

**TİROSİNAZ ENZİMİNİN EKSTRAKSİYONU,
SAFLAŞTIRILMASI VE FENOLLERİN
GİDERİMİNDE KULLANIMI**

Duygu ÖZTAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TEMMUZ 2007
ANKARA**

Duygu ÖZTAN tarafından hazırlanan TİROSİNAZ ENZİMİNİN EKSTRAKSİYONU, SAFLAŞTIRILMASI VE FENOLLERİN GİDERİMİNDE KULLANIMI adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Ufuk GÜNDÜZ ZAFER
Tez Yöneticisi

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Kimya Mühendisliği Anabilim Dalında Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: : Prof. Dr. Bekir Zühtü UYSAL

Üye : Prof. Dr. Ufuk GÜNDÜZ ZAFER

Üye : Prof. Dr. Nurdan SARAÇOĞLU

Üye : Doç. Dr. Ö. Murat DOĞAN

Üye : Doç. Dr. Emine BAYRAKTAR

Tarih : 17/07/2007

Bu tez, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygundur.

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Duygu Öztan

**TİROSİNAZ ENZİMİNİN EKSTRAKSİYONU,
SAFLAŞTIRILMASI VE FENOLLERİN
GİDERİMİNDE KULLANIMI
(Yüksek Lisans Tezi)**

Duygu ÖZTAN

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Temmuz 2007**

ÖZET

Bu çalışmada, üzümde tirozinaz enziminin ekstraksiyonu ve saflaştırılması yapılmıştır. Ekstrakte edilen ve saflaştırılan tirozinaz enzimi, uygulama alanlarından biri olan sulardaki fenollerin giderimiyle ilgili çalışmalar için kullanılmıştır. Ayrıca piyasadan alınan saf tirozinaz enzimi ile fenol giderimi çalışmaları yapılmıştır. Bu deney sonuçları, üzümde ekstrakte edilen ve saflaştırılan enzim ile karşılaştırılmıştır.

Üzümde tirozinaz enziminin ekstraksiyon ve saflaştırma aşamaları; sırasıyla, ham enzim ekstraktının eldesi, Triton X-100 ve PVP (polivinil pirrolidon) kombinasyonu ile saflaştırma ve son aşama olan amonyum sülfat çöktürmesidir. Spesifik aktivite üzerine, Triton X-100 ve PVP miktarının etkileri incelenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucu, % 3 (a/h) PVP ve % 4,5 (h/h) Triton X-100 kullanıldığında en yüksek spesifik aktivite (2874,51 U/mg protein) gözlenmiştir.

Enzimatik yolla fenol uzaklaştırma verimi üzerine, enzim miktarının, bekleme süresinin ve sıcaklığın etkileri incelenmiştir. Buna göre, tirozinaz enzimi kullanılarak maksimum fenol uzaklaştırma veriminin elde edildiği sıcaklık 25 °C ve bekleme süresi 3 saat olarak belirlenmiştir.

Aynı enzim aktivitesini veren miktarlar kullanılarak üzümde elde edilen enzimle yaklaşık % 75-79 ve piyasadan alınan saf tirozinaz enzimi ile yaklaşık % 92-95 verimle fenol giderimi yapılmıştır. Üzümde elde edilen enzim miktarı % 50 artırıldığında ise yaklaşık % 82-89 fenol uzaklaştırma verimi elde edilmiştir.

Bilim Kodu : 912.1.086
Anahtar Kelimeler : Üzüm, Tirozinaz, Fenol, Ekstraksiyon, Saflaştırma
Sayfa Adedi : 108
Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Ufuk GÜNDÜZ ZAFER

**EXTRACTION, PURIFICATION OF TYROSINASE
AND USING REMOVAL OF PHENOL**

(M.Sc. Thesis)

Duygu ÖZTAN

**GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

July 2007

ABSTRACT

In this study, tyrosinase was extracted and purified from green grape. This extracted and purified tyrosinase was used for separation of phenol from aqueous solutions containing phenol. Phenol separation was also studied with pure commercial tyrosinase. Phenol separation efficiencies observed with purified enzyme and commercial enzyme were compared.

Extraction and purification steps are firstly crude enzyme extraction, then purification with Triton X-100 and PVP (polyvinyl pyrrolidone) and finally precipitation with ammonium sulphate. The effects of Triton X-100 and PVP (polyvinyl pyrrolidone) concentrations on tyrosinase specific activity were investigated. The maximum specific activity of tyrosinase (2874,51 U/mg protein) was observed with 3 % (w/v) PVP (polyvinyl pyrrolidone) and 4,5 % (v/v) Triton X-100 concentrations in the experimental range studied.

The effects of enzyme concentration, separation time and temperature on phenol removal efficiency were investigated. The maximum phenol removal efficiency was achieved at 25 °C and with a separation time of three hours.

Phenol separation efficiencies obtained with purified enzyme and commercial enzyme were very close each other. Using equal enzyme activities, the phenol separation efficiencies were found as 75-79 % and 92-95 % with purified tyrosinase enzyme and commercial enzyme, respectively. Increasing the enzyme activity by 50 % for the separation experiments with the purified tyrosinase enzyme in this work resulted in an increase in the phenol separation efficiency to 82-89 %.

Science Code : 912.1.086

Key Words : Grape, tyrosinase, phenol, extraction, purification

Page Number: 108

Adviser : Prof. Dr. Ufuk GÜNDÜZ ZAFER

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarım boyunca, değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren hocam, Prof. Dr. Ufuk GÜNDÜZ ZAFER'e teőekkürü bir borç bilirim. Çalıőmalarım sırasında beni her konuda destekleyip, yardımlarını esirgemeyen ve benim için her türlü fedakarlığı yapan canım aileme, sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım. Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Biriminin 06/2006-22 kodlu projemize vermiş olduğu maddi destekten dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xiv
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xviii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1. Enzimlerin Keşfi.....	3
2.2. Enzimler.....	3
2.2.1. Enzimlerin genel özellikleri ve kimyasal yapıları.....	4
2.2.2. Enzim kinetiği.....	7
2.2.3. Enzimatik analiz ve aktivite belirleme yöntemleri.....	9
2.2.4. Enzim aktiflik birimleri.....	10
2.2.5. Enzim aktivitesini etkileyen faktörler.....	11
2.2.6. Enzimlerin sınıflandırılması.....	14
2.3. Tirosinaz Enzimi.....	16
2.3.1. Tirosinaz enzimi hakkında genel bilgi.....	16
2.3.2. Tirosinazın moleküler özellikleri.....	17
2.3.3. Tirosinazın katalizlediği tepkimeler.....	18

Sayfa

2.3.4. Tirosinazın endüstriyel uygulama alanları.....	19
2.4. Yüzey Aktif Maddeler.....	26
2.4.1. Sentetik yüzey aktif maddeler.....	26
2.5. Ayırma ve Saflaştırma.....	27
2.5.1. Ayırma ve saflaştırma teknikleri.....	28
2.5.2. Ayırma ve saflaştırma işleminde kullanılan kimyasallar.....	30
2.5.3. Saflaştırma işlemiyle ilgili parametrelerin belirlenmesi.....	32
2.6. Deneysel Tasarım.....	33
2.6.1. Geleneksel deneysel tasarım.....	33
2.6.2. İstatiksel deneysel tasarım.....	33
3. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI.....	38
4. MATERYAL VE METOD.....	40
4.1. Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar.....	40
4.1.1. Kullanılan kimyasallar.....	40
4.1.2. Kullanılan cihazlar.....	41
4.2. Deneysel Yöntem.....	41
4.2.1. Üzümünden tirozinaz enziminin ekstraksiyonu ve saflaştırılması.....	42
4.2.2. Piyasadan alınan saf tirosinaz enzimi ile yapılan fenol giderimi deneyleri.....	45
4.2.3. Üzümünden elde edilen tirosinaz enzimi ile yapılan fenol giderimi deneyleri.....	46
5. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	47
5.1. Üzümünden Tirozinaz Enziminin Ekstraksiyonu ve Saflaştırılması Basamaklarında Triton X-100 Miktarının Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	48

Sayfa

5.2. İstatiksel Yaklaşım ile Triton X-100 ve PVP Maddelerinin Saflaştırma Verimi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi.....	50
5.3. Piyasadan Alınan Saf Tirosinaz Enzimi İle Yapılan Fenol Giderimi.....	62
5.3.1. Başlangıç fenol miktarına göre saf tirosinaz enzimi kullanılarak gerekli enzim miktarının belirlenmesi.....	62
5.3.2. Fenol deneylerinde saf tirosinaz enzimi kullanılarak gerekli sürenin belirlenmesi.....	73
5.4. Üzümden Elde Edilen Tirosinaz Enzimi İle Yapılan Fenol Giderimi.....	77
5.4.1. Üzümden elde edilen tirosinaz enzimi ile saf tirosinaz enziminin fenol uzaklaştırma verimi üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması.....	78
5.4.2. Üzümden elde edilen tirosinaz enzimi ile yapılan fenol deneylerinde gerekli sürenin belirlenmesi.....	81
5.5. Sıcaklığın Enzimatik Yolla Fenol Uzaklaştırma Verimi Üzerine Etkisi.....	85
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	88
KAYNAKLAR.....	91
EKLER.....	95
EK-1 Tampon çözeltilerle pH ayarlanması.....	96
EK-2 Enzim aktivite tayini.....	99
EK-3 Toplam protein miktarının belirlenmesi.....	100
EK-4 İstatiksel analizler.....	102
EK-5 Ürün maliyetinin belirlenmesi.....	104
EK-6 Fenol tayini.....	106
EK-7 Başlangıç fenol konsantrasyonları için başlangıç reaksiyon hızlarının hesaplanması.....	107
ÖZGEÇMİŞ	108

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Bazı endüstrilerin atıksularında bulunan fenolik bileşen konsantrasyonları.....	23
Çizelge 2.2. İki faktörlü plan matrisi.....	36
Çizelge 2.3. Varyans çözümlemesi.....	37
Çizelge 5.1. Üzümden tirozinaz enziminin ekstraksiyonu ve saflaştırılmasında, Triton X-100 miktarının enzim aktivitesi üzerine etkisi	49
Çizelge 5.2. Deneysel planda bağımsız değişkenler.....	50
Çizelge 5.3. Deneysel planda bağımsız değişkenler ile yapılan deneyler.....	52
Çizelge 5.4. Üzümden tirozinaz enziminin ekstraksiyonu ve saflaştırılmasında, istatistiksel yöntemle belirlenen şartların kullanılması ile bulunan deney sonuçları.....	53
Çizelge 5.5. Matematiksel modeller ve R değerleri.....	58
Çizelge 5.6. Üzümden tirozinaz enziminin saflaştırılması için plan matrisinin kodlanmış değerleri ve spesifik aktivite değerleri (SA/model 1'e göre).....	59
Çizelge 5.7. Üzümden tirozinaz enziminin saflaştırılması için plan matrisinin kodlanmış değerleri ve spesifik aktivite değerleri (SA/model 8'e göre).....	60
Çizelge 5.8. Başlangıç fenol miktarına göre gerekli saf tirozinaz enzimi miktarının belirlenmesi için yapılan deney sonuçları (C ₀ :50 ppm).....	64
Çizelge 5.9. Başlangıç fenol miktarına göre gerekli saf tirozinaz enzimi miktarının belirlenmesi için yapılan deney sonuçları (C ₀ :150 ppm).....	65
Çizelge 5.10. Başlangıç fenol miktarına göre gerekli saf tirozinaz enzimi miktarının belirlenmesi için yapılan deney sonuçları (C ₀ :250 ppm).....	66
Çizelge 5.11. Başlangıç fenol miktarına göre gerekli saf tirozinaz enzimi miktarının belirlenmesi için yapılan deney sonuçları (C ₀ :350 ppm).....	67
Çizelge 5.12. Başlangıç fenol miktarına göre gerekli saf tirozinaz enzimi miktarının belirlenmesi için yapılan deney sonuçları (C ₀ :500 ppm).....	68

Çizelge	Sayfa
Çizelge 5.13. Başlangıç fenol miktarına göre gerekli saf tirozinaz enzimi miktarının belirlenmesi için yapılan deney sonuçları (C ₀ :750 ppm)....	69
Çizelge 5.14. Başlangıç fenol miktarına göre gerekli saf tirozinaz enzimi miktarının belirlenmesi için yapılan deney sonuçları (C ₀ :1000 ppm)..	70
Çizelge 5.15. Başlangıç fenol miktarına göre gerekli saf tirozinaz enzimi miktarı....	71
Çizelge 5.16. Fenol deneylerinde saf tirozinaz enzimi kullanılması ile gerekli sürenin belirlenmesi için yapılan deney sonuçları (C ₀ :50 ppm).....	74
Çizelge 5.17. Fenol deneylerinde saf tirozinaz enzimi kullanılması ile gerekli sürenin belirlenmesi için yapılan deney sonuçları (C ₀ :250 ppm).....	75
Çizelge 5.18. Fenol deneylerinde saf tirozinaz enzimi kullanılması ile gerekli sürenin belirlenmesi için yapılan deney sonuçları (C ₀ :500 ppm).....	76
Çizelge 5.19. Üzümden PVP (%3, a/h) ve Triton X-100 (%4,5, h/h) kullanılarak elde edilen tirozinaz enziminin fenol uzaklaştırma verimi üzerine etkisi.....	78
Çizelge 5.20. Üzümden elde edilen tirozinaz enzimi ile saf tirozinaz enziminin fenol uzaklaştırma verimi üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması.....	79
Çizelge 5.21. Üzümden PVP (%3, a/h) ve Triton X-100 (%4,5, h/h) kullanılarak elde edilen tirozinaz enzimi miktarının artırılması sonucu fenol uzaklaştırma verimi üzerine etkisi	80
Çizelge 5.22. Üzümden elde edilen tirozinaz enzimi kullanılarak yapılan fenol deneylerinde gerekli sürenin belirlenmesi için yapılan deney sonuçları (C ₀ :50ppm).....	82
Çizelge 5.23. Üzümden elde edilen tirozinaz enzimi kullanılarak yapılan fenol deneylerinde gerekli sürenin belirlenmesi için yapılan deney sonuçları (C ₀ :250ppm).....	83
Çizelge 5.24. Üzümden elde edilen tirozinaz enzimi kullanılarak yapılan fenol deneylerinde gerekli sürenin belirlenmesi için yapılan deney sonuçları (C ₀ :500ppm).....	84
Çizelge 5.25. Enzimatik yolla fenol uzaklaştırma verimi üzerine sıcaklığın etkisi, saf tirozinaz enziminin kullanılması ile.....	86

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Anahtar-Kilit modeli.....	6
Şekil 2.2. Michaelis-Menten grafiği.....	8
Şekil 2.3. Lineweaver-Burk grafiği.....	9
Şekil 2.4. Enzimatik reaksiyonun hızı üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi....	13
Şekil 2.5. Tirosinaz enziminin kodlandırılması.....	15
Şekil 2.6. Tirosinaz enziminin yapısının değişik açılardan gösterimi (A,B,C,D,E)...	17
Şekil 2.7. Tirosinaz enzimi ile fenol giderim mekanizması, (1) Monofenollerin o-difenollere hidroksilasyonu, (2) o-difenollerin tirosinazla o-benzokinonlara dehidrojenasyonu.....	18
Şekil 2.8. Fenol molekülü.....	20
Şekil 2.9. Triton X-100 açık formülü.....	31
Şekil 2.10. PVP (polivinil pirrolidon) yapısı.....	31
Şekil 4.1. Enzim ekstraksiyon ve saflaştırma basamakları.....	42
Şekil 5.1. Triton X-100 miktarının spesifik aktivite üzerine etkisi.....	50
Şekil 5.2. Triton X-100 ve PVP miktarının fonksiyonu olarak spesifik aktivite değerini gösteren üç boyutlu cevap yüzeyi, model 1'e göre.....	61
Şekil 5.3. Triton X-100 ve PVP miktarının fonksiyonu olarak spesifik aktivite değerini gösteren üç boyutlu cevap yüzeyi, model 8'e göre.....	62
Şekil 5.4. Saf tirosinaz enzimi miktarının fenol uzaklaştırma verimi üzerine etkisi (C ₀ :50 ppm).....	64
Şekil 5.5. Saf tirosinaz enzimi miktarının fenol uzaklaştırma verimi üzerine etkisi (C ₀ :150 ppm).....	65

Şekil	Sayfa
Şekil 5.6. Saf tirosinaz enzimi miktarının fenol uzaklaştırma verimi üzerine etkisi (C ₀ :250 ppm).....	66
Şekil 5.7. Saf tirosinaz enzimi miktarının fenol uzaklaştırma verimi üzerine etkisi (C ₀ :350 ppm).....	67
Şekil 5.8. Saf tirosinaz enzimi miktarının fenol uzaklaştırma verimi üzerine etkisi (C ₀ :500 ppm).....	68
Şekil 5.9. Saf tirosinaz enzimi miktarının fenol uzaklaştırma verimi üzerine etkisi (C ₀ :750 ppm).....	69
Şekil 5.10. Saf tirosinaz enzimi miktarının fenol uzaklaştırma verimi üzerine etkisi (C ₀ :1000 ppm).....	70
Şekil 5.11. Farklı başlangıç fenol konsantrasyonlarında saf tirosinaz enzimi miktarının son fenol konsantrasyonuna etkisi.....	71
Şekil 5.12. Başlangıç fenol miktarı için gerekli saf tirosinaz enzimi miktarı grafiği.....	73
Şekil 5.13. Zamanın son fenol konsantrasyonu üzerine etkisi, saf enzim kullanılması ile (C ₀ :50 ppm).....	74
Şekil 5.14. Zamanın son fenol konsantrasyonu üzerine etkisi, saf enzim kullanılması ile (C ₀ :250 ppm).....	75
Şekil 5.15. Zamanın son fenol konsantrasyonu üzerine etkisi, saf enzim kullanılması ile (C ₀ :500 ppm).....	76
Şekil 5.16. Farklı başlangıç fenol konsantrasyonlarında zamanın son fenol konsantrasyonuna etkisi, saf enzim kullanılması ile.....	77
Şekil 5.17. Farklı başlangıç fenol konsantrasyonlarında, üzümde elde edilen tirosinaz enzimi ile saf tirosinaz enziminin son fenol konsantrasyonu üzerine etkisi.....	79
Şekil 5.18. Üzümde elde edilen tirosinaz enzimi miktarının farklı başlangıç konsantrasyonlarındaki fenol uzaklaştırma verimi üzerine etkisi.....	81
Şekil 5.19. Zamanın son fenol konsantrasyonu üzerine etkisi, üzümde elde edilen enzim ile (C ₀ :50 ppm).....	82

Şekil	Sayfa
Şekil 5.20. Zamanın son fenol konsantrasyonu üzerine etkisi, üzümde elde edilen enzim ile (C_0 :250 ppm).....	83
Şekil 5.21. Zamanın son fenol konsantrasyonu üzerine etkisi, üzümde elde edilen enzim ile (C_0 :500 ppm).....	84
Şekil 5.22. Farklı başlangıç fenol konsantrasyonlarında zamanın son fenol konsantrasyonuna etkisi, üzümde elde edilen enzimin kullanılması ile.....	85
Şekil 5.23. Farklı başlangıç fenol konsantrasyonlarında, sıcaklığın fenol uzaklaştırma verimi üzerine etkisi.....	86

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. Enzim ekstraksiyon ve saflaştırma basamakları a) Yeşil üzüm b) Ham enzim ekstraktı c) Ham enzim ekstraktının santrifüjlenmesi d) Elde edilen çökelek e) TX-100-PVP'li çözelti f) PVP ve Triton X-100 ekstraktı g) Amonyum sülfat eklenmeden önceki çözelti h) Amonyum sülfat eklenmesi i) Amonyum sülfat sonrası santrifüjleme j) Elde edilen enzim.....	43
Resim 4.2. Enzimatik yolla fenol giderimi a) Kör örneği b) Tirosinaz ile muamele edilmiş fenol örneği (3 saat sonra).....	45

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
Kat	Katal
V_{max}	Maksimum hız
K_m	Michaelis-Menten sabiti (mM)
kDa	Kilodalton
TX-100	Triton X-100
PVP	Polivinil pirrolidon
C_o	Başlangıç kirletici konsantrasyonu (mg/l)
C_s	Son kirletici konsantrasyonu (mg/l)
ppm	Milyonda bir madde konsantrasyonu (mg/l)
U_i	i değişkeninin gerçek değeri
U_{io}	i değişkeninin orta noktadaki değeri
ΔU_i	i değişkeninin adım aralığı
SA	Spesifik aktivite (U/mg protein)
BSA	Bovine serum albumin
Kısaltmalar	Açıklama
EPA	Çevre Koruma Kurumu

1.GİRİŞ

Nüfusu hızla artmakta olan dünyamızda endüstrileşmenin yol açtığı başlıca sorunlardan biri de endüstriyel atıklardır. Endüstriyel atıkların yanı sıra, insan ve hayvan kaynaklı atık ve artıklar da dünyamız için büyüklüğü giderek artan bir sorun oluşturmaktadır. İster endüstriyel kaynaklı ister insan ve hayvan kaynaklı olsun, bu atık ve artıkların yol açtıkları veya açacakları sorunların önlenmesi hem dünyamız açısından hem de gelecek nesiller açısından oldukça büyük önem taşımaktadır. Yirmi birinci yüzyıla adım attığımız şu günlerde çevre bilincinin dünyamızda halen tam olarak yerleşmemiş olması, gelecek kuşaklar açısından büyük bir kayıptır. Şu bir gerçektir ki, çevre kalitesinin kontrolü bireysel bir istek olmaktan çok toplumsal bir gerekliliktir.

Son yirmi yıl içerisinde, atıkların arıtımında enzimlerin kullanımına yönelik oldukça dikkate değer çalışmalar yürütülmüştür. Enzimlerin atık arıtımında sundukları yeni olasılıklar üzerindeki çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir.

Enzimler günlük yaşantımızda önemli rolü olan maddeler haline gelmiştir.Bugün enzimlerden; gıda, ilaç ve kimya endüstrisinde, dericilik, boya ve temizlik maddeleri üretimi gibi özel konularda, biyoloji ve biyoteknoloji bilim dallarında, tıp, tarım ve veterinerlik alanlarında yaygın olarak yararlanılmaktadır.

Biyoteknolojide yaşanan gelişmelere bağlı olarak, daha iyi izolasyon ve saflaştırma yöntemlerinin kullanılması ile daha ucuz ve daha kolay elde edilebilir enzimlerin üretimi sağlanmaktadır [1, 2].

Bu çalışmada, üzümde tirozinaz enziminin ekstraksiyonu ve saflaştırılması yapılmıştır. Piyasadan alınan ve üzümde elde edilen tirozinaz enzimi kullanılarak, sulardaki fenollerin giderimi için enzimatik metod kullanılmıştır. İlk aşama olarak, üzümde tirozinaz enziminin ekstrakte edilmesi ve saflaştırılması yapılmıştır. İkinci aşamada ise, başlangıç fenol konsantrasyonu için gerekli enzim miktarının, sıcaklığın ve zamanın fenol uzaklaştırma verimi üzerine etkileri incelenmiştir. Piyasadan alınan

saf tirozinaz enzimi ve üzümde ekstrakte edilen ve saflaştırılan tirozinaz enzimi ile fenol giderimi çalışmaları yapılmış, fenol uzaklaştırma verimleri karşılaştırılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Enzimlerin Keşfi

Biyolojik olarak enzimlerin varlığı ilk olarak 1835 yılında İŖveçli kimyacı Jöns Jacob Berzelius tarafından tanımlanmıştır. Bu araştırmacı çok sayıda elementi keşfeden, kimyasal sembollerin yazılış şeklini ortaya koyan ve kataliz terimini ilk kullanan bilim adamıdır.

Berzelius, patatesde nişastanın yıkımını katalizleyen birşey bulunduğunu farketmiş ve tüm doğal ürünlerin bu tür bir kataliz altında oluştuğunu ileri sürmüştür. Ancak uzun yıllar biyolojik katalizin kimyasal tabiatı bilinmemiş ve bir gizem olarak kalmıştır. 1850-1860 yılları arasındaki dönemde Louis Pasteur, fermantasyonun canlı hücre varlığında anaerobik olarak şekerin CO₂ ve etanole yıkılması olduğunu göstermiştir.

1897 yılında Eduard Buchner tesadüfen fermantasyonun kendi hazırladığı berrak bir sıvı tarafından nasıl katalizlendiğini keşfetmiştir.

2.2. Enzimler

Enzimler, canlı organizmadaki biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen ve protein yapısında olan biyokatalizörlerdir. Metabolizma olarak adlandırdığımız organizmadaki biyokimyasal dönüşümlerin tümünün yürüyebilmesi enzimler sayesinde mümkün olmaktadır. Organizmadaki organik maddelerin yapımı, yıkımı, kas hareketleri ve solunum gibi fizyolojik olaylar enzimler yardımıyla yürümektedir.

Enzimler günlük yaşantımızda önemli rolü olan maddeler haline gelmiştir. Bugün enzimlerden; gıda, ilaç ve kimya endüstrisinde, dericilik, boya ve temizlik maddeleri üretimi gibi özel konularda, biyoloji ve biyoteknoloji bilim dallarında, tıp, tarım ve veterinerlik alanlarında yaygın olarak yararlanılmaktadır.

Gıda endüstrisinde pastörizasyon ve sterilizasyonunun uygun şekilde yapılıp yapılmadığının tespiti için enzim tayinlerinden faydalanılır.

2.2.1. Enzimlerin genel özellikleri ve kimyasal yapıları

Enzimler çok etkili ve spesifik katalizörlerdir. Enzimlerin, diğer kimyasal katalizörlere göre birçok üstünlükleri bulunmaktadır. Enzimlerin kimyasal katalizörlerden en önemli farkı spesifik olmalarıdır. Genel olarak enzimler belirli maddeler arasındaki belirli reaksiyonları katalize ederler. Biyokimyasal katalizörler, reaksiyon hızını 10^{20} 'ye kadar artırırken, diğer katalizörler 10^2-10^3 kadar arttırabilmektedir.

Enzimler yalnızca canlı hücreler tarafından sentezlenir. Bu enzimlerin bir kısmı hücre içinde kalır ve burada fonksiyon gösterir. Bu tip enzimlere “*intraselüler*” (hücre içi) enzimler denir. Bazı enzimler ise hücre içinde sentezlendikten sonra hücre dışına salınır ve burada fonksiyon gösterir. Bunlara da “*ekstraselüler*” (hücre dışı) enzimler denir.

Bazı enzimler benzer yapıda bir grup substrata etki ederken bazıları tek molekül türü üzerine etki eder.

Birbirine çok benzeyen maddeleri, hatta aynı maddenin stereoizomerlerini bile dönüşüme uğratmazlar. Bu yüksek seçicilik sayesinde en basit bir hücrede bile aynı anda binlerce biyokimyasal reaksiyon meydana gelmektedir.

Enzim tarafından değişikliğe uğratılan maddelere “*substrat*” denir. Substratlar enzimde “*aktif merkez*” denilen özel bir bölgeye bağlanırlar. Polipeptit zincirinin belirli kısımlarının özel katmanları ile oluşan bu aktif merkez, katalitik aktiviteden sorumludur.

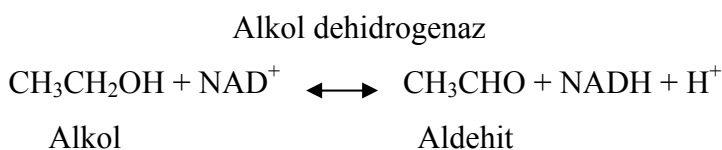
Enzimlerin tümü protein yapısındadır. Enzimler yapısında protein dışında yabancı madde içerip içermemesine göre gruplandırılabilirler:

- Bazı enzimler yalnızca proteinden yani aminoasitlerden oluşmuşlardır. Bu tip enzimlerde protein yapı hem spesifiklikten hem de katalitik aktiviteden sorumludur. Örnek olarak; amilazlar, pepsin, tripsin, üreaz verilebilir.
- Bazı enzimlerin yapısında proteinin yanısıra organik veya inorganik maddeler yer almaktadır. Protein yapısında olmayan bu maddelere “kofaktör” adı verilmektedir.
- Kofaktörü ile birleşmiş ve aktif halde bulunan enzimlere “haloenzim” adı verilmektedir. Haloenzimin protein kısmına ise “apoenzim” denilir. Apoenzimlerin protein yapısındaki aminoasit türleri ve dizilişleri her enzimde farklılık göstermektedir. Bu nedenle enzimin özelliğini ve özgülünü belirleyen kısım apoenzimdir. Apoenzimler tek başlarına aktivite gösteremezler, ancak koenzimle birlikteyken katalitik aktivite kazanırlar.

Kofaktörler; inorganik iyonlar ve koenzimler olarak gruplandırılabilirler.

Koenzimler; Bazı enzimler tek başlarına da aktivite gösterebilirken büyük bir çoğunluğunun aktivite gösterebilmesi için başka moleküllerle kompleks oluşturması gerekmektedir. Bu maddelere “koenzim” denir. Koenzimler metal iyonları veya vitamin yapısında, veya bu yapıya benzeyen organik moleküller olabilir. Koenzimler; reaksiyon sırasında enzimin aktif merkezine gevşek olarak bağlanırlar ve aktivite sonunda enzim molekülünden ayrılırlar. Örneğin; Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+), birçok yükseltgenme-indirgenme tepkimesinde yeralan bir koenzimdir.

Aşağıdaki tepkimeye göre koenzim kinetik olarak ikinci bir substrat gibi davranmakta ve indirgenerek reaksiyondan $NADH$ şeklinde farklı bir ürün olarak ortaya çıkmaktadır .



İnorganik iyonlar ise; kofaktör olarak görev üstlenen katyonlar (Ca^{+2} , Mg^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} , Cu^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} , Na^+ , K^+ vb.) ve anyonlar (Cl^- , Br^- , F^- , I^- vb.) dır.

Alman Kimyacı Emil Fischer 1894 yılında Anahtar-Kilit ve Enzim-Substrat ilişkisini ortaya koymuştur.

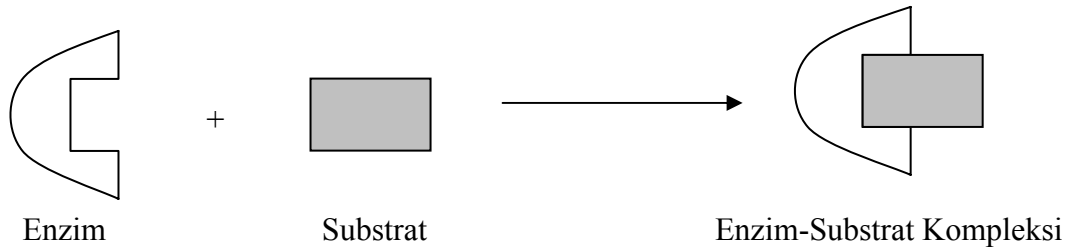
Enzimler genellikle sustratlardan daha büyük moleküllerdir. Enzim molekülü üzerindeki kofaktör ve koenzimlerin yer aldığı, enzim-substrat kompleksinin şekillendiği dar bir bölge aktif merkezi teşkil eder.

Enzim molekülü özel bir cep içerir; bu *aktif bölge* olarak tanımlanır. Aktif taraf substratı bağlayarak enzim-substrat kompleksi oluşturur. Enzim ürün yapısına çevrilir ve sonra üründen enzim ayrılır.

Bir enzimatik reaksiyon şu şekilde gerçekleşmektedir:



Bu tepkimeye göre enzim substratı ile birleşerek bir ES kompleksi oluşturmakta, daha sonra da bu ES kompleksinden ürün oluşmakta, enzim ise reaksiyon ortamında tekrar serbest hale geçmektedir.



Şekil 2.1. Anahtar-Kilit modeli

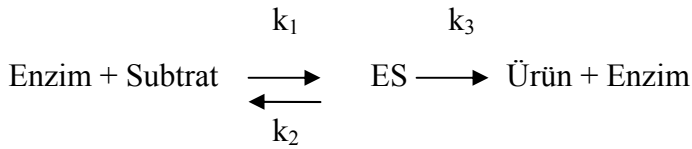
Aktif merkezin bazı özellikleri

- Aktif merkez enzimin protein kısmında yer alır.
- Aktif merkez belirli çeşit, sayı ve dizilişte aminoasitlerden oluşmuştur.
- Substrat aktif merkeze H-bağları, Van-der Waals ve elektrostatik güçlerle çok zayıf olarak bağlanmaktadır.
- Bazı enzimlerin birden fazla aktif merkezi olabilmektedir.
- Aktif merkez enzimin toplam hacminin çok küçük bir bölümünü oluşturmaktadır.

2.2.2. Enzim kinetiği

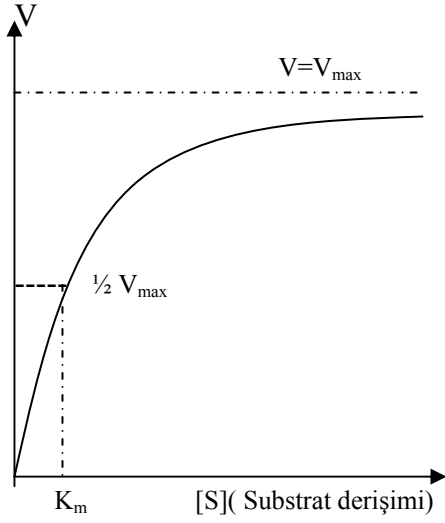
Enzim, substratı ürüne dönüştürürken önce onunla bir ‘‘Enzim-Substrat kompleksi’’ oluşturur, daha sonra da bu kompleks ürün ve enzime dönüşür.

Enzim kinetiği mekanizması şu şekilde gösterilir.



Burada ES kompleksi, E ve S’den k_1 hızı ile oluşur. ES’nin ayrışması ise k_2 hızındaki geri reaksiyonla ve k_3 hızı ile ürün ve enzime ayrışması ile olur. Reaksiyon kararlı duruma ulaşınca ‘‘Kararlı Durum İlkesine’’ göre ES’nin oluşması ayrışmasına eşit olur, yani derişimi değişmez.

Enzim reaksiyonları üzerinde ilk geniş kinetik çalışmalar 1913 yılında Michaelis-Menten tarafından yapılmıştır. Michaelis-Menten kinetiğine göre başlangıç enzim derişimi sabit alınıp reaksiyon hızının substrat derişimine bağıllığı incelenir. Sonuçta hiperbolik bir fonksiyon ve eğri elde edilir (Şekil 2.2). Bunun çözümü ile de Eş. 2.1’deki Michaelis-Menten bağıntısı bulunur.



Şekil 2.2. Michaelis-Menten grafiği

Michaelis-Menten Bağıntısı Şu Şekilde tanımlanır.

$$V = \frac{V_m \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (2.1)$$

Burada V_{\max} ; hiperbol asimtodunun y eksenini kestiği noktadır ve maksimum hız olarak belirtilir. Maksimum hızın yarısına ($V_{\max}/2$) karşılık gelen substrat derişimi K_m (Michaelis-Menten sabiti) olarak belirtilir. V_{\max} ve K_m , bir enzimin aktivitesini belirleyen önemli enzim sabitleridir.

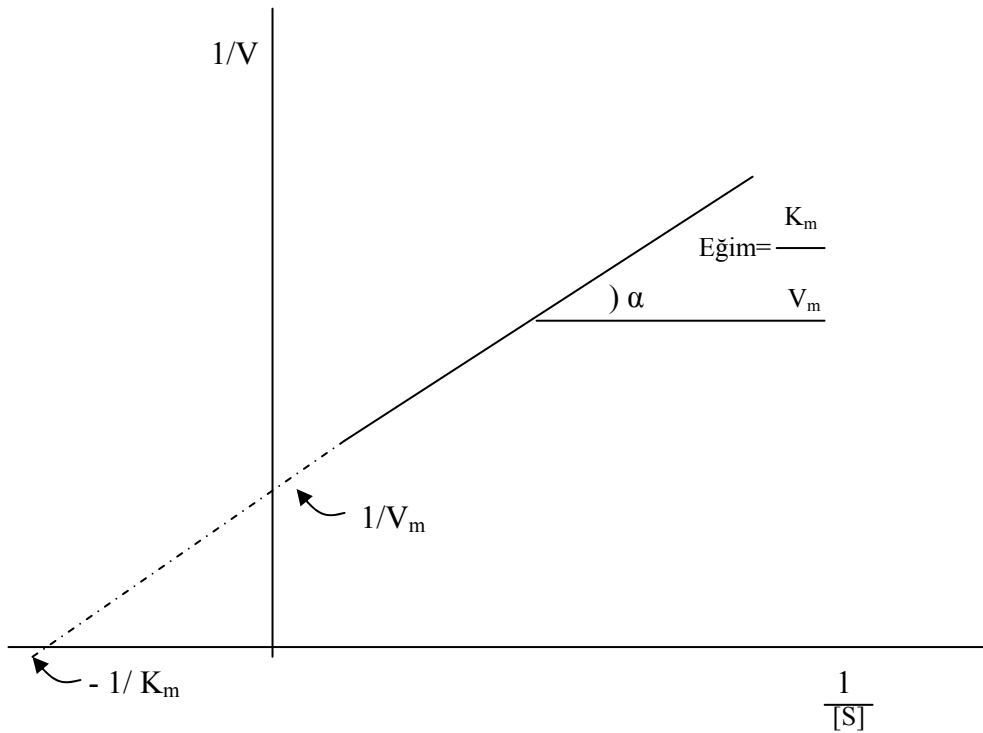
Michaelis-Menten grafiği 3 bölgeden oluşmaktadır. Birinci bölgede substrat konsantrasyonu düşük olacağından ($[S] \ll K_m$) grafik doğrusaldır. İkinci bölgede oldukça büyük substrat konsantrasyonlarında herhangi bir ihmal yapılamaz, reaksiyon karışık dereceden yürür. Üçüncü bölgede $[S] \gg K_m$ 'dir. $V = V_{\max}$ olur ve reaksiyon sabit bir hızla devam eder.

Michaelis-Menten grafiği ile bir hiperbol elde edildiğinden, uygulamalarda kolaylık sağlamak amacı ile bunun bir doğru denklemi haline getirilmesi gerekmektedir.

Bu amaçla eksen ölçekleri uygun şekilde değiştirilerek, değişik yollardan doğru denkleminde dönüştürülebilir. Bunlardan en çok kullanılanı Eş. 2.2'deki Lineweaver-Burk denklemidir [3].

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (2.2)$$

Bu denkleme göre ordinatta $1/V_{max}$, apsiste $1/[S]$ değerleri olmak üzere bir doğru elde edilir. Bu doğrunun eğimi ise K_m/V_{max} 'dir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Lineweaver-Burk grafiği

2.2.3. Enzimatik analiz ve aktivite belirleme yöntemleri

Enzimler, biyolojik katalizör olmaları nedeniyle dünyamızdaki yaşamı olası kılan etmenlerin başında gelmektedirler. Bu açıdan enzimoloji, moleküler biyolojinin en önemli alt çalışma alanlarından birisini oluşturmaktadır.

Enzimlerin varlıklarını, etkinliklerini, lokalizasyonlarını, kataliz mekanizmalarını, miktarlarını, saflıklarını vb. belirlemenin en etkin yolu onların aktivitelerini ölçmektir. Şu ana kadar binlerce enzimin varlığı saptanmış ve bunlara ilişkin aktivite tayin yöntemleri geliştirilmiştir. Herhangi bir enzim için ideal bir aktivite belirleme yolu yoktur, çünkü bir yöntemin uygunluğu bazı faktörlere bağlıdır. Bunların başında, enzimin saflığı, fizikokimyasal özellikleri, katalizlediği reaksiyonun tipi, lokalize olduğu yer, ölçüm yönteminin maliyeti, eldeki mevcut ölçüm cihazlarının niteliği ve ölçümün duyarlılığı ile ilgili zorunluluklar vb. gelmektedir.

2.2.4. Enzim aktiflik birimleri

Enzimler, biyolojik ortamda çok az miktarda buldukları için miktarlarının ölçümü çok zordur. Ancak aktiviteleri ölçülebilir.

Bir enzimin aktivitesini çeşitli yollardan ifade etmek olasıdır. Örneğin, 1 mg enzim proteini tarafından birim zamanda meydana getirilen absorbans değişikliği bir birim olarak ifade edilebilir. Fakat dünya genelinde, elde edilen sonuçları karşılaştırabilmek için daha standart bir birim tanımlaması geliştirilmiştir. Bu uluslararası ünite (International Unit; IU) veya enzim ünitesi olarak ifade edilmektedir.

Enzim ünitesi

Optimum şartlarda, bir ünite enzim, bir dakikada 1 μ mol ürünün oluşumunu (veya 1 μ mol substratın dönüşümünü) katalizleyen enzim miktarıdır.

Spesifik aktivite

Bir enzimin aktivitesini tanımlamak için kullanılan diğer bir birim de spesifik aktivitedir. Bir enziminin spesifik aktivitesi, 1 miligram protein başına düşen enzim ünitesinin sayısıdır. Spesifik aktivite, enzim ünitesi/mg protein olarak hesaplanmaktadır.

Saf bir enzimin spesifik aktivitesi sabittir ve o enzime özgü bir değerdir. Spesifik aktiviteden yola çıkarak enzim ünitesini miligram olarak tanımlamak da mümkündür.

$$\text{ünite/spesifik aktivite(ünite/mg) = miligram enzim} \quad (2.3)$$

Spesifik aktivite kavramı özellikle bir enzimin saflığını kabaca tanımlamak için kullanılan bir ölçüttür. Örneğin, ham özütlerdeki yüksek protein derişiminin ancak küçük bir kısmını ilgilendığımız enzime ait protein oluşturmaktadır. Bu nedenle ölçüm yapıldığında oldukça yüksek bir enzim ünitesi elde etmek olasıdır, fakat bu durumda enzimin spesifik aktivitesi düşük olacaktır. Enzimi saflaştırdıkça solüsyondaki enzim ünitesi sabit kalırken, protein derişimi düşeceği için spesifik aktivite yükselecektir. Enzim en yüksek saflığa eriştiğinde spesifik aktivite sabit bir değere ulaşacaktır.

Katal

Enzim aktivitesi birimi olarak ünite terimi günümüzde yaygın olarak kullanılmakla beraber, Uluslararası Biyokimya Birliği, Enzim Alt Komisyonu tarafından önerilmiş bir birim de katal (Kat)'dır. Optimum şartlarda 1 katal, 1 saniyede 1 mol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarıdır. Katal, tanımından da anlaşılacağı gibi, büyük ölçekli bir birimdir ve bu nedenle aktiviteleri tanımlamak için nanokatal ve pikokatal birimleri çok daha kullanışlıdır.

2.2.5. Enzim aktivitesini etkileyen faktörler

Enzim aktivitesini etkileyen faktörler şunlardır :

- Ortam pH'ı
- Sıcaklık
- Enzim konsantrasyonu
- Substrat konsantrasyonu
- Zaman

- İnhibitör
- Çeşitli iyonların konsantrasyonu ve özellikleri
- Işık ve diğer fiziksel faktörlerin etkisi

Ortam pH'ı

Enzimler katalitik etki gösterirken ortamın hidrojen iyonu konsantrasyonuna bağlı olarak aktiviteleri değişmektedir. Bazı enzimler düşük pH seviyelerinde (asit ortamda) daha aktif olmakla beraber, bazıları ise yüksek pH'lı ortamlarda (bazik ortamda) aktiftirler. Fakat çoğunlukla enzim aktivitesi nötral ortamlarda en fazla olmaktadır.

Enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH'a o enzimin *optimum pH*'ı adı verilir. Enzimatik çalışmalarda pH'ı optimumda sabit tutmak veya en azından hidrojen iyonu konsantrasyonunu elverişli durumda tutmak için tamponlar kullanılır. Optimum pH, kullanılan tamponun cinsine, özel substratın yapısına ve enzimin elde edildiği kaynağa bağlıdır.

Sıcaklık

Sıcaklık enzimatik reaksiyonları da diğer reaksiyonlarda olduğu gibi hızlandırır. Her 10°C sıcaklık artmasına karşılık enzimatik reaksiyonun hızı 2 kat kadar artmaktadır. Ancak enzimler protein yapılı olduklarından belli bir sıcaklığın üzerinde dayanıklılığını yitirerek denatüre olurlar. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığa *optimum sıcaklık* adı verilir.

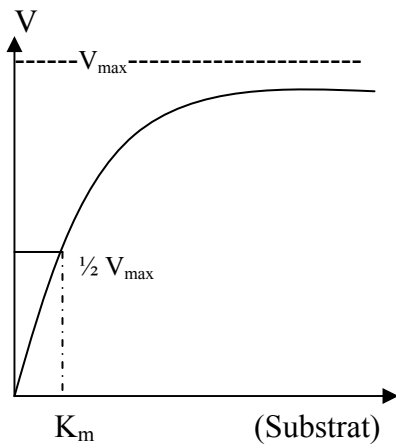
Enzim konsantrasyonu

Enzimatik reaksiyonun hızı, enzimin substratına doygun olduğu koşullarda enzim konsantrasyonuna bağlı olarak artmaktadır. Ortamdaki enzim molekülü ne kadar çoksa reaksiyon o kadar hızlı yürür. Enzimin hücrede lokalize olduğu yerde yeterince substrat bulunmadığı için reaksiyon o derece yüksek düzeyde meydana gelmez.

Substratın bol olduğu koşullarda enzim konsantrasyonu reaksiyon hızı ile doğru orantılıdır.

Substrat konsantrasyonu

Substrat konsantrasyonu reaksiyon hızını belli bir süre lineer olarak artırmaktadır. Enzim substratına karşı doygunluğa ulaştığında reaksiyon hızı değişmeden devam eder (şekil 2.4). Bu durumda enzim maksimum hız ile çalışıyor demektir. Maksimum hız V_{max} ile gösterilir. Enzim maksimum hız ile çalışırken enzim moleküllerinin yarısına bağlı substrat konsantrasyonuna *Michaelis-Menten sabiti* (K_m) denilmektedir. Enzimin substratına ilgisi ne kadar fazla ise K_m değeri o kadar kktr.



şekil 2.4. Enzimatik reaksiyonun hızı üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi

Zamanın etkisi

Bir enzim reaksiyonun hızı belirli bir zamanda üretilen ürünün miktarı ile belirlenmektedir.

Bir enzim tarafından katalize edilen bir reaksiyon sürerken reaksiyonun hızı giderek düşer. Bunun nedeni reaksiyon devam ederken oluşan ürünlerin aralarında birleşerek aksi yönde bir reaksiyon oluşturmaları, enzimin zamanla inaktive olması, reaksiyonu

önleyen maddelerin teşekkül etmesi ve substratın tükenmesi gibi faktörlerdir. Bu faktörlerin etkilerinin ortadan kaldırılması için enzim çalışmaları çoğunlukla substratın yaklaşık % 10'unun sarfedildiği reaksiyonun başlangıç aşamasında gerçekleştirilir.

İnhibitör

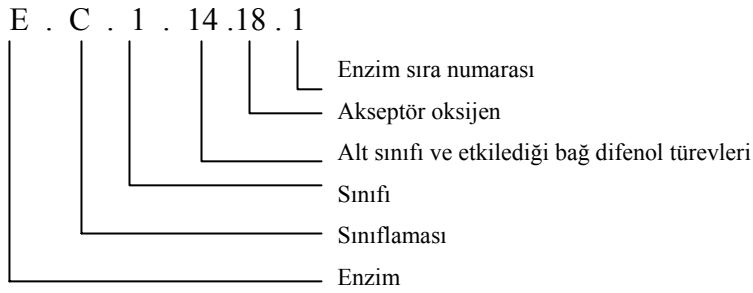
İnhibitörler, enzimatik tepkimelerin hızını azaltan maddelerdir. İnhibitörler, substratın enzimin aktif merkezine bağlanıp, enzim-substrat kompleksinin oluşumunu önlerler.

2.2.6. Enzimlerin sınıflandırılması

Enzimler kullandıkları substratın veya katalizledikleri reaksiyon tipine göre adlandırılmaktadır. Enzimin etkilediği substrat ve reaksiyon tipi –az eki getirilerek adlandırılmıştır. Ancak son zamanlarda bu şekilde adlandırılmaları önemini kaybetmiştir. Yeni keşfedilen ve sayıları günden güne artan enzimler Uluslararası Biyokimya Birliği tarafından yeni bir adlandırılmaya ve sınıflandırılmaya tabi tutulmuştur. Buna göre enzim sınıfları aşağıdaki gibidir.

- Oksidoredüktazlar
- Transferazlar
- Hidrolazlar
- Liyazlar
- İzomerazlar
- Ligazlar (Sentetazlar)

Yeni sınıflamada enzimlere 4 numara verilmektedir. İlk numara enzimin altı sınıftan hangisine ait olduğunu, ikinci numara etki ettiği kimyasal yapıyı veya fonksiyonel grubu, üçüncü numara akseptörü, dördüncü numara ise belli bir sınıfta enzimin aldığı sıra numarasını göstermektedir. Şekil 2.5'de tirozinaz enziminin kodlandırılması gösterilmiştir.



Şekil 2.5. Tirozinaz enziminin kodlandırılması

Oksidoredüktazlar

Redoks reaksiyonlarını katalizler. Bu sınıf enzimlerin substratları genellikle elektron ve hidrojen vericidir. Dehidrojenazlar ve redüktazlar bu gruptandır. Oksijen, elektron veya hidrojen alıcısı ise bu durumda oksidazlar olarak isimlendirilirler. Alkol–dehidrojenaz, redüktaz, tirozinaz bu grubun örnekleridir.

Transferazlar

Verici üzerindeki bir fonksiyonel grubun alıcı substrat molekülüne taşınmasını katalizleyen enzimlerdir. Amino-transferazlar, CoA-transferazlar bu grubun örnekleridir.

Hidrolazlar

Ester, glikozid, peptid, C-N, C-C, C-X, P-N, asit anhidrit bağların hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Lipazlar, fosfatazlar bu grubun örnekleridir.

Liyazlar

Çift bağ oluşumunu ve çift bağa katılma reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Dekarboksilazlar, aldolazlar, dehidratazlar bu grubun örnekleridir.

İzomerazlar

Molekülün geometrik veya yapısal çevrilmesini katalizleyen enzimlerdir. Aminoasit rasemazlar, glukozfosfat-izomerazlar, yağ asidi cis-trans izomerazlar, fosfogluktomutazlar bu grubun örnekleridir.

Ligazlar

ATP'nin AMP ve PPI'ye parçalanmasından açığa çıkan enerjiden yararlanarak iki molekülü birbirine bağlayan enzimlerdir. Aminoasitleri aktive eden enzimler, açilCoA – sentetazlar bu grubun örnekleridir.

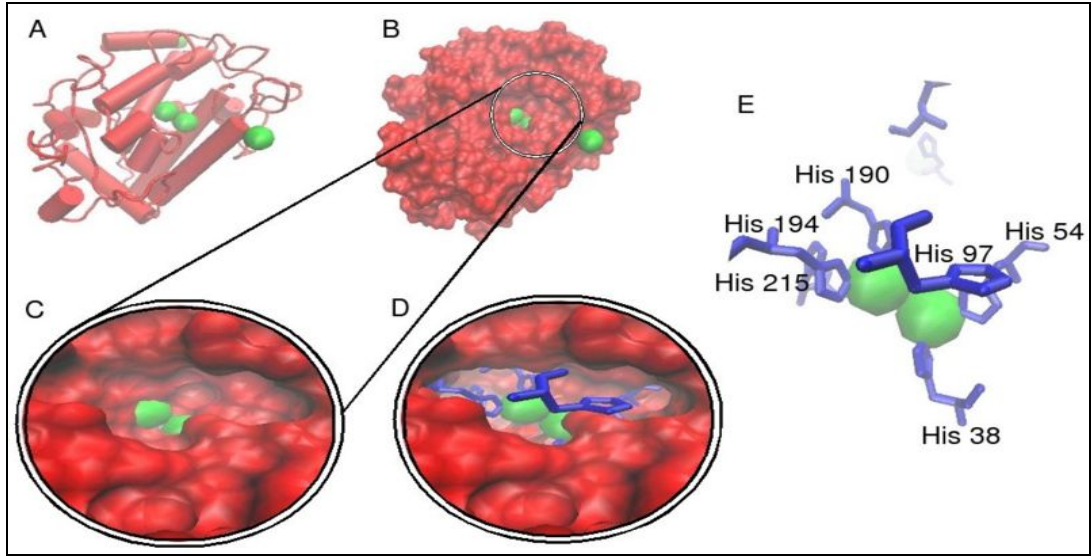
2.3. Tirosinaz Enzimi

2.3.1. Tirosinaz enzimi hakkında genel bilgi

Tirosinaz enziminin sistematik adı; 1,2-benzendiol : oksijen oksidoredüktaz'dır. Tirosinaz aynı zamanda polifenol oksidaz, fenolaz, katekol oksidaz, monofenol oksidaz, kresolaz ve katekolaz olarak da bilinir. Tirosinaz ilk olarak 1856 yılında Schobenbein tarafından mantar içinde keşfedilmiştir [4,5].

Tirosinaz bakır içeren bir enzimdir. Tirosinazın aktif merkezinde her biri üç histidin aminoasidi grubuna bağlanmış iki bakır atomu bulunmaktadır. Aktif merkezdeki iki bakır atomu iki tane oksijen atomuyla etkileşim halindedir.

Şekil 2.6'da tirosinaz enziminin yapısı değişik açılardan gösterilmektedir. Bakır atomları yeşil renkte, molekül yüzeyi kırmızı renkte, aktif merkezdeki bakır atomları ile koordine olmuş histidin aminoasitleri mavi çizgi şeklinde belirtilmiştir.



Şekil 2.6. Tirosinaz enziminin yapısının değişik açılardan gösterimi (A,B,C,D,E) [6]

Tirosinaz nötr tampon ve oda sıcaklığında oldukça kararlıdır. $pH > 8$, $pH < 5$ ve yüksek sıcaklıkta kararsızdır. Tirosinaz enzimi, fenollerini gidermedeki üstün yeteneği ile son yıllarda araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Tirosinaz enzimi fenol dönüşümünü, $pH = 7$ 'de etkin bir şekilde katalizler [1].

Tirosinaz birçok bitki dokusunda, bazı mantarlarda, üzüm, şeftali, ayva, elma, pancar, patates, ıspanak gibi meyve ve sebzelerde ayrıca böcek ve insanların da dahil olduğu bazı yüksek yapıli canlılarda bulunur. Yüksek yapıli bitkilerde enzim, bitkiyi böcek ve mikroorganizma ataklarına karşı korur; bitki yaralandığında mikroorganizmaların daha ileri ataklarına olanak tanımayan ve kurumayı önleyici bir melanin tabakası oluşturur. Tirosinaz böceklerde dış iskeletin sertleşmesine yardımcı olurken, öte yandan mikroorganizmalara karşı, onları sentezlediği melanin içerisine hapsederek koruma sağladığı ileri sürülmüştür. İnsanlarda ise tirosinaz cildin, saçın ve gözün pigmentasyonundan sorumludur [7-10].

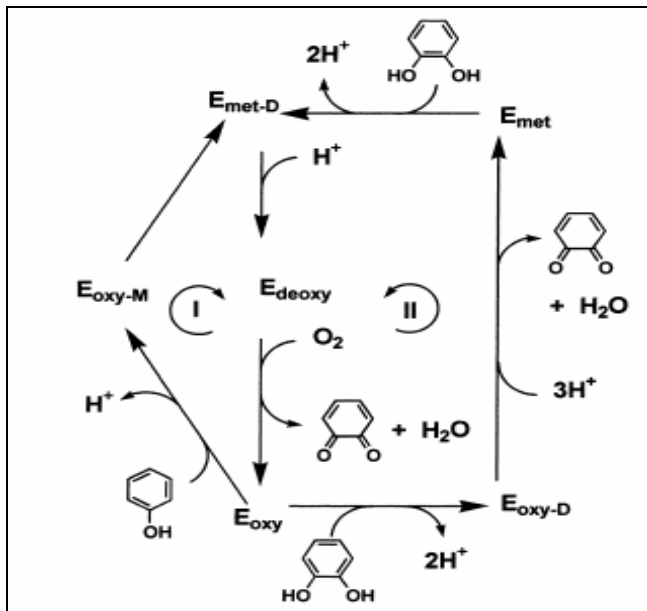
2.3.2. Tirosinazın moleküler özellikleri

Tirosinaz tipi fenol oksidazların moleküler ağırlıkları izole edildikleri kaynaklara göre oldukça değişkenlik göstermektedir. Dört farklı yüksek yapıli bitki türünden

izole edilen tirozinaz enziminin moleküler ağırlıkları 33.0 kDa ile 200.0 kDa arasında değişmektedir. Mantar kaynaklı tirozinaz enziminin genel olarak kabul görülen moleküler ağırlığı 128.0 kDa'dur [11]. Üzüm tirozinazının moleküler ağırlığı ise 40.680 kDa'dur. Tirozinaz enzimi için katekol substratı kullanıldığında, enzimin K_m (Michaelis-Menten sabiti) değeri 3.06 mM'dır.

2.3.3. Tirozinazın katalizlediği tepkimeler

Tirozinaz bakır içeren bir enzimdir. Bu enzim monofenollerin oksidasyonunu katalizlemek için moleküler oksijeni kullanır. Tirozinaz iki tane oksidasyon reaksiyonunu katalizler (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Tirozinaz enzimi ile fenol giderim mekanizması, (1) Monofenollerin o-difenollere hidroksilasyonu, (2) o-difenollerin tirozinazla o-benzokininonlara dehidrojenasyonu. M:monofenol ve D:difenol

Birinci halkada tirozinaz, oksijenle monofenollerin (C_6H_5OH) oksidasyonunu gerçekleştirir. Bu süreçte dört enzim durumundan geçer (E_{deoxy} , E_{oxy} , E_{oxy-M} ve E_{met-D}). İkinci halkada enzim beş halden (E_{deoxy} , E_{oxy} , E_{oxy-D} , E_{met} , ve E_{met-D}) geçerek o-difenolleri ($C_6H_6O_2$) oksitlemiş olur. Bu iki halka, birbiriyle oligomerler meydana getiren o-kinonların ($C_6H_4O_2$) oluşmasını sağlar [12].

2.3.4. Tirosinazın endüstriyel uygulama alanları

Gerek arıtım gerekse gıda, sağlık ve kozmetik endüstrisinde olsun tirosinazın günümüzde birçok uygulama alanı vardır. Tirosinaz, meyve ve sebzelerin işlenmesinin ardından enzimatik kararmaya ve buna bağlı olarak maddi kayıplara yol açması nedeniyle, ilk olarak gıda sektörüne yönelik araştırmalar yapan araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Bu alandaki araştırmacılar hasat ve işleme sonrası enzimin aktivitesini minimuma indirebilmek için birçok araştırma yapmışlardır.

Özellikle çay fermantasyonunda tirosinaz aktivitesi çok önemli bir işleve sahiptir; tirosinaz aktivitesinin yüksek olması çayın kalitesini arttıran bir özelliktir. Tirosinaz enziminin arıtım, kozmetik ve tıbbi uygulamalara yönelik önemi ise son zamanlarda giderek artan bir yoğunlukta dikkatleri çekmektedir [13].

Tirosinazın gıda endüstrisindeki önemi

Çoğu tarımsal kökenli gıda maddesi tirosinaz içeriği nedeniyle enzimatik kararmaya maruz kalır ve bunun sonucunda ürünün kalitesi düşer. Özellikle meyve ve sebzelerin işleme sürecinde O₂ temasına neden olabilecek herhangi bir durum, tirosinaz aktivitesine bağlı olarak kararmaya yol açmakta ve maddi kayıplara neden olmaktadır. Bu nedenle, gıda sektörü için çeşitli inhibitörler kullanarak tirosinaz enziminin aktivitesinin kontrolü ve buna bağlı olarak enzimatik kararmanın önlenmesi oldukça önemlidir. Tirosinaz aktivitesini inhibe etme yeteneğinde olan birçok bileşik bilinmesine karşın, bu inhibitörlerin enzimatik kararmayı kontrol edebilme yetenekleri inhibitör, substrat ve O₂ konsantrasyonuna, pH'a, sıcaklığa ve enzimin kaynağına bağlı olarak farklılık gösterir. Tirosinaz, siyanür, karbon monoksit, sodyum dietil-ditiyokarbamat, tropolon, 2-merkaptobenzotiyazol, azid ve EDTA gibi çeşitli ajanlar tarafından inhibe edilebilmektedir. Ayrıca, tuzlarda dahil olmak üzere, bazı inorganik iyonlarda tirosinazı inhibe edebilmekle birlikte, NaCl hariç bu bileşiklerin birçoğu toksik olduklarından, kullanımları sınırlıdır. Taze soyulmuş sebze ve meyvelerin kararmasını önlemek için kullanışlı olan NaCl, düşük konsantrasyonlarda zayıf bir inhibitördür [14-17].

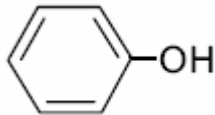
Tirosinaz aktivitesi bazı gıda ürünleri açısından önlenmesi gereken bir aktivite olmakla birlikte aktif tirosinaz; çay, kahve, kakao, kuru üzüm, kuru erik, kuru incir vb. gibi gıda ürünleri açısından oldukça önemlidir. Özellikle tirosinaz aktivitesinin yüksek olması çayın kalitesini arttıran bir özelliktir. Ayrıca, tirosinaz aktivitesi ile oluşan bazı çözüner pigmentler gıda renklendiricisi olarak kullanılmaktadır.

Tirosinazın tıbbi uygulama alanları

Tirosinaz, melanin oluşumunda görev alması nedeniyle tıbbi alanda da dikkatleri üzerine çekmiştir. Suda çözünmeyen heteropolimer yapıdaki melanin, 5,6-dihidroksiindol ve 5,6-dihidroksiindol-2-karboksilik asit birimlerinden oluşur ve özellikle kozmetik sanayi tarafından güneşin ultraviyole ışığından korunmak amacıyla üretilir. Ayrıca, bazı kanser türlerinde kanserli hücrede tirosinaz aktivitesinin oldukça arttığı gözlemlenmiş ve bu kanser türlerinin tedavisinde enzimin bu özelliğinden faydalanılması gündeme gelmiştir. Memelilerde tirosinazın aktif biçimi melanositler içerisinde bulunan özelleşmiş sitoplazmik granüller olan melanozomlarda yer alır. Dewey ve ark. (1977) tirosinazın bir substratı olan 4-hidroksianizolün farelerde Harding-Passey melanomasının gerilemesine sebep olduğunu bildirmişlerdir. Tirosinazın kullanıldığı bir başka önemli alan ise Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılan L-DOPA'nın üretimidir [18].

Tirosinazın fenollerin gideriminde kullanımı

Fenolün tanımı ve genel özellikleri



Şekil 2.8. Fenol molekülü

Fenoller (C_6H_5OH), aromatik bileşikler arasında en önemli organikler olarak bilinirler. Fenoller, beyaz renkli, kristal yapıdadırlar ve kendine has kokuları vardır.

Ancak havada yükseltgenerek pembemsi bir renk almaktadır. Kendilerine özgü tatları ve kokuları vardır. Fenoller benzenin hidroksi türevleri olarak isimlendirilirler. Monohidroksi benzen gibi tek hidroksil grubuna sahip fenollerin hoş ve tatlımsı bir kokusu varken, çift hidroksil grubuna sahip fenoller (difenoller) hafif kokulu, üç ya da daha çok hidroksil grubu içeren fenoller (polifenoller) tümüyle kokusuzdur. Erime noktası 43 °C olan fenol, oda sıcaklığında katı haldedir. 43 °C üzerinde organik çözücülerin çoğuyla, 80 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda ise suyla her oranda karışır. Yakıcı ve zehirli bir madde olarak bilinmektedir [19].

Fenoller, içerdikleri (-OH) grubu nedeniyle ilk bakışta alkol izlenimi verse de suda çok sınırlı olan ($K_a=1 \times 10^{-10}$) hidrolizi sırasında az miktarda H^+ ve fenil köküne ayrışır ve bu nedenle de zayıf bir asit gibi davranır. Asitliği nedeniyle fenole başlangıçta karbolik asit denmiştir. 1800'lü yıllarda, İngiliz cerrah Joseph Lister, fenolün hastanelerde antiseptik olarak kullanılabileceğini söylemiştir. O tarihe kadar enfeksiyonların nedeninin mikroorganizmalar değil kokular olduğu sanılmıştır ve antiseptik kullanılmamıştır. Günümüzde antiseptik olarak fenolün yerini daha az tahriş edici bileşikler almıştır. Ancak çağdaş antiseptiklerin bir çoğu hala fenolik gruplar içermektedir [20].

Doğal fenol, taş kömürü katranından elde edilebilmesine rağmen günümüzde sentezle de üretimi yapılmaktadır. Fenol en eski dezenfektanlardan biridir. Fenolün bütün türevleri mikrop öldürücü olup, bu özellik halkada alkil grubu olduğu zaman daha da artar. Alkil zincirindeki karbon sayısı 6 iken öldürücü etki maksimuma erişir.

Fenollerin klor türevleri özellikle bakteri ve mantarlara karşı çok etkindirler. Örneğin, pentaklorfenol mantarlara, kalas ve tahtaları çürümelerden ve termitlerden korumak için kullanılır. Klor bağlanmış difenol bileşiklerinden 2,2-dihidroksi-3,3-5,5-6,6- heksaklordifenil metanın fenol katsayısı 125'tir. Bu bileşik mikrop öldürücü sabunların, diş macunlarının ve çeşitli koku gidericilerin yapımında kullanılır.

Fenol ve homologları zehirli maddeler olup hayvansal dokular üzerinde yakıcı etkileri vardır. Bu nedenle kullanılırken deriye temas ettirilmemeli ve buharları solunmaktan kaçınılmalıdır.

Fenol ve türevlerinin kaynakları ve kullanım alanları

Fenolün dünyadaki ve Türkiye'deki kullanım alanlarından en önemlisi fenolik reçine üretimidir. Fenolik reçineler, kağıt endüstrisi, kauçuk işleme endüstrisi ile izolasyon ve yüksek sürtünmeye dayanıklı malzeme imalatında kullanılmaktadır.

Bisfenol A eldesinde de yine fenol gereklidir ve bu malzemede epoksi, polikarbonat fenoksi ve polisülfonat reçineler ile korozyona dayanıklı poliester üretiminde kullanılmaktadır.

Boya ve ilaç endüstrisinde kullanılan klorofenoller, reçineler, antioksidan ve plastikleştiricilerde kullanılan alkil fenoller, yüzey aktif maddeler, yine fenolden elde edilen önemli bileşiklerdir. Ayrıca çeşitli fenol türleri de salisilik asit (boya ve ilaç sanayinde), anisol (insektisit, parfüm yapımında çözücü olarak), pikrik asit (boya, ilaç, patlayıcı endüstrisinde), fenilsülfatlar (plastikleştiriciler, hidrolik akışkan üretiminde) geniş ölçüde kullanılmaktadır.

Fenollü atıksuların kaynakları

Fenollü atıksuların oluşmasına yol açan birçok endüstriyel faaliyet arasında, yağ rafinerileri, kimyasal tesisler, patlayıcı üreticileri, reçine üretimi ve kok fırınları önemli yer tutmaktadır. Fenol içeren atıksuların diğer kaynakları arasında orlon üretimi, kağıt üretim tesislerinde kostik havalı temizleyiciler, azot işleme, tekstil fabrikaları, fiberglas üretimi, dökümhaneler ve kullanılmış kauçukların geri kazanıldığı tesisler gösterilebilir ve miktarları da Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Karbonizasyon prosesi sırasında suya önemli miktarda fenol karışmaktadır. Demir çelik fabrikaları, kok ve havagazı üretim tesisleri karbonizasyon prosesi ile işletilmektedir [21].

Çizelge 2.1. Bazı endüstrilerin atıksularında bulunan fenolik bileşen konsantrasyonları [22]

Endüstri	Fenol Konsantrasyonu (mg/l)
Genel petrokimya	50-600
Benzen rafinerileri	210-230
Azot işleme prosesleri	250
Katran damıtma fabrikaları	300
Lastik gerikazanım prosesleri	3-10
Orlon yapımı	100-150
Plastik fabrikaları	600-2000
Fiber-board fabrikaları	150
Karbonizasyon prosesleri	500
Fenolik reçine üretimi	1600
Çorap fabrikaları	6000
Sentetik fenol	12-18
Plastik reçineler	369
Fiber-glas üretimi	40-400

Fenol ve türevlerinin canlılar üzerine etkileri

İçme ve besin endüstrisi sularında fenolün mevcudiyeti suyun tadını bozar. Fenol içeren su klorlandığında zehirli poliklorlu fenoller oluşur. EPA (Environmental Protection Agency) yüzey sularınının 1 ppb'den az fenol içerebileceğini belirtmektedir. Fenol varlığı suda tat ve koku olarak anlaşılabilir (0.01-0.1 mg/l).

Fenol cilt, ağız ve iç toplardamarlar yoluyla insanlar üzerinde olumsuz etkiler yapar. Midede iyileştirilmesi zor yaralar açar. Lokal etkileri; cilt tahrişi, tene beyzalama,

kızarmalar ya da derin yaralardır. Sistematik etkileri; kalp ritmini bozma, metabolik dengesizlikler, nefes darlığı, akut böbrek yetmezliği ve koyu idrardır.

Fenol buharının solunması halinde zehir etkisi yaptığı kabul edilmektedir. Fakat bu yolla ölümün gerçekleştiği görülmemiştir. Fenolün solunmasıyla ortaya çıkan semptomlar; yemek yiyememe, aşırı kilo kaybı, baş ağrısı, salyalanma ve koyu idrardır.

Klor içeren fenollerin zehirleyici etkisi ise izomere bağlı olarak değişim gösterir. Klorlu fenollerin çoğu deride ve gözde oldukça yıpratıcı özelliği sahiptir ve yine zehirleyici miktarları deriden adsorplanabilir.

Fenol uzaklaştırma yöntemleri

En önemli fenol giderme yöntemleri şunlardır;

- Koagülasyon (pıhtılaştırma)
- Adsorpsiyon
- Enzimatik yöntem

Enzimatik yöntem

Endüstriyel atıksulardaki fenollerin gidermede kullanılan başlıca enzimler tirozinaz ve peroksidaz enzimleridir [2]. Peroksidazlar oksidoredüktaz sınıfından enzimleri içeren bir grup olup, hidrojen peroksidi oksitleyici olarak kullanmak suretiyle fenollerin okside edebilirler. Bu oksidasyon sonucunda fenoksi radikaller ortaya çıkar. Söz konusu fenoksi radikaller daha sonra çözelti içerisindeki diğer fenol molekülleriyle veya aromatik bileşiklerle tepkimeye girerek poliaromatik yapıda polimerler oluştururlar. Orijinal fenol moleküllerinden farklı olarak, bu polimerler suda çözünmeyen bileşiklerdir ve bu nedenle sulu ortamlarda çökerler [23]. Fenolik bileşiklerin peroksidazca katalizlenen çökeltileri, bu kirleticilerin giderimini oldukça

kolaylaştırmaktadır. Çünkü, suda çözünebilen fenolik bileşiklerin aksine, çözünür olmayan polimerler basit filtrasyon yöntemleri kullanılarak atıksudan kolayca uzaklaştırılabilirler. Peroksidaz enzimini kullanarak atıksulardaki çeşitli fenoller, aromatik aminleri, hidrokarbonları ve poliklorlu bifenilleri uzaklaştırmak olanaklıdır [24-27]. Ancak ekonomik açıdan bakıldığında, yukarıda söz edilen yöntemin en önemli dezavantajlarından birisi, oksitleyici ajan olarak kullanılan H_2O_2 'nin pahalı olması ve tepkime sırasında yüksek miktarlarda tüketildiğinden bu şekildeki arıtım sürecinin işletim maliyetini arttırmasıdır. Bu nedenle, son yıllarda peroksidaz enzimine alternatif olarak bakterilerde, meyvelerde, sebzelerde, funguslarda ve hayvanlarda oldukça yaygın olarak bulunan tirozinaz enziminin kullanılması fikri ağırlık kazanmıştır. Bu tercihin başlıca nedeni; fenol oksidazların oksitleyici ajan olarak H_2O_2 yerine, moleküler oksijeni (O_2) kullanmalarındır.

Fenol oksidazlar oksidoredüktazlar sınıfında yer alan enzimlerin oluşturduğu bir grup olup, fenolik bileşiklerin oksidasyon tepkimelerini katalizler. Bu enzim grubu, tirozinaz ve lakkaz tipi fenol oksidazlar olmak üzere başlıca iki gruba ayrılır [2]. Her iki enzim grubu da aktivite göstermek için moleküler oksijenin varlığına gereksinim duyar.

Tirozinaz fenollerin uzaklaştırılmasında ardışık iki tepkimeyi katalizler. Bu tepkimeler sırasıyla; (1) monofenollerin moleküler oksijen varlığında orto difenollere hidroksilasyonları, (2) oluşan difenollerin o-kinonlar oluşturmak üzere dehidrojenasyonlar şeklinde gerçekleşir. Ardışık tepkimelerin son ürünü olan kinonlar kendiliğinden basit filtrasyon yöntemleriyle atıksulardan kolayca uzaklaştırılabilecek suda çözünmeyen polimerik yapılara dönüşürler. Böylece en önemli çevre kirleticileri arasında bulunan fenolik bileşikler atıksulardan kolayca uzaklaştırılabilir duruma gelirler [23, 28].

2.4. Yüzey Aktif Maddeler

Tüm yüzey aktif veya yüzey gerilimli moleküller, yüksek molekül ağırlığında polar moleküllerdir. Molekülün bir ucunun sudaki çözünürlüğü, diğer ucunun yağdaki çözünürlüğü fazladır. Sudaki çözünürlük karboksil, sülfat, sülfonat, veya hidroksil gruplarının molekülün bir ucunda bulunmasından kaynaklanır. Yağdaki çözünürlük ise, organik bir grubun bulunmasındandır [29].

Yağda çözünen kısım: Organik grup

Suda çözünen kısım: $\text{COO}^- \text{Na}^+$, $\text{SO}_4^- \text{Na}^+$, $\text{SO}_3^- \text{Na}^+$, OH

2.4.1. Sentetik yüzey aktif maddeler

1945 yılından beri sentetik yüzey aktif maddeler sabunun yerine temizlik amaçları için kullanılmaktadırlar. En büyük avantajları, sert sularla bile, bu sularda bulunan Ca^{+2} , Mg^{+2} iyonları ile çökelen sabunlar gibi çözünmeyen çökelek vermemeleri ve fazla harcanmayı gerektirmeden sonuç verebilmeleridir. Piyasada satılan yüzey aktif maddelerin sadece %20-30'luk kısmı aktif madde (surfactant) ve %70-80'lik kısmı ise çeşitli katkı maddelerinden oluşmaktadır. Katkı maddeleri arasında sodyum sülfat, sodyum tripolifosfat, sodyum pirofosfat, sodyum silikat v.b. gibi maddeler sayılabilir. Sentetik yüzey gerilimli maddeler üç ana gruba ayrılırlar. İyonik (anyonik, katyonik), iyonik olmayan (noniyonik) ve amfoterik [30,31].

İyonik yüzey aktif maddeler

Bu yüzey aktif maddeler anyonik ve katyonik yüzey aktif maddeler olmak üzere iki gruba ayrılır. İyonik deterjanlar, proteinlerin hem hidrofilik hem de hidrofobik ucuyla etkileşirler. Bu nedenle proteinlerin fonksiyonunu inaktif hale getirirler.

Anyonik yüzey aktif maddeler

Anyonik yüzey aktif maddelerin çoğu, sodyum tuzları olup, iyonize olduklarında, Na^+ ve (-) değerlikli, yüzey gerilimli bir iyonla ayrışır. Molekülün büyük ve etkili kısmı sulu çözeltide anyon olarak bulunur. En çok bilinenleri sülfatlar ve sülfonatlardır.

Katyonik yüzey aktif maddeler

Bunlar kuaterner amonyum hidroksit tuzlarıdır. NH_4OH molekülündeki, tüm hidrojen iyonları yerine alkil gruplar geçmiştir. Yüzey aktif özellikler katyonda mevcuttur. Katyonik deterjanlar dezenfektan özellikleri nedeni ile sağlık amaçları için kullanılırlar.

Noniyonik yüzey aktif maddeler

İyonik olmayan yüzey aktif maddeler iyonize olmazlar ve bu nedenle sudaki çözünürlükleri taşıdıkları organik radikaller dolayısıyladır. Bu yüzey aktif maddeler yüklü olanlara göre, tuzlu ortamlara ve çözeltinin pH'ına daha az duyarlı olma özellikleri vardır. Noniyonik deterjanlar, proteinleri çözerler ve onlara bağlanırlar. Proteinlerin hidrofilik uçları deterjana bağlanmaz. Bu nedenle, proteinler fonksiyonlarını kaybetmeden noniyonik deterjana bağlanırlar.

Amfoterik yüzey aktif maddeler

Hem anyonik (eksi uçlu) hem de katyonik (artı uçlu) fonksiyonel gruplar içeren yüzey aktif maddelere amfoterik yüzey aktif maddeler denir.

2.5. Ayırma ve Saflaştırma

Biyokimyasal ayırma ve saflaştırma, çeşitli teknikler kullanılarak yapılmaktadır. Ayırma ve saflaştırma işlemlerinde kullanılan teknikler Bölüm 2.5.1'de verilmiştir.

2.5.1. Ayırma ve saflaştırma teknikleri

Üzerinde çalışılacak molekül grubunu diğer moleküllerden ayırıp saf şekilde elde etmeye yönelik bir seri işlem uygulanır. Bu işlemler, karışımdaki molekül gruplarının genellikle çözünme özelliklerine, yoğunluk, elektriksel yük gibi fiziksel karakteristiklerine veya diğer moleküllere ilgisine göre birbirlerinden ayrılmalarını sağlayan yöntemleri kapsar [32].

Enzim kaynağından enzimin çıkarılması

Bu işlem her kaynak için farklı şekillerde yapılabilir. Mesela bakteri için sonikasyon kullanılırken, bitki için ezme yöntemi kullanılabilir.

Santrifüjleme

Bu teknik, santrifüj adı verilen aletler yardımıyla yüksek hızda döndürülerek merkezkaç kuvveti oluşturulan bir alanda partiküllerin davranışı temeline dayanır. Hücre organellerinin ve büyük partiküllerin uzaklaştırılması için kullanılabilen ve çeşitli aşamalarda başvurulabilecek bir işlemdir.

Çöktürme

Bu yolla ayırma, su veya çözücü içeren bir ortamda istenilen ya da istenmeyen moleküllerin çöktürülerek katı halde ayrılması temeline dayanır. Örneğin; amonyum ve sodyum sülfat proteinleri çöktürmede sıkça kullanılan anorganik tuzlardır. Belirli doygunluk derecesine göre eklenen amonyum sülfat değişik molekül ağırlığındaki enzimlerin çökmesine neden olur. Çöktürme işlemlerinde istenilen aralık bulunduğu zaman diğer proteinlerden kurtulmuş olunur.

İzoelektrik noktaya göre çöktürme

Aranılan enzimin izoelektrik noktasına göre belli bir pH aralığında karıştırılarak çöktürme işlemi yapıldığında yine bir çok proteinden kurtulmuş olunur.

Diyaliz

Bu teknik seyreltik bir sulu çözeltideki moleküllerin ayrılması için kullanılabilir. İstenmeyen küçük maddelerden kurtulmak için yapılan bir işlemdir. Çözelti, makromolekülleri geçirmeyen fakat su vb. küçük moleküllerin geçişine izin veren, yarı geçirgen bir zara (diyaliz tüpüne) konulup uygun bir tampona (veya saf suya) daldırılır. Ultrafiltrasyon temeline göre su diyaliz tüpünün dışına çıkarken içeride ayırımı istenen makromolekülün konsantre bir çözeltisi kalır.

Isıtma

Aranılan enzimin özellikleri göz önünde bulundurarak belirli dereceye kadar ısıtma işlemi yapıldığında ilgilenilmeyen diğer proteinlerden kurtulmuş olunur.

Kromatografi

Kromatografi, karışımı oluşturan moleküllerin biri sabit diğeri hareketli iki faz sistemi arasında hareket ederken farklı derecelerde adsorbsiyon, dağılma veya iyon değişimine uğrayarak ayrılmaları temeline dayanır. Proteinler çoğunlukla kolon kromatografisiyle ayrılır. Bu teknikte bir solüsyon içindeki protein karışımı porlu bir tutucu içeren kolondan geçirilir. Tutucu tiplerine göre, iyon değişimi, jel filtrasyonu ve afinite kromatografileri geliştirilmiştir. Saflaştırma işlemlerinden en çok saflaştırma derecesi veren işlemdir. Molekül büyüklüğü, elektriksel yük gibi değişik özelliklerden yararlanılarak hazırlanan kolonlardan numune geçirildiği zaman yüksek bir saflaştırma yüzdesi elde edilir.

Süzme (Filtrasyon)

Karışım filtre edici bir materyalden geçirilerek, süspansiyonda bulunan partiküllerin sıvı kısımdan ayrılmasıdır. Bu yolla, kullanılan gözeneklerin çapına göre, filtreden geçen kısımda belli büyüklükte partikül bulunabileceği gibi, bunların tamamı da filtrenin üzerinde kalabilir.

Ekstraksiyon

Bir maddenin bir fazdan diğer faza geçirilmesi işlemidir. Bu işlem için iki fazın birbirine karışmaması ve birbiri içinde dağılmaması şarttır. Ekstraksiyon için çoğunlukla organik yapıdaki çözücüler kullanılır. Ekstraksiyonda temel amaç, bir bileşenin fazlardan birinde kantitatif denebilecek ölçüde toplanmasıdır. Bir başka ifade ile bu işlem, maddenin konsantre edilmesi veya girişimlerin giderilmesi için ayrılmasıdır.

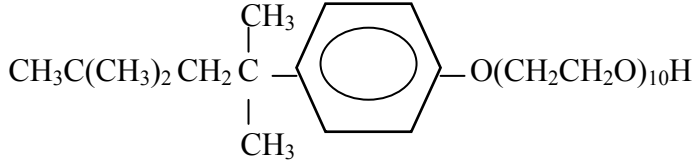
2.5.2. Ayırma ve saflaştırma işleminde kullanılan kimyasallar

Deneysel çalışmada ayırma ve saflaştırma işlemlerinde kullanılan kimyasallar:

Triton X-100

Noniyonik (polar) deterjan olan Triton X-100 (polietilen glikol p-izooktilfenil eter: oktilfenoksi polietoksi etanol: 4-(1,1,3,3-tetrametilbütü)fenil-polietilen glikol) yapısında bulunan polietilen oksitten dolayı hidrofilik bir özellik gösterir. Hidrofobik özelliği ise, alkil benzenden (izooktil fenil) dolaydır. Triton X-100 hem polar hem de nonpolar gruplar içerir. Triton X-100 tuzlu ortamlara ve çözeltinin pH'ına karşı diğer yüzey aktif maddelere göre daha az duyarlıdır. Noniyonik bir deterjan olduğundan, proteinleri denatüre etmez.

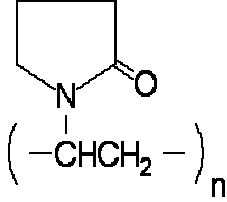
Bu deterjanın kapalı formülü $C_{34}H_{62}O_{11}$ olup, molekül ağırlığı 624,9 g/mol'dür. Açık formülü ise Şekil 2.9'da gösterilmiştir.



Şekil 2.9. Triton X-100 açık formülü

Polivinil pırrolidon (PVP)

Molekül formülü $(\text{C}_6\text{H}_9\text{NO})_n$ olup, ortalama molekül ağırlığı 360,000 g/mol'dür. Molekül yapısı ise Şekil 2.10'da görüldüğü gibidir.



Şekil 2.10. PVP (polivinil pırrolidon) yapısı

Enzimin ekstraksiyonu sırasında enzim kaynağının yapısında bulunan fenolik maddelerin oksidasyonunun ve polimerizasyonunun önlenmesindeki en etkili yol, ortamdaki substratların çözünmeyen bir polimere bağlanarak ortamdaki uzaklaştırılmasıdır. Fenol bağlamada en yaygın kullanılan madde PVP'dir.

Amonyum sülfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Molekül ağırlığı 132,14 g/mol'dür. Enzimlerin saflaştırılmasında en çok kullanılan tekniklerden biri yüksek tuz konsantrasyonlarında çöktürmedir. Çöktürmede en çok kullanılan tuz amonyum sülfattır. Amonyum sülfat proteinleri koruyucu özelliğinin olması ve yüksek tuz konsantrasyonlarının oluşabilecek bakteriyel etkileri engellemesinden dolayı en çok tercih edilen maddedir.

Belirli doygunluk derecesine göre eklenen amonyum sülfat gibi maddeler değişik molekül ağırlığındaki enzimlerin çökmesine neden olmaktadır. Çöktürme işlemleri belirli aralıklarda yapıldığı zaman istenmeyen diğer proteinlerden kurtulmuş olunur.

2.5.3. Saflaştırma işlemiyle ilgili parametrelerin belirlenmesi

Toplam Aktivite

Toplam aktivite, enzimin bir mililitredeki ünite cinsinden aktivitesinin, enzimin hacimsel miktarıyla (mL) çarpılmasıyla belirlenmiştir.

$$\text{Toplam Aktivite} = \text{Ekstrakt hacmi (mL)} \times \text{Aktivite (Ünite/mL)} \quad (2.4)$$

Toplam Protein

Toplam protein enzim çözeltisinin içerdiği toplam protein miktarı olup, 1 ml enzim çözeltisinin içerdiği protein miktarının enzim çözeltisinin hacimsel miktarıyla çarpılmasıyla belirlenmiştir.

$$\text{Toplam Protein} = \text{Ekstrakt hacmi (mL)} \times \text{1 ml ekstraktın içerdiği protein (mg)} \quad (2.5)$$

Spesifik Aktivite

Spesifik aktivite değeri mg protein başına düşen aktiviteyi göstermekte olup, toplam aktivitenin toplam protein miktarına bölünmesiyle belirlenmiştir.

$$\text{Spesifik Aktivite} = \text{Toplam Aktivite} / \text{Toplam Protein} \quad (2.6)$$

Saflık Düzeyi

Saflaştırma işleminin herhangi bir aşamasında ulaşılmış olan saflık düzeyi, belirli bir aşamadaki spesifik aktivitenin ham ekstraktın spesifik aktivitesine bölünmesiyle hesaplanmıştır.

$$\text{Saflık Düzeyi} = \frac{\text{Saflaştırma sonucu ulaşılmış spesifik aktivite}}{\text{Ham ekstraktın spesifik aktivitesi}} \quad (2.7)$$

Aktivite Verimi

Bu değer saflaştırma işleminin farklı basamaklarında meydana gelen aktivite kaybını veya aktivite düzeyini göstermekte olup, herhangi bir aşamadaki toplam aktivitenin ham ekstraktın toplam aktivitesine yüzde oranı olarak gösterilmiştir.

2.6. Deneysel Tasarım

Deneysel tasarım iki ana başlık altında incelenebilir. Bunlar; geleneksel deneysel tasarım ve istatistiksel deneysel tasarımdır.

2.6.1. Geleneksel deneysel tasarım

Geleneksel deneysel tasarımda, deney sonucunu etkileyecek değişik faktörler belirlendikten sonra, seçilen herhangi bir faktörün deney sonucunu nasıl etkilediğini görmek üzere bu faktör, diğer bütün faktörler sabit tutularak değiştirilir ve böylece seçilen faktörün deney sonucunu nasıl etkilediğı görülür. Deneyler bütün faktörler için, her seferinde sadece seçilen faktörün değiştirildiğı ve bunun dışındaki diğer faktörlerin sabit tutulduğı koşullarda tekrarlanır [33, 34].

2.6.2. İstatistiksel deneysel tasarım

İstatistiksel deneysel tasarım yönteminde, bir seferde sadece bir değişkenin değiştirilmesi yerine, daha az deney yapılarak daha fazla bilgi edinebilmek amacıyla, önceden düzenlenmiş deneysel plana göre faktörlerin etkileri çalışılır. İstatistiksel deney tasarım yöntemlerinden en çok kullanılanları, Box-Wilson Tasarımı, Faktöriyel Tasarım ve Kısmi Faktöriyel Tasarım yöntemleridir [33-35].

Box-Wilson deneysel tasarımı, bir prosesin matematiksel modelini oluşturmak üzere geliştirilmiş, prosesi etkileyen faktör sayısının belirlediğı sayıda deney içeren bir deney setidir. Box-Wilson deneysel tasarım metodunda, bağımsız her bir faktör beş ayrı düzeyde tanımlanır. Bu tasarımda üç ayrı tip kombinasyon vardır. Bunlar;

eksenel, faktöriyel ve orta noktalar. Eksenel nokta her bir faktörün uç seviyede ve diğer faktörlerin orta nokta seviyesinde olduğu değerleri içermektedir. Orta nokta ise her bir faktörün averaj seviyesindeki değerde yapılan tek deneydir. Deneysel hataların tahmini için, bu orta noktadaki deney üç veya beş kez tekrarlanır.

Problemlerin analiz ve modellemesinde cevap yüzeyi metodolojisi kullanılır. Örneğin bir proseste x_1 sıcaklığında x_2 basıncında maksimum verim elde etmek istendiği varsayılırsa, ürün sıcaklığın ve basıncın fonksiyonu olarak şöyle ifade edilir:

$$y = f(x_1, x_2) \quad (2.8)$$

Tahmin edilen cevap;

$$E(y) = f(x_1, x_2) = \eta \quad (2.9)$$

ile gösterilirse, cevap yüzeyi olarak adlandırılan yüzey;

$$\eta = f(x_1, x_2) \quad (2.10)$$

ile tanımlanır.

Pek çok cevap yüzeyi metodolojisi problemde cevapla bağımsız değişkenler arasındaki ilişki bilinmez. Bu nedenle, cevap yüzeyi metodolojisindeki ilk adım “y” ile bağımsız değişkenler arasında fonksiyonel bir bağıntı kurmak için uygun bir yaklaşım bulunmasıdır. Eğer cevap bağımsız değişkenlerin lineer bir fonksiyonu olarak modellenebiliyorsa 1. dereceden bir model oluşturulur. 1. derece (doğrusal) model Eş. 2.11'deki gibidir.

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 \quad (2.11)$$

Eğer sistemde kavislenme varsa 2. derece model gibi doğrusal olmayan polinomlar kullanılmalıdır. 2. derece model;

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_4x_1^2 + \beta_5x_2^2 + \beta_6x_3^2 \quad (2.12)$$

olarak veya parametrelerin birbirine olan bağımlılığını içeren model;

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_4x_1^2 + \beta_5x_2^2 + \beta_6x_3^2 + \beta_7x_1x_2 + \beta_8x_1x_3 + \beta_9x_2x_3 \quad (2.13)$$

olarak verilir.

Polinomlardaki (regresyon denklemleri) parametrelerin hesaplanmasında en küçük kareler yöntemi kullanılır. Cevap yüzeyi analizleri hazırlanan yüzeye göre daha sonra yapılır. Eğer hazırlanan yüzey doğru cevap fonksiyonu için uygun bir yaklaşım ise daha sonra hazırlanan yüzeyin analizleri gerçek sistemin analizlerine eşit olabilir. Cevap yüzeyi metodolojisinin temel amacı, sistem için optimum işletim şartlarını belirlemek ya da işletim karakteristiklerini içeren faktör aralığı bölgesini bulmaktır.

Kimya mühendisliği bir proses için maksimum ürün verimini sağlayan işletim şartlarının belirlenmesi ile ilgilenir bu şartları sağlayacak değişkenlerin her biri için öncelikle bir inceleme aralığı belirlenir. Eğer değişkenlerin optimum değeri hakkında hiç bir ön bilgi yoksa 1. derece modeli uygulanarak optimizasyona başlanır [33, 34]. Optimizasyonda parametrelerin gerçek değerleri yerine kodlaştırılmış değerleri kullanılır. Bir i parametresi için kodlaştırılmış değer Eş. 2.14'deki denklemden bulunabilir.

$$x_i = \frac{U_i - U_{i0}}{\Delta U_i} \quad (2.14)$$

Burada x_i , i değişkeninin kodlanmış değeri, U_i , i değişkeninin gerçek değeri, U_{i0} , i değişkeninin taranan alanın orta noktadaki değeri ve ΔU_i ise i parametresinin adım aralığıdır.

Parametrelerin kodlaştırılmış değerleri olan “+1” yüksek seviyeyi, “-1” düşük seviyeyi, “0” ise ortalama seviyeyi gösterir. Kodlaştırılmış değerlerin kullanılmasıyla deney sonuçları boyutsuzlaştırılmış ve hesaplamalar kolaylaştırılmış olur. Kodlaştırılmış değerler kullanılarak oluşturulan ve parametrelerin tanımlandığı plan matrisleri iki faktörlü problemler için Çizelge 2.2 'de gösterilmektedir.

Çizelge 2.2. İki faktörlü plan matrisi

Deney No	x_1	x_2	y
1	+1	+1	y_1
2	-1	+1	y_2
3	+1	-1	y_3
4	-1	-1	y_4
5	$+\alpha$	0	y_5
6	$-\alpha$	0	y_6
7	0	$+\alpha$	y_7
8	0	$-\alpha$	y_8
9	0	0	y_9
10	0	0	y_{10}
11	0	0	y_{11}
12	0	0	y_{12}
13	0	0	y_{13}
14	0	0	y_{14}

Bu temel bilgilerin kullanılması ile herhangi bir sayıda faktör içeren proseslerin tasarımı yapılabilir. Deneysel çalışmalar tamamlandıktan sonra, önerilen modeldeki katsayıları belirlemek için regresyon analizi yapılır. Model geliştirildikten sonra modelin güvenilirliğini ve yeterliliğini belirlemek için F-testi yapılır. Bunu belirlemek için varyans çözümlemesi çizelgesi oluşturulur [34].

Çizelge 2.3. Varyans çözümlemesi

Değişim Kaynakları DK	Serbestlik Derecesi SD	Kareler Toplamı KT	Kareler Ortalaması KO	Test
Toplam	n-1	YOAKT		$F_H = \frac{RKO}{RAKO}$
Regresyon	m	$RKT = b_1 X Y O A \check{T}$	$RKO = RKT/m$	
Regresyondan ayrılış	n-m-1	$RAKT = YOAKT - RKT$	$RAKO = \frac{RAKT}{n-m-1}$	

YOAKT : Y ortamlardan ayrılış kareler toplamı

RKT : Regresyon kareler toplamı

RAKT : Regresyondan ayrılış kareler toplamı

RKO : Regresyon kareler ortalaması

RAKO : Regresyondan ayrılış kareler ortalaması

n : Denei sayısı

m : Bağımsız değişken sayısı

Kullanılan diğer bir istatistiksel deney tasarımı olan faktöriyel tasarım metodu sistem değişkenlerinin ölçümlerinin yapılmasında kullanışlıdır. Bu tasarım herhangi bir sayıdaki faktör ve seviyelere uygulanabilir. Kısmi faktöriyel tasarım metodları, 2 düzlemli n sayıda faktör içeren 2^n tasarımları için uygundur [34].

3. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

Atlow ve ark. (1984) fenolik bileşikler içeren atıksuların arıtımında tirozinazın kullanılmasına yönelik çalışmalar yapmışlardır. Bu araştırmacılar yaptıkları çalışmada, tirozinaz enzimi kullanarak 0.01-1.0 g/l konsantrasyonlarındaki fenollerini çözeltilerden başarılı bir şekilde uzaklaştırmışlardır. Tirozinazın fenolün yanı sıra yan grup taşıyan sudaki çeşitli fenollerini de (kseroller, klorlu fenoller, naftol, vb.) uzaklaştırdığını bildirmişlerdir [23].

Wada ve ark. (1993) fenollerin gideriminde tirozinaz kullanımına yönelik yaptıkları çalışmada, fenol çözeltilisinin tirozinaz ile muamelesi sonucunda renksiz olan çözeltili renginin koyu kahverengiye dönüştüğünü bildirmişlerdir. Tirozinazın çeşitli yan gruplar taşıyan fenollerini uzaklaştırma kapasitesinin fenolik bileşiğin taşıdığı yan gruba ve bunun pozisyonuna bağlı olduğunu ve p-fenollerin o-fenol ve m-fenollere göre daha yüksek oranda giderildiğini belirtmişlerdir [36].

Zhang ve ark. (1997) Portebella mantarlarından elde edilen tirozinaz, lakkaz ve peroksidazın aktivitelerini incelemişlerdir. Tirozinazın mantar içindeki miktarının lakkaz ve peroksidaza göre daha fazla bulunduğunu tespit etmişlerdir. Tirozinaz için, en iyi substratın katekol olduğunu tespit etmişlerdir. Tirozinazın aktivitesini; 23 °C'de 410 nm'de 0,1 M fosfat tamponu (pH= 7'de) içinde 15 mM katekol substratı kullanarak belirlemişlerdir. Tirozinaz için katekol substratı kullanıldığında optimum pH'ın 7 olduğunu ve en düşük tirozinaz aktivitesinin pH=3,5'da görüldüğünü söylemişlerdir [37].

Bir başka çalışmada, Ikehata ve ark. (2000) atık sulardan fenolün uzaklaştırılmasında tirozinaz enzimi kullanarak, fenol arıtma verimi üzerine enzim miktarının, zamanın ve sıcaklığın etkisini araştırmışlardır. Fenol dönüşümlerinin, başlangıç fenol konsantrasyonlarının (0,5-10 mM, 47-940 mg/l) olduğu aralıklarda başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini söylemişlerdir. Tirozinazın aktivitesini; 25 °C'de 280 nm'de, pH=6,5'da sodyum fosfat tamponu ve L-tirosin substratı kullanarak

belirlemişlerdir. Fenol deneyleri, 0.05 M sodyum fosfat tamponunda pH=7'de 25°C'de gerçekleştirilmiştir. 3 saat deney süresi sonrasında sulu çözeltide kalan fenol konsantrasyonlarını spektrofotometrik olarak ölçmüşlerdir. Başlangıç fenol konsantrasyonu 0.5 mM olan bir fenol çözeltisi için, 6 ünite/ml'lik enzim kullanıldığında 3 saatlik deney süresi sonunda % 100 fenol dönüşümü elde etmişlerdir. Aynı zamanda yine başlangıç fenol konsantrasyonu 0,5 mM olan fenol ve 4-klorofenol çözeltilerini, pH=7'de 3 saatlik bir zamanda 8 ve 48 ünite/ml tirozinaz enzimini kullanarak tamamiyle sulardan arındırmışlardır [1].

Bir başka çalışmada; Valero ve ark. (1988) tirozinaz enzimini üzümlerden ekstrakte etmişlerdir. Enzimin aktivitesinin ölçümü için p-kresol substratı ve pH = 7'de sodyum fosfat tamponu kullanmışlardır. Ölçümler 25 °C sıcaklıkta ve 400 nm'de yapılmıştır. Tirozinaz enzimini; Triton X-100, PVP ve kalsiyum klorür, sodyum askorbat ve amonyum sülfat kullanarak saflaştırmışlardır. Böylece üzümde 67 kat saflaştırma yaparak % 30 verimle tirozinaz enzimini elde etmişlerdir [38].

Rapeanu ve ark. (2004) polifenol oksidazı (PPO) üzümlerden izole etmişlerdir. PPO'nun aktivitesinin hesaplanmasında, substrat olarak katekol, 4-metil katekol gibi maddeler kullanılmıştır. Aktivite için optimum pH ve sıcaklığın pH = 5 ve T= 25°C'de olduğunu görmüşlerdir. Direk olarak üzümde ya da üzüm suyundan diyaliz sonucu tirozinaz enzimi ekstrakte edilmiştir. Üzümden ekstrakte edilen tirozinaz enziminin aktivitesini; EDTA, L-askorbik asit, benzoik asit, sitrik asit gibi maddelerin yavaşlattığını söylemişlerdir. Tirozinaz enzimini; Triton X-100, PVP ve amonyum sülfat kullanarak saflaştırmışlardır. Böylece üzümde 135 kat saflaştırma yaparak % 8 verimle tirozinaz enzimini elde etmişlerdir [39].

Delicado ve ark. (1996) mantardaki tirozinaz enzimini TX-114 ve amonyum sülfat ile saflaştırmışlardır. Burada mantar ekstraktından saflaştırma 5,5 kat oranında, %84'lük geri dönüşümle sağlanmıştır. Ayrıca saflaştırılma sırasında kullanılan TX-114 ve amonyum sülfat kombinasyonunun saflaştırma esnasında oluşacak enzimatik kararmayı önlediğini söylemişlerdir [40].

4. MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada, üzümde tirozinaz enziminin ekstraksiyonu ve saflaştırılması yapılmıştır. Sulardaki fenollerin giderimi için enzimatik metod kullanılmıştır. İlk aşama olarak, üzümde tirozinaz enziminin ekstrakte edilmesi ve saflaştırılması yapılmıştır. İkinci aşamada ise, her bir başlangıç fenol konsantrasyonu için gerekli enzim miktarları tespit edilmiş, fenol uzaklaştırmada maksimum verimin elde edildiği sıcaklık ve zaman koşulları belirlenmiştir. Aynı zamanda, piyasadan alınan saf tirozinaz enzimi ve üzümde ekstrakte edilen ve saflaştırılan tirozinaz enzimi kullanılarak yapılan fenol gideriminde elde edilen fenol uzaklaştırma verimleri karşılaştırılmıştır.

4.1. Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

Deneysel çalışmalarda kullanılan çeşitli kimyasallar ve cihazlar Bölüm 4.1.1 ve 4.1.2 verilmiştir.

4.1.1. Kullanılan kimyasallar

Deneysel çalışmalarda,

- Tirozinaz enzimi (Sigma T3824, 50,000 ünite, ≥ 2000 ünite/mg katı),
- Protein tayini için Bradford belirteci (Bioquant Protein) (Sigma ve Merck) ve albumin fraction V (from Bovine Serum) (Merck),
- Ekstraksiyon ve saflaştırma aşamaları için, Triton X-100 (Merck), amonyum sülfat (Sigma) ve polivinil pirrolidon (PVP360) (Sigma),
- Enzim substratı olarak katekol (Pyrocatechol ($C_6H_6O_2$)) (Merck),
- Fenol (Riedel De Hagen),
- Tampon hazırlamada, Merck marka disodyum hidrojen fosfat dodekahidrat ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) ve sodyum fosfat (Na_2HPO_4) kullanılmıştır.

4.1.2. Kullanılan cihazlar

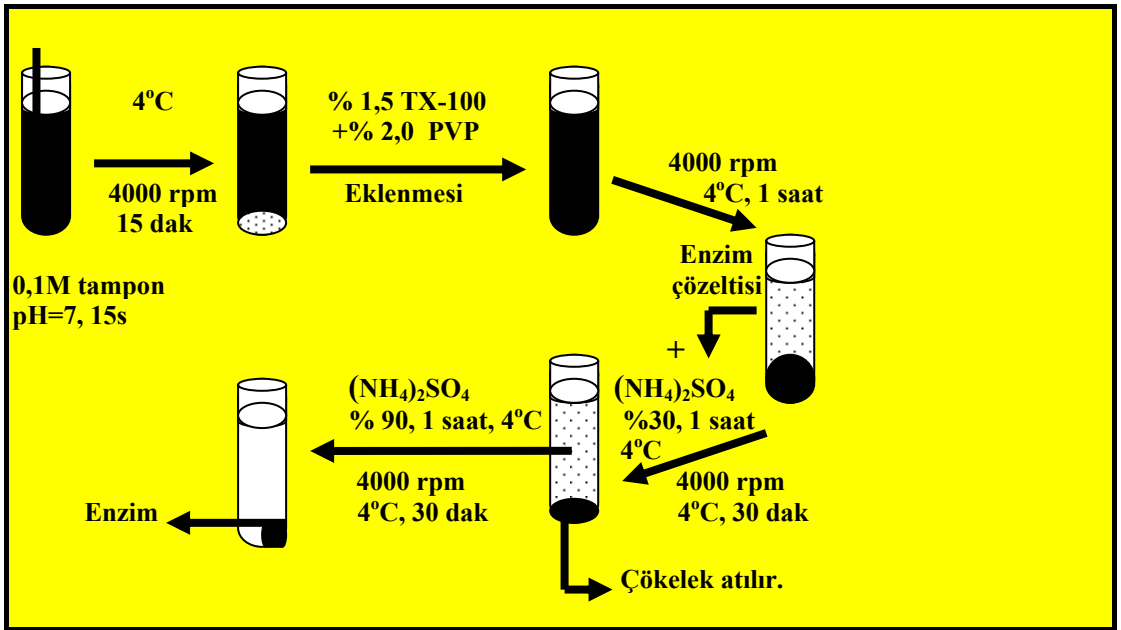
- Gerekli tartımların yapılması amacıyla Sciencetech SA80 marka terazi ($80 \pm 0,0001$),
- Çalışma sıcaklığının 15, 25 ve 35 °C'de sabit tutulması amacıyla Memmert marka su banyosu,
- Çözeltilerin pH'larının ayarlanmasında, Cole Parmer Benchtop pH/mV/°C metre ve elektrot,
- Deneyden alınan numunelerdeki fenol konsantrasyonlarının ölçümlerinin gerçekleştirilmesi amacıyla Hach DR/4000U marka (UV/VIS) spektrofotometre,
- Tirosinaz enziminin üzümde ekstraksiyonu sırasındaki çeşitli basamaklarda Nüve NF 800 R marka soğutmalı santrifüj,
- Tirosinaz enziminin üzümde ekstraksiyonu sırasındaki amonyum sülfatla çöktürme aşamasında Heidolph RZR 2020 marka karıştırıcı,
- Tirosinaz enziminin üzümde ekstraksiyonunda, elde edilen ekstraktın aktivite, protein miktarı ölçümleri yapılmaya kadar, ekstraktın içinde tutulduğu buzların üretildiği Focchetti BF80A marka buz makinası,
- Tirosinaz enziminin üzümde ekstraksiyonu sırasındaki amonyum sülfatla çöktürme aşamasının yapıldığı reaktörün 4 °C'de sabit tutulması için Grant CR 150-26 marka soğuk su banyosu,
- Tirosinaz enziminin üzümde ekstraksiyonu sırasındaki amonyum sülfatla çöktürme aşamasının içinde yapıldığı ceketli, karıştırıcılı, krom kelepçeli cam reaksiyon kabı kullanılmıştır.

4.2. Deneysel Yöntem

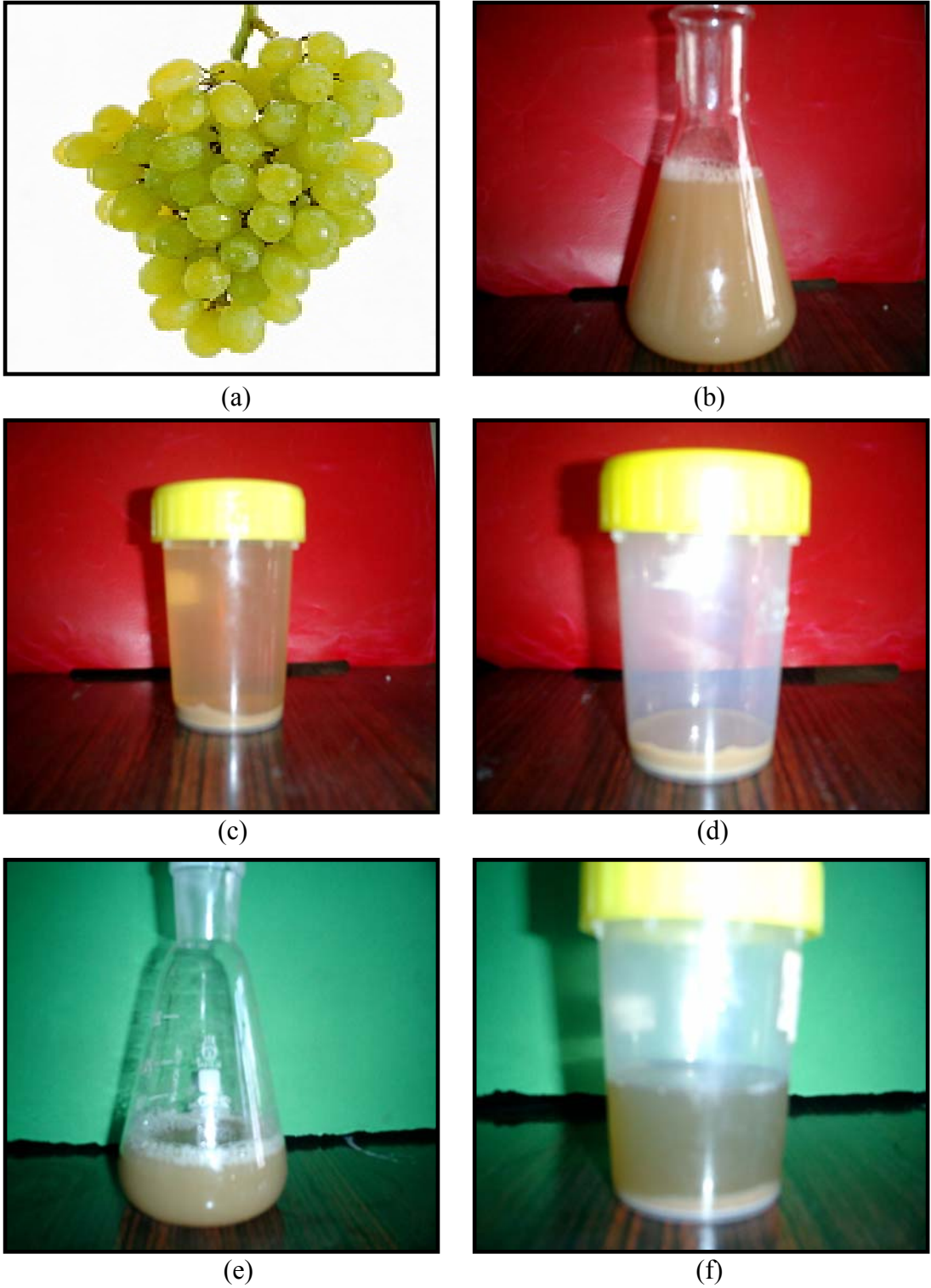
Deneysel çalışmada kullanılan yöntemler;

4.2.1. Üzümünden tirozinaz enziminin ekstraksiyonu ve saflaştırılması

250 g üzüm 125 ml sodyum fosfat tamponu içinde (0,1 M, pH = 7) 15 saniye blender ile karıştırılmış ve tülbenten süzölmüştür. Elde edilen ham enzim ekstraktının bozunmasını engellemek amacıyla sıcaklık 4 °C'de sabit tutularak 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Çökeltili 1 saat 4 °C'de 4000 rpm'de % 1,5 (h/h) TX-100 ve % 2,0 (a/h) PVP (polivinil pirrolidon) ile 100 ml sodyum fosfat tamponu içinde ekstrakte edilmiştir. Üstteki kısım, proteinleri koruyucu özelliğinin olması ve oluşabilecek bakteriyel etkileri engellemesinden dolayı % 30 doygunlukta amonyum sülfatla çöktürölmüştür. Çöktürme işlemi, reaksiyon kabı içerisinde 1 saat 4 °C'de 100 rpm'de karıştırılarak yapılmıştır. 1 saatin sonunda çözünmeyi engellemek amacıyla sıcaklık 4 °C'de sabit tutularak 30 dakika santrifüjlenmiştir. Üstteki kısma % 90 doygunlukta amonyum sülfat tekrar eklenmiştir. 1 saat 4 °C'de 100 rpm'de reaksiyon kabı içerisinde karıştırılarak tekrar çöktürme yapılmıştır. 1 saatin sonunda yine 4 °C'de 30 dakika santrifüjlenmiştir. Elde edilen çökelek toplanmıştır ve 25 ml 0,1 M pH = 7 olan sodyum fosfat tamponu içinde yeniden çözöndürölmüştür. Böylece istenilen enzim elde edilmiş ve maliyeti belirlenmiştir. (Bkz. EK-5). Saflaştırma basamakları Şekil 4.1 ve Resim 4.1'de verilmektedir.



Şekil 4.1. Enzim ekstraksiyon ve saflaştırma basamakları [39-41]



Resim 4.1. Enzim ekstraksiyon ve saflaştırma basamakları a) Yeşil üzüm b) Ham enzim ekstraktı c) Ham enzim ekstraktının santrifüjlenmesi d) Elde edilen çökelek e) TX-100-PVP'li çözelti f) PVP ve Triton X-100 ekstraktı g) Amonyum sülfat eklenmeden önceki çözelti h) Amonyum sülfat eklenmesi i) Amonyum sülfat sonrası santrifüjleme j) Elde edilen enzim



(g)



(h)



(i)



(j)

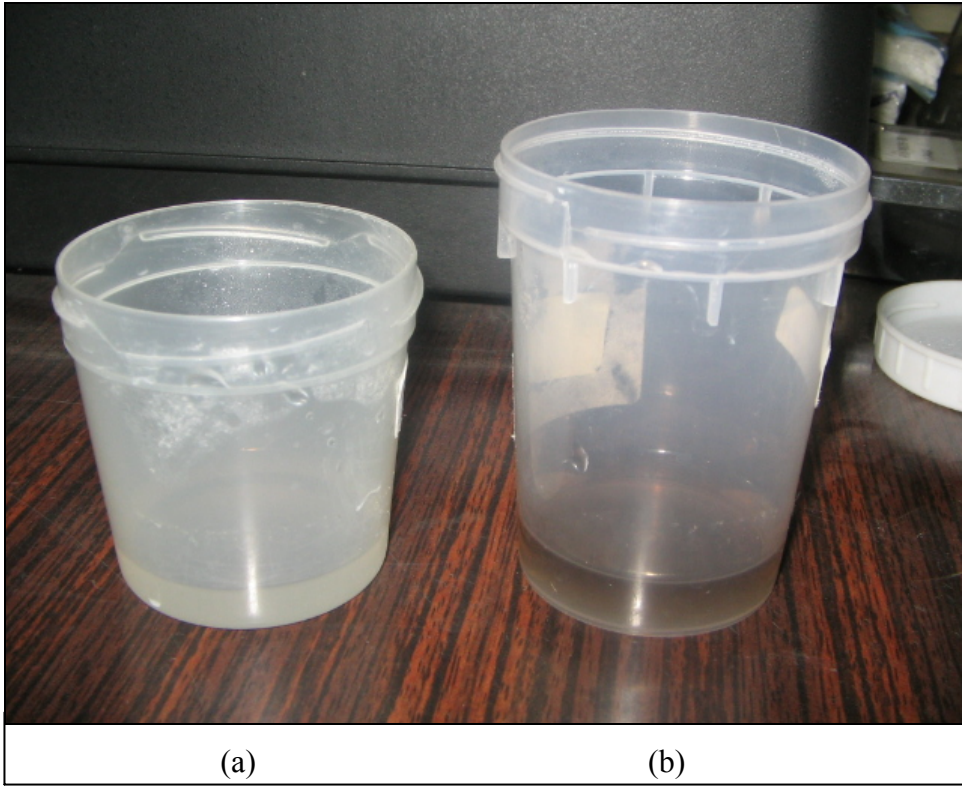
Resim 4.1. (Devam) Enzim ekstraksiyon ve saflaştırma basamakları a) Yeşil üzüm b) Ham enzim ekstraktı c) Ham enzim ekstraktının santrifüjlenmesi d) Elde edilen çökelek e) TX-100 – PVP’li çözelti f) TX-100 – PVP ekstraktı g) Amonyum sülfat eklenmeden önceki çözelti h) Amonyum sülfat eklenmesi i) Amonyum sülfat sonrası santrifüjleme j) Elde edilen enzim

Geleneksel deneysel tasarım yöntemi kullanılarak sabit % 2 PVP konsantrasyonunda, TX-100 konsantrasyonu % 0, % 1,5 ve % 6 olacak şekilde değiştirilip üzümünden tirozinaz enziminin ekstraksiyonu ve saflaştırılması yapılmıştır. Ayrıca üzümünden ekstraksiyon ve saflaştırma yapılarak tirozinaz enziminin eldesi için Bölüm 5.2’de bahsedilen istatistiksel deneysel tasarım yöntemi de kullanılmıştır ve Çizelge 5.3’de

gösterilen Triton X-100 ve PVP kombinasyonları kullanılarak üzümünden tirozinaz enziminin ekstraksiyonu ve saflaştırılması yapılmıştır.

4.2.2. Piyasadan alınan saf tirozinaz enzimi ile yapılan fenol giderimi deneyleri

Fenol giderimi için ilk olarak tirozinaz enziminin 25 °C sıcaklıkta pH=7'deki sodyum fosfat tamponunda katekol substratı kullanılarak aktivitesi ölçülmüştür (Bkz. EK-2). Daha sonra 25 °C sıcaklıkta pH=7'deki sodyum fosfat tamponu içinde başlangıç fenol konsantrasyonları 50, 150, 250, 350, 500, 750 ve 1000 ppm olan fenol çözeltileri için, farklı miktarlarda saf tirozinaz enzimi kullanılarak fenol giderimi yapılmış ve her bir başlangıç fenol konsantrasyonu için gerekli enzim miktarları tespit edilmiştir. 3 saatlik reaksiyon süresi sonunda fenolün tirozinaz ile muamelesi sonucu oluşan renk değişimi Resim 4.2'de gösterilmiştir.



Resim 4.2. Enzimatik yolla fenol giderimi a) Kör örneği b) Tirozinaz ile muamele edilmiş fenol örneği (3 saat sonra)

25 °C sıcaklıkta ve pH = 7'de saf tirozinaz enzimi kullanılarak, enzimatik yolla sulu çözeltilerden fenol uzaklaştırmada yeterli reaksiyon süresinin belirlenmesinde, başlangıç konsantrasyonları 50, 250 ve 500 ppm olan fenol çözeltilerinden 30 dakika sonra ve 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7 saat sonra numuneler alınmıştır. UV/VIS spektrofotometre cihazında çözeltilerdeki fenol konsantrasyonları ölçülmüştür. Zamanın son fenol konsantrasyonu üzerine etkileri incelenmiştir.

Mevsimsel hava değişiklikleri atıksu arıtma tesislerinin performansını etkilemektedir. Bu nedenle 3 saatlik reaksiyon süresinde ve pH = 7'de saf tirozinaz enzimi kullanılarak, sıcaklığın fenol uzaklaştırma verimi üzerine etkilerini incelemek amacıyla deneyler 15 °C, 25 °C ve 35 °C sıcaklıklarında yapılmıştır.

4.2.3. Üzümden elde edilen tirozinaz enzimi ile yapılan fenol giderimi deneyleri

Üzümden % 3 (a/h) PVP ve % 4,5 (h/h) Triton X-100 kullanılarak elde edilen tirozinaz enzimi ile, 25 °C sıcaklıkta pH = 7'deki sodyum fosfat tamponu içinde başlangıç konsantrasyonu 50, 150, 250, 350 ve 500 ppm olan fenol çözeltileri için, saf enziminkiyle aynı enzim aktivitesini veren miktarlar kullanılarak fenol giderimi yapılmıştır. Daha sonra da her bir başlangıç konsantrasyonu için enzim miktarları % 50 artırılarak deneyler tekrarlanmıştır.

25 °C sıcaklıkta ve pH = 7'de, üzümden elde edilen tirozinaz enzimi kullanılarak enzimatik yolla sulu çözeltilerden fenol uzaklaştırmada yeterli reaksiyon süresi belirlenmiştir. Başlangıç konsantrasyonları 50, 250 ve 500 ppm olan fenol çözeltilerinden 30 dakika sonra ve 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7 saat sonra numuneler alınmıştır. Zamanın son fenol konsantrasyonu üzerine etkileri incelenmiştir.

5. BULGULAR VE TARTIŞMA

Endüstri kuruluşlarının, toksik olan atıksularının çevreye olan deşarjı gerek yurt dışı gerekse yurt içindeki kanunlara göre yasa dışıdır. Bu kuruluşlar deşarj akımlarını belirli limitlerin altına indirmek zorundadırlar. Fenol de bu toksik maddeler arasında yer almaktadır ve Su Kirliliği Kontrol Yönetmeliği'ne göre belediye atıksu arıtım tesislerine gönderilen maksimum deşarj konsantrasyonu 10 ppm olarak belirlenmiştir. Kuruluşlar çıkış akımlarını bu değerın altına indirmek zorundadır.

Fenol uzaklaştırma yöntemlerinden en çok kullanılanları, enzimatik dönüşüm, koagülasyon ve adsorpsiyon metodlarıdır. Bu metodlar kullanılarak fenol gibi kirletici maddeler sulardan uzaklaştırılır. Enzimatik yolla sulardan fenollerin uzaklaştırılmasında en çok kullanılan enzim tirozinaz enzimidir [1,37].

Bu çalışmanın amacı, üzümde tirozinaz enziminin ekstraksiyonunu ve saflaştırmasını yapmak, aynı zamanda piyasadan alınan saf tirozinaz enzimi ve üzümde ekstrakte edilen ve saflaştırılan tirozinaz enzimi ile sulu ortamlardan fenollerin uzaklaştırılmasında enzimatik yöntemin etkilerini incelemektir.

Üzümde tirozinaz enziminin ekstraksiyonu ve saflaştırılmasında elde edilen enzimin spesifik aktivite değerine, Triton X-100 ve PVP miktarının etkileri araştırılmış ve bu çalışmalarda geleneksel yöntemle birlikte, istatistiksel deneysel tasarım yöntemi de kullanılmıştır.

Enzimatik yolla fenol uzaklaştırma verimi üzerine ise, başlangıç fenol konsantrasyonu için gerekli enzim miktarı, bekleme süresi ve sıcaklığın etkileri incelenmiştir.

5.1. Üzümden Tirozinaz Enziminin Ekstraksiyonu ve Saflaştırılması

Basamaklarında Triton X-100 Miktarının Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Üzümden tirozinaz enziminin ekstraksiyonu ve saflaştırılması basamakları 3 aşamadan oluşturmaktadır. Bunlar sırasıyla; ham enzim ekstraktının eldesi, Triton X-100 ve PVP (polivinil pirrolidon) kombinasyonu ile saflaştırma ve son aşama olan amonyum sülfat çöktürmesidir. 2.basamakta PVP miktarı % 2 (a/h) oranında sabit kalmak koşuluyla Triton X-100 miktarı değiştirilerek deneyler yapılmış ve her bir basamakta elde edilen aktivite sonuçları Çizelge 5.1’de gösterilmiştir. Çizelge 5.1’den anlaşılacağı üzere en yüksek spesifik aktivite ve verim % 6 (h/h) Triton X-100 kullanıldığında elde edilmiştir. Böylece % 70 verimle 16,2 kat saflaştırma yapılarak tirozinaz enzimi elde edilmiştir.

Ayrıca Şekil 5.1’de Triton X-100 miktarının spesifik aktivite üzerine etkisi gösterilmiştir. Buradan da görüldüğü üzere, Triton X-100 miktarının artması ile spesifik aktivite değerinde artış gözlenmiştir. Literatürde, kullanılan Triton X-100 miktarı % 1,5 (h/h) olarak verilmiştir [38,39]. Yaptığımız çalışmada, Triton X-100 miktarı % 1,5 (h/h)’dan % 6 (h/h)’ya çıktığında spesifik aktivite değerinde yaklaşık % 21 değerinde bir artış görülmüştür. Bu artış ve Triton X-100’ün fiyatı da gözönüne alınarak kullanılacak miktar belirlenmelidir. Elde edilen artışın çok da fazla olmadığı düşünülürse tirozinaz enzimini % 1,5 (h/h) Triton X-100 kullanarak üzümünden ekstrakte etmek ve saflaştırmak doğru olacaktır. Ancak göz önünde bulundurulması gereken bir nokta da olanaklar elverdiği ölçüde yüksek saflıktaki enzimle çalışmak birçok olumsuz faktörün aşılmasında baş koşuldur.

Çizelge 5.1. Üzümde tirosinaz enziminin ekstraksiyonu ve saflaştırılmasında, Triton X-100 miktarının enzim aktivitesi üzerine etkisi (pH = 7, T = 4 °C)

Ekstraksiyon ve Saflaştırma Adımları	Hacim (ml)	Aktivite (U/ml)	Toplam Aktivite (U)	Protein ¹ (mg/ml)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite ² (U/mg protein)	Verim ³ (%)	Saflaştırma ⁴ (n-kat)	m _{enzim} ⁵ (mg)
1)Ham Enzim Ekstraktı	244	720	175680	1,330	324,52	541,35	100	1,00	12,98
% 2 PVP ve % 0 TritonX-100 Ekstraktı	85	1200	102000	1,110	94,35	1081,08	58,1	2,00	7,54
% 30-90 Amonyum Sülfat	25	2280	57000	0,890	22,25	2561,80	32,4	4,73	4,21
2)Ham Enzim Ekstraktı	244	720	175680	1,330	324,52	541,35	100	1,00	12,98
% 2 PVP ve % 1,5 TritonX-100 Ekstraktı	85	1700	144500	0,890	75,65	1910,11	82,3	3,53	10,68
% 30-90 Amonyum Sülfat	25	4560	114000	0,670	16,75	6805,97	64,9	12,58	8,42
3)Ham Enzim Ekstraktı	244	720	175680	1,330	324,52	541,35	100	1,00	12,98
% 2 PVP ve % 6 TritonX-100 Ekstraktı	85	1800	153000	0,780	66,30	2307,69	87	4,26	11,31
% 30-90 Amonyum Sülfat	25	4920	123000	0,560	14,00	8785,71	70	16,22	9,10

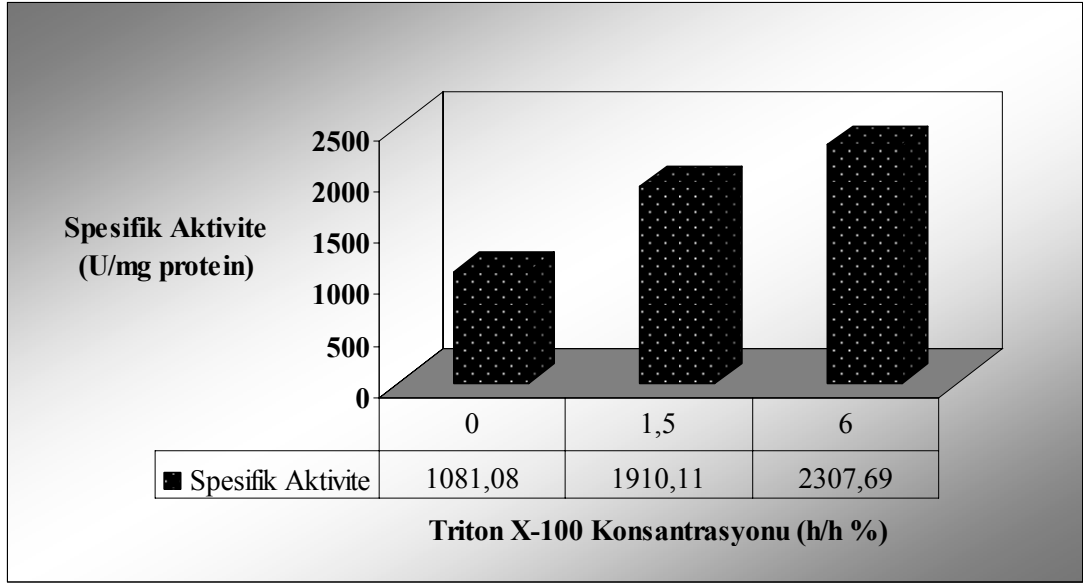
¹Bradford yöntemi kullanılarak Ek 3'de çizilen grafik yardımıyla hesaplanmıştır.

²Spesifik Aktivite=Toplam aktivite/Toplam protein

³Verim=(Herhangi bir aşamadaki toplam aktivite/Ham ekstraktın toplam aktivitesi)x100

⁴Saflaştırma(n-kat)=Saflaştırma sonucu ulaşılmış spesifik aktivite/Ham ekstraktın spesifik aktivitesi

⁵m_{enzim}=Toplam aktivite/Saf enzimin SA=13,533 U/mg enzim
(250 gram üzümde elde edilen tirosinaz enzimi kütlesi)



Şekil 5.1. Triton X-100 miktarının spesifik aktivite üzerine etkisi
(pH = 7, T = 4 °C, PVP (% 2 , a/h))

5.2. İstatiksel Yaklaşım ile Triton X-100 ve PVP Maddelerinin Saflaştırma Verimi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Üzümünden tirozinaz enziminin ekstraksiyonu ve saflaştırılmasında kullanılan maddelerin saflaştırma verimi üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla Box-Wilson istatistiksel deneysel tasarım yöntemi ile de çalışılmıştır. Çalışmalarımızda, Triton X-100 konsantrasyonu (U_1 , h/h) ve PVP konsantrasyonu (U_2 , a/h), bağımsız değişkenler, spesifik aktivite değeri (SA, U/mg protein) ise bağımlı değişken olarak tanımlanmıştır. Çizelge 5.2’de deneysel plandaki bağımsız değişkenlerin gerçek ve kodlu değerleri verilmektedir.

Çizelge 5.2. Deneysel planda bağımsız değişkenler
(U_1 =Triton X-100 konsantrasyonu (h/h), U_2 =PVP konsantrasyonu (a/h))

Kodlanmış Değerler	-1,414	-1	0	+1	+1,414
Gerçek Değerler					
U_1 (h/h)	0,88	1,5	3	4,5	5,12
U_2 (a/h)	0,59	1	2	3	3,41

Triton X-100 konsantrasyonu için alt değer 0,88, üst değer 5,12 seçilmiş, orta değer ise bu iki değer aritmetik ortalaması alınarak 3 olarak bulunmuştur. PVP konsantrasyonu içinde aynı şekilde alt değer 0,59, üst değer de 3,41 olarak seçilmiş, orta değer de 2 olarak bulunmuştur. Triton X-100 konsantrasyonu (U_1) için adım aralığı 1,5, PVP konsantrasyonu (U_2) için adım aralığı 1'dir.

Plan matrisinin uç noktalarında yer alan α değeri, değişken sayısının karekökü alınarak $\sqrt{2} = 1,414$ olarak belirlenmiştir. Her bir bağımsız değişken için, uç noktaların hesaplanmasında Eş. 5.1 ve Eş. 5.2'de verilen kodlanmış değer eşitlikleri kullanılmıştır. Buna göre, U_1 parametresi için uç noktalar, 0,88 ve 5,12 olarak, U_2 parametresi için uç noktalar, 0,59 ve 3,41 olarak hesaplanmıştır.

$$x_1 = \frac{U_1 - 3}{1,5} \quad (5.1)$$

$$x_2 = \frac{U_2 - 2}{1} \quad (5.2)$$

Çizelge 5.3'de, deneysel planda bağımsız değişkenler ile yapılan deneylerde, kullanılan Triton X-100 ve PVP konsantrasyonu miktarları gösterilmiştir.

Çizelge 5.3. Deneysel planda bağımsız değişkenler ile yapılan deneyler
(pH = 7, T = 4 °C)

Deney No	x ₁	x ₂	Deneysel parametreler	
			U ₁ (Triton X-100 konsantrasyonu (h/h))	U ₂ (PVP konsantrasyonu(a/h))
1	+1	+1	4,50	3,00
2	-1	+1	1,50	3,00
3	+1	-1	4,50	1,00
4	-1	-1	1,50	1,00
5	+α	0	5,12	2,00
6	-α	0	0,88	2,00
7	0	+α	3,00	3,41
8	0	-α	3,00	0,59
9	0	0	3,00	2,00
10	0	0	3,00	2,00
11	0	0	3,00	2,00
12	0	0	3,00	2,00
13	0	0	3,00	2,00
14	0	0	3,00	2,00

İki değişkenli bir Box-Wilson deney düzenleme planına göre çalışma, Bölüm 2.6, Çizelge 2.2’de görüldüğü gibi, yıldız noktasındaki ($\alpha = 1,414$) dört deney ve merkez noktasındaki dört deney ile birlikte toplam 14 deneyden oluşmaktadır. Çizelge 5.3’de gösterilen, deney no 9 ile 14 arası yapılan deneyler, güvenilirliği arttırmak için yapılan tekrar deneyleridir.

Deneysel planda belirtilen koşullarda yapılan deneyler sonucunda elde edilen spesifik aktivite (SA, U/mg protein) değerleri Çizelge 5.4’de verilmiştir.

Çizelge 5.4. Üzümde tirosinaz enziminin ekstraksiyonu ve saflaştırılmasında, istatistiksel yöntemle belirlenen şartların kullanılması ile bulunan deney sonuçları (pH = 7, T = 4 °C)

Ekstraksiyon ve Saflaştırma Adımları	Hacim (ml)	Aktivite (U/ml)	Toplam Aktivite (U)	Protein ¹ (mg/ml)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite ² (U/mg protein)	Verim ³ (%)	Saflaştırma ⁴ (n-kat)	m _{enzim} ⁵ (mg)
1)Ham Enzim Ekstraktı	248	762	188976	1,512	374,98	503,96	100	1,00	13,96
% 3 PVP ve % 4,5 TritonX-100 Ekstraktı	87	1992	173304	0,693	60,29	2874,51	91,71	5,70	12,81
% 30-90 Amonyum Sülfat	25	5790	144750	0,651	16,28	8891,28	76,60	17,64	10,70
2)Ham Enzim Ekstraktı	248	762	188976	1,512	374,98	503,96	100	1,00	13,96
% 3 PVP ve % 1,5 TritonX-100 Ekstraktı	87	1800	156600	0,810	70,47	2222,22	82,87	4,40	11,57
% 30-90 Amonyum Sülfat	25	5085	127125	0,771	19,28	6593,62	67,27	13,08	9,39
3)Ham Enzim Ekstraktı	248	762	188976	1,512	374,98	503,96	100	1,00	13,96
% 1 PVP ve % 4,5 TritonX-100 Ekstraktı	87	1824	158688	0,789	68,64	2311,89	83,95	4,59	11,73
% 30-90 Amonyum Sülfat	25	5115	127875	0,741	18,53	6900,97	67,67	13,69	9,45

¹Bradford yöntemi kullanılarak Ek 3'de çizilen grafik yardımıyla hesaplanmıştır.

²Spesifik Aktivite=Toplam aktivite/Toplam protein

³Verim=(Herhangi bir aşamadaki toplam aktivite/Ham ekstraktın toplam aktivitesi)x100

⁴Saflaştırma(n-kat)=Saflaştırma sonucu ulaşılmış spesifik aktivite/Ham ekstraktın spesifik aktivitesi

⁵m_{enzim}=Toplam aktivite/Saf enzimin SA=13,533 U/mg enzim
(250 gram üzümde elde edilen tirosinaz enzimi kütlesi)

Çizelge 5.4. (Devam) Üzümde tirozinaz enziminin ekstraksiyonu ve saflaştırılmasında istatistiksel yöntemle belirlenen şartların kullanılması ile bulunan deney sonuçları (pH = 7, T = 4 °C)

Ekstraksiyon ve Saflaştırma Adımları	Hacim (ml)	Aktivite (U/ml)	Toplam Aktivite (U)	Protein ¹ (mg/ml)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite ² (U/mg protein)	Verim ³ (%)	Saflaştırma ⁴ (n-kat)	m _{enzim} ⁵ (mg)
4)Ham Enzim Ekstraktı	248	762	188976	1,512	374,98	503,96	100	1,00	13,96
% 1 PVP ve % 1,5 TritonX-100 Ekstraktı	87	1344	116928	1,089	94,74	1234,20	61,87	2,45	8,64
% 30-90 Amonyum Sülfat	25	3240	81000	1,029	25,73	3148,08	42,86	6,25	5,99
5)Ham Enzim Ekstraktı	248	762	188976	1,512	374,98	503,96	100	1,00	13,96
% 2 PVP ve % 5,12 TritonX-100 Ekstraktı	87	1968	171216	0,723	62,90	2722,03	90,60	5,40	12,65
% 30-90 Amonyum Sülfat	25	5535	138375	0,666	16,65	8310,81	73,22	16,49	10,23
6)Ham Enzim Ekstraktı	248	762	188976	1,512	374,98	503,96	100	1,00	13,96
% 2 PVP ve % 0,88 TritonX-100 Ekstraktı	87	1380	120060	1,020	88,74	1352,94	63,53	2,68	8,87
% 30-90 Amonyum Sülfat	25	3375	84375	0,969	24,23	3482,25	44,65	6,91	6,23

¹Bradford yöntemi kullanılarak Ek 3'de çizilen grafik yardımıyla hesaplanmıştır.

²Spesifik Aktivite=Toplam aktivite/Toplam protein

³Verim=(Herhangi bir aşamadaki toplam aktivite/Ham ekstraktın toplam aktivitesi)x100

⁴Saflaştırma(n-kat)=Saflaştırma sonucu ulaşılmış spesifik aktivite/Ham ekstraktın spesifik aktivitesi

⁵m_{enzim}=Toplam aktivite/Saf enzimin SA=13,533 U/mg enzim
(250 gram üzümde elde edilen tirozinaz enzimi kütlesi)

Çizelge 5.4. (Devam) Üzümde tirozinaz enziminin ekstraksiyonu ve saflaştırılmasında istatistiksel yöntemle belirlenen şartların kullanılması ile bulunan deney sonuçları (pH = 7, T = 4 °C)

Ekstraksiyon ve Saflaştırma Adımları	Hacim (ml)	Aktivite (U/ml)	Toplam Aktivite (U)	Protein ¹ (mg/ml)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite ² (U/mg protein)	Verim ³ (%)	Saflaştırma ⁴ (n-kat)	m _{enzim} ⁵ (mg)
7)Ham Enzim Ekstraktı	248	762	188976	1,512	374,98	503,96	100	1,00	13,96
% 3,41 PVP ve % 3 TritonX-100 Ekstraktı	87	1848	160776	0,759	66,03	2434,89	85,17	4,83	11,88
% 30-90 Amonyum Sülfat	25	5160	129000	0,711	17,78	7255,34	68,31	14,40	9,53
8)Ham Enzim Ekstraktı	248	762	188976	1,512	374,98	503,96	100	1,00	13,96
% 0,59 PVP ve % 3 TritonX-100 Ekstraktı	87	1524	132588	0,942	81,95	1617,91	70,16	3,18	9,80
% 30-90 Amonyum Sülfat	25	3825	95625	0,879	21,98	4350,54	50,60	8,63	7,07
9)Ham Enzim Ekstraktı	248	762	188976	1,512	374,98	503,96	100	1,00	13,96
% 2 PVP ve % 3 TritonX-100 Ekstraktı	87	1810	157470	0,801	69,69	2259,58	83,32	4,48	11,64
% 30-90 Amonyum Sülfat	25	5096	127400	0,759	18,98	6712,33	67,42	13,32	9,41

¹Bradford yöntemi kullanılarak Ek 3'de çizilen grafik yardımıyla hesaplanmıştır.

²Spesifik Aktivite=Toplam aktivite/Toplam protein

³Verim=(Herhangi bir aşamadaki toplam aktivite/Ham ekstraktın toplam aktivitesi)x100

⁴Saflaştırma(n-kat)=Saflaştırma sonucu ulaşılmış spesifik aktivite/Ham ekstraktın spesifik aktivitesi

⁵m_{enzim}=Toplam aktivite/Saf enzimin SA=13,533 U/mg enzim
(250 gram üzümde elde edilen tirozinaz enzimi kütlesi)

Çizelge 5.4. (Devam) Üzümde tirozinaz enziminin ekstraksiyonu ve saflaştırılmasında istatistiksel yöntemle belirlenen şartların kullanılması ile bulunan deney sonuçları (pH = 7, T = 4 °C)

Ekstraksiyon ve Saflaştırma Adımları	Hacim (ml)	Aktivite (U/ml)	Toplam Aktivite (U)	Protein ¹ (mg/ml)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite ² (U/mg protein)	Verim ³ (%)	Saflaştırma ⁴ (n-kat)	m _{enzim} ⁵ (mg)
10)Ham Enzim Ekstraktı	248	762	188976	1,512	374,98	503,96	100	1,00	13,96
% 2 PVP ve % 3 TritonX-100 Ekstraktı	87	1806	157122	0,810	70,47	2229,63	83,14	4,42	11,61
% 30-90 Amonyum Sülfat	25	5090	127250	0,762	19,05	6679,79	67,34	13,25	9,40
11)Ham Enzim Ekstraktı	248	762	188976	1,512	374,98	503,96	100	1,00	13,96
% 2 PVP ve % 3 TritonX-100 Ekstraktı	87	1805	157035	0,807	70,21	2236,65	83,10	4,44	11,60
% 30-90 Amonyum Sülfat	25	5087	127175	0,762	19,05	6675,85	67,30	13,24	9,40
12)Ham Enzim Ekstraktı	248	762	188976	1,512	374,98	503,96	100	1,00	13,96
% 2 PVP ve % 3 TritonX-100 Ekstraktı	87	1812	157644	0,801	69,69	2262,07	83,42	4,49	11,65
% 30-90 Amonyum Sülfat	25	5100	127500	0,756	18,90	6746,03	67,47	13,38	9,42

¹Bradford yöntemi kullanılarak Ek 3'de çizilen grafik yardımıyla hesaplanmıştır.

²Spesifik Aktivite=Toplam aktivite/Toplam protein

³Verim=(Herhangi bir aşamadaki toplam aktivite/Ham ekstraktın toplam aktivitesi)x100

⁴Saflaştırma(n-kat)=Saflaştırma sonucu ulaşılmış spesifik aktivite/Ham ekstraktın spesifik aktivitesi

⁵m_{enzim}=Toplam aktivite/Saf enzimin SA=13,533 U/mg enzim
(250 gram üzümde elde edilen tirozinaz enzimi kütlesi)

Çizelge 5.4. (Devam) Üzümde tirosinaz enziminin ekstraksiyonu ve saflaştırılmasında istatistiksel yöntemle belirlenen şartların kullanılması ile bulunan deney sonuçları (pH = 7, T = 4 °C)

Ekstraksiyon ve Saflaştırma Adımları	Hacim (ml)	Aktivite (U/ml)	Toplam Aktivite (U)	Protein ¹ (mg/ml)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite ² (U/mg protein)	Verim ³ (%)	Saflaştırma ⁴ (n-kat)	m _{enzim} ⁵ (mg)
13)Ham Enzim Ekstraktı	248	762	188976	1,512	374,98	503,96	100	1,00	13,96
% 2 PVP ve % 3 TritonX-100 Ekstraktı	87	1808	157296	0,807	70,21	2240,36	83,24	4,45	11,62
% 30-90 Amonyum Sülfat	25	5093	127325	0,759	18,98	6708,38	67,38	13,31	9,41
14)Ham Enzim Ekstraktı	248	762	188976	1,512	374,98	503,96	100	1,00	13,96
% 2 PVP ve % 3 TritonX-100 Ekstraktı	87	1811	157557	0,804	69,95	2252,42	83,37	4,47	11,64
% 30-90 Amonyum Sülfat	25	5097	127425	0,756	18,90	6742,06	67,43	13,38	9,42

¹Bradford yöntemi kullanılarak Ek 3'de çizilen grafik yardımıyla hesaplanmıştır.

²Spesifik Aktivite=Toplam aktivite/Toplam protein

³Verim=(Herhangi bir aşamadaki toplam aktivite/Ham ekstraktın toplam aktivitesi)x100

⁴Saflaştırma(n-kat)=Saflaştırma sonucu ulaşılmış spesifik aktivite/Ham ekstraktın spesifik aktivitesi

⁵m_{enzim}=Toplam aktivite/Saf enzimin SA=13,533 U/mg enzim
(250 gram üzümde elde edilen tirosinaz enzimi kütlesi)

Yapılan deneylerdeki spesifik aktivite değerlerinin belirlenmesinde Eş. 5.3'de verilen genel bir polinom denkleminde yararlanılmıştır.

$$\text{Spesifik Aktivite (SA)} = \sum_{m+n \leq 4} b_{mn} x_1^m x_2^n \quad (5.3)$$

Bu modelin regresyon çözümlemesi ve analizi bir istatistiksel paket programı ile yapılmıştır. Elde edilen verilerin kullanılmasıyla geliştirilen model, yapılan analizler

sonucu anlamsızlığı tespit edilen değişkenler çıkarılarak, kodlanmış değerler cinsinden model 1 Eş. 5.4’de ve model 8 Eş. 5.5’deki şekilde ifade edilmiştir.

$$SA = 2246,79 + 458,30x_1 + 338,28x_2 - 106,35x_1x_2 - 110,23x_2^2 - 104,68x_1^2 + 128,83 x_1^2 x_2^2 \quad (R=0,995) \quad (5.4)$$

$$SA = 2202,20 + 458,3x_1 + 338,28x_2 - 72,44x_2^2 \quad (R=0,974) \quad (5.5)$$

Çizelge 5.5. Matematiksel modeller ve R değerleri

Model No	Model denklikleri	R değerleri
1	$SA=2246,79+458,3x_1+338,28x_2-106,35x_1x_2-110,23x_2^2-104,68x_1^2+128,83x_1^2x_2^2$	0,995
2	$SA=2246,77+458,3x_1+288,89x_2-106,35x_1x_2-78x_2^2-72,46x_1^2-98,77x_1^2x_2$	0,993
3	$SA=2246,77+484,12x_1+338,28x_2-106,35x_1x_2-78x_2^2-72,46x_1^2-51,62x_1x_2^2$	0,990
4	$SA=2246,77+458,3x_1+338,28x_2-106,35x_1x_2-78x_2^2-72,46x_1^2$	0,989
5	$SA = 2202,20-106,35x_1+338,28x_2-458,30x_1x_2-72,44x_2^2$	0,982
6	$SA = 2246,77 + 458,3x_1 + 338,28x_2 - 72,46x_1^2 - 78x_2^2$	0,981
7	$SA = 2198,78 + 458,3x_1 + 338,28x_2 - 106,35x_1x_2 - 66,47x_1^2$	0,981
8	$SA = 2202,20 + 458,3x_1 + 338,28x_2 - 72,44x_2^2$	0,974
9	$SA = 2198,78 + 458,3x_1 + 338,28x_2 - 66,47x_1^2$	0,973
10	$SA = 2160,81 + 458,3x_1 + 288,89x_2 - 98,77x_1^2x_2^2$	0,971
11	$SA = 2160,85 + 458,3x_1 + 338,28x_2 - 0,143x_1^2x_2^2$	0,967

Çizelge 5.6. Üzümünden tirozinaz enziminin saflaştırılması için plan matrisinin kodlanmış değerleri ve spesifik aktivite değerleri (SA/model 1'e göre) (pH = 7, T = 4 °C)

Deney No	x ₁	x ₂	SA _{deneysel}	SA _{model}	Relatif Hata*
1	+1	+1	2874,51	2850,94	0,819
2	-1	+1	2222,22	2147,04	3,383
3	+1	-1	2311,89	2387,08	-3,252
4	-1	-1	1234,20	1257,78	-1,911
5	+1,414	0	2722,03	2685,53	1,341
6	-1,414	0	1352,94	1389,46	-2,699
7	0	+1,414	2434,89	2569,25	-5,518
8	0	-1,414	1617,91	1612,60	0,328
9	0	0	2259,58	2246,79	0,566
10	0	0	2229,63	2246,79	-0,770
11	0	0	2236,65	2246,79	-0,453
12	0	0	2262,07	2246,79	-0,675
13	0	0	2240,36	2246,79	-0,287
14	0	0	2252,42	2246,79	0,250

* Relatif Hata = ((SA_{deneysel} - SA_{model})/ SA_{deneysel})x100

Çizelge 5.6'den görüldüğü üzere model 1'deki denklem baz alındığında, deneysel olarak bulunan spesifik aktivite değerleri ile modelden hesaplanan spesifik aktivite değerleri arasındaki relatif hata değerleri çok küçüktür. En büyük relatif hata % 5,52 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 5.7. Üzümden tirozinaz enziminin saflaştırılması için plan matrisinin kodlanmış değerleri ve spesifik aktivite değerleri (SA/model 8'e göre) (pH=7, T= 4 °C)

Deney No	x ₁	x ₂	SA _{deneyssel}	SA _{model}	Relatif Hata*
1	+1	+1	2874,51	2926,34	-1,803
2	-1	+1	2222,22	2009,74	9,562
3	+1	-1	2311,89	2249,78	2,687
4	-1	-1	1234,20	1333,18	-8,020
5	+1,414	0	2722,03	2850,24	-4,710
6	-1,414	0	1352,94	1554,16	-14,873
7	0	+1,414	2434,89	2535,69	-4,140
8	0	-1,414	1617,91	1579,04	2,402
9	0	0	2259,58	2202,20	2,539
10	0	0	2229,63	2202,20	1,230
11	0	0	2236,65	2202,20	1,540
12	0	0	2262,07	2202,20	2,647
13	0	0	2240,36	2202,20	1,703
14	0	0	2252,42	2202,20	2,230

* Relatif Hata = $((SA_{deneyssel} - SA_{model}) / SA_{deneyssel}) \times 100$

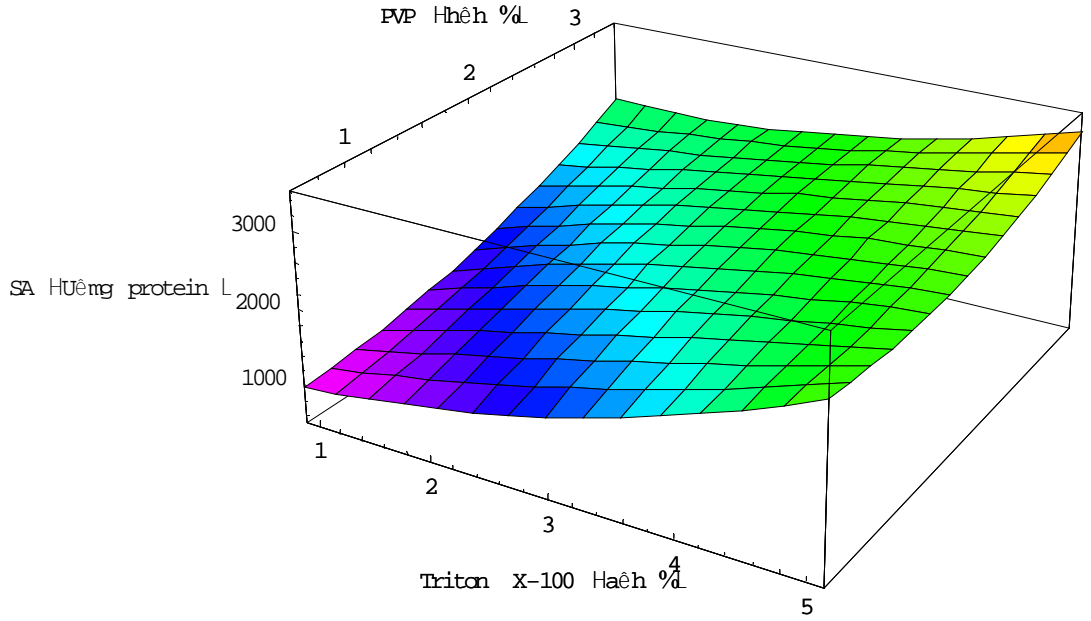
Çizelge 5.7'de model 8 baz alınmıştır. Burada deneysel olarak bulunan spesifik aktivite değerleri ile modelden hesaplanan spesifik aktivite değerleri arasındaki relatif hata değerleri model 1'e göre biraz daha fazladır. Ancak model 1'den daha basit bir modeldir.

Eş. 5.4 ve Eş. 5.5 'de elde edilen eşitliklerin gerçek değerler cinsinden ifadesi, Eş. 5.1 ve Eş. 5.2'deki formüller kullanılarak, TX-100 ve PVP konsantrasyonu cinsinden Eş. 5.6 ve Eş. 5.7'de gösterildiği şekilde ifade edilmiştir.

$$SA = 1429,87 - 653,54[\text{Triton X-100}] + 184,78[\text{Triton X-100}]^2 - 1069,38[\text{PVP}] + 1310,16[\text{Triton X-100}][\text{PVP}] + 405,09[\text{PVP}]^2 - 231,89[\text{Triton X-100}]^2[\text{PVP}] - 345,26[\text{Triton X-100}][\text{PVP}]^2 + 57,97[\text{Triton X-100}]^2[\text{PVP}]^2 \quad (5.6)$$

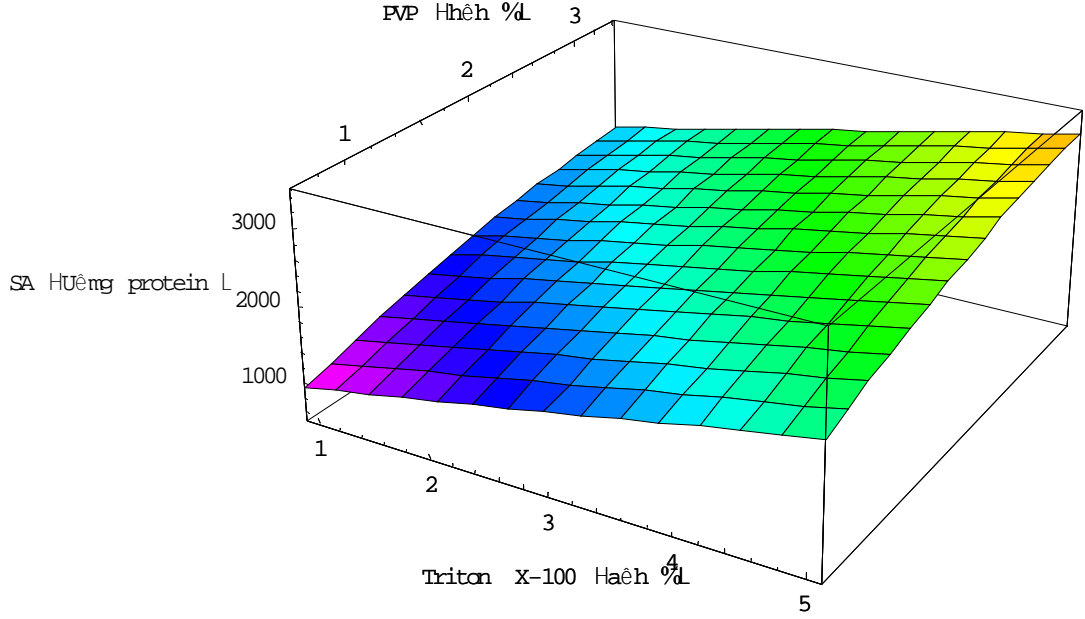
$$SA = 319,28 + 305,53[\text{Triton X-100}] + 628,04[\text{PVP}] - 72,44[\text{PVP}]^2 \quad (5.7)$$

Üzümde elde edilen enzim için maksimum spesifik aktivite değeri, Eş. 5.6 kullanılarak, bir paket program yardımıyla hesaplanmıştır. Buna göre, Şekil 5.2’de görüldüğü üzere, model 1 için maksimum spesifik aktivite değeri 3252,20 hesaplanmış ve bu değer elde edildiği Triton X-100 ve PVP miktarı, sırasıyla 5,12 ($x_1 = 1,414$) ve 3,41 ($x_2 = 1,414$) olarak bulunmuştur.



Şekil 5.2. Triton X-100 ve PVP miktarının fonksiyonu olarak spesifik aktivite değerini gösteren üç boyutlu cevap yüzeyi, model 1’e göre (pH=7, T=4 °C)

Eş. 5.7 kullanılarak, Triton X-100 ve PVP miktarının fonksiyonu olarak model 8'e göre spesifik aktivite değerini gösteren üç boyutlu cevap yüzeyi Şekil 5.3'de gösterilmiştir.



Şekil 5.3. Triton X-100 ve PVP miktarının fonksiyonu olarak spesifik aktivite değerini gösteren üç boyutlu cevap yüzeyi, model 8'e göre (pH=7, T=4 °C)

5.3. Piyasadan Alınan Saf Tirozinaz Enzimi İle Yapılan Fenol Giderimi

Piyasadan alınan saf tirozinaz enzimi kullanılarak her bir başlangıç fenol konsantrasyonu için gerekli enzim miktarları tespit edilmiş, fenol uzaklaştırmada maksimum verimin elde edildiği sıcaklık ve zaman koşulları belirlenmiştir.

5.3.1. Başlangıç fenol miktarına göre saf tirozinaz enzimi kullanılarak gerekli enzim miktarının belirlenmesi

Sulardan fenollerin uzaklaştırılmasında, farklı başlangıç konsantrasyonlarındaki fenol çözeltileri için gerekli enzim miktarının belirlenmesi gerekir. Çünkü her bir başlangıç fenol konsantrasyonu için gerekli olan enzim miktarları değişmektedir.

Başlangıç fenol konsantrasyonu 50, 150, 250, 350, 500, 750 ve 1000 ppm olan fenol çözeltileri için sıcaklık (25 °C) sabit tutularak, pH = 7’de sodyum fosfat tamponu içinde kullanılan enzim miktarları her denemede arttırılmış, maksimum verimin elde edildiği gerekli saf tirozinaz enzimi miktarları belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 5.8 – Çizelge 5.14’de sunulmuştur.

Sulardan fenol uzaklaştırmada, başlangıç konsantrasyonları 50 – 1000 ppm arasında değişen fenol çözeltileri için gerekli olan saf tirozinaz enzimi miktarı grafikleri Şekil 5.4 – Şekil 5.10’da gösterilmiştir.

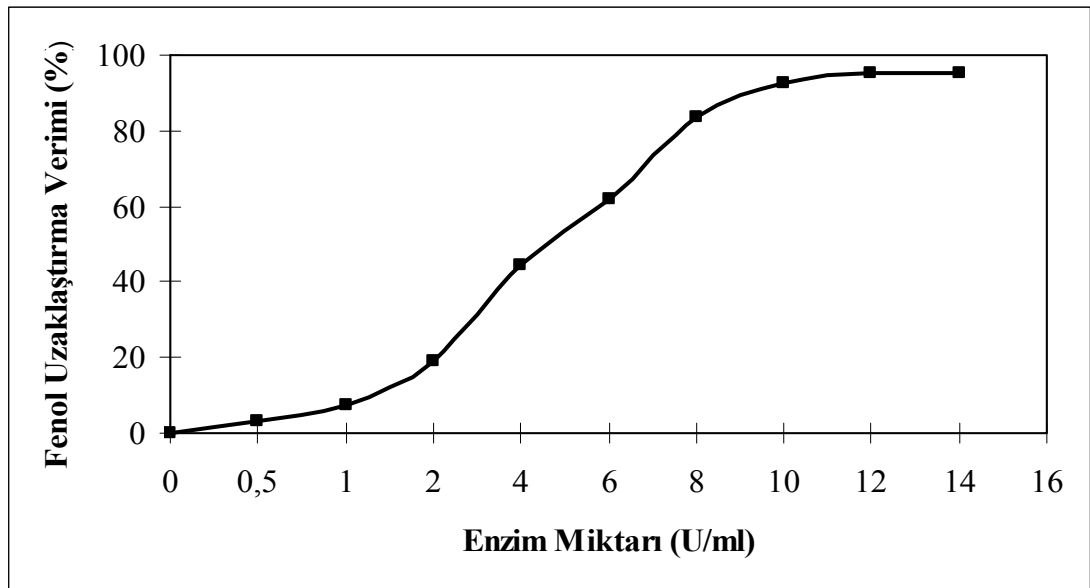
Fenol uzaklaştırma verimlerinin hesaplanmasında Eş. 5.8’deki denklem kullanılmıştır.

$$\text{Fenol Uzaklaştırma Verimi (\%)} = \frac{C_o - C_s}{C_o} * 100 \quad (5.8)$$

Burada; C_o , başlangıç fenol konsantrasyonu (mg/l), C_s ise son fenol konsantrasyonu (mg/l) olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 5.8. Başlangıç fenol miktarına göre gerekli saf tirozinaz enzimi miktarının belirlenmesi için yapılan deney sonuçları ($C_0 = 50$ ppm, pH= 7, T = 25 °C, t=3 saat)

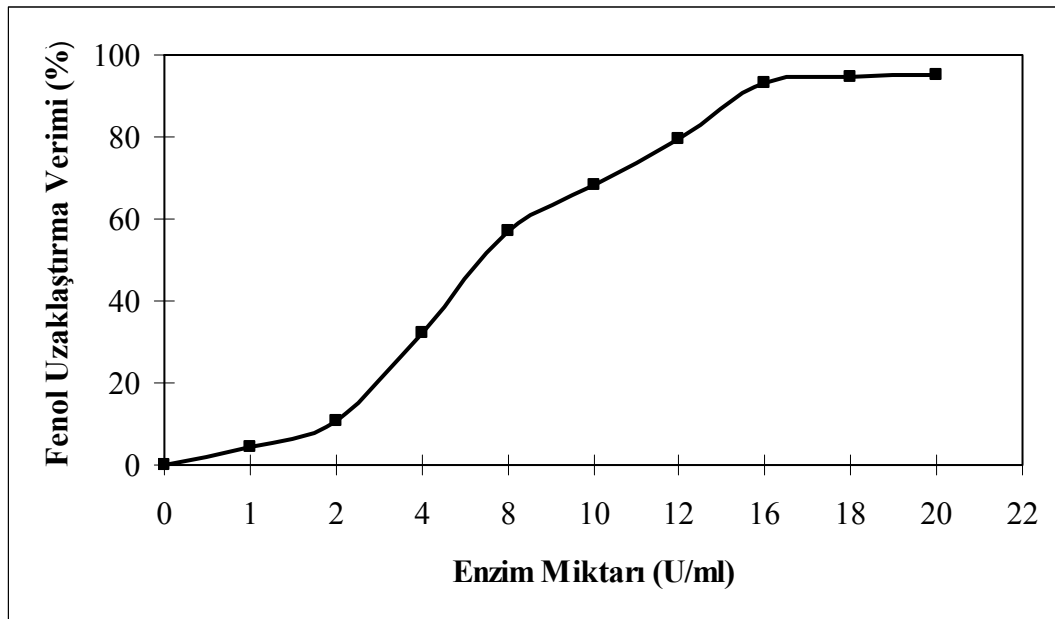
Başlangıç Fenol Konsantrasyonu, C_0 (ppm)	Enzim Miktarı (U/ml)	Son Fenol Konsantrasyonu, C_s (ppm)	Fenol Uzaklaştırma Verimi (%)
50	0	50,00	0
	0,5	48,32	3,36
	1	46,30	7,40
	2	40,36	19,28
	4	27,68	44,64
	6	18,98	62,04
	8	8,20	83,60
	10	3,82	92,36
	12	2,49	95,02
	14	2,43	95,14



Şekil 5.4. Saf tirozinaz enzimi miktarının fenol uzaklaştırma verimi üzerine etkisi ($C_0 = 50$ ppm, pH = 7, T = 25 °C, t = 3 saat)

Çizelge 5.9. Başlangıç fenol miktarına göre gerekli saf tirozinaz enzimi miktarının belirlenmesi için yapılan deney sonuçları
($C_0 = 150$ ppm, pH= 7, T = 25 °C, t=3 saat)

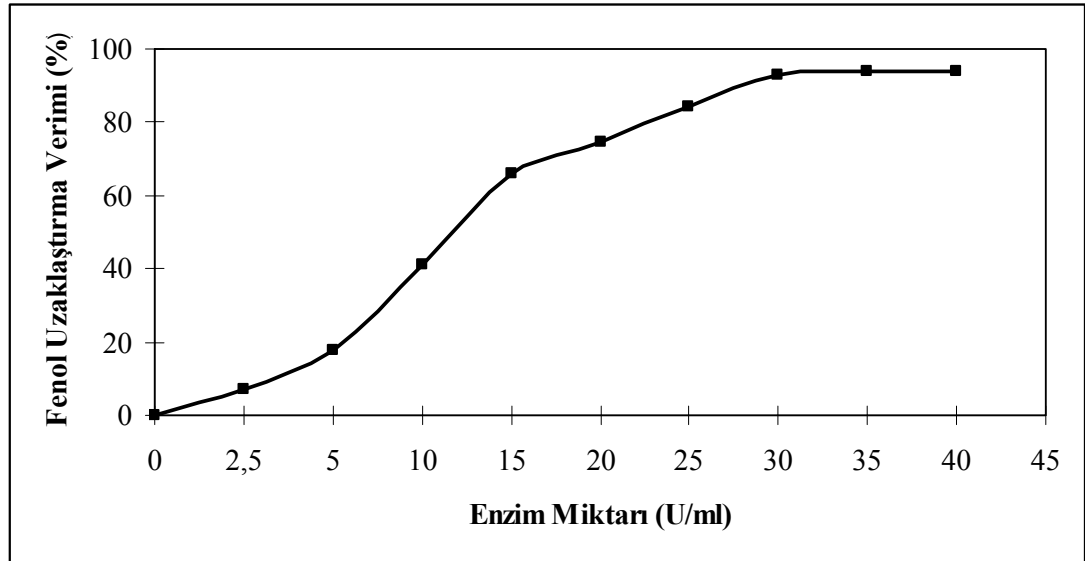
Başlangıç Fenol Konsantrasyonu, C_0 (ppm)	Enzim Miktarı (U/ml)	Son Fenol Konsantrasyonu, C_s (ppm)	Fenol Uzaklaştırma Verimi (%)
150	0	150,00	0
	1	143,48	4,35
	2	133,58	10,95
	4	101,94	32,04
	8	64,07	57,29
	10	47,46	68,36
	12	30,68	79,55
	16	10,60	92,93
	18	8,05	94,63
	20	7,64	94,91



Şekil 5.5. Saf tirozinaz enzimi miktarının fenol uzaklaştırma verimi üzerine etkisi
($C_0 = 150$ ppm, pH= 7, T = 25 °C, t = 3 saat)

Çizelge 5.10. Başlangıç fenol miktarına göre gerekli saf tirozinaz enzimi miktarının belirlenmesi için yapılan deney sonuçları ($C_0 = 250$ ppm, pH= 7, T = 25 °C, t=3 saat)

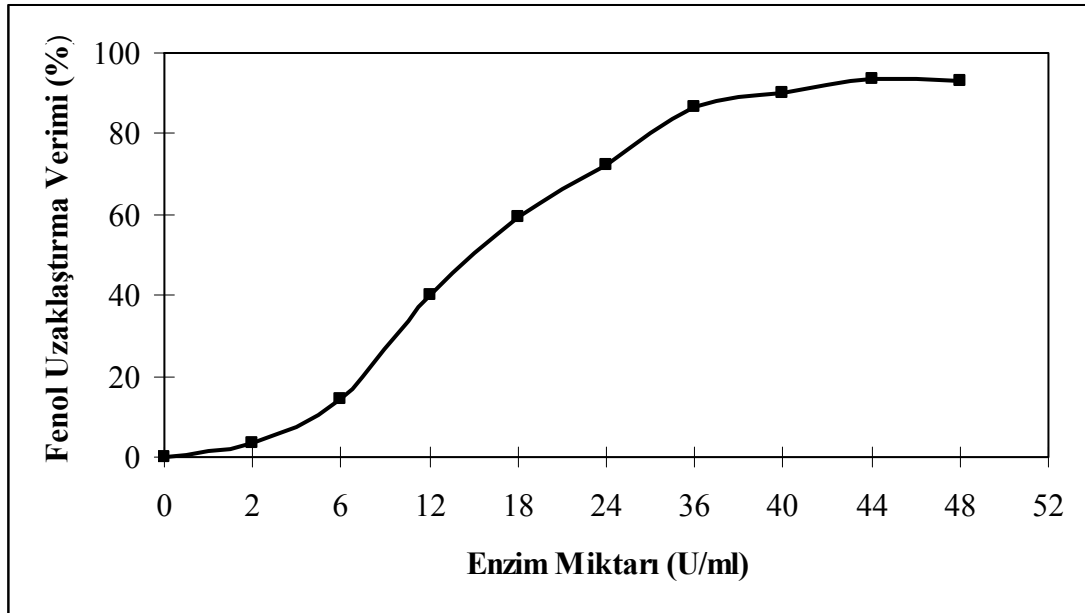
Başlangıç Fenol Konsantrasyonu, C_0 (ppm)	Enzim Miktarı (U/ml)	Son Fenol Konsantrasyonu, C_s (ppm)	Fenol Uzaklaştırma Verimi (%)
250	0	250,00	0
	2,5	232,47	7,01
	5	206,13	17,55
	10	146,70	41,32
	15	85,32	65,87
	20	63,75	74,50
	25	39,95	84,02
	30	17,18	93,13
	35	15,29	93,88
	40	15,15	93,94



Şekil 5.6. Saf tirozinaz enzimi miktarının fenol uzaklaştırma verimi üzerine etkisi ($C_0 = 250$ ppm, pH = 7, T = 25 °C, t = 3 saat)

Çizelge 5.11. Başlangıç fenol miktarına göre gerekli saf tirozinaz enzimi miktarının belirlenmesi için yapılan deney sonuçları
($C_0 = 350$ ppm, pH= 7, $T = 25$ °C, t=3 saat)

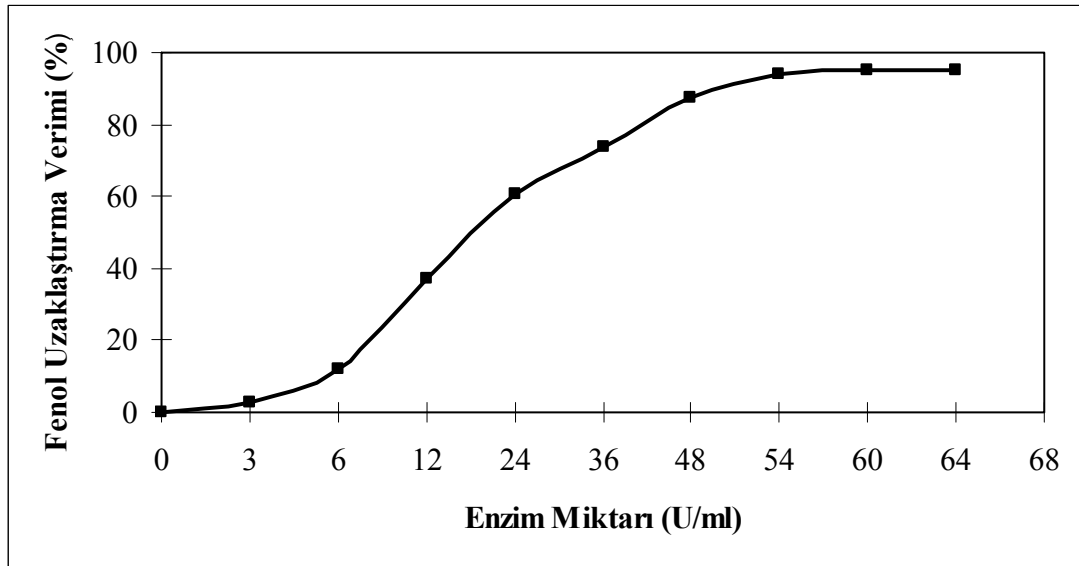
Başlangıç Fenol Konsantrasyonu, C_0 (ppm)	Enzim Miktarı (U/ml)	Son Fenol Konsantrasyonu, C_s (ppm)	Fenol Uzaklaştırma Verimi (%)
350	0	350,00	0
	2	338,08	3,41
	6	299,76	14,35
	12	209,64	40,10
	18	142,52	59,28
	24	96,20	72,51
	36	46,82	86,62
	40	35,31	89,91
	44	23,25	93,36
	48	23,81	93,20



Şekil 5.7. Saf tirozinaz enzimi miktarının fenol uzaklaştırma verimi üzerine etkisi
($C_0 = 350$ ppm, pH = 7, $T = 25$ °C, t = 3 saat)

Çizelge 5.12. Başlangıç fenol miktarına göre gerekli saf tirozinaz enzimi miktarının belirlenmesi için yapılan deney sonuçları ($C_0 = 500$ ppm, pH= 7, $T = 25$ °C, t=3 saat)

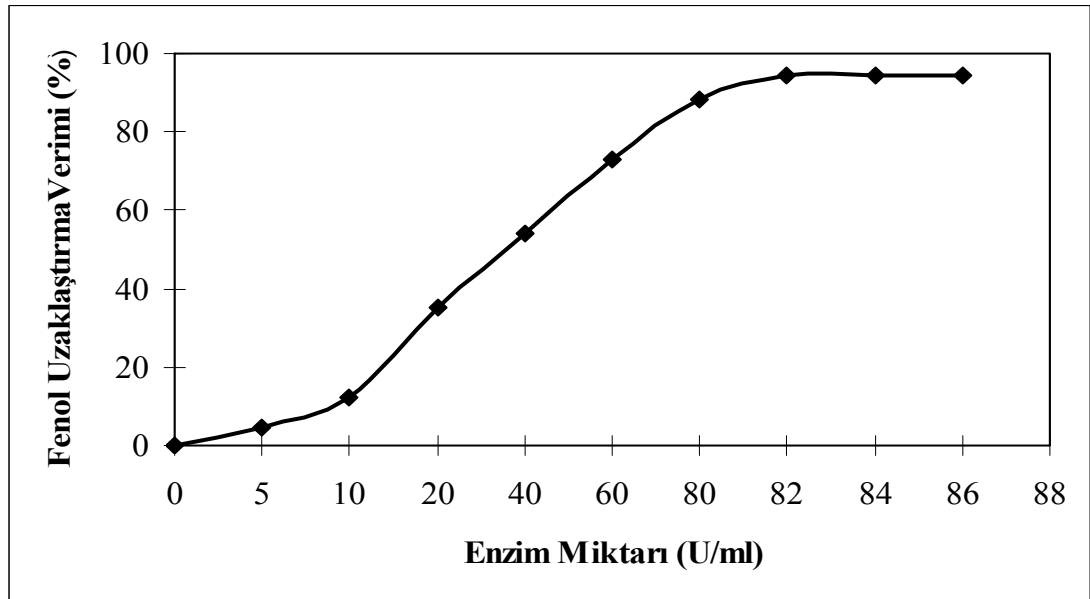
Başlangıç Fenol Konsantrasyonu, C_0 (ppm)	Enzim Miktarı (U/ml)	Son Fenol Konsantrasyonu, C_s (ppm)	Fenol Uzaklaştırma Verimi (%)
500	0	500,00	0
	3	487,02	2,60
	6	440,04	11,99
	12	313,50	37,30
	24	196,88	60,62
	36	129,93	74,01
	48	63,53	87,29
	54	29,24	94,15
	60	24,45	95,11
	64	23,65	95,27



Şekil 5.8. Saf tirozinaz enzimi miktarının fenol uzaklaştırma verimi üzerine etkisi ($C_0 = 500$ ppm, pH = 7, $T = 25$ °C, t = 3 saat)

Çizelge 5.13. Başlangıç fenol miktarına göre gerekli saf tirozinaz enzimi miktarının belirlenmesi için yapılan deney sonuçları ($C_o = 750$ ppm, pH= 7, T = 25 °C, t=3 saat)

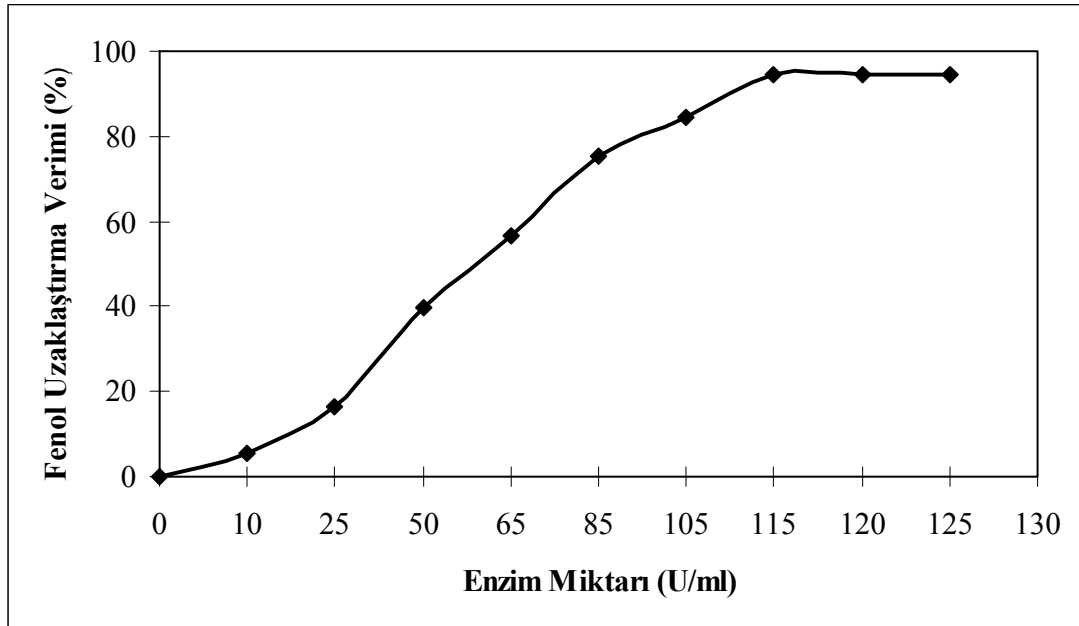
Başlangıç Fenol Konsantrasyonu, C_o (ppm)	Enzim Miktarı (U/ml)	Son Fenol Konsantrasyonu, C_s (ppm)	Fenol Uzaklaştırma Verimi (%)
750	0	750,00	0
	5	717,04	4,39
	10	656,96	12,41
	20	484,48	35,40
	40	343,20	54,24
	60	201,36	73,15
	80	88,54	88,19
	82	42,67	94,31
	84	42,19	94,37
	86	41,71	94,44



Şekil 5.9. Saf tirozinaz enzimi miktarının fenol uzaklaştırma verimi üzerine etkisi ($C_o = 750$ ppm, pH = 7, T = 25 °C, t = 3 saat)

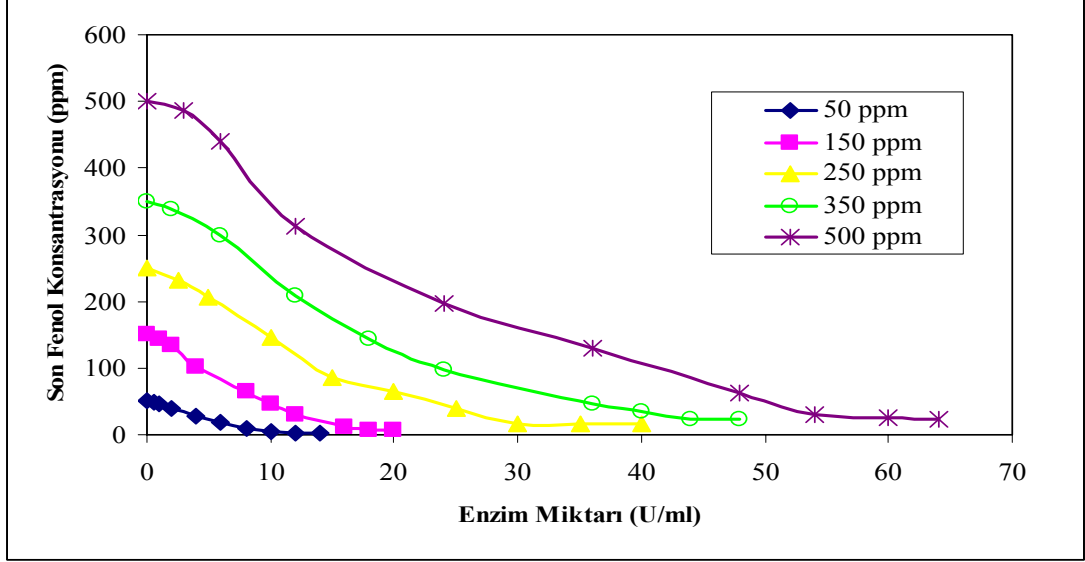
Çizelge 5.14. Başlangıç fenol miktarına göre gerekli saf tirozinaz enzimi miktarının belirlenmesi için yapılan deney sonuçları ($C_o=1000$ ppm, pH=7, T=25 °C, t=3 saat)

Başlangıç Fenol Konsantrasyonu, C_o (ppm)	Enzim Miktarı (U/ml)	Son Fenol Konsantrasyonu, C_s (ppm)	Fenol Uzaklaştırma Verimi (%)
1000	0	1000,00	0
	10	945,80	5,42
	25	835,60	16,44
	50	604,00	39,60
	65	433,36	56,66
	85	247,38	75,26
	105	154,68	84,53
	115	55,38	94,46
	120	54,90	94,51
	125	54,42	94,56



Şekil 5.10. Saf tirozinaz enzimi miktarının fenol uzaklaştırma verimi üzerine etkisi ($C_o = 1000$ ppm, pH= 7, T = 25 °C, t= 3 saat)

Farklı başlangıç fenol konsantrasyonlarında enzim miktarının son fenol konsantrasyonuna etkisi Şekil 5.11’de gösterilmiştir.



Şekil 5.11. Farklı başlangıç fenol konsantrasyonlarında saf tirozinaz enzimi miktarının son fenol konsantrasyonuna etkisi (pH=7, T=25 °C, t=3 saat)

Değişik başlangıç konsantrasyonlarındaki, C_o (50 – 1000 ppm) fenol çözeltileri için gerekli saf tirozinaz enzimi miktarları Çizelge 5.15’de verilmiştir.

Çizelge 5.15. Başlangıç fenol miktarına göre gerekli saf tirozinaz enzimi miktarı (pH=7, T=25 °C, t=3 saat)

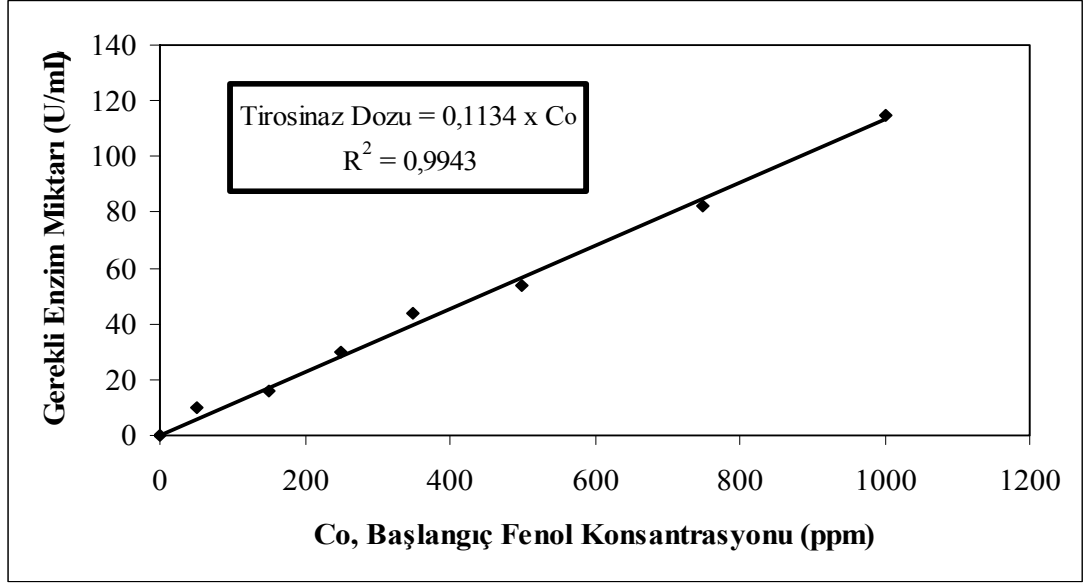
Başlangıç Fenol Konsantrasyonu C_o , (ppm)	Gerekli Enzim Miktarı (U/ml)	Son Fenol Konsantrasyonu, C_s (ppm)	Fenol Uzaklaştırma Verimi(%)*
50	10	3,82	92,36
150	16	10,60	92,93
250	30	17,18	93,13
350	44	23,25	93,36
500	54	29,24	94,15
750	82	42,67	94,31
1000	115	55,38	94,46

$$* \text{ Fenol Uzaklaştırma Verimi (\%)} = \frac{C_o - C_s}{C_o} * 100$$

Çizelge 5.15'den görüldüğü üzere, başlangıç konsantrasyonları 50 – 1000 ppm arasında değişen fenol çözeltileri için uygun enzim miktarları kullanıldığında % 95'lere varan fenol uzaklaştırma verimleri elde edilmiştir.

Ikehata ve ark. (2000), yaptıkları çalışmada atık sulardan fenolün uzaklaştırılmasında, tirozinaz enzimi kullanarak fenol uzaklaştırma verimi üzerine enzim miktarının, zamanın ve sıcaklığın etkisini araştırmışlardır [1]. Başlangıç fenol konsantrasyonu 47 ppm olan bir fenol çözeltisi için, 25 °C'de 6 ünite/ml'lik enzim kullanıldığında 3 saatlik deney süresi sonunda % 100 fenol dönüşümü elde etmişler ve fenol aralığı 94 – 940 ppm arasında değişen fenol çözeltilerini % 95'lere varan fenol uzaklaştırma verimi elde ederek sulardan arındırmışlardır. Yaptığımız çalışmalarda ise, 50 ppm'lik bir fenol çözeltisi için 25 °C sıcaklıkta 10 ünite/ml saf tirozinaz enzimi kullanıldığında yaklaşık % 92 fenol uzaklaştırma verimi elde edilmiştir. Fenol aralığı 50 – 1000 ppm arasında değişen fenol çözeltileri için % 95'lere varan fenol uzaklaştırma verimi elde edilmiştir. Bulunan sonuçlar, Ikehata ve ark.'nın buldukları sonuçlar ile benzerlik göstermektedir.

Başlangıç fenol konsantrasyonu 50 – 1000 ppm arasında değişen fenol çözeltileri için belirlenen enzim miktarları grafiğe geçirilmiştir (Şekil 5.12). Buradan lineer bir doğru elde edilmiş ve başlangıç fenol konsantrasyonu (C_0) için gerekli saf tirozinaz enzimi dozunu veren bir doğru denklemi elde edilmiştir.



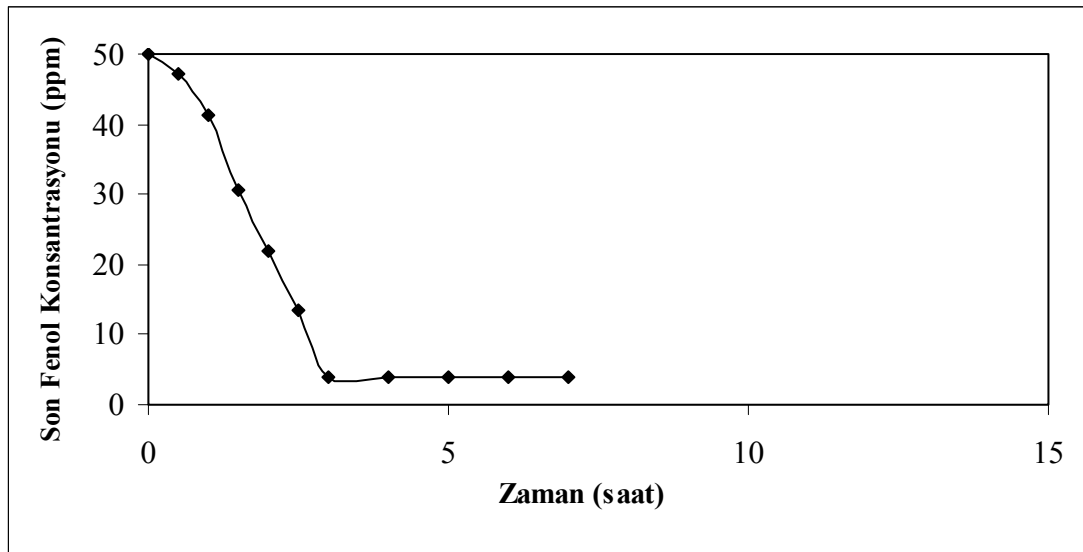
Şekil 5.12. Başlangıç fenol miktarı için gerekli saf tirosinaz enzimi miktarı grafiği (pH = 7, T = 25 °C, t = 3 saat)

5.3.2. Fenol deneylerinde saf tirosinaz enzimi kullanılarak gerekli sürenin belirlenmesi

Fenol deneylerinde yeterli zamanın belirlenmesi için değişik başlangıç konsantrasyonlarında fenol çözeltileri hazırlanmıştır. Fenollerin sulu çözeltilerden giderimindeki yeterli zaman, ilk olarak piyasadan alınan saf tirosinaz enzimi kullanılarak belirlenmiştir. Başlangıç fenol konsantrasyonu 50, 250 ve 500 ppm olan fenol çözeltileri için gerekli enzim miktarları kullanılarak, 25 °C sıcaklıkta, fenol giderimi için zamana karşı son fenol konsantrasyonları Çizelge 5.16 – Çizelge 5.18’de gösterilmiştir. Çizelge 5.16 – Çizelge 5.18’den anlaşılacağı üzere, 3 saatin üzerindeki zamanlarda son fenol konsantrasyonlarında belirgin bir değişim olmamıştır. Buna göre fenol giderimi için yeterli zaman, 3 saat olarak seçilmiştir. Ayrıca zamanın son fenol konsantrasyonu üzerine etkisi Şekil 5.13 – Şekil 5.15’de sunulmuştur.

Çizelge 5.16. Fenol deneylerinde saf tirozinaz enzimi kullanılması ile gerekli sürenin belirlenmesi için yapılan deney sonuçları ($C_0=50$ ppm, enzim konsantrasyonu=10 U/ml, pH=7, T=25 °C)

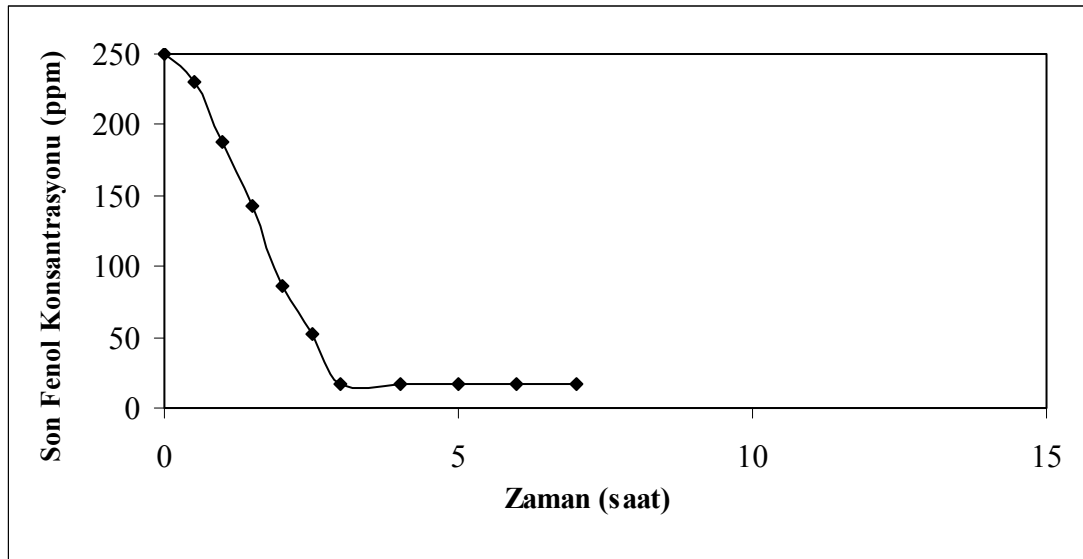
Başlangıç Fenol Konsantrasyonu, C_0 (ppm)	Zaman (saat)	Son Fenol Konsantrasyonu, C_s (ppm)	Fenol Uzaklaştırma Verimi(%)
50	0	50	0
	0,5	47,10	5,80
	1	41,42	17,16
	1,5	30,74	38,52
	2	22,05	55,90
	2,5	13,61	72,78
	3	3,84	92,32
	4	3,82	92,36
	5	3,87	92,26
	6	3,93	92,14
	7	3,88	92,24



Şekil 5.13. Zamanın son fenol konsantrasyonu üzerine etkisi, saf enzim kullanılması ile ($C_0=50$ ppm, saf enzim konsantrasyonu=10 U/ml, pH=7, T=25 °C)

Çizelge 5.17. Fenol deneylerinde saf tirozinaz enzimi kullanılması ile gerekli sürenin belirlenmesi için yapılan deney sonuçları ($C_0=250$ ppm, enzim konsantrasyonu=30 U/ml, pH=7, T=25 °C)

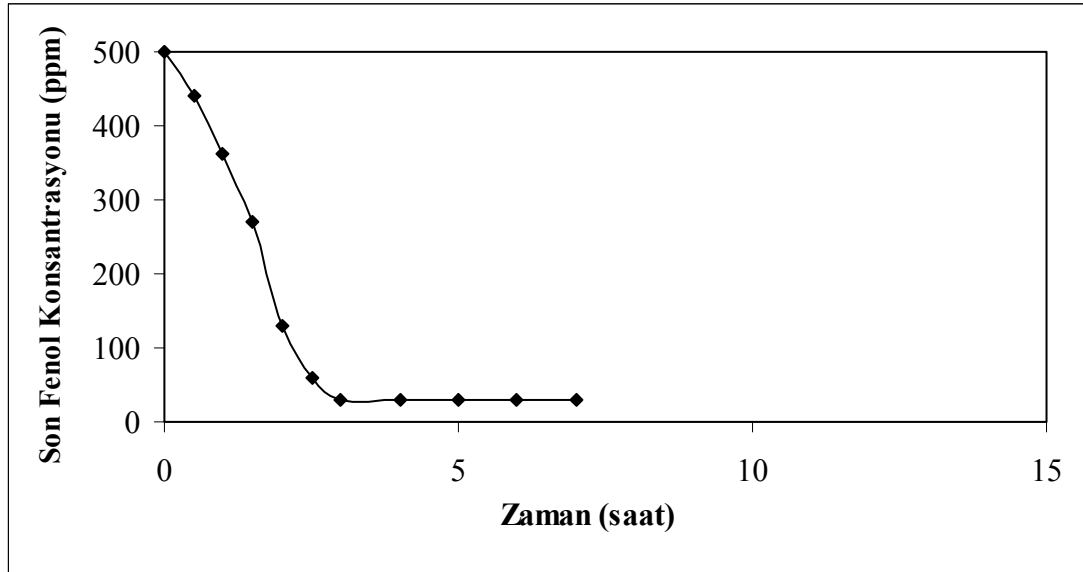
Başlangıç Fenol Konsantrasyonu, C_0 (ppm)	Zaman (saat)	Son Fenol Konsantrasyonu, C_s (ppm)	Fenol Uzaklaştırma Verimi(%)
250	0	250	0
	0,5	229,59	8,16
	1	187,44	25,02
	1,5	142,38	43,05
	2	86,04	65,58
	2,5	51,61	79,36
	3	17,18	93,13
	4	17,10	93,16
	5	17,26	93,10
	6	17,02	93,19
	7	16,94	93,22



Şekil 5.14. Zamanın son fenol konsantrasyonu üzerine etkisi, saf enzim kullanılması ile ($C_0=250$ ppm, saf enzim konsantrasyonu=30 U/ml, pH=7, T=25 °C)

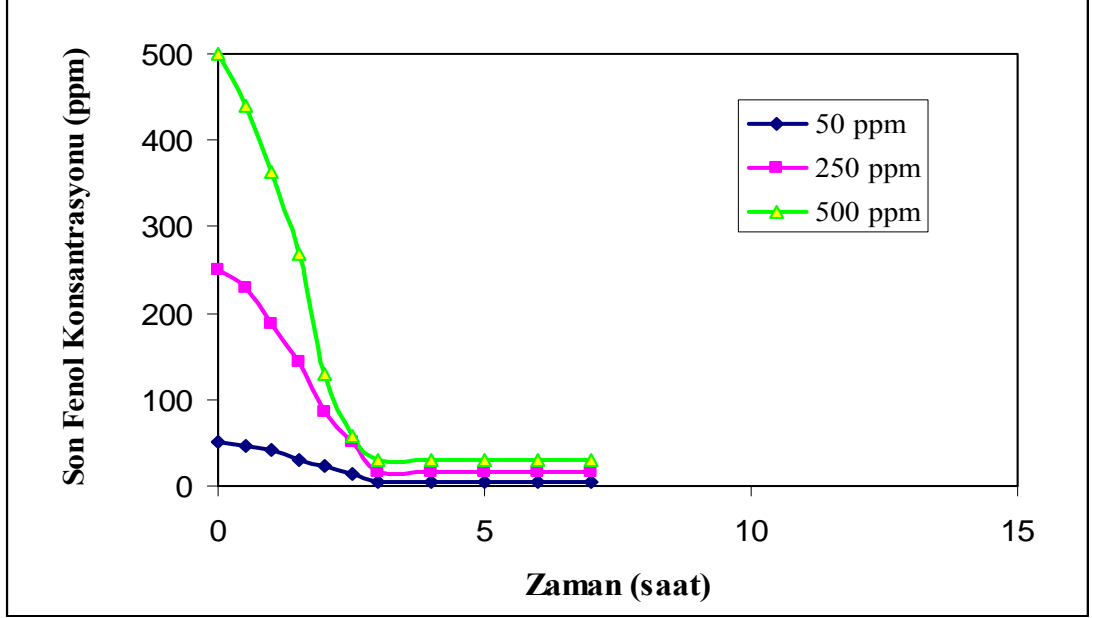
Çizelge 5.18. Fenol deneylerinde saf tirozinaz enzimi kullanılması ile gerekli sürenin belirlenmesi için yapılan deney sonuçları ($C_0=500$ ppm, enzim konsantrasyonu=54U/ml, pH=7, T=25 °C)

Başlangıç Fenol Konsantrasyonu, C_0 (ppm)	Zaman (saat)	Son Fenol Konsantrasyonu, C_s (ppm)	Fenol Uzaklaştırma Verimi(%)
500	0	500	0
	0,5	440,04	11,99
	1	363,36	27,33
	1,5	269,08	46,18
	2	128,49	74,30
	2,5	58,73	88,25
	3	29,32	94,14
	4	29,56	94,09
	5	29,40	94,12
	6	29,64	94,10
	7	29,08	94,18



Şekil 5.15. Zamanın son fenol konsantrasyonu üzerine etkisi, saf enzim kullanılması ile ($C_0=500$ ppm, saf enzim konsantrasyonu=54 U/ml, pH=7, T=25 °C)

Farklı başlangıç fenol konsantrasyonlarında C_0 (50 – 500 ppm) zamanın son fenol konsantrasyonuna etkisi Şekil 5.16’da gösterilmiştir.



Şekil 5.16. Farklı başlangıç fenol konsantrasyonlarında zamanın son fenol konsantrasyonuna etkisi, saf enzim kullanılması ile (pH=7, T = 25 °C)

Literatürde, tirozinaz enzimi kullanarak, atık sulardan fenolün uzaklaştırılması için yeterli olan zaman 3 saat olarak belirlenmiştir [1]. Yaptığımız çalışmada da 3 saatin üzerindeki zamanlarda son fenol konsantrasyonlarında belirgin bir değişim olmamıştır.

5.4. Üzümden Elde Edilen Tirozinaz Enzimi İle Yapılan Fenol Giderimi

Üzümden elde edilen tirozinaz enzimi ile farklı başlangıç fenol konsantrasyonlarında fenol giderimi yapılmış, fenol gideriminde yeterli reaksiyon süresinin belirlenmesi, üzümünden elde edilen tirozinaz enzimi kullanılarak tekrarlanmıştır.

5.4.1. Üzümde elde edilen tirozinaz enzimi ile saf tirozinaz enziminin fenol uzaklaştırma verimi üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması

Fenol giderimi deneylerinde, saf tirozinaz enziminin fenol giderimindeki etkisi ile üzümde ekstrakte edilen ve saflaştırılan tirozinaz enziminin fenol giderimindeki etkisini karşılaştırmak için, saf tirozinaz enzimi miktarları ile aynı miktarlar kullanılmıştır. Başlangıç fenol konsantrasyonu 50, 150, 250, 350 ve 500 ppm olan fenol çözeltileri için, üzümde elde edilen enzimden gerekli miktarlar kullanılarak fenol giderimi yapılmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 5.19'da gösterilmiştir.

Çizelge 5.19. Üzümde PVP (%3, a/h) ve Triton X-100 (%4,5, h/h) kullanılarak elde edilen tirozinaz enziminin fenol uzaklaştırma verimi üzerine etkisi (pH=7, T=25 °C, t=3 saat)

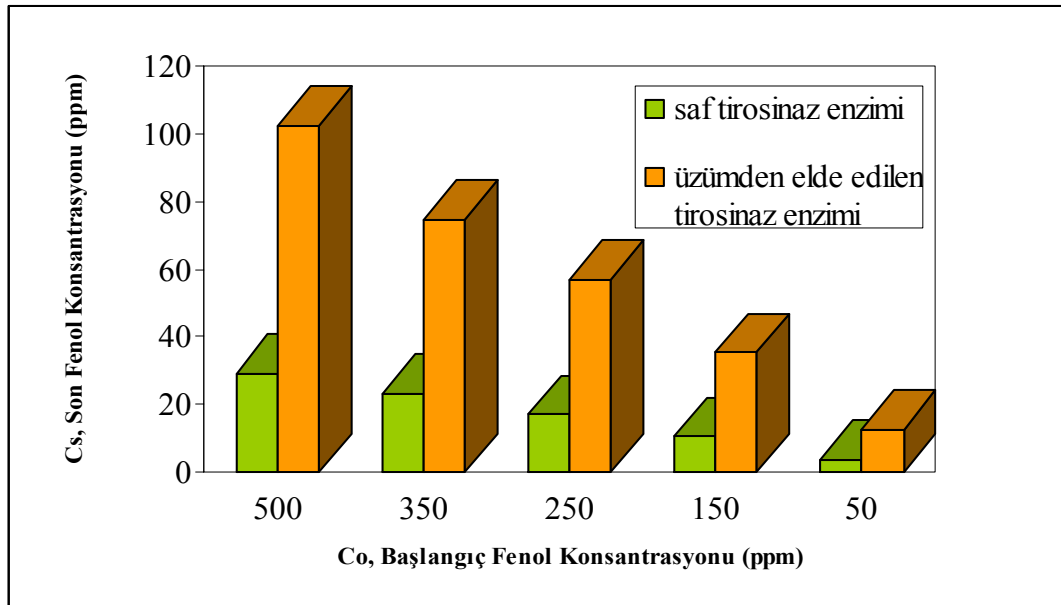
Başlangıç Fenol Konsantrasyonu, C ₀ (ppm)	Enzim Miktarı (U/ml)	Son Fenol Konsantrasyonu, C _s (ppm)	Fenol Uzaklaştırma Verimi (%)
50	10	12,61	74,78
150	16	35,47	76,35
250	30	57,04	77,18
350	44	74,78	78,63
500	54	102,60	79,48

Çizelge 5.20'de, aynı enzim miktarları kullanılarak, saf tirozinaz enziminin ve üzümde elde edilen tirozinaz enziminin fenol arıtımındaki etkileri karşılaştırılmıştır. Bu sonuçlardan görüleceği üzere, üzümde elde edilen tirozinaz enzimi ile yapılan fenol uzaklaştırma verimleri, saf tirozinaz enzimi ile yapılan fenol uzaklaştırma verimlerinden daha düşük çıkmıştır. Bu verimlerin daha düşük ya da farklı olmasının nedeni, elde edilen karışımda tirozinaz enzimi dışında bazı safsızlıkların olması ve saf tirozinaz enziminin kaynağının mantar kaynaklı olmasıdır. Safsızlıklar, enzimin fenol arıtımındaki etkinliğini olumsuz etkilemektedir. Ancak enzim miktarı artırılarak fenol uzaklaştırma verimini artırmanın mümkün olacağı düşünülmektedir.

Çizelge 5.20. Üzümde elde edilen tirozinaz enzimi ile saf tirozinaz enziminin fenol uzaklaştırma verimi üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması (pH=7, T=25 °C, t=3 saat)

		Üzümde Elde Edilen Tirozinaz Enzimi		Saf Tirozinaz Enzimi	
Başlangıç Fenol Konsantrasyonu, C ₀ (ppm)	Enzim Miktarı (U/ml)	Son Fenol Konsantrasyonu, C _s (ppm)	Fenol Uzaklaştırma Verimi (%)	Son Fenol Konsantrasyonu, C _s (ppm)	Fenol Uzaklaştırma Verimi (%)
50	10	12,61	74,78	3,82	92,36
150	16	35,47	76,35	10,60	92,93
250	30	57,04	77,18	17,18	93,13
350	44	74,78	78,63	23,25	93,36
500	54	102,60	79,48	29,24	94,15

Çizelge 5.20 ve Şekil 5.17'den görüldüğü üzere farklı başlangıç fenol konsantrasyonları C₀ (50 – 500 ppm) için 3 saatlik reaksiyon süresi sonunda, son fenol konsantrasyonu (C_s), saf tirozinaz enzimi kullanıldığında üzümde elde edilen tirozinaz enzimine göre yaklaşık 3,5 kat daha azdır.

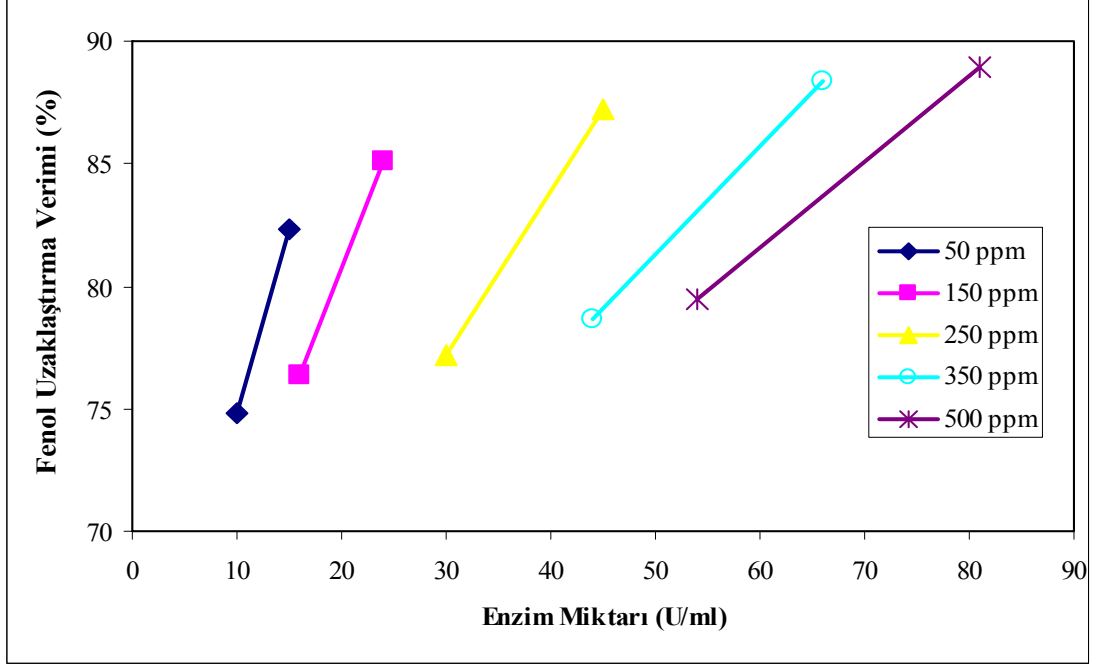


Şekil 5.17. Farklı başlangıç fenol konsantrasyonlarında, üzümde elde edilen tirozinaz enzimi ile saf tirozinaz enziminin son fenol konsantrasyonu üzerine etkisi (pH=7, T=25 °C, t=3 saat)

Saf tirozinaz enzimi kullanılarak yapılan fenol giderimi için gerekli olan enzim miktarı, üzümde elde edilen tirozinaz enzimi ile fenol giderimi için kullanıldığında yaklaşık % 75-79 civarında fenol uzaklaştırma verimi elde edilmiştir. Bunun için, enzim miktarı her bir başlangıç fenol konsantrasyonu için % 50 artırılarak fenol uzaklaştırma verimi üzerindeki etkisi incelenmiş ve yapılan deney sonuçları Çizelge 5.21’de sunulmuştur. Böylece enzim miktarının artması ile sulu çözeltilerden fenol gideriminde üzümde elde edilen tirozinaz enzimi ile yaklaşık % 82-89 civarında fenol uzaklaştırma verimi elde edilmiştir. Ayrıca enzim miktarının artırılması sonucu fenol uzaklaştırma verimi üzerine etkisi Şekil 5.18’de gösterilmiştir.

Çizelge 5.21. Üzümde PVP (%3, a/h) ve Triton X-100 (%4,5, h/h) kullanılarak elde edilen tirozinaz enzimi miktarının artırılması sonucu fenol uzaklaştırma verimi üzerine etkisi (pH= 7, T = 25 °C, t=3 saat)

Başlangıç Fenol Konsantrasyonu (C ₀) (ppm)	Enzim Miktarı (U/ml)	Son Fenol Konsantrasyonu (C _s) (ppm)	Fenol Uzaklaştırma Verimi(%)
50	15	8,82	82,36
150	24	22,29	85,14
250	45	31,88	87,25
350	66	40,75	88,36
500	81	55,13	88,97



Şekil 5.18. Üzümde elde edilen tirozinaz enzimi miktarının farklı başlangıç konsantrasyonlarındaki fenol uzaklaştırma verimi üzerine etkisi (pH= 7, T = 25 °C , t = 3 saat)

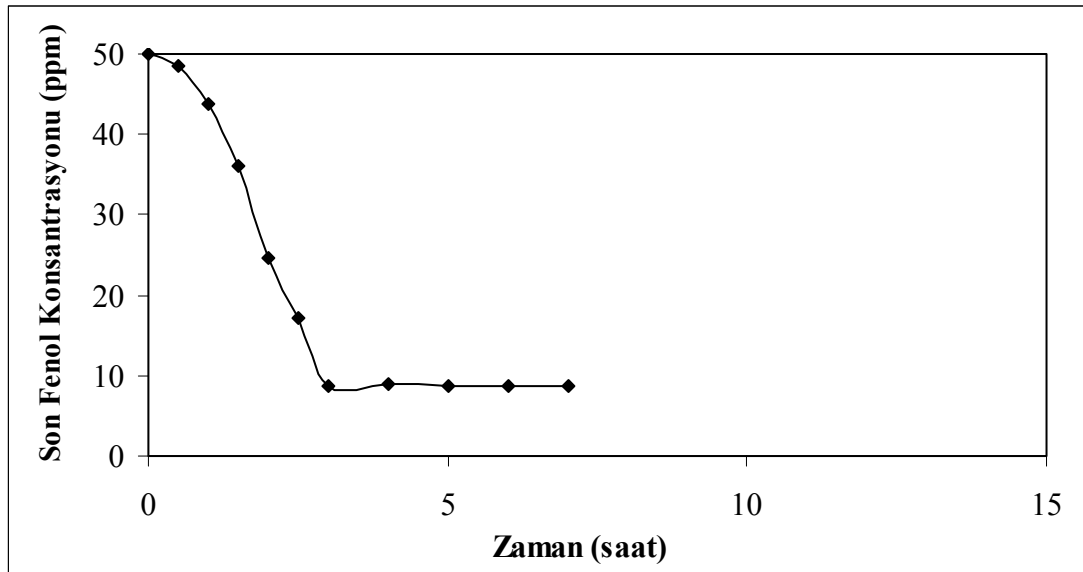
Şekil 5.18'den görüldüğü üzere, her bir başlangıç fenol konsantrasyonu için enzim miktarı % 50 artırıldığında yaklaşık % 15 – 20 arasında fenol uzaklaştırma veriminde bir artış görülmüştür. Böylece fenol uzaklaştırma veriminde istenilen seviyelere ulaşmak için, belirlenen miktarlardan daha fazla enzim miktarı kullanarak çalışmalara başlanmalıdır.

5.4.2. Üzümde elde edilen tirozinaz enzimi ile yapılan fenol deneylerinde gerekli sürenin belirlenmesi

Fenol deneylerinde yeterli zamanın belirlenmesi için değişik başlangıç konsantrasyonlarında fenol çözeltileri hazırlanmıştır. Başlangıç fenol konsantrasyonu 50, 250 ve 500 ppm olan fenol çözeltileri için üzümde elde edilen tirozinaz enzimi ile gerekli miktarlar kullanılarak, 25 °C sıcaklıkta, fenol giderimi için zamana karşı son fenol konsantrasyonları Çizelge 5.22 – Çizelge 5.24'de gösterilmiştir.

Çizelge 5.22. Üzümünden elde edilen tirozinaz enzimi kullanılarak yapılan fenol deneylerinde gerekli sürenin belirlenmesi için yapılan deney sonuçları ($C_0=50$ ppm, enzim konsantrasyonu=15 U/ml, pH=7, $T=25$ °C)

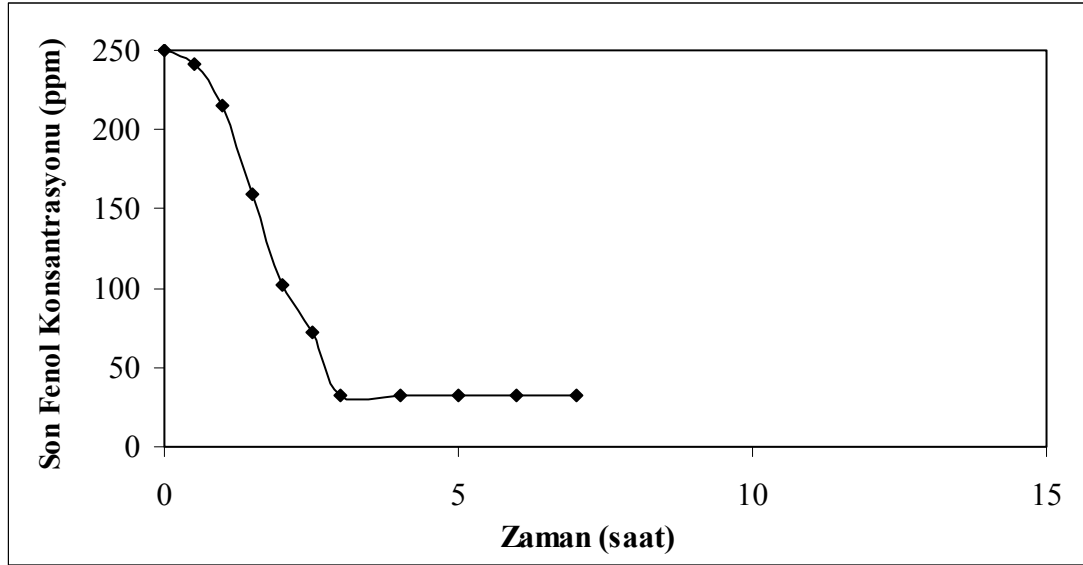
Başlangıç Fenol Konsantrasyonu, C_0 (ppm)	Zaman (saat)	Son Fenol Konsantrasyonu, C_s (ppm)	Fenol Uzaklaştırma Verimi (%)
50	0	50	100
	0,5	48,51	97,02
	1	43,81	87,62
	1,5	35,95	71,85
	2	24,69	50,62
	2,5	17,21	34,42
	3	8,82	17,64
	4	8,85	17,70
	5	8,76	17,52
	6	8,79	17,58
	7	8,82	17,64



Şekil 5.19. Zamanın son fenol konsantrasyonu üzerine etkisi, üzümünden elde edilen enzim ile ($C_0=50$ ppm, enzim konsantrasyonu=15 U/ml, pH=7, $T=25$ °C)

Çizelge 5.23. Üzümde elde edilen tirozinaz enzimi kullanılarak yapılan fenol deneylerinde gerekli sürenin belirlenmesi için yapılan deney sonuçları ($C_0=250$ ppm, enzim konsantrasyonu=45 U/ml, pH=7, T=25 °C)

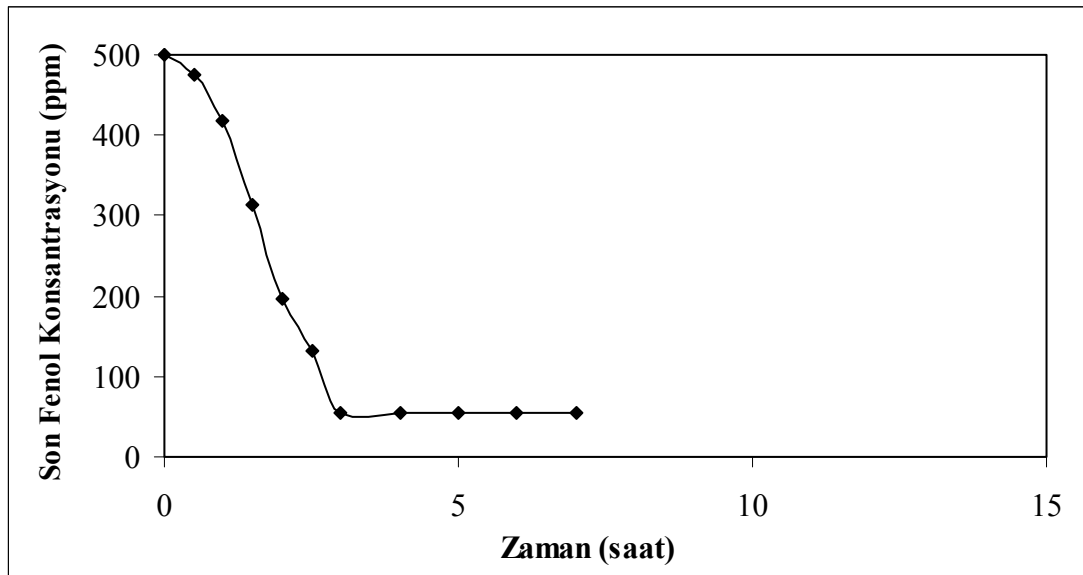
Başlangıç Fenol Konsantrasyonu, C_0 (ppm)	Zaman (saat)	Son Fenol Konsantrasyonu, C_s (ppm)	Kalan Fenol Verimi (%)
250	0	250	100
	0,5	241,11	96,44
	1	214,74	85,90
	1,5	159,63	63,85
	2	101,39	40,56
	2,5	71,90	28,76
	3	31,88	12,75
	4	31,80	12,72
	5	31,96	12,77
	6	31,80	12,72
	7	31,72	12,69



Şekil 5.20. Zamanın son fenol konsantrasyonu üzerine etkisi, üzümde elde edilen enzim ile ($C_0=250$ ppm, enzim konsantrasyonu=45 U/ml, pH=7, T=25 °C)

Çizelge 5.24. Üzümünden elde edilen tirozinaz enzimi kullanılarak yapılan fenol deneylerinde gerekli sürenin belirlenmesi için yapılan deney sonuçları ($C_0=500$ ppm, enzim konsantrasyonu=81 U/ml, pH=7, $T=25$ °C)

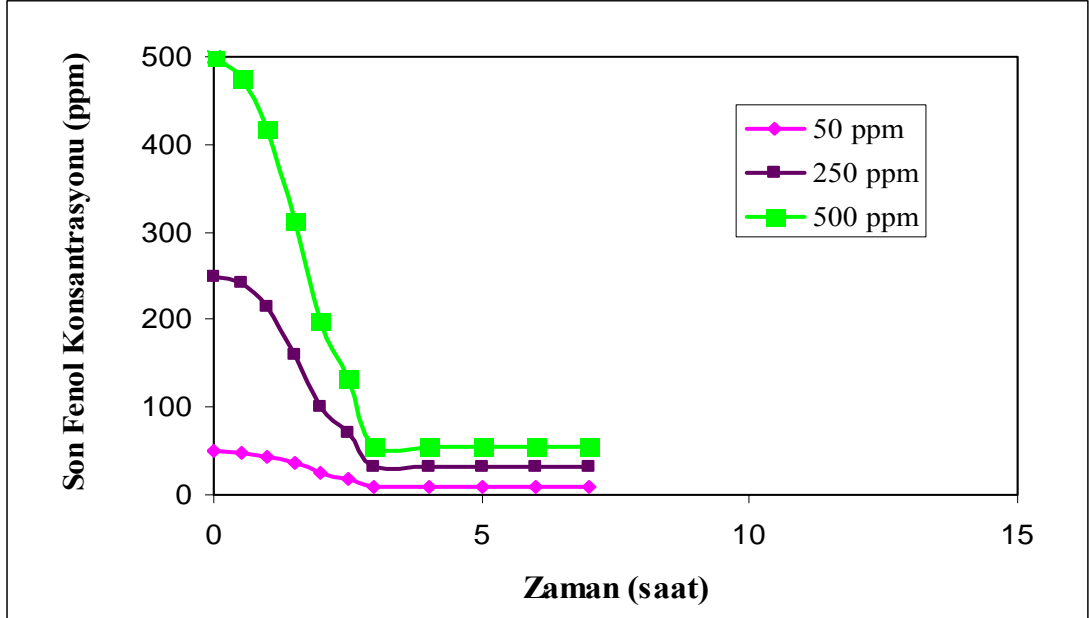
Başlangıç Fenol Konsantrasyonu (C_0) (ppm)	Zaman (saat)	Son Fenol Konsantrasyonu (C_s) (ppm)	Kalan Fenol Verimi(%)
500	0	500	100
	0,5	474,60	94,92
	1	417,96	83,59
	1,5	313,80	62,74
	2	197,49	39,50
	2,5	132,77	26,57
	3	55,13	11,03
	4	55,45	11,09
	5	55,29	11,06
	6	55,61	11,12
	7	55,29	11,06



Şekil 5.21. Zamanın son fenol konsantrasyonu üzerine etkisi, üzümünden elde edilen enzim ile ($C_0=500$ ppm, enzim konsantrasyonu=81 U/ml, pH=7, $T=25$ °C)

Çizelge 5.22 – Çizelge 5.24’den anlaşılacağı üzere, 3 saatin üzerindeki zamanlarda son fenol konsantrasyonlarında belirgin bir değişim olmamıştır. Buna göre üzümde elde edilen enzim kullanılarak yapılan fenol giderimi için de yeterli zaman 3 saat olarak belirlenmiştir.

Şekil 5.22’de farklı başlangıç konsantrasyonlarındaki fenol çözeltileri için üzümde elde edilen tirozinaz enziminin kullanılması ile zamanın son fenol konsantrasyonu üzerine etkisi gösterilmiştir.



Şekil 5.22. Farklı başlangıç fenol konsantrasyonlarında zamanın son fenol konsantrasyonuna etkisi, üzümde elde edilen enzimin kullanılması ile (pH=7, T=25 °C)

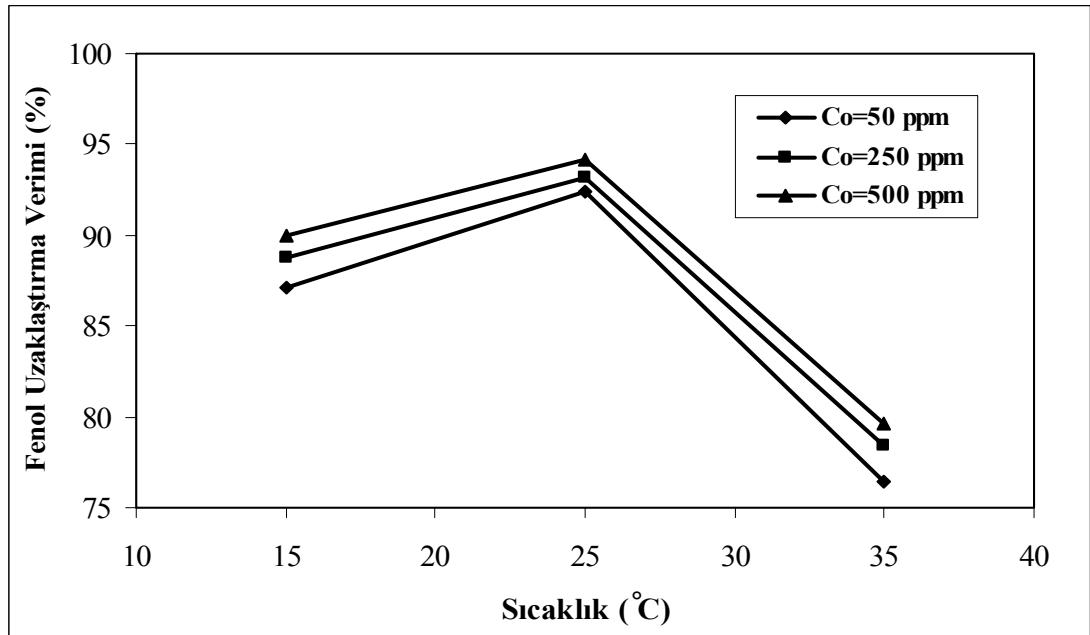
5.5. Sıcaklığın Enzimatik Yolla Fenol Uzaklaştırma Verimi Üzerine Etkisi

Deneyler, laboratuvar koşullarında sabit 25 °C sıcaklıkta yapılmıştır. Çünkü enzimin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık daha önceki çalışmalardan ve bizim yaptığımız çalışmalardan 25 °C olarak belirlenmiştir. Ancak, mevsimsel hava değişiklikleri atıksu arıtma tesislerinin performansını etkilemektedir. Bunun için sıcaklığın, enzim aktivitesi üzerine dolayısıyla fenol uzaklaştırma verimi üzerine etkilerini incelemek amacıyla, 15 °C, 25 °C ve 35 °C sıcaklıklarında deneyler tekrarlanmıştır. 15 °C,

25 °C ve 35 °C’de yapılan deney sonuçlarının karşılaştırılması amacıyla, son fenol konsantrasyonu ve fenol uzaklaştırma verimi cinsinden Çizelge 5.25’de sunulmuştur.

Çizelge 5.25. Enzimatik yolla fenol uzaklaştırma verimi üzerine sıcaklığın etkisi, saf tirozinaz enziminin kullanılması ile (pH=7, t=3 saat)

Başlangıç Fenol Konsantrasyonu, C _o (ppm)	Enzim Miktarı (U/ml)	Son Fenol Konsantrasyonu, C _s (ppm) (t = 3 saat)			Fenol Uzaklaştırma Verimi (%)		
		T=15°C	T=25°C	T=35°C	T=15°C	T=25°C	T=35°C
50	10	6,44	3,82	11,79	87,12	92,36	76,42
250	30	28,13	17,18	53,85	88,75	93,13	78,46
500	54	50,10	29,24	101,64	89,98	94,15	79,67



Şekil 5.23. Farklı başlangıç fenol konsantrasyonlarında, sıcaklığın fenol uzaklaştırma verimi üzerine etkisi (pH = 7, t = 3 saat)

Şekil 5.23’den görüldüğü üzere, farklı başlangıç konsantrasyonlarındaki fenol çözeltileri için sıcaklık 25 °C’nin üstüne çıktığında veya altına düştüğünde fenol uzaklaştırma performansında azalma gözlenmiştir. Atıksulardan fenollerin

uzaklaştırılmasında bu değişim mutlaka gözönünde bulundurulmalıdır. Fenol uzaklaştırma veriminin düştüğü sıcaklıklarda enzim miktarı değiştirilerek fenol uzaklaştırma veriminde artış sağlanabilir.

Valero ve ark. (1988) ve Rapeanu ve ark. (2004) maksimum enzim aktivitesinin görüldüğü sıcaklığı 25°C olarak belirlemişlerdir. Bu değerin altında ve üstünde enzim aktivitesinde belirgin bir azalma olduğunu söylemişlerdir. Bu literatür bilgilerine paralel olarak, yaptığımız çalışmada sıcaklığın 25 °C' nin altına inmesi veya üstüne çıkmasıyla fenol gideriminde düşüş gözlenmiştir. Bunun sebebi enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığın bir başka deyişle enzimin optimum sıcaklığının 25°C olmasından dolayıdır. Optimum sıcaklığın altındaki ve üstündeki sıcaklıklarda enzim aktivitesi düşmekte dolayısıyla da fenol uzaklaştırma veriminde azalma olmaktadır [38,39].

Ayrıca Çizelge 5.25'de görüldüğü üzere başlangıç fenol konsantrasyonu arttıkça, fenol uzaklaştırma verimi de artmıştır. Başlangıç fenol konsantrasyonunun artması, kütle transferi itici gücünü arttırmakta, dolayısıyla fenol moleküllerinin enzimatik dönüşümü artmaktadır.

Başlangıç fenol konsantrasyonunun artması ile fenol uzaklaştırma veriminin artmasının nedeni, bir başka açıdan da düşünülebilir. Bölüm 2.2.2'de, Eş. 2.1'deki Michaelis-Menten Bağıntısı kullanılarak 50, 250 ve 500 ppm başlangıç konsantrasyonlarındaki fenol çözeltileri için başlangıç reaksiyon hızları hesaplandığında sırasıyla; $V_{50\text{ppm}}=9,04 \times 10^{-4}$ mol/Ldak, $V_{250\text{ppm}}=2,84 \times 10^{-3}$ mol/Ldak, $V_{500\text{ppm}}=3,88 \times 10^{-3}$ mol/Ldak olarak bulunmuştur (Bkz. EK-7). Bu sonuçlardan görüleceği üzere, 50 ppm'den 500 ppm'e doğru gidildikçe başlangıç reaksiyon hızı artmaktadır. Başlangıç reaksiyon hızının artması moleküller arası çarpışma olasılığını arttırmakta böylece fenol moleküllerinin enzimatik dönüşümü artmaktadır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmalarda amaç, tirozinaz enziminin üzümde ekstraksiyonun ve saflaştırılmasının yapılmasıdır. Böylece daha ucuz maliyetle ekstrakte edilen enzim, uygulama alanlarından biri olan sulu ortamlardan fenollerin uzaklaştırılmasında kullanılmıştır. Değişik parametreler kullanılarak enzimatik yolla fenol giderimi için en iyi koşullar belirlenmiştir. Buna göre 25 °C sıcaklıkta 3 saatlik reaksiyon süresinde ve pH = 7'deki sodyum fosfat tamponunda, fenol aralığı 50-1000 ppm arasında değişen fenol çözeltilerinin, saf tirozinaz enzimi ve üzümde elde edilen tirozinaz enzimi kullanılarak sulu ortamlardan uzaklaştırılması sağlanmıştır. Saf tirozinaz enziminin ve üzümde elde edilen tirozinaz enziminin fenol uzaklaştırma verimi üzerine etkileri incelenmiş ve birbirleriyle karşılaştırma imkanı bulunmuştur.

Üzümde tirozinaz enziminin ekstraksiyon ve saflaştırma aşamaları; sırasıyla, ham enzim ekstraktının eldesi, Triton X-100 ve PVP (polivinil pirrolidon) kombinasyonu ile saflaştırma ve son aşama olan amonyum sülfat çöktürmesidir. Maksimum spesifik aktivite değerine, Triton X-100 ve PVP konsantrasyonunun etkileri incelenmiştir. İstatiksel olarak, Box-Wilson deneysel tasarımına göre yapılan modelleme çalışması sonucu elde edilen maksimum spesifik aktivite değeri 3252,20 U/mg protein olarak bulunmuştur. Bu aktivitenin elde edildiği PVP ve Triton X-100 konsantrasyonu % 3,41 (a/h) ve % 5,12 (h/h) olarak belirlenmiştir. Geleneksel deneylerde ise, en yüksek spesifik aktivite değeri (2307,69 U/mg protein), % 2 (a/h) konsantrasyonunda PVP ve % 6 (h/h) konsantrasyonunda Triton X-100 kullanıldığında elde edilmiştir. Geleneksel deneysel planda sabit % 2 (a/h) PVP konsantrasyonlarında çalışılmıştır. İstatiksel deneysel tasarım planına göre ise, maksimum spesifik aktivite değerinin görüldüğü PVP konsantrasyonu % 3,41 (a/h) olarak belirlenmiştir. Bu nedenle ileriki çalışmalarda, PVP değişkeninin daha yüksek konsantrasyonlarında çalışmalar yapılabilir. Böylece enzimin spesifik aktivitesinin dolayısıyla saflaştırma oranının artması ile daha yüksek verimle sulardan fenollerin giderileceği düşünülmektedir.

İstatiksel deneysel tasarım planına göre yapılan deneylerde, üzümünden tirozinaz enziminin ekstraksiyonu ve saflaştırılmasında 2. aşama olan PVP ve Triton X-100 kombinasyonu ile saflaştırma aşamasında, maksimum spesifik aktivite değeri için en uygun koşullar % 3 (a/h) PVP ve % 4,5 (h/h) Triton X-100 kullanıldığında belirlenmiştir. Daha sonra saflaştırmada son aşama olan amonyum sülfat çöktürmesi sonucu üzümünden 17,64 kat saflaştırma yapılarak 250 gram üzümünden 10,70 miligram tirozinaz enzimi elde edilmiştir. % 3 (a/h) PVP ve % 4,5 (h/h) Triton X-100 kullanıldığı koşullarda elde edilen toplam katı (protein) ağırlığı 16,28 mg olarak bulunmuştur. Böylece ürünün içindeki tirozinaz enzimi yüzdesi % 66 olarak belirlenmiştir. Bu enzimin spesifik aktivite değeri 8891,28 U/mg protein olarak bulunmuştur.

Sulu ortamlardan fenollerin uzaklaştırılmasında, değişik başlangıç konsantrasyonlarında fenol çözeltileri için gerekli enzim miktarları tespit edilmiş ve bu enzim miktarları kullanılarak maksimum fenol uzaklaştırma veriminin elde edildiği için sıcaklık 25 °C olarak belirlenmiştir. Ancak, mevsimsel hava değişiklikleri atıksu arıtma tesislerinin performansını etkilemektedir. Sıcaklık 25 °C'den 15 °C'ye düşürüldüğünde ya da 35 °C'ye çıkarıldığında fenol uzaklaştırma veriminde belirgin bir azalma görülmüştür. Bu nedenle bu değişim mutlaka gözönünde bulundurulmalıdır.

Enzimatik yolla fenol uzaklaştırmada incelenen diğer bir parametre bekleme süresidir. Saf tirozinaz enzimi ve üzümünden elde edilen tirozinaz enzimi kullanıldığında 3. saate kadar son fenol konsantrasyonu azalırken, 3. saatten sonra son fenol konsantrasyonunda belirgin bir değişim olmamıştır. Bu nedenle enzimatik yolla fenol uzaklaştırmada 3 saatlik bekleme süresi yeterli bulunmuştur.

Bu çalışmada değişik başlangıç fenol konsantrasyonları için, sulu ortamlardan fenollerin uzaklaştırılması deneyleri pH=7'de yapılmıştır. Çeşitli sanayi atıksularının pH'ları örneğin; gıda sanayisi atıksuları pH=7,32-7,85, zeytinyağı işletmeleri atıksuları pH=asidik, 4,99, 5,22, 5,60, 5,20, 5,52, evsel atık suları pH=6,5-7,5, süt

endüstrisi atıksuları pH=5,5-6,5, tekstil atıksuları pH=asidik veya bazik olmakla birlikte, tüm atıksular taze olduklarında zayıf alkalidirler ve pH'ları 7,0-8,8'dir. Bu sanayi atıksularının pH'ları nötr pH'a çeşitli maddeler eklenerek ayarlanıp fenollerin sulardan giderimi sağlanabilir.

Bu çalışmanın sonucunda, üzümde elde edilen tirozinaz enzimi ile farklı başlangıç fenol konsantrasyonlarında 25 °C sıcaklıkta ve 3 saatlik bekleme süresi sonunda yaklaşık % 82-89, piyasadan alınan saf tirozinaz enzimi ile yaklaşık % 92-95 verimle sulardan fenollerin giderimi sağlanmıştır. Üzümde elde edilen tirozinaz enzimiyle yapılan fenol giderimi saf tirozinaz enzimi ile yapılan fenol giderimine göre daha düşük çıkmıştır. Bu nedenle üzümde elde edilen tirozinaz enzimi miktarı her bir başlangıç fenol konsantrasyonu için artırıldığında fenol uzaklaştırma veriminde artış gözlenmiştir. Bu nedenle ileriki çalışmalarda, farklı başlangıç fenol konsantrasyonları için belirlenen enzim miktarlarının daha yüksek konsantrasyonları ile çalışmalara başlanırsa fenol uzaklaştırma veriminde daha iyi sonuçların elde edilebileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Ikehata, K., “Characterization of tyrosinase for the treatment of aqueous phenols”, *Canada Bioresource Technology*, 74: 191-199 (2000).
2. Karam, J., A., “Potential applications of enzymes in waste treatment”, *J.Chem. Tech. Biotechnol* , 69: 141-153 (1997).
3. Lineweaver, H., Burk, D., “The determination of enzyme dissociation constant” *J.Am.Chem. Soc.*, 56: 658-662 (1934).
4. Whitaker, J., R., “Principles of enzymology for the food sciences 2nd ed.”, *Marcel Dekker*, New York, 2-4, 543 (1994).
5. Wong-Dominic W., S., “Food enzymes structure and mechanism 1st ed.”, *Chapman & Hall*, New York, 271-272 (1995).
6. Matoba Y., Kumagi, T., “Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis”, *J. Biol. Chem.*, 281(13): 8981-8990 (2006).
7. Sherman, T., O., Vaughn, K., C., Duke, S., O., “A limited survey of the phylogenetic distribution of polyphenol oxidase”, *Phytochemistry*, 30: 2499-2506 (1991).
8. Osuga, D., Van Der Shaaf, A., Whitaker, J., R., “Protein structure-function relationships in foods”, *Blackie Academic & Professional*, Glasgow, 62-88 (1994).
9. Sugumaran, M., “Molecular mechanism for cuticular sclerotization”, *Adv. Insect Physiol.*, 21(9): 179-231 (1988).
10. Sugumaran, M., “Defense molecules 1st ed. ”, *Wiley-Liss*, New York, 47-62 (1990).
11. Yada, R., Y., Jackman, R., L., Smith, J., L., “Protein structure-function relationships in foods 1st ed.”, *Chapman and Hall*, London, 38 (1994).
12. Duran N., Esposito E., “Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review”, *Applied Catalysis B: Environmental*, 28: 83-99 (2000).
13. Eskin, N., A., “Biochemistry of foods 4th ed.”, *Academic Press*, New York 90-92 (1990).

14. Mayer, A., M., Harel, E., “Polyphenol oxidases in plants”, *Phytochemistry*, 18: 193-215 (1979).
15. Vámos-Vigyázó. L., “Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables”, *Critic. Rev. Food Science*, 15: 49-127 (1981).
16. Kahn, V., Andrawis, A., “Inhibition of mushroom tyrosinase by tropolone”, *Phytochemistry*, 24: 905-908 (1985).
17. Zawistowski, J., Biliaderis, C., G., Eskin, N., A., “Oxidative enzymes in foods 3rd ed.”, *Elsevier Applied Science*, London and New York, 217-273 (1991).
18. Dewey, D., L., Butcher, F., W., Galphine, A., R., “Hydroxyanisole-induced regression of the Harding-Passey melanoma in mice”, *J. Pathol.*, 122: 117-128 (1977).
19. Othmer, K., “Encyclopedia of Chemical Technology 3rd ed.”, *Wiley – Interscience*, U.S.,17: 373-382 (1982).
20. Fessenden, R., J., Fessenden, J., S., Logue, M., W., “Organik Kimya 6th ed.”, Tahsin Uyar, *Brooks/Cole Publishing Company*, Boston, 517 – 518 (2001).
21. Sokol W., “Oxidation of phenol by P.Putida ”, *Biotech. Bioeng.*, 32: 1065-1077 (1986).
22. Patterson, J., W., “Wastewater Treatment Technology 2nd ed.”, *Butterworth Publishers.*, U.S., 371 – 389 (1985).
23. Atlow, S., C., Banadonna - Aparo, L., Klibanov, A., M., “Dephenolization of industrial wastewaters catalysed by polyphenol oxidase”, *Biotechnology and Bioengineering*, 26: 599-603 (1984).
24. Klibanov, A., M., Alberti, B., N., Morris, E., D., Felshin, L., M., “Enzymatic removal of toxic phenols and anilines from wastewaters”, *J. Appl. Biochem.* ,2: 414-421 (1980).
25. Klibanov, A., M., Morris, E., D., “Horseradish peroxidase for the removal of carcinogenic aromatic amines from water”, *Enzyme Microb. Technol.*, 3: 119-125 (1981).
26. Klibanov, A., M., Tu, T., M., Scott, K., P., “Peroxidase catalysed removal of phenols from coal conversion wastewater”, *J. of Science*, 221: 259-261 (1983).
27. Nicell, J., A., Al-Kassim, L., Bewtra, J., K., Taylor, K., E., “Wastewater treatment by enzyme catalysed polymerization and precipitation”, *Biotech. Bioeng.*, 7(1): 1-8 (1993).

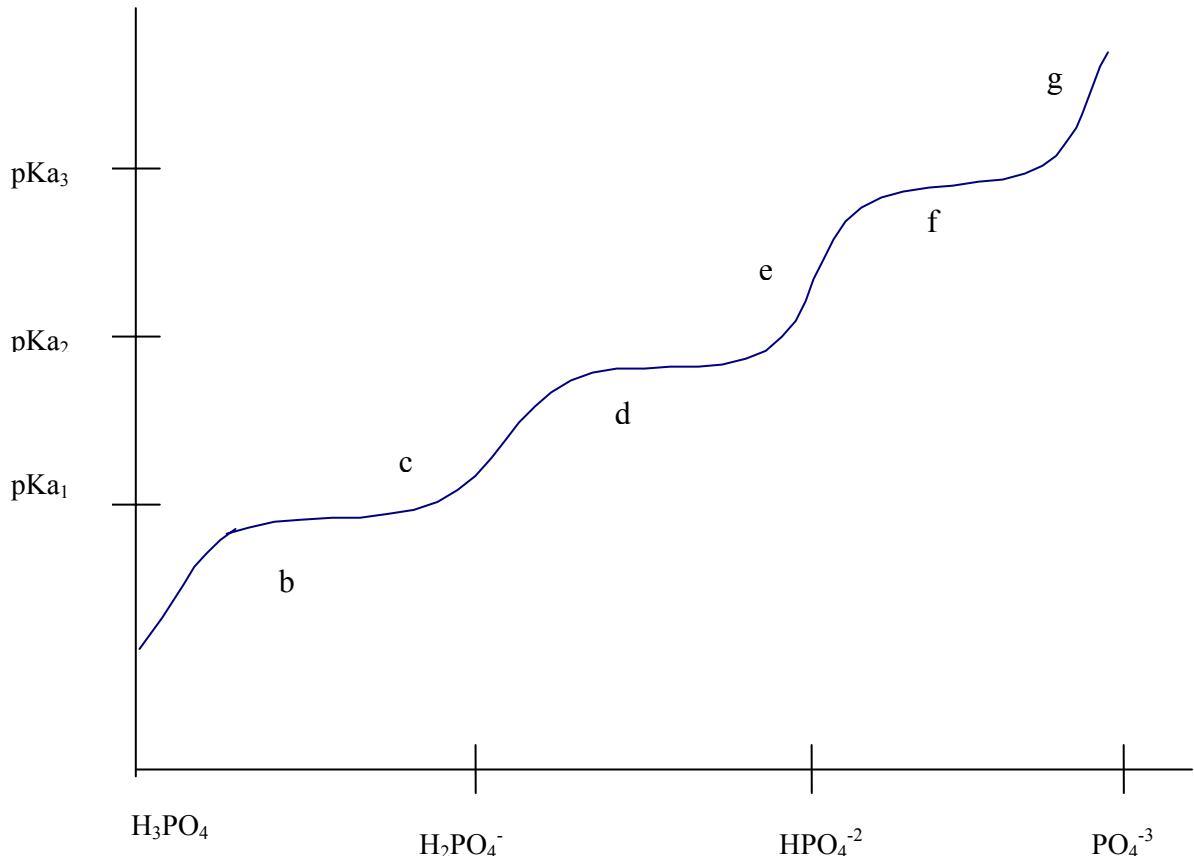
28. Sun, W., Q., Payne, G., F., Moas, M., Chu, J., H., Wallace, K., K., “Tyrosinase reaction/chitosan adsorption for removing phenols from wastewater”, *Biotechnology Progress*, 8: 179-186 (1992).
29. Samsunlu, A., “Çevre Mühendisliği Kimyası”, *SAM – Çevre Teknolojileri Merkezi Yayınları*, İstanbul, 12, 86 – 88 (1999).
30. Stryer, L., “İleri Teknoloji Malzemeleri 3rd ed.”, *W.H. Freeman and Company*, New York, 44-46 (1998).
31. Beşel, E., “Triton X-114 sulu iki-faz yönteminin mantardan elde edilen polifenoloksidazın eldesi için kullanımı”, Yüksek Lisans Tezi, *ODTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 26, (2003).
32. Temizkan, G., Arda, N., “Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, First Edition”, *Biyogem*, İstanbul, 8-12 (1999).
33. Barın, A., Y., “Fenolün sulu ortamlardan koagülasyon yöntemi ile uzaklaştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 36 – 39 (2006).
34. Korkmaz, K., “Sulu iki faz sistemlerde protein dağılımı”, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 34 – 39, 44 (1999).
35. Gündüz, U., Korkmaz, K., “Bovine serum albumin partitioning in an aqueous two-phase system: Effect of pH and sodium chloride concentration”, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 743: 255-258 (2000).
36. Wada, S., Ichikawa, H., Tatsumi, K., “Removal of phenols from wastewater by soluble and immobilized tyrosinase”, *Biotechnology and Bioengineering*, 42: 854-858 (1993).
37. Zhang, X., Flurkey, W., H., “Phenoloxidasen in portabella mushrooms”, *Journal of Food Science*, 62: 97-100 (1997).
38. Valero, E., Varon, R., Garcia-Carmona, F., “Characterization of polyphenol oxidase from airen grapes”, *Journal of Food Science*, 53: 1482-1485 (1988).
39. Rapeanu, G., Loey, A., V., Smout, C., Hendrickx, M., “Biochemical characterization and process stability of polyphenoloxidase extracted from Victoria grape”, *Food Chemistry*, 94: 253-261(2004).
40. Delicado, E., N., “Triton X-114-aided purification of latent tyrosinase”, *Journal of Chromatography B*, 680: 105-112 (1996).

41. Scopes, R., "Protein Purification 1st ed.", *La Trobe University*, New York, 261-263, (1982).
42. Dilan, E., "Polimer-tuz sistemlerinde protein dağılımı", Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 71-73, (2005).
43. Bradford, M., M., "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254 (1976).
44. Günendi, G., "Polifenoloksidaz enziminin mantardan izole edilmesi ve mikroenkapsülasyon tekniği ile immobilize edilerek özelliklerinin araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 15, (1996).

EKLER

EK – 1 Tampon çözeltilerle pH ayarlanması

Enzim – sodyum fosfat sistemlerinde pH istenilen değerlerde sabit tutulabilmesi için fosfat stok çözeltileri esas alınmıştır. Aşağıdaki grafikte görüldüğü gibi istenilen pH değerine yakın pKa değerleri ve uygun iyonlar kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır [42].



Şekil 1.1. H₃PO₄ titrasyon eğrisi

Bilinen pH değeri ve uygun pKa değerinden iyon konsantrasyonu oranları aşağıdaki formülle hesaplanabilir.

EK – 1 (Devam) Tampon çözeltilerle pH ayarlanması

$$pH = pKa_1 + \log \frac{[H_2PO_4^-]}{[H_3PO_4]} \quad (1.1)$$

$$pH = pKa_2 + \log \frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]} \quad (1.2)$$

$$pH = pKa_3 + \log \frac{[PO_4^{3-}]}{[HPO_4^{2-}]} \quad (1.3)$$

H_3PO_4 için $pKa_1 = 2,12$, $pKa_2 = 7,20$, $pKa_3 = 12,32$ olarak verilmiştir. İstenilen pH değeri sayısal olarak hangi pKa değerine daha yakınsa ona uygun formülün kullanılması uygundur. Uygun pKa ve formül seçildikten sonra formülden iyon oranı hesaplanır. Çözeltideki toplam fosfat konsantrasyonları hesaplanır. İyon konsantrasyonundan bu iyonları içeren stok çözelti miktarına geçilir.

Örnek hesaplama:

pH = 7,0 ve sodyum fosfat konsantrasyonu 0,1 M olan çözelti hazırlanması için

$V_{\text{toplam}} = 100$ ml için,

Toplam fosfat miktarı = (0,1) $(1 \cdot 10^{-1}) = 1 \cdot 10^{-2}$ mol fosfat

Eş. 1.2' deki pH ve pKa_2 değerleri yerine konulduğunda,

$$7 = 7,20 + \log \frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]}$$

EK – 1 (Devam) Tampon çözeltilerle pH ayarlanması

eşitliği elde edilir. Eşitlikten $\frac{[HPO_4^{-2}]}{[H_2PO_4^-]}$ oranı 0,63 olarak hesaplanır. Toplam fosfat miktarı 1.10^{-2} mol olduğuna göre bunu 63/163' si HPO_4^{-2} mol sayısını verir.

$$1.10^{-2} \frac{63}{163} = 3,865.10^{-3} \text{ mol } HPO_4^{-2}$$

$3,865.10^{-3}$ mol HPO_4^{-2} sağlanması için 0,2M' lık $Na_2HPO_4.12H_2O$ çözeltisinden 19,3 ml kullanılmıştır.

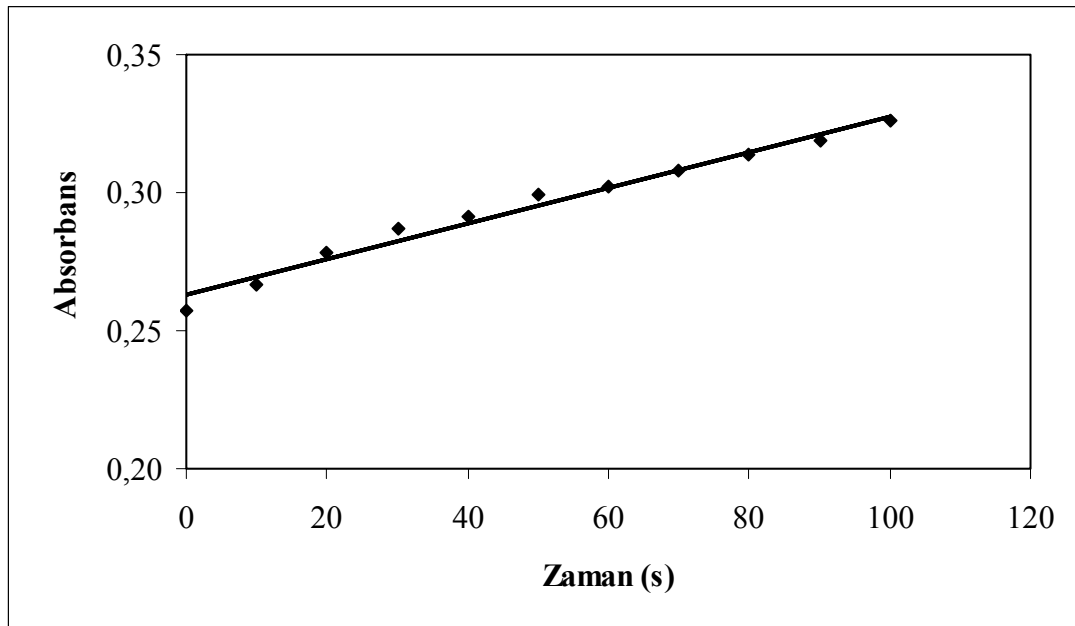
Toplam fosfatın 100/162'si ise $H_2PO_4^-$ mol sayısını vermektedir.

$$1.10^{-2} \frac{100}{163} = 6,135.10^{-3} \text{ mol } H_2PO_4^-$$

$6,135.10^{-3}$ mol $H_2PO_4^-$ sağlanması için 0,2M' lık NaH_2PO_4 çözeltisinden 30,7 ml kullanılmıştır.

EK – 2 Enzim aktivite tayini

Tirosinaz enzimi için en uygun substratın katekol olduğu yapılan daha önceki bilimsel çalışmalardan belirlenmiştir [37]. Tirosinaz enziminin aktivite tayini, spektrofotometrik olarak 410 nm’de, 25 °C’de 3 ml reaksiyon karışımı içinde substrat olarak 0,2 M katekol, pH=7’de 0,05 M sodyum fosfat tamponu ve yeterli miktarda enzim kullanılarak yapılmıştır. Daha sonra zamana karşı absorbans değerleri grafiğe geçirilerek saf enzim aktivitesi grafiği çizilmiştir (Şekil 2.1). 1 ünite tirosinaz enziminin aktivitesi katekol substratı için, dakikada absorbansta 0,001 kadar artışa yol açan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.



Şekil 2.1. Saf enzim aktivitesi grafiği

EK – 3 Toplam protein miktarının belirlenmesi

Bir çözeltildeki total protein miktarının belirlenmesi, ayırma ve saflaştırma işlemlerinin seçiminde ve belli aşamalardaki protein veriminin ve saflığının kontrolünde önemli bir yer tutar. Çalışılan bir enzimin spesifik aktivitesi ve saflaştırma derecesinin belirlenmesinde total protein miktarının bilinmesi şarttır.

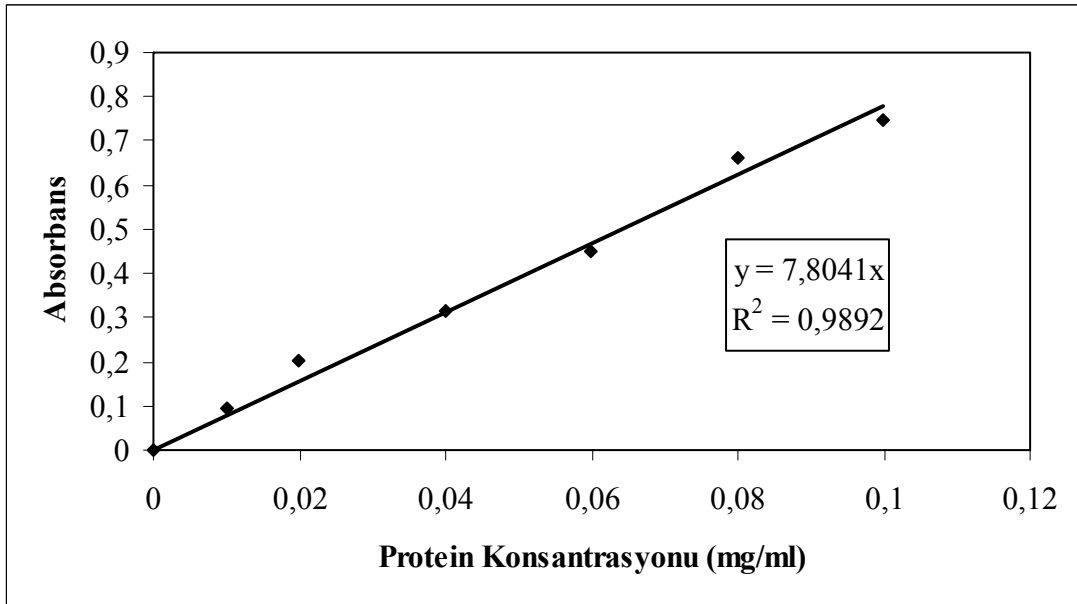
Protein konsantrasyonunun belirlenmesi için doğrudan veya dolaylı birçok yöntem geliştirilmiştir. Bunlar arasında, azot miktarının belirlenmesine dayalı ve dolaylı bir yöntem olan Kjeldahl yöntemi ile, kızılotesi spektrofotometri, türbidimetri, fluorimetri, refraktometri ve polarografi gibi doğrudan yöntemler sayılabilir. Primer yapısı bilinen bir proteinin aminoasit analizi yardımıyla da miktar tayinini yapmak olasıdır. Ancak triptofan, sistin ve sistein gibi asidik hidrolize çok duyarlı bazı aminoasitlere ait veriler güvenilir değildir. Ayrıca glutamin ve asparagin, hidrolizden sonra asit forma dönüşüklerinden bunlarla ilgili de hatalı sonuç alınabilir.

Son yıllarda yararlanılan teknikler, protein çözeltisinin UV absorpsiyonunun ölçülmesi veya bir belirteç ile reaksiyonu sonucu oluşan renkli bir bileşiğin görünür alanda spektral olarak belirlenmesi temeline dayanır. Spektrofotometrik deneylerde renk gelişimi, ilgili proteinin aminoasit içeriği ile ilişkilidir ve protein olmayan prostetik gruplardan (örneğin, karbonhidratlardan) da etkilenebilir. Bu nedenle standart protein olarak yaygın bir şekilde sığır serum albumini (bovine serum albumin, BSA) kullanılır.

Bradford yöntemi, bu yöntem, Coomassie brilliant blue (parlak mavi) G-250 boyasının farklı konsantrasyonlardaki proteinlere bağlanarak, değişik renk şiddetinde mavi renkli çözeltiler ortaya koymasından yararlanılarak geliştirilmiştir. Boyanın özellikle arginin gibi bazik aminoasitlere ve bazı aromatik aminoasitlere bağlanma eğiliminde olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla bu yöntemde proteinin primer yapısının önemi vardır. Duyarlılık sınırları, örnek konsantrasyonun 0.1-1.4 mg/ml ve 0.01-0.1 mg/ml arasında olan bu yöntemde asidik boya proteine bağlanır ve 495-595 nm arasında maksimum absorpsiyon değerleri elde edilir.

EK – 3 (Devam) Toplam protein miktarının belirlenmesi

Örnek çözeltinin absorpsiyonunun 595 nm’de konsantrasyonla orantılı olduğu söylenmiştir. Bu nedenle ölçümler 595 nm’de yapılmaktadır. Bu deneyde standart protein olarak miktarı belirlenecek proteinin kendisi kullanılırsa en doğru sonuç alınır. Ancak böyle bir uygulama genellikle mümkün olmamaktadır. Standart olarak çoğunlukla kullanılmakta olan bovine serum albumin (BSA)’den yararlanılmaktadır [43].



Şekil 3.1. Bradford kalibrasyon eğrisi

EK – 4 İstatiksel analizler

Çizelge 4.1. Üzümden elde edilen enzimin spesifik aktivitesi için elde edilen model ve R değeri

Model No	Model denklikleri	R değerleri
1	$SA=2246,79+458,3x_1+338,28x_2-106,35x_1x_2-110,23x_2^2-104,68x_1^2+128,83x_1^2x_2^2$	0,995

Modele giren değişkenler: $X_1X_2, X_1^2, X_2^2, X_1^2X_2, X_1X_2^2, X_1^3, X_2^3, X_1X_2^3, X_1^3X_2, X_1^2X_2^2, X_1^4, X_2^4$

Bağımlı değişken: SA

Çizelge 4.2. Üzümden elde edilen enzimin spesifik aktivitesi için elde kabul edilen modelin varyans çözümlemesi

Değişim Kaynakları DK	Serbestlik Derecesi SD	Kareler Toplamı KT	Kareler Ortalaması KO	Test
Toplam	6	2751564,837		$F_H=2650,024$
Regrasyon	7	25704,974	9731255,708	
Regrasyondan ayrılış	13	2777269,811	3672,139	

Modele giren değişkenler: $X_1X_2, X_1^2, X_2^2, X_1^2X_2, X_1X_2^2, X_1^3, X_2^3, X_1X_2^3, X_1^3X_2, X_1^2X_2^2, X_1^4, X_2^4$

Bağımlı değişken: SA

EK – 4 (Devam) İstatiksel analizler

Çizelge 4.3. Üzümden elde edilen enzimin spesifik aktivitesi için elde edilen model ve R değeri

Model No	Model denklikleri	R değerleri
1	$SA=2202,20 + 458,3x_1 + 338,28x_2 - 72,44x_2^2$	0,974

Modele giren değişkenler: $X_1, X_2, X_1X_2, X_1^2, X_2^2$

Bağımlı değişken: SA

Çizelge 4.4. Üzümden elde edilen enzimin spesifik aktivitesi için elde kabul edilen modelin varyans çözümlemesi

Değişim Kaynakları DK	Serbestlik Derecesi SD	Kareler Toplamı KT	Kareler Ortalaması KO	Test
Toplam	6	2634386,671		$F_H=1189,812$
Regrasyon	7	142883,140	17000402,948	
Regrasyondan ayrılış	13	2777269,811	14288,314	

Modele giren değişkenler: $X_1, X_2, X_1X_2, X_1^2, X_2^2$

Bağımlı değişken: SA

EK – 5 Ürün maliyetinin belirlenmesi

Ürün maliyetinin belirlenmesi için hammadde maliyetinin ve işletme maliyetinin bilinmesi gerekmektedir. Bu maliyetler bilindiğinde ürün maliyeti, Eş. 5.1'den hesaplanabilir.

$$\text{Ürün maliyeti} = \text{Hammadde maliyeti} + \text{İşletme maliyeti} \quad (5.1)$$

Tirosinaz enziminin ekstraksiyonu ve saflaştırılmasında kullanılan kimyasallar ve cihazlar, ayrıca hammadde maliyeti ve işletme maliyeti Çizelge 5.1 ve Çizelge 5.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 5.1. Kullanılan hammaddelerin fiyatları

Kimyasal	Fiyat	Kullanılan Miktar*	Maliyet (YTL)
Triton X-100	290 YTL/L	0,45 ml	0,13
PVP	460 YTL/L	0,30 g	0,14
Amonyum sülfat	325 YTL/kg	5,30 g	1,72
Disodyum hidrojen fosfat dodekahidrat	160 YTL/kg	0,40 g	0,06
Sodyum fosfat	240 YTL/kg	0,20 g	0,05
Katekol	235 YTL/kg	0,03 g	0,01
Bradford belirteci	330 YTL/L	1,80 ml	0,60
Üzüm	5 YTL/kg	25,00 g	0,13
			$\Sigma=2,84$ YTL/mg tirosinaz

* 1 mg tirosinaz enziminin ekstraksiyonu ve saflaştırılmasında kullanılan yaklaşık kimyasal miktarı

EK – 5 (Devam) Ürün maliyetinin belirlenmesi

Çizelge 5.2. İşletme maliyeti

Cihaz	Güç (kW)	Kullanım Süresi* (saat)	Enerji (kW.s)	Maliyet** (YTL)
Santrifüj	0,80	0,25	0,20	0,030
Soğuk Su Banyosu	0,50	0,20	0,10	0,020
Karıştırıcı	0,05	0,20	0,01	0,002
Buz Makinası	0,33	0,40	0,13	0,020
Buz Dolabı + Derin Dondurucu	1,00	0,50	0,50	0,080
				$\Sigma=0,152$ YTL/mg tirozinaz

* 1 mg tirozinaz enziminin ekstraksiyonu ve saflaştırılmasında kullanılan cihazların kullanım süreleri

** Elektrik fiyatı=0,15 YTL/kW.s

Eş. 5.1'den faydalanılarak,

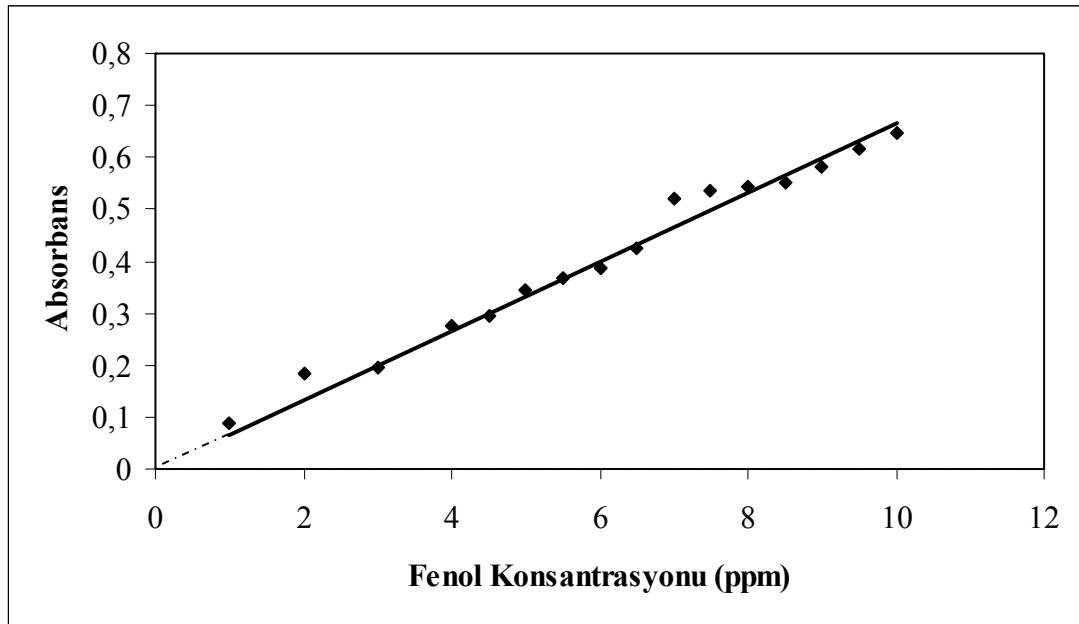
Ürün maliyeti = (2,840 + 0,152) YTL/mg tirozinaz \approx 3,00 YTL/mg tirozinaz olarak bulunmuştur.

Yapılan hesaplamalar sonunda üzümden elde edilen tirozinaz enziminin maliyeti 3,00 YTL/mg tirozinaz olarak belirlenmiştir. Saf tirozinaz enziminin piyasa satış fiyatı ise 35,00 YTL/mg tirozinaz olarak bilinmektedir.

Bölüm 5.2 ve Çizelge 5.4'de üzümden % 3 (a/h) PVP ve % 4,5 (h/h) Triton X-100 kullanılarak ekstraksiyon ve saflaştırma yapıldığında, toplam katı (protein) ağırlığı 16,28 mg ve elde edilen tirozinaz enzimi 10,70 mg olarak bulunmuştur. Böylece elde edilen ürünün içindeki tirozinaz enzimi yüzdesi % 66 olarak belirlenmiştir. Enzimin saflığının yükseltilmesi istendiğinde yeni ayırma-saflaştırma metodları ve cihazları kullanılmalıdır. Kullanılacak olan yeni cihazlar ise, yukarıda 3,00 YTL/mg tirozinaz olarak verilen enzim maliyet değerini artıracaktır. Enzimin 35,00 YTL/mg tirozinaz olarak verilen piyasa satış fiyatı ise % 100'e yakın saf enzim içindir.

EK – 6 Fenol tayini

Fenol tayini, Hach DR/4000U marka (UV/VIS) spektrofotometre kullanılarak yapılmıştır. Buna göre, fenolün bilinen konsantrasyonları hazırlanmış ve spektrofotometre yardımıyla absorbanları ölçülmüştür. Cihazın sıfır ayarı destile su kullanılarak yapılmıştır. Daha sonra absorbansa karşı konsantrasyon değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafiği çizilmiştir (Şekil 6.1). Daha sonraki ölçümlerde bu kalibrasyon grafiğinden faydalanılmıştır. Kalibrasyon işleminden önce, fenol için çalışılacak dalga boyu belirlenmiştir. Buna göre, spektrofotometre cihazında yapılan dalga boyu ölçümlerinde, fenol için en yüksek dalga boyu 212 nm’de ölçülmüş ve bu değer fenol için çalışılacak dalga boyu olarak belirlenmiştir.



Şekil 6.1. Fenol için kalibrasyon grafiği

EK – 7 Başlangıç fenol konsantrasyonları için başlangıç reaksiyon hızlarının hesaplanması

Başlangıç fenol konsantrasyonları 50, 250 ve 500 ppm olan fenol çözeltilerinin başlangıç reaksiyon hızları Eş. 7.1’de verilen denklem yardımıyla hesaplanmıştır.

$$V = \frac{V_m \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (7.1)$$

$$[S]_{50\text{ppm}} = 50 \text{ ppm} = 5,300 \times 10^{-4} \text{ M}$$

$$[S]_{250\text{ppm}} = 250 \text{ ppm} = 2,656 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$[S]_{500\text{ppm}} = 500 \text{ ppm} = 5,312 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$K_m = 3,06 \times 10^{-3} \text{ M} \quad [44].$$

$$V_m = K_m \times 2 = 6,12 \times 10^{-3} \text{ mol/Ldak}$$

Bu değerler Eş. 7.1’de yerine konulduğunda her bir başlangıç konsantrasyonu için elde edilen başlangıç reaksiyon hızları,

$$V_{50\text{ppm}} = 9,04 \times 10^{-4} \text{ mol/Ldak}$$

$$V_{250\text{ppm}} = 2,84 \times 10^{-3} \text{ mol/Ldak}$$

$$V_{500\text{ppm}} = 3,88 \times 10^{-3} \text{ mol/Ldak olarak bulunmuştur.}$$

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ÖZTAN, Duygu
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 14.04.1980 Ankara
Medeni hali : Bekar
Telefon : 0 (312) 221 15 83
e-mail : dyguoztan@yahoo.com.

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Lisans	Kırıkkale Üniversitesi/ Kimya Bölümü	2003
Lise	Batıkent Süper Lisesi	1998

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2004-2005	Gönül Sezer Dersaneleri	Öğretmen

Yabancı Dil

İngilizce

Hobiler

Ud çalmak, sinemaya ve tiyatroya gitmek