: Alt Fazda Ölçülen Verim
GLU	: Glutaraldehit
HBT	: 1-Hidroksibenzotriazol
HE	: Ham Ekstrakt
HIV	: İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
IEN	: İzoelektrik Nokta
İ.E	: İmmobilize Enzim
kDa	: Kilodalton
Mv	: Milivolt
NADH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit
pH	: Power of Hydrogen (Hidrojenin Gücü)
pI	: Isoelectric Point (İzoelektrik Noktası)
PMSF	: Fenilmetilsülfonil Florür
RPM	: Dakikadaki Devir Sayısı
RPM	: Revolutions Per Minute (Dakikada Devir Sayısı)
S.E	: Serbest Enzim
SA	: Spesifik Aktivite
SD	: Standart Değer
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SK	: Saflaştırma Katsayısı
TEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
TEM	: Transmisyon Elektron Mikroskobu
TEMED	: Tetrametiletildiamin
UV	: Ultra Viyole
ÜFA	: Üçlü Faz Ayırma
X-IFS	: X Işını Floresans Spektroskopisi
Ypss	: Maya Ekstrakt Çözünebilir Nişasta Agar

TRAMETES VERSICOLOR LAKKAZ ENZİMİNİN ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI, İMMOBİLİZASYONU VE BOYAR MADDE GİDERİMİNDE KULLANIMI

ÖZET

Trametes versicolor, beyaz çürükçül mantarlardan olup iyi bir lakkaz üreticisidir. Lakkaz enziminin boyar madde giderimindeki etkinliği serbest ve immobilize formunun sahip olduğu farklı biyokimyasal özelliklerine göre değişiklik göstermektedir. Ayrıca immobilizasyonda kullanılacak olan destek materyalleri de uygulama sürecinde verimlilik açısından önem arz etmektedir. Bu çalışma, *T. versicolor* lakkazının üretimi, saflaştırılması, biyokimyasal karakterizasyonu, immobilizasyonu ve farklı boyar maddelerin renk gideriminin üzerindeki etkinliğini içermektedir. Buna göre, yüksek aktivite değerinde (5000 U/L) üretilen lakkaz enzimi üçlü faz ayırma yöntemi ile %204 geri kazanımla 2,3 kat saflaştırıldı. Enzim için en iyi substrat 2,6-DMP ($K_m=0,1$ mM) olup bunu ABTS ($K_m=0,2$ mM) ve guakol ($K_m=3,8$ mM) izlemektedir. Optimum sıcaklık değeri tüm substratlarda 70 °C, optimum pH ise guakol için pH 5,5, ABTS için pH 4,0 ve 2,6-DMP için pH 5,0 olarak belirlendi. Substrata göre değişmekle birlikte geniş bir sıcaklık (40-80 °C) ve pH (3,5-7,0) aralığında aktif olduğu gözlemlendi. Enzim immobilizasyonu için, yüksek yüzey alanına sahip silika aerogel (535 m²/g), Mg-silika aerogel (437 m²/g) ve Cu-silika (370 m²/g) aerogel kullanıldı. Lakkaz enzimi bu aerojellerden Cu-silika aerogel'e kovalent bağlama yöntemi ile 4 saat, 25 °C sıcaklık, pH 4,5 ve 12 mg/g lakkaz miktarı ile %93 immobilizasyon verimliliği ve %93 aktivite verimliliği ile immobilize edildi. Cu-silika aerogele immobilize edilen lakkaz enzimin 24 saat sonunda commasie brilliant blue G 250 (serbest lakkaz %64) ve kongo kırmızısı (serbest lakkaz %83) boyalarını %100, metilen mavisi boyasını (serbest lakkaz %65) %95 oranında giderdiği gözlemlendi. Bu çalışma boyar madde gideriminde çeşitli immobilize enzimlerin tasarlanmasına, farklı destek materyallerinin boyar maddeler üzerindeki etkinliğinin test edilmesine olanak sağlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Aerojeller, Cu-silika Aerogel, Dekolorizasyon, İmmobilizasyon, Lakkaz.

PRODUCTION, PURIFICATION, IMMOBILIZATION OF *TRAMETES VERSICOLOR* LACCASE ENZYME AND ITS USE IN DYE REMOVAL

ABSTRACT

Trametes versicolor, a white rot fungus, is known for producing laccase, an enzyme effective in dye removal. The efficiency of laccase varies between its free and immobilized forms, and the choice of carrier materials for immobilization significantly impacts the application process. This study investigates the preparation, purification, biochemical characterization, immobilization, and activity of *T. versicolor* laccase in dye decolorization. The enzyme was produced with a high activity (5000 U/L) and purified 2.3-fold using a triple phase separation method, resulting in a recovery of 204. The enzyme's best substrate was 2,6-DMP ($K_m=0.1$ mM), followed by ABTS ($K_m=0.2$ mM) and guaiacol ($K_m=3.8$ mM). Optimal temperature for all substrates was 70 °C, while optimal pH varied: 5.5 for guaiacol, 4.0 for ABTS, and 5.0 for 2,6-DMP. The enzyme remained active over a broad temperature range (40-80 °C) and pH range (3.5-7.0). High surface area silica aerogel (535 m²/g), Mg silica aerogel (437 m²/g), and Cu silica aerogel (370 m²/g) were used for enzyme immobilization. Laccase immobilization on Cu-silica aerogel achieved 93% efficiency at 25 °C, pH 4.5, and 12 mg/g laccase, with 93% activity retention. The immobilized enzyme removed 100% of Coomassie brilliant blue G 250 (free laccase 64%) and Congo red (free laccase 83%), and 95% of methylene blue (free laccase 65%) after 24 hours. This study highlights the potential to develop various immobilized enzymes for dye removal and to test different carrier materials for efficiency.

Keywords: Aerogels, Cu-silica Aerogel, Decolourization, Immobilization, Laccase.

1.GİRİŞ

Günümüzde endüstri kaynaklı kirleticilerin etkileri artarak büyüyen bir problem haline gelmektedir. Bu kirleticiler arasında en yaygın olanları endüstriyel boyalardır (Liu ve diğ., 2021). Endüstriyel boyaların hiçbir işleme tabi tutulmadan ya da kısmi olarak ayrıştırıldığı durumlarda canlı ekosistem üzerinde ciddi etkileri bulunmaktadır. Bu tip çevresel kirleticilere karşı enzimlerin kullanımı, büyük bir avantaj sağlamaktadır. Özellikle boyar maddeler üzerinde etkinliği olduğu bilinen enzimler, mevcut etkinliklerine ilave olarak daha dayanıklı ve tekrar kullanılabilir formlarda üretildiklerinde daha da ilgi çekici hale gelmektedirler. Bu sebeple kullanılan enzimin kaynağına, üretim ve saflaştırma metotlarına ilave olarak daha etkili immobilizasyon materyallerine ve yöntemlerine de ihtiyaç duyulmaktadır (Rodríguez ve diğ., 1999).

Lakkaz, oksidoredüktaz sınıfında yer alan çoklu bakır içeren bir enzimdir. Aromatik aminler, difenoller ve alifatik aminlerin yanı sıra çeşitli fenolik ve fenolik olmayan bileşikler oksitlerler (Surwase ve diğ., 2016). Genişletilmiş stabilite ve geniş substrat seçiciliği nedeniyle, çeşitli biyoteknolojik uygulamalar için son derece yararlı biyokatalizördür (Bilal ve diğ., 2019). Bu oksidoredüktaz enzimi, lif biyosentezi, enerji kullanımı, çevre koruma, biyo-algılama, gıda iyileştirme, kozmetik endüstrisi, kâğıt endüstrisi, tekstil endüstrisi ve çevresel kirleticilerin biyolojik olarak parçalanması gibi gelecek vaat eden endüstriyel uygulamalara ilişkin özelliklerin geliştirilmesinde yüksek öneme sahiptir (Zheng ve diğ., 2016).

Enzimlerin etkinliklerinin yanında saflaştırma yöntemleri de büyük önem taşımaktadır. Üçlü faz ayırma yöntemi (ÜFA), ucuz ve etkili bir ayırma yöntemidir. ÜFA, enzimler, proteinler, karbohidratlar, yağlar, flavonoidler ve küçük molekülü organik bileşikler gibi çeşitli biyomoleküllerin ekstraksiyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır (Yan ve diğ., 2017). Yüksek geri kazanım ve kolay enzim eldesi gibi avantajlarıyla geleneksel olan saflaştırma yöntemlerine göre tercih sebebi olmaktadır (Yan ve diğ., 2018). Lakkaz immobilizasyonunda kullanılan beş teknik vardır: fiziksel adsorpsiyon, hapsetme, kapsülleme, kovalent bağlanma ve çapraz bağlama. Bu teknikler genel olarak fiziksel (tuzaklatma, kapsülleme ve adsorpsiyon) ve kimyasal (kovalent ve çapraz bağlama) olarak sınıflandırılır. İmmobilizasyonda kullanılan yöntemler maliyet ve hazırlama kolaylığı, stabilite, katalitik verimlilik ve biyokatalizörün fiziksel özellikleri açısından

farklılık gösterir (Yang ve diğ., 2017). Fiziksel tekniklerle immobilizasyon, destek ile nispeten zayıf ve geri dönüşümlü etkileşimleri içerir. Enzim yapısına daha az zarar verirken çözeltideki enzimin özelliklerini korur (Durán ve diğ., 2002). Bununla birlikte, enzim ve destek arasındaki zayıf etkileşimler enzimin sızmasına neden olur, bu da aktivite kaybına ve çevredeki ortamın kirlenmesine neden olabilir (Naghdi ve diğ., 2017). Kovalent bağlanma, enzimleri (çoğunlukla lizin kalıntıları yoluyla) katı desteklerle bağlamak için en yaygın kullanılan yöntemdir, ancak katı destekler aynı zamanda biyokatalizörün spesifik ve hacimsel aktivitesini azaltabilir (Cabana ve diğ., 2011). Enzim immobilizasyonu için destek olarak farklı kaynaklardan çok çeşitli malzemeler kullanılabilir. Bu malzemeler genel olarak organik, inorganik, hibrit veya kompozit olarak ayrılabilir. Destek, enzim yapısını zorlu reaksiyon koşullarına karşı korumakta ve böylece immobilize edilmiş enzimin yüksek katalitik aktivitesini korumasına yardımcı olmaktadır (Sheldon ve Pelt, 2013). Ancak bu alanda bazı sınırlamalar vardır, çünkü matrisin enzim yapısı üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olmaması ve stabil enzim-matris etkileşimini sağlaması gerekir (Fernandez-Lafuente, 2009). Ayrıca etkili bir immobilizasyon için taşıyıcı, substrat moleküllerinin kolay bağlanmasını, substratların ve ürünlerin difüzyon sınırlamalarını azaltmak için katalizörün aktif bölgelerini açığa çıkarmalıdır (Wong ve diğ., 2009). Immobilizasyon için birçok taşıyıcının yanında sol-gel yöntemi ile üretilen silika bazlı materyaller oldukça dikkat çekicidir. Sol-jel işlemi, enzim immobilizasyonu için uygun olan, mezo-gözenekli silika desteklerinin üretilmesine yönelik ana bir tekniktir. Sol-jel işlemi, organometalik bileşikler, solvent ve katalizör kullanılarak oda sıcaklığına yakın bir sıcaklıkta gerçekleştirilir (Costantini ve Califano, 2021). Bu teknikle üretilen destekler mezo- (2–50 nm) ve/veya mikro- gözenek (≤ 2 nm) aralığında ortalama gözenek çaplarına ve yaklaşık 100 ila 1000 m² g⁻¹ arasında değişen yüzey alanlarına sahiptirler. Bu yöntem yüksek saflık, geniş yüzey alanı, büyük gözenek hacmi ve enzime herhangi bir olumsuz etkisi olmaması bakımından oldukça avantajlı özelliklere sahiptir (Paul ve diğ., 2009).

Bu tez çalışması, *Trametes versicolor* lakkaz enziminin yüksek aktivite değeri ile üretilip, yüksek geri kazanım ile saflaştırılmasını, saf lakkaz enziminin biyokimyasal karakterizasyonunu ve kinetik çalışmalarının yanı sıra saf haldeki enzimin üç farklı aerojele (silika aerogel, Mg-silika aerogel, Cu-silika aerogel) iki farklı (adsorbsiyon ve kovalent) immobilizasyon tekniği ile karşılaştırmalı olarak immobilizasyonunu,

immobilize enzimin karakterizasyonunu ve son olarak optimum koşullarda elde edilen immobilize enzimin, endüstriyel boyar maddeler olan metilen mavisi, fenol kırmızı, malaşit yeşili, commasie brilliant blue G 250, kongo kırmızı ve metil kırmızı boyalarının renk giderim kapasitesinin belirlenmesini kapsamaktadır.

Bu alışma ile *T. versicolor* lakkazı ilk defa farklı özelliklere sahip aerojellere farklı immobilizasyon metotları ile karşılaştırılmalı olarak immobilize edilerek elde edilen sonuçlarla literatürde bu konudaki boşluğa ışık tutması beklenmektedir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Endüstriyel Atık Sular ve Boyar Maddeler

Endüstriyel kullanım sebebiyle ciddi çevresel sorunlar ortaya çıkmakla birlikte bu durum insan sağlığı ve ekosistem için önemli risklere yol açmaktadır. Özellikle tekstil endüstrisi bu sorunlarda önemli bir rol oynamaktadır. Tekstil üretimi, tekstil boyaları gibi çok çeşitli kirleticilerin kullanımını içeren birden fazla işlem aşamasını gerektirir. Ayrıca tekstil endüstrisinde su kullanımı oldukça fazladır. 1 kg tekstil ürünü üretmek için yaklaşık 200 L suya ihtiyaç vardır. Tekstil atık suları, çoğu toksik ve mutajenik olan, boyama işleminde kullanılan boyalar bakımından zengindir (Bento ve diğ., 2020).

Çeşitli boyaların endüstriyel işlemler sonrası çevreye salınması, bunların bol miktarda kullanıldığı tekstil endüstrisinin tipik bir özelliğidir. Hemen hemen tüm tekstil boya türleri oldukça karmaşık bir yapıya sahip, kalıcı ve dirençli olması sebebiyle geleneksel atık su arıtma yöntemleriyle arıtılması zordur. Boyaların çevresel etkileri söz konusu olduğunda, su kütlelerini renklendirebilirler, bu da ışığın nüfuz etmesinin azalmasına neden olur ki sonuçta fotosentez süreci etkilenir. Mutajenik, toksik ve kanserojen olduğu bilinen bu boyalar insan sağlığı açısından da ciddi tehdit oluştururlar (Al Tohamy ve diğ., 2022). Ticari uygulamalarda kullanılan sentetik boyaların yaklaşık %60-70'i, ikame edilmiş aromatik yapıları bağlayan bir veya birkaç- N=N- köprüsüne sahip azo boyalardır. Metilen mavisi, kongo kırmızısı, malaşit yeşili ve metil kırmızısı azo sınıfı boyalara, fenol kırmızısı ve commasie brilliant blue G 250 ise trifenilmetan sınıfı boyar maddelerdir (Tablo 2.1). Tekstil endüstrisinde boyar madde kullanımı boya bakımından zengin atık oluşumu ile sonuçlanır (Ogugbue ve diğ., 2011). Bu tür boyaların ve bunların bileşenlerinin çoğu mutajen görevi görür ve kanserojen maddelerdir. Atık suyun koyu rengi, güneş ışığının su kütlelerine nüfuz etmesini engelleyerek, alglerdeki fotosentezi ve su kalitesini büyük bir şekilde etkiler ve besin zincirine zarar verir (Verma ve diğ., 2012).

Tablo 2.1. Boya çeşitleri ve sınıfları

Boylar	Sınıf
Metilen Mavisi	Azo
Kongo Kırmızısı	Azo
Metil Kırmızısı	Azo

Tablo 2.1. (Devam) Boya çeşitleri ve sınıfları

Malaşit Yeşili	Triarilmetan
C.Brilliant Blue G 250	Trifenilmetan
Fenol Kırmızısı	Trifenilmetan

Su kütlelerinde asılı duran bu boyalar, su ekosistemini etkiler, biyolojik birikim nedeniyle halk sağlığı riskleri oluşturur ve toprak kirlenmesine neden olurlar. Ayrıca azo boyaların indirgenmiş ara ürünleri olan aromatik aminler, boyaların kendisinden daha toksiktir. Tekstil fabrika atıkları sulara deşarj edildiğinde, boyalar 5 µg/L konsantrasyonlarda görünür kirletici olarak kabul edilirler. Fiziksel renk giderme yöntemleri (aktif karbon ve pıhtılaşma gibi), boyaları farklı bir faza aktarırken tek başına boya gideriminde yetersiz kalmaktadır. Kimyasal yöntemler, boyaları ortadan kaldırabilir ancak dışarıdan eklenen reaktifler bazı durumlarda istenmeyen yan ürünlerin oluşmasına sebep olabilmektedir (Champagne ve Ramsay, 2010).

2.2. Endüstriyel Enzimler

Enzimler çeşitli endüstriyel işlemlerde kullanılmaktadır. Enzimler ılıman koşullar altında çalışırlar. Bu koşullar her enzim için optimum olan sıcaklık, pH, substrat konsantrasyonu gibi faktörleri ifade eder (Chapman ve diğ., 2018). Stabil, güvenilir, emniyetli ve biyolojik olarak parçalanabilir olmalarından ötürü endüstride birçok kimyasal bileşiğin yerini almak üzere yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Enzim kullanımı çevre dostu olmasının yanı sıra, ürünün kalitesinin arttırılmasına da yardımcı olur.

Enzimlerin tekstildeki önemli rolleri arasında kumaş görünümünün iyileştirilmesi, kumaş tüylerinin yüzeyden uzaklaştırılması, kotların biyolojik olarak ağartılması ve ağartma sonrasında kalan hidrojen peroksitin uzaklaştırılması sayılabilir (Madhu ve Chakraborty, 2017). İlaç, yiyecek, içecek, deterjan ve biyoyakıt endüstrileri ile ticari ölçekli uygulamalar enzimlerin katalitik özelliklerinden yararlanırken, doğal gaz ve(ya) hassas kimyasal madde üretimi gibi çalışmaların olduğu diğer endüstriler, bunların kullanımını yakın gelecek için planlamaktadır. Endüstriyel ölçekte kimyasal üretiminde, biyokatalizin faydaları genellikle çok yönlüdür; bu nedenle enzimler, uygun reaksiyon koşulları, yüksek ürün seçiciliği ve düşük çevresel etkiler nedeniyle tercih sebebidirler (Chapman ve diğ., 2018).

İlaç sektöründe, aktif farmasötik bileşenlerin üretimi için ara maddelerin sentezinde nitril hidrataz, transaminaz, monoamin oksidaz, lipaz ve penisilin asilaz gibi enzimler (Deasi, 2011; Li ve diğ., 2012), gıda endüstrisinde, nişastanın glukoza dönüştürülmesi, fruktoz oranı yüksek ürün üretimi, farklı prebiyotiklerin oluşturulması, içeceklerin acılığının giderilmesinde tripsin, amilaz, glukoz izomeraz, papain, pektinaz (Badgujar ve diğ., 2016; Panesar ve diğ., 2012); deterjan sektöründe, leke çıkarma, katı ve sıvı yağların giderilmesi, renk tutma gibi uygulamalarda proteaz, lipaz, amilaz ve selülaz (Panesar ve diğ., 2012); kağıt ve kağıt hamuru alanında daha iyi ağartma için ligninin uzaklaştırılması, lif özelliklerinin iyileştirilmesi ve farklı yağ asitlerinin oluşumu ve biyoetanol eldesi için lignoselülotik materyalin ayrıştırılması işlemlerinde lipaz, selülaz ve ksilanaz gibi enzimler kullanılmaktadır (Bhat, 2000; Tan ve diğ., 2010). Ayrıca bitkilerde bulunan lignoselülotik enzimler (lakkazlar, lignin peroksidazlar, mangan peroksidazlar, ksilanazlar, lipazlar ve selülazlar) tekstil boyaları ve birçok organik bileşiği parçalama özelliğine sahiptir (Lopes ve diğ., 2020).

2.3. Enzim Kaynağı Olarak Beyaz Çürükçül Mantarlar

Beyaz çürükçül mantarlar *Basidiomycetes* sınıfına dahildir. Beyaz çürükçül mantarların salgıladığı lakkaz, lignin peroksidaz, Mn-peroksidaz ve NADH peroksidaz (NADH oksidaz) gibi enzimler birçok endüstriyel alanda sıklıkla kullanılmaktadır (Mercimek, 2007). Bunlardan özellikle lakkaz, lignin peroksidaz ve mangan peroksidaz enzimleri karmaşık yapıdaki endüstriyel/çevresel kirleticileri daha az toksik veya toksik olmayan bileşiklere ayrıştırmasını ve mineralize etmesini sağlamaktadırlar. Beyaz çürükçül mantarların hücre dışı enzim üretme kapasitesi, onları tekstil, kâğıt ve kâğıt hamuru, ilaç veya zirai kimya endüstrileri gibi farklı endüstrilerden yayılan karmaşık/dirençli kirleticileri parçalamak için biyoremediasyon alanında çekici bir aday haline getirmektedir (Latif ve diğ., 2023).

Beyaz çürükçül mantarların büyük çoğunluğu lakkaz üretmektedir. Bunlardan en önemlileri: *Phlebia radiata*, *Pleurotus ostreatus* ve *T. versicolor* bu enzimi üreten en önemli beyaz mantarlardandır. Ayrıca *T. atroviridis*, *T. longibrachiatum* ve *T. harzianum* gibi birçok *Trichoderma* türünün yanında *Basidiomycetes*'lerden *Theiophora terrestris*, *Phanerochaete chrysosporium* ve *Lenzites betulina* da diğer lakkaz üreticileri olarak literatürde bulunmaktadır. Lakkaz enzimi diğer taraftan *Coriolopsis byrsina*,

Diaportha phaseolorum, *Cerrena unicolor* ve *Pestalotiopsis uvicola* gibi deniz mantarlarında da tespit edilmiştir (Khatami ve diğ., 2022).

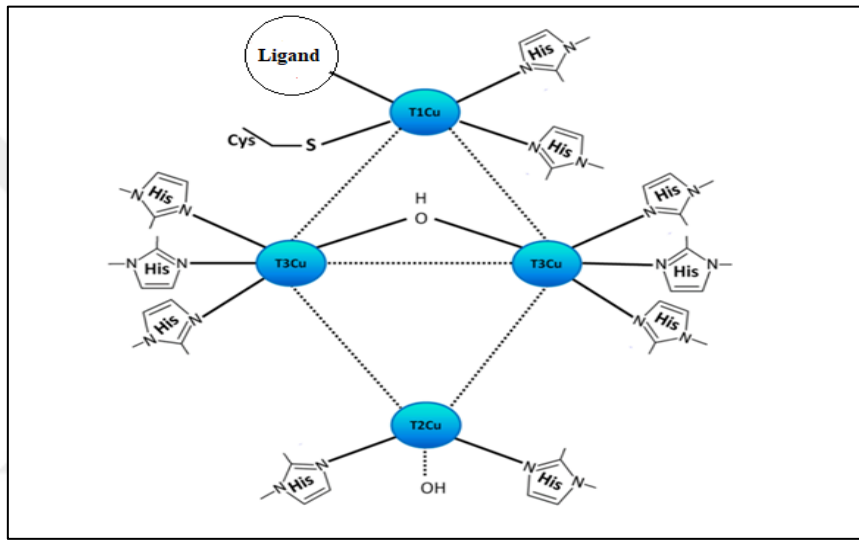
T. versicolor, tropik ve subtropik ormanlarda yayılım gösteren bir türdür. Özellikle odunlu ağaçlarda lignini parçalama özelliğine sahiptir. Bu özelliğinden dolayı beyaz çürükçül funguslar arasında sınıflandırılır (Veena ve Pandey, 2012). *T. versicolor*'un sahip olduğu ligninolitik enzimler birçok alanda geniş kullanım alanına sahiptir. *T. versicolor*, odundaki lignoselülozunun parçalanmasında rol oynayan birçok enzimi sentezlemektedir. *T. versicolor*'un lakkaz enzimi klor eklenmiş bifeniller, tekstil boyaları ve poliaromatik hidrokarbonlar gibi biyolojik parçalanmaya dirençli yeni sentezlenen birçok kimyasal bileşiği substrat olarak kullanabilme yeteneğine sahiptir. Bunun yanında *T. versicolor*'un enzimleri kâğıt endüstrisinde de kullanım alanına sahiptir. Kâğıt hamurunu beyazlatmak için *T. versicolor*'dan üretilen enzimler kullanılmaktadır (Ünal ve Kolankaya, 2001). İlave olarak *T. versicolor* önemli tıbbi bileşikler barındırmaktadır. Bunlardan en önemlisi krisin (PSC) adlı bileşiktir ve bu bileşik HIV (İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü) dahil birçok virüsün gelişmesini baskılama özelliğine sahiptir. Kanser hücreleri üzerine de etkileri olduğu bilinmektedir (Stamets, 2000).

2.4. Lakkazlar

Lakkazlar (EC 1.10.3.2), çok çeşitli fenolik ve fenolik olmayan bileşiklerin (mono-, di- ve poli-fenoller, aminofenoller, metoksifenoller, aromatik aminler ve askorbat dahil olmak üzere *orto* ve *para*-difenol grupları) moleküler oksijenin suya dört elektron indirgenmesiyle oksidasyonunu katalize eden çoklu bakır içeren enzimlerdir. Buna ilaveten lakkazlar fenolik asitler, metoksifenolik asitler, dikarboksilik asitler içeren grubu metoksi grubuna saldırarak yükseltgeyebilmektedirler (Gianfreda ve diğ., 1999). Diğer yandan enzimin aktif merkezine erişemeyen büyük ve yüksek redoks özelliğe sahip substratlar için kimyasal araçlar kullanıldığında lakkaz varlığında bu tip substratların yükseltgenme işlemi gerçekleştirilebilir. Bu yapıların yükseltgenmiş radikal biçimlerinin substratla etkileşim göstererek elektron aktarımına aracılık yaptığı düşünülmektedir (Kunamneni ve diğ., 2008).

Lakkaz enzimi dimerik veya tetramerik yapı gösteren bir glikoproteindir. 3 redoks bölgesine bağlı monomerik ve multimerik halde dört adet bakır atomunu içerir (Şekil

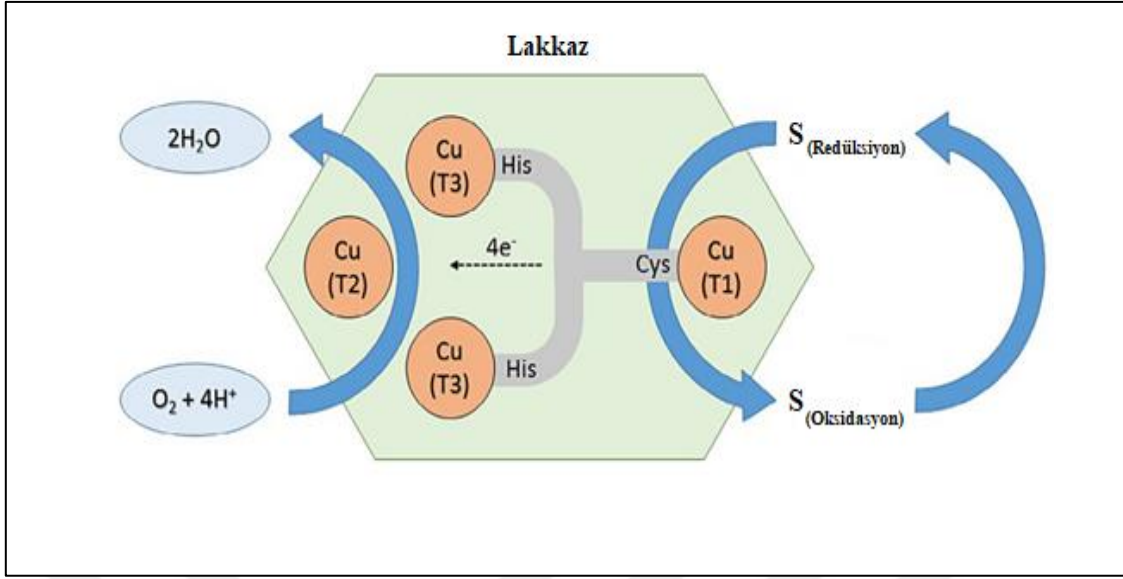
2.1); bu bakır atomları molekül içinde hayli öneme sahip prostetik gruplardır (Duran ve diğ., 2002; Madhavi ve diğ., 2009). Bunlardan Tip 1 bakır 600 nm’de gözlenebilen ve lakkaz enzimine mavi rengi veren yapıdır. Bu karakteristik mavi renk, Tip 1 bakırın sistein amino asidinin kükürt grubuyla yaptığı bağ kaynaklıdır. Tip 2 bakır bölgesi renksizdir. Görünür bölgede çok zayıf absorbans vermesine karşın EPR (Elektron Spin Rezonansı) ile belirlenebilir. Tip 3 bakır bölgesi ise iki çekirdekli yapıda çift bakır atomu içerir; 330 nm’de verdiği zayıf absorbans bandıyla karakterize edilirken EPR’de sinyal vermez (Vandertol-Vanier ve diğ., 2000; Xu ve diğ., 2007).



Şekil 2.1. Lakkaz bakır merkezleri (Zerva ve diğ., 2019)

Lakkazın katalitik mekanizması (Şekil 2.2), T1 bakırı tarafından substrata bir elektronun aktarılmasıyla başlar ve bunu indirgenmiş T1 bakırının T2 ve T3 bakır bölgelerine dahili bir elektron transferi takip eder. Ardından T2 ve T3 bakırın bulunduğu ve trinükleer küme olarak adlandırılan bölgeye T1 bakırdan elektron transferi yapılması ve T2 ve T3 bakır bölgesinde moleküler oksijenin indirgenerek suyun açığa çıkmasıdır (Rodriguez-Delgado ve diğ., 2015).

Lakkazların tekstil alanında kot ve pamuk ağartma, fitil temizleme ve yün boyama gibi birçok rolleri vardır. Bunun dışında lakkazların boya sentezinde ve atık su arıtımında da rolü vardır. Lakkazın en önemli rolü biyolojik ağartmadadır. Tekstil endüstrisinde kullanılan ilk ticari lakkaz bazlı ürün, Novozymes'in 1996 yılında piyasaya sürdüğü DeniLite'dır (Kumar ve diğ., 2023; Rodriguez-Delgado ve diğ., 2015).



Şekil 2.2. Lakkaz oksidasyonunun temel gösterimi (Rodríguez-Delgado ve diğ., 2015)

2.5. İmmobilize Enzimler ve Kullanım Alanları

İmmobilizasyon, enzimlerin katı desteklerin yüzeyine veya içerisine sabitlendiği, heterojen bir immobilize enzim sistemi oluşturulan teknik bir işlemdir. Enzimlerin immobilize formu, canlı hücrelerdeki gibi hücre iskeleti, membran ve organel yapılarındaki doğal modlarını taklit eder. Katı destek sistemleri genellikle enzimlerin yapısını stabilize eder ve bu sayede aktivitelerini etkili bir şekilde sürdürürler. Bu nedenle, serbest enzimlerle karşılaştırıldığında immobilize enzimler çevresel değişikliklere karşı daha dirençlidir. Ek olarak, heterojen immobilize enzim sistemleri hem enzimlerin hem de ürünlerin kolayca geri kazanılmasına, enzimlerin yeniden kullanımına, enzimatik süreçlerin devamlılığına, reaksiyonların hızlı bir şekilde sonlandırılmasına ve daha çeşitli biyoreaktör tasarımlarına olanak tanır. Öte yandan, serbest enzimlerle karşılaştırıldığında, çoğunlukla immobilize edilmiş enzimler daha düşük aktivite gösterir ve genellikle substrata erişimdeki zorluk nedeniyle daha yüksek Michaelis sabitleri gösterir (Homaei ve diğ., 2013). Enzim immobilizasyonu 1960'lı yıllardan bu yana ilgi çekici bir araştırma konusu olmuştur (Razzagi ve diğ., 2022). Ancak son zamanlarda biyoteknolojik/nanoteknolojik ilerlemelerin yaygınlaşması, enzim immobilizasyon tekniklerine olan ilgiyi artırmıştır (Mohammadi ve diğ., 2020). İmmobilizasyon uygulamaları, enzimatik bağlanma sonrasında katalizörlerin homojenden heterojen formlara dönüşebilmesini sağlamak ve bu sayede enzimlerin ayrılmasına yardımcı

olarak yüksek saflıkta ürünler elde edilmesine ve çeşitli uygulamalar yapılmasına olanak tanımaktadır (Marzodori ve diğ., 1998).

Enzimlerin endüstride serbest halde kullanılması yerine ekonomik açıdan kullanılabilirliğini sağlayabilmek adına immobilizasyon teknikleri geliştirilmiştir. İmmobilize enzimler, geri kazanım, tekrar kullanım, uzun süre aktif kalabilme ve çeşitli işlem formatlarına uygulanabilme özelliklerine sahip özel kataliz formlarıdır (Tufvesson ve diğ., 2010). İmmobilizasyon işleminden sonra enzimlere depolama süresinin uzatılması, farklı pH ve sıcaklık derecelerine dayanıklılığının artırılması gibi çeşitli özellikler kazandırılır. Bu şekilde etkinliği arttırılan immobilize enzimler ilaç, gıda endüstrisi, atık su arıtımı ve tekstil endüstrisi gibi çeşitli alanlarda yaygın olarak uygulanır (Liu ve diğ., 2018).

Lakkaz enziminin immobilizasyonuna yönelik literatürde çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bunlardan birinde manyetik mezo-gözenekli silika nanopartiküller kullanılarak *T. versicolor* fermentasyon sıvısından lakkaz enziminin %114,6 geri kazanım verimi ile 60,6 kat saflaştırılması sağlanmıştır (Wang ve diğ., 2012). Bir diğer çalışmada yine *T. versicolor* lakkazı kullanarak elde edilen $ZrO_2 - SiO_2$ - lakkaz ve $ZrO_2 - SiO_2 / Cu^{+2}$ - lakkaz için sırasıyla %86 ve %94'e ulaşan immobilizasyon verimleri elde edilmiştir (Jankowska ve diğ., 2019). Başka bir çalışmada *T. versicolor* lakkazı, kitosan bazlı metal şelatlı kopolimer nanopartiküler sistem ile immobilize edildiğinde, geniş pH ve sıcaklık profilleri ile serbest enzime göre daha iyi stabilite ve yeniden kullanılabilirlik sergilemiştir; sekiz kullanım sonrası, immobilize enzimin aktivitesinin %50'nin üzerinde kaldığı belirtilmiştir (Alver ve Metin, 2017). Bir diğer çalışmada, amino fonksiyonlu manyetik Fe_3O_4 nanopartikülleri, glutaraldehit çapraz bağlama yöntemi ile TEMPO (2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yl) oksidanyli ve lakkazın birlikte immobilizasyonu için sentezlenmiştir. İmmobilizasyon sonucu, sekiz işlem döngüsünden sonra bağıl aktivitenin %50'nin üzerinde korunmuş olduğu gözlenmiştir. Lakkaz ve TEMPO nanopartikülleri asit fuksinin rengini açmak için kullanıldığında, TEMPO-lakkaz oranı $0.3 \text{ mM g}^{-1} : 120 \text{ U g}^{-1}$ olacak şekilde maksimum %77,41 renk açma oranı elde edildiği rapor edilmiştir (Gao ve diğ., 2018). Manyetik immobilize lakkaz kullanarak susam yağı fenoliklerinin degradasyonu için yapılan bir çalışmada ise immobilize enzimin depolama üzerine stabilite denemeleri, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de 15 gün sonra başlangıç aktivitesinin %70'inden fazlasının

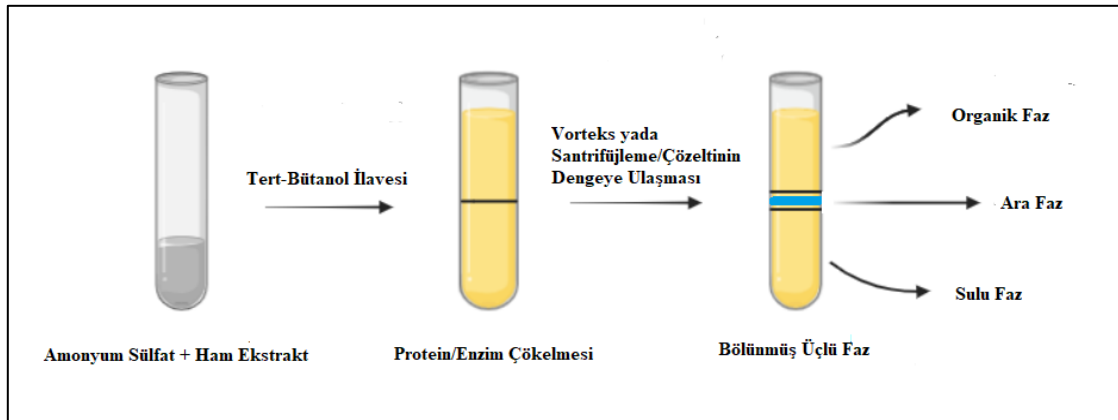
muhafaza edildiğini göstermiştir. 20 bağımsız döngüden sonra %70'in üzerinde fenol bozulması sağlanmış ve tutuklanmış lakkaz enziminin aktivitesinde %60'lık bir azalma gözlenmiştir (Amin ve diğ., 2020). Başka bir çalışmada, lakkazın SiO₂ nano taşıyıcılarda immobilizasyonu sonrasında maksimum %75,8'lik bir immobilizasyon verimi ve %92,9'luk bir immobilizasyon geri kazanımı sağlanmıştır. Ek olarak, bağlı aktivite, 10 döngü kullanımdan sonra %82,6 olarak ölçülmüştür (Patel ve diğ., 2014a). Tutuklanmış çapraz bağlı lakkaz kümeleri kullanılan bir diğer çalışmada immobilize enzim, birbirini izleyen 20 işlem döngüsünden sonra ilk etkinliğinin %79'una kadarını koruyarak iyi bir operasyonel stabilite ve yeniden kullanılabilirlik özelliği sergilemiştir (Fathali ve diğ., 2018). Lakkaz immobilizasyonu üzerine gerçekleştirilen başka bir çalışmada manyetik nanopartiküller üzerinde immobilize edilmiş *T. versicolor* lakkazı serbest haldeki formuna kıyasla lakkaz aktivitesinin yaklaşık %40'ının 8 döngüden sonra hala korunduğu bulunmuştur (Chen ve diğ., 2020). Zeolit-X nano-gözenekli destek materyali ile immobilize edilen *Polyporus durus* lakkazının kullanıldığı bir çalışmada ise 7 ardışık renk giderme döngüsünden sonra AB 225 boyasına karşı aktivitesini %100 koruduğu; diğer yandan %48 aktivite kaybıyla 11 kez tekrar kullanılabilirdiği gözlenmiştir (Wehaidy ve diğ., 2019). Muthuvelu ve diğ., (2019) tarafından gerçekleştirilen çalışmada bakır ferit nanopartiküller üzerine immobilize edilen lakkaz enzimi 6 döngüye kadar yeniden kullanılabilirdiği rapor edilmiştir (Muthuvelu ve diğ., 2019). Ayrıca, lakkazın katalitik aktivitesinin ve stabilitesinin sol-jel silika içinde tutuklanarak iyileştirilebileceğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (Brandi ve diğ., 2009).

2.6. Üçlü-Faz Ayırma Tekniği

ÜFA, protein saflaştırma işlemi için uygulaması oldukça basit bir yöntemdir. Bunun için birbirine karışmayan organik çözücü ve tuz, protein içeren sulu bir çözeltiye eklenir. Bir saatten az bir sürede üç ayrı faz oluşur: t-bütanol içeren üst faz, protein ihtiva eden ara faz, tuzla zengin alt faz olmak üzere. Tuz olarak genellikle amonyum sülfat tercih edilmekte olup artan konsantrasyona bağlı olarak protein moleküllerinin çökmesi sağlanır. Organik çözücü olarak -t-bütanol genellikle suyla karışabilir, ancak amonyum sülfat gibi belirli miktarda tuzun varlığında karışmaz hale gelir (Şekil 2.3). ÜFA'de t-bütanol, lipidler ve fenolik bileşikler gibi istenmeyen düşük molekül ağırlıklı bileşiklerini uzaklaştırmak için ayırıcı çözücü olarak kullanılır. Proteini denatüre etmediği için ÜFA

sisteminde t-bütanol kullanmak güvenlidir. Sülfat ile kullanıldığında enzimin fazlara dağılımını destekleyen kosmotropik etki gösterir (Correa ve diğ., 2021; Yuzugullu Karakus ve diğ., 2018).

ÜFA süreci iyonik güç ve dışlama-yığıma etkilerini, kosmotropiyi, ozmotik stresi, boşluk yüzey geriliminin arttırılmasını ve konformasyonel protein sıkılaşmasını içerir. Çeşitli araştırmacılar tarafından bildirildiği gibi, teknikte hedef proteinin fazlara dağılımı fiziksel koşulların yanı sıra proteinin hidrofilik özelliği, molekül ağırlığı ve izoelektrik noktası (pI) da etkilenir (Bayraktar ve Önal, 2013). Basit, kolay ve yüksek verimle sonuçlanan bir biyoayırma tekniği olarak ÜFA sistemi, bitkilerden, hayvanlardan ve mikroorganizmalardan proteinler, enzimler, yağlar, küçük moleküler organik bileşikler ve polisakkaritler dahil olmak üzere çok çeşitli biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonu ve izole edilmesi için birçok araştırmacı tarafından tercih edilmektedir. Geleneksel ekstraksiyon teknolojileriyle karşılaştırıldığında ÜFA, solventin geri dönüşümü, kısa ekstraksiyon süresi, ham ekstraktın doğrudan ekstraksiyonu ve ayrılması, ortam sıcaklığında çalışma gibi avantajlara sahiptir. Ayrıca yüksek ayırma verimliliği, geniş uygulama aralığı, maliyet etkinliği ve kolay ölçeklenebilirlik gibi avantajlara da sahiptir. ÜFA bu yüzden basit, hızlı, ucuz ve gelecek vaat eden bir ekstraksiyon ve ayırma teknolojisi olarak kullanılabilir. (Yan ve diğ., 2021).



Şekil 2.3. Üçlü faz ayırma tekniğinin aşamaları

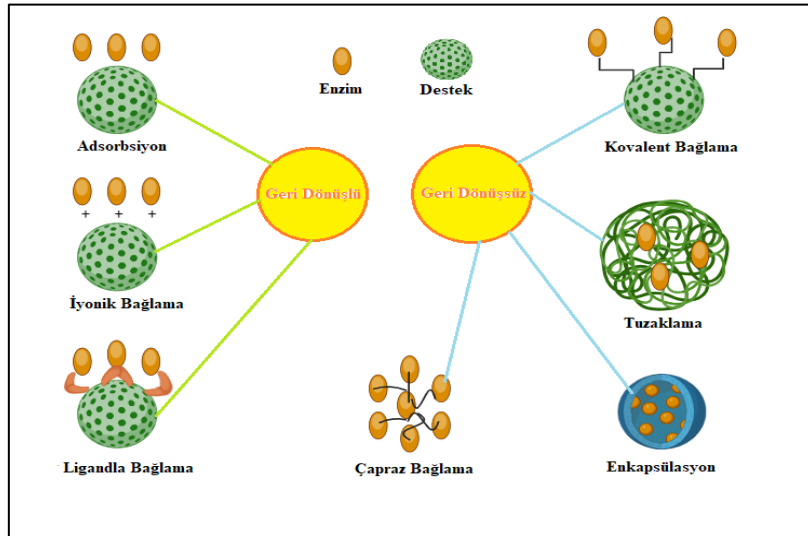
2.7. İmmobilizasyon

İmmobilizasyon, enzim teknolojisinin en eski ve en pratik tekniklerinden birisidir. İmmobilize enzimler, serbest haldeki enzimlere göre birçok yönden avantaj

sağlamaktadır. Örneğin immobilize enzim, reaksiyon sonunda ortamdan kolaylıkla uzaklaştırılabilir. Çevre koşullarına (sıcaklık ve pH gibi) daha dayanıklıdır. Birçok kez kullanılabilir. Serbest enzime göre daha karardır (Yıldırım, 2010). Dolayısıyla, enzimlerin katı destek malzemelerine immobilizasyonu, enzim aktivite ve stabilitesinin iyileştirilmesi, reaksiyon sonunda immobilize enzimin geri kazanım olasılığı, dolayısıyla yeniden kullanımına olanak sağlanması ve gerçekleştirilmesi gibi avantajlardan dolayı büyük ilgi görmektedir (Mateo ve diğ., 2007).

Enzimler çeşitli yöntemler kullanılarak immobilize edilmektedir. İmmobilizasyon teknikleri arasında en yaygın kullanılanlar (Şekil 2.4), biyospesifik bağlama metodu, çapraz bağlama, tutuklama, kovalent bağlama ve adsorpsiyondur (Zhu ve diğ., 2007). Bunlardan biyospesifik bağlama metodu, afiniteye bağlı ayırmada koenzimler, lektinler, inhibitörler, antikorlar ve efektörler gibi bileşikler ve aralarında biyospesifik etkileşimler olan enzimleri içerir (Doğan, 2014). Çapraz bağlama metodunda, küçük molekül ağırlıklı bi- ve multi- fonksiyonel reaktifler enzimler ile çeşitli bağlar yaparak suda çözünmeyen kompleksler oluşturulur. Bu yöntemde en çok kullanılan reaktifler; glutaraldehit, klorformat, korbonildiimidazol, heterosiklik halojenürler ve geçiş metal iyonlarıdır (Zhou ve diğ., 2020). Tutuklama metodunda, enzimler belirli bir alanda durmaya zorlanır. Bu işlem polimer matriksler içinde gerçekleştirileceği gibi, yarı geçirgen membran içinde mikrokapsülleme ile de gerçekleştirilebilir. İmmobilizasyon için kalsiyum aljinat, kolajen, poliakrilamid, agar, silikon, kitosan, polivinil alkol, jelatin ve poliüretan gibi çeşitli matrisler kullanılır (Bilal ve diğ., 2016). Bu metodu diğer bağlama yöntemlerinden farklı kılan özelliği, kullanılan enzimin taşıyıcıya herhangi bir kimyasal ya da fiziksel yöntemle bağlanmamasıdır (Doğan, 2014; Liu ve Dong, 2020;). Taşıyıcıya bağlama metodu ile enzim suda çözünmeyen bir taşıyıcıya bağlanır. Suda çözünmeyen polisakkaritler, sentetik polimerler ve agaroz türevleri ve inorganik maddeler gibi çözünmeyen tarzda materyaller bunlardan bazılarıdır (Tanaka ve Kawamoto, 1999). Kovalent bağlama yöntemi ise en sık kullanılan tekniklerden biri olup enzimlerin aktif bölge ya da substrat bağlanma bölgesinde bulunmayan amino asit birimleri taşıyıcıya kovalent bir şekilde bağlamada kullanılır (Doğan, 2014). Enzimleri yapısında içerdiği sistein, glutamik asit, aspartik asit ve lizin gibi amino asit grupları taşıyıcı ile kimyasal reaksiyon sonucu oluşan bağlar kurar (Cirillo ve diğ., 2014). Kovalent bağlar, destek matrislerinden enzimlerin sızmasını önleyerek tutuklanmış enzimlerin karardılığını

arttırır. Bu yöntemde, disikloheksilkarbodi amid, diazotizasyon, bromür siyanojen veya glutaraldehit kullanılır (Liu ve diğ., 2012). İmmobilizasyon tekniklerinin son örneği olan adsorpsiyon yöntemi ikiye ayrılmaktadır. Bunlardan iyonik adsorpsiyon yöntemi oldukça kolay bir metot olup taşıyıcının tekrar kullanımına olanak verir; ayrıca biyokatalizör taşıyıcıdan geri kazanılabilir. İyonik bağlama tekniğinde ise enzim taşıyıcı materyale sıcaklık, pH, tampon ve iyonik güç gibi etkenlere bağlı olarak bağ kurar (Jun ve diğ., 2019). Fiziksel adsorpsiyon ise bilinen en eski yöntemlerdendir. Bu metot, taşıyıcı ve enzim arasında oluşan hidrojen bağ, hidrofobik etkileşimler ve van der Waals etkileşimlerinin tek ya da bir arada olmalarından kaynaklı fiziksel etkileşimlere dayanır (Liu ve Dong, 2020; Pang ve diğ., 2016). Bu immobilizasyon modunda aktif kömür, silika jel, alüminyum oksit, gözenekli cam ve seramikler destek materyali olarak kullanılmaktadır (Liu ve diğ., 2018). Fiziksel yollarla destek materyaline adsorbe edilen enzim, uygun koşullar altında destekten çıkarılabilmektedir. Bu durum enzimatik aktivite azaldığı zaman oldukça önemli bir hale gelir; çünkü destek yeniden oluşturularak yeni enzimle yeniden yüklenebilir. Sonuçta sistem için gerekli olan maliyet düşürülmüş olur ki destek materyalinin maliyeti genellikle immobilize enzim üretiminde en önemli faktörlerin başında gelmektedir (Brena ve Batista-Viera, 2006; End ve Scheoning, 2004).

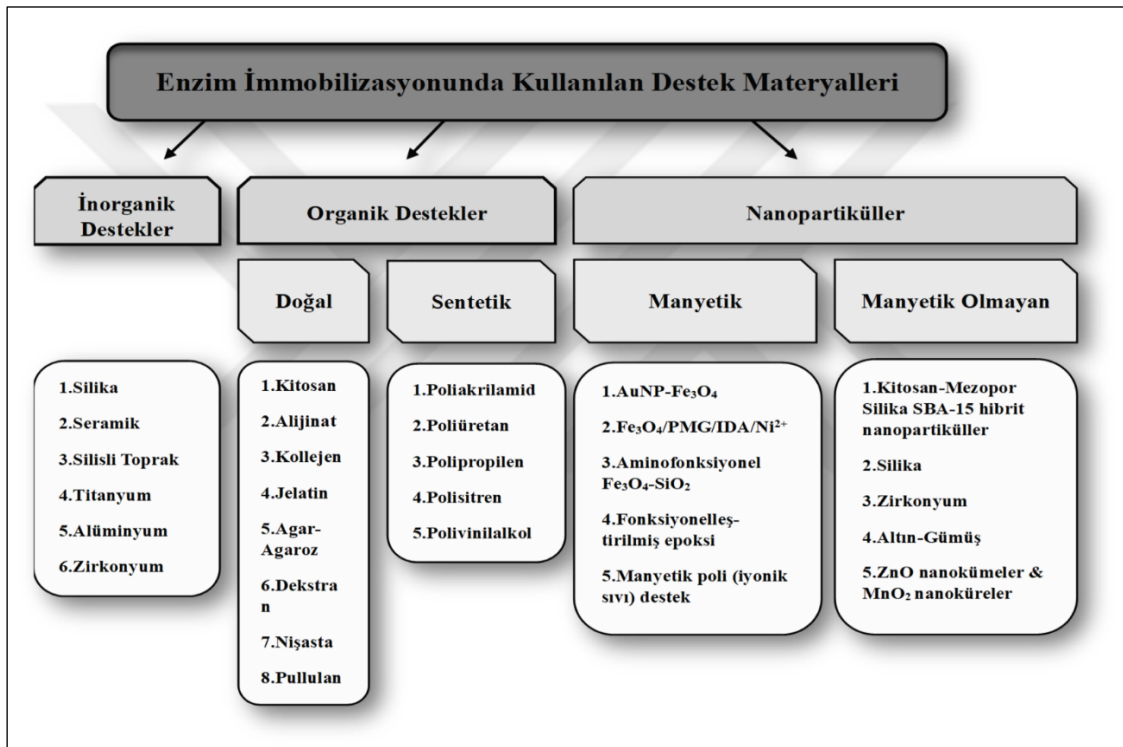


Şekil 2.4. İmmobilizasyon yöntemleri

2.8. İmmobilizasyonda Kullanılan Taşıyıcılar

Araştırmacılar, enzimlerin immobilizasyonu için birçok yararlı yaklaşım sunmaktadırlar. İmmobilizasyonda kullanılacak destek materyali yöntemin başarıyla işleyişinde oldukça

önemlidir. Desteğin temel işlevi, enzimlerin yapılarını stabilize etmek ve dolayısıyla onları çevresel ortamlara daha dayanıklı hale getirerek etkinliğini büyük ölçüde korumaktır (Jesionowski ve diğ., 2014). İnert polimerler ve inorganik maddeler (Şekil 2.5), genellikle enzimlerin immobilizasyonu için taşıyıcı matrisler olarak kullanılmaktadır (Datta ve diğ., 2013). İnorganik destekler, termal ve mekanik kararlılıklarının yüksek olması ve toksik olmamaları nedeniyle immobilizasyon çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir (Mateo ve diğ., 2007). Bu amaç için kullanılan malzemeler arasında kitin, selüloz, polialanin ve silika yer almaktadır (Gao ve diğ., 2009).



Şekil 2.5. İmmobilizasyonda kullanılan destek materyalleri (Aggarwal ve diğ., 2021)

2.8.1. Aerojeller

Aerojeller şeffaf, çok gözenekli ve düşük yoğunluklu yapılardır. Nano boyutlu gözeneklerden ve bağlantılı birincil parçacıklardan oluşan mikro yapı ve element bileşimi, sol-jel yöntemi olarak bilinen bir işlem aracılığıyla çözelti kimyası ile elde edilir. Aerojeller düşük termal iletkenlik, düşük kırılma indisi, düşük ses hızı ve dielektrik sabitine sahiptir. Bu malzemelere yönelik uygulamaların sayısı oldukça fazladır (Fricke ve Tillotson, 1997). Düşük sıcaklıkta geleneksel sol-jel kimyası ile ilk adımda sentezlenen çok yönlü malzemelerdir. Bununla birlikte, son aşamada çoğu ıslak jel, kserojeller olarak

adlandırılan ürünleri üretmek için sıklıkla buharlaştırma yoluyla kurutulurken, aerogeller, süperkritik kurutma olmak üzere diğer tekniklerle kurutulur. Kuru numuneler ıslak aşamada sahip oldukları sıra dışı gözenekli dokuyu korumaktadırlar. Genel olarak kuru bir yapıya sahip olan katılar çok düşük görünen yoğunluklara, geniş spesifik yüzey alanlarına sahiptir ve çoğu durumda X-ışını kırınımı (XRD) yöntemleriyle incelendiğinde amorf yapılar sergilerler. Ayrıca termodinamik özellikleri açısından yarı kararlıdırlar. Sonuç olarak, sıvı bir ortamda yaşlandırıldığında ve ısıtılınca tabi tutulduğunda sıklıkla kimyasal dönüşüm yoluyla yapısal bir evrim geçirirler. Aerogeller, yüksek oranda bölünmüş katı olma özelliklerini yarı kararlı karakterleriyle birleştirdiklerinden, diğer düşük sıcaklıktaki yumuşak kimyasal sentez yöntemleriyle elde edilemeyen ilgi çekici üstün fiziksel ve kimyasal özellikler geliştirebilirler. Başka bir deyişle, bir dizi uygulama için karmaşık potansiyeller gösteren yeni bir katı sınıfı oluştururlar (Livage ve diğ., 1998; Pieerre ve Pojonk, 2002). Aerogeller farklı organik ya da inorganik kaynaklar ile üretilebilir. Bunlar arasında aljinat, titanyum oksit, alüminyum oksit, silisyum dioksit, karbon ve selüloz gibi aerogeller yer alır. Organik aerogeller resorsinol ve formaldehitin sol-jel polikondenzasyon reaksiyonları ile sulu çözeltilerin varlığında sentezlenebilirken inorganik aerogellerin üretimi iki farklı şekilde olmaktadır. Bunlardan ilki metal alkoksitlerin polikondenzasyonu ile sentezlenebilen şeffaf ve çapraz bağlı hidrojel aracılığıyla üretilen aerogeller ve su ile reaksiyona sokulan sodyum silikattan oluşan silisik asidin polimerizasyonu sonucu üretilen aerogellerdir (Aegerter ve diğ., 2011).

2.8.2. Sol-Jel Üretim Aşamaları ve Çeşitleri

Destek materyali olarak göze çarpan silika aerogeller, yüksek spesifik yüzey alanlarına sahip son derece gözenekli malzemelerdir. Silika aerogeller, yüksek yüzey alanı ($500-1200 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$), yüksek gözenekli yapı (%80-99,8), düşük yoğunluk özelliği ($\sim 0,003-0,5 \text{ g cm}^{-3}$), düşük ısı iletkenliği ($0,005-0,1 \text{ W/(mK)}$), düşük seviyede dielektrik sabiti ($k = 1,0-2,0$) ve düşük kırılma indeksi ($\sim 1,05$) vb. niteliklere sahip malzemelerdir (Alves ve diğ., 2022; Schultz ve diğ., 2005).

Silika aerogeller sol-jel tekniği kullanılarak hazırlanır. İlk adım öncü, su ve katalizörden oluşan bir sol hazırlamaktır (Rao ve diğ., 2006). Öncü olarak genelde tetrametoksisilan (TMOS) ve tetraetoksisilan (TEOS) gibi bileşikler kullanılır (Wang ve diğ., 2020). Bazı öncü maddelerin toksik olması nedeniyle, daha çok bulunan ve ucuz olan

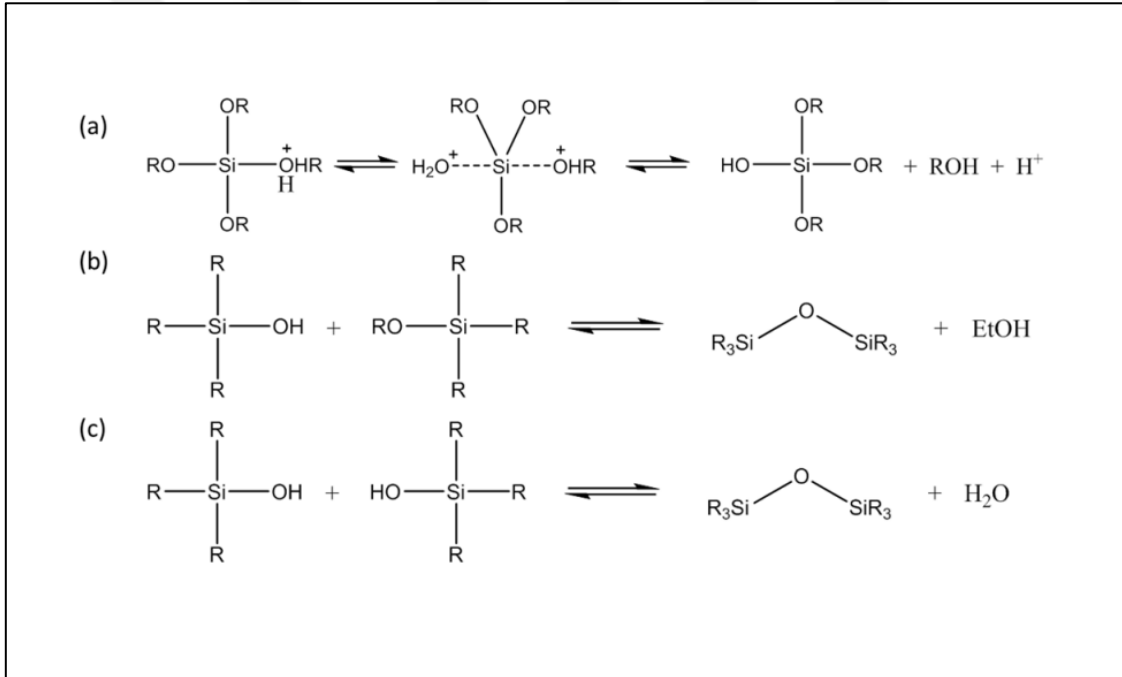
biyomateryallerin kullanılması yönünde bir eğilim vardır. Soldan jele geçiş iki aşamadan oluşur: ıslak jel oluşumu ve ara yaşlandırma prosesi sonrası kurutma yapılmasıdır. Jel kurutma kritik bir adımdır çünkü son ürünün sahip olduğu özellikler uygulanan sıcaklık ve basınçtan fazlaca etkilenir (Bhagat ve diğ., 2007). Tipik olarak, başlangıç malzemesi hidrojel olduğunda, aerojeller süperkritik kurutma kullanılarak, kserojeller geleneksel kurutmayla ve kriyojeller dondurarak kurutmayla elde edilir (Hayase ve diğ., 2017).

2.8.2.1. Jel Oluşumu

Jel oluşum aşaması: İstenilen özellikler ve fiziksel görünüm büyük ölçüde hazırlanan sol tipine, sentez prosedürlerine ve reaktiflere bağlıdır. Bu nedenle silika aerojeller, parçalı veya granüllü gibi çeşitli formlarda sentezlenebilir; özellikleri, istenilen çalışmaya göre uyarlanabilir (Mahadik ve diğ., 2012; Parmenter ve Milstein, 1998). Silika aerojelin istenen özellikleri büyük ölçüde bu aşamaya bağlı olduğundan sol hazırlığı çok önemlidir. Farklı özelliklere ulaşmak için farklı tipte çözücüler, katalizörler ve öncü madde kullanılabilir. Öncü madde, en sonunda hidrolize olup jeli oluşturan silikanın ana kaynağıdır. Geleneksel olarak silika aerojel sentezi için iki tip öncü kullanılır: silikon alkoksitler ve inorganik tuzlar. Tetrametoksisilan (TMOS), tetraetoksisilan (TEOS), polietoksisilan (PEDS), metiltrietoksisilan (MTES) ve benzeri maddeler silikon alkoksit öncüleri olarak kullanılmaktadır (Gurav ve diğ., 2010; Lee ve diğ., 2002; Sumirnova ve Gurikov, 2018). Fakat bu öncüller pahalı ve tehlikelidir. Genelde tercih edilen, silikon alkoksitlerle elde edilebilecek özelliklerin aynısını korurken, ucuz ve tehlikesiz maddelerin seçimi yönünde olmaktadır. Bu yüzden sodyum silikat çözeltisi en çok tercih edilen öncülerin başında gelmektedir (Gupta ve Ricci, 2008; Gurav ve diğ., 2010; Hong ve diğ., 2013). Bu çözelti silika ve sodyum hidroksit çözeltisinin karıştırılmasıyla yapılabilir. Sodyum silikat yapmak için gereken silika, örneğin %19-22 silika içeren pirinç kabuğu gibi biyokütleden ekstrakte edilebilir (Yücel ve diğ., 2004; Temel ve diğ., 2017).

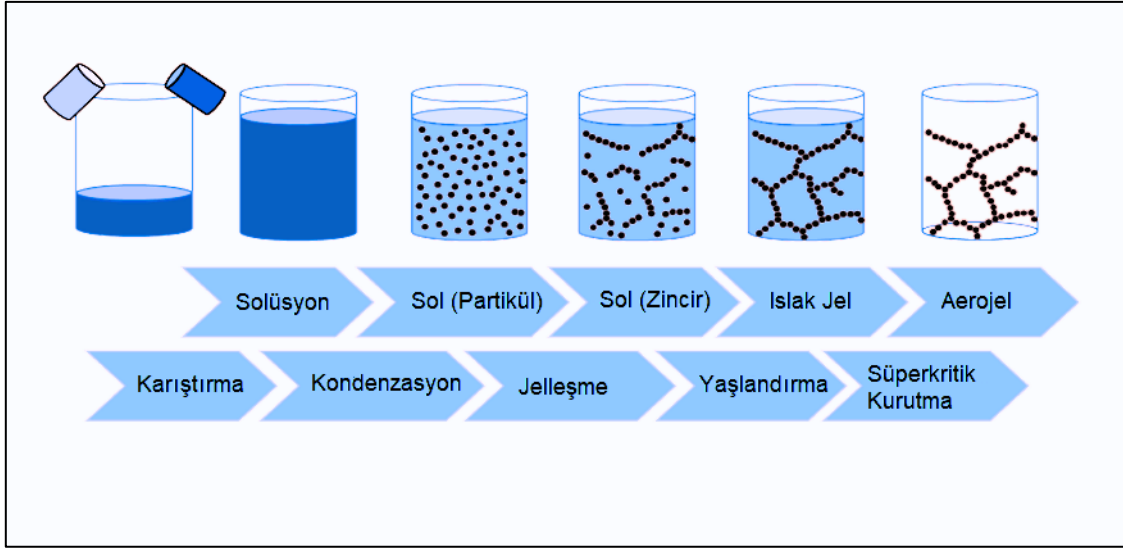
Pirinç kabuğundaki silika miktarı aynı zamanda pirinç türüne de bağlıdır (Feng ve diğ., 2018). Tipik olarak kullanılan çözücüler, etanol, metanol ve aseton gibi alkollerdir. Bunlar arasında etanol, diğerlerine kıyasla gözenek boyutunu ve yüzey alanını daha fazla artırmaya yardımcı olduğu için tercihen kullanılır (Daoussi ve diğ., 2009; Wang ve diğ., 2020). Katalizörler, gerekirse hidroliz sürecini başlatarak ve jelleşme hızını kontrol

ederek çok önemli bir rol oynarlar. Kullanılan katalizörler asit veya bazlardır. Asitle katalize edilen sol, daha az gözenekliliğe sahip daha yoğun bir malzeme verirken bazla katalize edilen sol, daha gözenekli bir silika aerogel oluşturur. Optimum sonuçlara ulaşmak için pH ve jelleşme süresinin kontrol edilmesi ve izlenmesi gerekmektedir (Asmussen ve diğ., 2019; Pierre ve Pajonk, 2002). Silika aerogellerin sol-jel ile üretiminin birinci aşamasında bir silika kaynağı (örneğin tetraetil ortosilikat TEOS), etanol, su ve katalizör birlikte karıştırılır. Silika kaynağı olarak kullanılan alkoksitlerin en yaygın olanı, işlem sırasında metanol üreten tetrametil ortosilikat (TMOS) yerine kullanılan tetraetil ortosilikattır (TEOS). TEOS ilk önce bir etanol, su ve hidroklorik asit karışımı içinde kısmen hidrolize edilir ve daha sonra bir polikondensasyon reaksiyonuyla reaksiyona girer. Hidroliz ve yoğunlaşma Şekil 2.6'da gösterilmiştir (Brinker ve Scherer, 2013).



Şekil 2.6. (a) Hidroliz, (b) Alkol yoğunlaşması, (c) Su yoğunlaşması (c) (Brinker ve Scherer, 2013)

Polimerizasyon reaksiyonu çok adımlı bir reaksiyondur. İlk adım, dimerlerin ve diğer kısa zincirli oligomerlerin oluşumundan oluşur. Uzun zincirli polimerler yalnızca reaksiyonun ileriki aşamalarında üretilir. Polimerizasyon sırasında viskozite artar ve sol ıslak jele dönüşür. Bu, prosesin son adımında süperkritik kurutma vardır (Pico ve diğ., 2017). Şekil 2.7'de çözeltiden silika aerogele kadar olan proses adımları gösterilmektedir.



Şekil 2.7. Aerojel üretim aşamaları (Pico ve diğ., 2017)

2.8.2.2. Yaşlandırma

Yaşlandırma sürecinin gözeneklilik, yüzey alanı ve gözenek boyutu gibi aerogelin özellikleri üzerinde önemli etkisi vardır (Mahadik ve diğ., 2012; Rao ve diğ., 2007). Yaşlandırma süresi ve sıcaklığın uzamasıyla birlikte olgunlaşma süreçlerine bağlı olarak spesifik yüzey alanının azaldığı gösterilmiştir (Feng ve diğ., 2018). Artan yaşlanma süresi, aerojellerin kütle yoğunluğunun azalmasına ve doğrusal büzülmeye neden olmasına karşın, ortamda kurutulmuş jellerin artan gözenek boyutuna ve gözenek hacmine sahip olduğu gösterilmiştir (Mahadik ve diğ., 2012; Parmenter ve Milstein, 1998; Shajesh ve diğ., 2009). Ayrıca, kullanılan çözücünün, üretilen aerojellerin gözenek boyutu, gözenek hacmi, yüzey alanı ve optik geçirgenliği üzerinde etkisi vardır (Maleki ve Hüsing, 2018).

2.8.2.3. Kurutma

Kurutma, elde edilen jelin doğasını belirlediği için son ve en önemli adımdır. Yaygın olarak sentezlenen jeller aerojeller, kserojeller ve kriyojellerdir. Aralarındaki temel ayırt edici faktör, kullanılan kurutma yönteminin türüdür. Aerojeller genellikle süperkritik kurutma yoluyla, kserojeller ortam basıncında kurutma yoluyla, kriyojeller ise dondurarak kurutma kullanılarak kurutulur. Dolayısıyla her üç jel tipi de diğerlerinin yanı sıra gözeneklilik ve yüzey alanı gibi farklı özellikler gösterir. Bununla birlikte, bu özellikler aynı zamanda temel jel ağını (silika aerojeller, karbon aerojeller, polimer

aerogeller vb.) sentezlemek için kullanılan türe veya öncül maddeye de büyük ölçüde bağlıdır. Silika aerogeller süperkritik kurutma dışında farklı kurutma yöntemleri ile de üretilirler. Büyük ölçekli üretimlerde yüksek üretim maliyetlerini düşürmek için sodyum silikat çözeltileri ve düşük maliyetli hammaddeler kullanılarak ortam şartlarında kurutma uygulanmaktadır (Terzioğlu ve diğ., 2018).

Silika aerogellerin ortalama gözenek çapları 20-40 nm, yüzey alanı $600-1000 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, organik ve karbon aerogellerinin ise gözenek boyutları 2-4 nm ve yüzey alanı $300-400 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ olabilir. Kriyojeller yüzey alanı $800 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ 'den büyük ve mezo-gözenekli olabilir (Baimenov ve diğ., 2020).

2.8.2.4. Sol-Jel Çeşitleri

Magnezyum silikat, polimerler, katalizörler ve adsorbanlar gibi çeşitli maddelerin yanında seramik üretiminde veya dolgu maddesi olarak kullanılmaktadır. Benzersiz yapısı, özel morfolojisi ve mükemmel adsorpsiyon kapasitesi nedeniyle yaygın olarak kullanılan kil minerali bileşiktir (Kara ve diğ., 2020). Magnezyum silikatlar $300-600 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ gibi değerlere ulaşan yüksek yüzey alanına sahip bileşiklerdir (Bilgin, 2008; Ghods ve diğ., 2016). Magnezyum silikat doğal ve sentezlenmiş formlarda bulunur. Talk, doğal magnezyum silikatlardan biridir ve polimerlerde dolgu maddesi olarak kullanılabilir. Doğal ve sentezlenmiş magnezyum silikatlar kristal veya amorf yapıyı ortaya çıkarabilir. Doğal magnezyum silikata erişimin zor olması nedeniyle, sentezlenerek elde edilmesi son zamanlarda daha fazla ilgi görmektedir. Sentezlenen magnezyum silikat, su ve alkolde çözünmeyen beyaz, amorf bir tozdur. Sentezlenen magnezyum silikat, sodyum ve magnezyum tuzu sulu çözeltisi arasındaki reaksiyonla elde edilir (Ghods ve diğ., 2016). Magnezyum silikatın yüzeyi hidrofobik ve hidrofilik kısımlar içermektedir. Hidrofobik kısım siloksan ($\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}\equiv$) gruplarını içermektedir. Hidrofilik kısım ise, izole haldeki hidroksi grupları ($-\text{Mg}-\text{OH}$), silanol gruplarını ($\equiv\text{Si}-\text{OH}$) ve komşu silikon atomlarına bağlanmış olan hidroksi gruplarının yakın çevresinden dolayı bulunan hidrojen bağlarını içermektedir (Ciesielczyk ve diğ., 2014). Silikat yüzeyinin hidrofobikliğini arttırmak ve dolayısıyla çeşitli bileşiklerin bağlanmasını desteklemek için yüzey modifikasyonu gerçekleştirilir. Modifikasyon, silikat yüzeyine yeni organofonksiyonel grupların eklenmesiyle gerçekleşir (Jesionowski ve Krysztafkiewicz, 2001).

Bakır içeren aerogeller, çeşitli öncü kimyasallar ve işleme yöntemleri kullanılarak sentezlenebilmektedir (Mohanen ve Brock, 2003). Bakır-silika aerogel geniş yüzey alanı ($511-652 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) ve yüksek gözenek hacmine ($2,7 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$) sahip destek materyallerindendir (Amiri ve diğ., 2016). Silika kaynağı olarak su camı, bakır kaynağı olarak kullanılarak ortam basıncında kurutma ile baz katalizli bir üretimle yüksek gözenekliliğe sahip bir şekilde elde edilebilmektedir. (Kristiansen ve diğ., 2011). Ayrıca su camı yerine tetraetil ortosilikat (TEOS) ve bakır (II) nitrat kullanılarak sol-jel yöntemiyle yüksek spesifik yüzey alanına sahip, bakır katkılı silika kompozit aerogeller sentezlenebilmektedir (GuiAn ve diğ., 2011). Geniş yüzey alanları nedeniyle silika üzerinde stabilize edilen metal nanopartiküller adsorpsiyonda daha iyi uygulamalar sunmaktadır (Hernández-Maldonado ve diğ., 2004).

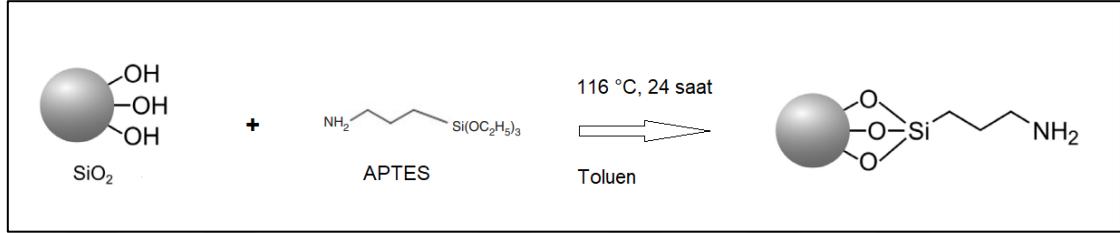
2.8.3. Aerogellerin Fonksiyonelleştirilmesi

Silika parçacığının fonksiyonelleştirilmesi, parçacıkların yüzey özelliklerinin hedef uygulamalara uyacak şekilde uyarlanmasına yönelik bir yöntemdir (Şekil 2.8). Amino-fonksiyonelleştirilmiş silikalar, kompozit malzemeler, katalizörler, tıbbi teşhis ve biyokimya dahil olmak üzere geniş ticari uygulamalara sahiptir (Lu, 2013). Silika yüzeyindeki silanol grupları (Si-OH), katalizörle birlikte organotrialkoksilsilan ($\text{RSi}(\text{OR})_3$) bileşikleri veya metalil silanlarla işleminden geçirilerek ve silika nanopartiküllerinin yüzey modifikasyonu ile çeşitli fonksiyonel gruplara kolaylıkla dönüştürülebilir (Yeon ve diğ., 2007). Amino-fonksiyonel grupların, silikaların dağılıbilirliğini ve karışabilirliğini arttırdığı ve diğer fonksiyonel molekülleri bağlamak için bir bağlantı birimi olarak kullanıldığı bilinmektedir (Knopp ve diğ., 2009). Aminoorganosilanlar, $\text{H}_2\text{N-R-Si}(\text{OR}')_3$ genel formülüne sahiptir. Organik zincirde bir aminofonksiyonel grup taşımaları bakımından genel organosilanlardan farklılık gösterirler. Bu grup, aminosilan moleküllerinin spesifik kimyasal reaksiyon davranışından ve yüksek reaktivitesinden sorumludur. Amin grubunun elektron bakımından zengin azot merkezi, hidroksil grupları veya diğer aminler gibi hidrojen veren gruplarla hidrojen bağı etkileşimlerine girebilir. Bir aminosilanın silika jel ile karıştırılması, aminin bir yüzey hidroksil grubuna hidrojen bağlanmasının ardında hızlı adsorpsiyonla sonuçlanır. En yaygın olarak kullanılan ve üzerinde çalışılan üç aminosilan şunlardır: γ -aminopropiltrietoksilsilan (APTS; $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})_3\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), γ -aminopropildietoksimetilsilan (APDMS;

$(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})_2\text{CH}_3\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$) ve N- β -aminoetil-y-aminopropiltrimetoksisilan (AEAPTS; $(\text{CH}_3\text{O})_3\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$) (Vrancken, 1995).

Silika aerojeller temel olarak birbirine kuvvetli Si-O-Si bağlarıyla bağlı silikalardan meydana gelmişlerdir. Polimerler ile bir araya gelen silika aerojellerde bu yüzden silika parçacıkları arasında kurulan yeni bağlantılar ortaya çıkmaktadır. (C=C) kovalent bağları ile parçacıklar arasında kuvvetli etkileşimler kurulur (Maleki ve diğ., 2014). İnorganik yapıda olan silika partiküllerine yüzey modifikasyonu gerçekleştirilerek organik ortamda kararlı bir hal almaları sağlanır (Tiryaki, 2017). Silika aerojeller iki farklı şekilde fonksiyonelleştirilmektedir. İlk aşama olan sentezlenme sürecindeki fonksiyonelleştirmede aerjel üretim kondenzasyon basamağında silan grupları ile yaşlandırma yapılır. İkinci aşama olan sentezlenme sonrası fonksiyonel grup eklenmesi ise aerjel üretimi yapıldıktan sonra sıvı veya gaz fazda yapılmaktadır. Gaz faz reaksiyonları zamana bağlı olarak silan konsantrasyonunun artması sebebi ile dezavantajlı olmaktadır (Alnaief ve Smirnova, 2010). Sıvı fazda fonksiyonel grup eklenmesi ise sulu veya susuz fazda gerçekleşebilir. Sıvı fazlarda bağlanma oranı reaksiyon sıcaklığının belirli bir seviyesinin üzerine çıkılamaması ve etkileşim süresinin fazla olması sebebi ile düşüktür (Qiao ve diğ., 2015). Fonksiyonelleştirme süresince polar ya da polar olmayan çözücüler kullanılabilir. Silika yüzeyinde bulunan hidroksil gruplara polar çözücülerde yer alan hidroksil gruplarının bağlanabilmesi APTES'in bağlanması süresince olumsuz etkiye sebep olmaktadır (Howerter ve Youngblood, 2006). Polar olmayan çözücüler olarak toluen, hekzan gibi çözücüler tercih edilmektedir. Bu tip çözücüler reaksiyon sırasında hidroliz oluşumunu engeller (Qiao ve diğ., 2015). APTES uygun olan bir çözücü ile silika yüzeyinde bir tabaka oluşturabilmektedir fakat etkili bir bağlanmanın gerçekleşmesi reaksiyon esnasında sıcaklığın kontrollü olması ile mümkündür (Kara, 2020). APTES silika yüzeyine farklı şekillerde bağlanabilmektedir. Fiziksel adsorbsiyon, protonlanma ve hidrojen bağı oluşması yoluyla olan bağlanmalar nispeten zayıf olurken yüzey silanolleri ve komşu silan molekülleri arasında olan kovalent bağlanmalar daha dayanıklı olmaktadır. Bu kovalent bağlar tekli, ikili, üçlü veya çapraz bağlanma şeklinde olabilir (Qiao ve diğ., 2015). Modifikasyon esnasında, partikül boyutları APTES miktarının artması sebebi ile $-\text{NH}_2$ gruplarının konsantrasyonunda meydana gelen artıştan kaynaklı artmaktadır. Partikül boyutu reaksiyon sırasında kullanılan çözücünün türüne göre de partikül büyüklüğünü etkilemektedir. Daha vizkoz

ortamlarda gerçekleştirilen reaksiyonlarda partiküller arası etkileşim düşerek reaksiyon hızı da azalmaktadır. Bu da partikül boyutlarının daha küçük olmasına sebep olur. (Rahman ve diğ., 2009). Farklı pH değerine sahip ortamlarda silika yüzeyinin zeta potansiyel değeri amin gruplarından kaynaklı olarak değişebilmektedir. Asidik pH değerlerinde yüzey pozitif zeta potansiyelinde (+33 mV) olurken bazik koşullarda negatif zeta potansiyeli (-32 mV) oluşmaktadır.



şekil 2.8. Amino-fonksiyonelleştirilmiş silikanın sentezinin şematik gösterimi

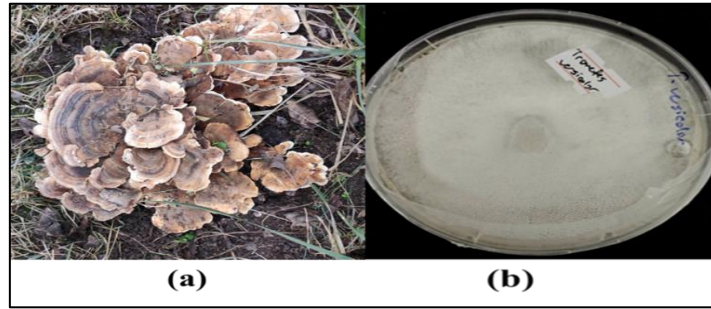
3. MATERYAL-METOT

3.1. Malzemeler

Bu tez çalışmasında kullanılan, silika aerogel, Mg-silika aerogel, Cu-silika aerogel Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya-Metalürji Fakültesi Biyomühendislik bölümünde üretildi. Kullanılan diğer malzemeler ise Sigma Aldrich (Almanya), Thermo Fischer Scientific (Amerika), Invitrogen (İngiltere), Euro-Lone (İtalya), Merck (Almanya) firmalarından temin edilen kimyasallardır.

3.2. Mikroorganizma Kültürü ve Saklama

Bu tez çalışmasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Mustafa YAMAÇ tarafından laboratuvarımıza hediye edilen *T. versicolor* kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan fungusun Kocaeli Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji laboratuvarında devamlılığı sağlanarak saf kültür halinde muhafazası sağlanmaktadır. Bunun için petrielerde hazırlanan YpSs (Yeast Powder Slouble Starch) besiyeri içeren yatık agarlar hazırlandı. Daha sonra, buzdolabında muhafaza edilen petrideki katı kültürden steril şartlar altında yatık YpSs ortamına ekim yapıldı ve yatık kültür, inkübatörde 30 °C’de statik olarak inkübasyona bırakıldı. Üretim sürecinin ardından yatık kültürün üzerine steril distile su eklendi ve miseller steril ekim çubuğu ile kazınıp misel süspansiyonu elde edildi. Hazırlanan misel süspansiyonundan 20 mL olacak şekilde 100 mL YpSs Broth içeren 250 mL erlene steril koşullarda ekim yapıldı. Hazırlanan kültür 30 °C ve 150 rpm’de 7 gün inkübe edildi. Inkübasyondan sonra, elde edilen sıvı kültür steril şartlarda homojenizatör ile düşük hızda homojenize edildi ve stok ekim kültürü olarak kullanıldı (Mercimek, 2007).



Şekil 3.1. *T. versicolor*'un (a) doğadaki ve (b) YpSs’de geliştirilmiş stok kültürlerine ait görüntüsü

3.3. Kalitatif Lakkaz Tayini

T. versicolor (30 °C) izolatu içerisinde 5 mM guakol bulunan YpSs plaklarına yoğun bir şekilde ekildi. Petri plakları 3-4 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu müteakip guakolu oksitleyen izolatların çevresinde kahverengi renkli halelerin varlığına göre lakkaz üretimi açısından değerlendirildi (Devasia ve Nair, 2016; Viswanath ve diğ., 2008).

3.4. Lakkaz Aktivite ve Protein Miktar Tayini

Lakkaz aktivite tayini spektrofotometrik yöntemle gerçekleştirildi. Substrat olarak guakol kullanıldı. 3,9 mL asetat tamponu (10 mM, pH 5,0), 1 mL guakol (1,76 mM) ve 0,1 mL kültür süpernatanı içeren 5 mL'lik reaksiyon karışımı, 25 °C'de yarım saat inkübe edildi. Daha sonra absorbans değeri 450 nm'de ölçüldü (Arora ve Sandhu, 1985). Bir ünite aktivite, dakikada 1 µmol substratı oksitlemek için gereken enzim miktarı olup aşağıda verilen formüle göre hesaplandı (3.1) (Nyanhongo ve diğ., 2006).

$$\text{Enzim aktivite} \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{\Delta OD}{\Delta t} \times \frac{1}{\epsilon} \times \frac{V_e}{V_t} \times DF \times \frac{1}{\text{inkübasyon zamanı (dk)}} \quad (3.1)$$

$\Delta OD/\Delta t$: 450 nm'de zamana karşı absorbans değişimi

ϵ : Guakolün [$12100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$] molar absorpsiyon katsayısı (Ademakinwa ve Agboola, 2016).

V_e : Assay küvet içindeki enzim örneğinin hacmi

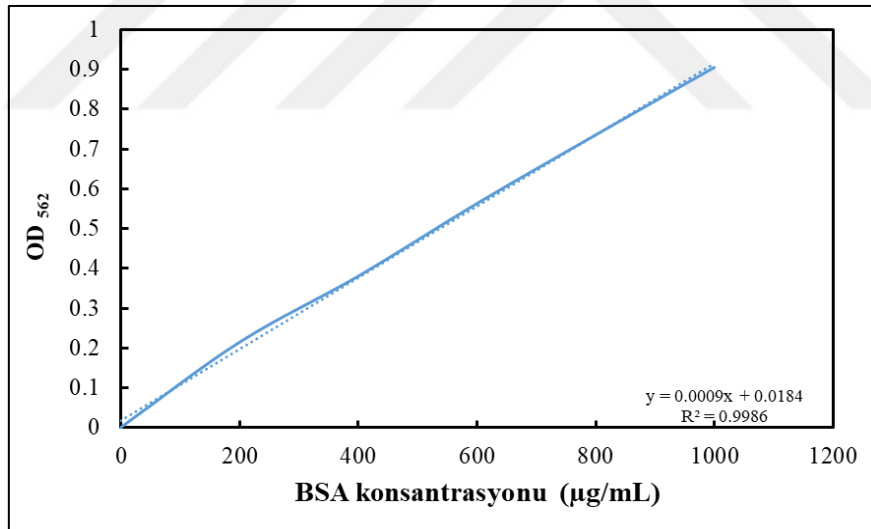
V_t : Assay küvetinin toplam hacmi

DF: Dilüsyon faktörü

Lakkaz aktivitesinin ABTS (2, 2-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)) substratı varlığında ölçümünde pH 4,5 olan 100 mM asetat tamponunda 5 mM ABTS kullanılarak ($\epsilon_{436} = 29,300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Chakroun ve diğ., 2010), 2,6-DMP (2,6-dimetoksifenol) substratı varlığında ölçümünde aynı tamponda 2 mM 2,6-DMP ($\epsilon_{469} = 27,500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

kullanıldı (Jaouania ve diğ., 2005). Tüm enzim aktivite analizleri oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

Lakkaz örneklerindeki protein miktarının belirlenmesi için bişinkoninik asit (BCA) yöntemi (Smith ve diğ., 1985) kullanıldı. Standart grafiği oluşturulmak amacıyla sığır serum albumini (Bovine Serum Albumine, BSA) kullanıldı. Buna göre, farklı konsantrasyonlarda (0,8, 0,6, 0,4, 0,2 ve 0 mg/mL) olacak şekilde hazırlanan standart haldeki protein örneklerine ait konsantrasyon ve absorbans değerleri ile standart bir grafik oluşturuldu (Şekil 3.2). Lakkaz örnekleri %5' lik (a/h) SDS içerisinde 5:1 (mg/mL) 72 saat 4 °C sıcaklıkta çözündükten sonra 96 kuyucuk içeren plakalara 3 tekrar olacak şekilde ayrıca kuyucukların her birine 10 µL içerecek halde eklendi. 200 µL A reaktifi (BCA Solüsyonu) ve B reaktifi (Bakır Sülfat Solüsyonu) 50:1 oranında karıştırılarak elde edilen çalışma solüsyonu kuyucuklara eklendi ve 60 °C sıcaklıkta 15 dak çalkalandıktan sonra 10 dak oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Ardından spektrofotometre cihazında (SPECTROstar Nano Microplate Reader) 562 nm absorbans ölçümü yapıldı.



Şekil 3.2. Protein miktar tayini için kullanılan standart doğru ($R^2=0,9986$)

3.5. Lakkaz Üretimi için Optimum Koşulların Belirlenmesi

T. versicolor mantarından optimum lakkaz üretimi için literatürden farklı besiyeri içerikleri ve büyüme koşulları araştırılarak 5 farklı inkübasyon ortamı seçildi (Tablo 3.1). İnkübasyon koşullarının sırasıyla referansları ve numaraları: Pazarlıoğlu ve diğ., 2004(1);

Mercimek, 2007 (2); Sanasarcı, 2020 (3); Mathur ve diğ., 2013 (4); Abd El Monssef ve diğ., 2015).

Tablo 3.1. Lakkaz üretimi için kullanılan farklı inkübasyon koşulları

İnkübasyon koşul no	Ön kültür besiyeri	Ana kültür besiyeri	Sıcaklık (°C)	Çalkalama hızı (rpm)
1	%2 (a/h) Malt özütü	10 g/L glukoz 1 g/L $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,05 g/L $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g/L CaCl_2 0,025 g/L maya özütü	26	175
2	-	25 g/L malt özütü 2 g/L KH_2PO_4 0,4 g/L K_2HPO_4	30	200
3	-	10 g/L glukoz 0,5 g/L $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,2 g/L K_2HPO_4 0,05 g/L $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g/L $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	30	200
4	4 g/L maya ekstraktı 1 g/L K_2HPO_4 0,5 g/L $\text{MgSO}_4 \times$ $7\text{H}_2\text{O}$ 10 g/L glukoz	5 g/L glukoz 1 g/L maya özütü 1 g/L et özütü 0,2 g/L pepton 1 g/L KH_2PO_4 0,5 g/L MgSO_4 0,1 g/L CuSO_4 3 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g/L CaCl_2 1 g/L Na_2HPO_4	30	155
5	-	3 g/L pepton 0,6 g/L KH_2PO_4 0,001 g/L ZnSO_4 0,4 g/L K_2HPO_4 0,0005 g/L FeSO_4 0,05 g/L MnSO_4 0,5 g/L MgSO_4	30	150

3.6. Lakkaz Enziminin ÜFA Yöntemi ile Saflaştırılması

Optimum koşullarda üretilen lakkaz enzimi, geleneksel protein saflaştırma yöntemlerine kıyasla hızlı ve etkili bir yöntem olan ÜFA tekniği ile saflaştırıldı. Bunun için, fermentasyon sıvısındaki lakkaz enzimi ile birlikte bulunan mantar hücreleri oda sıcaklığında 9,000xg'de 10-15 dak santrifüjleme işlemi yapılarak uzaklaştırıldı. Elde edilen homojenat, ÜFA yöntemi için enzim kaynağı olarak kullanıldı. Lakkaz enziminin

saflaştırılması için kullanılan ÜFA yönteminde, organik çözücü olarak t-bütanol ve tuz olarak amonyum sülfat seçildi. İlk olarak saflaştırmada en iyi verime ulaşabilmek amacıyla en uygun amonyum sülfat konsantrasyonu ve ham ekstrakt : t-bütanol oranı optimize edildi. Bunun için 5 farklı tuz oranı (%20, %30, %40, %50 ve %60, a/a) ve 2 farklı ham ekstrakt : t-bütanol oranı uygulanarak (Ham enzim ekstraktı : t-bütanol; (1,0:1,0 ve 2,0:1,0) denemeler yapılmıştır. Her bir denemede 1 saat oda sıcaklığında inkübasyon ve ardından 4500xg'de 10 dak santrifüj yapılmıştır. Oluşan üç fazdan üstte bulunan organik faz pastör pipetiyle alındı; alt ve ara fazda ise aktivite ve protein tayini gerçekleştirildi (Alici ve Arabaci, 2016; Duman ve Kaya, 2014). Enzimin etkili şekilde ayrılıp ayrılmadığının kontrolü için aşağıda verilen saflaştırma değerleri hesaplandı:

Spesifik aktivite tanımı (SA), 1 mg protein karşılık gelen enzim ünitesini ifade eder. Fazların sahip olduğu enzim aktivitesi değeri (U/mL) yine her fazdaki protein konsantrasyon değerine (mg/mL) bölünerek hesaplanır. Saflaştırma katsayısı (SK) ise, fazlarda ölçülen enzim spesifik aktivitesinin ham enzim ekstraktında ölçülen enzim aktivitesine oranıdır. Geri kazanım (%GK) ise proteinin herhangi bir fazda sahip olduğu enzim aktivite değerinin sisteme ilave edilen ham enzimin ilk aktivitesine oranıdır.

3.7. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

Lakkaz enzim saflığının kontrolü SDS-PAGE analizi ile yapıldı. Bio-Rad Mini Protean sistemi kullanılarak; %5 (h/h) yükleme jeli ve %15 (h/h) ayırma jeli hazırlanarak gerçekleştirildi (Laemmli, 1970). Elektrofrez 200 V'da yaklaşık 60-80 dak yürütülerek gerçekleştirildi ve yürütülen jeller elde edilen protein konsantrasyonuna göre coomassie blue boyama metodu ile boyandı. Elektrofrezde kullanılan çözeltiler ve hacimleri Tablo 3.2'te verilmektedir.

Tablo 3.2. SDS-PAGE'de kullanılan çözeltiler ve hacimleri

Bileşenler	Yükleme jeli (mL) (%5, pH 6,8)	Ayırma jeli (mL) (%15, pH 8,8)
%30 (a/h) Akrilamid/Bisakrilamid	0,83	5,0
Yükleme jel tamponu (1 M Tris-HCl, pH 6,8)	0,63	---
Ayırma jel tamponu (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)	---	2,50

Tablo 3.2. (Devam) SDS-PAGE’de kullanılan çözeltiler ve hacimleri

%20 (a/h) SDS	0,025	0,050
%10 (a/h) Amonyum persülfat (APS)	0,05	0,10
N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED)	0,005	0,010
ddH ₂ O	3,40	2,35

3.8. Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrez (PAGE) ve Aktivite Boyaması

Doğal PAGE, Bio-Rad Mini Protean sistemi kullanılarak %5 (h/h) yükleme jeli ve %10 (h/h) ayırma jeli hazırlanarak gerçekleştirildi (Laemmli, 1970). Doğal elektrofrez yükleme boyası ile 1:1 oranındaki numuneler mikropipet yardımıyla kuyucuklara yüklendi. Boya, yükleme jelinden ayrılana kadar 20 mA’lık ve ayırma jeli esnasında da 25 mA’lık akım uygulandı. Elektrik akımı kesildikten sonra jel düzeneğe özenle çıkartılarak boyama yapımına geçildi. Elektrofrez yapılırken gerekli olan çözeltiler ve hacimleri Tablo 3.3’te verilmektedir.

Tablo 3.3. Doğal Poliakrilamid jel elektrofrezinde kullanılan çözeltiler ve hacimleri

Bileşenler	Yükleme jeli (mL) (%5, pH 6,8)	Ayırma jeli (mL) (%15, pH 8,8)
%30 (a/h) Akrlamid/Bisakrlamid	0,83 mL	5,0 mL
Yükleme jel tamponu (1 M Tris-HCl, pH 6,8)	0,63 mL	----
Ayırma jel tamponu (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)	---	2,50 mL
%10 (a/h) Amonyum persülfat (APS)	0,05 mL	0,10 mL
N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED)	0,005 mL	0,010 mL
ddH ₂ O	3,40 mL	2,35 mL

Doğal jel elektrofrez sonucu elde edilen jel, substrat boyama çözeltilisi (10 mM’lık ABTS) içinde 30 dak inkübe edilerek lakkaz aktivite varlığı yeşil renkte bant gözlenerek tespit edildi (Patel ve diğ., 2014b).

3.9. Lakkaz Enziminin Karakterizasyonu

3.9.1. Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi

Lakkazın kinetik özelliklerini analiz etmek için substrat olarak ABTS (0,1 – 1,5 mM), guakol (0,1 - 7 mM) ve 2,6-DMP (0,1 mM - 2 mM) kullanıldı (Terron ve diğ., 2004; Ullrich ve diğ., 2005). ABTS, guakol ve 2,6-DMP oksidasyonun kinetik parametreleri (K_m , V_{max}) Lineweaver-Burk (Lineweaver ve Burk, 1934) diyagramları oluşturularak belirlendi. Deneyler üç tekrarlı gerçekleştirildi ve Lineweaver-Burk grafiği için ortalama $\pm$ SD değerleri alındı.

3.9.2. Sıcaklığın Lakkaz Aktivitesi ve Stabilitesine Etkisi

Safılaştırılan lakkaz enziminin aktif olduğu optimal sıcaklık değerini bulmak için standart aktivite assay koşulları altında 4 °C ve 80 °C arasında (4 °C, 20 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C ve 80 °C) aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Enzime ait sıcaklık profilinin belirlenmesi amacıyla 1 mL enzim çözeltisi (7194 U/g spesifik aktivite, 0,7 mg/mL protein) kullanıldı. Elde edilen en yüksek değerdeki aktivite %100 olarak kabul edildi ve elde edilen diğer aktivite sonuçları en yüksek olan aktivite sonucuna bölünerek % bağıl aktivite şeklinde hesaplandı. Deneyler üç tekrarlı gerçekleştirildi ve grafik için ortalama $\pm$ SD değerleri alındı.

Safılaştırılan lakkaz enziminin sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi için ise enzim örneği (7194 U/g spesifik aktivite, 0,7 mg/mL protein) 4 °C'den 80 °C'ye kadar olan sıcaklıklarda farklı zamanlarda (1, 2, 3 ve 4 saat) inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda lakkaz aktivite tayin metodu kullanılarak enzim aktivitesi hesaplandı. Inkübasyon öncesi aktivite miktarı 100 olarak kabul edilerek farklı sıcaklık değerlerindeki kalan aktivite yüzdesi (%) hesaplandı (Mehandia ve diğ., 2020). Deneyler üç tekrarlı gerçekleştirildi ve grafik için ortalama $\pm$ SD değerleri alındı.

3.9.3. pH'nın Lakkaz Aktivitesi ve Stabilitesine Etkisi

Safılaştırılan lakkaz enziminin optimum pH değerini belirlemek amacıyla 100 mM asetat tamponu (pH 3,0 – 5,5) ile 100 mM fosfat tamponu (pH 6,0 – 8,0) kullanılmış ve standart koşullarda aktivite tayini gerçekleştirildi. Enzimin pH profilinin belirlenmesi için 1 mL

enzim çözeltisi (7194 U/g spesifik aktivite, 0,7 mg/mL protein) kullanıldı. Aktivitenin en yüksek olduğu pH değeri 100 olarak kabul edildi ve pH değerleri ona göre bağıl aktivite (%) cinsinden hesaplandı (Han ve diğ., 2005; Mehandia ve diğ., 2020; Patel ve diğ., 2014b). Deneyler üç tekrarlı gerçekleştirildi ve grafik için ortalama $\pm$ SD değerleri alındı.

Saflaştırılan lakkaz enziminin pH stabilitesinin belirlenmesi maksadı ile 1 mL enzim çözeltisi (7194 U/g spesifik aktivite, 0,7 mg/mL protein) 10 mM asetat ve 10 mM fosfat tampon çözeltilerinin 3 mL'si ile karıştırılarak 4 saat oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra her pH değerine karşılık gelen enzim aktivitesi yukarıda verilen lakkaz aktivite hesaplama protokolüne göre belirlendi. Her bir pH değerininin sıfır anında ki aktivitesi %100 kabul edilerek enzim çözeltilerine ait kalan aktivite değerleri hesaplandı. pH'ya karşı kalan aktivite değerlerine göre grafik çizilip enzimin pH stabilite profili belirlendi. Deneyler üç tekrarlı gerçekleştirildi ve grafik için ortalama $\pm$ SD değerleri alındı.

3.9.4. İnhibitörlerin ve Metal İyonlarının Lakkaz Aktivitesine Etkisi

İnhibitörlerin ve metal iyonlarının lakkaz aktivitesi üzerindeki etkisini belirlemek için lakkaz enzimi farklı konsantrasyonlarda 50 °C'de 30 dak süreyle inkübe edildi. İnhibitör olarak β -merkaptotanol, Etilendiamintetrasetik asit (EDTA) ve fenilmetilsülfonil florit (PMSF), metal iyonları olarak da KCl, FeSO₄, CaCl₂, ZnSO₄, MgSO₄, MnSO₄, CuSO₄, NaCl ve NiSO₄ kullanıldı. Deneyler üç tekrarlı gerçekleştirildi ve hesaplamalarda ortalama $\pm$ SD değerler kullanıldı. Kalan aktivite değeri aşağıda verilen formüle (3.2) göre hesaplandı:

$$\% \text{ Kalan aktivite} = \left(100 - \frac{\text{Muamele edildikten sonra ölçülen lakkaz aktivite}}{\text{Muamele edildikten önce ölçülen lakkaz aktivite}} \right) \times 100 \quad (3.2)$$

3.9.5. Sürfaktanların Lakkaz Aktivitesine Etkisi

Lakkaz aktivitesi çeşitli iyonik (anyonik SDS) ve iyonik olmayan (Triton-100, Tween-20 ve Tween-80) sürfaktanlar (0,1 – 1 mM) varlığında ölçüldü. Enzim 37 °C'de 30 dak boyunca inkübe edildi. Lakkaz aktivite ölçümü yukarıda açıklandığı gibi gerçekleştirildi ve kalan aktivite değeri (%) yukarıda verilen formüle göre hesaplandı. Deneyler üç tekrarlı gerçekleştirildi ve hesaplamalarda ortalama $\pm$ SD değerler kullanıldı.

3.9.6. Organik Çözücülerin Lakkaz Aktivitesine Etkisi

Organik çözücülerin lakkaz aktivitesi üzerindeki etkisini belirlemek için lakkaz enzimi farklı konsantrasyonlarda (%5, %10, %30 ve %60, v/v) 50 °C'de 30 dak süreyle inkübe edildi (Ögel ve diğ., 2006; Yuzugullu Karakus ve diğ., 2021). Organik çözücü olarak kloroform, izopropanol, etanol, dimetilsülfoksit (DMSO) ve metanol kullanıldı. Enzim aktivite ölçümü standart koşullarda ölçüldü. Deneyler üç tekrarlı gerçekleştirildi ve hesaplamalarda ortalama $\pm$ SD değerler kullanıldı.

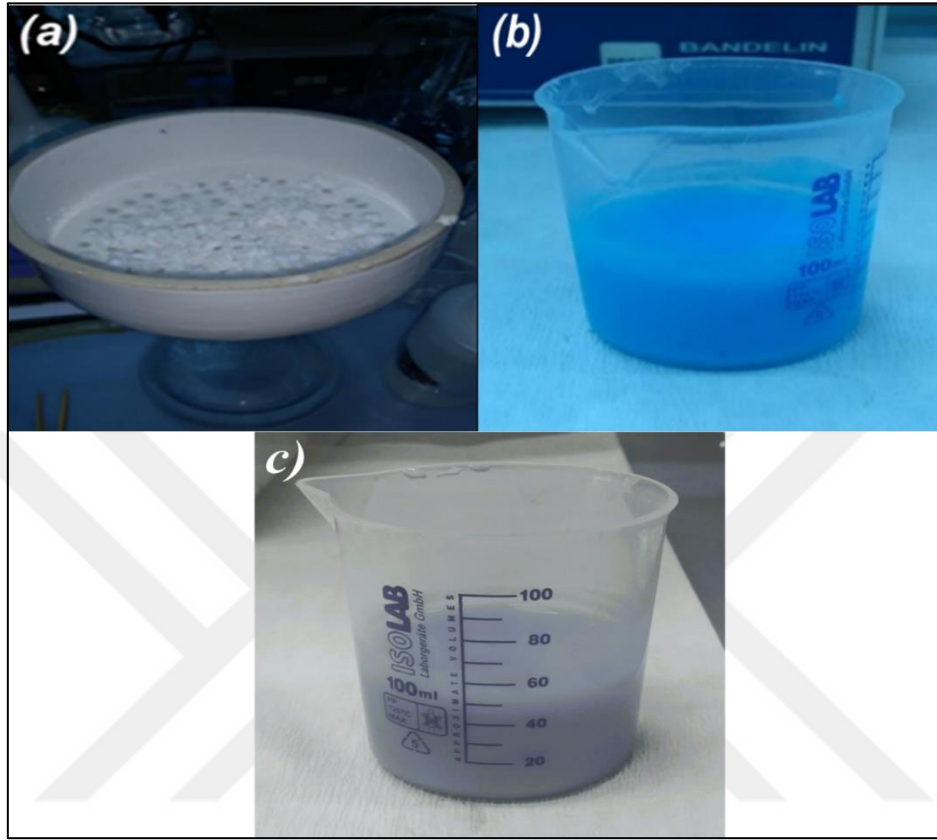
3.10. Silika Aerojel, Magnezyum Silika Aerojel ve Bakır Silika Aerojel Üretimi

Silika aerojel, magnezyum silika aerojel ve bakır silika aerjellerin üretimi genel olarak;

1. Reaksiyon aşaması,
2. Safsızlıkların giderilmesi için yıkama aşaması,
3. Çözücü değişimi/yüzey modifikasyonu uygulanarak yaşlandırma,
4. Kurutma basamaklarından oluşmaktadır.

Silika aerojel üretimi için Yücel ve diğ., (2016) tarafından oluşturulan yöntem kullanılırken çözücü içerisinde yaşlandırma basamağı için Nayak & Bera (2009) yöntemi kullanıldı. Silika, magnezyum silika ve bakır silika aerjellerin üretimi yapılmadan önce üretim esnasında kullanılacak olan ticari Na_2SiO_3 çözeltisinin silis içeriği belirlendi. Bunun için: Ticari nötral Na_2SiO_3 (Özkimsan firması, Bolu), 3 mL sodyum silikat çözeltisi 12 mL dH_2O (1/5) oranında seyreltilti. Ardından 1 mL 6N HCl ile yarı akışkan jel benzeri yapı elde edildi. Sodyum tuzlarını uzaklaştırmak için 200 mL dH_2O ile yıkanıp ardından vakum altında nuçe süzülüp (Şekil 3.3 (a)) filtre kağıdında kalan numune 12 saat 110 °C sıcaklıkta kurutmaya bırakıldı. Kurutma sonrası içerik tartılarak %28,7 SiO_2 olduğu tespit edildi. Bu değer farklı bir ticari sodyum silikat çözeltisinin (Palkim Kimya Sanayi ve Dış Ticaret Ltd. Şti.) SiO_2 değeri olan %27,43 değeri ile benzerlik göstermektedir (Emine, 2019). Silis miktarı belirlenen sodyum silikat çözeltisi silika, magnezyum silika ve bakır silika aerojel üretimi için kullanıldı. Bu amaçla jel benzeri yapının oluşturulması için 6N ve 1N HCl çözeltileri hazırlandı. Yine aynı yöntemle göre, magnezyum ve bakır silika aerojel üretimi için bu sefer HCl yerine ilgili tuzlar belirlenen

oranlarda hesaplanıp distile su ile çözdürüldükten sonra manyetik karıştırıcıda karışmakta olan Na_2SiO_3 çözeltisine ilave edilerek jel benzeri yapı elde edildi (Şekil 3.3(b)).



Şekil 3.3. (a) Silika aerojellerin vakum altından nuçeden süzülmesi, (b) Bakır silika aerojelin jel benzeri yapısı, (c) Magnezyum silika aerojelin jel benzeri yapısı

Karışım içerisindeki magnezyum klorür-silikat ve bakır sülfat-silikat çözeltilerinin oranları Mg/Si : 0,5 ve Cu/Si : 0,5 olarak seçilmiştir (Bawaked ve Narasimharao, 2020; Hariu ve diğ., 2013; İlkay, 2020). Her iki tuz da silika aerogel üretiminde olduğu gibi jel benzeri yapının oluşumu için belirlenen oranlarda eklendi. Jel benzeri yapı oluşuktan sonra vakum altında nuçeden süzüldü. Süzgeç kâğıdı üzerinde biriken katı yapı bir behere alınarak saf su ile sodyum içeren tuzların uzaklaştırılması için yıkandı. Ardından yeniden nuçeden süzüldü. Süzülen numune %80 etanol içeren çözelti ile 24 saat 50 °C’de yaşlandırıldı. Ardından %70 TEOS / %30 EtOH ile 20 saat 50 °C ve 4 saat 70 °C sıcaklıkta yüzey modifikasyonu sağlandı. Bu süre sonunda n-hekzan (3 kere yıkama) da 24 saat 50 °C de bekletildikten sonra yine n-hekzan (2 kere yıkama) da 72 saat 50 °C de bekletildi. Bu süreç sonunda 20 saat 80 °C de ve 4 saat 100 °C sıcaklıkta kurutma yapıldı.

3.11. Hazırlanan Aerojel Malzemelerinin Karakterizasyonu

3.11.1. Silika Aerojel, Magnezyum Silika Aerojel ve Bakır Silika Aerojellerin 3-(aminopropil)triethoksisilan (APTES) ile Yüzey Modifikasyonu (Fonksiyonelleştirilmesi)

Destek materyalleri olan silika aerojel, Mg-silika aerojel ve Cu-silika aerojelin aminasyonu APTES (3- Aminopropil triethoksisilan) ile gerçekleştirildi. Her destek materyali için APTES'in %1, %5 ve %10'luk konsantrasyonları çalışıldı. %10 konsantrasyon için: destek materyali ve toluen (10:1 oranında) erlen içersine konularak 30 dak boyunca ultrasonik homojenizatörde destek materyalinin dağıtılması sağlandı. Ardından APTES ilave edilerek (1:10; APTES:Toluen) geri distilasyon (reflux) gerçekleştirildi. Geri distilasyon koşulları 110 °C sıcaklık ve 250 RPM karıştırma hızı olacak şekilde ayarlanıp 24 saat boyunca uygulandı. 24 saat sonunda fazla APTES ve çözücüyü uzaklaştırmak için 15 dak süre ile 9000 RPM'de santrifüjleme yapıldı. Ardından 3 kez etanolle yıkanarak 50-80 °C sıcaklıkta 24 saat süre ile vakum etüvünde kurumaya bırakıldı (He, 2017).

3.11.2. Brunauer-Emmett-Teller (BET) Yüzey Alanı, Gözenek Boyutu ve Gözenek Hacmi

Aerojellerin spesifik yüzey alanı, gözenek boyutu ve gözenek hacmi Yüzey Alanı ve Porozite Cihazı (Micromeritics, TriStar II 3020) ile 77 K'de azot adsorpsiyon ölçümlerine bağlı olarak belirlendi. Spesifik yüzey alanı Brunauer-Emmett-Teller (BET) metodu ile hesaplandı. Gözenek boyutu ve gözenek hacmi Barrett-Joiner-Halenda (BJH) metodunda elde edilen izotermin desorpsiyon değerlerine göre belirlendi. Bu analizler Yıldız Teknik Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, Lipid ve Biyokompozit Laboratuvarında gerçekleştirildi.

3.11.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) Spektroskopisi Ölçümleri

Üretimi yapılan aerojellerin sahip olduğu fonksiyonel grupları FTIR Spektrofotometresi (Shimadzu IR Prestige 21, Kyoto, Japonya) ile belirlendi. Spektrumlar 4000-650 cm⁻¹ bölgesinde alındı. Analizler Yıldız Teknik Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümünde gerçekleştirildi.

3.11.4. Aerojellerin Partikül Boyut Analizi

Mie teorisi ile ölçüm yapan, ışık saçılım teknolojisini kullanan Horiba LA-350 cihazı ile partikül boyut analizi yapıldı. Lazer difraksiyonu ile yapılan ölçümlerde partiküllerin çapının büyüklüğüne göre dağılım grafiği elde edildi

Cihazın uygulamasında belirlenen transmitans değeri aralığına gelene kadar numune eklenir ve 60 saniye sonikasyon uygulanır. Particia mini cihazı lazer kırınımları kullanılarak parçacık boyutu tayininde kullanılır. Çalışma prensibinde lazer ışını dağılmış bir parçacıklı numuneden geçerken dağılan ışığın yoğunluğundaki açısal değişimi ölçerek parçacık boyutu dağılımlarını ölçer. Büyük parçacıklar ışığı lazer ışınına göre küçük açılarda saçar ve küçük parçacıklar ışığı büyük açılarda dağıtır. Açısal saçılma yoğunluğu verileri daha sonra, Mie ışık saçılımı teorisi kullanılarak saçılma modelini oluşturmaktan sorumlu parçacıkların boyutunu hesaplamak için analiz edilir. Parçacık boyutu, hacim eşdeğer küre çapı olarak bildirilir (Younes ve diğ., 2018). Partikül boyut analizi Yıldız Teknik Üniversitesinde gerçekleştirildi.

3.11.5. Taramalı Elektron Mikroskopu (TEM) Analizi

Tez çalışması için hazırlanan silika, Mg-silika ve Cu-silika aerojellerin farklı büyütme oranlarında (x1000, x10000, x20000, x40000) TEM görüntüleri alınarak yüzey morfolojileri incelendi. Bu analizler Yıldız Teknik Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde hizmet alımı ile gerçekleştirildi.

3.11.6. X Işını Floresans Spektroskopisi (X-IFS/XRF) Analizleri

Hazırlanan silika, Mg-silika ve Cu-silika aerojel bileşimleri X-ışını floresans spektroskopisi (X-IFS) analizi ile belirlendi. Bu analizler Liman Kimya Analiz Laboratuvarında hizmet alımı ile gerçekleştirildi.

3.11.7. Zeta Potansiyel Analizi

Üretimi yapılan silika aerojellerin yüzey yük içeriğinin tespit edilmesi maksadıyla zeta potansiyel ölçümleri yapıldı. Bunun için hem APTES yapılmış hem de yapılmamış olan silika aerojel örnekleri 1,5 mg tartılıp 20 mL distile suya eklenerek yarım saat ultrasonik banyo ile tampon içerisinde yer alan partiküllerin homojen bir şekilde dağılması sağlandı.

Bu aşamadan sonra analiz yapılabilmesi için küvet içerisine 800 µL partikül- PBS karışımı konularak ölçüm alındı (Tiryaki, 2017).

3.12. Lakkaz Enziminin İmmobilizasyonu

Hazırlanan silika aerojel destek materyallerine çapraz bağlayıcı bir ajan olan glutaraldehit ile lakkaz immobilizasyonu yapıldı. Silika aerojel, Mg-silika aerojel ve Cu-silika aerojel %1-3 (a/h) arasındaki konsantrasyon değerlerinde hazırlanan glutaraldehit çözeltisi ile 3 saat süresince 25 °C’de inkübe edildi. Ardından 9,000xg’de 10 dak santrifüj yapılarak süpernatant uzaklaştırıldı, pelet ise 3 defa sodyum asetat (100 mM, pH 5,0) tamponu ile yıkanarak çapraz bağlayıcının fazlasının uzaklaştırılması sağlandı. Glutaraldehit muamele edilmiş silika aerojeller 0,3 mg lakkaz ihtiva eden enzim çözeltisi ile 2 saat boyunca inkübe edildi (Amin ve diğ., 2020; Ozyılmaz ve diğ., 2015). Süre sonunda aerojel yüzeyine bağlanan enzimlerin tespit edilmesi için pelet aktivite ölçümleri gerçekleştirilirken, bağlanma gerçekleştiremeyen enzimlerin tespiti için ise üst faz ve yıkama sonrası süpernatanda enzimatik aktivite tayini yapıldı (Bautista ve diğ., 2010). Taşıyıcı üzerine bağlanan protein miktarının belirlenmesinde BCA yöntemi (Smith ve diğ., 1985) kullanıldı.

Lakkazın destek materyaline adsorpsiyonu için ise 40 mg destek materyali, 0,3 mg lakkaz içeren 5 mL sodyum asetat (0,1 M, pH 5,0) içerisinde süspanse edilip 2 saat boyunca 5 °C’de 200 rpm’lik mekanik çalkalama ile karıştırıldı. Ürünler santrifüjlendikten sonra süpernatantta enzimatik aktivite tespit edilmeyene kadar tamponla (0,1 M, pH 5,0) üç kez yıkanıp, vakumlu dondurarak kurutucuda kurutuldu ve ileride kullanılmak üzere 5 °C’de bir buzdolabında saklandı (Zhang ve diğ., 2018).

3.13. İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

Lakkazın destek materyallerine kovalent bağlama ve adsorpsiyon metodu ile immobilizasyonunda pH, sıcaklık, glutaraldehit konsantrasyonu, immobilizasyon zamanı ve başlangıç enzim konsantrasyonunun etkisini değerlendirmek için aşağıda verilen aralıklar denendi (Ozyılmaz ve diğ., 2005; Patel ve diğ., 2014a):

1. Sıcaklığın etkisini ölçmek için 4-45 °C aralığında çalışıldı.

2. pH etkisini ölçmek için 100 mM konsantrasyonda ve pH'sı 3,5 ila 6,0 arasında değişen tampon çözeltiler kullanıldı. Bunun için glisin-HCl (pH 2,0–3,0) ve sodyum asetat (pH 4,0–6,0) tamponları kullanıldı.
3. İmmobilizasyon zamanının etkisini ölçmek için 2, 4 ve 6 saat aralıklarında denemeler yapıldı.
4. Başlangıç enzim konsantrasyonunun etkisini ölçmek için 5 mL reaksiyon ortamında ise 0,15 – 0,30 ve 0,60 mg lakkaz olacak şekilde saf enzim örnekleri hazırlandı.

3.14. İmmobilize Lakkazın Karakterizasyonu

İmmobilize lakkazın karakterizasyonu (kinetik parametrelerin belirlenmesi, sıcaklık ve pH'nın aktivite ve stabiliteye etkisi) için serbest enzim karakterizasyonu sırasında izlenen adımlar takip edildi.

İmmobilize hale getirilmiş lakkazın yeniden kullanılabilirliği, 10 döngü boyunca 25 °C'de sodyum asetat tamponunda (100 mM; pH 4,5) ölçüldü. Her bir oksidasyon döngüsünden sonra, immobilize enzim, 15 dak boyunca 4,000xg'de santrifüjleme yoluyla çıkarıldı. İmmobilize enzim toplandıktan sonra, deiyonize su ve tamponla yıkandı. İkinci ve sonraki döngüler yapılırken, immobilize enzim yeni hazırlanmış tampon içinde oksitlenmemiş ABTS ile yeniden muamele edildi. İmmobilize enzimin aktivitesi, ilk (sıfır) döngüde %100 olduğu kabul edildi (Chen ve diğ., 2020; Patel ve diğ., 2014a).

3.15. Boya Renklerinin Giderilmesinde Serbest ve İmmobilize Lakkaz Uygulaması

Serbest ve immobilize lakkazın boya gideriminin test edilmesi için kullanılan boyalar sırasıyla; Malaşit yeşili (λ_{maks} . 620 nm), commasie brilliant blue G 250 (λ_{maks} . 465 nm), kongo kırmızısı (λ_{maks} . 350 nm), metil kırmızısı (λ_{maks} . 409 nm), metilen mavisi (λ_{maks} . 660 nm) ve fenol kırmızısıdır (λ_{maks} . 560 nm) (Bagewadi ve diğ., 2017; Younes ve diğ., 2007). Bu farklı tekstil boyaları genellikle tekstil atık sularındaki ana kirleticilerdir ve organizmalar üzerinde toksik ve genotoksik etkileri vardır (Dogan ve diğ., 2005). Bu sebeple boya renklerinin giderilmesi çalışmasında tercih edildiler.

Renk giderimi, her bir boya için maksimum dalga boyunda absorbanstaki azalma ölçülerek spektrofotometrik yöntemle (Cary60, Agilent, UV / Vis spektrofotometre) belirlendi. Renk giderimi için reaksiyon karışımı, 100 mM sodyum asetat tamponunda

(pH 4,5), serbest lakkaz veya immobilize edilmiş lakkaz (serbest enzimle aynı aktivite değeri içerecek şekilde hazırlanan) ile 200 mg/L boyadan oluşan 50 mL toplam hacme sahip olması sağlandı (Bagewadi ve diğ., 2017). Reaksiyonlar 25 °C sıcaklıkta 6 saatlik aralıklarla 150 RPM çalkalama hızında inkübasyona bırakıldı. Kontroller, 100 °C'de 10 dak inkübasyondan sonra ısıyla inaktive edilmiş enzim kullanılarak ve enzim olmaksızın yapıldı (Wehaidy ve diğ., 2019). Kontrol grubuna ilave olarak kullanılan immobilizasyon materyali de yalnızca boya ortamına ilave edilerek renk giderimi üzerine etkisinin olup olmadığı test edildi. Renk giderim oranı;

% Boya Giderimi: $[(A_i - A_s) / A_s] \times 100$ denklemi ile hesaplandı.

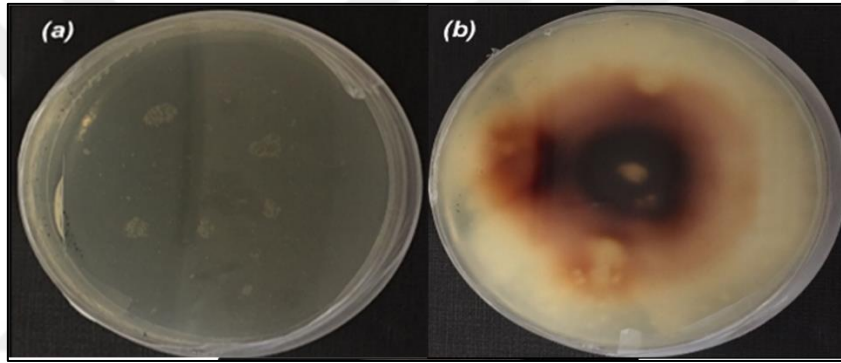
A_i : Boyanın ilk absorbansı

A_s : Boyanın son absorbansı

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Lakkazın Kalitatif Tayini

Hücre dışı lakkaz enziminin kalitatif tayininde inkübasyonu müteakip guakolü oksitleyen izolatların çevresinde kahverengi renkte halelerin varlığı, lakkaz enzimi üretimi yönünden, pozitif olarak değerlendirilmektedir (Devasia ve Nair, 2016; Viswanath ve diğ., 2008). Bu tez çalışmasında lakkaz enzimini literatürden edinilen bilgiye göre *T. versicolor*'dan üretilmesi hedeflendi. Buradan yola çıkarak *T. versicolor*'un lakkaz üretimini kalitatif olarak gözlemlemek üzere gerçekleştirilen deneyde Şekil 4.1'de gösterildiği gibi izolatın hücre dışı lakkaz enzimini ürettiği tespit edildi.

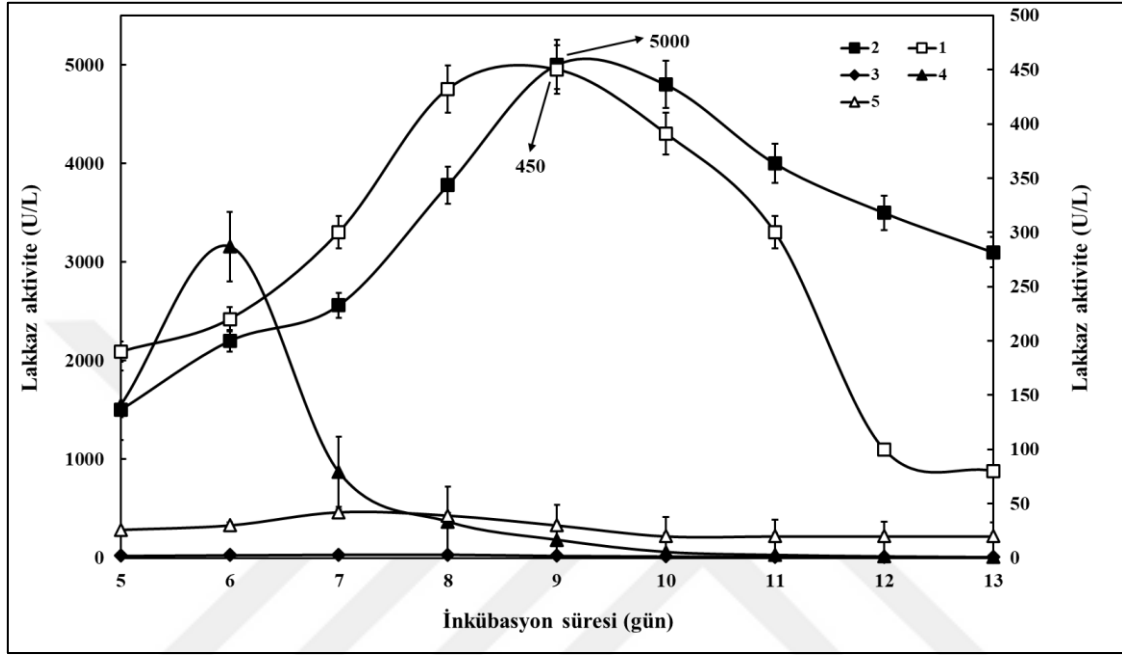


Şekil 4.1. Guakol (5 mM) içeren ortamda kalitatif lakkaz tayini. (a): negatif kontrol, (b): *T. versicolor*

4.2. Lakkazın *T. versicolor*'dan Üretimi

Lakkaz enziminin optimum üretimi için literatürden yapılan araştırma neticesinde 5 farklı besi yeri seçildi (Tablo 3.1). Şekil 4.2'de gösterildiği gibi 2 numaralı inkübasyon koşulunda ölçülen lakkaz aktivite değerinin diğer koşullarla karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu gözlemlendi. Sonrasında sırayla 1, 4, 5 ve 3 numaralı inkübasyon ortamları gelmektedir. Her bir inkübasyon ortam sürecinde optimum ölçülen lakkaz aktivite değerlerinin farklı inkübasyon sürelerinde gözlemlendiği tespit edildi. Örneğin 1 ve 2 nolu ortamlarda enzim optimum aktivite değerine 9. günde erişirken 4, 5 ve 3 nolu ortamlarda sırasıyla 6., 7. ve 8. günde eriştikleri belirlendi. *T. versicolor*'dan optimum lakkaz üretimi için gerçekleştirilen çalışmalarda inkübasyon süresinin 5 ila 20 güne kadar değişiklik gösterdiği rapor edilmiştir (Göksel, 2007; Risdianto ve diğ., 2012; Wang ve diğ., 2014). İnkübasyon süresindeki değişken durumun kullanılan besiyeri başta olmak

üzere indükleyiciler, havalandırma, fermentasyon çeşidi (katı faz veya sıvı) ve inokulum kaynağının yaşına bağlı olduğu görülmektedir. Bulgular da benzer şekilde *T. versicolor* izolatının farklı büyüme ortamlarında farklı sürelerde lakkazı optimum seviyede ürettiğini göstermektedir.



Şekil 4.2. Farklı inkübasyon ortamlarında (no 1-5, Tablo 3.1) büyütülen *T. versicolor*'un fermentasyon sıvısında ölçülen lakkaz aktivite grafiği

En yüksek lakkaz aktivitesi (5000 U/L), yukarıda da belirtildiği gibi 2 numaralı inkübasyon ortamında 9.günde ölçüldü. Literatürde *T. versicolor* lakkazı için rapor edilen aktivite değerleri ile karşılaştırıldığında bu çalışmada daha yüksek enzim aktivite değerine ulaşıldığı görülmektedir. Örneğin, Abd El Monssef ve diğ., (2016) gerçekleştirdiği çalışmada lakkaz aktivite değerini 1896 U/L olarak verirken Pazarlıoğlu ve diğ., (2005) tarafından yürütülen çalışmada 2575 U/L olarak sunulmuştur.

En yüksek lakkaz üretiminin (5000 U/L), 25 g/L malt özütü, 2 g/L KH_2PO_4 , 0,4 g/L K_2HPO_4 içeren besiyerinde 30 °C ve 200 rpm çalkalama hızında 9 gün boyunca büyütülen *T. versicolor*'dan gerçekleşmesi sebebiyle enzim saflaştırma denemelerinde bu inkübasyon ortamı kullanıldı.

4.3. Lakkazın Saflaştırılması

Fermentasyon sıvısından lakkaz enziminin saflaştırılmasında biyomoleküllerin tek bir adımda hızlı ve verimli saflaştırılmasını sağlayan ÜFA yöntemi kullanıldı. ÜFA'nın lakkaz saflaştırılması için en uygun teknik olmasının sebepleri arasında sistem kullanımının kolay olması, çevre dostu olması ve kromatografi tekniğine kıyasla daha az çözücüye ihtiyaç duyması sayılabilir (Dennison ve Lovrien, 1997).

Enzim saflaştırma işleminin maksimum verimde gerçekleşmesi için amonyum sülfat konsantrasyonu, ham ekstrakt:t-bütanol oranı ve sistem pH'sı gibi ÜFA parametreleri optimize edildi. Bunun sonucunda, %20 (a/a) amonyum sülfat ve 2,0:1,0 oranında t-bütanol içeren ortamdan lakkaz enzimi alt fazda %204 verimle 2,3-kat saflaştırıldı (Tablo 4.1). ÜFA sistemlerinde enzim aktivasyonuna rastlanabilmektedir. Örneğin, peroksidaz, proteinaz K ve tripsin inhibitör gibi proteinlerin sulu üçlü-faz sistemlerinden saflaştırılmaları sırasında katalitik aktivitelerinde artış gözlenmiştir (Karakuş ve diğ., 2018; Wati ve diğ., 2009). Bu durumun saflaştırma sırasında enzim molekülünün esnekliğinde oluşabilecek artışla bağlantılı olabileceği düşünülmektedir (Duman ve Kaya, 2013; Gagaoua ve diğ., 2015).

Tablo 4.1. ÜFA sistemiyle lakkaz enziminin saflaştırma bulguları

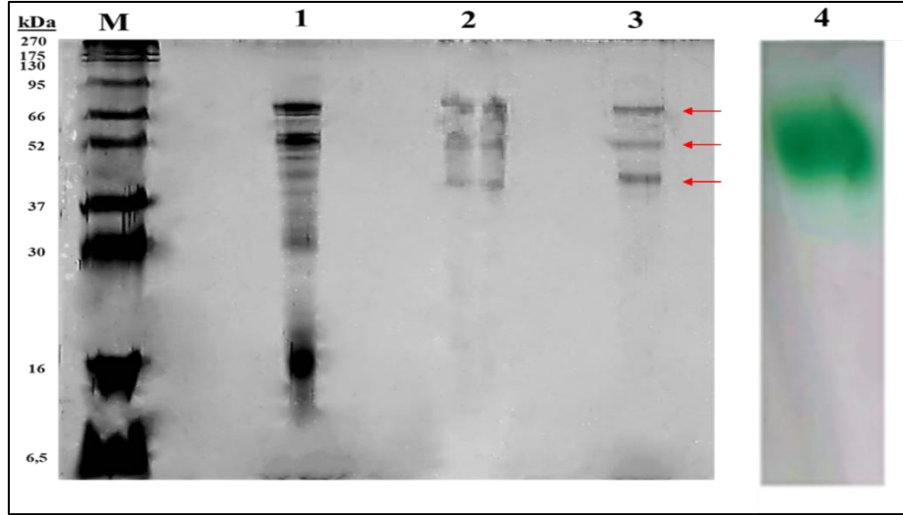
Sistem kompozisyonu	SA (U/g)	SK	G.K (%)
%20 AS 2,0:1,0 HE:BUT	3580±0,5	2,3±0,1	204±10
%20 AS 1,0:1,0 HE:BUT	2942±0,3	1,8±0,1	152±8
%30 AS 2,0:1,0 HE:BUT	2207±0,7	1,4±0,2	111±4
%30 AS 1,0:1,0 HE:BUT	429±0,5	0,3±0,02	18±0,6
%40 AS 2,0:1,0 HE:BUT	310±0,2	0,02±0	1,5±0,1
%40 AS 1,0:1,0 HE:BUT	60±0,8	0,01±0	0,2±0,01
%50 AS 2,0:1,0 HE:BUT	290±0,1	0,02±0	1,4±0,06
%50 AS 1,0:1,0 HE:BUT	1450±0,1	0,9±0,04	50±2
%60 AS 2,0:1,0 HE:BUT	300±0,4	0,02±0	1,4±0,05
%60 AS 1,0:2,0 HE:BUT	830±0,4	0,05±0	3,1±0,1

AS: Amonyum sülfat, HE: ham ekstrakt, BUT: t-bütanol, SA: spesifik aktivite, SK: saflaştırma katsayısı, GK: alt fazda ölçülen verim (Ham ekstrakt SA değeri: 7194 U/mg)

Literatürde ÜFA kullanarak başarılı bir şekilde saflaştırılan enzimler üzerine çok sayıda benzer rapor bulunmaktadır (Birge ve diğ., 2022; Kumar ve diğ., 2012; Patil ve Yadav, 2017; Wasak ve diğ., 2018). Genel olarak, ÜFA sistemi ile hedef proteinler kromatografik tekniklere oranla daha düşük saflaştırma katsayıları ile saflaştırılmasına rağmen proteinin sistemden geri kazanımı her zaman kromatografik tekniklerden daha yüksektir. Sistemin kolay uygulanabilirliği, ucuz olması ve düşük protein kaybına sebep olması gibi avantajları ÜFA sistemlerini endüstriyel enzimler için ideal hale getirmektedir (Dennison ve Lovrien, 1997). Diğer taraftan, lakkaz enziminin ÜFA ile saflaştırılmasına yönelik literatür çalışması sınırlıdır. Wasak ve diğ., (2018) çalışmasında *T. versicolor* lakkazını %73 geri kazanımla 24 kat saflaştırmıştır. Patil ve Yadav., (2017) *T. hirsute* ile yaptıkları bir çalışmada ÜFA'yi mikrodalga kullanarak denemişler ve lakkaz enzimini %53,9 geri kazanımla saflaştırmışlardır. Birge ve diğ., (2022) *Enterobacter faecium* A2 izolatından lakkaz enzimini %110 verimle 4,9-kat saflaştırdıklarını rapor etmişlerdir. Kumar ve diğ., (2012) ise *Pleurotus ostreatus*'tan lakkazı %161 verimle 27,8 kat saflaştırdıklarını beyan etmişlerdir.

4.4. Elektroforez Bulguları

ÜFA sisteminden alt fazda saflaştırılan lakkaz enziminin saflığını kontrol etmek ve moleküler ağırlığını belirlemek için SDS-PAGE analizi yapıldı. Şekil 4.2'de gösterildiği gibi 66, 52 ve 43 kDa'ya karşılık gelen üç bant gözlemlendi. Literatürde ise SDS-PAGE'de lakkaz enzimi için genelde 66-97 kDa arasında değişen tek bantın varlığı belirtilmektedir. Örneğin, *Pleurotus ferulae* (Ding ve diğ., 2014), *P. ostreatus* (Patel ve diğ., 2014b), *T. versicolor* (Han ve diğ., 2005) ve *Fomes durissimus*'tan (Shay ve diğ., 2011) izole edilen lakkaz enzimlerinin moleküler ağırlığı değerleri sırasıyla 66, 68, 97 ve 75 kDa olarak rapor edilmiştir. Literatürden farklı bir bulgu elde edilmesi üzerine pozitif kontrol olarak ticari lakkaz (*T. versicolor* lakkaz, 1.10.3.2) enzimi kullanarak SDS-PAGE analizi tekrar edildi ve ticari lakkazın bu çalışmada ÜFA ile izole edilen örneklerle benzer bant profili gösterdiği tespit edildi (Şekil 4.3). Ayrıca lakkaz örneğini diğer analizlerde kullanmadan önce doğal poliakrilamid jel elektroforezi de gerçekleştirildi ve literatüre (Patel ve diğ., 2014b) benzer şekilde yeşil renkte tek bir bant gözlemlendi (Şekil 4.3). Buda çalışılan enzimin lakkaz olduğunun bir diğer göstergesi oldu ve bu aşamalardan sonra saflaştırılan enzimin karakterizasyon çalışmaları yapıldı.

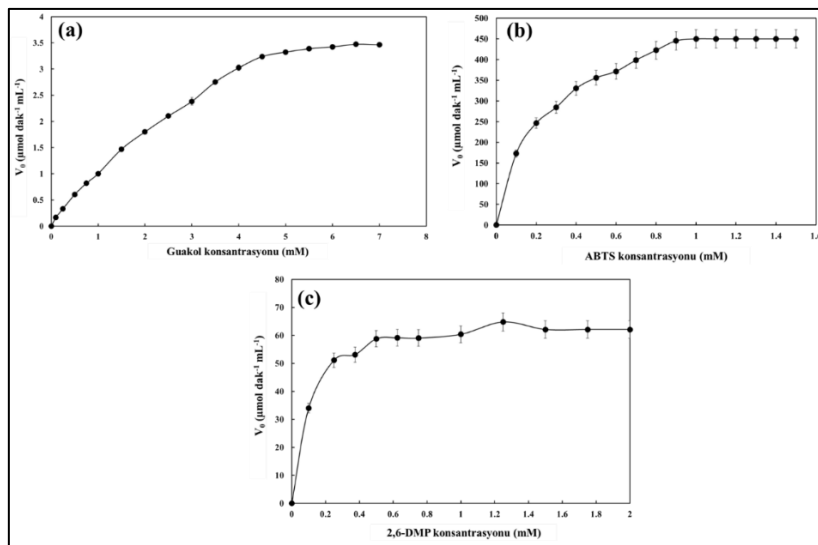


Şekil 4.3. Lakkaz numunelerinin elektroforetik analizi. M: Protein markör (Euro-Lone, EPS026500), 1: Ham ekstrakt örneği, 2: Ticari *T. versicolor* lakkaz, 3: ÜFA alt faz lakkaz örneği, 4: ÜFA alt faz lakkazının ABTS ile aktivite boyaması. 10 µg enzim örneği yüklendi.

4.5. ÜFA ile Saflaştırılan Lakkaz Enziminin Karakterizasyonu

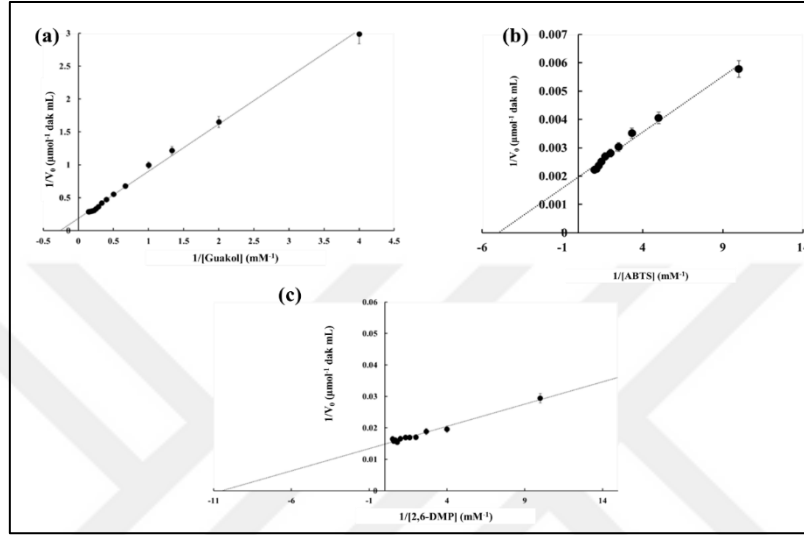
4.5.1. Kinetik Parametreler

T. versicolor lakkazının kinetik parametrelerini hesaplamak üzere kinetik analizler gerçekleştirildi. Substrat olarak guakol (0-7 mM), ABTS (0-1,5 mM) ve 2,6-DMP (0-2 mM) kullanıldı. Bulgular her üç substrat varlığında enzimin Michaelis-Menten kinetiğine uyduğunu gösterdi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Lakkaz enziminin (a) guakol, (b) ABTS ve (c) 2,6-DMP substratlarına ait Michaelis-Menten grafikleri

Şekil 4.4'ten yola çıkarak üç substrat için Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Şekil 4.5) ve K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı. Buna göre guakol için K_m 3,8 mM, V_{max} değeri 5,3 $\mu\text{mol dak}^{-1} \text{mL}^{-1}$, 2,6-DMP için K_m değeri 0,1 mM, V_{max} değeri 68,4 $\mu\text{mol dak}^{-1} \text{mL}^{-1}$ ve ABTS için K_m değeri 0,2 mM, V_{max} değeri 500 $\mu\text{mol dak}^{-1} \text{mL}^{-1}$ olarak belirlendi (Tablo 4.2).



Şekil 4.5. Lakkaz enziminin (a) guakol, (b) ABTS ve (c) 2,6-DMP substratlarına ait Lineweaver-Burk grafikleri

Tablo 4.2. ÜFA yöntemiyle saflaştırılan lakkaz enziminin farklı substratlara ait K_m ve V_{max} değerleri

	Guakol	2,6-DMP	ABTS
K_m (mM)	3,8	0,1	0,2
V_{max} ($\mu\text{mol dak}^{-1} \text{mL}^{-1}$)	5,3	68,4	500

Guakol, ABTS ve 2,6-DMP için hesaplanan kinetik parametreleri literatürde ticari *T. versicolor* lakkazı başta olmak üzere farklı mantarlardan izole edilen lakkaz enzimleri için rapor edilen değerler ile karşılaştırıldı. Pazarlıoğlu ve diğ., (2005), ticari lakkazı kullanarak yaptıkları çalışmada ABTS için K_m ve V_{max} değerlerini sırasıyla 0,57 mM ve 333 U/L olarak belirlemişlerdir. Bu çalışmada ise K_m değeri daha düşük (ABTS'e daha yüksek ilgi gösteren) V_{max} değeri ise daha yüksek bir değerde hesaplandı. Chakroun ve diğ., (2010), *Trichoderma atroviride* lakkazının ABTS için K_m değerini 2,5 mM, V_{max} değerini 870 mU μg^{-1} olarak vermişlerdir. Patel ve diğ., (2014b), *Pleurotus ostreatus* HP-1 lakkazının K_m değerini ABTS için 46,55 mM olarak hesaplamışlardır. Vantamuri ve

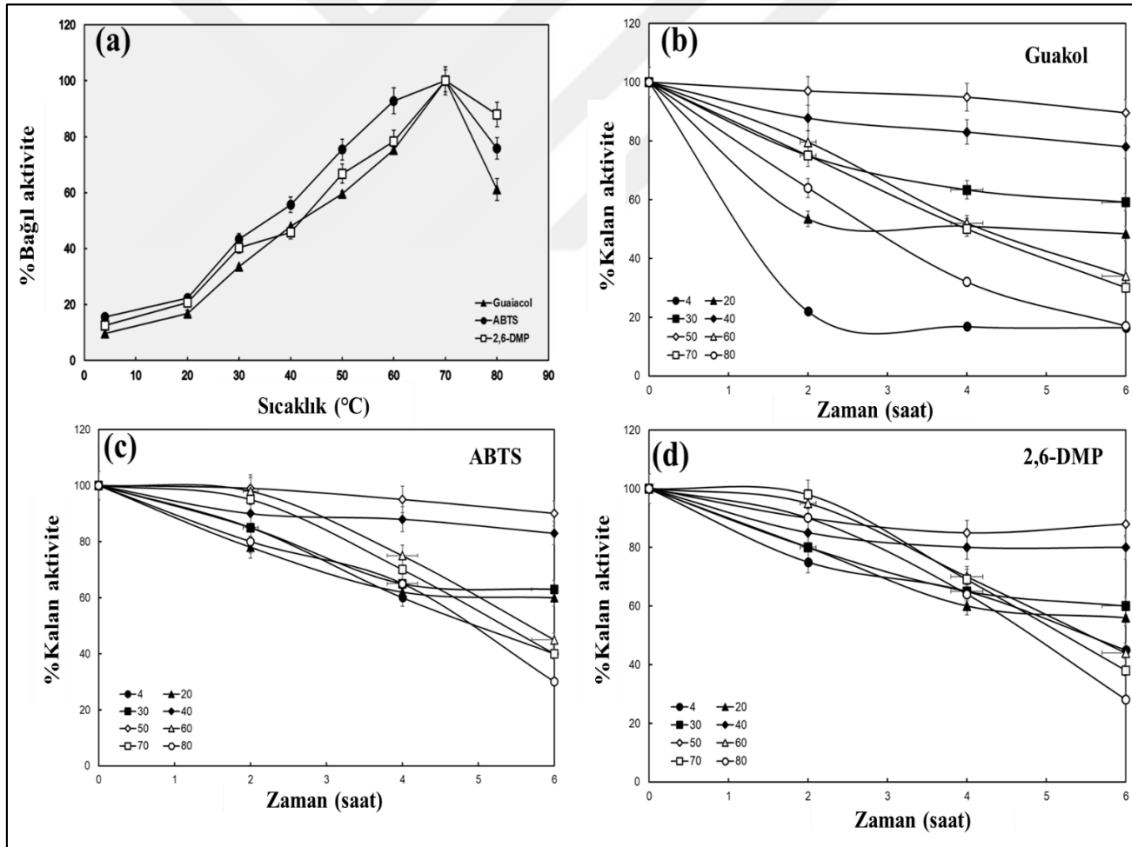
Kaliwal, (2016) *Marasmius sp.* BBKAV79 lakkazının ABTS için K_m değerini 3,03 mM, V_{max} değerini 5 $\mu\text{mol/dak}$ olarak rapor etmişlerdir. Younes ve diğ., (2007) ise *Perenniporia tephropora* lakkazının ABTS için K_m değerini 0,4 mM, V_{max} değeri 391 $\mu\text{mol}^{-1} \text{min}^{-1}$ olarak vermişlerdir. Buna göre, rapor edilen tüm lakkazlar içinde en düşük K_m değerine sahip olan bu çalışmada saflaştırdığımız lakkaz enzimidir. Diğer taraftan guakol için K_m değerleri *Ganoderma leucocontextum* (1,658 mM, Umar ve Ahmad, 2022) ve *Pleurotus ostreatus* HP-1'den (100 mM, Patel ve diğ., 2014b) izole edilen lakkazlarda da rapor edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan lakkaz enziminin K_m değeri *G. leucocontextum* daha yüksek ancak *P. ostreatus* HP-1'den daha düşüktür. Son olarak 2,6-DMP için K_m değerleri *T. atroviride* (1,6 mM, Chakroun ve diğ., 2010), *Ganoderma lucidum* 77002 (0,12 mM, Fang ve diğ., 2015), *P. ostreatus* HP-1 (400 mM, Patel ve diğ., 2014b), *P. tephropora*'dan (7,3 mM, Younes ve diğ., 2007) izole edilen lakkazlarda rapor edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan lakkaz enziminin 2,6-DMP için K_m değeri, rapor edilen tüm lakkazlar içinde en düşük K_m değerine sahiptir. Bu da mevcut çalışmadaki lakkazın rapor edilen lakkazlara kıyasla 2,6-DMP substratına karşı afinitesinin daha yüksek olduğunu gösterdi.

Mantar kökenli lakkazların K_m ve V_{max} değerleri substrata bağlı olarak değişmektedir. Optimum koşullarda üretilen ve ÜFA yöntemiyle saflaştırılan *T. versicolor* lakkazının 3 farklı substrat için belirlenen K_m değerlerine göre afinitesi 2,6-DMP>ABTS>Guakol, V_{max} değerleri ise ABTS>2,6-DMP>Guakol olarak belirlendi. Her üç substrat için literatürdeki K_m ve V_{max} değerleri karşılaştırıldığında afinitenin oldukça yüksek olduğu görülmektedir.

4.5.2. Sıcaklığın Lakkaz Aktivitesi ve Kararlılığı Üzerine Etkisi

T. versicolor'dan izole edilen lakkaz enziminin sıcaklık profili 4 ile 80 °C arasında ABTS, guakol ve 2,6-DMP varlığında ölçüldü. Şekil 4.6(a), test edilen tüm substratlar için optimum sıcaklığın 70 °C olduğunu göstermektedir. Yüksek sıcaklık değerlerinde gözlenen optimum aktivite lakkaz enzimine endüstriyel uygulamalarda avantaj kazandırmaktadır (Daassi ve Alharbi, 2023). Literatürde yer alan farklı lakkaz enzimine ait optimum sıcaklık değerleri şu şekildedir: *T. versicolor* FPRL 28A IMI lakkazı (ABTS ile 35 °C; Pazarlıoğlu ve diğ., 2005), *Trichoderma harzianum* lakkazı (Guakol ile 35 °C; Abd El Monssef ve diğ., 2016), *Marasmius* lakkazı (Guakol ile 40 °C; Vantamuri ve

Kaliwal, 2016), *T. versicolor* ticari lakkazı (2,6-DMP ile 40 °C; Saoudi ve Ghaouar, 2019), *Coriolus hirsutus* lakkazı (45 °C; ABTS; Shin ve diğ., 2000), *Trichoderma atroviride* lakkazı (2,6-DMP ile 50 °C; Chakroun ve diğ., 2010), *Cerrena sp.* lakkazı (ABTS ile 55 °C; Yang ve diğ., 2015), *Aspergillus niger* ticari lakkazı (ABTS ile 60-70 °C; Pazarlıoğlu ve diğ., 2005) ve *Scytalidium thermophilum* lakkazı (2,6- ile 80 °C) DMP; Younes ve Sayadi, 2011). Bu çalışmada ve diğer çalışmalarda elde edilen sonuçlara göre elde edilen farklı sıcaklık değerlerinin kullanılan enzim kaynağına ve substrata göre değiştiği görülmektedir. Genel olarak, lakkaz aktivitesi için optimum sıcaklık, bir suştan diğerine farklılık gösterebilir ve çoğu mantar lakkazının aralığı 50–70 °C olarak bildirilmektedir (El-Batal ve diğ., 2015). Bu durum lakkazın kullanımının, daha yüksek reaksiyon hızları ve daha düşük enzim inaktivasyonu riskleriyle birlikte yüksek proses sıcaklıklarına izin verebileceğine işaret etmektedir (Bertrand ve diğ., 2015).



Şekil 4.6. Sıcaklığın lakkaz aktivitesi (a) ve stabilitesi (b, c & d) üzerine etkisinin farklı substratlar varlığında ölçülen grafikleri

Enzimin sıcaklık kararlılığı incelendiğinde, 40 °C ve 50 °C'de 6 saate kadar tüm substratları aktif olarak oksitleyebildiği görüldü. 40°C'de altı saatlik ön inkübasyondan

sonra, guakol, ABTS ve 2,6-DMP varlığında ölçülen lakkaz aktivitesi, başlangıç aktivitesinin sırasıyla %78 (Şekil 4.6b), %83 (Şekil 4.6c) ve %80'ini (Şekil 4.6d) koruduğu belirlendi. 50 °C'de bu değerler sırasıyla %89, %90 ve %88'e yükseldi. 50°C'nin altındaki sıcaklıklarda, aktivitedeki düşüş aşamalı gerçekleşerek düşük sıcaklıklarda daha büyük kayıplar gözlemlendi ve bu kayıplar sıcaklık arttıkça kademeli olarak azaldı. Guakol oksidasyonundaki en yüksek kayıp (%84), 4 °C'de 6 saat ön inkübasyona tabi tutulan enzim çözeltisinde gözlemlendi (Şekil 4.6b). 50 °C'nin üzerinde, özellikle 60 ve 70 °C'de, ABTS ve 2,6-DMP varlığında, dört saatlik bir inkübasyondan sonra orijinal enzim aktivitesinin yaklaşık %70-75'i korunduğu belirlendi (Şekil 4.6c&d). 80 °C'de dört saatlik inkübasyondan sonra, ABTS ve 2,6-DMP ile ölçülen aktivitenin yaklaşık %65'i başlangıçtaki aktiviteye kıyasla korunurken, altı saat sonra aktivitedeki düşüşte değer olup yaklaşık %70'e ulaştı. Genel olarak, guakol varlığında ölçülen aktivite değerlerinin ABTS ve 2,6-DMP'den daha düşük olduğu gözlemlendi (Şekil 4.6).

Farklı kaynaklardan izole edilen lakkaz enzimleriyle yapılan çalışmalarda genelde enzim aktivitesinde 50 °C üzerinde başlangıç aktivitesine göre %70 oranında düşüş gözlemlendiği rapor edilmiştir (Chen ve diğ., 2016; Han ve diğ., 2005). Palonen ve diğ. (2003) ile Xu ve diğ. (1996), lakkazların genel olarak 30 ila 50 °C arasındaki sıcaklıklara dayanabildiğini ancak 60 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda aktivitelerinin hızla azaldığını vurgulamışlardır. Bu görüşe benzer şekilde, *Trichoderma atroviride* lakkazı 40 °C'de başlangıç aktivitesinin %80'ini korurken, 50 °C ve üzerinde %50'sini kaybetmektedir (Chakraborty ve diğ., 2010). *Pleurotus ostreatus* HP-1'in lakkazının 70 °C'de aktivitesini tamamen kaybettiği rapor edilmiştir (Patel ve diğ., 2014b). Benzer şekilde *Agaricus blazei* lakkazının 60 °C'de bir saatlik inkübasyonun ardından aktivitesini tamamen kaybettiği rapor edilmiştir (Ullrich ve diğ., 2005). Bu açıdan bu çalışmada kullanılan lakkaz enziminin literatürdeki örnekler ile karşılaştırıldığında sıcaklığa karşı çok daha dayanıklı bir özellik sergilediği söylenebilir. Çok yüksek sıcaklıklarda lakkaz aktivitesindeki azalma, enzimin iç kısmının aşırı sıcak ortamda tahrip olmasından kaynaklanabilir (El-Batal ve diğ., 2015). Yüksek sıcaklıklarda gözlemlenen optimal aktivite, lakkaz enzimine endüstriyel uygulamalarda avantaj sağlamaktadır (Daassi ve Alharbi, 2023). Termal stabilitede gözlenen farklılıklar kısmen protein molekülündeki disülfid bağlarının sayısına bağlı olabilir. Ayrıca termal ayrışmanın da sıcaklık profiline katkıda bulunabileceği rapor edilmiştir (Xu ve diğ., 1996). Mantar lakkazlarının çoğunluğunun ılıman koşullar altında işlev gördüğü

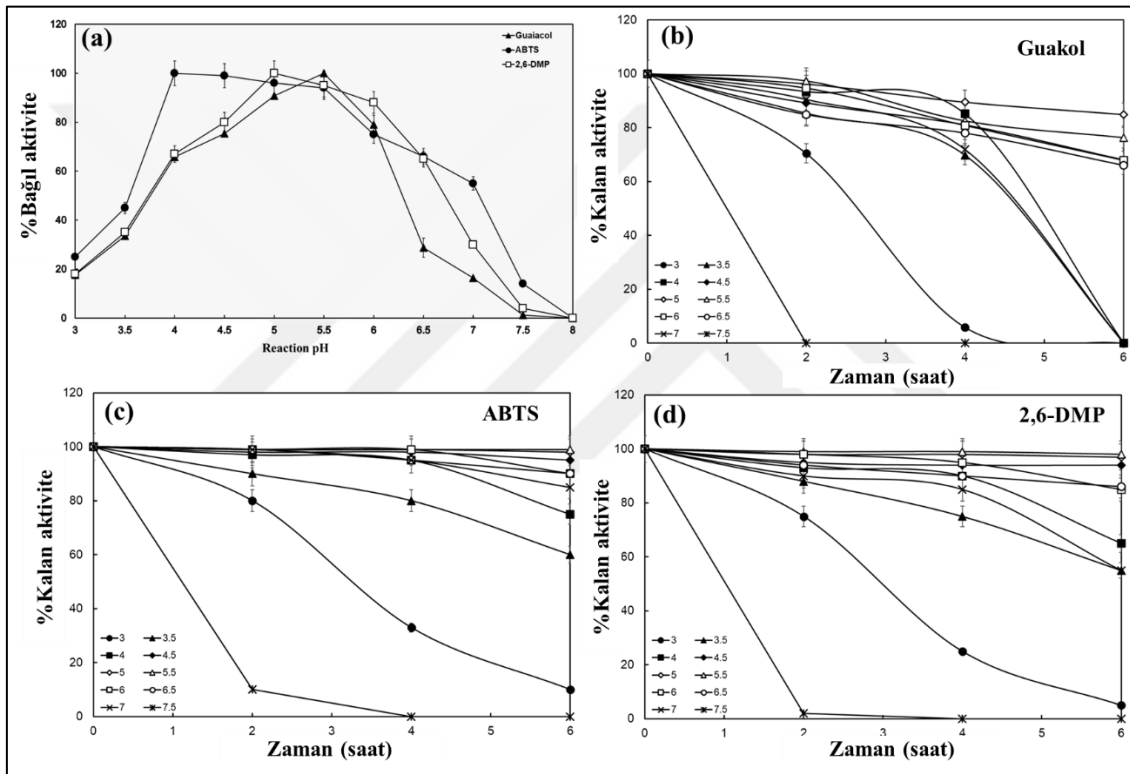
bilinmektedir; daha iyi termostabilite göstermesine ek olarak ölçülen yüksek optimum sıcaklık değerleri lakkaz uygulamaları için yeni potansiyeller barındırmaktadır (Ramírez-Cavazos ve diğ., 2014).

4.5.3. pH'nın Lakkaz Aktivitesi ve Kararlılığı Üzerine Etkisi

T. versicolor'dan ÜFA ile izole edilen lakkaz enziminin pH profili 3,0 ila 8,0 arasında analiz edildi. Şekil 4.7'a, lakkaz enzimi için optimum pH değerinin deney ortamındaki substrata bağlı olarak değiştiğini göstermektedir. Buna göre, guakol, ABTS ve 2,6-DMP için optimum pH değerleri sırasıyla 5,5, 4,5 ve 5,0 olarak ölçüldü (Şekil 4.7a). pH 3,0, 3,5, 7,0 ve 7,5'te tüm substratlar için lakkaz aktivitesinde %45 ile %96 arasında bir azalma gözlenirken, pH 8'de aktivite tamamen kaybolduğu belirlendi.

Optimum pH değerleri farklı fungal lakkaz örnekleri ile yapılan çalışmalarda değişiklik göstermektedir. Örneğin, *T. versicolor* IBL-04 lakkazının optimal pH değeri 5,0 (ABTS; Asgher ve diğ., 2017), *T. versicolor* FPRL 28A IMI lakkazına yönelik optimal pH 4,5 (ABTS; Pazarlıoğlu ve diğ., 2005), *Trichoderma harzianum* lakkazına yönelik pH 5,0 (Guakol; Abd El Monssef ve diğ., 2016), *Marasmius* lakkazı için pH 5,5 (Guakol; Vantamuri ve Kaliwal, 2016), *T. versicolor*'un ticari lakkazı için pH 4,0 (2,6-DMP; Saoudi ve Ghaouar, 2019), *Coriolus hirsutus* lakkaz için iki farklı pH değeri, pH 2,5 (ABTS) ve 4,0 (2,6-DMP) (Shin ve diğ., 2000), *Trichoderma atroviride* lakkazı için pH 3,0 (ABTS) ve pH 5,0 (2,6-DMP) (Chakroun ve diğ., 2010), *Cerrena sp.* lakkazı için pH 3,5 (ABTS; Yang ve diğ., 2015), *Aspergillus niger* ticari lakkazı için pH 5,5 (ABTS; Pazarlıoğlu ve diğ., 2005), *Scytalidium thermophilum* lakkazı için pH 5,0 (ABTS ve 2,6-DMP) ve pH 6,0 (Guakol) (Younes ve Sayadi, 2011), *Pleurotus ostreatus* HP-1 lakkaz için pH 4,5 (ABTS), pH 3,5 (2,6-DMP) ve pH 5,5 (Guakol) (Patel ve diğ., 2014b) ve *Agaricus blazei* lakkazı için pH 5,5 (2,6-DMP; Ullrich ve diğ., 2005) olarak rapor edilmiştir. Mantar lakkazları, substrat olarak hidrojen atomlarının organik vericileri kullanıldığında 3,5 ile 5,0 arasındaki pH aralığında sıklıkla daha yüksek aktivite gösterirler (Baldrian, 2005; Kwang-Soo ve Chang-Jin, 1998). Artan pH değerlerinde ise aktivitede düşüş eğilimi görülmektedir. Bu durum pH'ın artmasıyla substratların çözelti iyonizasyonunun önemli ölçüde azalmasından kaynaklanmaktadır. Buna ek olarak nötr/alkali pH'ta lakkaz aktivitesindeki azalma, bir hidroksit anyonunun lakkazın T2/T3 bakırlarına bağlanması ve T1'den T2/T3 merkezlerine dahili elektron transferini bozarak enzimi inhibe

etmesinden kaynaklanabilir (Xu, 1997). Farklı substratlara dair örneklere bakılacak olursa optimum pH'ta gözlenen farklılık, mantar lakkazları için yaygın bir durumdur. Farklı substratların varlığında enzim tarafından gerçekleştirilen oksidasyon reaksiyonlarında farklılıklar olur. Bunun nedeni mekanizmanın substrattan bir elektronun veya hidrojenin çıkarılmasını içermesidir. Özellikle hidrojenin uzaklaştırılması ortamın pH değerindeki değişiklikten etkilenir. Aynı zamanda lakkazın gerçekleştirdiği reaksiyon substratın redoks potansiyeline de bağlıdır (Majcherzyk ve diğ., 1999; Younes ve Sayadi, 2011).



Şekil 4.7. pH'nın lakkaz aktivitesi (a) ve stabilitesi (b, c & d)üzerine etkisinin farklı substratlar varlığında ölçülen grafikleri

T. versicolor lakkaz ile farklı pH değerlerinde yapılan stabilite deneyleri, enzimin 3,5 ila 7,0 pH değerlerinde 6 saate kadar orijinal aktivitesini koruduğunu göstermektedir. pH 7,5'te neredeyse tüm aktivite kaybolmaktadır (Şekil 4.7b, c&d). Başka bir deyişle, enzim alkali koşullar altında tamamen inhibe olmakta, ancak hafif asidik ve nötr pH değerlerinde aktivitesini açıkça koruyabilmektedir. Örneğin, 6 saatlik inkübasyondan sonra, 4,0 ila 7,0 pH değerlerinde aktivitenin %75'inden fazlası korunmaktadır (Şekil 4.7c). Asidik koşullar altında kararlılık fungal lakkazlar için çok yaygın değildir. Çoğu fungal lakkaz enzimi pH

5'in üzerinde kararlılık gösterir (Younes ve diğ., 2001). Örneğin, *P. ostreatus*, *Melanocarpus albomyces*, *Perenniporia tephropora* ve *P. erengii*'den izole edilen lakkazlar genellikle alkali pH aralığında yüksek stabilite gösterdikleri tespit edilmiştir (Chakroun ve diğ., 2010).

4.5.4. İnhibitör ve Metal İyonlarının Lakkaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

ÜFA ile izole edilen *T. versicolor* lakkazın aktivitesi, potansiyel lakkaz veya oksidaz inhibitörleri olarak bilinen bileşiklerin varlığında araştırıldı. Tablo 4.3'te gösterildiği gibi β -Merkaptoetanol, 1 mM ve 5 mM konsantrasyon seviyelerinde tamamen aktivite kaybına neden oldu. Test edilen diğer inhibitörlerden EDTA 5 mM konsantrasyonda yaklaşık %25'lik bir azalmaya neden olurken, PMSF aynı konsantrasyonda %66'lık bir azalmaya neden oldu. Buna göre bu çalışmada kullanılan *T. versicolor* lakkazının EDTA'ya karşı dirençli β -Merkaptoetanole karşı ise oldukça duyarlı olduğu söylenebilir.

Chakraun ve diğ., (2010) tarafından yapılan çalışmada *T. atroviride* lakkazının 5 mM EDTA konsantrasyonunda aktivitesinde %81 oranında düşüş gözlemlendiği rapor edilmiştir. Bir metal şelatlama ajanı olan EDTA, çoğu lakkazda düşük düzeyde inhibisyona neden olmaktadır (Patel ve diğ., 2014b). PMSF varlığında gözlemlenen düşük inhibisyon seviyesi, enzimin aktif bölgesinde serin içermediğini göstermektedir (Vantamuri ve Kaliwal, 2016). Sülfidril içeren bileşik olan β -merkaptoetanolün de bir lakkaz inhibitörü olduğu bilinmektedir (Kiiskinen ve diğ., 2002). Sülfidril içeren bileşiklerin varlığında gözlemlenen inhibisyonun, enzimin inhibisyonundan ziyade oksidatif substrat azalması sonucu ürün oluşumunun inhibisyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir (Johannes ve Majcherczyk, 2000).

Tablo 4.3. İnhibitörlerin *T. versicolor* lakkaz enzimi üzerindeki etkisi

İnhibitör	Konsantrasyon (mM)	Kalan Aktivite (%)
β -Merkaptoetanol	1	0
	5	0
EDTA	1	75 $\pm$ 0,6
	5	73 $\pm$ 0,2
PMSF	1	45 $\pm$ 0,02
	5	34 $\pm$ 0,1

Metal iyonlarının etkisi incelendiğinde Tablo 4.4'e göre MnSO_4 ve NiSO_4 *T. versicolor* lakkazı üzerinde aktiviteyi arttıran özellik sergilerken MgSO_4 ve CuSO_4 aktiviteyi önemli ölçüde etkilememektedir. Diğer taraftan KCl , NaCl , FeSO_4 ve CaCl_2 enzim aktivitesi üzerinde inhibe edici etki göstermektedir. Bunlardan özellikle FeSO_4 'ün etkisi yıkıcıdır; aktiviteyi tamamen inhibe etmektedir. Ancak KCl , NaCl ve CaCl_2 , 0,1 mM konsantrasyonda enzimin sadece %20'nin altında kaybına sebep olmaktadır.

Endüstriyel uygulamalarda metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerindeki etkisi oldukça dikkate alınır, çünkü bazı metal iyonları enzim aktivitesi üzerinde hem uyarıcı hem de inhibitör etkiye sahiptir (Park ve Park, 2014). Genel olarak ağır metaller yaygın çevresel kirleticilerdir ve enzimlerin üretimini ve stabilitesini etkileyebilirler (Murugesan ve diğ., 2009). Metallerin lakkaz aktivitesi üzerindeki etkisinin araştırılması ve lakkazın farklı metalleri tolere etme yeteneğinin değerlendirilmesi çok önemlidir. Lakkaz aktivitesi için metal iyonlarının aktivasyon/stimülasyon etkisi, olumlu konformasyonel değişikliklere bağlı olabilir (Jaiswal ve diğ., 2016). Lakkaz enziminin katalitik bölgesinin, substratların elektronik oksidasyonunu gerçekleştirmek için gerekli olan dört bakır atomunu içerdiği rapor edilmiştir (Frasconi ve diğ., 2010). Bununla birlikte, elektronların uygun transferi ve/veya substrata sınırlı erişim, lakkaz aktivitesinde azalmaya neden olabilmektedir (Fang ve diğ., 2012). Cu^{+2} tarafından lakkazın aktivitesinin uyarılması, bakır bağlama bölgelerinin Cu^{+2} metal iyonları ile doldurulmasından kaynaklanabilir (Sadhasivam ve diğ., 2008). Lakkaz aktivitesinin daha yüksek Cu^{+2} seviyesinde aktivasyonu, bu konsantrasyonda enzimin tip 2 (T2) bakır bağlama bölgelerinin Cu^{+2} ile doygunluğuna bağlı olabilir (Sadhasivam ve diğ., 2008). Beyaz çürükçül mantar lakkazları çoklu bakır içeren oksidazlar olduğundan, bakır iyonları lakkaz aktiviteleri üzerinde çeşitli (pozitif, negatif veya nötr) etkiler gösterirler (Wanga ve diğ., 2017). Buna karşılık Zhou ve diğ., (2010) Cu^{+2} ile muamele sonucu *Odontotermes formosanus*'tan lakkazının inhibe olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte, bakır iyonlarının *Cerrena sp.* HYB07 (Yan ve diğ., 2014) ve *Clitocybe maxima* (Zhang ve diğ., 2010) 'den elde edilen lakkazlar üzerinde herhangi bir etkisi olmamıştır. Ayrıca *Trametes polyzona* WRF03 lakkaz aktivitesi, Ca^{+2} , Co^{+2} , Hg^{+2} , Ba^{2+} ve Fe^{+2} gibi metalik klorürlerdeki metal iyonlarının konsantrasyonunun artmasıyla inhibe olmuştur (Ezike ve diğ., 2020). *Myrothecium verrucaria* NF-05 lakkaz aktivitesi de yine aynı şekilde artan konsantrasyonlarda inhibe olmuştur (Zhao ve diğ., 2012). *Trametes polyzona* WR710-1 lakkazı 1 mM FeSO_4 ile ancak %6,8 geri kazanım

elde edebilmiştir (Chairin ve diğ., 2012). Bunun nedeninin demir iyonlarının lakkazın elektron taşıma sistemi ile etkileşiminden kaynaklanıyor olabileceği önerilmiştir (Bao ve diğ., 2012; Daâssi ve diğ., 2014; Murugesan ve diğ., 2009). Glac 15 lakkazın aktivite değeri 5 mM Ca^{+2} değerinde %10'a düşerken *T. versicolor* lakkaz için bu oran %8'dir (Fang ve diğ., 2015). *Bacillus sp.* MSK-01 lakkazının 1 ve 5 mM Fe^{+2} konsantrasyonlarında bu çalışmaya benzer şekilde tüm aktivitesini kaybettiği belirtilmiştir (Sondhi ve diğ., 2020).

Tablo 4.4. Metal iyonlarının *T. versicolor* lakkaz enzimi üzerindeki etkisi

	Konsantrasyon (mM)	Kalan Aktivite (%)
KCl	0,1	80±0,6
	1	35±0,1
	5	3±0,03
FeSO ₄	0,1	29±0,1
	1	0
	5	0
CaCl ₂	0,1	82±0,1
	1	20±0,04
	5	3±0,01
ZnSO ₄	0,1	94±0,1
	1	81±0,1
	5	62±0,1
MgSO ₄	0,1	89±0,03
	1	90±0,1
	5	91±0,1
MnSO ₄	0,1	109±0,1
	1	117±0,1
	5	109±1,6
CuSO ₄	0,1	90±0,01
	1	99±0,1
	5	85±0,1
NaCl	0,1	81±0,1
	1	28±0,2
	5	6±0,1
NiSO ₄	0,1	142±1,3
	1	106±0,1
	5	88±0,1

4.5.5. Sürfactanların Lakkaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Tablo 4.5'te bazı sürfactanların *T. versicolor* lakkazı üzerindeki etkileri gösterilmektedir. Buna göre, SDS kuvvetli bir inhibitördür; en düşük konsantrasyonda dahi aktivitenin tamamen kaybolmasına sebep olmuştur. SDS, düşük konsantrasyonlarda bile lakkazların çoğunu etkisiz hale getiren güçlü bir protein denatüranıdır (Gu ve diğ., 2014; Lin ve diğ., 2013; Zhao ve diğ., 2012).

Tablo 4.5'e göre, lakkaz enzimi iyonik olmayan deterjanlara karşı SDS'ye göre daha yüksek stabilite gösterdi. Örneğin, Triton 100, Tween-20 ve Tween-80 sırasıyla %1 konsantrasyonlarda başlangıçtaki aktivitenin %59, %51 ve %50 oranında koruyabildiler. %5'lik konsantrasyonlarda ise sırasıyla %42, %40 ve %30 oranında düşüşlere sebep oldular. Artan konsantrasyonlar lakkaz enzim aktivitesini düşürse de belirli konsantrasyon değerlerinde aktivite varlığı göstermesi çeşitli uygulamalar açısından avantaj olarak görülebilir. Triton X-100 ve Tween-80 gibi iyonik olmayan deterjanlar lakkaz enzimi üzerinde uyarıcı bir etkiye sahip olduğu durumlar da olmaktadır (Gu ve diğ., 2014; Yang ve diğ., 2015). Diğer taraftan, Glac15 lakkazı 5 mM SDS konsantrasyonunda aktivitesinin tamamını kaybederken, başka bir *T. versicolor* izolatına ait lakkazın da bu çalışmaya benzer şekilde %1 konsantrasyonda aktivitesinin tamamını kaybettiği rapor edilmiştir (Fang ve diğ., 2015).

Tablo 4.5. Bazı sürfactanların *T. versicolor* lakkaz enzimi üzerindeki etkisi

	Konsantrasyon (%)	Kalan Aktivite (%)
SDS	1	0
	5	0
Triton 100	1	59±0,04
	5	42±0,02
Tween 20	1	51±0,022
	5	40±0,1
Tween 80	1	50±0,5
	5	30±0,5

4.5.6. Organik Çözücülerin Lakkaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Tablo 4.6'te farklı organik çözücülerin *T. versicolor* lakkaz aktivitesi üzerindeki etkileri gösterilmektedir. Bu deneyde endüstride yaygın olarak kullanılan çözücüler tercih edildi.

Tüm organik çözücüler artan konsantrasyonlarında enzim aktivitesinde azalmaya neden oldu. Buna göre, düşük organik çözücü konsantrasyonuna ihtiyaç duyulan uygulamalar için lakkaz enziminin kullanışlı olacağı öngörülebilir.

Organik çözücüler biyokataliz için yaygın olarak kullanılan önemli susuz ortamlardır (Wang ve diğ., 2016). Bu nedenle, çeşitli organik çözücülerde lakkaz stabilitesinin belirlenmesi, biyokataliz ve biyotransformasyon gibi uygulamalarda reaksiyon ortamının seçimi için yararlı bilgiler sağlayacaktır. Suyla karışabilen solventlere karşı direnç, lakkazın endüstriyel uygulamaları için önemli bir husustur çünkü birçok dönüşüm, yüksek konsantrasyonlarda organik solventlerde gerçekleşir. Lakkazlar genellikle bu bileşiklerin varlığında açılmaya karşı yüksek hassasiyet gösterirler (Al-Adhami ve diğ., 2002). *Trametes polyzona* WRF03'ten elde edilen lakkaz, çeşitli organik çözücülerin 50 mM konsantrasyonunda benzer şekilde aktivitede düşüş göstermiştir (Ezike ve diğ., 2020). *T. polyzona* KU-RNW027 lakkazı ile yapılan çalışmada ise metanol, etanol, izopropanol'ün artan konsantrasyonlarının tümünde aktivitede oldukça yüksek düzeyde düşüşler görülmüştür (Lueangjaroenkita ve diğ., 2019). Enzimlerin suyla karışabilen organik çözücülerde kullanılması, hidrofobik substratların çözünürlüğünün artması veya mikrobiyal kontaminasyonun önlenmesi nedeniyle ürün oluşumunda yüksek verim gibi avantajlar sunmaktadır (Wu ve diğ., 2019). Çeşitli fungal lakkazlar (*Myceliophthora thermophila*, *Agaricus bisporus*, *Cerrena unicolor*, *Pleurotus ostreatus* vb.) ile yapılan çalışmalarda enzimin etanol, aseton, asetonitril veya DMSO varlığında düşük aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Rodakiewicz-Nowak ve Jarosz-Wilkolazka, 2007; Tonin ve diğ., 2016; Zumárraga ve diğ., 2007).

Tablo 4.6. Organik çözücülerin *T. versicolor* lakkaz enzimi üzerindeki etkisi

	Konsantrasyon (mM)	Kalan Aktivite (%)
Kloroform	5	54±0,1
	15	41±0,1
	30	23±0,01
	60	17±0,01
İzopropanol	5	42±0,1
	15	8±0,2
	30	1±0,1
	60	0
Etanol	5	46±0,2

Tablo 4.6. (Devam) Organik çözücülerin *T. versicolor* lakkaz enzimi üzerindeki etkisi

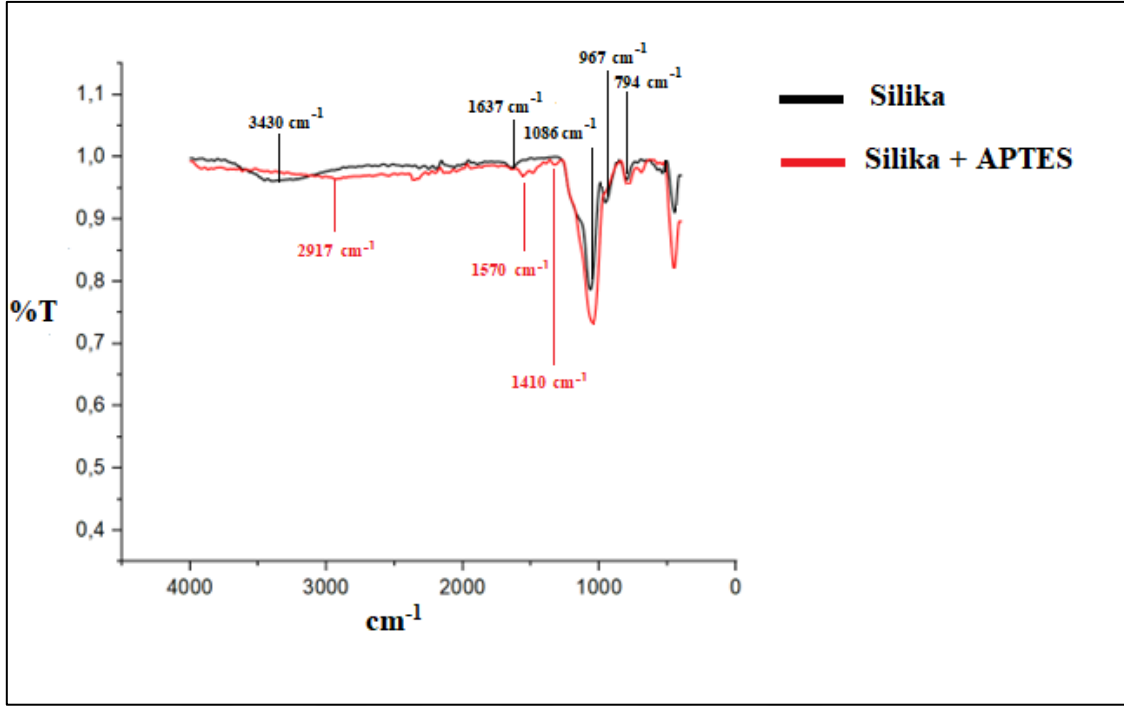
	15	30±0,1
	30	21 ±1
	60	11±0,3
DMSO	5	49±0,1
	15	37±0,1
	30	8±0,3
	60	8±0,1
Metanol	5	71±0,1
	15	42±1
	30	24±0,1
	60	17 ± 2

4.6. Hazırlanan Aerojel Malzemelerinin Karakterizasyonu

4.6.1. Silika Aerojel, Magnezyum Silika Aerojel ve Bakır Silika Aerojellerin 3-(aminopropil)trioksasilan (APTES) ile Yüzey Modifikasyonu (Fonksiyonelleştirilmesi) Sonrası FT-IR Analizi

Silika aerojel, Mg-silika aerojel ve Cu-silika aerojeller, %10 APTES uygulama sonrası FT-IR spektrum analizine tabi tutuldu. Silika aerojel için, 1086 ve 794 cm^{-1} 'deki bantlar (Şekil 4.8), literatürde iyi bilinen sırasıyla silika jelin asimetrik ve simetrik Si-O-Si gerilmesini ifade etmektedir. 967 cm^{-1} 'deki bantlar silanol -OH gruplarına karşılık gelmektedir. Silanol gruplarının -OH gerilme bantları 3430 cm^{-1} seviyesinde gözlemlendi. Havadaki nemin silika aerojel yüzeyine absorplanmasına bağlı olarak görülen 3000 ve 3700 cm^{-1} aralığındaki geniş bir bant O-H hidroksil gruplarının temel gerilme titreşimini ifade eder.

2917 cm^{-1} bölgesinde C-H ve N-H gerilmelerinin karakteristik bantları da gözlenmektedir (Timur ve Demetgül, 2017). 1410 cm^{-1} 'deki bant ise -CH₃ titreşimleri ile uyumlu bantı işaret etmektedir. Aminleme öncesi 3430 cm^{-1} ve 1637 cm^{-1} bantları yüzeye absorbe olmuş su moleküllerini temsil etmektedir (Tiryaki, 2017). Aminleme sonrası silika aerojel FT-IR spektrumunda 1570 cm^{-1} 'de NH₂ bükülmesine ve diğer CH₂'nin gerilme titreşimine denk gelen bant, aminleme sırasında eklenen metil grubu nedeniyle 2917 cm^{-1} 'de ortaya çıkmıştır (He ve diğ., 2017).

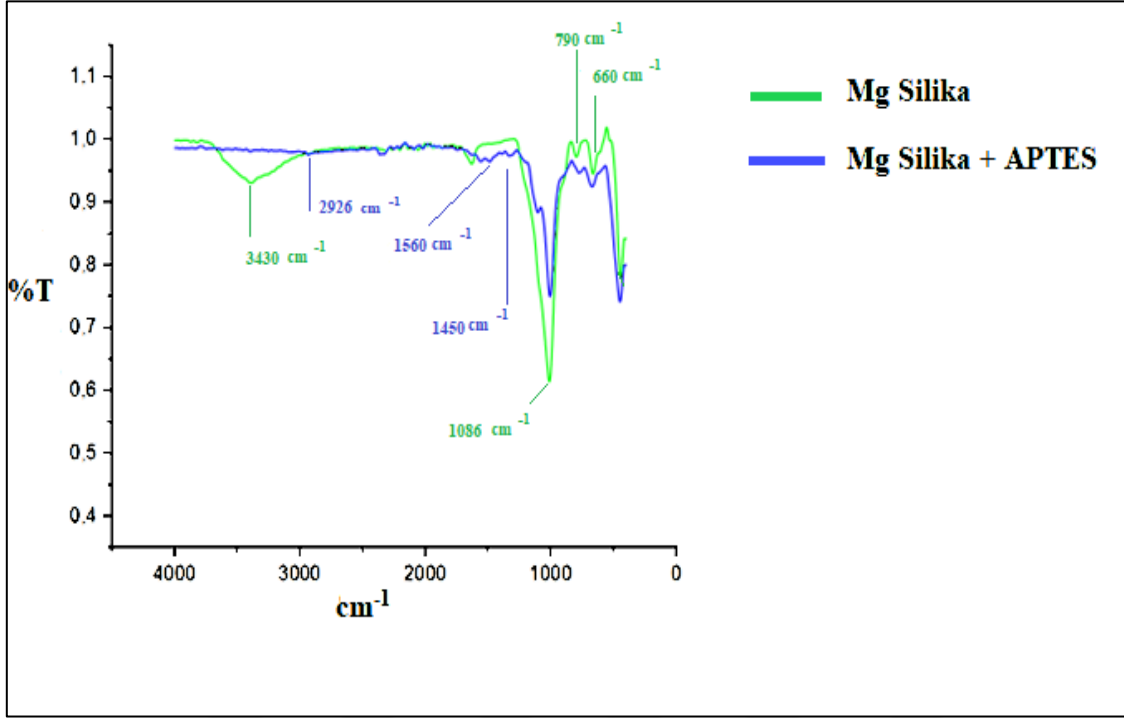


Şekil 4.8. Silika aerojelin APTES öncesi ve sonrasına ait FT-IR spektrumları

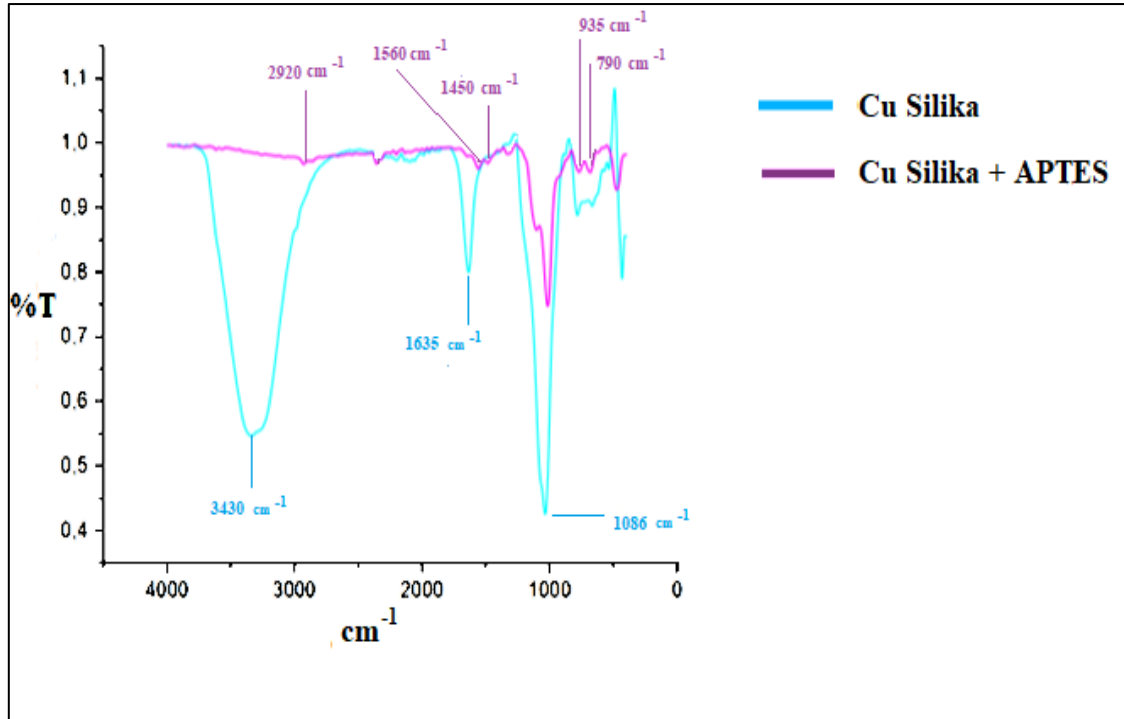
Mg-silika aerojel için 1560 cm^{-1} spektrumunda APTES kaynaklı karakteristik NH deformasyon pikinde ve fonksiyonelleştirme için kullanılan organik çözücünün sebep olduğu -CH asimetrik ve simetrik gerilmesi 2926 cm^{-1} , -CH₂ titreşimlerinin 1560 cm^{-1} ve -CH₃ titreşimlerinin 1450 cm^{-1} piklerinde artışlar görüldü. Fonksiyonelleştirme yapılmayan Mg-silika aerojellerin Si-OH bükülmesini temsil eden 958 cm^{-1} piki yüzeydeki -OH gruplarının APTES ile bağ yapması sebebiyle azaldı. Aminleme öncesi 3430 cm^{-1} ve 1635 cm^{-1} meydana gelen bant yüzeye absorbe olmuş su moleküllerini temsil etmektedir (Tiryaki, 2017). APTES'in karakteristik piki olan 1560 cm^{-1} (-NH deformasyonu) olmaktadır (İlkay, 2020). Ayrıca 1086 cm^{-1} 'de ana Si-O gerilme bantları, 790 cm^{-1} 'de bir Si-O-Si simetrik gerilmesi bandı görüldü. Normal koşullarda Mg-silika aerojel için 450 cm^{-1} ve 448 cm^{-1} 'de tek bir Si-O-Mg eğilme titreşimi ile net bir karakter gösterirler. 528 cm^{-1} 'de ise dikey Mg titreşimleri ile var olmaktadır (Ambrohevicz ve diğ., 2013). FT-IR ölçümlerinin yapıldığı cihaz $4000\text{--}500\text{ cm}^{-1}$ aralığında ölçüm yapabildiğinden bu aralıklar taranamadı.

Cu-silika aerojel için, Si-OH'nin titreşim zirvesi 3430 cm^{-1} civarında güçlü bir şekilde görülmektedir. Si-O-Si'nin 790 cm^{-1} civarındaki esneme titreşimi soğurma bandı

görülmektedir (Şekil 4.10). 1086 cm^{-1} 'de ana Si–O gerilme bantları ortaya çıktı (Amiri ve diğ., 2016; GuiAn ve diğ., 2011).



Şekil 4.9. Mg-silika aerogelin APTES öncesi ve sonrasına ait FT-IR spektrumları



Şekil 4.10. Cu-silika aerogelin APTES öncesi ve sonrasına ait FT-IR spektrumları

Silika aerogel ve Mg-silika aerogeldeki gibi aminleme öncesi 3430 cm^{-1} ve 1635 cm^{-1} bandı yüzeye absorbe olmuş su moleküllerini temsil etmektedir (Tiryaki, 2017). Aminleme sonrası ise, silika aerogel ve Mg-silika aerogel ile benzer spektrum özellikleri sergilendi. Cu-silika aerogel için FT-IR spektrumunda, 575 , 500 ve 460 cm^{-1} 'de görünen CuO bağlarının tepe noktaları gözlenebilmektedir (Amiri ve diğ., 2016). Fakat yine Mg-silika aerogelde olan ve ölçümlerin yapıldığı cihazın $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ aralığında ölçüm yapabilmesinden kaynaklı olarak bu aralıklar taranamadı. Aerojellerin FT-IR spektrumu pikleri ve bağ karşılıkları Tablo 4.7’de verilmektedir.

Tablo 4.7. Aerojellerin FT-IR spektrum pikleri ve bağ karşılıkları

Pik	Bağ
3430 cm^{-1}	-OH gerilmesi (yüzeye adsorbe olmuş su molekülleri)
2920 cm^{-1}	-CH gerilmesi, (-CH ₃ ya da -CH ₂ kaynaklı)
1635 cm^{-1}	H ₂ O deformasyonu (fiziksel olarak silika yüzeyinde biriken su)
1560 cm^{-1}	-NH deformasyonu
1450 cm^{-1}	-CH ₃ titreşimleri
1086 cm^{-1} ve 790 cm^{-1}	Si-O-Si asimetrik gerilmesi
967 cm^{-1} – 935 cm^{-1}	Si-OH bükülmesi
794 cm^{-1}	Si-C ve Si-O gerilmesi

4.6.2. Brunauer-Emmett-Teller (BET) Yüzey Alanı, Gözenek Boyutu ve Gözenek Hacmi

Tablo 4.8’de BET analiz sonuçları verilmektedir. Sentezlenen silika aerogel, Cu-silika aerogel ve Mg-silika aerogellerin spesifik yüzey alanı, gözenek boyutu ve gözenek hacmi Spesifik Yüzey Alanı ve Gözenek Boyut Dağılım analiz cihazı (Micromeritics, TriStar II 3020, ABD) ile 77 K ’de azot adsorpsiyon-desorpsiyon ölçümlerine bağlı olarak belirlendi. Spesifik yüzey alanı Brunauer- 57 Emmett-Teller (BET) metodu ile hesaplandı. Gözenek boyutu ve gözenek hacmi Barrett-Joiner-Halenda (BJH) metodunda elde edilen izotermin desorpsiyon değerlerine göre belirlendi. Analiz öncesinde hazırlanan numunelerin nemi, nem tayini cihazı ile $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ ’de uzaklaştırıldı. Nemleri

uzaklaştırılan örnekler numune tüpleri içerisinde tartılarak, 4 saat 200 °C sıcaklıkta azot gazı ile gaz giderme (degaz) işlemine tabi tutuldu.

Tablo 4.8. Hazırlanan aerojellerin BET analizi sonuçları

Malzeme Adı	BET yüzey alanı (m ² /g)	¹ BJH gözenek hacmi (cm ³ /g)	² BJH gözenek çapı (nm)
Silika Aerojel	535	0,18	3,85
Magnezyum Silika Aerojel	437	0,26	3,70
Bakır Silika Aerojel	370	0,53	5,91

¹BJH Kümülatif desorpsiyon por hacmi (1,7 - 300 nm arasında) (cm³/g)

²BJH Ortalama desorpsiyon por çapı (4V/A) (nm)

Hazırlanan üç farklı aerojele yönelik fonksiyonelleştirme öncesi BET yüzey alanı (m²/g), BJH gözenek hacmi (cm³/g) ve BJH gözenek çapı (nm) değerleri Tablo 4.8’de verildi. Silika aerojel için yüzey alanı 535 m²/g olarak hesaplandı. Gözenek hacmi ve gözenek çapı ise sırasıyla 0,18 cm³/g ve 3,85 nm olarak bulundu. Mg-silika aerojel için bu değerler 437 m²/g yüzey alanı, 0,26 cm³/g gözenek hacmi ve 3,70 nm gözenek çapı olurken Cu-silika aerojel için 370 m²/g yüzey alanı, 0,53 cm³/g gözenek hacmi ve 5,91 nm gözenek çapı oldu.

Tablo 4.9. %1 APTES ile fonksiyonelleştirilmiş aerojellerin BET analizi sonuçları

Malzeme Adı	BET yüzey alanı (m ² /g)	¹ BJH gözenek hacmi (cm ³ /g)	² BJH gözenek çapı (nm)
Silika Aerojel	43	0,057	5,94
Magnezyum Silika Aerojel	129	0,162	4,55
Bakır Silika Aerojel	191	0,28	5,65

¹BJH Kümülatif desorpsiyon por hacmi (1,7 - 300 nm arasında) (cm³/g)

²BJH Ortalama desorpsiyon por çapı (4V/A) (nm)

Tablo 4.10. %5 APTES ile fonksiyonelleştirilmiş aerojellerin BET analizi sonuçları

Malzeme Adı	BET yüzey alanı (m ² /g)	¹ BJH gözenek hacmi (cm ³ /g)	² BJH gözenek çapı (nm)
Silika Aerojel	36	0,049	5,45
Magnezyum Silika Aerojel	84	0,076	4,71
Bakır Silika Aerojel	72	0,19	5,19

¹BJH Kümülatif desorpsiyon por hacmi (1,7 - 300 nm arasında) (cm³/g)

²BJH Ortalama desorpsiyon por çapı (4V/A) (nm)

Her üç aerojelin fonksiyonelleştirme sonrasına ait değerleri ise Tablo 4.9, Tablo 4.10 ve Tablo 4.11’de yer almaktadır. Kullanılan silanlama ajanının ya da metal katkılı olarak

yapılan üretimler de metal konsantrasyonunun artmasının yüzey alanı ve por hacminde düşüşe sebep olduğu silika bazlı taşıyıcıların üretiminde de gözlenmiştir (Yousefi Amiri ve diğ., 2016).

Tablo 4.11. %10 APTES ile fonksiyonelleştirilmiş aerojellerin BET analizi sonuçları

Malzeme Adı	BET yüzey alanı (m ² /g)	¹ BJH gözenek hacmi (cm ³ /g)	² BJH gözenek çapı (nm)
Silika Aerojel	14	0,011	4,31
Magnezyum Silika Aerojel	0	0	0
Bakır Silika Aerojel	13,5	0,012	4,68

¹BJH Kümülatif desorpsiyon por hacmi (1,7 - 300 nm arasında) (cm³/g)

²BJH Ortalama desorpsiyon por çapı (4V/A) (nm)

Amin fonksiyonelleştirme sonrası aerojellerin yüzey alanları, gözenek hacimleri ve gözenek çaplarında değişiklikler meydana geldi. Artan APTES konsantrasyonu ile birlikte tüm aerojellerde yüzey alanları düştü. Fonksiyonelleştirme sonrası yüzey alanlarının düşmesi beklenen bir durumdur. Yine artan APTES konsantrasyonu ile gözenek hacimlerinin düşüşü gözlemlendi. Fakat gözenek çaplarında ise tam tersi bir durum söz konusudur. %1 APTES uygulanan aerojellerden silika aerjel ve Mg-silika aerjel de başlangıç gözenek çapına göre artış görülmektedir. Ancak Mg-silika aerjel için %10 APTES konsantrasyonunda bu durum geçerli değildir. Cu-silika aerjel için ise %1 APTES uygulamasında gözenek çapı çok az bir düşüş gösterdi. %10 APTES uygulandığında gözenek çapı 4,68 nm oldu. Tüm aerjel örneklerinin azot (N₂) adsorbsiyon/desorpsiyon izotermelerinin tip IV olduğu Şekil 4.11’de görülmektedir. Fonksiyonelleştirme sonrası yüzey alanları, gözenek hacmi ve gözenek çapı açısından ele alındığında Mg-silika aerjel ve Cu-silika aerjel ile etkin bir fonksiyonelleştirme yapıldığı görülmektedir. Literatürde yer alan farklı silika bazlı aerojellerde: Yang ve diğ., (2011) yaptığı çalışmada SBA-15-NH₂’nin (Amino-modifiye mezogözenekli silika) adsorpsiyon ve desorpsiyon eğrisinin, desteğin mezo-gözenekli bir yapıya sahip olduğunu gösteren tip IV adsorpsiyon ve desorpsiyon izotermiyle tutarlı olduğu görülmektedir. Ayrıca taşıyıcının BET yöntemi ile hesaplanan spesifik yüzey alanı 33,14 m²/g ve BJH yöntemiyle hesaplanan gözenek boyutu 4,13 nm olmuştur.

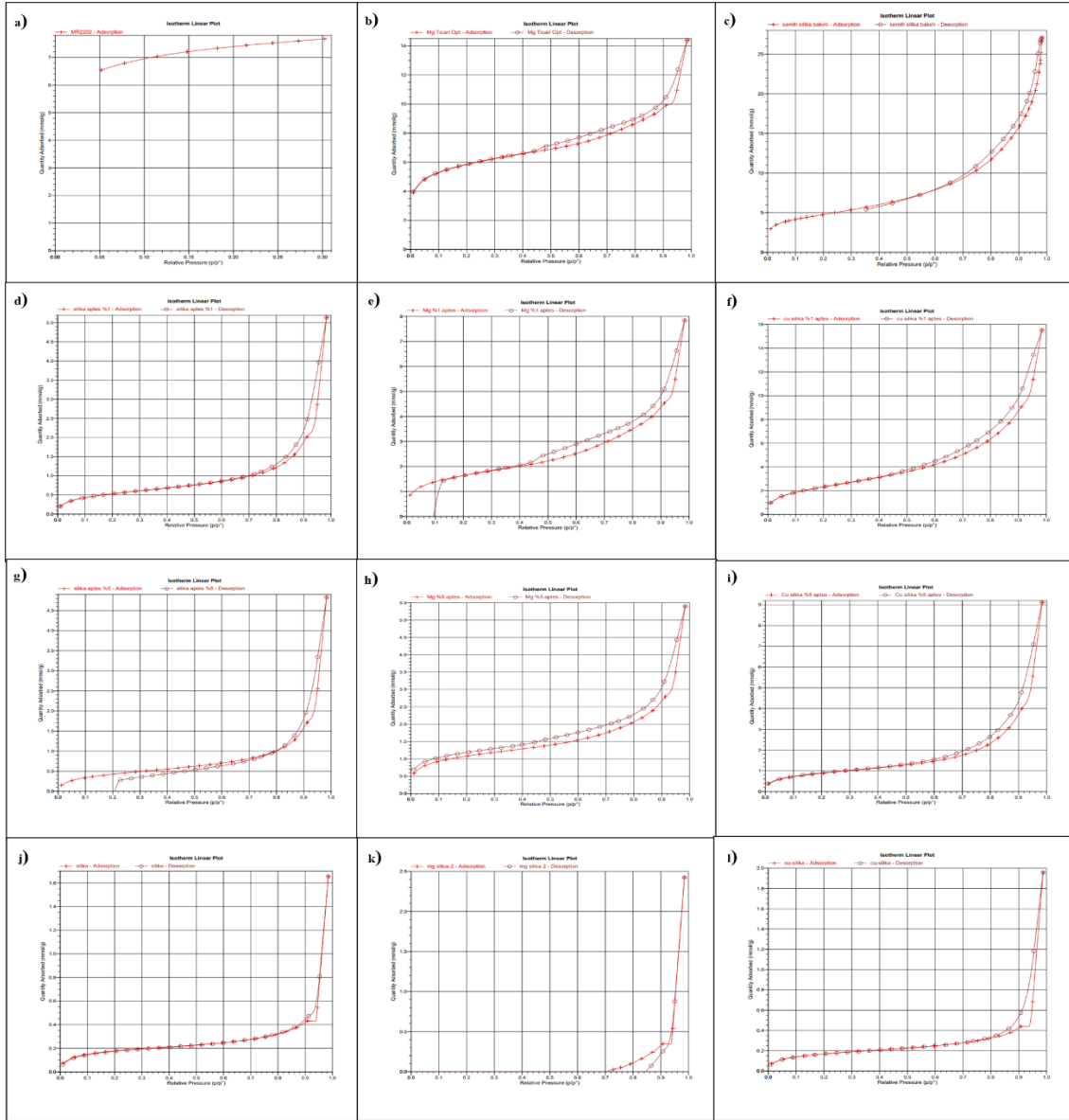
Guiann ve diğ., (2011) Cu-SiO₂ ile yaptığı çalışmada ise, 2-15 nm aralığında por çaplarına sahip taşıyıcılar üretmişlerdir. Fonksiyonelleştirme sonrası organik yapıli fonksiyonel grupların oluşması, aerjel yüzeyinde var olan Si-OH gruplarının arasındaki hidrojen

bağlarının yok olmasına sebep olmaktadır. Aerojel yüzeyine bağlanan ve birbirini itme eğilimi olan fonksiyonel gruplar gözenek boyutlarında artışa neden olmaktadır. Silanlama ajanının konsantrasyonunun artması aerojellerin yüzeyine bağlanmış olan fonksiyonel grupların artmasına sebep olarak yüzey alanlarını ve gözenek hacmini düşürürken, gözeneklerin boyutlarını artırır (Tiryaki, 2017). Çalışmada APTES konsantrasyonunun %10 olarak kullanılması sonucunda yüzey alanlarındaki düşüş bunu açıkça göstermektedir. Örneğin silika aerojel için %5 ve %10 APTES konsantrasyonlarında sırasıyla 43 ve 36 m²/g değerleri Tiryaki'nin çalışmasında (2017) aynı konsantrasyon değerlerinde %53 ve %41 m²/g olarak yakın şekilde bulunmuştur.

50 °C yaşlandırma sıcaklığı ve 24 saat yaşlandırma süresi ile üretilen silika aerojel aminleme öncesi 535 m²/g olarak oldukça yüksek bir yüzey alanına sahiptir. Aynı şekilde bu çalışmada üretilen ve yüksek yüzey alanına sahip olan Mg-silika aerojel (437 m²/g yüzey alanı) 0,5 mol Si/Mg oranı, 50 °C yaşlandırma sıcaklığı ve 24 saat yaşlandırma süresi şartlarında üretildi. Mg-silika aerojel üretimi için birden çok parametrenin olduğu görülmektedir. Bunlar: Si/Mg mol oranı, yaşlandırma sıcaklığı ve yaşlandırma süresidir. Bu parametreler açısından ele alındığında üretilen Mg-silika aerojel üretiminin yapıldığı bir başka çalışmada aynı mol oranına sahip taşıyıcı üretimine kıyasla daha yüksek bir yüzey alanı bulundu. Yine aynı çalışmada APTES ile fonksiyonelleştirilen Mg-silika aerojel örneklerinin por hacmi ve yüzey alanlarında ciddi bir düşüş görülürken por çapında artış gözlenmiştir (İlkay, 2020). Cu-silika aerojel (370 m²/g yüzey alanı) 0,5 mol Si/Cu oranı, 50 °C yaşlandırma sıcaklığı ve 24 saat yaşlandırma süresi şartlarında üretilmiştir. Gözenek hacmi ve gözenek çapı sırasıyla 0,53 cm³/g ve 5,91 nm olarak bulunmuştur. Kristiansen ve diğ., (2011) çalışmalarında üretilen Cu-silika aerogelin yüzey alanını çalışmamıza benzer şekilde 379 m²/g olarak bulmuştur. Benzer şekilde gözenek hacmi 0,54 cm³/g ve gözenek çapı 5,10 nm olarak bildirilmiştir.

Azot (N₂) adsorpsiyon/desorpsiyon izotermi incelendiğinde aminlenmiş ve aminlenmemiş aerojellerin Tip IV izotermi gösterdiği görüldü (Şekil 4.11). Bu durum aerojellerin mezogözenekli yapıda olduğunu göstermektedir (Yang ve diğ., 2011). Aminlenmemiş aerojellerin azot adsorpsiyon değerleri daha yüksektir. Bunun yanında artan APTES konsantrasyonu ile tüm aerojellerde azot adsorpsiyon kapasitesinin azaldığı

görüldü. Bu durum aerojellerin fonksiyonelleştirmesi sonrası düşen yüzey alanlarından kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.11. Aerojellerin azot (N_2) adsorbsiyon/desorpsiyon izotermi: (a) Saf silika aerojel, (b) Saf Mg-silika Aerojel (c) Saf Cu-silika Aerojel, (d) %1 APTES + silika aerojel, (e) %1 APTES + Mg-silika aerojel (f) %1 APTES + Cu-silika Aerojel, (g) %5 APTES + silika aerojel, (h) %5 APTES + Mg-silika Aerojel, (i) %5 APTES + Cu-silika Aerojel, (j) %10 APTES + silika aerojel, (k) %10 APTES + Mg-silika aerojel, (l) %10 APTES + Cu-silika aerojel

Yüzey alanı arttıkça adsorpsiyon kapasitesi de artmaktadır (Tiryaki, 2017). Yang ve diğ., (2011) SBA-15-NH₂'nin adsorpsiyon ve desorpsiyon eğrisine göre, desteğin mezo-gözenekli bir yapıya sahip olduğunu gösteren tip IV adsorpsiyon ve desorpsiyon

izotermine sahip bir sonuç ifade etmiştir. Lu, (2013) ise silika nanopartikülleri ile yapılan çalışmada herhangi bir belirgin histerezis döngüsü olmayan tip II izoterme sahip gözeneksiz parçacıkları ifade etmiştir. Amiri ve diğ., (2016) ise ürettikleri Cu-silika aerogelin, artan bakır konsantrasyonu ile gözenek çapının büyüdüğünü ve mezo-gözenekli bir yapıya işaret eden tip IV izotermine sahip olduğunu bildirmiştir. Yine aynı şekilde Kara ve diğ., (2020) Mg-silika aerogel için mezogözenekli ve tip IV izotermi sergileyen bir yapı gösterdiğini ifade etmişlerdir.

4.6.3. Aerojellerin Partikül Boyut Analizi

Partikül boyut analizleri yapılan silika aerogel, Mg-silika aerogel ve Cu-silika aerogel'in ortalama boyutları Tablo 4.12'de yer almaktadır.

Tablo 4.12. Hazırlanan aerojellerin partikül boyutları.

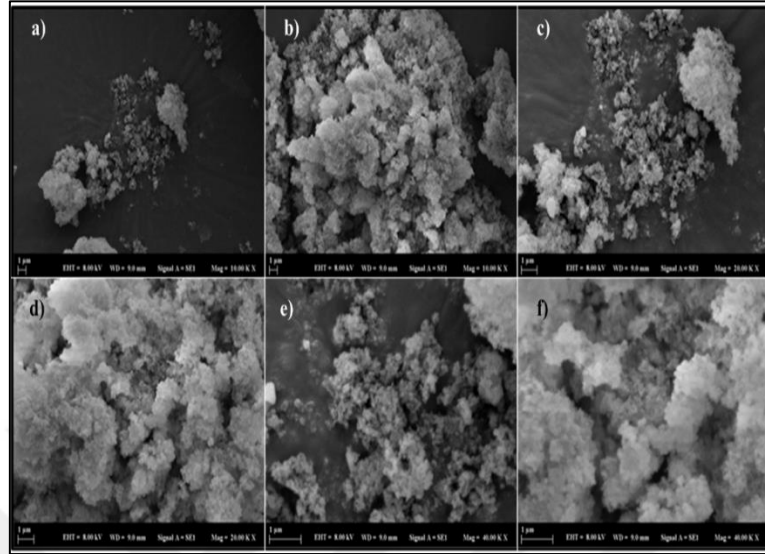
Aerojeller	Partikül Boyutları (µm)
Silika Aerojel	15
Mg-Silika Aerojel	22
Cu-Silika Aerojel	19

Tablo 4.12'de silika bazlı olarak hazırlanan her üç aerogelin sırasıyla 15, 22 ve 19 µm boyutlarında olduğu görülmektedir. Literatürde çöktürme yöntemi ile hazırlanmış E 551 kodlu gıda katkı maddesi olarak kullanılan silikon dioksit malzemelerin 60 saniye sonikasyon sonrası ölçülen partikül boyutları 3 ila 140 µm arasında değişmektedir (Younes ve diğ., 2018).

4.6.4. Taramalı Elektron Mikroskopu (TEM)

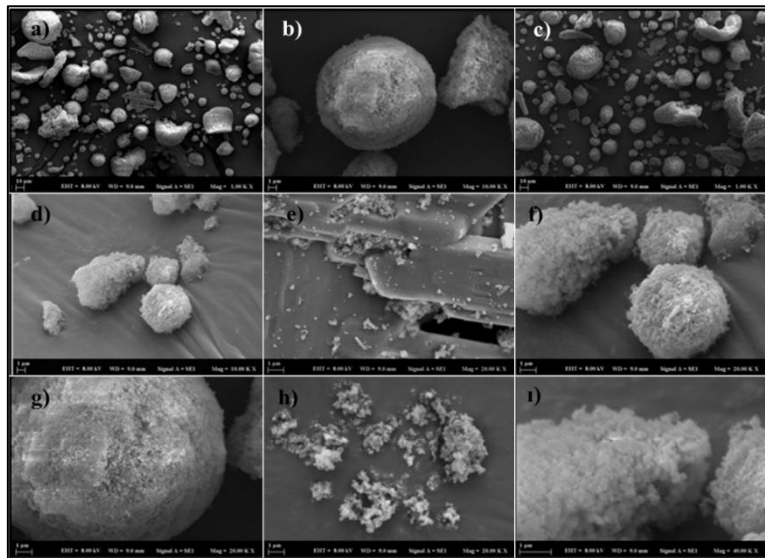
Üretimi yapılan ve fonksiyonelleştirilen üç farklı aerogel için 10 kV'de, farklı büyütme oranlarında görüntülemeleri yapıldı (x1000, x1500, x10000, x20000 ve x40000). Şekil 4.12'te gösterilen silika aerogel TEM görüntüleme sonuçlarına göre sentezlenen silika aerojellerin süngerimsi ve gözenekli bir ağ yapısına sahip olduğu görülmektedir. Bu görüntüleme sonuçları bilinen silika aerogel örnekleri ile de benzerlik göstermektedir (Kaya ve Deveci, 2021; Kim ve diğ., 2011; Pajonk ve diğ., 1996). Mg-silika aerogel için yapılan TEM görüntüleme sonuçlarına göre (Şekil 4.13) Mg-silika aerojellerin küresel yapıda oldukları görülmektedir. Ayrıca taneciklerin gözenekli ve süngerimsi yapıda

oldukları da dikkat çekmektedir. Tüm tanecikler genel itibariyle eşit küresel boyutlara sahiptir (Ambrohewicz ve diğ., 2013; Emine, 2019; İlkay, 2020).

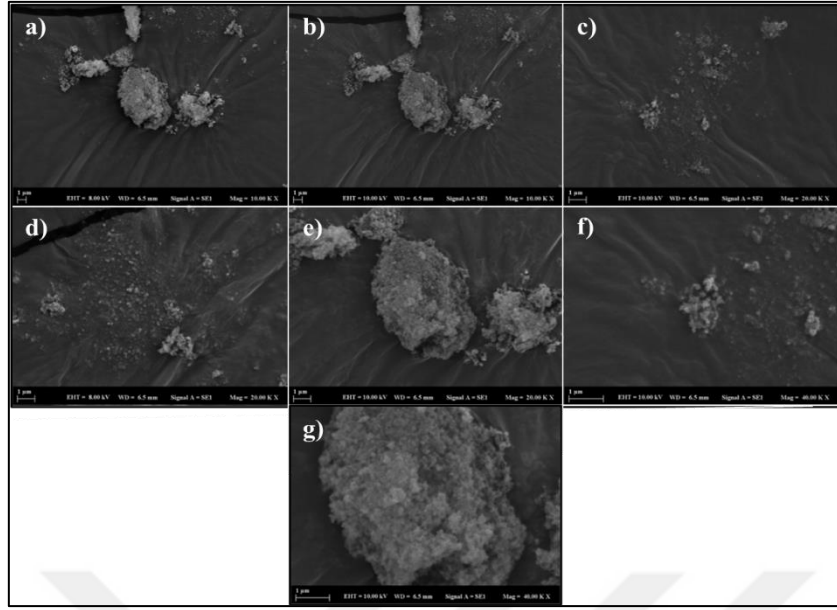


Şekil 4.12. Silika aerogel TEM analizi (a-b: x10K, c-d: x20K, e-f: x40K büyüme boyutları)

Cu-silika aerogel için yapılan TEM görüntüleme analizinde (Şekil 4.14) Cu-silika aerojellerin küresel şekle yakın, nanoparçacıklardan oluşan bir yapıya sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca taneciklerin gözenekli bir yapıya sahip olduğu da görülmektedir (Amiri ve diğ., 2016; Amiri ve Moghaddas, 2014).

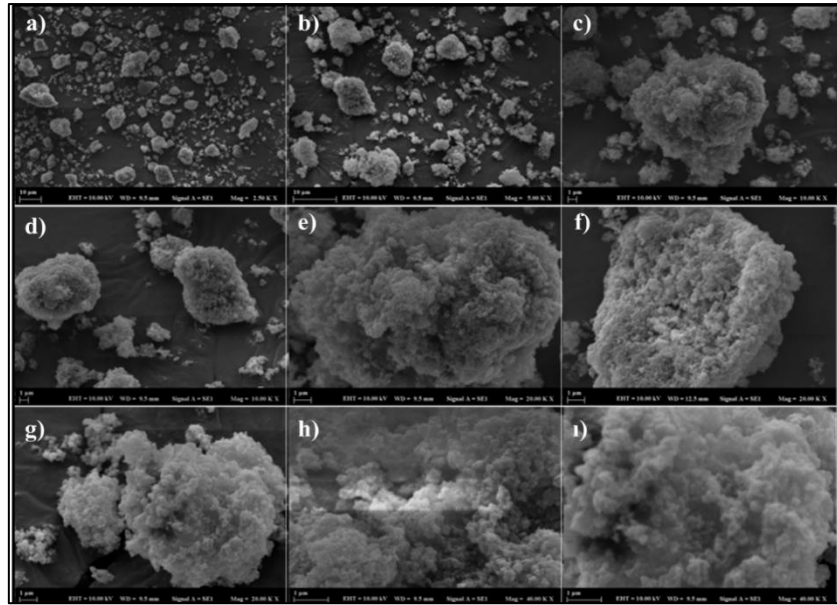


Şekil 4.13. Mg-silika aerogel TEM Analizi (a-c: x1K, b-d: x10K, e-f-g-h: x20K, i: x40K büyüme boyutları)

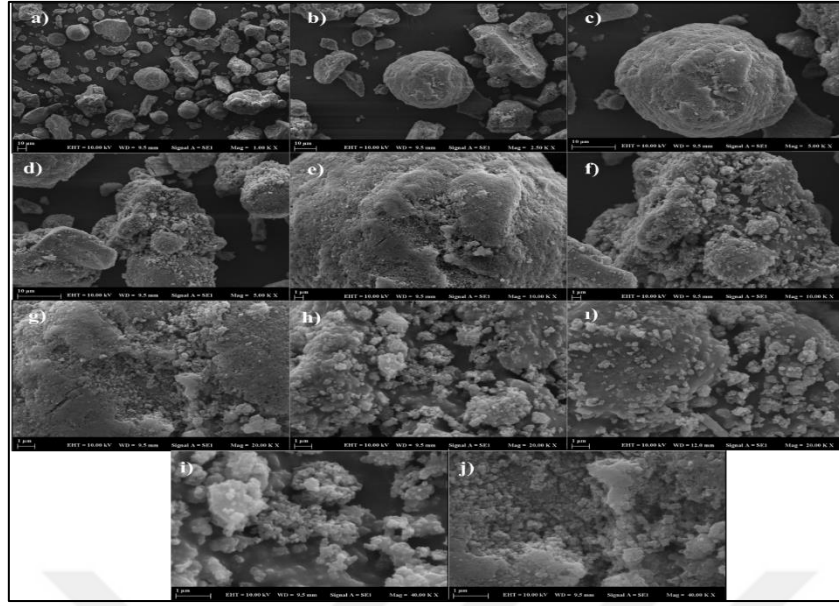


Şekil 4.14. Cu-Silika Aerojel TEM analizi (a-b: x10K, c-d-e: x20K, f-g: x40K büyüme boyutları)

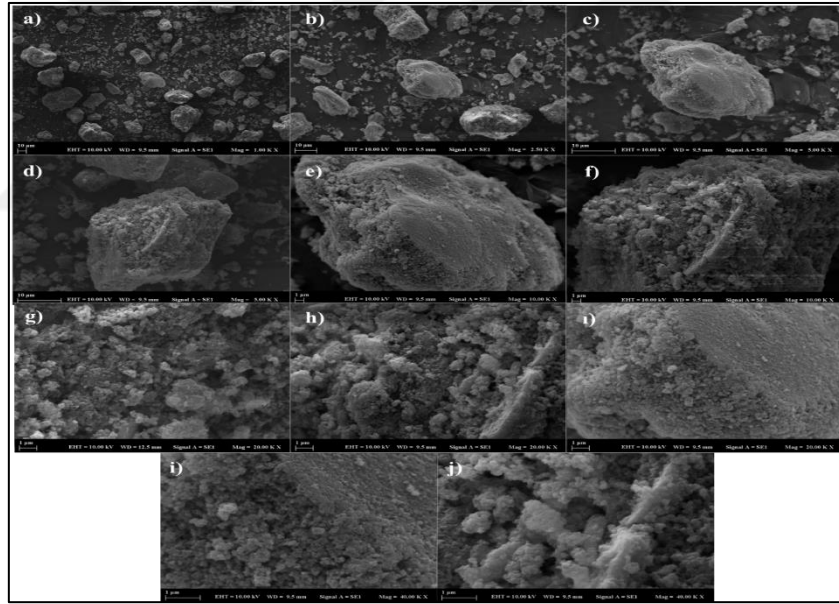
Fonksiyonelleştirme sonrasında aerojellerin tümünde partikül boyutları artmıştır. Görüntüleme sonuçları Şekil 4.15, Şekil 4.16 ve Şekil 4.17’de yer almaktadır. Çünkü fonksiyonelleştirme sonrası amin konsantrasyonunun artması bu durumun gerçekleşmesine neden olmaktadır (Tiryaki, 2017). Tüm aerojellerin EDS sonuçlarında ise elementlerin % ağırlık cinsinden değerleri Şekil 4.18’de gösterilmektedir.



Şekil 4.15. Fonksiyonelleştirme sonrası silika aerogel TEM analizi (a: x2,5K, b: x5K, c-d: x10K, e-f: X20K, h-i: X40K büyüme boyutları)

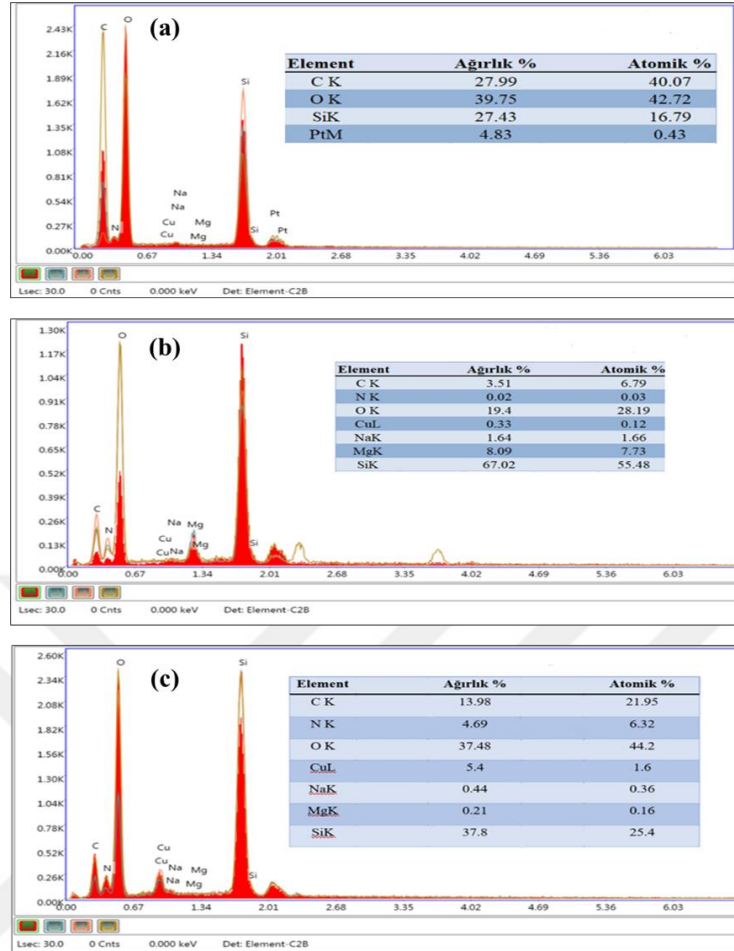


Şekil 4.16. Fonksiyonelleştirme sonrası Mg-silika aerogel TEM analizi (a: x1K, b: x2,5K, c-d: x5K, e-f: X10K, g-h-i: X20K, j-j: X40K büyüme boyutları, k: EDS sonucu)



Şekil 4.17. Fonksiyonelleştirme sonrası Cu-silika aerogel TEM analizi (a: x1K, b: x2,5K, c-d: x5K, e-f: X10K, g-h-i: X20K, j-j: X40K büyüme boyutları)

Fonksiyonelleştirme sonrası (a) silika, (b) Mg-silika ve (c) Cu-silika aerogellerin EDS sonuçları incelendiğinde her aerogel için elementel içeriklerinin farklı oranlarda olduğu görülmektedir. Mg-silika aerogel ve Cu-silika aerogelde elementel içerik üretim aşamasında eklenen magnezyum ve bakır elementlerinden kaynaklı olarak daha zengin olurken silika aerogelde bu şekilde bir metal ilavesi olmadığı için karboksijen ve silisyum oranı daha fazladır.



Şekil 4.18. Fonksiyonelleştirme sonrası (a) silika, (b) Mg-silika ve (c) Cu-silika aerojellerin EDS sonuçları

4.6.5. X Işını Floresans Spektroskopisi (X-IF) Analizleri

Silika aerogel, Mg-silika aerogel ve Cu-silika aerogel örnekleri elementel içeriğinin belirlenmesi için X-IF analizi gerçekleştirildi. Öncesinde safsızlıkların giderilmesi için kül fırında 1000 °C da 1 gün boyunca bekletildi. Bu sayede tutuşma kaybı da hesaplandı. Her üç örnek için X-IF analizleri sırasıyla Tablo 4.13, Tablo 4.14, ve Tablo 4.15’de yer almaktadır. Silika aerogel için yapılan X-IF analizinde %82 oranında SiO₂ içeriği bulundu. Diğer element değerleri ise tabloda yer almaktadır. Ayrıca sentez aşamasında TEOS kullanıldığı için bu oranın daha yüksek olması doğaldır. Çünkü TEOS’lu silika aerogel daha fazla silis içerir. Silikadaki Si–OH ve tetraetil ortosilikattaki Si–OC₂H₅’in reaksiyonları siloksan (Si–O–Si) bağlarının oluşumuna yol açar. Bu nedenle, TEOS’lu silika aerogelde silika içeriği daha yüksektir (Tadjarodi ve diğ., 2012; Wu ve diğ., 2018). Mg-silika aerogel X-IF sonuçlarına göre ise SiO₂ %59, MgO değeri %14, Cu-silika aerogel

içinse SiO₂ %65, CuO %17 olarak elde edildi. Bulunan değerler aerojel üretim prosesine ve aerojelin çeşidine göre değişiklik göstermektedir. Tadjoradi ve diğ., (2012) çalışmasında pirinç kabuğu külünden sol jel yöntemi ile hazırladıkları mezo-gözenekli silika aerojel X-IF sonuçlarına bakıldığında SiO₂ oranı %52 olmuştur. Omatolo ve diğ., (2023) tarafından pirinç kabuğu külü ve toz haline getirilmiş sahil kumundan silika kserojel ve aerojelin sol-jel yoluyla sentezinde ise aerojel için SiO₂ değeri %80,2 olmuştur. Zou ve diğ., (2015) çalışmasında Mg/SiO mol oranı 0,22 olduğunda üretilen magnezyum silikatın yüzey alanı 373 m²/g olarak elde edilmiştir. Bu çalışmada belirlenen X-IF sonuçlarına göre Mg/SiO mol oranı 0,24 olurken üretilen Mg-silika aerojelin yüzey alanı 437 m²/g oldu. Buna göre, yakın mol oranlarına sahip olmalarına rağmen bu çalışmada oldukça yüksek yüzey alanı değerine sahip bir materyal üretilmiştir. Mohanan ve Brock, 2003 çalışmasında CuO için ise bu oranı %3,06 olarak ifade etmiştir.

Tablo 4.13. Silika aerojel X-IF sonuçları

Özellik	Yüzde (%)
Tutuşma kaybı	15
SiO ₂	82,28
Na ₂ O	2,71

Tablo 4.14. Mg-silika aerojel X-IF sonuçları

Özellik	Yüzde (%)
Tutuşma kaybı	%20,90
MgO	%14,34
SiO ₂	%59,3
Na ₂ O	%4,93

Tablo 4.15. Cu-silika aerojel X-IF sonuçları

Özellik	Yüzde (%)
Tutuşma kaybı	%13,58
CuO	%17,26
SiO ₂	%65,93
Na ₂ O	%3,23

4.6.6. Zeta Potansiyel Analizi

Destek materyallerinin APTES ile fonksiyonelleştirilmesiyle yüzeye üzerine bağlanan amin gruplarının yüzey yük dağılımına olan etkisinin karakterizasyonu, Zeta Sizer (Malvern Instruments) kullanılarak zeta potansiyel ölçümü ile yapıldı. Zeta potansiyel ölçümü 25 °C sıcaklıkta, distile su içerisinde, silika aerojellerin dağıtılması ile yapıldı. Destek materyallerinin modifikasyonu, silisyum üzerindeki hidroksil (-OH) gruplarının APTES' teki silanol grupları (Si-OH) ile etkileşimini gerektirmektedir. Kullanılan silika aerjel materyallerinin yüzeyinde bulunan Si-OH grupları sebebiyle negatif yüzey yükü, APTES ile modifikasyon yapılmasından sonra yüzeye bağlanan amin gruplarının etkisiyle azalırken yüzey daha pozitif hale gelmektedir. Bu yüzden APTES ile modifikasyonu yapılan destek materyallerinin yüzey üzerindeki amin grupları yüzeyin pozitif olmasına sebep olur (Kragiel, 2014; Schulz ve diğ., 2011). Zeta potansiyel analiz sonucuna göre APTES ile fonksiyonelleştirilmemiş destek materyallerinin yüzeyinin APTES ile fonksiyonelleştirilmesi sonrası negatif yükün azaldığı görüldü (Tablo 4.16). Literatürde saf silika ve artan konsantrasyonlarda APTES ile fonksiyonelleştirilen silika aerojeller için pH 8,0 da zeta potansiyel analiz sonuçlarına göre saf silika için yüzey yükü negatif olarak tespit edilirken artan APTES konsantrasyonları ile yüzeyin negatif yükünün oldukça azaldığı görülmüştür (Tiryaki, 2017). Bir diğer çalışmada yine Mg-silika aerjel için fonksiyonelleştirme öncesi negatif olan yüzey yükü APTES konsantrasyonu ile pozitif hale gelmiştir (İlkay, 2020). Zeta potansiyeli için ortam pH'sı oldukça önemli bir faktördür. Jankowska ve diğ., (2019) çalışmasında, ZrO₂-SiO₂ için zeta potansiyeli farklı pH değerlerinde birbirinden farklı yüklere sahip olmuştur. Artan pH değeri -OH gruplarının yoğunluğundan ötürü malzeme yüzeyini daha negatif hale getirirken düşük pH değerlerinde ise yüzey yükü daha pozitif hale gelmiştir.

Tablo 4.16. Saf ve %10 APTES ile fonksiyonelleştirilmiş destek materyallerinin zeta potansiyelleri

	Saf	APTES ile Fonksiyonelleştirilmiş
Destek Materyali	Zeta Potansiyeli mV (pH 7,0)	Zeta Potansiyeli mV (pH 7,0)
Silika Aerjel	-15.2	-2.18
Mg-silika Aerjel	-18.6	-2.12
Cu-silika Aerjel	-18.6	-3.93

4.7. İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

Lakkaz enziminin üç farklı destek materyaline (silika aerogel, Mg-silika aerogel ve Cu-silika aerogel) immobilizasyonunda kovalent bağlama ve adsorpsiyon olmak üzere iki farklı yöntem kullanıldı. Buna göre optimizasyon koşulları üç farklı destek materyaline enzimin iki farklı yöntemle immobilizasyonu için ayrı ayrı belirlendi.

4.7.1. Lakkaz İmmobilizasyonunda Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

Kovalent bağlama metodu lakkaz enziminin üç farklı destek materyaline immobilizasyonunda sıcaklığın etkisini belirlemek için 4, 15, 20, 25, 30, 35, 40 ve 45 °C sıcaklıklarında immobilize enzimin lakkaz aktivitesi ölçüldü (Şekil 4.18). Silika aerogel için immobilizasyon verimi artan sıcaklıklarda kısmen düşerken aktivite verimi ise en yüksek 25 °C sıcaklıkta gözlemlendi (Şekil 4.18(a)). Bu sebeple optimum sıcaklık değeri, %23 immobilizasyon verimliliği ve %17 aktivite verimliliğine sahip 25 °C olarak belirlendi. Mg-silika aerogel için immobilizasyon verimliliği açısından en düşük değer 45 °C sıcaklıkta ölçülürken 25 °C sıcaklıkta immobilizasyon verimliliği %40 ve aktivite verimliliği %52 olarak en yüksek değerine ulaştı (Şekil 4.18(b)). Cu-silika aerogelde ise hem immobilizasyon verimi hem de aktivite verimi açısından en düşük değer 45 °C olarak gözlenirken 4 ve 15 °C dışındaki sıcaklıklarda immobilizasyon verimliliği açısından benzer sonuçlar elde edildi. 25 °C sıcaklıkta ise immobilizasyon verimliliği %57, aktivite verimliliği ise %72 olarak en yüksek değere ulaştı (Şekil 4.18(c)).

Farklı destek materyallerinin optimum immobilizasyon sıcaklık değerinin belirlenmesi için yapılan bu deney çalışmasında en iyi destek materyali Cu-silika aerogel olarak belirlendi (Kovalent bağlayıcı ajan olan glutaraldehit miktarı toplam 5 mL çalışma hacminde %1 konsantrasyon olarak kullanıldı). Her üç destek materyaline ait immobilizasyon sıcaklık değerlerine bakıldığında optimum sıcaklık değerinin 25 °C olduğu görülmektedir. Düşük sıcaklık değerlerinde immobilizasyon veriminde bir değişiklik olmazken aktivite veriminde düşüşler görüldü. Patel ve diğ., (2014a) silika desteğine kovalent bağlama yöntemi ile immobilize ettikleri *T. versicolor* lakkaz enzimi için optimum immobilizasyon sıcaklık değerini 4 °C olarak ifade etmişlerdir. Artan sıcaklıklarda aktivite verimi oldukça fazla düşüş göstermiştir. Yang ve diğ., (2021) ise amino-modifiye mezoporlu silika materyaline immobilize ettikleri beyaz çürükçül

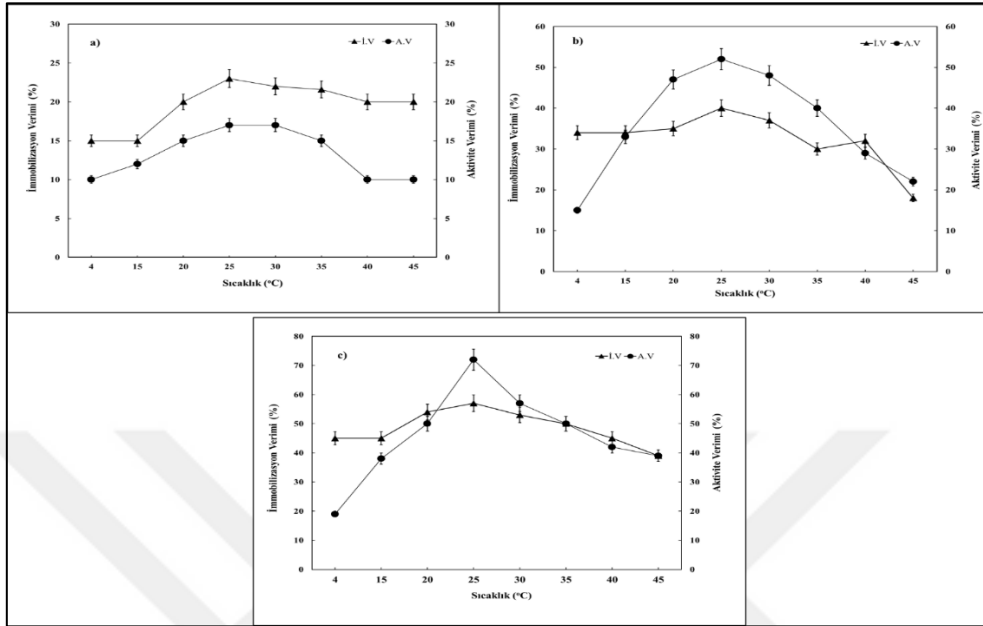
mantardan elde edilen lakkaz enzimi içinse optimum immobilizasyon sıcaklığını benzer şekilde 25 °C olarak ifade etmişlerdir. Uygulanabilirlik açısından ele alındığında 25 °C immobilizasyon sıcaklık değeri oldukça önemlidir. Çok düşük ya da çok yüksek sıcaklık değerlerinde bu işlemin gerçekleştirilmesi hem kullanılan enzimin etkinliğini hem de hedeflenen uygulamanın kolaylığı açısından oldukça önemlidir.

Adsorpsiyon metodu ile lakkaz enziminin üç destek materyaline immobilizasyonunda optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi için aynı sıcaklık değerlerinde denemeler gerçekleştirildi (Şekil 4.19). Silika aerojelle yapılan denemelerde 20 ve 40 °C sıcaklıklar ve arasındaki değerlerde benzer immobilizasyon verimliliği ve aktivite verimliliği değerlerine ulaşıldı. 4 ve 45 °C sıcaklık değerlerinde aktivite verimliliği açısından oldukça düşük değerler elde edildi. 25 °C sıcaklıkta immobilizasyon verimliliği %33 aktivite verimliliği ise %23 olarak en yüksek değere ulaştı (Şekil 4.19 (a)). Mg-silika aerojelde immobilizasyon verimi açısından en yüksek değer 35 °C sıcaklıkta %43 olurken aktivite verimliliği %24 olarak gerçekleşti. Bu sebeple immobilizasyon verimi %42 ve aktivite verimi %30 olan 25 °C sıcaklık değeri en optimum koşul olarak belirlendi (Şekil 4.19 (b)). Cu-silika aerogel de ise 25 °C sıcaklıkta immobilizasyon verimliliği %46, aktivite verimliliği ise %30 değerine ulaştı (Şekil 4.19 (c)).

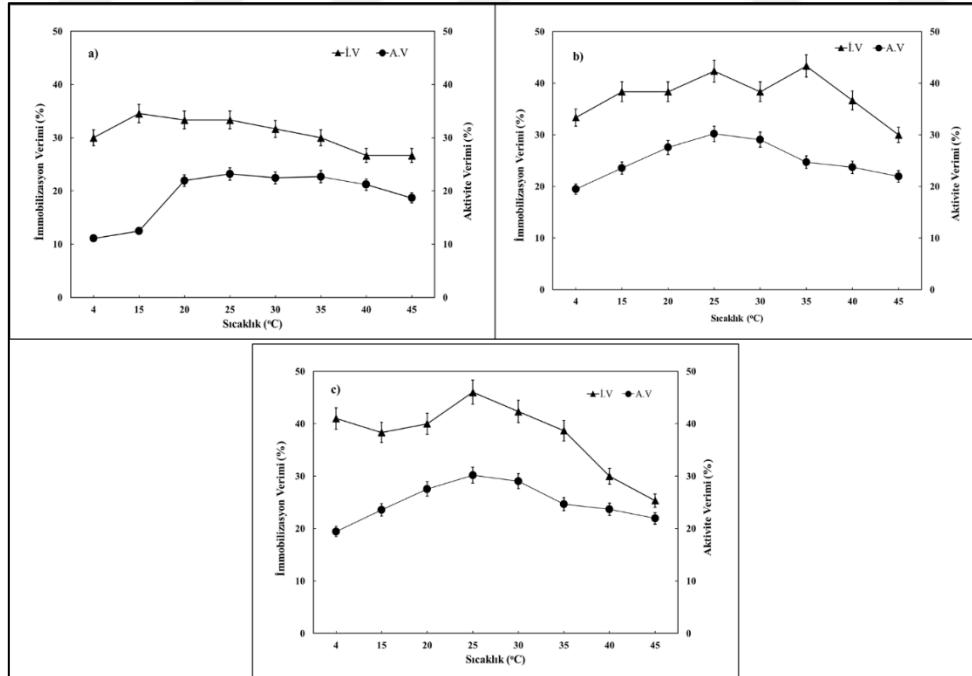
Destek materyalleri kendi içlerinde kıyaslandığında Cu-silika aerogelin diğer iki desteğe göre daha yüksek immobilizasyon verimliliği ve aktivite verimliliği sergilediği söylenebilir. Adsorpsiyon metodu ile yapılan çalışmalarda da immobilizasyon esnasında farklı sıcaklık değerlerinin olduğu görülmektedir. Örneğin Girelli ve diğ., (2020) silika-kitosan hibrit desteğine ticari *T. versicolor* lakkazı ile yaptıkları çalışmasında immobilizasyon sıcaklığını 4 °C bulmuşlardır. Diğer taraftan, Bautista ve diğ., (2010)'nin silika bazlı malzemelere immobilize ettikleri *T. versicolor* lakkazının immobilizasyonu için optimum sıcaklık değeri oda sıcaklığı olarak belirlenmiştir. Kovalent bağlama tekniğinde olduğu gibi adsorpsiyon tekniği ile yapılan immobilizasyonda da sıcaklık değeri uygulanabilirlik açısından 25 °C olarak ön plana çıkmaktadır.

Enzim immobilizasyonu açısından ele alındığından sıcaklık değerindeki farklılıkların immobilizasyon ve aktivite verimini etkilemediği durumlar olsa da büyük ölçüde etkileri gözlenmektedir. Bu da maruz kalınan ortam sıcaklığına göre enzimin denatürasyonu ya

da kullanılan destek materyalinin sıcaklık değişimlerine olan toleransı ile açıklanabilir (Wang ve diğ., 2008).



Şekil 4.19. (a) Silika aerojele ve (b) Mg-silika aerojele (c) Cu-silika aerojele kovalent bağlama metodu ile immobilize edilen lakkazın sıcaklık optimizasyonu (İ.V: İmmobilizasyon verimliliği; A.V: Aktivite verimliliği)



Şekil 4.20. (a) Silika aerojele ve (b) Mg-silika aerojele (c) Cu-silika aerojele adsorpsiyon metodu ile immobilize edilen lakkazın sıcaklık optimizasyonu (İ.V: İmmobilizasyon verimliliği; A.V: Aktivite verimliliği)

4.7.2. Lakkaz İmmobilizasyonunda Optimum pH'nın Belirlenmesi

Kovalent bağlama metodu ile yapılan lakkaz enzimi immobilizasyonunda pH'nın farklı destek materyalleri üzerine etkisini belirlemek için her bir destek materyali pH 3,5, pH 4,0, pH 4,5, pH 5,0, pH 5,5 ve pH 6,0 değerlerinde immobilize edilerek lakkaz aktivite tayini yapıldı (Şekil 4.20). Silika aerogel için pH 3,5 ve pH 6,0 değerinde immobilizasyon verimi sırasıyla %10 ve %12 olurken aktivite verimleri ise %14 ve %9 olarak belirlendi. pH 4,5 değerinde immobilizasyon verimi %23 aktivite verimi ise %17 olarak en yüksek değere ulaştı (Şekil 4.20 (a)). Mg-silika aerogelde pH 3,5 ve pH 6,0' da immobilizasyon verimliliği %21 olarak ölçülürken aktivite verimliliği sırasıyla %15 ve %22 olarak en düşük değerine ulaştığı görüldü. En yüksek immobilizasyon verimliliği ve aktivite verimliliği sırasıyla %40 ve %52 olarak pH 4,5 de elde edildi. pH 4,0 ve pH 4,5 değerlerinde aktivite verimliliği açısından en optimum koşula yakın değerler elde edildi (Şekil 4.20 (b)). Cu silika aerogelde de yine pH 3,5 ve pH 6,0 değerlerinde en düşük değerler elde edilirken pH 4,5 da hem immobilizasyon verimliliği hem de aktivite verimliliği sırasıyla %57 ve %72 olarak maksimum değerde belirlendi. pH 4,0 ve pH 5,0' da aktivite verimliliği sırasıyla %62 ve %59 olarak oldukça iyi bir performans sergiledi (Şekil 4.20 (c)).

Tüm destek materyalleri kıyaslandığında Cu-silika aerogel destek materyalinde pH 4,5' da %57 immobilizasyon verimliliği ve %72 aktivite verimliliğine ulaşıldı (Kovalent bağlayıcı ajan olan glutaraldehit miktarı toplam 5 mL çalışma hacminde %1 konsantrasyon olarak kullanıldı).

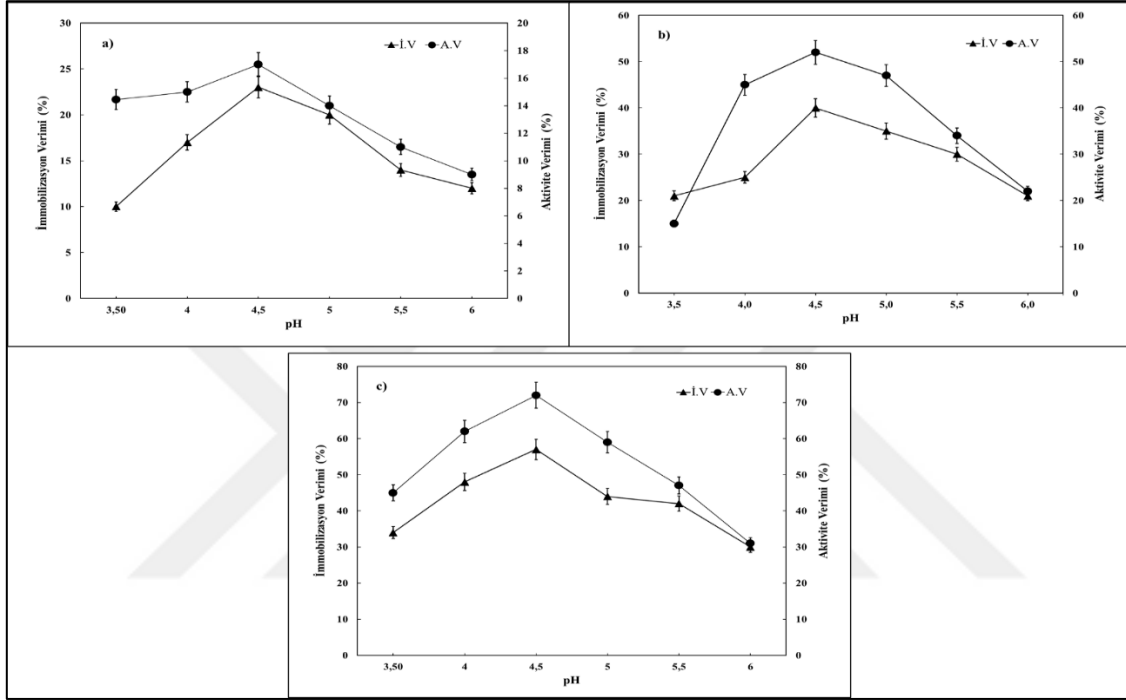
Kovalent bağlama ile immobilizasyon çalışmalarında uygulama tek ya da iki aşamalı olacak şekilde gerçekleştirilebilmektedir. Yang ve diğ., (2021) çalışmasında beyaz çürükçül mantardan elde edilen lakkaz enziminin amino-modifiye silikaya immobilizasyonunda immobilizasyon pH değeri belirlemişlerdir. Destek materyali, enzim ve glutaraldehitin tek aşamada immobilizasyonunu içeren süreçte optimum pH değeri 5,0 olarak ölçülürken, bu çalışmada kullanılan metotta olduğu gibi destek materyali ve glutaraldehitin ilk muamelesi sonrası enzimin ilave edildiği iki aşamalı yöntemde optimum immobilizasyon pH değerini 6,0 olarak bulmuşlardır. Patel ve diğ., (2014a) çalışmasında *T. versicolor* lakkaz enzimini silika desteğine kovalent bağlama metodu ile yaptıkları immobilizasyon çalışmasında optimum pH değerini 5,0,

immobilizasyon verimini ise %73 olarak belirlemişlerdir. pH 5,0 dan 2,0'a düşüşlerde ve pH 7,0'a çıkışlarda immobilizasyon veriminin azaldığını da görmüşlerdir. *Aspergillus sp.* lakkazının mezo-gözenekli silikaya immobilizasyonu çalışmasında optimum immobilizasyon pH değeri 5,4 olarak ifade edilmiştir. Immobilizasyon sürecinde çözeltinin pH'sı, taşıyıcı ve lakkazın iyonizasyon durumunu belirler. Bu nedenle lakkaz ile ortaya çıkan taşıyıcının farklı derecelerde çapraz bağlanması, immobilize lakkazın farklı spesifik aktivitelerine yol açabilir. Bunun nedeni lakkaz ve silika taşıyıcının farklı izoelektrik nokta (IEN) değerlerine sahip olmasıdır. Mezogözenekli silika ile immobilizasyonu yapılan lakkazın IEN değeri 3,0-6,0 aralığında olması bu durumu açıklamaktadır (Baldrian, 2005; Yang ve diğ., 2016). Mezo-gözenekli silikalar içinse IEP değeri pH 3,0 altındadır. Bu sebeple pH 3,0 ve pH 6,0 değerinde tampon kullanılan immobilizasyon çalışmalarında lakkaz enziminin glutaraldehit ile gelen amino gruplarının iyonize olarak daha da pozitif yüklenmesi beklenen bir durumdur. Bu pH değerlerinde mezo-gözenekli silika ise negatif yüklenmektedir. Bu durum destek ve protein arasındaki çekimi daha da artırır. Mevcut çalışmada optimum pH değerinin 5,0 olarak bulunması buna işaret etmektedir (Davies ve Ducros., 2001).

Tamponun pH'sı, enzim moleküllerinin ve immobilize taşıyıcının iyonik durumunu değiştirmektedir. Çözeltinin pH'sı belirli bir aralığın üzerine çıktığında enzimin mikro yapısı değişir ve enzimin inaktivasyonuna neden olur. Asidik ortamda glutaraldehit serbest halde veya oligomer formunda bulunur ve moleküler hacmi alkali koşullardaki polimerinkinden çok daha küçüktür. Bu nedenle, mezo-gözenekli silikanın gözeneklerine girmek ve enzim molekülleri ile çapraz bağlanmak kolaydır, böylece taşıyıcının enzim taşıma kapasitesi artar (Yang ve diğ., 2021). Ayrıca artan pH değerlerinde immobilizasyon sırasında aktivite veriminin düştüğü de gözlenen bir durumdur. Bu durum lakkazın bir protein olması ve mikroskobik yapısında meydana gelen değişikliklerden dolayı, çözeltinin pH'sı belirli bir aralığın ötesinde olduğunda lakkazın aktif olmamasına yol açar ve lakkaz enzimi aktivitesi $pH \geq 7$ 'de kaybolur (Bollag ve diğ., 1988).

Adsorpsiyon metodu ile yapılan lakkaz enziminin immobilizasyonunda pH etkisini gözlemek için pH 3,0 ila pH 8,0 arasında üç farklı destek materyaline immobilizasyon denemeleri gerçekleştirildi (Şekil 4.21). Silika aerogel için 25 °C optimum sıcaklık değerinde pH 6,5'te immobilizasyon verimi %17 ve aktivite verimi %9 ile en düşük

değerde ölçüldü. pH 3,0 ve pH 3,5’da immobilizasyon verimliliği %50 ile en yüksek değere ulaşsa da aktivite verimlilikleri sırasıyla %12 ve %18 ile nispeten düşük değerlerde hesaplandı. Diğer taraftan, yüzde immobilizasyon (%40) ve aktivite verimliliği (%25) değerleri en yüksek değerlerine pH 4,0’da ulaştı. Bu sebeple silika aerojel için en uygun koşul 25 °C sıcaklık ve pH 4,0’de gerçekleştirilen immobilizasyon olarak not edildi (Şekil 4.21 (a)).

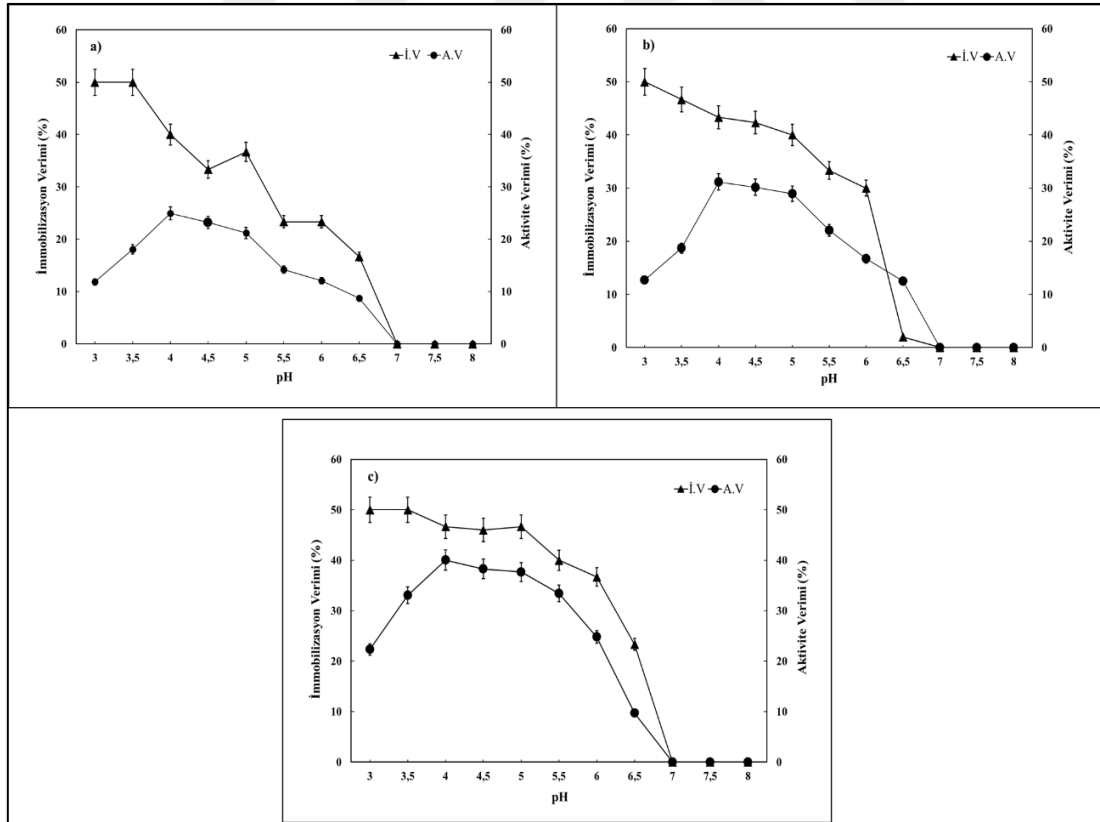


Şekil 4.21. (a) Silika aerojele, (b) Mg-silika aerojele ve (c) Cu-silika aerojele kovalent bağlama metodu ile immobilize edilen laktazın pH optimizasyonu (İ.V: İmmobilizasyon verimliliği; A.V: Aktivite verimliliği)

Mg-silika aerojel ile yapılan denemelerde pH 6,5’ da silika aerojele benzer olarak en düşük immobilizasyon ve aktivite verimlilik değerleri elde edildi. Yine benzer olarak en yüksek immobilizasyon verimliliği %50 değeri ile pH 3,0’ da ölçülmüş olsa da hem immobilizasyon verimliliği hem de aktivite verimliliği açısından en optimum koşul pH 4,0’de kurulan deneme olarak kaydedildi. Çünkü pH 4,0’de ölçülen yüzde immobilizasyon ve aktivite verimlilik değerleri sırasıyla %43 ve %31 olarak belirlendi (Şekil 4.21 (b)). Son destek materyali olarak Cu-silika aerojel kullanılarak yapılan immobilizasyon denemelerinde pH 3,0 ila pH 5,0 arasında %46-50 arasında immobilizasyon verimlilik değerleri hesaplandı. En yüksek yüzde immobilizasyon ve aktivite verimlilik değerleri ise sırasıyla %47 ve %40 olarak pH 4,0’de ölçüldü (Şekil

4.21 (c)). Diğer taraftan pH 6,5’da en düşük immobilizasyon (%23) ve aktivite (%9,7) verimlilik değerleri kaydedildi. Üç destek materyali kıyaslandığında en yüksek değerlere Cu-silika varlığında erişildi.

Silika materyalinin ve lakkaz enziminin yüzey yükleri, adsorpsiyon yöntemi ile immobilizasyonun gerçekleştirilmesinde en etkili faktördür. Çünkü silika partikülleri üzerinde bulunan silanol grupları (Si-OH) pH 4,0 üzerindeki pH değerlerinde protondan arınmış olur. İzoelektrik noktası pH 3,0-6,0 arasında değişen lakkaz da yine bu aralıkta negatif yüklü olmaktadır. Bu engelin ortadan kaldırılması için genelde taşıyıcı yüzeylerine enzimin karboksil gruplarına bağlanabilen amino grupları eklenmektedir (Banjanak ve diğ., 2016; Gascon ve diğ., 2014). Mevcut çalışmada optimum immobilizasyon pH değerinin 5,0 olarak bulunması bu bilgiyi destekler niteliktedir. Bebic ve diğ., (2020) çalışmasında *Myceliophthora thermophila* lakkazının fonksiyonelleştirilmiş silika nanopartiküllerine immobilizasyonunda da optimum immobilizasyon pH’sı 5,0 olarak bulmuşlardır.



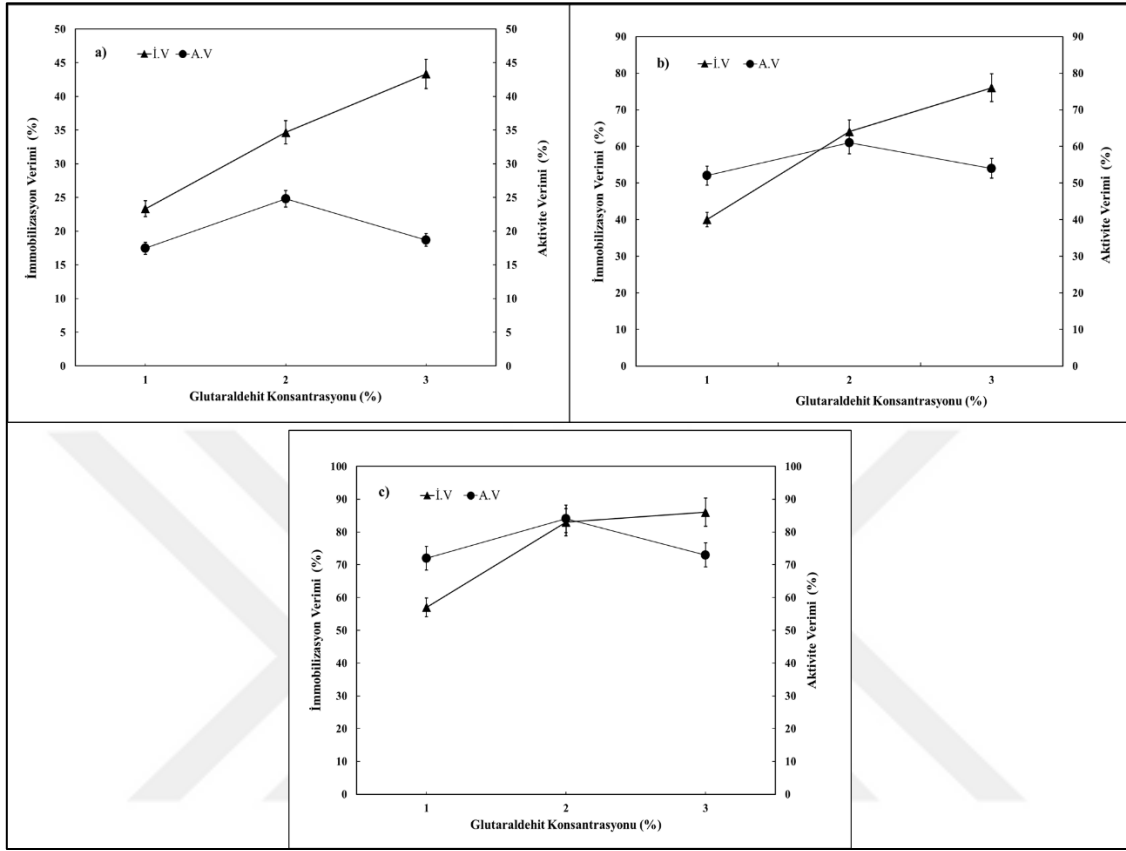
Şekil 4.22. (a) Silika aerojele, (b) Mg-silika aerojele ve (c) Cu-silika aerojele adsorpsiyon metodu ile immobilize edilen lakkazın pH optimizasyonu (İ.V: İmmobilizasyon verimliliği; A.V: Aktivite verimliliği)

4.7.3. Lakkaz İmmobilizasyonunda Optimum Glutaraldehit Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Kovalent bağlama metodundan optimum glutaraldehit konsantrasyonunun belirlenmesi için her üç destek materyalinde toplam 5 mL hacimde %1 (a/h), %2 (a/h) ve %3 (a/h) glutaraldehit ile muamele edilerek denemeler yapıldı (Şekil 4.22). Silika aerogelde en yüksek yüzde immobilizasyon ve aktivite verimlilik değerleri sırasıyla %35 ve %25 olarak %2 (a/h) glutaraldehit varlığında ölçüldü (Şekil 4.22 (a)). Mg-silika aerogelde %1 (a/h), %2 (a/h) ve %3 (a/h) konsantrasyonlarda immobilizasyon verimliliği sırasıyla %40, %64 ve %76 olarak hesaplanırken aktivite verimliliği sırasıyla %52, %61 ve %54 olarak ölçüldü (Şekil 4.22 (b)). Buna göre Mg-silika için en uygun glutaraldehit konsantrasyonu silika aerogelde olduğu gibi %2 (a/h) olarak belirlendi. Cu-silika aerogelde ise %1 (a/h), %2 (a/h) ve %3 (a/h) konsantrasyonda immobilizasyon verimliliği sırasıyla %57, %83 ve %86 olarak ölçülürken aktivite verimliliği ise sırasıyla %72, %84 ve %73 olarak belirlendi (Şekil 4.22 (c)). Bu destekte de en yüksek değere ulaşılan %2 (a/h) glutaraldehit konsantrasyonu optimum koşul olarak tespit edildi. Tüm aerojeller için başlangıç deneylerinde %1 (a/h) glutaraldehit konsantrasyonu tercih edilmesine rağmen konsantrasyonu belirlemek için yapılan denemelerde artan glutaraldehit konsantrasyonunun hem immobilizasyon verimi hem de aktivite verimi açısından olumlu bir etkisinin olduğu görüldü. Üç destek materyali bu açıdan ele alındığında en uygun olanının %83 immobilizasyon verimliliği ve %84 aktivite verimliliği ile Cu-silika aerogel olduğu tespit edildi.

Glutaraldehit ile immobilizasyon gerçekleştirilmesi için enzim, iyonik değişim yoluyla destek ile etkileşime girer ve ardından temel amino asit olan lizin ve destek materyalinin glutaraldehit grubu arasında kovalent bağ oluşumu gerçekleşir (Patel ve diğ., 2014a). Yang ve diğ., (2021), beyaz çürükçül mantardan elde edilen lakkaz enziminin amino-modifiye silikaya immobilizasyonunda glutaraldehit konsantrasyonunu iki adımlı ve tek adımlı yöntemlerde sırasıyla %2,0–7,0 ve %0,1–2,0 olarak denemişlerdir. Burada iki adımlı yöntem olarak ifade edilen durum bu tez çalışmasında olduğu gibi destek materyali ve glutaraldehitin ilk aşamada reaksiyona sokulup lakkaz enziminin ikinci aşamada ilave edilmesi durumudur. Tek adımlı yöntem olarak ifade edilen ise destek materyali, glutaraldehit ve lakkaz enziminin tek aşamada reaksiyona sokulmasını ifade eder.

Optimal glutaraldehit konsantrasyonunu iki aşamalı yöntemde %4 olarak belirlerken tek aşamalı yöntemde %0,75 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.23. (a) Silika aerogel, (b) Mg-silika aerogel ve (c) Cu-silika aerogel kullanılarak yapılan lakkaz immobilizasyonunda glutaraldehit konsantrasyonunun belirlenmesi (İ.V: Immobilizasyon verimliliği; A.V: Aktivite verimliliği)

Konsantrasyonunun artmasıyla birlikte glutaraldehit ile çapraz bağlanan lakkaz miktarı da artmıştır. Bir diğer çalışmada *Aspergillus sp.* lakkaz enziminin mezo-gözenekli silikaya immobilizasyonu için glutaraldehit konsantrasyonu %4 bulunmuştur. Artan konsantrasyonda aktivite de düşüş meydana gelmiştir (Yang ve diğ., 2016). Glutaraldehit konsantrasyonu belirli bir seviyenin üzerine çıktığında, mezo-gözenekli silikanın yüzeyine daha fazla aldehit grubu bağlanır ve aldehit grupları ile lakkaz molekülleri arasında çok sayıda bağlanma bölgesi oluşur. Bu nedenle lakkazın yapısı değişebilir ve lakkazın aktivitesinde düşüşler meydana gelebilir. Bu sonuçlar glutaraldehitin sadece immobilizasyon reaksiyonu için çapraz bağlama reaktifi değil aynı zamanda lakkaz için denatüran olduğunu da göstermiştir (Xiao ve diğ., 2006; Wang ve diğ., 2014). Aşırı miktardaki glutaraldehit, lakkazın aktif gruplarıyla reaksiyona girerek enzim aktivitesinin

azalmasına neden olmaktadır. Diğer bir deyişle, glutaraldehit lakkaz aktivitesini belirli bir dereceye kadar inhibe etmektedir. Glutaraldehit konsantrasyonu ne kadar yüksek olursa inhibisyon etkisi o kadar belirgin olur. Bu nedenle lakkazın aktivitesi azalır (Chen ve diğ., 2013).

Buradan anlaşılmaktadır ki immobilizasyon işleminde iki aşamalı yöntemle göre lakkaz eklendiğinde, iki aşamalı yöntemin reaksiyon sisteminde yalnızca taşıyıcıya çapraz bağlı glutaraldehit mevcut olduğundan yan reaksiyon olasılığı, tek aşamalı yöntemle göre daha küçüktür. Üstelik reaksiyon sisteminde serbest glutaraldehit yoktur, dolayısıyla enzimin inhibisyonu düşüktür ve optimal glutaraldehit reaksiyon konsantrasyonu, tek adımlı yöntemle göre daha yüksek olmaktadır. İki aşamalı yöntemin tercih edildiği mevcut çalışmada her üç destek materyali içinde aktivite verimi açısından en uygun glutaraldehit konsantrasyonu %2 olarak bu durumu desteklemektedir. Artan glutaraldehit konsantrasyonlarında immobilizasyon verimi aktivite verimindeki düşüş göz ardı edilememektedir.

4.7.6. Lakkaz İmmobilizasyonunda Optimum Protein Miktarının Belirlenmesi

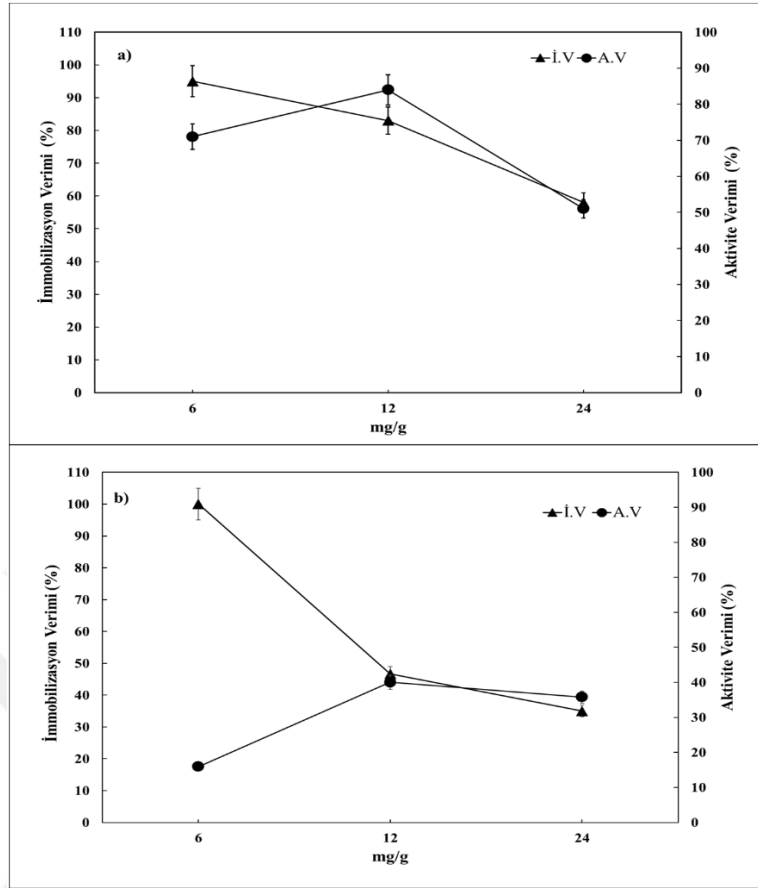
Lakkaz immobilizasyonun şimdiye kadar gerçekleştirilen optimizasyon denemeleri, destek materyalleri arasında Cu-silikanın en iyi çalıştığını göstermektedir. Bu sebeple protein miktarının optimizasyon denemeleri sadece Cu-silika kullanarak lakkazın (protein miktarı/destek miktarı: 6 mg/g, 12 mg/g ve 24 mg/g) bu destek materyaline iki farklı yöntemle (kovalent ve adsorpsiyon) immobilizasyonu gerçekleştirilerek tamamlandı.

Kovalent bağlama yöntemi ile immobilize edilen Cu-silika arojel için immobilizasyon verimliliği açısından en yüksek değer %95 ile 6 mg/g'da ölçülürken aktivite verimliliği aynı protein miktarında %71 olarak hesaplandı. 24 mg/g protein ise hem immobilizasyon verimi hem de aktivite veriminde en düşük değerlerin kaydedilmesiyle sonuçlandı. Diğer taraftan en yüksek aktivite verimliliği (%84), 12 mg/g protein varlığında hesaplandığı için kovalent bağlamada optimum protein miktarı 12 mg/g olarak belirlendi (Şekil 4. 23 (a)). İmmobilize lakkazın spesifik aktivitesi belirli bir protein miktarı artışına kadar artmaktadır. Bunun nedeni, taşıyıcı yüzeyindeki aktif grup miktarının sınırlı olması ve bağlanma bölgeleri doyuma ulaşmadan önce lakkaz miktarının artmasıyla immobilize lakkazın spesifik aktivitesinin artmasıdır. Salami ve diğ., (2018) çalışmasında

Myceliophthora thermophila lakkazının epoksi işlevselleştirilmiş silikaya kovalent bağlanma yoluyla immobilizasyonu ile optimum enzim miktarını 50 mg/g olarak belirlerken izosiyanür yokluğunda 20 mg/g olarak sunmuşlardır. Yang ve diğ., (2021) ise glutaraldehitin uygulanması bakımından iki aşamalı ve tek aşamalı yöntemle sahip çalışmada beyaz çürükçül mantarlar tarafından salgılanan lakkaz enzim konsantrasyonunu optimum 1,0 g/L ve 0,2 g/L olarak bulmuşlardır. Enzimle reaksiyona girebilen serbest aldehit grupları enzim molekülüne tam olarak bağlanmadığında lakkaz konsantrasyonunun artmasıyla immobilize lakkazın bağlı enzim aktivitesi artacaktır. Ancak enzimle reaksiyona girebilecek serbest aldehit grupları enzim molekülüne bağlandığında, enzim konsantrasyonunun artması enzim moleküllerinin agregasyonuna neden olacak ve enzim molekülleri üzerindeki aktif bölgeler kaplanarak enzim aktivitesinde azalmaya neden olacaktır. Ayrıca enzimin yüksek konsantrasyonu, substrat ile enzim molekülünün aktif bölgesi arasındaki teması engelleyecek ve bu da dolaylı olarak bağlı enzim aktivitesinin azalmasına yol açacaktır (Jiang ve diğ., 2005). Bu sebeple lakkaz enzimi mezo-gözenekli silika taşıyıcılarla immobilize edilirken çapraz bağlanmanın sınırlı olduğunu görülmektedir.

Adsorpsiyon bağlama metodu ile immobilize edilen Cu-silika aerogelde ise kovalent bağlama metodundan daha farklı sonuçlar elde edildi. 6 mg/g proteinin tamamı desteğe bağlanarak immobilizasyon verimi %100 olarak belirlenirken aktivite verimi %16 gibi oldukça düşük bir değerde ölçüldü. 12 mg/g olarak yapılan denemede immobilizasyon ve aktivite verimlilik sırasıyla %35 ve %36 oldu. En yüksek değerler ise %47 immobilizasyon ve %40 aktivite verimliliği ile 12 mg/g protein varlığında kaydedildi (Şekil 4.23 (b)).

Girelli ve diğ., (2020) çalışmada, ticari *T. versicolor* lakkazının silika-kitosan hibrit desteğine immobilizasyon işleminde lakkaz miktarı 0,002 U/mg olarak uygulandığında aktivite veriminin en yüksek değere ulaştığı gösterilmiştir. Bunun nedeni muhtemelen enzim miktarı arttığında desteğin enzim doygunluğuna ulaşma eğiliminde olması ve enzim moleküllerinin kendi aralarında etkileşime girerek protein agregatlarının oluşmasına neden olabilmesidir. Bu nedenle enzim moleküllerinin aktif bölgesi kısıtlanabilir. Betic ve diğ., (2020) çalışmada lakkaz enzimi immobilizasyonunda en yüksek aktivite verimini (%68,3), 160 mg/g protein varlığında tespit etmişlerdir



Şekil 4.24. Cu-silika aerojele (a) kovalent bağlama ve (b) adsorpsiyon ile immobilize edilen lakkazın protein miktarının optimizasyonu (İ.V: İmmobilizasyon verimliliği; A.V: Aktivite verimliliği)

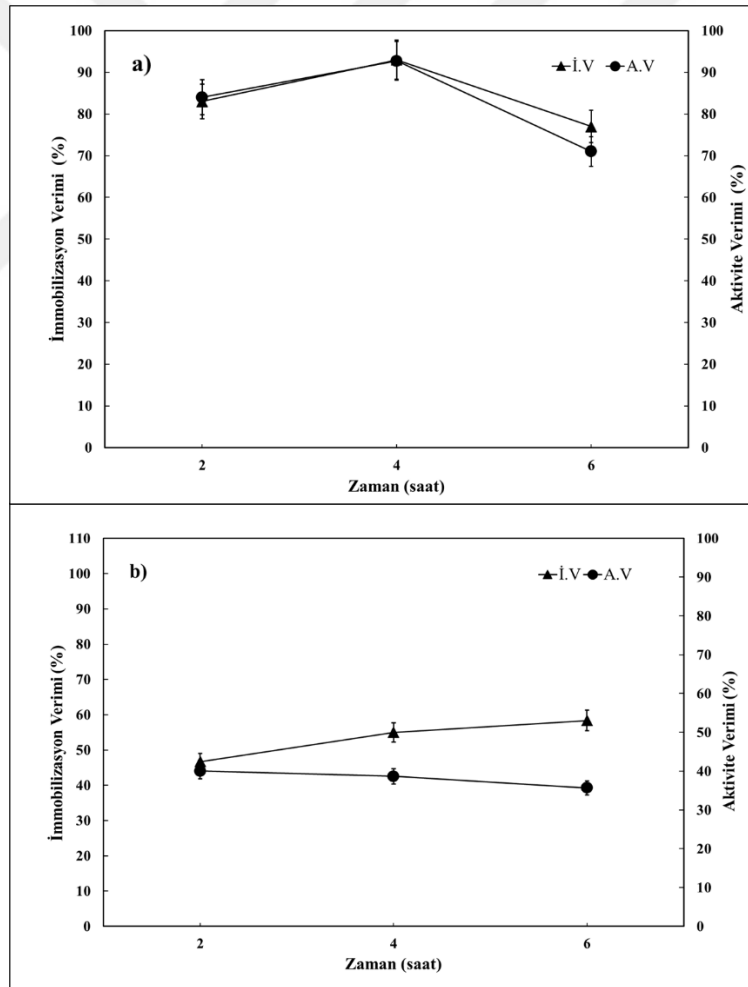
Elektrostatik çekim kuvvetleri negatif yüklü protein kalıntıları ile pozitif yüklü amino grupları arasındaki etkileşimi sağlamaktadır. İmmobilize lakkazın artan aktivitesi, adsorpsiyonla taşıyıcıya bağlanan farklı yüklerdeki diğer protein kalıntılarından kaynaklı olarak lakkazın substrata kolayca erişebilmesine de olanak tanır (Maghraby ve diğ., 2023). Literatürde optimum protein miktarının belirlenmesinde ifade edilen değerler mg/L, mg/g ya da U/mg gibi farklı şekillerde verilebilmektedir.

4.7.7. Lakkaz İmmobilizasyonunda Optimum Zamanın Belirlenmesi

Kovalent bağlanma ve adsorpsiyon yöntemleriyle lakkaz enziminin immobilizasyonu için bir sonraki optimizasyon basamağı bağlanma için optimum zamanın belirlenmesidir. Bu aşamada yine denemeler sadece Cu-silika aerojel kullanılarak gerçekleştirildi. İmmobilizasyon zamanı için test edilen süre 2, 4 ve 6 saat olarak belirlendi. Kovalent bağlama metodu ile immobilize edilen Cu-silika aerojel için 2 saat immobilizasyon

zamanında immobilizasyon verimi %83, aktivite verimi ise %84 olarak hesaplandı. 6 saatlik immobilizasyonda bu değerler sırası ile %77 ve %71 ile ölçüldü. 4 saatlik immobilizasyon zamanında ise immobilizasyon ve aktivite verimlilik değerlerinin ikisi de %93 olarak ölçülerek en yüksek değerlere ulaşılmış olundu (Şekil 4.24 (a)).

İmmobilizasyon süresi kısa olduğunda glutaraldehit ile enzimin etkileşim süresi kısa olmaktadır. Süre kısa olduğunda enzim aktivitesindeki kayıp azdır. İmmobilizasyon süresinin uzamasıyla birlikte çapraz bağlı enzim miktarı artmış ve glutaraldehitin lakkaz üzerinde inhibisyonu da ortaya çıkmıştır. Aynı zamanda reaksiyon süresinin uzun olması nedeniyle taşıyıcı üzerinde immobilize edilen lakkaz, enzimle etkileşime girmemiş serbest haldeki glutaraldehit grupları ile reaksiyona girerek, lakkaz aktivitesinin azalmasına neden olabilir (Chen ve diğ., 2013; Jiang ve diğ., 2005; Wang ve diğ., 2014).



Şekil 4.25. Cu-Silika aerojele kovalent bağlama (a) ve adsorpsiyon (b) ile immobilize edilen lakkazın optimum zamanının belirlenmesi (İ.V: İmmobilizasyon verimliliği; A.V: Aktivite verimliliği)

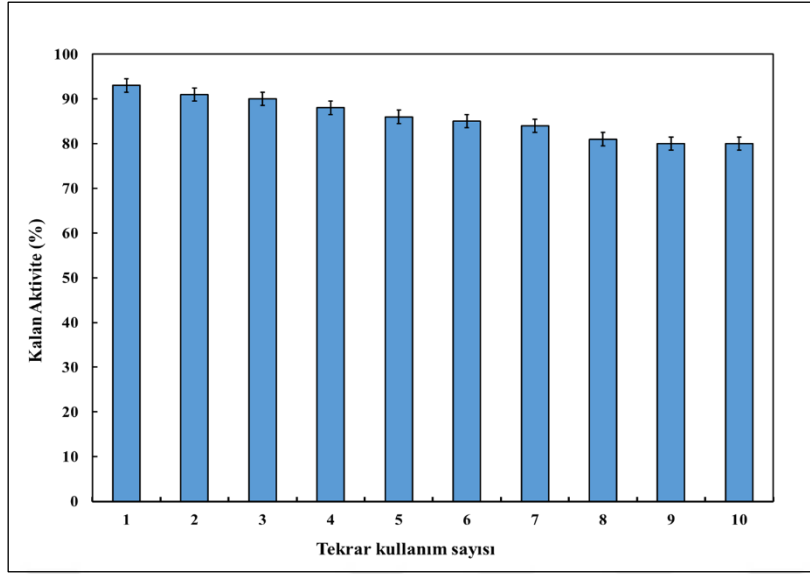
Adsorpsiyon metodu ile immobilize edilen Cu-silika aerogel için 2 saat immobilizasyon süresinde immobilizasyon verimi %47, aktivite verimi ise %40 olarak hesaplandı. 6 saat süren immobilizasyonda, immobilizasyon verimi %58 ölçülürken ki bu değer 2 ve 4 saat süren immobilizasyon ile ölçülen değerlerden daha yüksektir; aktivite verimi %36 ile tüm denemlerdeki en düşük değeri gösterdi. Hem immobilizasyon verimi hem de aktivite verimi değerleri açısından ele alındığında en uygun immobilizasyon zamanı, %55 immobilizasyon verimi ve %39 aktivite verimi ile 4 saat immobilizasyon süresi olarak belirlendi (Şekil 4.24 (b)). Hareketsizleştirme süresi aynı zamanda immobilizasyon lakkaz aktivitesini de önemli ölçüde etkilemektedir (Zheng ve diğ., 2016). İmmobilize enzimlerin aktivitesi, proteinin doğasına bağlı değişebilmektedir. Sürenin artmasıyla birlikte immobilizasyon sırasında lakkazın olası inaktivasyonu da artmaktadır. Bu arada lakkaz enziminin esnekliği de azalabilmektedir. (Huang ve diğ., 2017).

4.7.8. Optimum Koşullarda İmmobilize Edilmiş Lakkaz Enziminin Tekrar Kullanım Sayısı

T. versicolor lakkazı üç farklı destek materyaline (Silika aerogel, Mg-silika aerogel, Cu-silika aerogel) iki farklı bağlama yöntemi (Kovalent bağlama ve Adsorpsiyon) ile immobilize edildi. Yapılan deneysel çalışmalar *T. versicolor* lakkazının immobilizasyonu için en uygun desteğin Cu-silika aerogel olduğunu ve en uygun immobilizasyon metodunsa kovalent bağlama yöntemi olduğunu gösterdi. Sonuç olarak 12 mg/g lakkaz örneği kullanarak 25 °C ve pH 4,5'ta Cu-silika aerogel desteğine kovalent bağlama yoluyla 4 saat süren immobilizasyon sonunda %93 oranında verim sağlanmış olundu (Tablo 4.17). Lakkaz örneğinin belirlenen optimum koşullarda tekrar kullanılabilirliği ölçüldüğünde ise 10 defa kullanıldığında aktivitenin %80'inin korunmuş olduğu gözlemlendi (Şekil 4.25).

Tablo 4.17. Optimum immobilize lakkaz enzimi verim değerlerinin immobilizasyon metoduna göre karşılaştırılması

	Kovalent Bağlama		Adsorpsiyon	
	İmmobilizasyon verimi (%)	Aktivite verimi (%)	İmmobilizasyon verimi (%)	Aktivite verimi (%)
Cu-silika aerogel	93	93	55	39



Şekil 4.26. Cu-Silika aerojele kovalent bağlama metodu ile optimum koşullarda immobilize edilen lakkazın tekrar kullanım sayısı

Literatürde yer alan *T. versicolor* kaynaklı lakkaz enziminin immobilizasyonuna yönelik çalışmalar şu şekildedir:

Liu ve diğ., (2008) yaptıkları çalışmada lakkaz enzimini silanize edilmiş manyetik silika nanopartiküllerine glutaraldehit ile immobilize etmişlerdir. İmmobilize lakkazın 60 °C'de 4 saat sonra aktivitesi %61 olarak ölçülmüş, 10 işlem döngüsünden sonra %55'e düştüğü bulunmuştur. Bir diğer çalışmada $ZrO_2 - SiO_2 -$ lakkaz ve $ZrO_2 - SiO_2 / Cu^{+2} -$ lakkaz için sırasıyla %86 ve %94'e ulaşan immobilizasyon verimleri elde edilmiştir (Jankowska ve diğ., 2019). Başka bir çalışmada kitosan bazlı metal şelatlı kopolimer nanopartiküller sistem ile lakkaz enzimi immobilize edildiğinde, geniş pH ve sıcaklık profilleri ile serbest enzime göre daha iyi stabilite ve yeniden kullanılabilirlik sergilemiştir; sekiz kullanım sonrası, immobilize enzimin aktivitesi %50'nin üzerinde kalmıştır (Alver ve Metin, 2017). Bir diğer çalışmada, amino fonksiyonlu manyetik Fe_3O_4 nanopartikülleri, glutaraldehit çapraz bağlama yöntemi ile immobilize edilmiştir. İmmobilizasyon sonucu, sekiz işlem döngüsünden sonra bağlı aktivitenin %50'nin üzerinde korunmuş olduğu gözlenmiştir (Gao ve diğ., 2018). Manyetik gözenekli silika küreleri ile gerçekleştirilen immobilizasyonda %65,6 immobilizasyon verimi ve %56,9 aktivite verimine 12 saatlik immobilizasyon süresi, 25 °C sıcaklık ve pH 7,0 immobilizasyon koşullarında ulaşılmıştır. 10 döngü sonrası başlangıç aktivitesinin %70'nin korunduğu gösterilmiştir (Zhu ve diğ., 2007). Epoksi işlevselleştirilmiş manyetik kitosan boncukları ile yapılan

immobilizasyonda %81 immobilizasyon verimi ve %82,6 aktivite verimine 12 saatlik immobilizasyon süresi, 22 °C sıcaklık ve pH 5,0 immobilizasyon koşullarında ulaşılmıştır. 10 döngü sonrası kalan aktivite %87 olarak hesaplanmıştır (Bayramoğlu ve diğ., 2010). Silisli mezo-yapılı hücrese köpükler ile yapılan immobilizasyonda %52,2 immobilizasyon verimi ve %69 aktivite verimine 5 °C sıcaklık ve pH 5,5 immobilizasyon koşullarında ulaşılmıştır. 10 döngü sonrası kalan aktivite %65 bulunmuştur (Rekuc ve diğ., 2009). Manyetik çift modlu mezo-gözenekli karbon ile yapılan immobilizasyonda %19,6 immobilizasyon verimi ve %91 aktivite verimine 3 saatlik immobilizasyon süresi, 25 °C sıcaklık ve pH 4,0 immobilizasyon koşullarında ulaşılmıştır. 10 döngü sonrası kalan aktivite %50 ölçülmüştür (Liu ve diğ., 2012). Manyetik silika kompozit parçacıkları ile yapılan immobilizasyonda %31,3 immobilizasyon verimi ve %83,9 aktivite verimine 6 saatlik immobilizasyon süresi, 4 °C sıcaklık immobilizasyon koşullarında ulaşılmıştır. 10 döngü sonrası kalan aktivite %86,9 olarak hesaplanmıştır (Zheng ve diğ., 2012). Manyetik silika kompozit parçacıkları ile yapılan immobilizasyonda %72,6 immobilizasyon verimi ve %81,5 aktivite verimine 1 saatlik immobilizasyon süresi, 25 °C sıcaklık ve pH 3,0 immobilizasyon koşullarında ulaşılmıştır (Whang ve diğ., 2010). Modifiye silika materyali ile yapılan immobilizasyonda %50 immobilizasyon verimine 24 saatlik immobilizasyon süresi, 4 °C sıcaklık ve pH 6,0 immobilizasyon koşullarında ulaşılmıştır. 10 döngü sonrası kalan aktivite %70 olarak rapor edilmiştir (Tavares ve diğ., 2013). Silika nanopartikülleri ile gerçekleştirilen immobilizasyonda %75,8 immobilizasyon verimi ve %92 aktivite verimine 36 saatlik immobilizasyon süresi, 4 °C sıcaklık ve pH 5,0 immobilizasyon koşullarında ulaşılmıştır. 10 döngü sonrası kalan aktivite %82,5 olmuştur (Patel ve diğ., 2014a).

Literatürde yer alan çalışmalar ile kıyaslandığında bu tez çalışmasında elde edilen immobilizasyon verimi (%93), aktivite verimi (%93) ve tekrar kullanım sayısı (10) oldukça yüksek değerlerde elde edildi. Bu da tercih edilen immobilizasyon materyalinin ve immobilizasyon yönteminin etkili bir biçimde çalıştığını göstermektedir.

4.7.9. İmmobilize Lakkazın Karakterizasyonu

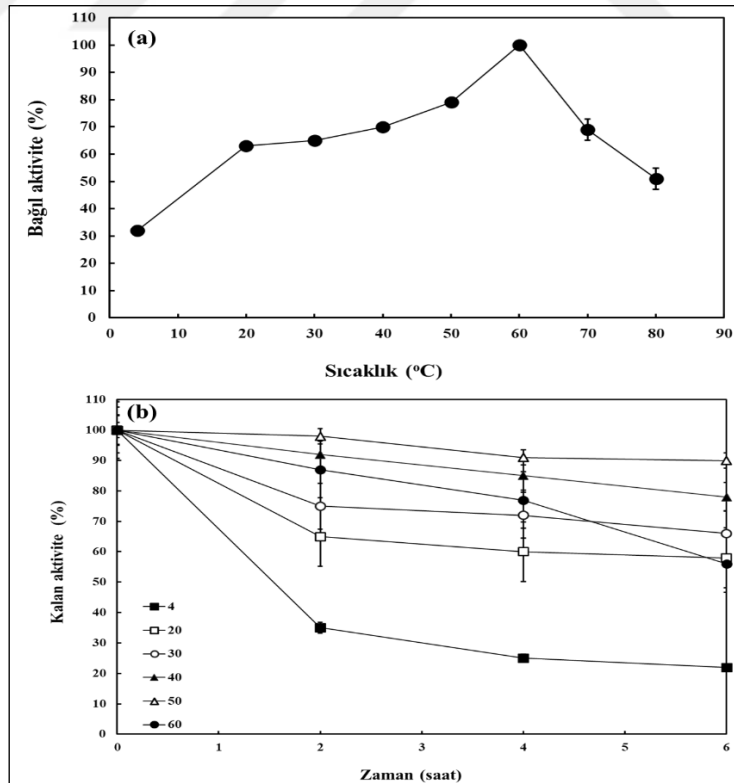
4.7.9.1. Sıcaklığın İmmobilize Lakkaz Aktivitesi ve Stabilitesine Etkisi

Optimum koşullarda immobilize edilen lakkaz enziminin karakterizasyonu için öncelikle sıcaklık profili çıkarıldı. Buna göre optimum sıcaklık değeri 60 °C olarak belirlendi (Şekil 4.26 (a)). En düşük aktivite değeri (%32) 4 °C’de ölçülürken 20, 30, 40, 50, ve 70 °C’de ölçülen aktivite değerleri %63 ila %79 arasında değiştiği gözlemlendi. 80 °C’de immobilize enzimin aktivitesinin %51 civarında ölçülmesi yüksek sıcaklıklarda dahi enzimin aktif olduğunu göstermektedir. Serbest enzimle karşılaştırıldığında optimum sıcaklık değerinde 10 °C’lik bir düşüş olduğu göze çarpmaktadır.

İmmobilize enzimin sıcaklık stabilite analizine göre enzimin en fazla dayanıklılık gösterdiği sıcaklık 50 °C olup 6 saate kadar başlangıçtaki aktivitesinin %90’nını koruyabilmektedir (Şekil 4.26 (b)). Ayrıca 30 °C ve 40 °C’de sırasıyla orijinal aktivitesinin %66 ve %78’inin 6 saat boyunca korunduğu tespit edildi. 20 °C ve 60 °C’de de aktivitesinin %50’sinden fazlasını koruyabilmektedir. Ancak 4 °C’de zamana bağlı olarak aktivitede hızlı bir düşüş gözlemlendi; 6 saat sonunda aktivitede yaklaşık %78 oranında kayıp gerçekleştiği bulundu. Serbest enzimin sıcaklığa karşı gösterdiği stabilite analiz bulguları (Şekil 4.6) ile karşılaştırıldığında serbest enzimin de 50 °C’de 6 saate kadar aktivitesinin %89’unun korunduğu ancak beklenildiği gibi diğer sıcaklıklarda immobilize enzimin sıcaklığa karşı daha dayanıklı olduğu gözlemlendi.

Yang ve diğ., (2021) yaptıkları çalışmada beyaz çürükçül mantardan elde edilen serbest lakkaz ile mezogözenekli silikaya immobilize ettikleri lakkazın optimum sıcaklık değerlerini sırasıyla 35 °C ve 40 °C olarak bulmuşlardır. Serbest enzime göre immobilize enzimin çalıştığı sıcaklık değerinde 5 °C’lik bir artış tespit etmişlerdir. Salami ve diğ., (2018) ise epoksi işlevselleştirilmiş silikaya immobilize ettikleri *Myceliophthora thermophila* lakkazının serbest ve immobilize halde optimum sıcaklığını 35 °C bulmuşlardır. Ancak, immobilize enzimin sıcaklığa karşı daha dayanıklı olduğunu gözlemlemişlerdir. Serbest enzimle karşılaştırıldığında 2 saat sonra immobilize enzim aktivitesinin 35 °C’de %80’ninin 40 °C’de ise %75’inin korunduğunu rapor etmişlerdir. Patel ve diğ., (2014a) gerçekleştirdikleri çalışmada *T. versicolor* lakkazının SiO₂ nanopartikülleri üzerinde immobilizasyonundan sonra, maksimum bağlı aktivite için

optimal sıcaklık değerinin 40 °C'den 45 °C'ye değiştiğini bildirmişlerdir. 50 °C ve 60 °C'de inkübasyon sonrası ölçülen enzim aktivite değerleri immobilize enzim için sırasıyla %78,5 ve %52,5, serbest lakkaz için %37,8 ve %32,2 olarak hesaplanmıştır. Benzer şekilde, immobilize lakkazın 50 °C ve 60 °C'de serbest enzime göre daha dayanıklı olduğu tespit edilmiştir. Guardado ve diğ., (2021) çalışmasında silikaya immobilize ettikleri ticari *T. versicolor* lakkazının serbest ve immobilize formu için optimum sıcaklık değerini 55 °C olarak bulmuşlardır. Optimum sıcaklık değerlerinde değişiklik olmamasına rağmen stabilite denemelerinde immobilize enzimin daha güçlü bir dayanıklılık profili gösterdiğini belirlemişlerdir. Buna göre, immobilize enzim serbest enzime göre daha geniş bir sıcaklık aralığında aktivitesinin yaklaşık %80'nini koruyabilmektedir. Mohammadi ve diğ., (2018) çalışmasında epoksi fonksiyonelleştirilmiş silikaya immobilize ettikleri *M. thermophila* lakkazının serbest haldeki formun 30 °C'de 1 saat süre inkübasyon sonunda aktivitesinin %76'sını korurken immobilize formun %100'ünü koruduğunu gözlemlemişlerdir. 35 °C'de ön inkübasyon sonrası ise enzimin serbest ve immobilize formunun arasındaki farkın iyice açıldığını, aktivitenin sırasıyla %35 ve %96'sının korunduğunu bulmuşlardır.



Şekil 4.27. Immobilize lakkaz enziminin (a) optimal sıcaklık profili ve (b) sıcaklık stabilitesi

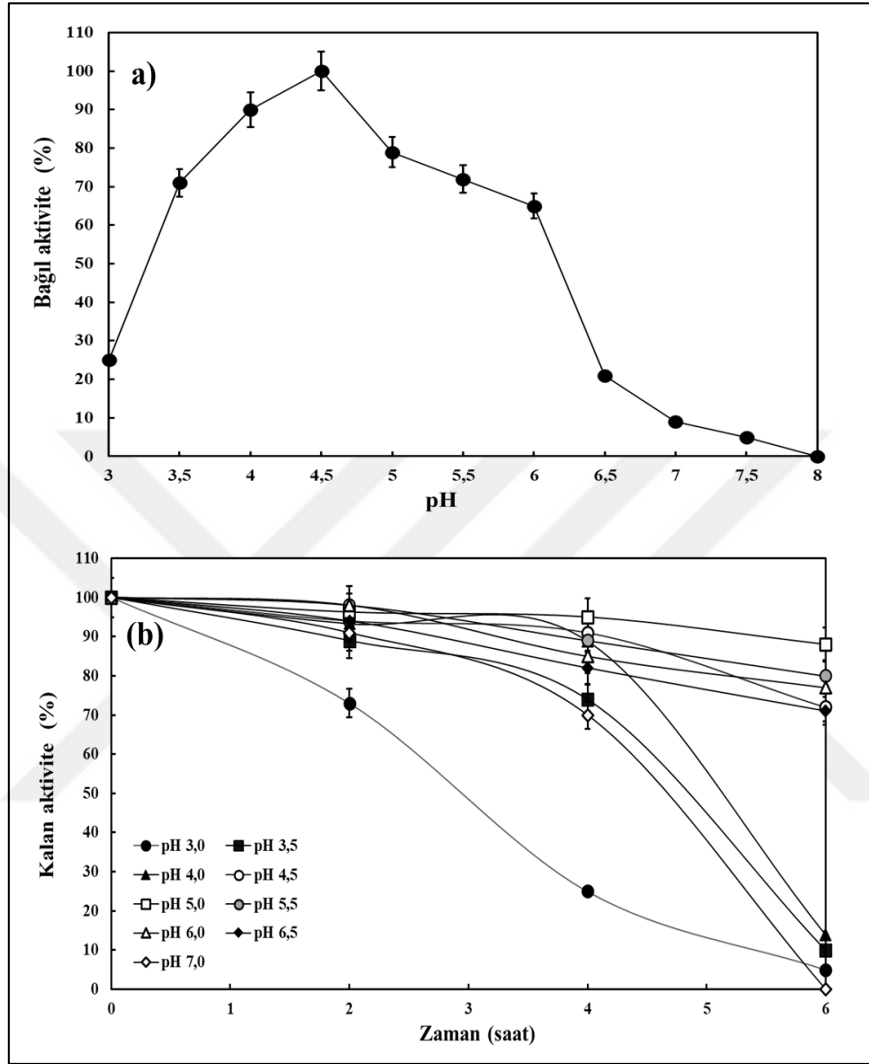
Bazı durumlarda, lakkaz enziminin immobilizasyon sonrasında aktif bölgesinin üç boyutlu yapısının değişerek stabiliteyi ve enzimin sıcaklığa uyum yeteneğinin arttığı belirtilmiştir. Bir enzimin bir destek üzerinde immobilizasyonu normalde enzimin serbest hareketlerini ve konformasyonel değişikliklerini sınırlar ve termal denatürasyona karşı stabilitenin artmasına neden olur (Amin ve diğ., 2020; Girelli ve diğ., 2020; Osma ve diğ., 2010). Yüksek sıcaklıklarda enzimler protein yapıda olmaları sebebiyle hızla denatürasyona uğrarlar. Ancak bir destek materyaline bağlandığında enzimle destek arasındaki etkileşim enzimin dinamikliğini azaltarak moleküler yapının değişmesini engeller dolayısıyla denatürasyondan korunmuş olur (Tran ve Balkus, 2011).

4.7.9.2. pH'nın İmmobilize Lakkaz Aktivite ve Stabilitesine Etkisi

İmmobilize enzimin optimal pH değerini belirlemek üzere pH 3,0 ile 8,0 arasında değişen tampon çözeltilerde aktivite analizleri gerçekleştirildi. Şekil 4.27 (a)'da gösterildiği üzere immobilize enzimin optimum pH'sı 4,5 bulundu. İmmobilize enzim pH 3,5 ile 6,0 arasında %65'in üzerinde aktivite gösterirken, pH 3,5'un altında ve pH 6,5 ve üzerinde aktivite %5 ile %25 oranında düşüş sergilediği gözlemlendi. Buna göre immobilize enzim pH 3,5-6,0 aralığında oldukça aktiftir. Serbest enzim ise nispeten daha dar pH aralığında aktiftir (Şekil 4.7).

İmmobilize enzimin farklı pH'larda hazırlanan tampon çözeltilerde zamana bağlı stabilitesindeki değişiklik analiz edildiğinde Şekil 4.27 (b)'de görüldüğü gibi pH 4,5 ile 6,5 arasında altı saatlik bir ön inkübasyon sonrasında orijinal aktivitesinin %71 ile %88'ini koruyabilmektedir. Ancak pH 7,0'de enzim altı saatte tamamen inaktif olmaktadır. Diğer taraftan aynı pH'da dört saat inkübe edilirse aktivitenin yaklaşık %70'ini koruyabilmektedir. pH 3,5 ve pH 4,0'da immobilize enzim dört saat aktif kalabilmektedir, ancak pH 3,0'da sadece iki saat boyunca enzim aktiftir. Serbest enzimle karşılaştırıldığında (Şekil 4.7 (b)), immobilize enzimin pH stabilitesinde az da olsa bazı farklılıklar göze çarpmaktadır. Örneğin, serbest enzim altı saat içinde pH 4,5'un altında tamamen inhibe olurken immobilize enzim %10-14 oranında aktivite göstermektedir. Ayrıca serbest enzim pH 4,5-6,5 arasında başlangıç aktivitesinin %65-85'ini (Şekil 4.7 (b)) korumaktadır ki immobilize formunun belirtilen pH'larda aktivitesi daha yüksektir. Yang ve diğ., (2021) mezogözenekli silikaya immobilize ettikleri beyaz çürükçül mantar kaynaklı lakkaz enziminin, bu çalışmaya benzer şekilde serbest formunun (pH 4,5) ve

immobilizasyon (pH 4,0) sonrası formunun optimum pH'sının değiştiğini gözlemlemiştir.



Şekil 4.28. İmmobilize lakkaz enziminin (a) optimal pH profili ve (b) pH stabilitesi

Başka bir çalışmada Salami ve diğ., (2018), epoksi işlevselleştirilmiş silikaya immobilize ettikleri *Myceliophthora thermophila* lakkazının serbest ve immobilize formunun maksimum aktivite değerlerini sırasıyla pH 4,0 ve pH 5,0'de ölçtüklerini belirtmişlerdir. Patel ve diğ., (2014b) ise silika nanopartiküllerine immobilize ettikleri *T. versicolor* lakkazının serbest formunun optimum pH değerini 3,0, immobilize formununkini ise 3,5 olarak bulmuşlardır. Ayrıca immobilize enzimin pH stabilitesinin daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Serbest enzimle karşılaştırıldığında immobilize lakkaz, pH 4,0- 5,0 ve 6,0'da %84,7, %66,8 ve %30,1'lik aktivite gösterirken serbest enzimin aynı pH'larda aktivitesi sırasıyla %59,1, %33,0 ve %7,2 olarak hesaplanmıştır. Yang ve diğ., (2016) ise

mezogözenekli silikaya immobilize ettikleri *Aspergillus sp.* lakkazının serbest formunun optimum çalışma pH değerini 5,8, immobilize formununkini ise 5,4 olarak ifade etmişler ve immobilize lakkazın optimum pH'sının asidik yönde hafifçe kaydığını göstermişlerdir. Guardado ve diğ., (2021) çalışmasında silikaya immobilize ettikleri *T. versicolor* lakkazının hem immobilize hem de serbest formunun pH 3,0'da optimum aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Ancak pH 6,0'da immobilize lakkazın bağıl aktivitesi, serbest lakkazınkinden ortalama %15 daha düşük çıkmıştır.

İmmobilize lakkazın ve onu çevreleyen mikro ortamın yüklü özellikleri değişiklik gösterebilmektedir. Reaksiyon sisteminin pH'sı çok yüksek veya çok düşük olduğunda lakkaz moleküllerinin mikro yapısı değişir ve bu da enzim aktivitesinin azalmasına neden olur. Lakkaz immobilizasyonundan sonra aktif bölgesinin bir kısmı taşıyıcıya sabitlenerek yapısal stabilitede artış gözlenmektedir. Bu şekilde pH'nın enzimin moleküler yapısına etkisi azaltılarak enzimin aktif grubunun belirli bir aralıkta etkilenmemesi sağlanabilir. Bu da daha geniş bir pH aralığına uyumu beraberinde getirir (Bebic ve diğ., 2020). İmmobilize enzimin pH değerinin serbest enzime göre azalmasının nedeni ise, mezo-gözenekli silikanın yüzeyindeki serbest amino gruplarından kaynaklanmaktadır. Bunlar, mezo-gözenekli silika taşıyıcı etrafındaki immobilize enzimin mikro ortamını zayıf alkaline hale getirmektedir ve bu nedenle, immobilize edilmiş silikanın en iyi çalışma pH'sını elde etmek için çözeltinin, serbest lakkazın optimum pH'sından daha düşük pH değerine sahip olması gerekir (Yang ve diğ., 2016).

4.7.9.3. İmmobilize Lakkazın Kinetik Parametreleri

İmmobilize enzimin kinetik sabitleri, K_m ve V_{max} değerleri, sırasıyla 2,6-DMP için 0,18 mM ve $178 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$ olarak hesaplanırken ABTS için 0,35 ve $278 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$ olarak belirlendi. Aynı substratlar için serbest enzim kullanarak belirlenen K_m ve V_{max} değerlerine bakıldığında immobilize enzimin K_m ve V_{max} değerlerinde önemli değişiklikler gözlemlendi. Örneğin immobilize enzimin her iki substrata olan ilgisinin serbest haldeki enzime göre azaldığı tespit edildi (Tablo 4.18). Ancak 2,6-DMP varlığında immobilize enzimin V_{max} değerinin yaklaşık üç kat arttığı gözlemlendi. ABTS için ise serbest enzimin V_{max} değeri daha yüksektir. Sonuçta enzimin serbest ve immobilize formu farklı substratlara karşı farklı davranış göstermektedir. Buna göre, serbest enzim için ABTS daha iyi substrat olarak gözlenirken immobilize enzim için 2,6-DMP tercih edilmelidir.

İmmobilizasyon sonrasında kinetik sabitlerde gözlenen değişimleri içeren birçok çalışma mevcuttur. Örneğin, *T. versicolor* lakkazının karragenan (bir çeşit deniz yosunu) bazlı yarı iç içe geçmiş polimer ağlarında lakkazın immobilizasyonunu içeren bir çalışmada $V_{\max}$ değeri serbest enzim için $1,08 \cdot 10^{-3}$ mM/dak olarak verilirken immobilize enzim için bu değer $6,8 \cdot 10^{-3}$ mM/dak olarak göstermiştir (Makas ve değ., 2010). Yarı iç içe geçmiş polimer ağlarında tuzaklama yöntemi ile yapılan bir başka immobilizasyon çalışmasında ise *T. versicolor* lakkazının $V_{\max}$ değeri serbest enzim için $1,8 \cdot 10^{-3}$ mM/dk olurken immobilize enzim için $6,1 \cdot 10^{-3}$ mM/dk olarak ifade edilmiştir (Yamak ve diğ., 2009). Bu örneklerde ve mevcut tez çalışmasında yer alan immobilize lakkazın $V_{\max}$ değeri serbest forma göre artış göstermiştir. Mevcut çalışmada immobilize enzimin 2,6-DMP substratına gösterdiği yüksek afinite göz önünde bulundurulduğunda $V_{\max}$ değerindeki artış anlamlı kabul edildi.

Tablo 4.18. Serbest lakkaz ve immobilize lakkaz enziminin kinetik sabitlerinin karşılaştırılması

	2,6-DMP		ABTS	
	K_m (mM)	$V_{\max}$ ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$)	K_m (mM)	$V_{\max}$ ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$)
Serbest enzim	0,10	69	0,20	500
İmmobilize enzim	0,20	178	0,35	278

Yang ve diğ., (2021) beyaz çürükçül mantardan elde edilen lakkaz enziminin mezogözenekli silikaya immobilizasyonu çalışmasında serbest lakkazın K_m değeri 32,9 mM olurken, tek adımlı ve iki adımlı yöntemle (glutaraldehitin ortama kademeli ya da tek seferde eklenmesi durumu) elde edilen immobilize enzimlerin K_m 'si sırasıyla 69,4 ve 47,3 mM olmuştur. Patel ve diğ., (2014) *T. versicolor* lakkazının silikaya immobilize edildiği bir başka çalışmada ABTS substratı ile yapılan ölçümlerde immobilize enzimin K_m değeri serbest enzime göre artış gösterirken $V_{\max}$ değerinde bir düşüş gözlenmiştir. *T. versicolor* lakkazının serbest formunun $V_{\max}$ ve K_m değerleri $1.890 \mu\text{mol/dak/mg}$ protein ve 29,3 mM olarak elde edilirken, immobilize formunun K_m değeri 46,5 mM değerine çıkarken $V_{\max}$ değeri $1.630 \mu\text{mol/dak/mg}$ değerine düşmüştür (Patel ve diğ., 2014a). K_m değerindeki artış, enzimin mikro ortamında meydana gelen değişiklik, aktif bölgenin sterik engeli, substrat bağlanması için gerekli enzim esnekliğinin kaybı veya substrat bölünmesine karşı difüzyon direncine bağlı olabilir (Jaiswal ve diğ., 2015). Ayrıca çeşitli

desteklere immobilize edilen lakkazların K_m değerlerinin arttığına dair benzer raporlar bulunmaktadır (Metin ve diğ., 2013). V_{max} değerinde gözlenen düşüş de immobilizasyon sonrasında karşılaşılabilen bir durumdur. İmmobilizasyon için enzim ve destek arasında kurulacak olan bağlara bazı enzim moleküllerinin aktif grupları aracılığıyla bağlanarak inaktivasyona uğraması sebebiyle olabilmektedir (Kumar ve diğ., 2009).

4.8. İmmobilize Lakkaz Enziminin Boyar Madde Giderimde Kullanımı

Bu bölümde serbest ve immobilize lakkaz enziminin seçilen boyar maddeler üzerindeki renk giderim kapasiteleri test edildi. Ayrıca immobilizasyon materyali olarak kullanılan Cu-silika aerogelinde renk gideriminin kendi başına bir etkisinin olup olmadığı da kontrol edildi.

Bu çalışmada kullanılan boyalardan metilen mavisi, kongo kırmızısı, malaşit yeşili ve metil kırmızısı azo sınıfı, fenol kırmızısı ve commasie brilliant blue G 250 ise trifenilmetan sınıfı boyar maddelerdir. Tekstil endüstrisinde boyar madde kullanımı ve kullanım sonrası süreç genellikle sularda kirliliğe neden olan, boya bakımından zengin bir atık oluşumu ile sonuçlanır (Ogugbue ve diğ., 2011). Bu tür boyaların ve bunların bileşenlerinin çoğu mutajen görevi görür ve kanserojen maddelerdir. Atık suyun koyu rengi, güneş ışığının su kütlelerine nüfuz etmesini engelleyerek, alglerdeki fotosentezi ve su kalitesini büyük bir şekilde etkiler ve besin zincirine zarar verir (Verma ve diğ., 2012). Bu ve benzeri sonuçlara karşı boyar maddelerin giderimi büyük bir önem arz etmektedir.

Tablo 4.19. Boya çeşitleri ve sınıfları

Boyarlar	Sınıf
Metilen Mavisi	Azo
Kongo Kırmızısı	Azo
Metil Kırmızısı	Azo
Malaşit Yeşili	Triarilmetan
C.Brilliant Blue G 250	Trifenilmetan
Fenol Kırmızısı	Trifenilmetan

Tablo 4.20’de verilen bilgilere bakıldığında serbest enzimle immobilize formunun bazı boyalar üzerindeki etkisi farklıdır. Örneğin, metilen mavisi, Commasie brilliant blue G-250, kongo kırmızısı ve fenil kırmızısı üzerinde immobilize enzim daha etkindir. Bunlardan özellikle metilen mavisi, Commasie brilliant blue G-250 ve kongo kırmızısının

24 saatte %95-%100'nün giderilmesinde etkili olduğu gözlemlendi. Fenol kırmızı üzerinde her iki enzim de etki göstermezken malaşit yeşilinin ancak %5-%10'nun giderimi sağlandı.

Tablo 4.20. Serbest ve immobilize lakkazın farklı sürelerde renk giderim yüzdeleri

Boyalar	6 (s)		12 (s)		18(s)		24 (s)		30 (s)	
	S.E	İ.E	S.E	İ.E	S.E	İ.E	S.E	İ.E	S.E	İ.E
Metilen Mavisi	47	69	54	77	62	89	65	95	65	95
Fenol Kırmızısı	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Malaşit Yeşili	5	10	5	10	5	10	5	10	5	10
C.Brilliant Blue G 250	40	66	47	70	53	83	64	100	62	100
Kongo Kırmızısı	47	59	55	67	68	88	83	100	83	100
Metil Kırmızısı	28	37	36	45	39	52	47	64	47	64

*S.E: Serbest enzim; İ.E: Immobilize enzim; s: saat; Boya konsantrasyonu: 200 mg/L

Tablo 4.21. Cu-silika aerogel destek materyalinin farklı sürelerde renk giderim yüzdeleri

Boyalar	6 (s)	12 (s)	18(s)	24 (s)	30 (s)
	D.M	D.M	D.M	D.M	D.M
Metilen Mavisi	33	44	55	55	55
Fenol Kırmızısı	10	10	13	23	23
Malaşit Yeşili	6	6	6	6	6
C.Brilliant Blue G 250	25	25	25	25	25
Kongo Kırmızısı	0	0	0	0	0
Metil Kırmızısı	28	19	21	21	21

*D.M: Destek materyali; s:saat

Serbest ve immobilize enzimin renk giderim kapasitesinin belirlenmesi için yapılan deneysel çalışmanın yanı sıra yalnızca destek materyalinin kendisinin renk giderim özelliğine sahip olup olmadığı da test edildi. Tablo 4.21' de yer alan sonuçlara göre Cu-silika aerogelin belirli oranlarda ve bazı boyalarda oldukça dikkat çekici bir oranda renk giderim özelliğine sahip olduğu tespit edildi. Serbest ve immobilize enzim için optimum renk giderim zamanı olan 24.saatte yalnızca destek materyalinin kullanıldığı renk giderim denemelerinde bu oran metilen mavisi için %55, commasie brilliant blue G-250 boyasında %25, fenol kırmızısında %23 ve metil kırmızısında %21 oldu. Literatürde serbest ve immobilize lakkazlara ait çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin; *T. versicolor* lakkazı kullanarak yapılan boya giderim çalışmasında 6 saat sonunda commasie brilliant

blue, kongo kırmızısı ve metilen mavisi boyalarının giderim oranları sırasıyla %20, %10 ve %20 bulunmuştur (boya konsantrasyonu 120 mg/L) (Forootanfar ve diğ., 2012).

Bu tez çalışmasında ise 6 saatlik sürede bu üç boya için giderim oranları çok daha yüksek olarak elde edildi. Epoksi veya karbonat grupları taşıyan akrilat bazlı mikro boncuklar üzerine immobilize edilen *T. versicolor* lakkazı kullanılarak yapılan başka bir çalışmada bir medyatör olan asetosiringon varlığında, immobilize edilmiş lakkaz tarafından metilen mavisi boyası için %100 olan giderim medyatör yokluğunda %63 olarak verilmiştir (Bayramoglu ve Arica, 2019). Bu literatür örneğinin mevcut tez çalışması ile karşılaştırılması da oldukça önemlidir. Çünkü bu tez çalışmasında metilen mavisi için tüm inkübasyon sürelerinde elde edilen renk giderim oranları (en düşüğü 6 saatte %69, en yükseği 24 saatte %95) medyatör ilavesi olmaksızın elde edildi. Bir başka çalışmada hem serbest hem de poliakrilamid jel içerisine immobilize edilen *T. versicolor* lakkazı kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada, 48 saatlik inkübasyon süresinde serbest lakkaz metil kırmızısının rengini %72,7 giderirken immobilize lakkaz metil kırmızısının rengini %89,8 gidermiştir (Goyat ve diğ., 2024). Kitosan/CeO₂ mikrokürelerine (glutaraldehitte aktive edilmiş) immobilize edilen *T. versicolor* lakkazı kullanılarak yapılan bir çalışmada ise metil kırmızısı (24 mg/L) renginin giderilme oranı 288. saatte %83,3 olarak belirlenmiş olup, bu oran serbest lakkaz varlığında %49,0 olarak ölçülmüştür (Lin ve diğ., 2015). Son iki örnekteki inkübasyon süreleri dikkate alındığında bu tez çalışmasında metil kırmızısı için 24 saatlik inkübasyonda serbest enzimde elde edilen %47 ve immobilize enzimde elde edilen %64 renk giderim oranı süre açısından oldukça avantajlı görülmektedir. Amino-fonksiyonellenmiş metal organik sisteme immobilizasyonu gerçekleştirilen *T. versicolor* lakkazı kongo kırmızısı (100 mg/L) boyasının ortamdan uzaklaştırılmasını %95 oranında sağlarken serbest lakkazın sadece %11,52'sini uzaklaştırabildiği rapor edilmiştir (Li ve diğ., 2023). *T. polyzona* WRF03 serbest lakkazı 6 saatlik inkübasyon sonucunda, coomassie brilliant blue boyasını %72, kongo kırmızısını %18, metilen mavisini ise %0,4 oranında gidermiştir (Ezike ve diğ., 2020). Mevcut tez çalışmasında kullanılan serbest enzim 6 saatlik inkübasyon süresinde kongo kırmızı ve metilen mavisinde oldukça üstün bir performans gösterdi. Bir başka çalışmada ise üçlü faz metodu ile saflaştırılan *Enterococcus faecium* A2 lakkazı 90 dakikalık inkübasyon süresinde kongo kırmızısı boyasına %35, metilen mavisi boyasına ise %15 renk giderme özelliği sergileyebilmiştir (Birge ve diğ., 2021). *Perenniforia tephropora*

lakkazının metilen mavisi ve malaşıit yeşili üzerinde herhangi bir renk giderme kapasitesine sahip olmadığı görülmüştür (Younes ve Sayadi, 2006). Aljinat-jelatin desteğine immobilize edilen *Brevibacterium halotolerans* N11 lakkazının serbest formunun kongo kırmızısını (50 mg/L) 40 °C'de pH 5,5'ta 24 saat sonra %85 oranında giderirken immobilize formunun 50 °C'de aynı pH'da neredeyse tümünün giderimini sağladığı önerilmiştir (Reda ve diğ., 2018). Tez çalışmasında elde edilen sonuçlara en yakın bulgu, Reda ve diğ. (2018) tarafından gerçekleştirilen çalışmada gösterilmektedir. Ancak burada daha yüksek sıcaklıkta boya gideriminin gerçekleştirilmesi tez çalışmasının oda sıcaklığında gerçekleşmesi açısından değerlendirildiğinde daha düşük maliyette benzer sonuç alınacağından tez çalışmasını öne çıkarmaktadır. Literatürde yer alan ve yukarıda verilen çalışmalar karşılaştırıldığında elde ettiğimiz serbest ve immobilize lakkaz enziminin 24 saatlik sürede metilen mavisi, commasie brilliant blue G-250 ve kongo kırmızısı üzerindeki renk giderim kapasitesi oldukça başarılıdır. Ayrıca 6 saatlik inkübasyon sürelerinin dikkate alınarak karşılaştırıldığı çalışmalarda (Forootanfar ve diğ., 2012; Ezike ve diğ., 2020) da performansı daha yüksektir.

Sentetik boyaların parçalanması lakkazın en önemli biyoteknolojik uygulamasıdır (Mogharabi ve diğ., 2012). Kullanılan boyaların kimyasal yapısı renk giderme yüzdesini etkileyen en önemli faktörlerden biridir (Gholami-Borujeni ve diğ., 2013). Azo boyalarının (kongo kırmızısı, metilen mavisi, metil kırmızısı vb.) lakkaz tarafından bozulması, azo bağının (-N = N-) asimetrik bölünmesiyle başlar ve ardından boya yapısına bağlı olarak oksidatif bölünme, desülfonasyon, deaminasyon ve dihidroksilasyonundan ileri gelir. (Yang ve diğ., 2015; Zheng ve diğ., 2016). Lakkaz, azo-boya yapılarını, kromoforik düzeneklerini müteakip serbest radikal oluşumuyla oksitleyerek parçalamaktadır (Chivukula ve Renganathan, 1995). Boyaların enzimatik bozulması, boyanın tamamen uzaklaştırılmasına izin veren alternatif bir yaklaşımdır (Suman ve diğ., 2021).

Lakkazın sentetik boyaların rengini giderebilme yeteneği boyanın yapısına bağlıdır. Çünkü biyolojik bozulma mekanizması buna göre değişir (Asgher ve diğ., 2008). Immobilize lakkazın yüksek sıcaklığa toleransı onu daha uzun süre stabil tutar ve renk giderme verimliliğini artırır. Ayrıca boyanın gideriminde enzimin yanında immobilizasyon materyalinin kullanımı da avantaj sağlamaktadır. Bu destekler

endüstriyel atık sularda bulunan çeşitli fenolik kirleticilerin ve endokrin bozucuların katalitik bozulmasında kullanılmaktadır ve dolayısıyla atık su arıtımında potansiyel olarak kullanılabilir. Bu afinite desteği aynı zamanda enzimi solvent kaynaklı inaktivasyona karşı da koruyabilir (Jan ve diğ., 2001). Bu açıdan ele alındığında Tablo 4.21’de yer alan Cu-silika aerogelin enzim olmadan gerçekleştirdiği renk giderim yüzdeleri oldukça dikkat çekicidir.

Diğer boya gruplarıyla karşılaştırıldığında trifenilmetan boyaları (malaşit yeşili, commasie brilliant blue) enzimatik işlemlere dirençlidir ve renk giderimi için daha uzun süreye ihtiyaç duyarlar (Eichlerova’ ve diğ., 2006). Bu tez çalışmasında da görüldüğü üzere malaşit yeşili lakkaza karşı oldukça dirençli bir özellik sergilemiştir fakat commasie brilliant blue boyası %100 oranında giderilmiştir. Bazı lakkaz enzimler bir medyatör varlığında renk giderim özelliğini daha iyi sergileyebilmektedir. Örneğin, HBT (1-hydroxybenzotriazole) yokluğunda, serbest lakkaz kongo kırmızısını yalnızca %43 oranında renksizleştirmeyi başarırken, hareketsiz lakkazın her iki formu da diazo boyasının rengini kısmen giderebilmiştir. Nanopartiküle immobilize lakkaz, HBT'nin yokluğuna kıyasla HBT'nin varlığında diazo boyasının rengini daha etkili bir şekilde gidermiştir (Sadighi ve diğ., 2013). Bu tez çalışmasında ise kongo kırmızısı boyasının herhangi bir medyatöre ihtiyaç duyulmadan serbest enzimle %83 immobilize enzimle ise %100 oranında giderilmiştir (Tablo 4.20).

Bir biyokatalizör olarak immobilize edilmiş lakkazın etkinliğini değerlendirmek için, immobilize edilmiş türevlerin serbest enzimle karşılaştırılması da oldukça uygundur. Bu çalışmada immobilize enzim, serbest lakkaza göre boyalar üzerinde daha etkin sonuçlar verdi. Buna göre, lakkazın immobilizasyonu, sistemin çalıştırılmasının daha kolay olması, enzimin yeniden kullanılabilmesi ve proses maliyetinin düşürülmesi nedeniyle boya renk gideriminde daha etkin kullanılabilir (Peralta-Zamora ve diğ., 2003).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında öncelikle *T. versicolor*'dan lakkaz enzimi (5000 U/L), optimum koşullarda (Ana kültür besiyeri: 0,4 g/L K_2HPO_4 , 25 g/L malt özütü, 2 g/L KH_2PO_4 ; Sıcaklık: 30 °C; Çalkalama hızı: 200 RPM, inkübasyon süresi: 9 gün) üretildi. Ardından fermentasyon sıvısı alınarak %20 (a/a) amonyum sülfat ve 2,0:1,0 oranında ham ekstrakt:t-bütanol hazırlanan ÜFA sistemi kullanarak %204 geri kazanımla 2,3 kat saflaştırıldı. Lakkaz örneğinin saflığı SDS-PAGE ve Native-PAGE ile kontrol edildi. Enzimin optimum sıcaklığı 70 °C (guakol, ABTS ve 2,6-DMP), optimum pH'sı ise kullanılan substrata göre değişmekle birlikte guakol için pH 5,5, ABTS için pH 4,0 ve 2,6-DMP için pH 5,0 olarak bulundu. Enzimin sıcaklık ve pH stabilitesi araştırıldığında substrata bağlı olarak geniş aralıkta aktif olduğu gözlemlendi. Guakol ($K_m=3,8$ mM; $V_{max}=5,3$ $\mu\text{mol dak}^{-1} \text{ mL}^{-1}$), ABTS ($K_m=0,2$ mM; $V_{max}=500$ $\mu\text{mol dak}^{-1} \text{ mL}^{-1}$) ve 2,6-DMP ($K_m=0,1$ mM; $V_{max}=68,4$ $\mu\text{mol dak}^{-1} \text{ mL}^{-1}$) için kinetik parametreler belirlendi. Buna göre enzimin test edilen substratlara gösterdiği afinitenin 2,6-DMP>ABTS>guakol şeklinde olduğu tespit edildi. Farklı inhibitör ve metal iyonları varlığında enzimin aktivitesi incelendiğinde, β -merkaptetanolün güçlü bir inhibitör olduğu gözlemlendi. EDTA'nın ise düşük seviyede inhibisyona neden olduğu belirlendi. Metal iyonlarından $MnSO_4$ ve $NiSO_4$ 'ün aktivatör olarak işlev gördüğü, ancak KCl, NaCl, $FeSO_4$ ve $CaCl_2$ 'nin 5 mM konsantrasyonda aktivitede %94 ila %100'e kadar inhibisyona sebep olduğu belirlendi. Diğer taraftan, $MgSO_4$ ve $CuSO_4$ ise aktivitede önemli değişikliğe sebep olmadı. SDS, Triton-100, Tween-20 ve Tween-80 gibi sürfaktanların lakkaz üzerindeki etkileri farklılık gösterdi. Bunlardan SDS, enzimi tamamen inhibe ederken Triton-100, Tween-20 ve Tween-80 test edilen düşük konsantrasyonda (%1, v/v) yaklaşık %50, yüksek konsantrasyonda (%5, v/v) ise %58-70 oranında inhibisyona sebep oldu. Lakkaz enziminin organik çözücüler varlığında stabilitesi test edildiğinde ise enzimin kullanılan çözücülere karşı dayanıklılık sırası metanol > kloroform > DMSO > etanol > izopropanol şeklinde olduğu belirlendi.

ÜFA tekniği ile saflaştırılan ve biyokimyasal özellikleri belirlenen lakkaz enziminin daha sonra destek materyali olarak sentezlenen ve BET, FT-IR, partikül boyut, TEM, X-IFS ve zeta potansiyel analizi yapılarak karakterize edilen silika aerogel, Mg-silika aerogel ve Cu-silika aerojellere optimum koşullarda immobilizasyonu çalışıldı. Sentezlenen

aerogellerden silika aerogel 535 m²/g Mg-silika aerogel 437 m²/g, Cu silika aerogel ise 370 m²/g yüzey alanına sahiptir. Ayrıca gözenek çapları sırası ile 0,18-0,26 ve 0,53 cm³/g, gözenek çapları ise 3,85-3,70 ve 5,91 nm olarak elde edildi. Her üç aerogelinde azot adsorpsiyon/desorpsiyon izotermine göre Tip IV izotermi sergilediği ve mezogözenekli yapıda oldukları tespit edildi. Başarılı bir şekilde sentezlenen aerogellere kovalent ve adsorpsiyon yöntemiyle immobilizasyon denemeleri yapıldı. En iyi sonuç Cu-silika aerogel desteğinde kovalent bağlama yöntemi ile gerçekleşti. Optimum immobilizasyon koşulları 4 saat, 25 °C sıcaklık, pH 4,5 ve 12 mg/g lakkaz olarak belirlendi. Bu koşullar altında *T. versicolor* lakkazı %93 immobilizasyon verimi ve %93 aktivite verimi ile immobilize edildi. 10 tekrar kullanım sonucunda aktivitesinin %80'inin korunmuş olduğu gözlemlendi (Şekil 4.25).

İmmobilize enzimin biyokimyasal özellikleri şu şekildedir: Optimum reaksiyon sıcaklığı 60 °C, optimum pH 4,5, K_m ve V_{max} değerleri ABTS substratı için sırasıyla 0,35 mM ve 278 µmol min⁻¹ mL⁻¹, 2,6-DMP için sırasıyla 0,2 mM ve 178 µmol min⁻¹ mL⁻¹'dir. İmmobilize lakkaz enzimi serbest enzime göre 70 °C değerine kadar olan sıcaklıkların tümünde daha yüksek % bağıl aktivite sergiledi. 50 °C sıcaklıkta 6 saat boyunca immobilize lakkaz enzimi aktivitesinin %90'ını, serbest enziminde %89'unu koruduğu tespit edilirken aynı sürede diğer tüm sıcaklıklarda immobilize lakkaz enziminin daha stabil olduğu görüldü. İmmobilize enzimin serbest enzime göre daha geniş pH aralığında aktivite gösterdiği görülürken immobilize enzimin pH 4,5 altında ve pH 4,5-6,5 değerleri arasında daha stabil olduğu tespit edildi. İmmobilize enzimin bir diğer dikkat çekici özelliği ise 2,6-DMP substratında V_{max} değerinin serbest enzime göre oldukça yüksek olmasıdır (Tablo 4.18).

Son olarak serbest enzim ve immobilize enzimin metilen mavisi, kongo kırmızısı, malaşit yeşili, metil kırmızısı, fenol kırmızısı ve commasie brilliant blue G 250 boyaalarının giderimindeki etkinliği araştırıldı. İmmobilize enzim commasie brilliant blue G 250 ve kongo kırmızısı boyaalarını 24 saat sonra %100 giderirken serbest enzim için bu değerler sırasıyla %64 ve %83 oldu. Ayrıca immobilize enzim metilen mavisi boyasını 24 saat sonunda %95 serbest enzim ise %65 oranında giderdi (Tablo 4.20). Bir diğer dikkat çekici bulgu ise Cu-silika aerogelin enzim ilavesiz olarak 24 sonunda metilen mavisini %55

commasie brilliant blue g 250 boyasını %25, fenol kırmızısını %23 ve son olarak metil kırmızısını %21 oranında gidermedir.

Birden çok destek materyali kullanılarak iki farklı yöntemle immobilizasyon optimizasyonu gerçekleştirilen bu deneysel çalışma sonrası elde edilen immobilize lakkaz enzimi gerek immobilizasyon verimliliği ve aktivite verimliliği açısından gerekse de yüksek boya giderim etkinliği açısından potansiyel bir endüstriyel ürün özelliği taşımaktadır. *T. versicolor* lakkazının ilk defa Mg-silika aerogel ve Cu-silika aerojele immobilizasyonunun gerçekleştirildiği bu çalışmada literatüre bu açıdan da katkı sağlanacağı düşünülmektedir. Üretimi gerçekleştirilen ve boyar madde gideriminde enzim ilavesiz olarak da etkisi olduğu gözlenen Cu-silika aerogelin etkinliğinin gözlenmesi açısından da bu çalışma önemli bir rol oynamıştır.

Bu tez çalışmasının, enzim immobilizasyonu ve endüstriyel boyar madde giderimi gibi çeşitli çalışma alanlarında yeni immobilize enzim ve destek materyallerinin tasarımına katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Bu çalışma da elde edilen veri ve birikimlerle fonksiyonelleştirme sonrası daha geniş yüzey alanına sahip olabilecek Cu-silika aerogel üretimi optimize edilebilir ve farklı sınıf boyar maddeler üzerine çalışmalar yapılabilir. Ayrıca silika aerogel ve Mg-silika aerogelin de dahil olduğu yeni bir optimizasyon çalışması ile enzim ilavesiz olacak şekilde yalnızca geniş yüzey alanına sahip destek materyalleri kullanılarak farklı sınıf boyar maddeler üzerinde renk giderim çalışmaları da yapılabilir.

KAYNAKLAR

- Abd El Monssef, R. A., Hassan, E. A., Ramadan, E. M. (2016). Production of Laccase Enzyme for Their Potential Application to Decolorize Fungal Pigments on Aging Paper and Parchment. *Annals of Agricultural Sciences*, 61(1), 145-154.
- Ademakinwa, A. N., Agboola, F. K. (2016). Biochemical Characterization and Kinetic Studies on A Purified Yellow Laccase From Newly Isolated Aureobasidium Pullulans NAC8 Obtained From Soil Containing Decayed Plant Matter. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 14(1), 143-151.
- Aegerter, M. A., Leventis, N., Koebel, M. M. (2011). Advances in Sol-Gel Derived Materials and Technologies. *Aerogels Handbook; Springer: New York, NY, USA*.
- Al-Adhami, A. J., Bryjak, J., Greb-Markiewicz, B., Peczyńska-Czoch, W. (2002). Immobilization of Wood-Rotting Fungi Laccases on Modified Cellulose and Acrylic Carriers. *Process Biochemistry*, 37(12), 1387-1394.
- Alici, E. H., Arabaci, G. (2016). Determination of SOD, POD, PPO and Cat Enzyme Activities in Rumex Obtusifolius L. *Annual Research Review in Biology*, 11(3), 1-7.
- Alnaief, M., Smirnova, I. (2010). Effect of Surface Functionalization of Silica Aerogel on Their Adsorptive and Release Properties. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 356(33-34), 1644-1649.
- Al-Tohamy, R., Ali, S. S., Li, F., Okasha, K. M., Mahmoud, Y. A. G., Elsamahy, T., Sun, J. (2022). A Critical Review on The Treatment of Dye-Containing Wastewater: Ecotoxicological and Health Concerns of Textile Dyes and Possible Remediation Approaches For Environmental Safety. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 231, 113160.
- Alver, E., Metin, A. Ü. (2017). Chitosan Based Metal-Chelated Copolymer Nanoparticles: Laccase Immobilization and Phenol Degradation Studies. *International Biodeterioration Biodegradation*, 125, 235-242.
- Alves, P., Dias, D. A., Pontinha, A. D. R. (2022). Silica Aerogel-Rubber Composite: A Sustainable Alternative For Buildings' Thermal Insulation. *Molecules*, 27(20), 7127.
- Ambrozewicz, D., Ciesielczyk, F., Nowacka, M., Karasiewicz, J., Piasecki, A., Maciejewski, H., Jesionowski, T. (2013). Fluoroalkylsilane Versus Alkylsilane As Hydrophobic Agents For Silica and Silicates. *Journal of Nanomaterials*, 2013, 18-18.
- Amin, R., Khorshidi, A., Bensch, W., Senkale, S., Faramarzi, M. A. (2020). Degradation of Sesame Oil Phenolics Using Magnetic Immobilized Laccase. *Catalysis Letters*, 150, 3086-3095.

- Amiri, T. Y., Moghaddas, J. (2015). Cogeled Copper–Silica Aerogel As A Catalyst in Hydrogen Production From Methanol Steam Reforming. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(3), 1472-1480.
- Arora, D. S., Sandhu, D. K. (1987). Decomposition of Angiospermic Wood Sawdust and Laccase Production by Two Pleurotus Species. *Journal of Basic Microbiology*, 27(4), 179-184.
- Asgher, M., Bhatti, H. N., Ashraf, M., Legge, R. L. (2008). Recent Developments In Biodegradation of Industrial Pollutants by White Rot Fungi and Their Enzyme System. *Biodegradation*, 19, 771-783.
- Asgher, M., Noreen, S., Bilal, M. (2017). Enhancement of Catalytic, Reusability, and Long-Term Stability Features of Trametes Versicolor IBL-04 Laccase Immobilized on Different Polymers. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 54-62.
- Asmussen, R. M., Matyáš, J., Qafoku, N. P., Kruger, A. A. (2019). Silver-Functionalized Silica Aerogels and Their Application in The Removal of Iodine From Aqueous Environments. *Journal of Hazardous Materials*, 379, 119364.
- Azat, S., Korobeinyk, A. V., Moustakas, K., Inglezakis, V. J. (2019). Sustainable Production of Pure Silica From Rice Husk Waste in Kazakhstan. *Journal of Cleaner Production*, 217, 352-359.
- Badgujar, K. C., Pai, P. A., Bhanage, B. M. (2016). Enhanced Biocatalytic Activity of Immobilized Pseudomonas Cepacia Lipase Under Sonicated Condition. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39, 211-221.
- Bagewadi, Z. K., Mulla, S. I., Ninnekar, H. Z. (2017). Purification and Immobilization of Laccase From Trichoderma Harzianum Strain HZN10 and Its Application in Dye Decolorization. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1), 139-150.
- Baimenov, A., Berillo, D. A., Pouloupoulos, S. G., Inglezakis, V. J. (2020). A Review of Cryogels Synthesis, Characterization and Applications on The Removal of Heavy Metals From Aqueous Solutions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 276, 102088.
- Baldrian, P. (2006). Fungal Laccases—Occurrence and Properties. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(2), 215-242.
- Banjanac, K., Mihailović, M., Prlainović, N., Stojanović, M., Carević, M., Marinković, A., Bezbradica, D. (2016). Cyanuric Chloride Functionalized Silica Nanoparticles For Covalent Immobilization of Lipase. *Journal of Chemical Technology Biotechnology*, 91(2), 439-448.

- Bao, W., Peng, R., Zhang, Z., Tian, Y., Zhao, W., Xue, Y., ... Yao, Q. (2012). Expression, Characterization and 2, 4, 6-Trichlorophenol Degradation of Laccase From *Monilinia Fructigena*. *Molecular Biology Reports*, 39, 3871-3877.
- Bautista, L. F., Morales, G., Sanz, R. (2010). Immobilization Strategies For Laccase From *Trametes Versicolor* on Mesostructured Silica Materials and The Application To The Degradation of Naphthalene. *Bioresource Technology*, 101(22), 8541-8548.
- Bawaked, S., Narasimharao, K. (2020). Structural and Catalytic Properties of Copper Silicate Nanomaterials. *Scientific Reports*, 10(1), 518.
- Bayraktar, H., Önal, S. (2013). Concentration and Purification of A-Galactosidase From Watermelon (*Citrullus Vulgaris*) by Three Phase Partitioning. *Separation and Purification Technology*, 118, 835-841.
- Bayramoglu, G., Arica, M. Y. (2019). Biodegradation of Methylene Blue and Carbaryl by *Trametes Versicolor* Laccase Preparations in The Presence of A Mediator Compound. *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 56(3), 277-285.
- Bayramoglu, G., Yilmaz, M., Yakup Arica, M. (2010). Preparation and Characterization of Epoxy-Functionalized Magnetic Chitosan Beads: Laccase Immobilized For Degradation of Reactive Dyes. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 33, 439-448.
- Bebić, J., Banjanac, K., Ćorović, M., Milivojević, A., Simović, M., Marinković, A., Bezbradica, D. (2020). Immobilization of Laccase From *Myceliophthora Thermophila* on Functionalized Silica Nanoparticles: Optimization and Application in Lindane Degradation. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 28(4), 1136-1144.
- Ben Younes, S., Mechichi, T., Sayadi, S. (2007). Purification and Characterization of The Laccase Secreted by The White Rot Fungus *Perenniporia Tephropora* and Its Role in The Decolourization of Synthetic Dyes. *Journal of Applied Microbiology*, 102(4), 1033-1042.
- Bento, R. M., Almeida, M. R., Bharmoria, P., Freire, M. G., Tavares, A. P. (2020). Improvements in The Enzymatic Degradation of Textile Dyes Using Ionic-Liquid-Based Surfactants. *Separation and Purification Technology*, 235, 116191.
- Bertrand, B., Martínez-Morales, F., Tinoco-Valencia, R., Rojas, S., Acosta-Urdapilleta, L., Trejo-Hernández, M. R. (2015). Biochemical and Molecular Characterization of Laccase Isoforms Produced by The White-Rot Fungus *Trametes Versicolor* Under Submerged Culture Conditions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 122, 339-347.
- Bhagat, S. D., Oh, C. S., Kim, Y. H., Ahn, Y. S., Yeo, J. G. (2007). Methyltrimethoxysilane Based Monolithic Silica Aerogels Via Ambient Pressure Drying. *Microporous and Mesoporous Materials*, 100(1-3), 350-355.

- Bhat, M. (2000). Cellulases and Related Enzymes in Biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18(5), 355-383.
- Bilal, M., Adeel, M., Rasheed, T., Zhao, Y., Iqbal, H. M. (2019). Emerging Contaminants of High Concern and Their Enzyme-Assisted Biodegradation—A Review. *Environment International*, 124, 336-353.
- Bilgin, N. (2008). Pirinç Kabuğu Külünden Üretilen Magnezyum Silikatın Yüzey Alanını Etkileyen Parametrelerin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 252209.
- Birge, A., Alcicek, E. A., Baltaci, M. O., Sisecioglu, M., Adiguzel, A. (2022). Purification and Biochemical Characterization of A New Thermostable Laccase From *Enterococcus Faecium* A2 by A Three-Phase Partitioning Method and Investigation of Its Decolorization Potential. *Archives of Microbiology*, 204(8), 533.
- Bollag, J. M., Shuttleworth, K. L., Anderson, D. H. (1988). Laccase-Mediated Detoxification of Phenolic Compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(12), 3086-3091.
- Bourbonnais, R., Paice, M. G., Freiermuth, B., Bodie, E., Borneman, S. (1997). Reactivities of Various Mediators and Laccases With Kraft Pulp and Lignin Model Compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(12), 4627-4632.
- Brandi, P., D'Annibale, A., Galli, C., Gentili, P., Pontes, A. S. N. (2006). In Search For Practical Advantages From The Immobilisation of An Enzyme: The Case of Laccase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 41(1-2), 61-69.
- Brena, B. M., Batista-Viera, F. (2006). Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. *Immobilization of Enzymes and Cells*, 15-30.
- Brinker, C. J., Scherer, G. W. (2013). *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*. Academic Press.
- Cabana, H., Ahamed, A., Leduc, R. (2011). Conjugation of Laccase From The White Rot Fungus *Trametes Versicolor* To Chitosan and Its Utilization For The Elimination of Triclosan. *Bioresource Technology*, 102(2), 1656-1662.
- Chairin, T., Nitheranont, T., Watanabe, A., Asada, Y., Khanongnuch, C., Lumyong, S. (2014). Purification and Characterization of The Extracellular Laccase Produced by *Trametes Polyzona* WR710–1 Under Solid-State Fermentation. *Journal of Basic Microbiology*, 54(1), 35-43.
- Chakroun, H., Mechichi, T., Martinez, M. J., Dhouib, A., Sayadi, S. (2010). Purification and Characterization of A Novel Laccase From The Ascomycete *Trichoderma Atroviride*: Application on Bioremediation of Phenolic Compounds. *Process Biochemistry*, 45(4), 507-513.

- Champagne, P. P., Ramsay, J. A. (2010). Dye Decolorization and Detoxification by Laccase Immobilized on Porous Glass Beads. *Bioresource Technology*, 101(7), 2230-2235.
- Chapman, J., Ismail, A. E., Dinu, C. Z. (2018). Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks. *Catalysts*, 8(6), 238.
- Chen, H., Zhang, Q., Dang, Y., Shu, G. (2013). The Effect of Glutaraldehyde Cross-Linking on The Enzyme Activity of Immobilized B-Galactosidase on Chitosan Bead. *Adv. J. Food Sci. Technol*, 5(7), 932-935.
- Chen, L., Yi, X., Deng, F., Fang, W., Zhang, X., Wang, X., ... Xiao, Y. (2016). A Novel Ethanol-Tolerant Laccase, Tvlac, From *Trametes Versicolor*. *Biotechnology Letters*, 38, 471-476.
- Chen, X., He, B., Feng, M., Zhao, D., Sun, J. (2020). Immobilized Laccase on Magnetic Nanoparticles For Enhanced Lignin Model Compounds Degradation. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 28(8), 2152-2159.
- Chivukula, M., Renganathan, V. (1995). Phenolic Azo Dye Oxidation by Laccase From *Pyricularia Oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(12), 4374-4377.
- Ciesielczyk, F., Krysztafkiewicz, A., Jesionowski, T. (2004). Influence of Precipitation Parameters on Physicochemical Properties of Magnesium Silicates. *Physicochemical Problems of Mineral Processing*, 38(1), 197.
- Cirillo, G., Nicoletta, F. P., Curcio, M., Spizzirri, U. G., Picci, N., Iemma, F. (2014). Enzyme Immobilization on Smart Polymers: Catalysis on Demand. *Reactive and Functional Polymers*, 83, 62-69.
- Cooney, D. G., Emerson, R. (1964). *Thermophilic Fungi* (Vol. 27). San Francisco WH Freeman
- Corrêa, P. S., Morais Júnior, W. G., Martins, A. A., Caetano, N. S., Mata, T. M. (2020). Microalgae Biomolecules: Extraction, Separation and Purification Methods. *Processes*, 9(1), 10.
- Costantini, A., Califano, V. (2021). Lipase Immobilization in Mesoporous Silica Nanoparticles For Biofuel Production. *Catalysts*, 11(5), 629.
- Daâssi, D., Alharbi, S. R. (2023). Degradation of Endocrine-Disrupting Chemicals in Wastewater by New Thermophilic Fungal Isolates and Their Laccases. *3 Biotech*, 13(1), 26.
- Daâssi, D., Rodríguez-Couto, S., Nasri, M., Mechichi, T. (2014). Biodegradation of Textile Dyes by Immobilized Laccase From *Coriolopsis Gallica* Into Ca-Alginate Beads. *International Biodeterioration Biodegradation*, 90, 71-78.

- Daoussi, R., Vessot, S., Andrieu, J., Monnier, O. (2009). Sublimation Kinetics and Sublimation End-Point Times During Freeze-Drying of Pharmaceutical Active Principle With Organic Co-Solvent Formulations. *Chemical Engineering Research and Design*, 87(7), 899-907.
- Datta, S., Christena, L. R., Rajaram, Y. R. S. (2013). Enzyme Immobilization: An Overview on Techniques and Support Materials. *3 Biotech*, 3, 1-9.
- Dennison, C., Lovrien, R. (1997). Three Phase Partitioning: Concentration and Purification of Proteins. *Protein Expression and Purification*, 11(2), 149-161.
- Desai, A. A. (2011). Sitagliptin Manufacture: A Compelling Tale of Green Chemistry, Process Intensification, and Industrial Asymmetric Catalysis. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(9), 1974-1976.
- Devasia, S., Nair, A. J. (2016). Screening of Potent Laccase Producing Organisms Based on The Oxidation Pattern of Different Phenolic Substrates. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 5(5), 127-137.
- Ding, Z., Chen, Y., Xu, Z., Peng, L., Xu, G., Gu, Z., Zhang, K. (2014). Production and Characterization of Laccase From *Pleurotus Ferulae* in Submerged Fermentation. *Annals of Microbiology*, 64, 121-129.
- Dogan, E. E., Yesilada, E., Ozata, L., Yologlu, S. (2005). Genotoxicity Testing of Four Textile Dyes in Two Crosses of *Drosophila* Using Wing Somatic Mutation and Recombination Test. *Drug and Chemical Toxicology*, 28(3), 289-301.
- Duman, Y. A., Kaya, E. (2013). Three-Phase Partitioning As A Rapid and Easy Method For The Purification and Recovery of Catalase From Sweet Potato Tubers (*Solanum Tuberosum*). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 170, 1119-1126.
- Duman, Y., Kaya, E. (2014). Purification and Recovery of Invertase From Potato Tubers (*Solanum Tuberosum*) by Three Phase Partitioning and Determination of Kinetic Properties of Purified Enzyme. *Turkish Journal of Biochemistry/Turk Biyokimya Dergisi*, 39(4).
- Dunn, B. C., Cole, P., Covington, D., Webster, M. C., Pugmire, R. J., Ernst, R. D., Huffman, G. P. (2005). Silica Aerogel Supported Catalysts For Fischer–Tropsch Synthesis. *Applied Catalysis A: General*, 278(2), 233-238.
- Durán, N., Rosa, M. A., D'Annibale, A., Gianfreda, L. (2002). Applications of Laccases and Tyrosinases (Phenoloxidases) Immobilized on Different Supports: A Review. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(7), 907-931.
- EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources Added To Food (ANS), Younes, M., Aggett, P., Aguilar, F., Crebelli, R., Dusemund, B., Lambré, C. (2018). Re-Evaluation of Silicon Dioxide (E 551) As A Food Additive. *Efsa Journal*, 16(1), E05088.

- Eichlerová, I., Homolka, L., Nerud, F. (2006). Synthetic Dye Decolorization Capacity of White Rot Fungus *Dichomitus Squalens*. *Bioresource Technology*, 97(16), 2153-2159.
- Eichlerová, I., Šnajdr, J., Baldrian, P. (2012). Laccase Activity in Soils: Considerations For The Measurement of Enzyme Activity. *Chemosphere*, 88(10), 1154-1160.
- El-Batal, A. I., Elkenawy, N. M., Yassin, A. S., Amin, M. A. (2015). Laccase Production by *Pleurotus Ostreatus* and Its Application in Synthesis of Gold Nanoparticles. *Biotechnology Reports*, 5, 31-39.
- End, N., Schöning, K. U. (2004). Immobilized Biocatalysts in Industrial Research and Production. *Immobilized Catalysts: Solid Phases, Immobilization and Applications*, 273-317.
- Ezike, T. C., Ezugwu, A. L., Udeh, J. O., Eze, S. O. O., Chilaka, F. C. (2020). Purification and Characterisation of New Laccase From *Trametes Polyzona* WRF03. *Biotechnology Reports*, 28, E00566.
- Fang, Z. M., Li, T. L., Chang, F., Zhou, P., Fang, W., Hong, Y. Z., Xiao, Y. Z. (2012). A New Marine Bacterial Laccase With Chloride-Enhancing, Alkaline-Dependent Activity and Dye Decolorization Ability. *Bioresource Technology*, 111, 36-41.
- Fang, Z., Liu, X., Chen, L., Shen, Y., Zhang, X., Fang, W., Xiao, Y. (2015). Identification of A Laccase Glac15 From *Ganoderma Lucidum* 77002 and Its Application in Bioethanol Production. *Biotechnology For Biofuels*, 8, 1-12.
- Fathali, Z., Rezaei, S., Faramarzi, M. A., Habibi-Rezaei, M. (2019). Catalytic Phenol Removal Using Entrapped Cross-Linked Laccase Aggregates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 122, 359-366.
- Feng, Q., Chen, K., Ma, D., Lin, H., Liu, Z., Qin, S., Luo, Y. (2018). Synthesis of High Specific Surface Area Silica Aerogel From Rice Husk Ash Via Ambient Pressure Drying. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 539, 399-406.
- Fernandez-Lafuente, R. (2009). Stabilization of Multimeric Enzymes: Strategies To Prevent Subunit Dissociation. *Enzyme and Microbial Technology*, 45(6-7), 405-418.
- Forootanfar, H., Moezzi, A., Aghaie-Khozani, M., Mahmoudjanlou, Y., Ameri, A., Niknejad, F., Faramarzi, M. A. (2012). Synthetic Dye Decolorization by Three Sources of Fungal Laccase. *Iranian Journal of Environmental Health Science Engineering*, 9, 1-10.

- Fortes, C. C., Daniel-Da-Silva, A. L., Xavier, A. M., Tavares, A. P. (2017). Optimization of Enzyme Immobilization on Functionalized Magnetic Nanoparticles For Laccase Biocatalytic Reactions. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 117, 1-8.
- Frasconi, M., Favero, G., Boer, H., Koivula, A., Mazzei, F. (2010). Kinetic and Biochemical Properties of High and Low Redox Potential Laccases From Fungal and Plant Origin. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1804(4), 899-908.
- Gagaoua, M., Hoggas, N., Hafid, K. (2015). Three Phase Partitioning of Zingibain, A Milk-Clotting Enzyme From Zingiber officinale Roscoe Rhizomes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 73, 245-252.
- Galvão, W. S., Pinheiro, B. B., Golçalves, L. R. B., De Mattos, M. C., Fonseca, T. S., Regis, T., Fechine, P. B. A. (2018). Novel Nanohybrid Biocatalyst: Application in The Kinetic Resolution of Secondary Alcohols. *Journal of Materials Science*, 53(20), 14121-14137.
- Gamallo, M., Moldes-Diz, Y., Eibes, G., Feijoo, G., Lema, J. M., Moreira, M. T. (2018). Sequential Reactors For The Removal of Endocrine Disrupting Chemicals by Laccase Immobilized onto Fumed Silica Microparticles. *Biocatalysis and Biotransformation*, 36(3), 254-264.
- Gao, S., Wang, Y., Wang, T., Luo, G., Dai, Y. (2009). Immobilization of Lipase on Methyl-Modified Silica Aerogels by Physical Adsorption. *Bioresource Technology*, 100(2), 996-999.
- Gao, Z., Yi, Y., Zhao, J., Xia, Y., Jiang, M., Cao, F., Yong, X. (2018). Co-Immobilization of Laccase and TEMPO onto Amino-Functionalized Magnetic Fe₃O₄ Nanoparticles and Its Application in Acid Fuchsin Decolorization. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1), 1-8.
- Gascón, V., Díaz, I., Márquez-Álvarez, C., Blanco, R. M. (2014). Mesoporous Silicas With Tunable Morphology For The Immobilization of Laccase. *Molecules*, 19(6), 7057-7071.
- Ghods, B., Rezaei, M., Meshkani, F. (2016). Synthesis of Nanostructured Magnesium Silicate With High Surface Area and Mesoporous Structure. *Ceramics International*, 42(6), 6883-6890.
- Gholami-Borujeni, F., Faramarzi, M. A., Nejatizadeh-Barandozi, F., Mahvi, A. H. (2013). Oxidative Degradation and Detoxification of Textile Azo Dye by Horseradish Peroxidase Enzyme. *Fresen Environ Bull*, 22, 739-744.
- Gianfreda, L., Xu, F., Bollag, J. M. (1999). Laccases: A Useful Group of Oxidoreductive Enzymes. *Bioremediation Journal*, 3(1), 1-26.

- Girelli, A. M., Quattrocchi, L., Scuto, F. R. (2020). Silica-Chitosan Hybrid Support For Laccase Immobilization. *Journal of Biotechnology*, 318, 45-50.
- Goyat, N., Kapoor, R. K., Saharan, B. S., Kapoor, P., Kumari, K., Singh, N. (2024). Production, Purification and Immobilization of Laccase From *Trametes Versicolor* HBB 7328 For Its Role in Decolorization of Textile Dyes. *Indian Journal of Microbiology*, 1-14.
- Gu, C., Zheng, F., Long, L., Wang, J., Ding, S. (2014). Engineering The Expression and Characterization of Two Novel Laccase Isoenzymes From *Coprinus Comatus* in *Pichia Pastori* S by Fusing An Additional Ten Amino Acids Tag At N-Terminus. *Plos One*, 9(4), E93912.
- Guardado, A. L. P., Druon-Bocquet, S., Belleville, M. P., Sanchez-Marcano, J. (2021). A Novel Process For The Covalent Immobilization of Laccases on Silica Gel and Its Application For The Elimination of Pharmaceutical Micropollutants. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 25579-25593.
- Gupta, N., Ricci, W. (2008). Processing and Compressive Properties of Aerogel/Epoxy Composites. *Journal of Materials Processing Technology*, 198(1-3), 178-182.
- Gurav, J. L., Jung, I. K., Park, H. H., Kang, E. S., Nadargi, D. Y. (2010). Silica Aerogel: Synthesis and Applications. *Journal of Nanomaterials*, 2010, 1-11.
- Hariu, T., Arima, H., Sugiyama, K. (2013). The Structure of Hydrated Copper-Silicate Gels, An Analogue Compound For Natural Chrysocolla. *Journal of Mineralogical and Petrological Sciences*, 108(2), 111-115.
- Hayase, G., Nagayama, S., Nonomura, K., Kanamori, K., Maeno, A., Kaji, H., Nakanishi, K. (2017). Fabrication of Hydrophobic Polymethylsilsesquioxane Aerogels by A Surfactant-Free Method Using Alkoxysilane With Ionic Group. *Journal of Asian Ceramic Societies*, 5(2), 104-108.
- He, Y., Luo, L., Liang, S., Long, M., Xu, H. (2017). Amino-Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles As Efficient Carriers For Anticancer Drug Delivery. *Journal of Biomaterials Applications*, 32(4), 524-532.
- Hernández-Maldonado, A. J., Stamatis, S. D., Yang, R. T., He, A. Z., Cannella, W. (2004). New Sorbents For Desulfurization of Diesel Fuels Via Π Complexation: Layered Beds and Regeneration. *Industrial Engineering Chemistry Research*, 43(3), 769-776.
- Homaei, A. A., Sariri, R., Vianello, F., Stevanato, R. (2013). Enzyme Immobilization: An Update. *Journal of Chemical Biology*, 6, 185-205.
- Hong, C. Q., Han, J. C., Zhang, X. H., Du, J. C. (2013). Novel Nanoporous Silica Aerogel Impregnated Highly Porous Ceramics With Low Thermal Conductivity and Enhanced Mechanical Properties. *Scripta Materialia*, 68(8), 599-602.

- Howarter, J. A., Youngblood, J. P. (2006). Optimization of Silica Silanization by 3-Aminopropyltriethoxysilane. *Langmuir*, 22(26), 11142-11147.
- Huang, D., Wang, X., Zhang, C., Zeng, G., Peng, Z., Zhou, J., ... Qin, X. (2017). Sorptive Removal of Ionizable Antibiotic Sulfamethazine From Aqueous Solution by Graphene Oxide-Coated Biochar Nanocomposites: Influencing Factors and Mechanism. *Chemosphere*, 186, 414-421.
- J Fricke, T Tillotson, Aerogels: Production, Characterization, and Applications, Thin Solid Films, Volume 297, Issues 1–2, 1997, Pages 212-223, ISSN 0040-6090, [https://doi.org/10.1016/S0040-6090\(96\)09441-2](https://doi.org/10.1016/S0040-6090(96)09441-2).
- Jaiswal, N., Pandey, V. P., Dwivedi, U. N. (2016). Immobilization of Papaya Laccase in Chitosan Led To Improved Multipronged Stability and Dye Discoloration. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86, 288-295.
- Jan, U., Husain, Q., Saleemuddin, M. (2001). Preparation of Stable, Highly Active and Immobilized Glucose Oxidase Using The Anti-Enzyme Antibodies and F (Ab)' 2. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 34(1), 13-17.
- Jankowska, K., Ciesielczyk, F., Bachosz, K., Zdarta, J., Kaczorek, E., Jesionowski, T. (2019). Laccase Immobilized onto Zirconia–Silica Hybrid Doped With Cu²⁺ As An Effective Biocatalytic System For Decolorization of Dyes. *Materials*, 12(8), 1252.
- Jaouani, A., Guillén, F., Penninckx, M. J., Martínez, A. T., Martínez, M. J. (2005). Role of Pycnoporus Coccineus Laccase in The Degradation of Aromatic Compounds in Olive Oil Mill Wastewater. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(4), 478-486.
- Jesionowski, T., Krysztafkiewicz, A. (2001). Influence of Silane Coupling Agents on Surface Properties of Precipitated Silicas. *Applied Surface Science*, 172(1-2), 18-32.
- Jesionowski, T., Zdarta, J., Krajewska, B. (2014). Enzyme Immobilization by Adsorption: A Review. *Adsorption*, 20, 801-821.
- Jiang, D. S., Long, S. Y., Huang, J., Xiao, H. Y., Zhou, J. Y. (2005). Immobilization of Pycnoporus Sanguineus Laccase on Magnetic Chitosan Microspheres. *Biochemical Engineering Journal*, 25(1), 15-23.
- Johannes, C., Majcherczyk, A. (2000). Laccase Activity Tests and Laccase Inhibitors. *Journal of Biotechnology*, 78(2), 193-199.
- Jun, L. Y., Yon, L. S., Mubarak, N. M., Bing, C. H., Pan, S., Danquah, M. K., ... Khalid, M. (2019). An Overview of Immobilized Enzyme Technologies For Dye and Phenolic Removal From Wastewater. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7(2), 102961.

- Kara, İ. T., Yücel, S., Arıcı, M. (2020). Optimization Aging Parameters of Mg Silica Aerogel Using Box-Behnken Approach. In *Journal of Nano Research* (Vol. 62, Pp. 31-46). Trans Tech Publications Ltd.
- Karakus, Y. Y., Yildirim, B., Acemi, A. (2021). Characterization of Polyphenol Oxidase From Fennel (*Foeniculum Vulgare* Mill.) Seeds As A Promising Source. *International Journal of Biological Macromolecules*, 170, 261-271.
- Kaya, G. G., Deveci, H. (2021). Morphological, Textural and Thermal Properties of Low-Cost Silica Aerogel Composites. *Konya Journal of Engineering Sciences*, 9(3), 787-796.
- Khatami, S. H., Vakili, O., Movahedpour, A., Ghesmati, Z., Ghasemi, H., Taheri-Anganeh, M. (2022). Laccase: Various Types and Applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(6), 2658-2672.
- Kiiskinen, L. L., Viikari, L., Kruus, K. (2002). Purification and Characterisation of A Novel Laccase From The Ascomycete *Melanocarpus Albomyces*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 198-204.
- Kim, N. H., Hwang, H. S., Lee, J. Y., Choi, K. H., Park, I. (2011). Silica Aerogel For The Mechanical Reinforcement of Thermoset Epoxy Polymers. In *Proceedings of The 18th International Conference on Composite Materials (South Korea), Jeju. International Committee on Composite Materials* (Pp. 318-324).
- Knopp, D., Tang, D., Niessner, R. (2009). Bioanalytical Applications of Biomolecule-Functionalized Nanometer-Sized Doped Silica Particles. *Analytica Chimica Acta*, 647(1), 14-30.
- Kolankaya, N., Ünal, A. T. (2001). Dechlorination of Bleached Kraft Pulp by Laccase Enzyme Produced From Some White-Rot Fungi. *Turkish Journal of Biology*, 25(1), 67-72.
- Kregiel, D. (2014). Advances in Biofilm Control For Food and Beverage Industry Using Organo-Silane Technology: A Review. *Food Control*, 40, 32-40.
- Kristiansen, T., Mathisen, K., Einarsrud, M. A., Bjørgen, M., Nicholson, D. G. (2011). Single-Site Copper by Incorporation in Ambient Pressure Dried Silica Aerogel and Xerogel Systems: An X-Ray Absorption Spectroscopy Study. *The Journal of Physical Chemistry C*, 115(39), 19260-19268.
- Kumar, D., Bhardwaj, R., Jassal, S., Goyal, T., Khullar, A., Gupta, N. (2021). Application of Enzymes For An Eco-Friendly Approach To Textile Processing. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-11.

- Kumar, S., Dwevedi, A., Kayastha, A. M. (2009). Immobilization of Soybean (Glycine Max) Urease on Alginate and Chitosan Beads Showing Improved Stability: Analytical Applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 58(1-4), 138-145.
- Kumar, V. V., Sathyaselvabala, V., Kirupha, S. D., Murugesan, A., Vidyadevi, T., Sivanesan, S. (2011). Application of Response Surface Methodology To Optimize Three Phase Partitioning For Purification of Laccase From *Pleurotus Ostreatus*. *Separation Science and Technology*, 46(12), 1922-1930.
- Kunamneni, A., Ghazi, I., Camarero, S., Ballesteros, A., Plou, F. J., Alcalde, M. (2008). Decolorization of Synthetic Dyes by Laccase Immobilized on Epoxy-Activated Carriers. *Process Biochemistry*, 43(2), 169-178.
- Kwang-Soo, S., Chang-Jin, K. (1998). Properties of Laccase Purified From Nitrogen Limited Culture of White-Rot Fungus *Coriolus Hirsutus*. *Biotechnology Techniques*, 12(2), 101-104.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins During The Assembly of The Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lassouane, F., Aït-Amar, H., Amrani, S., Rodriguez-Couto, S. (2019). A Promising Laccase Immobilization Approach For Bisphenol A Removal From Aqueous Solutions. *Bioresource Technology*, 271, 360-367.
- Latif, W., Ciniglia, C., Iovinella, M., Shafiq, M., Papa, S. (2023). Role of White Rot Fungi in Industrial Wastewater Treatment: A Review. *Applied Sciences*, 13(14), 8318.
- Lee, C. H., Jin, E. S., Lee, J. H., Hwang, E. T. (2020). Immobilization and Stabilization of Enzyme in Biomineralized Calcium Carbonate Microspheres. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 553591.
- Lee, C. J., Kim, G. S., Hyun, S. H. (2002). Synthesis of Silica Aerogels From Waterglass Via New Modified Ambient Drying. *Journal of Materials Science*, 37, 2237-2241.
- Legerská, B., Chmelová, D., Ondrejovič, M. (2018). Decolourization and Detoxification of Monoazo Dyes by Laccase From The White-Rot Fungus *Trametes Versicolor*. *Journal of Biotechnology*, 285, 84-90.
- Leonowicz, A., Sarkar, J. M., Bollag, J. M. (1988). Improvement in Stability of An Immobilized Fungal Laccase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 29, 129-135.
- Li, G., Zhu, T., Deng, Z., Zhang, Y., Jiao, F., Zheng, H. (2011). Preparation of Cu-Sio 2 Composite Aerogel by Ambient Drying and The Influence of Synthesizing Conditions on The Structure of The Aerogel. *Chinese Science Bulletin*, 56, 685-690.

- Li, R., Li, X., Tian, D., Liu, X., Wu, Z. (2023). Amino-Functionalized MOF Immobilized Laccase For Enhancing Enzyme Activity Stability and Degrading Congo Red. *Journal of The Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 143, 104647.
- Li, T., Liang, J., Ambrogelly, A., Brennan, T., Gloor, G., Huisman, G., ... Zhang, X. (2012). Efficient, Chemoenzymatic Process For Manufacture of The Boceprevir Bicyclic [3.1. 0] Proline Intermediate Based on Amine Oxidase-Catalyzed Desymmetrization. *Journal of The American Chemical Society*, 134(14), 6467-6472.
- Lin, J., Fan, L., Miao, R., Le, X., Chen, S., Zhou, X. (2015). Enhancing Catalytic Performance of Laccase Via Immobilization on Chitosan/Ceo2 Microspheres. *International Journal of Biological Macromolecules*, 78, 1-8.
- Lin, J., Lai, Q., Liu, Y., Chen, S., Le, X., Zhou, X. (2017). Laccase–Methacryloyl Functionalized Magnetic Particles: Highly Immobilized, Reusable, and Efficacious For Methyl Red Decolourization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, 144-152.
- Lin, Y., Zhang, Z., Tian, Y., Zhao, W., Zhu, B., Xu, Z., ... Yao, Q. (2013). Purification and Characterization of A Novel Laccase From *Coprinus Cinereus* and Decolorization of Different Chemically Dyes. *Molecular Biology Reports*, 40, 1487-1494.
- Lineweaver, H., Burk, D. (1934). The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *Journal of The American Chemical Society*, 56(3), 658-666.
- Liu, D. M., Chen, J., Shi, Y. P. (2018). Advances on Methods and Easy Separated Support Materials For Enzymes Immobilization. *Trac Trends in Analytical Chemistry*, 102, 332-342.
- Liu, D. M., Dong, C. (2020). Recent Advances in Nano-Carrier Immobilized Enzymes and Their Applications. *Process Biochemistry*, 92, 464-475.
- Liu, L., Chen, Z., Zhang, J., Shan, D., Wu, Y., Bai, L., Wang, B. (2021). Treatment of Industrial Dye Wastewater and Pharmaceutical Residue Wastewater by Advanced Oxidation Processes and Its Combination With Nanocatalysts: A Review. *Journal of Water Process Engineering*, 42, 102122.
- Liu, Y., Guo, C., Wang, F., Liu, C. Z., Liu, H. Z. (2008). Preparation of Magnetic Silica Nanoparticles and Their Application in Laccase Immobilization. *Chin J Process Eng*, 8, 583-588.
- 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.

- Livage, J., Henry, M., Sanchez, C. (1988). Sol-Gel Chemistry of Transition Metal Oxides. *Progress in Solid State Chemistry*, 18(4), 259-341.
- Lopes, L. S., Vieira, N., Da Luz, J. M. R., Marliane De Cássia, S. S., Cardoso, W. S., Kasuya, M. C. M. (2020). Production of Fungal Enzymes in Macaúba Coconut and Enzymatic Degradation of Textile Dye. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 26, 101651.
- Lu, H. T. (2013). Synthesis and Characterization of Amino-Functionalized Silica Nanoparticles. *Colloid Journal*, 75, 311-318.
- Lueangjaroenkit, P., Teerapatsakul, C., Sakka, K., Sakka, M., Kimura, T., Kunitake, E., Chitradon, L. (2019). Two Manganese Peroxidases and A Laccase of *Trametes Polyzona* KU-RNW027 With Novel Properties For Dye and Pharmaceutical Product Degradation in Redox Mediator-Free System. *Mycobiology*, 47(2), 217-229.
- Madhavi, V., Lele, S. S. (2009). Laccase: Properties and Applications. *Bioresources*, 4(4), 1694-1717.
- Madhu, A., Chakraborty, J. N. (2017). Developments in Application of Enzymes For Textile Processing. *Journal of Cleaner Production*, 145, 114-133.
- Maghraby, Y. R., El-Shabasy, R. M., Ibrahim, A. H., Azzazy, H. M. E. S. (2023). Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications. *ACS Omega*, 8(6), 5184-5196.
- Mahadik, D. B., Rao, A. V., Kumar, R., Ingale, S. V., Wagh, P. B., Gupta, S. C. (2012). Reduction of Processing Time by Mechanical Shaking of The Ambient Pressure Dried TEOS Based Silica Aerogel Granules. *Journal of Porous Materials*, 19, 87-94.
- Majcherczyk, A., Johannes, C., Hüttermann, A. (1999). Oxidation of Aromatic Alcohols by Laccase From *Trametes Versicolor* Mediated by The 2, 2'-Azino-Bis-(3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulphonic Acid) Cation Radical and Dication. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 267-276.
- Makas, Y. G., Kalkan, N. A., Aksoy, S., Altinok, H., Hasirci, N. (2010). Immobilization of Laccase in K-Carrageenan Based Semi-Interpenetrating Polymer Networks. *Journal of Biotechnology*, 148(4), 216-220.
- Maleki, H., Durães, L., Portugal, A. (2014). An Overview on Silica Aerogels Synthesis and Different Mechanical Reinforcing Strategies. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 385, 55-74.
- Maleki, H., Hüsing, N. (2018). Current Status, Opportunities and Challenges in Catalytic and Photocatalytic Applications of Aerogels: Environmental Protection Aspects. *Applied Catalysis B: Environmental*, 221, 530-555.

- Martino, A., Pifferi, P. G., Spagna, G. (1996). Immobilization of B-Glucosidase From A Commercial Preparation. Part 2. Optimization of The Immobilization Process on Chitosan. *Process Biochemistry*, 31(3), 287-293.
- Marzadori, C., Miletto, S., Gessa, C., Ciurli, S. (1998). Immobilization of Jack Bean Urease on Hydroxyapatite: Urease Immobilization in Alkaline Soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(12), 1485-1490.
- Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., Fernandez-Lafuente, R. (2007). Improvement of Enzyme Activity, Stability and Selectivity Via Immobilization Techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(6), 1451-1463.
- Mathur, G., Nigam, R., Jaiswal, A., Kumar, C. (2013). Bioprocess Parameter Optimization For Laccase Production in Solid State Fermentation. *International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research*, 4(2013), 521-530.
- Mehandia, S., Sharma, S. C., Arya, S. K. (2020). Isolation and Characterization of An Alkali and Thermostable Laccase From A Novel *Alcaligenes faecalis* and Its Application in Decolorization of Synthetic Dyes. *Biotechnology Reports*, 25, E00413.
- Mercimke, H. A. (2007). *Trametes versicolor*'ın Tekstil Boyalarının Gideriminde Kullanım Olanakları. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Adana, 212571.
- Metin, A. Ü. (2013). Immobilization of Laccase onto Polyethyleneimine Grafted Chitosan Films: Effect of System Parameters. *Macromolecular Research*, 21, 1145-1152.
- Misra, N., Kumar, V., Goel, N. K., Varshney, L. (2014). Laccase Immobilization on Radiation Synthesized Epoxy Functionalized Polyethersulfone Beads and Their Application For Degradation of Acid Dye. *Polymer*, 55(23), 6017-6024.
- Mogharabi, M., Nassiri-Koopaei, N., Bozorgi-Koushalshahi, M., Nafissi-Varcheh, N., Bagherzadeh, G., Faramarzi, M. A. (2012). Immobilization of Laccase in Alginate-Gelatin Mixed Gel and Decolorization of Synthetic Dyes. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2012.
- Mohammadi, A., Jafari, S. M., Mahoonak, A. S., Ghorbani, M. (2021). Liposomal/Nanoliposomal Encapsulation of Food-Relevant Enzymes and Their Application in The Food Industry. *Food and Bioprocess Technology*, 14, 23-38.
- Mohammadi, M., As'habi, M. A., Salehi, P., Yousefi, M., Nazari, M., Brask, J. (2018). Immobilization of Laccase on Epoxy-Functionalized Silica and Its Application in Biodegradation of Phenolic Compounds. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 443-447.

- Mohanan, J. L., Brock, S. L. (2003). Influence of Synthetic and Processing Parameters on The Surface Area, Speciation, and Particle Formation in Copper Oxide/Silica Aerogel Composites. *Chemistry of Materials*, 15(13), 2567-2576.
- Moon-Jeong, H., Hong-Gyu, S. (2005). Purification and Characterization of Laccase From The White Rot Fungus *Trametes Versicolor*. *Journal of Microbiology*, 43(6), 555-560.
- Moț, A. C., Pârvu, M., Damian, G., Irimie, F. D., Darula, Z., Medzihradszky, K. F., Silaghi-Dumitrescu, R. (2012). A “Yellow” Laccase With “Blue” Spectroscopic Features, From *Sclerotinia Sclerotiorum*. *Process Biochemistry*, 47(6), 968-975.
- Murugesan, K., Yang, I. H., Kim, Y. M., Jeon, J. R., Chang, Y. S. (2009). Enhanced Transformation of Malachite Green by Laccase of *Ganoderma Lucidum* in The Presence of Natural Phenolic Compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82, 341-350.
- Muthuvelu, K. S., Rajarathinam, R., Selvaraj, R. N., Rajendren, V. B. (2020). A Novel Method For Improving Laccase Activity by Immobilization onto Copper Ferrite Nanoparticles For Lignin Degradation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 152, 1098-1107.
- Naghdi, M., Taheran, M., Brar, S. K., Kermanshahi-Pour, A., Verma, M., Surampalli, R. Y. (2017). Immobilized Laccase on Oxygen Functionalized Nanobiochars Through Mineral Acids Treatment For Removal of Carbamazepine. *Science of The Total Environment*, 584, 393-401.
- Nayak, J. P., Bera, J. (2009). Preparation of Silica Aerogel by Ambient Pressure Drying Process Using Rice Husk Ash As Raw Material. *Transactions of The Indian Ceramic Society*, 68(2), 91-94.
- Nguyen, L. N., Hai, F. I., Dosseto, A., Richardson, C., Price, W. E., Nghiem, L. D. (2016). Continuous Adsorption and Biotransformation of Micropollutants by Granular Activated Carbon-Bound Laccase in A Packed-Bed Enzyme Reactor. *Bioresource Technology*, 210, 108-116.
- Novak, Z., Habulin, M., Krmelj, V., Knez, Ž. (2003). Silica Aerogels As Supports For Lipase Catalyzed Esterifications At Sub-and Supercritical Conditions. *The Journal of Supercritical Fluids*, 27(2), 169-178.
- Nyanhongo, G. S., Couto, S. R., Guebitz, G. M. (2006). Coupling of 2, 4, 6-Trinitrotoluene (TNT) Metabolites onto Humic Monomers by A New Laccase From *Trametes Modesta*. *Chemosphere*, 64(3), 359-370.
- Ogugbue, C. J., Sawidis, T. (2011). Bioremediation and Detoxification of Synthetic Wastewater Containing Triarylmethane Dyes by *Aeromonas Hydrophila* Isolated From Industrial Effluent. *Biotechnology Research International*, 2011.

- Omatolaa, K. M., Onojah, A. D., Amah, A. N., Ahemen, I. (2023). Synthesis and Characterization of Silica Xerogel and Aerogel From Rice Husk Ash and Pulverized Beach Sand Via Sol-Gel Route. *Journal of The Nigerian Society of Physical Sciences*, 11609-11609.
- Osma, J. F., Toca-Herrera, J. L., Rodríguez-Couto, S. (2010). Transformation Pathway of Remazol Brilliant Blue R by Immobilised Laccase. *Bioresource Technology*, 101(22), 8509-8514.
- Ozyilmaz, G., Tukul, S. S., Alptekin, O. (2005). Activity and Storage Stability of Immobilized Glucose Oxidase onto Magnesium Silicate. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 35(4-6), 154-160.
- Ögel, Z. B., Yüzügül, Y., Mete, S., Bakir, U., Kaptan, Y., Sutay, D., Demir, A. S. (2006). Production, Properties and Application To Biocatalysis of A Novel Extracellular Alkaline Phenol Oxidase From The Thermophilic Fungus *Scytalidium Thermophilum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 853-862.
- Öz, D. C., Kaya, N. (2020). Sol-Jel Yöntemiyle Üretilen Alümina Alkojelin Fizikokimyasal ve Yapısal Özellikleri Üzerine Kurutma Türünün Etkisi. *Politeknik Dergisi*, 23(3), 657-669.
- Özcan, Ş. (2019). Amin Fonksiyonel Silika Nanotanciklere Kovalent Bağlanma İle Lakkaz Enzim İmmobilizasyonu ve Enzimatik Renk Giderimi. Yüksek Lisans Tezi, Kırıkkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale, 617121.
- Özgül-Yücel, S., Tolay, M., Erdağ, S., Türkay, S. (2004). Magnesium Silicate Synthesis From Rice Hull Ash. *Journal of The American Oil Chemists' Society*, 81, 619-620.
- Pajonk, G. M., Venkateswara Rao, A., Parvathy, N. N., Elaloui, E. (1996). Microstructural Characterization of Silica Aerogels Using Scanning Electron Microscopy. *Journal of Materials Science*, 31, 5683-5689.
- Palonen, H., Saloheimo, M., Viikari, L., Kruus, K. (2003). Purification, Characterization and Sequence Analysis of A Laccase From The Ascomycete *Mauginiella* Sp. *Enzyme and Microbial Technology*, 33(6), 854-862.
- Panesar, P. S., Kumari, S., Panesar, R. (2013). Biotechnological Approaches For The Production of Prebiotics and Their Potential Applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 33(4), 345-364.
- Pang, S., Wu, Y., Zhang, X., Li, B., Ouyang, J., Ding, M. (2016). Immobilization of Laccase Via Adsorption onto Bimodal Mesoporous Zr-MOF. *Process Biochemistry*, 51(2), 229-239.
- Park, N., Park, S. S. (2014). Purification and Characterization of A Novel Laccase From *Fomitopsis Pinicola* Mycelia. *International Journal of Biological Macromolecules*, 70, 583-589.

- Parmenter, K. E., Milstein, F. (1998). Mechanical Properties of Silica Aerogels. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 223(3), 179-189.
- Patel, H., Gupte, S., Gahlout, M., Gupte, A. (2014a). Purification and Characterization of An Extracellular Laccase From Solid-State Culture of *Pleurotus Ostreatus* HP-1. *Biotech*, 4(1), 77-84.
- Patel, S. K., Kalia, V. C., Choi, J. H., Haw, J. R., Kim, I. W., Lee, J. K. (2014b). Immobilization of Laccase on SiO_2 Nanocarriers Improves Its Stability and Reusability. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(5), 639-647.
- Patil, P. D., Yadav, G. D. (2018). Application of Microwave Assisted Three Phase Partitioning Method For Purification of Laccase From *Trametes Hirsuta*. *Process Biochemistry*, 65, 220-227.
- Patil, S. P., Shendye, P., Markert, B. (2020). Molecular Dynamics Simulations of Silica Aerogel Nanocomposites Reinforced by Glass Fibers, Graphene Sheets and Carbon Nanotubes: A Comparison Study on Mechanical Properties. *Composites Part B: Engineering*, 190, 107884.
- Pazarlıoğlu, N. K., Sarioşık, M., Telefoncu, A. (2005). Laccase: Production by *Trametes Versicolor* and Application To Denim Washing. *Process Biochemistry*, 40(5), 1673-1678.
- Peralta-Zamora, P., Pereira, C. M., Tiburtius, E. R., Moraes, S. G., Rosa, M. A., Minussi, R. C., Durán, N. (2003). Decolorization of Reactive Dyes by Immobilized Laccase. *Applied Catalysis B: Environmental*, 42(2), 131-144.
- Pico, D., Meyer, E., Luking, A., Milow, B., Gries, T. (2017). SILICA-AERO. Production of Lightweight Silica Aerogel Fibers For Excellent Heat Insulating Application. *Chemical Engineering Transactions*, 60, 91-96.
- Pierre, A. C., Pajonk, G. M. (2002). Chemistry of Aerogels and Their Applications. *Chemical Reviews*, 102(11), 4243-4266.
- Qiao, B., Wang, T. J., Gao, H., Jin, Y. (2015). High Density Silanization of Nano-Silica Particles Using Γ -Aminopropyltriethoxysilane (APTES). *Applied Surface Science*, 351, 646-654.
- Rahman, I. A., Jafarzadeh, M., Sipaut, C. S. (2009). Synthesis of Organo-Functionalized Nanosilica Via A Co-Condensation Modification Using Γ -Aminopropyltriethoxysilane (APTES). *Ceramics International*, 35(5), 1883-1888.
- Ramírez-Cavazos, L. I., Junghanns, C., Ornelas-Soto, N., Cárdenas-Chávez, D. L., Hernández-Luna, C., Demarche, P., Parra, R. (2014). Purification and Characterization of Two Thermostable Laccases From *Pycnoporus Sanguineus* and Potential Role in Degradation of Endocrine Disrupting Chemicals. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 108, 32-42.

- Rao, A. V., Bhagat, S. D., Hirashima, H., Pajonk, G. M. (2006). Synthesis of Flexible Silica Aerogels Using Methyltrimethoxysilane (MTMS) Precursor. *Journal of Colloid and Interface Science*, 300(1), 279-285.
- Rao, A. V., Hegde, N. D., Hirashima, H. (2007). Absorption and Desorption of Organic Liquids in Elastic Superhydrophobic Silica Aerogels. *Journal of Colloid and Interface Science*, 305(1), 124-132.
- Razzaghi, M., Homaei, A., Vianello, F., Azad, T., Sharma, T., Nadda, A. K., ... Iqbal, H. M. (2022). Industrial Applications of Immobilized Nano-Biocatalysts. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 1-20.
- Reda, F. M., Hassan, N. S., El-Moghazy, A. N. (2018). Decolorization of Synthetic Dyes by Free and Immobilized Laccases From Newly Isolated Strain *Brevibacterium Halotolerans* N11 (KY883983). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 15, 138-145.
- Rekuć, A., Bryjak, J., Szymańska, K., Jarzębski, A. B. (2009). Laccase Immobilization on Mesoporous Cellular Foams Affords Preparations With Ultra High Activity. *Process Biochemistry*, 44(2), 191-198.
- Risdianto, H., Sofianti, E., Suhardi, S. H., Setiadi, T. (2012). Optimisation of Laccase Production Using White Rot Fungi and Agriculture Wastes in Solid State Fermentation. *ITB Journal of Engineering Science*, 44(2), 93-105.
- Rodakiewicz-Nowak, J., Jarosz-Wilkolazka, A. (2007). Catalytic Activity of *Cerrena Unicolor* Laccase in Aqueous Solutions of Water-Miscible Organic Solvents—Experimental and Numerical Description. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 44(2), 53-59.
- Rodriguez, E., Pickard, M. A., Vazquez-Duhalt, R. (1999). Industrial Dye Decolorization by Laccases From Ligninolytic Fungi. *Current Microbiology*, 38(1), 27-32.
- Rodríguez-Delgado, M. M., Alemán-Nava, G. S., Rodríguez-Delgado, J. M., Dieck-Assad, G., Martínez-Chapa, S. O., Barceló, D., Parra, R. (2015). Laccase-Based Biosensors For Detection of Phenolic Compounds. *Trac Trends in Analytical Chemistry*, 74, 21-45.
- Rogalski, J., Dawidowicz, A. L., Leonowicz, A. (1990). Purification and Immobilization of The Inducible Form of Extracellular Laccase of The Fungus *Trametes Versicolor*. *Acta Biotechnologica*, 10(3), 261-269.
- Sadhasivam, S., Savitha, S., Swaminathan, K., Lin, F. H. (2008). Production, Purification and Characterization of Mid-Redox Potential Laccase From A Newly Isolated *Trichoderma Harzianum* WL1. *Process Biochemistry*, 43(7), 736-742.

- Sadighi, A., Faramarzi, M. A. (2013). Congo Red Decolorization by Immobilized Laccase Through Chitosan Nanoparticles on The Glass Beads. *Journal of The Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44(2), 156-162.
- Sahay, R., Yadav, R. S. S., Yadava, S., Yadav, K. D. S. (2012). A Laccase of Fomes Durissimus MTCC-1173 and Its Role in The Conversion of Methylbenzene To Benzaldehyde. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166, 563-575.
- Salami, F., Habibi, Z., Yousefi, M., Mohammadi, M. (2018). Covalent Immobilization of Laccase by One Pot Three Component Reaction and Its Application in The Decolorization of Textile Dyes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, 144-151.
- Sansarcı, Ö. (2020). Remazol Brilliant Blue-R Remazol Red Rr Dystar Boyar Maddelerin Beyaz Çürükçül Fungus *Trametes Versicolor* ile Biyogiderimi ve Optimizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Mersin, 612311.
- Saoudi, O., Ghaouar, N. (2019). Biocatalytic Characterization of Free and Immobilized Laccase From *Trametes Versicolor* in Its Activation Zone. *International Journal of Biological Macromolecules*, 128, 681-691.
- Schultz, J. M., Jensen, K. I., Kristiansen, F. H. (2005). Super Insulating Aerogel Glazing. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, 89(2-3), 275-285.
- Schulz, A., Woolley, R., Tabarin, T., McDonagh, C. (2011). Dextran-Coated Silica Nanoparticles For Calcium-Sensing. *Analyst*, 136(8), 1722-1727.
- Shajesh, P., Smitha, S., Aravind, P. R., Warriar, K. G. K. (2009). Effect of 3-Glycidoxypropyltrimethoxysilane Precursor on The Properties of Ambient Pressure Dried Silica Aerogels. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 50, 353-358.
- Sharma, J., Sharma, S., Soni, V. (2021). Classification and Impact of Synthetic Textile Dyes on Aquatic Flora: A Review. *Regional Studies in Marine Science*, 45, 101802.
- Sheldon, R. A., Van Pelt, S. (2013). Enzyme Immobilisation in Biocatalysis: Why, What and How. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6223-6235.
- Shin, K. S., Lee, Y. J. (2000). Purification and Characterization of A New Member of The Laccase Family From The White-Rot Basidiomycete *Coriolus Hirsutus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 384(1), 109-115.
- Shioji, S., Hanada, M., Hayashi, Y., Tokami, K., Yamamoto, H. (2003). Continuous Surface Modification of Silica Particles For Enzyme Immobilization. *Advanced Powder Technology*, 14(2), 231-245.
- Smirnova, I., Gurikov, P. (2018). Aerogel Production: Current Status, Research Directions, and Future Opportunities. *The Journal of Supercritical Fluids*, 134, 228-233.

- Smith, P. E., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M., ... Klenk, D. C. (1985). Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76-85.
- Sondhi, S., Kaur, R., Madan, J. (2021). Purification and Characterization of A Novel White Highly Thermo Stable Laccase From A Novel Bacillus Sp. MSK-01 Having Potential To Be Used As Anticancer Agent. *International Journal of Biological Macromolecules*, 170, 232-238.
- Stamets, P. E. (2000). Techniques For The Cultivation of The Medicinal Mushroom Royal Sun Agaricus-Agaricus Blazei Murr.(Agaricomycetideae). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2(2).
- Suman, Singh, S., Ankita, Kumar, A., Kataria, N., Kumar, S., Kumar, P. (2021). Photocatalytic Activity of A-Fe₂O₃@ Ceo₂ and Ceo₂@ A-Fe₂O₃ Core-Shell Nanoparticles For Degradation of Rose Bengal Dye.
- Surwase, S. V., Patil, S. A., Srinivas, S., Jadhav, J. P. (2016). Interaction of Small Molecules With Fungal Laccase: A Surface Plasmon Resonance Based Study. *Enzyme and Microbial Technology*, 82, 110-114.
- Tadjarodi, A., Haghverdi, M., Mohammadi, V. (2012). Preparation and Characterization of Nano-Porous Silica Aerogel From Rice Husk Ash by Drying At Atmospheric Pressure. *Materials Research Bulletin*, 47(9), 2584-2589.
- Tan, T., Lu, J., Nie, K., Deng, L., Wang, F. (2010). Biodiesel Production With Immobilized Lipase: A Review. *Biotechnology Advances*, 28(5), 628-634.
- Tanaka, A., Kawamoto, T. (1999). Cell and Enzyme Immobilization. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2nd Ed. Washington, DC: American Society For Microbiology Press. P, 94-102.
- Tavares, A. P., Rodríguez, O., Fernández-Fernández, M., Domínguez, A., Moldes, D., Sanromán, M. A., Macedo, E. A. (2013). Immobilization of Laccase on Modified Silica: Stabilization, Thermal Inactivation and Kinetic Behaviour in 1-Ethyl-3-Methylimidazolium Ethylsulfate Ionic Liquid. *Bioresource Technology*, 131, 405-412.
- Teerapatsakul, C., Parra, R., Keshavarz, T., Chitradon, L. (2017). Repeated Batch For Dye Degradation in An Airlift Bioreactor by Laccase Entrapped in Copper Alginate. *International Biodeterioration Biodegradation*, 120, 52-57.
- Temel, T. M., İkizler, B. K., Terzioğlu, P., Yücel, S., Elalmış, Y. B. (2017). The Effect of Process Variables on The Properties of Nanoporous Silica Aerogels: An Approach To Prepare Silica Aerogels From Biosilica. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 84, 51-59.

- Terrón, M. C., González, T., Carbajo, J. M., Yagüe, S., Arana-Cuenca, A., Téllez, A., ... González, A. E. (2004). Structural Close-Related Aromatic Compounds Have Different Effects on Laccase Activity and on Lcc Gene Expression in The Ligninolytic Fungus *Trametes* Sp. I-62. *Fungal Genetics and Biology*, 41(10), 954-962.
- Terzioglu, P., Temel, T. M., İkizler, B. K., & Yucel, S. (2018). Preparation of Nanoporous Silica Aerogel From Wheat Husk Ash by Ambient Pressure Drying Process For The Adsorptive Removal of Lead From Aqueous Solution. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 8(01).
- Timur, M., Demetgül, C. (2017). Synthesis and Metal Ion Uptake Studies of Silica Gel-Immobilized Schiff Base Derivatives and Catalytic Behaviors of Their Cu (II) Complexes. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering (IJCCE)*, 36(4), 111-122.
- Tiryaki, E. (2017). Dekstran Kaplı Silika Aerojellerin Kolon Kanseri Tedavisi İçin İlaç Salım Sistemi Olarak Geliştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 467784.
- Tonin, F., Melis, R., Cordes, A., Sanchez-Amat, A., Pollegioni, L., Rosini, E. (2016). Comparison of Different Microbial Laccases As Tools For Industrial Uses. *New Biotechnology*, 33(3), 387-398.
- Tran, D. N., Balkus Jr, K. J. (2011). Perspective of Recent Progress in Immobilization of Enzymes. *Acs Catalysis*, 1(8), 956-968.
- Tufvesson, P., Fu, W., Jensen, J. S., Woodley, J. M. (2010). Process Considerations For The Scale-Up and Implementation of Biocatalysis. *Food and Bioproducts Processing*, 88(1), 3-11.
- Turhan, İ. (2020). Magnezyum Silika Aerojel Üretimi, Karakterizasyonu ve Berrak Üzüm Suyu Üretiminde Durultma Performansının İncelenmesi. Doktora Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 643502.
- Ullrich, R., Huong, L. M., Dung, N. L., Hofrichter, M. (2005). Laccase From The Medicinal Mushroom *Agaricus Blazei*: Production, Purification and Characterization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67, 357-363.
- Umar, A., Ahmed, S. (2022). Optimization, Purification and Characterization of Laccase From *Ganoderma Leucocontextum* Along With Its Phylogenetic Relationship. *Scientific Reports*, 12(1), 2416.
- Vandertol-Vanier, H. A. (2000). The Role of Laccase From *Coriolopsis Gallica* in Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolism.

- Vantamuri, A. B., Kaliwal, B. B. (2016). Purification and Characterization of Laccase From *Marasmius* Species BBKAV79 and Effective Decolorization of Selected Textile Dyes. *3 Biotech*, 6, 1-10.
- Veena, S. S., Pandey, M. (2012). Physiological and Cultivation Requirements of *Trametes Versicolor*, A Medicinal Mushroom To Diversify Indian Mushroom Industry. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 82(8), 672.
- Verma, A. K., Dash, R. R., Bhunia, P. (2012). A Review on Chemical Coagulation/Flocculation Technologies For Removal of Colour From Textile Wastewaters. *Journal of Environmental Management*, 93(1), 154-168.
- Viswanath, B., Chandra, M. S., Pallavi, H., Reddy, B. R. (2008). Screening and Assessment of Laccase Producing Fungi Isolated From Different Environmental Samples. *African Journal of Biotechnology*, 7(8).
- Vrancken, K. C., Possemiers, K., Van Der Voort, P., Vansant, E. F. (1995). Surface Modification of Silica Gels With Aminoorganosilanes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 98(3), 235-241.
- Wan, Y. Y., Lu, R., Xiao, L., Du, Y. M., Miyakoshi, T., Chen, C. L., ... Kennedy, J. F. (2010). Effects of Organic Solvents on The Activity of Free and Immobilised Laccase From *Rhus Vernicifera*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 47(4), 488-495.
- Wang, F., Guo, C., Liu, H. Z., Liu, C. Z. (2008). Immobilization of *Pycnoporus Sanguineus* Laccase by Metal Affinity Adsorption on Magnetic Chelator Particles. *Journal of Chemical Technology Biotechnology: International Research in Process, Environmental Clean Technology*, 83(1), 97-104.
- Wang, F., Guo, C., Yang, L. R., Liu, C. Z. (2010). Magnetic Mesoporous Silica Nanoparticles: Fabrication and Their Laccase Immobilization Performance. *Bioresource Technology*, 101(23), 8931-8935.
- Wang, F., Huang, W., Guo, C., Liu, C. Z. (2012). Functionalized Magnetic Mesoporous Silica Nanoparticles: Fabrication, Laccase Adsorption Performance and Direct Laccase Capture From *Trametes Versicolor* Fermentation Broth. *Bioresource Technology*, 126, 117-122.
- Wang, M., Shi, H., Wu, D., Han, H., Zhang, J., Xing, Z., ... Li, Q. (2014). Glutaraldehyde Cross-Linking of Immobilized Thermophilic Esterase on Hydrophobic Macroporous Resin For Application in Poly (E-Caprolactone) Synthesis. *Molecules*, 19(7), 9838-9849.
- Wang, Q., Mahadik, D. B., Meti, P., Gong, Y. D., Lee, K. Y., Park, H. H. (2020). Dioxycbenzene-Bridged Hydrophobic Silica Aerogels With Enhanced Textural and Mechanical Properties. *Microporous and Mesoporous Materials*, 294, 109863.

- Wang, S. S., Ning, Y. J., Wang, S. N., Zhang, J., Zhang, G. Q., Chen, Q. J. (2017). Purification, Characterization, and Cloning of An Extracellular Laccase With Potent Dye Decolorizing Ability From White Rot Fungus *Cerrena Unicolor* GSM-01. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 920-927.
- Wang, S., Xu, X., Lu, X. (2016). Movement Optimization of Freely-Hanging Deepwater Risers in Reentry. *Ocean Engineering*, 116, 32-41.
- Wasak, A., Drozd, R., Grygorcewicz, B., Jankowiak, D., Rakoczy, R. (2018). Purification and Recovery of Laccase Produced by Submerged Cultures of *Trametes Versicolor* by Three-Phase Partitioning As A Simple and Highly Efficient Technique. *Polish Journal of Chemical Technology*, 20(4), 88-95.
- Wati, R. K., Theppakorn, T., Benjakul, S., Rawdkuen, S. (2009). Three-Phase Partitioning of Trypsin Inhibitor From Legume Seeds. *Process Biochemistry*, 44(12), 1307-1314.
- Wehaidy, H. R., Abdel-Naby, M. A., El-Hennawi, H. M., Youssef, H. F. (2019). Nanoporous Zeolite-X As A New Carrier For Laccase Immobilization and Its Application in Dyes Decolorization. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 19, 101135.
- Wever, R., Hemrika, W., Messerschmidt, A., Huber, R., Poulos, T., Wieghardt, K., Bode, C. M. W. (2001). Handbook of Metalloproteins. *Messerschmidt, A., Huber, R., Wieghardt, K., Poulos, TL, Eds.*
- Wong, L. S., Khan, F., Micklefield, J. (2009). Selective Covalent Protein Immobilization: Strategies and Applications. *Chemical Reviews*, 109(9), 4025-4053.
- Wu, M. H., Lin, M. C., Lee, C. C., Yu, S. M., Wang, A. H. J., Ho, T. H. D. (2019). Enhancement of Laccase Activity by Pre-Incubation With Organic Solvents. *Scientific Reports*, 9(1), 9754.
- Wu, X., Fan, M., McLaughlin, J. F., Shen, X., Tan, G. (2018). A Novel Low-Cost Method of Silica Aerogel Fabrication Using Fly Ash and Trona Ore With Ambient Pressure Drying Technique. *Powder Technology*, 323, 310-322.
- Xiao, H. Y., Huang, J., Cheng, L. I. U., Jiang, D. S. (2006). Immobilization of Laccase on Amine-Terminated Magnetic Nano-Composite by Glutaraldehyde Crosslinking Method. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 16, S414-S418.
- Xu, F., Shin, W., Brown, S. H., Wahleithner, J. A., Sundaram, U. M., Solomon, E. I. (1996). A Study of A Series of Recombinant Fungal Laccases and Bilirubin Oxidase That Exhibit Significant Differences in Redox Potential, Substrate Specificity, and Stability. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1292(2), 303-311.

- Yan, J. K., Wang, C., Yu, Y. B., Wu, L. X., Chen, T. T., Wang, Z. W. (2021). Physicochemical Characteristics and in Vitro Biological Activities of Polysaccharides Derived From Raw Garlic (*Allium Sativum* L.) Bulbs Via Three-Phase Partitioning Combined With Gradient Ethanol Precipitation Method. *Food Chemistry*, 339, 128081.
- Yan, J. K., Wang, Y. Y., Qiu, W. Y., Ma, H., Wang, Z. B., Wu, J. Y. (2018). Three-Phase Partitioning As An Elegant and Versatile Platform Applied To Nonchromatographic Bioseparation Processes. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(14), 2416-2431.
- Yan, J., Chen, D., Yang, E., Niu, J., Chen, Y., Chagan, I. (2014). Purification and Characterization of A Thermotolerant Laccase Isoform in *Trametes Troglitii* Strain and Its Potential in Dye Decolorization. *International Biodeterioration Biodegradation*, 93, 186-194.
- Yang, B., Tang, K., Wei, S., Zhai, X., Nie, N. (2021). Preparation of Functionalized Mesoporous Silica As A Novel Carrier and Immobilization of Laccase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193, 2547-2566.
- Yang, J., Ng, T. B., Lin, J., Ye, X. (2015). A Novel Laccase From Basidiomycete *Cerrena* Sp.: Cloning, Heterologous Expression, and Characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 77, 344-349.
- Yang, J., Wang, Z., Lin, Y., Ng, T. B., Ye, X., Lin, J. (2017). Immobilized *Cerrena* Sp. Laccase: Preparation, Thermal Inactivation, and Operational Stability in Malachite Green Decolorization. *Scientific Reports*, 7(1), 16429.
- Yang, J., Yang, X., Lin, Y., Ng, T. B., Lin, J., Ye, X. (2015). Laccase-Catalyzed Decolorization of Malachite Green: Performance Optimization and Degradation Mechanism. *Plos One*, 10(5), E0127714.
- Yang, Y., Xu, Y., Yang, Y., Yang, H., Yuan, H., Huang, Y., Liu, X. (2016). Laccase Immobilized on Mesoporous SiO₂ and Its Use For Degradation of Chlorophenol Pesticides. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 90, 2044-2054.
- Yapıcı, E. (2019). Pirinç Kabuğu Silikasından Magnezyum ve Alüminyum-Potasyum Katkılı Silika Aerojellerin Üretimi, Karakterizasyonu, Optimizasyonu ve Gıda Katkı Maddesi Olarak Değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 603827.
- Yeon, Y. R., Park, Y. J., Lee, J. S., Park, J. W., Kang, S. G., Jun, C. H. (2008). Sc (Otf) 3-Mediated Silylation of Hydroxy Functional Groups on A Solid Surface: A Catalytic Grafting Method Operating At Room Temperature. *Angewandte Chemie International Edition*, 47(1), 109-112.
- Yıldırım, A. (2010). *Moleküler Biyoloji* (2). Ankara: Nobel Akademik Yayıncılık.

- Younes, S. B., Sayadi, S. (2011). Purification and Characterization of A Novel Trimeric and Thermotolerant Laccase Produced From The Ascomycete *Scytalidium Thermophilum* Strain. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 73(1-4), 35-42.
- Yousefi Amiri, T., Moghaddas, J., Rahmani Khajeh, S. (2016). Silica Aerogel-Supported Copper Catalyst Prepared Via Ambient Pressure Drying Process. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 77, 627-635.
- Yuzugullu Karakus, Y., Acemi, A., Işık, S., Duman, Y. (2018). Purification of Peroxidase From *Amsonia Orientalis* by Three-Phase Partitioning and Its Biochemical Characterization. *Separation Science and Technology*, 53(5), 756-766.
- Yücel, S., Karakuzu İkizler, B., Terzioğlu, P., Temel, T. M. (2016, September). Influence of Gel Aging Time on The Properties of Various Silica Aerogels Synthesized From Water Glass. In *Materials Science Forum* (Vol. 866, Pp. 176-180). Trans Tech Publications Ltd.
- Zarcula, C., Kiss, C., Corici, L., Croitoru, R., Csunderlik, C., Peter, F. (2009). Combined Sol-Gel Entrapment and Adsorption Method To Obtain Solid-Phase Lipase Biocatalyst. *Rev Chim (Bucharest)*, 60(9), 922-927.
- Zhang, G. Q., Wang, Y. F., Zhang, X. Q., Ng, T. B., Wang, H. X. (2010). Purification and Characterization of A Novel Laccase From The Edible Mushroom *Clitocybe Maxima*. *Process Biochemistry*, 45(5), 627-633.
- Zhang, S., Wu, Z., Chen, G., Wang, Z. (2018). An Improved Method To Encapsulate Laccase From *Trametes Versicolor* With Enhanced Stability and Catalytic Activity. *Catalysts*, 8(7), 286.
- Zhao, D., Zhang, X., Cui, D., Zhao, M. (2012). Characterisation of A Novel White Laccase From The Deuteromycete Fungus *Myrothecium Verrucaria* NF-05 and Its Decolourisation of Dyes. *Plos One*, 7(6), E38817.
- Zheng, F., Cui, B. K., Wu, X. J., Meng, G., Liu, H. X., Si, J. (2016). Immobilization of Laccase onto Chitosan Beads To Enhance Its Capability To Degrade Synthetic Dyes. *International Biodeterioration Biodegradation*, 110, 69-78.
- Zheng, X., Wang, Q., Jiang, Y., Gao, J. (2012). Biomimetic Synthesis of Magnetic Composite Particles For Laccase Immobilization. *Industrial Engineering Chemistry Research*, 51(30), 10140-10146.
- Zhou, W., Zhang, W., Cai, Y. (2021). Laccase Immobilization For Water Purification: A Comprehensive Review. *Chemical Engineering Journal*, 403, 126272.
- Zhou, Y., Deng, T., Pan, C., Chen, C., Mo, J. (2010). Purification of A Laccase From Fungus *Combs* in The Nest of *Odontotermes Formosanus*. *Process Biochemistry*, 45(7), 1052-1056.

- Zhu, Y., Kaskel, S., Shi, J., Wage, T., Van Pée, K. H. (2007). Immobilization of Trametes Versicolor Laccase on Magnetically Separable Mesoporous Silica Spheres. *Chemistry of Materials*, 19(26), 6408-6413.
- Zofair, S. F. F., Arsalan, A., Khan, M. A., Alhumaydhi, F. A., Younus, H. (2020). Immobilization of Laccase on Sepharose-Linked Antibody Support For Decolourization of Phenol Red. *International Journal of Biological Macromolecules*, 161, 78-87.
- Zou, X., Tian, Z., Wang, X., Tan, M., Ding, W., Lu, X. (2015). Formation of Magnesium Silicate on Surface of Silica For Steam Reforming of Liquefied Petroleum Gas. *Catalysis Communications*, 68, 116-119.
- Zumarraga, M., Bulter, T., Shleev, S., Polaina, J., Martínez-Arias, A., Plou, F. J., ... Alcalde, M. (2007). In Vitro Evolution of A Fungal Laccase in High Concentrations of Organic Cosolvents. *Chemistry Biology*, 14(9), 1052-1064.

KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

- Işık S.**, Yuzugullu Y., Duman Y., *Bacillus Pumilus* Y7 İzolatından Katalaz-Peroksidaz Enziminin Üretimi, 23. *Ulusal Biyoloji Kongresi*, Gaziantep, Türkiye, 5-9 Eylül 2016.
- Işık S.**, Yüzügüllü Karakuş Y., *Bacillus Pumilus* Y-7 İzolatı Katalazının Sulu İkili Faz Yöntemi ile Saflaştırılması ve Biyokimyasal Karakterizasyonu, 19. *Ulusal Biyoteknoloji Kongresi*, Eskişehir, Türkiye, 30 Kasım- 2 Aralık 2017.
- Işık, S.**, Çolak, S., Yüzügüllü Karakuş, Y., (2023). Production and Purification of Laccase From *Trametes Versicolor*. *1st International Conference on Frontiers in Academic Research* (Pp.551-555). Konya, Türkiye
- Yuzugullu Karakus, Y., Acemi, A., **Işık, S.**, & Duman, Y. (2018). Purification of Peroxidase From *Amsonia Orientalis* By Three-Phase Partitioning and Its Biochemical Characterization. *Separation Science and Technology*, 53(5), 756-766.
- Yuzugullu Karakus, Y., & **Isik, S.** (2019). Partial Characterization of *Bacillus Pumilus* Catalase Partitioned in Poly (Ethylene Glycol)/Sodium Sulfate Aqueous Two-Phase Systems. *Preparative Biochemistry of Biotechnology*, 49(4), 391-399.

ÖZGEÇMİŞ

İlkokul eğitimini Cumhuriyet İlköğretim okulunda ve lise öğrenimini İstanbul Bakırköy Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2015 yılında Kocaeli Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü bitirdi. 2015 yılında Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda, Doç. Dr. Yonca YÜZÜGÜLLÜ KARAKUŞ danışmanlığında başladığı yüksek lisans eğitimini, 2018 yılında tamamladı. Aynı yıl Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı.

