

## LAKKAZ ENZİMİ İLE KOT BOYARMADESİNİN DEKOLORİZASYONU

Serap GEDİKLİ<sup>1</sup>, Pınar AYTAR<sup>1</sup>, Ahmet ÇABUK<sup>2</sup>, Arzu ÜNAL<sup>3</sup>,  
Nazif KOLANKAYA<sup>4</sup>

### ÖZ

Tekstil endüstrisinde kullanılan çeşitli boyarmaddeler üretim sürecinde alıcı ortamlara büyük miktarlarda deşarj edilmektedir. Bu durum, çevre ve insan sağlığı ile ilgili telafisi zor olan bir sürecin başlangıcını oluşturmaktadır. Bu nedenle gerek kirlenmiş alanların temizlenmesinde ve gerekse kirletici potansiyeli olan teknolojilerin biyolojik yaklaşımlarla bütünleştirilmesi ile tekstil endüstrisinin bir atığı olan boyarmaddelerin oluşturacağı kirlilik azaltılabilecektir. Bu çalışma kapsamında ticari olarak piyasada satılan bir kot boyasının *Trametes versicolor* ATCC 200801'in buğday kepeği içeren potato dekstroz broth besiyerinde geliştirilmesi ile elde edilen lakkaz aktivitesi yüksek kültür sıvısı ile renk giderimi çalışılmış ve optimum koşullar belirlenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda pH 4.0, başlangıç boya konsantrasyonu 75 mg/l, sıcaklık 55 °C, inkübasyon süresi ise 120 dakika olarak seçilmiştir. Belirlenen optimum koşullarda % 68.02 renk giderimi elde edilmiştir. Bununla birlikte, boya çözeltisi içerisinde tekstil atık sularında bulunabilecek çeşitli metal iyonları ve kumaş boyama işleminde kullanılan yardımcı kimyasal maddeler reaksiyon ortamına ilave edilerek, geliştirilmeye çalışılan renk giderim potansiyeli üzerine olası etkileri araştırılmıştır. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, belirlenen optimum koşullarda denenen kirleticilerin renk giderimini genel olarak olumsuz yönde etkilemediği görülmektedir. En fazla inhibe edici etkinin görüldüğü 10 mM Tween 80 varlığında bile % 54.68 düzeyinde bir renk giderimi elde edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler** : Lakkaz, Boyar madde, Renk giderimi.

## DECOLORIZATION OF DENIM DYESTUFF BY LACCASE ENZYME

### ABSTRACT

Large quantities of dyes used in the textile industry are discharged to recipient environment during manufacture. This situation is beginning of a process which is difficult to recovery and relevant to environment and human health. Therefore, pollution of dyestuff produced textile industry will be reduced by cleaning of polluted area and integrating biological approaches with technologies having polluting potential. In scope of this study, commercial denim dye was decolorized by using high laccase activity culture supernatant of *Trametes versicolor* ATCC 200801 pellets grown in potato dex-

<sup>1</sup> Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir.

<sup>2</sup> Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Eskişehir. Faks: 0222 2393578, e-posta: acabuk@ogu.edu.tr

<sup>3</sup> Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Tarla Bitkileri Araştırmaları Dairesi, Ankara.

<sup>4</sup> Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara.

Bu çalışma kapsamında sunulan verilerin bir kısmı Serap GEDİKLİ tarafından yapılan Yüksek Lisans Tez çalışmasına aittir.

**Geliş:** 8 Mayıs 2009; **Düzeltilme:** 2 Ekim 2009; **Kabul:** 15 Şubat 2010

trose broth including wheat bran and determined optimum conditions. In the result of experiments done, pH, initial dye concentration, temperature and incubation time were selected 4.0, 75 mg/l, 55 °C and 120 minutes, respectively. 68.02 % of decolorization was obtained at the determined optimum conditions. Furthermore, adding different metal ions to find in textile wastewater and supplementary chemical materials used fabric dyeing process to reaction medium, potential of decolorization copied with improvement was investigated effects of these. When the obtained data were examined, pollutants which tested at optimum conditions were observed not affected negatively decolorization. Even in the presence of Tween 80 detected the maximum inhibitor effect, 54.68 % of decolorization was obtained.

**Keywords:** Laccase, Dyestuff, Decolorization.

## 1. GİRİŞ

Tekstil, kağıt, kozmetik, deri, gıda, matbaa gibi endüstriler özellikle boyarmadde atıklarını yakın çevrelerinde bulunan sulara atarak sucul ekosistemlerde yaşayan canlı popülasyonuna büyük zarar vermektedirler. Öncelikle suyun renginde olan değişim nedeniyle suyun içerisinde güneş ışığının girmesi engellenerek fotosentezin durmasına ya da azalmasına neden olur. Bu renkli atıklar akarsu, göl ve denizlere özellikle de yüzey ve yeraltı sularına karışarak içme sularını kirletebilirler (Aksu ve Çağatay, 2006; Kumar vd., 2006). Ayrıca bazı boyarmaddeler kanserojenik ve mutajenik etkilere sahiptir, temas edilmesi halinde deride tahriş, kanser ve bazı alerjik durumların meydana gelmesine neden olabilirler (Robinson vd., 2001).

Tekstil endüstrisinde kullanılan boyarmaddelerin çevre ve canlılar üzerinde oluşturduğu etkilerin farkına varıldıktan sonra çeşitli Avrupa ülkelerinde atık suların deşarj standartları ile ilgili yasalar daha kısıtlayıcı bir hale getirilmiştir (Robinson vd., 2001).

Boyarmadde renk gideriminin derecesi zaman, sıcaklık, pH ve boyama işlemlerinde kullanılan yardımcı kimyasallar gibi çeşitli faktörlerin etkisi altındadır. Boyama sürecinde sıkça kullanılan yardımcı kimyasallar metal tuzları, asitler, bazlar, tamponlar, kompleks madde yapıcılar, dağıtıcı, düzgünleştirici ajanlar, yüzey aktif maddeleri, okside edici maddeler, indirgeyici maddeler, taşıyıcılar olabilmekte ve çeşitli amaçlarla kullanılabilir. Bu nedenle, boyama işlemi sonucunda çıkış sularında boyarmadde haricinde çok sayıda farklı bileşik de bulunabilmektedir (Kocaer ve Alkan, 2002). Tek bir boyama işlemi için farklı kimyasal sınıftaki boyarmaddelerin birlikte kullanılabilir olması çıkış suyu bileşimini daha da karmaşık hale getirmekte ve renk giderimini daha da zorlaştırmaktadır. Suda çözünebilen reaktif ve asit boyarmaddeler geleneksel arıtma sistemlerinden etkilenmeden çıktıkları için çevresel açıdan en

sorunlu boyalar olarak kabul edilirler (Kocaer ve Alkan, 2002).

Bu boyarmaddelerin çevredeki olumsuz etkilerini en aza indirmek amacıyla değerlendirilen biyolojik yaklaşımlar günümüzde çevre sağlığının korunması ve benzeri atık suların arıtımında önem kazanmıştır. Önerilen kimyasal ve fiziksel arıtım süreçleri yüksek maliyet, zehirli yan ürünlerin oluşumu, aşırı miktarda enerji tüketimi, konsantre çamur oluşumu ve farklı karakterlerdeki tüm atık sulara adapte edilememe gibi dezavantajlara sahiptir (Banat vd., 1996; Robinson vd., 2001; Stolz, 2001). Dolayısıyla biyolojik yaklaşımlar daha avantajlı hale gelmektedir. Bu çalışmalarda bazı mikrobiyal türler vazgeçilmez örnekler olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu türler arasında Basidiomycetes üyeleri sahip oldukları özellikleri ile önemli ve ayrıcalıklı bir yere sahiptir. Basidiomycetes grubuna giren beyaz çürükçül fungusların, yoğun endüstriyel aktiviteye bağlı olarak ortaya çıkan ve çevre kirliliğinin giderilmesinde, lakkaz enzimi başta olmak üzere sentezledikleri çeşitli enzimleri ile çok farklı moleküler yapıdaki organik bileşiklerin oksidasyonunda rol oynadıkları bilinmektedir (Kunamneni vd., 2008).

Lakkaz hücre dışı, bakır içeren, elektron alıcısı olarak moleküler oksijeni kullanmak suretiyle çeşitli fenolik bileşiklerin oksidasyonunu katalizleyen polifenol oksidaz grubu bir enzimdir (Gienfreda vd, 1999). Diğer peroksidaz grubu enzimler oksitleyici olarak toksik ve inhibisyon etkileri olan hidrojen peroksit gereksinim duyarken, lakkaz enzimi bu amaçla sadece çözülmüş oksijeni kullanır. Ayrıca substrat özgülüğünün geniş olması nedeniyle çevre kirliliğinin giderilmesinde sürekli çalışılan ve vazgeçilmesi zor olan bir enzimdir (Saparrat vd., 2007). Lakkazlar delignifikasyon, boya giderimi, biyolojik iyileştirme ajanı olarak, etanol üretiminde, biyosensör, biyoyakıt gibi birçok endüstriyel ölçekte kullanımını giderek artan bir enzimdir (Rodriguez ve Herrera, 2006).

Günümüz şartlarında lakkazlar ucuz ve kolay elde edilememektedir. Kirlenmiş sistemleri iyileştirmek için büyük ölçekli lakkaz uygulaması büyük miktarlarda üretimi gerektirmektedir. Ham enzim preparasyonlarının kullanımı da pahalı olabilir. En etkili lakkaz üreten kaynağı bulmak için; en uygun fungal türü seçme, yeniden üretilebilir ve pahalı olmayan izolasyon yöntemlerini bulma, enzim üretim koşullarını optimize etme açısından çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Ancak enzim üretimi sadece fungal türe bağlı değildir. Aynı zamanda üretimin gerçekleştiği büyüme şartlarına, indükleyicilerin varlığına, inkübasyon süresine, kültür ortamının içeriğine ve genetik manipülasyona bağlıdır. Bu faktörler arasında indükleyicilerin varlığı, kimyasal yapıları, ortama eklenme miktarları ve inkübasyon süresi lakkaz üretimini önemli ölçüde etkilemektedir (Mougin vd., 2003).

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda yapılan daha önceki çalışmalar kapsamında, lakkaz aktivitesini indükleme deneylerinden elde edilen sonuçlar doğrultusunda potato dekstroz broth besiyerine indükleyici olarak buğday kepeği ilave edilmiş besiyerinde *Trametes versicolor* ATCC 200801 ile yüksek lakkaz aktivitesine sahip kültür sıvısı üretilmiştir (Gedikli, 2008). Bu çalışma kapsamında, bu kültür sıvısı enzim kaynağı olarak kullanılarak ticari olarak piyasada satılan kot boyasının renk giderimi hedeflenmiştir. Deneyde renk gideriminde rol oynayabilecek çeşitli değişkenler kullanılarak en uygun koşullar saptanmaya çalışılmıştır. Belirlenen optimum koşullar sabit tutularak, boyarmadde içeren atık sularda yoğun miktarda bulunan ağır metallerin tuzları kullanılarak sentetik atık su yapılmış ve lakkaz enziminin bu atık sudaki etkinliği değerlendirilmiştir.

## 2. MATERYAL ve YÖNTEM

### 2.1 Mikroorganizma ve Kültür Ortamı

Çalışmalarda, Basidiomycetes sınıfına ait bir fungus olan *T. versicolor* ATCC 200801 kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan mikroorganizma Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Nazif Kolankaya'dan temin edilmiştir. Çalışma süresince ve sonrasında kültürler potato dekstroz agarda (PDA) +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Stok kültürlerden yatık PDA besiyerlerine ekim yapılarak 30 °C'de 7 gün inkübasyona bırakılmış ve bu kültürler aşılama için aktif kültür-

ler olarak kullanılmıştır. Kültürün yüzeyinden kazıma ile distile su içerisine alınan miseller toplam 40 ml hacimde homojenize edilmiştir (Heidolph). Homojenizattan 4 ml alınarak içerisinde 3 g buğday kepeği bulunan 100 ml'lik potato dekstroz broth (PDB) besiyerine aseptik şartlarda ilave edilmiştir. Kültürler 150 rpm çalkalama hızında 30 °C'de 12 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresi sonucunda gelişen biyokütleler filtrasyon ve santrifüj işlemleri ardışık olarak uygulanarak ortamdan uzaklaştırılmıştır. Elde edilen kültür sıvısı enzim kaynağı olarak kullanılarak lakkaz aktivitesi ölçülmüştür.

### 2.2 Lakkaz Aktivitesinin Ölçülmesi

Lakkaz aktivitesi ölçümü için tepkime tüplerinde toplam hacim 5 ml olacak şekilde substrat olarak 4.9 ml ve 1 mM Guaiakol içeren 50 mM sodyum-asetat tamponu (pH 4.5) ve enzim kaynağı olarak 0.1 ml kültür sıvısı kullanılmıştır. 37 °C'de 15 dakika inkübasyondan sonra 465 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Sp-2102UVP Spectrum UV-Vis spectrophotometer) absorbans ölçülmüştür (Taşpınar ve Kolankaya, 1998). Çalışmada, 37 °C, 1 dakika, 465 nm dalga boyunda absorbansı 0.1 birim artıran enzim aktivitesi 1 Unit aktivite olarak tanımlanmıştır.

### 2.3 Lakkaz Aktivitesi Yüksek Kültür Sıvısının Katalaz Enzimi ile Muamelesi

Lakkaz enzimi aktivitesi yüksek kültür süpernatantı ile renk giderimi çalışmalarında ortamda bulunabilecek olan lignin peroksidaz (LiP) ve mangan peroksidazın (MnP) dekoloryzasyona olası katkısını engellemek amacı ile çalışma ortamından H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin uzaklaştırılması için katalaz ilave edilmiştir. Bu denemede, pH 7.2 olan 0.25 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponuna % 0.2 (v/v) oranında katalaz ilave edilerek hazırlanan enzim preparasyonundan lakkaz aktivitesi yüksek kültür süpernatantına ilave edilerek kullanılmıştır.

### 2.4 Boyarmadde ve Renk Giderim Çalışmaları

Lakkaz aktivitesine sahip kültür sıvısının renk giderim açısından etkinliğinin araştırılması amacıyla piyasada ticari olarak satılan ve kot boyası olarak bilinen (Viktoria) bir ticari preparasyon kullanılmıştır. Bu boyarmadde için öncelikle bir dalga boyu taraması yapılmış ve en yüksek absorbans değeri 573 nm olarak bulun-

muştur. Bundan sonraki çalışmalarda bu değer sabit tutularak ölçümler yapılmıştır. Enzimatik renk gideriminde uygun koşulların belirlenmesi için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır.

## 2.5 Enzimatik Renk Giderimi İçin Optimum Koşulların Belirlenmesi

Enzimatik renk gideriminde optimum koşullarının belirlenmesi için; pH, başlangıç boya konsantrasyonu, enzim miktarı, inkübasyon süresi ve sıcaklık parametreleri çalışılmıştır. Enzimatik dekolorizasyon için kullanılan enzim; daha önce laboratuvarımızda yapılan lakkaz aktivitesi iyileştirme çalışmalarının sonucunda en yüksek aktivitenin elde edildiği buğday kepeği ile aktivitesi artırılmış *T. versicolor* ATCC 200801 lakkazıdır.

Enzimatik dekolorizasyon çalışmaları tepkime tüplerinde toplam hacim 10 ml olacak şekilde hazırlanıp inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda renk gideriminin takibi için 573 nm dalga boyunda okumalar yapılmıştır. Tüm deneylerde kontrol grubu olarak denatüre enzim ve boya çözeltisi kullanılmıştır.

Ortam pH'nın enzimatik renk giderimine etkisini değerlendirmek amacı ile 3.5 – 4.0 – 4.5 – 5.0- 5.5 – 6.0 – 6.5 – 7.0 pH değerleri denenmiştir. pH 3.0-5.5 için 0.2 M sodyum asetat tamponu, pH 6.0-7.0 için 0.2 M fosfat tamponu kullanılmıştır. Çalışma tepkime tüplerinde toplam hacim 10 ml olacak şekilde belirtilen pH değerlerinde hazırlanmış 100 mg/l konsantrasyondaki boya çözeltisi (9 ml) ve 1 ml 25.08 U/ml enzim aktivitesine sahip enzim ilave edilerek yapılmıştır. Inkübasyon süresi 30 dk, inkübasyon sıcaklığı ise 30 °C' dir.

Başlangıç boya konsantrasyonunun enzimatik dekolorizasyona etkisini belirlemek amacıyla pH optimizasyonunda belirlenen pH değerinde ve 5–100 mg/l konsantrasyonda hazırlanan boya çözeltileri ile çalışılmıştır. Çalışmada diğer koşullar; tepkime tüplerinde toplam hacim 10 ml olacak şekilde; 9 ml belirtilen konsantrasyonlarda ve pH da hazırlanmış boya çözeltisi, 1ml 25.08 U/ml enzim aktivitesine sahip lakkaz enzimi ilave edilmiştir ve inkübasyon süresi ve sıcaklığı 30 dk ve 30 °C'de sabit tutulmuştur.

Enzim miktarının enzimatik dekolorizasyona etkisini belirlemek amacıyla 0.5-4.0 ml arasında değişen miktarlarda enzim kullanılmıştır. Çalışma koşulları pH 4.0, 75 mg/l

başlangıç boya konsantrasyonu, inkübasyon süresi ve sıcaklığı 30 dk ve 30 °C' dir.

Inkübasyon süresinin enzimatik dekolorizasyona etkisini belirlemek amacıyla 5.-15.-45.-60.-120. dk ve 12.-24. saatler denenmiştir. Çalışma koşulları pH 4.0, 75 mg/l başlangıç boya konsantrasyonu, 1ml 25.08 U/ml enzim aktivitesine sahip enzim ve inkübasyon sıcaklığı 30 °C' dir.

Ortam sıcaklığının enzimatik dekolorizasyona etkisini belirlemek için 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, ve 90 °C sıcaklıklar denenmiştir. Diğer çalışma koşulları pH 4.0, 75 mg/l boya konsantrasyonu, 1 ml 25.08 U/ml aktiviteye sahip enzim ve inkübasyon süresi 120 dk' dır.

## 2.6 Enzimatik Renk Giderimine Diğer Kirleticilerin Etkisi

Boyarmadde içeren endüstriyel atıksularda önemli miktarda metal iyonları da bulunabilmektedir. Ayrıca, tekstil endüstrisinde boyama işlemleri sırasında da kullanılan bazı kimyasallar yine atıksuyun bileşenleri arasında yer almaktadır. Bu çalışma kapsamında tekstil endüstrisinde kullanılan kot boyarmaddesinin enzimatik renk giderim koşullarının belirlenmesinin yanı sıra ortamda bulunabilecek diğer kirleticilerin de renk giderimi üzerindeki olası etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla, belirlenen optimum koşullarda (pH 4.0, 75 mg/l boya konsantrasyonu, 25.08 U/ml aktivitede 1ml enzim, 120 dakika, 55 °C) reaksiyon ortamına değişen konsantrasyonlarda metal iyonları ilave edilerek oluşturulan sentetik atık su örneğinde boya giderimi üzerinde metal iyonlarının etkisi değerlendirilmiştir. Reaksiyon ortamı; son konsantrasyonları 1, 5 ve 10 mM olacak şekilde çeşitli metal tuzlarını (FeCl<sub>2</sub>, KCl, NaCl, MnSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub> ve CaCl<sub>2</sub>) içeren boya çözeltisi ile enzim kaynağı olarak kullanılan lakkaz aktivitesi yüksek kültür süpernatantından oluşmaktadır. Tekstil endüstrisinde boyama işleminde kullanılan NaOH, asetik asit, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, EDTA ve yüzey aktif bir madde olarak bilinen Tween 80'in geliştirilen enzimatik renk giderim süreci üzerine olası etkileri de belirlenen optimum koşullarda araştırılmıştır.

## 3. SONUÇLAR

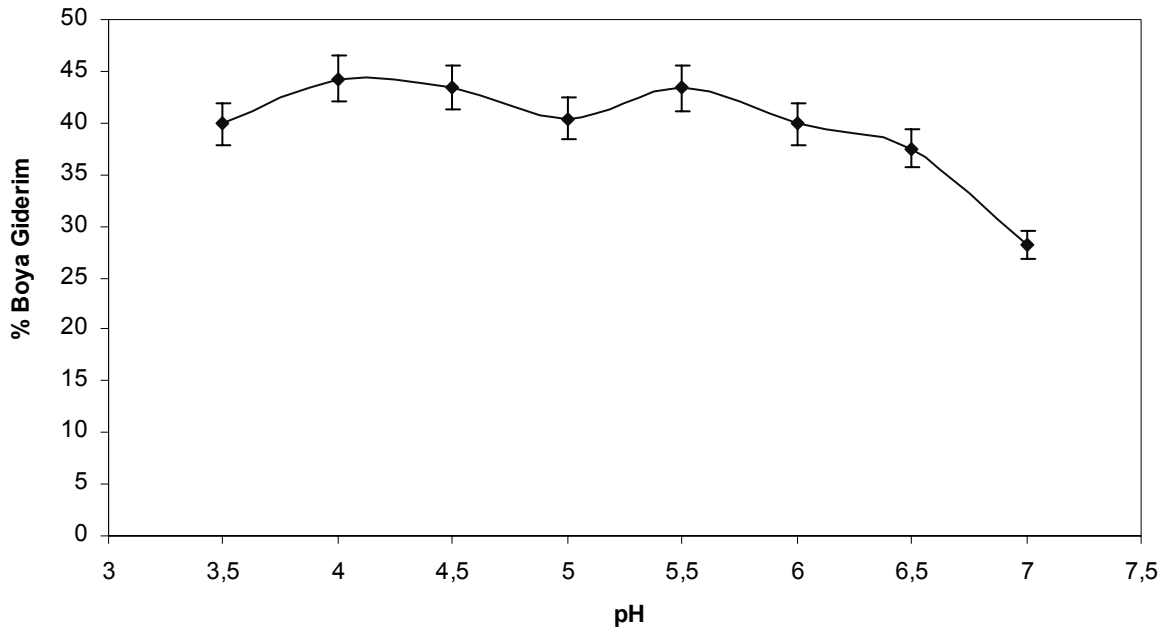
Reaksiyon ortamında oluşan renk gideriminden lakkaz enzimin sorumlu olduğunun belirlenebilmesi için ortamda bulunma olasılığı yüksek olan ve renk giderimine katkısının olabileceği düşünülen lignin peroksi-

daz (LiP) ve mangan peroksidaz (MnP) enzimlerinin aktivitelerinin sınırlanabilmesi için kültür süpernatantı katalaz ile muamele edilmiştir. Böylece LiP ve MnP'nin olası aktiviteleri için ortamdaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tamamen uzaklaştırılmıştır. Elde edilen optimum koşullarda katalaz ilave edilmiş kültür süpernatantı ile yapılan denemelerde tüm boyarmaddeler için herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Sonuç olarak elde edilen de-kolorizasyondan lakkaz enziminin sorumlu olduğu düşünülmektedir.

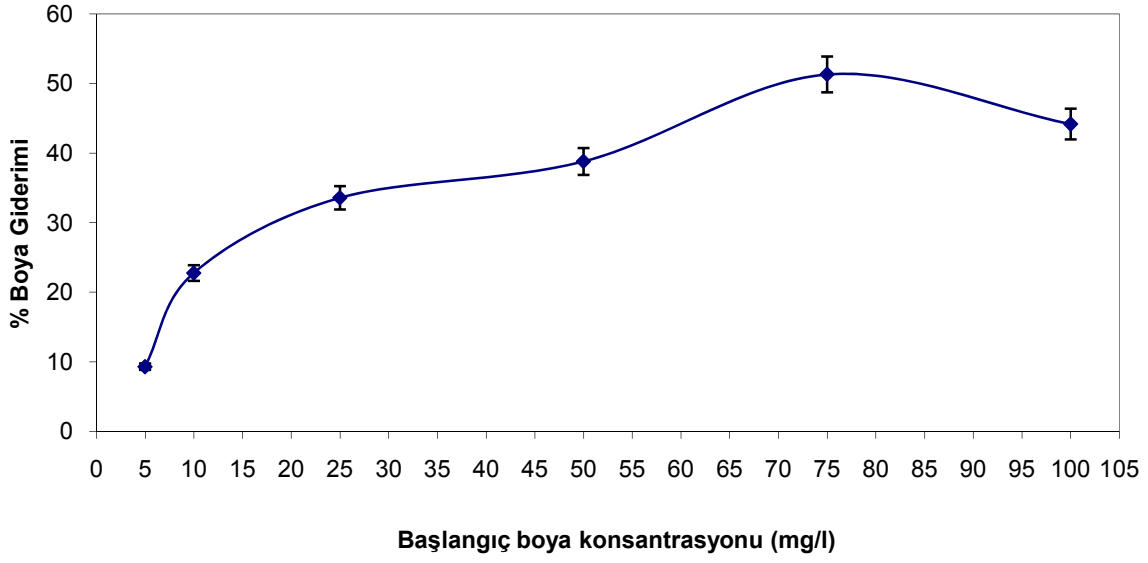
Enzimatik renk gideriminde ortam pH değerinin etkisini araştırmak amacıyla pH 3.5-7.0 arası boya çözeltileri ile çalışılmış ve optimum değer pH 4.0 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar Şekil 1'de gösterilmiştir. Başlangıç boya konsantrasyonunun enzimatik renk giderimine etkisini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada optimum konsantrasyon 75 mg/l olarak bulunmuştur. Çalışma sonuçları Şekil 2'de verilmiştir. Enzim miktarının etkisini belirlemek için 0.5-4.0 ml arasında değerler çalışılmıştır. Enzim miktarı arttıkça % boya gideriminin arttığı görülmüştür. Elde edilen sonuçlar Şekil 3'de verilmiştir. İnkübasyon süresinin enzimatik de-kolorizasyon etkisini belirlemek amacıyla yapılan çalışmaya göre optimum süre 120 dakika olarak seçilmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen sonuçlar Şekil 4'de verilmiştir. İnkübasyon sıcaklığının enzimatik renk giderimine etkisini belirlemek amacıyla 20-90

°C arası sıcaklık değerleri çalışılmış ve 55 °C'ye kadar sıcaklık arttıkça % boya gideriminin de arttığı ancak daha sonra belirgin bir biçimde azaldığı görülmüştür. Çalışma sonuçları Şekil 5'de verilmiştir.

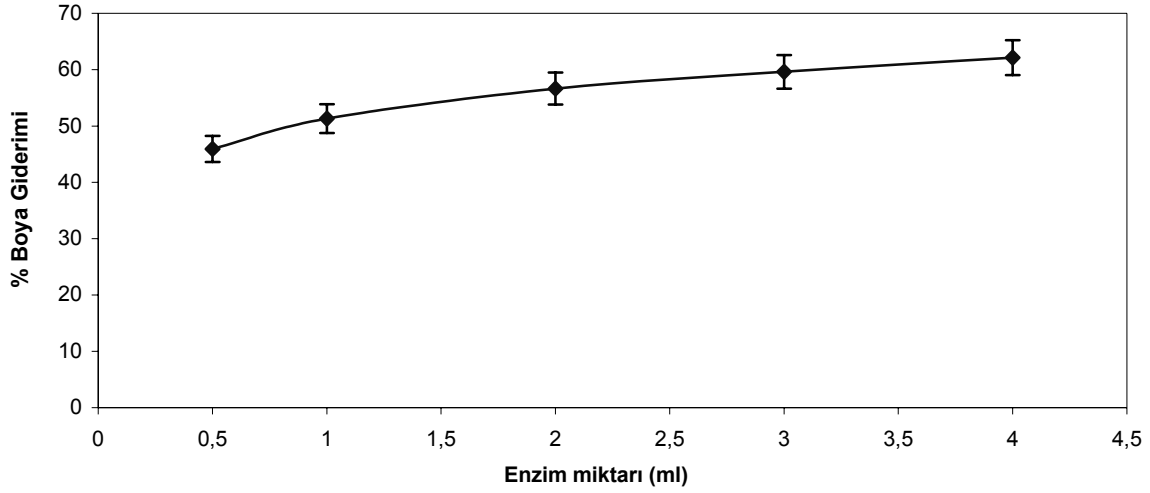
Tekstil boyama faaliyetlerinden üretilen atık sular boya üretim teknolojisinde kullanılan ya da boya molekülünde bulunan metalleri içermektedir (Rodriguez vd., 2005). Beyaz çürükçül fungusların hücre dışı ligninolitik enzimleri ile metallerin etkileşimi; ksenobiyotik bileşiklerin fungal yolla parçalanmasının biyoteknolojik süreçlerinin düzenlenmesinin anlaşılmasında önemlidir. Bu nedenle belli konsantrasyonlarda bazı metal bileşiklerinin içinde bulunduğu boya çözeltilerinin renk giderim miktarı inkübasyon öncesi ve sonrası ölçülmüş ve metallerin boya giderimi üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Endüstriyel süreçlerin deşarj sularında normalde bulunan Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> ve Na<sup>+</sup> gibi metallerin tuzlarının yanı sıra boyama işlemlerinde kullanılan yardımcı kimyasal maddelerin (EDTA, NaOH, asetik asit, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ve yine ortamda bulunabilecek Tween 80 gibi yüzey aktif maddelerin boya giderimine olan etkisi araştırılmıştır. Bunun dışında Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, Fe<sup>2+</sup> ve Mg<sup>2+</sup> tuzlarının boya giderim süreci üzerine etkisi denenmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 1'de verilmektedir.



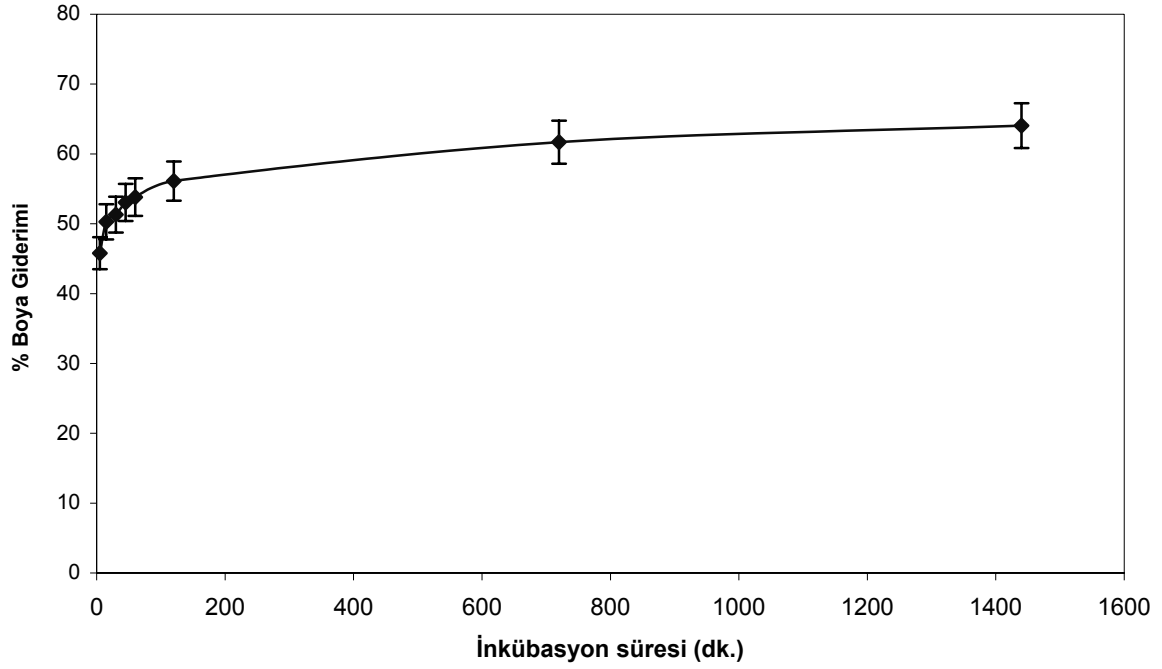
Şekil 1. Enzimatik renk gideriminde ortam pH değerinin etkisi. (Çalışma koşulları: Başlangıç boya konsantrasyonu 100 mg/l, inkübasyon süresi 30 dk., enzim miktarı 1 ml (25.08 U/ml aktiviteye sahip enzim), inkübasyon süresi 30 °C)



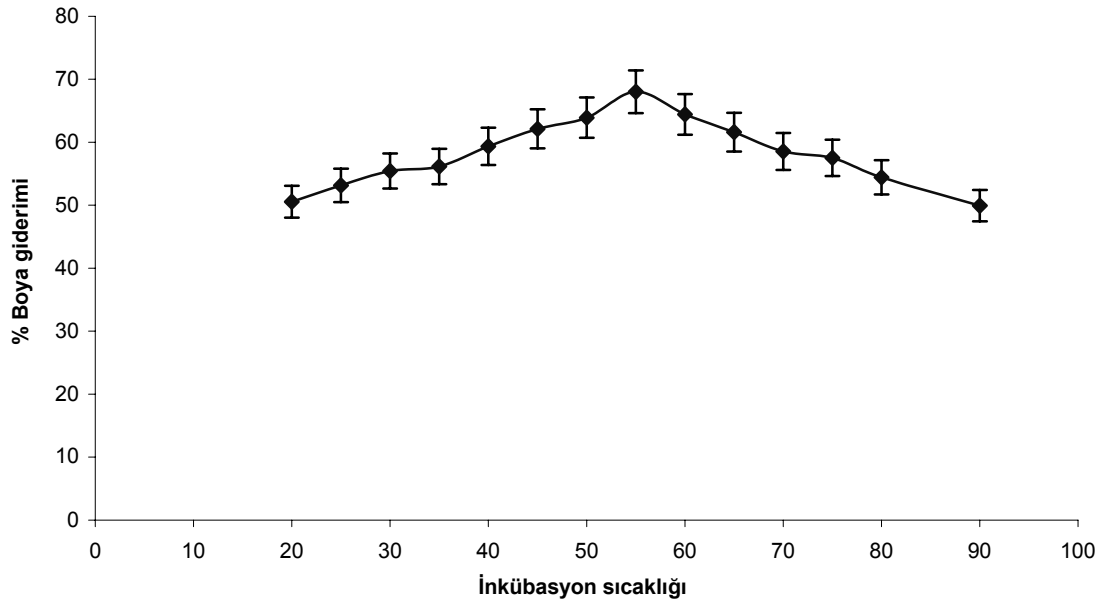
Şekil 2. Başlangıç boya konsantrasyonunun enzimatik renk giderimine etkisi. (Çalışma koşulları: pH 4.0, inkübasyon süresi 30 dk, enzim miktarı 1 ml (25.08 U/ml aktiviteye sahip enzim), inkübasyon sıcaklığı 30 °C)



Şekil 3. Enzim miktarının enzimatik renk giderimine etkisi. (Çalışma koşulları: pH 4.0, inkübasyon süresi 30 dk, inkübasyon sıcaklığı 30 °C, başlangıç boya konsantrasyonu 75 mg/l).



Şekil 4. İnkübasyon süresinin enzimatik renk giderimine etkisi. (Çalışma koşulları: pH 4.0, enzim miktarı 1 ml (25.08 U/ml aktiviteye sahip enzim), inkübasyon sıcaklığı 30 °C, başlangıç boya konsantrasyonu 75 mg/l)



Şekil 5. İnkübasyon sıcaklığının enzimatik renk giderimine etkisi (Çalışma koşulları: pH 4.0, enzim miktarı 1 ml (25.08 U/ml aktiviteye sahip enzim), inkübasyon süresi 120 dk, başlangıç boya konsantrasyonu 75 mg/l)

Tablo 1. Çeşitli metal tuzlarının ve kimyasal maddelerin boya giderimine etkisi (Çalışma koşulları: 55°C, pH 4.0, 75 mg/l boya çözeltisi, 1 ml 25.08 U/ml aktiviteye sahip enzim, 120 dakika)

Konsantrasyonlar	% Renk Giderimi		
	1 mM	5 mM	10 mM
FeCl <sub>2</sub>	% 69.29	% 65.81	% 62.98
KCl	% 67.65	% 62.62	% 59.54
NaCl	% 70.02	% 70.19	% 68.91
MnSO <sub>4</sub>	% 74.03	% 77.07	% 80.51
MgSO <sub>4</sub>	% 69.74	% 72.68	% 69.60
CuSO <sub>4</sub>	% 68.68	% 69.12	% 67.83
ZnSO <sub>4</sub>	% 70.25	% 70.78	% 69.96
CaCl <sub>2</sub>	% 69.56	% 69.85	% 66.89
NaOH	% 69.66	% 71.19	% 70.75
Asetik asit	% 75.56	% 75.90	% 76.03
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	% 75.34	% 75.29	% 75.23
EDTA	% 74.03	% 74.67	% 74.93
Tween 80	% 73.14	% 58.13	% 54.68

\*Bu tabloda yer alan kirleticiler ilave edilmediğinde elde edilen renk giderimi % 68.02'dir.

#### 4. TARTIŞMA

Lakkaz fenoloksidaz grubu ve endüstriyel kullanım alanı çok fazla olan bir enzimdir. Lakkazlar delignifikasyon, boya giderimi, biyolojik iyileştirme ajanı, etanol üretimi, biyosensör, biyoyakıt ve ağartıcı olarak birçok endüstriyel süreçlerde kullanımı giderek artan bir enzimdir. Diğer peroksidaz grubu enzimler oksitleyici olarak toksik ve inhibisyon etkisi olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye gereksinim duyarlar. Fakat lakkaz bu amaçla sadece çözülmüş oksijeni kullanır. Bu durum, ortama herhangi bir kimyasal ilavesini gerektirmeyeceği için önemli bir avantaj olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca lakkaz enziminin kullanımı diğer tür enzimatik reaksiyonlarda olduğu gibi aynı amaçla kullanılan hücresel preparatlara kıyasla daha kısa sürede etkili sonuç vermesiyle tercih edilmektedir. Ancak burada

enzimin üretim maliyetinin genellikle yüksek olması, her zaman yeterli miktarlarda üretilmemesi gibi durumlar göz ardı edilmemelidir. Daha önceki çalışmalarımızda, lakkaz aktivitesi yüksek kültür sıvısının üretiminde farklı ortamlar ve çeşitli tarımsal atıklar denenmiştir. Elde edilen sonuçlar içerisinde potato dekstroz broth besiyerine buğday kepeği ilave edildiğinde yüksek aktivitenin elde edildiği görülmüştür (Gedikli, 2008). Bu sonuçlardan yola çıkarak ürettiğimiz lakkaz enziminin çevresel uygulamalarda kullanılabilirliğinin belirlenmesi amacı ile bir tekstil boyarmaddesi üzerindeki etkinliği araştırılmıştır.

Benzer çalışmalarda, bazı tarımsal atıkların besiyeri olarak ya da besiyerine katılarak kullanılması durumunda yüksek enzim aktivitelerinin elde edildiği ve çeşitli boya ve boyarmaddelerin renk giderimi amacıyla kul-



lanılabildiği görülmektedir. Rodriguez ve arkadaşları (1999) tarafından yapılan bir çalışmada 23 endüstriyel boyanın dekolorizasyonu için beyaz çürükçül funguslar kullanmıştır. Yulaf üzerinde büyütülen 16 farklı fungal ırkın katı faz kültürlerinden elde edilen ham ekstraktlarında lakkaz, LiP, MnP ve aril alkol oksidaz aktivitesi saptanmıştır. En yüksek lakkaz aktivitesi ve boya giderim oranı *Trametes hispida*'da bulunmuştur. Bu da ham ekstraktın renk giderimi yüzdesinin lakkaz aktivitesine bağlı olduğunu göstermektedir. Lakkaz aktivitesinin yanı sıra renk gideriminde önemli rol oynayan bir diğer faktör de boyanın kimyasal yapısıdır. Bu çalışmada kullanılan boyanın da içerisinde fenolik yapıda bileşikler bulunabileceği düşünüldüğünden enzimin işlev gördüğü yorumu yapılabilir. Abadulla ve arkadaşları (2000) da *T. hirsuta*'dan saflaştırılan lakkazın triarilmetan, indigo, azo ve antraquinon boyaları parçalayabileceğini tespit etmişler ve renk giderimi oranının boyalardaki fenolik halkaların bileşenlerine bağlı olduğunu bildirmişlerdir (Rodriguez vd., 1999; Abadulla vd., 2000).

Bu bilgiler doğrultusunda, bu çalışma kapsamında, uygun kaynaklardan üretimi yapılacak yüksek aktivitede lakkaz enziminin boyar maddelerden renk giderimi amacıyla kullanım potansiyelinin ticari olarak satılan ve yaygın olarak tekstil endüstrisinde kot boyama işleminde kullanılan bir boyarmaddenin renginin giderimindeki etkinliği araştırılmıştır.

Bu çalışma kapsamında buğday kepeği ilave edilmiş potato dekstroz broth besiyerinde geliştirilen *T. versicolor* ATCC 200801 kültüründen yüksek aktivitede lakkaz enzimi içeren bir kültür sıvısı elde edilmiştir. Ancak bu kültür sıvısı içerisinde lakkaz enzimi ile birlikte lignin peroksidaz ve mangan peroksidaz gibi enzimlerinde üretilme olasılıkları vardır. Söz konusu her iki enzimde potansiyel olarak boyar maddelerden renk giderim yeteneğine sahiptir. Bilindiği gibi LiP ve MnP enzimleri reaksiyon ortamında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'e gereksinim gösterirler. Bu çalışmada kullanılan yüksek aktivitede lakkaz enzimi içeren kültür sıvısına katalaz enzimi ilave edilerek ortamda bulanabilecek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> parçalanması hedeflenmiştir. Böylece olası LiP ve MnP aktiviteleri de engellenmiştir. Belirlenen optimum renk giderim koşullarında katalaz ilave edilmiş ve edilmemiş kültür sıvısı ile yapılan renk giderim denemelerinde herhangi bir farklılık gözlenmemiştir. Bu sonuçlar bize elde edilen renk gideriminden kültür sıvısında bulunan lakkaz enziminin sorumlu olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmanın bundan sonraki aşamasında enzimatik renk giderimi için optimum koşullar belirlenmiştir. Bu amaçla ortam pH değerinin, başlangıç boya konsantrasyonunun, enzim miktarının, inkübasyon süresinin ve ortam sıcaklığının renk giderimi üzerine etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre optimum pH değeri 4.0 olarak bulunmuş ve 30 dakika sonunda % 44 boya giderimine ulaşılmıştır (Şekil 1). Rodriguez ve arkadaşları (2004) *T. hirsuta*'dan elde ettiği 0.3 U/ml aktiveye sahip lakkaz ile Luganil boyasının degradasyonunda pH 4.0 değerinde, 2 saat sonunda % 16.2'lik bir giderim olduğu bildirilmiştir. Nyabhongo ve arkadaşlarının (2002) yaptıkları çalışmada da yine bir beyaz çürükçül fungus olan *Trametes modesta* lakkazının asidik koşullar altında boya gideriminin daha verimli olduğunu tespit etmişlerdir. Lakkaz enziminin de optimum pH değerinin 4.5 olduğu düşünüldüğünde özellikle bu değere yakın pH değerlerine sahip boyarmadde içeren atıksularda renk giderimi amacıyla kullanılabileceği açıktır. Başlangıç boya konsantrasyonunu etkisini belirlemek amacıyla 5-100 mg/l konsantrasyona sahip boya çözeltileri ile çalışılmıştır. Şekil 2'de de görüldüğü gibi 75 mg/l konsantrasyona kadar boya gideriminde bir artış olmuş 75 mg/l de boya giderimi % 51'e ulaşmıştır. Bununla birlikte, 100 mg/l başlangıç boya konsantrasyonunda boya gideriminde bir düşüş olduğu gözlemlenmiştir.

Enzimatik dekolorizasyonda diğer bir parametre olan enzim miktarının etkisi için yapılan çalışmada enzim miktarı arttıkça boya gideriminin de arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 3). 4 ml enzim ile % 62.15 boya giderimi sağlanmıştır. Belirlenen en yüksek dekolorizasyon değerinin 4 ml olmasına karşın çalışmalarda 1ml enzim kullanılmıştır. Bunun nedeni toplam çalışma hacmi 10 ml olduğu için 4 ml enzimle çalışıldığında reaksiyon hacminin % 40 oranında seyreltilmiş olacağı düşüncesidir.

İnkübasyon süresinin enzimatik dekolorizasyona etkisini incelemek amacıyla 5.-15.-45.-60.-120. dakikalarda ve 12. ile 24. saatlerde örnekler alınmıştır. Şekil 4'te de görüldüğü gibi süre arttıkça boya giderimi de artmıştır. Çalışma sonunda optimum inkübasyon süresi olarak 120 dakika seçilmiştir ve boya giderimi % 56.11'dir. Luganil ve Sella Solid Red boyalarının lakkaz enzimi ile yapılan yıkımında sırayla 2 saat sonunda optimum % 16.2 ve % 40 oranında boya giderimi sağlandığı bildirilmiştir (Rodriguez vd., 2004). Selvam ve arkadaşları (2003) tarafından yapılan başka bir çalışmada da *T. versicolor* lakkazının Congo Red için maksimum % 12, Amido Black 10B için % 15'lik kısmını de-

kolorize ettiğini göstermişlerdir. *Trametes versicolor* kültür filtratlarındaki lakkazın çok sayıda yapısal olarak farklı boyayı 30 dakika sonrasında yaklaşık % 30 oranında parçalamasına rağmen Azure B'nin sadece % 5'ini 1 saatte parçalamış ve Poly R-478 ile Fuschin'i 24 saat içinde dahi parçalayamamıştır. Fakat enzimatik bir kataliz teknolojisi kullanılarak birçok boya 30-135 dakikada dekolorize edilebileceği Cameselle ve arkadaşları (2003) tarafından ifade edilmiştir. Bu çalışmada elde ettiğimiz renk giderim süresinin literatürdeki benzer çalışmalar ile kıyaslanabilir düzeyde olduğunu söyleyebiliriz.

İnkübasyon sıcaklığının enzimatik dekolorizasyona etkisini belirlemek amacıyla 20-90 °C arası çalışılmıştır. Şekil 5'te de görüldüğü gibi sıcaklık arttıkça boya giderimi de artmış ancak 55 °C'den sonra bir düşüş gözlenmiştir. Bu nedenle optimum sıcaklık olarak 55°C seçilmiştir. *Funalia trogii* ATCC 200800 suşunun Drimaerene Blue X 3LR'yi dekolorize eden lakkazı tek basamak izolasyon ve saflaştırma olarak isimlendirilen yeni bir yöntem ile izole edilmiştir. pH 4.0 ve 50 °C'de enzim boyayı maksimum oranda dekolorize etmiştir (Ünyayar vd., 2005). Lakkaz enziminin sıcaklık artışlarından önemli derecede etkilenmediği ve hatta yüksek sıcaklık değerlerinde düşük sıcaklık değerlerine kıyasla daha kararlı olduğu bilinmektedir (Monteiro ve Carvalho, 1998; Nyanhongo vd., 2002). Yüksek sıcaklıkta elde edilen yüksek renk giderimi lakkaz enziminin kararlılığındaki artış ile açıklanabilir. Şekil 5 incelendiğinde 55 °C'den itibaren enzimatik renk gideriminin azaldığı söylenebilir. Ancak, burada dikkat edilmesi gereken bir durum da 90 °C sıcaklıkta % 49.92'lik bir renk gideriminin olmasıdır. Bu durum özellikle tekstil endüstrisinin yüksek sıcaklıklardaki atıksularına uygulanabilme potansiyeli açısından önemlidir.

Çalışmada kullanılan boyarmadde için belirlenen optimum koşullar sabit tutularak tekstil endüstrisinin atıksularında yaygın olarak bulunabilen diğer kirleticilerin geliştirilmeye çalışılan renk giderim sürecine etkileri de incelenmiştir. Boyarmadde içeren atıksularda bulunabilen çeşitli metallerin ve yardımcı kimyasal maddelerin boya giderimi üzerine etkisi değerlendirilmiş ve önemli ölçüde bir farklılık gözlenmemiştir. Rodriguez ve arkadaşlarının (2005) yaptıkları bir çalışmada lakkaz stabilitesi üzerine metal iyonlarının etkileri değerlendirilmiş ve Hg<sup>2+</sup>'nin konsantrasyonu ve lakkazın ile birlikte bulunduğu süre arttıkça lakkaz aktivitesini olumsuz yönde etkilediği bundan dolayı da boya giderimini negatif yönde etkile-

diği gösterilmiştir, çalışmada kullanılan diğer metallerin ise lakkaz stabilitesi üzerinde düşük konsantrasyonlarda çok etkili olmadığı ancak yüksek konsantrasyonlarda stabiliteyi etkilediği bulunmuştur. Nagai ve arkadaşları (2002) *Lentinula edodes*'den elde edilen ve saflaştırılan lakkazın Ca<sup>2+</sup> (%70), Zn<sup>2+</sup> (%64), K<sup>+</sup> (%54) gibi metal iyonlarının varlığında inhibe edildiğini, 10 mM Cu<sup>2+</sup> iyonu varlığında ise enzimin % 40'a kadar aktive edildiğini göstermişlerdir. Bu durum metal iyonlarının lakkaz kararlılığı üzerine olan etkisinin lakkazın üretildiği kaynağa bağlı olabileceğini de düşündürmektedir.

Bu bilgiler doğrultusunda Tablo 1 incelendiğinde, ortama herhangi bir kirletici ilave edilmediği durumlarda, yani daha önceden belirlenen optimum koşullarda % 68.02 düzeyinde bir renk giderimine ulaşıldığı görülmektedir. Ortama ilave edilen metal tuzlarının söz konusu enzimatik renk giderimini inhibe etmediği ve hatta 1mM konsantrasyonda renk giderimi üzerine artırıcı bir etki gösterdiği görülmektedir. Ancak artan metal konsantrasyonlarında bu artırıcı etkinin azaldığı ya da önemli bir değişim oluşturmadığı görülmektedir. Bununla birlikte, Mn<sup>2+</sup>'nin ortamdaki konsantrasyonunun artması durumunda ise renk gideriminin % 80.51 düzeyine ulaştığı dikkat çekmektedir.

Tekstil endüstrisinde boyama işlemlerinde kullanılan bazı yardımcı kimyasalların da enzimatik renk giderimi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Burada elde edilen sonuçlar incelendiğinde reaksiyon ortamına ilave edilen EDTA, NaOH, asetik asit ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in renk giderimini bir miktar artırdığını ancak bu durumun söz konusu maddelerin artan konsantrasyonlarından etkilenmediğini söyleyebiliriz. Gerek tekstil endüstrisinin kullandığı ve gerekse diğer kaynaklardan gelebilecek çeşitli yüzey aktif maddelerinde renk giderimi üzerine etkinliğini araştırmak üzere reaksiyon ortamına Tween 80 ilave edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 10 mM Tween 80 ilave edildiğinde renk gideriminde kayda değer bir azalmanın olduğu (%54.68) görülmektedir. Renk giderimindeki bu azalmanın Tween 80 konsantrasyonu ile ilişkisini belirlemek için daha yüksek konsantrasyonlarda ortama Tween 80 ilave edilmiş ve 100 mM Tween 80 konsantrasyonunda renk giderimi %20.22 seviyesine gerilemiştir. Bu sonuçlara göre, belirlenen optimum koşullarda lakkaz enzimi ile boyarmadde içeren bir atıksu örneğinde renk giderimi yapılacaksa, söz konusu atık suya yüzey aktif bir maddenin karışmasının engellenmesi, eğer engellenmiyorsa düşük kon-

santrasyonlarda bulunması renk giderim sürecini olumlu yönde etkileyecektir.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre *T. versicolor* ATCC 200801'den elde edilen yüksek lakkaz aktivitesine sahip kültür sıvısının, ticari olarak satılan ve kot boyama amacı ile kullanılan boyarmaddenin enzimatik renk giderimi için bir kullanım potansiyeline sahip olduğu görülmüştür. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda belirlenen koşullarda diğer kirleticilerin ortamda bulunması durumunda da renk gideriminin etkin bir biçimde devam etmesi geliştirilmeye çalışılan sürecin endüstriyel uygulamaları için umut verici sonuçlar olarak değerlendirilmektedir.

## KAYNAKLAR

- Abadulla, E., Tzanov, T., Costa, S., Robra, K.H., Cavaco-Paulo, A. ve Guebitz, G.M. (2000). Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3357–3362.
- Aksu, Z. ve Çağatay, Ş.Ş. (2006). Investigation of biosorption of Gemazol Turquoise Blue-G reactive dye by dried *Rhizopus arrhizus* in batch and continuous systems. *Sep. Purif. Technol.* 48(1), 24-35.
- Banat, I.M., Nigam, P., Singh, D. ve Marchant, R. (1996). Microbial decolorization of textile dye containing effluents: A review. *Bioresource Technology* 58, 217-227.
- Cameselle, C., Pazos, M., Lorenzo, M. ve Sanroman, M.A. (2003). Enhanced decolorization ability of laccase towards various synthetic dyes by an electrocatalysis technology. *Biotechnol. Lett.* 25, 603–606.
- Gedikli, S. (2008). Çeşitli Makrofungus İzolatlarının Lakkaz Üretim Yetenekleri Açısından Değerlendirilmesi ve Dekolorizasyon Uygulamalarında Kullanılabilirliği. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir.
- Gianfreda, L., Xu, F. ve Bollag, J. (1999). Laccase: A useful Group of oxidoreductive enzymes. *Biorem. J.* 3, 1-25.
- Kocaer, F.O. ve Alkan, U. (2002). boyarmadde içeren tekstil atıksularının arıtım alternatifleri. *Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi* 7(1), 47-55.
- Kumar, K.V., Ramamurthi, V. ve Sivanesan, S. (2006). Biosorption of malachite green, a cationic dye onto *Pithophora sp.*, a fresh water algae. *Dyes and Pigments* 69, 74-79.
- Kunamneni, A., Ghazi, I., Camarero, S., Ballesteros, A., Plou, F.J. ve Alcalde, M. (2008). Decolorization of synthetic dyes by laccase immobilized on epoxy-activated carriers. *Process Biochemistry* 43(2), 169-178.
- Monteiro, M.C. ve Carvalho, M.E.A. (1998). Pulp bleaching using laccase from *Trametes versicolor* under high temperature and alkaline conditions. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 70-72, 983-993.
- Mougin, C., Jolival, C., Briozzo, P. ve Madzak, C. (2003). Fungal laccases: from structure-activity studies to environmental applications. *Environmental Chemistry Letters* 1(2), 145-148.
- Nagai, M., Sato, T., Watanabe, H., Saito, K., Kawata, M. ve Enei, H., (2002). Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes* and decolorization of chemically different dyes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 327–335.
- Nyanhongo, G.S., Gomes, J., Guebitz, G.M., Zvauya, R., Read, J. ve Steiner, W. (2002). Decolorization of textile dyes by laccases from a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Water Research* 36, 1449–1456.
- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R. ve Nigam, P. (2001). Remediation of dyes in textile effluents: A critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology* 77, 247-255.
- Rodríguez, C.S., Sanromán, M.A., Hofer, D. ve Gübitz, G.M. (2004). Production of laccase by *Trametes hirsuta* grown in an immersion bioreactor and its application in the decolorization of dyes from a leather factory. *Engineering in Life Science* 4(3), 233-238.
- Rodríguez, C.S., Sanroman, M. ve Gübitz, G.M. (2005). Influence of redox mediators and metal ions on synthetic acid dye decol-

- ourization by crude laccase from *Trametes hirsuta*. *Chemosphere* 58, 417–422.
- Rodriguez, C.S. ve Herrera, F.L.T. (2006). Industrial and biotechnological applications of laccase. *Biotechnology Advances* 24, 500-513.
- Rodriguez, E., Pickard, M.A. ve Vazquez-Duhalt, R. (1999). Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. *Curr. Microbiol.* 38, 27–32.
- Saparrat, M.C.N., Mocchiutti, P., Liggieri, C.S., Aulicino, M.B., Caffini, N.O., Balatti, P.A. ve Martinez, M.J. (2007). Ligninolytic Enzyme ability And Potential Biotechnology Applications Of The White-rot Fungus *Grammothele subargentea* LPSC No: 436 Strain. *Proces Biochemistry* 43, 368-375.
- Selvam, K., Swaminathan, K. ve Chae, K.S. (2003). Decolorization of azo dyes and a dye industry effluent by a white rot fungus *Thelephora sp.* *Bioresource Technology* 88(2), 115–119.
- Stolz, A. (2001). Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 56, 69-80.
- Taşpınar, A. ve Kolankaya, N. (1998). Optimization of enzymatic chlorine removal from Kraft pulp. *Bull. of Environ. Contamin. & Toxicol.* 61, 15-21.
- Ünyayar, A., Mazmanci, M.A., Atacag, H., Erkurt, E.A. ve Coral, G. (2005). A Dri-maren Blue X3LR dye decolorizing enzyme from *Funalia trogii* one step isolation and identification. *Enzyme Microb. Technol.* 36, 10–16.