



İmmobilize ve Serbest Lakkaz Enziminin Optimum Koşullarının Araştırılması ve Renk Giderme İşleminde Kullanımı

Investigation of the Optimum Conditions of Immobilized and Free Laccase Enzyme and its Use in Decolorization Process

Haydar Altınok*¹

¹Kırıkkale Üniversitesi, Kimya Bölümü, , 71450 Kırıkkale, TURKEY

Başvuru/Received: 17/06/2018

Kabul/Accepted: 17/01/2019

Son Versiyon / Final Version: 30/01/2019

Öz

Bu çalışmada *Trametes versicolor*' dan elde edilen Laccase enzimi (L), poli(N-izopropilakrilamid)-kalsiyum aljinat, (P(NIPA)-CaAlj) boncuklarına hapsedme yöntemi ile immobilize edildi. İmmobilize enzimin özellikleri ve enzimatik renk giderme işlemlerinde kullanımı araştırıldı ve serbest enzim ile karşılaştırıldı. Michaelis-Menten sabiti (Km) ve maksimum reaksiyon hızı (Vmax) değerleri sırasıyla serbest enzim için $1,70 \times 10^{-2}$ mM ve $2,08 \times 10^{-3}$ mM.dakika⁻¹ olarak bulundu. İmmobilize enzim için Km ve Vmax değerleri de sırasıyla $4,80 \times 10^{-2}$ mM ve $8,70 \times 10^{-3}$ mM.dakika⁻¹ olarak bulundu. Optimum pH değerleri serbest enzim için 5,0 ve immobilize enzim için 6,0 olarak belirlendi. Optimum sıcaklık sırasıyla serbest lakkaz ve immobilize lakkaz için 40°C ve 45°C olarak belirlendi. 4°C da tutulan serbest lakkazın 30 günlük depolama sonrasında orijinal aktivitesinin % 60'ını koruduğu bulunurken aynı koşullarda tutulan immobilize enzimin ise orijinal aktivitesinin% 83'ünü koruduğu bulundu. İmmobilize enzimin 10 kez tekrar kullanım sonrasında orijinal aktivitesinin % 77'sini koruduğu bulunmuştur. Metil oranjin renginin giderilmesinde, serbest lakkaz ve immobilize lakkaz için renk giderme yüzdeleri sırasıyla %73 ve %70 olarak bulundu.

Anahtar Kelimeler

“Lakkaz, immobilizasyon, hapsedme, kalsiyum-aljinat, N-izopropilakrilamid, renk giderme”

Abstract

In this study, Laccase enzyme (L) from *Trametesversicolor* was entrapped into poly(N-isopropylacryl amide)-calcium alginate (P(NIPA)-CaAlj) beads The properties of the immobilized enzyme and use of enzymatic decolorization processes were investigated and compared with those of the free enzyme. Michaelis-Menten constant (Km) and maximum reaction rate (Vmax) values were found to be 1.70×10^{-2} mM and 2.08×10^{-3} mM.min⁻¹ for free enzyme respectively. Km and Vmax values were found as 4.80×10^{-2} mM and 8.70×10^{-3} mM.min⁻¹ for entrapped enzymes respectively. Optimum pH was determined as 5.0 and 6.0 and optimum temperature determined as 40°C and 45°C for free laccase and entrapped laccase respectively. After 30 days of storage at 4 °C free laccase retained 60 % of its original activity. Also after 30 days of storage at 4 °C, entrapped enzymes were retained 83 % its original activity. Immobilized enzyme was used repeatedly 10 times, were retained 77 % of its original activities. Percent decolorization of methyl orange by free enzyme and entrapped enzymes were found to be 73% and 70%, respectively.

Key Words

“Laccase, immobilization, entrapment, calcium-alginate, N-isopropylacrylamide, decolorization”

1. GİRİŞ

İçinde yaşadığımız dünya, özellikle son yıllarda dünya nüfusunun önlenemez bir şekilde hızlı artması ve buna paralel olarak da endüstriyel ürün kullanımının artması nedeniyle çok hızlı bir şekilde kirlenmektedir. Son yıllarda çevre kirliliğini önlemek amacıyla yapılan çalışmalar çok büyük bir önem kazanmıştır. Çevre kirliliğine neden olan katı, sıvı ve gaz atıklar biyolojik, fiziksel ve kimyasal atıklar olarak sınıflandırılırlar. Bazı mikroorganizmalar çevre kirliliğine neden olan bu atıkları besin ve enerji kaynağı olarak kullanabilmektedirler. Son yıllarda biyoteknolojik yöntemler kullanılarak enzim üretimi ve enzimlerin biyolojik arıtma işlemlerinde kullanılması çalışmaları dikkat çeken çalışma alanlarından olmuştur. Fenol içeren polisiklik aromatik hidrokarbonlar pek çok endüstriyel atıklar içerisinde bulunmaktadır. Enzimler suda çözünen biyolojik katalizörler olduğu için, suda çözünen endüstriyel atıkların arıtılması için kullanılabilirler. Tekstil endüstrisinde boyar madde olarak kullanılan maddeler çevre ve su kirliliğine neden olmaktadır. Beyaz çürükçül mantarlardan elde edilen lakkaz enzimi oksidoredüktaz türü bir enzimdir (Gianfreda vd., 1999; Kaim ve Schwederski, 1991). Lakkaz, Sentetik boyalar, tekstil, kâğıt, kozmetik ve ilaç endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu boyaların atıklarının çoğu, doğada zor parçalandığı için çevre kirliliğine neden olmaktadır, bu da insan sağlığı için tehdit oluşturmaktadır. Boya atıklarının bozularak renksizleştirilmesi çeşitli fiziksel ve kimyasal metotlarla gerçekleştirilebilir. Bu metotlar arasında adsorpsiyon, koagülasyon-flokülasyon, iyon değiştirme, yükseltgenme sayılabilir. Bu metotların maliyetlerinin yüksek olması kullanımlarını sınırladığı için boya atıklarının biyobozunmasının enzimatik yoldan gerçekleştirilmesi bir alternatif olarak ortaya çıkmaktadır. Özellikle atık suların arıtılması ve renk giderme işlemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Davis ve Burns, 1990; Davis ve Burns, 1992). Lakkaz aromatik aminlerin renginin giderilmesi ve atık suların arıtılması için kullanılan bir enzimdir (Shuttleworth ve Bollag, 1986 ; Milstein vd., 1988). Lakkaz enzimi aynı zamanda fenol içeren atıkları arıtmak için kullanılan önemli bir enzimdir (Nicell vd., 1993; Bamforth vd., 2005). Enzimler bir destek materyali üzerine tutturularak tekrar kullanılabilir hale getirildiklerinde ekonomik olarak arıtma işlemlerinde kullanılabilirler. Lakkaz enzimi pek çok destek materyaline tutturularak kullanılmıştır. Örneğin hapsedme yöntemi ile polimerik jellere immobilize edilmiş (Curulli vd., 2006), içiçe geçmiş poliakrilamid polimer ağlara hapsedme yöntemi ile tutturulmuş (Gökgöz ve Altınok, 2012) karragenan bazlı yarı içiçe geçmiş polimer ağlara tutturularak kullanılmıştır (Makas vd., 2010).

Poli (N-İzopropil akrilamid) (P-NİPA) Molekül formülü $[H_2C-CH-CO-NH-CH(CH_3)_2]_n$, sıcaklığa duyarlı polimer P-NİPA ilk olarak 1950 yılında sentezlenmiştir. P(NİPA) sıcaklık ve pH hassasiyetinden dolayı biyolojik olarak aktif sistemlerde (protein konjugasyonunda) katyonu aktif çözülebilir polimer olarak su ve fizyolojisine uygun ortamlarda kullanılır. P-NİPA'nın kenar zincirlerindeki hidrofilik amid gurupları ve hidrofobik izopropil guruplarından dolayı çapraz bağlı şişmiş hidrojel oluşturur. P-NİPA hidrojel sulu çözeltide, hızlı ve dönüşebilir hidrasyon-dehidrasyon değişimini Kritik Çözelti Sıcaklığına yakın küçük sıcaklık değişimlerinde gösterir. Kritik Çözelti Sıcaklığının altında hidrojel şişerken, üzerindeki sıcaklıkta ise hidrojel büzülür ve bozulmuş, suyu gitmiş hidrofobik bir hal oluşur. Bunun sebebi ise network yapıdaki hidrofilik-hidrofobik dengenin bozulmasından dolayıdır. Sıcaklığa hassas P-NİPA hidrojelini immunoassay uygulamalarında, ilaç sistemlerinde, ayırma işlemlerinde ve enzimlerin immobilizasyonunda kullanışlı bir maddedir. Bu uygulamalarda şişme tarzı ve mekaniksel kuvvet önemlidir. Hidrojellerin şişme derecesi; hidrojinin doğasına, şiştiği ortama ve çapraz bağlanma yoğunluğuna bağlıdır (Chen ve Hoffman, 1995, Ringsdorf vd., 1991).

Bu çalışmada Lakkaz enzimi (L), (P(NİPA)-CaAlj) boncuklarına hapsedme yöntemi ile immobilize edildi. İmmobilize enzimin özellikleri ve enzimatik renk giderme işlemlerinde kullanımı araştırıldı ve serbest enzim ile karşılaştırıldı.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Lakkaz : (EC 1.10.3.2. 27,5 U/mg, Fluka (Almanya) firmasından alındı, Kalsiyum Klorür: $CaCl_2$ MA:110,99 g/mol, Sitrik asit : ($C_6H_8O_7$, MA:192,13 g/mol), Sodyum hidroksit: (NaOH, MA:40,0 g/mol) ve N,N,N',N'-Tetrametiletilediamin (TEMED) : ($C_6H_{16}N_2$, MA:116,21 g/mol) Merck (Almanya) firmasından sağlandı, 4-Hidroksi-3,5-dimetoksibenzaldehit azin (Siringaldazin) : ($C_{18}H_{20}N_2O_6$, MA:360,3 g/mol) ve Sodyum aljinat Sigma (Almanya) firmasından alındı, N-izopropil akrilamid : ($C_6H_{11}NO$, MA:113,16 g/mol) Aldrich (Almanya) firmasından sağlandı, Amonyum persülfat : ($(NH_4)_2S_2O_8$, MA:228,19 g/mol) Analar (İngiltere) firmasından sağlandı, Etil alkol (Mutlak) : (C_2H_5OH , MA:46,06 g/mol) ve Fosforik asit (H_3PO_4 , MA:98,0 g/mol) Riedel-de Haen (Almanya) firmasından temin edildi.

2.2. Lakkazın İmmobilizasyonu

Sodyum aljinat (kütlece %1'lik, 0,5 g) 50 mL saf suda çözüldü ve oluşan çözeltiden 10 mL alınarak üzerine 1 mL P(NİPA) çözeltisi eklenip iyice karıştırıldı. (Poli(N-İzopropil akrilamid) elde etmek için 0,7 g N-İzopropil akrilamid 10 mL saf suda çözülerek üzerine 10 mg amonyum persülfat ve 10 damla N,N,N',N'-tetraetilediamin (TEMED) ilave edilip iyice karışması sağlandıktan sonra 10 mL sıcak saf suya yavaşça dökülerek katı çökelek oluşturuldu. Oluşan çökelek alınarak 25 mL saf suda çözüldü). Daha sonra 0,3 M $CaCl_2$ çözeltisine damla damla ilave edildi. Na-aljinat, $CaCl_2$ ile temas ettiğinde sodyum-kalsiyum değişimi nedeniyle suda çözünmeyen Ca-aljinat polimerik küreleri elde edildi. Daha sonra küreler üzerine enzim çözeltisi ilave edilerek dört saat süreyle manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak enzim immobilizasyonu gerçekleştirildi. Yüzey üzerinde adsorbe olan enzimler deiyonize su ile yıkanarak ortamdan uzaklaştırıldı. Daha sonra kullanılmak üzere 4°C'da saf su içinde bekletildi.

2.3. Serbest ve İmmobilize Lakkaz Enziminin Aktifliğinin Belirlenmesi

Serbest lakkazın aktiflik tayini literatürde verilen yöntemle göre yapıldı (Leonowicz ve Grzywnowicz, 1981). Aktiflik tayininde sitrat tamponu üzerine siringaldazin çözeltisi ve lakkaz çözeltisi veya (P(NİPA)-CaAlj) boncuklarına immobilize edilmiş lakkaz

eklenerek tepkime başlatıldı. Tepkime sonunda absorbans değerleri UV-görünür spektrofotometre kullanılarak ölçüldü. Tepkime hızı literatürde belirtildiği gibi hesaplandı (Yamak vd., 2009; Makas vd., 2010; Gökgöz ve Altınok, 2012).

2.4. Optimum pH ve Sıcaklığın Belirlenmesi

Serbest ve immobilize lakkaz enziminin aktivitesi üzerine pH'ın etkisi, 3,0-8,0. pH aralığında enzim aktivitesi ölçülerek incelendi. Tepkimelerde sıcaklık (25°C) ve siringaldazin konsantrasyonu (0,1 mM) sabit tutuldu. Optimum sıcaklığı belirlemek için ise serbest ve immobilize lakkaz Enzimi 25-70 °C sıcaklık aralığında enzim aktivitesi ölçülerek incelendi.

2.5. Depolama Süresinin Etkisi

Depolama süresinin etkisini incelemek için serbest ve immobilize lakkazlar 4°C da saklandı ve lakkaz aktiviteleri 30 gün boyunca periyodik olarak ölçüldü.

2.6 İmmobilize Enzim Aktifliğinin Kullanım Sayısı ile Değişimi

İmmobilize lakkazın kullanım sayısı ile aktifliğinde değişimi incelemek için aynı gün içerisinde 10 kez tekrar tekrar kullanıldı. P(NİPA)-CaAlj polimer boncuklarının üzerine immobilize edilmiş lakkazın aktiflik tayini yapıldı.

2.7. Kinetik Parametrelerin Bulunması

Enzim aktivitesine substrat derişiminin etkisini incelemek üzere 4 farklı derişimde substrat çözeltisi hazırlandı. Kinetik parametreler Km ve Vmax Lineweaver-Burk Eşitliğinden hesaplandı (Yamak vd., 2009).

2.8. Enzimatik Renk Giderme

Metil oranj çözeltisine ($3,0 \times 10^{-5}$ M) serbest lakkaz çözeltisi, (0,4 mg/mL) veya immobilize enzim eklenerek manyetik karıştırıcıda düşük hızda 30 °C' da inkübe edildi. 0., 15., 30., 45., 60. dakikalarda ve sonra birer saat aralıklarla 6 saat boyunca tepkime ortamından örnekler alınarak UV-görünür bölge spektrofotometresinde 466 nm de absorbans değeri ölçüldü. Lakkazın, metil oranj rengini giderme yüzdeleri aşağıdaki eşitlik yardımıyla hesaplandı

$$\% \text{ Renk Giderme} = [(A_0 - A_t) / A_0] \times 100$$

A_0 : t= 0 anındaki absorbans değeri

A_t : t = t anındaki absorbans değeri.

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1. Serbest ve İmmobilize Enzimin Aktifliğine pH Etkisi

Serbest lakkaz ve P(NİPA)-CaAlj boncuklarına immobilize edilmiş enzim için optimum pH sırasıyla 5,0 ve 6,0 olarak bulundu ve pH artışı ile maksimum aktifliğinin değişimi Şekil 1'de gösterilmiştir. Literatürde, Adsorpsiyon ve kovalent bağlanma yöntemi ile karbon fiber mikro elektrotlar üzerine immobilize edilen lakkazın optimum pH'sı 5,0 olarak verilmiştir (Freire vd., 2001), Gözenekli cam boncuklar üzerine adsorpsiyon yöntemi ile immobilize edilen lakkaz için optimum pH'sı 5,7 olduğu bulunmuştur (Luterek vd., 1998). Polimer matrislere immobilize edilen *Trametes hirsuta*'dan elde edilmiş Lakkaz için optimum pH 6 olarak bulunmuştur (Solna vd., 2005). Dopamin için hazırlanan McIlvaine tamponunda platin elektroda immobilize edilen lakkaz için optimum pH'nın 6,0 olduğu belirlenmiştir (Quan vd., 2004). Bu çalışmada bulunan sonuçlar ile literatürdeki sonuçlar uyumludur.

3.2. Serbest ve immobilize Enzimin Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi

Serbest lakkaz ve P(NİPA)-CaAlj boncuklarına immobilize edilmiş enzim için optimum sıcaklık değerleri sırasıyla 40 °C ve 45°C olarak bulunmuş ve sıcaklık artışı ile maksimum aktiflikteki değişim Şekil 2'de gösterilmiştir. Literatürde, Hidrofilik silika filmlerinde immobilize edilen *Cerrena unicolor*' dan elde edilen lakkazın maksimum performans gösterdiği sıcaklığı aralığı ise 40 – 50°C (Zawisza vd., 2006), kaolinit üzerine kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edilen lakkazın optimum sıcaklığı 50°C olarak belirlenmiştir (Hu vd., 2007). Serbest lakkaz enzimi için 45°C ve poliakrilamid (AAM), poliakrilamid - κ-karragenan hidrojellerine hapsedme yöntemi ile immobilize edilen lakkaz için optimum sıcaklık 60°C olarak bulunduğu belirtilmiştir. (Gökgöz ve Altınok, 2012), Eupergite immobilize edilen lakkazın optimum sıcaklığı 50°C olarak bulunmuştur (Hublik ve Schinner, 2000). Bu çalışmada bulunan sonuçların literatürde verilen sonuçlar ile uyumlu olduğu görülmektedir.

3.3. Serbest ve İmmobilize Enzimin Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi

Serbest lakkaz ve P(NİPA)-CaAlj boncuklarına immobilize edilen lakkazın aktifliğine depolama süresinin enzim aktifliğindeki azalmaya etkisi 4°C'da saklanan serbest ve immobilize enzimin yaklaşık beşer gün aralıklarla 30 gün boyunca aktiflik ölçümleri yapılarak araştırıldı. Serbest lakkaz, 4 °C de depolamada 30. günde başlangıç aktifliğinin % 60 ını korurken, (P(NİPA)-CaAlj) boncuklarına immobilize edilen lakkaz enzimi, aynı koşullarda başlangıç aktifliğinin % 83'ünü korumuştur. Maksimum aktifliğin depolama süresi ile değişimi Şekil 3'de gösterildi. Literatürde, magnetik kitosan nano partiküller üzerine glutraldehitte çapraz bağlanan lakkazın 30 gün sonunda aktivitesinin %85'ini koruduğu belirtilmiştir (Fang vd., 2009). Lakkaz DEAE-Granocel 500, CM-Granocel ve akrilik taşıyıcılara immobilize edildiğinde, 4°C'da 4 ay depolandığında immobilize lakkazın aktivitesinin % 90'ını koruduğu belirtilmiştir (Al-Adhmi vd., 2002). Poliakrilamid (AAM), poliakrilamid - κ-karragenan hidrojellerine hapsedme yöntemi ile immobilize edilen lakkazlar 60 günde %44-68 aralığında aktifliklerini korudukları belirtilmiştir (Gökgöz ve Altınok, 2012). Bu çalışmada bulunan sonuçlar literatürdeki sonuçlarla uyum göstermektedir.

3.4. İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanımında Aktiflik Değişiminin İncelenmesi

P(NİPA)-CaAlj boncuklarına immobilize edilen lakkaz aynı gün içerisinde 10 kez kullanılarak aktiflik ölçümü yapıldı. İmmobilize enzimin maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi şekil 4’ de gösterilmiştir. İmmobilize edilmiş enzimin 10 defa kullanılmasıyla başlangıç aktifliğinin % 77’sini koruduğu gözlemlendi. Literatürde, Magnetik kitosan nano partiküller üzerine gluteraldehit ile çarpaz bağlanan lakkazın 10 kullanımından sonra aktivitesinin yaklaşık %87’sini koruduğu tespit edilmiştir (Fang vd., 2009, Poliakrilamid (AAM), poliakrilamid - κ -karragenan hidrojellerine hapsedme yöntemi ile immobilize edilen lakkazlar 35 kez tekrar kullanımında %28-58 aralığında aktifliğini koruduğu belirtilmiştir (Gökgöz ve Altınok, 2012). Bu çalışmada 10 kez tekrar kullanım sonrasında bulunan % 77 aktiflik immobilizasyonun tekrar kullanım için uygun olduğunu göstermektedir.

3.5. Serbest ve İmmobilize Lakkazın Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

Serbest ve P(NİPA)-CaAlj boncuklarına hapsedme yöntemiyle immobilize edilen lakkazın aktifliğine substrat derişiminin etkisini araştırmak için farklı konsantrasyonlarda substrat çözeltilerinin aktiflikleri bulundu. Serbest ve P(NİPA)-CaAlj boncuklarına immobilize edilen lakkaz enziminin kinetik parametrelerini bulmak için Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Sonuçlar şekil 5 ve şekil 6 da gösterilmiştir. Serbest lakkaz için Km değeri $1,70 \times 10^{-2}$ mM, Vmax değeri $2,08 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹ olarak bulundu. P(NİPA)-CaAlj boncuklarına immobilize edilen lakkaz için, Km değeri $4,80 \times 10^{-2}$ mM ve Vmax değeri $8,70 \times 10^{-3}$ mM.dakika⁻¹ olarak bulundu. Dene sonuçlarına göre enzimin immobilize edilmesiyle Km değerinin arttığı, yani enzimin substrata olan ilgisinin düştüğü görülmektedir. Literatürde serbest ve Poliakrilamid (AAM), poliakrilamid - κ -karragenan hidrojellerine hapsedme yöntemi ile immobilize edilen lakkaz enzimleri için, Serbest lakkaz, AAM, AAM – K (0,05) ve AAM – K (0,1) için Km değerleri sırasıyla 88, 139, 133 ve 131 μ M iken, Vmax değerleri de sırasıyla $2,83 \times 10^{-6}$, $4,51 \times 10^{-6}$, $4,76 \times 10^{-6}$ ve $4,97 \times 10^{-6}$ M.dakika⁻¹ olarak bulunduğu belirtilmiştir (Gökgöz ve Altınok, 2012).

3.6. Metil Oranjin Renginin Giderilmesi

Serbest ve P(NİPA)-CaAlj boncuklarına immobilize edilen lakkaz kullanılarak metil oranjin renginin giderilmesi deneyleri yapıldı. Serbest lakkaz ve immobilize lakkaz için renk giderme yüzdeleri sırasıyla %73 ve %70 olarak bulundu. Literatürde, Coriopolis rigida’ dan elde edilen lakkaz ile mediyatör kullanmadan metil oranjin rengi bir gün sonunda % 80-% 90 oranında giderilmiştir (Gomez vd., 2005). Kaynağı Trametes hirsuta olan lakkaz ile metil oranjin renk giderime deneyinde 24 saat sonunda % 65 oranında renk giderme sağlanmıştır (Moldes vd., 2003) Bulunan sonuçlar literatür ile uyumludur.

3.7. P(NİPA)-CaAlj Boncuklarının Yapı Analizi

Sentezlenen P(NİPA)-CaAlj boncuklarının kimyasal yapısı FT-IR ile incelendi, P(NİPA)-CaAlj boncuklarının FT-IR spektrumu şekil 7 ve Fotoğraf Görüntüsü şekil 8 de gösterilmiştir.

4. SONUÇLAR

(P(NİPA)-CaAlj) boncuklarına hapsedme yöntemi ile immobilize edilen lakkazın yaklaşık % 92 oranında destek üzerine tutunduğu bulunmuştur. Serbest lakkaz için optimum pH değeri 5,0 iken (P(NİPA)-CaAlj) boncuklarına immobilize edilen lakkaz enzimi için optimum pH değeri 6,0 olduğu bulunmuştur. Serbest lakkaz enzimi için optimum sıcaklık 40°C iken (P(NİPA)-CaAlj) boncuklarına immobilize edilen lakkaz enzimi için optimum sıcaklık 45°C olduğu bulunmuştur. Serbest lakkaz için kinetik parametreler; Km değeri $1,70 \times 10^{-2}$ mM, Vmax değeri $2,08 \times 10^{-3}$ mM.dakika⁻¹ iken (P(NİPA)-CaAlj) boncuklarına immobilize edilen lakkaz enzimi için Km ve Vmax değeri değerleri sırasıyla $4,80 \times 10^{-2}$ mM, $8,70 \times 10^{-3}$ mM.dakika⁻¹ olarak bulunmuştur. Serbest lakkaz enzimi, 4 °C de depolamada 30. günde başlangıç aktifliğinin % 60 ını korurken (P(NİPA)-CaAlj) boncuklarına immobilize edilen lakkaz enzimi, 4 °C de depolamada 30. günde başlangıç aktifliğinin % 83 ünü korumuştur. (P(NİPA)-CaAlj) boncuklarına immobilize edilen lakkaz enziminin 10 kez tekrar kullanım sonunda başlangıç aktifliğinin % 77 sini koruduğu bulunmuştur. Metil oranjin renginin giderilmesinde, serbest lakkaz ve immobilize lakkaz için renk giderme yüzdeleri sırasıyla %73 ve %70 olarak bulundu.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP 2011-23 numaralı proje) tarafından desteklenmiştir.

REFERANSLAR

Al-Adhami, A.J.H., Bryjak, J., Markiewicz, B.G., & Chozch, W.P. (2002). Immobilization of wood-rotting fungi laccases on modified cellulose and acrylic carriers. *Process Biochem*, 37, 1387-1394.

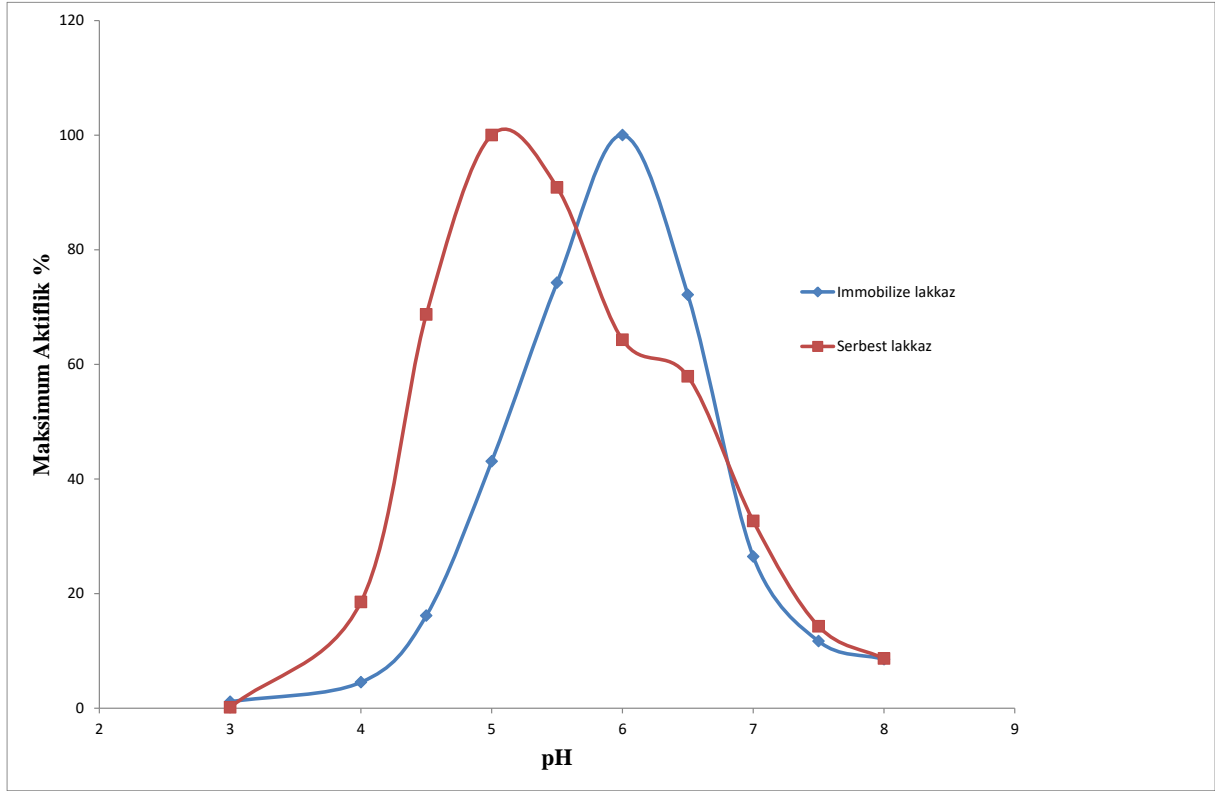
Bamforth, S.M., & Singleton, I. (2005). Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *J Chem Technol Biotechnol*, 80, 723–736.

Chen, G., & Hoffman, A. S. (1995). A new temperature- and pH responsive copolymer for possible use in protein conjugation. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 196, 1251–1259.

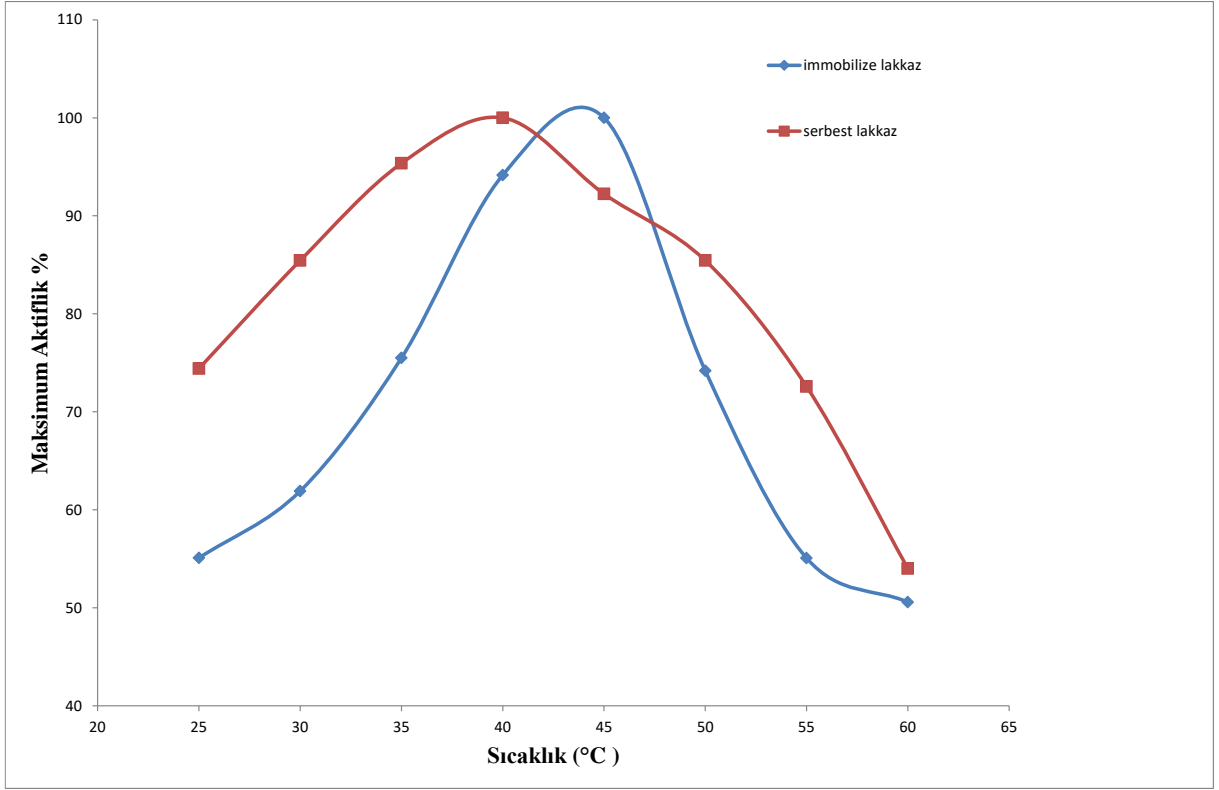
Curulli, A., Cusma, A., Kaciulis, S., Padeletti, G., Pandolfi, L., Valentini, F., & Vitocelli M. (2006). Immobilization of GOD and HRP enzyme on nanostructured substrates. *Surf. Interface Anal*, 38, 478–481.

- D'Annibale, A., Stazi, A., Vinciguerra, S.R., & Giovannozzi, V.G. (2000). Oxirane-immobilized *Lentinula edodes* laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater. *Biotechnol*, 77, 265-273.
- Davis, S., & Burns, R. G. (1990). Decolorization of phenolic effluents by soluble and immobilized phenol oxidases. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 32, 721–726.
- Davis, S., & Burns, R. G. (1992). Covalent immobilization of laccase on activated carbon for phenolic effluent treatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 37, 474–479.
- Fang, H., Huang, J., Ding, L., Li, M., & Chen, Z. (2009). Preparation of magnetic Chitosan nanoparticles and immobilization of Laccase. *Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed*, 24 (1), 42-47.
- Freire, R.S., Durán, N., & Kubota, L.T. (2001). Effects of fungal laccase immobilization procedures for the development of a biosensor for phenol. *Talanta*, 54, 681-686.
- Gianfreda, L., Xu, F., & Bollag, J. M. (1999). Laccases: A Useful Group of Oxidoreductive Enzymes. *Bioremediat. J*, 3, 1–26.
- Gokgoz, M., & Altinok, H. (2012). Immobilization of laccase on polyacrylamide and polyacrylamide - κ - carragennan-based semi-interpenetrating polymer networks. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 40, 326–330.
- Gomez, J., Pazos, M., Couto, R., & Sanroman, M. (2005). Chestnut shell and barley bran as potential substrates for laccase production by *Corilopsis rigida* under solid-state conditions. *Journal of Food Engineering*, 68, 315-319.
- Hu, X., Zhau, X., & Hwang, H. (2007). Comparative study of immobilized *Trametes versicolor* laccase on nonparticles and kaolinite. *Chemosphere*, 66, 1618-1626.
- Hublik, G., & Schinner, F. (2000). Characterization and immobilization of the Laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of fenolic pollutants. *Enzyme Microb Tech*, 27, 330-336.
- Leonowicz, A., & Grzywnowicz, K. (1981). Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate. *Enzyme Microb Tech*, 3, 55-58.
- Luterek, J., Gianfreda, L., Wojtas-Wasilewska, M., Cho, N., Rogalski, J., Jaszek, M., Malarczyk, E., Staszczak, M., Fink Boots, M., & Leonowicz, A. (1998). Activity of free and immobilized extracellular *Cerrena unicolor* Laccase in water miscible organic solvents. *Cat. Inist*, 52, 589-595.
- Makas, Y.G., Kalkan, N.A., Aksoy, S., Altinok, H., & Hasirci, N. (2010). Immobilization of laccase in -carrageenan based semi-interpenetrating polymer Networks. *Journal of Biotechnology*, 148, 216–220.
- Milstein, O., Haars, A., Majerczyk, A., Trojanowski, J., Tautz, D., Zanker, H., & Huttermann, A. (1988). Removal of Chlorophenols and Chlorolignins from Bleaching Effluent by Combined Chemical and Biological Treatment. *Water Sci. Technol*, 20(1), 161–170.
- Moldes, D., Gallego, P., Couto, R. & Sanroman, A. (2003). Grape seeds: the best lignocellulosic waste to produce laccase by solid state cultures of *Trametes hirsute*. *Biotechnology Letters*, 25, 491-495.
- Nicell, J.A., Al-Kassim, L., Bewtra, J.K., & Taylor, KE. (1993). Wastewater treatment by enzyme catalysed polymerization and precipitation. *Biodeterior Abstr*, 7, 1–8.
- Quan, D., & Shin, W. (2004). Amperometric detection of Catechol and Catecholamines by immobilized Laccase from *DeniLite*. *Electroanalysis*, 16 (19), 1576-1582.
- Ringsdorf, H., Venzmer, J., & Vinnik, F.M. (1991). Use of Nonradioactive energy-transfer to explore interpolymer and polymer solute interaction in aqueous solutions of poly (thermal- isopropyl-acrylamide). *Macromolecules*, 24, 1678–1686.
- Shuttleworth, K. L., & Bollag, J. M. (1986). Soluble and immobilized laccase as catalysts for the transformation of substituted phenols. *Enzym. Microb. Technol*, 8, 171–177.
- Solna, R., & Petr, S. (2005). Amperometric flow-Injection determination of phenolic compounds using a biosensor with immobilized Laccase, Peroxidase and Tyrosinase. *Electroanalysis*, 17 (23), 2137–2146.
- Yamak, O., Kalkan, N.A., Aksoy, S., Altinok, H., & Hasirci, N. (2009). Semi-interpenetrating polymer networks (semi-IPNs) for entrapment of laccase and their use in Acid Orange 52 decolorization. *Process Biochem*, 44, 440–445.

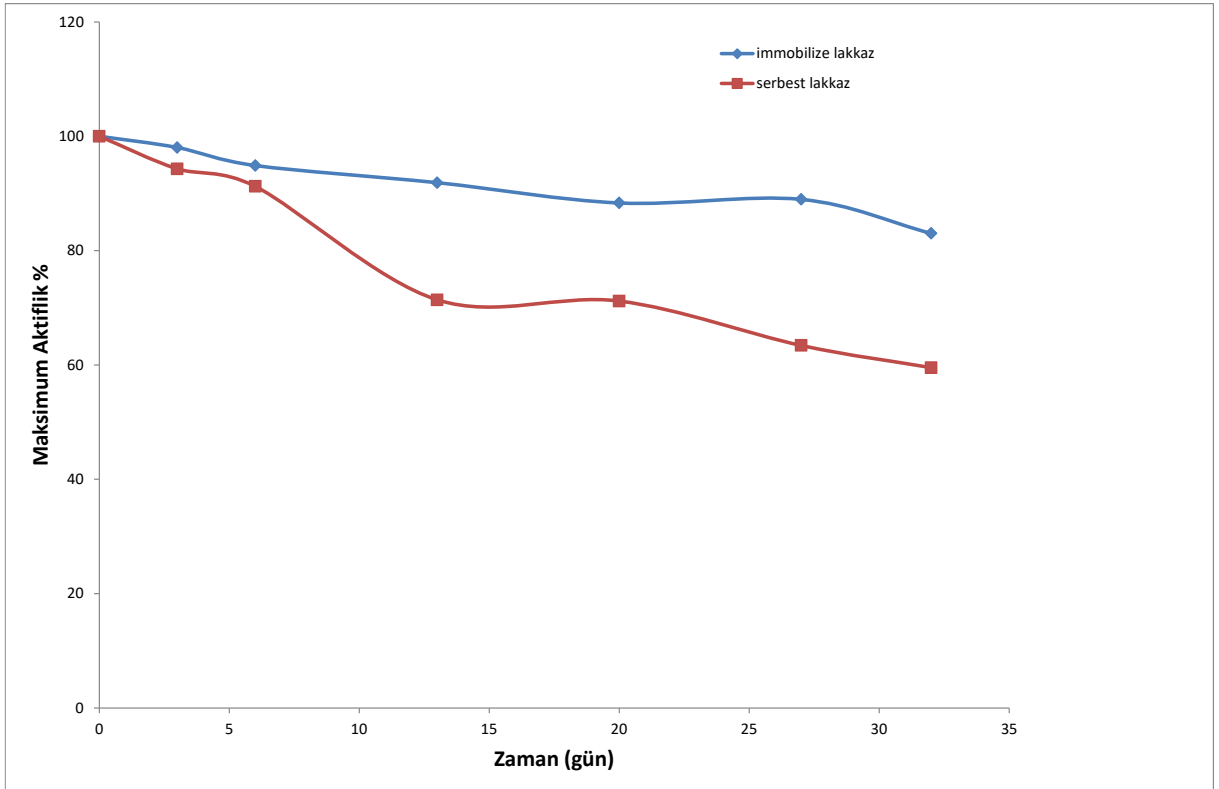
Zawisza, I., Rogalsky, J., & Opallo, M. (2006). Electrocatalytic reduction of dioxygen by redox mediator and laccase immobilized in silicate thin film. J. Electroanal Chem, 588, 244-252.



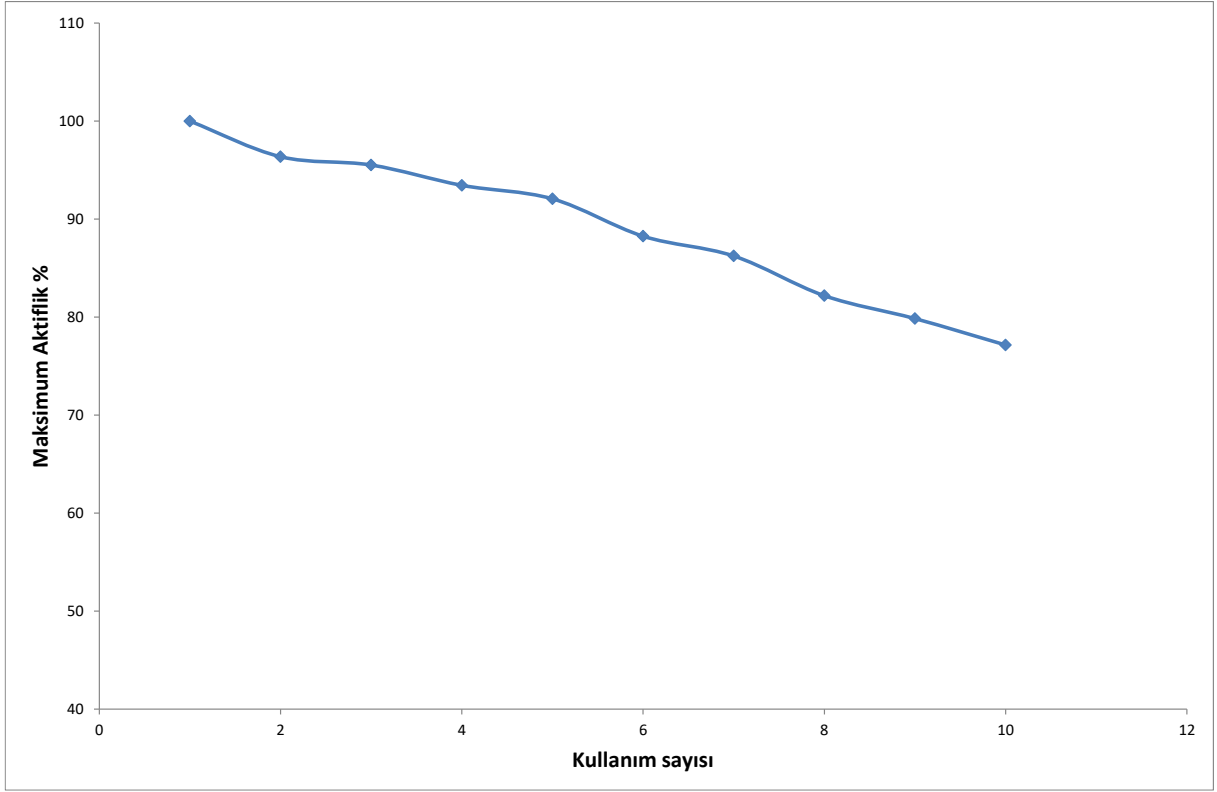
Şekil 1. Serbest ve immobilize enzimin maksimum aktifliğinin pH ile değişimi.



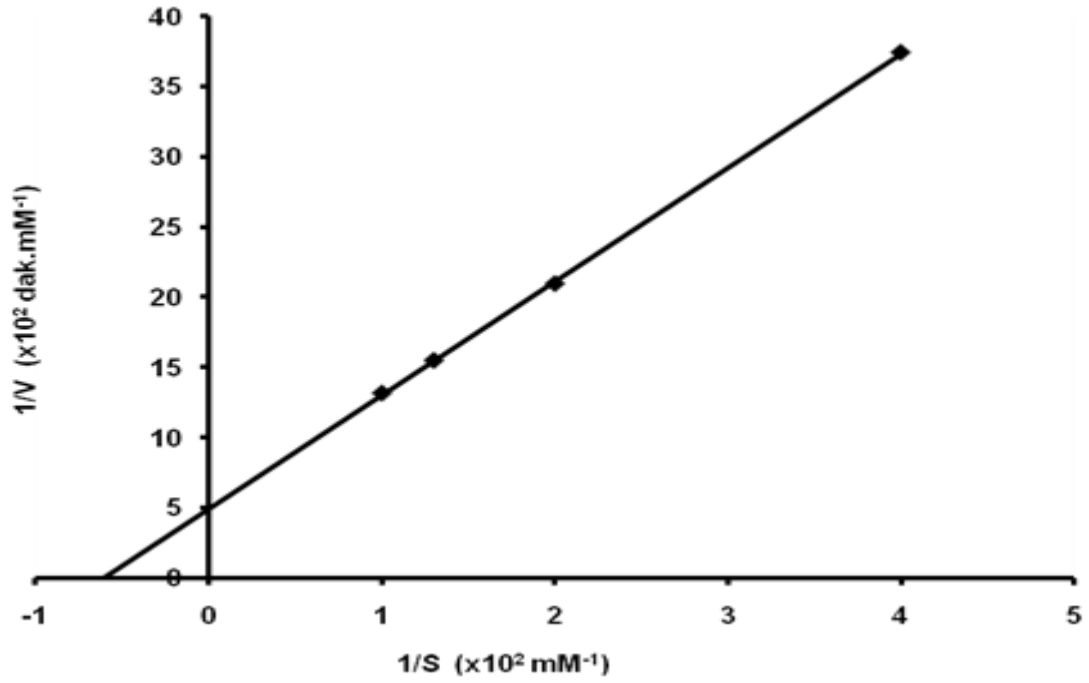
Şekil 2. Serbest ve immobilize enzimin maksimum aktifliğinin sıcaklık ile değişimi.



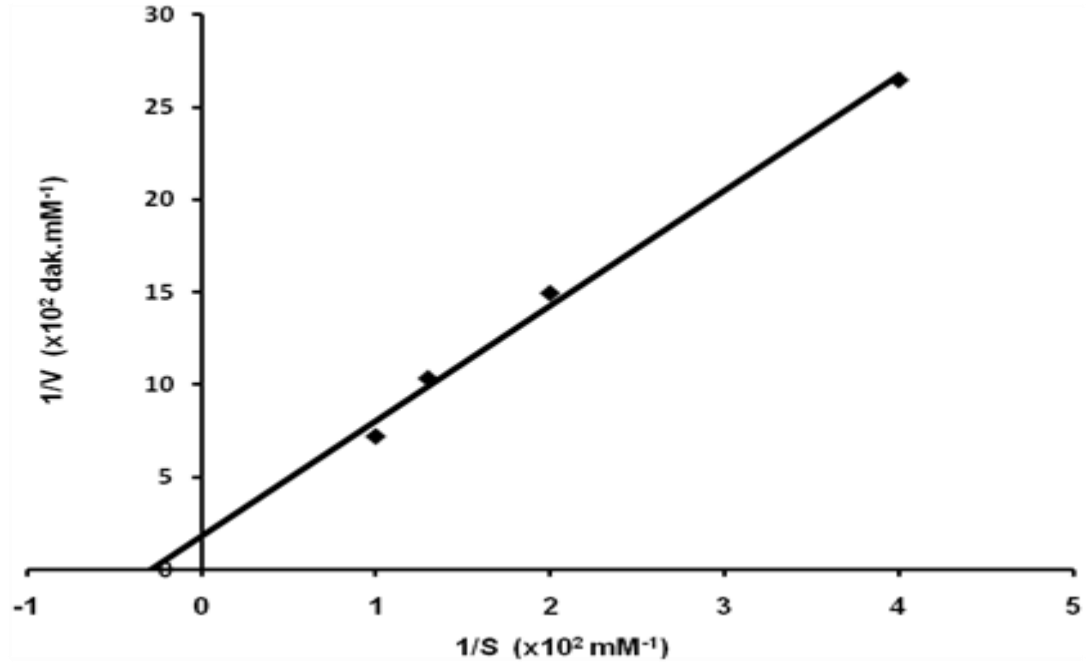
Şekil 3. Serbest ve İmmobilize Enzimin Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi.



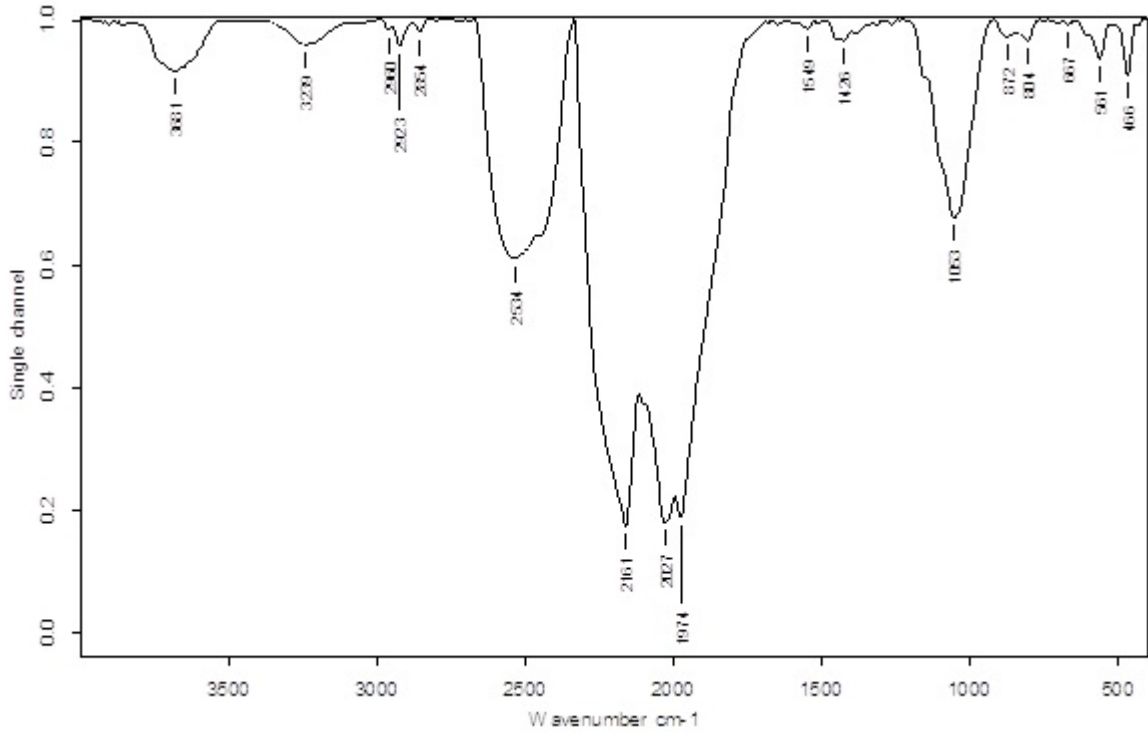
Şekil 4. İmmobilize Enzim Aktifliğinin Kullanım Sayısı ile Değişimi.



Şekil 5. Serbest enzim için Lineweaver-Burk grafiği.



Şekil 6. P(NİPA)-CaAlj hidrojel kürelerine immobilize edilen lakkazın Lineweaver-Burk grafiği.



Şekil 7. P(NİPA)-CaAlj boncuklarının FT-IR spektrumu



Şekil 8. P(NİPA)-CaAlj boncuklarının Fotoğraf Görüntüsü