



T.C.
SIVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KATALAZ VE PEROKSİDAZ ENZİMLERİNİN PARAFİN
DESTEKTE İMMOBİLİZE EDİLEREK TEKSTİL BOYASI
GİDERİLMESİNDE KULLANIMININ İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BURCU EROL

(201492011025)

Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Şenay ÇETİNUS

SİVAS

2019

Burcu EROL'un hazırladığı ve “**KATALAZ VE PEROKSİDAZ ENZİMLERİNİN PARAFİN DESTEKTE İMMOBİLİZE EDİLEREK TEKSTİL BOYASI GİDERİLMESİNDE KULLANIMININ İNCELENMESİ**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ OLARAK** kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı **Prof. Dr. Şenay ÇETİNUS**
Cumhuriyet Üniversitesi



Jüri Üyesi **Prof. Dr. Ferda CANDAN**
Cumhuriyet Üniversitesi



Jüri Üyesi **Dr. Öğr. Üyesi Fatma GEDİKLİ**
Gaziosmanpaşa Üniversitesi



Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. İsmail ÇELİK

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 20.08.2014 tarihli ve 7 sayılı kararı ile kabul edilen Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırlanmıştır.

Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) Komisyonu tarafından F- 547 Nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

Bütün hakları saklıdır.

Kaynak göstermek koşuluyla alıntı ve gönderme yapılabilir.

© Burcu EROL, 2019

ETİK

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- ✓ Bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- ✓ Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- ✓ Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere, bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- ✓ Bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir farklılık yapmadığımı,
- ✓ Tezin herhangi bir bölümünü, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi veya bir başka üniversitede, bir başka tez çalışması olarak sunmadığımı; beyan ederim.

26/06/2019

Burcu EROL



TEŞEKKÜR

Tezimin bütün aŐamalarında yardımını ve desteğini esirgemeyen değerli hocam ve tez danıŐmanım Prof. Dr. Şenay ÇETİNUS'a,

Yüksek Lisans eğitimim süresince üzerimde emekleri olan değerli hocalarım Prof. Dr. Ferda CANDAN'a ve Prof. Dr. H. Nursevin ÖZTOP'a,

Tezimi maddi olarak destekleyen Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimine,

ÇalıŐmam esnasında beni her zaman olumlu yönde motive eden maddi ve manevi anlamda her zaman yanımda olan aileme,

AraŐtırmamın her aşamasında bana destek olan kıymetli eŐim Türker EROL'a,

Canım oğlum Ali Eren EROL'a sonsuz teşekkür ve Őükranlarımı sunarım.

ÖZET

KATALAZ VE PEROKSİDAZ ENZİMLERİNİN PARAFİN DESTEKTE İMMOBİLİZE EDİLEREK TEKSTİL BOYASI GİDERİLMESİNDE KULLANIMININ İNCELENMESİ

Burcu EROL

Yüksek Lisans Tezi

Biyokimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Şenay ÇETİNUŞ

2019, 80+xviii sayfa

Bu çalışmanın ilk bölümünde, katalaz ve horseradish peroksidazın (HRP) parafin destekte immobilizasyonu incelendi. Serbest ve immobilize enzimlerin optimum sıcaklık, optimum pH, termal kararlılık, pH kararlılık, kullanım kararlılığı, saklama kararlılığı, Km ve Vmax değerleri gibi biyokimyasal parametreleri araştırıldı. Serbest ve immobilize katalaz için optimum sıcaklık ve termal kararlılık 35 °C, optimum pH ve pH kararlılığı ise 7.0 olarak bulundu. Serbest katalaz için Km= 72,91 mM, Vmax= 137.738,00 µmol.mg enzim⁻¹, parafin destekte immobilize katalaz için Km= 83,58 mM, Vmax= 1.500,00 µmol.mg enzim⁻¹ olarak bulundu. Serbest ve immobilize peroksidaz için optimum sıcaklık 40 °C, termal kararlılık 35 °C, optimum pH ve pH kararlılığı ise 7.0 olarak bulundu. Serbest peroksidaz için Km= 21,28 mM, Vmax= 9.393.199,00 µmol.mg enzim⁻¹, parafin destekte immobilize peroksidaz için Km= 25,39 mM, Vmax= 2.224.990,00 µmol.mg enzim⁻¹ olarak bulundu.

Çalışmanın ikinci bölümünde ise immobilize peroksidaz kullanılarak Asit Blue 129 (AB 129) ve Asit Blue 113 (AB 113) boyaalarının renk giderimi incelendi. Sıcaklık, pH, enzim derişimi, boya derişimi ve hidrojen peroksit derişiminin boya giderimine etkisi araştırıldı. İmmobilize peroksidaz ile AB 129 boyasının renk giderimi (% 85) AB 113'ten daha yüksek (% 50) olduğu bulundu. AB 129 boyasının en yüksek boya giderimi değerleri 20 °C sıcaklıkta, pH: 5.0'te, 0,1 mg.mL⁻¹ boya, 0,4 mM H₂O₂ ve 0,312 mg immobilize peroksidaz derişiminde gözlemlendi.

Sonuç olarak, parafin destekte immobilize peroksidaz kullanılarak tekstil atık sularının çevreye zararsız türlere dönüştürülebilmesi ile renk giderimi sağlanabileceği gözlemlendi.

Anahtar kelimeler: Katalaz, peroksidaz, immobilizasyon, parafin, boya giderimi, Asit Blue 129, Asit Blue 113.

ABSTRACT

IMMOBILIZATION OF CATALASE AND PEROXIDASE ENZYMES IN PARAFFIN SUPPORT AND INVESTIGATION OF THE DECOLORIZATION EFFECT ON TEXTILE DYES

Burcu EROL

Master of Science Thesis

Department of Biochemistry

Supervisor: Prof. Dr. Şenay ÇETİNUŞ

2019, 80+xviii pages

In the first part of this study, the immobilization of catalase and horseradish peroxidase (HRP) in paraffin support was investigated. Biochemical parameters such as optimum temperature, optimum pH, thermal stability, pH stability, usage stability, storage stability, K_m and V_{max} values of free and immobilized enzymes were investigated. Optimum temperature and thermal stability were found to be 35 °C, optimum pH and pH stability were found to be 7.0 for the free and immobilized catalase. It was found that $K_m = 72,91$ mM, $V_{max} = 137.738,00$ $\mu\text{mol.mg enzyme}^{-1}$ for free catalase and $K_m = 83,58$ mM, $V_{max} = 1.500,00$ $\mu\text{mol.mg enzyme}^{-1}$ for immobilized catalase in paraffin support. Optimum temperature and thermal stability were found to be 40 °C, 35 °C respectively, optimum pH and pH stability were found to be 7.0 for the free and immobilized HRP peroxidase. It was found that $K_m = 21,28$ mM, $V_{max} = 9.393.199,00$ $\mu\text{mol.mg enzyme}^{-1}$ for free HRP peroxidase and $K_m = 25,39$ mM, $V_{max} = 2.224.990,00$ $\mu\text{mol.mg enzyme}^{-1}$ for immobilized HRP peroxidase in paraffin support.

In the second part of the study, the effect of decolorization from Acid Blue 129 (AB 129) and Acid Blue 113 (AB 113) dyes were investigated by using immobilized HRP peroxidase enzyme. The effects of temperature, pH, enzyme concentration, dye concentration and hydrogen peroxide concentration on the decolorization were investigated. Using the immobilized peroxidase, the effect of decolorization in AB 129 dye was found to be higher (85%) than that of AB 113 (50%). The highest decolorization effect of AB 129 was achieved at 20 °C, pH 5.0, with 0,1 mg.mL^{-1} dye, 0,4 mM H_2O_2 and 0,312 mg immobilized peroxidase.

As a result, it was observed that the decolorization of textile wastewater by using immobilized peroxidase in paraffin support can be converted into environmentally harmless species.

Key Words: Catalase, peroxidase, immobilization, paraffin, decolorization, Acid Blue 129, Acid Blue 113

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xvi
SİMGELER DİZİNİ	xvii
KISALTMALAR DİZİNİ	xviii
1.GİRİŞ	1
1.1 Enzim Aktivitesi	2
1.1.1 Enzim aktivitesine etki eden faktörler	3
1.2 Enzimlerin Kinetiği.....	4
1.3 Katalaz (EC: 1.11.1.6)	6
1.4 Peroksidaz (EC:1.11.1.7)	7
1.5 Parafin	11
2. ENZİM İMMOBİLİZASYONU	13
2.1 Enzimlerin İmmobilizasyon Yöntemleri	13
2.1.1 Bağlanma	14
2.1.1.1 Çapraz bağlanma.....	14
2.1.1.2 Taşıyıcıya bağlanma	14
2.1.2 Tutuklanma	18
2.2 Uygun İmmobilizasyon Yönteminin Seçilmesi.....	19
3. TEKSTİL BOYAR MADDELER	20
3.1 Boyaların Kullanım Amacına Göre Sınıflandırılması	21
3.1.1 Asidik boyalar	21
3.1.2 Bazik boyalar	21
3.1.3 Reaktif boyalar.....	21
3.1.4 Direkt boyalar	22
3.1.5 Dispers boyalar	22
3.1.6 Mordan boyalar.....	22
3.1.7 Küpe boyalar.....	23
3.1.8 Metal-Kompleks boyalar	23
3.1.9 Pigment boyalar	23

3.1.10 İnkışaf Boyalar.....	23
3.2 Kullanılan Boyalar.....	24
3.2.1 Asit Blue 129 boyası ve özellikleri.....	24
3.2.2 Asit Blue 113 boyası ve özellikleri.....	25
3.3 Tekstil Atık Sularında Boya Giderme Yöntemleri.....	26
3.3.1 Boyaların enzimler ile giderimi.....	26
4. MATERYAL VE METOD.....	30
4.1 Kullanılan Cihazlar.....	30
4.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	30
4.3 Kullanılan Çözeltiler.....	30
4.4 Katalaz ve Peroksidazın Parafin Destekte İmmobilizasyonu.....	31
4.5 Katalaz Enziminin Aktivite Tayini.....	32
4.5.1 Serbest ve immobilize katalaz aktivitesinin ölçülmesi.....	32
4.5.1.1 Serbest ve immobilize katalazın optimum sıcaklığının belirlenmesi..	34
4.5.1.2 Serbest ve immobilize katalazın optimum pH'ının belirlenmesi.....	34
4.5.1.3 Serbest ve immobilize katalazın kinetik sabitlerinin belirlenmesi.....	34
4.5.1.4 Serbest ve immobilize katalazın termal kararlılığının belirlenmesi...35	
4.5.1.5 Serbest ve immobilize katalazın pH kararlılığının belirlenmesi.....35	
4.5.1.6 Serbest ve immobilize katalazın saklama kararlılığının belirlenmesi.35	
4.5.1.7 İmmobilize katalazın kullanım kararlılığının belirlenmesi.....35	
4.6 Horseradish Peroksidaz (HRP) Enziminin Aktivite Tayini.....	36
4.6.1 Serbest peroksidazın aktivitesinin ölçülmesi.....	36
4.6.1.1 Serbest ve immobilize peroksidazın optimum sıcaklığının belirlenmesi.....	38
4.6.1.2 Serbest ve immobilize peroksidazın optimum pH'ının belirlenmesi..38	
4.6.1.3 Serbest ve immobilize peroksidazın kinetik sabitlerinin belirlenmesi38	
4.6.1.4 Serbest ve immobilize peroksidazın termal kararlılığının belirlenmesi.....	39
4.6.1.5 Serbest ve immobilize peroksidazın pH kararlılığının belirlenmesi...39	
4.6.1.6 Serbest ve immobilize peroksidazın saklama kararlılığının belirlenmesi.....	39
4.6.1.7 İmmobilize peroksidazın kullanım kararlılığının belirlenmesi.....	40
4.7 SEM Analizleri.....	40
4.8 Parafin Destekte İmmobilize HRP Enzimi İle AB 129 ve AB 113 Boyalarının Rengin Giderilmesi.....	40

4.8.1 İmmobilize peroksidaz ile AB 129 boyasının renk giderimi.....	40
4.8.1.1 Sıcaklık etkisi.....	41
4.8.1.2 pH etkisi.....	41
4.8.1.3 Enzim derişiminin etkisi.....	41
4.8.1.4 Boya derişiminin etkisi.....	41
4.8.1.5 H ₂ O ₂ derişimi etkisi.....	42
4.8.2 İmmobilize peroksidaz ile AB 113 boyasının renk giderimi.....	42
4.8.2.1 Sıcaklık etkisi.....	43
4.8.2.2 pH etkisi.....	43
4.8.2.3 Enzim derişiminin etkisi.....	43
4.8.2.4 Boya derişiminin etkisi.....	43
4.8.2.5 H ₂ O ₂ derişimi etkisi.....	43
5. BULGULAR.....	44
5.1 Katalaz Enzimi İçin Bulgular.....	44
5.1.1 Serbest ve immobilize katalazın optimum sıcaklığının belirlenmesi.....	44
5.1.2 Serbest ve immobilize katalazın optimum pH'ının belirlenmesi.....	44
5.1.3 Serbest ve immobilize katalazın kinetik sabitlerinin belirlenmesi.....	45
5.1.4 Serbest ve immobilize katalazın termal kararlılığının belirlenmesi.....	47
5.1.5 Serbest ve immobilize katalazın pH kararlılığının belirlenmesi.....	47
5.1.6 İmmobilize katalazın kullanım kararlılığının belirlenmesi.....	48
5.1.7 Serbest ve immobilize katalazın saklama kararlılığının belirlenmesi.....	49
5.2 HRP Enzimi İçin Bulgular.....	51
5.2.1 Serbest ve immobilize peroksidazın optimum sıcaklığının belirlenmesi.....	51
5.2.2 Serbest ve immobilize peroksidazın optimum pH'ının belirlenmesi.....	51
5.2.3 Serbest ve immobilize peroksidazın kinetik sabitlerinin belirlenmesi.....	52
5.2.4 Serbest ve immobilize peroksidazın termal kararlılığının belirlenmesi.....	54
5.2.5 Serbest ve immobilize peroksidazın pH kararlılığının belirlenmesi.....	54
5.2.6 İmmobilize peroksidazın kullanım kararlılığının belirlenmesi.....	55
5.2.7 Serbest ve immobilize peroksidazın saklama kararlılığının belirlenmesi.....	56
5.3 SEM Görüntüleri.....	57
5.4 İmmobilize Horseradish Peroksidaz ile Asit Blue 129 (AB 129) Boyasının Renginin Giderilmesi.....	59
5.4.1 Zaman etkisi.....	59
5.4.2 Sıcaklık etkisi.....	59

5.4.3 pH etkisi	61
5.4.4 Enzim derişimi etkisi	62
5.4.5 Boya derişimi etkisi	62
5.4.6 H ₂ O ₂ derişimi etkisi	63
5.5 İmmobilize Horseradish Peroksidaz ile Asit Blue 113 (AB 113) Boyasının Renginin Giderilmesi	64
5.5.1 Zamanın etkisi.....	64
5.5.2 Sıcaklık etkisi.....	64
5.5.3 pH etkisi	66
5.5.4 Enzim derişimi etkisi	66
5.5.5 Boya derişimi etkisi	67
5.5.6 H ₂ O ₂ derişimi etkisi	68
6. TARTIŞMA VE SONUÇ	69
KAYNAKLAR	75
ÖZGEÇMİŞ	80

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	Enzim şematik gösterimi.	1
Şekil 1.2	Michaelis-Menten grafiği.	5
Şekil 1.3	Lineweaver-Burk grafiği.	6
Şekil 1.4	Yaygın olarak kullanılan peroksidaz substratları.	9
Şekil 1.5	Peroksidazın guaiakol substratını guaiakolün renkli oksidasyon ürünlerine çevirme mekanizması.	10
Şekil 2.1	Enzim immolizasyon yöntemleri	13
Şekil 2.2	Çapraz bağlanma.	14
Şekil 2.3	Taşıyıcıya bağlanma.	15
Şekil 2.4	İyonik bağlanma ile taşıyıcıya bağlanma	16
Şekil 2.5	Enzimin taşıyıcıya bir ajan olmadan kovalent olarak bağlanması	17
Şekil 2.6	Enzimin taşıyıcıya bir ajan ile kovalent olarak bağlanması	17
Şekil 2.7	Enzimin (a) matriks içine, (b) fiber içine, (c) kapsül içine tutuklanması.	18
Şekil 3.1	Asit Blue 129 boyası.	24
Şekil 3.2	Asit Blue 113 boyası.	25
Şekil 3.3	Bayır turpu (<i>Armoracia rusticana</i>) “Horseradish” bitkisi	27
Şekil 3.4	HRP C'nin X-ışını kristal yapısının üç boyutlu gösterimi.	28
Şekil 3.5	HRP C'nin hem bağlayıcı bölgesindeki anahtar aminoasit kalıntıları.	28
Şekil 3.6	HRP enziminin genel çalışma mekanizmasının şematik gösterimi.	29
Şekil 4.1	(a)1 cm ² boyutlarında kesilmiş pamuklu kumaş parçaları.	31
Şekil 4.2	Serbest katalaz aktivite tayini şematik gösterimi.	32
Şekil 4.3	İmmobilize katalaz aktivite tayini şematik gösterimi.	33
Şekil 4.4	Serbest peroksidaz aktivite tayini şematik gösterimi.	36
Şekil 4.5	İmmobilize peroksidaz aktivite tayini şematik gösterimi.	37
Şekil 4.6	İmmobilize peroksidaz ile AB 129 boyasının renk giderim yöntemi şematik gösterimi.	41
Şekil 4.7	İmmobilize peroksidaz ile AB 113 boyasının renk giderim yöntemi şematik gösterimi.	42
Şekil 5.1	Serbest ve immobilize katalazın optimum sıcaklık grafiği.	44
Şekil 5.2	Serbest ve immobilize katalazın optimum pH grafiği.	45
Şekil 5.3	Serbest katalazın Lineweaver-Burk grafiği.	46
Şekil 5.4	İmmobilize katalazın Lineweaver-Burk grafiği.	46

Şekil 5.5 Serbest ve immobilize katalazın termal kararlılık grafiği.	47
Şekil 5.6 Serbest ve immobilize katalazın pH kararlılık grafiği.....	48
Şekil 5.7 İmmobilize katalazın kullanım kararlılığı grafiği.	48
Şekil 5.8 Serbest katalazın 4 °C ve 20 °C’de saklama kararlılığı grafiği.	49
Şekil 5.9 İmmobilize katalazın 4 °C ve 20 °C’de saklama kararlılığı grafiği.....	50
Şekil 5.10 Serbest ve immobilize peroksidazın optimum sıcaklık grafiği.	51
Şekil 5.11 Serbest ve immobilize peroksidazın optimum pH grafiği.....	52
Şekil 5.12 Serbest peroksidazın Lineweaver-Burk grafiği.	53
Şekil 5.13 İmmobilize peroksidazın Lineweaver-Burk grafiği.	53
Şekil 5.14 Serbest ve immobilize peroksidazın termal kararlılık grafiği.	54
Şekil 5.15 Serbest ve immobilize peroksidazın pH kararlılık grafiği.....	55
Şekil 5.16 İmmobilize peroksidazın kullanım kararlılığı grafiği.	55
Şekil 5.17 Serbest peroksidazın 4 °C ve 20 °C’de saklama kararlılığı grafiği.	56
Şekil 5.18 İmmobilize peroksidazın 4 °C ve 20 °C’de saklama kararlılığı grafiği.....	56
Şekil 5.19 Pamuklu kumaş ve parafinli kumaşın SEM görüntüleri.	57
Şekil 5.20 Parafinli kumaş, immobilize katalaz ve immobilize peroksidazın SEM görüntüleri.	58
Şekil 5.21 Zamanla immobilize peroksidaz ile AB 129 boya giderimi grafiği.....	59
Şekil 5.22 İmmobilize peroksidaz ile zamana karşı farklı sıcaklıklarda AB 129 boya giderimi grafiği.....	60
Şekil 5.23 İmmobilize peroksidaz ile farklı sıcaklıklarda AB 129 boya giderimi grafiği.	61
Şekil 5.24 İmmobilize peroksidaz ile farklı pH’larda hazırlanan AB 129 boya giderimi grafiği.	61
Şekil 5.25 Farklı derişimlerinde immobilize peroksidaz ile AB 129 boya giderimi grafiği.	62
Şekil 5.26 Farklı boya derişimlerinde immobilize peroksidaz ile AB 129 boya giderimi grafiği.	63
Şekil 5.27 Farklı H ₂ O ₂ derişimlerinde immobilize peroksidaz ile AB 129 boya giderimi grafiği.	63
Şekil 5.28 İmmobilize peroksidaz ile 15 dakika süresince AB 113 boya giderimi grafiği.	64
Şekil 5.29 İmmobilize peroksidaz ile zamana karşılık farklı sıcaklıklarda AB 113 boya giderimi grafiği.....	65
Şekil 5.30 İmmobilize peroksidaz ile farklı sıcaklıklarda AB 113 boya giderimi grafiği.	65

Şekil 5.31 İmmobilize peroksidaz ile farklı pH'larda AB 113 boya giderimi grafiği.....	66
Şekil 5.32 Farklı derişimlerinde immobilize peroksidaz ile AB 113 boya giderimi grafiği.	66
Şekil 5.33 Farklı boya derişimlerinde immobilize peroksidaz ile AB 113 boya giderimi grafiği.	67
Şekil 5.34 Farklı H ₂ O ₂ derişimlerinde immobilize peroksidaz ile AB 113 boya giderimi grafiği.	68

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1 Değişik tutuklama yöntemlerinin karşılaştırılması	19
Tablo 3.1 Asit Blue 129 boyasının karakteristik özellikleri	24
Tablo 3.2 Asit Blue 113 boyasının karakteristik özellikleri	25
Tablo 3.3 Atık su arıtma yöntemleri	26

SİMGELER DİZİNİ

mL	mililitre
μL	mikrolitre
%	yüzde değeri
dak	dakika
mg	miligram
mM	milimolar
μmol	mikromol
nm	nanometre
$^{\circ}$C	derece santigrat
λ	dalga boyu
cm²	santimetrekare
mA	miliamper
Au	altın
mm	milimetre

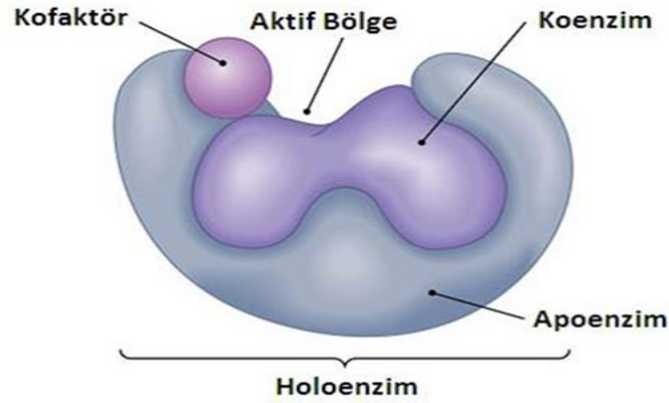
KISALTMALAR DİZİNİ

HRP	Horseradish Peroksidaz
HRP C	Horseradish Peroksidaz C izo enzimi
AB 129	Asit Blue 129
AB 113	Asit Blue 113
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
EC	Enzim Komisyonu

1.GİRİŞ

Kimyasal tepkimeleri hızlandıran bileşikler katalizör olarak adlandırılır. Enzimler; oldukça kararlı olan ve biyolojik sistemlerdeki kimyasal tepkimeleri hızlandıran, katalitik RNA moleküllerinin (ribozimler) bir grubu hariç protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir (Gözükara, 2011). Hücrelerde organik maddelerin anabolizma ve katabolizmasında, hücre solunumu, kas kasılması, sindirim gibi önemli faaliyetler çeşitli metabolizma tepkimelerinin sonucudur ve bu tepkimeler enzimlerin katalitik etkisiyle gerçekleşmektedir (Nelson ve Cox, 2013).

Enzimler genellikle kimyasal katalizörlerden çok daha büyük bir kataliz gücüne sahip olduğundan substratlarına karşı son derece spesifikler yani belirli maddeler arasındaki belirli tepkimeleri katalize ederler. Bazı enzimler katalizlemeyi sadece protein yapıları ile oluştururken bazıları ise bu fonksiyonları için kofaktör denilen gruplara ihtiyaç duyarlar. Bu gruplar bazen bir metal iyonu ya da kompleks bir organik bileşik (koenzim) olabilirler (Şekil 1.1) (Keha ve Küfrevioğlu, 2009). Katalitik olarak aktif olan enzim- kofaktör kompleksi haloenzim; bu enzimin sadece protein kısmını içeren katalitik olarak inaktif durumda olan kısmı ise apoenzim olarak adlandırılır (Nelson ve Cox, 2013; Keha ve Küfrevioğlu, 2009).



Şekil 1.1 Enzim şematik gösterimi.

Substrat ve enzimin birbirine bağlanmasında bazen kofaktörler köprü görevi görürler. Bazen de enzimin aktif merkezinde bulunarak katalitik grup olarak rol alırlar. Örneğin katalaz enziminin merkezinde Fe bulunur ve hidrojen peroksidin su ve moleküler oksijene yıkılmasına aracılık yapar (Gözükara, 2011).

Enzimlerle katalize edilerek tepkimeye katılan kimyasal maddeler substrat olarak tanımlanır. Enzimler ile ilgili yapılan ilk çalışmalarda kullandıkları substratın veya kataliz ettikleri tepkimenin türüne göre ve enzimin etkilediği substratın adının sonuna – az eki getirilerek adlandırılmıştır. Zamanla birçok enzimin ortaya çıkmasıyla, sistematik bir adlandırmaya ihtiyaç duyulmuştur. Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından yapılan sistematik bir sınıflandırma ile her enzim için dört rakamlı bir kod numarası tanımlanmıştır. Tanımlanan dört rakamdan ilki enzimin bağlı bulunduğu sınıfı, ikincisi alt alt grubu yani etki ettiği kimyasal yapıyı ve fonksiyonel grubu, üçüncüsü alt alt grubu yani akseptörü ve dördüncüsü ise belli bir sınıfta enzimin aldığı sıra numarasıdır (Nelson ve Cox, 2013; Gözükara, 2011). Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından enzimler altı sınıfta incelenmektedir.

Bunlar;

1. Oksidoredüktazlar: Oksidasyon ve Redüksiyon tepkimelerini katalizleyen enzimlerdir.
2. Transferazlar: C, N, P taşıyan grupları, bir donörden bir akseptöre taşıyan enzimlerdir.
3. Hidrolazlar: Bağlara su sokarak bağların parçalandığı hidroliz tepkimelerini katalizleyen enzimlerdir.
4. Liyazlar: Hidrolizden ve oksidasyondan farklı bir yol ile bağları kırarak atom, çift bağların meydana getirildiği tepkimeleri katalizleyen enzimlerdir.
5. İzomerazlar: Bir molekül içindeki geometrik ve yapısal değişiklikleri katalizleyen enzimlerdir.
6. Ligazlar: Enerji açısından yüksek enerjili bir bağın kopması ile ortaya çıkan enerji yardımı ile iki molekülün birbirine bağlanmasını katalizleyen enzimlerdir (Aehle, 2007; Adam ve Yiğitoğlu, 2012).

1.1 Enzim Aktivitesi

Bir enzimatik tepkimenin hızı, enzimin etkinliği veya enzimin aktivitesi ile ilişkilidir. Etkinliği veya aktivitesi fazla olan bir enzim, belirli bir sürede daha fazla substrat molekülünü ürün haline dönüştürür. Enzim aktivitesini göstermek için kullanılan birimler şunlardır (Keha ve Küfrelioğlu, 2009):

Enzim ünitesi (U) : 25 °C’de, optimum şartlarda, 1 dakikada, 1 µmol (10^{-6} mol) substratı ürüne dönüştüren enzim miktarı ‘1 enzim ünitesi’ (EU) olarak kabul edilmiştir. En çok kullanılan enzim aktivite birimi IU’dur.

Spesifik aktivite: 1 mg protein başına enzim ünitesidir. U/mg protein şeklinde hesaplanır. Enzimin saflığının bir ölçüsüdür.

Katal: Optimum şartlarda 1 saniyede 1 mol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarıdır.

1.1.1 Enzim aktivitesine etki eden faktörler

Enzimlerin etkinliğini, dolayısıyla kimyasal tepkimelerin hızını artıran veya azaltan pek çok faktör vardır. Bunlar; pH, sıcaklık, enzim derişimi, substrat derişimi, zaman vb. faktörlerdir (Keha ve Küfrevioğlu, 2009).

pH: Ortam pH’ı enzimatik tepkimelerin çoğunda hızı etkileyen önemli bir faktördür. Her enzimin optimum çalıştığı bir pH aralığı vardır ve bu pH’a “optimum pH” denilmektedir. Substrat değıştikçe enzim tepkimelerinin optimum pH’sı farklılık gösterebilir. Enzimlerin optimum pH’ları 2-10 arasında değışmektedir. Örneğin pepsinin optimum pH’ı 2 iken, alkalen fosfatazın pH’ı 10’dur.

Sıcaklık: Sıcaklık, enzimlerin hem hızını hem de stabilitesini etkileyen önemli bir faktördür. Enzimatik tepkimenin hızı sıcaklık arttıkça belli bir noktaya kadar artmaktadır. Her enzim için birim zamanda substratını en fazla değışikliğe uğrattığı belirli bir sıcaklık vardır. Bu sıcaklık enzimin optimum sıcaklığıdır. Hayvansal kaynaklı enzimlerin çoğunun optimum sıcaklığı 40-50 °C arasındadır. Bitkisel kaynaklı enzimler daha yüksek sıcaklığa dayanıklıdır, optimum sıcaklıkları 50-60 °C arasındadır.

Enzim derişimi: Enzim tepkimesinin hızı enzimin substrata doygun olduğu koşullarda enzim derişimine bağlı olarak doğrusal olarak artmaktadır. Ortamdaki her enzim molekülü bağımsız çalıştığı için ortamda ne kadar enzim molekülü varsa yeterli substrat olduğu sürece tepkime de hızla sürecektir.

Substratın oldukça fazla olduğu bir enzimatik tepkimedey, optimal şartlar sağlandığında ölçülen ilk hız (V_0), enzim konsantrasyonu [E] ile doğru orantılı olmaktadır.

Substrat derişimi: Enzim derişimi ve diğer şartların sabit tutulduğu bir ortamda substrat derişimi arttıkça enzimatik tepkimenin hızı da başlangıçta doğrusal bir artış gösterir. Enzim substratına doygun hale geldiğinde yani tepkime hızı maksimuma ulaştığında bu nokta maksimum hız noktası V_{max} adını alır.

Zaman: Bir enzim tepkimesinin hızı belirli zaman da üretilen ürünün miktarı ile belirlenir. Enzim aktivite tayinlerinde tayin süresi genellikle 5 dakikadır. Bir enzim tarafından katalize edilen bir tepkime sürerken tepkimenin hızı giderek düşer. Bunun nedeni tepkime devam ederken oluşan ürünlerin aralarında birleşerek aksi yönde bir tepkime oluşturmaları, enzimin zamanla inaktive olması, tepkimeyi önleyen maddelerin bulunması ve substratın tükenmesi gibi faktörlerdir. Bu faktörlerin etkilerinin ortadan kaldırılması için enzim çalışmaları çoğunlukla substratın yaklaşık % 10'unun sarf edildiği tepkimenin başlangıç aşamasında gerçekleştirilir (Keha ve Küfrevioğlu, 2009).

1.2 Enzimlerin Kinetiği

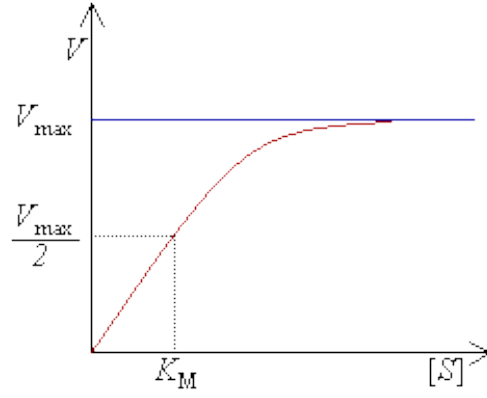
Bir enzimin aktivitesi, o enzim tarafından katalizlenen enzimatik tepkimenin hızının, enzim etkisiyle optimum koşullarda belirli bir sürede ürüne dönüştürülen substrat miktarına göre ifadesidir. Enzimlerin katalizleme güçleri “Turnover Sayısı” ile anlamlandırılır ve birim zamanda bir mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısı olarak ifade edilir .

Sabit derişimde tutulan enzimlerin tepkime hızı substrat derişimine bağılı olarak doğrusal şekilde artar. Enzim tepkime hızına V , substrat derişimine $[S]$ dersek ve bunları grafiğe geçirirsek Şekil 1.2'deki gibi bir hiperbolik eğri ortaya çıkar.

Leonard MICHAELIS ve Malid MENTEN bu hiperbolik eğriyi matematiksel olarak tanımlamış, enzimatik tepkimelerde oluşan enzim substrat kompleksinin ($[ES]$) önemli olduğunu ifade etmişlerdir (Keha ve Küfrevioğlu, 2009).

Michaelis-Menten Bağıntısı şu şekilde tanımlanır:

$$V = \frac{V_{Max}[S]}{K_M + [S]} \quad [1.1]$$



Şekil 1.2 Michaelis-Menten grafiği.

Çoğu kez hız eğrisinden V_{max} 'in ulaşıldığı noktayı tesbit etmek hatalı sonuçlara neden olabilir. Bu nedenle V_{max} 'in yarısına denk gelecek ölçümler yapılır. Tepkime hızının $(1/2)V_{max}$ 'a ulaştığı andaki substrat değerine de Michaelis-Menten sabitesi denir ve K_m ile gösterilir. Michaelis-Menten kinetiğine uyan bütün enzimler için $V_0 = (1/2)V_{max}$ olduğunda $K_m = [S]$ kuralı geçerlidir. V_{max} ve K_m değerleri bütün enzimler için farklı olup enzimin katalitik aktivitesinin bir ölçüsüdür. K_m tepkime mekanizmalarının basamak sayısı, hızları gibi tepkime özelliklerine bağlıdır. K_m , $[ES]$ kompleksinde enzimin substratına olan ilgisinin ölçüsüdür (Keha ve Küfrevioğlu, 2009; Nelson ve Cox, 2013).

Enzimlerin V_{max} değerleri birbirinden farklı olup pH, substratın yapısı, iyonik şiddet ve sıcaklık ile değişime uğrar. Substrata doyumluğun olduğu tepkimelerde enzim miktarı ile hız doğru orantılıdır. Enzim miktarı iki katına çıktığında hızda iki katına çıkar anlamına gelmektedir (Keha ve Küfrevioğlu, 2009).

Düşük substrat derişimlerinde $[S] < K_m$ tepkime hızı birinci basamaktır yani, substrat derişimi ile orantılıdır.

Yüksek substrat derişimlerinde $[S] > K_m$ tepkime hızı sıfırcı basamaktır yani, substrat derişiminden bağımsız ve sabittir.

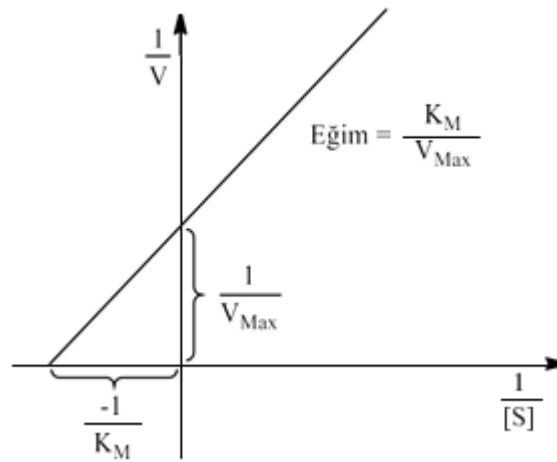
Michaelis-Menten grafiği ile hiperbolik bir grafik elde edildiğinden, uygulamalarda kolaylık sağlamak amacı ile Michaelis-Menten eşitliğinin bir doğru denklemi haline getirilmesi gerekmektedir. [1.1]'deki denklemde eşitliğin her iki tarafı ters çevrildiğinde [1.2] denklemi oluşur.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M + [S]}{V_{Max} [S]} \text{ Eşitliğinden,} \quad [1.2]$$

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{Max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{Max}} \quad [1.3]$$

İfadesi çıkarılabilir.

Eşitliğin her iki tarafı ters çevrildiğinde $y= mx+n$ şeklinde bir doğru denklemi elde edilir. Bu denkleme göre çizilen grafik “Lineweaver-Burk grafiği” olarak adlandırılır (Şekil 1.3).



Şekil 1.3 Lineweaver-Burk grafiği.

Bu grafite x ekseninde $1/[S]$, y ekseninde $1/V$ olmak üzere bir doğru elde edilir. Bu doğrunun eğimi K_M/ V_{Max} ve y ekseninin kesildiği nokta ise $1/ V_{Max}$ olur. Doğru x-eksenini kesecek şekilde uzatıldığında kesme noktası $1/ K_M$ 'yi verir. Bu grafikten faydalanarak K_M ve V_{Max} değerleri bulunabilir ve deneylerde çıkan yanlış sonuçlar da doğru üzerinde büyük sapmalar halinde kolayca farkedilebilir (Keha ve Küfrevioğlu, 2009).

1.3 Katalaz (EC: 1.11.1.6)

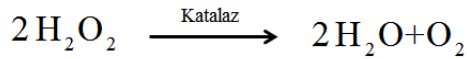
Katalaz, reaktif oksijen türlerinin, diğer bir deyişle aerobik solunumun bir yan ürünü olarak üretilen hidrojen peroksidin etkisinin azaltılmasında önemli bir rol oynayan oksidoredüktaz sınıfına ait bir enzimdir. Bu nedenle bir antioksidan görevi görür ve oksidatif strese karşı koruma sağlar. Enzim çok çeşitli aerobik ve anaerobik organizmalarda bulunur (Sharma ve Ahmad, 2014; Kaushal vd., 2018).

Katalazın bütün hayvan hücrelerinde ve mikroorganizmalarda katalitik aktivitesi bulunur. Mol kütlesi 250.000 dalton olup dört eşit büyüklükte alt birimi bulunmaktadır ve her bir alt birim (mol kütlesi~ 60.000) tek bir polipeptid zinciri tarafından oluşturulur (Valentine, 1964; Vainshtein vd., 1981).

Hücre içinde sitozolde ve daha çok peroksizomlarda bulunmaktadır. Aktif bölgesinde hem grubu bulunan bir hem proteinidir (Burk, 1990).

Substratının düşük maliyetlerle elde edilebilmesi ve enzim aktivitesinin kolaylıkla belirlenebilmesinden dolayı bilim insanlarının önemli çalışma alanını oluşturmuştur (Zamocky vd., 2008).

Süperoksit dizmutaz enzimi süperoksit radikalının yıkımını katalizleyerek hidrojen peroksit açığa çıkarır. Oluşan hidrojen peroksit, peroksizomlarda bulunan katalaz enziminin etkisiyle su ve moleküler oksijene parçalanır (Kavas, 1989).



Enzim endüstrisinin gelişmesiyle birlikte katalaz enziminin kullanım alanı da artmıştır. Tıbbi alanda; klinik tanının yapılmasında, oksidatif stres tedavisinde; gıda endüstrisi alanında; gıdaların paketlenmesinde, katalaz-glukoz oksidaz sisteminde, süt ve süt ürünlerinin kalitesinin belirlenmesinde (İnal, 1990); biyoremediasyon alanında; ortama oksijen sağlayıcı olarak, tekstil endüstrisinde boya gideriminde ve temizlik alanında ise kontak lensleri dezenfekte etmek amacıyla kullanılmaktadır (Kaushal vd., 2018).

1.4 Peroksidaz (EC:1.11.1.7)

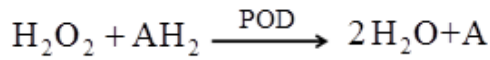
Peroksidaz, 32 ve 45 kDa arasında mol kütlesine sahip olan prostetik grup olarak ferriprotoporfirin IX ihtiva eden hem grubu içeren enzimdir. Oksitleyici (oksidant) olarak hidrojen peroksit veya organik hidrojen peroksitleri kullanan oksidoredüktaz sınıfına ait bir enzimdir (Adams, 1978; Belcarz vd., 2008).

Peroksidazlar, bakterilerde, mantarlarda, bitkilerde ve hayvanlarda bulunur (Doerge vd., 1997). Özellikle bitkilerde hücre duvarında bulunan ve bitkilerin büyümesini ve gelişmesini kontrol eden önemli enzimlerden biridir (Chen vd., 2002).

Hem peroksidazları, birbirini takip eden benzerliğin temelinde iki üst familya olarak sınıflandırılabilir. Bunlar hayvan peroksidazları ve bakteri, bitki, mantar peroksidazlarıdır (Duarte-Vázquez vd., 2000; Rompel vd., 2007).

Peroksidazlar amino asid dizilimleri dikkate alınarak üç grupta incelenmektedir. I. Grup sitokrom c peroksidaz (CcP), askorbat peroksidaz (APX), ve bakterial katalaz peroksidazları içeren hücre içi peroksidazlardır. II. Grup manganaz peroksidaz, lignin peroksidaz (LiP) gibi salgılanan “fungal enzimleri” kapsamaktadır. III. Grup ise bitki peroksidazlarını bulundurmaktadır. Kararlı olması ve yabani turp (horseradish) köklerinden kolayca izole edilmesinden dolayı birçok uygulamada yer alan “horseradish peroksidaz” izoenzim C (HRP) III. Grup’ta yer almaktadır. Peroksidaz sınıfının yapı-fonksiyon ilişkileri ile ilgili yapılan çalışmaların çoğu, III. grup’un temsilcisi gibi görülen HRP ile gerçekleştirilmiştir (Rodriguez-Lopez, 1996; Schuller, 1996; Altıkatoğlu vd., 2009).

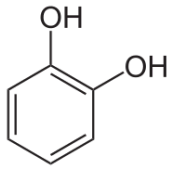
Peroksidazların katalizledikleri tepkimeler oldukça kompleks olmalarından dolayı aşağıdaki gibi genel bir denklem ile gösterilmektedirler (Huystee, 1987).



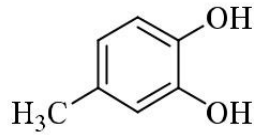
Canlı organizmada oluşan H_2O_2 oksitleyici özelliğe sahip olduğundan hızlı bir şekilde ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Hücre içindeki bu görev antioksidan özellik gösteren katalaz ve peroksidaz enzimleri tarafından gerçekleştirilir (Krych-Madej ve Gebicka, 2017).

Hidrojen peroksit miktarı peroksidazlarda, H_2O_2 ’ten başka bir substrata ihtiyaç duymayan katalaz enzimleri tarafından düzenlenirken, hücrenin diğer bölümlerinde ise aktivitesini gösterebilmesi için H_2O_2 ’ten başka substratlara da ihtiyaç duyan farklı peroksidaz enzimleri tarafından düzenlenir (Huystee, 1987).

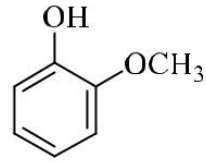
Guaiakol, klorogenik asit o- dianisidin ve katekol gibi birtakım fenolik moleküller peroksidazlar tarafından substrat olarak kullanılarak metabolizmada meydana gelen hidrojen peroksiti suya indirgeyerek zararsız hale dönüştürürler (Robinson vd., 1997; Onsa vd., 2004).



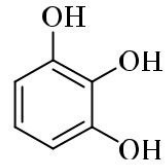
katekol



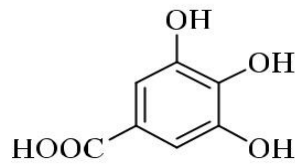
4- metil katekol



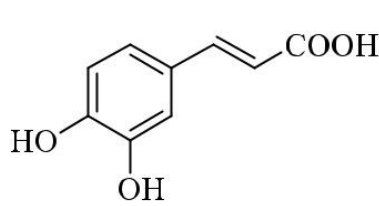
guaiakol



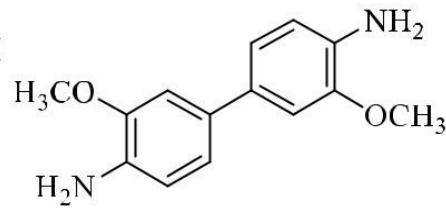
pirogallol



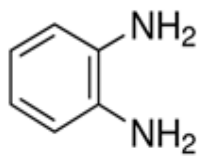
gallik asit



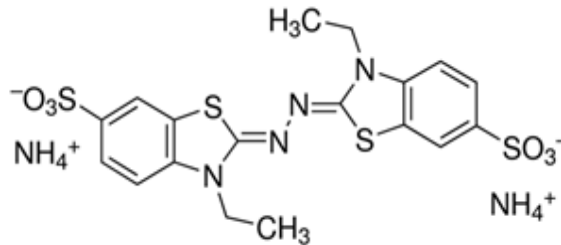
kafeik asit



o- dianisidin



o- fenilendiamin

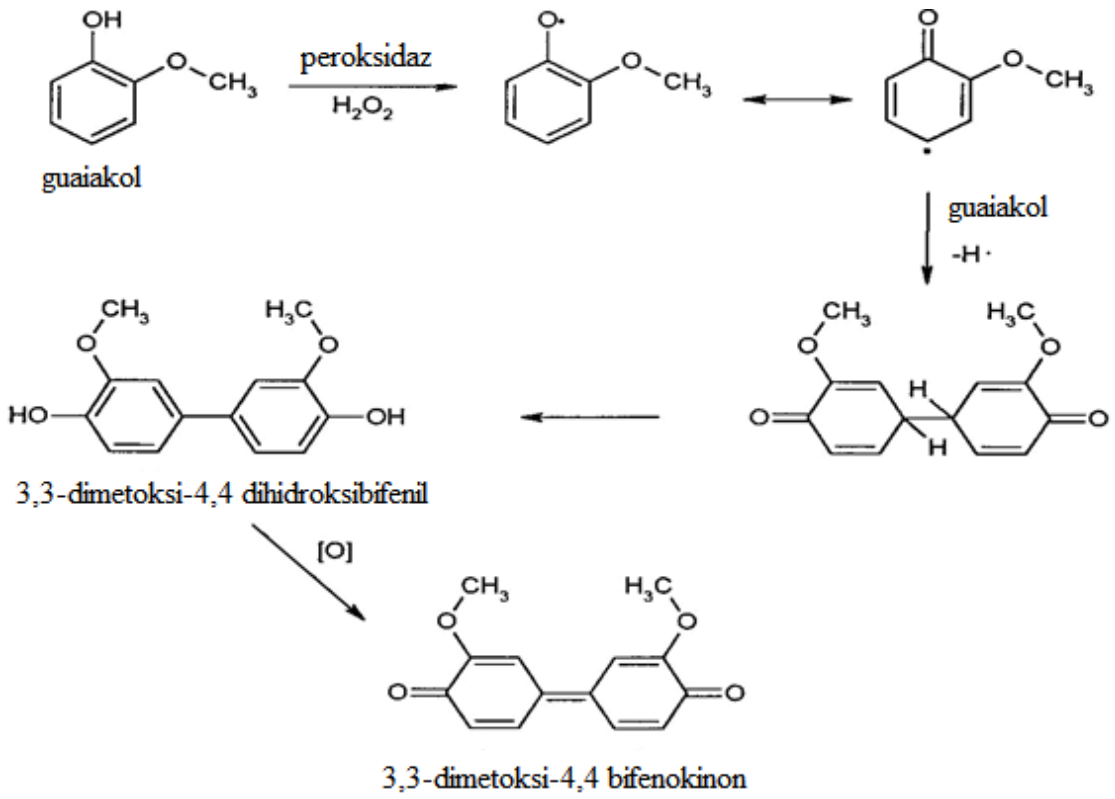


ABTS

Şekil 1.4 Yaygın olarak kullanılan peroksidaz substratları.

Peroksidazın H_2O_2 ile birlikte kullandığı diğer substratlar Şekil 1.4'te verilmiştir. Bunlardan ilk olarak kullanılan guaiakoldür. Yapılan çalışmalarda bitki fizyolojisinde artan fizyolojik fonksiyonların peroksidazlarla ilişkili olduğu bulunmuş ve peroksidaz kataliz tepkimesi açıklanmıştır (Huystee, 1987).

Yapılan çalışmalar sonucunda peroksidazın tepkime katalizleme mekanizması açığa çıkarılmıştır. Hidrojen peroksitin indirgendiği ve guaiakolün yükseltgendiği tepkime mekanizması üç basamakta gerçekleşir (Şekil 1.5).



Şekil 1.5 Peroksidazın guaiakol substratını guaiakolün renkli oksidasyon ürünlerine çevirme mekanizması (Doerge vd., 1997).

Peroksidazın guaiakolü yükseltgemesi ile amber renkli 3,3-dimetoksi-4,4 bifenokinonun oluştuğu bulunmuştur (Doerge vd., 1997).

1.5 Parafin

Parafin mumu (*parum affinis*), petrolden elde edilen renksiz, kokusuz bir mum çeşididir. Parafin mumu ilk defa 1829 yılında Carl Reichenbach tarafından odun katranından; daha sonra bütümlü tabakalardan; 1867'den sonra da petrolden elde edilmiş, 1947'de de sentetik parafin mumu yapılmıştır. Petrolün bir yan ürünüdür. Ayrıca ham petrolün, parafininin giderilmesi gerekir. Ham petrolün rafinasyonunda yan ürün olarak elde edilen yağlı parafin önce sıcakta eritilir, sonra da soğutulmuş parafinin donması sağlanır ve donan posa şeklindeki parafin yağlı kısımlarından süzülerek ayrılır. Bugün modern olarak çalışan parafin imalathaneleri de, yukardaki esasa dayanarak parafin mumunu üretir. Yeni metodlara göre yapılan parafin mumları % 20 kadar yağ ihtiva eder. Bazı durumlarda yağ miktarı % 3'e kadar düşürülür. Daha ileri saflaştırma ile renk, koku ve tadı daha iyileştirilir. Saflaştırma işleminde sülfürik asit ve kil kullanılır. Ham parafin mumunun erime noktası 37 ile 48 °C tam rafine edilmiş parafin mumunun erime noktası ise, 48 ile 66 °C arasında değişir. Erime noktası yüksek olan parafin mumu çoğunlukla 26-30 karbonlu alkanlardır. Sentetik parafin mumu, İkinci Dünya Savaşından sonra Fischer-Tropsch tekniğiyle elde edildi. Bu metodda ham madde kömürdür. Kömürden elde edilen karbon monoksit ve H₂ karışımından manyetik demirin katalitik etkisiyle hidrokarbonlara dönüşür. Elde edilen ürünlerden bir kısmı parafin mumudur. Bunlar çok beyaz olup, petrolden yapılan parafin mumlarından daha serttir. 50-55 karbon bulunduran sentetik parafinlerin molekül kütlesi ortalama 750 civarındadır (Url-1).

Tekstilde kullanılan parafin sayesinde, materyallar su veya hava geçirmeyi önler. Böylece etkili bir yalıtım sağlanmış olur. Tekstilin birçok alanında parafinden yararlanır. Örneğin iplikte parafin kullanımına bakarsak; parafin, ipliğe kayganlık kazandırarak ipliğin sürtünme katsayısını aşağıya çekerek, 'sürtünme' sebebiyle oluşabilecek sorunlara çare olur. Parafinlenmesi kötü olmuş bir iplik, kaliteli bile olsa örme işleminde problemler oluşacağı için, iplik olarak değeri düşer.

Eczacılıkta kullanılan parafin; sıvı haliyle, kremler, merhemler, fitil ve kabızlık, vb. ilaçlarda bulunmaktadır. Bunun dışında yapısı gereği ısı iletkenliği düşük olan parafin, bir izolasyon malzemesi gibi olduğu için fizik tedavi ve tıp alanlarında da sıklıkla kullanılmaktadır.

Kozmetikte kullanılan parafin malzemelerin suya karşı dayanıklılığını artırır, kalıcı olmasını sağlar ve oldukça çeşitli şekillerde değerlendirilir. Hem güzellik ürünlerinde hem de bakım ürünlerinde parafine rastlamak mümkündür. Parafinin cilt bakım ürünlerinde kullanımının amacı; ciltteki gözenekleri tıkaması, nemi cilde hapsedmesi ve bu sayede cildin kurumadan yumuşacık olmasıdır. Cilt için önerilen maske tariflerinde parafinli olanları sıklıkla tercih edilir. Özellikle soğuk parafinin el ve ayak bakımında çok sık kullanıldığı bilinmektedir. Deride çatlama, gerginlik hissi, soyulma vb. sorunlarla mücadelede çok etkili olduğu belirtilir. Soğuk parafin, sıcak olanına göre daha hijyeniktir çünkü tek kullanımlıdır (Url-2).

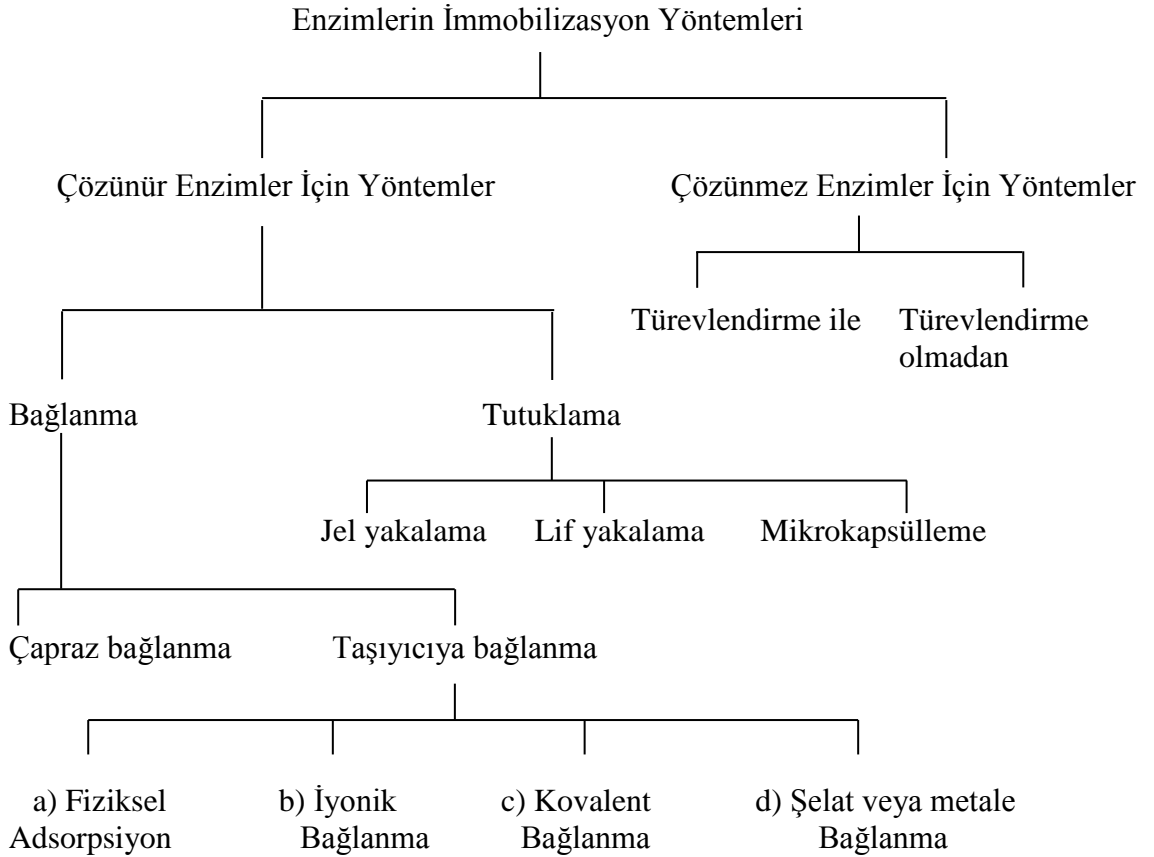
2. ENZİM İMMOBİLİZASYONU

Enzimin, katalitik aktivitesini koruyarak tekrar tekrar kullanımını sağlamak amacı ile kimyasal veya fiziksel olarak çözünmez katı bir destek materyale bağlanmasını içeren teknik immobilizasyon olarak tanımlanmaktadır (Krajewska, 2004; Çelebi vd., 2009).

Yaklaşık son 30 yılda enzim immobilizasyon çalışmaları önem kazanmış olup birçok enzim değişik desteklere farklı yöntemlerle immobilize edilmiş ve çeşitli alanlarda kullanılmıştır (Zhao vd., 2016). Immobilize edilmiş enzimler, ilaç ve kozmetik üretimi proseslerinde ve gıda alanında olduğu kadar ilaç salınımında da biyosensör şeklinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Yüksek substrat spesifikliğı, seçiciliğı ve pH, sıcaklık, atmosfer basıncı gibi ılımlı koşullarda etkili olma özelliğı, enzimleri diğer katalizörlerden daha çekici yapmıştır (Hoffmann vd., 2017).

2.1 Enzimlerin İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzimlerin immobilizasyon yöntemleri çözünmez formda ve çözünür formda olmak üzere iki grupta incelenmektedir (Kennedy ve Melo, 1990).



Şekil 2.1 Enzim immolizasyon yöntemleri (Kennedy ve Melo, 1990).

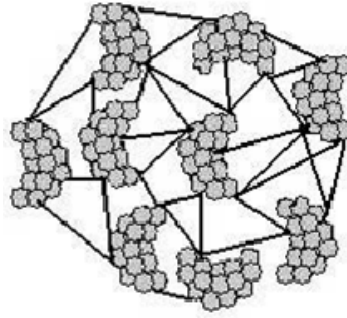
2.1.1 Bağlanma

Bağlanma yöntemi ile immobilizasyon iki grupta incelenir: Çapraz bağlanma ve taşıyıcıya bağlanma. Taşıyıcıya bağlanma ise dört grupta incelenmektedir.

2.1.1.1 Çapraz bağlanma

Enzimler hem kendi molekülleri arasında hem de bir ya da çok fonksiyonlu reaktifler yardımıyla destekler arasında kovalent bağlı yapılar oluşturabilirler (Costa vd., 2005).

Kovalent bağlanma ile çapraz bağlanma arasındaki en belirgin fark enzim molekülleri arasındaki köprüden kaynaklanmaktadır. Çapraz bağlanmada enzim ve taşıyıcı (destek) arasında köprü oluşurken kovalent bağlanmada enzim desteğe doğrudan bağlanmaktadır (Kennedy ve Melo, 1990).



Şekil 2.2 Çapraz bağlanma (Çelebi, 2013).

Klorformat, karbonildiimidazol, glutaraldehit, p-benzokinon, epiklorhidrin, divinilsülfonlar ve heterosiklik halojenürler en sık kullanılan çapraz bağlama reaktifleridir. Çapraz bağlanma derecesi ve immobilizasyon, reaktif ve protein derişimine, pH ve immobilize edilecek enzime bağlı olarak değişebilir (Telefoncu, 1997).

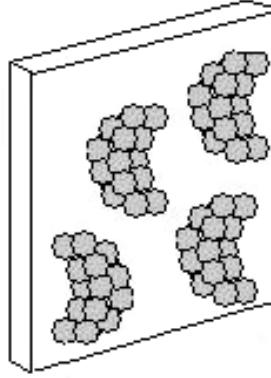
2.1.1.2 Taşıyıcıya bağlanma

Taşıyıcıya bağlanmada enzim molekülünün yapısından faydalanılır. Molekül yüzeyindeki iyonik gruplar, fonksiyonel gruplar ve hidrofobik bölgeler bu bağlanmada rol alırlar (Telefoncu, 1997). Taşıyıcıya bağlanma yöntemi enzimin bağlanmasına göre dört grupta incelenebilir.

a) Fiziksel adsorpsiyon

Enzim immobilizasyonunda kullanılan en eski ve en basit yöntemdir. Bu yöntemin temeli destek yüzeyi ile enzimin etkileşimi esasına dayanır. Enzimin taşıyıcıya bağlanmasında iyonik ilişkiler ya da Van der Waals kuvvetleri gibi zayıf etkileşimler rol oynar. Enzim ve destek arasındaki bağlar desteğin kimyasal yapısına ve enzim molekülünün yüzeyindeki aminoasitlerin türüne bağlıdır. Destek maddesi olarak selüloz, nişasta, gluten, dekstran, kitosan, seramik, alümina, aktif karbon, gözenekli cam, bentonit, kül ve CaCO_3 kullanılmaktadır (Telefoncu, 1997; Costa vd., 2005).

Yöntem; uygun şartlarda enzim ile desteğin karıştırılması ve daha sonra santrifüjleme ya da filtrasyon ile enzimin fazlasının materyalden ayrılması işlemidir. Enzimin adsorpsiyonu; iyonik kuvvete, enzim ve çözücü derişimine, sıcaklık gibi değişkenlere bağlıdır.

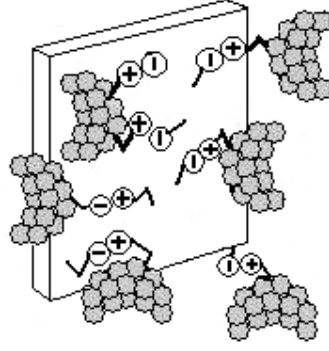


Şekil 2.3 Taşıyıcıya bağlanma (Çelebi, 2013).

Adsorpsiyonla immobilizasyonda yöntemin basit oluşu, farklı absorbentlerin kullanımı ve absorbentlerin tekrar kullanımı avantaj iken; enzim ve destek arasındaki zayıf bağlar nedeniyle enzimin desorpsiyonu ise en büyük dezavantajdır (Kennedy ve Melo, 1990).

b) İyonik bağlanma

İyonik bağlanma yöntemi ile enzimler, iyon değiştirici bölgeler içeren suda çözünmeyen taşıyıcılara iyonik bağ ile bağlanırlar. Aynı zamanda fiziksel adsorpsiyon da meydana gelebilir. İyonik bağlanmada bağlanmanın kuvveti, fiziksel adsorpsiyondan daha kuvvetlidir. Bu yöntem ortamın iyonik kuvvetine ve pH'ına bağlı olduğundan bu koşulların değişmesi destekten enzimin ayrılmasına neden olur (Telefoncu, 1997).

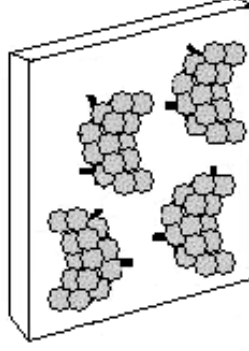


Şekil 2.4 İyonik bağlanma ile taşıyıcıya bağlanma (Çelebi, 2013).

İyonik bağlanmada destek maddesi olarak iyon değıştiriciler kullanılmaktadır. Destek maddesi olarak katyon ve anyon değıştiriciler olarak iki gruba ayrılırlar. Katyon değıştirici olarak; karboksimetil ve sülfat türevleri; anyon değıştirici olarak ise, dietilaminoetil (DEAE), epiklorohidrin ve trietanolamin kullanılmaktadır. İyonik bağlanma yöntemi ile ilk olarak katalaz enzimi DEAE selüloz üzerine tutturulmuştur. Endüstride ise ilk olarak DEAE safedex kullanılarak aminoaçilaz enziminin immobilizasyonunda kullanılmıştır (Kennedy ve Melo, 1990).

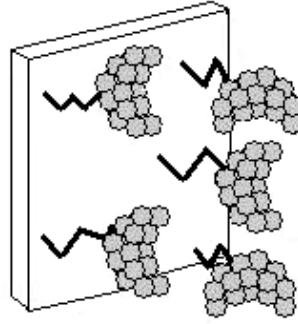
c) Kovalent bağlanma

Genellikle sulu ortamda gerçekleşen ve suda çözünmeyen bir desteğe enzimlerin kovalent bağ ile bağlanması yöntemidir. Kovalent bağ yapısı güçlü olduğundan immobilize olmuş enzim substrat içeren çözelti içerisine geçemez. Enzimin desteğe kovalent bağ ile bağlanabilmesi için desteğin amino, hidroksil, karboksil gibi reaktif gruplara sahip olması gerekmektedir. Bu yöntemde uygun tutuklanma yöntemini bağlanma tepkimesi, destek ve enzimdeki fonksiyonel grup belirlemektedir (Kennedy ve Melo, 1990; Telefoncu, 1997).



Şekil 2.5 Enzimin taşıyıcıya bir ajan olmadan kovalent olarak bağlanması (Çelebi, 2013).

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak destek maddesi reaktif değilse yardımcı bir reaktif ile aktif hale getirilmesi gerekir. İmmobilizasyon oda sıcaklığı, nötral pH gibi çok ılımlı koşullarda gerçekleştirilmelidir (Telefoncu, 1997).



Şekil 2.6 Enzimin taşıyıcıya bir ajan ile kovalent olarak bağlanması (Çelebi, 2013).

Kolay bulunabilmesi, ucuzluk, hidrofilik olması, bağlama kapasitesi ve uygulamadaki dayanıklılığı gibi faktörler desteğin seçiminde önemlidir (Costa vd., 2005).

d) Şelat veya metale bağlanma

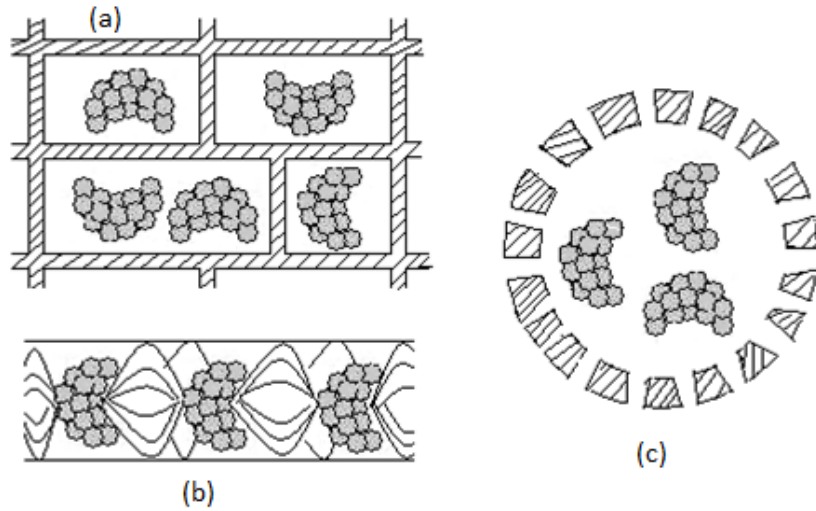
Destek maddesinin yüzeyinin geçiş metal bileşikleriyle aktive edilmesi yöntemidir. Şelat yapısında olan aktive olmuş desteğe enzim doğrudan bağlıdır. İmmobilize enzimler için ilk metal bağı 1971 yılında Birmingham Novais Üniversitesinde gerçekleştirilmiştir. Selülozu aktive etmek için demir, titanyum, vanadyum ve çinko gibi geçiş metal iyonlarının klorürleri veya sülfatları kullanılmıştır (Kennedy ve Melo, 1990).

2.1.2 Tutuklanma

Tutuklama ile immobilizasyon yönteminin prensibi adından da anlaşılacağı üzere enzim molekülünü belirli bir ortamda kalmaya zorlayarak bulunduğu çevreden dışarıya çıkamaz durumda bulunmasıdır. Tutuklama işlemi polimer matriks içindeki kafeslerde gerçekleştirilebileceği gibi yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ve miseller ile de gerçekleştirilebilir. Bu yöntemi kovalent bağlama ve çapraz bağlama immobilizasyon yöntemlerinden ayıran en önemli fark, enzimin fiziksel veya kimyasal olarak bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır (Telefoncu, 1997).

Bu immobilizasyon yöntemin avantajı küçük bir hacim içinde enzim ve substrat arasında son derece geniş bir yüzey alanı oluşturması ve aynı anda immobilizasyon işleminin gerçekleşmesidir. Dezavantajları ise, mikrokapsülleme sırasında enzimin aktivitesinde azalma ve yüksek enzim derişimi ihtiyacının olmasıdır. Enzimin tutuklandığı ortamdan dışarı sızması için, gözenek büyüklüğünün çok düşük olması gerekmektedir (Çelebi, 2013).

Tutuklanma yönteminin 3 şekli bulunmaktadır; lif yakalaması, jel yakalaması ve mikrokapsülleme (Kennedy ve Melo, 1990).



Şekil 2.7 Enzimin (a) matriks içine, (b) fiber içine, (c) kapsül içine tutuklanması (Çelebi, 2013).

2.2 Uygun İmmobilizasyon Yönteminin Seçilmesi

Enzimlerin çoğu için farklı immobilizasyon yöntemleri bulunduğu halde tüm enzimler için kullanılabilen tek bir immobilizasyon yöntemi bulunmamaktadır. Bunun nedenleri şöyle açıklanabilir:

- i. Enzimlerin birbirinden tamamen farklı bileşimde ve kimyasal yapıda olması,
- ii. Substrat ve ürünün farklı özelliklere sahip olması,
- iii. Ürüne uygulanabilen farklı kullanımların olması.

Bundan dolayı ucuz, basit, yüksek kullanım kararlılığı ve kalıcı bir aktiviteye sahip olan bir yöntem bulmak immobilize enzimlerin bütün uygulamaları için gereklidir. İmmobilizasyon metotlarının avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Tablo 2.1’de farklı immobilizasyon yöntemlerinin birbirine göre kıyaslaması verilmiştir (Kennedy ve Melo, 1990).

Tablo 2.1 Değişik tutuklama yöntemlerinin karşılaştırılması (Kennedy ve Melo, 1990).

Özellik	Çapraz bağlanma	Fiziksel adsorpsiyon	İyonik bağlanma	Metal bağlanma	Kovalent bağlanma	Yakalama
Hazırlık	Orta	Basit	Basit	Basit	Zor	Zor
Bağlanma gücü	Kuvvetli	Zayıf	Orta	Orta	Kuvvetli	Orta
Enzim aktivitesi	Düşük	Orta	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Düşük
Desteğin tekrar kullanımı	Kullanılamaz	Kullanılabilir	Kullanılabilir	Orta	Yüksek	Orta
Tutuklama maliyeti	Orta	Düşük	Düşük	Orta	Yüksek	Orta
Kararlılık	Yüksek	Düşük	Orta	Orta	Yüksek	Yüksek

3. TEKSTİL BOYAR MADDELER

Boyar maddeler, rengi veren kromofor ve boyayı ipliğe bağlayan fonksiyonel grup olmak üzere genellikle iki ana bileşenden oluşan küçük moleküllerdir. Literatürde uygulandığı ipliğin tipine veya kimyasal yapısına göre sınıflandırılmış yüzlerce çeşit boya bulunmaktadır. Boyanın iplik üzerine adsorbe olması tekstil ipliğine ve boyanın tipine bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Kocaer ve Alkan, 2002).

Boyar maddeler birkaç şekilde sınıflandırılabilirler. Boyama özellikleri, çözünürlük, kimyasal yapı, kullanılış yerleri gibi özellikleri göz önüne alınır. Boyar maddelerin sınıflandırılması yaygın olarak iki farklı bakış açısıyla yapılabilir. Bu bakış açılarından birincisi boyar maddelerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması, ikincisi ise boyar maddelerin tekstildeki kullanım şekillerine göre sınıflandırılmasıdır (Başer ve İnanıcı, 1990).

Kimyasal yapılarına göre boyar maddeler sınıflandırılırken temel olan nokta boyar maddeye absorpsiyon özelliği kazandıran kromofor gruptur. Kimyasal yapılarına göre boyar maddeler; azo boyalar, nitro boyalar, antrakinon boyalar, kükürt boyalar ve Di- ve Triarilmetan boyalar olarak da sınıflandırılmaktadırlar (Başer ve İnanıcı, 1990).

Boyar maddelerin kimyasal yapılarından daha çok tekstildeki kullanım şekillerine göre sınıflandırılması daha çok rağbet edilen bir sınıflama şeklidir. Kullanım amacına göre boyar maddeler aşağıdaki sınıflara ayrılırlar (Başer ve İnanıcı, 1990);

1. Asidik boyalar,
2. Bazik boyalar,
3. Reaktif boyalar,
4. Direkt boyalar,
5. Dispers boyalar,
6. Mordan boyalar,
7. Küpe boyalar,
8. Metal- kompleks boyalar,
9. Pigment boyalar,
10. İnkişaf boyalar.

3.1 Boyaların Kullanım Amacına Göre Sınıflandırılması

3.1.1 Asidik boyalar

Molekülde bir veya birden fazla karboksilik asit grubu veya sülfonik asit grubu gibi oksokrom grupları içerirler. Renkli kısım boya anyonudur ve anyonik sınıfa girerler. Asidik boyalar olarak adlandırılmasının nedeni, uygulamanın asidik banyolarda yapılması ve hemen hemen hepsinin organik asitlerin tuzları olmalarıdır. Sülfonik asit grubu içeren direkt, metal-kompleks ve reaktif boyalar da anyonik yapıdadır; fakat farklı yöntemler ile boyama yaptıklarından asit boyalar sınıfına girmez. Elyaf ile asidik boyanın arasındaki ilişki iyonik bağ şeklindedir.

Asidik boyar maddeler öncelikle yün, ipek, poliamid elyaf ile katyonik modifiye akrilonitril elyafı ile kâğıt, kürk, deri ve besin maddelerinin boyanmasında kullanılmaktadır (Başer ve İnanıcı, 1990).

3.1.2 Bazik boyalar

Organik bazların hidroklorürleri şeklinde olup renkli kısım katyonik gruptur. Pozitif yük taşıyıcı olarak S ve N atomu bulundurulur. Bazik olarak etki ettiklerinden boyanın katyonu, elyafın anyonik gruplarıyla bağlanır. Bu boyalar başlıca poliaktilonitril, kısmen de yün ve pamuk elyafın boyanmasında kullanılırlar. Boya ile elyaf arasındaki ilişki iyoniktir ve boyar maddenin katyonu elyafın anyonik grupları ile tuz oluşturur (Başer ve İnanıcı, 1990; Mathew vd., 2019).

3.1.3 Reaktif boyalar

Reaktif boyalar % 60-90 fikse oranları ile atık sularda en fazla renge neden olan boyar maddelerdendir. Bütün lif tüketiminin yaklaşık % 40'ını karşılayan pamuk lifinden yapılmış ürünlerin renklendirilmesinde en çok kullanılan boyar madde sınıfıdır. Dünyada yıllık 21 milyon tona yakın pamuğun renklendirilmesinde yıllık 120.000 ton reaktif boyar madde tüketilmektedir. Reaktif boyar maddeler diğer bütün boyar maddelerden farklı olarak lif molekülleriyle tepkimeye giren ve liflere gerçek kovalent bağlarla bağlanırlar (Eren vd., 2007).

Bütün reaktif boyar maddeler, *kromofor* taşıyan renkli bir grup, *reaktif* grup ve moleküle *çözünürlük sağlayan* grup içerir. Selülozik elyafın boyanmasında kullanılan bu boyar maddeler pamuk, yün, ipek ve poliamid boyanmasında da kullanılmaktadırlar (Başer ve İnanıcı, 1990; Eren vd., 2007).

Reaktif boyalar tekstil boyalarının önemli bir sınıfını oluşturmakta ve dünyada en fazla tüketilen boyaların başında gelmektedir. Tekstil süreçlerinde kullanılan boyaların yaklaşık olarak yarısı suda çözünebilen reaktif boyalardır. Suda oldukça iyi çözündüklerinden boyama ünitesinde boyanın tamamı selüloz elyafıyla tepkimeye girmez ve bir kısım boya boşaltım ünitelerinden suyla birlikte atılır (Çelebi, 2013).

3.1.4 Direkt boyalar

Direkt boyalar genellikle sülfonik, bazen de karboksilik asitlerin sodyum tuzlarıdır. Sülfo grubu (-SO₃H) asidik bir gruptur ancak NaOH veya KOH ile nötrale edildiğinde nötral ve iyonik hale geçer bu da çözünmeyi artırır. Yapı bakımından direkt ve asit boyar maddeler arasında kesin bir sınır yoktur. Boyama yöntemi bakımından farklıdırlar. Direkt boyalara bu adın verilmesinin nedeni bir ön işlem olmaksızın doğrudan boyama yapılabilmesindedir. Renkli kısımlarında bazik grup içeren direkt boyalar, sulu çözeltide zwitter iyon şeklinde bulunurlar. Suyu karşı dayanıklılığı (yaş haslıkları) sınırlıdır. Boyama sonrası yapılan ek işlemlerle yaş haslıkları düzeltilebilir (Başer ve İnancı, 1990).

3.1.5 Dispers boyalar

Suda eser miktarda çözünebilen bu nedenle sudaki dispersiyonları halinde uygulanabilen boyalardır. Poliester, poliamid ve akrilik elyafın boyanmasında kullanılırlar. Boyar madde, boyama işlemi sırasında dispersiyon ortamından hidrofob elyaf üzerine difüzyon yolu ile çekilir ve boyama boyar maddenin elyaf içerisinde çözünmesi şeklinde gerçekleşir. Poliamid ve akrilik elyafın boyanmasında kullanılırlar (Başer ve İnancı, 1990). Boyanın sudaki dağılımını ve homojenliğini arttırmak için ortama dispersiyon ajanları (dispersant) eklenmektedir (Satar ve Husain, 2009).

3.1.6 Mordan boyalar

Mordan sözcüğü, boyar maddeyi elyafa bağlayan madde anlamını taşır. Doğal ve birçok sentetik boya bu sınıfa girer. Bu boyar maddeler asidik ve bazik fonksiyonel gruplar içerirler. Bitkisel ve hayvansal elyaf ile kararsız bileşik oluşturduklarından hem elyaf hem de boyaya karşı aynı kimyasal ilgiyi gösteren bir madde (mordan), önce elyafa yerleştirilir; daha sonra elyaf ile boyar madde suda çözünmeyen bir bileşik vermek üzere tepkimeye sokulur. Böylece boyanın elyaf üzerine bağlanması sağlanır. Mordan olarak suda çözünmeyen hidroksitler oluşturan Al, Sn, Cr, Fe tuzları kullanılır.

Bu tuzların katyonları ile boya molekülleri elyaf üzerinde suda çözünmeyen kompleksler oluşturur. Günümüzde yalnızca krom tuzları yün boyamada önem taşımaktadır. Cr (III) bu amaç için en çok kullanılan metal iyonu olduğundan tekstilciler mordan denince akla Cr (III) iyonunu getirirlerde mordanlama bütün metal iyonları için kullanılan bir tanımdır (Başer ve İnanıcı, 1990).

3.1.7 Küpe boyalar

Karbonil grubu içeren ve suda çözünmeyen boyalardır. İndirgenme ile suda çözünür hale getirildikten sonra elyafa çektirilirler. Daha sonra yükseltgenme ile yeniden çözünmez hale getirilirler. Daha çok selülozik kısımda protein elyafın boyanmasında ve baskısında kullanılırlar. Küpe boyasındaki karbonil grubu oksijeni indirgendiğinde enolat oksijenine dönüşür. Bunlardan ilkinde kromofor ikincisinde oksokrom özellik gösterir. Bu nedenle küpeleme (indirgeme) işlemi az veya çok bir renk değişimi gösterir (Başer ve İnanıcı, 1990).

3.1.8 Metal-Kompleks boyalar

Belirli gruplara sahip bazı azo boyar maddeleri ile metal iyonlarının kompleks etkileşimi ile oluşturdukları boyalardır. Kompleks oluşumunda azo grubu rol oynar ve metal katyonu olarak Ni, Cr ve Cu iyonları kullanılır. Krom kompleksleri daha çok yün, poliamid boyamasında kullanılırken bakır kompleksleri ise pamuk ve deri boyacılığında kullanılır (Başer ve İnanıcı, 1990).

3.1.9 Pigment boyalar

Tekstil elyafı, organik ve inorganik pigmentler ile de boyanabilir. Pigmentlerin elyaf afinitesi yoktur. Kimyasal bağ ve absorpsiyon yapmazlar. Bağlayıcı madde adı verilen sentetik reçinelerle elyaf yüzeyine bağlanırlar. Suda çözünemediklerinden sudaki yağ ve yağdaki su emülsiyonları şeklinde ince dağılmış olarak kullanılırlar (Başer ve İnanıcı, 1990).

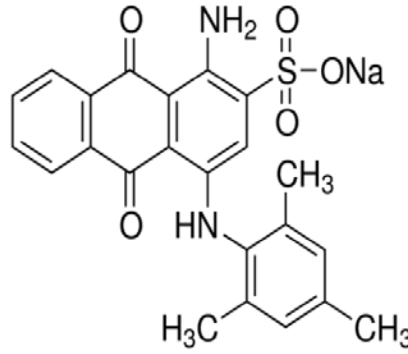
3.1.10 İnkişaf Boyalar

Elyaf üzerinde oluşturularak son şekline dönüştürülebilen bütün boyar maddeler bu sınıfa girer (Başer ve İnanıcı, 1990).

3.2 Kullanılan Boyalar

3.2.1 Asit Blue 129 boyası ve özellikleri

Antrakinon moleküler yapıda olup parlak mavi renklidir. Özellikle yün, ipek ve poliamid elyaf boyama ve doğrudan baskı için kullanılır. Deri boyamalarında da kullanılabilir (Url-3).



Şekil 3.1 Asit Blue 129 boyası.

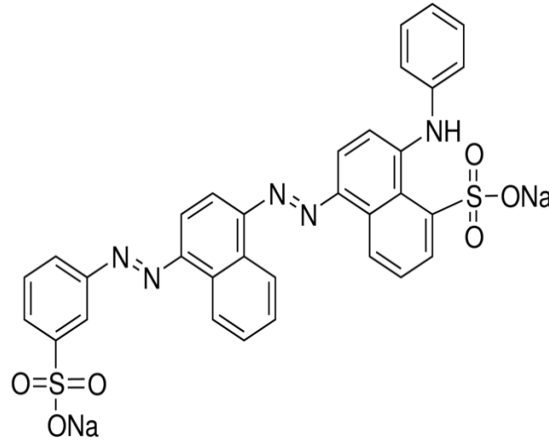
Tablo 3.1 Asit Blue 129 boyasının karakteristik özellikleri.

Adı (C.I.)	Asit Blue 129 (AB 129)
Molekül Formülü	C ₂₃ H ₂₁ N ₂ NaO ₅ S
Molekül Kütlesi	460.48 g mol ⁻¹
EC Numarası	229-008-4
Renk İndeks Numarası	62058
Maksimum Absorbsiyon	629 nm
Dalga Boyu (λ _{max})	
CAS Numarası	6397-02-0
Boya İçeriği	% 25

3.2.2 Asit Blue 113 boyası ve özellikleri

Azo boyar madde olup suda, etanolde çözünür, menekşe mavisi renk verir. Asetonda az çözünür, diğer organik çözücülerde çözünmez.

Yün, poliamid elyaf ve ipek kumaşların boyanmasında, yün / çubuk karışumlu kumaş ile direkt boyalarda da kullanılabilir, deri, kağıt ve biyolojik gölgelemede de kullanılabilir (Url-4). Azo boyar maddeler yapılarında -N=N- grubu içeren boyar maddelerdir (Srinivasan ve Sadasivam, 2018).



Şekil 3.2 Asit Blue 113 boyası.

Tablo 3.2 Asit Blue 113 boyasının karakteristik özellikleri.

Adı (C.I.)	Asit Blue 113 (AB 113)
Molekül Formülü	C ₃₂ H ₂₁ N ₅ Na ₂ O ₆ S ₂
Molekül Kütlesi	681.65 g mol ⁻¹
EC Numarası	222-111-5
Renk İndeks Numarası	26360
Maksimum Absorbsiyon Dalga Boyu (λ _{max})	566 nm
CAS Numarası	3351-05-1
Boya İçeriği	% 50

3.3 Tekstil Atık Sularında Boya Giderme Yöntemleri

Piyasada 100.000'den fazla farklı sentetik boya bulunmaktadır. Dünyada; tekstil, kağıt, kozmetik, gıda ve ilaç endüstrisinde yıllık 700.000 ton boya kullanılmakta ve bu boyaların % 10–15'i atık su içinde bulunmaktadır (O'Brien ve Ó'Fágáin, 2000). Boya kullanımı bazı canlı organizmalar için toksisite ve kanserojenlik açısından tehlikeli olmaktadır.

Arıtma yöntemleri tekstil atık suyunun özelliğine göre değişebilmektedir. Tekstil atık sularının arıtılması genellikle üç ana başlık altında toplanmaktadır.

Tablo 3.3 Atık su arıtma yöntemleri (Pavko, 2011).

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

Günümüzde boyar maddelerin giderimi büyük oranda fiziksel ve kimyasal yöntemlerle gerçekleştirilmektedir. Ancak bu yöntemlerin maliyeti oldukça yüksek olduğundan yeni yöntemlerin araştırılması söz konusu olmuştur. Bu nedenle büyük hacimli atık sulardaki boyar maddelerin etkili ve ekonomik bir şekilde giderilebilmesi için biyolojik sistemler gibi alternatif yöntemlere gereksinim vardır (Kocaer ve Alkan, 2002).

3.3.1 Boyaların enzimler ile giderimi

Son zamanlarda araştırmacılar enzimlerle boya giderimine dikkat çekmektedirler. Bununla birlikte, yüksek derecede renk giderimi elde etmek için büyük miktarlarda enzim gerekmektedir. Bu durum endüstriyel alanlarda enzimle boya giderimini sınırlandırmaktadır. Enzimin immobilizasyonu, bu sınırlamaların üstesinden gelmek için kullanılan yöntemlerden biridir. Bu tür uygulamalar için immobilize edilmiş bir enzim preparatı hazırlamak için her zaman daha ucuz bir destek ve enzim arayışı vardır.

İmmobilizasyon işlemi ile enzimlerin veya mikroorganizmaların tekrar tekrar kullanılması sağlanacağından, önerilen biyoarıtma yöntemlerinin diğer yöntemlere göre çok daha ekonomik olması beklenmektedir (Liu vd., 2006; Khan ve Husain, 2007).

Endüstriyel atıklarda boyayı gidermek için lignin peroksidaz (Novotný vd., 2001), mangan peroksidaz (Harazono vd, 2003), yabanturpu peroksidaz (HRP) ve soya fasulyesi peroksidaz (Knutson vd., 2005) gibi birçok peroksidaz ve lakkaz (Levin vd., 2004) kullanılmaktadır (Husain, 2006; Nisha vd., 2012). Peroksidazların boyayı renksizleştirilmesinde başlatıcı olarak hidrojen peroksit kullanılmaktadır (Khan ve Husain, 2007).

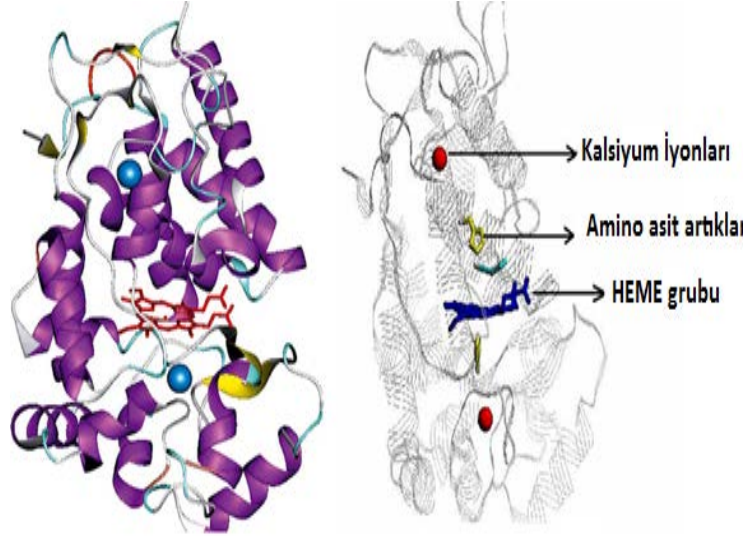
Horseradish ya da yaban turpu (*Armoracia rusticana*), dünyanın ılıman iklim bölgelerinde yetiştirilen uzun ömürlü dayanıklı bir bitkidir (Şekil 3.3). Bitkinin kökleri, organik ve inorganik bileşikleri oksitlemek için hidrojen peroksit kullanan zengin bir peroksidaz kaynağıdır (Veitch, 2004).



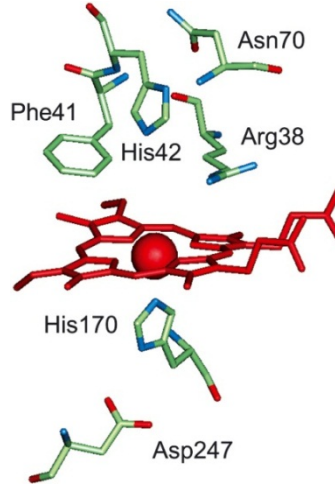
Şekil 3.3 Bayır turpu (*Armoracia rusticana*) “Horseradish” bitkisi (Çelebi, 2013).

Horseradish peroksidaz, bir asırdan uzun süredir üzerinde çalışılan önemli bir hem içeren enzimdir. HRP enzimi, kararlı olması ve bitki köklerinden kolayca elde edilebilmesi nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu bitkinin kökü birkaç tane farklı peroksidaz izoenzimi içermektedir. Bunlardan en yaygın olanı HRP C izoenzimidir (Azevedo vd., 2003; Veitch, 2004).

HRP enzimi, 308 aminoasit kalıntısı, bir hem grup (demir (III) protoporfirin IX) ve iki kalsiyum atomundan oluşan iki farklı metal merkeze sahiptir (Morawski vd., 2000; Veitch, 2004). HRP enziminin üç boyutlu molekül yapısı Şekil 3.4’te gösterilmiştir.



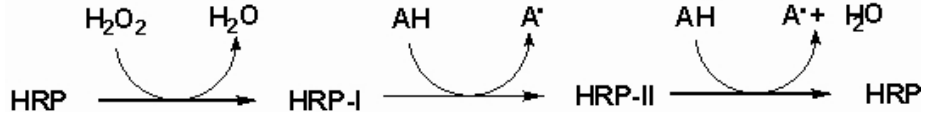
Şekil 3.4 HRP C'nin X-ışını kristal yapısının üç boyutlu gösterimi (Veitch, 2004).



Şekil 3.5 HRP C'nin hem bağlayıcı bölgesindeki anahtar aminoasit kalıntıları (Veitch, 2004).

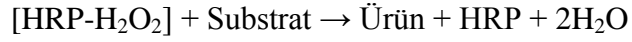
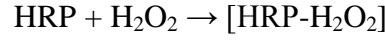
Hem grubu ve hem kırmızı renkte, geriye kalan aminoasit kalıntıları ve bazı atomlar ise kırmızı, yeşil ve mavi renklere gösterilmiştir. His170, proksimal histidin artığı, hem demir atomuna koordine durumdadır (Şekil 3.5) (Veitch, 2004).

Peroksidazlar, H_2O_2 ile Bileşik I, II ve III olmak üzere üç farklı yapı oluştururlar. HRP'nin genel çalışma mekanizması Şekil 3.6'da verildiği gibidir. HRP-I ve HRP-II, sırasıyla Bileşik I ve Bileşik II'yi, AH ise indirgenen substratı göstermektedir (Altıkatoğlu vd., 2009).



Şekil 3.6 HRP enziminin genel çalışma mekanizmasının şematik gösterimi.

HRP'nin enzimatik aktivitesi, hem grubunda bulunan demir atomunun yükseltgenmesinden ve indirgenmesinden kaynaklanmaktadır. Şartların uygun olduğu bir ortamda HRP, H_2O_2 ile birleşerek $[HRP-H_2O_2]$ kompleksini oluşturur. Oluşan kompleks çeşitli elektron vericiler ile yükseltgenir. Organik bileşiklerin, H_2O_2 varlığında peroksidaz oksidasyonu atık sulardaki organik kirliliklerin uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır (Çelebi, 2013).



Horseradish peroksidaz (HRP), fenoller, bifenoller, anilinler, benzidinler gibi aromatik bileşiklerin oksidasyonunu katalize edebilir. HRP enzimi başlıca tıbbi tanı kitlerinde kullanılmaktadır. Geniş bir pH ve sıcaklık aralığında aktivitesini koruduğundan atık su arıtımında azo boyaların giderilmesinde etkili olduğu bilinmektedir (Duran ve Esposito, 2000; Altıkatoğlu vd., 2009).

Çalışmamızda katalaz ve peroksidaz enzimlerinin parafin destekte ayrı ayrı immobilize edilerek immobilizasyonun optimal koşullarının belirlenmesi, ayrıca parafin destekte immobilize peroksidazın ve katalazın tekstil endüstrisinde kullanılan boyalardan olan AB 129 ve AB 113'ün giderimine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

4. MATERYAL VE METOD

4.1 Kullanılan Cihazlar

Spektrofotometre : SHIMADZU UV-1800 (Sıcaklık Ayarlı)

Hassas terazi : RADWAG AS 220.R2

pH metre cihazı : Adwa

Manyetik çoklu karıştırıcı : JEOTECH

İnkübatör : J. P. SELECTA

Su banyosu : Nüve

4.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Katalaz (EC: 1.11.1.6), horseradish peroksidaz (HRP) (EC: 1.11.1.7), hidrojen peroksit (w/ v %50), Asit Blue 129 (AB 129) ve Asit Blue 113 (AB 113) boyları Sigma-Aldrich; parafin, sitrik asit monohidrat, potasyum klorür, disodyum hidrojen fosfat, sodyum dihidrojen fosfat Merck; guaicol (99+%) Acros Organics; borik asit J.T. Baker; etil alkol (% 99) Carlo Erba marka kullanılmıştır. Bütün kimyasallar analitik saflıkta olup deneylerin tüm aşamasında çift distile deiyonize su kullanılmıştır.

4.3 Kullanılan Çözeltiler

Sitrat tamponları: pH: 3.0, 4.0, 5.0, (50 mM)

Fosfat tamponları: pH: 6.0, 7.0, 8.0, (50 mM)

Potasyum klorür- Borik asit tamponu: pH: 9.0, (50 mM)

Stok katalaz: 0,5 mg.mL⁻¹ (pH: 7.0, 50 mM fosfat tamponu içerisinde)

Stok horseradish peroksidaz: 0,25 mg.mL⁻¹ (pH: 7.0, 50 mM fosfat tamponu içerisinde)

Stok hidrojen peroksit: 10 mM (pH: 7.0, 50 mM fosfat tamponu içerisinde)

Guaikol: (w/ v) % 0,5 (% 50'lik etil alkolde)

4.4 Katalaz ve Peroksidazın Parafin Destekte İmmobilizasyonu

Her iki enzim için de immobilizasyon Pithawala ve arkadaşlarının (2010) kullandığı yöntemle yapıldı. Termostatlı su banyosunda (60 °C) 4 g parafin eritilip parafin üzerine, 20 mg katı enzim eklenerek yavaş yavaş karıştırıldı. Deiyonize suda yıkanıp güneşte kurutulan pamuklu kumaş 1 cm²'lik parçalara kesildi. 1 cm²'lik kumaş parçaları karışmakta olan enzim-parafin karışımına daldırılıp 3-5 sn bekletilip bir pens yardımı ile çıkarıldı ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Bu yöntemle enzim içeren parafinli 1 cm²'lik kumaş parçaları hazırlandı.



(a)

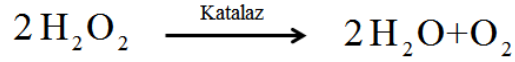
(b)

Şekil 4.1 (a) 1 cm² boyutlarında kesilmiş pamuklu kumaş parçaları.
(b) Parafin ve enzim içeren kumaş parçaları.

4.5 Katalaz Enziminin Aktivite Tayini

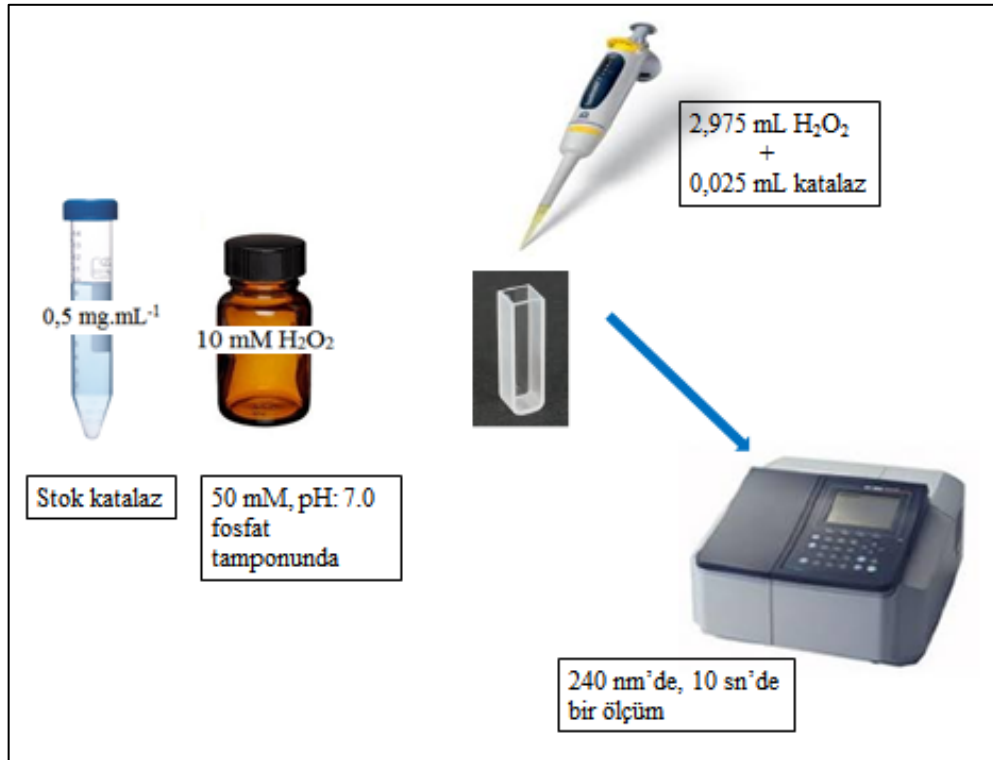
4.5.1 Serbest ve immobilize katalaz aktivitesinin ölçülmesi

Katalaz aktivitesinin saptanmasında kullanılan yöntem hidrojen peroksitin su ve moleküler oksijene parçalanmasının 240 nm dalga boyunda spektrofotometrede izlenmesi ilkesine dayanır (Aebi, 1981).



Serbest katalaz için yöntem:

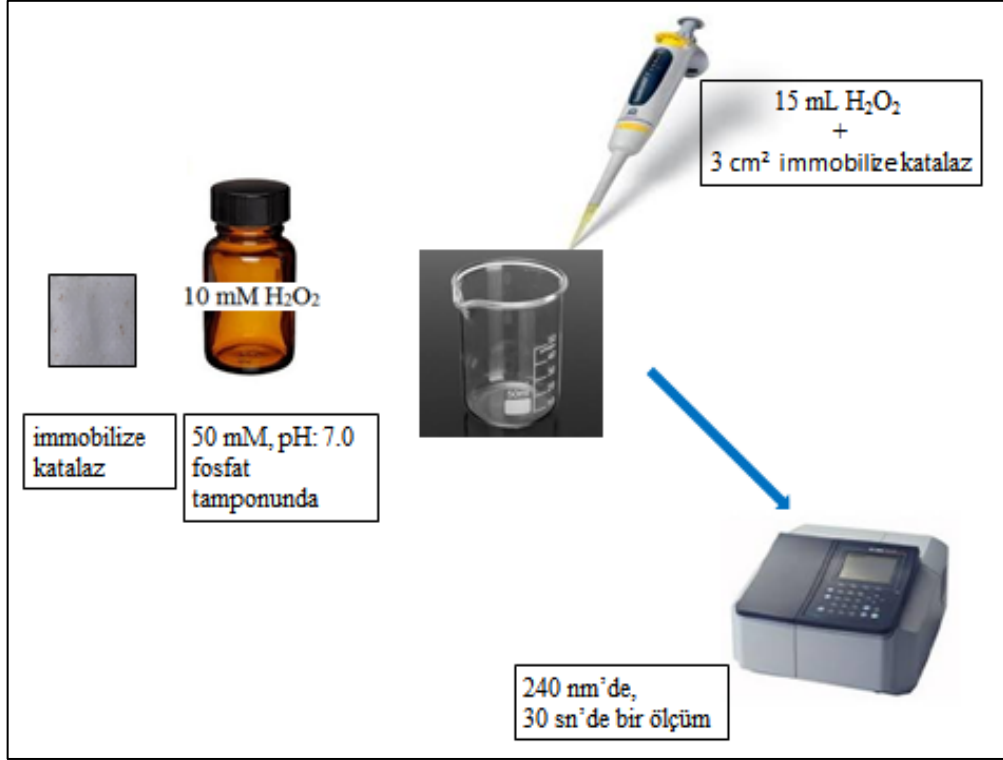
0,5 mg.mL⁻¹ derişimde serbest katalaz stok çözeltisi ve 10 mM H₂O₂ çözeltisi (50 mM, pH: 7.0 fosfat tamponu) hazırlandı. Kuvars küvet içerisine 2,975 mL H₂O₂ çözeltisi alındı. Üzerine 0,025 mL katalaz enzimi eklendi ve çözelti karıştırılıp 35 °C sıcaklıkta, spektrofotometrede 240 nm'de bir dakika boyunca her 10 saniyede bir, absorbans değerleri kaydedilerek aktivite [4.1]'deki denklem kullanılarak hesaplandı. Serbest katalaz ile ilgili tüm işlemler en az 3 tekrarlı çalışılarak değerlendirildi.



Şekil 4.2 Serbest katalaz aktivite tayini şematik gösterimi.

İmmobilize katalaz için yöntem:

1 cm²'lik (~0,147 mg.cm⁻²) 3 adet immobilize katalaz, 15 mL 10 mM H₂O₂ (50 mM, pH: 7.0 fosfat tamponu) içine atılıp hafifçe çalkalanarak 240 nm'de beş dakika boyunca her 30 sn'de bir, absorbanları kaydedilerek aktiviteleri [4.1] nolu denklem kullanılarak hesaplandı. İmmobilize katalaz ile ilgili tüm işlemler en az 3 tekrarlı çalışılarak değerlendirildi.



Şekil 4.3 İmmobilize katalaz aktivite tayini şematik gösterimi.

Başlangıç hızının doğrusal kesiminden dakikadaki soğurum değişimi ΔA bulunarak aşağıdaki denklemden aktivite hesaplandı.

$$\text{Unite/mL} = \frac{V_t}{\epsilon \cdot b \cdot V_e} \cdot \frac{\Delta A}{\Delta T_{(\text{dk})}} \quad [4.1]$$

V_t = Toplam hacim (mL)

V_e = Enzim hacmi (mL) (serbest katalaz için)

V_e = Enzim hacmi (cm²) (immobilize katalaz için)

b = Küvet kalınlığı (1 cm)

ϵ = Molar soğurum katsayısı (0.040 cm². μ mol⁻¹)

4.5.1.1 Serbest ve immobilize katalazın optimum sıcaklığının belirlenmesi

Serbest ve immobilize katalazın 4.5.1'de belirtilen deney yöntemleri kullanılarak aktiviteler değişik sıcaklıklarda (20, 25, 30, 35, 40, 45 ve 50 °C) ölçüldü.

4.5.1.2 Serbest ve immobilize katalazın optimum pH'ının belirlenmesi

Farklı pH'larda (pH: 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0) hazırlanan tamponlar içerisinde 10 mM H₂O₂ çözeltileri hazırlandı. Spektrofotometre küvetine 2,975 mL pH: 3.0'te hazırlanmış H₂O₂ çözeltisi alındı ve üzerine 0,025 mL stok katalaz enzimi eklendi ve çözelti karıştırılıp spektrofotometrede 35 °C'de, 240 nm'de her 10 saniyede bir absorbans değerleri kaydedilerek aktivite [4.1]'deki denklemden serbest katalazın aktivitesi hesaplandı. Aynı işlemler diğer pH'larda hazırlanmış H₂O₂ çözeltileri kullanılarak yinelendi.

Farklı pH'larda (pH: 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0) tamponlar kullanılarak 10 mM H₂O₂ çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan bu substrat çözeltilerinden 15'er mL behere alınarak içerisine immobilize katalazdan 3 cm² eklendi. Hafifçe çalkalanarak yürütülen deneyde her 30 saniyede bir spektrofotometrede 35 °C'de, 240 nm'de absorbans değerleri kaydedilerek immobilize katalazın aktivitesi hesaplandı. Bu işlemler diğer pH değerleri için tekrarlandı.

4.5.1.3 Serbest ve immobilize katalazın kinetik sabitlerinin belirlenmesi

Farklı derişimlerde (5, 10, 15, 20, 25, 30 mM) H₂O₂ substrat çözeltileri (50 mM, pH: 7.0 fosfat tamponunda) hazırlandı. Spektrofotometre küveti içerisine 2,975 mL 5 mM H₂O₂ çözeltisinden alındı. Üzerine 0,025 mL katalaz enzimi eklendi ve çözelti karıştırılıp spektrofotometrede 35 °C'de, 240 nm'de her 10 saniyede bir absorbans değerleri kaydedilerek [4.1]'deki denklemden serbest katalazın aktivitesi hesaplandı. Aynı işlemler diğer H₂O₂ derişimleri için tekrarlandı. Lineweaver- Burk grafiği çizilerek V_{max} ve K_m değerleri hesaplandı.

50 mM, pH: 7.0 fosfat tamponu içerisinde farklı derişimlerde (5, 10, 15, 20, 25, 30 mM) H₂O₂ substrat çözeltileri hazırlandı. Bir beher içerisine 15 mL 5 mM H₂O₂ substrat çözeltisi alındı ve üzerine immobilize katalazdan 3 cm² atıldı. Hafifçe çalkalanarak her 30 saniyede bir spektrofotometrede 35 °C'de 240 nm'de absorbans değerleri kaydedilerek immobilize katalazın aktivitesi hesaplandı.

Aynı işlemler diğer substrat derişimleri için yinelendi. Lineweaver-Burk grafiği çizilerek V_{max} ve K_m değerleri hesaplandı.

4.5.1.4 Serbest ve immobilize katalazın termal kararlılığının belirlenmesi

Stok serbest katalaz çözeltisi 20 °C sıcaklıkta 1 saat inkübe edildikten sonra aktivitesi 4.5.1’de anlatılan yöntemle tayin edildi. Aynı işlemler 25, 30, 35, 40, 45 ve 50 °C sıcaklıklarda inkübe edilen katalaz kullanılarak yinelendi.

Parafin destekte immobilize katalaz 20 °C sıcaklıkta 1 saat inkübe edilip aktivitesi 4.5.1’de belirtilen şekilde ölçüldü. Aynı işlemler 25, 30, 35, 40, 45 ve 50 °C sıcaklıklarda inkübe edilen immobilize katalaz kullanılarak yinelendi.

4.5.1.5 Serbest ve immobilize katalazın pH kararlılığının belirlenmesi

0,5 mg.mL⁻¹ derişimde katalaz çözeltisi 50 mM pH: 3.0 olan tamponda hazırlanarak 35 °C sıcaklıkta 1 saat bekletildi. Daha sonra 10 mM 2,975 mL H₂O₂ üzerine pH: 3.0’te bekletilen katalazdan 0,025 mL eklenerek aktivitesi [4.1]’de belirtildiği gibi ölçüldü. Aynı işlemler pH: 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0’da 1 saat bekletilmiş serbest katalaz kullanılarak yinelendi.

Parafin destekte immobilize katalaz pH: 3.0 olan tampon çözeltide 1 saat 35 °C’de bekletildi. Daha sonra 10 mM 15 mL H₂O₂ çözeltisine pH: 3.0’te bekletilmiş immobilize katalaz 3 cm² eklendi ve aktiviteler [4.1]’de anlatılan yöntemle ölçüldü. Aynı işlemler pH: 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0’da 1 saat bekletilen immobilize katalaz kullanılarak yinelendi.

4.5.1.6 Serbest ve immobilize katalazın saklama kararlılığının belirlenmesi

Serbest ve immobilize katalaz buzdolabında (4 °C) ve oda sıcaklığında (20 °C) saklandı. Deney, 5-7 günde bir 4.5.1’de anlatıldığı gibi serbest ve immobilize katalazın aktiviteleri ölçüldü.

4.5.1.7 İmmobilize katalazın kullanım kararlılığının belirlenmesi

Parafin destekte immobilize katalazdan 3 cm² alınarak 15 mL 10 mM H₂O₂ (50 mM, pH: 7.0 fosfat tamponu) çözeltisi içerisine atıldı ve spektrofotometrede 240 nm’de 30 sn’de bir absorbans kaydedilerek aktivite [4.1]’deki denklemden hesaplandı. Kullanılan immobilize katalaz 50 mM, pH: 7.0 fosfat tamponu ile yıkanarak tekrar aynı miktardaki substrat çözeltisine katılarak deney tekrarlandı. Bu işlem enzim aktivitesi tamamen düşene kadar tekrar edildi.

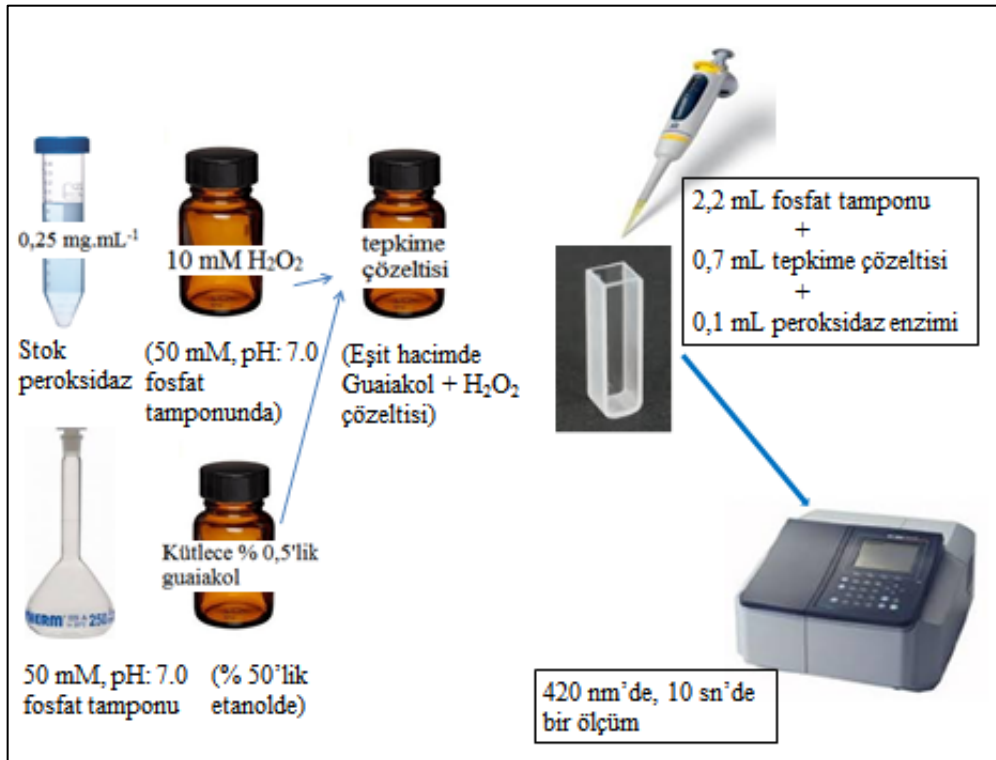
4.6 Horseradish Peroksidaz (HRP) Enziminin Aktivite Tayini

4.6.1 Serbest peroksidazın aktivitesinin ölçülmesi

Guaiakol ve hidrojen peroksit bulunan ortamda peroksidaz aktivitesine bağlı olarak guaiakol'un oksidasyonu sonucu ortaya çıkan kırmızımsı esmer renkli oksidasyon ürünlerinin oluşum hızının spektrofotometrede 420 nm'de belli aralıklarla kaydedilen absorbans değerlerinden yararlanılarak belirlenmesine dayanmaktadır (Yemenicioğlu ve Cemeroğlu, 2013).

Serbest peroksidaz için yöntem:

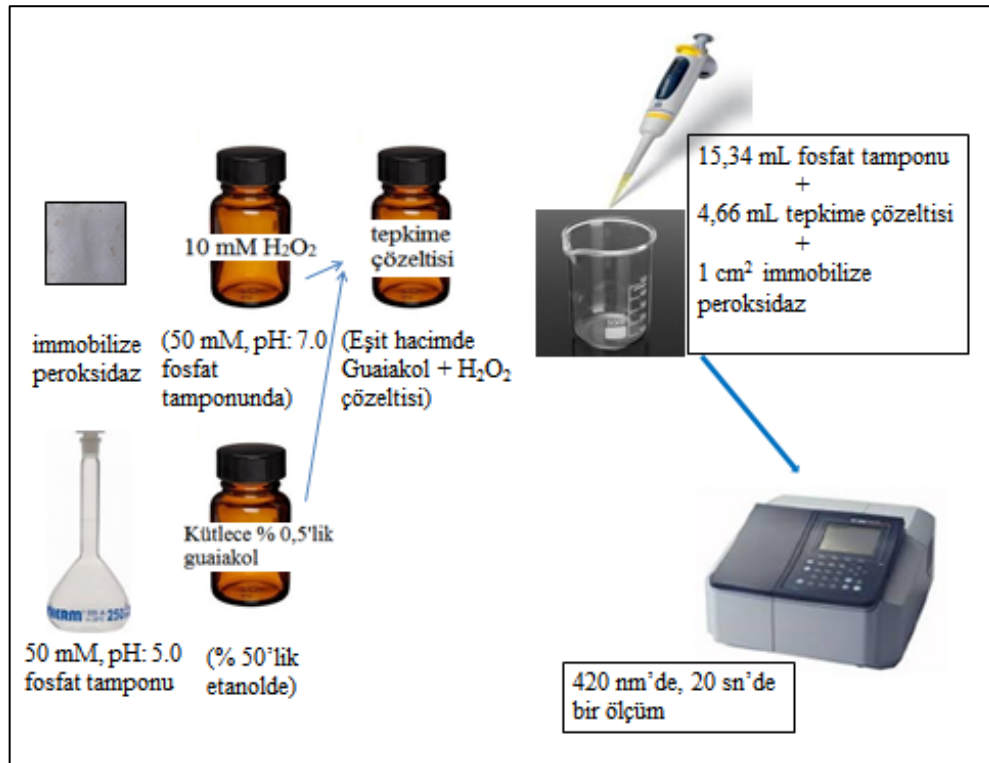
0,25 mg.mL⁻¹ peroksidaz stok çözeltisi ve 10 mM H₂O₂ çözeltisi (50 mM, pH: 7.0 fosfat tamponunda) hazırlandı. Kütlece % 0,5'lik guaiakol çözeltisi (w/v % 50'lik etanolde) hazırlandı. Guaiakol ile H₂O₂ çözeltileri eşit hacimlerde karıştırılarak tepkime çözeltisi günlük taze olarak hazırlandı. Kuvars küvet içerisine 2,2 mL fosfat tamponu ve 0,7 mL tepkime çözeltisi alındı. Üzerine 0,1 mL peroksidaz eklenip karıştırıldıktan sonra spektrofotometrede 420 nm'de 1 dakika boyunca her 10 saniyede bir absorbans değerleri kaydedilerek aktivite [4.2]'deki denklemden hesaplandı.



Şekil 4.4 Serbest peroksidaz aktivite tayini şematik gösterimi.

İmmobilize peroksidaz için yöntem:

10 mM H₂O₂ çözeltisi (50 mM, pH: 7.0 fosfat tamponunda) ve kütlece % 0,5'lik guaiakol çözeltisi (w/v % 50'lik etanolde) hazırlandı. Guaiakol ile H₂O₂ çözeltileri eşit hacimlerde karıştırılarak tepkime çözeltisi günlük taze olarak hazırlandı. Bir beherin içerisine 15,34 mL fosfat tamponu, 4,66 mL tepkime çözeltisi alınarak içerisine immobilize peroksidazdan 1 cm² (~0,147 mg.cm⁻²) atıldı ve deney başlatıldı. Hafifçe çalkalanarak 3 dakika boyunca her 20 saniyede bir spektrofotometrede 420 nm'de absorbans değerleri kaydedilerek aktivite [4.2] deki denklemden hesaplandı.



Şekil 4.5 İmmobilize peroksidaz aktivite tayini şematik gösterimi.

$$\text{Unite/mL} = \frac{V_t}{\epsilon \cdot b \cdot V_e} \cdot \frac{\Delta A}{\Delta T_{(\text{dk})}} \quad [4.2]$$

V_t = Toplam hacim (mL)

V_e = Enzim hacmi (mL) (serbest peoksidaz için)

V_e = Enzim hacmi (cm²) (immobilize peroksidaz için)

b = Küvet kalınlığı (1 cm)

ϵ = Molar soğurum katsayısı (0.001 cm². μ mol⁻¹)

4.6.1.1 Serbest ve immobilize peroksidazın optimum sıcaklığının belirlenmesi

Serbest ve immobilize peroksidazın 4.6.1’de belirtilen deney yöntemleri kullanılarak aktiviteler değişik sıcaklıklarda (20, 25, 30, 35, 40, 45 ve 50 °C) ölçüldü.

4.6.1.2 Serbest ve immobilize peroksidazın optimum pH’ının belirlenmesi

pH: 3.0’te hazırlanan tampon çözelti içerisinde 10 mM H₂O₂ çözeltisi hazırlanıp eşit hacimde guaiakol ile karıştırılarak tepkime çözeltisi hazırlandı. Küvete 2,2 mL pH: 3.0 tamponu ve 0,7 mL yukarıda hazırlanan tepkime çözeltisi eklendi. Üzerine 0,1 mL serbest peroksidaz eklenip karıştırıldıktan sonra (40 °C ayarlı) spektrofotometrede 420 nm’de her 10 saniyede bir absorbanslar kaydedilerek aktivite [4. 2]’deki denklem ile hesaplandı. Aynı işlemler pH: 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 için tekrarlandı.

pH: 3.0 tamponu kullanarak pH: 3.0’te hazırlanan 10 mM H₂O₂ ile guaiakol karıştırılarak (eşit hacimde) tepkime çözeltisi hazırlandı. 15,34 mL pH: 3.0’deki tampon çözelti üzerine 4,66 mL tepkime çözeltisi eklenip üzerine 1 cm² immobilize peroksidaz atılıp her 20 saniyede bir 40 °C’ye ayarlanmış spektrofotometrede 420 nm’de absorbanslar kaydedilip [4. 2]’deki denklem kullanılarak aktiviteler hesaplandı. Aynı işlemler pH: 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 için tekrarlandı.

4.6.1.3 Serbest ve immobilize peroksidazın kinetik sabitlerinin belirlenmesi

Farklı derişimlerde (9, 27, 45, 63, 81, 99 mM) guaiakol ve yine farklı derişimlerde (35, 104, 174, 243, 312, 382 mM) H₂O₂ substrat çözeltileri hazırlandı. Farklı derişimlerde hazırlanan guaiakol ile H₂O₂ çözeltileri (yukarıda belirtilen sıralamada) eşit hacimlerde karıştırılarak reaksiyon çözeltileri günlük hazırlandı. Kuvars küvet içerisine 2,2 mL fosfat tamponu (50 mM, pH: 7.0) ve 0,7 mL tepkime çözeltisi (9 mM guaiakol + 35 mM H₂O₂ içeren) alındı. Üzerine 0,1 mL peroksidaz eklenip karıştırıldıktan sonra spektrofotometrede 40 °C’de, 420 nm’de her 10 saniyede bir absorbans değerleri kaydedilerek [4.2]’deki denklemden serbest katalazın aktivitesi hesaplandı. Aynı işlemler diğer substrat derişimleri için tekrarlandı. Lineweaver- Burk grafiği çizilerek V_{max} ve K_m değerleri bulundu. Her bir H₂O₂ substrat derişimi için en az 3 tekrarlı çalışıldı.

Farklı derişimlerde (9, 27, 45, 63, 81, 99 mM) guaiakol ve yine farklı derişimlerde (35, 104, 174, 243, 312, 382 mM) H₂O₂ substrat çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan guaiakol ile H₂O₂ çözeltileri (yukarıda belirtilen sıralamada) eşit hacimlerde karıştırılarak tepkime çözeltisi günlük taze hazırlandı. Bir beher içerisine 15,34 mL fosfat tamponu

(50 mM, pH: 7.0), 4,66 mL tepkime çözeltisi (9 mM guaiakol + 35 mM H₂O₂ içeren) alınarak içerisine immobilize peroksidazdan 1 cm² bırakıldı ve deney başlatıldı. Hafifçe çalkalanarak spektrofotometrede 40 °C'de, 420 nm'de her 20 saniyede bir absorbans değerleri kaydedilerek [4.2]'deki denklemden immobilize katalazın aktivitesi hesaplandı. Aynı işlemler diğer substrat derişimleri için tekrarlandı. Lineweaver- Burk grafiği çizilerek V_{max} ve K_m değerleri hesaplandı.

4.6.1.4 Serbest ve immobilize peroksidazın termal kararlılığının belirlenmesi

0,25 mg.mL⁻¹ peroksidaz stok çözeltisi ve 10 mM H₂O₂ çözeltisi (50 mM, pH: 7.0 fosfat tamponunda) hazırlandı. Hazırlanan enzim çözeltisi 20, 25, 30, 35, 45 ve 50 °C sıcaklıklarda 1 saat inkübatörde edildi. Her bir sıcaklıkta inkübe edilen serbest peroksidaz kullanılarak ayrı ayrı 4.6.1'deki deney yöntemi kullanılarak aktiviteleri ölçüldü.

Parafin destekte immobilize peroksidaz 20, 25, 30, 35, 45 ve 50 °C sıcaklıklarda inkübatörde 1 saat bekletildi. Her bir sıcaklıkta inkübe edilen immobilize peroksidaz kullanılarak ayrı ayrı 4.6.1'de belirtilen yöntemle aktiviteleri ölçüldü.

4.6.1.5 Serbest ve immobilize peroksidazın pH kararlılığının belirlenmesi

0,25 mg.mL⁻¹ stok serbest peroksidaz pH: 3.0 olan tamponda hazırlanarak 40 °C'de 1 saat bekletildi. Bu bekletilen peroksidazın aktivitesi yöntem 4.6.1'de belirtildiği gibi ölçülerek aktivite tayin edildi. Aynı işlemler pH: 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0'da 1 saat bekletilen serbest peroksidaz için tekrarlanarak aktiviteler hesaplandı.

Parafin destekte immobilize peroksidaz pH: 3.0 olan tampon içinde 40 °C sıcaklıkta 1 saat bekletildi. Bekletilen immobilize peroksidazın aktivitesi 4.6.1'de belirtilen yöntemle ölçülerek hesaplandı. Aynı işlemler pH: 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0'da 1 saat inkübe edilen immobilize peroksidaz ile yinelenerek aktiviteler hesaplandı.

4.6.1.6 Serbest ve immobilize peroksidazın saklama kararlılığının belirlenmesi

Serbest ve immobilize peroksidaz buzdolabında (4 °C) ve oda sıcaklığında (20 °C) saklandı. Deney, 5-7 günde bir 4.6.1'deki yöntemle serbest ve immobilize peroksidazın aktiviteleri hesaplandı.

4.6.1.7 İmmobilize peroksidazın kullanım kararlılığının belirlenmesi

Bir beher içerisine 15,34 mL fosfat tamponu (50 mM, pH:7.0), 4,66 mL tepkime çözeltisi alınarak içerisine immobilize peroksidazdan 1 cm² atılıp ve deney başlatıldı. Hafifçe çalkalanarak her 20 saniyede bir spektrofotometrede 420 nm'de absorbans değerleri kaydedilerek aktivite [4.2]'deki denklemden hesaplandı. Kullanılan immobilize peroksidaz 50 mM, pH: 7.0 fosfat tamponu ile yıkanarak tekrar aynı miktardaki substrat çözeltisine atılarak deney tekrarlandı. Bu işlem enzim aktivitesi tamamen düşene kadar tekrar edildi.

4.7 SEM Analizleri

Örneklerin SEM görüntüleri için Sivas Cumhuriyet Üniversitesi İleri Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (CÜTAM) bulunan Yüksek Taramalı Elektron Mikroskobu (TESCAN MIRA3, XMU) kullanıldı. Örnekler Quorum K150 cihazı ile Argon plazma, 20 mA'de Au ile kaplanıp 10 kV hızlandırma voltajı, 10 mm çalışma mesafesinde SEM görüntüleri kaydedildi.

4.8 Parafin Destekte İmmobilize HRP Enzimi İle AB 129 ve AB 113 Boyalarının Renginin Giderilmesi

4.8.1 İmmobilize peroksidaz ile AB 129 boyasının renk giderimi

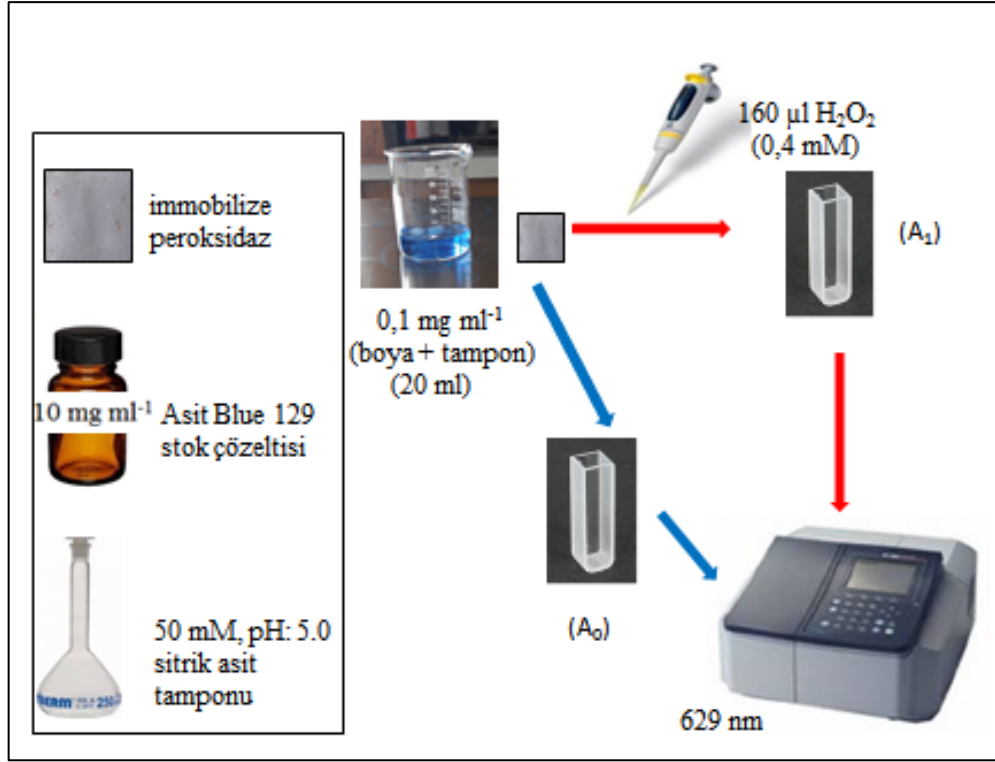
Deney Yöntemi:

10 mg.mL⁻¹ derişimde AB 129 stok çözeltisi suda hazırlandı. Son derişimi 0,1 mg.mL⁻¹ olacak şekilde pH:5.0'de hazırlanmış sitrik asit tamponunda seyreltildi. Bu çözeltiden 20 mL alınarak içine immobilize peroksidaz 2 cm² (~0,156 mg.cm⁻²) eklenip başlangıç absorbansı 629 nm dalga boyunda ölçülerek kaydedildi (A₀). Daha sonra üzerine (0,4 mM) 160 µL H₂O₂ eklenerek tepkime başlatıldı. Oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıyla hafif karıştırarak 15. dakikada çözeltinin absorbansı (A₁) tekrar ölçülerek [4.3]'teki denklem kullanılarak % boya giderim değerleri hesaplandı.

$$\% \text{ Boya Giderme} = \frac{(\text{Abs}_{(0)} - \text{Abs}_{(1)})}{\text{Abs}_{(0)}} \times 100 \quad [4.3]$$

Abs₍₀₎: boyanın maksimum dalga boyunda gösterdiği absorbans değeri,

Abs₍₁₎: tepkime H₂O₂ ile başlatıldıktan sonra her bir bekleme süresi sonunda ölçülen maksimum dalga boyundaki absorbans değeri.



Şekil 4.6 İmmobilize peroksidaz ile AB 129 boyasının renk giderim yöntemi şematik gösterimi.

4.8.1.1 Sıcaklık etkisi

4.8.1'deki deney yöntemi kullanılarak farklı sıcaklıklarda (20, 30, 35, 40, 45, 50 °C) AB 129 boyası giderimi araştırıldı.

4.8.1.2 pH etkisi

AB 129 boyasının immobilize peroksidaz ile H₂O₂ başlatıcısı kullanılarak farklı pH'larda (pH: 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0) 20 °C'de AB 129 boyası giderimi 4.8.1'deki deney yöntemi kullanılarak incelendi.

4.8.1.3 Enzim derişiminin etkisi

Farklı derişimlerde (0,156, 0,312, 0,468, 0,624, 0,780 mg) AB 129 boyası kullanılarak immobilize peroksidaz ile renk giderimi 4.8.1'deki deney yönteminde belirtildiği gibi incelendi.

4.8.1.4 Boya derişiminin etkisi

AB 129 boyasının farklı derişimlerinde (0,025, 0,05, 0,10, 0,15 ve 0,20 mg.mL⁻¹) giderilmesi 4.8.1'deki deney yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi.

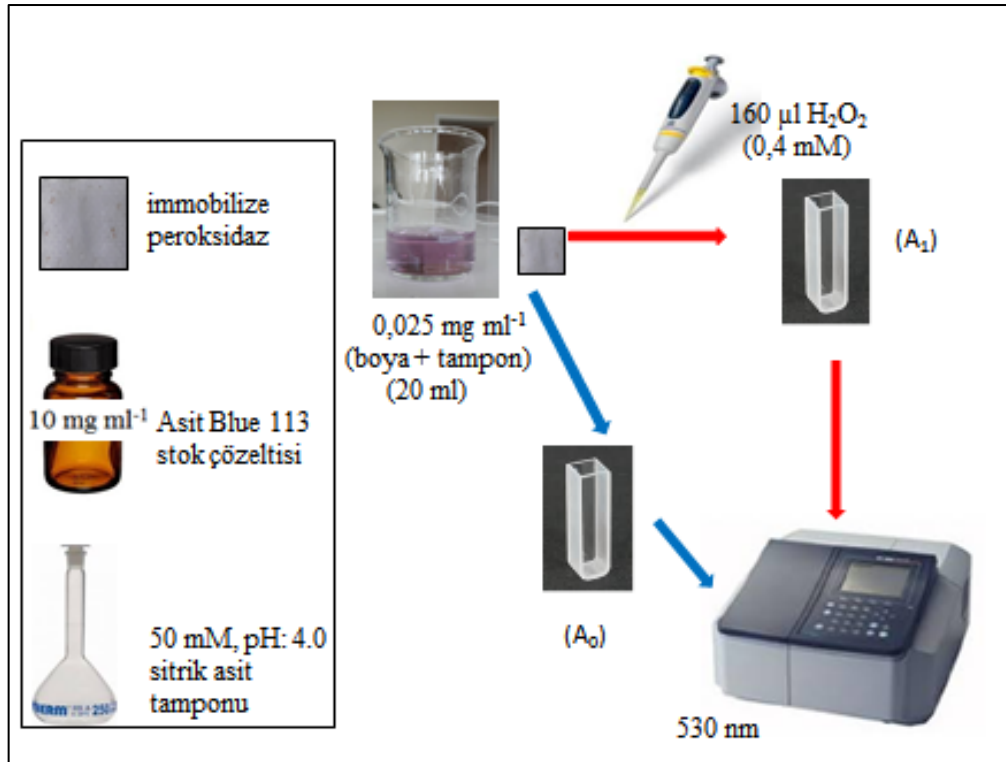
4.8.1.5 H₂O₂ derişimi etkisi

AB 129 boyasının immobilize peroksidaz ile H₂O₂'in farklı derişimlerinde (0,2, 0,4, 0,6, 0,8 ve 1,0 mM) 4.8.1'deki deney yöntemi kullanılarak renk giderimi incelendi.

4.8.2 İmmobilize peroksidaz ile AB 113 boyasının renk giderimi

Deney Yöntemi:

10 mg.mL⁻¹ derişimde AB 113 stok çözeltisi suda hazırlandı. Son derişimi 0,025 mg.mL⁻¹ olacak şekilde pH:4.0'de hazırlanmış sitrik asit tamponunda seyreltilti. Bu çözeltiden 20 mL alınarak içine immobilize peroksidaz 2 cm² (~0,152 mg.cm⁻²) eklenip başlangıç absorbansı 530 nm dalga boyunda ölçülerek kaydedildi. (A₀) Daha sonra üzerine (0,4 mM) 160 µL H₂O₂ eklenerek tepkime başlatıldı. Oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıyla hafif karıştırarak 15. dakikada çözeltinin absorbansı (A₁) tekrar ölçülerek [4.3]'deki denklem kullanılarak % boya giderim değerleri hesaplandı.



Şekil 4.7 İmmobilize peroksidaz ile AB 113 boyasının renk giderim yöntemi şematik gösterimi.

4.8.2.1 Sıcaklık etkisi

4.8.2'deki deney yöntemi kullanılarak farklı sıcaklıklarda (20, 30, 35, 40, 45, 50 °C) AB 113 boyası giderimi araştırıldı.

4.8.2.2 pH etkisi

İmmobilize peroksidaz ile H₂O₂ başlatıcısı kullanılarak farklı pH'larda (pH: 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0) 20 °C'de AB 113 boyası giderimi 4.8.2'deki deney yöntemi kullanılarak incelendi.

4.8.2.3 Enzim derişiminin etkisi

AB 113 boyasının, farklı enzim derişimleri kullanılarak (0,152, 0,304, 0,456, 0,608, 0,760 mg) giderilmesi 4.8.2'deki deney yönteminde anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi.

4.8.2.4 Boya derişiminin etkisi

Farklı derişimlerinde (0,005, 0,01, 0,015, 0,025, 0,035 ve 0,045 mg.mL⁻¹) AB 113 boyası kullanılarak immobilize peroksidaz ile renk giderimi 4.8.2'deki deney yönteminde belirtildiği gibi gerçekleştirildi.

4.8.2.5 H₂O₂ derişimi etkisi

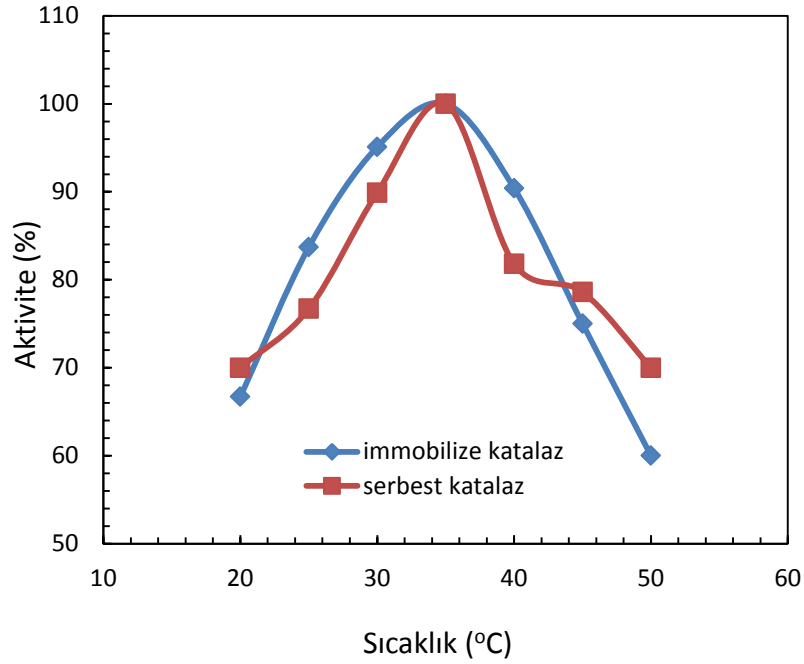
Farklı derişimlerde H₂O₂ (0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0 ve 2,0 mM) kullanılarak immobilize peroksidaz ile AB 113 boyası giderimi 4.8.2'deki yöntemle araştırıldı.

5. BULGULAR

5.1 Katalaz Enzimi İçin Bulgular

5.1.1 Serbest ve immobilize katalazın optimum sıcaklığının belirlenmesi

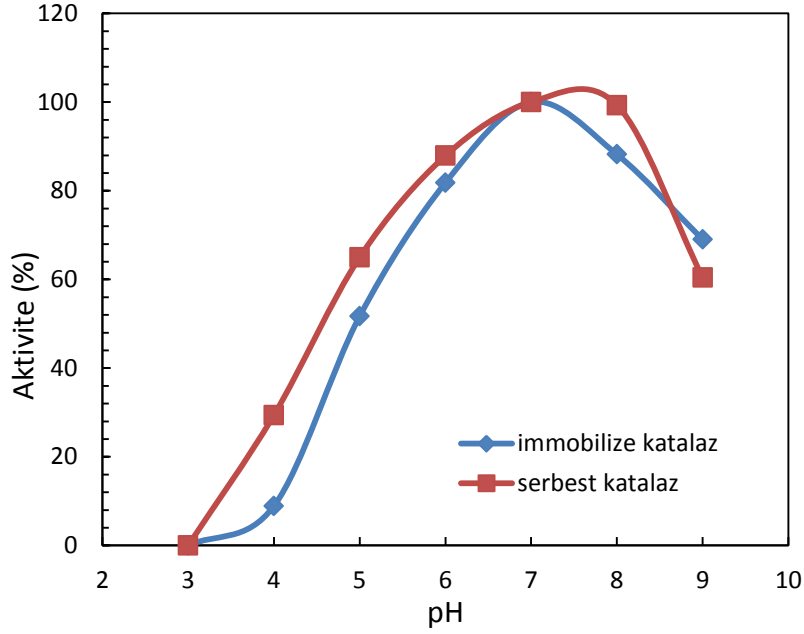
Serbest ve immobilize katalazın optimum sıcaklığının belirlenmesinde substrat derişimi ve enzim miktarı sabit tutularak farklı sıcaklıklarda enzim aktiviteleri ölçüldü ve sıcaklık-% aktivite grafiği çizildi (şekil 5.1). Serbest ve immobilize katalaz için optimum sıcaklık 35 C bulunmuştur.



şekil 5.1 Serbest ve immobilize katalazın optimum sıcaklık grafiği.

5.1.2 Serbest ve immobilize katalazın optimum pH'nın belirlenmesi

Serbest ve immobilize katalazın optimum pH'nın belirlenmesinde farklı pH'lardaki tamponlarda hazırlanmış substrat çözeltileri kullanılarak enzim aktiviteleri ölçüldü ve pH-% aktivite grafiği çizildi (şekil 5.2).



Şekil 5.2 Serbest ve immobilize katalazın optimum pH grafiği.

Serbest ve immobilize katalazın optimum pH'ı 7.0 olarak bulundu.

5.1.3 Serbest ve immobilize katalazın kinetik sabitlerinin belirlenmesi

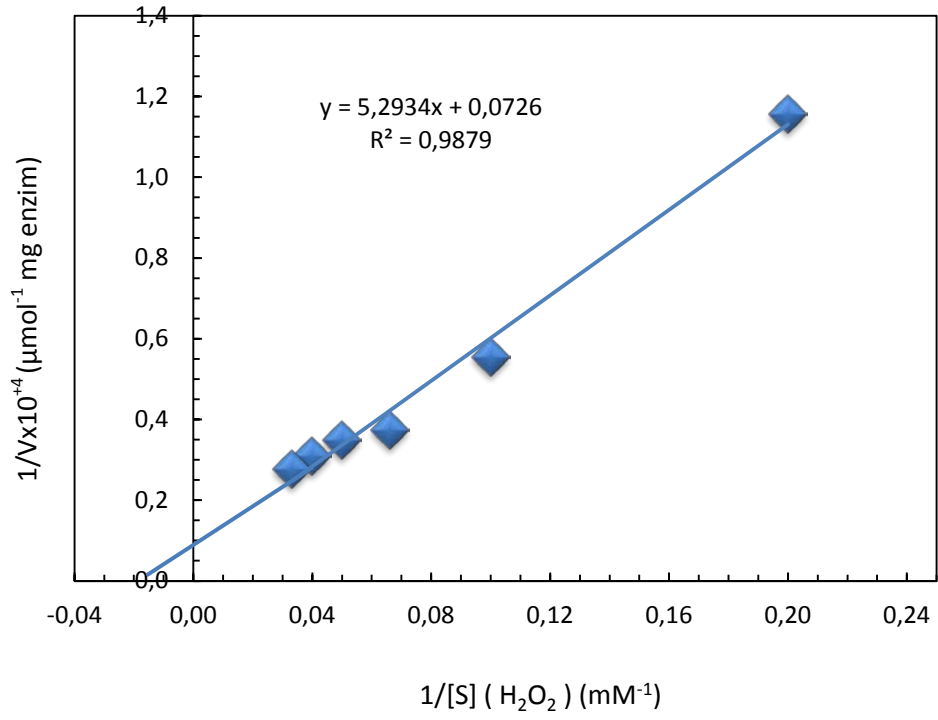
Serbest ve immobilize katalazın kinetik sabitlerinin belirlenmesi amacıyla sabit miktarda enzim ve farklı derişimlerde substrat kullanılarak Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 5.3 ve 5.4).

Serbest katalaz için $K_m = 72,91 \text{ mM}$, $V_{max} = 137.738,00 \text{ } \mu\text{mol.mg enzim}^{-1}$, immobilize katalaz için $K_m = 83,58 \text{ mM}$, $V_{max} = 1.500,00 \text{ } \mu\text{mol.mg enzim}^{-1}$ olarak bulundu.

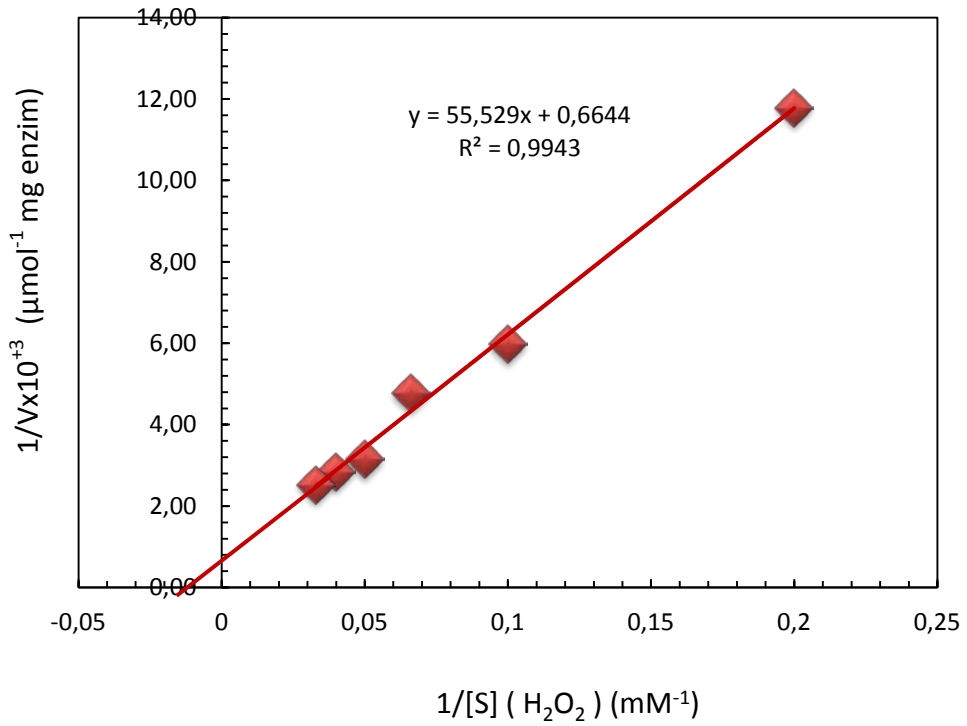
Serbest katalaz, $K_m = 72,91 \text{ mM}$, $V_{max} = 137.738,00 \text{ } \mu\text{mol.mg enzim}^{-1}$ değerlerinde $35 \text{ } ^\circ\text{C}$ sıcaklıkta, pH:7.0'de $[\text{H}_2\text{O}_2] = 10 \text{ mM}$ substrat derişiminde, 1 dakikada mg enzim başına $16.613 \text{ } \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ parçalamıştır.

İmmobilize katalaz, $K_m = 83,58 \text{ mM}$, $V_{max} = 1.500,00 \text{ } \mu\text{mol.mg enzim}^{-1}$ değerlerinde $35 \text{ } ^\circ\text{C}$ sıcaklıkta, pH:7.0'de $[\text{H}_2\text{O}_2] = 10 \text{ mM}$ substrat derişiminde, 1 dakikada mg enzim başına $160 \text{ } \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ parçalamıştır.

Bu değerler enzimlerin başlangıç hızını belirlemek için denklem [1.2] Michaelis-Menten Eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır.



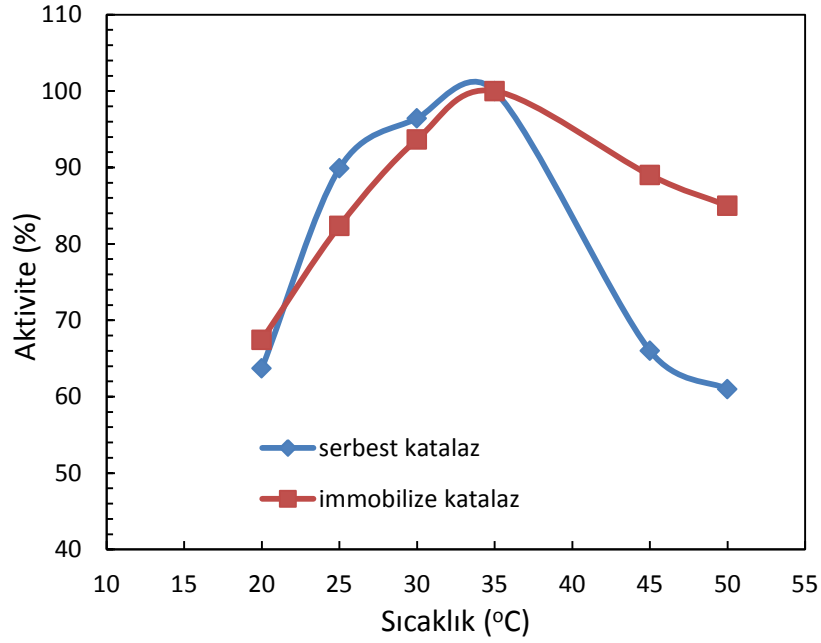
Şekil 5.3 Serbest katalazın Lineweaver-Burk grafiği.



Şekil 5.4 İmmobilize katalazın Lineweaver-Burk grafiği.

5.1.4 Serbest ve immobilize katalazın termal kararlılığının belirlenmesi

Serbest ve immobilize katalaz 1 saat değişik sıcaklıklarda inkübatörde bekledikten sonra aktivite ölçümü yapıldı ve sıcaklığa karşı % aktivite grafiği çizildi (Şekil 5.5).

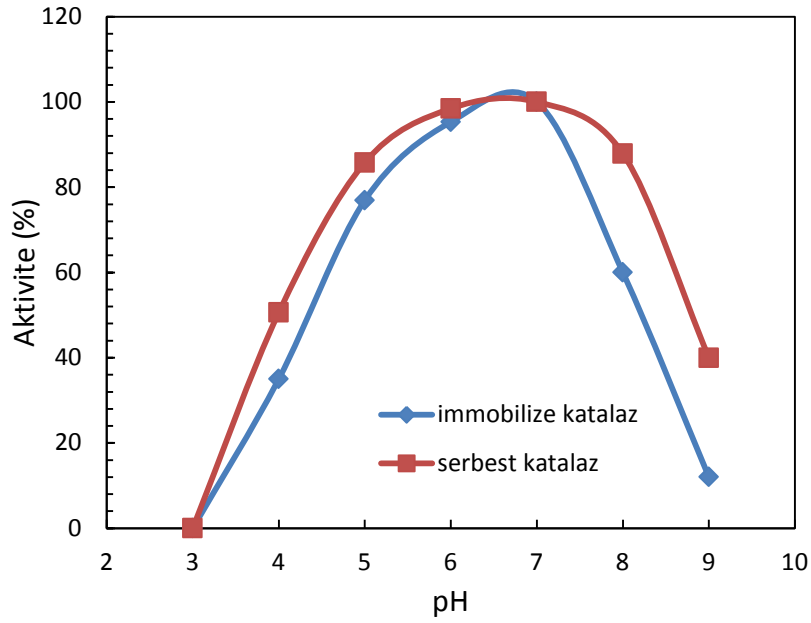


Şekil 5.5 Serbest ve immobilize katalazın termal kararlılık grafiği.

Serbest ve immobilize katalaz 35 °C sıcaklıkta yüksek termal kararlılık göstermiştir. 35 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda (35-50 °C) immobilize katalazın termal kararlılığı serbest katalazdan yüksek bulunmuştur.

5.1.5 Serbest ve immobilize katalazın pH kararlılığının belirlenmesi

Serbest ve immobilize katalaz 1 saat değişik pH değerlerinde bekledikten sonra aktivite ölçümü yapıldı ve pH 'a karşı % aktivite grafiği çizildi (Şekil 5.6).

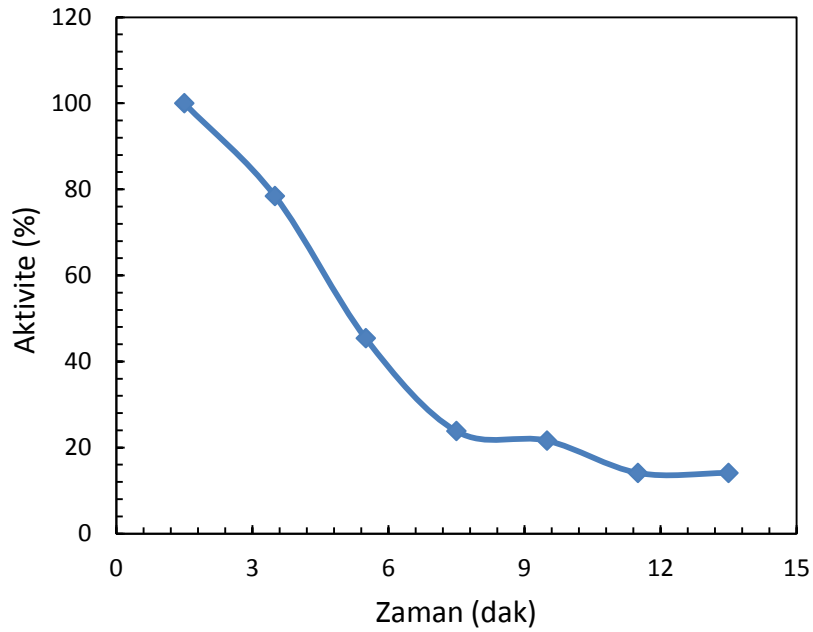


Şekil 5.6 Serbest ve immobilize katalazın pH kararlılık grafiği.

Serbest ve immobilize katalazın pH kararlılığında farklılık gözlenmemiş, her ikisinde de pH: 7.0'de kararlılığı en yüksek bulunmuştur.

5.1.6 İmmobilize katalazın kullanım kararlılığının belirlenmesi

İmmobilize katalaz enziminin kullanım kararlılığının belirlenmesinde aynı immobilize enzim kullanılıp yıkanarak tekrar kullanılarak aktiviteleri ölçüldü. Zamana karşı aktivite grafiği çizildi (Şekil 5.7).

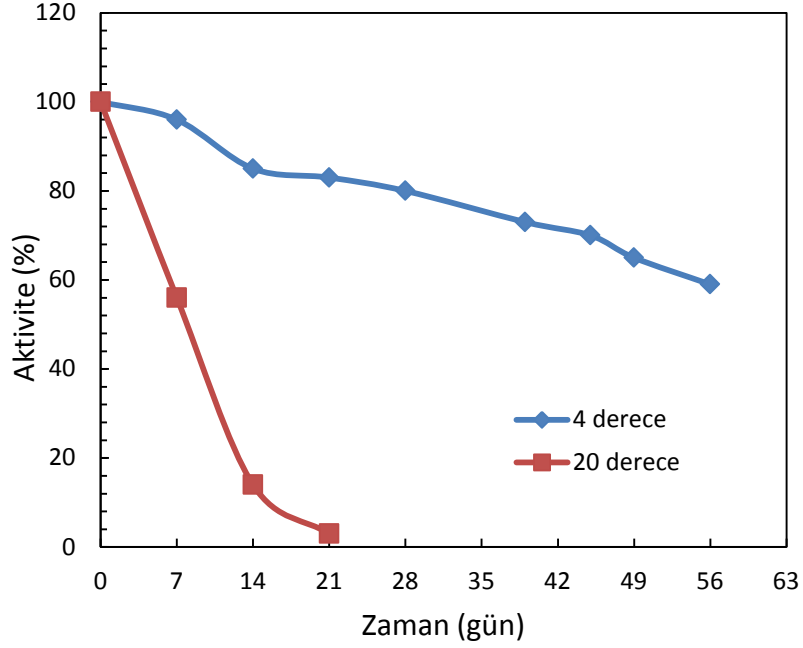


Şekil 5.7 İmmobilize katalazın kullanım kararlılığı grafiği.

İmmobilize katalaz yaklaşık üç kullanımda % 60 aktivitesini kaybetmiştir. Dördüncü kullanımda ise aktivitesinin yalnız % 20'sini koruduğu bulunmuştur.

5.1.7 Serbest ve immobilize katalazın saklama kararlılığının belirlenmesi

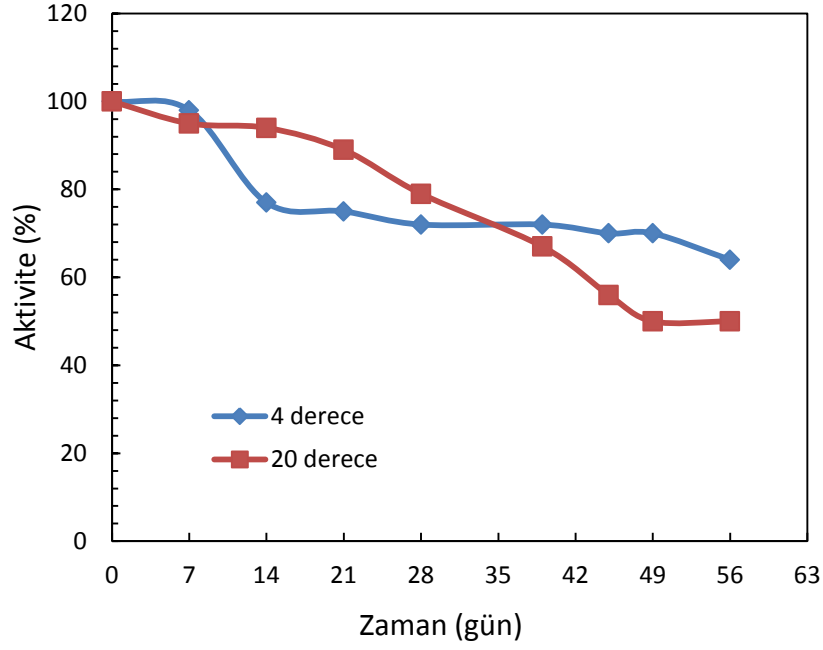
Serbest katalaz enziminin biri oda sıcaklığında (20 °C), diğeri ise 4 °C (dolapta) sıcaklıkta saklanarak belirli günlerde aktiviteleri ölçüldü (Şekil 5.8).



Şekil 5.8 Serbest katalazın 4 °C ve 20 °C'de saklama kararlılığı grafiği.

20 °C'de saklanan serbest enzim aktivitesinin yarısını ilk bir haftada, tamamını 14 günde yitirmiştir. 4 °C'de saklanan serbest enzim ise 40 gün kadar aktivitesinin yaklaşık % 80'ini korumuştur.

İmmobilize katalaz da aynı sıcaklıklarda oda sıcaklığında (20 °C) ve 4 °C (dolapta) sıcaklıkta saklanarak belirli günlerde aktiviteleri ölçüldü (Şekil 5.9).



Şekil 5.9 İmmobilize katalazın 4 °C ve 20 °C’de saklama kararlılığı grafiği.

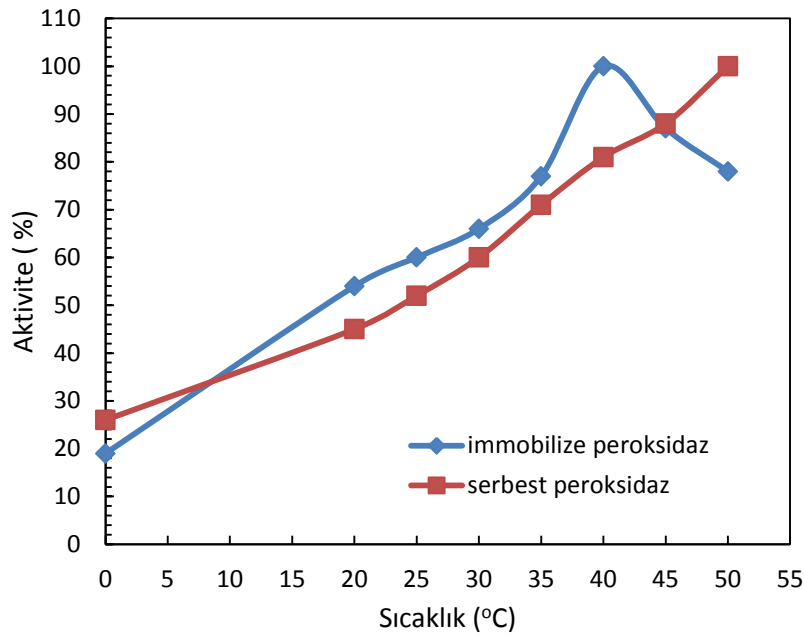
İmmobilize katalaz 4 °C sıcaklıkta ilk 14 günde aktivitesinin %20’sini kaybederken yaklaşık 40 günde halen % 80 aktivitesini korumuştur. 20 °C’de beklenen immobilize katalaz ise aynı sıcaklıkta saklanan serbest katalazdan daha yüksek bir saklama kararlılığı göstermiştir. Aktivite kaybı daha yavaş gerçekleşmiştir. İmmobilizasyonla 20 °C’de saklama kararlılığında artış gözlenmiştir.

5.2 HRP Enzimi İçin Bulgular

5.2.1 Serbest ve immobilize peroksidazın optimum sıcaklığının belirlenmesi

Serbest ve immobilize peroksidazın optimum sıcaklığının belirlenmesinde substrat derişimi ve enzim miktarı sabit tutularak farklı sıcaklıklarda enzim aktiviteleri ölçüldü ve sıcaklığa karşı % aktivite grafiği çizildi (Şekil 5.10).

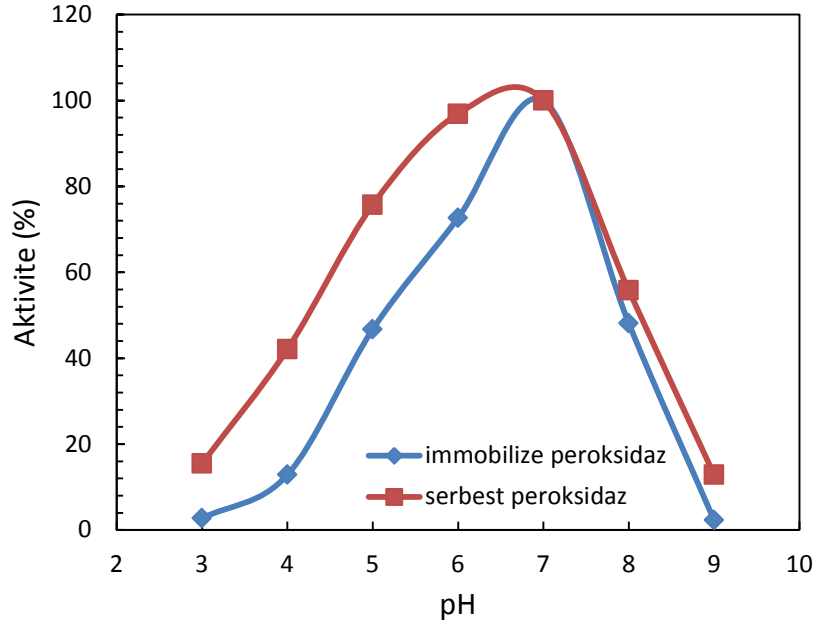
Sıcaklık arttıkça serbest ve immobilize peroksidazın aktivitesinde artış gözlenmiştir. Immobilize peroksidaz 40 °C’de optimum göstermiştir.



Şekil 5.10 Serbest ve immobilize peroksidazın optimum sıcaklık grafiği.

5.2.2 Serbest ve immobilize peroksidazın optimum pH’ının belirlenmesi

Serbest ve immobilize peroksidazın optimum pH’ının belirlenmesinde farklı pH’lardaki tamponlarda hazırlanmış substrat çözeltileri kullanılarak enzim aktiviteleri ölçüldü ve pH-% aktivite grafiği çizildi (Şekil 5.11).



Şekil 5.11 Serbest ve immobilize peroksidazın optimum pH grafiği.

Serbest peroksidaz için optimum pH 6.0-7.0 aralığında, immobilize peroksidaz için ise pH: 7.0 olarak bulunmuştur.

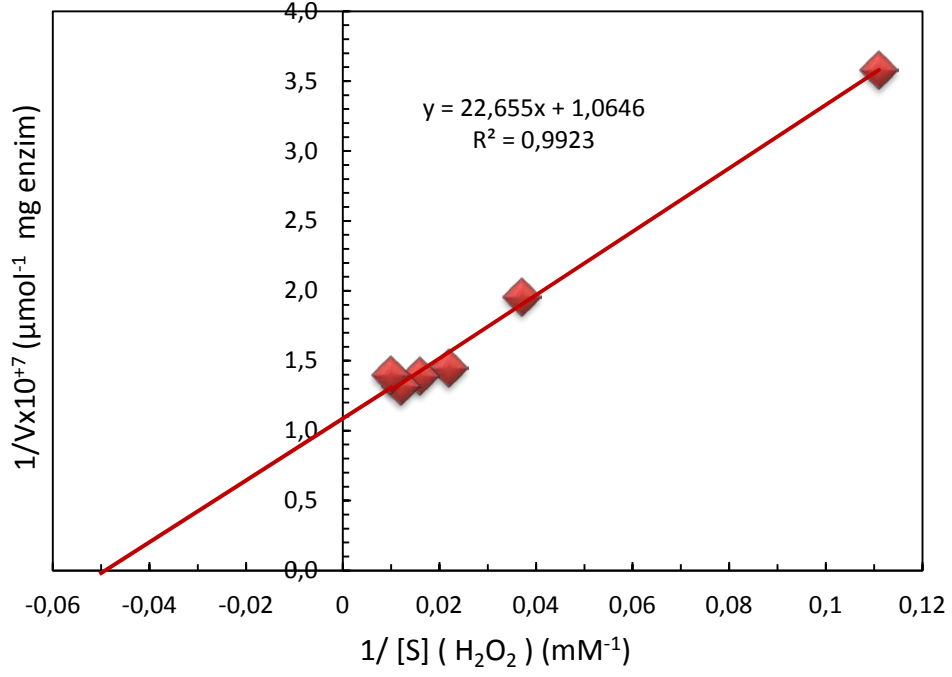
5.2.3 Serbest ve immobilize peroksidazın kinetik sabitlerinin belirlenmesi

Serbest ve immobilize peroksidazın kinetik sabitlerinin belirlenmesi amacıyla sabit miktarda enzim ve artan derişimlerde substrat kullanılarak Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 5.12 ve 5.13). Serbest peroksidaz için $K_m = 21,28$ mM, $V_{max} = 9.393.199,00$ $\mu\text{mol.mg enzim}^{-1}$, immobilize peroksidaz için $K_m = 25,39$ mM, $V_{max} = 2.224.990,00$ $\mu\text{mol.mg enzim}^{-1}$ olarak bulundu.

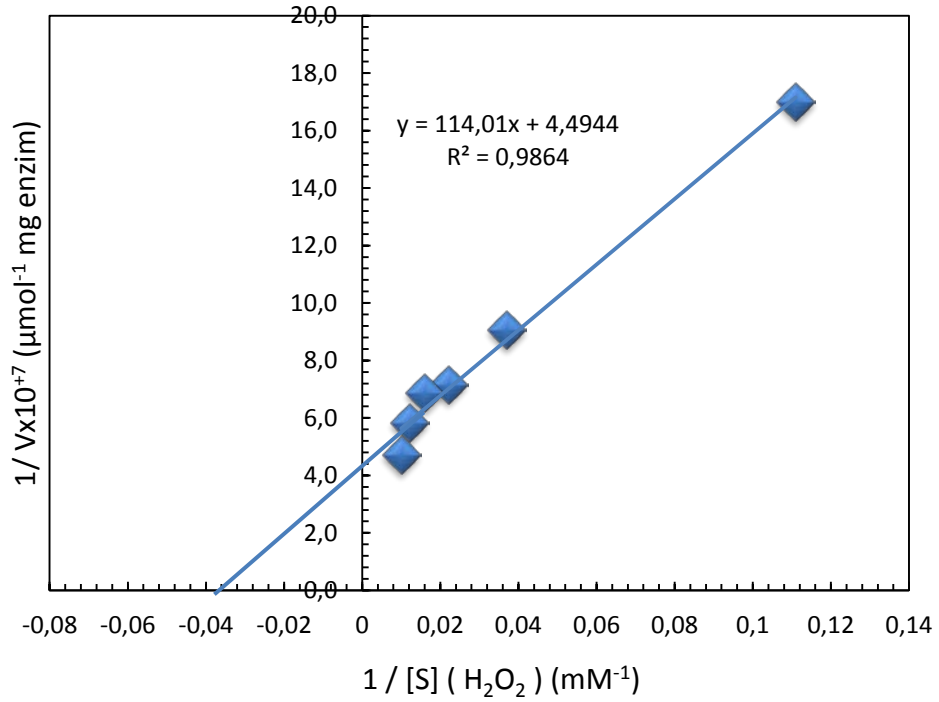
Serbest peroksidaz, $K_m = 21,28$ mM, $V_{max} = 9.393.199,00$ $\mu\text{mol.mg enzim}^{-1}$ değerlerinde 40 °C sıcaklıkta, pH:7.0'de [Guaiakol]= 45 mM substrat derişiminde, 1 dakikada mg enzim başına 6.377.400 μmol guaiakolü ürüne dönüştürmüştür.

İmmobilize peroksidaz, $K_m = 21,28$ mM, $V_{max} = 9.393.199,00$ $\mu\text{mol.mg enzim}^{-1}$ değerlerinde 40 °C sıcaklıkta, pH:7.0'de [Guaiakol]= 45 mM substrat derişiminde, 1 dakikada mg enzim başına 1.422.425 μmol guaiakolü ürüne dönüştürmüştür.

Bu değerler enzimlerin başlangıç hızını belirlemek için denklem [1.2] Michaelis-Menten Eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır.



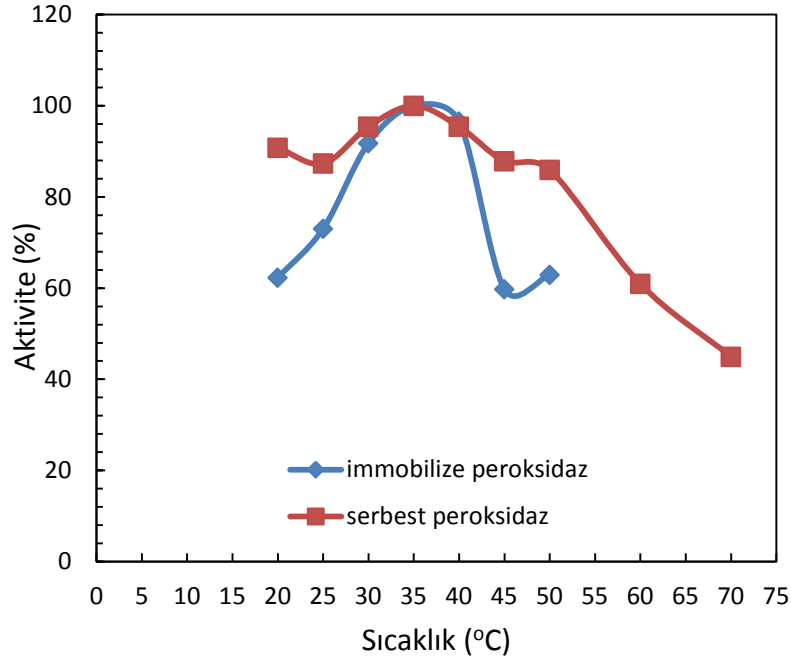
Şekil 5.12 Serbest peroksidazın Lineweaver-Burk grafiği.



Şekil 5.13 İmmobilize peroksidazın Lineweaver-Burk grafiği.

5.2.4 Serbest ve immobilize peroksidazın termal kararlılığının belirlenmesi

Serbest ve immobilize peroksidaz 1 saat farklı sıcaklıklarda inkübe edildikten sonra aktivite ölçümü yapıldı ve sıcaklık-% aktivite grafiği çizildi (Şekil 5.14).



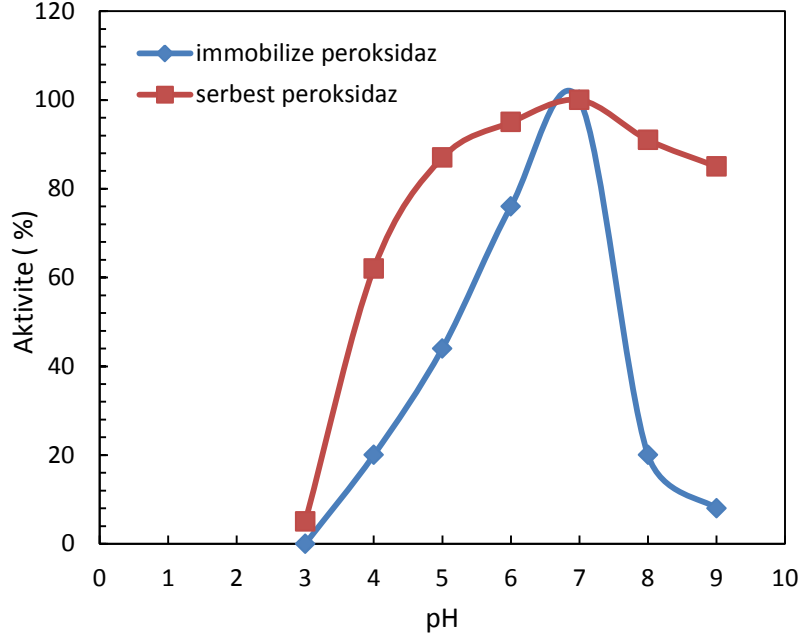
Şekil 5.14 Serbest ve immobilize peroksidazın termal kararlılık grafiği.

İmmobilize peroksidaz ve serbest peroksidazın 35 °C sıcaklıkta termal kararlılığı yüksek olduğu bulunmuştur.

5.2.5 Serbest ve immobilize peroksidazın pH kararlılığının belirlenmesi

Serbest ve immobilize peroksidaz 1 saat farklı pH'da bekledikten sonra aktivite ölçümü yapıldı ve pH'a karşı % aktivite grafiği çizildi (Şekil 5.15).

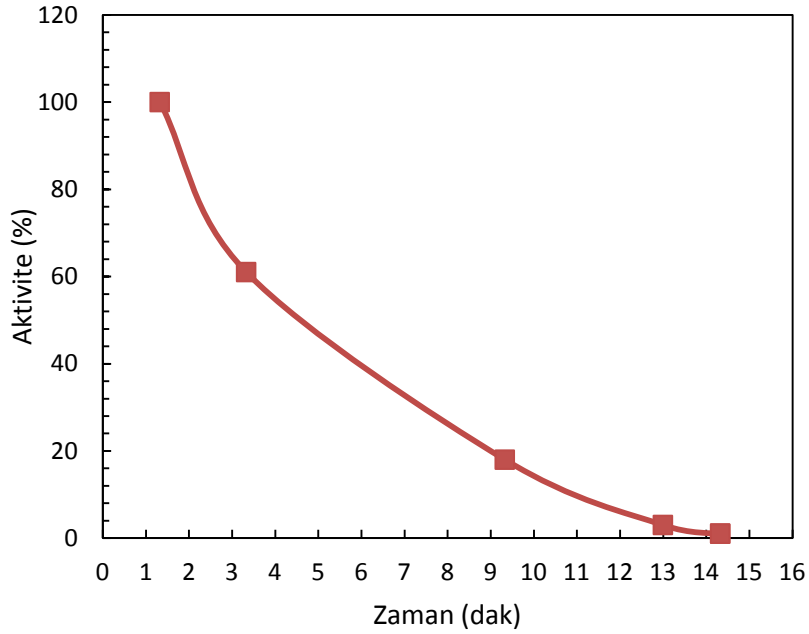
İmmobilize peroksidazın pH kararlılığı serbest peroksidazdan daha düşük bulunmuştur.



Şekil 5.15 Serbest ve immobilize peroksidazın pH kararlılık grafiği.

5.2.6 İmmobilize peroksidazın kullanım kararlılığının belirlenmesi

İmmobilize peroksidazın kullanım kararlılığının belirlenmesinde aynı immobilize enzim taze substrat çözeltisine atılıp tekrar tekrar yıkanarak aktiviteleri ölçüldü (Şekil 5.16).

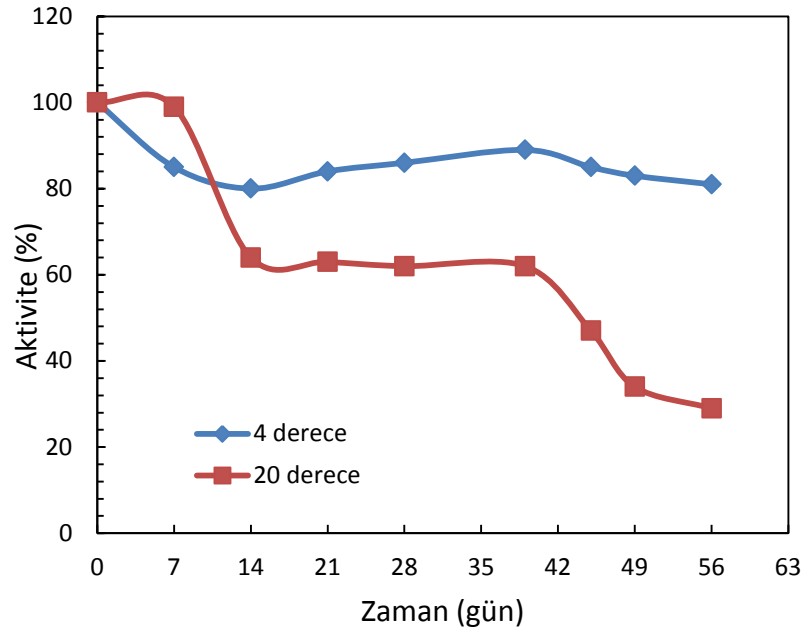


Şekil 5.16 İmmobilize peroksidazın kullanım kararlılığı grafiği.

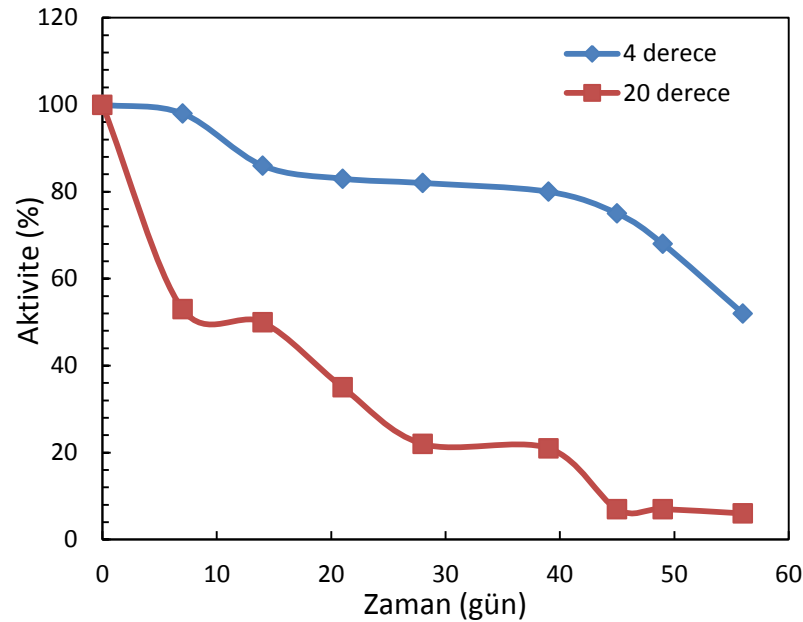
İmmobilize peroksidazın kullanım kararlılığının iki kullanımdan fazla olmadığı, üçüncü kullanımda aktivitesini % 80 kaybettiği gözlenmektedir.

5.2.7 Serbest ve immobilize peroksidazın saklama kararlılığının belirlenmesi

Serbest peroksidaz ve immobilize peroksidaz oda sıcaklığında (20 °C) ve 4 °C (dolapta) sıcaklıkta saklanarak belirli günlerde aktiviteleri ölçüldü (Şekil 5.17). Serbest enzim 4 °C sıcaklıkta, 20 °C'deki sıcaklığa göre daha yüksek saklama kararlılığı göstermiştir.



Şekil 5.17 Serbest peroksidazın 4 °C ve 20 °C'de saklama kararlılığı grafiği.

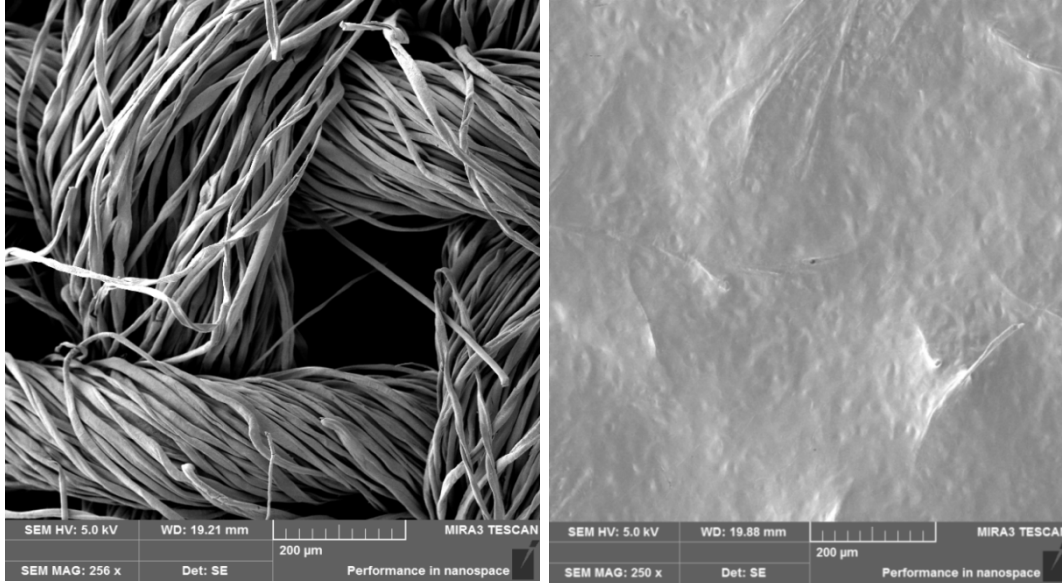


Şekil 5.18 İmmobilize peroksidazın 4 °C ve 20 °C'de saklama kararlılığı grafiği.

İmmobilize peroksidazın 4 °C sıcaklıktaki saklama kararlılığı, 20 °C'dekine göre daha yüksek bulunmuştur (Şekil 5.18).

5.3 SEM Görüntüleri

Bu çalışmada kullanılan pamuklu kumaş, parafinli kumaş, immobilize katalaz ve immobilize peroksidazın SEM görüntüleri Şekil 5.19 ve 5.20’de verilmiştir.

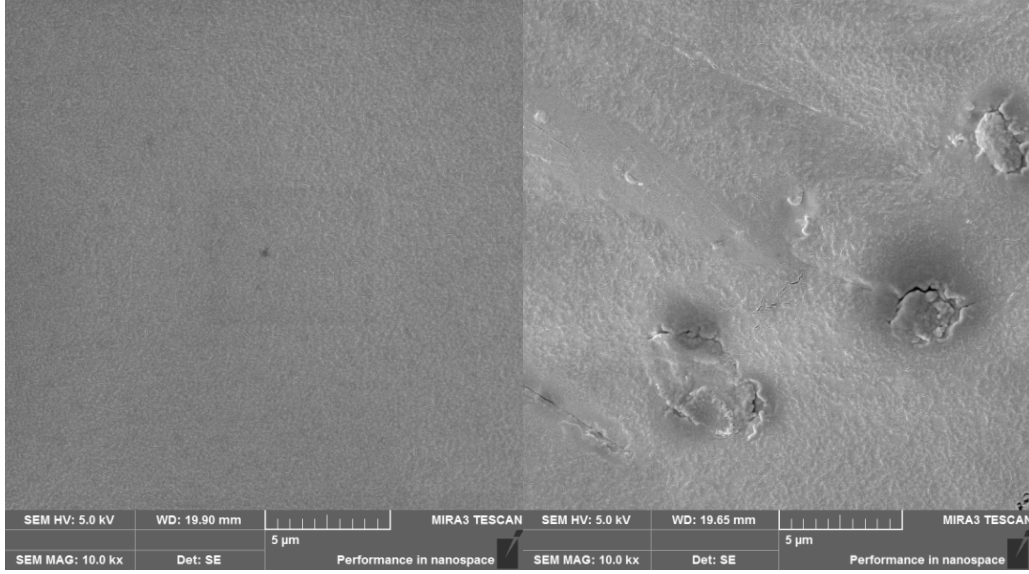


(pamuklu kumaş)

(parafinli kumaş)

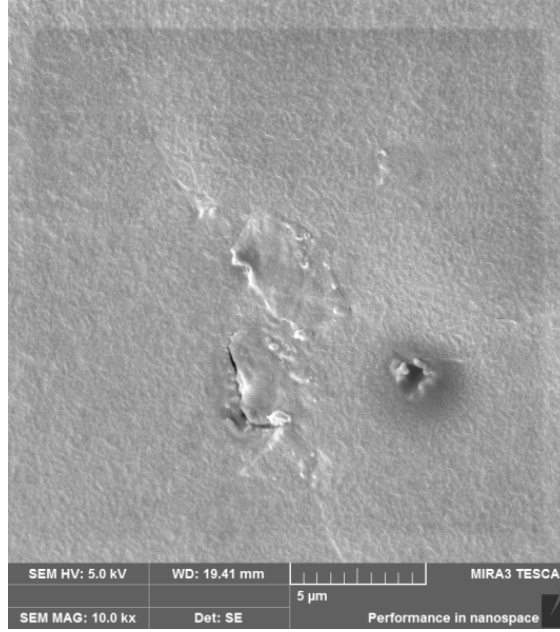
Şekil 5.19 Pamuklu kumaş ve parafinli kumaşın SEM görüntüleri.

Şekil 5.19 incelendiğinde kumaşın içerdiği pamuk lifleri açık ve net olarak görülmektedir. Kumaş parafin ile etkileştirildiğinde lifler arasındaki boşluklar ve kumaşın tamamının parafin ile kaplandığı SEM görüntülerinden anlaşılmaktadır.



(parafinli kumaş)

(immobilize katalaz)



(immobilize peroksidaz)

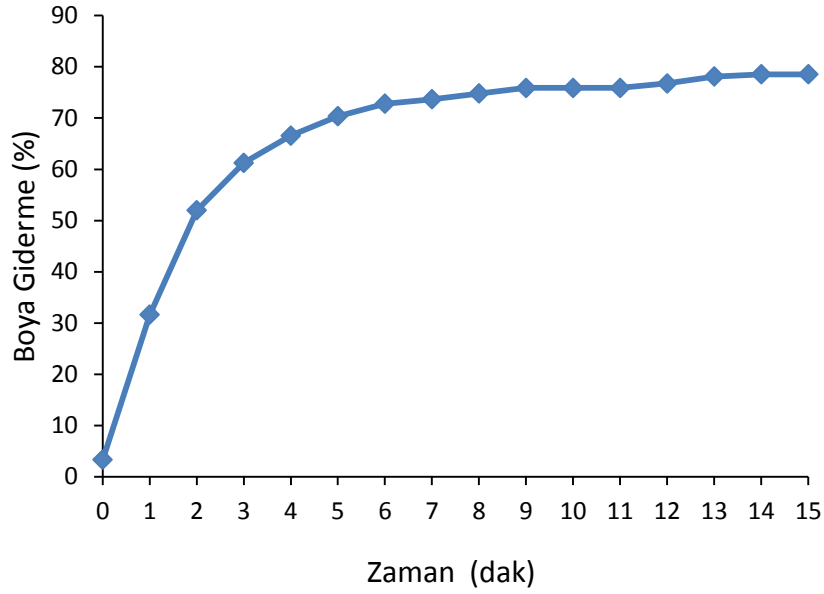
Şekil 5.20 Parafinli kumaş, immobilize katalaz ve immobilize peroksidazın SEM görüntüleri.

Katalaz ve peroksidaz parafin destekte immobilize edildikten sonra çekilen SEM görüntüleri Şekil 5.20'de verilmiştir. Parafininin kendisi olabildiğince homojen bir görünüme sahipken enzim immobilize edilen parafin destek katı katalaz ve katı peroksidazı çözünmemiş formda içerdiğinden heterojen bir görünüme sahiptir.

5.4 İmmobilize Horseradish Peroksidaz ile Asit Blue 129 (AB 129) Boyasının Renginin Giderilmesi

5.4.1 Zaman etkisi

İmmobilize peroksidaz ile AB 129 boyasının giderilmesi; 20 °C’de, 0,312 mg peroksidaz (2 cm²), 0,1 mg.mL⁻¹ boya, 0,4 mM H₂O₂ derişiminde ve pH: 5.0’te gerçekleştirildi.

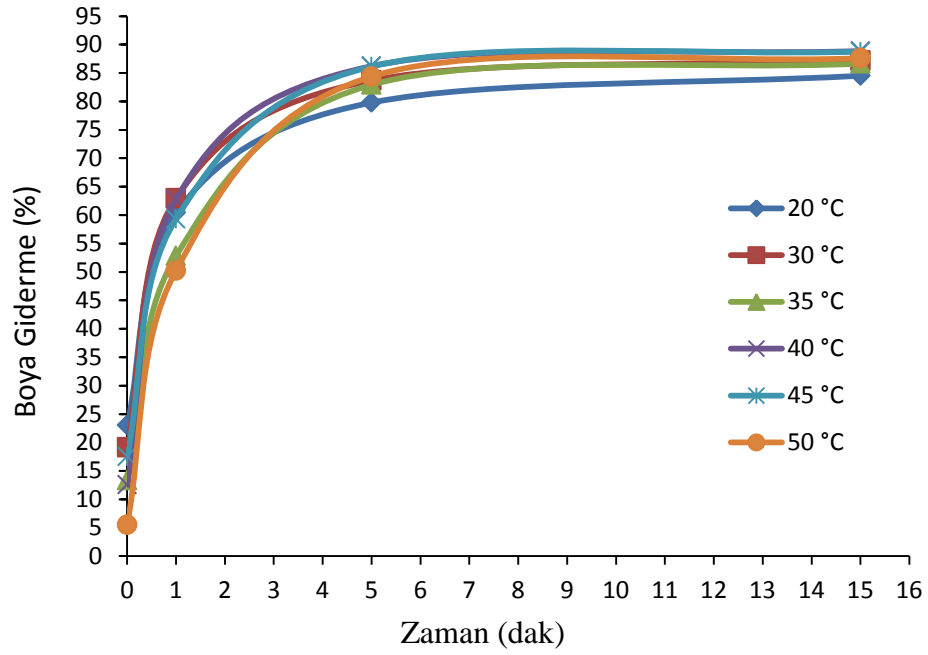


Şekil 5.21 Zamanla immobilize peroksidaz ile AB 129 boya giderimi grafiği.

Şekil 5.21 incelendiğinde en yüksek boya giderme değeri 8 ve 9. dakikalarda gözlenerek boya giderme süresi olarak bunun yaklaşık iki katı olan 15 dakika optimum giderme süresinin deneyde kullanımına karar verildi.

5.4.2 Sıcaklık etkisi

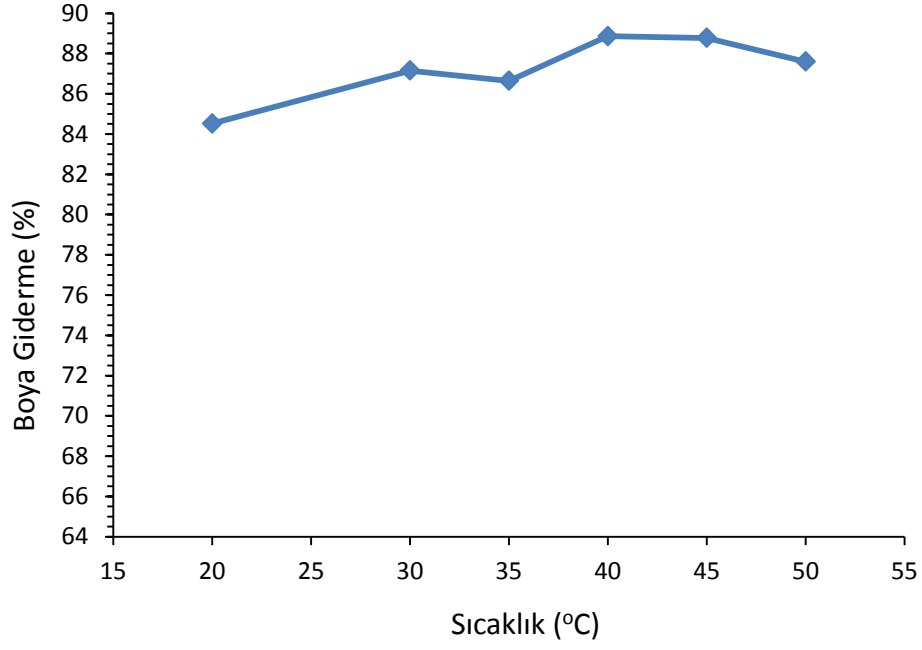
pH: 5.0’te, 0,312 mg (2 cm²) immobilize peroksidaz, 0,1 mg.mL⁻¹ boya, 0,4 mM H₂O₂ kullanılarak farklı sıcaklıklarda 15 dk etkileşim zamanında boya giderimi incelendi. Farklı sıcaklıklarda zamana karşı boya giderimi Şekil 5.22’de verilmiştir.



Şekil 5.22 İmmobilize peroksidaz ile zamana karşı farklı sıcaklıklarda AB 129 boya giderimi grafiği.

20, 30, 35, 40, 45 ve 50 °C’de boya gideriminin yaklaşık ilk beş dakikada (% 85) maksimum boya giderimine ulaşıldığı bulundu.

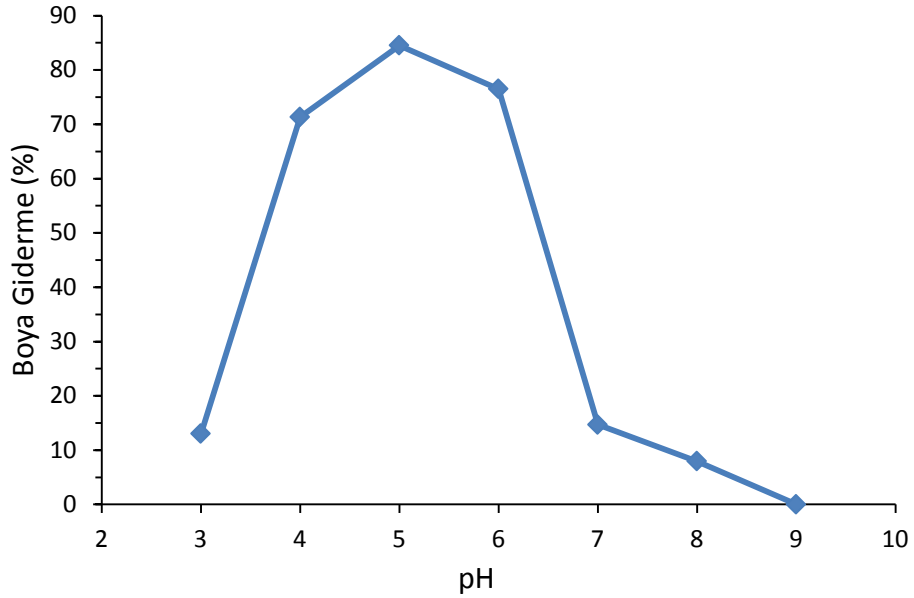
Şekil 5.23’de görüldüğü gibi bu çalışmada 15. dakika sonunda 20, 30, 35, 40, 45 ve 50 °C için sırası ile % 85, % 87, % 87, % 89, % 89, % 88 boya giderme değerleri hesaplanmıştır. 20-50 °C sıcaklık aralığında birbirine yakın boya giderim değerleri elde edildi.



Şekil 5.23 İmmobilize peroksidaz ile farklı sıcaklıklarda AB 129 boya giderimi grafiği.

5.4.3 pH etkisi

İmmobilize peroksidaz ile optimum boya giderim pH'ı; 20 °C'de, 0,1 mg.mL⁻¹ boya, 0,312 mg (2 cm²) enzim, 0,4 mM H₂O₂ derişiminde ve 15 dakika süre ile gerçekleştirildi.

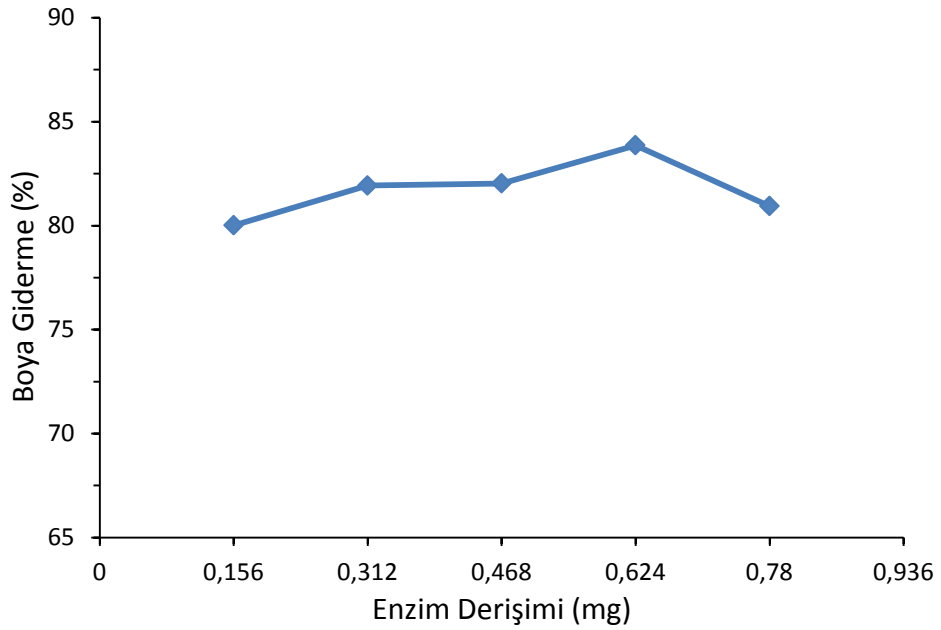


Şekil 5.24 İmmobilize peroksidaz ile farklı pH'larda hazırlanan AB 129 boya giderimi grafiği.

İmmobilize peroksidaz ile AB 129 boyasının giderilmesi çalışmalarında farklı pH'larda (pH: 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0) hazırlanan boyanın immobilize peroksidaz ile 15 dakikalık sürede boya giderme değerleri incelenmiştir. Bu değerler sonucunda pH: 5.0'te en yüksek boya giderim (% 85) değerine ulaşılmıştır (Şekil 5.24).

5.4.4 Enzim derişimi etkisi

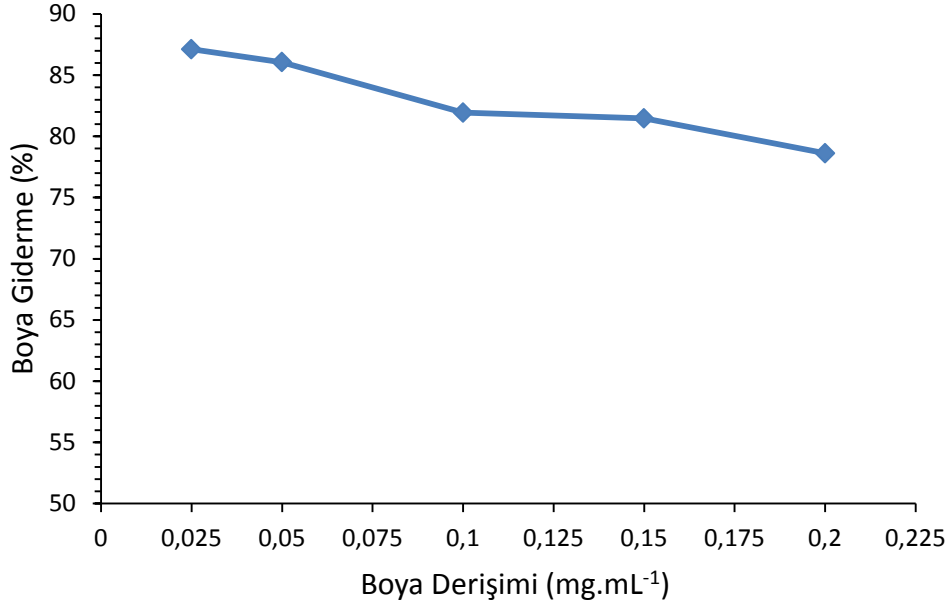
Artan immobilize peroksidaz derişimleri kullanılarak (0,156, 0,312, 0,468, 0,624 ve 0,780 mg) 0,1 mg.mL⁻¹ AB 129 boyasının renk giderimi araştırıldı. Enzim derişimi arttıkça boya gideriminde önemli bir değişim gözlenmediği bulundu (Şekil 5.25).



Şekil 5.25 Farklı derişimlerinde immobilize peroksidaz ile AB 129 boya giderimi grafiği.

5.4.5 Boya derişimi etkisi

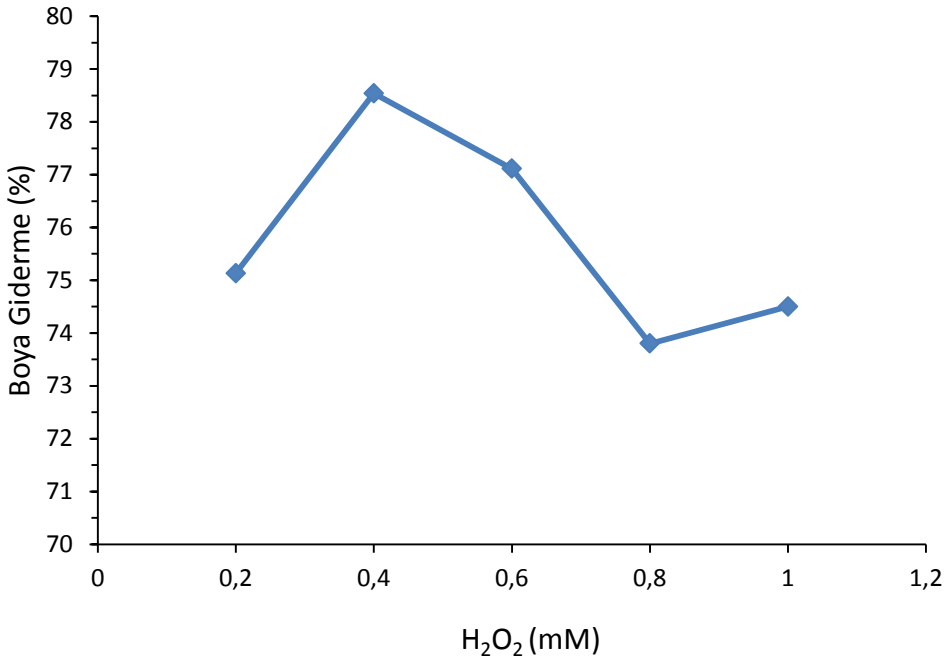
Artan AB 129 boyasının boyası derişiminin (0,025, 0,05, 0,10, 0,15 ve 0,20 mg.mL⁻¹), immobilize peroksidaz ile giderimi 4.8.1'de anlatıldığı gibi incelendi ve boya derişimine karşılık boya giderim grafiği çizildi (Şekil 5.26). Boya derişimi arttıkça boya gideriminin yaklaşık % 7 azaldığı gözlenmiştir.



Şekil 5.26 Farklı boya derişimlerinde immobilize peroksidaz ile AB 129 boya giderimi grafiği.

5.4.6 H₂O₂ derişimi etkisi

İmmobilize peroksidaz kullanılarak AB 129 boyası gideriminde H₂O₂ derişimi (0,2, 0,4, 0,6, 0,8 ve 1,0 mM) etkisi incelenip H₂O₂ derişimine karşılık boya giderim grafiği çizilmiştir (Şekil 5.27). En yüksek boya giderimine (%78) 0,4 mM H₂O₂ derişiminde ulaşılmıştır.

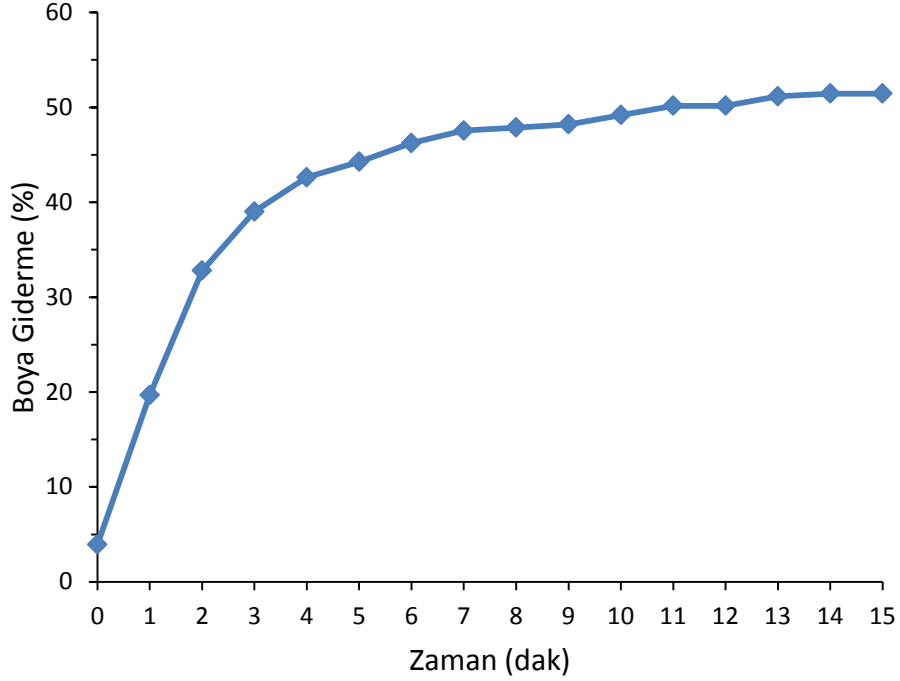


Şekil 5.27 Farklı H₂O₂ derişimlerinde immobilize peroksidaz ile AB 129 boya giderimi grafiği.

5.5 İmmobilize Horseradish Peroksidaz ile Asit Blue 113 (AB 113) Boyasının Renginin Giderilmesi

5.5.1 Zamanın etkisi

İmmobilize peroksidaz ile AB 113 boyasının renk giderilmesine ait zamana karşılık boya giderim grafiği Şekil 5.28’de verilmiştir.

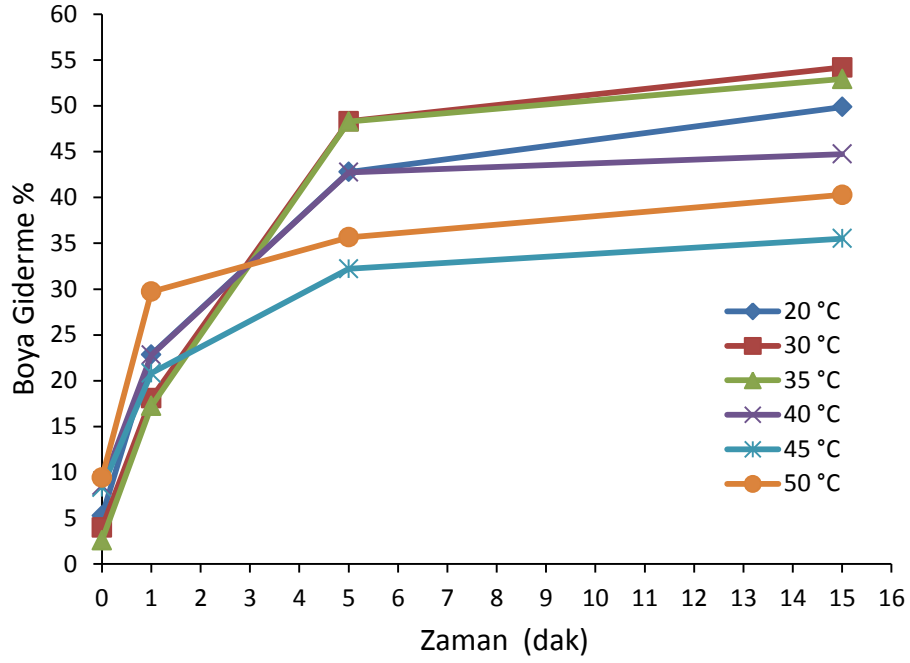


Şekil 5.28 İmmobilize peroksidaz ile 15 dakika süresince AB 113 boya giderimi grafiği.

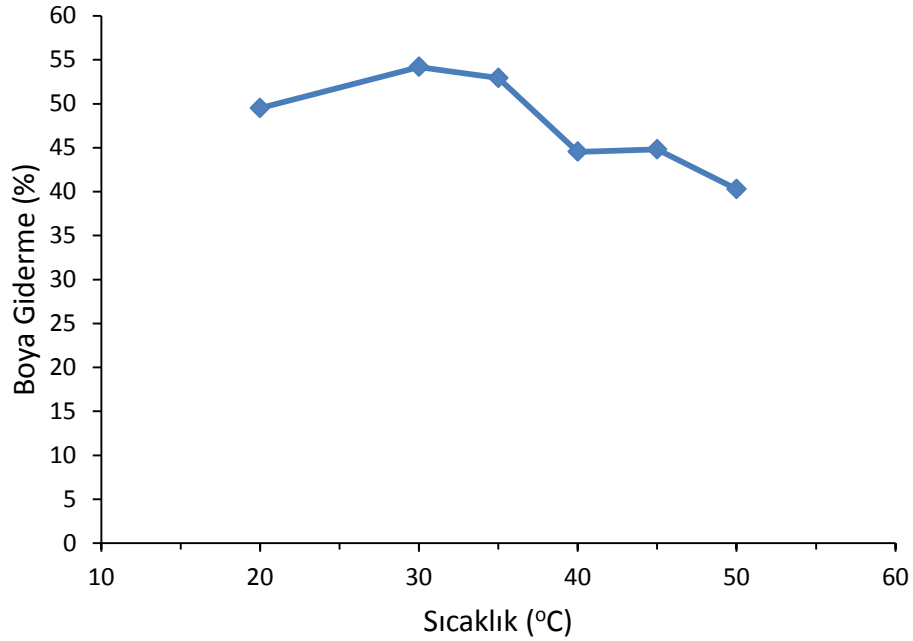
Şekil 5.28 incelendiğinde 6 ve 7. dakikalarda maksimum boya giderimine (% 45) ulaşılmıştır. Çalışmamızda 15 dakikalık boya giderim süresi kullanılmıştır.

5.5.2 Sıcaklık etkisi

İmmobilize peroksidaz ile farklı sıcaklıklarda AB 113 boyasının giderimine ait grafikler Şekil 5.29’da verilmiştir. En yüksek boya giderim değerine (%53) 30 °C sıcaklıkta ulaşılmıştır. 35 °C’den sonra sıcaklık yükseldikçe boya gideriminin düştüğü gözlenmiştir.



Şekil 5.29 İmmobilize peroksidaz ile zamana karşılık farklı sıcaklıklarda AB 113 boya giderimi grafiği.

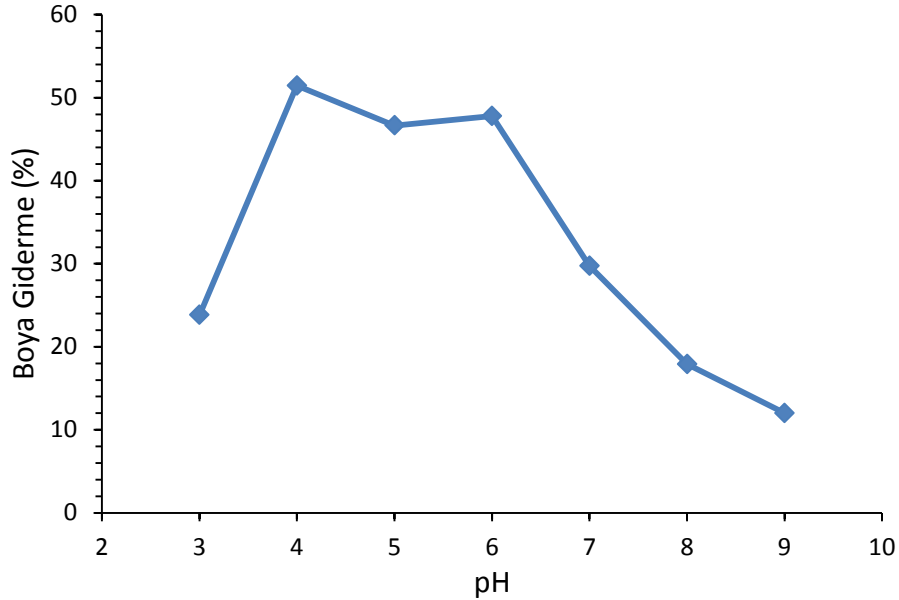


Şekil 5.30 İmmobilize peroksidaz ile farklı sıcaklıklarda AB 113 boya giderimi grafiği.

Şekil 5.30'da görüldüğü gibi 20, 30, 35, 40, 45 ve 50 °C için sırası ile % 50, % 54, % 53, % 45, % 45, % 40 boya giderme değerleri elde edilmiştir. 20-35 °C sıcaklık aralığında % 50-55 arasında bir boya giderim değeri elde edilmiş tüm diğer boya giderim çalışmalarında oda sıcaklığında yapılmasına karar verilmiştir.

5.5.3 pH etkisi

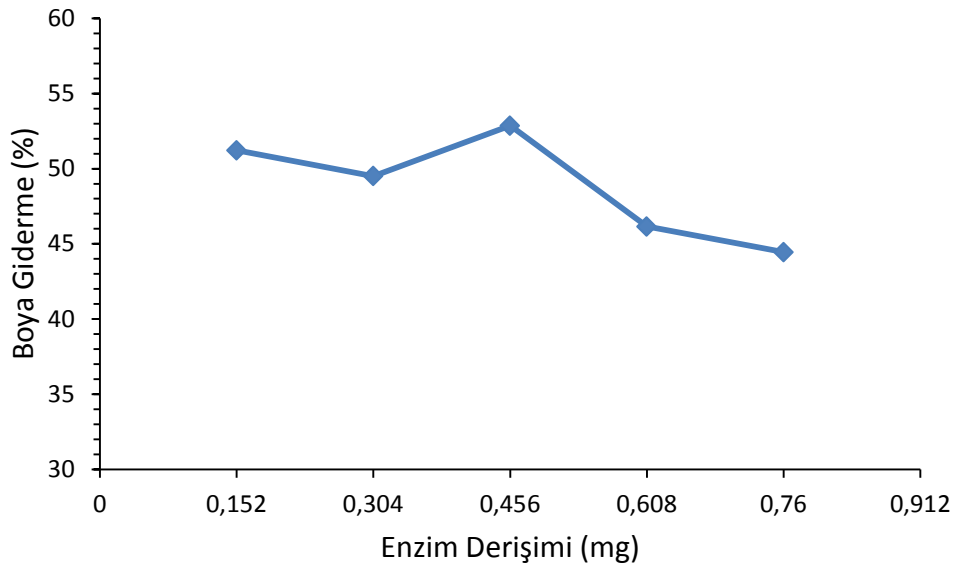
Farklı pH'larda (pH: 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0) hazırlanan AB 113 boyasının immobilize peroksidaz ile boya giderimi incelenmiş ve sonuçlar Şekil 5.31'de verilmiştir. En yüksek boya giderim değerine (% 52) pH: 4.0'te ulaşılmıştır.



Şekil 5.31 İmmobilize peroksidaz ile farklı pH'larda AB 113 boya giderimi grafiği.

5.5.4 Enzim derişimi etkisi

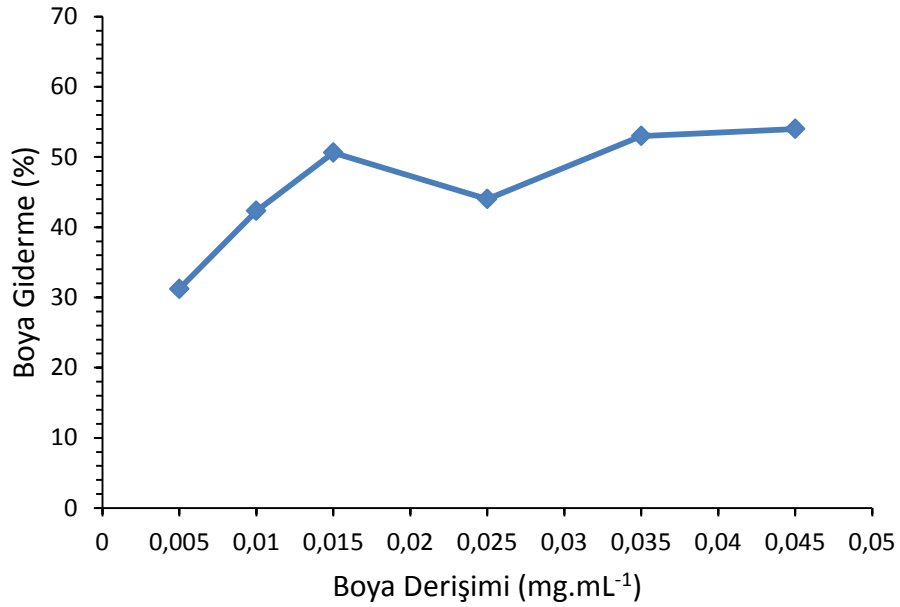
AB 113 boyasının giderimine immobilize peroksidaz derişiminin etkisi incelenerek Şekil 5.32'de verilmiştir. Düşük enzim derişimlerinde boya gideriminde önemli bir fark gözlenmezken yüksek enzim derişimlerinde boya gideriminin azaldığı bulunmuştur.



Şekil 5.32 Farklı derişimlerinde immobilize peroksidaz ile AB 113 boya giderimi grafiği.

5.5.5 Boya derişimi etkisi

İmmobilize peroksidaz ile AB 113 boyası giderimine boya derişiminin (0,005, 0,010, 0,015, 0,025, 0,035 ve 0,045 mg.mL⁻¹) etkisi incelenerek Şekil 5.33’de verilmiştir.

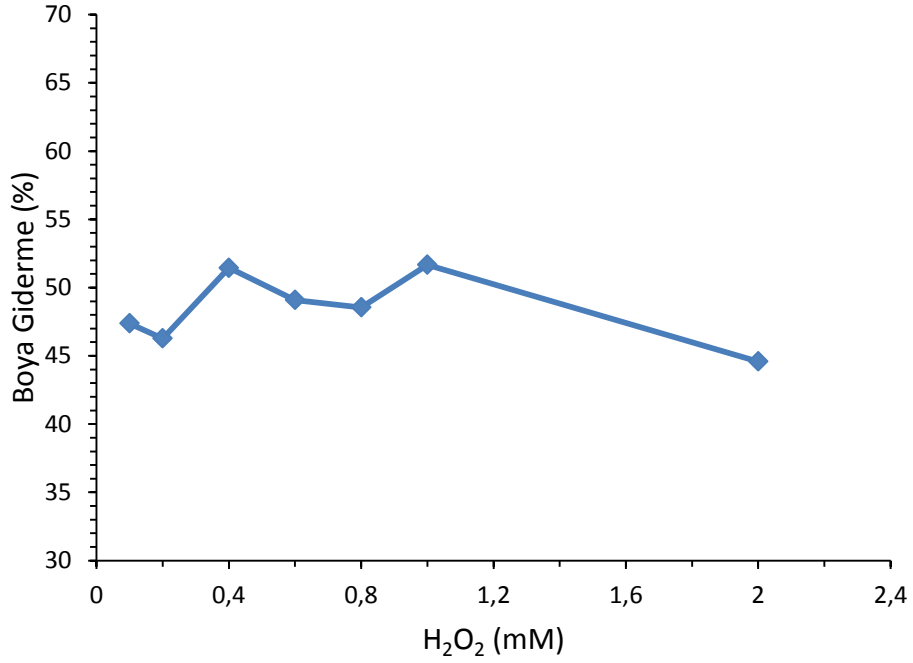


Şekil 5.33 Farklı boya derişimlerinde immobilize peroksidaz ile AB 113 boya giderimi grafiği.

Sabit enzim derişiminde boya derişimi arttıkça boya giderimi artmakta ve 0,015 mg.mL⁻¹ boya derişiminden sonra daha fazla boya giderimi olmayıp % 50 maksimum boya giderimine ulaşılmıştır. Diğer deneylerimizde 0,025 mg.mL⁻¹ boya derişimleri kullanılmıştır (Şekil 5.33).

5.5.6 H₂O₂ derişimi etkisi

İmmobilize peroksidaz ile AB 113 boyası giderimine H₂O₂ derişiminin (0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0 ve 2,0 mM) etkisi incelenerek Şekil 5.34'te verilmiştir.



Şekil 5.34 Farklı H₂O₂ derişimlerinde immobilize peroksidaz ile AB 113 boya giderimi grafiği.

Çalışılan H₂O₂ derişimlerinde % 45-52 arasında boya giderimi gözlenmiştir. H₂O₂ derişimindeki artışın boya gideriminde önemli bir değişikliğe sebep olmamıştır.

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmanın ilk aşamasında katalaz ve peroksidaz enzimleri parafin destekte hapsedilerek immobilize edildi. Her iki enzimin optimum immobilizasyon koşulları belirlenip biyokimyasal parametreleri hesaplandı. Serbest enzimler ile immobilize enzimlerin biyokimyasal parametreleri karşılaştırıldı. Çalışmanın ikinci aşamasında ise immobilize peroksidazın tekstil boyası gideriminde kullanımı ve optimal koşulları araştırıldı. İmmobilize katalaz ile de boyaların giderim etkisi mevcut yöntem kullanılarak incelenmesine rağmen hiçbir boya giderim etkisi gözlenmediği için daha ileri çalışmalara devam edilmemiştir.

Sıcaklık Etkisi:

Serbest ve immobilize katalaz için optimum sıcaklık 35 °C olarak bulundu (Şekil 5.1). Serbest peroksidaz için sıcaklık artışıyla aktivitede artış gözlenirken bir optimum değer elde edilemedi. İmmobilize peroksidaz için ise optimum sıcaklık (Şekil 5.10) 40 °C olarak tesbit edildi. Mohamed ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada peroksidazı yün üzerine immobilize ederek optimum sıcaklığını 40 °C bulmuşlar (2013a), diğer bir çalışmalarında ise HRP'yi kitosana immobilize etmiş ve immobilize peroksidazın optimum sıcaklığını 35 °C bulmuşlardır (2013b). Bulgularımızın literatüre uyduğu gözlenmektedir. İmmobilize katalazın 35 °C ve üzerindeki sıcaklıklarda termal kararlılığı, serbest katalazdan daha yüksek bulundu (Şekil 5.5). İmmobilizasyon ile oluşturulan yeni mikro çevre enzimi yüksek sıcaklıklarda denatürasyondan koruduğu için immobilize katalazın termal kararlılığı artmıştır. İmmobilize peroksidaz ve serbest peroksidazın 35 °C sıcaklıkta termal kararlılığı yüksek olduğu bulunmuştur. 35 °C'nin altında ve üstündeki sıcaklıklarda immobilizasyonla peroksidazın termal kararlılığında serbest peroksidaza göre düşüş gözlendi (Şekil 5.14). Peroksidaz ise yüksek sıcaklıklara dayanıklı bir enzim olduğu için serbest peroksidazın immobilize peroksidazdan yüksek termal kararlılık göstermesi de doğal olacaktır. İmmobilizasyonla oluşturulan yeni mikro çevrenin denatürasyona eğilimini artırdığı için immobilize peroksidazın 35 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda termal kararlılığı düşük bulundu.

pH Etkisi:

Serbest ve immobilize katalaz ile serbest ve immobilize peroksidaz için optimum pH değerleri 7.0 olarak bulundu (Şekil 5.2, Şekil 5.11). Enzimin immobilizasyonu ile yeni

mikro çevreye bağılı olarak aktif bölgede amino asit iyonlaşma derecesindeki değişimler sonucu birçok enzimin optimum pH'ı değişebilir. Desteğin anyonik olması ile daha bazik pH'a doğru, katyonik olması ile daha asidik pH'a doğru kayabilir. İyonik kuvvetin büyük olması durumunda bu etki gözlenmez (Krajewska vd., 1990). Inanan (2019) adlı araştırmacı katalazı kitosan Ko-polimerik nano yapılara immobilize etmiş ve hem serbest hem de immobilize katalazın optimum pH'ını 7.0 olarak bulmuştur. Bu sonuç bizim bulgularımızı desteklemektedir. Yine başka bir çalışmada ise peroksidazın immobilize edilmesi ile optimum pH'ı 6.5'tan 7.0'ye kaymıştır (Yu vd., 2019). Çalışmamızda enzimlerin immobilize edilmesiyle optimum pH'ında değişiklik gözlenmedi. Aynı şekilde serbest ve immobilize katalaz ile serbest ve immobilize peroksidazın pH kararlılığı pH:7.0 olarak bulundu (Şekil 5.6, Şekil 5.15). Yüksek ve düşük pH değerlerinde immobilizasyonla pH kararlılığı katalazda değişmemiş, peroksidazda düşük çıkmıştır. Deneilerimizde kullanılan parafin destek suda çözünmeyip, yüklü gruplar içermemektedir. Immobilizasyon işleminde enzim destek ile herhangi bir etkileşime girmeyip hapsedilerek tutuklanmıştır. Yüksek ve düşük pH değerlerinde peroksidazın pH'a bağımlı bir miktar denatürasyonu ile pH kararlılığı beklendiği gibi yüksek bulunmamıştır.

Kinetik Sabitleri:

Serbest katalaz için $K_m = 72,91$ mM, $V_{max} = 137.738,00$ $\mu\text{mol.mg enzim}^{-1}$, parafin destekte immobilize katalaz için $K_m = 83,58$ mM, $V_{max} = 1.500,00$ $\mu\text{mol.mg enzim}^{-1}$ olarak bulundu (Şekil 5.3, 5.4). Serbest peroksidaz için $K_m = 21,28$ mM, $V_{max} = 9.393.199,00$ $\mu\text{mol.mg enzim}^{-1}$, parafin destekte immobilize peroksidaz için $K_m = 25,39$ mM, $V_{max} = 2.224.990,00$ $\mu\text{mol.mg enzim}^{-1}$ olarak bulundu (Şekil 5.12, 5.13). Katalaz ve peroksidazın parafin destekte ayrı ayrı immobilizasyonu ile K_m değerlerinde küçük artış, V_{max} değerlerinde ise büyük bir azalma gözlemlendi. Enzimlerin parafin destekte hapsedilerek immobilize edilmesi ile çözeltideki substrat ile etkileşimi serbest enzime göre daha yavaş olacak dolayısıyla da tepkime hızı da düşecektir. Substratın enzime difüzyon hızı çözeltideki substrat derişimi arttıkça belli bir sınıra kadar artacaktır. Bu sınırlı değere tutuklu enzimin substrat tarafından tümü ile doyurulmasından önce erişilirse V_{max} değeri serbest enzimin V_{max} değerinden daha düşük olacaktır. Bu ise çalışmamızda immobilize enzimlerin V_{max} değerlerinin serbest enzimin V_{max} değerlerinden düşük bulunmasının sebebini açıklayabilmektedir. Enzimlerin immobilize edilmesi ile maksimum hızda azalma gözlenen pek çok çalışma

literatürde bulunmaktadır (Line vd., 1971; Kennedy ve Melo, 1990; Çetinus ve Öztop, 2000; Çetinus ve Öztop, 2003; Mohamed vd., 2013a; Mohamed vd., 2013b). Yu ve arkadaşlarının (2019) yapmış olduğu araştırma sonucunda peroksidazın immobilize edilmesi ile K_m değerinde artış V_{max} değerinde ise azalma olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Bu sonuç bizim bulgularımızı desteklemektedir.

Kullanım Kararlılığı:

İmmobilize enzimlerin kullanım kararlılığı incelendiğinde, immobilize katalaz yaklaşık üç kullanımda % 45, dördüncü kullanımda ise aktivitesinin % 25'ini korudu (Şekil 5.7). İmmobilize peroksidazın kullanım kararlılığının yaklaşık iki kullanımdan fazla olmadığı, üçüncü kullanımda aktivitesini % 80 kaybettiği gözlemlenmektedir (Şekil 5.16). İmmobilize katalaz ve immobilize peroksidaz için kullanım kararlılığı beklendiği gibi yüksek çıkmamıştır. Monier ve arkadaşlarının (2010) yaptığı çalışmada kitosan boncuklarında HRP'yi immobilize etmişler ve peroksidazın altı kullanım sonunda HRP aktivitesinin % 65,8 gibi yüksek aktivite korunumu bulmuşlardır. Çalışmamızda enzimin parafin desteğe fiziksel yöntemle hapsedilmesi bir dezavantaj oluşturmuş, bunun sonucunda çözeltiye enzimin sızması söz konusu olabileceğinden düşük kullanım kararlılıkları gözlenmiştir.

Saklama Kararlılığı:

Enzimlerin saklama kararlılıkları incelendiğinde 20 °C'de saklanan serbest katalaz ilk yedi günde % 56 aktivitesini korurken on dördüncü günde aktivitesinin % 80'ini kaybetti. Serbest katalaz 4 °C'de daha yüksek saklama kararlılığına sahiptir. Yirmi sekizinci günde % 80, ellinci günde ise % 65 aktivitesini korudu (Şekil 5.8). İmmobilize katalaz 4 °C ve 20 °C'de serbest katalaza göre daha yüksek saklama kararlılığı gösterdi. 4 °C'de saklanan immobilize katalazın aktivite kaybı aynı sıcaklıktaki serbest katalaza göre daha yavaş gerçekleşti. İmmobilize katalaz elli altıncı günde 4 °C'de % 65, 20 °C'de %50 aktivitesini korumuştur (Şekil 5.9). 20 °C sıcaklıkta saklanan immobilize katalaz aynı sıcaklıkta saklanan serbest katalazdan daha uzun süre aktivitesini koruyabildiği için katalazın immobilizasyonu ile saklama kararlılığı artış gözlemlendi. 20 °C'de saklanan serbest peroksidaz ondördüncü günde aktivitesinin % 64'ünü korumuş ve bu aktiviteyi kırk gün boyunca sürdürmüştür. 4 °C'de saklanan serbest peroksidaz 20 °C'de saklanan serbest peroksidaza göre daha yüksek saklama kararlılığına sahiptir. Enzim ilk yedi günde % 85 aktivitesini korudu ve bu aktivitesini fazla kaybetmeden elli

altıncı güne kadar devam etti (Şekil 5.17). İmmobilize peroksidazın 4 °C sıcaklıktaki saklama kararlılığı, 20 °C'dekine göre daha yüksek bulunmuştur. İmmobilize peroksidaz elli altıncı günde 4 °C'de % 52, 20 °C'de % 6 aktivitesini korumuştur (Şekil 5.18). Peroksidazın parafin destekte immobilize edilmesi ile her iki sıcaklıkta da saklama kararlılığında değişiklik gözlenmemiştir. Yeni mikro çevreye bağlı olarak enzimin zamana bağlı denatürasyona dayanıklılığı aynı kaldığı için immobilizasyon ile saklama kararlılığında artış gözlenmemiştir. Darwesh ve arkadaşlarının (2019) yapmış olduğu bir çalışmada 4 °C ve 25 °C sıcaklıkta yüz yirmi gün boyunca serbest ve immobilize enzimlerin saklama kararlılıklarını incelemişlerdir. 4 °C'de saklanan serbest enzimin yüz yirmi günün sonunda, 25 °C'de saklanan serbest enzimin ise yirmi günün sonunda aktivitesini kaybettiği gözlenmiştir. Peroksidazın immobilize edilmesi ile ise hem 4 °C hem de 25 °C'de aktivitesini koruduğunu gözlemişlerdir.

SEM Görüntüleri:

Katalaz ve peroksidaz parafin destekte immobilize edildikten sonra çekilen SEM görüntüleri Şekil 5.20'de verilmiştir. Parafininin kendisi homojen bir görünüme sahipken parafin destekte katı katalaz ve katı peroksidazı çözünmemiş formda içerdiğinden heterojen bir görünüme sahiptir. Bu görüntülerden de anlaşılacağı gibi parafin içinde çözünmeyen enzim kristalleri, sıcaklığının oda sıcaklığına düşürülerek parafinin donması sağlanarak parafin içinde hapsedilmiştir. Parafin içinde hapsolan ve yüzeye yakın enzim partikülleri substrat ile etkileşmişlerdir.

AB 129 Boyası Giderimi:

İmmobilize peroksidaz ile AB 129 boyasının boya giderimi incelenerek maksimum % 85- 88 arasında yüksek boya giderimi elde edildi. Bu değerlere ulaşmak için optimal koşullar belirlendi. Boya giderim süresi olarak 15 dakika (Şekil 5. 21) seçildi. 20-55 °C sıcaklıklar arasında boya giderimine sıcaklığın etkisinin olmadığı gözlemlendi ve optimal sıcaklık olarak 20 °C kullanıldı (Şekil 5.23). pH: 5.0'te en yüksek boya giderme değerine (% 85) ulaşıldığı için bütün deneylerde optimal boya giderim pH'ı 5.0 olarak alındı (Şekil 5.24). Peroksidaz derişiminin boya giderimine etkisi incelendi ve enzim derişiminin artması ile boya gideriminde önemli bir değişiklik gözlenmedi (Şekil 5.25). Forgiarini ve Ulson de Souza'nın (2007) yaptığı boya giderimi çalışmasında yüksek peroksidaz derişiminin boya giderimine etkisi olmadığını bulmuşlardır. Peroksidaz çok pahalı bir enzim olduğundan bu çalışmada maksimum boya giderimine minimum

enzim derişimi ile ulaşılması büyük bir avantaj olmuştur. Boya derişiminin boya giderimine etkisi incelendiğinde boya derişimi arttıka boya gideriminin azaldığı görülmüştür (şekil 5.26). Enzim aktivitesine bağlı olarak artan boya derişimi ile boya gideriminin azalması da doğaldır ve benzer sonuqlar literatürde de bulunmaktadırdır (Sekuljica vd, 2015). Farklı H₂O₂ derişimleri kullanılarak immobilize peroksidaz ile AB 129 boya giderimi incelendi (şekil 5.27). En yüksek boya giderimine 0,4 mM H₂O₂ derişiminde ulaşıldı. Yararlanılan kaynaktada da 0,4 mM H₂O₂ derişimi kullanılmıştır (Sekuljica vd, 2015).

AB 113 Boyası Giderimi:

İmmobilize peroksidaz ile AB 113 boyası giderimi 20 ile 50 °C sıcaklıklarda optimal 15 dk süre iqlerisinde incelendi. En yüksek boya giderimine 20 °C ile 30 °C arasında sırasıyla % 50 ve % 54 gibi farklı olmayan boya giderim değerlerine ulaşıldığından diğer deneyler 20 °C sıcaklıkta gerqlleştirilmiştir (şekil 5.30). İmmobilize peroksidaz ile en iyi boya giderimi pH: 4.0- 6.0 aralığında elde edildi (şekil 5.31). Enzim derişiminin artması ile boya gideriminde belirgin bir değerlik gözlenmedi (şekil 5.32). Ancak düşük enzim derişiminde boya gideriminde fazla bir fark gözlenmezken yüksek enzim derişiminde boya gideriminin azaldığı gözlenmiştir. Literatürde benzer sonuqlar bulunmaktadırdır (Sekuljica vd, 2015). Boya derişimi arttıka immobilize peroksidazın boya giderim etkisinin arttığı ve 0,015 mg.mL⁻¹ boya derişiminden sonra önemli bir değerlik olmadığı gözlendi (şekil 5.33). Diğer boya giderimi qalışmaları spektrofotometrenin duyarlılık sınırları iqlerisinde olan 0,025 mg.mL⁻¹ boya derişiminde yapılmasına karar verildi. H₂O₂ derişiminin immobilize peroksidaz ile AB 113 boya giderimine etkisi incelendi (şekil 5.34). 0,1- 2,0 mM aralığındaki H₂O₂ derişimlerinde maksimum % 52 (0,4 mM H₂O₂), minimum % 45 (2,0 mM H₂O₂) boya giderimleri sağlandı. Diğer deneylerde 0,4 mM H₂O₂ derişimi kullanıldı (Sekuljica vd, 2015).

Sonuç:

Sentetik boyalar endüstride değerliqlerde kullanılmaktadırdır. Tekstil, kâğıt, gıda, plastik ve kozmetik gibi qeşitli sektörlerden renkli atık su deşarjı ile ilgili sorunlar endüstriyel ve akademik bilim insanlarının ilgisini qekmektedir. Yaklaşık 10.000 farklı boya ve pigment endüstriyel olarak kullanılmaktadırdır. Sentetik boyalar yılda 0,7-0,8 milyon tondan fazla dünya qapında üretilmektedir (Fazli vd., 2010). Tekstil endüstrisinde boyama prosesleri sırasında genellikle renkli, kullanılan prosese ve boya

türüne göre farklı pH'larda atık sular meydana gelmektedir. Çeşitli canlılar için bu atık suların risk oluşturmaları nedeniyle arıtılmaları önemlidir (Song vd., 2008).

Horseradish peroksidaz bifenollerin, anilinlerin, fenollerin ve bunlar gibi heteroaromatik bileşiklerin oksidasyonlarını katalizleyebilmektedir. Horseradish peroksidaz geniş bir sıcaklık ve pH aralığında aktivite gösterdiğinden atık su işleminde kullanılması uygun görünmektedir. Sulu çözeltilerden fenollerin HRP katalizinde fenol giderilmesini sağlamak amacıyla son yıllarda birçok çalışma gerçekleştirilmiştir (Duran ve Esposito, 2000).

Literatürde AB 129 ve AB 113 boyaalarının giderimine yönelik enzimatik yöntemle ilgili herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Gerçekleştirilen bu tez çalışması ile parafin destekte immobilize peroksidaz kullanılarak boyaalarının giderimi başarılmıştır. En etkili boya giderimine AB 129 ile ulaşılmıştır. Çevredeki canlılara zararlı olan tekstil endüstrisi atık sularından benzer boyaaların giderimine alternatif bir yol sunulmuştur.

Bu çalışmada parafin destekte immobilize edilen enzimlerin gerek termal kararlılığı gerekse kullanım kararlılığı açısından serbest enzime göre daha avantajlı bir durum ortaya konmadığı için immobilizasyonda parafinin çok kullanışlı bir destek olmadığı kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Adam, B., Yiğitoğlu, R.** (2012). *Tıbbi Biyokimya. Atlas Yayınevi*, 628s, Ankara.
- Adams, J. B.** (1978). The inactivation and regeneration of peroxidase in relation to the high temperature–short time processing of vegetables. *International Journal of Food Science & Technology*, 13(4), 281-297.
- Aebi H.** (1981). Catalase. Methods of enzymatic analysis. **Bergmayer H. U.** (Ed.), *Verlag Chemie international*. 673–684, Florida.
- Aehle, W.** (2007). *Enzymes in industry: production and applications. John Wiley & Sons*, 516s.
- Altıkatoğlu, M., Başaran, Y., Arıöz, C., Kuzu, H.** (2009). Thermal stabilization of horseradish peroxidase by covalent conjugation with dextran. *Sigma*, 27, 216-225.
- Azevedo, A. M., Martins, V. C., Prazeres, D. M., Vojinovic, V., Cabral, J. M., Fonseca, L. P.** (2003). Horseradish peroxidase: a valuable tool in biotechnology. *Biotechnology annual review*, 9(3), 1387-2656.
- Başer, İ., İnanıcı, Y.** (1990). *Boya Kimyası, Marmara Üniversitesi Yayını*, Yayın No 482, 216s, İstanbul.
- Belcarz, A., Ginalska, G., Kowalewska, B., Kulesza, P.** (2008). Spring cabbage peroxidases–Potential tool in biocatalysis and bioelectrocatalysis. *Phytochemistry*, 69(3), 627-636.
- Burk, R. F.** (1990). Protection against free radical injury by selenoenzymes. *Pharmacology & therapeutics*, 45(3), 383-385.
- Chen, E. L., Chen, Y. A., Chen, L. M., Liu, Z. H.** (2002). Effect of copper on peroxidase activity and lignin content in *Raphanus sativus*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 439-444.
- 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.
- Çelebi, M.** (2013). *Tekstil atık sularında boyaların biyobozunma ile giderilmesi. Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı (Doktora Tezi)*, 171s, İstanbul.
- Çelebi, S., İbibikcan, E., Kayahan, S. K., Yiğitsoy, B., Toppare, L.** (2009). Immobilization of Invertase in Copolymer of 2, 5-Di (thiophen-2-yl)-1-p-Tolyl-1 H-Pyrrole with Pyrrole. *Journal of Macromolecular Science®, Part A: Pure and Applied Chemistry*, 46(8), 739-744.
- Çetinus, Ş. A., Öztop, H. N.** (2000). Immobilization of catalase on chitosan film. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(7), 497-501.
- Çetinus, Ş. A., Öztop, H. N.** (2003). Immobilization of catalase into chemically crosslinked chitosan beads. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(7), 889-894.

- Darwesh, O. M., Matter, I. A., Eida, M. F.** (2019). Development of peroxidase enzyme immobilized magnetic nanoparticles for bioremediation of textile wastewater dye. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7(1), 102805.
- Doerge, D. R., Divi, R. L., Churchwell, M. I.** (1997). Identification of the colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases. *Analytical Biochemistry*, 250(1), 10-17.
- Duarte-Vázquez, M. A., García-Almendárez, B., Regalado, C., Whitaker, J. R.** (2000). Purification and Partial Characterization of Three Turnip (*Brassica napus* L. var. *esculenta* DC) Peroxidases. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48, 1574-1579.
- Duran, N., Esposito, E.** (2000). Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied catalysis B: environmental*, 28(2), 83-99.
- Eren, H. A., Kurcan, P., Anış, P.** (2007). Boyamada Kullanılan Yardımcı Kimyasal Maddelerin Reaktif Boyama Atık Sularının Ozonlanmasına Etkileri. *Uludağ University Journal of The Faculty of Engineering*, 12(2), 53-60.
- Fazli, M. M., Mesdaghinia, A., Naddafi, K., Nasser, S., Yunesian, M., Assadi, M. M., Hamzehei, H.** (2010). Optimization of reactive blue 19 decolorization by *ganoderma* sp. using response surface methodology. *Journal of Environmental Health Science & Engineering*, 7(1), 35-42.
- Forgiarini, E., de Souza, A. A. U.** (2007). Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). *Journal of Hazardous Materials*, 147(3), 1073-1078.
- Gözükara, M. E.** (2011). Biyokimya. *Nobel Matbaacılık*, İstanbul, 908s.
- Harazono, K., Watanabe, Y., 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(5), 455-459.
- Hoffmann, C., Pinelo, M., Woodley, J. M., Daugaard, A. E.** (2017). Development of a thiol-ene based screening platform for enzyme immobilization demonstrated using horseradish peroxidase. *Biotechnology progress*, 33(5), 1267-1277.
- 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(4), 201-221.
- Huystee, R. V.** (1987). Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. *Annual Review of Plant Physiology*, 38(1), 205-219.
- Inanan, T.** (2019). Chitosan Co-polymeric nanostructures for catalase immobilization. *Reactive and Functional Polymers*, 135, 94-102.
- İnal, T.** (1990). Süt ve süt ürünleri hijyen ve teknolojisi. Final Ofset İstanbul, 334-341.
- Kaushal, J., Singh, S. G., Raina, A., Arya, S. K.** (2018). Catalase enzyme: Application in bioremediation and food industry. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 192-199.

- Kavas, G., Ö. (1989).** Serbest Radikaller ve Organizma Üzerine Etkileri. *Türkiye Klinikleri. Ankara Journal of Medical Sciences*, 9(1), 1-8.
- Keha, E. E., Küfrevioğlu, Ö. İ. (2009).** Biyokimya. *Aktif Yayınevi*, 642s, Erzurum.
- Kennedy, J. F., Melo E. H. M., (1990).** Immobilized Enzymes and Cells: *Chemical Engineering Progres*. July 81-89.
- Khan, A. A., 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(5), 1012-1019.
- Knutson, K., Kirzan, S., Ragauskas, A. (2005).** Enzymatic biobleaching of two recalcitrant paper dyes with horseradish and soybean peroxidase. *Biotechnology letters*, 27(11), 753-758.
- Kocaer, F. O., Alkan, U. (2002).** Boyar madde İçeren Tekstil Atıksularının Arıtım Alternatifleri. *Uludağ Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 7, 47-55.
- Krajewska, B., Leszko, M., Zaborska, W. (1990).** Urease immobilized on chitosan membrane: Preparation and properties. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 48(3), 337-350.
- Krajewska, B. (2004).** Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and microbial technology*, 35(2-3), 126-139.
- Krych-Madej, J., Gebicka, L. (2017).** Interactions of nitrite with catalase: Enzyme activity and reaction kinetics studies. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 171, 10-17.
- Levin, L., Papinutti, L., Forchiassin, F. (2004).** Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzymes and decolorize industrial dyes. *Bioresource Technology*, 94(2), 169-176.
- Line, W. F., Kwong, A., Weetall, H. H. (1971).** Pepsin insolubilized by covalent attachment to glass: preparation and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 242(1), 194-202.
- Liu, J. Z., Wang, T. L., Ji, L. N. (2006).** Enhanced dye decolorization efficiency by citraconic anhydride-modified horseradish peroxidase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 41(3-4), 81-86.
- Mathew, M. L., Gopalakrishnan, A., Aravindakumar, C. T., Aravind, U. K. (2019).** Low-cost multilayered green fiber for the treatment of textile industry waste water. *Journal of hazardous materials*, 365, 297-305.
- Mohamed, S. A., Darwish, A. A., El-Shishtawy, R. M. (2013a).** Immobilization of horseradish peroxidase on activated wool. *Process Biochemistry*, 48(4), 649-655.
- Mohamed, S. A., Al-Malki, A. L., Kumosani, T. A., El-Shishtawy, R. M. (2013b).** Horseradish peroxidase and chitosan: Activation, immobilization and comparative results. *International journal of biological macromolecules*, 60, 295-300.

- Monier, M., Ayad, D. M., Wei, Y., Sarhan, A. A.** (2010). Immobilization of horseradish peroxidase on modified chitosan beads. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46(3), 324-330.
- Morawski, B., Lin, Z., Cirino, P., Joo, H., Bandara, G., Arnold, F. H.** (2000). Functional expression of horseradish peroxidase in *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. *Protein Engineering*, 13(5), 377-384.
- Nelson, L. D., Cox, M. M.** (2013). Lehninger Biyokimyanın İlkeleri, **Elçin, Y. M.** (Ed.), Palme Yayıncılık, 183-233, Ankara.
- Nisha, S., Karthick, S. A., Gobi, N.** (2012). A review on methods, application and properties of immobilized enzyme. *Chemical Science Review and Letters*, 1(3), 148-155.
- Novotný, Č., Rawal, B., Bhatt, M., Patel, M., Sašek, V., Molitoris, H. P.** (2001). Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes. *Journal of Biotechnology*, 89(2-3), 113-122.
- O'Brien, A. M., Ó'Fágáin, C.** (2000). Dye bleaching and phenol precipitation by phthalic anhydride-modified horseradish peroxidase. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 75(5), 363-368.
- Onsa, G. H., bin Saari, N., Selamat, J., Bakar, J.** (2004). Purification and characterization of membrane-bound peroxidases from *Metroxylon sagu*. *Food Chemistry*, 85(3), 365-376.
- Pavko, A.** (2011). Fungal decolourization and degradation of synthetic dyes. Some chemical engineering aspects. *Waste Water—Treatment and Reutilization, EINSCHLAG*, 65-88.
- Pithawala, K., Mishra, N., Bahadur, A.** (2010). Immobilization of urease in alginate, paraffin and lac. *Journal of Serbian Chemical Society*, 75(2), 175-183.
- Robinson, E. E., Maxwell, S. R., Thorpe, G. H.** (1997). An investigation of the antioxidant activity of black tea using enhanced chemiluminescence. *Free Radical Research*, 26(3), 291-302.
- Rodriguez-Lopez, J. N., Smith, A. T., Thorneley, R. N.** (1996). Role of Arginine 38 in horseradish peroxidase a critical residue for substrate binding and catalysis. *Journal of Biological Chemistry*, 271(8), 4023-4030.
- Rompel, A., Albers, M., Naseri, J. I., Gerdemann, C., Büldt-Karentzopoulos, K., Jasper, B., Krebs, B.** (2007). Purification, cloning and characterization of a novel peroxidase isozyme from sweetpotatoes (*Ipomoea batatas*). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1774(11), 1422-1430.
- Satar, R., Husain, Q.** (2009). Phenol-mediated decolorization and removal of disperse dyes by bitter gourd (*Momordica charantia*) peroxidase. *Environmental technology*, 30(14), 1519-1527.
- Šekuljica, N. Ž., Prlainović, N. Ž., Stefanović, A. B., Žuža, M. G., Čičkarić, D. Z., Mijin, D. Ž., Knežević-Jugović, Z. D.** (2015). Decolorization of anthraquinonic dyes from textile effluent using horseradish peroxidase: optimization and kinetic study. *The Scientific World Journal*, 2015.

- Schuller, D. J., Ban, N., Van Huystee, R. B., McPherson, A., Poulos, T. L.** (1996). The crystal structure of peanut peroxidase. *Structure*, 4(3), 311-321.
- Sharma, I., Ahmad, P.** (2014). Catalase: a versatile antioxidant in plants. In *Oxidative Damage to Plants* (pp. 131-148). Academic Press.
- Song, S., Yao, J., He, Z., Qiu, J., Chen, J.** (2008). Effect of operational parameters on the decolorization of CI Reactive Blue 19 in aqueous solution by ozone-enhanced electrocoagulation. *Journal of hazardous materials*, 152(1), 204-210.
- Srinivasan, S., Sadasivam, S. K.** (2018). Exploring docking and aerobic-microaerophilic biodegradation of textile azo dye by bacterial systems. *Journal of water process engineering*, 22, 180-191.
- Telefoncu, A.** (1997). Enzimoloji. Lisansüstü Yazokulu, 446s, Aydın.
- Vainshtein, B. K., Melik-Adamyanyan, W. R., Barynin, V. V., Vagin, A. A., Grebenko, A. I.** (1981). Three-dimensional structure of the enzyme catalase. *Nature*, 293, 411-412.
- Valentine, C. R.** (1964). Sub-units of the catalase molecule seen by elektron microscopy. *Nature*, 204, 1262-1265.
- Veitch, N. C.** (2004). Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65(3), 249-259.
- Yemenicioğlu, A. ve Cemeroglu, B.** (2013). Enzim aktivitesi tayin yöntemleri. Gıda analizleri, **Cemeroglu, B. S.** (Ed.), Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, 183-218, Ankara.
- Yu, B., Cheng, H., Zhuang, W., Zhu, C., Wu, J., Niu, H., Ying, H.** (2019). Stability and repeatability improvement of horseradish peroxidase by immobilization on amino-functionalized bacterial cellulose. *Process biochemistry*, 79, 40-48.
- Zamocky, M., Furtmüller, P. G., Obinger, C.** (2008). Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxidants & redox signaling*, 10(9), 1527-1548.
- Zhao, K., Di, Q., Cao, X., Wang, M., Deng, L., Wang, F.** (2016). Production of biodiesel using immobilized lipase and the characterization of different co-immobilizing agents and immobilization methods. *Sustainability*, 8(9), 764.
- Url-1** <<http://www.solverkimya.com/site/makaleler/endustriyel-urunler-makaleleri/parafinin-kimyasal-ozellikleri.html>>, alındığı tarih: 16.05.2019.
- Url-2** <<http://www.askimya.com/urunler/likit-parafin-59.html>>, alındığı tarih: 16.05.2019.
- Url-3** <<http://www.worlddyevariety.com/acid-dyes/acid-blue-129.html>>, alındığı tarih: 21.04.2019.
- Url-4** <<http://www.worlddyevariety.com/acid-dyes/acid-blue-113.html>>, alındığı tarih: 21.04.2019.

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel bilgiler

Adı Soyadı	Burcu EROL
Doğum Yeri ve Tarihi	Diyarbakır, 01.10.1983
Medeni Hali	Evli
Yabancı Dil	İngilizce
İletişim Adresi	Kardeşler Mah. 10. Sok. İskar Garden Apt. No: 20 Dai:9 Merkez/SİVAS
E- posta Adresi	burcuroll83@gmail.com

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise	Ankara Kimya Teknik Lisesi, 2001
Lisans	Selçuk Üniversitesi, 2009
Yüksek Lisans	Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, 2019