

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEKSTİL ATIK SULARINDA BOYALARIN BİYOBOZUNMA İLE GİDERİLMESİ

MİTHAT ÇELEBİ

**DOKTORA TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
BİYOMÜHENDİSLİK PROGRAMI**

**DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. ZEYNEP MUSTAFAEVA AKDESTE**

İSTANBUL, 2013

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEKSTİL ATIK SULARINDA BOYALARIN BİYOBOZUNMA İLE GİDERİLMESİ

Mithat Çelebi tarafından hazırlanan tez çalışması 04.06.2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Zeynep MUSTAFAEVA AKDESTE
Yıldız Teknik Üniversitesi

Eş Danışman

Prof. Dr. Hüseyin YILDIRIM
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Yrd. Doç. Dr. Zeynep MUSTAFAEVA AKDESTE
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Ayşe OGAN
Marmara Üniversitesi

Doç. Dr. Ayşegül PEKSEL
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. İbrahim IŞILDAK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Nesrin EMEKLİ
Medipol Üniversitesi

Bu alışma, İstanbul Sanayi Odası ile Yıldız Teknik Üniversitesi arasında, sanayi-üniversite işbirliğinin geliştirilmesi ve akademik çalışmaların ekonomik kalkınmaya katkısının arttırılması amacıyla başlatılan İSO-YTÜ Doktora/Yüksek Lisans Tezlerine Sanayi Desteği” projesi kapsamında İstanbul Sanayi Odası tarafından ve Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü’nün YTÜ-BAPK-29-01-02-GEP01 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Değerli katkılarından ve yönlendirmelerinden dolayı danışmanım Yrd. Doç. Dr. Zeynep Mustafaeva Akdeste ve değerli önerileri ve destekleri için eş danışmanım Prof.Dr. Hüseyin Yıldırım'a,

Her türlü bilimsel katkı ve desteklerinden dolayı Doç. Dr. Melda Altıkatoğlu'na ve mikroorganizma ile ilgili kısmında tecrübelerine başvurduğumuz ve fikirini aldığımız Doç.Dr. Ayşegül Peksel'e, çalışmanın polimerler ile ilgili kısmında yardımlarını aldığım Yrd. Doç. Dr. Mehmet Arif Kaya'ya,

İstanbul Sanayi Odası ve İstanbul Sanayi Odası (İSO) 11. Komite üyelerine doktora tez çalışmasını destekledikleri için, ayrıca atık su teminindeki yardımlarından ve konunun tekstil endüstrisi açısından önemini vurgulamasından dolayı İSO 11. Komite üyesi ve İSO Çevre İhtisas Kurulu Başkanı Fikret Tanrıverdi'ye, İSO ile araştırmacı arasındaki iletişimi sağlayan Hakan Çoban'a,

Atomik Kuvvet Mikroskobu ölçümleri için Araş. Gör. Yeliz Başaran'a, Floresans ölçümleri için Araş. Gör. Dr. Yasemin Budama'ya, yardımları için Yrd. Doç. Dr. Zafer Ömer Özdemir'e, Araş. Gör. Murat Topuzoğulları'na ve çalışmalarımda bana yardımcı olan arkadaşlarıma,

Lisans, yüksek lisans ve doktora eğitimim ilk yılları süresince, çok değerli katkı ve yardımlarını aldığım Y.T.Ü. Biyomühendislik Bölümü'nün kurulmasında emeği geçen rahmetli Prof. Dr. Huriye Kuzu'ya ve Biyomühendislik Bölümü'nün kurulmasını sağlayan rahmetli Prof. Dr. Mehmet Mustafaev Akdeste'ye,

Laboboratuvarlarını bizlere açtıkları için Y.T.Ü. Biyomühendislik Bölüm Başkanı Prof.Dr. İbrahim Işıldak'a, Bölüm Başkan yardımcısı ve Dekan yardımcısı Prof. Dr. Mustafa Cemek'e, ayrıca Prof. Dr. Adil Allahverdiyev'e, Doç. Dr. Sevil Yücel'e ve YTÜ Biyomühendislik Bölümü'ndeki diğer hocalarıma,

Hayatımın her döneminde maddi ve manevi destek olan ve hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan öncelikle sevgili Anneme, Anneme, Anneme, Babama, Kardeşlerime, Kimyager Mehmet Toraman'a, arkadaşlarıma ve manevi desteğini hissettiğim değerli hocalarıma,

İlgisi ve sabırı ile hep yanımda olan sevgili eşime ve manevi desteğini hissettiğim oğullarım Yunus Hamza ve Ömer Taha'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Mayıs, 2013

Mithat ÇELEBİ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

KISALTMA LİSTESİ.....	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xv
ÖZET.....	xviii
ABSTRACT.....	xx
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı.....	7
1.3 Hipotez	7
BÖLÜM 2	
BOYALAR.....	9
2.1 Boyaların Kimyasal Yapılarına Göre Sınıflandırılması	9
2.2 Boyaların Kullanım Amacına Göre Sınıflandırılması	9
2.2.1 Asit Boyalar	11
2.2.2 Bazik Boyalar	11
2.2.3 Reaktif Boyalar	12
2.2.4 Dispers Boyalar	13
2.2.5 Direkt Boyalar	13
2.2.6 Mordan Boyalar	14
2.2.7 Küpe Boyalar	14
2.2.8 İnkişaf Boyalar.....	15
2.2.9 Metal-Kompleks Boyalar.....	15
2.2.10 Pigment Boyalar.....	15
BÖLÜM 3	

TEKSTİL ATIK SULARININ ÖZELLİKLERİ ve ATIK SULARDAKİ BOYALARIN ÇEVREYE ETKİLERİ.....	16
--	----

3.1 Boya Türlerinin Bağlanma Yüzdeleri.....	17
3.2 Atık Sulardaki Kimyasalların ve Boyaların Oluşturduğu Kimyasal Riskler.....	18
3.2.1 Zehirlilik.....	19
3.2.2 Atık Sulardaki Ağır Metaller.....	21
3.2.3 Yardımcı Kimyasallar.....	22
3.2.4 Renk.....	23

BÖLÜM 4

TEKSTİL ATIK SULARINDA BOYALARIN GİDERİLME YÖNTEMLERİ	24
---	----

4.1 Fiziksel Arıtma Yöntemleri.....	24
4.1.1 Adsorpsiyon	24
4.1.2 Sedimentasyon	25
4.1.3 Membran Filtrasyonu	25
4.2 Kimyasal Arıtma Yöntemleri.....	26
4.2.1 Koagülasyon ve Flokulasyon	26
4.2.2 Ozon.....	28
4.2.3 H_2O_2 -Fe(II) Tuzları (Fenton Ayırıcı).....	29
4.2.4 Fotokimyasal Yöntem	29
4.2.5 Elektrokimyasal Yöntem	29
4.3 Biyolojik Arıtma Yöntemleri	30
4.3.1 Aerobik Yöntem	30
4.3.1.1 Aktif Çamur Sistemi	31
4.3.2 Anaerobik Yöntem	32
4.3.3 Biyosorpsiyon.....	35

BÖLÜM 5

BOYALARIN ENZİMLER İLE GİDERİLMESİ	39
--	----

5.1 Horseradish Peroksidaz Enzimi (HRP)	39
5.1.1 HRP Reaksiyon Mekanizması	43
5.2 Lakkaz Enzimi.....	43
5.3 Lignin Peroksidaz Enzimi (LiP)	44
5.3.1 Redoks Mediatorleri	45

BÖLÜM 6

ENZİM İMMOBİLİZASYONU.....	46
----------------------------	----

6.1 Enzimlerin Stabilizasyonu	46
6.2 Enzim İmmobilizasyonu	47
6.2.1 Enzimlerin İmmobilizasyon Yöntemleri	48
6.2.1.1 Adsorpsiyon	48
6.2.1.2 İyonik Bağlanma.....	49
6.2.1.3 Kovalent Bağlanma	50

6.2.1.4	Çapraz Bağlanma	52
6.2.1.5	Tutuklama Yöntemleri	53

BÖLÜM 7

BOYALARIN MİKROORGANİZMA İLE GİDERİLMESİ.....	56
7.1 Beyaz Çürükçül Mantarlar	56
7.2 Mantarların Boya Gidermede Kullanımını Etkileyen Faktörler	58
7.2.1 Besiyeri İçeriği	58
7.2.1.1 Karbon Kaynağı	58
7.2.1.2 Azot Kaynağı	58
7.2.1.3 Diğer Bileşenler	59
7.2.2 pH.....	59
7.2.3 Oksijen	59
7.2.4 Sıcaklık.....	59
7.2.5 Başlangıç Boya Konsantrasyonu	60

BÖLÜM 8

DENEYSEL ÇALIŞMA.....	61
8.1 Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	61
8.1.1 Kullanılan Cihazlar	61
8.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	62
8.1.3 Kullanılan Cihazlar	63
8.1.3.1 UV-Visible Spektrofotometresi	63
8.1.3.2 Fourier Transform Infrared Spektroskopi (FT-IR)	63
8.1.3.3 Atomik Kuvvet Mikroskopi (AFM)	64
8.1.3.4 Floresans Spektrometresi	64
8.1.4 Horseradish Peroksidaz Enziminin Aktivite Tayini	65
8.1.5 Kullanılan Reaktifler	65
8.1.6 Horseradish Peroksidaz Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi	65
8.1.7 Aktivite Değerlerinin Hesaplaması (U/mg)	65
8.2 Horseradish Peroksidaz Enzimi ile Reaktif Blue 19 Boyasının Giderilmesi.....	66
8.2.1 Boya Gidermenin UV-Visible Spektrofotometresi ile İncelenmesi	66
8.2.1.1 HRP Enzimi ile Boya Gidermenin Şematiksel Gösterimi	67
8.2.2 HRP Enzimi ile RB 19 Boyasının Giderilmesine pH'ın Etkisinin İncelenmesi	67
8.2.3 HRP Enzimi ile RB 19 Boyasının Giderilmesine Enzim Konsantrasyonunun Etkisi İncelenmesi	67
8.2.4 HRP Enzimi ile RB 19 Boyasının Giderilmesine Başlangıç Boya Konsantrasyonunun Etkisinin İncelenmesi	67
8.2.5 HRP Enzimi ile RB 19 Boyasının Giderilmesine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi	68
8.2.6 HRP Enzimi ile RB 19 Boyasının Giderilmesine Başlatıcı (H ₂ O ₂) Konsantrasyonunun Etkisinin İncelenmesi	68

8.2.7	HRP Enzimi ile RB 19 Boyasının Giderilmesine Üre Konsantrasyonunun Etkisinin İncelenmesi	68
8.2.8	HRP enzimi ile RB 19 Boyasının Giderilmesine NaCl Konsantrasyonunun Etkisi	68
8.3	Horseradish Peroksidaz Enzimi ile Rengi Giderilen Asit Black 1 Boyasının Floresansının Ölçülmesi	69
8.4	İmmobilize Horseradish Peroksidaz Enzimi ile Boya Giderme	70
8.4.1	Polisülfon Polimerlerinin Modifikasyonu	70
8.4.2	Destek Materyali Üzerine Enzim İmmobilizasyonu	71
8.4.3	İmmobilize Enzimin Farklı Koşullarda Aktivite Tayini	72
8.4.4	İmmobilize Horseradish Peroksidaz Enzimi ile Reaktif Blue 19 ve Asit Black 1 Boyalarının Giderilmesi	73
8.5	Beyaz Çürükçül Mantar (<i>T. versicolor</i>) ile Boyaların Giderilmesi	74
8.5.1	<i>Trametes versicolor</i> 'un Üretimi	74
8.5.1.1	Katı Besiyerine Ekimi (% 2'lik malt agar katı besi yeri)	74
8.5.2	Mikroorganizmanın Sıvı Besiyerinde Üretimi	74
8.5.3	Boya Giderme Besiyerinin Hazırlanması	75
8.5.4	Asit Black 1 (AB 1) Boyasının Giderilmesi	76
8.5.5	Reaktif Blue 19 (RB 19) Boyasının Giderilmesi	77
8.5.6	Bazik Blue 41 Boyasının <i>Trametes versicolor</i> ile Giderilmesi	77
8.5.7	Dispers Boyaların <i>Trametes versicolor</i> ile Giderilmesi	77
8.5.7.1	Dianix Reaktif Blue R (DRBR)	78
8.5.7.2	Dianix Navy CC (DNCC)	78
8.5.8	Tekstil Boya Atık Suyunun <i>Trametes versicolor</i> ile Giderilmesi	78

BÖLÜM 9

DENEY SONUÇLARI.....	79
9.1 Horseradish Peroksidaz Enzimin Farklı Koşullarda Aktivite Sonuçları. 79	
9.1.1 Enzimin Aktivitesine pH'ın Etkisi.....	79
9.1.2 Enzimin Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi	80
9.1.3 Enzimin Aktivitesine + 4 °C'de Beklemenin Etkisi.....	81
9.1.4 Enzimin 50 °C Sıcaklığa Direnci	82
9.2 RB 19 Boyasının Horseradish Peroksidaz Enzimi ile Giderilmesinin UV-Visible Spektrofotometre ile İncelenmesi	84
9.2.1 HRP Enzimi ile RB 19 Boyasının Giderilmesine pH'ın Etkisinin İncelenmesi.....	85
9.2.2 HRP Enzimi ile RB 19 Boyasının Giderilmesine Enzim Konsantrasyonunun Etkisi İncelenmesi	87
9.2.3 HRP Enzimi ile RB 19 Boyasının Giderilmesine Başlangıç Boya Konsantrasyonunun Etkisinin İncelenmesi	89
9.2.4 HRP Enzimi ile RB 19 Boyasının Giderilmesine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi.....	91
9.2.5 HRP Enzimi ile RB 19 Boyasının Giderilmesine Başlatıcı (H ₂ O ₂) Konsantrasyonunun Etkisinin İncelenmesi	93
9.2.6 HRP Enzimi ile RB 19 Boyasının Giderilmesine Üre Konsantrasyonunun Etkisinin İncelenmesi	94

9.2.7	HRP Enzimi ile RB 19 Boyasının Giderilmesine NaCl Konsantrasyonunun Etkisinin İncelenmesi	96
9.3	Asit Black 1 Boyasının ve HRP Enzimi ile Boyanın Giderilmesinin Floresans Spektroskopisi ile İncelenmesi	97
9.4	Horseradish Peroksidaz Enziminin Polimer Destek Üzerine İmmobilizasyonu.....	105
9.4.1	İmmobilize Enzimin FT-IR, C ₁₃ NMR ve AFM İle Karakterizasyonu	105
9.4.2	İmmobilize Enzimin Farklı Koşullarda Aktivite Tayini	113
9.4.3	İmmobilize Horseradish Peroksidaz Enzimi İle Reaktif Blue 19 ve Asit Black 1 Boyalarının Giderilmesi	118
9.5	Beyaz Çürükçül Mantar (<i>T. versicolor</i>) ile Boyaların Giderilmesi	120
9.5.1	Asit Black 1 (AB 1) Boyasının giderilmesi	120
9.5.2	Reaktif Blue 19 (RB 19) Boyasının giderilmesi	122
9.5.3	Dispers Boyaların <i>Trametes versicolor</i> ile Giderilmesi	123
9.5.4	Bazik Blue 41 Boyasının Giderilmesi	125
9.5.5	Tekstil Boya Atık Suyunun <i>Trametes Versicolor</i> ile Giderilmesi ..	125
BÖLÜM 10		
SONUÇ VE ÖNERİLER.....		130
10.1	Horseradish Peroksidaz Enzimi ile Reaktif Blue 19 Boyasının Giderilmesi.....	130
10.1.1	Horseradish Peroksidaz Enzimi ile Reaktif Blue 19 Boyasının Giderilmesine pH Etkisi	130
10.1.2	Horseradish Peroksidaz Enzimi ile Reaktif Blue 19 Boyasının Giderilmesine Enzim Konsantrasyonunun Etkisi.....	131
10.1.3	Horseradish Peroksidaz Enzimi ile Reaktif Blue 19 Boyasının Giderilmesine Boya Konsantrasyonunun Etkisi	131
10.1.4	Horseradish Peroksidaz Enzimi ile Reaktif Blue 19 Boyasının Giderilmesine Sıcaklığın Etkisi.....	131
10.1.5	Horseradish Peroksidaz Enzimi ile Reaktif Blue 19 Boyasının Giderilmesine Başlatıcı (Hidrojen Peroksit) Konsantrasyonunun Etkisi	132
10.1.6	Horseradish Peroksidaz Enzimi ile Reaktif Blue 19 Boyasının Giderilmesine Üre ve Tuz Konsantrasyonunun Etkisi	132
10.2	İmmobilize Horseradish Peroksidaz Enzimi ile Reaktif Blue 19 ve Asit Black 1 Boyalarının Giderilmesi	133
10.3	Asit Black 1 Boyasının ve Boyanın HRP Enzimi ile Giderilmesinin Floresans Spektroskopisi ile İncelenmesi	134
10.4	Beyaz Çürükçül Mantar (<i>T. versicolor</i>) ile Boyaların Giderilmesi	134
KAYNAKLAR.....		137
ÖZGEÇMİŞ.....		146

SİMGE LİSTESİ

%	Yüzde değeri
μ	Mikro
μL	Mikrolitre
Dak	Dakika
G	Gram
L	Litre
M	Molar, bir litre çözelti içerisindeki çözünmüş maddenin mol miktarı
Mg	Miligram
mL	Mililitre
Nm	Nanometre
°C	Derece santigrat
U	Ünite
Λ	Dalgaboyu (nm)
λ max	Maksimum Absorbansın Yapıldığı Dalga Boyu

KISALTMA LİSTESİ

A	Absorbans
AB 1	Asit Black 1
AKM	Askıda katı madde
BOİ	Biyolojik Oksijen İhtiyacı
ÇKM	Çözünmüş katı madde
DNCC	Dianix Navy CC
DRBR	Dianix Remazol Brilliant R
HBS	Hidrolik Besleme Süresi
HBT	1-hidroksibenzotriazol
HÇYR	Havasız Çamur Yataklı Reaktör
HRP	Horseradish Peroksidaz
İSO	İstanbul Sanayi Odası
KOİ	Kimyasal Oksijen İhtiyacı
LC-MS	Sıvı kromatografisi ve Kütle Spektrofotometresi
LiP	Lignin Peroksidaz
MnP	ManganPeroxidaz
PBS	Fosfat Tamponu
RB 19	Reaktif Blue 19
UV-Visible	Ultraviyole Görünür Bölge spektrofotometresi

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2. 1 C.I. Asit Black 1 boyası	11
Şekil 2. 2 Reaktif Blue 19 boyası	12
Şekil 2. 3 C.I: Dispers Blue 3 (DB3).....	13
Şekil 5. 1 Bayır turpu (<i>Armoracia rusticana</i>) “Horseradish” bitkisi [86].....	41
Şekil 5. 2 X-ışını kristalografisi ile HRP’nin üç boyutlu molekül yapısı [86].	41
Şekil 5. 3 HRP C’nin hem-bağlama bölgesindeki anahtar amino asit artıkları [86]	42
Şekil 5. 4 HRP enziminin çalışma mekanizması [62].....	43
Şekil 6. 1 Enzimin taşıyıcıya adsorpsiyon ile bağlanması.....	49
Şekil 6. 2 Enzimin iyonik bağlanma ile taşıyıcıya bağlanması.....	50
Şekil 6. 3 Enzimin taşıyıcıya bir ajan (“spacer”) ile kovalent olarak bağlanması ...	51
Şekil 6. 4 Enzimin taşıyıcıya bir ajan (“spacer”) olmadan kovalent olarak bağlanması	51
Şekil 6. 5 Enzimin taşıyıcıya çapraz bağlı olarak bağlanması	52
Şekil 6. 6 Enzimin taşıyıcıya yardımcı bir çapraz bağlayıcı ajan ile inert moleküller yardımı ile bağlanması	52
Şekil 6. 7 Enzimin (a) matriks içine, (b) fiber içine, (c) kapsül içine tutuklanması	54
Şekil 8. 1 Bisfenol A polisülfon polimerinin metakrillenmesi	71
Şekil 8. 2 Bisfenol AF bazlı polisülfon polimerinin metakrillenmesi.....	71
Şekil 8. 3 Enzimin modifiye A-PSU polimere immobilizasyonu	72
Şekil 8. 4 Enzimin modifiye AF-PSU polimere immobilizasyonu.	72
Şekil 8. 6 Sıvı besiyerinde üretilen misellerin üstten ve yandan görünüşü	75
Şekil 8. 7 Boya çözeltilerinin sıvı besiyerine ilavesinden sonraki görünüşleri	75
Şekil 9. 1 Horseradish Peroksidaz enziminin 25 °C’de farklı pH’larda ölçülen aktivite değerleri	80
Şekil 9. 2 pH: 5,0 ve farklı sıcaklıklardaki Horseradish Peroksidaz enziminin aktivite değerleri	80
Şekil 9. 3 +4 °C’de bekleyen Horseradish peroksidaz ve iki farklı immobilize enzimin farklı bekleme sürelerinde 25 °C’de ve pH: 5,0’te ölçülen aktivite değerleri	81
Şekil 9. 4 50 °C’de farklı sürelerde bekletilen enzimin pH: 5,0 ve 25 °C’de hesaplanan aktivite değerleri	82
Şekil 9. 5 50 °C’de farklı sürelerde bekletilen enzimin pH: 5,0 ve 25 °C hesaplanan aktivite değerlerine enzimin aktivitesindeki % kayıp.	83

Şekil 9. 6 pH: 5,0 ve 30 °C'de Horseradish Peroksidaz enzimi ile Reaktif Blue 19 (RB 19) boyasının giderilmesinin farklı sürelerde alınan UV-Visible Spektrumları ile incelenmesi	84
Şekil 9. 7 30 °C'de farklı pH'larda HRP enzimi ile Reaktif Blue 19 boyasının % giderilmesi.....	86
Şekil 9. 8 RB 19 boyasının (110 mg L ⁻¹) pH: 5,0 ve 30 °C'de farklı enzim konsantrasyonlarında (13,2 µg/mL (E1), 6,6 µg/mL (E2), 3,3 µg/mL (E3), 1,65 µg/mL (E4), 0,825 µg/mL (E5), 0,330 µg/mL (E6), 0,165 µg/mL (E7), 0,0825 µg/mL (E8))% boya giderme değerleri	88
Şekil 9. 9 RB 19 boyasının HRP enzimi ile farklı RB 19 boya konsantrasyonlarında 10 dakika süresince pH: 5,0 ve 30 °C'de 594 nm deki % giderme değerleri.....	90
Şekil 9. 10 pH: 5,0 ve farklı sıcaklıklarda (25-50 °C) HRP enzimi ile RB 19 boyasının (110 mg/L) % giderilmesi	92
Şekil 9. 11 RB 19 boyasının HRP enzimi ile farklı H ₂ O ₂ başlatıcısı konsantrasyonlarında 15 dakika süresince pH: 5,0 ve 30 °C'de % giderme	94
Şekil 9. 12 RB 19 boyasının HRP enzimi ile farklı üre konsantrasyonlarında 30 dak. süresince pH: 5,0 ve 30 °C'de % giderme	95
Şekil 9. 13 Farklı NaCl konsantrasyonlarında pH: 5,0 ve 30 °C'de RB 19 boyasının HRP enzimi ile % giderilmesi	97
Şekil 9. 14 Asit Black 1 boyasının (0,02 mg/mL) pH: 6,0 ve farklı bekleme sürelerinde elde edilen Emisyon Floresans spektrumları. Boya (turuncu)(enzimsiz); enzim ilavesinden sonra; sıfırıncı (mor), 2. dak. (açık yeşil), 5. dak. (açık mavi), 1. gün (sarı), 2. gün (yeşil), 3. gün (kırmızı), 4. gün (mavi).	100
Şekil 9. 15 Asit Black 1 boyasının (0,02 mg/mL) Horseradish peroksidaz enzimi ile reaksiyonunun 4. günün sonunda ve farklı pH'larda [pH: 5,0 (kırmızı), pH: 6,0 (sarı), pH: 7,0 (yeşil)] elde edilen Emisyon Floresans spektrumları.....	100
Şekil 9. 16 pH: 7,0'de Asit Black 1 boyasının farklı konsantrasyonlarında ölçülen floresans değerleri	102
Şekil 9. 17 pH: 7,0 and 30 °C'de farklı konsantrasyonlardaki AB 1 boyasına Horseradish Peroksidaz enzimi ilave edilmesinin 2. dakikasında ve 1. günündeki floresans şiddetleri	104
Şekil 9. 18 Bisfenol A bazlı Polisülfon ve metakril Bisfenol A bazlı Polisülfon polimerlerinin ATR-FTIR spektrumları.....	105
Şekil 9. 19 Bisfenol AF bazlı polisülfon ve metakril Bisfenol AF bazlı polisülfon polimerlerinin ATR-FTIR spektrumları	106
Şekil 9. 20 Bisfenol A bazlı polisülfon ve metakril Bisphenol A bazlı polisülfon için ¹ H NMR spektrumları	107
Şekil 9. 21 Bisfenol AF bazlı polisülfon ve metakril Bisphenol AF bazlı polisülfon için ¹ H NMR spektrumları	108
Şekil 9. 22 Bisfenol A bazlı Polisülfon polimerinin AFM görüntüsü.....	109
Şekil 9. 23 Metakril Bisfenol A bazlı Polisülfon polimerinin AFM görüntüsü	110

Şekil 9. 24 Enzim bağlı metakril Bisfenol A bazlı Polisülfon polimerine immobilize Horseradish Peroksidaz enzimi	110
Şekil 9. 25 Bisfenol AF Polisülfonun AFM görüntüsü	111
Şekil 9. 26 Metakrillenmiş Bifenol AF Polisülfon	112
Şekil 9. 27 Enzim bağlı metakril-Bisfenol AF Polisülfon AFM	112
Şekil 9. 28 HRP ve immobilize enzimlerin 4 °C'de farklı sürelerde bekledikten sonra pH:5,0 ve 25 °C'de hesaplanan aktiviteleri	114
Şekil 9. 29 Farklı pH'larda serbest ve immobilize enzimlerin aktiviteleri.....	115
Şekil 9. 30 HRP ve immobilize enzimlerin pH: 5,0'te farklı sıcaklıklarda hesaplanan aktiviteleri.....	116
Şekil 9. 31 HRP ve immobilize enzimlerin pH: 5,0 ve 50 °C'de farklı bekleme sürelerinde hesaplanan aktiviteleri	117
Şekil 9. 32 A bazlı-PSU destek materyali üzerine immobilize enzimin tekrar kullanılması ile iki boyanın farklı günlerde giderilmesi (k: enzim polimer sisteminin tekrar kullanımı)	119
Şekil 9. 33 AF bazlı PSU destek materyali üzerine immobilize enzimin tekrar kullanılması ile iki boyanın farklı günlerde giderilmesi (k: enzim polimer sisteminin tekrar kullanımı)	120
Şekil 9. 34 <i>Trametes versicolor</i> ile Asit Black 1 boyasının pH: 3,6'da 30 °C'de çalkalamalı ve çalkalamasız koşullarda giderilmesi	121
Şekil 9. 35 <i>Trametes versicolor</i> ile RB 19 boyasının pH: 3,6'da 30 °C'de çalkalamalı ve çalkalamasız koşullarda giderilmesi	122
Şekil 9. 36 UV-Visible Spektrofotometre ile Dianix Navy CC boyasının mikroorganizma ile farklı sürelerde renk gideriminin incelenmesi	123
Şekil 9. 37 <i>Trametes versicolor</i> ile Dianix Reaktif Blue R ve Dianix Navy CC boyaalarının farklı konsantrasyonlarda % giderilmesi.....	124
Şekil 9. 38 <i>Trametes versicolor</i> ile Bazik Blue 41 (B 41) boyasının iki farklı konsantrasyonda % giderilmesi	125
Şekil 9. 39 Tekstil fabrikasından alınan atık suyun UV-Visible spektrumları.....	126
Şekil 9. 40 Tekstil fabrikası atık suyunun farklı pH'larda <i>Trametes versicolor</i> mikroorganizması ile %'de giderilmesi	127
Şekil 9. 41 Farklı koşullarda çalkalamalı olarak 30 °C'de 50 mL tekstil atık suyun % giderilmesi.....	128
Şekil 9. 42 250 mL atık suyun farklı boya giderme besiyeri konsantrasyonlarında (Besiyeri 1: 1,25 g Malt, 0,05 g glukoz; Besiyeri 2: 6,25 g Malt, 0,25 g Glukoz) 1,6 mM HBT'li ortamda pH: 3,6'da 30 °C'de 10 mL sıvıbesiyeri ile giderilmesi	129

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 1. 1 Reaktif Blue 19 boyasının giderilmesi ile ilgili son yıllarda yapılan çalışmalar	3
Çizelge 1. 2 Reaktif Blue 19 boyasının giderilmesinde yaygın olarak çalışılan mikroorganizmalar [27].	4
Çizelge 1. 3 Bazik boyaların giderilmesinde literatürde kullanılan yöntemler	5
Çizelge 2. 1 Boyaların sınıfları, kimyasal tipleri ve uygulamaları [47], [68]	10
Çizelge 2. 2 Reaktif Blue 19 boyasının karakteristikleri	12
Çizelge 3. 1 Tekstil endüstrisi atık sularının özellikleri [71]	17
Çizelge 3. 2 Farklı boya türlerinin için uygulamaları ve bağlanmayan boya yüzdesi (%) [68]	18
Çizelge 3. 4 Boyaların zehirlilik dereceleri [73]	19
Çizelge 3. 5 Tekstil endüstrisi kaynaklı çevre ve su kirleticisi sınıfları [74]	20
Çizelge 3. 6 1994'te Alman Hükümeti Tarafından Yasaklanan Kanserojen Aromatik Aminlerin Listesi [73]	20
Çizelge 3. 7 Atık sulardaki ağır metal kaynakları [74]	21
Çizelge 3. 8 Boyaların ağır metal içeriği [73]	21
Çizelge 3. 9 Boyama işlemlerinde en sık kullanılan yardımcı kimyasallar [66]	22
Çizelge 4. 1 Atık su arıtma yöntemleri [76]	24
Çizelge 4. 2 Boya gidermede kullanılan fiziksel ve kimyasal yöntemlerin olumsuz özellikleri [47]	27
Çizelge 4. 3 Aktif çamur sistemine boyaların adsorpsiyonu [80]	31
Çizelge 4. 4 Tekstil boyalarının gideriminde farklı anaerobik proseslerin performansı [83]	34
Çizelge 4. 5 Tekstil atık su arıtma yöntemlerinin avantajları ve dezavantajları [73]	36
Çizelge 4. 5 Tekstil atık su arıtma yöntemlerinin avantajları ve dezavantajları (Devamı) [73]	37
Çizelge 5. 1 Amino asit kalıntılarının spesifik fonksiyonları [86]	42
Çizelge 6. 1 Boya gidermede immobilize oksidoredüktazların uygulamaları [47]	55
Çizelge 8. 1 Kullanılan kimyasal maddeler	62
Çizelge 9. 1 Horseradish Peroksidaz enziminin 25 °C'de farklı pH'larda ölçülen aktivite değerleri	79

Çizelge 9. 2 pH: 5,0 ve farklı sıcaklıklardaki Horseradish Peroksidaz enziminin aktivite değerleri.....	80
Çizelge 9. 3 + 4 °C'de bekleyen Horseradish peroksidaz farklı bekleme sürelerinde 25 °C'de ve pH: 5,0'te ölçülen aktivite değerleri.....	81
Çizelge 9. 4 50 °C'de farklı sürelerde bekletilen enzimin pH: 5,0 ve 25 °C'de hesaplanan aktivite değerleri.....	82
Çizelge 9. 5 30 °C'de farklı pH'larda HRP enzimi ile RB 19 boyasının % giderme değerleri.....	85
Çizelge 9. 6 RB 19 boyasının (110 mg L ⁻¹) pH: 5,0 ve 30 °C'de farklı enzim konsantrasyonlarında % boya giderme değerleri.....	87
Çizelge 9. 7 RB 19 boyasının HRP enzimi ile farklı RB 19 boya konsantrasyonlarında 10 dakika süresince pH: 5,0 ve 30 °C'de % giderme değerleri.....	90
Çizelge 9. 8 pH: 5,0 ve farklı sıcaklıklarda (25-50 °C) HRP enzimi ile RB 19 boyasının (110 mg/L) % giderilme değerleri.....	91
Çizelge 9. 9 RB 19 boyasının HRP enzimi ile farklı H ₂ O ₂ (B) başlatıcısı konsantrasyonlarında 15 dakika süresince pH: 5,0 ve 30 °C'de % giderme.....	93
Çizelge 9. 10 RB 19 boyasının HRP enzimi ile farklı üre konsantrasyonlarında 30 dakika süresince pH: 5 ve 30 °C'de % giderme.....	95
Çizelge 9. 11 HRP enzimi ile RB 19 boyasının farklı NaCl konsantrasyonlarında pH: 5,0 ve 30 °C'de % giderilmesi.....	96
Çizelge 9. 12 pH:5,0'te AB 1 boyasının farklı konsantrasyonlarda Horseradish Peroksidaz enzimi ile giderilmesinin floresans şiddetlerinin ölçülmesi.....	98
Çizelge 9. 13 pH: 6,0'da AB 1 boyasının farklı konsantrasyonlarda Horseradish Peroksidaz Enzimi ile giderilmesinin floresans şiddetlerinin ölçülmesi.....	99
Çizelge 9. 14 pH: 7,0'de AB 1 boyasının farklı konsantrasyonlarda Horseradish Peroksidaz Enzimi ile giderilmesinin floresans şiddetlerinin ölçülmesi.....	101
Çizelge 9. 15 Farklı konsantrasyonlarda ve pH'da Asit Black 1 boyasına ait $\lambda_{maks.}$ (maksimum dalga boyu) ve maksimum floresans şiddeti ($I_{maks.}$) değerleri.....	102
Çizelge 9. 16 30 °C ve 7,0'de farklı konsantrasyonlardaki Asit Black 1 boyasının Horseradish Peroksidaz enzimi ve başlatıcısı iave edildikten sonra 2. dakıda ve 1. günde Floresans Spektrometresi ile incelenmesi.....	103
Çizelge 9. 17 Polimerlerin ve polimerler üzerine immobilize enzimlerin AFM görüntülerinden elde edilen ortalama yükseklikler (Rp).....	113
Çizelge 9. 18 +4 °C'de bekleyen Horseradish peroksidaz ve iki farklı immobilize enzimin farklı bekleme sürelerinde 25 °C'de ve pH: 5,0'te ölçülen aktivite değerleri.....	114
Çizelge 9. 19 Serbest ve immobilize Horseradish Peroksidaz enziminin 25 °C'de farklı pH'larda ölçülen aktivite değerleri.....	115
Çizelge 9. 20 HRP ve immobilize enzimlerin farklı pH: 5,0 ve 25 °C'de hesaplanan aktiviteleri.....	116

Çizelge 9. 21 50 °C'de farklı sürelerde bekletilen serbest ve immobilize enzimlerin pH: 5,0 ve 25 °C hesaplanan aktivite değerleri.....	117
Çizelge 9. 22 Reaktif Blue 19 ve Asit Black 1 Boyalarının iki farklı immobilize enzim (A-PSU immobilize enzim ve AF-PSU immobilize enzim) ile farklı günlerde tekrar kullanılması ile % giderilmesi.....	118
Çizelge 9. 23 AB 1 boyasının boya giderme besiyerinde pH: 3,6'da 30 °C'de giderilmesi.....	121
Çizelge 9. 24 RB 19 boyasının boya giderme besiyerinde pH: 3,6'da 30 °C'de giderilmesi.....	122
Çizelge 9. 25 Dianix Reaktif Blue 19 ve Dianix Navy CC boyalarının iki farklı konsantrasyonda <i>Trametes versicolor</i> ile % giderilmesi.....	124
Çizelge 9. 26 Bir tekstil fabrikasından alınan atık suyun farklı pH' larda çalkalamalı su banyosunda 30 °C'de boya giderme besiyerinde giderilmesi)....	126
Çizelge 9. 27 Farklı sıvıbesiyeri hacimlerinde ve HBT'li ve HBT'siz koşullarda çalkamalı olarak 30 °C'de 50 mL tekstil atık suyunun giderilmesi....	127
Çizelge 9. 28 250 mL tekstil atık suyun farklı boya giderme besiyeri konsantrasyonlarında 1,6 mM HBT'li ortamda pH: 3,6'da 30 °C'de 10 mL <i>T. versicolor</i> ile giderilmesi.....	128

TEKSTİL ATIK SULARINDA BOYALARIN BİYOBOZUNMA İLE GİDERİLMESİ

Mithat ÇELEBİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Zeynep MUSTAFAEVA AKDESTE

Eş Danışman: Prof. Dr. Hüseyin YILDIRIM

Tekstil endüstrisi, Türkiye'nin gelişmesinde ve istihdamın artmasında önemli rol üstlenen sektörlerin başında gelmektedir. Bu hızlı gelişim, boyama ve baskı işlemlerinden gelen kirlilik taşıyan atık suların içerdiği boyaların ve kimyasal maddelerin arıtma gerekliliğini de beraberinde getirmektedir.

Çevre kirliliği ve su kirliliği canlıların yaşam alanlarını ve kalitesini olumsuz etkileyen konulardan birisidir. Su kirliliğini oluşturan endüstriyel atık sular içerisinde tekstil atık suları, içerdikleri çok çeşitli kimyasallar ve boyalar nedeniyle dikkat çekmektedirler. Organik kirlilikler ve boya atıkları tekstil sektöründe temel kirletici sorunlardandır. Bu sebeplerden dolayı, boyahane atık sularının arıtılması çevrenin korunması ve insan sağlığı açısından hayati önem taşımaktadır.

Bu doktora tez çalışmasında aşağıdaki çalışmalar yapılmıştır;

Horseradish Peroksidaz enzimi ile Reaktif Blue 19 boyası giderildi. Boya giderme farklı koşullarda; sıcaklık, pH, enzim konsantrasyonu, boya konsantrasyonu, Hidrojen Peroksit konsantrasyonu, üre ve tuz etkisi incelenerek optimum koşullar belirlendi.

Horseradish peroksidaz enzimi boya gidermede tekrar kullanılması için destek materyaline immobilize edildi. Destek materyali olarak iki farklı polisülfon polimerleri kullanıldı. Polisülfon polimerleri immobilizasyon öncesi modifiye edilerek aktif hale getirildi ve Horseradish Peroksidaz enzimine immobilize edildi.

Bu immobilize enzim ile Reaktif Blue 19 ve Asit Black 1 boyları farklı günlerde giderilmesi defalarca tekrarlandı. İmmobilize enzimin farklı koşullardaki (pH, sıcaklık, bekleme süresi) aktivite değeri hesaplandı. İmmobilize enzimin serbest enzime göre stabilitesinin arttığı, raf ömrünün uzadığı, sıcaklığa karşı direnç kazandığı ve 7 kez tekrar kullanılabilirdi belirlendi. Horseradish Peroksidaz enzimi ilk kez iki farklı polisülfon polimerine immobilizasyonu gerçekleştirilerek atık sulardaki boyların giderilmesinde kullanıldı.

Trametes versicolor mikroorganizması ile Reaktif Blue 19, Asit Black 1, Dianix Navy CC, Dianix Remazol Brilliant Blue R ve Bazik Blue 19 boyları boya giderme besiyerinde giderildi. Ayrıca, bu mikroorganizma ile fabrikadan alınan tekstil atık suyunda çeşitli koşullarda (süre, atık su hacmi, pH, boya giderme besi yeri konsantrasyonu) boya giderme çalışmaları yapıldı. Tekstil atık suyunun boya giderme değeri asidik pH'larda daha yüksek olduğu tespit edildi.

Asit Black 1 boyası farklı konsantrasyonlarda ve Horseradish Peroksidaz enzimi ile muamele edildikten sonra farklı sürelerde ve pH'larda Floresans Spektrometre ile incelendi.

Anahtar Kelimeler: tekstil endüstrisi, çevre, atık su, boya giderme, enzim (Horseradish Peroksidaz), immobilizasyon, mikroorganizma (*Trametes versicolor*), polimer (polisülfon)

DECOLORIZATION OF DYES IN TEXTILE WASTEWATER BY BIODEGRADATION

Mithat ÇELEBİ

Bioengineering Department

PhD. Thesis

Advisor: Assit. Prof. Dr. Zeynep MUSTAFAEVA AKDESTE

Co-Advisor: Prof. Dr. Hüseyin YILDIRIM

The textile industry is the leading sector which it assumes a significant role in increasing employment of Turkey's development. This rapid development of dyeing and printing processes dyes and chemical substances contained in waste waters from the pollution, which brings about the need for treatment.

Environmental pollution and water pollution is one of the issues affecting the quality of habitats and species. Water pollution is a wide variety of industrial waste waters which contain chemicals and dyes. In the textile waste waters are attracting attention. Organic impurities and contaminants of colored dye wastes are major problem in the textile industry. For these reasons, treatment of dyehouses' dyeing waste water have vital importance.

This doctoral thesis studies the following issues were, respectively;

Decolorization of Reactive Blue 19 dye by using Horseradish Peroxidase enzyme was studied with the in different conditions (temperature, pH, enzyme concentration, dye concentration, Hydrogen Peroxide concentration, urea and salt effect). The optimum decolorization conditions were determined for Reactive Blue 19 dye.

Horseradish Peroxidase enzyme was immobilized on a solid support in order to re-use the enzyme for dye decolorization. As support materials were used in two different polysulfone polymers. Immobilized enzyme was reused for

decolorization of Reactive Blue 19 and Acid Black 1 dyes at different days. Activity values of immobilized enzyme were calculated under different conditions (pH, temperature, storage time). In conclusion; stability, shelf-life, storage activity, resistance to temperature of immobilized enzyme were increased against to free enzyme. Also, immobilized enzyme were reused 7 times for decolorization of Reactive Blue 19 and Acid Black 1 dyes.

Reactive Blue 19, Acid Black 1, Disperse Dyes and Bazik Blue 41 dye solutions were decolorized by using *Trametes versicolor* (mold) in a nutrient medium. In addition, real textile wastewater was decolorized under various conditions (time, wastewater volume, pH, concentration of dye removal broth) with *Trametes versicolor* mold. Acidic pH values were more effective than high pHs for decolorization of textile wastewater.

Acid Black 1 dye at different concentrations and the dye after treatment with Horseradish Peroxidase enzyme at different times and the pH values were examined by Fluorescence Spectrometer.

Key Words: textile industry, environment, wastewater, decolorization, enzyme (Horseradish Peroxidase), immobilization, microorganism (*Trametes versicolor*), polymer (polysulfone)

1.1 Literatür Özeti

Sentetik boyalar endüstride değişik sektörlerde kullanılmaktadır. Tekstil, kağıt, gıda, plastik ve kozmetik gibi çeşitli sektörlerden renkli atık su deşarjı ile ilgili sorunlar endüstriyel ve akademik bilim insanlarının ilgisini çekmektedir. Yaklaşık 10.000 farklı boya ve pigment endüstriyel olarak kullanılmaktadır. Sentetik boyalar yılda 0,7-0,8 milyon tondan fazla dünya çapında üretilmektedir [1]. Tekstil endüstrisinde boyama prosesleri sırasında genellikle renkli, yüksek KOİ'li ve kullanılan prosese ve boya türüne göre farklı pH'larda atık sular meydana gelmektedir. Çeşitli canlılar için bu atık suların risk oluşturmaları nedeniyle arıtmaları önemlidir [2].

Reaktif boyalar en yaygın kullanılan boya sınıflarındandır. Renklendirmedeki avantajı ve kumaş üzerindeki stabillitesi nedeniyle doğal ve rejenere selüloz fiberlerinin baskısında ve boyanmasında gittikçe artan bir oranda reaktif boyalar kullanılmaktadır [3], [4]. Reaktif boyalarda en çok bulunan önemli gruplar triazin ve vinil sülfon gruplarıdır. Vinil sülfon reaktif boyaları vinil sülfon grubu ($-\text{SO}_2\text{CH}=\text{CH}_2$) içerirler. Antrakinon reaktif boyalarda temel reaktif boyalardandır. Antrokinon yapıdaki reaktif boyalar aromatik yapılar içerdiklerinden dolayı parçalanmaya karşı dirençlidirler. Bu boyalar suda yaşayan canlı organizmalarda toksik ve mutajenik etkiler görülmesine neden olabilmektedir [5], [6]. Reaktif boyaların yaklaşık % 2'si üretim prosesleri sırasında ve yaklaşık % 9'u ise tekstil endüstrisinde boyama ve terbiye işlemleri sırasında atık sulara karışmaktadır. Bunun sonucunda her yıl 40.000-50.000 ton arasında boya yüzey sularına karışmaktadır [7], [8], [9], [10].

Bu doktora tezi çalışmasında kullanılan boyalardan biri olan Reaktif Blue 19 (RB 19) boyası endüstriyel önemi olan ve polimerik boya üretiminde sıklıkla başlatıcı olarak kullanılan bir boyadır. RB 19 boyasının yapısında antrakinin türevi içermesi zehirli ve parçalanması güç olan organik kirleticilerden olmasını sağlamaktadır. Deveci vd. [11] Reaktif Blue 19 boyasının parçalayabilmek için *Funalia troglia* ATCC 200800 kültürlerinden oksijenaz enzimini elde etmişlerdir [11]. Reaktif Blue 19'un yapısı polisiklik ligninolitik peroksidazların substratları olan aromatik hidrokarbonlara benzemektedir [12], [13].

Reaktif Blue 19 boyası reaktif bir boya olması ve endüstride yaygın olarak kullanılması nedeniyle araştırmacılar tarafından en çok çalışılan tekstil boyalarındandır (Çizelge 1.1 ve Çizelge 1.2). Reaktif Blue 19 boyasının giderilmesi ile ilgili yapılan çalışmalar literatür taranarak incelenmiş ve Çizelge 1.1'de sunulmuştur.

Silva vd. [14] tarafından yapılan bir çalışmada ise, Horseradish Peroksidaz enzimi ile Reaktif Blue 19 boyasını 20-45 °C'larında ve 0-4,44 mM H₂O₂ konsantrasyon aralıklarında pH: 6,0'da giderilmesini incelenmiştir. Çalışma sonucu 35 °C'de 5. ve 60. dakikalarda pH: 6,0'da elde edilen boya giderme değerleri sırası ile % 96 ve % 97 olmuştur.

Bu doktora tezi çalışmasında Reaktif Blue 19 boyasının Horseradish Peroksidaz enzimi ile giderilmesi çalışmalarında ise pH: 5,0'te en yüksek boya giderme değerlerine ulaşılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucu pH: 5,0 ve 35 °C'de 5. dakikada ve 60. dakikalarda bekleme sürelerinde sırasıyla % 94 ve % 99 boya giderme değerleri elde edilmiştir. Silva vd. [14] sadece belirli koşullarda çalışmışlardır. Bu doktora tezi çalışmasında ise Horseradish Peroksidaz enzimi ile Reaktif Blue 19 boyasının giderilmesi ayrıntılı bir şekilde farklı koşullarda çalışılarak incelendi ve optimum boya giderme koşulları belirlendi.

Literatür incelendiğinde Reaktif Blue 19 boyasının çeşitli yöntemler kullanılarak giderildiği pek çok çalışma vardır. Bu çalışmalardan bazıları Çizelge 1.1'de gösterilmektedir. Buna rağmen Horseradish Peroksidaz enzim ile Reaktif Blue 19 boyasının giderilmesi daha önce literatürde farklı koşullarda ayrıntılı bir şekilde incelenerek (farklı pH, sıcaklık, enzim konsantrasyonu, boya konsantrasyonu, Hidrojen

peroksit, üre ve tuz) çalışılmamıştır. Atık sularda boyama işlemlerinden kaynaklanan üre ve tuz gibi kimyasalların mevcut olması nedeniyle bu kimyasalların enzim ile RB 19 boyasının giderilmesine etkileri incelenerek çalışma zenginleştirilmiştir. Kısaca, ayrıntılı bir şekilde farklı koşullar denenerek Reaktif Blue 19 boyasının Horseradish Peroksidaz enzimi ile giderilmesi için optimum koşullar belirlenmiştir.

Çizelge 1. 1 Reaktif Blue 19 boyasının giderilmesi ile ilgili son yıllarda yapılan çalışmalar

Adsorban / Kimyasal/Mikroorganizma	Genel Yöntem	Kaynak
Nano-zero valent demir partikülleri	Adsorpsiyon	[15]
Modifiye zeolit	Adsorpsiyon	[16]
Ozon	Elektrokimyasal oksidasyon	[17]
Odun atıklar	Adsorpsiyon	[18]
Biyomateryal	Biosorbent	[19]
Anerobik/Aerobik koşullar	Biyolojik	[20]
Fotoelektrokimyasal	Oksidasyon	[21]
Elektrokimyasal oksidasyon	Oksidasyon	[22]
Ozon	Kimyasal oksidasyon	[6]
<i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Coriolus Versicolor</i> ve <i>Funalia troglia</i>	Biyolojik	[23]
Ozonlu elektrokoagülasyon	Kimyasal	[2]
<i>Ganoderme Sp.</i>	Biyolojik	[1]
<i>Pleurotus Ostreatus</i>	Biyolojik	[24]
Tropik Brazilian basidiomycetes	Biyolojik	[25]
Horseradish Peroksidaz enzimi	Biyolojik	[14]

Reaktif Blue 19 boyasının giderilmesinde yaygın olarak kullanılan mikroorganizmalar ise Çizelge 1.2’de gösterilmiştir.

Selüloz elyafların (fiberlerin) tekstil endüstrisinde kullanımının artmasından dolayı reaktif boyaların kullanılması artmaktadır. Reaktif boyalar genellikle azo, fitalosiyanin, antrokinon, formazon ve oksazin kromoforlarını bulundurur. Boyama işlemi sırasında, alkalın koşullarda ısının etkisiyle boyanın reaktif ucu fiberin fonksiyonel grupları ile reaksiyona girer. Bununlabirlikte, kullanılan reaktif boyanın büyük hacimleri atık olmaktadır. Boyama işlemi sırasında reaktif boyanın bir kısmı hidroliz olur ve reaktif boyanın bir kısmı inaktive olur. Sonuç olarak, reaktif boyanın selüloz fiberlere tutunma derecesi diğer boyalara göre düşük (% 50-90 aralığında) olabilmektedir. Diğer boyalar ile karşılaştırıldığında reaktif boyalar tehlikeli kirleticilerdendir [26].

Çizelge 1. 2 Reaktif Blue 19 boyasının giderilmesinde yaygın olarak çalışılan mikroorganizmalar [27].

Mikroorganizma	Mikroorganizma
<i>Candida lipolytica</i>	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Rigidoporus sp.</i>
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Sclerotium rolfsii</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Trametes hirsuta</i>
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Trametes modesta</i>
<i>Ganoderma sp.</i>	<i>Trametes versicolor</i>
<i>Irpex lacteus</i>	<i>Trametes villosa</i>
<i>Phanerochaete magnoliae</i>	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	<i>Ischnoderma resinosum</i>

Dispers boyalar tekstil endüstrisinde poliester fiberlerin boyanması için yaygın olarak kullanılan tek boya sınıfıdır. Dispers boyaların parçalanmasının belirlenmesinde sulu ortamda ve yüzey aktif maddelerin varlığında boyaların düşük çözünürlüğü nedeniyle bazı zorluklar vardır [28]. Dünya genelinde sıklıkla dispers boyalar poliester, naylon, selüloz asetat ve akrilik fiberlerin boyanmasında kullanılmaktadır. Bu boyaların kararsız ve kompleks yapıları geleneksel su arıtma yöntemleri ile uzaklaştırmalarını zorlaştırmaktadır. Fenollerin, aromatik aminlerin, bifenillerin, pestisitlerin, insektisitlerin parçalanmasında enzimatik katalize yardımcı olarak kullanılan redoks mediatörleri geniş bir uygulama alanına sahiptir [29].

Jamal vd. [29] tarafından yapılan bir çalışmada, suda çözünmeyen Dispers Red 19 ve Dispers Black 9 boyalarının giderilmesinde redoks aracılığı ile *Trichosanthes dioica* peroksidazın etkisi araştırılmıştır. 9 farklı redoks mediatörü; bromofenol, 2,4-diklorofenol, guaiakol, 1-hidroksibenzotriazol, m-kresol, kinol, sringaldehid, vanillin ve violurik asit kullanılmışlardır. Seçilen redoks mediatörleri arasından 1-hidroksibenzotriazol (HBT) renk giderme için en etkili bulunmuştur. 0,45 U mL⁻¹ peroksidaz ile 60 dakikada ve 42 °C'de, Dispers Red 19 boyası 0,2 mM HBT redoks mediatörü varlığında maksimum % 79 giderilmiştir. 0,45 U mL⁻¹ peroksidaz ile 60 dakikada ve 42 °C'de, Dispers Black 9 boyası ise 0,5 mM HBT redoks mediatörü varlığında % 60 boya giderme gerçekleşmiştir. UV-Visible Spektrofotometre ile boyanın giderilmesinin incelenmesi sırasında dispers boyanın iyi çözünmesi için boya çözeltisine eşit hacimde metanol eklenmiştir [29].

Çizelge 1. 3 Bazik boyaların giderilmesinde literatürde kullanılan yöntemler

Boya	Yöntem	Kaynak
Bazik Blue 41	Adsorpsiyon (Nikel Demir Nanopartiküller)	[30]
Bazik Blue 41	Adsorpsiyon (Magnetik demir nanopartikül–alginat komposit)	[31]
Bazik Blue 41	Enzimatik (Kloroperoksidaz)	[32]
Bazik Red 46	Elektrokoagülasyon	[33]
Bazik Yellow 28	Elektrokoagülasyon	[34]
Bazik boya tekstil atık suyu	Elektrokoagülasyon	[35]
Bazik Red 46	Fotokatalitik (immobilize TiO ₂ nanopartiküller)	[36]
Kristal Violet	Adsorpsiyon (aktif karbon)	[37]
Methylene Blue	Biyosorpsiyon (<i>Trichoderma viride</i> fungus)	[38]
Methylene Blue	Süperabsorbent hidrojel	[39]
Kristal Violet, Bismarck Brown Y	Adsorpsiyon (modifiye kitosan)	[40]
Methylene Blue	Lignin Peroksidaz enzimi	[41]
Methylene Blue	Adsorpsiyon (Hidrojeller)	[42]
Bazik Violet 3 Bazik Red 9	<i>P. ostreatus</i> , <i>S. commune</i> , <i>S. rolfsii</i> , <i>N. crassa</i> , <i>Polyporus sp.</i> , <i>T. villosa</i> and <i>M. thermophila</i>	[43]
Kristal Violet, Bazik Fuchsin, Brilliant Green, Malachite Green	Aeromonas hydrophila strain DN322	[44]
Metil Violet	Adsorpsiyon (perlit)	[45]

Boyaların giderilmesinde biyolojik yöntem en yaygın olarak kullanılan yöntemlerden birisidir. Biyolojik arıtma aerobik (oksijen varlığında) ve anaerobik (oksijensiz) veya her ikisi birlikte gerçekleştirilebilir [46].

Geleneksel fiziksel ve kimyasal metodlara alternatif olarak son yıllarda enzimatik yaklaşım ilgi görmektedir. Boyaların giderilmesinde peroksidazlar, mangan peroksidaz, lignin peroksidaz, lakkazlar, mikropereksohidaz-11, polifenol oksidaz ve azoredüktaz enzimleri kullanılmaktadır. Bazı zor parçalanıyan boyalar bu enzimler ile parçalanmaktadır. Bazı redoks mediatörlerin eklenmesi substratların çeşitliliğini ve zor

parçalanmış bileşiklerin etkili parçalanmasını arttırmaktadır. Kullanılan bazı redoks mediatörleri literatürde yer almaktadır. Sıklıkla kullanılan mediatörler 1-hidroksibenzotriazol, veratril alkol ve violurik asittir [47].

Boya içeren atık suların arıtılması karmaşık ve pahalıdır. Kimyasal oksidasyon, elektrokimyasal oksidasyon, membran prosesleri, koagülasyon-flokülasyon, adsorpsiyon ve iyon değiştirici reçineler gibi yöntemler atık suların arıtılmasında araştırmacılar tarafından kullanılan ve tavsiye edilen yöntemlerden bazılarıdır [3], [23]. Bu yöntemlerden bazıları endüstride kullanılabilir, buna karşın diğerleri yalnızca laboratuvarlarda küçük ölçeklerde test edilen yöntemlerdir [7], [48].

Enzimlerin çevre çalışmalarında kullanılması imkânı araştırılmaktadır. Son yıllarda araştırmacılar atık sulardaki boya giderilmesinde birçok enzimi çalışmalarında kullanmaktadır. Çeşitli kaynaklardan (mantar ve bitki) elde edilen Horseradish Peroksidaz, Lignin Peroksidaz, Mangan Peroksidaz, Soya Peroksidaz ve lakkaz benzeri birçok enzim endüstriyel atık sulardaki boya giderilmesinde kullanılmıştır [11], [47], [48], [49], [50], [51], [52], [53], [54], [55].

Seçilen enzimin kaynağı ve yapısı kirleticilerin uzaklaştırılması için önem taşımaktadır. Mantar kaynaklı enzimler boya giderme çalışmalarında yaygın olarak çalışılmaktadır [11], [56], [57], [58]. Horseradish Peroksidaz enziminin hidrojen peroksit varlığında endüstriyel önemi olan aromatik azo boya etkili bir şekilde parçaladığı bilinmektedir [47], [56], [58], [59], [60], [61], [62]. Bu doktora tezi kapsamında ise Horseradish Peroksidaz enzimi ile Reaktif Blue 19 boyası giderilmiştir [63], [64].

Serbest enzimler stabilite ve yeniden kullanılmak gibi sınırlamalar nedeniyle geniş ölçekte kullanılamamaktadırlar. Bundan dolayı, immobilize enzimlerin kullanımının önemli avantajları vardır. Gelecekte, immobilize enzimler içeren reaktörler kullanılarak geniş ölçekte atık sularındaki boya giderilmesinin mümkün olacağı düşünülmektedir [47].

Peroksidazlar sentetik boya giderilmesini katalizleyen güçlü oksitleyiciler olmasına karşın suda çözünmeyen boyalarda etkilidirler. Solvent Yellow ve Solvent Yellow Blue gibi suda çözünmeyen solvent boya giderilmesinde bu boya çözünmesi için organik solvent ihtiyacı enzimlerin çalışmasını olumsuz etkilemektedir [62], [65].

Peroksidaz enzimleri ile çevre çalışmalarında özellikle fenolik kirleticilerin uzaklaştırılması çalışılmaktadır [32]. Ftalik anhidritle modifiye edilen HRP yüksek sıcaklıklarda daha fazla fenolü uzaklaştırmaktadır [53].

Önder vd. [58] tarafından Horseradish Peroksidaz enzimi ile yapılan bir çalışmada, Asit Black 1 boyası farklı koşullar altında (pH, sıcaklık, reaksiyon süresi) giderilmiştir. Asit Black 1 Boyası enzim ile parçalandıktan sonra oluşan parçalanma ürünleri LC-MS spektrometre ile belirlenmiştir [58].

1.2 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasında, ülkenin ekonomisine ve istihdamına önemli bir katkı sunan tekstil endüstrisinin sebep olduğu renkli atık sulardaki boyaların giderilmesi ve daha az zararlı hale getirilmesi farklı yöntemler ile gerçekleştirilerek ülke ekonomisine, çevreye ve canlı yaşamına katkıda bulunulması hedeflenmektedir.

Laboratuvar koşullarında hazırlanan tekstil boyalarının farklı konsantrasyonlarında çözeltilerinin ve tekstil fabrikasından alınan atık suların enzim ve mikroorganizma ile giderilmesi amaçlanmaktadır. Laboratuvarda hazırlanan asit (Asit Black 1), bazik (Bazik Blue 41), reaktif (Reaktif Blue 19) ve dispers (Dianix Brilliant Blue R ve Dianix Navy CC) boyalar enzim ve mikroorganizma ile giderilmeye çalışılacak ve hangi boya türünün giderilmesinde enzim ve/veya mikroorganizmanın etkili olup olmadığı tespit edilecektir. Çeşitli tekstil boya sınıfına ait boyaların giderilmesi için farklı yöntemler (enzim, mikroorganizma) kullanılarak en uygun yöntemin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Enzimin boya gidermede tekrar kullanılabilmesi amacı ile enzim katı bir destek materyali üzerine immobilize edilecektir. Ayrıca Asit Black 1 boyasının ve bu boyanın Horseradish Peroksidaz enzimi ile giderilmesi floresans spektrometresi ile incelenecektir.

1.3 Hipotez

Bu çalışmada, reaktif (Reaktif Blue 19), asit (Asit Black 1), dispers (Dianix Navy CC, Dianix Remazol Brilliant Blue R) ve bazik (Bazik Blue 41) boyalarının giderilmesinde Horseradish Peroksidaz enzimi, immobilize Horseradish Peroksidaz enzimi, *Trametes*

versicolor mikroorganizması kullanılacaktır. Her boya türü için hangi yöntemin daha uygun olacağı belirlecektir. Laboratuvarda hazırlanan bu boya çözeltileri yanısıra tekstil fabrika atık suyunda da bu yöntemler kullanarak boya giderme çalışmaları yapılarak tekstil atık suyu için hangi yöntemin daha uygun olacağı belirlenecektir.

Horseradish peroksidaz enziminin katı bir desteğe (polimer) immobilizasyonu ile başlıca uygulama kolaylığı, enzimin tekrar kullanılmasıyla ekonomik katkı sağlanması ve enzimin raf ömrünün arttırılması hedeflenmektedir.

BÖLÜM 2

BOYALAR

Boyalar genellikle iki ana bileşenden oluşan küçük moleküllerdir: rengi veren kromofor ve boyayı ipliğe bağlayan fonksiyonel grup. Literatürde kimyasal yapısına göre veya uygulandığı ipliğin tipine göre sınıflandırılmış boya çeşitleri mevcuttur [66]. Organik moleküller olarak bilinen boyalar, boyama işlemi sırasında genellikle ortamda çözünürler. Boyaların çoğu suda çözünürken (bazik, asit, metal kompleks, direk ve reaktif), dispers boyalar suda dispersiyon halinde bulunurlar [47]. Boyalar birkaç şekilde sınıflandırılabilirler. Sınıflandırmada çözünürlük, kimyasal yapı, boyama özellikleri, kullanış yerleri gibi özellikleri göz önüne alınır. Boyalar yaygın olarak kimyasal yapılarına ve kullanım amacına olmak üzere iki farklı şekilde sınıflandırılırlar [67]. Tekstil endüstrisinde yaygın kullanımı sebebi ile boya terimi bu çalışmada boyar madde terimi yerine kullanılmıştır.

2.1 Boyaların Kimyasal Yapılarına Göre Sınıflandırılması

Boyalar yapılarına göre sınıflandırılırken, molekülün temel yapısı esas alınabildiği gibi, molekülün kromojen ve renk verici özellikteki kısmı da esas kabul edilebilir [67]. Boyalar kimyasal yapılarına göre azo boyalar, antrokinon boyalar, ftalosiyenin boyalar, Di- ve Triarilmetan boyalar ve nitro boyalar olarak da sınıflandırılmaktadırlar.

2.2 Boyaların Kullanım Amacına Göre Sınıflandırılması

Tekstil endüstride boyalar daha çok kullanım amacına göre sınıflandırıldıkları isimleri ile bilinmektedir. Boyaların kullanım amacına göre sınıflandırılmasında boyama

teknolojisinde boyanın kimyasal yapısı ile değil onun hangi yöntemle elyafı boyadığına ve boyama özelliklerine bakılır [67].

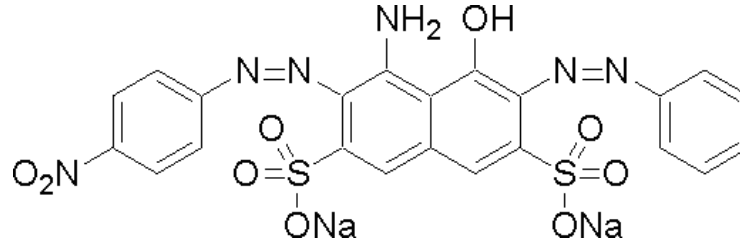
Çizelge 2. 1 Boyaların sınıfları, kimyasal tipleri ve uygulamaları [47], [68].

Boya Sınıfı	Tanımı	Kimyasal Tipi	Oluşturduğu Kirleticiler
Asit	Çözünebilen anyonik bileşikler	Azo, nitro ve nitrozo, trifenilmetan, azin ve ksanten	Renk, organik asitler, bağlanmayan boya artıkları
Bazik	Çözünebilir, çok parlak boyalar	Siyanin, azo, azin, triarilmetan, ksanten, oksazin ve antrakinon	N/A
Direkt	Çözünebilir, anyonik bileşikler, selülozik elyafa direkt uygulanabilir	Azo, ftalosiyenin, stilben ve oksozin	Renk, tuz, bağlanmayan boya artıkları, katyonik fiksasyon kimyasalları, yüzey aktif maddeler, köpük kesiciler, düzgünleştirici, geçiktirici ve apreleme kimyasalları, seyrelticiler
Dispers	Suda çözünmez	Azo, antrakinon, stiril ve nitro	Renk, organik asitler, taşıyıcılar, fosfatlar, köpük kesiciler, ağartıcılar, parlaklaştırıcılar, dispergantlar, seyrelticiler
Reaktif	Suda çözünebilir, anyonik bileşikler, en geniş boya sınıfı	Azo, antrakinon, ftalosiyenin, formazon, oksazin ve bazik	Renk, tuz, alkalinite, bağlanmayan boya artıkları, yüzey aktif maddeler, köpük kesiciler, seyrelticiler, apreleme (bitim işlemleri) kimyasalları
Sülfür	Sülfür ya da sodyum sülfid içeren organik bileşikler	Bilinmeyen yapılar	Renk, alkalinite, oksidan maddeler, indirgen maddeler, bağlanmayan boya artıkları
Vat	En eski boyalar; kimyasal olarak daha kompleks, suda çözünmez	Antrakinon (polisiklik guaninler içerir) ve indigoidler	Renk, alkalinite, oksidan ve indirgen maddeler

2.2.1 Asit Boyalar

Moleküllerinde hidroksil, sülfonik asit grubu veya karboksil gibi oksokrom grupları içerirler. Bu boyalar Na^+ , K^+ , Ca^+ , NH_4^+ gruplarla tuz oluştururlar. Renkli bileşen boya anyonudur ve anyonik sınıfa girerler. Bu boyalara asit boyalar ismi verilmesinin nedeni uygulamanın asidik banyolarda yapılması ve hemen hemen hepsinin organik asitlerin tuzları olmalarından kaynaklanmaktadır. Sülfonik asit grubu içeren direkt, metal-kompleks ve reaktif boyalar anyonik yapıdadır; fakat farklı yöntemler ile boyama yaptıklarından asit boyalar sınıfına girmezler. Asit boyalar ile elyaf ilişkisi iyonik bağ şeklindedir [67].

Başlıca yün, ipek, deri ve poliamid elyaf ile katyonik modifiye akrilonitril elyafın boyanmasında kullanılırlar. Ayrıca, deri, kürk, kağıt ve besin boyası olarak da kullanılabilmektedirler [67].



Şekil 2. 1 Asit Black 1 boyası

2.2.2 Bazik Boyalar

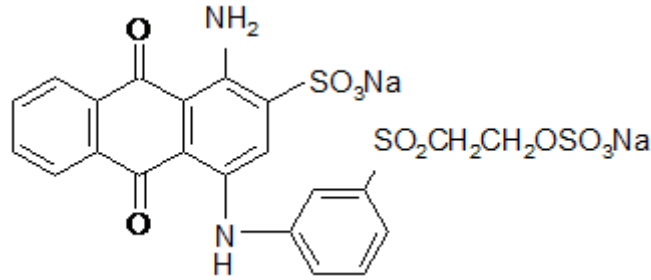
Bu boyalar organik bazların hidroklorürleri şeklinde veya asetat tuzları şeklindedir. Yani renkli kısım katyondur. Pozitif yük taşıyıcı olarak N ve S atomu içerirler. Bazik olarak etki ettiklerinden sulu çözeltide boya katyonu, elyafın anyonik gruplarıyla, elyaf-boya tuzunu meydana getirir [67].

Bazik boyalar başlıca poliakrilonitril, kısmen de yün ve pamuk elyafın boyanmasında kullanılırlar. Elyaf ile boya arasında iyonik etkileşim vardır. Boya katyonu elyafın anyonik grupları ile tuz oluşturur. Bazik boyalar ile selülozik elyafın boyanmasında tanen, K-antimonil tartarat gibi maddeler ile mordanlama (boyayı elyafa bağlayan madde) gerekir [67].

2.2.3 Reaktif Boyalar

Tekstil süreçlerinde kullanılan boyaların yaklaşık olarak yarısı suda çözünebilen reaktif boyalardır. Reaktif boyaların moleküler yapısı üç fonksiyonel grup ile karakterize edilmektedir [69].

1. Hidrofilik grup
2. Renk veren bir grup (kromofor)
3. Tekstil fiberi ile reaksiyon veren bir grup



Şekil 2. 2 Reaktif Blue 19 boyası

Şekil 2. 2’de Reaktif Blue 19 boyası yapısında antrakınon, naftalen ve sülfon grupları içermektedir.

Çizelge 2. 2 Reaktif Blue 19 boyasının karakteristikleri

Diğer adı	Remazol Brilliant Blue R
Formül	$C_{22}H_{16}N_2Na_2O_{11}S_3$
Moleküler Ağırlık (M_w)	626,54 g/mol
Renk İndeks Numarası (C. I.)	61200
EC No	219-949-9
Maksimum Absorbsiyon Dalga Boyu (λ_{max})	594 nm

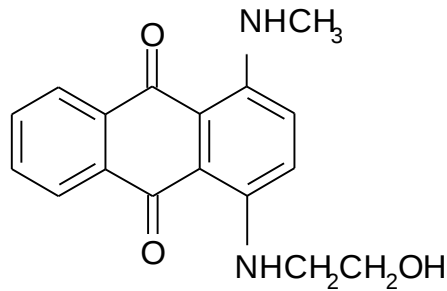
Reaktif boyalar uygun koşullar altında lif ile kimyasal reaksiyona girerek, kovalent bağ özelliğine sahip tek boya sınıfıdır. Selülozun hidroksil ($-OH$), poliamidin amin ($-NH_2$), protein esaslı liflerin $-NH_2$, SH (merkaptan) grupları ile gerçek kovalent bağlar oluşturarak liflere bağlanırlar. Selülozik elyafın boyanmasında kullanılan bu boyalar yün, ipek, pamuk, naylon, orlon, akrilik karışımları ve poliamit boyanmasında da kullanılmaktadırlar [67].

Reaktif boyalar çok iyi yıkama sürtünme ve ışık haslıkları verir. Reaktif boyalar genel olarak reaktif grubun kimyasal yapısına göre veya bu grubun kimyasal reaktivitesinin

derecesine göre sınıflandırılırlar. Tekstil boyalarının önemli bir sınıfını oluşturmaktadır ve dünyada en fazla tüketilen boyaların başında gelmektedir. Suda oldukça çözünür olduklarından boyama ünitesinde boyanın tamamı selüloz elyafıyla ile tepkimeye girmez ve bir kısım boya boşaltım ünitelerinden suyla birlikte atılır. Azo reaktif boyalar ise genellikle aerobik arıtmaya karşı dirençlidir. Yapılan çalışmalar boyaların özellikle reaktif boyaların % 90'ının aerobik arıtım işlemlerinden değişmeden çıktığını; bir kısmının anaerobik arıtım proseslerinde parçalanabildiğini fakat parçalanma ürünlerinin toksik olduğunu göstermiştir [69].

2.2.4 Dispers Boyalar

Amino ve hidroksil grupları ihtiva eden düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Elyaf üzerine çekilmesi gayet iyidir. Fakat elyaf içine difüzyon oldukça yavaştır. Boya, boyama işlemi sırasında dispersiyon ortamında hidrofob elyaf üzerine difüzyon yolu ile çekilir. Boyama boyanın elyaf içinde çözünmesi şeklinde gerçekleşir [67].



Şekil 2. 3 Dispers Blue 3

Dispers boyalar suda eser miktarda çözündüklerinden dolayı elyafa sudaki dispersiyonları halinde uygulanırlar. Poliester, poliamit ve akrilik elyafın boyanmasında kullanılırlar [67]. Uygulama sırasında ise dispers boyanın sudaki dağılımını ve homojenliğini arttırmak için dispersiyon ajanları (dispergant) kullanılmaktadır [70].

2.2.5 Direkt Boyalar

Direkt boyalar genellikle sülfonik, bazen de karboksilik asitlerin sodyum tuzlarıdır. Doğal ve rejenere selülozik elyaf ile kağıdı boyayabilen direkt boyalara bu adın verilmesinin nedeni bir ön işlem olmaksızın doğrudan boyama yapılabilmesinden kaynaklanmaktadır. Elyafın iç misellerinde hiçbir kimyasal bağ meydana getirmeksizin

depo edilirler. Renkli kısımda bazik bazik grup içeren direkt boyalar, sulu çözeltide çift iyon şeklinde bulunurlar. Suyu karşı dayanıklılığı (yaş haslıkları) sınırlıdır. Fakat boyama sonrası yapılan ek işlemler ile yaş haslıkları iyileştirilebilir. Direkt boyalar kağıt, deri, yün, ipek, naylon ve elyafın boyanmasında kullanılırlar [67].

Direkt boyalar tekstil endüstrisinde yaygın olarak kullanılır ve en ekonomik boya sınıfları arasındadır. Kimyasal olarak direkt boyalar, sülfonik asitlerin kompleks tuzlarıdır ve suda çözünürler ve fiberlerin değişik türleri ile (pamuk, yün, ipek, naylon vb.) fiziksel bir etkileşimdedirler. Direkt boyama normalde nötral veya zayıf alkalın boya banyosunda kaynama noktasında veya kaynama noktası yakınlarında sodyum klorür tuzunun ya da Glauber tuzunun ilave edilmesiyle gerçekleştirilir [26].

2.2.6 Mordan Boyalar

Mordan sözcüğü, boyayı elyafa bağlayan madde veya bileşim anlamını taşır. Birçok doğal ve sentetik boya bu sınıfa girer. Bu boyalar asidik ve bazik fonksiyonel gruplar içerirler ve bitkisel ve hayvansal elyaf ile kararsız bileşik oluştururlar. Bu nedenle hem elyaf hem de boyaya karşı aynı kimyasal ilgiyi gösteren bir madde (mordan), önce elyafa yerleştirilir; daha sonra elyaf ile boya suda çözünmeyen bir bileşik vermek üzere reaksiyona sokulur. Böylece boyanın elyaf üzerinde tutunması sağlanır. Mordan olarak suda çözünmeyen hidroksitler oluşturan Al, Sn, Fe, Cr tuzları kullanılır. Bu tuzların katyonları ile boya molekülleri elyaf üzerinde suda çözünmeyen kompleksler oluşturur. Günümüzde yalnızca krom tuzları yün boyamada önem taşımaktadır [67].

2.2.7 Küpe Boyalar

Karbonil grubu içeren ve suda çözünmeyen boyalardır. Bu boyalar indirgeme ajanları kullanılarak suda çözünür hale getirilirler ve bu halde iken elyafa çektilirler. Daha sonra oksidasyonla yine çözünmez hale getirilirler. İndirgeme ajanı olarak sodyum ditiyonit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) ve oksidasyon için hava oksijeni kullanılmaktadır. Küpe boyalar moleküllerinde en az iki oksijen atomu içeren bileşiklerdir. İri, ince ve çok ince toz halinde bulunabilirler. Daha çok selülozik kısmen de protein elyafının boyanmasında kullanılır. Işığa, yıkamaya, sürtünmeye karşı haslıkları oldukça yüksektir [67].

2.2.8 İnkışaf Boyalar

Elyaf üzerinde oluşturularak son şekline dönüştürülebilen bütün boyalar bu sınıfa girer. Azoik boyalarda denilen Naftol-AS boyları ile ftalosiyanın boyları bu sınıftandır. Bunlardan elyafa affinitesi olan bileşen önce elyafa emdirilir. Daha sonra ikinci bileşenle reaksiyona sokularak suda çözünmeyen boyaya dönüştürölür. Bu işlem ile hemen hemen bütün renk çeşitleri elde edidilir [67].

2.2.9 Metal-Kompleks Boyalar

Belirli gruplara sahip bazı azo boyları ile metal iyonlarının kompleks etkileşimi ile oluşturdukları boylardır. Kompleks oluşumunda boyadaki azo grubu rol oynar. Metal katyonu olarak Co, Cr, Cu ve Ni iyonları kullanılır. Krom kompleksleri daha çok yün, poliamid, bakır kompleksleri ise pamuk ve deri boyacılığında kullanılır. Işık ve yıkama haslıkları yüksektir [67].

2.2.10 Pigment Boyalar

Tekstil elyafı, organik ve anorganik pigmentler ile de boyanabilir. Daha çok organik olanları tercih edilir. Pigmentlerin elyaf affinitesi yoktur. Kimyasal bağ ve absorbsiyon yapmazlar. Bağlayıcı madde denilen sentetik reçineler ile elyaf üzerine bağlanırlar. Suda çözünmediklerinden sudaki yağ ve yağdaki su emülsiyonları şeklinde ince dağılmış olarak kullanılırlar. Emülsiyon, elyaf veya kumaşa emdirildikten sonra bozulur. Pigment, kumaş yüzeyinde ince dağılmış halde kalır. Sıkılarak kurutulduktan sonra 140-170 °C'de termofiks edilir. Özellikle açık renklerde yıkama ve ışık haslıkları iyidir. Sürtünme haslıklarının iyi olmayışı, koyu renklerin elde edilememesi, bağlayıcı filmin hava etkisiyle parçalanması, bağlayıcının kumaşa sertlik vermemesi olumsuz özellikleridir. [67].

TEKSTİL ATIK SULARININ ÖZELLİKLERİ ve ATIK SULARDAKİ BOYALARIN ÇEVREYE ETKİLERİ

Tekstil endüstrisi, Türkiye'de en hızlı gelişen sanayilerin başında gelmektedir. Bu hızlı gelişim, büyük debilerde ve büyük konsantrasyonlarda kirlilik taşıyan atık suların arıtma gerekliliğini de beraberinde getirmiştir. Tekstil fabrikalarında üretim aşamalarına göre çeşitli bileşim ve miktarlarda atık sular oluşmaktadır. Bu atık suların büyük kısmı ağartma, boyama ve yıkama işlemlerinden kaynaklanmaktadır. Asit, baz, boya, deterjan, tuz ve kullanılan diğer kimyasallar atık suda kirlilik yaratan başlıca kirleticilerdir [66].

Tekstil endüstrileri, yaş dokuma işlemleri için çok büyük miktarlarda su ve kimyasal tüketmektedirler. Gerek boyamada gerekse diğer işlemlerde kullanılan bu organik ve inorganik formdaki bileşiklerin çeşitliliğine bağlı olarak, ortaya çıkan atık suların özellikleri de farklı olmaktadır. Alıcı sulara verilen renkli atık sular su ortamındaki ışık geçirgenliğini azaltır ve fotosentetik aktiviteyi olumsuz yönde etkiler. Ayrıca boyaların bazı suda yaşayan organizmalarda birikmesi toksik ve kanserojenik ürünlerin meydana gelme riskini de beraberinde getirmektedir. Boya içeren tekstil endüstrisi atık sularının renk giderim işlemleri ekolojik açıdan önem kazanmaktadır. Ancak kompleks kimyasal yapılarına ve sentetik kökenlerine bağlı olarak, boyaların giderilmesi oldukça zor bir işlemdir [66].

Çizelge 3.1'de tekstil proseslerinin çeşitli atık su türlerinin oluşumuna neden olduğu gösterilmektedir. Tekstil atık suları boyahanede yapılan boyama türüne, kullanılan boyaların kalitesine, sınıfına ve boyamada kullanılan makineye göre farklılıklar

göstermektedir. Tekstil atık suyunun özelliğine göre arıtma yöntemleri değişebilmektedir [71].

Çizelge 3. 1 Tekstil endüstrisi atık sularının özellikleri [71].

Proses	Atık Su Bileşimi	Özelliği
Haşılama	Nişasta, vakslar, karboksimetil selüloz (CMC), polivinil alkol (PVA)	Yüksek KOİ, BOİ
Haşıl Sökme	Nişasta, glukoz, CMC, PVA, yağlar, vakslar	Yüksek KOİ, BOİ, askıda katı madde (AKM), çözülmüş katı madde (ÇKM)
Ağartma	hipoklorit, Klor, kostik soda, hidrojen peroksid (H_2O_2), NaOH, , asitler, yüzey aktif maddeler, $NaSiO_3$, sodyum fosfat, kısa kumaş fiberi	AKM, alkali
Merserizasyon	Kostik soda	Yüksek pH, düşük KOİ, yüksek ÇKM
Boyama	Çeşitli Boyalar, mordanlar, indirgeyici ajanlar, asetik asit, sabunlar	Renk, yüksek KOİ, yüksek ÇKM, düşük AKM, ağır metaller
Baskı	Yapıştırıcı, nişasta, reçine, yağlar, renk sabitleştiriciler, asitler, sabunlar	Renk, yüksek KOİ, yağlı görünüş, AKM
Apren (Bitim)	İnorganik tuzlar, toksik bileşikler	Zayıf alkali, düşük BOİ

3.1 Boya Türlerinin Bağlanma Yüzdeleri

Boyama işlemi sırasında boyanın tamamı kumaşa tutunmamaktadır. Çizelge 3.2’de çeşitli tekstiller için bağlanmayan boya yüzdeleri göstermektedir. Pamuğun boyanmasında kullanılan reaktif boyaların bağlanma hızı en zayıftır. Tekstil fiber pazarının % 52’si reaktif boyalardan oluşmaktadır. Renkli atık sulardaki problemler en çok pamuğun reaktif boyalar ile boyanmasından kaynaklanmaktadır. Atık sulardaki ağır metallerin çoğu yünün boyanmasından kaynaklanmaktadır [68].

Atık sular, içeriklerindeki boyaların oluşturduğu görüntü ve renk kirliliği, sergiledikleri toksik etki, sudaki yabancı, zararlı organik kirlilik yükünün artması ve ağır metallerin konsantrasyonunun artması çevredeki ve sudaki canlı yaşamını dolayısıyla insan yaşamını ciddi anlamda olumsuz etkilemektedir [72].

Çizelge 3. 2 Farklı boya türlerinin için uygulamaları ve bağlanmayan boya yüzdesi (%) [68].

Fiber	Boya Tipi	Bağlanmamış Boya (%)
Yün ve naylon	Yün için asit/reaktif boyalar	7- 20
	Metallendirilmiş boyalar	2-7
	Krom İçerenler	1-2
Pamuk ve viskoz	Azo boyalar	5-10
	Reaktif boyalar	20-50
	Direkt Boyalar	5- 20
	Pigment	1
	İndigo Boyalar	5-20
	Sülfür Boyalar	30-40
Poliester	Dispers	8-20
Akrilik	Bazik	2-3
Polipropilen	Masterbatch	N/A

3.2 Atık Sulardaki Kimyasalların ve Boyaların Oluşturduğu Kimyasal Riskler

Tekstil atıkları biyolojik olarak ayrışabilir olmakla birlikte bazen biyolojik proseslerde olumsuz durumlara neden olabilirler. Boyama işlemlerinden kaynaklanan bazı toksik bileşikler (boyalardan gelen kromatlar, sülfürler, Hidrojen Peroksit vs.) atık suya geçmiş olabilir [72].

Tekstil endüstrisine bağlı olarak, birlikte veya ayrı şekilde çalışan kumaş boyama kuruluşlarının atık suları çevresel açıdan oldukça büyük sorunlara yol açmaktadır. Boyama yerlerinde kullanılan kimyasal maddelerin formülleri tam olarak açıklanmayıp genelde ticari kullanım adları ile anılmaktadırlar. Ayrıca boyama işlemleri sırasında boyamanın daha verimli olabilmesi için ilave edilen maddeler arıtma işlemlerini daha da güçleştirmektedir [72].

Kimyasalların riskleri değerlendirilirken başlıca iki etken göz önüne alınır; tehlike ve maruz kalma. Tehlike, zehirlenme ve kanser oluşturma gibi olası biyolojik etkiler olarak tanımlanmaktadır. Maruz kalma ise zaman ve mesafe üzerine bir kimyasalın beklenen çevresel konsantrasyonun bir ölçüsüdür [73].

3.2.1 Zehirlilik

Çok düşük konsantrasyon değerlerinde dahi doğada kolaylıkla farkedilebilen boyalar, çevresel endişeler açısından toplum nezdinde ilk sıraları işgal etmektedir. Her bir boya için zehirlilik (toksisite), biyobozunurluğu, su toksisitesi ve maruz kalma durumunda etkisi gibi bilgileri içeren güvenlik bilgi kartları hazırlanmalıdır. Zehirlilik değeri hayvanlar (genellikle fare) üzerinde gerçekleştirilen denemelerle belirlenir, bu denemelerde hayvan gruplarındaki fert sayısının yarısının ölümüne yol açan doz zehir dozu olarak belirlenir. Sonuç vücut ağırlığı başına alınan miktar olarak (mg/kg) olarak gösterilir ve ölümcül doz (50), LD₅₀ olarak bilinir [73].

Çizelge 3. 3 Boyaların zehirlilik dereceleri [73].

LD ₅₀ (mg/kg)	Sınıflandırma	Boya Sayısı	Boya (%)
< 25	Çok zehirli		
25 – 200	Zehirli	44	1
200 – 2.000	Zararlı	314	7
> 2.000	Sınıflandırılmadı	4.103	92
Toplam		4.103	100

Ames Salmonella ile mutajenik test yapılarak bazı boyalarda mutajen özellik belirlenmiştir ve bazı dispers boyaların alerjik kontakt egzamaya neden olduğu tespit edilmiştir [73].

Doğaları gereği aerobik işlemlerden etkilenmeden kalabilen boyaların sahip olduğu toksisite nedeniyle, mikroorganizmalara yönelik bazı kaygılar vardır. Boyaların aerobik bakteriler üzerindeki inhibitör etkisini belirlemek için ETAD (“Ecological and Toxicological Association of Dyes and Organic Pigments Manufacturer”) tarafından bir izleme yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntem kullanılarak toplam 202 boya üzerinde toksisite testi uygulanmış ve % 50 inhibisyon konsantrasyon (IC₅₀) değerleri bulunarak rapor edilmiştir. Elde edilen sonuçlarda direkt, dispers, reaktif, indigo, mordant, pigment, Asit ve solvent boyaların IC₅₀ değerleri 100 mg/L’den büyük olduğu saptanmıştır. Bu yüzden tekstil atık sularında belli değerin altındaki konsantrasyonlardaki boyaların mikroorganizmaya karşı toksik etki göstermediği ortaya çıkmıştır. Buna rağmen bazı bazik boyalar ile yapılan çalışmalarda IC₅₀ değerlerinin 100 mg/L’den küçük olduğu sonucundan yola çıkarak bazik boyaların atık sularda

mikroorganizmalar için inhibitör etkisi gösterdiği sonucuna varılmıştır. Bu testlerden ve ETAD'ın genel deneyimlerinden kanalizasyon çalışmalarında boyaların renginden dolayı endişe edilebileceği, fakat toksisiteden endişe duymaya gerek olmadığı sonucuna varılmıştır [73].

Çizelge 3. 4 Tekstil endüstrisi kaynaklı çevre ve su kirletici sınıfları [74].

Sınıfı	Örnek	Kaynak
Tuz	NaCl, Na ₂ SO ₄	Boyama
Yüzey aktif maddeler	Etoksile fenoller	Birçok kaynaktan
Metaller	Bakır, Çinko, vb.	Boyalar
Organikler	Klorlu solventler	Yıkama, makine temizleme
Biyositler	Pentaklorofenol	Yün elyaf kirletici
Toksik anyonlar	Sülfür	Sülfür Boyama

Boya parçalanma ürünlerinin kanserojen potansiyeli 1991'de özetlenmiştir. Hayvanlarda yapılan testlerde renklendirici ailesinin yaklaşık % 70'ini oluşturan azo boyalar sınıfına ait az sayıda boyada kanserojen etki bulunmuştur. Yapılan bu çalışmada azo boyaların kimyasal yapılarına göre bu boyaların toksisitesi değerlendirilmiştir. Bu toksisitenin azo bağının indirgenmesi veya enzimatik sistemlerin etkisiyle meydana gelebileceği bulundu. Bu sınırlı sayıda boya için, azo renklendiricilerin bozunması sonrasında oluşan aromatik aminlerin metabolizmada kanserojen etki meydana getiren başlıca etken olduğu sonucuna varılmıştır. 1994'te Alman Hükümeti Çizelge 3.6'da verilen aromatik aminleri içeren bazı azo boyaların kullanımını yasaklamıştır [73].

Çizelge 3. 5 1994'te Alman Hükümeti Tarafından Yasaklanan Kanserojen Aromatik Aminlerin Listesi [73].

4-aminodifenil	3,3'-dimetilbezidin
Benzidin	2-metoksi-5-metilanilin
2-amino-5-klorotoluen	3,3'-dimetil-4,4'-diaminodifenilmetan
2-aminonaftalen	4,4'-metilen-bis(2-kloroanilin)
2-aminazotoluen	4,4'-oksidianilin
2-amino-4-nitrotoluen	4,4'-tiyodianilin
4-kloroanilin	2-aminotoluen
2,4-diaminoanizol	2,4-diaminotoluen
4,4'-diaminodifenilmetan	2,4,5-trimetilanilin
3,3'-diklorobenzidin	2-metoksianilin
3,3'-dimetoksibenzidin	4-aminoazobenzen

3.2.2 Atık Sulardaki Ağır Metaller

Atık sulardaki ağır metaller özellikle yünün boyanmasından kaynaklanabilmektedir. Boyalarda ağırlıkça % 3'ten % 4'e varan oranlarda bulunan ağır metallerin kaynağı önceden metallendirme işlemidir. Bu ön metallendirme işlemine bazik boyaların hazırlanmasında çinko tuzlarının kullanımı, boyaların yükseltgenmesi ve tutunması için dikromatların kullanımı ve yün boyamada görev alan krom bileşikler örnek olarak verilebilmektedir [73].

Çizelge 3. 6 Atık sulardaki ağır metal kaynakları [74].

Metal	Kaynağı
Arsenik	Elyaf
Kadmiyum	Tuzdaki safsızlık
Krom	Boyalar, laboratuvar
Kobalt	Boyalar
Kurşun	Boyalar, su tesisatı
Bakır	Boyalar, elyaf
Manganez	Permanganat şeridinden (küf önlemi)
Civa	Boya, hammaddedeki kimyasal safsızlık
Nikel	Boyalar
Gümüş	Resim uygulamaları
Kalay	Apre Kimyasalları, su tesisatı
Titanyum	Elyaf
Çinko	Boyalar, hammaddedeki safsızlık, su tesisatı

Çizelge 3. 7 Boyaların ağır metal içeriği [73].

Metal	Konsantrasyon (ppm)	Boya Sınıfı
Arsenik	< 1 - 1,4	Reaktif
Kadmiyum	< 1	Hepsi
Krom	3 – 83	İndigo
Kobalt	< 1 - 3,2	Asit
Bakır	33 – 110	İndigo
Kurşun	6 – 52	Reaktif
Civa	0,5 – 1	İndigo
Çinko	3 – 32	Bazik

Atık sulardaki ağır metaller su yaşamı ve hayvanlar için toksik olabilmektedir. Metal kompleks boyalar şelatlı krom, bakır, kobalt ve nikel içerir. Bazı katyonik boyalar çinko ve eser miktarda civa, kadmiyum ve arsenik içermektedir. Bazı yükseltgeme ve indirgeme ajanları metaller (dikromat ve permanganat) içermektedir. Fakat bazı

durumlarda bu kimyasallar uzun süre kullanılmamaktadır. Metaller ayrıca son işlemlerde antibakteriyel ve koku önleyicilerde, su geçirmezlerde ve alev geciktiricilerde de bulunmaktadır [73].

3.2.3 Yardımcı Kimyasallar

Boyanın iplik üzerine adsorbe olması tekstil ipliğine ve boyanın tipine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Adsorbsiyonun derecesi zaman, sıcaklık, pH ve yardımcı kimyasallar gibi çeşitli faktörlerin de etkisi altındadır. Boyama işleminde sıkça kullanılan yardımcı kimyasallar Çizelge 3.8’de listelenmiştir. Çizelge 3.9’da ise boyama işlemleri çıkış sularında boyalar haricinde çok sayıda farklı bileşiklerin de bulunacağını göstermektedir. Tek bir boyama işlemi için farklı kimyasal sınıftaki boyaların birlikte kullanılabilir olması çıkış suyu bileşimini daha da karmaşık hale getirmektedir. Boyama işlemi çıkış sularındaki kimyasal yük, prosesin kimyasının yanı sıra boyama işleminin kesikli ya da sürekli olmasına bağlı olarak da farklılıklar göstermektedir [66].

Çizelge 3. 10 Boyama işlemlerinde en sık kullanılan yardımcı kimyasallar [66].

Kimyasal Madde	Bileşim	Fonksiyon
Tuzlar	Sodyum klorür	Sodyum sülfat elyafın zeta potansiyelini nötralize edici, yavaşlatıcı
Asitler	Asetik asit, Sülfürik asit	pH kontrolü
Bazlar	Sodyum hidroksit Sodyum karbonat	pH kontrolü
Tamponlar	Fosfat	pH kontrolü
Kompleks yapıcılar	EDTA	Kompleks yapma, yavaşlatıcı
Dispersiyon ajanları ve yüzey aktif maddeler	Anyonik, katyonik ve noniyonik	Boyaları dağıtma, boyaların uygulamasını kolaylaştırma
Okside edici maddeler	Hidrojen peroksit, Sodyum nitrit	Boyaları çözünemez yapma
İndirgeyici maddeler	Sodyum hidrosülfid, Sodyum sülfid	Boyaları çözünabilir yapma, reaksiyona girmemiş boyanın uzaklaştırılması
Taşıyıcılar	Fenil fenoller Klorlu benzenler	Adsorbsiyonun artırılması

Tekstilde kullanılan boyalar harici diğer yardımcı kimyasalların da kirlilik potansiyeli vardır. Amerika’da yapılan bir çalışmada boya atıklarının biyolojik oksijen ihtiyacının (BOİ) toplam tekstil boya atık yükü BOİ’ye oranının sadece % 10-30 arasında olduğu bulunmuştur. Tek başına asetik asit boyahane BOİ’sinin % 50 ile % 90’ını oluşturmaktadır. Bir başka çalışmada ise, boyaların atık sudaki kimyasal oksijen ihtiyacına (KOİ) katkısı sadece % 2–5 arasında olduğu tespit edilmiştir. Buna karşın KOİ’ye kimyasalların (tesviye edici, köpük kesici ve ıslatma ajanları vb.) katkısı % 25 ile % 35 arasında olmuştur. Kirliliklerin iki temel kaynağı yüzey aktif maddeler ve boya banyolarına ilave edilen elektrolitlerdir. Diğer kirlletici kimyasallar ise toksik organik maddeler (aseton, kloroform, metilen klorür ve sikloheksan), biyosidler ve toksik anyonlar olduğu ifade edilmiştir [73].

3.2.4 Renk

Tekstil atık suları bağlanmayan boya kalıntıları içerdiklerinden dolayı renkli olmaktadır ve görüntü kirliliği oluşturmaktadırlar. Ayrıca, renk çözünmüş, askıda ve kolloidal maddelerden genelde gri bir renk meydana gelmektedir. Renkli atığın alıcı ortama boşaltılması estetik açıdan rahatsız edici olmasının yanında, sudaki ışık geçirgenliğini de etkilemektedir. Işık geçirgenliğinin azalması ise suda biyolojik hareketliliğin azalmasına veya tamamen durmasına sebep olmaktadır. Atık sudaki renk sudaki canlı yaşamını olumsuz etkilemektedir [72].

Atık sulardaki rengi önlemek için yasa yapıcılar bazı kısıtlamalar getirmiştir. Alıcı ortamda renk parametresi 300 birimden (Pt-Co) fazla ölçülürse işletme gerekli önlemleri alması ve düzenlemelere uyması konusunda yaptırım uygulanması kararı alınmıştır ve bu kısıtlamaları içeren kurallar Resmi Gazete’de yayınlamıştır [75].

TEKSTİL ATIK SULARINDA BOYALARIN GİDERİLME YÖNTEMLERİ

Özellikle gelişmiş ülkelerde yasa yapıcılar giderek artan sorunlara neden olan tekstil ve boya sanayi için çevre ve halk sağlığı ile ilgili çevre mevzuatının katı bir şekilde uygulanmasını istemektedirler. Atık deşarjı için mevzuat ve renk standartları farklı ülkelere göre değişmektedir [76], [77], [78].

Tekstil atık suyunun özelliğine göre arıtma yöntemleri değişebilmektedir Genel olarak tekstil atık sularının arıtılması üç ana başlık altında toplanmaktadır [71].

Çizelge 4. 1 Atık su arıtma yöntemleri [76].

Fiziksel Arıtma Yöntemi	Kimyasal Arıtma Yöntemi	Biyolojik Arıtma Yöntemi
Adsorpsiyon Sedimentasyon Flotasyon Koagülasyon Membran filtrasyon Radyasyon	H ₂ O ₂ oksidasyon Fenton Oksidasyon Ozon Klorinasyon Fotokimyasal Oksidasyon Elektrokoagülasyon	Bakteriyal aerobik Bakteriyal aneorobik Alg Mantar Maya

4.1 Fiziksel Arıtma Yöntemleri**4.1.1 Adsorpsiyon**

Adsorpsiyon işlemi, arıtılması güç olan ve zehirlilik, renk, koku kirliliği oluşturan kimyasal maddelerin adsorplayıcı bir katı madde (adsorban) yüzeyinde fiziksel bağlar ile tutunmasıdır. Bazı durumlarda biyolojik ve/veya kimyasal arıtmadan çıkan su

bir aktif karbon ortamından geçirilerek suda kalan kirletici maddeler giderilebilir. Yerine göre adsorpsiyon bir ara kademe işlemleri de olabilmektedir [72].

Etkili kirletici giderimi, ekonomik olarak uygun olması nedeniyle olumlu ilgi görmektedir. Adsorpsiyon birçok fizikokimyasal faktörden etkilenmektedir. Bunlar; boya sorbent etkileşimi, adsorban yüzey alanı ve partikül büyüklüğü, sıcaklık, pH ve temas süresi. Adsorpsiyon malzemeleri olarak aktif karbon, turba, odun yongaları, kömür ve kül, silika jel, mikrobiyal biyokütle ve diğer ucuz malzeme (örneğin, doğal kil, mısır koçanı, pirinç kabuğu) kullanılır [76].

Adsorpsiyonla renk gideriminde en çok kullanılan yöntem aktif karbon yöntemidir. Aktif karbonla renk giderimi özellikle katyonik, mordan ve asit boyalar için etkilidir, fakat dispers, direkt, vat, pigment ve reaktif boyalar için daha az bir boya giderimi söz konusudur. Yöntemin etkinliği kullanılan karbonun tipine ve atık suyun karakteristiğine bağlıdır. Rejenerasyon ve tekrar kullanım boya giderim etkinliğinin azalmasına neden olmaktadır. Yeniden kullanabilen adsorbanların kullanımı ile rejenerasyon problemi çözülebilmektedir [66].

4.1.2 Sedimentasyon

Bir katı-sıvı ayırma yöntemidir. Sedimentasyon kimyasal veya biyolojik yöntemlerin birleşmesinden oluşan boya içeren partiküller veya boya parçalanma ürünlerinin pıhtılaşma/çökme veya bazı diğer kimyasal yöntemler ile veya değişik metaryaller üzerine adsorpsiyon ile uzaklaştırılmasında kullanılır. Yüksek çamur üretimi olumsuz yanındır [76].

4.1.3 Membran Filtrasyonu

Bu yöntemle boyanın sürekli olarak arıtılması, konsantre edilmesi ve en önemlisi atık sudan ayrılması mümkün olmaktadır. Diğer yöntemlere göre en önemli üstünlüğü sistemin sıcaklığa, beklenmedik bir kimyasal çevreye ve mikrobiyal aktiviteye karşı dirençli olmasıdır [66].

Boya moleküllerini atık sudan uzaklaştırmak için membranlar kullanılabilir. Arıtılmak istenen atık suyun karakteristiklerine ve gözenek büyüklüklerine göre farklı

membranlar kullanılmaktadır. Membranların sınıflandırılması farklı moleküler ağırlıkları ile atıkları tutan gözenek büyüklüğü temel alınarak gerçekleştirilmiştir. Boya ayırma için, ters osmoz ($M_w < 1.000$), nanofiltrasyon ($500 < M_w < 15.000$) ve ultrafiltrasyon ($1.000 < M_w < 100.000$) membranlar boya özelliklerine bağlı olarak kullanılabilir. Ayrıca, boya ayırmak için, membranlar sedimentasyon yerine adsorpsiyon ve koagülasyondan sonra kullanılabilirler [76].

Ters osmoz membranları çoğu iyonik türler için % 90'nın üzerinde verim gösterir. Membran ile ayırmadan sonra kalan konsantre atığın bertaraf problemlerine neden olması, sermaye giderlerinin yüksek olması, membranın tıkanma olasılığı ve yenilenme gerekliliği gibi dezavantajları vardır [66].

4.2 Kimyasal Arıtma Yöntemleri

Tekstil atık sularının kimyasal yöntemlerle arıtılması uzun yıllardan beri en çok uygulanan yöntem olmuştur. Bunun en büyük nedeni atık su kalitesinde meydana gelen değişikliklerin kullanılan kimyasalda veya uygulanan dozda yapılan değişikliklerle kolayca tolere edilebilir olması ve uygulamanın basit oluşundan kaynaklanmaktadır. En yaygın olarak kullanılan kimyasal yöntemleri; oksidasyon yöntemleri (Fenton ayırıcı-Fe(II) tuzlarıyla aktive edilmiş hidrojen peroksit, ozon, fotokimyasal yöntem, sodyum hipoklorit (NaOCl), elektrokimyasal yöntem), kimyasal çöktürme ve flokülasyon yöntemi ve Cucurbituril (Cucurbituril glikoluril ve formaldehitten oluşan bir polimer) şeklinde sıralanabilmektedir [66].

Çizelge 4.2'de kimyasal yöntemlerin atık suların arıtımında kullanımdan dolayı meydana gelebilecek olan olumsuzluklardan bahsedilmektedir. Bu olumsuzluklara rağmen kimyasal yöntemler yatırım maliyetlerinin düşük olması, yöntemin uygulama kolaylığı ve kontrol edilebilirliğinin basit oluşundan dolayı en çok kullanılan yöntemlerin başında gelmektedir.

4.2.1 Koagülasyon ve Flokülasyon

Su ve kullanılmış su tasfiyesinde suyun taşıdığı çözünmüş ve askıda bulunan ve istenmeyen çok küçük maddelerin giderilmesi için suya kimyasal maddeler ilave edilir. Bu maddelere kimyasal pıhtılaştırıcı veya koagülant adı verilir. Kolloidlerin

çökelmelerini sağlamak için suya yumaklaştırıcı olarak polielektrolit polimer ilave edilir. Koagülantların suya ilave edilmesi ve etkili hale getirilmesi için kimyasal ve mekanik işlemler uygulanır. Bu işlemler pıhtılaştırma ve yumaklaştırma olarak iki kısımdan meydana gelmektedir [72].

Çizelge 4. 2 Boya gidermede kullanılan fiziksel ve kimyasal yöntemlerin olumsuz özellikleri [47].

Yöntem	Olumsuz Özellikleri
Fenton reaktifi	Aşırı çamur üretimi
Ozon	Kısa yaşam süresi (20 dak.)
Fotokimyasal	Yan ürünlerin oluşumu, daha zehirli bileşiklerin üretilmesi, zayıf boya giderimi, oldukça yavaş proses
NaOCl	Aromatik aminlerin salınması
Cucurbituril	Çok pahalı
Ters Osmoz	Çok pahalı, yavaş proses
Elektrokimyasal parçalama	Yüksek elektrik maliyeti, zayıf boya giderimi
Aktif karbon	Çok pahalı, aşırı çamur üretimi
Yer kömürü	Adsorpsiyon için spesifik yüzey alanı
Tahta parçaları	Uzun işlem görme süresi gerektirmektedir
İyon değiştirme	Bütün boyalar için etkili değil
Membran Filtrasyonu	Yoğun çamur üretimi
Işınlama	Çok fazla çözünmüş oksijen ihtiyacı
Elektrokinetik çöktürme	Fazla çamur üretimi
Silika Jel	Ticari uygulamayı engelleyen yan reaksiyon

Bu yöntemde flokleşme ve çökelme kimyasal maddeler yardımıyla sağlanır. Atık suya katılan kimyasal maddeler yardımıyla meydana gelen flokleşme ile çözünmüş maddeler ve kolloidler giderilirler. $Al_2(SO_4)_3$, $FeCl_3$, $FeSO_4$ ve kireç koagülant kimyasalları olarak kullanılmaktadır [66]. Kimyasal yöntem ile arıtma boya atıklarının koagüle/çöktürücü ajanlar kullanılarak renk uzaklaştırılmaktadır. Bu proseste alüminyum (Al^{3+}), kalsiyum (Ca^{2+}) veya demir (Fe^{3+}) iyonlarının kullanılmasını gerektirmektedir. Bu ajanların

yanında diğ er ajanlarda bu işlem için kullanılabilmektedir. Yöntemin etkinliğini arttırmak için flotasyon ve koagülasyon birlikte kullanılabilir. Genellikle bu proses dispers, sülfür ve vat boya­larının uzaklaştırılması ekonomiktir. Bu yöntemin olumsuz yanı ise, işlem sonunda büyük miktarlarda konsantre çamur üretilir. Bunun yanında boya giderme pH'ya bağımlıdır. Kimyasal yöntem ile suda kolayca   z ne­bilen azo, reaktif, asit ve özellikle bazik boyaları için genellikle uygun değildir [46]. Flokulasyon kimyasalı olarak ise polielektrolitler tercih edilmektedir. Flokulasyon kimyasalları koagülasyona yardımcı olarak boyaların çökelmesini ve bir araya gelmesini hızlandırmak amacı ile kullanılmaktadır.

Kimyasal koagülasyon ve flokulasyon yöntemi basit ve uygulanabilirliği en önemli avantajıdır. Fakat özellikle flokulasyon kimyasalları ve meydana gelen çamurun bertarafı bu yöntemin olumsuz yanlarıdır [47], [66].

4.2.2 Ozon

Atık suların ozonlanması ile dikkate değ r boyutlarda boya giderimi sağlanabilmektedir. Ozonlama sonucu elde edilen boya giderimi boyanın cinsine göre farklılık göstermektedir. Boya banyosu çıkış sularının ozonlandıktan sonra tekrar kullanılabilmesi tesis için kimyasal madde ve su tasarrufu sağlamakta, atık su arıtma tesisinin yükü azalmaktadır. Yüksek kararsızlığına bağlı olarak oldukça iyi bir yükseltgen olan ozon aynı zamanda tekstil yaş proseslerinden kaynaklanan atık sularda bulunan yüzey aktif maddeler ve taşıyıcılar gibi diğ er kirleticilerin giderilmesine de yardımcı olmaktadır. Ozonla oksidasyon, klorlu hidrokarbonların, fenollerin, pestisitlerin ve aromatik hidrokarbonların parçalanmasında da oldukça etkilidir. Boya içeren atık sulara uygulanan dozaj, toplam renge bağlıdır ve giderilecek KOÇ bir kalıntı ya da çamur oluşumuna veya toksik ara ürünlerin oluşumuna neden olmaz [66].

Ozon yönteminin önemli bir avantajı ozonun gaz durumunda uygulanabilir olması ve dolayısıyla diğ er bazı yöntemlerin aksine atık çamur oluşmamasıdır. Boyalardaki kromofor grupları genellikle konjuge çift bağlı organik bileşiklerdir. Bu bağlar kırılarak daha küçük moleküller oluşturabilir ve renkte azalmaya neden olabilirler [66].

Olumsuz tarafı ise, ozon sonucu oluşan yan ürünleri küçük moleküller atık suyun kanserojenik ya da toksik özelliklerini arttırabilmektedir. Bu durumun önlenmesinde ozonlama ilave bir arıtım metodu olarak da uygulanabilmektedir. Yarı ömrünün kısa oluşu (20 dakika) ozonlamanın en büyük dezavantajıdır. Alkali şartlarda ozonun bozunması hız kazandığı için atık suyun pH kontrolü dikkatle yapılmalıdır. Ozonlama yönteminin diğer bir dezavantajı kısa yarı ömrüne bağlı olarak ozonlamanın sürekli olması gerekliliği ve yüksek maliyettir [66].

4.2.3 H₂O₂-Fe(II) Tuzları (Fenton Ayırıcı)

Fenton ayırıcı (Fe(II) tuzlarıyla aktive edilmiş hidrojen peroksit) biyolojik arıtmayı inhibe edici ya da toksik atık suların oksidasyonu için çok uygundur. Fenton ayırıcı ile yapılan arıtım ön oksidasyon ve koagülasyon olmak üzere iki adımda gerçekleşmektedir. KOİ, renk ve toksisite giderimi gibi avantajları vardır. Bu avantajların yanında prosesin bazı dezavantajları da mevcuttur. Bu dezavantajlar; proses flokülasyon işlemini de içerdiği için atık sudaki kirleticiler çamura geçerler ve çamur problemi ortaya çıkmaktadır [66].

4.2.4 Fotokimyasal Yöntem

Bu yöntemde boya molekülleri hidrojen peroksit varlığında UV radyasyonu ile CO₂ ve H₂O'ya dönüştürülür. Parçalanma yüksek konsantrasyonlardaki hidroksil radikallerinin oluşmasıyla meydana gelir. Bu işlemde UV ışığı hidrojen peroksiti aktive ederek iki hidroksil radikaline parçalanmasını sağlar. Böylece organik maddenin kimyasal oksidasyonu gerçekleşir. Fotokimyasal yöntemlerde UV radyasyonu genellikle civa ark lambalarıyla sağlanmaktadır. Boya içeren atık suların fotokimyasal yöntemlerle giderilmesinin en önemli avantajı işlem sonucu atık çamur oluşmaması ve kötü kokulara neden olan organiklerin önemli derecede azaltılmasıdır [66].

4.2.5 Elektrokimyasal Yöntem

Boya gideriminde etkili bir şekilde kullanılabilirliği açısından yöntem bazı önemli avantajlara sahiptir. Kimyasal madde tüketimi çok azdır veya yoktur ve çamur oluşumu söz konusu değildir. Oldukça etkili ve ekonomik bir boya giderimi sağlar, renk

gideriminde ve dirençli kirleticilerin parçalanmasında yüksek verim gösterir. Yöntemin en büyük dezavantajı tehlikeli bileşiklerin oluşma olasılığıdır [66].

4.3 Biyolojik Arıtma Yöntemleri

Biyolojik yöntem kirli suların doğal olarak kendi kendine arıtılması eşdeğer bir işlemdir. Biyolojik işlemde, mikroflora ve mikrofauna, bakteri, mantar ve protozoa gibi mikroorganizmalar tarafından sistemde bulunan çözünmüş oksijen ve organik madde kullanılarak biyolojik yumaklaşma ve mineralizasyon olayı meydana getirilir. Bakteriler besin maddesi olarak organik madde kullanırlar. Örneğin, *Zoogloca ramigera* türü bakteri etrafını jelatinimsi kalın bir tabaka ile çevreler. Bu jelatinimsi tabaka çözünmüş organik maddeyi, kolloid katı maddeleri ve süspansiyon haldeki ince katı maddeleri kuvvetli bir şekilde adsorbe ederek biyolojik yumak haline getirir [72].

Son yıllarda yapılan çalışmalar birçok boya türünü atık sudan giderebilme yeteneğine sahip yaygın mikroorganizma türlerinin varlığını göstermiştir. Mikroorganizmaların elde edilmelerinde ve bu mikroorganizmalardan enzimlerin saflaştırılmasında biyoteknolojik yöntemlerin kullanılması ön plana çıkarmıştır [66].

Biyolojik yöntemler atık suların arıtılmasında fiziksel ve kimyasal yöntemlere kıyasla ön plana çıkmaktadır [27], [79].

Biyolojik arıtmanın ilk yatırım maliyetlerinin yüksek olmasına rağmen, kimyasal kullanımı gerektirmemesi, daha az çamur üretmesi, maliyetinin daha düşük olması, her boya türü için uygun olması ve çevreci olması nedeniyle kullanımı daha çok tercih edilmeye başlanmıştır [66].

4.3.1 Aerobik Yöntem

Aerobik proseslerde arıtma oksijenli ortamda gerçekleşir. Bu prosesler, mikroorganizmanın konumuna göre askıda büyüme, bağlı büyüme ve ikisinin birlikte uygulandığı kombine sistemler olarak sınıflandırılır. Askıda büyüme sistemlerinde mikroorganizmaların oksijen ihtiyacı çeşitli tipteki havalandırıcılar ile karşılanır. Bazı durumlarda ise oksijenin biyolojik olarak algler ile kaşılması mümkündür [72].

Aerobik giderme; bakteri ve küf (mantar, fungi) boya atık sularının giderilmesinde yaygın olarak kullanılan iki mikroorganizma grubudur. Aerobik koşullarda, bakterilerde bulunan enzimler atık sulardaki organik bileşikleri parçalar [46].

Beyaz çürükçül mantar *Phanerochaete chrysosporium* tarafından üretilen lignin peroksidaz, manganze bağlı peroksidaz gibi enzimlerin kullanılmasıyla boyaların parçalanabildiği bilinmektedir. Bu beyaz çürükçül mantarların içerdiği ligninolitik enzimlerin optimum değerinin asidik pH değerlerinde olması ve atık sularda bulunma ihtimali düşük olan tiamin ile veratril alkol maddelerine ihtiyaç duyması gibi dezavantajları vardır [66].

4.3.1.1 Aktif Çamur Sistemi

Organik kirliliğin, askıda büyüyen mikroorganizmalar yardımı ile giderildiği bir yöntemdir. Biyolojik arıtma denilince ilk akla gelen proses aktif çamur prosesidir. 1914 yılında Arden ve Lockett tarafından İngiltere’de geliştirilmiştir. Aktif çamur prosesi, askıda büyüyen sistem olarak atık suyun biyolojik arıtımında yaygın olarak kullanılan procestir. Bir atığın aerobik olarak stabilizasyonunu gerçekleştirebilen aktif kütle üretiminin meydana gelmesi sebebiyle aktif çamur olarak adlandırılmıştır [72].

Aktif çamur tesislerinde temel amaç, karbonlu organik maddelerin giderilmesidir. Ancak BOİ meydana getiren azotlu maddelerinde oksidasyonu istenebilir. Söz konusu azot bileşiklerinden en önemlisi amonyumdur. Nitrifikasyon işlemi ile amonyak biyolojik olarak nitrata yükselir. Denitrifikasyon işleminde ise azot bileşiklerinin nitrata oksitlenmesinden sonra, nitrat oksijensiz şartlarda parçalanarak azot gazına dönüştürülür [72].

Çizelge 4. 3 Aktif çamur sistemine boyaların adsorpsiyonu [80].

Boya Tipi	Adsorpsiyon Karakteristikleri
Asit	Suda yüksek çözünürlük; zayıf adsorpsiyon
Reaktif	Suda yüksek çözünürlük; zayıf adsorpsiyon, hidroliz kolaylığı
Direkt	Yüksek adsorpsiyon
Dispers	Yüksek ve orta derece arasında adsorpsiyon
Bazik	Yüksek adsorpsiyon

Geleneksel olarak kullanılan aktif çamur sistemi tekstil endüstrisindeki bazı boyaların parçalanmasında yetersiz kalmaktadır. Birçok sentetik boyaların örnek olarak azo boyalar, atık su arıtma fabrikalarında aerobik şartlar altında mikrobiyal parçalanmaya karşı direnç gösterdikleri bulundu. Aerobik mikrobiyal parçalanmaya karşı gösterilen bu direnç boya malzemelerinin, kimyasal ve ışık kaynaklı oksidatif etkiler sonucu renklerinin açılmasını engelleyecek şekilde sentezlenmelerinden kaynaklanmaktadır. Boyaların biyodegradasyonun azalmasını etkileyen diğer faktörler ise, boyaların sudaki yüksek çözünürlüğü ve molekül ağırlıklarının yüksek olması nedeniyle hücre membranlarının içine nüfuz etmelerinin güçlüğünden kaynaklanmaktadır [66], [80].

4.3.2 Anaerobik Yöntem

Anaerobik arıtma, organik ve inorganik maddelerin, oksijensiz ortamda mikroorganizmaların yardımıyla parçalanarak CO₂, CH₄, H₂S ve NH₃ gibi son ürünlere dönüşmesi olarak açıklanabilir. Anaerobik arıtma ilk olarak sadece çamurların çürütülmesi amacıyla kullanılmaya başlanmış, ancak atık sularda aerobik arıtmaya kıyasla avantajlarının keşfedilmesinden sonra bu alanda da yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır [72].

Anaerobik atık su arıtımı, bazı özellikleri nedeniyle son yıllarda önem kazanmış ve üzerinde çok sayıda araştırma yapılmıştır. Özellikle konsantre sanayi atık sularının arıtımı amacıyla çok sayıda anaerobik arıtma tesisi kurulmuştur. Anaerobik arıtma birçok atık su çeşidine uygulanabilmesi, enerji gerektirmemesi hatta fazladan enerji üretebilmesi ve düşük teknoloji ve maliyetler ile inşa edilebilmesi gibi üstünlüklere sahiptir. Bütün bu üstünlüklere rağmen anaerobik arıtma özellikle sıcaklık, pH, aşırı yükler gibi çevresel faktörlerden aerobik arıtmaya göre daha çok etkilenmektedir. Anaerobik işletme ani bir çevresel değişikliğe (zehirli maddeler, aşırı organik yükleme, sıcaklık değişimi) maruz kaldığında reaktör dengesi bozulmakta ve bakteri grupları arasında bu etkiye farklı tepkiler göstermektedir [72].

Parlak renkli olan ve suda çözünebilen reaktif ve asit boyalar geleneksel arıtma sistemlerinden giderilmeden çıktıkları için çevresel açıdan en problemli boyalar olarak kabul edilmektedirler. Bu boyaların belediye arıtma sistemlerindeki aerobik gideriminin de yetersiz kaldığı bilinmektedir [66].

Anaerobik arıtımın ilk basamağında asidojenik bakteriler karbonhidratlar, yağlar veya proteinler gibi organikleri düşük moleküler ağırlıklı ara ürünlere dönüştürürler. Bu fermentasyon ürünleri daha sonra asidojenik bakteri tarafından kullanılır ve asetat, karbon dioksit ve moleküler hidrojen açığa çıkar. Son olarak metanojenik bakteriler asetat ve karbondioksidi metana indirgerler. Metan ve karbondioksit içeren biyogaz, anaerobik parçalanma testlerinde parçalanmanın seviyesini belirleme amacıyla kullanılabilir [66].

Boyalarla yapılan anaerobik parçalanma çalışmaları, özellikle aerobik ortamda parçalanamayan suda çözünabilir reaktif azo boyalar üzerinde yoğunlaşmıştır. Çift bağlı azot halkasına bağlı bu boyaların aerobik proseslerle arıtılabilirliğinin mümkün olmaması anaerobik arıtmayı gerekli kılmaktadır. Anaerobik olarak renk gideriminin gerçekleşebilmesi için ilave karbon kaynağına ihtiyaç vardır. İlave karbon metan ve karbondioksite dönüştürülmekte ve elektronlar açığa çıkmaktadır. Bu elektronlar elektron taşıma zincirinden azo-reaktif boyaya taşınmakta ve bu elektron boyayla reaksiyona girerek azo bağı indirgemektedir. Böylece anaerobik parçalanma sonucunda azo boyalarda renk veren azo bağı kırılmakta ve renk giderilmektedir. Bu renk giderimi prosesi oksijen tarafından inhibe edilmektedir. Bu yüzden boya atıklarını gidermek için ilk adım diazo bağının indirgenerek parçalandığı anaerobik koşullar altında arıtım gerçekleşmelidir [66], [81], [82].

Çeşitli yazarlar saf kültürlerde aromatik aminlerin parçalanma yöntemlerini araştırmışlardır. Bununla birlikte, saf olmayan karışık kültürlerde parçalanma derecelerinin belirlenmesi zordur. Anaerobik olarak atık suların renksizleştirmenin etkinliğini arttırmak için genellikle yardımcı substrat eklenmektedir. Metabolitlerin analitik olarak izlenmesi HPLC ile mümkündür. Bununla birlikte metabolitlerin bazıları oksijen varlığında kararlı değildir ve kendiliğinden okside olabileceğinden daha uzun süreler için HPLC ile ölçülemeyebilir [69], [81]. Araştırmacılar tarafından yapılan bir çalışmada Reaktif Black 5 ve Synozol Red boyalarının anaerobik arıtma ile giderilebildiği, kullanılan mikroorganizma türüne ve boya derişimine bağlı olarak % 23 ile % 78 arasında değişen KOİ giderme verimlerinin elde edilebileceği belirlenmiştir. Boyanın tamamının giderilmesi azo boyaların renk veren N=N yapısının anaerobik kültür tarafından parçalanması ile mümkün olmuştur [66].

Çizelge 4. 4 Tekstil boyalarının gideriminde farklı anaerobik proseslerin performansı [83].

Boya	Boya tipi	Reaktör tipi	Boya (mg/L)	Süre	Renk Giderme (%)
Kongo Red Direct Black 38	Azo	Kesikli (Escherichia coli)	100	5 gün	98 72
Kongo Red Direct Black 38	Azo	Kesikli (Pseudomonas sp.)	100	5 gün	100 83
Red RBN	Azo	Kesikli (Proteus mirabilis)	100	20 saat	95
Asit Orange 7 Direct Red 254	Monoazo Diazo	HÇYR	60	24 saat	92
Reaktif Red RB Reaktif Black B Remazol Blue	Reaktif	Kesikli	953,2 864,9 1031,3	24 saat	94,9 91 63,6
Reaktif Orange 16	Reaktif	Kesikli	350	6 saat	80-98
Reaktif Black 5 Direct Red 28 Direct Black 38 Direct Brown 2 Direct Yellow 12	Azo	HÇYR	250	20 saat	~ 100
Bazik Yellow 28 Bazik Yellow 21 Bazik Red 18 Bazik Red 46 Bazik Blue 16 Bazik Blue 41	Azo	HÇYR	1.000	5 gün	90
Orange 11 Reaktif Black 3HN	Reaktif	Kesikli	100	10 gün	99
Reaktif Red 195 Sumifix Supra Red 3BF	Monoazo	Anaerobik-aerobik AKR	100	18 saat	85
Bisazo vinilsülfonil Antrakinin Vinilsülfonil Antrakinin Monoklorotriazenil		Anaerobik-aerobik AKR	20	18 saat	63 64 66
Tekstil atık suyu	İndigo	Kesikli	100	13 gün	~ 100
Tekstil atık suyu	Reaktif	Akışkan yataklı	20	24 saat	59

Kayıkoğlu ve Debik [83] tarafından karışık anaerobik bakteri topluluklarının kesikli denemelerde iki azo tekstil boyasının mono azo boya ve diazo boya) boya giderimi

üzerine etkileri laboratuvar ölçekli havasız çamur yataklı reaktörde (HÇYR) araştırılmış ve başlangıç karbon kaynağı olarak asetat kullanıldığında 24 saat HBS'(Hidrolik bekleme süresi) de her iki boya için de % 88'den daha yüksek giderim verimi elde edildiği tespit edilmiştir [83].

Çizelge 4.4'te tekstil boyalarının gideriminde farklı anaerobik proseslerin performansları verilmiş olup, elde edilen boya giderme yüzdelerinin yüksek olduğu görülmektedir. Fakat anaerobik koşullarda oluşan boyaların parçalanma ürünleri (aromatik aminler) tam olarak mineralize olamamakta ve canlılar için toksik etki meydana getirmektedir. Anaerobik reaktörün ardından atık suların aerobik proseslerden geçirilmesi, anaerobik şartlar altında meydana gelen bu aromatik aminlerin zararsız hale gelmesini sağlamaktadır. Aerobik prostesten önce anaerobik bir reaktör kullanımı, boya gideriminde %90'dan daha fazla verim elde edilmesi, enerji üretimi için metan eldesi, daha az çamur oluşumu gibi avantajlara da sahip olmaktadır. Ayrıca, anaerobik arıtma aerobik arıtmadan önce bir ön arıtım yapılmasını sağlayarak daha yüksek KOİ giderim verimleri elde edilmesini sağlamaktadır [83].

4.3.3 Biyosorpsiyon

Kimyasal maddelerin mikrobiyal kütle tarafından adsorpsiyonu veya kütlede birikimi biyosorpsiyon olarak ifade edilmektedir. Ölü bakteriler, maya ve mantarlar boya içeren atık suların renginin giderilmesinde kullanılabilir. Tekstil boyalarının kimyası geniş bir yelpazede değişiklik gösterdiği için mikroorganizmalarla olan etkileşimler boyanın kimyasına ve mikrobiyal kütlenin spesifik kimyasına dayanmaktadır. Bu nedenle kullanılan mikroorganizmanın cinsine ve boyaya bağlı olarak farklı bağlanma hızları ve kapasiteleri söz konusudur. Boya içeren atık su çok toksik olduğunda biyosorpsiyon yöntemi daha avantajlı olmaktadır [66], [84].

Bazı boyalar biyokütle tarafından % 40-80 adsorplanabilmektedir. Çalışılan 87 adet boyanın % 62'sinde renk giderimi sorpsiyon ile başarılı bir şekilde gerçekleşmiştir. Sülfonik asit gruplarının sayısına bağlı olarak çözünürlüğü yüksek olan asit boyaların adsorpsiyonu düşüktür. Reaktif boyalar da düşük adsorpsiyon göstermektedirler. Buna rağmen, reaktif boyaların adsorpsiyonu hidrolizin kolaylığına veya üzerindeki sülfon

gruplarına bağlı değildir. Direkt ve bazik boyalar yüksek adsorpsiyon özelliğine sahiptir. Dispers boyalar ise yüksek ile orta arası adsorpsiyon özelliği gösterirler [73].

Çizelge 4. 5 Tekstil atık su arıtma yöntemlerinin avantajları ve dezavantajları [73].

Yöntem	Örnekler	Avantajları	Dezavantajları
Koagülasyon/ Flokulasyon	Alüm Kireç Demir Polielektrolitler	Basit ekipman, Görece hızlı renk uzaklaştırma, KOİ' de önemli azalma	Çamur üretimi, Kimyasal ilavesi, Yüksek çalışma maliyetleri, Polielektrolitler tesisin çalışmasını etkileyebilir, Reaktif boyalar uzaklaştırılmaz, pH kontrolü ihtiyacı.
Membranlar	Ters osmos Nanofiltrasyon Ultrafiltrasyon	Belirli moleküler büyüklükteki kirlilikleri uzaklaştırır, İyi renk giderimi, Hızlı, Büyük hacimler için kullanılabilir, İyonları uzaklaştırır	Yüksek sermaye yatırımı, Bazı atıklar arıtılamamaktadır. Hemen hemen tüm safsızlıklarda konsentrat içerir. Konsentrat başka bir teknoloji ile uzaklaştırılmalıdır. Sürekli temizleme ihtiyacı Ön arıtma gerektirir. Hassas pH kontrolü.
	Diyaliz veya sürekli deiyonizasyon	Saflaştırılan atık su yeniden kullanılabilir, Katyonlu atık su suyu yumuşatmak için yeniden kullanılabilir veya boyama prosesinde kostik veya karbonat kullanılabilir	Atığın bir kısmı arıtılmaz, Hemen hemen tüm safsızlıklarda konsentrat içerir, Organik materyal membranları bozabilir, İyonik olmayan türler uzaklaştırılmaz, Sermaye ve kullanım maliyeti bilinmemektedir.
Adsorbanlar	Aktif karbon, silika, kömür, sentetik polimerler	İyi renk giderimi, Basit teknoloji Bazı adsorbanlar için düşük uygulama maliyeti, Solventlerin uzaklaştırılması	Yüksek sermaye maliyetleri, Yavaş proses, Yenilenme veya atık maliyetleri, Tüm boya tipleri için tek adsorban uygun değildir, Gerekli olan doz yüksek olabilir.

Çizelge 4. 6 Tekstil atık su arıtma yöntemlerinin avantajları ve dezavantajları (Devamı)
[73].

Yöntem	Örnekler	Avantajları	Dezavantajları
Yükseltgenme	Ozon	İyi renk giderimi, Büyük hacimlere uygulanabilir	Yüksek sermaye maliyeti, Yüksek uygulamalı maliyeti, Tüm boya türlerinin uzaklaştırılmasında etkili değil, Oksidasyon ürünleri bilinmemektedir.
	Fenton reaktifi	Hızlı renk giderimi, Basit uygulama, Çamurun tesisin çalışmasını arttırması	Oksidasyon ürünleri bilinmemektedir, Yüksek çalışma maliyetleri
	UV/Peroksit	İyi renk giderimi	Yüksek sermaye maliyeti
	UV/Katalist	Güçlü oksidant, Etkili bir şekilde organik bileşikler parçalar	Yüksek yatırım maliyeti, Oksidasyon ürünleri bilinmemektedir.
	Klorlama	Ucuz, İyi renk giderimi	Klorlu yan ürünler
İngirgenme	Kalay Klorür Hidrosülfid	İyi renk giderimi, Azo boyaların renksizleştirilmesinde etkili	Aromatik aminler oluşabilmektedir, Yetersiz parçalama
Biyolojik	Aerobik	Çözünmeyen boyalar için uygun, Boyaların mineralizasyonunda genellikle sonuç verir	Büyük hacimde çamur üretimi Büyük enerji ihtiyacı
	Anerobik	Renk gideriminde spesifik değildir, İndirgeme mekanizması tümüyle renksizleştirir, Metan üretilir.	Bilinmeyen parçalanma ürünleri, Yüksek sermaye maliyeti

Mevcut atık su arıtma problemlerine büyük yatırımlar yapılarak zamanla çözüme ulaştırılabilmesine rağmen sonuç olarak daima artırılması çok zor konsantre atık arıtma

çamurları kalmaktadır. Bu nedenle mali imkânları yeterli olmayan ülkelerde basit, pahalı olmayan, geri kazanma ve yeniden kullanma metodlarıyla bağlantılı uygun arıtma tekniklerinin kullanılması ve bu tesislerden çıkacak artıkların ihmal edilmeden takip edilmesi gerekmektedir [72].

Endüstride atık sular için kullanılan geleneksel fiziksel ve kimyasal arıtma yöntemlerinin yüksek maliyetli olması ve her boya için kullanılamıyor olması, uygulanmalarının sınırlı kalması yeni yöntemlerin araştırılmasını ve kullanılma sunulmasını gerekli kılmaktadır [66].

Ortamda ilave atık oluşturmada çok hızlı ve güvenilir olarak arıtmanın enzimler ve mikroorganizma yani biyobozunma ile gerçekleştirilmesi bu çalışmayı diğer kullanılan geleneksel yöntemlerden farklı ve önemli kılmaktadır. Özellikle immobilizasyon işlemi ile enzimlerin veya mikroorganizmaların defalarca kullanılması sağlanacağından, önerilen biyoarıtma yöntemlerinin diğer yöntemlere kıyasla çok daha ekonomik olması beklenmektedir.

BOYALARIN ENZİMLER İLE GİDERİLMESİ

Atık sudaki organik kirliliklerin oksidoredüktif enzimler ile giderilmesi fikri 1980'lerin başında geliştirilmiştir. Enzimler uygun koşullarda aromatik bileşikleri parçalayabilmektedirler. Bazı peroksidazlar ve lakkazlar atık su boyalarının giderilmesinde kullanılmaktadır. Peroksidazlar tarafından boyaların giderilmesinde başlatıcı olarak hidrojen peroksit kullanılmaktadır. Lakkaz enziminin elde edildiği kaynaklardan saflaştırılması işlemleri kullanımını sınırlamaktadır. Bitki kaynaklı polifenol oksidaz serbest moleküler oksijeni kullanarak aromatik kirleticileri uzaklaştırabilmesi bir diğer alternatif enzim kullanımı olarak dikkat çekmektedir [85].

5.1 Horseradish Peroksidaz Enzimi (HRP)

Horseradish Peroksidaz enzimi bitki kaynaklı bir enzimdir. HRP, H_2O_2 varlığında farklı fenollerin oksidasyonunu katalizlemektedir. Oksidasyon sonucu oluşan fenoksi radikalleri çözeltide dağılmakta ve suda çözünmeyen poliaromatik ürünleri oluşturan benzer ya da benzer olmayan moleküler türlere saldırılmaktadır. Serbest radikaller spesifik değildir ve zayıf peroksidaz substratlarıyla reaksiyon verirler. Peroksidaz saldırısına karşı hassaslığı değişen kompleks karışımı bir atık su sistemi içerdiğinden bu önemlidir. Klivanov vd. [53] bir molekül peroksidazın yaklaşık 10.000 fenol molekülünün katalitik ömrünü ortadan kaldırdığını hesap etti. Bundan başka peroksidazın büyük bir kısmının inaktivasyonu yüksek derecede fenolü uzaklaştırmak için gereklidir. Bu da endüstriyel durumlarda kullanımlarını sınırlandırmaktadır.

Klibanov enzimin aktif bölgesi ile fenoksi radikallerinin etkileşimi sonucu enzim inaktivasyonun oluştuğunu ileri sürmektedir [53].

HRP mekanizması farklı enzim formlarındaki ara ürünlerle ilişkilidir. H_2O_2 'nin başlangıçta indirgenmesi tüketilen her bir peroksit molekülü için 2 serbest radikal oluşmaktadır [53].

Bu enzimatik yaklaşım aromatik kirlilik içeren atık su çalışmaları için uygundur. Bunlar suda çözünmediklerinden daha az toksiktirler. Suda çözünen toksik fenollerin peroksidaz katalizli dönüşümleri sudan kirleticilerin uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır. Şekil 5.4'te gösterildiği gibi okside halde HRP, bileşik I'ın oluşumuna yol açmaktadır. Bileşik I tek elektronlu indirgemeye Bileşik II'yi oluşturmakta bileşik II ise ikinci bir tek elektronlu adımla hareketsiz enzime indirgenmektedir. H_2O_2 fazlası bileşik III'ün katalitik olarak inaktive olmasına yol açmaktadır [53].

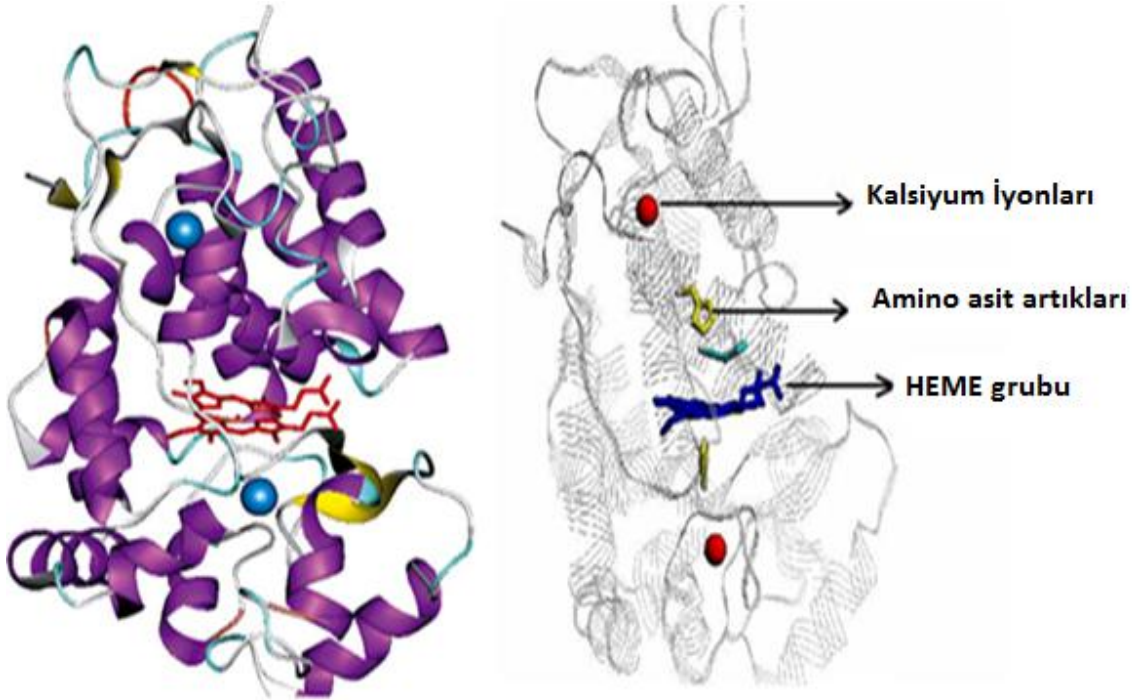
Sentetik boyalar tekstil, boya, kağıt basımı, renkli fotoğraf ve petrol ürünlerinde katkı olarak kullanılmaktadır [53].

Fenolik bileşikler insan sağlığı bakımından potansiyel bir tehdit oluşturduklarından polimer prosesi, fiber endüstrisi ve yağ rafinasyonunda yer alan zararlı kirleticilerdir. Peroksidaz varlığında hidrojen peroksid ilavesi fenolleri oksitlemektedir. Çözünmeyen polimerler ise çökmektedir. Horseradish peroksidaz (HRP) fenol ve klorofenollerin polimerizasyonları sonucu oluşan serbest radikal oluşumunu katalizlemektedir. HRP'nin etkisini gösterebilmesi için optimum pH, HRP inhibitörü olan boyalar, boyaya karşı HRP'nin substrat spesifikliği, boya ve H_2O_2 varlığında HRP'nin inaktivasyonu ve seçilen boya için kinetik sabitler (Michaelis sabitleri) gereklidir. HRP, fenolleri serbest radikal mekanizması ile fenolleri gidermektedir [53].



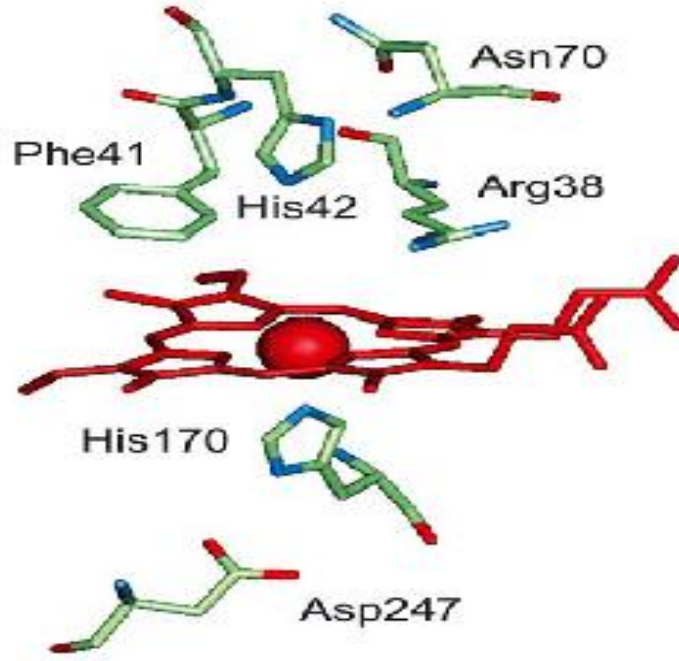
Şekil 5. 1 Bayır turpu (*Armoracia rusticana*) “Horseradish Peroksidaz” bitkisi [86].

Şekil 5.1’de Horseradish Peroksidaz enzimin elde edildiği kaynak olan turpgiller ailesine ait Bayır turpu (*Armoracia rusticana*) bitkisi gösterilmektedir.



Şekil 5. 2 X-ışını kristalografisi ile HRP’nin üç boyutlu molekül yapısı [86].

Şekil 5.2’de Horseradish Peroksidaz enziminin X-ışınları kristalografisi ile alınan üç boyutlu yapısı görülmektedir.



Şekil 5. 3 HRP C'nin hem-bağlama bölgesindeki anahtar amino asit artıkları [86].

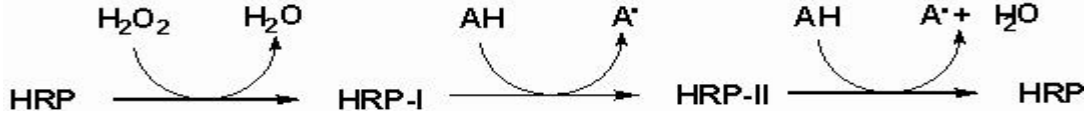
Şekil 5.3'te Hem grubu ve hem grubunda yer alan demir atomu kırmızı, amino asit artıkları ve bazı atomlar yeşil, mavi ve kırmızı renklerde gösterilmektedir. His170, proksimal histidin artığı, hem demir atomuna koordine durumdadır. Amino asit kalıntılarının özel görevleri Çizelge 5.1'de verilmektedir [86].

Çizelge 5. 1 Amino asit kalıntılarının özel görevleri [86].

Amino Asit Kalıntıları	Özellikleri ve görevleri
Arg38	Önemli rolleri (i), bileşik I'ın oluşumu ve stabilizasyonu, (ii) ligand ve aromatik substratların bağlanması ve stabilizasyonu
Phe41	Bileşik I'ın demir oksijenine substratın ulaşmasını önlemektir.
His42	Önemli rolleri (i), bileşik I oluşumu (hidrojen peroksitten proton almaktadır), (ii) ligand ve aromatik substratların bağlanması ve stabilizasyonu
Asn70	His42 yan zincirinin bazlığı Asn70-His42 çifti aracılığı ile korunmaktadır (Hidrojen bağı, Asn70 amit oksijeni ile His42 imidazol NH'ı arasındadır).
Pro139	Bitki peroksidazlarında korunan '-Pro-X-Pro-' (HRP C' de Pro139-Ala140-Pro141) yapısal şeklinin bir parçasıdır.

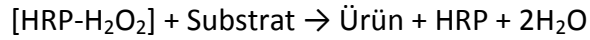
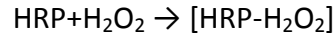
5.1.1 HRP Reaksiyon Mekanizması

Peroksidazlar, H_2O_2 ile Bileşik I, II ve III olmak üzere üç farklı yapı oluşturmaktadır. HRP'nin genel çalışma mekanizması aşağıda verildiği gibidir. HRP-I ve HRP-II, sırasıyla Bileşik I ve Bileşik II'yi, AH ise indirgenen substratı göstermektedir [86].



Şekil 5. 4 HRP enziminin çalışma mekanizması [62], [86].

HRP'nin enzimatik aktivitesi, hem grubunda bulunan demir atomunun yükseltgenmesinden ve indirgenmesinden kaynaklanmaktadır. Uygun ortamda HRP, H_2O_2 ile birleşerek $[HRP-H_2O_2]$ kompleksini oluşturmaktadır. Oluşan kompleks çeşitli elektron vericiler ile yükseltgenir. Organik bileşiklerin, H_2O_2 varlığında peroksidaz oksidasyonu atık sulardaki organik kirliliklerin uzaklaştırılmasında kullanılabilmektedir. [86].



Horseradish peroksidaz (HRP) fenollerin, bifenollerin, anilinlerin ve bunlar gibi heteroaromatik bileşiklerin oksidasyonlarını katalizleyebilmektedir. HRP geniş bir pH ve sıcaklık aralığında aktivite gösterdiğinden atık su işleminde kullanılması uygun görünmektedir. Sulu çözeltilerden fenollerin HRP katalizinde fenol giderilmesini optimize etmek amacıyla son yıllarda birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. HRP-peroksit-aromatik substrat sistemleri için pistonlu-akış ve sürekli akış reaktör modelleri geliştirilmiştir [87].

5.2 Lakkaz Enzimi

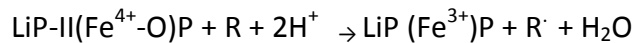
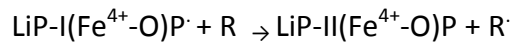
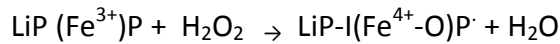
Lakkaz enzimi multinükleer bakır içeren mavi bakır oksidazlar sınıfına ait bir glikoprotein yapılı bir enzimdir. Lakkazlar (E.C. 1.10.3.2) endüstriyel biyokatalizör olarak kullanmak için yüksek potansiyele sahip benzodiollerdir. Lakkazlar moleküler oksijenin harcanmasında çeşitli organik bileşikleri oksidasyonunu katalizler [89].

Lakkaz enzimi bitkilerde hücre duvarı yapısı içinde bağlanmışlardır. Bu grup enzim ilk olarak 19. yüzyılın sonunda *Rhus vernicifera* adlı vernik ağacının reçine komponenti olarak tanımlanmıştır [89], [90]. Lakkaz enzimi moleküler oksijenin harcanmasında substratların monoelektronik oksidasyonunu katalizlerler. Tekstil, kağıt ve gıda endüstrilerinde kullanılır. Tekstil endüstrisinde; boyaların renk gideriminde, ağartma işleminde ve toksik bileşiklerin uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır. Lakkazlar ayrıca tipik substratları fenoller ve aminler olan, reaksiyon ürünleri dimer ve oligomerler olan organik sentezlerde de kullanılmaktadırlar. Lakkaz enzimi serbest veya immobilize olarak azo boyalarının renk gideriminde kullanılmaktadır. 1-hidroksibenzotriazol (HBT)'nin mediatör (aracı) olarak kullanımı lakkaz enziminin katalitik yeterliliğini arttırmaktadır [90].

5.3 Lignin Peroksidaz Enzimi (LiP)

Lignin peroksidazlar 40 kDa molekül ağırlığına sahiptirler, glikolizdir, asidik izoelektrik noktaları vardır, 2,5-3,0 gibi düşük pH değerleri vardır. Aktif bölgelerinde hem proteinleri ve protoporfirin IX içerirler. LiP tipik bir peroksidaz gibi davranır ve H₂O₂ tarafından iki elektron eksik Bileşik I'e yükseltgenir. Bir elektron eksik olan kısım ise Bileşik II olarak belirlenmiştir. Tipik peroksidazlar sadece fenol ve aromatik aminleri okside etmelerine rağmen LiP'lar farklı olarak fenolik olmayan yapıları da okside eder [91], [92].

LiP, farklı lignin model bileşiklerinde H₂O₂ bağımlı oksidasyonu aşağıdaki adımlardan oluşan reaksiyon sıralaması ile katalizler.



R: veratril alkol gibi bir aromatik substrattır, P: pofrindir. LiP Bileşik I (LiP-I) ise biri oksiferil noktası diğeri deporfirin π (pi) katyon radikali olan Hidrojen Peroksite yükseltgenen eşdeğer, iki yapıyı taşır. LiP bileşik II ise sadece bir yükseltgenen eşdeğer yapı taşıyabilir. R substratı Bileşik I'e yükseltgenir. Aşırı H₂O₂ varlığında LiP katalitik

olarak inaktif orta dereceli Bileşik III'e dönüşür. Doğal LiP Bileşik III'ten kendiliğinden bir ayrışmayla, bir süperoksit açığa çıkararak yenileştirilebilir [91].

5.3.1 Redoks Mediatörleri

Lakkaz aracılı sistemlerin lignine karşı aktivitesi iki ana faktöre bağlıdır. Birincisi enzimin redoks potansiyeli, ikincisi mediatörün oksidasyonundan oluşan radikallerin stabilitesi ve reaksiyona girme kapasitesidir [91]. Substratlar büyüklüklerinden dolayı enzimatik pakete direkt giremediklerinden küçük birer molekül olan mediatörler devreye girer. Mediatör, bir çeşit elektron mekiği olarak davranan bir moleküldür. Enzim tarafından yükseltgendiğinde oldukça kuvvetli yükseltgen bir ara bileşik oluşur. Enzimatik paketten difüz edildiğinde herhangi bir substratı kolaylıkla oksitleyebilmektedir [91].

Polisiklik bileşiklerin, fenollerin, aromatik aminlerin, bifenillerin, pestisidlerin, insektisidlerin parçalanma uygulanmalarında redoks yardımcıları ile enzimatik kataliz geniş uygulama alanına sahiptir. Bunların en önemlileri; bromofenol, 2,4-diklorofenol, gayakol, 1-hidroksibenzotriazol, m-kresol, kinol, siringaldehid, vanilin ve vilorik asittir [29].

ENZİM İMMOBİLİZASYONU

Biyoteknolojik uygulamalarda enzimlerin yüksek sıcaklıklarda hızlı denatüre olmaları büyük bir problem oluşturmaktadır. Enzimlerin biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilmesi için çalışma koşullarında uzun süre kararlı olmaları gerekmektedir. Stabilitenin uzatılması enzim tekrarlarının sayısını azaltacak ve böylece enzimin kullandığı maliyetini de düşürecektir. Normal şartlar altında enzimin katalitik olarak aktif doğal yapısı, hidrojen bağları, hidrofobik, iyonik ve Van der Waals etkileşimleri gibi kovalent olmayan kuvvetler ile korunmaktadır. pH değişikliği ile bu kuvvetlerin etkisi azalır ve protein molekülü açılır. Bu ise enzimin denatürasyonu ile sonuçlanır [86]. Denatürasyonu engellemek ve enzimin çevre koşullarına daha kararlı hale gelebilmesi için enzimler bir desteğe immobilize edilmektedirler.

Doğal ve sentetik makromoleküller olan polimerlerin biyomoleküller (Örn. antijenler, antikolar, ilaç aktif maddeleri ve enzimler) ile oluşturduğu konjugatlar tıpta ve biyoteknolojinin çeşitli dallarında kullanılmaktadır [93], [94].

6.1 Enzimlerin Stabilizasyonu

Proteinlerin polielektrolitlerle etkileşimlerinin incelenmesi biyolojik açıdan önemli mekanizmaların varlığını ortaya koymaktadır. Bu proteinlerle yapılan çalışmaların model olarak alınması proteinlerin polielektrolitler ile kompleksleri biyomedikal uygulamalar için büyük ümit vaat etmektedir. Proteinlerin polimerler ile etkileşmesi proteinin işlevsel özelliklerinde önemli değişikliklere yol açabilmektedir. Enzimlerin polimer destek materyallerine bağlanması enzimin stabilitesini arttırmaktadır [95].

Fakat enzimlerin polianyonlar ile enzim-polianyon kompleksleri oluşturulduğunda enzimlerin katalitik aktiviteleri yok olur [94], [95]. Enzimlerin biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilmeleri için stabilitelerinin artırılması gerekmektedir. Enzimler doğal polimerler olan polisakkaridler kullanılarak direnç kazanmaktadırlar ve kullanılan polimerin özelliğine göre enzime yeni özellikler kazandırılabilir [96], [97], [98].

Enzimlerin stabilizasyonu için başlıca 5 yöntem vardır [86].

Bu yöntemler aşağıda sıralanmaktadır;

- 1) Doğal olarak yüksek stabiliteye sahip enzimleri üreten mikroorganizmaların bulunması
- 2) Stabilize edici maddelerin (nötral tuzlar, şelat yapıcı maddeler, albüminler ve diğer proteinler) enzim çözeltilerine ilavesi,
- 3) Enzim moleküllerinin kimyasal modifikasyonu (bifonksiyonel reaktiflerin kullanımıyla molekül içi çapraz bağlama ya da açılasyon ve redüktif alkilasyon gibi reaksiyonlarla proteinlerin üçüncül yapılarındaki fonksiyonel grupların modifiye edilmesi)
- 4) Protein mühendisliği
- 5) Enzimlerin taşıyıcı destek materyallere immobilizasyonu [86].

Enzimlerin kullanılması ile arıtma, henüz bir endüstriyel ölçekte uygulanan bir yöntem değildir. Bu yöntemin, serbest enzimlerin sıcaklığa dayanamaması, yeniden kullanım imkânının olmaması, proteaz enzimlerin saldırılarına açık olmaları ve inhibisyon vb. gibi eksiklikleri vardır. Bu kısıtlamaları aşmak için enzim stabilitesinin yüksek olması, yeniden kullanımı ve uygulamadaki kolaylıkları gibi nedenlerden dolayı immobilize enzimlerin kullanılması gerekmektedir [85], [86].

6.2 Enzim Immobilizasyonu

İmmobilize enzimi terimi ilk olarak 1971'de New Hampshire'de yapılan Enzim Mühendisliği Konferansında benimsendi. İmmobilize enzimler serbest enzime göre daha kararlıdır. Ayrıca immobilize enzimler tekrar ve sürekli olarak kullanılabilmektedir. Biyokatalizlerin immobilizasyonuna biyoteknolojik uygulamalarda dünya genelinde ilgi artmaktadır. Günümüzde immobilize biyokatalizlerin uygulamaları; stereospesifik veya "regiospesifik" biyodönüşüm ile faydalı bileşiklerin üretimi, biyolojik prosesler ile enerji üretiminde, çevre problemlerinin çözülmesinde belirli

kirleticilerin ortamdaki uzaklaştırılmasında, yüksek duyarlılık ve spesifiklik ile bileşiklerin sürekli analizlerinde ve enzim ile iyileştirme ve yapay organlar için yeni tip ilaçların geliştirilmesinde medikal uygulamalarda kullanılmaktadırlar [76], [100]. Enzimlerin katı bir destek üzerine immobilizasyonu immobilize enzimlerin endüstride kullanımından dolayı yoğun bir ilgi alanıdır [101]. Immobilizasyon yöntemi immobilize edilecek enzimin yapısına ve kullanım amacına göre seçilir. Kullanılan taşıyıcı ve analiz edilen maddenin fiziksel durumu da seçilecek yöntem için önemli faktörlerdendir [86]. Immobilize enzimin özellikleri, hem enzim, hem de taşıyıcı materyalin özelliklerine bağlıdır. Immobilizasyon işlemi ile birlikte enzimin kimyasal, biyokimyasal, mekanik ve kinetik özellikleri değişmektedir. Immobilizasyondan sonra enzimin aktivitesi, optimum pH ve sıcaklık aralığı, substrata ilgisi ve stabilitesi farklı olmaktadır. Genellikle enzimin aktivitesi ve substrata olan ilgisi immobilizasyondan olumsuz, optimum sıcaklığı ve kararlılığı olumlu etkilenmektedir. Enzimdeki bu değişiklikler enzimin yapısına, taşıyıcı türüne ve immobilizasyon koşullarına bağlı olarak farklıdır [86], [102]. Çok sayıda doğal veya sentetik polimerler enzimlerin immobilizasyonunda kullanılmaktadır.

Mükemmel stabilite özelliklerinden dolayı sentetik polimerler enzim immobilizasyonunda destek materyali olarak yaygın kullanıma sahiptirler. Sentetik polimerler bakteriyel saldırılara dirençlidirler, istenen yapı ve özelliklerde kolayca hazırlanabilirler [102], [103].

6.2.1 Enzimlerin Immobilizasyon Yöntemleri

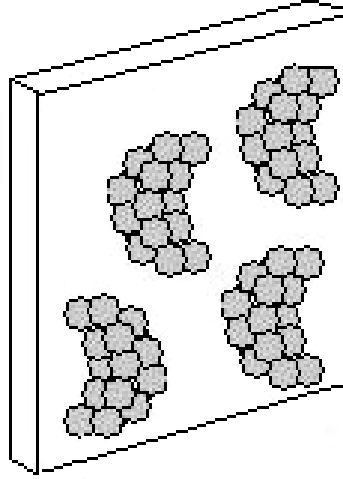
Biyokatalizlerin immobilizasyonu için günümüzde yaygın olarak kullanılan yöntemler geliştirilmiştir. Immobilizasyon destek materyali kimyasal kompozisyonuna (organik, inorganik), doğal ve sentetik olmasına göre sınıflandırılabilir [104].

6.2.1.1 Adsorpsiyon

En eski immobilizasyon yöntemidir. Destek veya film materyal üzerine enzimin immobilizasyonu en basit yöntemdir. Enzim destek materyaline kovalent olmayan bağlar ile bağlanır ve destek herhangi bir önceden aktivasyon işlemi gerektirmez. Enzim ve destek materyali arasındaki bağlar desteğin mevcut yüzey kimyasına ve enzim molekülünün yüzeyindeki amino asitlerin tipine bağlıdır. Enzimin adsorpsiyon ile

immobilizasyonunda destek ve enzim arasında iyonik veya hidrofobik, hidrojen bağı ve Van der Waals kuvvetleri gibi zayıf etkileşimler rol oynar [104].

İnorganik taşıyıcılar olarak seramik, alumina, aktif karbon, bentonit, gözenekli cam, CaCO_3 ve kül kullanılmaktadır. Organik sentetik taşıyıcılar olarak ise naylon, polistren ve doğal organik taşıyıcılar; kitosan, dekstran, jelatin, selüloz ve nişasta kullanılmaktadır [104].



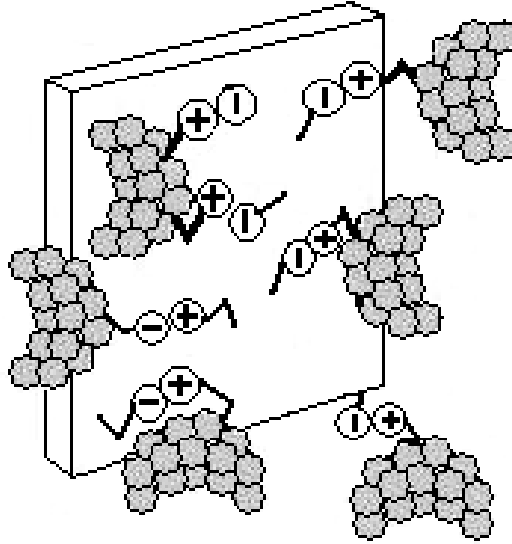
Şekil 6. 1 Enzimin taşıyıcıya adsorpsiyon ile bağlanması

Yöntem basitçe belirli bir zamanda enzim çözeltisinin destek materyeli ile karıştırılmasıdır. Enzimin fazlası destek materyelinden yıkanarak uzaklaştırılır. Bu prosedürde pH kontrolü ve iyonik kuvvet çok önemlidir. En önemli avantajları; basitliği, enzimin konformasyonunda ve aktivitesinde çok az değişiklik olmasıdır. Zayıf etkileşimler ile immobilizasyon gerçekleştiğinden enzimin desorpsiyonu olabilmektedir. Enzimin desorpsiyonu pH, sıcaklık, solvent ve iyonik kuvvet değişimlerinde kolayca gerçekleştirilebilir [104].

6.2.1.2 İyonik Bağlanma

Burada temelde immobilizasyon, iyonik bağlanma ile immobilizasyon gerçekleşir. Bu yöntem iyon değiştirme yeteneğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılara, enzimin iyonik bağlanması temeline dayanır. Bazı durumlarda iyonik bağlama yanında fiziksel adsorpsiyon da etkili olmaktadır. İyonik bağlama çok yumuşak koşullarda gerçekleştiğinden enzimin aktif merkezinde değişikliğe neden olmaz. Bağlanma

kovalent bağ kadar kuvvetli olmadığından uygulama sırasına enzimin yüzeyden kaçıışı sorun olmaktadır [86].

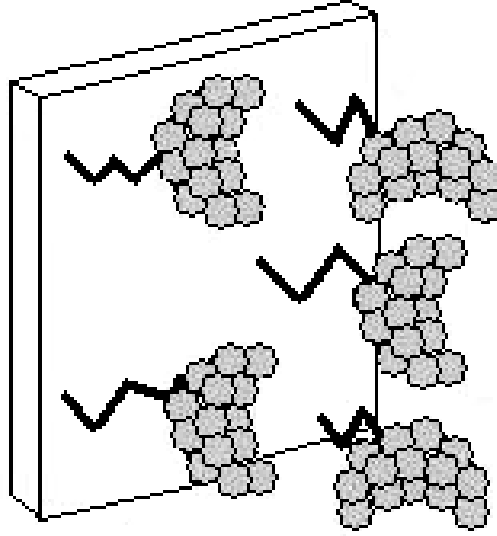


Şekil 6. 2 Enzimin iyonik bağlanma ile taşıyıcıya bağlanması

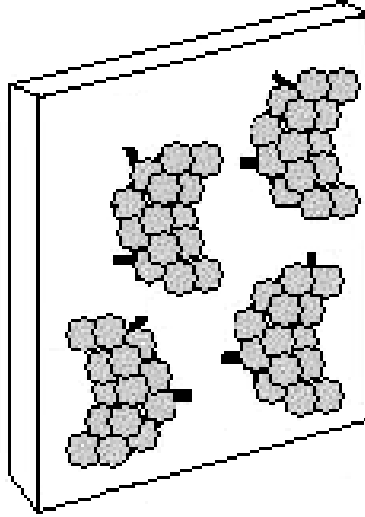
İyonik bağlanmada kullanılan destek materyalleri polisakkarit türevleri (dietilaminoetilselüloz, dekstran, kitosan, karboksimetil selüloz), sentetik polimerler (polistiren türevleri, polietilen vinilalkol) ve inorganik materyaller (amberlit, alümina, silikatlar, bentonit, sepiolit, silikajel vb.) [104].

6.2.1.3 Kovalent Bağlanma

Kovalent bağlanma yönteminde enzimler desteğe (taşıyıcıya) kovalent bağ ile bağlanırlar. Bağlanma destek üzerindeki fonksiyonel grup ile enzim yüzeyindeki amino asit yan grupları arasında gerçekleşir. Enzimin yüzeyindeki lizin veya arginininin amino (NH_2) grubu, aspartik asit veya glutamik asitin karboksil (COOH) grubu, serin veya treoninin hidroksil (OH) grubu ve sisteinin sülfidril (SH) grupları kovalent bağ yapabilen gruplardır. Enzimi desteğe kovalent bağlanma ile bağlayan birçok reaksiyon türü vardır. Bunlar; Schiff bazı oluşumu, amidasyon reaksiyonları, tiyol-disülfid, peptid bağı ve alkilasyon reaksiyonlarıdır [100].



Şekil 6. 3 Enzimin taşıyıcıya bir ajan ("spacer") ile kovalent olarak bağlanması

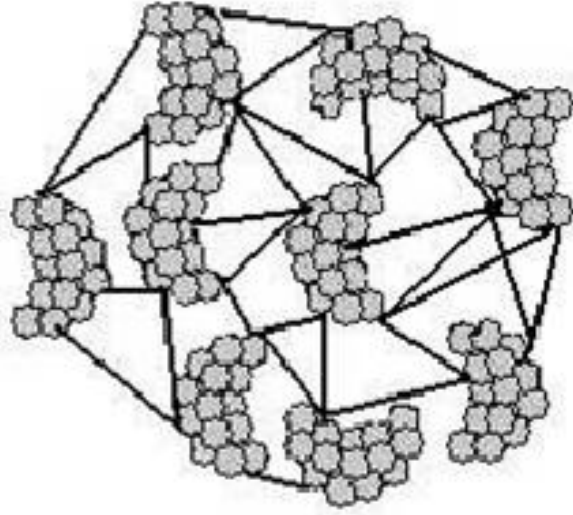


Şekil 6. 4 Enzimin taşıyıcıya bir ajan ("spacer") olmadan kovalent olarak bağlanması

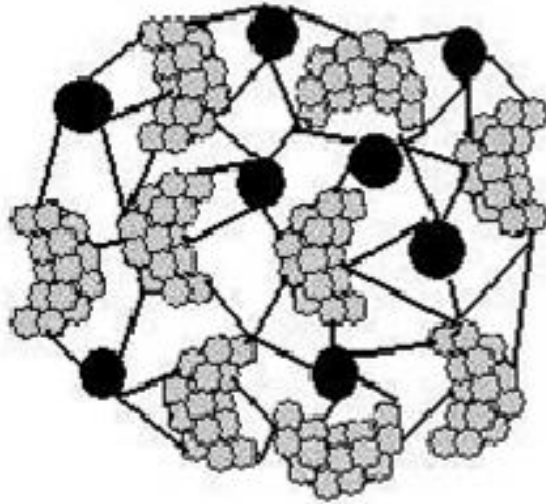
Temelde, destek materyale enzimin bağlanması iki adımda gerçekleşir. İlk adım, destek materyali üzerindeki fonksiyonel grupların spesifik ajanlar (siyanojen bromid, karbodiimid, aminoalkiletoksilan, izotiyosiyanat ve epiklorohidrin vb.) ile aktive edilmesidir. Kovalent bağ ile immobilizasyon enzimin sıcaklığa, organik solvente, denatüre edici ajanlara karşı direncini arttırmak amacıyla yapılmaktadır. Destek malzemesinin seçimde birçok faktör önemlidir. Bunlar ucuzluk, kolay bulunulabilirlik, bağlama kapasitesi, hidrofiliği ve uygulamadaki dayanıklılığı gibi faktörlerdir [104].

6.2.1.4 Çapraz Bağlanma

Enzimler bi- veya çok fonksiyonlu reaktifler (rneğin, glutaraldehit, glioksal, diizosiyanat, heksametilen diizosiyanat, toluen diizosiyanat, vb) yardımıyla ile birbirlerine bağlanır. Enzimin apraz bağlanması normal olarak lizin amino Asitindeki amino gruplarından gerekleğir fakat, bazı durumlarda bağlanma, sisteindeki sülfidril gruplarından, tirozinin fenolik OH grupları, veya histidininin imidazol grupları da bağlama için de kullanılabilir [104].



Şekil 6. 5 Enzimin taşıyıcıya çapraz bağlı olarak bağlanması

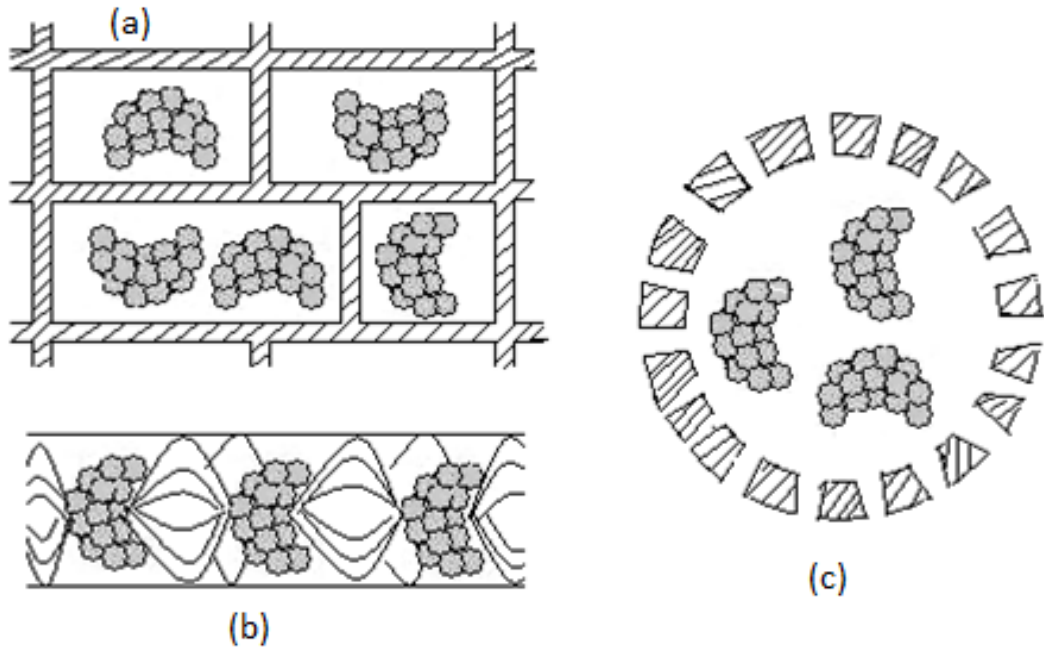


Şekil 6. 6 Enzimin taşıyıcıya yardımcı bir çapraz bağlayıcı ajan ile inert moleküller yardımı ile bağlanması

Çapraz bağlanma işlemi basit bir işlemdir. Fakat difüzyon sınırlıdır ve üretilen materyal kırılmalıdır. Çapraz bağlanma kovalent bağlar ile gerçekleştiğinden immobilize enzimin konformasyonel yapısı değişir ve bunun sonucunda da aktivite kaybı olmaktadır. Glukozun izomerizasyon sürecindeki glutaraldehit ile çapraz bağlı enzim endüstriyel uygulama için önemli bir örnek olarak verilebilir. Büyük ölçekli işlemlerde kullanılan immobilize enzimlerden bazıları bakteriyel hücre kütlelerinden oluşan partiküllerin glutaraldehit ile muamelesinden kolayca elde edilebilmektedir [104].

6.2.1.5 Tutuklama Yöntemleri

İmmobilizasyon için “entrapment” (tutuklama) yönteminde film, jel, fiber, kaplama veya mikrokapsülasyon içinde aktif bileşiklere fiziksel tuzak içermektedir. Bu yöntem enzimin polimer ile karıştırılması ile başarılabılır. Daha sonra enzimin tuzaklara yerleşmesini sağlayacak kafes yapısı oluşturması için polimer çapraz bağlanır. Mikrokapsüller kullanılarak enzimlerin kontrollü gözenekliliğe sahip küresel yarı geçirgen polimer membranlar içine alınması sağlanır. Boyaların, ilaçların ve diğer kimyasalların kapsüllemesi bir süredir biliniyor olsa da, bu yöntem enzimlere 1960'ların ortalarında uygulandı. Bir dizi işlemlerle enzimler farklı malzeme ve yöntemler kullanılarak hazırlanan mikrokapsüllere immobilize edilmektedir. Bu immobilizasyon yöntemin avantajı nispeten küçük bir hacim içinde substrat ve enzim arasında son derece geniş bir yüzey alanı oluşturması ve aynı anda immobilizasyonun gerçekleşmesidir. Bu yöntemin dezavantajları ise, mikrokapsülleme sırasında enzimin aktivitesinde azalma ve yüksek enzim konsantrasyonu ihtiyacı olmasıdır. Buna ek olarak, enzimin tuzaklardan dışarı sızmaması için, gözenek büyüklüğünün çok düşük olması gerekmektedir [104].



Şekil 6. 7 Enzimin (a) matriks içine, (b) fiber içine, (c) kapsül içine tutuklanması

Enzim belirli bir ortamda kalmaya zorlanarak bulunduğu çevreden dışarıya çıkamaz durumdadır. Tutuklama polimer matriks içindeki kafeslerde veya yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ile gerçekleştirilir. Bu yöntemin diğerlerinden en önemli farkı, enzimin fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır [86].

Enzimlerin polimerler içine tutuklanmasına (hapsedilmesine) iyi bir alternatif, uygun fonksiyonel gruplar taşıyan polimer yüzeylerine kovalent olarak bağlanmalarıdır. Amino, hidroksil, karboksil ve fenol grupları gibi fonksiyonel gruplar enzim immobilizasyonu için uygun olmaktadır [86].

Çizelge 6. 1 Boya gidermede immobilize oksidoredüktazların uygulamaları [47].

Enzim	Kaynağı	Destek materyali	Uygulamaları
Katalaz peroksidaz	Bacillus SF	Çeşitli alümin temelli destekler	Tekstil atık suyunun reksizleştirilmesi
Lakkaz	<i>Coriolopsis gallica</i>	Agaroz	Procion navy Blue HER
Lakkaz	<i>Trametes hirsute</i>	Alümina	İndigoid, azo ve antrakinoik boyalar
Lakkaz	<i>Trametes hirsute</i> <i>Sclerotium rolfsii</i>	Alümina	Tekstil atık suyundan indigo parçalanması
Lakkaz	<i>Trametes versicolor</i> <i>Myceliophthora thermophila</i>	Bentonit/Alginat	Direct Red 28, Indigoid, Asit Blue 74, Antrakinoik boyalar
Lakkaz	<i>Trametes modesta</i>	Y-alüminyum oksit pelletleri	Antrakinoik ve trifenilmetan boyalar
Lakkaz	<i>Trametes modesta</i>	Alümina	Reaktif Black 5 boyama atığı
Lakkaz	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Cu-alginat, kitosan ile kaplı Cu-alginat	Reaktörlerde RB 19 boyasının giderilmesi
Mangan peroksidaz	Membran reaktörü	Orange II	-
Mikro-peroksidaz 11	Sitokrom c	Silika jel	Suda çözünmeyen boyalar
Peroksidaz	Horseradish	Poliakrilamid jel	Asit Black 10BX
Peroksidaz	<i>Saccharum uvarum</i>	Hidrofobik destek (modifiye polietilen)	4 tekstil boyası Procion Navy Blue, HER, Procion Brilliant Blue H-7G, Procion Green HE-4BD ve Supranol Green
Peroksidaz	<i>Momordica charantia</i>	Con A-Sefadeks, Biyoaffinity destek	8 adet reaktif tekstil boyası
Polifenol oksidaz	<i>Solanum tuberosum</i>	Celite 545	17 farklı tekstil boyası

BOYALARIN MİKROORGANİZMA İLE GİDERİLMESİ

7.1 Beyaz Çürükçül Mantarlar

Beyaz çürükçül mantarlar özellikle çevre biyoteknolojisinin ilgisini çekmektedir. Mantarlar odundan lignin giderimi, boyaların giderimi ve endüstriyel atıkların arıtımı çalışmalarında biyolojik sistem olarak kullanılmaktadır [105].

Beyaz çürükçül mantarlar “White Rot Fungi” basidiomycetes sınıfına aittirler. *Trametes versicolor* küfü bir beyaz çürükçül mantardır. *Trametes versicolor* araştırmacılar tarafında çok çalışılan ve özellikle lakkaz enzimi üreten bir beyaz çürükçül mantardır. *Trametes versicolor* ayrıca Lignin peroksidaz ve mangan peroksidaz enzimlerini de üretmektedir [92], [106]

Beyaz çürükçül mantarlar reaktif, polimerik, azo, heterosiklik gibi değişik türdeki boyaları parçalama özelliğine sahip en etkili ligninolitik organizmalardır. Beyaz çürükçül mantarların bu özellikleri lakkaz, lignin peroksidaz ve mangan peroksidaz birleşiminden oluşan hücre dışı spesifik olmayan enzim sistemlerinden kaynaklanmaktadır [1].

Beyaz çürükçül mantarlar tarafından sentezlenen lakkaz, Mn-peroksidaz, lignin peroksidaz ve NADH peroksidaz (NADH oksidaz) ekstrasellüler enzimleri biyoteknolojik çalışmalarda yoğun olarak kullanılmaktadır. Boya giderimi başta olmak üzere birçok çalışmada kullanılan bu mantarlara *Trametes (Coriolus) versicolor*, *Funalia trogii*, *Phanerochate chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *P.sajor-caju* ve *P.eryngii* örnek olarak verilmektedir. İlk yıllarda yapılan çalışmalarda *P.chrysosporium* üzerine

yoğunlaşılmasına rağmen, son yıllarda *Trametes versicolor* tekstil atık sularında boyalarının gideriminde çok geniş kullanım alanı bulmaktadır [107].

Beyaz çürükçül mantarların kullanım alanlarından birisi de kağıt hamuru üretimidir. Odun maddesi lignin, selüloz ve hemiselüloz bileşenlerinden meydana gelmektedir. Kraft yöntemi ile kimyasal hamur üretim yönteminde; kağıt hamuru meydana getirmek için odun fibrillere ayrılarak odunun hammadde olan lignin çözülür ve kağıt üretimi için ham kağıt hamuru meydana getirilir. Kraft işleminde odun sodyum sülfid ve sodyum hidroksit ile kaynatılarak lignin çözülür. Bu işlemde sonra karakteristik olarak koyu kahverengi bir renk oluşur. Bu kahverengi ağartmak için kimyasal yöntemde klor kullanılmaktadır. Alkali ekstraksiyonu sonrası yapılan klorlama işlemi ile ağartılmamış kağıt hamurundan kalan ligninin pek çoğu uzaklaştırılsada klorun bir kısmı lignine bağlanır ve klorlu organik bileşikler oluşabilmektedir. Bu işlem sonucu oluşan atıkların nehirlerle verilmesi durumunda çevre problemlerine sebep olur [105].

Beyaz çürükçül mantarların ve bu mantarlardan saflaştırılan enzimlerin biyoteknolojinin çeşitli alanlarında kullanılmaktadır. Bu alanlar kısaca aşağıda özetlenmektedir [107].

1. Enzim üretiminde kullanımı,
2. Ağır metallerin biyolojik adsorpsiyonunda kullanımı,
3. Tekstil fabrikası atık sularının renginin gideriminde kullanımı,
4. Kağıt ve kağıt hamuru üreten endüstrilerde ligninin parçalanmasında kullanımı
5. Zeytinyağı fabrikası atık suyunun renginin gideriminde kullanımı,
6. Mikrobiyal protein kaynağı olarak kullanımı,
7. Hormon üretiminde kullanımı,
8. Pestisid ve herbisid'lerin biyolojik yıkımında kullanımı,
9. Kağıt, tekstil ve petrokimya endüstrilerinden alıcı ortama bırakılan endüstriyel atıkların toksisitesinin azaltılmasında kullanımı,
10. Anti-kanser ilaçlarının üretiminde katalizör olarak kullanımı,
11. Son zamanlarda kozmetik ve dermatolojik ürünlerin hazırlanmasında kullanımı

12. Nanobiyoteknoloji alanında biosensor olarak kullanımı şeklinde olmaktadır [107].

7.2 Mantarların Boya Gidermede Kullanımını Etkileyen Faktörler

Fungal büyüme ve enzim üretimi ve sonuç olarak boya giderimi ve parçalanma birçok faktörden etkilenmektedir. Bu faktörler; besiyeri içeriği, pH değeri, karıştırma ve havalandırma, sıcaklık ve başlangıç boya konsantrasyonudur. Bu etkiler aşağıda kısaca maddeler halinde açıklanmaktadır [76].

7.2.1 Besiyeri İçeriği

Besiyerinin içeriği fungal büyüme ve renk giderme sistemlerinin üretiminde en büyük etkiye sahiptir. Mineral besinler ve diğer katkılar ile birlikte karbon ve azot kaynağı önemlidir [76].

7.2.1.1 Karbon Kaynağı

Karbon kaynağı fungal büyüme ve oksidanlar için kaynak sağlamak ve boya giderimi için gereklidir. Araştırma çalışmaların çoğunda glukoz karbon kaynağı olarak kullanılmaktadır. Diğer alternatifler ise; fruktoz, sükroz, maltoz, ksiloz ve gliserol, nişasta ve ksilan kullanılabilir. Buna rağmen, selüloz ve türevleri karbon kaynağı substratları olarak kullanılmamaktadır. Karbon kaynağı ihtiyacı organizmaya ve uygulandığı boyaya göre belirlenmektedir [76]. Ayrıca, çok yaygın ve ucuz oluşları nedeni ile son yıllarda hidrokarbonlar da karbon kaynağı önem kazanmışlardır. Ancak, hidrokarbonların suda çok az çözünmeleri nedeni ile mikroorganizmaların yararlanması güç ve üreme hızları yavaş olmaktadır [108].

7.2.1.2 Azot Kaynağı

Fungal türleri arasında büyümede ve özellikle enzim üretiminde azot ihtiyacı oldukça farklıdır. *P. chrysosporium* ile lignilolitik enzimlerin üretimi azotça sınırlandırılmış koşullarda daha etkili olduğu yaygın bir şekilde bilinmektedir. Diğer taraftan *B. adusta* azotça zengin bir ortamda daha fazla LiP ve MnP üretmektedir. Beyaz çürükçül mantarlar azot kaynağı olarak organik kaynaklar kadar inorganik kaynakları da

kullanabilmektedir. İnorganik azot, birçok durumda amonyum tuzları, fungal büyüme ve enzim üretimi araştırmaları sırasında kullanılmaktadır [76].

7.2.1.3 Diğer Bileşenler

Büyüme faktörlerinin kullanıldığı birçok çalışma vardır. Boya giderme teknolojilerinde bu bileşenlerin kullanımı ekonomik değildir. Mikroorganizmalar bazı minerallere gereksinim duymaktadırlar. Örneğin beyaz çürükçül mantar demir, bakır ve mangana gereksinim duymaktadır. Bu mineraller atık suyun bir parçası olabilir veya ortama ilave edilmelidirler. Boya giderimini arttırmak için veratril alkol, triptofan ve aromatikler gibi (fenol ve anilin) düşük molekül ağırlıklı redoks mediatörleri de kullanılabilir [76].

7.2.2 pH

En önemli kriterlerden birisidir. Besiyerinin pH'sı mikroorganizmaların besinlerden yararlanma verimleri üzerine etki etmektedir [108]. Beyaz çürükçül mantarlar genellikle asidik pH değerlerinde gelişirler. Farklı boyaların gideriminde farklı optimum pH değerlerinde çalışırlar. Mikroorganizmaların optimum pH'ları besiyerine, mantara ve mantarın enzim sistemine bağlıdır [79].

7.2.3 Oksijen

Beyaz çürükçül mantarlar üreme ve gelişmeleri için gereken oksijen genellikle inkübasyon ortamının çalkalanması veya havalandırılması ile elde edilmektedir. Yapılan çalışmalarda çalkalamalı şartların boya gideriminde daha etkili olduğunu göstermektedir [109].

7.2.4 Sıcaklık

Sıcaklığın üreme hızı üzerine etkisi olduğu bilinmektedir. Besiyeri ortamının sıcaklığı karbon ve enerji kaynaklarının gelişme verimi üzerinde etkilidir [108]. Beyaz çürükçül mantarlar farklı optimum sıcaklıklarda gelişirler. Ancak çoğunluğu 25 °C, 30 °C ve 35°C arasında gelişmektedir [109].

7.2.5 Başlangıç Boya Konsantrasyonu

Boya giderimi için başlangıç boya konsantrasyonun optimize edilmesi önemlidir. Boyalar mikroorganizmalar için toksiktir. Toksisite boyanın konsantrasyona ve mikroorganizma türüne göre değişmektedir. Boyaların yüksek konsantrasyonları daima toksiktir. Literatürde değişik kaynaklarda 50–1.000 mg/L aralığında çalışılma yapılmıştır. [78].

BÖLÜM 8

DENEYSEL ÇALIŞMA

8.1 Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

8.1.1 Kullanılan Cihazlar

Kaba terazi	: Ohaus Adventurer (0,01 g hassasiyetle)
Hassas terazi	: OHAUS Explorer Pro (0,1 mg hassasiyetle)
Manyetik karıştırıcı	: Heidolph MR 3001
Vorteks	: Heidolph Type REAX top
Çalkalamalı Su banyosu	: GFL 1086 20 L (450 x 300 x 160 mm)
Saf su cihazı	: Millipore F4SN77678
pH metre cihazı	: Inolab
U.V. Visible Spektrofotometre	: Shimadzu UV 1700 (Sıcaklık Ayarlı)
Floresans Spektrometresi	: PTI
FT-IR Spektrometre	: “Pelkin Elmer Spectrum One” marka
Otoklav	: HIRAYAMA HICLAVE HVE-50
Taramalı Prop Mikroskobu	: Shimadzu-SPM-9600
Etüv	: Binder
Soğuk Oda Kabini (+4 °C)	: Kerman
Soğutmalı Santrifüj	: Heraeus Biofuge stratos
Santrifüj	: NÜVE NF 200
Ultrasonik Su Banyosu	: BANDELIN SONOREX

8.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çizelge 8. 1 Kullanılan kimyasal maddeler

Madde	Üretici firma	No
Horseradish Peroksidaz (HRP)	Fluka	77332
Na_2CO_3	Riedel-de Haen	31432
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Riedel-de Haen	04269
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Fluka	71647
NaCl	Riedel-de Haen	13423
Üre	Fluka	51459
Asetik Asit	Fluka	45754
o-dianisidin	Fluka	33430
H_2O_2	Fluka	95321
H_2SO_4	Merck	K31996213315
HCl	Merck	K33825814439
D-(+)-Glukoz	Sigma	G 7528
NaOH	Riedel-de Haen	06203
Etil alkol	Merck	K 32846483 404
Asit Black 1 boyası	Fluka	70492
Reaktif Blue 19 boyası	Sigma	R8001
Dispers boyalar (Dianix Reaktif Blue 19, Dianix Navy CC)	Tekstil Fabrikası	
Tekstil Atık Suları	İstanbul ve Çorlu'daki Tekstil Fabrikaları	
Malt ekstrakt	Merck	1.0539.0500
Agar agar	Merck	14513829
1-Hidroksibenzotriazol hidrat	Fluka	54804
Tween 20	Fluka	93773
<i>Trametes versicolor</i>	İstanbul Teknik Üniversitesi	Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Metanol	Besa Kimya	67-56-1
N,N-dimetilformamid	Sigma–Aldrich	22,705-6
Diklorometan	Merck KGaA	8,22271,2500
Trietilamin	Merck KGaA	471283
Metakroil Klorür	Fluka	64120
2,2-Bis (4-hidroksifenil) propan (Bisfenol A)	Merck KGaA	80-05-7
2,2-Bis (4-hidroksifenil) hekzafloropropan (Bisfenol AF)	Merck KGaA	1478-61-1

8.1.3 Kullanılan Cihazlar

8.1.3.1 UV-Visible Spektrofotometresi

UV-Visible spektrofotometrenin protein ve nükleik asit konsantrasyonlarını ölçmede kullanılması bilinen bir yöntemdir. Biyolojik moleküller (proteinler, enzimler vb.) yapılarından dolayı ultraviyole ışığı absorblamaktadır. Proteinlerin UV ışığını absorplama özelliklerinden yararlanılarak protein çözeltilerinin konsantrasyonun ve saflığının tayininde UV-Visible spektrofotometre kullanılmaktadır. Proteinler UV bölgede karakteristik olarak iki absorbans pikine sahiptirler. Bunlardan bir tanesi 215-230 nm'de, diğeri ise 280 nm'de gözlenmektedir. Proteinlerin ultraviyole ışığı absorblaması özelliğinden yola çıkılarak protein çözeltilerinin konsantrasyonlarının saptanmasında, UV-Visible Spektrofotometresi oldukça yaygın kullanılmaktadır. Protein çözeltileri için 280 nm'deki absorbans ile derişim arasında doğru orantılı bir ilişki vardır ve bundan yararlanarak protein çözeltilerinde konsantrasyon tayini yapılabilmektedir [110].

Tekstil boyalarında ise, UV-Visible Spektrofotometresi boyaların maksimum dalga boylarının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu işlem boyanın Absorbans şiddeti 1,0'i geçmeyecek şekilde hazırlanan boya çözeltisinin 200-800 nm arasında spektrumunun alınmasından sonra en yüksek absorbans pikinin ölçüldüğü boyanın maksimum absorbansı olarak kaydedilir. Boyaların maksimum dalga boya her boyaya göre değişmektedir. Tekstil boyalarının renklerinin giderilmesinin belirlenmesinde de UV-Visible Spektrofotometresi kullanılmaktadır. Boyanın belirlenen maksimum dalga boyundaki azalma dikkate alınarak % boya giderme değerleri hesaplanmaktadır. Çalışmamızda kullandığımız UV-Visible Spektrofotometre sıcaklık kontrollü olması nedeniyle farklı sıcaklıklar ve belirli sıcaklıklarda yapılan çalışmalar için kolaylık sağlanmıştır. Sıcaklık kontrol ünitesinin çalışılacak sıcaklığa getirilmesi ile UV-küvetindeki çözelti istenen sıcaklığa getirilmektedir.

8.1.3.2 Fourier Transform Infrared Spektroskopi (FT-IR)

Hafifletilmiş Toplam Yansıtma Fourier Dönüşümlü IR Spektroskopi (ATR-FTIR) ışığın içe yansıtılmasıyla bir yüzeyi örnekleyebilmektedir. Çoklu tabakalı filmlerde kullanılan

diğer tekniklerden farklı olarak, ATR-FTIR yüzey üzerindeki tek tek bileşenleri ayırt etmektedir [111]. Polisülfon polimerleri metakroil kullanılarak metrakrilenmesi FT-IR ile doğrulandı. Spektrumlar ATR aparatı kullanılarak $4000 - 650 \text{ cm}^{-1}$ aralığında 4 cm^{-1} çözünürlükte 8 kez tarama yapılarak elde edildi.

8.1.3.3 Atomik Kuvvet Mikroskopi (AFM)

Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM), numune ve prob arasındaki düşey kuvvetten dolayı alan yüksekliğini ölçer, 3 boyutlu görüntüler ile topografik bilgiler elde edilir. AFM film kalınlığının ve enzim-polimer tabakalarının ve uçlarının yüzey yapısının tespitinde geniş kullanım alanına sahiptir.

Shi vd. [112] tarafından yapılan bir çalışmada altın yüzey üzerine glukoz oksidaz enzimini immobilize etmişler ve immobilize yüzeyler ve altın yüzey AFM ile incelenmiştir. Altın yüzeyler üzerine immobilize enzimlerin AFM ile görüntülenmeleri gerçekleştirilmektedir. Makromoleküllerin fizyolojik koşullar altında AFM ile görüntülenmeleri yaygın kullanılan bir yöntemdir [112]. Polimerik membran üzerine endo-1,4- β -ksilenaz enzimi immobilize edilmiş ve AFM görüntüsü alınmıştır [113].

Bir başka çalışmada ise Horseradish Peroksidaz enzimi ile farklı molekül ağırlıklarında ve farklı oranlarda dekstran biyopolimeri ile kompleksleşmesi AFM ile görüntülenmiştir [114].

Bu doktora tezinde iki farklı polisülfon polimerlerinin ve bu polimerler immobilize edilen Horseradish Peroksidaz örneklerin görüntülenmesinde AFM özelliklerinin yanı sıra daha gelişmiş özelliklere sahip olan Taramalı Prop Mikroskobu kullanılmıştır. Ölçümler dinamik mod ("dynamic mode")'ta kuvvet sabiti 42 N/m ve rezonans sıklığı 320 kHz olan silikon konsol ("silicon cantilever") ile gerçekleştirildi.

8.1.3.4 Floresans Spektrometresi

Floresans spektroskopisi, moleküller biyofizik ve biyokimya alanlarında çok yaygın bir şekilde kullanılan spektroskopik tekniklerden birisidir. Floresans ölçümleri ayrıntılı yapısal bilgi vermemesine rağmen biyomoleküllerin ve biyomoleküler komplekslerin yapısal ve dinamik özelliklerindeki değişiklikleri çok keskin hassasiyet ile ortaya

koymaktadır. Floresans, protein yapısal değişikliklerini, protein adsorpsiyonunu ve adsorbe edilen proteinlerin hem kolloid hem de düzlemsel yüzeylerdeki dinamiğini izlemek için kullanılabilir. Floresans spektrometre ile birçok madde milyonda birin altındaki hassasiyetle tayin edilebilmektedir [115].

8.1.4 Horseradish Peroksidaz Enziminin Aktivite Tayini

8.1.5 Kullanılan Reaktifler

0,01 M Fosfat Tamponu, 0,05 M Asetat Tamponu, 10 mM o-dianisidin, HRP enzim çözeltisi (0,00025 mg/mL) ve % 3'lük H₂O₂.

8.1.6 Horseradish Peroksidaz Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi

25 °C'deki çalkalamalı su banyosunda bekletilen deney tüplerine sırası ile 885 µL tampon çözelti, 20 µL o-dianisidin, 10 µL enzim çözeltisi konuldu ve 10 µL H₂O₂ (% 3'lük) eklenerek reaksiyon başlatıldı. 10. dakika UV-Visible spektrofotometrede absorpsiyon spektrumları alınarak A₄₆₀ değerleri okundu [58], [60], [86].

8.1.7 Aktivite Değerlerinin Hesaplaması (U/mg)

Horseradish Peroksidaz enziminin aktivitesi, H₂O₂ vasıtası ile o-dianisidinin yükseltgenmiş formunun 460 nm'deki absorbansının spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle tayin edilmiştir (o-dianisidin için ϵ_{460} : 11,3 mM⁻¹ cm⁻¹ [58], [60], [86]. Horseradish Peroksidaz enziminin aktivitesi 8.1'deki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

1 unite enzim aktivitesi, standart koşullar altında 1 dakikada 1 µmol substratı oksitleyen peroksidaz miktarı olarak tanımlanmaktadır [58], [60], [86].

$$\frac{U}{mg} = \frac{A_{460} \times 10^6}{M_{\epsilon} \times t \times c_{HRP}} \quad (8.1)$$

M_{ϵ} = o-dianisidinin molar absorpsiyon katsayısı (11,300 M⁻¹ cm⁻¹), t= Bekleme süresi (10 dakika), 1 mol= 10⁶ µmol, c_{HRP}= Enzim konsantrasyonu (0,00025 mg/mL).

8.2 Horseradish Peroksidaz Enzimi ile Reaktif Blue 19 Boyasının Giderilmesi

8.2.1 Boya Gidermenin UV-Visible Spektrofotometresi ile İncelenmesi

Stok boya çözeltisi destile suda Reaktif Blue 19 (33 mg/mL) boyası kullanılarak laboratuvarında hazırlandı. Bu stok boya çözeltisinden 10 µL alınarak çalışılacak tampon çözeltiye ilave edildi. Boyası giderilecek son boya çözeltisinin konsantrasyonu 110 mg/L oldu. UV-Visible Spektrofotometrede bu boya çözeltisinin 200 - 800 nm dalga boyları arasında spektrum alınarak Reaktif Blue 19 boyasının maksimum dalga boyu 594 nm olarak belirlendi. Bu boya çözeltisine satın alınan Horseradish Peroksidaz (HRP) enzimi ilave edildikten sonra UV-Visible Spektrofotometresi ile spektrumu alındı. Elde edilen bu spektrumdan boyanın 594 nm'deki absorbansı boyanın başlangıç absorbansı olarak kaydedildi. Boya ve enzim olan çözeltiye 10 µL H₂O₂ (Hidrojen Peroksit) başlatıcısı ilave edilerek reaksiyon başlatılır başlatılmaz UV-Visible Spektrofotometre ile ölçüm alındı. Bu ölçülen spektrumun maksimum dalga boyundan elde edilen absorbans değeri 0. dakikada okunan absorbans değeri olarak kaydedildi. Daha sonra belirli sürelerde UV-Visible Spektrofotometre ile spektrumlar alındı ve bu süreler için maksimum dalga boyundaki absorbans değerleri kaydedildi.

Boyanın absorbans değerlerinde enzim ve başlatıcısı ilave edildikten sonra zamanla düşüşler meydana geldi. Başlangıçta ölçülen boyanın absorpsiyonu dikkate alınarak belirli sürelerde ölçülen absorbanslar kullanılarak bu boya için % boya giderme değerleri hesaplandı. Kısaca, boya giderme spektrofotometrik olarak maksimum dalga boyundaki azalmanın hesaplanması ile belirlendi. % boya giderme değerleri 8.2'deki eşitliğe göre hesaplandı.

$$\% \text{ Boya Giderme: } \frac{(Abs_{(i)} - Abs_{(t)})}{Abs_{(i)}} \times 100 \quad (8.2)$$

Abs (i): boyanın maksimum dalga boyunda gösterdiği absorbans değeri

Abs (t): Reaksiyon H₂O₂ ile başlatıldıktan sonra her bir bekleme süresi için maksimum dalga boyundaki absorbans değeri.

8.2.1.1 HRP Enzimi ile Boya Gidermenin Şematiksel Gösterimi

- A. Tampon Çözeltisi (Farklı pH'lar için hazırlanan Fosfat ve Asetat tamponları)
- B. C_{stok} : 33 mg mL⁻¹ tan 10 µL (Reaktif Blue 19) boya çözeltisi (110 mg L⁻¹)
- C. 16,4 µL enzim çözeltisi (Enzim konsantrasyonu: 3,3 µg mL⁻¹)
- D. % 3' lük Hidrojen Peroksit çözeltisinden 10 µL H₂O₂ (3,0 M) ilave edilerek reaksiyon başlatılır başlatılmaz spektrum alınır. Reaksiyonun son hacmi 3 mL'dir.

8.2.2 HRP Enzimi ile RB 19 Boyasının Giderilmesine pH'ın Etkisinin İncelenmesi

Reaktif Blue 19 (RB 19) boyasının satın alınan Horseradish Peroksidaz (HRP) enzimi ile hidrojen peroksit (H₂O₂) başlatıcısı kullanarak pH: 3,0, pH: 4,0, pH: 5,0, pH: 6,0, pH: 7,0 ve pH: 8,0 için 30 °C'de 60 dakika boyunca UV-Visible Spektrofotometrede 200–800 nm arasında spektrumları alındı. Bu spektrumlardan RB 19 boyasının maksimum absorbans değeri olan 594 nm'deki değerleri kaydedildi ve yüzde (%) boya giderme değerleri eşitlik 8.2'ye göre hesaplandı.

8.2.3 HRP Enzimi ile RB 19 Boyasının Giderilmesine Enzim Konsantrasyonunun Etkisi İncelenmesi

8 farklı enzim konsantrasyonlarında Reaktif Blue 19 boyasının (110 mg/L) giderilmesi 60 dakika süresince gözlemlendi. RB 19 boyasının farklı enzim konsantrasyonlarında (0,0825 µg/mL, 0,165 µg/mL, 0,330 µg/mL, 0,825 µg/mL, 1,65 µg/mL, 3,3 µg/mL, 6,6 µg/mL, 13,2 µg/mL) giderilmesi 110 mg/L boya ve 3,0 mM H₂O₂ konsantrasyonunda, pH: 5,0 ve 30 °C'de gerçekleştirildi.

8.2.4 HRP Enzimi ile RB 19 Boyasının Giderilmesine Başlangıç Boya Konsantrasyonunun Etkisinin İncelenmesi

RB 19 boyasının farklı konsantrasyonlarında (28, 55, 110, 166, 263 mg/L) giderilmesi 3,3 µg/mL enzim ve 3,0 mM H₂O₂ konsantrasyonunda, pH: 5,0 ve 30 °C'de gerçekleştirildi. Farklı başlangıç konsantrasyonlarında HRP enzimi ile boya giderme etkisi incelendi. Reaktif Blue 19 boyası 5 farklı konsantrasyonda 10 dakika süresince sabit enzim konsantrasyonun (3,3 µg/mL) ilavesi ile giderilmesi incelendi. İlk birkaç

dakikadan sonra boya giderme değerleri değişmediğinden bu boya giderme çalışmasını 10 dakikadan daha fazla devam etmeye gerek olmadığı sonucuna varıldı.

8.2.5 HRP Enzimi ile RB 19 Boyasının Giderilmesine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi

pH: 5,0 ve sabit enzim (0,0033 mg/mL) ve sabit boya konsantrasyonunda (110 mg/L) 60 dakika süresince Reaktif Blue 19 boyası farklı sıcaklıklarda (25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C) giderildi.

8.2.6 HRP Enzimi ile RB 19 Boyasının Giderilmesine Başlatıcı (H₂O₂) Konsantrasyonunun Etkisinin İncelenmesi

% 30'luk Hidrojen Peroksit özeltisi 10 kat seyreltilerek % 3'lük Hidrojen peroksit çözeltisi hazırlandı. % 3'lük Hidrojen Peroksit özeltisi de 3 kat seyreltilerek % 1'lik Hidrojen Peroksit kullanılarak 6 farklı konsantrasyonda Hidrojen peroksit çözeltileri (0,5 mM, 0,1 mM, 1,5 mM, 3,0 mM ve 6,0 mM) hazırlandı. RB 19 boyası (110 mg/L) Horseradish Peroksidaz enzimi (3,3 µg/mL) ile H₂O₂'in farklı konsantrasyonlarında reaksiyonun başlatılması ile 15 dakika süresinde Hidrojen Peroksidin boya gidermeye olan etkisi pH: 5,0 ve 30 °C'de incelendi.

8.2.7 HRP Enzimi ile RB 19 Boyasının Giderilmesine Üre Konsantrasyonunun Etkisinin İncelenmesi

6,0 Molar konsantrasyonunda üre stok çözeltisi destile su ile hazırlandı. Bu stok çözeltisi kullanılarak 0,05 M, 0,2 M, 1,0 M, 1,5 M, 2,0 M ve 2,5 M üre içeren Reaktif Blue 19 (110 mg/L) boya çözeltileri hazırlandı ve Horseradish Peroksidaz enzimi ile 30 dakika süresince giderilmesi pH: 5,0 ve 30 °C'de incelendi.

8.2.8 HRP enzimi ile RB 19 Boyasının Giderilmesine NaCl Konsantrasyonunun Etkisi

Tuz yardımcı kimyasal olarak boyamada kullanılmaktadır.

Boyamada tuz kullanımının kazandırdığı kolaylıklar şöyle sıralanabilir;

- Boyanın life olan ilgisini arttırır.
- Boyanın selüloz tarafından alınma miktarı artar.

- Boyanın lif üzerinde homojen dağılımını sağlar.
- Boya moleküllerinin kumaşa yönelmesini sağlar.

Boyamada yukarıda sıralanan nedenlerden dolayı tuz kullanıldığından atık suda tuz varlığının enzimin boya giderme verimliliğini etkisi incelendi.

0,05 M, 0,1 M, 0,25 M, 0,5 M, 1,0 M ve 2,0 M NaCl içeren Reaktif Blue 19 (110 mg/L) boya çözeltileri hazırlandı. Tuz içeren boya çözeltisi 30 dakika boyunca Horseradish Peroksidaz enzimi ile pH: 5,0 ve 30 °C’de giderildi.

8.3 Horseradish Peroksidaz Enzimi ile Rengi Giderilen Asit Black 1 Boyasının Floresansının Ölçülmesi

Floresans deneyleri için dalga boyları ve slit aralıkları değiştirilerek floresans ölçümleri için optimum çalışma koşulları belirlendi. Öncelikle Asit Blue Black 1 boyası düşük konsantrasyonlarda destile su ile çözeltileri hazırlanarak floresans spektrofotometresi ile farklı dalga boylarında uyarıldı ve Floresans Emisyon spektrumları alındı. Uyarılmanın hangi dalga boyunda yapılacağı belirlendi. Ön denemeler sonrası; uyarma dalga boyu 320 nm, uyarma monokromatörün slit aralığı 4 nm, emisyon monokromatörünün slit aralığı 6 nm olarak belirlendi. Asit Black 1 boyası 320 nm’de uyarıldığında maksimum floresans şiddeti verdiği gözlemlendi. Bundan sonraki floresans ölçümler 320 nm’de uyarılarak yapılmıştır. Emisyon spektrumu ise 365 – 600 nm arasında izlendi.

Floresans çalışmasında üç farklı pH (5,0, 6,0 ve 7,0)’da Asit Black 1 boyasının farklı konsantrasyonlarında ve bu boya çözeltileri Horseradish Peroksidaz enzimi ile muamele edildikten sonra farklı sürelerde 320 nm’de uyarılarak maksimum floresans şiddetleri okundu. Maksimum floresans şiddetinin gözlemlendiği maksimum dalga boyları kaydedildi.

Ölçüm yapılacak pH’daki tampon çözeltiye boya, Horseradish Peroksidaz enzimi ve hidrojen peroksit başlatıcısı ilave edildiğinde reaksiyonun gerçekleştiği son hacim 5,0 mL olmaktadır. Floresans çalışmasında kullanılan Asit Black 1 boyasının stok çözeltisinin konsantrasyonu 4 mg/mL’dir. Floresansı ölçülecek boya konsantrasyonuna göre stok boya çözeltisinden 0,005, 0,01, 0,02, 0,04, 0,08, 0,1 ve 0,2 mg/mL’lerde Asit Black 1 boya çözeltileri hazırlandı. Bu boya çözeltisindeki enzim konsantrasyonu 3,3 µg/mL

olacak şekilde enzim çözeltisi ilave edildi. Son olarak 10 µL H₂O₂ ilave edilerek (reaksiyonun son hacmi: 5 mL) reaksiyon başlatıldı ve belirli sürelerde floresans şiddetleri ölçüldü. Alınan floresans spektrumlarından boyanın yüksek konsantrasyonlarında (0,1 ve 0,2 mg/mL) gürültü pikleri gözlemlendi ve yüksek boya konsantrasyonlarında (0,1 ve 0,2 mg/mL) floresans şiddetleri çok düştü. Bu nedenle çalışılacak boya konsantrasyonu aralığı 0,005, 0,01, 0,02, 0,04, 0,08 mg/mL olarak belirlendi.

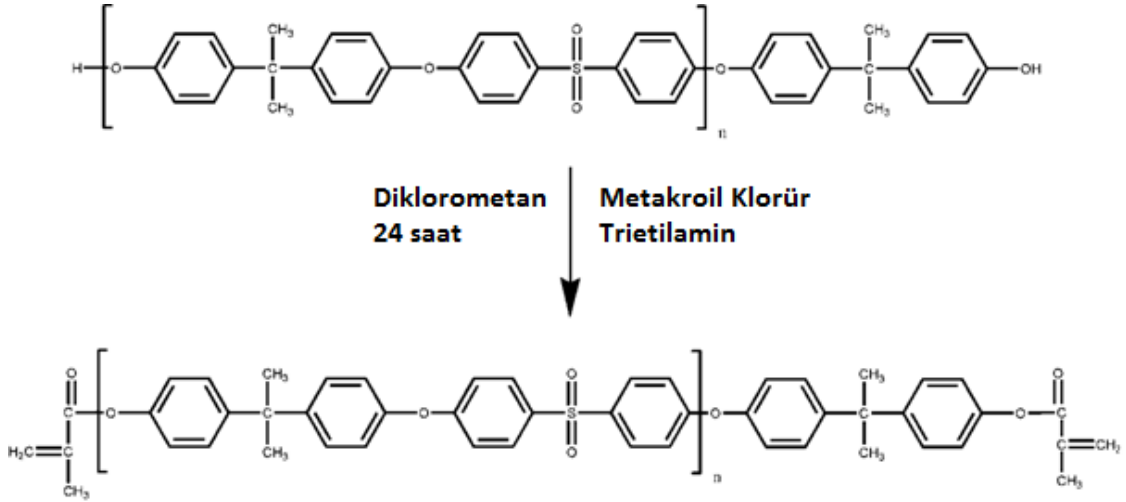
8.4 İmmobilize Horseradish Peroksidaz Enzimi ile Boya Giderme

Çalışmanın bu bölümünde, polimer olarak iki farklı polisülfon polimeri kullanıldı. Bu polimerlerden birisi A esaslı polisülfon polimeri diğeri ise AF esaslı polisülfon polimeridir. Polisülfon polimerleri ilk önce enzimin bağlanabilmesi için metakrillenerek aktif hale getirildi. Bu polimerler film oluşturması için kalıba döküldüler ve vakum etüvünde 2 gün 150 °C'de bekletildiler. 2 günün sonunda elde edilen film çok kırılgan bir özellik gösterdi. Enzim polimere immobilizasyonunda, immobilize sistemin kolay kullanılabilmesi amacı ile polimerin işlenmemiş bir kumaşa emdirilmesi ve kurutulmasının daha uygun olacağı kararlaştırıldı. Polimerin işlenmemiş kumaş üzerine emdirilmesi ile enzimin bağlanacağı yüzey alanı da artmış oldu. Böylece enzim, polimer-kumaş destek materyaline immobilize edildikten sonra boyaların giderilmesinde daha kolay bir şekilde kullanılması sağlandı. Enzimin destek materyali (polimer-kumaş) üzerine immobilizasyonu ile atık suda immobilize sistemin kullanım kolaylığı sağlandığından immobilize sistem boyaların giderilmesinde tekrar kullanılabilir.

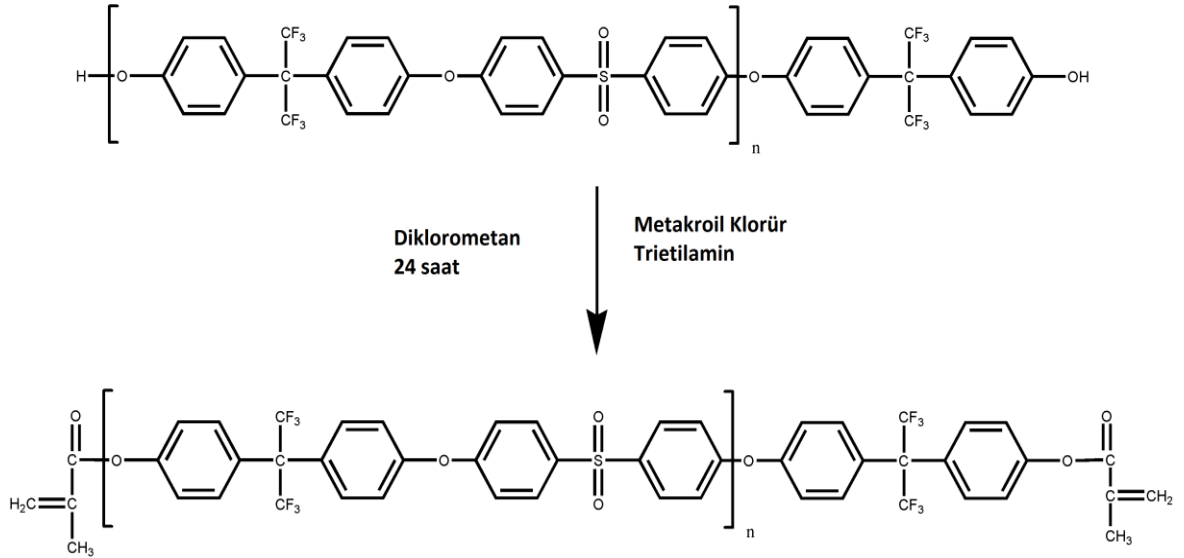
8.4.1 Polisülfon Polimerlerinin Modifikasyonu

3 g Bisfenol-A-polisülfon-OH ve 3 g Bisfenol-AF-polisülfon-OH, 30 mL diklorometan, 3 mL trietilamin ve 0,44 g metakroil klorür (10 mL dikloro metan içinde) azot ortamında 3 boyunlu balona sırayla yavaşça ilave edildi [113]. Üç boyunlu balon kimyasallar ilave edilmeden önce buz banyosu içine daldırıldı. Polimerlerin metakrillenmesi reaksiyonları soğukta gerçekleştirildi. Reaksiyon 24 saat sonra durduruldu ve metanolde çöktürme yapılarak saflaştırıldı. Kurutulan modifiye polimerler safsızlıkların iyice uzaklaşması için

dimetilasetamitte çözülerek tekrar metanolde çöktürme yapılarak saflaştırıldı. Metanolde çöktürme işlemi toz polimer dimetilasetamitte çözüldükten sonra mekanik karıştırıcı ile karıştırılan 2L beher içerisinde 400-500 mL metanol çözeltisinde gerçekleştirildi.



Şekil 8. 1 Bisfenol A bazlı polisülfon polimerinin metakrillenmesi



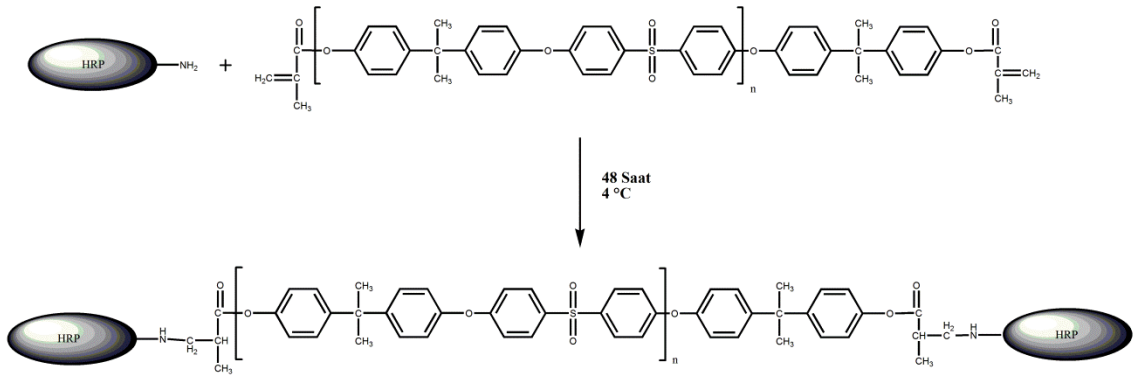
Şekil 8. 2 Bisfenol AF bazlı polisülfon polimerinin metakrillenmesi

8.4.2 Destek Materyali Üzerine Enzim İmmobilizasyonu

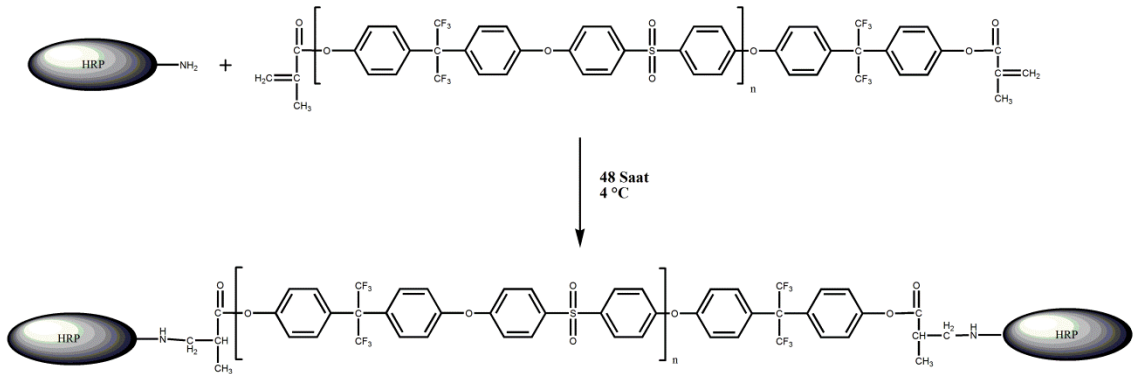
Kumaş parçacıkları 2 cm^2 (her bir kumaş parçasının ağırlığı yaklaşık olarak 60 mg) olacak şekilde kesilerek hazırlandı. 50 mg metakril polisülfon polimeri dimetilasetamitte çözüldü (ağırlıkça; % 85 dimetilasetamit, % 15 modifiye polisülfon polimeri). Bu polimer çözeltisi her bir kumaş parçacığı üzerine homojen olarak ince bir film oluşturacak

şekilde emdirildi. Daha sonra tamamen kuruyana kadar etüvde 80 °C'de 2 gün bekletildi. Bu kumaş parçacıkları üzerinde polimer filmin oluşturulması ile destek materyali hazırlanmış oldu [113].

Destek materyali üzerine Horseradish peroksidaz enzimi pH: 7,0'de 0,1 M fosfat tamponunda hazırlanıp ilave edildi ve 48 saat +4 °C'de bekletildi. Daha sonra immobilize enzim 0,1 M fosfat tamponu içinde 1 gece bekletildikten sonra 2 kez 1 saat ara ile yıkama yapılarak bağlanmayan enzim uzaklaştırıldı [113]. Horseradish peroksidaz enziminin lizin amino asit artıklarında ve amin ucunda bulunan –NH₂ grubu ile destek materyali üzerindeki aktif polimer uçları arasında Michael Katılması ile enzim polimere bağlandı.



Şekil 8. 3 Horseradish Peroksidaz enziminin metakril A bazlı polisülfon polimerine immobilizasyonu



Şekil 8. 4 Horseradish Peroksidaz enziminin metakril AF bazlı polisülfon polimerine immobilizasyonu

8.4.3 Immobilize Enzimin Farklı Koşullarda Aktivite Tayini

Enzim destek materyaline immobilize edildikten sonra 1 gece fosfat tamponunda bekletildikten sonra 2 kez birer saat ara ile fosfat tamponu ile yıkama yapılarak

bağlanmayan enzim uzaklaştırıldı. Stok c_{enzim} : 0,0686 mg/mL'den c_{enzim} : 0,01 mg/destek materyali. Enzim miktarı aktivite çalışmalarında her bir destek materyali için 0,01 mg Horseradish Peroksidaz enzimi stoktan alınarak ilave edildi.

Prosedür;

4850 μ L Tampon çözelti

100 μ L o-dianisidin

İmmobilize HRP enzimi ve 50 μ L H₂O₂ ilavesinden sonra, 10. dakıda 460 nm'deki absorbans değeri UV-Visible Spektrofotometrede okunarak aktivite değerleri 8.3 eşitliğine göre hesaplandı.

$$U/mg = \frac{A_{460} \cdot 10^6}{M \varepsilon_{\varepsilon} \cdot c_{HRP} \cdot t} \quad (8.3)$$

$M\varepsilon$: o-dianisidinenin molar absorpsiyon katsayısı ($11.300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), t: bekleme zamanı (10 dakika), c_{HRP} : HRP konsantrasyon (mg mL⁻¹), A_{460} : Başlangıç A_{460} – Yıkama çözeltisinin A_{460} .

8.4.4 İmmobilize Horseradish Peroksidaz Enzimi ile Reaktif Blue 19 ve Asit Black 1 Boyalarının Giderilmesi

Reaktif Blue 19 boyası stok çözelti konsantrasyonu 4 mg mL⁻¹ olacak şekilde hazırlandı. Stok RB 19 çözeltisinden 100 μ L alınarak 10 mL hacminde pH: 5,0 tamponuna ilave edildikten sonra üzerine immobilize enzim bırakıldı. Reaktif Blue 19 boyasının 10 mL'lik hacimdeki boya konsantrasyonu 40 mg L⁻¹'dir. Başlangıç absorbansı UV-Visible Spektrofotometrede 594 nm'de okundu. 100 μ L H₂O₂ ile reaksiyon başlatıldıktan 1 saat sonra tekrar UV-Visible da ölçüm yapıldı ve boya giderme değerleri elde edildi.

Asit Black 1 boya çözeltisinin stok boya konsantrasyonu 4 mg mL⁻¹ olacak şekilde hazırlandı. Bu boya çözeltisinden 25 μ L alınarak 10 mL hacminde pH: 5,0 tamponuna ilave edildikten sonra üzerine immobilize enzim bırakıldı. Asit Black 1 boyasının 10 mL'lik hacimdeki boya konsantrasyonu 10 mg/L'dir. Başlangıç absorbansı Asit Black 1 boyasının maksimum absorbansı olan 618 nm'de okundu. 100 μ L H₂O₂ ile reaksiyon başlatıldıktan 1 saat sonra tekrar UV-Visible spektrofotometrede ölçüm yapıldı ve boya

giderme değerleri elde edildi. Boya giderme çalışmalarında destek materyali üzerine ilave edilen enzim miktarı bir 2 cm²'lik bir kumaş parçası için (60 mg kumaşın yaklaşık ağırlığı ve 50 mg polisülfon polimeri) 0,41 mg Horseradish Peroksidaz enzimi kullanılmıştır.

Reaktif Blue 19 ve Asit Black 1 boyaarının giderilmesinde kullanılan immobilize enzim sistemi destile su ile yıkandıktan sonra tekrar kullanılmak üzere 0,1 M Fosfat tamponu içerisinde +4 °C'de bekletildi.

8.5 Beyaz rkl Mantar (*Trametes versicolor*) ile Boyaların Giderilmesi

Boya giderme üzerine mikroorganizmaların doğrudan ya da mikroorganizmalardan saflaştırılan enzimleri kullanılması ekonomik ve çevreci olması nedeniyle araştırmacıların dikkatini çekmektedir. Atık sulardaki boyaların giderilmesinde yaygın olarak beyaz çürükçül mantarlar tercih edilmektedir.

İlk olarak *Trametes versicolor* katı besiyerine ekildi, daha sonra sıvı besiyerine aktarılarak çoğaltıldı. Ve hazırlan boya giderme besiyerine ilave edilerek boya gidermede kullanıldı. Bu çalışmada bir beyaz çürükçül mantarı olan *Trametes versicolor* ile farklı boya sınıflarına ait boyaların laboratuvarı hazırlanan boya zelteleri ve fabrikadan alınan tekstil atık suyunun giderilmesi çalışmaları yapıldı.

8.5.1 *Trametes versicolor*'un retimi

8.5.1.1 Katı Besiyerine Ekimi (% 2'lik malt agar katı besi yeri)

3 g Malt agar ve 2 g agar agar 100 mL destile suda çözülerek otoklavda sterilizasyonu yapıldı. Petri kaplarına katılaşması için konuldu. Daha sonra petride *Trametes versicolor* misellerinin üretilmesi için 25 °C'de 15 gün etüvde inkübasyona bırakıldı. Gelişen misellerin yaklaşık bir ayda bir yeniden katı besiyerine ekimi pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

8.5.2 Mikroorganizmanın Sıvı Besiyerinde retimi

Renk gideriminde kullanılan misel süspansiyonun üretilmesi amacı ile sıvı besiyeri hazırlanmıştır. Sıvı besiyerinin içeriği 250 mL'de 6,25 g malt ekstrakt, 0,5 g KH₂PO₄ ve

0,1 g K_2HPO_4 olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu besiyeri bileşenleri saf su içerisinde çözündükten sonra pH'ı 5,5'e ayarlanarak 121 °C'de 1,2 atm basınçta 15 dakika steril edildikten sonra kullanılmıştır [107], [116]. Çalışma 250 mL'lik erlenlerde 50 mL'lik sıvı besiyeri hacminde yapılmıştır.



Şekil 8. 5 Sıvı besiyerinde üretilen misellerin üstten ve yandan görünüşü

8.5.3 Boya Giderme Besiyerinin Hazırlanması

Trametes versicolor'ın misel süspansiyonunun boya giderme üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla hazırlanmıştır. Boya giderme besiyeri 50 mL'de 1,25 g malt ekstrakt ve 0,05 g glukoz içermektedir. Bu maddeler destile suda çözündükten sonra pH'ı 3,6'ya ayarlanarak otoklavda sterilizasyonu yapıldı [107]. Boya çözeltileri ise şırınga ile 0,22 µL steril filtrelerden geçirilerek boya giderme besiyerine ilave edildikten sonra 5 mL *Trametes versicolor* uygun koşullarda ilave edilerek boya giderme çalışmaları gerçekleştirildi.



Şekil 8. 6 Boya çözeltilerinin sıvı besiyerine ilavesinden sonraki görünüşleri

Farklı boya konsantrasyonlarının hazırlanmasında, hazırlanan en yüksek boya konsantrasyonunun UV-Visible spektrumu alındığında maksimum dalga boyundaki Absorbansının 1,0'i geçmemesine dikkat edildi. Bundan dolayı, bu doktora tezi çalışmasında laboratuvarında hazırladığımız boyaların konsantrasyonları birbirlerine göre değişiklik göstermektedir.

8.5.4 Asit Black 1 (AB 1) Boyasının Giderilmesi

Asit Black 1 (AB 1) boyasının 6 farklı konsantrasyonda (100, 300, 500, 700, 1.000, 1.500 mg L⁻¹) destile su ile boya çözeltileri hazırlandı. Asit Black 1 boyasının maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu UV-Visible Spektrofotometresinde spektrum alınarak 618 nm olarak belirlendi. Hazırlanan boya çözeltileri *Trametes versicolor* ile giderildi. Boya giderme çalkalamalı ve çalkalamasız olarak 30 °C'de sabit sıcaklığa getirilmiş su banyosunda gerçekleştirildi. pH: 3,6. Boya giderme UV-Visible Spektrofotometre ile izlendi. UV-Visible Ölçümlerinden önce giderilmiş boyada bulunan biyokütlenin uzaklaştırılması için 10 dakika 7.500 devir/dak. (rpm)'da santrifüj edildikten sonra UV-Visible ölçümleri yapıldı. Boya içeren besiyerindeki renk değişimi absorbans olarak belirlendi.

İşlem sırası şu şekilde ilerlemektedir. Önce boya besiyerinde kullanılacak maddeler destile suda çözülerek hazırlanır ve sterilizasyonu yapılır. Daha sonra önceden hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki boya çözeltilerinde giderilerek boya konsantrasyonuna göre hesap yapılarak 0,22 µL steril filtreler yardımıyla süzülerek boya giderme besiyerine ilave edilirdi. En son olarak steril koşullarda 5 mL *Trametes versicolor* boya giderme besiyeri ilave edildi. Asit Black 1 boyasının giderilmesi çalkalamalı ve çalkalamasız olarak 30 °C'de sabit sıcaklığa getirilmiş su banyosunda gerçekleştirildi. Boya giderme UV-Visible Spektrofotometre ile izlendi. 4. günün sonunda UV-Visible ölçümlerinden önce giderilmiş boyada bulunan biyokütlenin uzaklaştırılması için 10 dakika 7.500 devir/dak. (rpm)'de santrifüj cihazı ile santrifüj edildikten sonra UV-Visible ölçümleri yapıldı. Boya içeren besiyerindeki renk değişimi absorbans olarak belirlendi.

8.5.5 Reaktif Blue 19 (RB 19) Boyasının Giderilmesi

Reaktif Blue 19 (RB 19) boyası 6 farklı konsantrasyonlarında (100, 300, 500, 700, 1.000, 1.500 mg L⁻¹) destile suda boya çözeltileri hazırlandı. Reaktif Blue 19 boyasının maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu UV-Visible Spektrofotometresinde spektrum alınarak 594 nm olarak belirlendi. Hazırlanan boya çözeltilerinin rengi boya giderme besiyerinde renk giderme çalışmaları yapıldı. Reaktif Blue 19 (RB 19) boyasının giderilmesi çalkalamalı ve çalkalamasız olarak 30 °C'de sabit sıcaklığa getirilen su banyosunda gerçekleştirildi. Boya giderme UV-Visible Spektrofotometre ile izlendi. 3. ve 6. günlerin sonunda UV-Visible ölçümlerinden önce giderilmiş boyada bulunan biyokütlenin uzaklaştırılması için 10 dakika 7.500 devir/dak'da santrifüj edildikten sonra UV-Visible ölçümleri yapıldı. Boya içeren besiyerindeki renk değişimi absorbans olarak belirlendi.

8.5.6 Bazik Blue 41 Boyasının *Trametes versicolor* ile Giderilmesi

Bazik Blue 41 boyası katyonik bir boyadır. Bazik Blue 41 boyası yerel bir fabrikadan alınarak destile su ile iki farklı konsantrasyonda (10 mg/L ve 20 mg/L) hazırlandı. Bazik Blue 41 boyasının maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu UV-Visible Spektrofotometresinde spektrum alınarak 608 nm olarak belirlendi. Hazırlanan boya çözeltileri çalkalamalı koşullarda *Trametes versicolor* ile 30 °C'de ve pH: 3,6'da giderildi. Reaktif Blue 19 ve Asit Black 1 boyaalarının giderilmesinde çalkalamalı koşullarda elde edilen boya giderme değerlerinin yüksek olmasından dolayı bundan sonra yapılan boya giderme çalışmalarında sadece çalkalamalı koşullar kullanıldı. Boya giderme UV-Visible Spektrofotometre ile izlendi. Boya giderme besiyerine ve 5 mL *Trametes versicolor* sıvı besiyeri ilave edildikten sonra 7., 11. ve 18. günlerin sonunda UV-Visible ölçümlerinden önce giderilmiş boyada bulunan biyokütlenin uzaklaştırılması için 10 dakika 7.500 devir/dak.'da santrifüj edildikten sonra kalan süpernatantın UV-Visible spektrumları alındı.

8.5.7 Dispers Boyaların *Trametes versicolor* ile Giderilmesi

Dianix terimi dispers boyaların ticari olarak isimlendirilmesinde ön ek olarak kullanılmaktadır. Dispers boyalar tekstil endüstrisinde poliester fiberlerin boyanması

için yaygın olarak kullanılan tek boya sınıfıdır. Dispers boyaların parçalanmasının belirlenmesinde sulu ortamda düşük çözünürlükleri nedeniyle bazı zorluklar vardır. Rengin giderilmesinin incelenmesi sırasında boyanın iyi çözünmesi için eşit hacimde metanol eklenmiştir [28], [117]. Ayrıca, dispers boya çözeltilerinin hazırlanmasında boyanın suda daha iyi dağılması için 0,025 (v/v) oranında Tween 20 kullanıldı [118].

8.5.7.1 Dianix Reaktif Blue R (DRBR)

10 mg Dianix Reaktif Blue R boyası 50 mL metanol içinde çözölerek stok boya çözeltilisi hazırlandı. Stok çözeltiliden aşağıdaki oranlarda alınarak iki farklı konsantrasyonda boya çözeltilisi hazırlandı. Dianix Reaktif Blue R boyasının maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu UV-Visible Spektrofotometresinde spektrum alınarak 618 nm olarak belirlendi. Dianix Reaktif Blue R (DRBR) boyası iki farklı konsantrasyonda (16 mg L^{-1} ve 32 mg L^{-1}) hazırlandı. Boya giderme besiyerine ve 5 mL *Trametes versicolor* boya giderme besiyerine ilave edildi. 7., 11. ve 18. günler sonunda UV-Visible ölçümlerinden önce giderilmiş boyada bulunan biyokütlenin uzaklaştırılması için 10 dakika 7.500 devir/dak.'da santrifüj cihazı ile santrifüj edildikten sonra UV-Visible ölçümleri yapıldı. Boya içeren besiyerindeki renk değışimi absorbans olarak belirlendi. Boyanın maksimum dalga boyu olan 618 nm'ye göre % boya giderme hesaplandı.

8.5.7.2 Dianix Navy CC (DNCC)

10 mg Dianix Navy CC (DNCC) boyası 50 mL metanol içinde çözölerek stok boya çözeltilisi hazırlandı. Dianix Navy CC boyasının maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu UV-Visible Spektrofotometresinde spektrum alınarak 582 nm olarak belirlendi. İki farklı konsantrasyonda (60 mg L^{-1} ve 120 mg L^{-1}) boya çözeltilisi hazırlandı.

8.5.8 Tekstil Boya Atık Suyunun *Trametes versicolor* ile Giderilmesi

Atık suyun maksimum dalga boyunun 522 nm olduğı UV-Visible Spektrofotometre kullanılarak belirlendi. Tekstil atık suyunda bir çok farklı koşulun (pH, süre, redoks mediatörü etkisi, mikroorganizma miktarı, boya giderme besiyeri konsantrasyonu) boya gidermeye olan etkisi incelendi. İki farklı hacimde sıvı besiyerinden (5 mL ve 10 mL) alınarak mikroorganizma miktarının boya gidermeye olan etkisi incelendi.

BÖLÜM 9

DENEY SONUÇLARI

9.1 Horseradish Peroksidaz Enzimin Farklı Koşullarda Aktivite Sonuçları

Enzimin optimum boya giderme koşullarının belirlenmesi amacı ile farklı koşullarda aktiviteleri belirlendi.

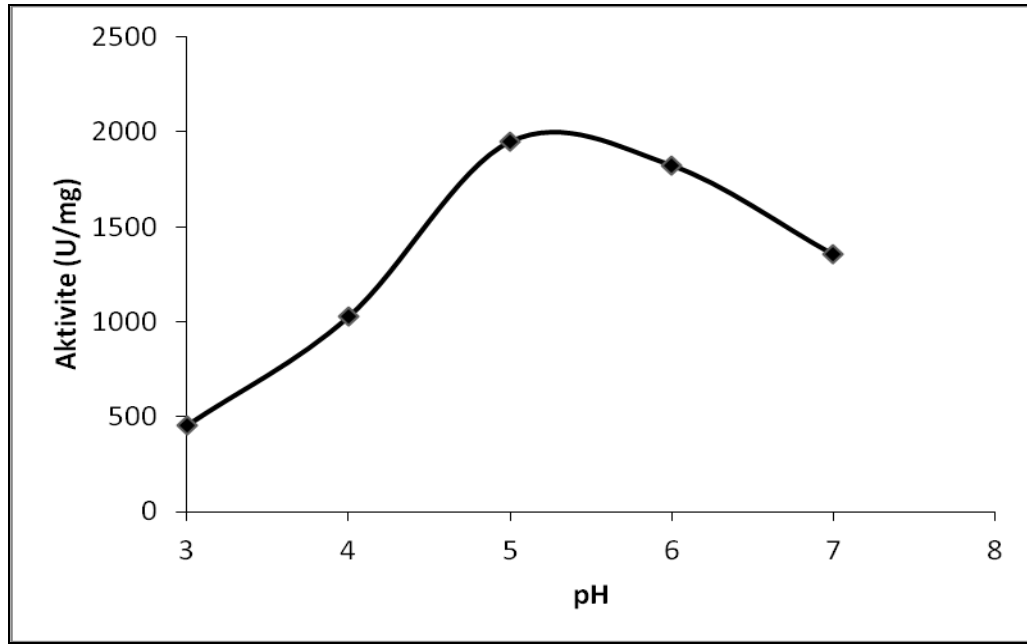
9.1.1 Enzimin Aktivitesine pH'ın Etkisi

Horseradish Peroksidaz enziminin farklı pH'larda aktiviteleri belirlendi. Enzimin en yüksek aktiviteyi pH: 5,0'te gösterdiği saptandı.

Çizelge 9. 1 Horseradish Peroksidaz enziminin 25 °C'de farklı pH'larda ölçülen aktivite değerleri

	pH				
	pH: 3,0	pH: 4,0	pH: 5,0	pH: 6,0	pH: 7,0
HRP Aktivite (Ünite/mg)	453	1026	1950	1825	1356

Şekil 9.1 ve Çizelge 9.1'de görüldüğü üzere enzimin optimum pH'ı pH: 5,0'dır. Fakat enzim pH: 5,0'e göre daha az olmakla birlikte pH: 6,0'da aktivitesinin yüksek olduğu görülmektedir.

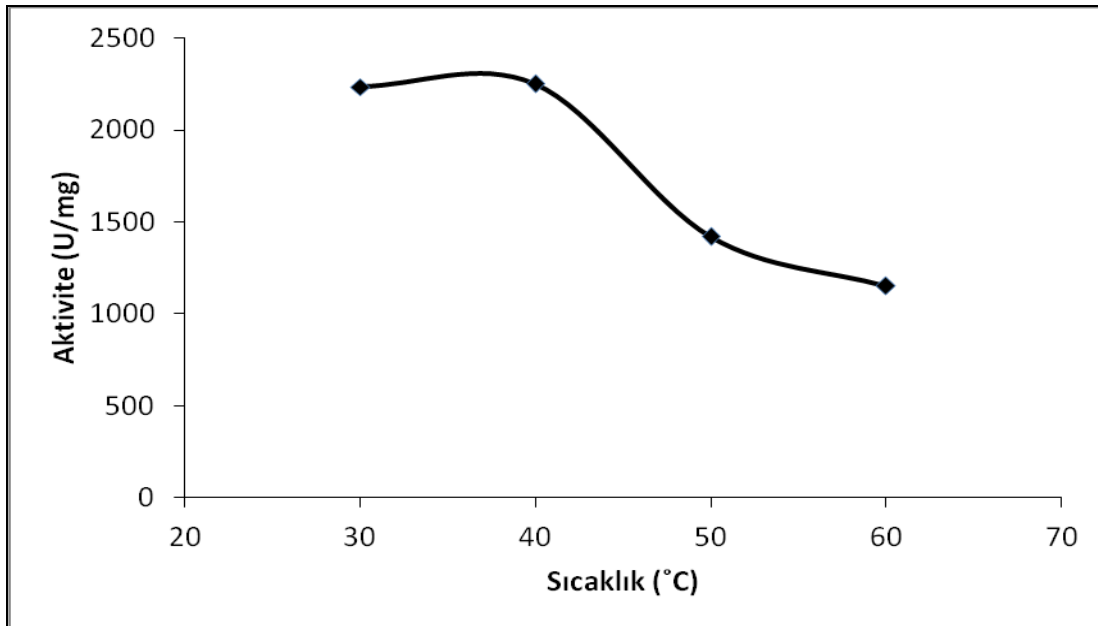


Şekil 9. 1 Horseradish Peroksidaz enziminin 25 °C’de farklı pH’larda ölçülen aktivite değerleri

9.1.2 Enzimin Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi

Çizelge 9. 2 pH: 5,0 ve farklı sıcaklıklardaki Horseradish Peroksidaz enziminin aktivite değerleri

	Sıcaklık (°C)			
	30 °C	40 °C	50 °C	60 °C
HRP Aktivite (Ünite/mg)	2236	2250	1420	1151



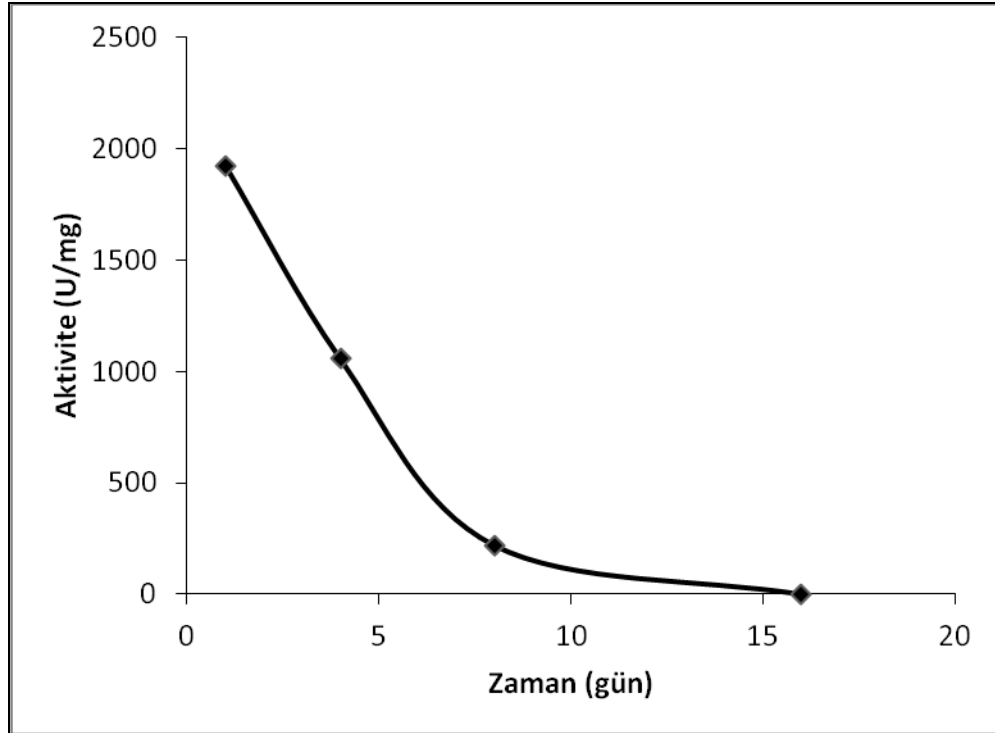
Şekil 9. 2 pH: 5,0 ve farklı sıcaklıklardaki Horseradish Peroksidaz enziminin aktivite değerleri

Şekil 9.2’de görülebileceği gibi enzim 30 °C ve 40 °C’de diğer sıcaklıklara göre daha yüksek aktivite göstermektedir. Enzim 40 °C’nin üzerinde aktivitesinde düşüş başlamaktadır. Sıcaklık yükseldikçe enzimin yapısı bozulmaktadır.

9.1.3 Enzimin Aktivitesine + 4 °C’de Beklemenin Etkisi

Çizelge 9. 3 + 4 °C’de bekleyen Horseradish peroksidaz farklı bekleme sürelerinde 25 °C’de ve pH: 5,0’te ölçülen aktivite değerleri

Zaman (gün)	HRP Aktivite (Ünite/mg)
1	1925
4	1056
8	220
16	0



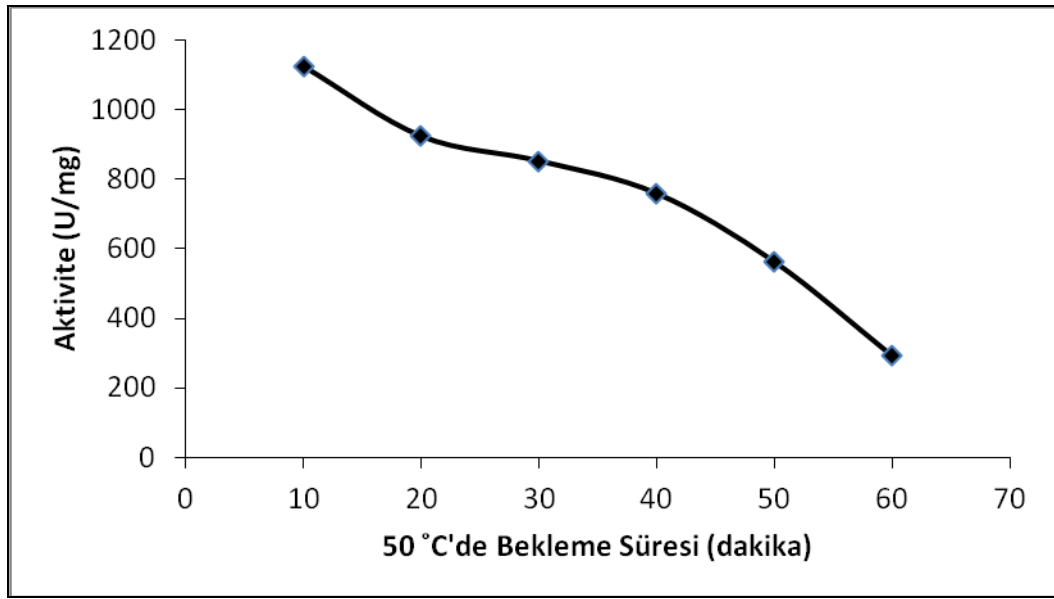
Şekil 9. 3 +4 °C’de bekleyen Horseradish peroksidaz ve iki farklı immobilize enzimin farklı bekleme sürelerinde 25 °C’de ve pH: 5,0’te ölçülen aktivite değerleri

Horseradish Peroksidaz enzimi yaklaşık 15 gün sonunda aktivitesini kaybetmektedir.

9.1.4 Enzimin 50 °C Sıcaklığa Direnci

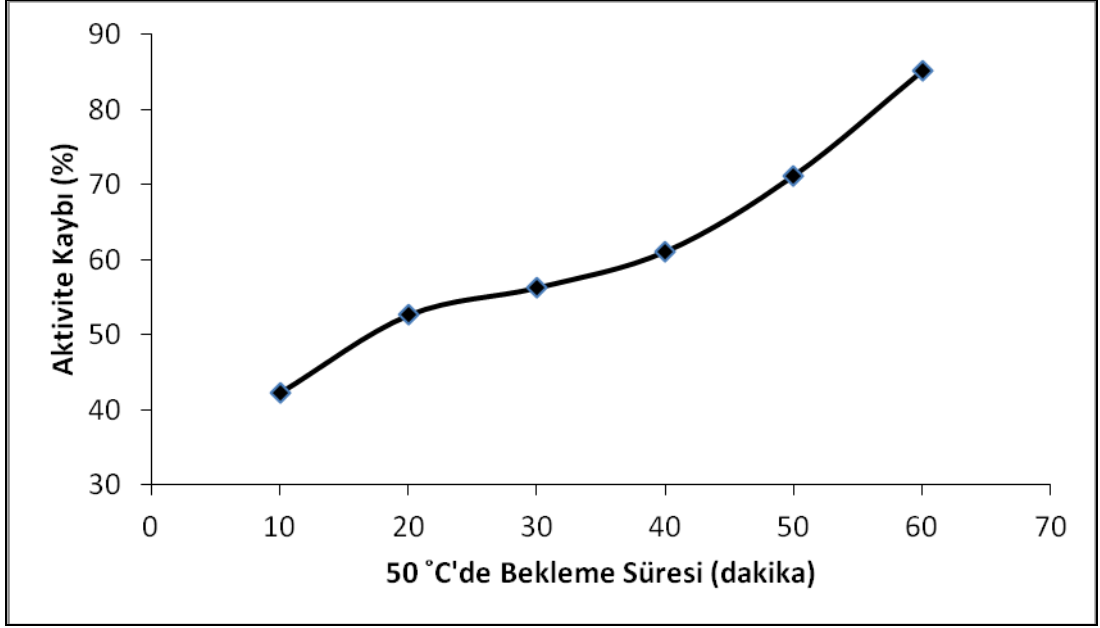
Çizelge 9. 4 50 °C’de farklı sürelerde bekletilen enzimin pH: 5,0 ve 25 °C’de hesaplanan aktivite değerleri

	50 °C’de Bekleme Süresi (dakika)					
	10 dak.	20 dak.	30 dak.	40 dak.	50 dak.	60 dak.
HRP Aktivite (Ünite/mg)	1125	924	853	759	562	291



Şekil 9. 4 50 °C’de farklı sürelerde bekletilen enzimin pH: 5,0 ve 25 °C’de hesaplanan aktivite değerleri

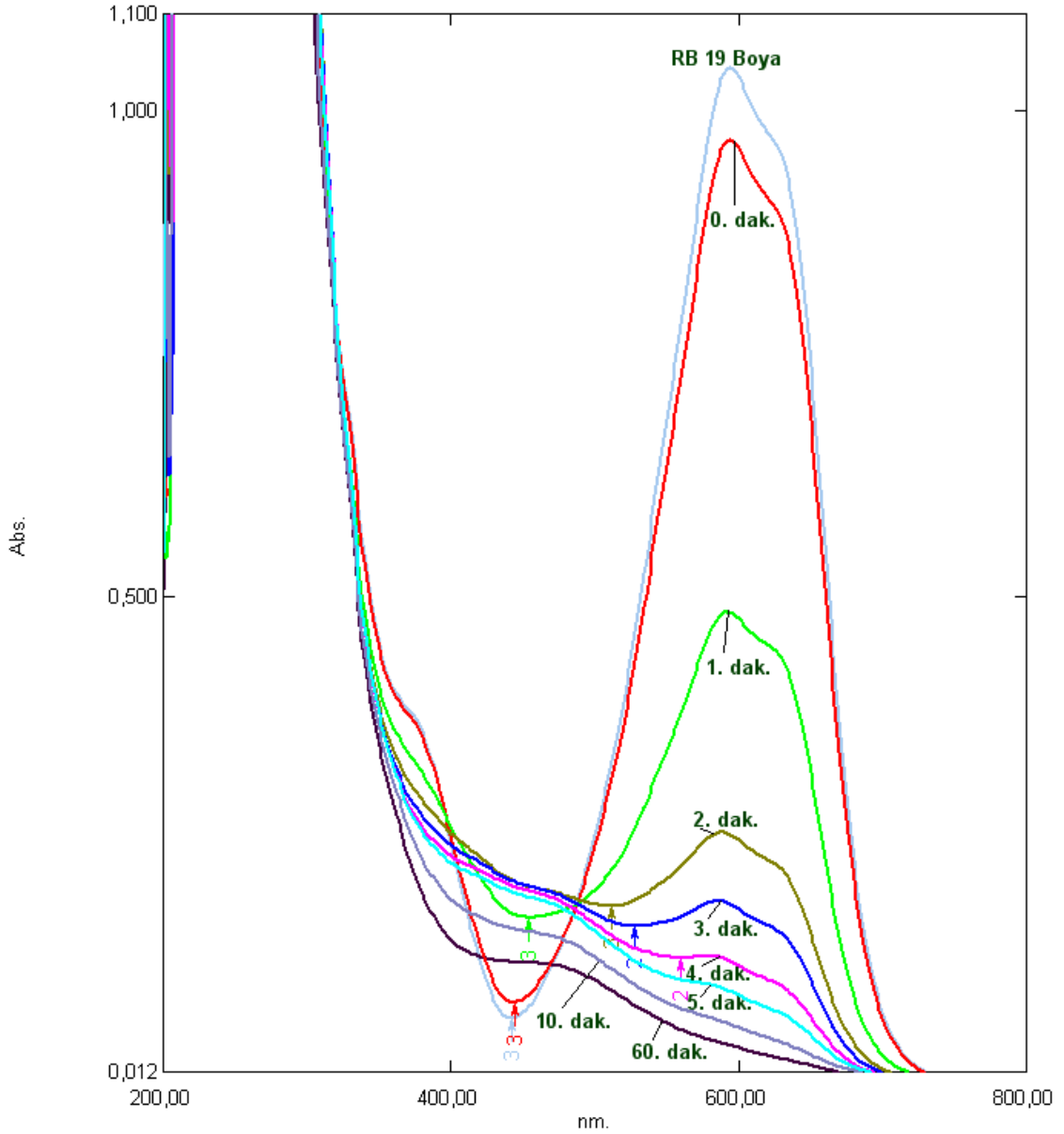
Enzimin pH: 5 ve 25 °C’de ölçülen aktivitesi 1950 U/mg’dir. Enzim 50 °C’de 10 dakika beklediğinde aktivite 1125 U/mg’a düşmüştür. 60. dakika sonunda ise enzimin aktivitesi 291 U/mg’a düşmektedir. Enzim 50 °C’de 60 dakika süresince beklediğinde aktivitesinin % 85’ini kaybetmektedir. Şekil 9.5’te Horseradish Peroksidaz enzimi 50 °C sıcaklığa belirli sürelerde maruz kaldığında enzimin aktivitesindeki kayıp yüzde (%) olarak gösterilmektedir.



Şekil 9. 5 50 °C'de farklı sürelerde bekletilen enzimin pH: 5,0 ve 25 °C hesaplanan aktivite değerlerine enzimin aktivitesindeki % kayıp.

Şekil 9.5'te de görüldüğü gibi enzim 50 °C sıcaklığında beklediği süre arttıkça enzimin aktivite kaybı belirgin bir şekilde artmaktadır.

9.2 RB 19 Boyasının Horseradish Peroksidaz Enzimi ile Giderilmesinin UV-Visible Spektrofotometre ile İncelenmesi



Şekil 9. 6 pH: 5,0 ve 30 °C'de Horseradish Peroksidaz enzimi ile Reaktif Blue 19 (RB 19) boyasının giderilmesinin farklı sürelerde alınan UV-Visible Spektrumları ile incelenmesi

Enzim ile Reaktif Blue 19 boyası 30 °C'de pH: 5,0'te 1., 2., 3., 4., 5.,10. ve 60. dakika bekleme süreleri için sırası ile % 54, % 75, % 82, % 87, % 91, % 94 ve % 97 boya giderme değerleri elde edilmiştir (Çizelge 9.5). Boya gidermenin incelenmesinde kullanılan UV-Visible spektrofotometresi cihazı ile alınan UV-Visible spektrumları Şekil 9.6'da gösterilmektedir. ilk 5 dakikadaki boyanın maksimum dalga boyundaki hızlı

düşüş gösterilmiştir. Boyanın 5 dakikada Horseradish Peroksidaz enzimi ile yüksek bir yüzde ile giderildiği görülmektedir.

9.2.1 HRP Enzimi ile RB 19 Boyasının Giderilmesine pH'ın Etkisinin İncelenmesi

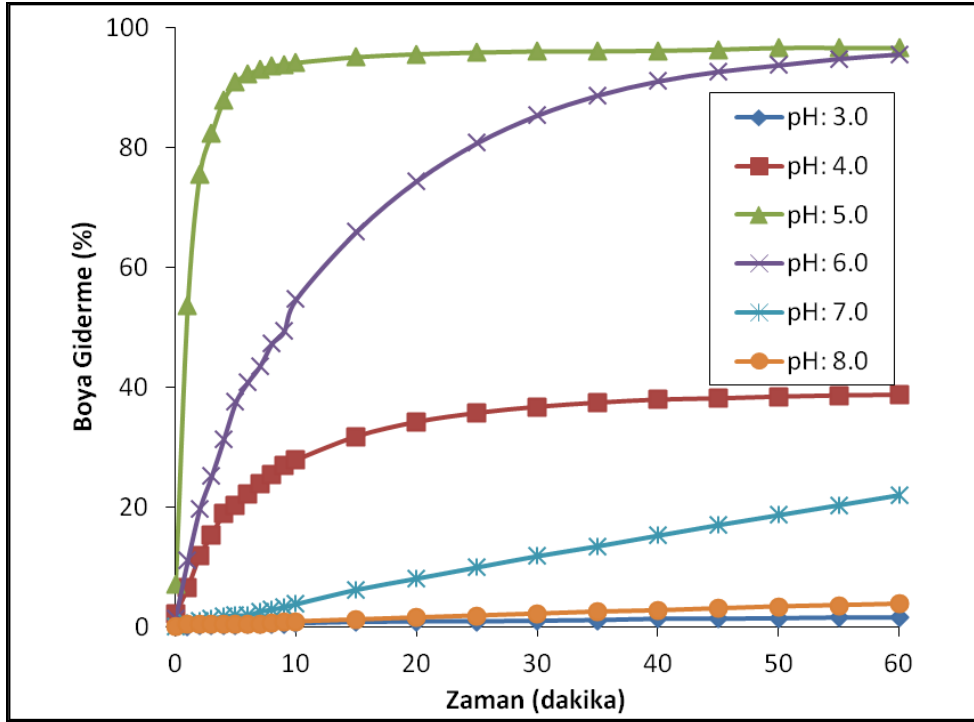
pH optimizasyonu 3,3 µg/mL enzim, 110 mg/L boya ve 3,0 mM H₂O₂ konsantrasyonunda gerçekleştirildi.

Çizelge 9. 5 30 °C'de farklı pH'larda HRP enzimi ile RB 19 boyasının % giderme değerleri

Zaman (dakika)	Boya Giderme (%)					
	pH: 3,0	pH: 4,0	pH: 5,0	pH: 6,0	pH: 7,0	pH: 8,0
0	0,10	2,21	7,09	1,50	0,10	0,11
1	0,10	6,62	53,64	11,05	0,62	0,42
2	0,21	11,94	75,48	19,64	1,14	0,53
3	0,21	15,35	82,38	25,21	1,45	0,53
4	0,21	18,96	87,93	31,33	1,77	0,53
5	0,31	20,26	90,90	37,55	1,97	0,53
6	0,41	22,17	92,24	40,88	1,97	0,53
7	0,41	23,97	93,01	43,56	2,60	0,53
8	0,41	25,38	93,58	47,32	2,91	0,64
9	0,52	26,88	93,87	49,36	3,32	0,85
10	0,62	27,88	94,16	54,72	3,84	0,95
15	0,83	31,80	95,11	65,99	6,23	1,27
20	0,93	34,20	95,59	74,46	8,10	1,59
30	1,03	36,71	96,07	85,41	11,84	2,22
40	1,34	37,91	96,17	91,09	15,26	2,75
50	1,45	38,42	96,65	93,78	18,69	3,39
60	1,55	38,72	96,65	95,60	22,01	3,81

Silva vd. [14] tarafından yapılan bir çalışmada ise, Horseradish Peroksidaz enzimi ile Reaktif Blue 19 boyasının pH: 6,0'da giderilmesini incelenmiştir. Çalışma sonucu 35 °C'de 5. ve 60. dak. pH: 6'da elde edilen boya giderme değerleri sırası ile % 96 ve % 97 olmuştur. Bu doktora tezi çalışmasında ise pH 6,0'da 5. ve 60. dakikalarda sırası ile % 38 ve % 97 boya giderme değerlerine ulaşılmıştır (Çizelge 9.5).

Rekatif Blue 19 boyasının Horseradish Peroksidaz enzimi ile giderilmesi çalışmalarında farklı pH'lar (pH: 3,0, pH: 4,0, pH: 5,0, pH: 6,0, pH: 7,0 ve pH: 8,0) için 30 °C'de 60 dakika boyunca UV-Visible Spektrofotometrede boya giderme giderme değerleri incelenmiştir. Bunun sonucunda pH: 5,0'te en yüksek boya giderme değerlerine ulaşılmıştır (Şekil 9.7).



Şekil 9. 7 30 °C'de farklı pH'larda HRP enzimi ile Reaktif Blue 19 boyasının % giderilmesi

Enzim ile Reaktif Blue 19 boyası 30 °C'de pH: 5,0'te 5., 10., 30. ve 60. dakikalarda sırası ile % 91, % 94, % 96 ve % 97 giderilmiştir. Enzim ile Reaktif Blue 19 boyası 30 °C'de pH: 6,0'da 5., 10., 30. ve 60. dakikalarda sırası ile % 38, % 56, % 85 ve % 96 giderilmiştir. 60 dakika bekleme süresi sonunda pH: 5,0'ten sonra pH: 6,0'da yüksek boya giderme değerine ulaşıldığı görülmektedir (Şekil 9.7).

Horseradish peroksidaz enzimi en yüksek boya giderme değerine pH: 5,0'te ulaşmıştır. Aktivite sonuçları da incelendiğinde enzimin pH: 5,0'te en yüksek aktivite gösterdiği görülmektedir (Şekil 9.1). pH: 3,0 ve pH: 8,0'de boya giderme değerlerinin 60. dakika sonunda sırası ile % 2,0 ve % 4,0 olması dikkat çekmektedir. pH: 3,0 ve pH: 8,0'de elde edilen çok düşük boya giderme değerleri Horseradish Peroksidaz enziminin bu pH'larda aktivite göstermediğinden kaynaklanmaktadır. Literatürde yapılan çalışmalarda da

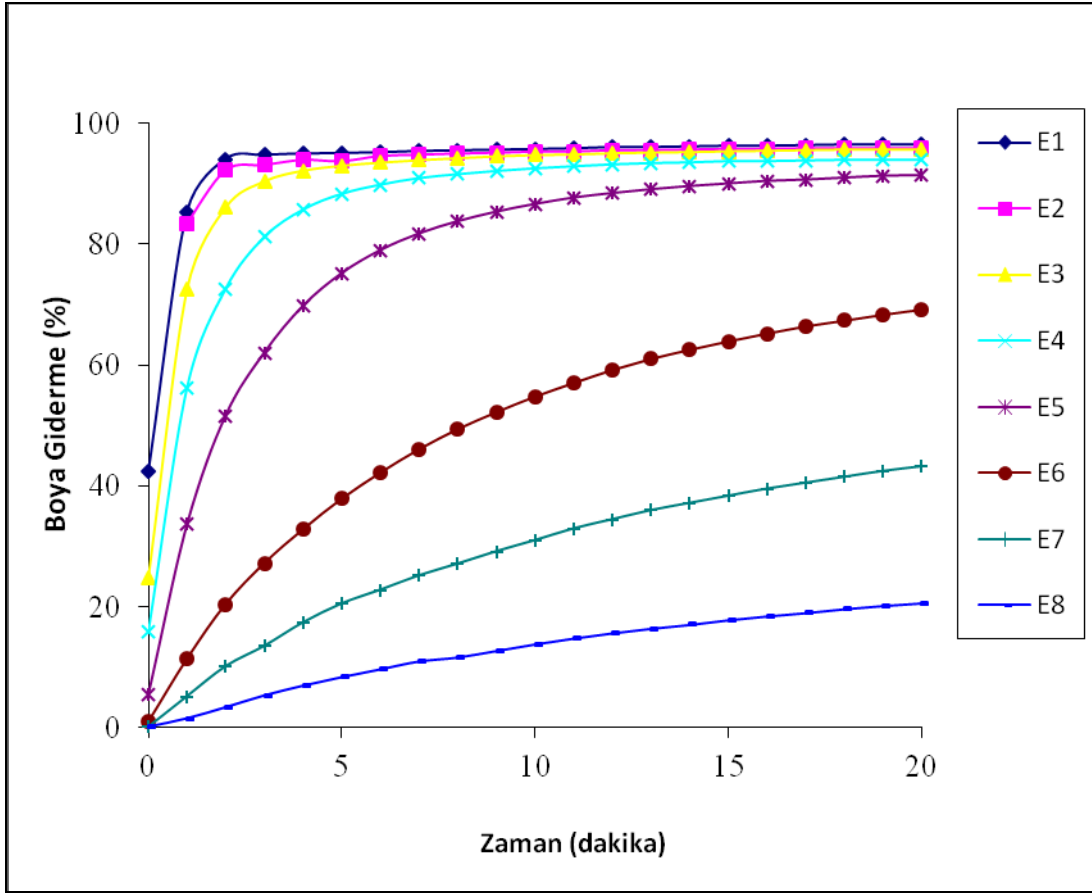
Horseradish Peroksidaz enziminin pH: 5,0'te optimum aktivite gösterdiği görülmektedir [54], [58].

9.2.2 HRP Enzimi ile RB 19 Boyasının Giderilmesine Enzim Konsantrasyonunun Etkisi İncelenmesi

RB 19 boyasının farklı enzim konsantrasyonlarında (0,0825 µg/mL, 0,165 µg/mL, 0,330 µg/mL, 0,825 µg/mL, 1,65 µg/mL, 3,3 µg/mL, 6,6 µg/mL, 13,2 µg/mL) giderilmesi 110 mg/L boya ve 3,0 mM H₂O₂ konsantrasyonunda, pH: 5,0 ve 30 °C'de gerçekleştirildi.

Çizelge 9. 6 RB 19 boyasının (110 mg L⁻¹) pH: 5,0 ve 30 °C'de farklı enzim konsantrasyonlarında % boya giderme değerleri

	Boya Giderme (%)							
Zaman (dakika)	13,2 µg/mL Enzim (E1)	6,6 µg/mL Enzim (E2)	3,3 µg/mL Enzim (E3)	1,65 µg/mL Enzim (E4)	0,825 µg/mL Enzim (E5)	0,330 µg/mL Enzim (E6)	0,165 µg/mL Enzim (E7)	0,0825 µg/mL Enzim (E8)
0	42,47	28,13	24,87	15,91	5,41	0,97	0,11	0,11
1	85,38	83,32	72,55	56,28	33,62	11,41	5,18	1,52
2	94,09	92,19	86,07	72,62	51,64	20,45	10,15	3,37
3	94,73	93,05	90,4	81,17	62,04	27,23	13,5	5,33
4	94,95	93,9	92,16	85,71	69,78	32,83	17,39	6,96
5	95,05	93,69	92,98	88,31	75,19	37,89	20,52	8,38
6	95,16	94,55	93,5	89,83	79	42,2	22,79	9,68
7	95,38	94,76	93,91	90,91	81,76	46,07	25,16	10,99
8	95,48	94,97	94,22	91,56	83,78	49,41	27,11	11,64
9	95,59	95,08	94,53	92,1	85,37	52,21	29,16	12,73
10	95,7	95,29	94,74	92,53	86,64	54,79	30,99	13,82
11	95,81	95,29	94,84	92,86	87,7	57,05	32,94	14,8
12	96,02	95,51	95,05	93,18	88,44	59,2	34,45	15,67
13	96,02	95,51	95,15	93,4	89,08	61,03	35,96	16,43
14	96,13	95,61	95,25	93,51	89,61	62,54	37,15	17,08
15	96,24	95,72	95,36	93,72	90,03	63,94	38,34	17,85
16	96,24	95,72	95,46	93,72	90,46	65,23	39,52	18,5
17	96,34	95,83	95,56	93,83	90,67	66,42	40,5	19,04
18	96,45	95,83	95,67	93,94	90,99	67,38	41,47	19,7
19	96,45	95,83	95,67	93,94	91,3	68,35	42,44	20,24
20	96,45	95,83	95,67	93,94	91,41	69,21	43,2	20,67



Şekil 9. 8 RB 19 boyasının (110 mg L^{-1}) pH: 5,0 ve 30°C 'de farklı enzim konsantrasyonlarında ($13,2 \text{ µg/mL}$ (E1), $6,6 \text{ µg/mL}$ (E2), $3,3 \text{ µg/mL}$ (E3), $1,65 \text{ µg/mL}$ (E4), $0,825 \text{ µg/mL}$ (E5), $0,330 \text{ µg/mL}$ (E6), $0,165 \text{ µg/mL}$ (E7), $0,0825 \text{ µg/mL}$ (E8))% boya giderme değerleri

Horseradish Peroksidaz enzimi pahalı bir enzimdir. Atık sulardaki boyaların giderilmesinde HRP enziminin maliyeti enzimatik proseslerin kullanımında kısıtlayıcı olabilmektedir. Bu nedenle, en yüksek boya giderme değerine en düşük enzim konsantrasyonunda ulaşmak gerekmektedir [48], [54]. Optimum enzim konsantrasyonunun belirlenmesi bu nedenle önemlidir. 110 mg/L konsantrasyondaki boya çözeltisine enzim ve başlatıcısı (hidrojen peroksit) ilave edildikten sonra artan enzim konsantrasyonları (0.0825 µg/mL , 0.165 µg/mL , 0.330 µg/mL , 0.825 µg/mL , 1.65 µg/mL , 3.3 µg/mL , 6.6 µg/mL , 13.2 µg/mL) için 1. dakikada elde edilen boya giderme değerleri sırası ile % 2, % 5, % 11, % 34, % 56, % 73, % 83 ve % 85 sonuçları elde edilmiştir. 5. dakikada ise artan enzim konsantrasyonuna göre % 8, % 21, % 38, % 75, % 88, % 93, % 94 ve % 95 boya giderme değerleri elde edilmiştir. 10. Dakikda ise artan

enzim konsantrasyonlarına göre % 14, % 31, % 55, % 87, % 93, % 95, % 95 ve % 96; 20 dakika da ise; % 21, % 43, % 69, % 91, % 94, % 96, % 96 ve % 97 boya giderme değerlerine ulaşılmıştır. Şekil 9.8’de ve Çizelge 9.6’da görüldüğü gibi enzim konsantrasyonunun artması ile boya gidere yüzdeleri artmaktadır. İlk 10 dakika içerisinde özellikle düşük enzim konsantrasyonları için enzim konsantrasyonunun artması ile boya giderme değerleri artmaktadır. Bununla birlikte, özellikle yüksek enzim konsantrasyonlarında boyanın enzim ile etkileştiği sürenin artması ile boya giderme değerleri birbirine yaklaşmıştır. 0,825 µg/mL enzim konsantrasyonundan itibaren 20. dakika sonunda % 90’ın üzerinde boya giderme değerlerine ulaşmakla birlikte % boya giderme değerleri yüksek enzim konsantrasyonlarında birbirine yaklaşmıştır. Bu deney sonuçlarından faydalanarak uygulamalar için 20. dakikada % 90’ın üzerinde boya giderme değerine ulaşması nedeniyle 0,825 µg/mL enzim konsantrasyonunun uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

Reaktif Blue 19 boyasının farklı koşullarda giderilmesinde enzim konsantrasyonunu sabit tuttuğumuz çalışmalarda boya gidermenin daha kısa sürede gerçekleşmesi amacıyla 3,3 µg/mL enzim konsantrasyonunda 5. dakikada % 90’ın üzerinde boya giderme değeri elde edildiğinden 3,3 µg/mL enzim konsantrasyonu kullanılmıştır.

Ayrıca, Ulson de Souza ve ark. yüksek enzim konsantrasyonlarının boya giderme çalışmaları için boya giderme değerlerine etki etmediğini vurgulamışlardır [54].

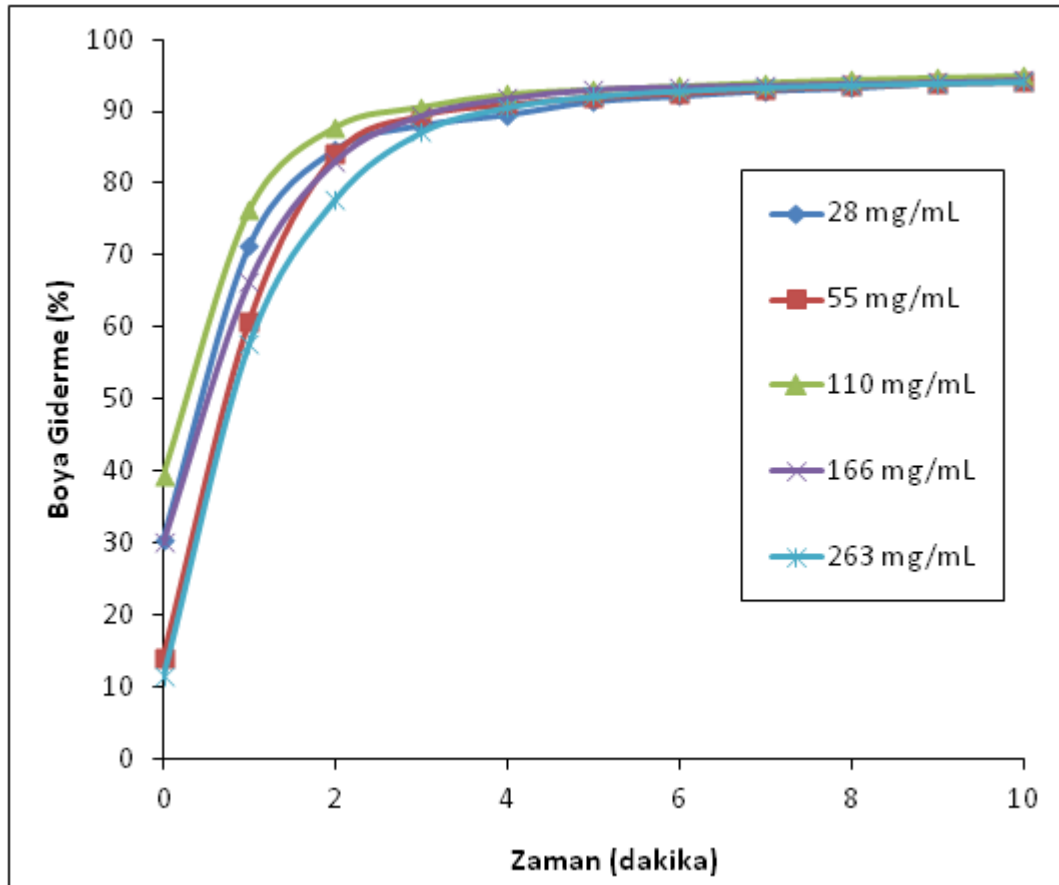
9.2.3 HRP Enzimi ile RB 19 Boyasının Giderilmesine Başlangıç Boya Konsantrasyonunun Etkisinin İncelenmesi

RB 19 boyasının farklı konsantrasyonlarında (28, 55, 110, 166, 263 mg/L) giderilmesi 0,0033 mg/mL (3,3 µg/mL) enzim ve 3,0 mM H₂O₂ konsantrasyonlarında pH: 5,0 ve 30 °C’de gerçekleştirildi. Boya giderme sonuçları Çizelge 9.7’de gösterilmektedir. 1. dakikada boyanın enzim ile reaksiyonundan sonra 28, 55, 110, 166, 263 mg/L boya konsantrasyonları için sırası ile % 71, % 61, % 76, % 66 ve % 56 boya giderme değerleri elde edildi. 5. dakikada ise artan boya konsantrasyonlarında boya giderme değerleri sırası ile % 91, % 92, % 93, % 93 ve % 92 olarak hesaplanmıştır. Boyanın enzim ile muamele süresi uzadıkça boya giderme değerlerinin arttığı ve birbirine yaklaştığı

görülmektedir. 10. dakikada ise artan boya konsantrasyonlarında boya giderme değerleri sırası ile % 94, % 94, % 95, % 94 ve % 94'e ulaşmıştır.

Çizelge 9. 7 RB 19 boyasının HRP enzimi ile farklı RB 19 boya konsantrasyonlarında 10 dakika süresince pH: 5,0 ve 30 °C'de % giderme değerleri

Zaman (dakika)	Boya Giderme (%)				
	RB 19 28 mg/L	RB 19 55 mg/L	RB 19 110 mg/L	RB 19 166 mg/L	RB 19 263 mg/L
0	30,48	14,01	39,36	30,04	11,43
1	71,38	60,89	76,32	66,33	57,77
2	84,76	84,05	87,81	83,13	77,86
3	88,10	89,49	90,61	89,45	87,18
4	89,59	91,05	92,41	91,85	90,63
5	91,45	92,02	93,01	93,09	92,16
6	92,19	92,61	93,51	93,45	92,92
7	92,94	93,19	94,01	93,67	93,40
8	93,31	93,58	94,41	93,89	93,74
9	94,05	93,97	94,71	94,11	93,97
10	94,42	94,16	94,91	94,40	94,17



Şekil 9. 9 RB 19 boyasının HRP enzimi ile farklı RB 19 boya konsantrasyonlarında 10 dakika süresince pH: 5,0 ve 30 °C'de 594 nm'deki % giderme değerleri

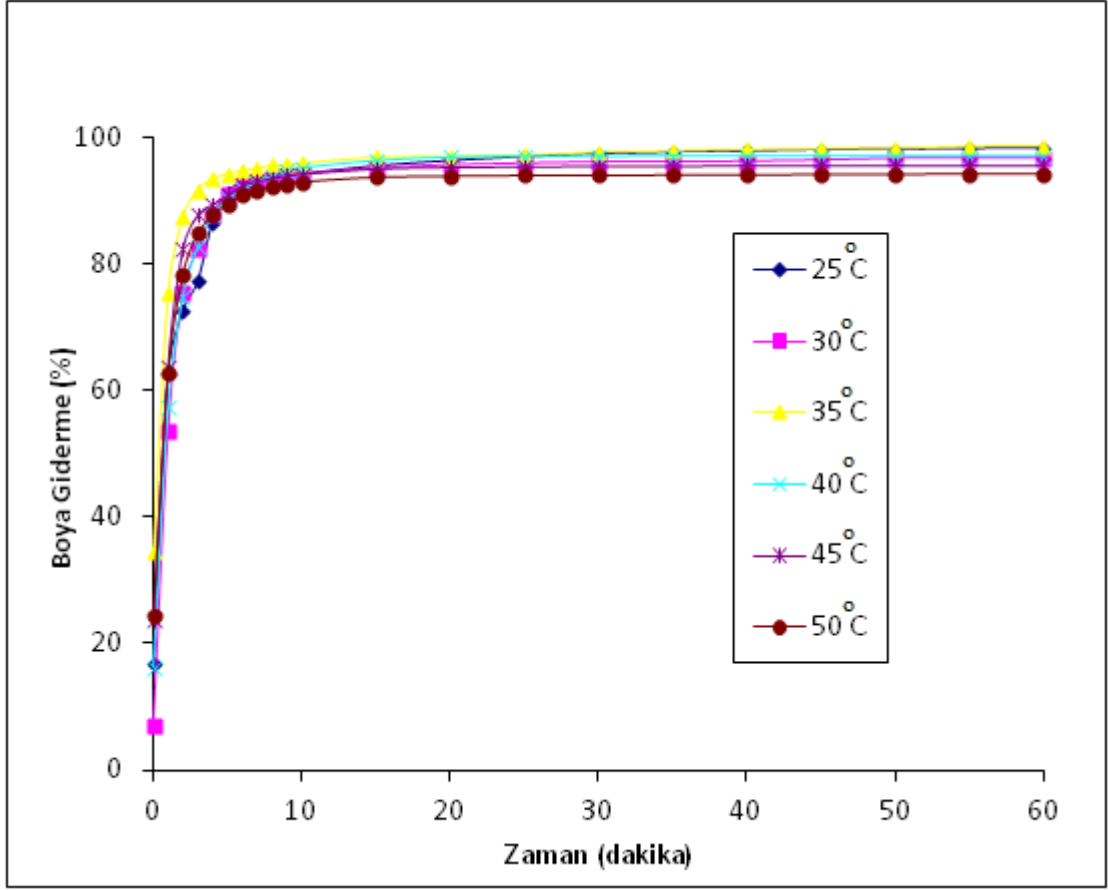
Şekil 9,9'da görüldüğü gibi boya konsantrasyonunun artmasına rağmen boya giderme etkisi devam etmektedir. pH: 5,0 ve 30 °C'de 10 dakika gibi kısa bir sürede 28-263 mg/L konsantrasyonları aralığında % 94 boya giderme yüzdesine ulaşılmıştır.

9.2.4 HRP Enzimi ile RB 19 Boyasının Giderilmesine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi

pH: 5,0 ve farklı sıcaklıklarda 60 dakika boyunca RB 19 boyası giderildi. Boya giderme yüzdeleri 25-50 °C arasındaki sıcaklıklarda benzer sonuçlar vermektedir. Sonuçlar Çizelge 9.8'te gösterilmiştir.

Çizelge 9. 8 pH: 5,0 ve farklı sıcaklıklarda (25-50 °C) HRP enzimi ile RB 19 boyasının (110 mg/L) % giderilme değerleri

	Boya Giderme (%)					
Zaman (dakika)	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C	45 °C	50 °C
0	16,82	7,09	34,42	16,22	23,68	24,49
1	62,87	53,64	75,42	57,29	63,81	62,71
2	72,52	75,48	87,38	74,95	82,48	78,39
3	77,3	82,38	91,74	82,63	87,76	84,79
4	86,67	87,93	93,41	87,81	89,45	87,66
5	91,36	90,9	94,25	90,31	90,88	89,52
6	92,65	92,24	94,71	91,75	92,4	90,82
7	93,29	93,01	95,18	92,99	93,12	91,65
8	93,57	93,58	95,55	93,95	93,57	92,21
9	93,75	93,87	95,73	94,63	94,01	92,67
10	94,12	94,16	95,92	95,2	94,28	92,95
15	95,4	95,11	96,85	96,35	95,08	93,69
20	96,23	95,59	97,03	96,93	95,35	93,88
25	96,88	95,88	97,22	97,02	95,44	93,97
30	97,33	96,07	97,68	97,02	95,53	93,97
35	97,61	96,07	97,87	97,12	95,53	94,06
40	97,79	96,17	98,14	97,12	95,62	94,06
45	97,98	96,36	98,24	97,12	95,62	94,16
50	98,07	96,65	98,3	97,12	95,62	94,16
55	98,16	96,65	98,61	97,12	95,62	94,25
60	98,25	96,65	98,7	97,12	95,62	94,25



Şekil 9. 10 pH: 5,0 ve farklı sıcaklıklarda (25-50 °C) HRP enzimi ile RB 19 boyasının (110 mg/L) % giderilmesi

Boya giderme yüzdeleri 25-50 °C arasındaki sıcaklıklarda birbirine yakın boyadır giderme değerleri vermektedir. 60 dakika bekleme süresi sonunda 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C ve 50 °C sıcaklıkları için sırası ile % 98, % 97, % 99, % 97, % 96 ve % 94 boyadır giderme değerleri elde edilmiştir. Çalışılan bütün sıcaklıklar için elde edilen boyadır giderme değerleri birbirine yakın olmakla birlikte en yüksek boyadır giderme değerine 35 °C ulaşılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucu pH: 5,0 ve 35 °C'de 5. ve 60. dakika bekleme sürelerinde sırasıyla % 94 ve % 99 boyadır giderme değerleri elde edilmiştir. Şekil 9.10'da görüldüğü gibi istenen sıcaklıklarda boyadır giderme işleminin gerçekleşebileceğini göstermektedir.

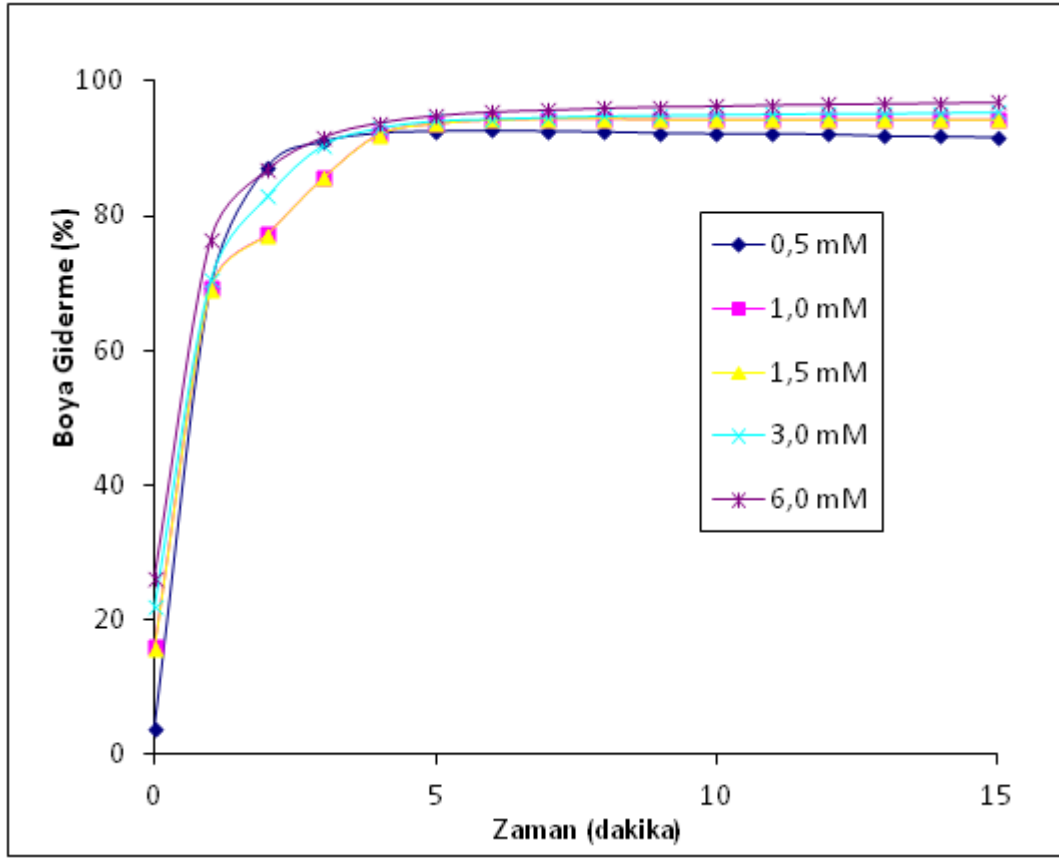
9.2.5 HRP Enzimi ile RB 19 Boyasının Giderilmesine Başlatıcı (H_2O_2) Konsantrasyonunun Etkisinin İncelenmesi

RB 19 boyası için H_2O_2 'in farklı konsantrasyonlarının (0,5 mM, 1,0 mM, 1,5 mM, 3,0 mM ve 6,0 mM) boya gidermeye olan etkisi incelendi. Deney sonuçları Çizelge 9,9'da gösterilmiştir.

Çizelge 9. 9 RB 19 boyasının HRP enzimi ile farklı H_2O_2 (B) başlatıcısı konsantrasyonlarında 15 dakika süresince pH: 5,0 ve 30 °C'de % giderme

Zaman (dakika)	Boya Giderme (%)				
	0,5 mM	1,0 Mm	1,5 mM	3,0 mM	6,0 mM
0	3,83	15,83	15,59	21,88	26,11
1	69,43	69,18	69,09	70,46	76,44
2	87,23	77,19	77,12	82,86	86,75
3	91,06	85,57	85,53	90,52	91,67
4	92,34	92,09	92,06	93,07	93,85
5	92,61	93,67	93,65	94,17	94,89
6	92,7	94,23	94,21	94,44	95,46
7	92,61	94,41	94,4	94,71	95,74
8	92,52	94,41	94,4	94,9	96,03
9	92,34	94,32	94,3	94,99	96,22
10	92,24	94,23	94,21	95,08	96,31
11	92,24	94,23	94,21	95,17	96,5
12	92,15	94,23	94,21	95,26	96,59
13	91,88	94,23	94,21	95,26	96,69
14	91,79	94,23	94,21	95,35	96,78
15	91,7	94,23	94,21	95,44	96,88

pH: 5,0 ve 30 °C'de 110 mg/L konsantrasyondaki Reaktif Blue 19 boyasına 3,3 µg/mL enzim ilave edildikten sonra reaksiyonun başlatılması için ilave edilen H_2O_2 'in farklı konsantrasyonlarının (0,5 mM, 1,0 mM, 1,5 mM, 3,0 mM ve 6,0 mM) boya gidermeye olan etkisi incelendi. 15 dakika bekleme süresi sonrasında artan Hidrojen Peroksit konsantrasyonları için sırası ile % 92, % 94, % 94, % 95 ve % 97 boya giderme değerleri elde edilmiştir. Şekil 9.11'de görüldüğü üzere 0,5 mM Hidrojen Peroksit başlatıcısının enzimin çalışması için yeterli olduğu görülmektedir.



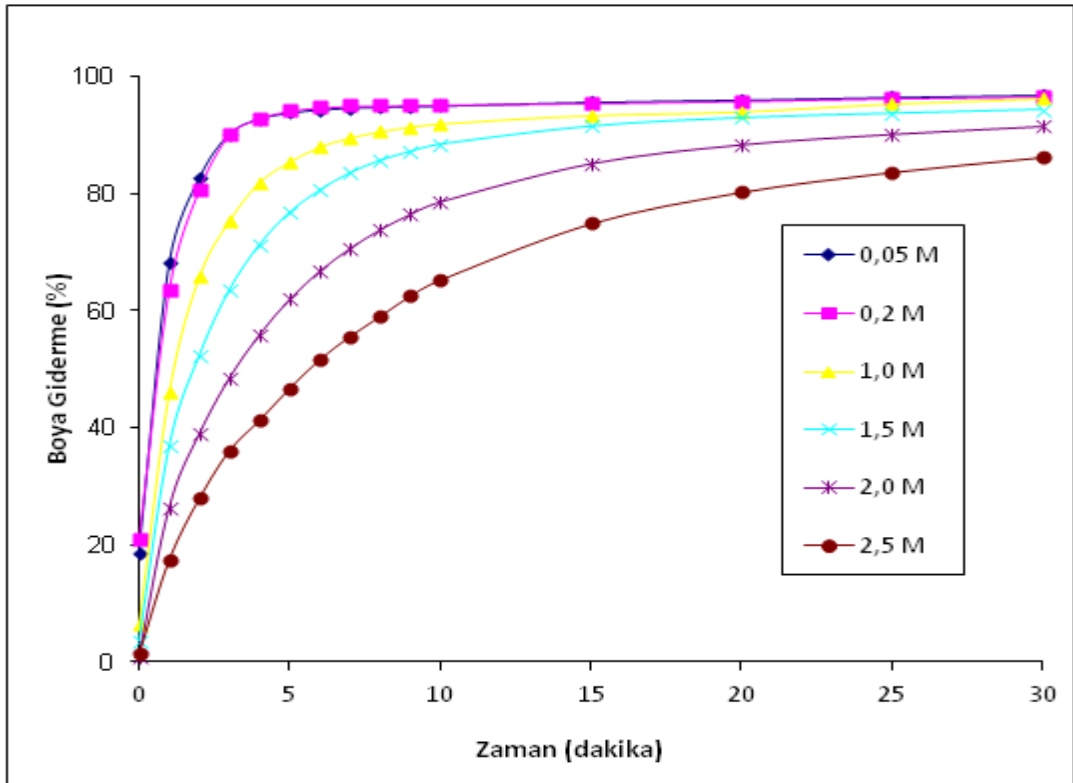
Şekil 9. 11 HRP enzimi ile RB 19 boyasının farklı H_2O_2 başlatıcısı konsantrasyonlarında 15 dakika süresince pH: 5,0 ve 30 °C’de % giderme

9.2.6 HRP Enzimi ile RB 19 Boyasının Giderilmesine Üre Konsantrasyonunun Etkisinin İncelenmesi

6,0 M konsantrasyonunda üre stok çözeltisi hazırlandı. pH: 5,0 ve 30 °C’de ürenin artan konsantrasyonlarında boya giderme yüzdesi düşmektedir. Boya giderme sonuçları Çizelge 9.10’da gösterilmektedir. 0,05 M, 0,2 M, 1.0 M, 1.5 M, 2.0 M ve 2.5 M üre içeren Reaktif Blue 19 boya çözeltileri hazırlandı. pH: 5,0 ve 30 °C’de 110 mg/L konsantrasyondaki Reaktif Blue 19 boyasına 3,3 µg/mL Horseradish Peroksidaz enzimi ile 30 dakika süresince boya gidermeye üre etkisi incelendi. 30 dakika sonunda artan üre konsantrasyonları için sırası ile % 97, % 97, % 96, % 94, % 91 ve % 86 boya giderme değerleri elde edilmiştir. Sonuçlardan da anlaşıldığı üzere düşük üre konsantrasyonu içeren Reaktif Blue 19 boya çözeltisi daha yüksek yüzdeler ile boya giderilirken, boya çözeltisindeki üre konsantrasyonunun artması ile boya giderme değerlerinde azalma gözlenmektedir (Çizelge 9.10).

Çizelge 9. 10 RB 19 boyasının HRP enzimi ile farklı üre konsantrasyonlarında 30 dakika süresince pH: 5 ve 30 °C'de % giderme

Zaman (dakika)	Boya Giderme (%)					
	0,05 M	0,20 M	1,0 M	1,5 M	2,0 M	2,5 M
0	18,66	20,90	6,45	3,55	0,90	1,36
1	68,11	63,54	45,93	36,86	26,37	17,46
2	82,63	80,60	65,71	52,31	38,92	27,94
3	90,17	89,97	75,29	63,50	48,43	36,12
4	92,74	92,78	81,83	71,23	55,87	41,31
5	93,75	94,10	85,32	76,73	61,88	46,76
9	94,85	95,03	91,32	87,12	76,41	62,52
10	94,94	95,13	91,85	88,37	78,57	65,25
15	95,59	95,41	93,29	91,47	85,11	74,87
20	95,96	95,78	93,91	92,90	88,34	80,24
25	96,42	96,25	95,26	93,69	90,13	83,65
30	96,78	96,53	96,15	94,32	91,48	86,20



Şekil 9. 12 RB 19 boyasının HRP enzimi ile farklı üre konsantrasyonlarında 30 dak. süresince pH: 5,0 ve 30 °C'de % giderme

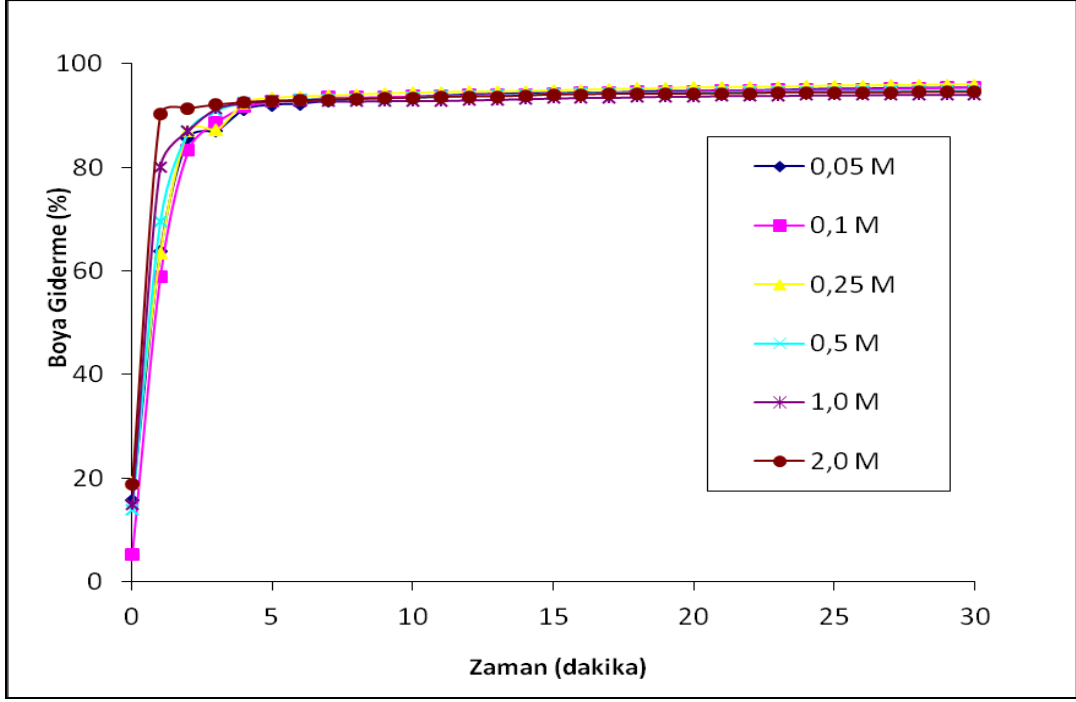
Reaktif Blue 19 boyası içerindeki düşük üre konsantrasyonlarında (0,05 M ve 0,2 M) boya giderme değerleri yüksektir. Bununlabirlikte, re konsantrasyonunun artması ile boya giderme verimin azaldığı ekil 9.12’de gösterilmektedir.

9.2.7 HRP Enzimi ile RB 19 Boyasının Giderilmesine NaCl Konsantrasyonunun Etkisinin İncelenmesi

Boyama işlemleri sırasında tuz kullanıldığından atık suda tuz varlığının enzimin boya giderme üzerine etkisi olup olmadığı incelendi. Tuz konsantrasyonunun artması ile ilk birkaç dakikada boya giderme %’si 80-90 lara ulaşmasına rağmen, daha uzun sürelerde boya giderme yüzdesi üzerinde bir değişiklik gözlenmedi. 0,05 M, 0,1 M, 0,25 M, 0,5 M, 1,0 M ve 2,0 M NaCl içeren Reaktif Blue 19 (110 mg/L) zeltileri hazırlandı. pH: 5,0 ve 30 °C’de 110 mg/L konsantrasyondaki Reaktif Blue 19 boyasına 3,3 µg/mL Horseradish Peroksidaz enzimi ile 30 dakika süresince boya gidermeye üre etkisi incelendi. Tuz içeren boya çözeltisi 30 dakika boyunca Horseradish Peroksidaz enzimi ile giderildi. 30 dakika sonunda artan tuz konsantrasyonlarına göre sırası ile % 95, % 96, % 96, %95, % 94 ve % 95 boya giderme sonuçları elde edildi. Bu sonuçlara göre tuzun boya gidermeye herhangi bir olumsuz etkisi olmadığı sonucuna varıldı (ekil 9.13).

Çizelge 9. 11 HRP enzimi ile RB 19 boyasının farklı NaCl konsantrasyonlarında pH: 5,0 ve 30 °C’de % giderilmesi

Zaman (dakika)	Boya Giderme (%)					
	0,05 M	0,1 M	0,25 M	0,5 M	1,0 M	2,0 M
0	15,80	5,22	19,31	13,87	14,86	18,91
1	63,76	58,82	63,45	69,60	80,14	90,23
2	85,52	83,35	87,01	86,94	87,04	91,35
3	87,07	88,68	87,20	90,98	91,32	92,09
4	91,16	91,68	92,41	92,49	92,39	92,58
5	92,04	92,79	93,33	92,83	92,75	92,83
6	92,27	93,01	93,68	93,18	92,87	92,95
7	92,82	93,56	93,79	93,18	92,75	93,08
10	93,59	93,78	94,37	93,53	92,87	93,45
15	94,25	94,23	94,83	94,22	93,34	94,07
20	94,70	94,67	95,40	94,45	93,70	94,19
25	95,14	95,12	95,75	94,68	93,94	94,44
30	95,36	95,56	95,98	94,91	94,05	94,56



Şekil 9. 13 HRP enzimi ile RB 19 boyasının farklı NaCl konsantrasyonlarında pH: 5,0 ve 30 °C'de % giderilmesi

9.3 Asit Black 1 Boyasının ve HRP Enzimi ile Boyanın Giderilmesinin Floresans Spektroskopisi ile İncelenmesi

Floresans çalışmasında üç farklı pH (5,0, 6,0 ve 7,0)'da Asit Black 1 boyasının farklı konsantrasyonlarında ve bu boya çözeltileri Horseradish Peroksidaz enzimi ile muamele edildikten sonra farklı sürelerde 320 nm'de uyarılarak maksimum floresans şiddetleri okundu. Maksimum floresans şiddetinin gözlendiği maksimum dalga boyları kaydedildi.

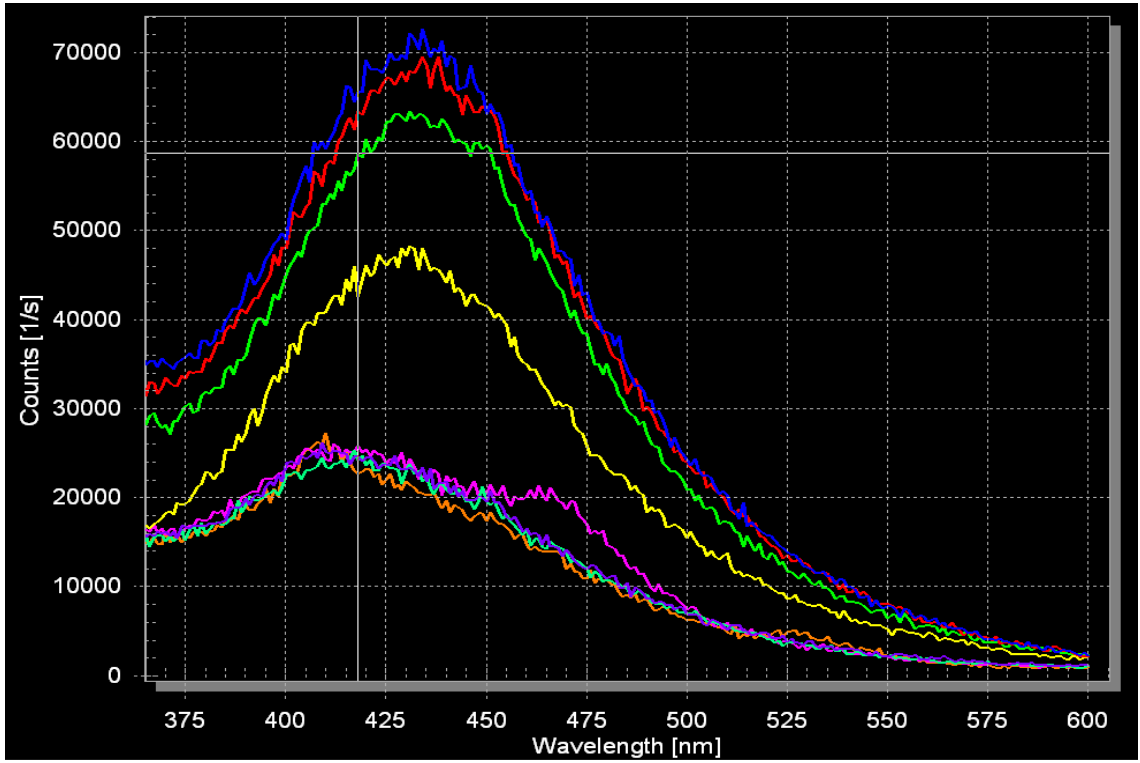
Maksimum floresans şiddeti değerlerine ise 4. gün yapılan ölçümlerde ulaşılmıştır. Boyanın enzim ile muamele edildikten sonra zamanla şiddetinin artması boyanın parçalandıktan sonra parçalanma ürünlerinin suyla daha kolay bir şekilde etkileşebildiği ve şiddetin yüksek çıktığı sonucuna varılmıştır.

Çizelge 9. 12 pH:5,0'te AB 1 boyasının farklı konsantrasyonlarda Horseradish Peroksidaz enzimi ile giderilmesinin florresans şiddetlerinin ölçülmesi

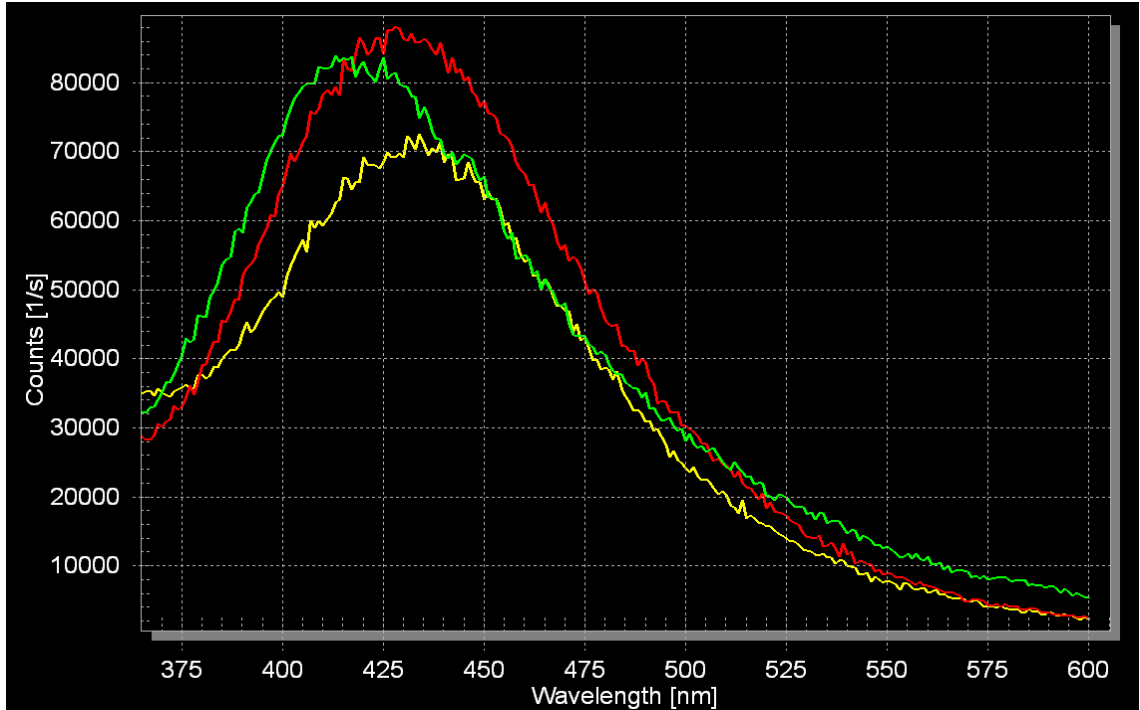
Boya Konsantrasyonu (mg/mL)	Zaman (dak/gün)	$\lambda_{\max}$	$I_{\max}$
0,005 mg/mL	0.dak.	407	15.089
	2.dak.	405	15.120
	5.dak.	409	15.745
	1.gün	423	34725
	2. gün	423	54.626
	3. gün	424	70.458
	4. gün	423	92.390
0,01 mg/mL	0.dak.	410	17.349
	2.dak.	410	16.219
	5.dak.	410	16.552
	1. gün	426	34.898
	2. gün	427	53.484
	3. gün	427	69.856
	4. gün	427	90.676
0,02 mg/mL	0. dak.	412	7.304
	2. dak.	412	7.607
	5. dak.	417	21.845
	1. gün	428	40.349
	2. gün	428	51.235
	3. gün	429	68.397
	4. gün	429	87897
0,04 mg/mL	0.dak.	417	17884
	2. dak.	417	19035
	5. dak.	417	21582
	1. gün	425	42.920
	2. gün	425	65.788
	3. gün	425	75361
	4. gün	425	80.680
0,08 mg/mL	0. dak.	420	5.718
	2. dak.	434	7.545
	5. dak.	432	8.699
	1.gün	438	9.463
	2. gün	438	23.445
	3. gün	431	35.896
	4. gün	429	44.720

Çizelge 9. 13 pH: 6,0'da AB 1 boyasının farklı konsantrasyonlarda Horseradish Peroksidaz Enzimi ile giderilmesinin floresans şiddetlerinin ölçülmesi

Boya Konsantrasyonu (mg/mL)	Zaman (dak/gün)	$\lambda_{\max}$	$I_{\max}$
0,005 mg/mL	0.dak.	410	33.167
	2. dak.	410	31.103
	5.dak.	410	29.132
	1.gün	416	47.845
	2.gün	419	68.428
	3. gün	417	77.535
	4.gün	417	83.676
0,01 mg/mL	0.dak.	410	31.550
	2.dak.	410	30.148
	5.dak.	410	28.554
	1.gün	417	52.515
	2.gün	417	75.517
	3.gün	417	86.821
	4.gün	417	100.420
0,02 mg/mL	0.dak.	412	26.027
	2. dak.	417	25.277
	5. dak.	412	25.297
	1.gün	431	48.286
	2.gün	431	63.388
	3. gün	434	69.474
	4. gün	432	72.192
0,04 mg/mL	0.dak.	413	17.419
	2. dak.	413	17.177
	5. dak.	413	17.278
	1.gün	425	49.065
	2.gün	430	79.139
	3.gün	432	83.143
	4. gün	431	87.312
0,08 mg/mL	Başlangıç	414	7.344
	2. dak.	414	7.243
	5.dak.	413	7.826
	1.gün	425	27.295
	2.gün	427	39.000
	3.gün	427	45.048
	4.gün	429	50.030



Şekil 9. 14 Asit Black 1 boyasının (0,02 mg/mL) pH: 6,0 ve farklı bekleme sürelerinde elde edilen Emisyon Floresans spektrumları. Boya (turuncu); enzim ilavesinden sonra; sıfırıncı (mor), 2. dak. (açık yeşil), 5. dak. (açık mavi), 1. gün (sarı), 2. gün (yeşil), 3. gün (kırmızı), 4. gün (mavi).



Şekil 9. 15 Asit Black 1 boyasının (0,02 mg/mL) Horseradish peroksidaz enzimi ile reaksiyonunun 4. günün sonunda ve farklı pH'larda [pH: 5,0 (kırmızı), pH: 6,0 (sarı), pH: 7,0 (yeşil)] elde edilen Emisyon Floresans spektrumları.

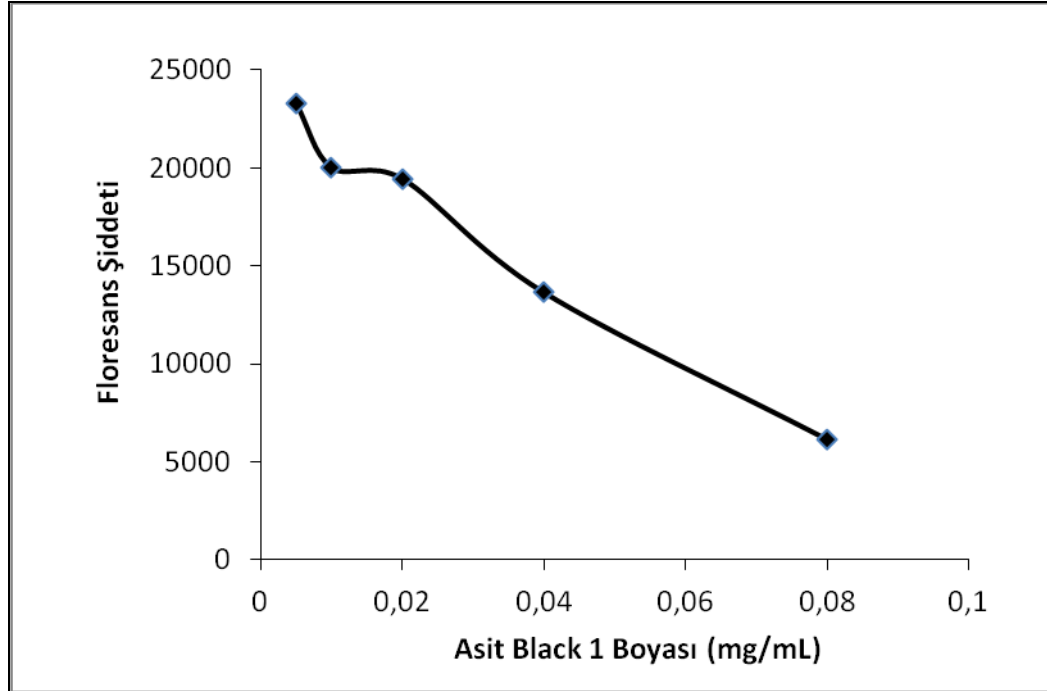
Çizelge 9. 14 pH: 7,0'de AB 1 boyasının farklı konsantrasyonlarda Horseradish Peroksidaz Enzimi ile giderilmesinin floresans şiddetlerinin ölçülmesi

Boya Konsantrasyonu (mg/mL)	Zaman	$\lambda_{\max}$	$I_{\max}$
0,005 mg/mL	0.dak.	407	27.579
	2. dak.	408	26.646
	5.dak.	407	25.885
	1.gün	410	64.412
	2.gün	410	79.347
	3. gün	409	86.120
	4.gün	410	97.264
0,01 mg/mL	0.dak.	407	21.016
	2.dak.	407	20.834
	5.dak.	408	20.096
	1.gün	412	51.868
	2.gün	417	68.687
	3.gün	417	77.900
	4.gün	419	93.619
0,02 mg/mL	0.dak.	408	18.834
	2. dak.	408	19.055
	5. dak.	408	18.681
	1.gün	413	53.945
	2.gün	414	65.260
	3. gün	416	72.255
	4. gün	420	83.039
0,04 mg/mL	0.dak.	412	12.561
	2. dak.	413	13.853
	5. dak.	412	12.048
	1.gün	412	45.488
	2.gün	414	54.716
	3.gün	415	60.610
	4. gün	419	68.189
0,08 mg/mL	0. dak.	417	5.530
	2.dak.	415	5.538
	5. dak.	415	5.919
	1.gün	413	26.413
	2.gün	413	33.900
	3.gün	414	37.038
	4.gün	418	40.804

Çizelge 9. 15 Farklı konsantrasyonlarda ve pH'da Asit Black 1 boyasına ait $\lambda_{\text{maks.}}$ (maksimum dalga boyu) ve maksimum floresans şiddeti ($I_{\text{maks.}}$) değerleri

Boya Konsantrasyonu (mg/mL)	pH: 5,0		pH: 6,0		pH: 7,0	
	$\lambda_{\text{maks.}}$	$I_{\text{maks.}}$	$\lambda_{\text{maks.}}$	$I_{\text{maks.}}$	$\lambda_{\text{maks.}}$	$I_{\text{maks.}}$
0,005	407	14938	410	27751	408	23282
0,01	410	19434	410	26494	407	20005
0,02	410	17193	410	27264	408	19439
0,04	417	14253	414	17561	413	13649
0,08	417	5407	413	7454	414	5530

Çizelge 9.15'te farklı konsantrasyon ve pH'larda Asit Black 1 boyasına ait $\lambda_{\text{maks.}}$ (maksimum dalga boyu) ve maksimum floresans şiddeti ($I_{\text{maks.}}$) değerleri gösterilmektedir.



Şekil 9. 16 pH: 7,0'de Asit Black 1 boyasının farklı konsantrasyonlarında ölçülen floresans değerleri

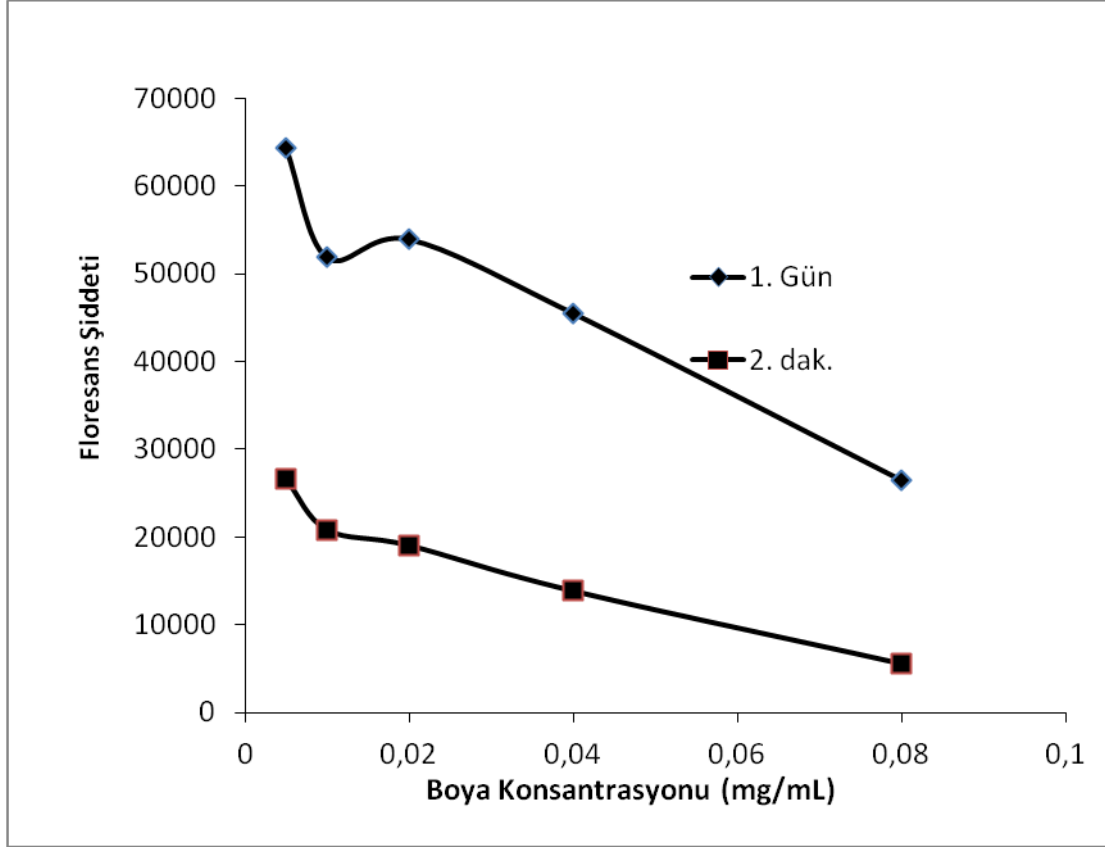
Boya konsantrasyonunun artması ile floresans şiddetlerinde azalma gözlemlendi. Boya konsantrasyonu fazla olduğunda floresans sönümü ("quenching") gerçekleştiği görüldü.

Çizelge 9. 16 30 °C ve 7,0'de farklı konsantrasyonlardaki Asit Black 1 boyasının Horseradish Peroksidaz enzimi ve başlatıcısı iave edildikten sonra 2. dakıda ve 1. günde Floresans Spektrometresi ile incelenmesi

Boya Konsantrasyonu (mg/mL)			$\lambda_{\max}$	$I_{\max}$
0,005 mg/mL	Boya + Enzim + H ₂ O ₂	2.dak.	408	26 646
		1. gün	410	64 412
0,01 mg/mL	Boya + Enzim + H ₂ O ₂	2. dak.	407	20 834
		1. gün	412	51 868
0,02 mg/mL	Boya + Enzim + H ₂ O ₂	2. dak.	408	19 055
		1. gün	413	53 945
0,04 mg/mL	Boya + Enzim + H ₂ O ₂	2. dak.	413	13 853
		1. gün	412	45 488
0,08 mg/mL	Boya + Enzim + H ₂ O ₂	2. dak.	415	5538
		1. gün	413	26413

Farklı parametrelere bağlı olarak boya Floresans Spektroskopisi ile incelendiğinde, boya konsantrasyonun çok küçük değerlerinde floresans şiddetlerinin yaklaşık aynı olduğu ancak daha yüksek boya konsantrasyonlarında ise floresans şiddetinin azaldığı gözlenmiştir. Konsantrasyon artması ile floresans şiddetinin azalması floresans sönümü olarak bilinmektedir.

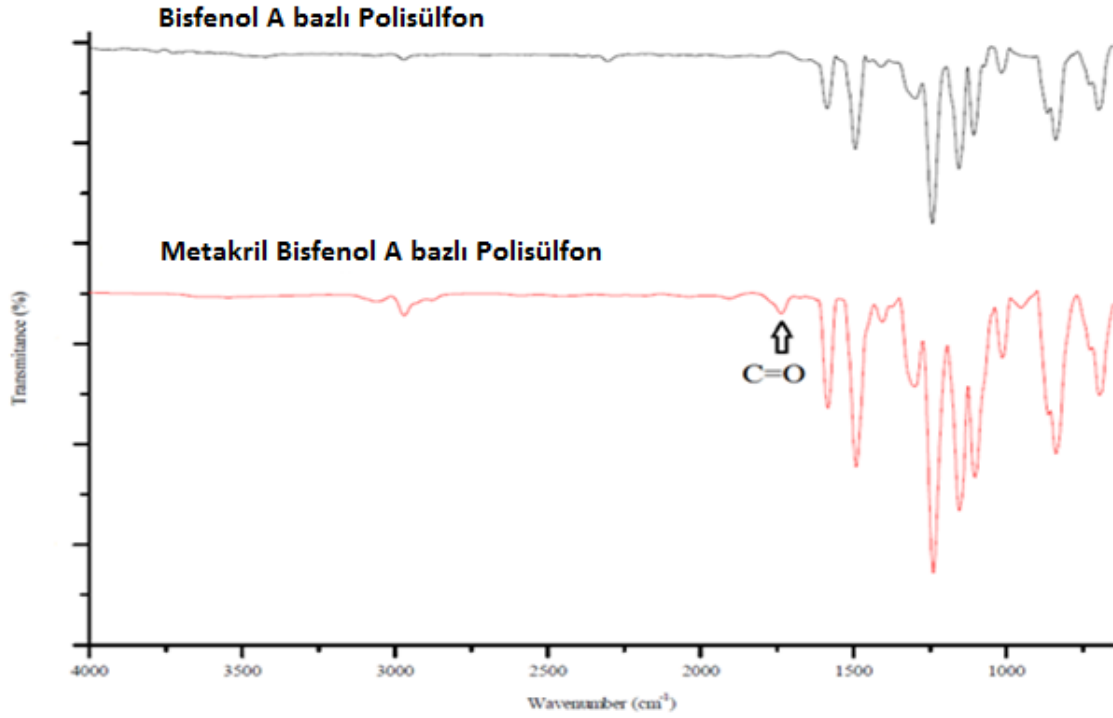
Elde edilen bu floresans sonuçlara dayanarak, zamanın artmasına bağlı olarak enzimin boyayı daha iyi parçaladığı gözlenmiştir. Parçalanmış moleküler yapısı bozulan boya molekülleri sulu ortam ile daha fazla etkileşimde olduğundan dolayı floresans şiddetlerinin arttığı ve dalga boylarının kırmızı bölgeye kaydığı izlenmiştir. Sonuç olarak Horseradish Peroksidaz enzimi Asit Black 1 boya molekülünün yapısını bozmakta, zamana bağlı olarak bu bozunma süreci devam etmektedir ve floresans spektroskopisi ile bu izlenmektedir. Şekil 9.17'de enzim ile muamele edilmiş boyanın floresans şiddetleri enzim ile muamele edilmemiş Şekil 9.16 ile karşılaştırıldığında 1. gün de Şekil 9.17'deki floresans şiddetlerinin Şekil 9.16'ye göre çok yüksek olduğu görülmektedir.



Şekil 9. 17 pH: 7,0 and 30 °C'de farklı konsantrasyonlardaki AB 1 boyasına Horseradish Peroksidaz enzimi ilave edilmesinin 2. dakikasında ve 1. günündeki floresans şiddetleri

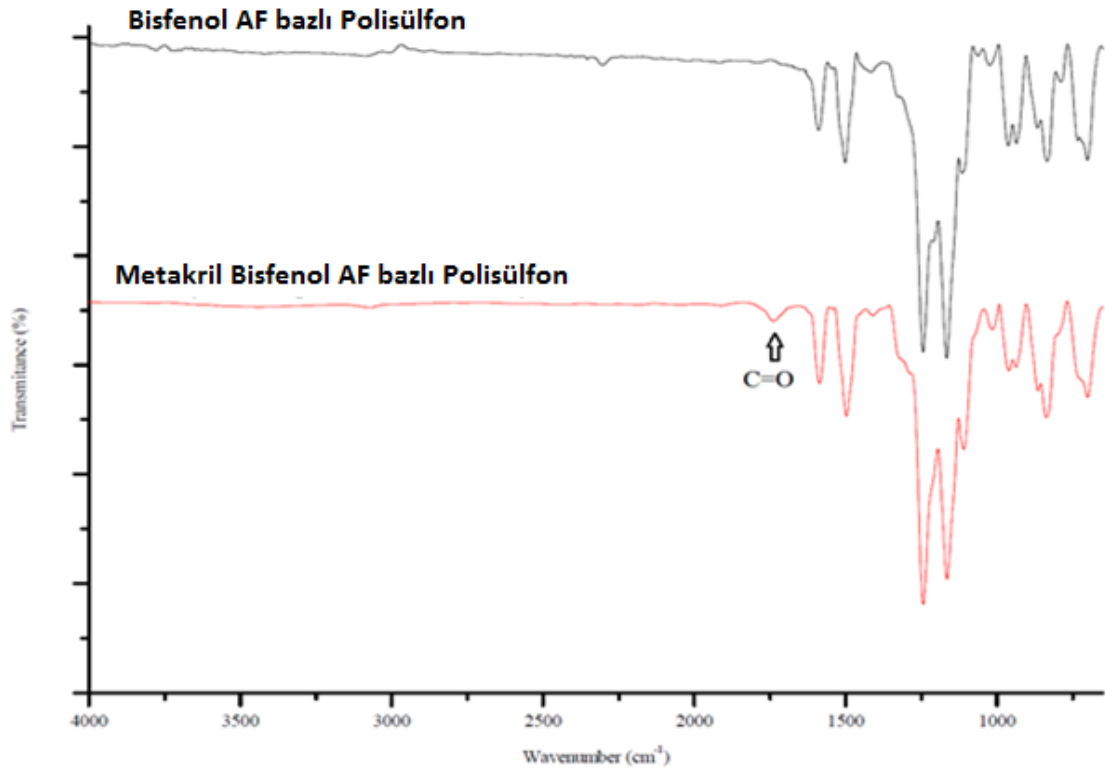
9.4 Horseradish Peroksidaz Enziminin Polimer Destek Üzerine İmmobilizasyonu

9.4.1 İmmobilize Enzimin FT-IR, C₁₃ NMR ve AFM İle Karakterizasyonu



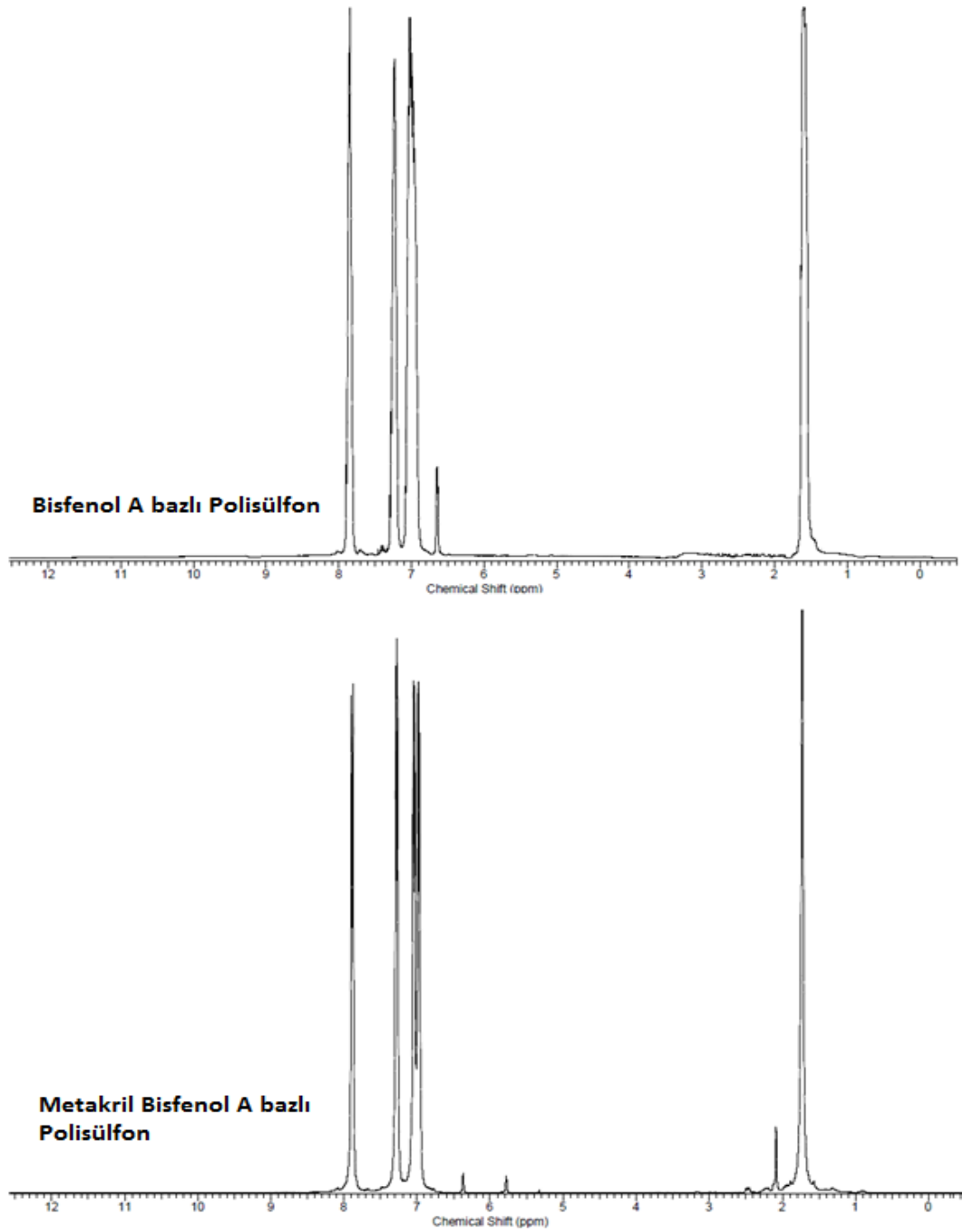
Şekil 9. 18 Bisfenol A bazlı Polisülfon ve metakril Bisfenol A bazlı Polisülfon polimerlerinin ATR-FTIR spektrumları

Metakrilat ile modifiye edilmiş Bisfenol A bazlı polisülfon polimerine ait FT-IR spektrumu incelendiğinde metakrilat ile modifiye edilmemiş Bisfenol A bazlı polisülfon polimerine ait spektrumda gözlenmeyen bir bant görülmektedir. 1735 cm⁻¹'de gözlenen bu bant metakrilatlanma reaksiyonu sonucu oluşan yeni karbonil ester grubuna aittir ve bu bant polisülfonun metakrillenmesi reaksiyonun başarı ile gerçekleştiğini göstermektedir.



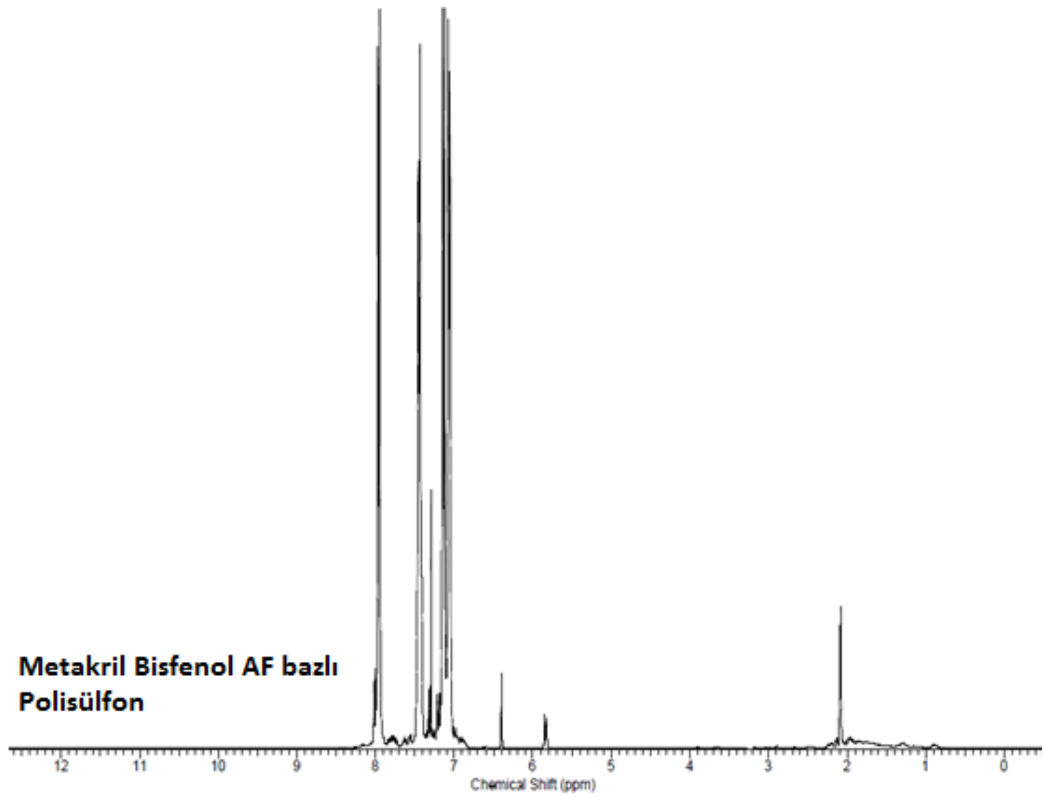
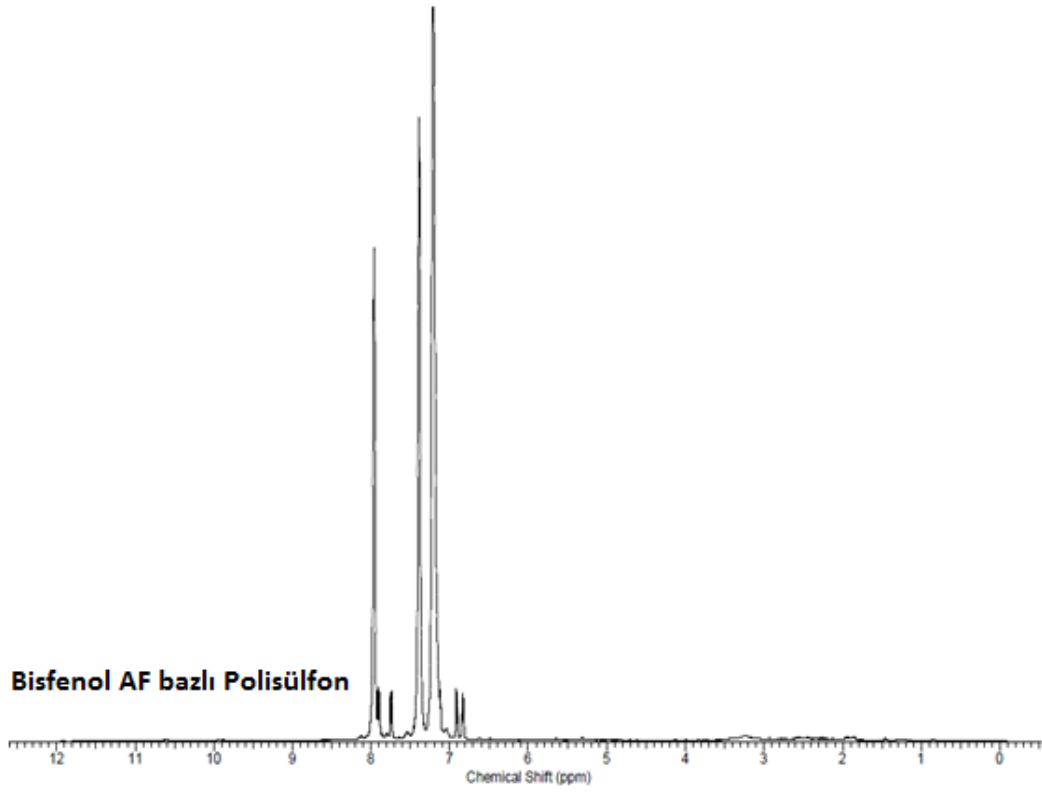
Şekil 9. 19 Bisfenol AF bazlı polisülfon ve metakril Bisfenol AF bazlı polisülfon polimerlerinin ATR-FTIR spektrumları

Metakrilat ile modifiye edilmiş Bisfenol AF bazlı polisülfon polimerine (metakril Bisfenol AF bazlı Polisülfon) ait FT-IR spektrumu incelendiğinde modifiye edilmemiş Bisfenol AF bazlı polisülfon örneğine ait spektrumda bulunmayan bir bant görülmektedir. Metakrillenme reaksiyonu sonucu oluşan yeni karbonil ester grubuna 1735 cm⁻¹'de gözlenen bu bant polisülfonun metakrillenmesi reaksiyonun başarı ile gerçekleştiğini göstermektedir.



Şekil 9. 20 Bisfenol A bazlı polisülfon ve metakril Bisfenol A bazlı polisülfon için ¹H NMR spektrumları

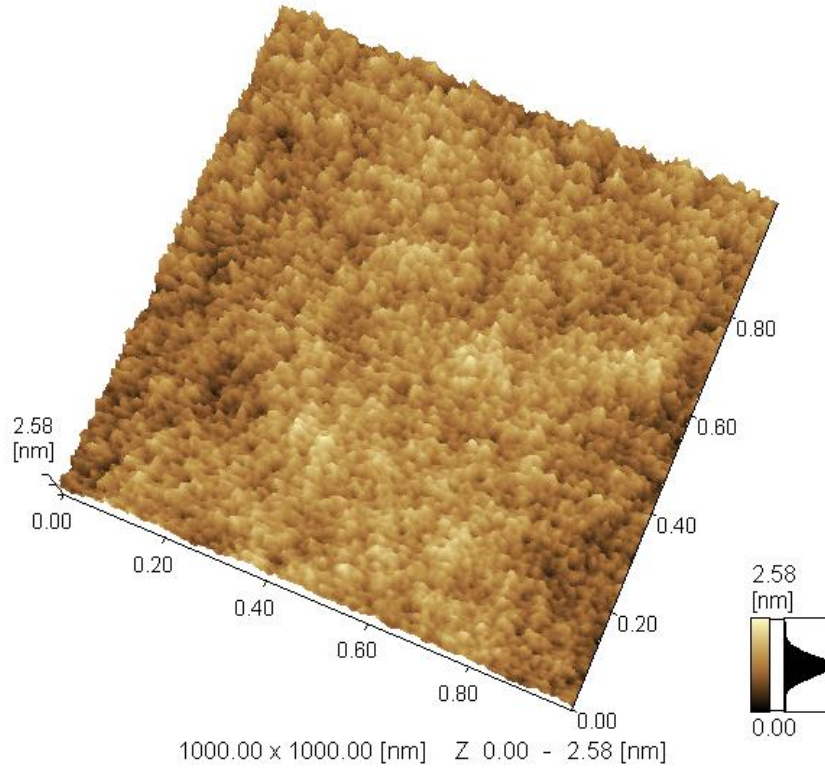
İlk olarak 1,65 ppm'deki pik Bisfenol A daki isopropil grubunun metil grubuna ait. Daha sonra 6,70 ppm ve 7,86 ppm'de görülen pikler poli(eter sülfon)'nun aromatik halkasındaki protonlara karşılık gelmektedir. 5,8 ppm civarında, 6,40 ppm ve metakril Bisfenol A bazlı polisülfon grupları 2,10 ppm'de yeni pik oluşmu metakril grubundaki protonlara aittir.



Şekil 9. 21 Bisfenol AF bazlı polisülfon ve metakril Bisfenol AF bazlı polisülfon için ^1H NMR spektrumları

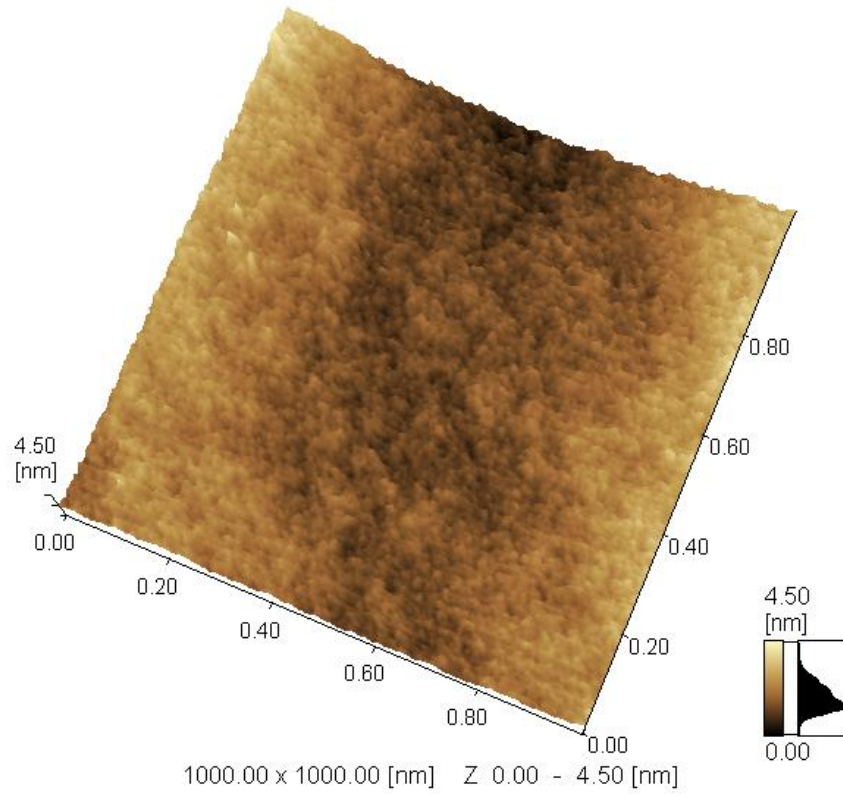
Aynı şekilde 1,65 ppm'deki pik Bisfenol AF'deki isopropil grubunun metil grubuna aittir. Daha sonra 6,70 ppm ve 7,86 ppm'de görülen pikler ise poli(eter sülfon)'nun aromatik

halkasındaki protonlara karşılık gelmektedir. 5,8 ppm civarında, 6,4 ppm ve metakril Bisfenol AF bazlı polisülfon grupları 2,10 ppm’de yeni pik oluşmu metakril grubundaki protonlara aittir. H-NMR yöntemi ile yapılan inceleme ile metakrilleme reaksiyonun Bisfenol A ve Bisfenol AF bazlı polisülfon örneklerinde başarı ile gerçekleştiği bulundu. 5,80 ppm, 6,40 ppm ve 2,10 ppm’de gözlenen yeni pikler metakril grubuna aittir ve bu pikler Bisfenol A ve Bisfenol AF bazlı polisülfonların spektrumlarında bulunmamaktadır.

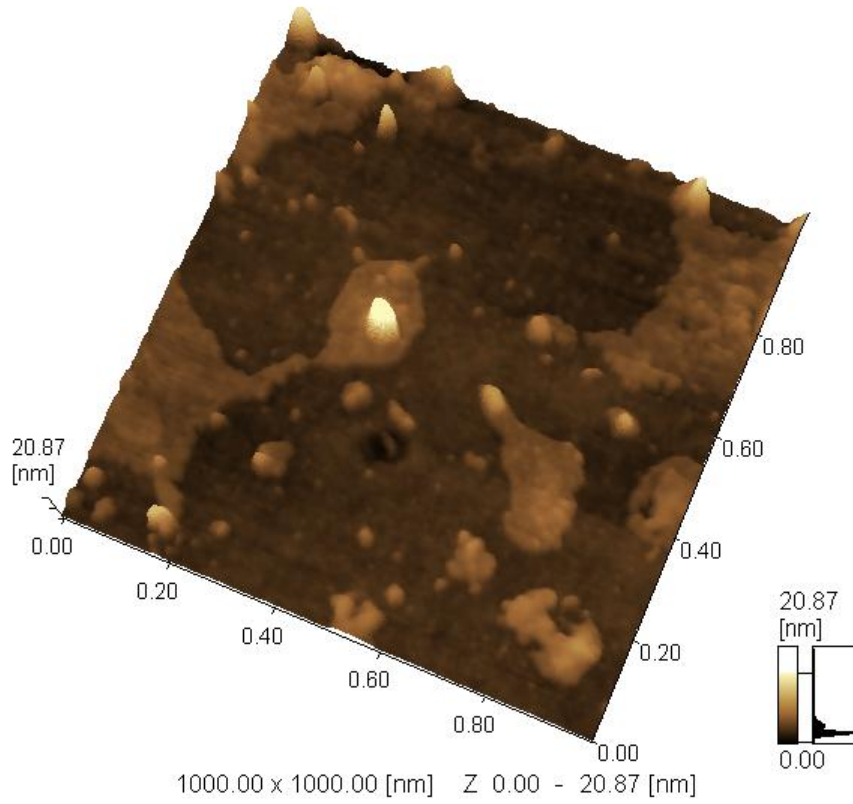


Şekil 9. 22 Bisfenol A bazlı Polisülfon polimerinin AFM görüntüsü

Şekil 9.22’te Bisfenol A bazlı polisülfon polimerinin AFM görüntüsü gösterilmektedir. Şekil 9.22’de polimerin homojen bir şekilde dağıldığı görülmektedir. Şekil 9.23’te Bisfenol A bazlı polisülfonun metakrillenmesi sonucu oluşan metakril Bisfenol A bazlı polimerinin AFM görüntüsü gösterilmektedir. Yapılan modifikasyondan sonra Şekil 9.23’teki yüzey yükseklik değerlerinin (1,23 nm) Şekil 9.22’e (2,15 nm) göre arttığı gözlenmiştir. Ayrıca elde edilen ortalama yükseklik değerleri Çizelge 9.17’de gösterilmektedir.

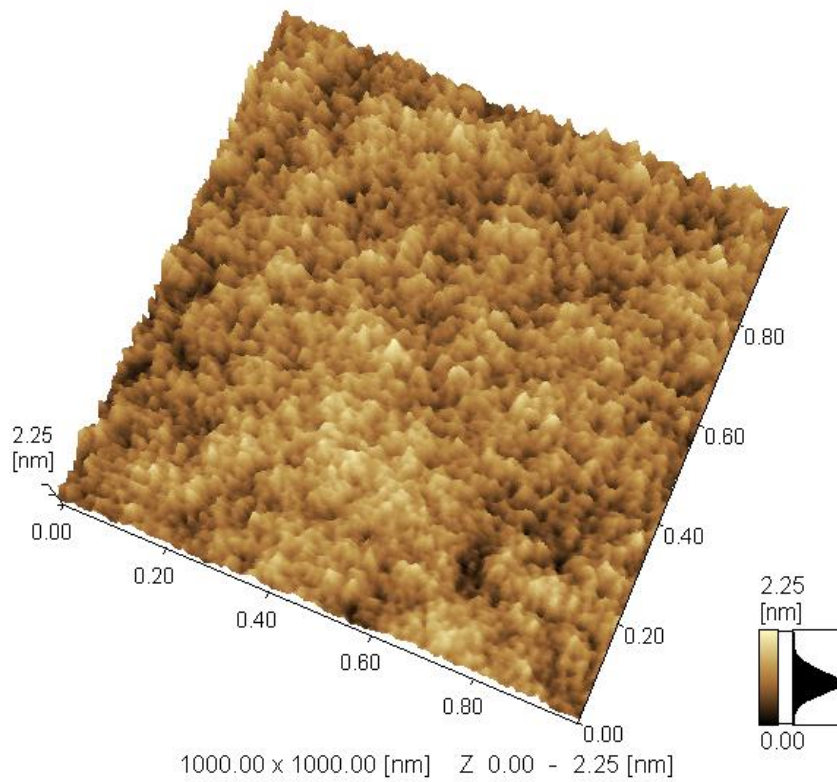


Şekil 9. 23 Metakril Bisfenol A bazlı Polisülfon polimerinin AFM görüntüsü



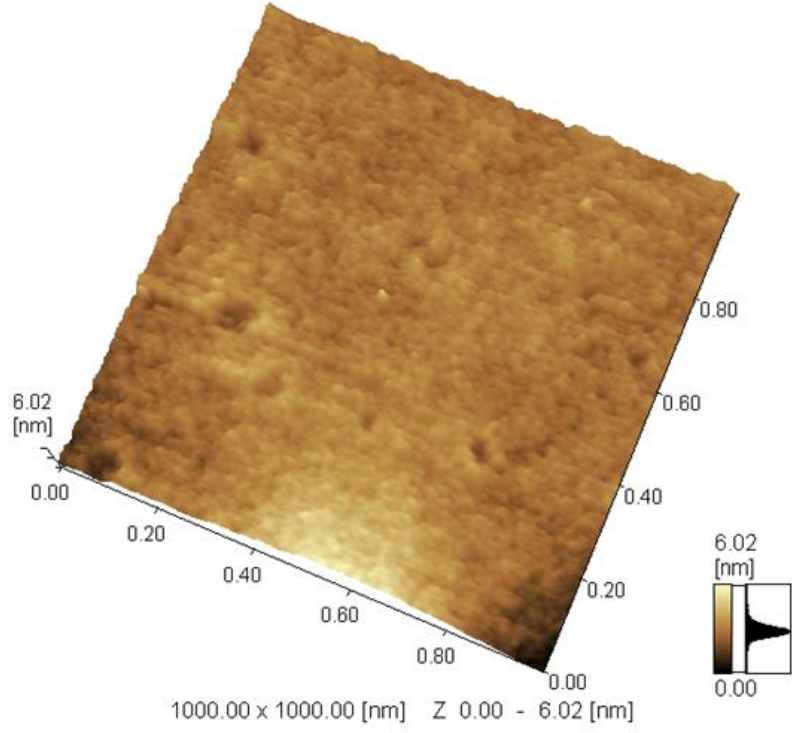
Şekil 9. 24 Metakril Bisfenol A bazlı Polisülfon polimerine Horseradish Peroksidaz enziminin immobilizasyonu sonucu elde edilen AFM görüntüsü

Şekil 9.24'te metakril Bisfenol A bazlı polisülfon materyaline Horseradish Peroksidaz enzimi immobilize edildikten sonraki AFM görüntüsü gösterilmektedir. Enzim immobilizasyonunu gösteren AFM görüntüsü olan Şekil 9.24 ile metakril Bisfenol A polisülfon polimerine ait AFM görüntüsü Şekil 9.23 karşılaştırıldığında yükseltilerde belirgin bir fark görülmektedir. Enzimin polimerin yüzeyine belirli bölgelerinden bağlanmanın gerçekleştiği ve yoğunlaştığı görülmektedir. Şekil 9.23'te elde edilen ortalama yükseklik değeri 2,15 nm iken enzim immobilizasyonundan sonra Şekil 9.24'te elde edilen ortalama yükseklik değeri 24,23 nm'ye yükselmiştir. Elde edilen ortalama yükseklik değerleri Çizelge 9.17'de gösterilmektedir.

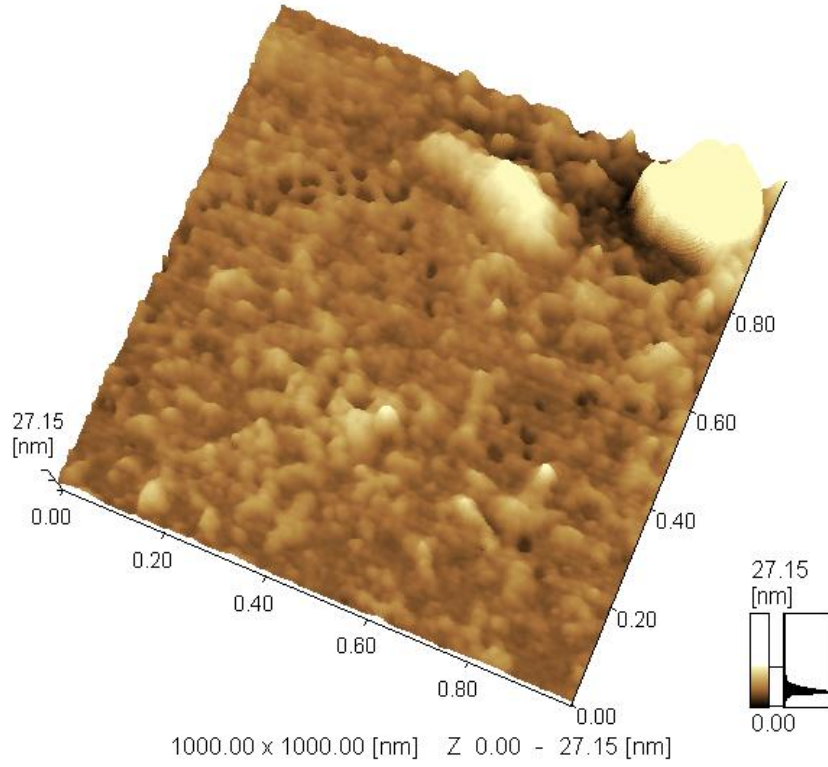


Şekil 9. 25 Bisfenol AF bazlı Polisülfonun AFM görüntüsü

Şekil 9.25'te Bisfenol AF bazlı polisülfon polimerinin AFM görüntüsü gösterilmektedir ve polimerin homojen bir şekilde dağıldığı görülmektedir. Şekil 9.26'da ise Bisfenol AF bazlı polisülfon polimerinin metakrillenmesi sonucu elde edilen metakril Bisfenol AF bazlı polimerinin AFM görüntüsü gösterilmektedir. Yapılan modifikasyondan sonra Şekil 9.25'teki yüzey yükseklik değerlerinin (1,19 nm) Şekil 9.26'ya (3,24 nm) göre arttığı gözlenmiştir. Elde edilen ortalama yükseklik değerleri Çizelge 9.17'de gösterilmektedir.



Şekil 9. 26 Metakril Bisfenol AF bazlı Polisülfonun AFM görüntüsü



Şekil 9. 27 Metakril Bisfenol AF bazlı Polisülfon polimerine Horseradish Peroxidaz enziminin immobilizasyonu sonucu elde edilen AFM görüntüsü

Şekil 9.26’da elde edilen ortalama yükseklik değeri 3,24 nm iken enzim immobilizasyonundan sonra Şekil 9.27’te elde edilen ortalama yükseklik değerinin 52,12 nm’ye yükseldiği Çizelge 9.17’de gösterilmektedir.

Çizelge 9. 17 Polimerlerin ve polimerler üzerine immobilize enzimlerin AFM görüntülerinden elde edilen ortalama yükseklikler (Rp)

Örnekler	Ortalama yükseklik (Rp) (nm)	Şekil
Bisfenol A bazlı Polisülfon	1,23	Şekil 9.22
Metakril Bisfenol A bazlı Polisülfon	2,15	Şekil 9.23
Metakril Bisfenol A bazlı Polisülfona immobilize Horseradish Peroksidaz enzimi	24,23	Şekil 9.24
Bisfenol AF bazlı Polisülfon	1,19	Şekil 9.25
Metakril Bifenol AF bazlı Polisülfon	3,24	Şekil 9.26
Metakril Bisfenol AF bazlı Polisülfona immobilize Horseradish Peroksidaz enzimi	52,12	Şekil 9.27

9.4.2 İmmobilize Enzimin Farklı Koşullarda Aktivite Tayini

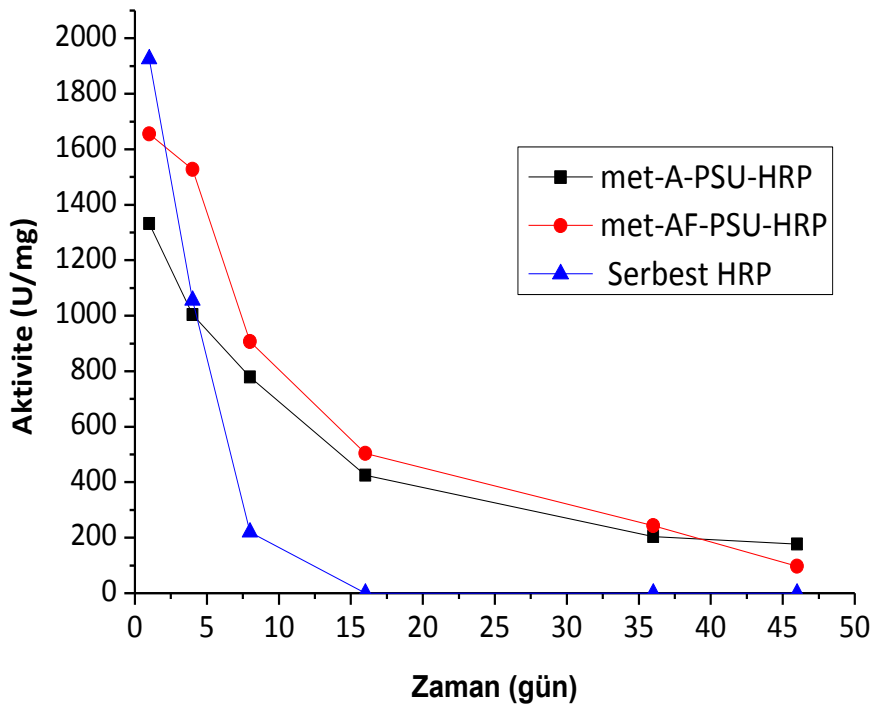
İmmobilize enzimin aktivitesi pH: 5,0 ve 25 °C’de gerçekleştirilmiştir. İmmobilize enzim için çok sayıda destek materyali hazırlanmış ve üzerine 0,01 mg Horseradish Peroksidaz enzimi immobilize edilmiştir. İmmobilize enzimlerin aktivitelerinin hesaplanmasında eşitlik (8.3) kullanılmıştır. İmmobilize enzimler +4 °C’de bekletilmektedir.

Serbest enzim immobilize enzimlere göre daha kısa sürede aktivitesini kaybetmektedir (Çizelge 9.18 ve Şekil 9.28). AF-bazlı polisülfon destek materyaline immobilize enzimin aktivitesi A-bazlı polisülfon destek materyaline bağlı enzimin aktivitesini daha uzun süre korumaktadır. Burada AF-bazlı polisülfon destek materyaline bağlı Horseradish peroksidaz enzimi aktivitesini biraz daha yüksek görülmesi AF-bazlı polisülfon polimerinin yapısında bulunan Flor gruplarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Flor gruplarının yarıçapları büyük olması nedeni ile immobilize destek materyalinin ana zincirini ve bu ana zincire substitue grubu (enzim veya fonksiyonel grup) termal ve kimyasal saldırılara karşı korumaktadır. AF bazlı polisülfon materyaline immobilize Horseradish Peroksidaz enzimini ile elde edilen aktivitelerde (raf ömrü, farklı sıcaklıklar, 50 °C sıcaklığına direnç) belirgin bir fark görülmüştür. Bu olumlu etkinin flor

gruplarından kaynaklandığı ve destek materyalinin ana zincirindeki flor gruplarının enzimi ve destek materyalini dış etkilere karşı koruduğu sonucu çıkarılmıştır.

Çizelge 9. 18 +4 °C’de bekleyen Horseradish peroksidaz ve iki farklı immobilize enzimin farklı bekleme sürelerinde 25 °C’ de ve pH: 5,0’te ölçülen aktivite değerleri

Zaman (gün)	Aktivite (Ünite/mg)		
	A-PSU-immobilize HRP	AF-PSU-immobilize HRP	Serbest HRP
1	1.332	1.655	1.925
4	1.004	1.527	1.056
8	779	907	220
16	425	504	0
36	204	243	0
46	177	97	0



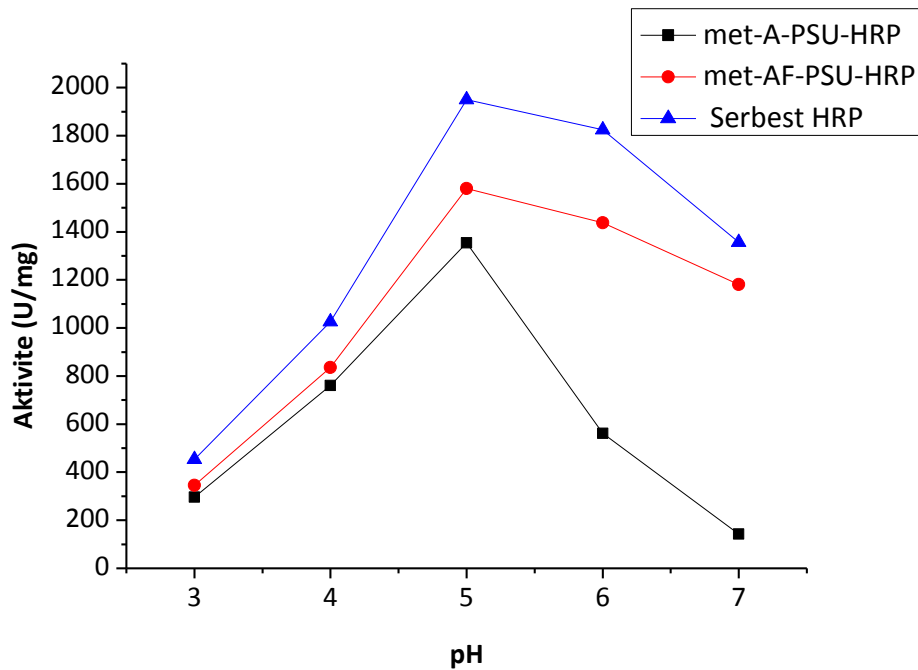
Şekil 9. 28 HRP ve immobilize enzimlerin 4 °C’de farklı sürelerde bekledikten sonra pH:5,0 ve 25 °C’de hesaplanan aktiviteleri

Şekil 9.28’de ve Çizelge 9.18’de görüldüğü üzere iki farklı destek materyaline immobilize Horseradish Peroksidaz enzimi serbest enzimi göre daha uzun süre aktivitesini korumaktadır. İmmobilizasyondan dolayı immobilize enzimlerin (metakril A

ve metakril AF bazlı polisülfon materyallerine immobilize Horseradish Peroksidaz enzimleri) aktiviteleri ilk gün düşüktür. + 4 °C'de bekleyen enzimin ve immobilize enzimlerin farklı günlerde pH: 5,0 ve 25 °C'de ölçülen aktiviteleri karşılaştırıldığında serbest enzimin aktvitesinde hızlı bir düşüş yaşanırken immobilize enzimler aktvitelerini daha uzun süre koruyabilmektedir.

Çizelge 9. 19 Serbest ve immobilize Horseradish Peroksidaz enziminin 25 °C'de farklı pH' larda ölçülen aktivite değerleri

	pH				
	pH: 3,0	pH: 4,0	pH:5,0	pH: 6,0	pH: 7,0
A-PSU-HRP Aktivite (Ünite/mg)	296	761	1354	562	142
AF-PSU-HRP Aktivite (Ünite/mg)	345	836	1580	1438	1181
HRP Aktivite (Ünite/mg)	453	1026	1950	1825	1356



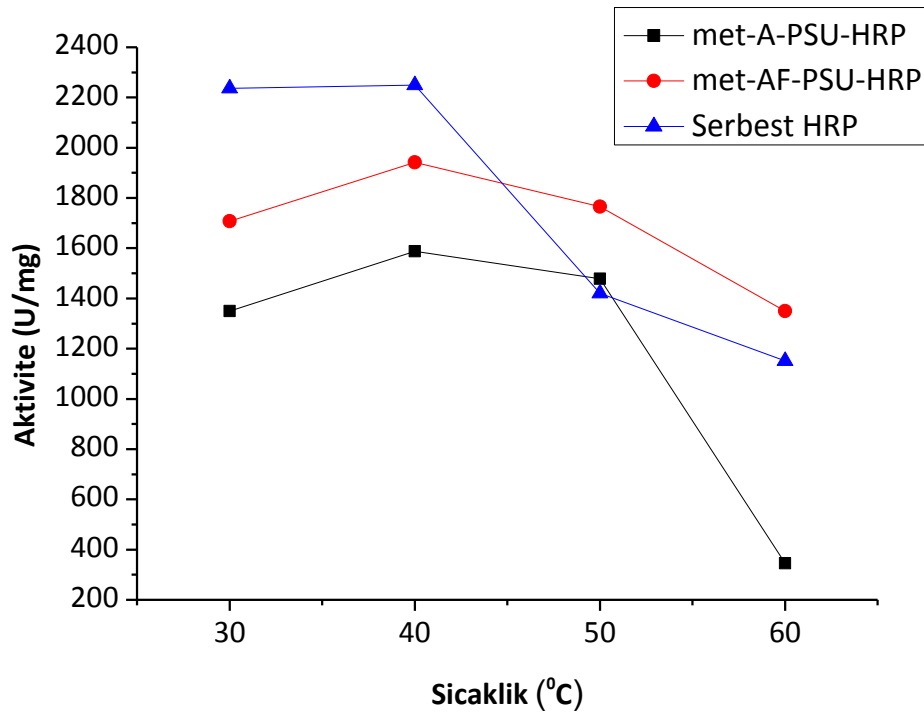
Şekil 9. 29 Farklı pH'larda serbest ve immobilize enzimlerin aktiviteleri

Şekil 9.29'da görüldüğü üzere serbest enzim ve destek materyallerine immobilize enzimler en yüksek aktvitelerini pH: 5,0'te göstermişlerdir. AF-bazlı destek materyaline immobilize enzimin A bazlı destek materyaline bağlı enzimi göre farklı pH'larda aktvitesini daha yüksek olduğu görülmektedir. AF-bazlı destek materyaline bağlı enzim daha pH aralığında aktivite göstermiştir. Serbest enzimin aktivitesi immobilize

enzimlere kıyasla daha yüksektir. İmmobilizasyon sonucu immobilize enzimlerin aktivitelerinde düşüş yaşanmıştır. AF bazlı polisülfon destek materyaline immobilize enziminin aktivitesi A bazlı destek materyaline immobilize enzimin aktivitesine göre daha yüksek çıkmıştır. Bunun AF bazlı destek materyalindeki flor gruplarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çizelge 9. 20 HRP ve immobilize enzimlerin farklı pH: 5,0 ve 25 °C’de hesaplanan aktiviteleri

	Sıcaklık (°C)			
	30 °C	40 °C	50 °C	60 °C
MET-PSU-HRP Aktivite (Ünite/mg)	1350	1588	1478	345
AF-PSU-HRP Aktivite (Ünite/mg)	1708	1942	1765	1350
HRP Aktivite (Ünite/mg)	2236	2250	1420	1151



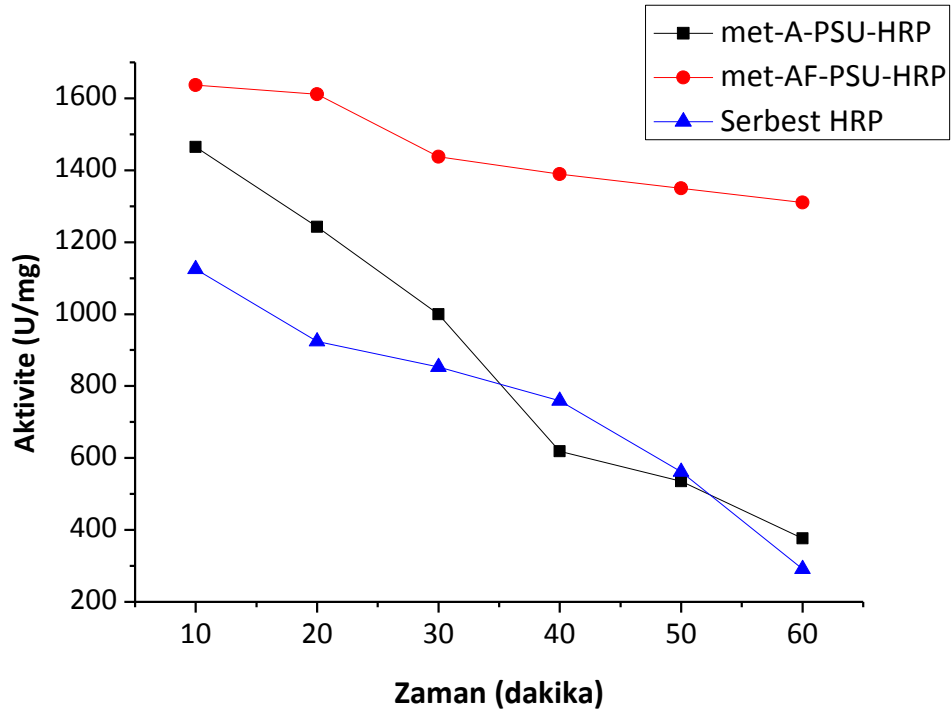
Şekil 9. 30 HRP ve immobilize enzimlerin pH: 5,0’te farklı sıcaklıklarda hesaplanan aktiviteleri

Şekil 9.30’da görüldüğü üzere AF-bazlı destek materyaline bağlı enzim yüksek sıcaklıklarda da yüksek aktivite göstermektedir. Serbest enzimin daha düşük sıcaklıklarda (30-40 °C’de) aktivitesi immobilize enzimlere göre düşük iken sıcaklığın

artması ile özellikle AF bazlı polisülfon materyaline bağlı immobilize enzimin (met-AF-PSU-HRP) aktivitesini koruduğu gözlenmiştir.

Çizelge 9. 21 50 °C’de farklı sürelerde bekletilen serbest ve immobilize enzimlerin pH: 5,0 ve 25 °C hesaplanan aktivite değerleri

	50 °C’de Bekleme Süresi (dakika)					
	10 dak.	20 dak.	30 dak.	40 dak.	50 dak.	60 dak.
A bazlı PSU-HRP Aktivite (Ünite/mg)	1465	1243	1000	619	535	376
AF bazlı PSU- HRP Aktivite (Ünite/mg)	1637	1611	1438	1389	1350	1310
Serbest HRP Aktivite (Ünite/mg)	1125	924	853	759	562	291



Şekil 9. 31 HRP ve immobilize enzimlerin pH: 5,0 ve 50 °C’de farklı bekleme sürelerinde hesaplanan aktiviteleri

İmmobilize enzimler serbest enzime göre 50 °C’de bekletildiğinde aktivitelerini korudukları Şekil 9.31’de gösterilmektedir. Özellikle AF-bazlı destek materyaline immobilize enzim A bazlı destek materyaline bağlı enzime ve serbest enzime göre pH: 5,0’te 50 °C’de daha uzun bekleme sürelerinde aktivitesini korumaktadır (Şekil 9.31).

9.4.3 İmmobilize Horseradish Peroksidaz Enzimi İle Reaktif Blue 19 ve Asit Black 1 Boyalarının Giderilmesi

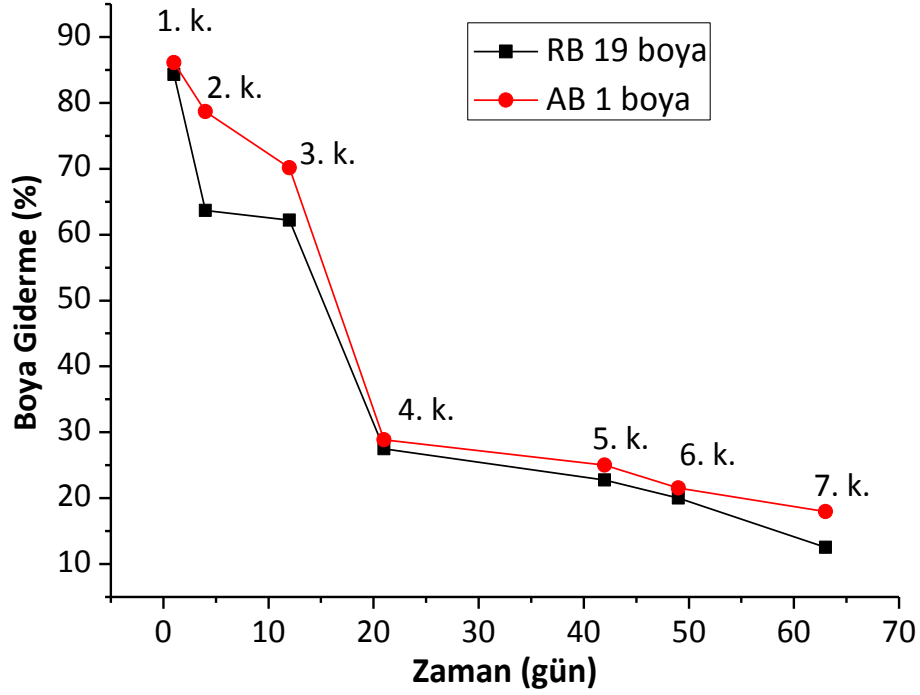
Reaktif Blue 19 ve Asit Black 1 boyalarının giderilmesinde kullanılan immobilize enzim sistemleri destile su ile yıkandıktan sonra tekrar kullanılmak üzere +4 °C'de bekletildi.

İmmobilize enzimlerin farklı günler sonunda tekrar kullanılmalarından elde edilen boya giderme sonuçları Çizelge 9.22'de gösterilmektedir.

Çizelge 9. 22 Reaktif Blue 19 ve Asit Black 1 Boyalarının iki farklı immobilize enzim (A-PSU immobilize enzim ve AF-PSU immobilize enzim) ile farklı günlerde tekrar kullanılması ile % giderilmesi

Tekrar Kullanım Sayısı	Tekrarın Yapıldığı Gün	Boya Giderme (%)			
		A bazlı PSU-HRP		AF bazlı PSU-HRP	
		Reaktif Blue 19 boyası	Asit Black 1 boyası	Reaktif Blue 19 boyası	Asit Black 1 boyası
1.	1.	84,33	86,09	85,85	87,04
2.	4.	63,66	78,66	73,58	79,39
3.	12.	62,21	70,15	52,05	66,97
4.	21.	27,48	28,88	27,21	28,44
5.	42	22,77	25	18,66	25,37
6.	49	20	21,54	17,48	19,38
7.	63	12,54	17,93	11,76	15,15

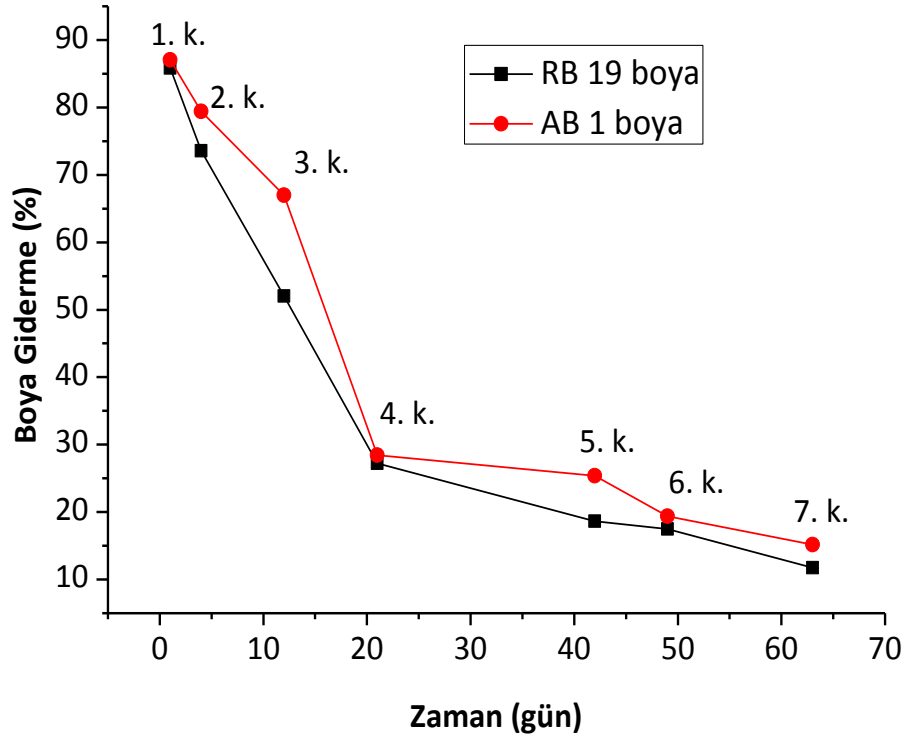
İlk gün A bazlı polisülfon polimerine immobilize Horseradish Peroksidaz enziminin Reaktif Blue 19 ve Asit Black 1 boya çözeltilerine uygulanmasından bir saat sonra sırası ile % 84 ve % 86 boya giderme değerleri elde edildi. A bazlı polisülfon polimerine immobilize enzimin 4 gün sonra 2. kez kullanımında Reaktif Blue 19 ve Asit Black 1 boya için sırası ile % 64 ve % 79 boya giderme değerleri elde edildi. İmmobilize enzimlerin 12 gün sonra 3. kez kullanımlarında da yüksek boya giderme değerleri elde edildi. Fakat, immobilize enzimlerin 21 gün sonra 4. kez boyaların giderilmesinde kullanımlarında boya giderme değerlerinin önemli ölçüde düştüğü Çizelge 9.22'de görülmektedir.



Şekil 9. 32 A bazlı-PSU destek materyali üzerine immobilize enzimin tekrar kullanılması ile iki boyanın farklı günlerde giderilmesi (k: enzim polimer sisteminin tekrar kullanımı)

İlk gün AF polisülfon polimerine immobilize Horseradish Peroksidaz enziminin Reaktif Blue 19 ve Asit Black 1 boya çözeltilerine uygulanmasından bir saat sonra sırası ile % 86 ve % 87 boya giderme değerleri elde edildi. 4 gün sonra immobilize enzimler tekrar kullanıldı. AF bazlı polisülfon polimerine immobilize enzimin 4 gün sonra 2. kez kullanımında Reaktif Blue 19 ve Asit Black 1 boya için sırası ile % 74 ve % 79 boya giderme değerleri elde edildi.

Reaktif blue 19 boyasının Asit Black 1 boyasına göre daha düşük yüzde ile giderildiği görülmektedir. Ayrıca, AF bazlı polisülfon polimerine immobilize enziminin A bazlı polisülfon polimerine immobilize göre her iki boyayı da daha yüksek bir yüzde ile giderdiği Çizelge 9.22’de görülmektedir.



Şekil 9. 33 AF bazlı PSU destek materyali üzerine immobilize enzimin tekrar kullanılması ile iki boyanın farklı günlerde giderilmesi (k: enzim polimer sisteminin tekrar kullanımı)

9.5 Beyaz Çürükçül Mantar (*Trametes versicolor*) ile Boyaların Giderilmesi

Atık suların giderilmesinde yaygın olarak beyaz çürükçül mantarlar tercih edilmektedir. Bu çalışmada bir beyaz çürükçül mantarı olan *Trametes versicolor* ile farklı boya sınıflarına ait boyaların laboratuvarında hazırlanan boya çözeltileri ve fabrikadan alınan tekstil atık suyunun giderilmesi çalışmaları yapıldı.

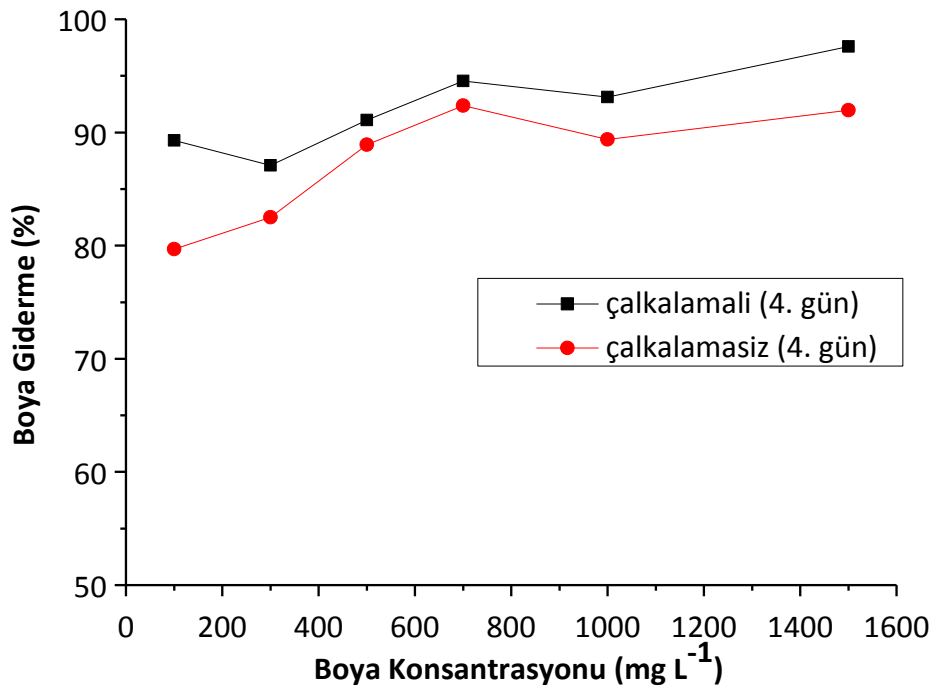
9.5.1 Asit Black 1 (AB 1) Boyasının giderilmesi

Asit Black 1 (AB 1) boyasının 6 farklı konsantrasyonunda (100, 300, 500, 700, 1.000, 1.500 mg L⁻¹) hazırlanan boya çözeltilerinin boya giderme işlemi *Trametes versicolor* ile yapıldı. Boya giderme çalkalamalı ve çalkalamasız olarak 30 °C'de sabit sıcaklığa getirilmiş su banyosunda pH: 3,6'da gerçekleştirildi.

Çizelge 9. 23 AB 1 boyasının boya giderme besiyerinde pH: 3,6'da 30 °C'de giderilmesi

AB 1 Boya (Konsantrasyon, mg/L)	Boya Giderme (%)	
	4. gün Çalkalamalı	4. gün Çalkalamasız
100	89,30	79,68
300	87,07	82,51
500	91,10	88,93
700	94,53	92,36
1.000	93,13	89,37
1.500	97,60	91,95

Asit Black 1 boyası için, 4. günün sonunda en yüksek boya konsantrasyonunda (1.500 mg L⁻¹) çalkalamalı ve çalkalamasız koşullarda sırası ile % 98 ve % 92 boya giderme değerleri elde edildi. Asit Black 1 boyasının konsantrasyonun artması ile boya giderme değerinde de artma olduğu gözlemlendi. Çalkalamalı koşullarda gerçekleşen boya giderme işleminde elde edilen değerlerin çalkalamasız koşullarda ulaşılan boya giderme değerlerine göre daha yüksek olduğu belirlendi.



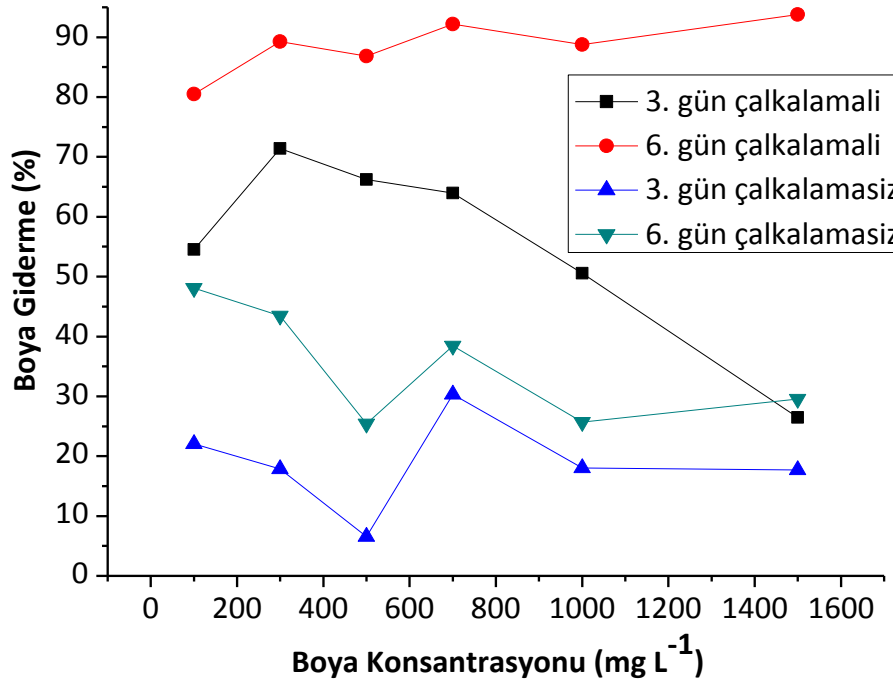
Şekil 9. 34 *Trametes versicolor* ile Asit Black 1 boyasının pH: 3,6'da 30 °C'de çalkalamalı ve çalkalamasız koşullarda giderilmesi

9.5.2 Reaktif Blue 19 (RB 19) Boyasının giderilmesi

Reaktif Blue 19 (RB 19) boyasının da farklı konsantrasyonlarında (100, 300, 500, 700, 1.000, 1.500 mg L⁻¹) hazırlanan boya çözeltilerinin boya giderme besiyerinde renk giderme çalışmaları yapıldı ve elde edilen sonuçlar Çizelge 9.24'te gösterilmektedir.

Çizelge 9. 24 RB 19 boyasının boya giderme besiyerinde pH: 3,6'da 30 °C'de giderilmesi

RB 19 (Konsantrasyon, mg/L)	Boya Giderme (%)			
	3. gün Çalkalamalı	6. gün Çalkalamalı	3. gün Çalkalamasız	6. gün Çalkalamasız
100	54,55	80,52	22,08	48,05
300	71,43	89,29	17,86	43,45
500	66,23	86,84	6,58	25,44
700	63,96	92,19	30,33	38,44
1.000	50,55	88,79	18,02	25,71
1.500	26,44	93,80	17,73	29,54

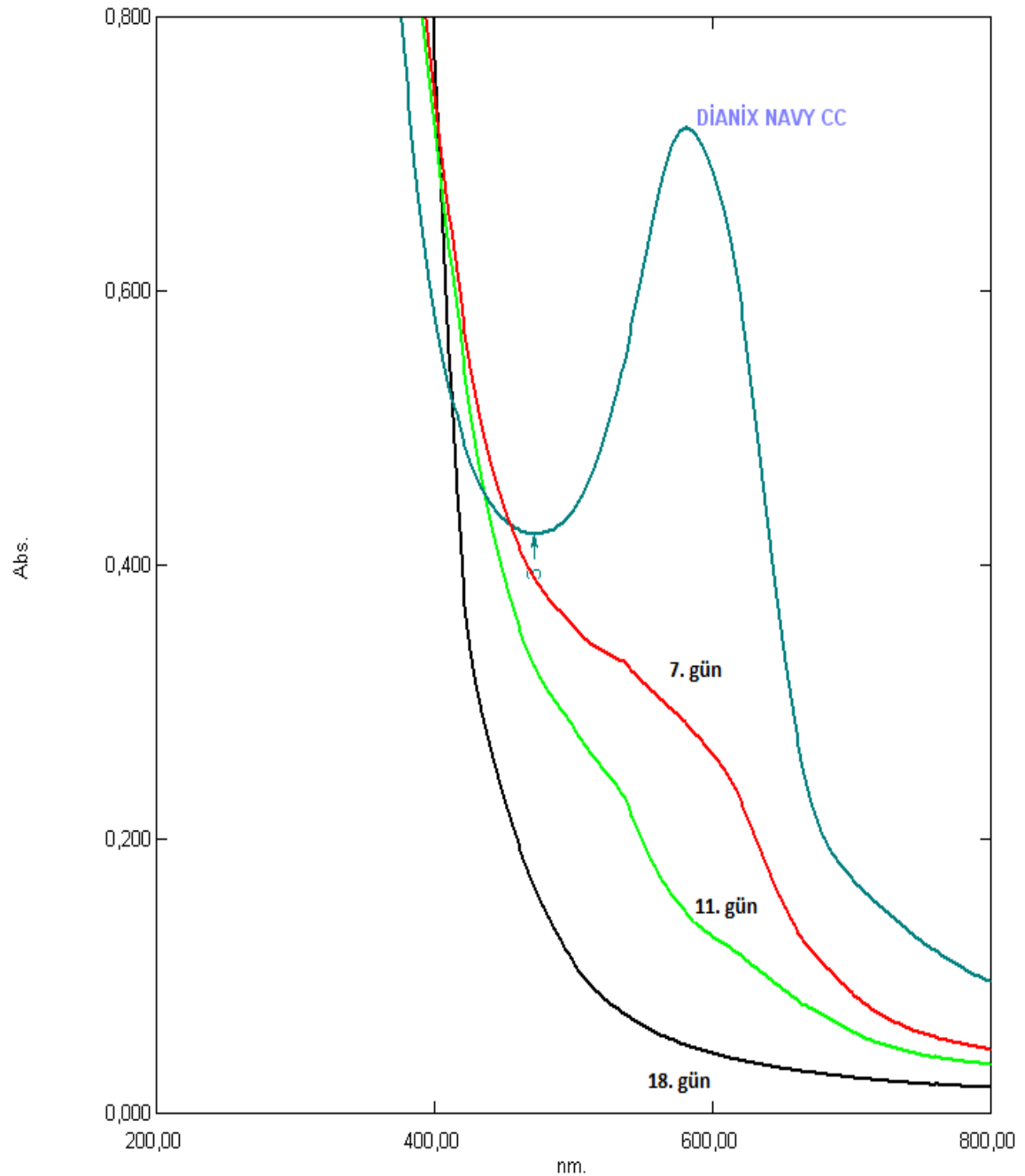


Şekil 9. 35 *Trametes versicolor* ile RB 19 boyasının pH: 3,6'da 30 °C'de çalkalamalı ve çalkalamasız koşullarda giderilmesi

Reaktif Blue 19 boyası için, en yüksek boya konsantrasyonunda (1.500 mg L⁻¹) 3. günde çalkalamalı ve çalkalamasız koşullarda sırası ile % 2 ve % 18, 6. günün sonunda sırası ile % 94 ve % 30 boya giderme sonuçları elde edildi. Ayrıca elde edilen sonuçlara göre

(Çizelge 9.23 ve Çizelge 9.24) *Trametes versicolor* ile Asit Black 1 boyası, Reaktif Blue 19 boyasına göre daha kısa sürede yüksek boya giderme yüzdesi ile giderildiği sonucu çıkarılmaktadır.

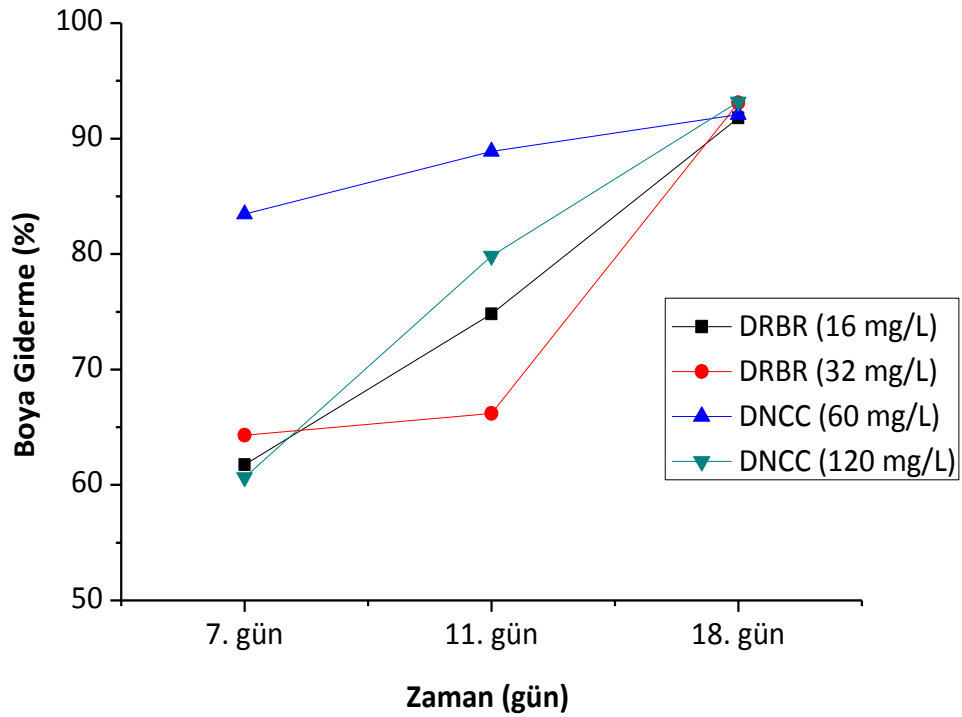
9.5.3 Dispers Boyaların *Trametes versicolor* ile Giderilmesi



Şekil 9. 36 UV-Visible Spektrofotometre ile Dianix Navy CC boyasının mikroorganizma ile farklı sürelerde renk gideriminin incelenmesi

Çizelge 9. 25 Dianix Reaktif Blue 19 ve Dianix Navy CC boyaalarının iki farklı konsantrasyonda *Trametes versicolor* ile % giderilmesi

	Boya Giderme (%)			
	DRBR1 (16 mg L ⁻¹)	DRBR2 (32 mg L ⁻¹)	DNCC1 (60 mg L ⁻¹)	DNCC2 (120 mg L ⁻¹)
7. gün	61,75	64,31	83,45	60,64
11. gün	74,81	66,19	88,89	79,83
18. gün	91,79	93,08	92,06	93,18

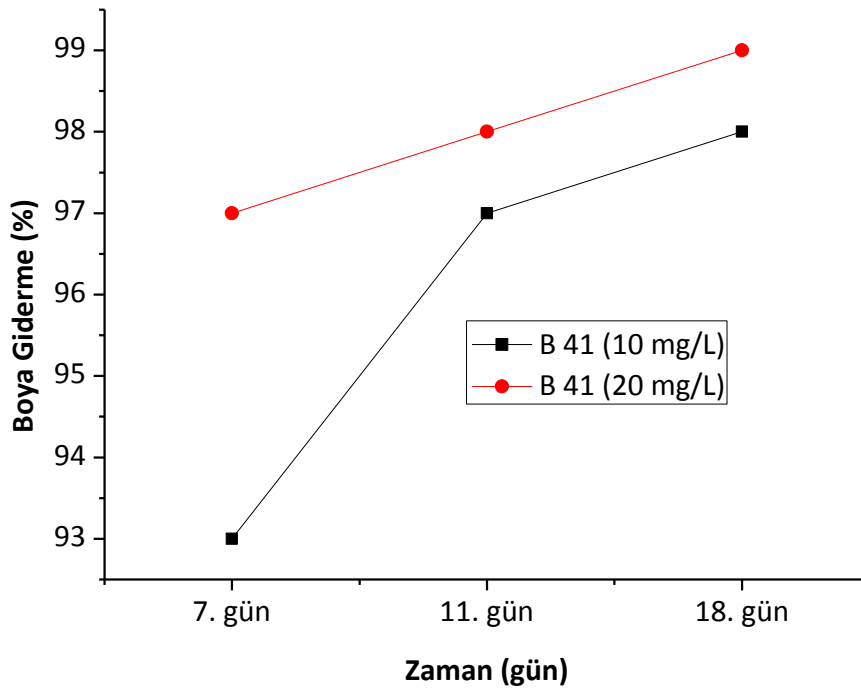


Şekil 9. 37 *Trametes Versicolor* ile Dianix Reaktif Blue R ve Dianix Navy CC boyaalarının farklı konsantrasyonlarda % giderilmesi

Dianix Reaktif Blue R (DRBR) boyası iki farklı konsantrasyonda (16 mg L⁻¹ ve 32 mg L⁻¹) bir hafta sonunda konsantrasyona göre sırası ile % 62 ve % 64 oranında giderilmiştir. Dianix Navy CC (DNCC) boyası iki farklı konsantrasyonda (60 mg L⁻¹ ve 120 mg L⁻¹) bir hafta sonunda % 83 ve % 61 oranında giderilmiştir.

9.5.4 Bazik Blue 41 Boyasının Giderilmesi

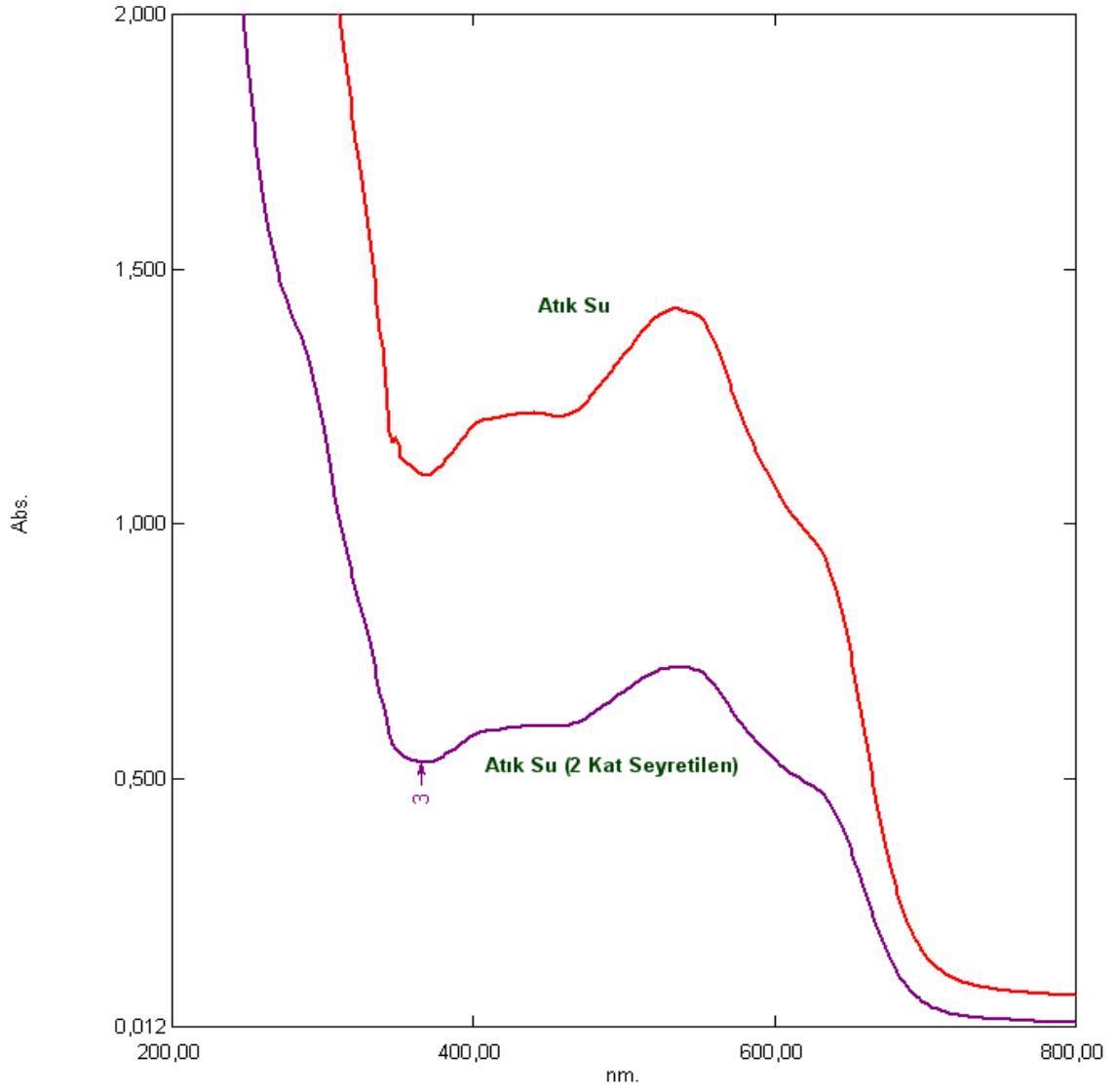
Bazik Blue 41 boyası *Trametes Versicolor* ile pH : 3,6'da ve 30 °C'de giderilmesi Şekil 9.38'de gösterilmektedir. Boya giderme çalkalamalı koşullarda iki farklı boya konsantrasyonunda (10 mg/L ve 20 mg/L) gerçekleştirilmiştir. 10 mg/L konsantrasyondaki Bazik Blue 41 boyası 7., 11. ve 18. günlerde sırası ile % 93, % 97 ve % 97 giderilmiştir. 20 mg/L konsantrasyondaki Bazik Blue 41 boyası ise 7., 11. ve 18. günlerde sırası ile % 97, % 98 ve % 99 oranında giderilmiştir.



Şekil 9. 38 *Trametes Versicolor* ile Bazik Blue 41 (B 41) boyasının iki farklı konsantrasyonda % giderilmesi

9.5.5 Tekstil Boya Atık Suyunun *Trametes Versicolor* ile Giderilmesi

Atık su soğuk odada (+4 °C'de) bekletilmektedir. Atık suyun maksimum dalga boyunun 522 nm olduğu UV-Visible spektrofotometre kullanılarak belirlendi.

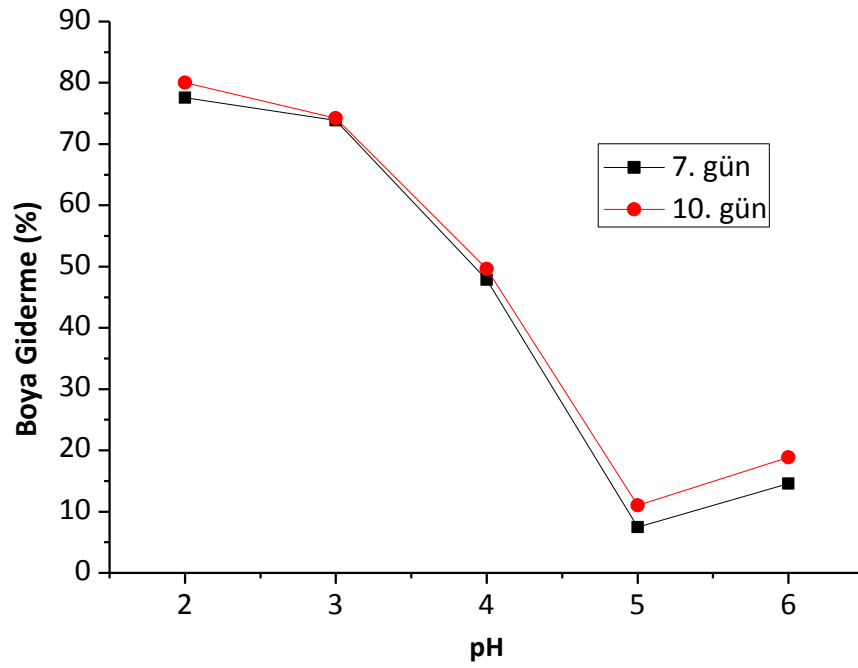


Şekil 9. 39 Tekstil fabrikasından alınan atık suyun UV-Visible spektrumları

Çizelge 9. 26 Bir tekstil fabrikasından alınan atık suyun farklı pH' larda çalkalamalı su banyosunda 30 °C' de boya giderme besiyerinde giderilmesi)

	Boya Giderme (%)					
Zaman (gün)	pH: 2,0	pH: 3,0	pH:4,0	pH: 5,0	pH: 6,0	pH: 3,0 4,14 mM HBT
7. gün.	77,59	73,85	47,86	7,47	14,59	66,20
10. gün.	80,00	74,20	49,64	11,03	18,86	70,77

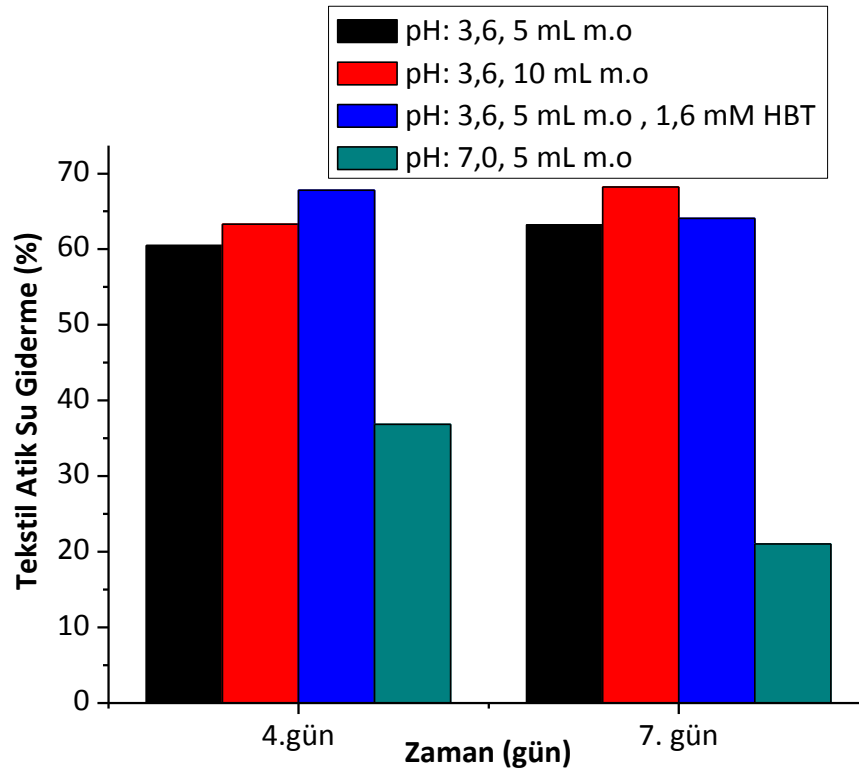
Çizelge 9.26 ve Şekil 9.40'da görüldüğü üzere düşük pH'larda boya giderme yüzdesinin arttığı dikkat çekmektedir.



Şekil 9. 40 Tekstil fabrikası atık suyunun farklı pH'larda *Trametes Versicolor* mikroorganizması ile %'de giderilmesi

Çizelge 9. 27 Farklı sıvıbesiyeri hacimlerinde ve HBT'li ve HBT'siz koşullarda çalkamalı olarak 30 °C'de 50 mL tekstil atık suyunun giderilmesi

Koşullar	Boya Giderme (%)	
	4. gün	7. gün
pH: 3,6, 5 mL <i>T. versicolor</i>	60,48	63,21
pH: 3,6, 10 mL <i>T. Versicolor</i>	63,29	68,24
pH: 3,6, 5 mL <i>T. versicolor</i> ve 1,6 mM HBT	67,79	64,70
pH: 7,0 ve 5 mL <i>T. versicolor</i>	36,84	21,02

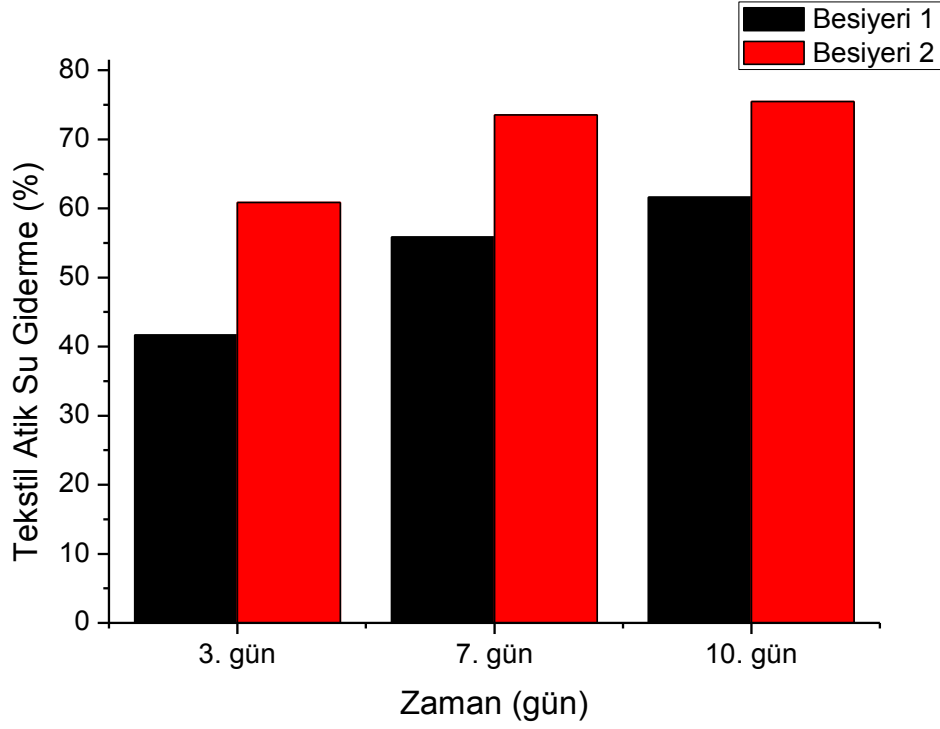


Şekil 9. 41 Farklı koşullarda çalkalamalı olarak 30 °C’de 50 mL tekstil atık suyun % giderilmesi

İki farklı hacimde sıvı besiyeri (5 mL ve 10 mL) kullanılarak mikroorganizma (*T. versicolor*) miktarının boya gidermeye olan etkisi incelendi. pH: 3,6’da 5 mL ve 10 mL mikroorganizma sıvı besiyerinden alınarak boya giderme besiyerine ilave edildikten 7 gün sonra sırası ile % 63 ve % 68 tekstil boyasının giderildiği görüldü.

Çizelge 9. 28 250 mL tekstil atık suyun farklı boya giderme besiyeri konsantrasyonlarında 1,6 mM HBT’li ortamda pH: 3,6’da 30 °C’de 10 mL *T. versicolor* ile giderilmesi

Besiyeri Konsantrasyonu	Boya Giderme (%)		
	3. gün	7. gün	10. gün
1,25 g Malt, 0,05 g glukoz	41,65	55,85	61,61
6,25 g Malt, 0,25 g glukoz	60,85	73,54	75,49



Şekil 9. 42 250 mL atık suyun farklı boya giderme besiyeri konsantrasyonlarında (Besiyeri 1: 1,25 g Malt, 0,05 g glukoz; Besiyeri 2: 6,25 g Malt, 0,25 g Glukoz) 1,6 mM HBT'li ortamda pH: 3,6'da 30 °C'de 10 mL sıvıbesiyeri ile giderilmesi

İki farklı boya giderme besiyerinde (Besiyeri 1: 1,25 g Malt, 0,05 g glukoz ve Besiyeri 2: 6,25 g Malt, 0,25 g glukoz) yapılan tekstil boyasının giderilmesinde ise sırası ile 7 günün sonunda % 56 ve % 74 değerlerine ulaşılmıştır. Boya giderme besiyerindeki maddelerin konsantrasyonu 5 kat arttırıldığında boya giderme değerlerinde de belirgin bir artış gözlenmiştir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

10.1 Horseradish Peroksidaz Enzimi ile Reaktif Blue 19 Boyasının Giderilmesi

Reaktif boyalar tekstil endüstrisinin atık sularında bulunan ve arıtılması en zor olan boyalardandır. Reaktif Blue 19 boyası ise en yaygın olarak kullanılan boyalardandır. Bu çalışmada Reaktif Blue 19 boyasının Horseradish Peroksidaz enzimi ile farklı koşullarda giderilerek optimum boya giderme koşullarının belirlenmesi ile literatüre katkıda bulunulmuştur.

10.1.1 Horseradish Peroksidaz Enzimi ile Reaktif Blue 19 Boyasının Giderilmesine pH Etkisi

Reaktif Blue 19 boyasının Horseradish Peroksidaz enzimi ile giderilmesi çalışmalarında farklı pH'lar (pH: 3,0, pH: 4,0, pH: 5,0, pH: 6,0, pH: 7,0 ve pH: 8,0) için 30 °C'de 60 dakika boyunca yapılan çalışmalar sonucunda pH: 5,0'te en yüksek boya giderme değerlerine ulaşılmıştır. pH: 5,0'te 5 dakika sonra % 91 ve 60 dakika sonra % 97 giderirken, pH: 6,0' da aynı şartlarda 60 dakika sonunda % 96 gidermektedir. 60 dakika bekleme süresi sonunda pH: 5,0'ten sonra pH: 6,0'da da yüksek boya giderme değerine ulaşılmıştır.

10.1.2 Horseradish Peroksidaz Enzimi ile Reaktif Blue 19 Boyasının Giderilmesine Enzim Konsantrasyonunun Etkisi

Enzim konsantrasyonunun artması ile boya giderme yüzdeleri artmaktadır. İlk 10 dakika içerisinde özellikle düşük enzim konsantrasyonlarında enzim konsantrasyonunun artması ile boya giderme değerleri artmıştır. Ayrıca, özellikle yüksek enzim konsantrasyonlarında boyanın enzim ile etkileştiği sürenin artması ile boya giderme değerleri birbirine yaklaşmıştır. 0,825 µg/mL enzim konsantrasyonundan itibaren 20. dakika sonunda % 90'ın üzerinde boya giderme değerlerine ulaşmakla birlikte % boya giderme değerleri yüksek enzim konsantrasyonlarında birbirine yaklaşmıştır.

Reaktif Blue 19 boyasının farklı koşullarda giderilmesinde boya gidermenin daha kısa sürede gerçekleşmesi amacıyla 3,3 µg/mL enzim konsantrasyonunda 5. dakikada % 90'ın üzerinde boya giderme değeri elde edilmesi nedeniyle 3,3 µg/mL enzim konsantrasyonu kullanılmıştır.

10.1.3 Horseradish Peroksidaz Enzimi ile Reaktif Blue 19 Boyasının Giderilmesine Boya Konsantrasyonunun Etkisi

Boyanın enzim ile muamele süresi uzadıkça boya giderme değerleri artarak birbirine yaklaşmıştır. Boya konsantrasyonunun artmasına rağmen enzimin boyayı giderme etkisi devam etmektedir. pH: 5,0 ve 30 °C'de 10 dakika gibi kısa bir sürede 28-263 mg/L Reaktif Blue 19 boya konsantrasyonları aralığında % 94 boya giderme yüzdesine ulaşılmıştır. Horseradish Peroksidaz enzimi yüksek Reaktif Blue 19 boya konsantrasyonlarında da etkili bir boya giderme sağlamaktadır.

10.1.4 Horseradish Peroksidaz Enzimi ile Reaktif Blue 19 Boyasının Giderilmesine Sıcaklığın Etkisi

pH: 5,0 ve farklı sıcaklıklarda 60 dakika boyunca RB 19 boyası giderilmesi incelendi. Boya giderme yüzdeleri 25-50 °C arasındaki sıcaklıklarda birbirine yakın boya giderme değerleri vermektedir. 60 dakika bekleme süresi sonunda 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C ve 50 °C sıcaklıkları için sırası ile % 98, % 97, % 99, % 97, % 96 ve % 94 boya giderme değerleri elde edilmiştir. Çalışılan bütün sıcaklıklar için elde edilen boya giderme

değerleri birbirine yakın olmakla birlikte en yüksek boya giderme değerine 35 °C ulaşılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucu pH: 5,0 ve 35 °C'de 5 ve 60 dakika bekleme süreleri sonrasında sırasıyla % 94 ve % 99 boya giderme değerleri elde edilmiştir.

10.1.5 Horseradish Peroksidaz Enzimi ile Reaktif Blue 19 Boyasının Giderilmesine Başlatıcı (Hidrojen Peroksit) Konsantrasyonunun Etkisi

pH: 5,0 ve 30 °C'de 110 mg/L konsantrasyondaki Reaktif Blue 19 boyasına 3,3 µg/mL enzim ilave edildikten sonra reaksiyonun başlatılması için ilave edilen H₂O₂'in farklı konsantrasyonlarının (0,5 mM, 1,0 mM, 1,5 mM, 3,0 mM ve 6,0 mM) boya gidermeye olan etkisi incelendi. 15 dakika bekleme süresi sonrasında artan Hidrojen Peroksit konsantrasyonları için sırası ile % 92, % 94, % 94, % 95 ve % 97 boya giderme değerleri elde edilmiştir. 0,5 mM Hidrojen Peroksit başlatıcısının enzimin çalışması için yeterli olduğu sonucuna ulaşıldı.

10.1.6 Horseradish Peroksidaz Enzimi ile Reaktif Blue 19 Boyasının Giderilmesine Üre ve Tuz Konsantrasyonunun Etkisi

Boyama işlemleri sırasında kullanılan yardımcı kimyasallar arasında üre ve tuz kullanılması ve bu yardımcı kimyasalların atık sulara karıştığı durumlar için bu kimyasalların boya giderme verimi üzerine etkisi incelendi.

30 dakika sonunda artan üre konsantrasyonları için sırası ile % 97, % 97, % 96, % 94, % 91 ve % 86 boya giderme değerleri elde edildi. Sonuçlara göre düşük üre konsantrasyonu içeren Reaktif Blue 19 boya çözeltisi daha yüksek yüzdelere boya giderilirken, boya çözeltisindeki üre konsantrasyonunun artması ile boya giderme değerlerinde azalma gözlenmektedir. Elde edilen verilere göre, atık sudaki yüksek üre konsantrasyonunun boya giderme yüzdesini olumsuz etkileyebileceği sonucuna ulaşılmıştır.

30 dakika sonunda artan tuz konsantrasyonlarında ise (0,05 M, 0,1 M, 0,25 M, 0,5 M, 1,0 M ve 2,0 M) göre sırası ile % 95, % 96, % 96, %95, % 94 ve % 95 boya giderme sonuçları elde edildi. Bu sonuçlara göre tuzun boya gidermeye herhangi bir olumsuz etkisi olmadığı sonucuna varıldı.

10.2 İmmobilize Horseradish Peroksidaz Enzimi ile Reaktif Blue 19 ve Asit Black 1

Boyalarının Giderilmesi

Enzimin destek materyali üzerine immobilizasyonu ile atık suda immobilize enzim sisteminin kullanım kolaylığı sağlandığından bu sistem boyaların giderilmesinde kullanılabilir.

Horseradish peroksidaz enziminin destek materyaline immobilizasyonu ile uygulama kolaylığı, enzimin tekrar kullanılmasıyla ekonomik katkı sağlanması ve enzimin raf ömrünün arttırılması sağlanmıştır.

Serbest enzim immobilize enzimlere göre daha kısa sürede aktivitesini kaybetmektedir. AF-bazlı polisülfon destek materyaline immobilize enzimin aktivitesi A bazlı polisülfon destek materyaline bağlı enzimin aktivitesini daha uzun süre korumaktadır. Burada AF bazlı polisülfon destek materyaline bağlı Horseradish peroksidaz enzimi aktivitesini biraz daha yüksek görülmesi AF-bazlı polisülfon polimerinin yapısında bulunan Flor gruplarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

AF bazlı destek materyaline bağlı enzim yüksek sıcaklıklarda da yüksek aktivite gösterdiğinden enzim immobilize edilerek sıcaklığa direnç kazandığı sonucuna varılmıştır.

AF-bazlı destek materyaline immobilize enzimin A bazlı destek materyaline bağlı enzime ve serbest enzime göre pH: 5,0'te 50 °C'de daha uzun bekletme sürelerinde aktivitesini korumaktadır.

İmmobilize enzim Asit Black 1 ve Reaktif Blue 19 boyalarının giderilmesinde 7 kez kullanılabilir. İlk 3 kez kullanımda boya giderme değerleri yüksek iken daha sonraki tekrar kullanımlarda boya giderme değerleri düşmektedir.

İmmobilize enzimin +4 °C'de daha uzun süre aktivitesini koruduğu görülmektedir. Dolayısıyla, immobilize enzim tekrar kullanılmak üzere çok daha uzun süre saklanabilir.

İmmobilize enzimin serbest enzime göre sıcaklığa daha dayanıklı olduğu belirlendi.

İmmobilize enzim tekstil atık suyunda ve Dianix Remazol Brilliant R, Dianix Navy CC, Bazik Blue 41 boyalarının giderilmesinde etkili olmadı.

10.3 Asit Black 1 Boyasının ve Boyanın HRP Enzimi ile Giderilmesinin Floresans

Spektroskopisi ile İncelenmesi

Farklı parametrelere bağılı olarak boya Floresans Spektroskopisi ile incelendiğinde, boya konsantrasyonun çok küçük değerlerinde floresans şiddetlerinin yaklaşık aynı olduğu ancak daha yüksek boya konsantrasyonlarında ise floresans şiddetinin azaldığı gözlenmiştir. Konsantrasyon artması ile floresans şiddetinin azalması floresans sönümü olarak bilinmektedir.

Boyaya enzim ilave edildikten sonra zamana bağılı olarak floresans spektroskopisi ile yapılan incelemede, enzim ile muamele edilmiş boya örneklerinin zaman içerisinde floresans şiddetinin arttığı ve maksimum dalga boylarının kırmızıya kaydığı gözlenmiştir. Maksimum floresans şiddeti değerlerine ise 4. gün yapılan ölçümlerde ulaşılmıştır. Boyanın enzim ile muamele edildikten sonra zamanla şiddetinin artması boyanın parçalandıktan sonra parçalanma ürünlerinin suyla daha kolay bir şekilde etkileşebildiği ve şiddetin yüksek çıktığı sonucuna varılmıştır.

Elde edilen bu floresans sonuçlara dayanarak, zamanın artmasına bağılı olarak enzimin boyayı daha iyi parçaladığı gözlenmiştir. Parçalanan moleküler yapısı bozulan boya molekülleri sulu ortam ile daha fazla etkileşimde olduğundan dolayı floresans şiddetlerinin arttığı ve dalga boylarının kırmızı bölgeye kaydığı izlenmiştir. Sonuç olarak Horseradish Peroksidaz enzimi Asit Black 1 boya molekülünün yapısını bozmakta, zamana bağılı olarak bu bozunma süreci devam etmektedir ve floresans spektroskopisi ile bu izlenmektedir.

10.4 Beyaz Çürükçül Mantar (*Trametes versicolor*) ile Boyaların Giderilmesi

Reaktif Blue 19 boyası için, en yüksek boya konsantrasyonunda (1.500 mg L^{-1}) 3. günde çalkalamalı ve çalkalamasız koşullarda sırası ile % 26 ve % 18, 6. günün sonunda sırası ile % 94 ve % 30 boya giderme sonuçları elde edildi. Ayrıca elde edilen sonuçlara göre *Trametes versicolor* ile Asit Black 1 boyası, Reaktif Blue 19 boyasına göre daha kısa sürede yüksek boya giderme yüzdesi ile giderildiği sonucu çıkarılmaktadır. Asit Black 1 boyası için, 4. günün sonunda en yüksek boya konsantrasyonunda (1.500 mg L^{-1}) çalkalamalı ve çalkalamasız koşullarda sırası ile % 98 ve % 92 boya giderme değerleri

elde edildi. Asit Black 1 boyasının konsantrasyonunun artması ile boya giderme değeri de artma olduğu gözlemlendi. Çalkalamalı koşullarda gerçekleşen boya giderme işleminde elde edilen değerlerin çalkalamasız koşullarda ulaşılan boya giderme değerlerine göre daha yüksek olduğu belirlendi.

Asit Black 1 ve Reaktif Blue 19 boya ları çalkalamalı koşullarda çalkalamasız koşullara göre daha yüksek yüzde ile giderildiğinden diğer boyaların giderilmesinde sadece çalkalamalı koşullar kullanıldı.

Dianix Reaktif Blue R boyası iki farklı konsantrasyonda (16 mg L^{-1} ve 32 mg L^{-1}) bir hafta sonunda pH: 3,6'da konsantrasyona göre sırası ile % 62 ve % 64 oranında giderilmiştir. Dianix Navy CC boyası iki farklı konsantrasyonda (60 mg L^{-1} ve 120 mg L^{-1}) bir hafta sonunda % 83 ve % 61 oranında giderilmiştir.

Trametes versicolor Bazik Blue 41 boyası iki farklı konsantrasyonda (10 mg/L 20 mg/L) 7 gün sonunda sırası ile % 93 ve % 97 oranında gidermektedir.

Tekstil atık suyunda ise bir çok farklı koşulun (pH, süre, redoks mediatörü etkisi, mikroorganizma miktarı, boya giderme besi yeri konsantrasyonu) boya gidermeye olan etkisi incelendi. 7 günün sonunda pH: 2,0'de % 78 ve pH: 3,0'te ise % 74 boya giderme değerleri elde edildi. pH: 3,0'te bir redoks mediatörü olan 1-Hidroksibenzotriazol'ün (HBT) boya gidermeye etkisi incelendi. 4,14 mM HBT boya giderme besi yerine ilave edildiğinde 7 günün sonunda % 66 boya giderme sonucu elde edildi. 4,14 mM HBT ilavesi ile boya giderme yüzdesinde % 8 bir azalma görüldü. İki farklı *T. versicolor* haciminde (5 mL ve 10 mL) alınarak mikroorganizma miktarının boya gidermeye olan etkisi incelendi. pH: 3,6' da 5 mL ve 10 mL mikroorganizma sıvı besiyerinden alınarak boya giderme besiyerine ilave edildikten 7 gün sonra sırası ile % 63 ve % 68 tekstil atık suyunun giderildiği görüldü. İki farklı boya giderme besiyerinde (Besiyeri 1: 1,25 g Malt, 0,05 g glukoz ve Besiyeri 2: 6,25 g Malt, 0,25 g glukoz) yapılan tekstil boyasının giderilmesinde ise sırası ile 7 günün sonunda % 56 ve % 74 değerlerine ulaşılmıştır. Boya giderme besiyerindeki maddelerin konsantrasyonu 5 kat arttırıldığında boya giderme değerlerinde de belirgin bir artış gözlenmiştir.

Mikroorganizmanın ise Reaktif Blue 19, Asit Black 1, Dianix Remazol Brilliant R, Dianix Navy CC ve tekstil atık suyunun giderilmesini farklı sürelerde gerçekleştirdiği sonucuna ulaşıldı.

Trametes versicolor ile boyaların ve tekstil atık suyunun giderilmesinde asidik pH değerlerinde en yüksek boya giderme değerlerinde ulaşıldı. *Trametes versicolor*'un özellikle düşük pH'da boya gideriminin daha yüksek olması düşük olması pH'sı yüksek olan atık sular için pH ayarlama maliyetini beraberinde getirebilmektedir. Bundan sonra yapılacak çalışmalarda kullanılan mikroorganizmaların pH: 7.0'ye yakın pH'larda optimum göstermesinin yapılacak çalışmaların tekstil endüstrisi atık sularının giderilmesinde daha uygulanabilir olabileceği düşünülmektedir.

Bu doktora tezi çalışması tekstil endüstrisi kaynaklı boya atık suların geleneksel arıtma yöntemlerine alternatif olabilmesi amacıyla biyobozunma (enzim ve mikroorganizma varlığında) ile atık sulardaki renklerin giderilmesi, optimum koşulların belirlenmesi açısından önem taşımaktadır. Son yıllarda tekstil endüstrisi atık sularının alıcı ortama verilmesi için renk parametresi de eklenmesi bu çalışmayı ayrıca önemli kılmaktadır.

KAYNAKLAR

-
- [1] Fazli, M. M., Mesdaghinia, A. R., Naddafi, K., Nasser, S., Yunesian, M., Assadi, M.M., Rezaie, S. ve Hamzehei, H., (2010). "Optimization of Reactive Blue 19 by Ganoderme Sp. using Response Surface Methodology", *Iran Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 7(1): 35-42.
 - [2] Song, S., Yao, J., He, Z., Qiu, J. ve Chen, J. (2008). "Effect of operational parameters on the decolorization of C.I. Reaktif blue 19 in aqueous solution by ozone-enhanced electrocoagulation", *Journal of Hazardous Material*, 152: 204–210.
 - [3] Kara, S., Aydinera, C., Demirbas, E., Kobayaa. M., Dizge, N., (2007). "Modelling the effects of adsorbent dose and particle size on the adsorption of reactive textile dyes by fly ash". *Desalination*, 212: 282-293.
 - [4] Filipkowska, U., Klimiuk, E., Grabowski, S. ve Siedlecka, E., (2002). "Adsorption of reactive dyes by modified chitin from aqueous solutions", *Polish Journal of Environmental Studie*, 11(4): 315–323.
 - [5] Epolito, W. J., Lee, Y. H., Bottomley, L. A. ve Pavlostathis, S. G., (2005). "Characterization of the textile anthraquinone dye Reactive Blue 4", *Dyes Pigments*", 67: 35–46.
 - [6] Fanchiang, J.M. ve Tseng, D.H., (2009). "Degradation of anthraquinone dye C.I. Reactive blue 19 in aqueous solution by ozonation". *Chemosphere* 77: 214 - 221.
 - [7] Shin, K.S., Oh, I.K. ve Kim, C.J., (1997). "Production and purification of Remazol brilliant blue R decolorizing peroxidase from the culture filtrate of *Pleurotus ostreatus*", *Applied Environmental Microbiology*, 63 (5): 1744–1748.
 - [8] Reddy, S.S., Kotaiah, B., Velu, M., (2006). "The removal of composite reactive dye from dyeing unit effluent using sewage sludge derived activated carbon". *Tur. J. Engg. Env. Sci*, 4: 367–373.
 - [9] Yasin, Y., Hussein, M.Z. ve Ahmad, F.H., (2007). "Adsorption of activated carbon", *Malaysian Journal of Analytical Science*, 11: 400–406.
 - [10] Parvathi, C. ve Maruthavanan, T., (2010). "Adsorptive removal of Megenta MB cold brand reactive dye by modified activated carbons derived from agricultural waste", *Indian Journal of Science and Technology*, 3(4): 408–410.

- [11] Deveci, T., Unyayar, A. ve Mazmanci, M. A. (2004). "Production of Remazol brilliant blue R decolourising oxygenase from the culture filtrate of *Funalia trogii* ATCC 200800", Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 30: 25–32.
- [12] Young, L. ve Yu, J., (1997). "Ligninase-catalysed decolorization of synthetic dyes", Water Research, 31(5): 1187–1193.
- [13] Vyas, B.R.M. ve Molitoris, H.P., (1995). "Involvement of an extracellular H₂O₂-dependent ligninolytic activity of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in the decolorization of Remazol brilliant blue R", Applied Environmental Microbiology, 61(11): 3919–3927.
- [14] Silva, M. R., Sa, L. R. V., Russo, C., Scio, E. ve Leitao, V.R. (2010). "The Use of HRP in Decolorization of Reactive Dyes and Toxicological Evaluation of Their Products", Enzyme Research, Article ID 703824, 1-7.
- [15] Cheng, Y., Lu, M. ve Liu, H.J., (2013). "Preparation of stabilized nano zero-valent iron particles via a rheological phase reaction method and their use in dye decolourization, Environmental technology", 34 (4): 445-451.
- [16] Kuleyin, A., ve Aydin, F., (2011). "Removal of Reaktif Textile Dyes (Reaktif Blue 19 and Remazol Yellow) by Surfactant-Modified Natural Zeolite", Environmental Progress and Sustainable Energy, 30 (2): 141-151.
- [17] Parsa, J.B. ve Abbasi, M., (2012). "Application of in situ electrochemically generated ozone for degradation of anthraquinone dye Reaktif Blue 19", Journal of Applied Electrochemistry, 42: 435–442.
- [18] Azizi, A., Moghaddam, M.R.A. ve Arami, M., (2012). "Application of Wood Waste For Removal of Reaktif Blue 19 from Aqueous Solutions: Optimization Through Response Surface Methodology", Environmental Engineering and Management Journal (EEMJ), 11 (4): 795-804.
- [19] Asgher, M. ve Bhatti, H.N., (2012). "Removal of reaktif blue 19 and reaktif blue 49 textile dyes by citrus waste biomass from aqueous solution: Equilibrium and kinetic study", The Canadian Journal of Chemical Engineering, 90 (2): 412-419.
- [20] Mehrali, S., Moghaddam, M.R.A. ve Hashemi, S.H., (2012). "Feasibility Study of Several Cyclic Anaerobic/Aerobic Conditions in SBR System for Treating of Simulated Dye (Reaktif Blue 19) Wastewater", Environmental Engineering and Management Journal (EEMJ), 11 (3): 617-621.
- [21] Loraine, C. V., Jacobs, P.G. ve Zamora, P., (2012). "Photoelectrochemical Degradation of Reactive Blue 19 in Aqueous Solutions, Quim. Nova", 35(5): 895-899.
- [22] Ho, C.H., Chen, L. ve Yang, C.H., (2011). "Electrochemical Decomposition of Reaktif Blue 19", Environmental Engineering Science, 28(1): 53-61.
- [23] Erkurt, E.A., Unyayar, A. ve Kumbur, H., (2007). "Decolorization of synthetic dyes by white rot fungi, involving laccase enzyme in the process", Process Biochemistry, 42: 1429–1435.

- [24] Machado, K. M. G. ve Matheus, D.R., (2006). "Biodegradation of Remazol Brilliant Blue R by Ligninolytic Enzymatic Complexs Produced by *Pleurotus Ostreatus*", *Brazilian Journal of Microbiology*, 37, 468-473.
- [25] Machado, K.M.G., Matheus, D.R. ve Bononi, V.L.R., (2005). "Ligninolytic Enzymes production and Reaktif Blue 19 Decolorization by Tropical Brazilian Basidiomycetes Fungi", *Brazilian Journal of Microbiology*, 36, 246-252.
- [26] Bogoeva-Gaceva, G., Buzarovska, A. ve Dimzoski, B., (2008). "Discoloration of Synthetic Dyeing Wastewater Using Polyaluminium Chloride", *G.U. Journal of Science*, 21(4): 123-128.
- [27] Siddique, M., Farooq. R. ve Shaheen, A., (2011). "Removal of Reactive Blue 19 from Wastewaters by Physicochemical and Biological Processes-A Review", *Journal of Chemical Society Pakistan*, 33 (2): 284-293.
- [28] Zhao, X. ve Hardin, I.R., (2007). "HPLC and spectrophotometric analysis of biodegradation of azo dyes by *Pleurotus ostreatus*", *Dyes and Pigments*, 73: 322-325.
- [29] Jamal, F., Pandey, P.K. ve Qidwai, T., (2010). "Potential of peroxidase enzyme from *Trichosanthes dioica* to mediate disperse dye decolorization in conjunction with redox mediators", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 66: 177–181.
- [30] Mahmoodi, N.M., (2013). "Nickel Ferrite Nanoparticle: Synthesis, Modification by Surfactant and Dye Removal Ability", *Water Air and Soil Pollution*, 224 (2): 224-1419.
- [31] Mahmoodi, N.M., (2013). "Magnetic ferrite nanoparticle–alginate composite: Synthesis, characterization and binary system dye removal", *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44: 322–330.
- [32] Guerrero, E., Aburto, P., Terre, E., Villegas, O., Gonzalez, E., Zayas, T., Hernandez, F. ve Torres, E., (2013). "Improvement of catalytic efficiency of chloroperoxidase by its covalent immobilization on SBA-15 for azo dye oxidation", *Journal of Porous Materterials*, 20: 387–396.
- [33] Daneshvar, N., Oladegaragoze, A. ve Djafarzadeh, N. (2006). "Decolorization of basic dye solutions by electrocoagulation: An investigation of the effect of operational parameters", *Journal of Hazardous Materials B*, 129: 116–122.
- [34] Daneshvar, N., Khataee, A.R. ve Djafarzadeh, N., (2006). "The use of artificial neural networks (ANN) for modeling of decolorization of textile dye solution containing C. I. Basic Yellow 28 by electrocoagulation process", *Journal of Hazardous Materials B*, 137: 1788–1795.
- [35] Zaroual, Z., Azzi, M., Saib, N. ve Chainet, E. (2006). "Contribution to the study of electrocoagulation mechanism in basic dye textile effluent", *Journal of Hazardous Materials B*, 131: 73-78.
- [36] Khataee, A.R. (2009). "Photocatalytic removal of C.I. Basic Red 46 on immobilized TiO₂ nanoparticles: Artificial neural network modelling", *Environmental Technology*, 30: 1155–1168.

- [37] Prasad, S, Pichiah S., ve Manickam, M., (2012). "Optimization of operating parameters using response surface methodology for adsorption of crystal violet by activated carbon prepared from mango kernel", *Sustainable Environmental Research*, 22, 1-7.
- [38] Asma, S., Muhammed, I. ve Seed, I.Z., (2009). "Immobilization of *Trichoderma viride* for enhanced methylene blue biosorption: Batch and column studies", *Journal of Hazardous Materials*, 168: 406-415.
- [39] Alexander, T. P., Marcos, R. G., Adriano, V. R., Gilsinei, M. C., Edvani, C. M. ve Jorge, N., (2006). "Removal of methylene blue dye from an aqueous media using superabsorbent hydrogel supported on modified polysaccharide", *Journal Colloid and Interface Science*, 301: 55-62.
- [40] An-Chong, C., Shin-Shing, S., Yu-Chuang, L. ve Fwu-Long, M., (2004). "Enzymatic grafting of carboxyl groups on to chitosan to confer on chitosan the property of a cationic dye adsorbent", *Bioresource Technology*, 91: 157–162.
- [41] Viridiana, S., Maria, E. ve Elba, P. (2007). "Lignin peroxidase efficiency for methylene blue decolouration: Comparison to reported methods", *Dyes and Pigments*, 74: 230-236.
- [42] Bajpai, S.K., Chand, N. ve Mahendra, M., (2012). "The adsorptive removal of cationic dye from aqueous solution using Poly(methacrylic acid) Hydrogels", *International Journal of Environmental Sciences*, 2: 1609-1624.
- [43] Elias, A., Karl-Heinz, R., Georg, M. G., Luisa, M. S. ve Arthur C.P., (2000). "Enzymatic Decolorization of Textile Dyeing Effluents", *Textile Research Journal*, 70: 409-414.
- [44] Ren, S.Z., Guo, J., Wang, Y.L., Cen, Y.H. ve Sun, G.P., (2006). "Properties of a triphenylmethane dyes decolorization enzyme TpmD from *Aeromonas hydrophila* strain DN322", *Wei Sheng Wu Xue Bao.*, 46: 385-394.
- [45] Doğan, M. ve Alkan, M., (2003). "Adsorption kinetics of methyl violet onto perlite", *Chemosphere*, 50(4): 517-28.
- [46] Gupta, V.K. ve Suhas, B.A., (2009). "Application of low-cost adsorbents for dye removal- a review". *Journal of Environmental Management*, 90: 2313–2342.
- [47] Husain, Q., (2006). "Potential Applications of the Oxidoreductive Enzymes in the Decolorization and Detoxification of Textile and Other Synthetic Dyes from Polluted Water: A Review", *Critical Reviews in Biotechnology*, 26: 201–221.
- [48] Liu, J.Z., Wang, T.L. ve Ji, L.N., (2006). "Enhanced dye decolorization efficiency by citraconic anhydride-modified horseradish peroxidase", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 41: 81–86.
- [49] Levin, L., Papinutti, L. ve Forchiassin, F., (2004). "Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzymes and decolorize industrial dyes", *Bioresearch Technology*, 94: 169–176.

- [50] Bhunia, A., Susheel, D. ve Wangikar, P.P., (2001). "Horseradish peroxidase catalyzed degradation of industrially important dyes", *Biotechnology and Bioengineering*, 72: 562–567.
- [51] Knutson, K., Kirzan, S. ve Ragauskas, A., (2005). "Enzymatic biobleaching of two recalcitrant paper dyes with horseradish and soybean peroxidase", *Biotechnology Letters*, 27: 753–758.
- [52] Mohan, S.V., Prasad, K.K., Rao, N.C. ve Sarma, P.N., (2005). "Acid azo dye degradation by free and immobilized horseradish peroxidase (HRP) catalyzed process", *Chemosphere*, 58: 1097–1105.
- [53] O'Brien, A.M. ve O'Fagain, C., (2000). "Dye bleaching and phenol precipitation by phthalic anhydride-modified horseradish peroxidase", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 75: 363-368.
- [54] Ulson de Souza, S.M.A.G., Forgiarini, E. ve Ulson de Souza, A.A., (2007). "Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP)", *Journal of Hazardous Materials*, 147: 1073–1078.
- [55] Tatsumi, K., Wada, K. ve Ichikawa, H., (1996). "Removal of chlorophenols from wastewater by immobilized horseradish peroxidase", *Biotechnolgy and Bioengineerin*, 51: 126–130.
- [56] Novotny, C., Rawal, B., Bhatt, M., Patel, M., Susek, V. Ve Molutoris, H.P., (2001). "Irpex lactless and Pleatotus ostreatus for decolourization of chemically different dyes", *Journal of Biotechnology*, 89: 113–122.
- [57] Harazona, K., Watanabe, Y. ve Nakamura, K., (2003). "Decolorization of azo dye by the white-rot basidiomycete *phanerochaete sordida* and by its manganese peroxidase", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 95: 455–459.
- [58] Onder, S., Celebi, M., Altikatoglu, M., Hatipoglu, A. ve Kuzu, H., (2011). "Decolorization of naphthol blue black using the horseradish peroxidase", *Applied Biochemistry and Biotechnolgy*, 163, 433–443.
- [59] Aitken, M. D. (1993). "Waste treatment applications of enzymes: opportunities and obstacles". *Chemical Engineering Journal*, 52, B49–B58.
- [60] Altıkatoğlu, M. ve Çelebi, M., (2011). "Enhanced Stability and Decolorization of Coomassie Brilliant Blue R-250 by Dextran Aldehyde-modified Horseradish Peroxidase", *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 39 (3), 185-190.
- [61] Kuzu H., Altıkatoğlu M., Çelebi M. ve Öztolan Ö., "Degradation of Dyes with HRP and Its Dextran Conjugate", *FEBS Journal*, 275, 410-410, (2008).
- [62] Önder, R. S. Çelebi, M., Altıkatoğlu, M. ve Kuzu, H., (2009). "The Effect of Horseradish Peroxidase (HRP)-Dextran Conjugate on Naphtol Blue Black", *Y.T.Ü. Journal of Engineering and Natural Sciences, Sigma*, 27, 18-25.
- [63] Çelebi, M. Altıkatoğlu, M., Akdeste, Z. ve Yıldırım, H., (2010). "Spectrophotometric Determination of Bleaching of textile dyes by peroxidase

- enzyme", V. International Bioengineering Congress, Turkey, 16-19 June 2010, İzmir.
- [64] Çelebi, M., Altıkatoğlu, M., Akdeste., Z. Ve Yıldırım, H. "Determination of decolorization properties of reactive blue 19 dye using Horseradish Peroxidase", Türk Biyokimya Dergisi, (Kabul edildi).
- [65] Okazaki, S., Nagasawa, S., Goto, M., Furusaki, S., Wariishi, H. Ve Tanaka, H. (2002). "Decolorization of azo and anthraquinone dyes in hydrophobic organic media using microperoxidase-11 entrapped in reversed micelles", Biochemical Engineering Journal, 12: 237–241.
- [66] Kocaer, F.O. ve Alkan, U., (2002). "Boya İçeren Tekstil Atık Sularının Arıtım Alternatifleri", Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi, 7 (1): 47-55.
- [67] Başer, İ. Ve İnanıcı, Y., 1990. Boya Kimyası, Marmara Üniversitesi Yayını, Yayın No 482, İstanbul.
- [68] EPA (Environmental Technology Best Practice Programme), (1997). Water and Chemical Use in the Textile Dyeing and Finishing Industry, Washington.
- [69] Wiesmann, U., Choi, I. S. ve Dombrowski. E.M., (2007). Fundamentals of Biological Wastewater Treatment, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim.
- [70] Satar, R. ve Husain, Q., (2009). "Phenol-mediated decolorization and removal of disperse dyes by bitter melon (Momordica charantia) peroxidase", India Environmental Technology, 30: 1519–1527.
- [71] Bisschops, I. Ve Spanjers, H., (2003). "Literature review on textile wastewater, characterisation", Environmental Technology, 24: 1399-1411.
- [72] Demir, A., Kanat, G., Debik, E., (2000). Atıksu Arıtımında Fiziksel, Kimyasal ve Biyolojik Metodlar, Y.T.Ü. İN.DK.-2000.0586, İstanbul.
- [73] Barclay, S. ve Buckley, C., (2000). Waste Minimisation Guide for the Textile Industry: A Step Towards Cleaner Production (Volume 1).
- [74] EPA (Environmental Technology Best Practice Programme), (1996). Best Management Practices for Pollution Prevention in the Textile Industry. Washington.
- [75] T.C. Resmi Gazete, Çevre ve Orman Bakanlığından Resmi Gazete Alıcı ortama atıksu deşarjı konusunda çevre iznine tabi işletmeler için genel hükümler. (27537), 30.03.2010.
- [76] Pavko, A., (2011). Fungal Decolourization and Degradation of Synthetic Dyes Some Chemical Engineering Aspects. Waste Water–Treatment and Reutilization Editör: Prof. Fernando Sebastian Garcia Einschlag, InTech.
- [77] Hao, O. J., Hyunook, K. Ve Chiang P. (2000). "Decolorization of wastewater", Critical reviews in environmental science and technology, 30, 449-505.

- [78] Singh, H. (2006). *Mycoremediation-Fungal Bioremediation*, Wiley Interscience, 421-471, New Jersey.
- [79] Knapp, J. S., Vantoch-Wood, E. J. ve Zhang, F. (2001). Use of Wood – rotting fungi 143ort he decolorization of dyes and industrial effluents, *Fungi in Bioremediation*, G. M. Gadd(Ed.), 253-261, Cambridge University Press.
- [80] Willmott, N., Guthrie, J. ve Nelson, G., (1998). “The biotechnology approach to colour removal from textile effluent”, *Biotechnology, JSDC*, 114: 38-41.
- [81] Chengalroyen, M. D. ve Dabbs, E. R., (2013). “The microbial degradation of azo dyes: minireview”, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29: 389–399.
- [82] Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R. ve Nigam, P. (2001). “Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment 143ort he143gies with a proposed alternative” *Bioresource technology*, 77: 247-255.
- [83] Kaykioğlu, G. ve Debik, E., (2006). “Color Removal From Textile Wastewater with Anaerobic Treatment Processes”, *Journal of Engineering and Natural Sciences, Review Paper*, 4: 59-68.
- [84] Robinson, T., Chandran, B. ve Nigam, P. (2001). “Studies on the production of enzymes by white-rot fungi 143ort he decolourisation of textile dyes”. *Enzyme and Microbial technology*, 29: 575-579.
- [85] Khan, A. A. ve Husain, Q., (2007). “Decolorization and removal of textile and non-textile dyes from polluted wastewater and dyeing effluent by using potato (*Solanum tuberosum*) soluble and immobilized polyphenol oxidase”, *Bioresource Technology*, 98: 1012–1019.
- [86] Altıkatoğlu, M., (2007). *Enzim-Dekstran Konjugatları*, Doktora Tezi, Y.T.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [87] Durán, N. ve Esposito, E., (2000). “Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review”, *Applied Catalysis B: Environmental*, 28: 83–99.
- [88] Enaud, E., Trovaslet, M., Bruyneel, F., Billottet, L., Karaaslan, R., Sener, M. E., Coppens, P. Ve Casas, A., (2010). “A novel azoanthraquinone dye made through innovative enzymatic process”. *Dyes and Pigments*, 85: 99-108.
- [89] Riva, S., (2006), “Laccases: blue enzymes for 143ort chemistry”, *Trends in Biotechnology*, 24: 219-226.
- [90] Temoçin, H., (2006). *Tekstil Atık Sularının Renginin Giderilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [91] Hatakka, A., (2001). In: *Biopolymers. Biology, Chemistry, Biotechnology, Applications. Vol 1. Lignin, Humic Substances and Coal.*, Editörler: Hofrichter, M. & Steinbüchel, A., Wiley-VCH, Weinheim.
- [92] Kirk, T.K. ve Cullen D., (1998). *Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. Environmentally Friendly Technologies 143ort he Pulp and Paper Industry.*, Editörler: Young, R.A. ve Akhtar, M., John Wiley

ve Sons, New York.

- [93] Altıkatoğlu, M., Başaran, Y., Arıöz, C., Ogan A. ve Kuzu, H., (2010). "Glucose Oxidase-dextran Conjugates with Enhanced Stabilities Against Temperature and pH", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160: 2187–2197.
- [94] Mustafaev, M.I., Mustafaeva, Z., Bermek, E. Ve Osada, Y., (1998). "New Amphiphilic Immunogens by Cu^{2+} -Mediated Complexes of Water-Born Poly(N-isopropylacrylamide) and Bovine Serum Albumin", *J. Bioact Compet. Polym.*, 13: 33-49.
- [95] Mustafaev, M.I., (1996), *Biyopolimerler*, Marmara Araştırma Merkezi, Kocaeli.
- [96] Kuzu, H., Altikatoglu, M., Oztolan, O., Arslan, A., Celebi, M., Arioiz, C. ve Basaran, Y., (2006). "The Complexes of Enzymes with Water Soluble Polymers", *FEBS Journal*, 273, 363-363.
- [97] Altıkatoğlu, M., Oztolan, O., Arslan, A., Çelebi, M., Arıöz, C., Başaran, Y., Kuzu, H. Ve Mustafaev, M. (2006). "Dextran-Enzyme Conjugates and Their Characteristics", 3rd. International Congress on Biocatalysis, September, Hamburg.
- [98] Çelebi, M., Öztolan, Ö., Altıkatoğlu, M. ve Kuzu, H., (2007). "Enzyme-Dextran Sulphate Conjugates", 4th European Symposium on Biopolymers, October, Kusadası.
- [99] Arioiz, C., Oztolan, O., Celebi, M. ve Kuzu, H., (2007). "Activity Determination of Enzyme-Dextran Sulphate Conjugates", *FEBS Journal*, 274, 277-277.
- [100] Boyer, R. F., (1993). *Modern Experimental Biochemistry*, Hope Collage, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. California.
- [101] Demir, S., Gok, S.B., ve Kahraman M.V., (2012). "alpha-Amylase Immobilization on Functionalized Nano CaCO_3 by Covalent Attachment", *Starch*, 64: 3-9.
- [102] Madakbaş, S., Danış, O., Demir, S. ve Kahraman, M.V., (2013). "Xylanase immobilization on functionalized polyaniline support by covalent attachment", *Starch*, 65: 146-150.
- [103] Baştürk, E., Demir, S., Danış, Ö. Ve Kahraman, M.V., (2013). "Covalent immobilization of alpha-amylase onto thermally cross-linked electro spun PVA/PAA nanofibrous hybrid membranes", *Journal of Applied Polymer Science*, 127: 349–355.
- [104] Costa, S. A., Azevedo, H. S., ve Reis, R.L., (2005). *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Part 17. Enzyme Immobilization in Biodegradable Polymers for Biomedical Applications*, Editörler: Reis, L. R., ve Roman, J. S., CRC Press. U.S.
- [105] Pilatin, S., (2004). *Beyaz Çürükçül Funguslar ile Tekstil Boyaların Renginin Giderilmesi*, Doktora tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir.

- [106] Call, H., Mucke, L., (1997). "History, Overview and Applications of Mediated Lignolytic Systems, Especially Laccase-Mediator Systems", Journal of Biotechnology, 53, 163-202.
- [107] Mercimek, H. A., (2007). Trametes Versicolor'ın Tekstil Boyalarının Gideriminde Kullanım Olanakları, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gaziantep.
- [108] Arisan, İ. Ve Peksel, A., (2000). Biyoteknolojinin Temel İlkeleri, Y.T.Ü. İstanbul.
- [109] Fu, Y. ve Viraraghavan, T., (2001). "Fungal Decolorization of Dye Wastewater: a Review", Biosource Technology, 79: 251-262.
- [110] Acar, S., (2006). Protein Peptid Kovalent Konjugasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Y.T.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [111] Çimen N., (2006). Proteinlerin Poliakrilik Asit ile Suda Çözünmeyen Kompleksleri, Yüksek Lisans Tezi, Y.T.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [112] Shi, J.X., Zhang, X.N., Xie, W.H., Zhou, Y.F, Zhang, Z.P., Deng, J.Y., Cass, A.E.G., Zhang, Z.L., Pang, W.V. ve Zhang, C.G. (2004). "Improvement of Homogeneity of Analytical Biodevices by Gene Manipulation", Analytical Chemistry, 76: 632-638.
- [113] Cano, A., Minguillon, C., Palet, C., (2006). "Immobilization of endo-1,4- β -xylanase on polysulfone acrylate membranes: Synthesis and characterization", Journal of Membrane Science, 280: 383–388.
- [114] Altıkatoglu, M. ve Başaran, Y., (2011). "Additive Effect of Dextran on the Stability of Horseradish Peroxidase", Protein Journal, 30: 84–90.
- [115] Battal, Y.B., (2006). Anyonik Polielektrolitlerin Sığır Serum Albuminle Etkileşiminin Floresans Yöntemi ile İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Y.T.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [116] Borchert M, Libra AJ. (2001). "Decolorization of Reactive Dyes by the White Rot Fungus Trametes versicolor in Sequencing Batch Reactors", Biotechnology and Bioengineering. 75, 313-321.
- [117] Zhao, X., Hardin, I.R. ve Hwang, H.M., (2006). "Biodegradation of a model azo disperse dye by the white rot fungus Pleurotus ostreatus", International Biodeterioration and Biodegradation, 57: 1–6.
- [118] Satar, R. Ve Husain, Q., (2009). "Phenol-mediated decolorization and removal of disperse dyes by bitter melon (*Momordica charantia*) peroxidase", India Environmental Technology 30: 1519–1527.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Mithat ÇELEBİ
Doğum Tarihi ve Yeri : 1981 Havza
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : celebimithat@gmail.com; mithat.celebi@yaloa.edu.tr

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Biyomühendislik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2007
Lisans	Kimya	Yıldız Teknik Üniversitesi	2004
Lise	Fen Bilimleri	Ladik Akpınar Anadolu Öğretmen Lisesi	1999

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2009 –Devam Ediyor	Yalova Üniversitesi	Öğretim Görevlisi

YAYINLARI

Makale

1. Onder, S., Çelebi, M., Altikatoglu, M., Hatipoglu, A., Kuzu, H. (2011). Decolorization of Naphthol Blue Black using the Horseradish Peroxidase., *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 163 (3), 433-443.
2. Altikatoglu, M., Çelebi, M., (2011). Enhanced stability and decolorization of Coomassie Brilliant Blue R-250 by dextran aldehyde-modified Horseradish Peroxidase., *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology: An International Journal*. 39 (3), 185-190.
3. Çelebi, M., Altıkatoğlu, M., Akdeste., Z. Ve Yıldırım, H. “Determination of decolorization properties of reactive blue 19 dye using Horseradish Peroxidase”, *Turkish Journal of Biochemistry*, Kabul edildi.

Bildiri

1. H. Kuzu, M. Altikatoglu, O. Oztolan, A. Arslan, M. Celebi, C. Arioz, Y. Basaran, “The Complexes of Enzymes with Water Soluble Polymers”, *FEBS Journal*, 273, 363-363, (2006).
2. M.Altıkatoğlu, O.Oztolan, Aslı Arslan, M. Çelebi, C. Ariöz, Y. Başaran, H. Kuzu, Dextran-Enzyme Conjugates and Their Characteristics, *International Congress on Biocatalysis*, September, Hamburg, (2006).
3. M. Çelebi, Ö. Öztolan, M. Altıkatoğlu, H. Kuzu, “Enzyme-Dextran Sulphate Conjugates”, 4th European Symposium on Biopolymers, Kusadası, October (2007).
4. C. Arioz, O. Oztolan, M. Celebi, H. Kuzu, “Activity Determination of Enzyme-Dextran Sulphate Conjugates”, *FEBS Journal*, 274, 277-277, (2007).
5. Kuzu H., Altıkatoğlu M., Çelebi M., Öztolan Ö., “Degradation of Dyes with HRP and Its Dextran Conjugate”, *FEBS Journal*, 275, 410-410, (2008).
6. Mithat Çelebi, Melda Altikatoglu, Zeynep Akdeste, Hüseyin Yıldırım., “Spectrophotometric Determination of Bleaching of textile dyes by peroxidase enzyme”, V. International Bioengineering Congress, İzmir, Turkey, 16-19 June, 2010.

7. Mithat Çelebi, Melda Altıkatoğlu, Zeynep Akdeste, Hüseyin Yıldırım., Enzim Etkisi ile Reaktif Tekstil Boyasının Giderilmesinde Başlangıç Boya Konsantrasyonunun Etkisinin İncelenmesi, 24. Ulusal Kimya Kongresi, Zonguldak, Türkiye, 29 Haziran- 2 Temmuz 2010.
8. Mithat Çelebi, Melda Altıkatoğlu, Hüseyin Yıldırım, Zeynep Akdeste., Removal of Textile Industry Dyes with Enzymes, Paint İstanbul, 23-26 Eylül 2010, 229-231.

Proje

1. “Horseradish” Peroksidaz (HRP) ve Türevleri Kullanılarak Çevre Kirleticili Boyaların Giderilmesi. Yıldız Teknik Üniversitesi Araştırma Fonu, Araştırmacı, 2007-2010. (29-01-02-GEP01) (APK)