

**T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**TEKSTİL ATIK SULARINDA ENZİMATİK RENK
GİDERİMİNİN DENEYSEL TASARIMI VE
OPTİMİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BANUAY COŞKUN

OCAK 2013

MUĞLA

**T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**TEKSTİL ATIK SULARINDA ENZİMATİK RENK
GİDERİMİNİN DENEYSEL TASARIMI VE
OPTİMİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BANUAY COŞKUN

OCAK 2013

MUĞLA

MUGLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

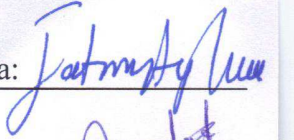
Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

BANUAY COŞKUN tarafından hazırlanan **TEKSTİL ATIK SULARINDA ENZİMATİK RENK GİDERİMİNİN DENEYSEL TASARIMI VE OPTİMİZASYONU** başlıklı tezinin, 07/01/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

TEZ SINAV JURİSİ

Prof.Dr. Fatma Ayhan (Jüri Başkanı)

İmza: 

Kimya Anabilim Dalı, Muğla Üniversitesi, Muğla

Yrd. Doç. Dr. Oğuz Akpolat (Üye)

İmza: 

Kimya Anabilim Dalı, Muğla Üniversitesi, Muğla

Yrd. Doç. Dr. Aydan Gülsu (Üye)

İmza: 

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Muğla Üniversitesi, Muğla

BÖLÜM BAŞKANLIĞI VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ ONAYI

Prof. Dr. Gül Asiye AYÇIK

İmza: 

Kimya Bölüm Başkanı, Muğla Üniversitesi, Muğla

Yrd. Doç. Dr. Oğuz AKPOLAT

İmza: 

Danışman, Kimya Anabilim Dalı Muğla Üniversitesi, Muğla

Savunma Tarihi: 07/01/2013

Tez çalışmalarım sırasında elde ettiğim ve sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgelerin tarafımdan bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde edildiğini; akademik ve bilimsel etik kurallarına uygun olduğunu beyan ederim. Ayrıca, akademik ve bilimsel etik kuralları gereği bu tez çalışması sırasında elde edilmemiş başkalarına ait tüm orijinal bilgi ve sonuçlara atıf yaptığımı da beyan ederim.

Banuay Coşkun

07/01/2013

ÖZET
TEKSTİL ATIK SULARINDA ENZİMATİK RENK GİDERİMİNİN
DENEYSEL TASARIMI VE OPTİMİZASYONU

Banuay COŞKUN

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Oğuz AKPOLAT

Ocak 2013, 68 sayfa

Sunulan bu çalışmanın amacı ; Peroksidaz enziminin çapraz bağlı enzim agregatları yöntemi kullanılarak taşıyıcısız immobilizasyonunu gerçekleştirmek optimum immobilizasyon koşullarını belirlemektir. Çalışmanın ilk kısmında peroksidaz enziminin çapraz bağlı enzim agregatları hazırlama yöntemi ile taşıyıcısız immobilizasyon işlemi yapılmıştır.

Enzim immobilizasyonunu etkileyen önemli parametrelerden olan başlangıç enzim derişim, çapraz bağlayıcı oranı ve çöktürücü derişimi seçilmiştir. Seçilen bu değişkenlerin alt ve üst sınırları çerçevesinde tam faktöriyel deney tasarım modeline göre yapılarak deney sayısı ve değişkenlerin değerleri belirlenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda önerilen modelin çözümü ve yüzey cevap analizi ile immobilizasyonu etkileyen değişkenlerin optimum değerleri saptanmıştır.

Bu amaçla yapılan deneyler ve deneysel tasarım çalışmalarının sonunda optimum koşullar; başlangıç enzim derişimi 0.06 mg/ml, çöktürücü tipi BSA ,çöktürücü derişimi 2 mg/ml, çapraz bağlayıcı tipi glutaraldehit, çapraz bağlayıcı derişimi ise % 3 (v/v) olarak tespit edilmiştir. Çalışmanın devamında endüstriyel boyutta renk gideriminde taşıyıcısız immobilize enzim agregat sisteminin kullanımıyla optimum koşullarda elde edilen agregat yapısı endüstriden temin edilen Reactive blue 160 boyasının belli derişim aralıklarında renk giderimine bakılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Peroksidaz,Çapraz Bağlı Enzim Agregatları (CLEA),
Taşıyıcısız Enzim İmmobilizasyonu, Tam Faktöriyel Tasarım

ABSTRACT
**EXPERIMENTAL DESIGN AND OPTIMIZATION OF ENZYMATIC
REMOVAL FOR WASTE WATER TEXTILE COLOR**

Banuay COŞKUN

Master of Science (M.Sc)

Graduate School of Naturel and Applied Sciences

Department of Chemistry Science

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Oğuz AKPOLAT

January 2013, 68 pages

The purpose of the proposed study is that ; it was achieved carrier- free immobilization of peroxidase enzyme by using cross-linked enzyme aggregates and to optimize the immobilization. In the first part of the study , carrier –free immobilization was done cross linked enzyme aggregates preparation methods.

It was chosen the enzyme concentration ,the rate of cross linked and the precipitant concentration as the parametres to affect the immobilization. Experiment number and parameter values were determined by full factorial desing and the parameters were choosen between their upper and lower values. At the end uf experiments ,the factor affect the immobilization was optimized by the solution of the suggested model and response surface analysis.

At the end of the work, optimum conditions were 0.06 mg/ml as starting enzyme concentration BSA as precipitant type , BSA precipitation type, precipitation concentration of 2 mg/ml, glutaraldehyde cross-linker type, cross-linker concentration of 3% (h/h) respectively. Continuation of the study, the aggregate system, the use of immobilized enzymes in industrial scale carrier optimum conditions for the removal of color from the aggregate structure of the industry obtained a certain concentration range of Reactive Blue 160 dye color removal were investigated.

Keywords: Peroxidase, Cross-Linked Enzyme Aggregates(CLEA), Carrier-Free Immobilization, Full Factorial Design of Experiments

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans tez çalışmam boyunca çok büyük desteğini gördüğüm , görüş ve bilgi birikiminden yararlandığım değerli tez danışmanım ve değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Oğuz Akpolat'a ve desteğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Fatma Ayhan'a,saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarım sırasında fikirlerini benden esirgemeyen Prof. Dr. Hakan Ayhan'a,

Her zaman yüzümü güldüren aynı laboratuvarı paylaşmaktan ve dostluklarından keyif aldığım yüksek lisans arkadaşlarıma,

Her konuda beni dinleyen , yol gösteren biricik kardeşim Büşra Coşkun'a

BAP-2012/31 numaralı Bilimsel Araştırma Projesi desteğine,

Tez çalışmam süresince ilgi sabır ve desteklerini esirgemeyip benim için fedakarlıklarda bulunan canım annem Nuray Coşkun ve canım babam Fikri Coşkun'a,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Enzimler	6
1.1.1. Enzimlerin yapısı	6
1.1.2. Enzimlerin kullanım alanları.....	6
1.1.3.Enzimlerin çalışması.....	7
1.1.4. Enzimatik tepkime hızı	8
1.1.5. Enzim inhibisyonu.....	11
1.1.6. Enzim aktivitesini değiştiren etmenler	12
1.1.7. Michealis-Menten tipi kinetik için hız parametrelerinin deneysel olarak tespit edilmesi.....	14
1.1.8. Kinetik modelin doğrusallaştırılması.....	15
1.2.İmmobilizasyon	16
1.2.1.Enzim immobilizasyonu	17
1.2.2.Taşıyıcılı immobilizasyon	18
1.2.3.Taşıyıcısız immobilizasyon	19
1.2.3.1.Çapraz bağlı çözünmüş enzim(CLE)..	20
1.2.3.2.Çapraz bağlı enzim kristalleri(CLEC).....	21
1.2.3.3.Çapraz bağlı enzim agregatları(CLEA)	21
1.3.Deneysel Tasarım Ve Optimizasyon	24
1.3.1.Tam faktöriyel tasarım.....	25
1.3.2.Fraksiyonel faktöriyel tasarım	27
1.3.3.Deney tasarımında optimizasyon.....	27
1.4. Tekstil Enzimleri.....	28
1.4.1. Aşındırma işlemi (Karbonizasyon).....	28
1.4.2. Ağartma işlemi.....	29
1.4.3. Boyama atık suyunun arıtılması	30

1.5. Peroksidaz Enzimi	33
1.5.1. Peroksidaz enzimin yapısı	33
1.5.2. Peroksidaz enziminin mekanizması.....	34
1.5.3. Peroksidaz enziminin sınıflandırılması.....	35
1.5.4. Kullanım alanları	35
2. MALZEME VE YÖNTEM	36
2.1. Peroksidaz Enziminin Taşıyısız Olarak Agregat Formda Eldesi	36
2.2. Peroksidaz Enziminin Aktivite Tayini	37
2.3. Hidrojen Peroksit Tayini	37
2.4. Tam Faktöriyel Tasarım uygulanması.....	39
2.5. Tam Faktöriyel Tasarım İle Agregat Oluşumu	41
2.6. Tepkime Hızının ve Kinetiğinin Bulunması	41
2.7. Aktivitelerin Hesaplanması	43
2.8. Tam Faktöriyel Tasarımın Programlanması.....	44
2.9. Optimizasyon Çalışmaları Ve İstatistiksel Değerlendirme	46
2.10. Reaktif Blue 160 Boyasının Hazırlanması	49
2.11. Boya Çözeltilisinin Hazırlanması.....	50
2.12. Renk Gideriminin Sağlanması.....	50
3. BULGULAR VE İRDELEME.....	51
3.1. Agregatların Hazırlanması	51
3.2. Çapraz Bağlı Enzim Agregatları	52
3.3. Enzim Aktivite Ölçümleri	52
3.4. Tepkime Hızlarının Bulunması	54
3.5. Optimizasyon Çalışmaları	56
3.6. İstatistiksel Değerlendirme.....	57
3.7. Cevap Yüzey Fonksiyonları(0.012 Baş. Der. Den. İçin).....	58
3.8. Renk Giderimi.....	60
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	61
KAYNAKLAR	62
ÖZGEÇMİŞ.....	67

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Enzimlerin Sınıflandırılması.....	7
Çizelge 1.2.Tepkime Hızlarının Hesaplanması.....	10
Çizelge 2.1.Tam Faktöriyel Tasarımda Agregat Oluşumunda Uygulanan Çalışma Aralıkları	40
Çizelge 2.2.Tam Faktöriyel Tasarım Deneysel Tasarım Gösterimi	40
Çizelge 2.3.Üç Faktörün Ölçüm Değerleri	41
Çizelge 2.4.Çalışılan Parametrelerin Birim Gösterimi	41
Çizelge 2.5.Tepkime Hızlarının Hesaplanması.....	43
Çizelge 2.6. Peroksidaz Enzimi İçin Line weaver-Burk Yöntemiyle Hesaplanan Kinetik Parametreler	43
Çizelge 3.1. Tam Faktöriyel Tasarım 'daki Kullanılan Parametre Oranları.	52
Çizelge 3.2.Sekiz Agregat İçin Hesaplanan Aktivite Değerleri.....	53
Çizelge 3.3.Aktivitelerin Bağlı Olduğu Tepkime Hızı	54
Çizelge 3.4. Düzenlenmiş Şekilde Oluşan Bölge I Ve Bölge II Değerleri	55
Çizelge 3.5.Aktivite Olarak Tepkime Hızı (Bölge II- Tüm Hesaplamalar için $R^2>0.99$)	56
Çizelge 3.6. 25°C 'de Zamana Bağlı Renk Gideriminin Absorbans Değerlendirilmesi.....	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Anahtar –Kilit Modelinin Şematik Gösterimi.....	8
Şekil 1.2.Tepkime Hızlarının Zaman-Derişim Eğrisinden Hesaplanması	10
Şekil 1.3. Birinci Mertebe Enzimatik Olmayan Tepkimeler İçin Kinetik Sabitlerin Bulunması.....	11
Şekil 1.4. Substrat Derişiminin Tepkime Hızına Etkisi	14
Şekil 1.5. Line weaver-Burk Çizimi	16
Şekil 1.6. Enzim İmmobilizasyonunda yararlanılan taşıyıcılarda aranan özellikler..	19
Şekil 1.7. Taşıyıcısız İmmobilize Enzim Üretimine Farklı Yaklaşımlar: a)Kristalleştirme b)Agregasyon c)Sprey Kurutması d)Direk Çapraz Bağlama.....	20
Şekil 1.8. CLEA'nın Hazırlanması	22
Şekil 1.9. Atıksu Arıtma Yöntemleri	31
Şekil 1.10. Bazı Tekstil Boyalarının Yapısal Formülü	32
Şekil 2.1. Reactive Blue 160 Molekül Yapısı.....	50
Şekil 3.1. Tepkimeye İlişkin Olarak Ölçülen Zaman- Konsantrasyon Değerleri.....	54
Şekil 3.2. Doğrusallaştırılmış Tepkime Hızı Bölgeleri.....	55
Şekil 3.3. Bölge II için Aktivite Gösterimi	57
Şekil 3.4. Modelsel Aktivite ve Deneysel Aktivitenin Tam Faktöriyel Tasarımda Gösterilişi	57
Şekil 3.5. Deneysel Aktivitenin Modelde Aktivite Sapmaları.....	58
Şekil 3.6. Cevap Yüzey Fonksiyonunda Çapraz Bağlayıcı Oranı Parametresi Sabittir	58
Şekil 3.7. Cevap Yüzey Fonksiyonunda Başlangıç Enzim Derişimi Parametresi Sabittir	59
Şekil 3.8. Cevap Yüzey Fonksiyonunda Çöktürücü Derişimi Parametresi Sabittir	59

KISALTMALAR DİZİNİ

HRP	Horseradish Peroksidaz
BSA	Bovin Serum Albumin
POD	Peroksidaz
E	Enzim
I	İnhibitör
CLE	Çapraz Bağlı Çözünmüş Enzim
CLEC	Çapraz Bağlı Enzim Kristalleri
CLEA	Çapraz Bağlı Enzim Agregatları
GA	Glutaraldehit
μ l	Mikrolitre
AGG	Agregat
BE	Başlangıç Enzim Derişimi
ÇD	Çöktürücü Derişimi
ÇB	Çapraz Bağlayıcı
mL	Mililitre
M	Molarite
mM	Milimolar
nm	Nanometre
%	Yüzdalik
°C	Santigrad Derece
mg	Miligram
Km	Substrat Konsantrasyonu
Vm	En Yüksek Reaksiyon Hızı
g	Gram
L	Litre
dk	Dakika

1. GİRİŞ

Boyar maddeler kompleks aromatik bileşiklerdir ve genel olarak çeşitli substratların renklendirilmesinde kullanılmaktadırlar. Bazen yapılarının ara yüzeyinde ağır metallerle birleşebilmekte ve bu nedenle zehirli ve inhibe edici etkisi yüzünden çevrede kötü sonuçlar görülebilmektedir. Boyar maddeler arasında azo boyalar dirençli , biyolojik olarak parçalanmayan ve kalıcı özelliklere sahiptirler. Bu nedenle boyar madde esaslı atıkların arıtımı çevresel olarak en önemli işlerden biridir. Bugüne kadar kullanılan fiziko kimyasal uzaklaştırma yöntemleri toplam maliyetin yüksek oluşu , yenilenme sorunu ve ikincil kirleticiler / çamur üretmesi kullanımlarında sınırlama getirmektedir. Bunlara ek olarak boya esaslı atıkların geleneksel biyolojik atık su arıtma yöntemi ile arıtmaya dirençli oluşları ve inhibe edici özellikleri nedeni ile cevap vermemektedirler. Bu nedenlerden dolayı araştırmalar seçici özellikleri nedeni ile enzimatik arıtıma yönlenebilir başlamışlardır. Enzimler özel direnç kirleticileri üzerinde etki gösterebilir ve düşük alıkonma sürelerinde aromatik bileşiklerin geniş bir derişim aralığında çalışılabilir (Robinson vd., 2001;Levin ve Forchiassin vd., 2005).

Yıllık 10000 farklı boya ve renk vericiler üretilmektedir ve boyama ve baskı endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Sentetik boyalar kimyasal olarak çok çeşitlidir fakat endüstride en çok kullanılanlar açısından azo bileşikleri, trifenilmetanlar veya heterosiskil/polimerik yapılar sayılabilir. Ürün işleme yöntemleri boyar maddelerin büyük bir miktarının atık sular ile kaybına neden olmaktadır. Bu miktar uygulanan boyanın %10-15'ine karşılık gelmektedir. Bu boyaların bir kaçı ışığa ,sıcaklığa ve mikrobiyal etkiye karşı çok dayanıklıdır ve bu da onları bileşik olarak dirençli yapılar yapmaktadır ve bir çoğu da zehirlidir (Levin ve Forchiassin vd., 2005). Atık suyun renk giderimi için çeşitli kaynaklarda var olan temel yöntemler kimyasal ve biyolojik yöntemler olarak sınıflandırılabilir (Robinson ve McMullan vd., 2001).

Bunlar adsorpsiyon , biyosorbsiyon , çöktürme, kimyasal parçalanma, elektrokimya, fotokimya, biyoparçalanma işlemlerini içermektedir (Levin vd., 2005; Kariminiaae vd., 2007; Vijayaraghavan vd., 2008; Rafatullah ve Othman vd., 2010).

Mikrobiyal renk giderimi bazı araştırcılar tarafından daha ucuz ve çevreye daha az zararlı bir yöntem olarak görölmektedir. Lignin peroksidazlar, mangan peroksidazlar ve lakkazlı organizmalar, boyar maddelerin renk giderimi ile ilişkilendirilmiştir (Levin ve Forchiassin vd., 2005; Kariminiaae vd., 2007). Yaban turbundan elde edilen peroksidaz enzimi kimyasal, çevre, farmasötik ve biyoteknolojik endüstrilerde kullanılan çok yönlü bir enzimdir (Mohan vd., 2006). Acı su kabağında elde edilen peroksidaz, konkanavalin A kaplı kalsiyum aljinat-nişasta taneciklerine immobilize edilmiştir ve tekstil endüstrisi artığının renk gideriminde kullanılmıştır. Artığın renk gideriminde redoks aracı olarak 1.0 mM 1-hidroksibenzotriazol varlığında 580 nm’de yapılan ölçümler ile bir saat sonundaki renk giderimi % 70 olarak ölçülmüştür. Fakat immobilize acı sukabağı peroksidazı en yüksek renk giderimini pH 5.0 ve 40°C’de göstermiştir. Kesikli işlemden üç saat sonunda rengin % 90’ını gidermiştir. Biri immobilize peroksidaz diğeri aktif silika olan iki reaktörlü düzende iki aylık sürekli işlem ile % 40 renk giderimi yapabilmektedir. Renk gideriminin tespiti için kullanılan absorpsiyon spektrumunda işlem görmüş ve görmemiş artıkların absorpsiyonlarında farklı dalga boylarında önemli farklar görölmüştür. Bu nedenle peroksidaz/1-hidroksibenzotriazol düzeneği sürekli bir reaktörde büyük miktarlı hacimlerinin işlenmesi için kullanılabilirliği bildirilmiştir (Mohan vd., 2006; Mohorcic ve Teodorovic vd., 2006).

Farklı lakkaz-membran reaktör biçimleri beyaz küf mantarından saflaştırılarak elde edilen lakkaz ile çalışılmıştır. Reaktörler doğrudan enzim teması, enzim aşılınmış, immobilize enzim ve kitosan membranlara lakkaz immobilize edilmesine dayalı reaktör düzeneklerinin verimliliği incelenmiş ve azo boyanın (acid black 10 BX) renk giderimi incelenmiştir. Deneysel verilere göre lakkaz enzimi harici redoks araçları eklemeyen renk gideriminde büyük gücü olduğu bildirilmiştir. Denemelerde farklı reaktör türlerinden lakkaz enkapsüle edilmiş kitosan membran reaktör ile kısa temas süresi ve tekrar kullanılabilirlik açısından üstünlükleri olduğu tespit edilmiştir (Nelson ve Cox, 2005).

Enzim katalizini sulu organik çözücülerde gerçekleştirmek için uzun yıllardır araştırcılar tarafından araştırma yapılmaktadır. Fakat yakın zamanda kararlılık ve böyle ortamlarda enzimlerin kararlılığı üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır. Kararlılık çalışmaları ya kimyasal çapraz bağlama veya protein mühendisliğini içermektedir. Çapraz bağlama ile kararlılığın sağlanmasında iki fonksiyonlu reaktiflerin kullanımı

üzerindedir. İkincisi enzimleri polimer ağaların içine bağlamaktır. Bunların birçoğunda bu bağlanma kovalent bağlanmadır. Üçüncüsü de çapraz bağlı enzim kristalleri ile çalışmaktadır. Her üç yaklaşımda da genel olarak enzim molekülünün farklı bölgelerini bağlayarak veya enzimin yüzeyindeki bazı amino asit kalıntılarını polimere bağlayarak yapısal sağlamlığı arttırmaktır. Kimyasal çapraz bağlama ile hazırlanan çok sayıda çözünmez enzim agregatları hazırlanmıştır. Bu tür agregatların oluşumu genelde protein molekülüne giren molekül içi veya moleküller arası çapraz bağlar ile yorumlanmaktadır. Farklı tür enzimlerden (oksidoredüktazlar, transferazlar, izomerazlar, liyazlar ve hidrolazlar) oluşturulmuş bu tür agregatlar hakkında bilgi oluşmaya başlamıştır. Bu tür çözünmez agregatların ısıl kararlılıkları serbest hallerine göre daha yüksektir. Önemli bir nokta da bu amorf yapıların uygulamalara göre farklı şekillerde ve biçimlerde yapılandırılabilmesidir (akışkan yatak reaktörde, enzim elektrot tasarımında ve enzim inhibitörlerinin ayrılmasında vb.). Yapılan bir çalışmada dört enzim kimyasal olarak glutaraldehit ile agregat haline getirilmiş ve sıcaklık ve organik çözücülere karşı aktiviteleri incelenmiştir. Birçok durumda incelenen organik çözücülere ve ısıya karşı daha yüksek kararlılık gösterdikleri bulunmuştur (Roger., 2011).

Enzimlerin etkin immobilizasyonunda çapraz bağlı enzim agregatlarının geniş uygulanabilirliği gösterilmiş ve çapraz bağlı enzim agregatlarının özelliklerini etkileyen parametreler belirlenmiştir. Bu kapsamda agregat hazırlama birkaç basamağa ayrılmıştır. Birincisi çöktürücü seçimi ve derişimin optimize edilmesi, ikincisi de çapraz bağlayıcı ve protein derişiminin optimize edilmesi. Lipaz, Lakkaz, Fitaz, Galaktoz Oksidaz, Tripsin, Glukoz Oksidaz, b-Galactosidaz, Alkol dehidrojenaz ve format dehidrojenaz enzimleri ile yapılan bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre agregasyon yöntemi her enzim için % 100 aktiviteye yükselmiştir (R. Schoevaart vd., 2004).

Pseudomonas cepacia lipazı ve penisilin açılaz çapraz bağlı enzim agregatı olarak hazırlanmıştır. Lipaz enzimi çöktürücü olarak BSA kullanıldığında aktivitenin % 100'ünü korumuştur. Penisilin açılaz enziminde ise yine BSA kullanıldığında aktivitenin % 86'sı kalmıştır (Shah vd., 2006). Mantardan lakkaz enzimi çapraz bağlı enzim agregatı olarak oluşturulmuştur. Çöktürücü olarak polietilen glikol kullanılmış ve çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit kullanılmıştır. Aktivite kazanımı % 60.2 olarak bulunmuştur.

Peroksidaz enziminin taşıyıcısız olarak immobilizasyonu ile hidrojen peroksit giderimine yönelik yapılan çalışmada başlangıç enzim derişimi, BSA (bovine serum albumin) miktarı ve çapraz bağlayıcı oranı değiştirilerek en yüksek enzim aktivitesi veren bileşim değerleri belirlenmiştir. Yapılan deneyler sonucu başlangıç enzim derişimi 0,05 mg/mL, çöktürücü derişimi 5 mg/mL, çapraz bağlayıcı derişimi % 4 olarak bulunmuştur. Linewiever-Burk yöntemi ile yapılan çizim ile taşıyıcısız immobilize enzimin Km değerinde artış, Vm değerinde düşüş olduğu ortaya çıkmıştır. Enzim aktivitesi olarak % 40 ın üzerinde aktivite bildirilmiştir (Topçular ve Ayhan , 2008).

Glukoz Oksidaz enzimi taşıyıcısız olarak çapraz bağlı enzim agregatları (ÇBEA) olarak sentezlenmiştir. Çalışmada en yüksek enzim aktivitesini veren agregat yapısının belirlenmesi için başlangıç enzim derişimi, en uygun sıcaklık, çöktürücü türü ve derişimi ile çapraz bağlayıcı derişimi belli aralıklarda taranmıştır. Bulunan sonuçlara bakıldığında başlangıç enzim derişimi 0,05 mg/mL, en uygun sıcaklık 25°C, çöktürücü tipi BSA, çöktürücü derişimi 5 mg/mL, çapraz bağlayıcı derişimi % 2 olarak bulunmuştur. Kinetik sabitler hesaplanmış ve serbest enzime göre Km değerinde artış, Vm değerinde düşüş gözlenmiştir. Çalışmada elde edilen bir başka önemli sonuç tayin edilen taşıyıcısız immobilize enzim aktivite değeri serbest enzime göre daha yüksek olarak bulunmuştur (Ayhan vd., 2011).

Geniş uygulamalar için enzim fiyatları işlemin maliyetini belirleyen en önemli etkenlerden biridir. Bu nedenle organizmalardan elde edilecek enzimlerin üretim maliyetini düşürmek için fermentasyon ortamının optimize edilmesi için çalışma yapılmıştır. Bu amaçla ksilanaz, amilaz ve lakkaz enzimlerinin üretimi için farklı istatistiksel tasarımlar kullanılmıştır. *Trametes trogii* ile igninolitik enzim üretimi ve renk giderimi için yine bir deneysel tasarım olan Packett-Burman tasarımı kullanılmıştır (Levin vd., 2005).

Genel olarak bakıldığında biyokimyasal bir süreçte istenen nitelikte ürünün elde edilebilmesi diğerl süreçlerde olduğu gibi, ancak o sürece ilişkin parametrelerin optimum olacak şekilde saptanmasına bağlıdır. Doğru saptama da, ancak çok sayıda deneysel çalışmayla gerçekleştirilebilir. Deney sayısının artması ise daha fazla zaman, malzeme ve maliyet artışı demektir. Bilimsel çalışmalar da ve mühendislik problemlerinin çözümünde az sayıda deney yaparak doğru saptamalara ulaşmak için araştırmacılar tarafından izlenecek yol da deneysel çalışmalara başlamadan önce

toplam maliyeti optimize edebilmek için deney tasarımı yapılması olup, bunun için önerilen muhtelif deney tasarım modelleri mevcuttur. Bunlardan en sık karşılaşılanı Box ve Wilson tarafından geliştirilen Cevap Yüzey Yöntemidir. Bu yöntemde mümkün olan en az sayıda ki minimum gözlem değeri için, kontrol parametresini bağımsız çalışma parametrelerine bağlı olarak ilişkilendiren cevap yüzey fonksiyonun en yüksek yani maksimum değerinin saptanmasıdır. Bu da bir optimizasyon problemidir ve çözümü de ancak bir dizi sayısal işlem gerektirmektedir (Lübbert vd., 2000).

Enzimlerin katalitik etkisi kimyasal katalizlere göre oldukça verimli ve seçicidir. Bu nedenle önerilen projede çevre açısından çok büyük önemi olan boyar maddelerin renk gideriminden kullanılma potansiyeli olan Peroksidaz enzimi seçilmiştir. Çalışmada enzimin taşıyıcısız olarak immobilize edilmesi aşamasında immobilizasyon sonrası en yüksek enzim aktivitesi veren immobilizasyon koşullarının belirlenmesi amacı ile deneyler yapılacaktır. Yine bu kapsamda değişkenler ve çalışma aralıkları tam faktöriyel deneysel tasarıma göre belirlenmiş ve deneylerin tamamlanmasından sonra önerilen modelin çözülmesi ve yüzey cevap analizinin yapılmasından sonra da optimum değerler belirlenecektir. Immobilizasyon optimizasyonu için kinetik parametreler hesaplanacak enzimin aktiviteleri tespit edilecektir.

Araştırmada peroksidaz enzimi taşıyıcısız olarak immobilize edilecektir. Bu amaçla enzimin immobilizasyonunu etkileyen en önemli parametreler olan başlangıç enzim derişimi, çapraz bağlayıcı oranı ve çöktürücü derişimi seçilmiştir. Seçilen bu değişkenlerin alt ve üst sınırları çerçevesinde tam faktöriyel deneysel tasarım modeline göre yapılacak deney sayısı ve değişkenlerin değerleri belirlenecektir. Yapılacak deneyler sonucu önerilen modelin çözümü ve yüzey cevap analizi ile immobilizasyonu etkileyen değişkenlerin optimum değerleri saptanacaktır. Önerinin kapsamında endüstriyel boyutta uygulama için bir ön aşama olarak endüstriden temin edilecek boyar madde ile farklı derişimlerde endüstriyel atık su ile renk giderimi incelenmiş olacaktır.

1.1. Enzimler

Enzimler, canlı hücrelerin doğal olarak yapısında bulunan ve bu hücrelerinin tek başına veya çoklu olarak yer aldığı canlılar olarak adlandırılan biyolojik sistemlerin varlığının sürdürülebilmesi için gerekli olan kimyasalların, biyokimyasalların üretilmesi ile gerekli olan enerjinin sağlanması, dengeli olarak dağıtılması ve biyolojik sistemlerden uzaklaştırılması sırasında karşılaşılan ve çok karmaşık yapıda oluşan bir dizi tepkimenin gerçekleşmesinde yer alarak onu kolaylaştırabilen, ancak bu tepkimelere doğrudan katılmayıp etkin rol alabilen biyolojik yapıdaki katalizörlerdir. Biyolojik sistemlere ilişkin tepkimelerin gerçekleştirilmesini sağlayan enzimlerin üretilmesini başlı başına bir çalışma alanı olup, daha sonra tekli veya çoklu olarak kullanılmak üzere, üretildikleri hücre yapısından ayrılmaları yani izolasyonları ve kullanımları için saflaştırılmaları gerekmektedir. Bu prosesler de hem çok karmaşık hem de pahalı olduklarından, çoğunlukla pahalı proseslerdir (Bailay, 1986; Telefoncu, 1997; Kieran ve Beroviç, 2001).

1.1.1. Enzimlerin yapısı

Molekül ağırlıkları yüksek olan enzimlerin çoğu (katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu dışında) proteinlerden meydana gelmiştir (Nelson ve Cox, 2005). Protein yapısında olmayan enzimler ise şeker, lipit veya metallerle bağılırlar ve enzimin yapısında olup da protein özeliği taşımayan bu gruplara prostetik gruplar adı verilir. Bağlı olunan grup bir metal iyonu ise kofaktör, NAD, FAD, NADP, tiamin, CoA gibi ısıya dayanıklı organik moleküller ise koenzim olarak adlandırılır. Enzimin yapısındaki protein kısmına apoenzim, protein olmayan grup içeren enzime de holoenzim denir (Özata ve Kutlu, 2000; İspirli, 2008).

1.1.2. Enzimlerin kullanım alanları

Kullanım alanlarına göre enzimler endüstriyel, analitik ve klinik olmak üzere 3 grupta toplanabilir (Walsh ve Headon, 1994; İspirli, 2008; Körlü ve Altay, 2009). Çizelge 1.1 'de enzimlerin altı temel sınıfı ve fonksiyonları gösterilmektedir.

Çizelge 1.1. Enzimlerin sınıflandırılması

1.Oksiredüktazlar	İndirgenme yükseltgenme reaksiyonlarını katalizlerler.
2.Transferazlar	Fonksiyonel grup transferini katalizler.
3.Hidrolazlar	Kimyasal bağların su varlığında hidrolizini katalizler.
4.Liyazlar	Eliminasyon yoluyla yıkımı katalizleme.
5.İzomerazlar	Bir substratın bir izomere dönüşümü reaksiyonlarını katalizler.
6.Ligazlar	İki molekülün kovalent bağlanma reaksiyonlarını katalizler.

Endüstriyel enzimler: Düşük saflık derecesine sahip kimyasal reaksiyonları katalizleyen biyokatalizörlerdir. Çoğunlukla mikroorganizmalardan üretilirler. Endüstriyel enzimlerin başta tekstil sektöründe olmak üzere çevre dostu üretim gerçekleştirmek amacıyla kullanımları her geçen gün artmaktadır. Bu grupta yer alan enzimler; renin, proteazlar, amilazlar, glukoz izomerazlar, sükröz, pektinazlar, selülaz, katalaz vb. dir.

Analitik enzimler: Bilimsel araştırma ve tanı kitlerinde kullanılan, saflık derecesi endüstriyel enzimlerden daha yüksek olan enzimlerdir. Bu gruba giren başlıca enzimler heksokinaz, alkoldehidrogenaz, glukozoksidaz vb. dir.

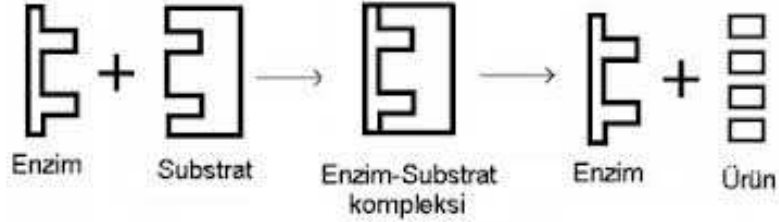
Klinik enzimler: Çeşitli fizyolojik rahatsızlıkların tedavisinde kullanılan, saflık dereceleri yüksek olan enzimlerdir. Bu amaçla kullanılan başlıca enzimler de proteazlar, lipazlar, asparaginaz vb.dir.

1.1.3. Enzimlerin çalışması

Enzimler substrata bağlanıp, ardından enzim-substrat yapısını oluşturarak tepkimelerin aktivasyon enerjisini düşürür. Enzim kullanımı tepkimenin denge sabitini etkilemez. Ancak aktivasyon enerjisinde, tepkime aynı sıcaklıkta yürütülmesine rağmen önemli şekilde düşme gözlenir.

Enzimler özgül oldukları substrat ile etkileşerek enzim-substrat yapısını oluştururlar. Enzimle substrat ilişkisinin moleküler yönü henüz tam olarak anlaşılacak şekilde birlikte bu etkileşimden zayıf bağların sorumlu olduğu bilinmektedir. Birçok durumda, Van der Waals kuvvetleri ve hidrojen bağları enzim-substrat yapısının oluşturulmasını sağlar. Substrat, enzime aktif bölge olarak bilinen özgül bölgelerden bağlanır.

Substrat molekülü kendinden daha büyük olan enzim molekülünün aktif bölgesine tam uyacak şekildedir. Bu nedenle enzim-substrat ilişkisi Şekil 1.1’de anahtar kilit modeli ile tanımlanmaktadır.

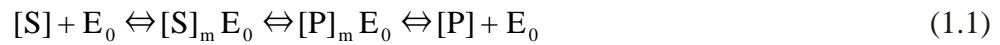


Şekil 1.1. Anahtar-kilit modelinin şematik gösterimi

Birden fazla substrat içeren enzim katalizli tepkimelerde, yakınlık etkisi denilen şekilde substrat moleküllerini reaktif bölgelerinden bir araya getirerek, kendi aktif bölgelerine bağlar. Bu durumda, doğru pozisyon ve açının oluşturulabilmesi ile yönlendirme doğru yapılacak ve tepkime hızı arttırılabilecektir (İspirli, 2008).

1.1.4. Enzimatik tepkime hızı

Genel olarak tepkime hızı tepkimeye giren bileşenlerin ya da ürünlerin zamana bağlı olarak derişiminin bir ifadesi olup S, substrat, P, ürün ve E_0 ’dan başlangıçtaki enzim derişimlerini göstermek üzere genel tepkime denklemi için önerilen tepkime hızı aşağıdaki gibi verilmiştir. Bunlar;



veya



ve

$$v \text{ veya } r = -\frac{dS}{dt} = \frac{dP}{dt} \quad (1.3)$$

olarak yazılır ve enzimatik olmayan birinci merteye tepkimeler için en basit tepkime kinetik modeli

$$v = kS \quad (1.4)$$

şeklinde iken, bu enzimatik tepkimeler için biraz daha karmaşık olup, Michealis-Menten tarafından aşağıdaki gibi önerilmiş ve uygulamada büyük oranda başarı sağlamıştır.

$$v = \frac{v_m [S]}{K_m + [S]} \quad (1.5)$$

Buradan k , enzimatik olmayan tepkimeler için kinetik hız sabitini gösterirken K_m enzimatik tepkimeleri için önerilmiş olan Michealis-Menten kinetik sabitini belirtmektedir. v_m ise ulaşılabilecek en yüksek tepkime hızıdır. Tepkime hızlarının bulunması başlı başına bir işlem olup Şekil 1.2'den anlaşılacağı gibi tepkimeye ilişkin çizilecek zaman-derişim eğrisinin belirlenen noktalarındaki teğetlerinin eğiminden hesaplanabilir. Tepkime hızının hesaplanması zamana ilişkin bir limit işlemi olup, hız hesaplanması

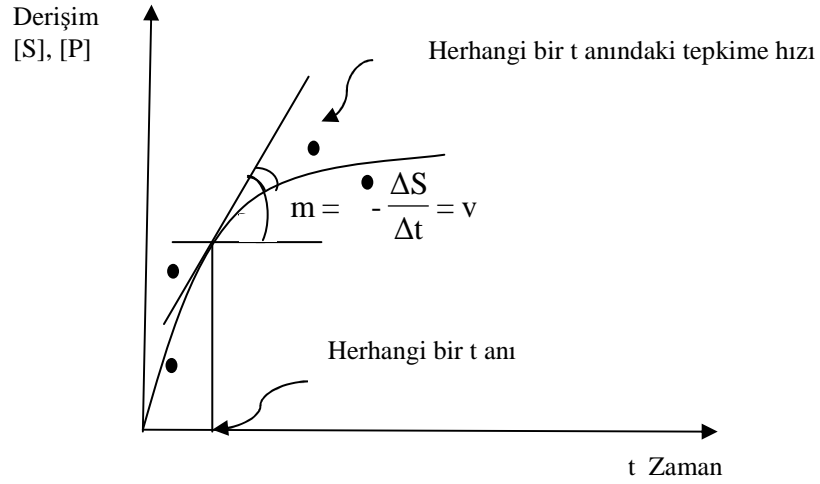
$$v = \frac{\Delta S}{\Delta t \lim_{\Delta t \rightarrow 0}} = -\frac{dS}{dt} \quad (1.6)$$

zamana bağlı çizelge haline getirilseydi bu Çizelge 1.2'deki gibi olurdu. Görüldüğü gibi tepkime hızlarının bulunmasından sonra ancak kinetik sabitlerin uygun bir yöntemle hesaplanabileceği anlaşılmaktadır. Şekil 1.2 'de tepkime hızlarının hesaplanması gösterilmiştir.

Çizelge 1.2. Tepkime hızlarının hesaplanması (Lübbert vd., 2000)

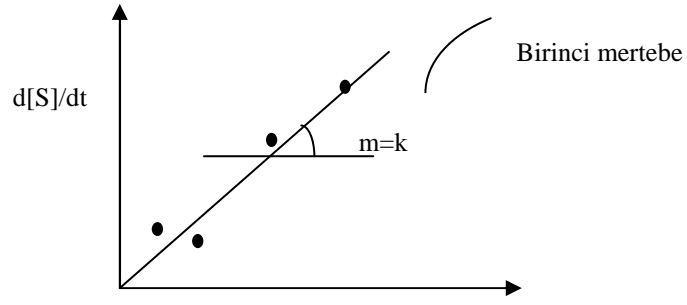
($\Delta t=1$)	T	[S]	V
	$t_0=0$	S_0	$V_0=0$
	$t_1=1$	S_1	$v_1=(S_1-S_0)/\Delta t$
	$t_2=2$	S_2	$v_2=(S_2-S_1)/\Delta t$

	$t_n=t_n$	S_n	$v_n=(S_n-S_{n-1})/\Delta t$



Şekil 1.2. Tepkime hızlarının zaman-derişim eğrisinden hesaplanması

Şekil 1.3'ten de görüleceği gibi, birinci mertebe enzimatik olmayan tepkimeler için bu, tepkime hızı-derişim grafiğinde çizilecek olan doğrunun eğiminden hesaplanırken, enzimatik tepkimeler için bunun ancak olarak önerilen kinetik modelin doğrusallaştırılmasıyla gerçekleştirilebileceği anlaşılmaktadır (Bailey, 1986; Shuler ve Kargi, 1992).



Şekil 1.3. Birinci mertebe enzimatik olmayan tepkimeler için kinetik sabitlerin bulunması (Smith, 1970)

1.1.5. Enzim inhibisyonu

Enzim faaliyetlerini yavaşlatan ya da durduran bileşiklere *inhibitör* adı verilir. İnhibitör bileşiklerin enzim aktif merkezine girerek substratının bu bölgeye bağlanmasını engelleyerek veya aktif merkez dışında bir bölgeye bağlanarak enzim konformasyonunu değiştirerek enzimin reaksiyon hızının azaltılmasına da *inhibisyon* denir (Özata ve Kutlu, 2000).

Enzim inhibisyonu geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz olmak üzere iki genel gruba ayrılmıştır. Geri dönüşümlü inhibitörler bağlanmadan sonra kolayca enzimden ayrılabilir. Etilendiamintetraasetikasit (EDTA) ve sitrat gibi bazı bileşiklerle geri dönüşümsüz inhibisyon gerçekleştirilir ve kendi arasında yarışmalı, yarışmasız ve karışık olmak üzere üçe ayrılır.

Yarışmalı inhibisyon: Yarışmalı inhibitör enzimin aktif bölgesi için substratla yarışan, geri dönüşümlü inhibitörler arasında yaygın olan bir çeşittir. Bu inhibisyon türünde görülen kinetik sabit K_m 'nin artışı ve bu artışla tepkime hızının düştüğüdür. Bu inhibisyon türünü ortadan kaldırabilmek için ortama yüksek derişimde substrat eklenmelidir.

Yarışmasız inhibisyon: Substrat aktif yerin dışındaki bir yere bağlanır ve yarışmalı inhibitörün tersine sadece ES kompleksine bağlanır. Bu şekilde enzimin substrata karşı gösterdiği affinite düşmektedir. Bu inhibisyon türü tepkime hızını düşürmektedir ve bunu engelleyebilmek için ortama reaktif eklenmesi

gerekmektedir. Tepkime ortamında enzim-substrat-inhibitör yapısı oluştuğunda maksimum hız (v_m) düşer ve bu da K_m 'nin artmasına yol açar.

Karışık inhibisyon: Yarışmasız ve karışık inhibisyon iki veya daha fazla substratlı enzimler için gözlenmektedir. Bu inhibisyon türünde inhibitör genel olarak hem K_m 'i hem de v_m 'i etkiler. v_m 'deki düşüş tepkime hızının azalmasını K_m 'deki düşüşten daha fazla etkilemektedir.

Geri dönüşümsüz inhibisyonda inhibitör önce aktif bölgeye bağlanır, sonra aktif bölgede kovalent bağ oluşturmak üzere reaksiyona girer (E-I). Ardından aktif bölge inhibitör tarafından geri dönüşümsüz olarak bloke edilir ve kalıcı olarak inaktif hale getirilmiş olur. Bu kuvvetli bağların sonucu inhibitör konsantrasyonunun düşmesi halinde inhibitör enzimden ayrılmadığı için enzimatik aktivite hızı eski haline gelmezken, geri dönüşümlüde ise inhibitör konsantrasyonunun azalması aktivite hızını arttırmaktadır. Ayrıca elektrofilik fonksiyon gruplarıyla da geri dönüşümsüz inhibisyon gerçekleştirilebilir (Bugg, 1997; Nelson ve Cox, 2005; Topçular, 2006; Kalaycıoğlu vd., 2010).

1.1.6. Enzim aktivitesinde etkili etmenler

Sıcaklık Etkisi: Kimyasal tepkimelerin tümünde sıcaklık artışı ile tepkime hızının arttığı görülür. Enzim katalizli tepkimelerin hızı, belli bir sıcaklık değerine kadar artış göstermekte, tepkime veren moleküller arasındaki çarpışma hızı da kinetik enerjileri arttığı için yükselmektedir. Bu duruma bağlı olarak ta aktivasyon enerji seviyesini aşabilen çarpışmaların sayısı da artar ve reaksiyon hızı maksimum hıza ulaşır. Enzim katalizli tepkimelerin hızı diğer kimyasal tepkimelerde olduğu gibi Arrhenius eşitliğine uygun olarak değişim göstermekte olup sıcaklık değişimi tepkime hızının yanı sıra K_m ve v_m değerlerini de değiştirir (Bailay, 1986).

$$K_m(T) = A.exp(E_a/RT) \quad (1.7)$$

Maksimum hıza ulaşılan o noktadan sonra sıcaklık düşmeye başlar ve enzimin üç boyutlu yapısı bozulur. Sıcaklık artışı ile enzim aktivitesinin düşmesi olayına “termal denatürasyon” adı verilmektedir.

pH Etkisi: Enzimlerin aktivitesi H^+ iyon konsantrasyonuna bağlıdır ve her enzimin aktivite gösterdiği pH değerleri birbirinden farklıdır. Enzimlerin en fazla etkinlik gösterdiği pH' ya *optimum pH* denir. Çoğu enzimin optimum pH'sı 5-7 arasında görülmektedir (pepsin pH'sı 1-2, tripsin pH'sı 8 gibi uymayanlar hariç). Enzimlerin birçoğu aktif bölgesinde iyonik gruplar içermekte ve ortam pH'sında meydana gelen değişiklikler bu aktif bölgelerin iyonik formunu etkilemektedir. Bu formdaki değişiklik enzim aktivitesini değiştirmektedir ve bu şekilde tepkime hızı değişmiş olur. Enzim aktivite çalışmalarında ortam pH'sının çalışılan enzimin optimum pH'sı düzeyinde tutulmasına dikkat edilmelidir (Özata ve Kutlu, 2000; Sözbilir ve Bayşu, 2008; İspirli, 2008).

Enzim Derişimi: Enzimatik tepkimelerde enzim denatüre olmadığı sürece ve ortamda yeterli miktarda substrat bulunması durumunda enzim konsantrasyonu arttıkça reaksiyon hızında artış göstermek gözlenmektedir. Ancak yüksek enzim derişimlerinde ortamdaki substrat sınırlı miktarda olduğundan substratın tükenmesiyle ve inhibe edici faktörlerin varlığında tepkime hızı artışı bir süre sonra yavaşlamakta ve sabit bir değere yaklaşmaktadır. (Özata ve Kutlu, 2000; Sözbilir ve Bayşu, 2008; İspirli, 2008).

Substrat Derişimi: Sabit bir enzim konsantrasyonlu ortamda substrat konsantrasyonu arttıkça enzimatik tepkime hızı da artış göstermektedir; böylece birim zamanda oluşan ürün miktarı da artmış olmaktadır. Ancak bu artış belli bir noktaya kadar devam etmekte, substrat derişimi ne kadar artarsa artsın bu noktadan sonra değişmemekte, durmaktadır. İşte ulaşılan bu maksimum değere *maksimum hız* (v_m) olarak tanımlanmaktadır (Özata ve Kutlu, 2000; İspirli, 2008).

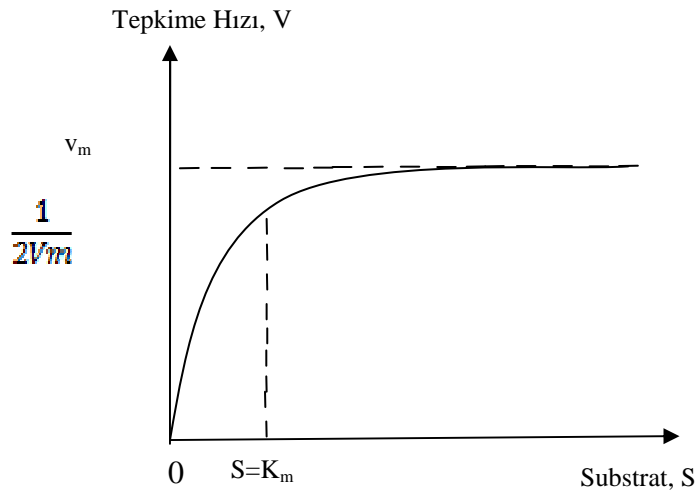
Ürün Derişimi: Enzim katalizli biyolojik tepkimeler genellikle birbirini takip eden, zincirleme tepkimelerdir. Bir enzimin ürünü diğer enzimin substratı olmakta ve zincirleme tepkimeler sonucu son ürün oluşmaktadır. Ortamdaki ürün derişim artışı ile ürün enzim molekülüne bağlanmakta ve enzimi inhibe etmekte ya da aktivitesini azaltmaktadır. Böylelikle enzimatik tepkime ile oluşan ürünler enzimlerin aktivitesini kontrol etmektedirler (İspirli, 2008).

Süre: Enzim reaksiyon eğrisi zamana bağlı olarak bir noktaya kadar artar ve belli bir süre sonra belli bir seviyede sabit kalır, bu durum ürün artışının durduğunu gösterir. Enzim aktivitesinin zamana bağlı olarak azalmasının sebepleri enzimin denatüre

olması, ortamdaki substrat konsantrasyonun gittikçe azalması, ortamda ürün birikmesi nedeniyle reaksiyon dengesinin sola doğru kayması, reaksiyon sonucu oluşan ürünün asidik ya da bazik olmasından kaynaklı ortam pH'sının değişmesi olarak gösterilebilir (Özata ve Kutlu, 2000; İspirli, 2008).

1.1.7. Michealis-Menten tipi kinetik için hız parametrelerinin deneysel olarak tespit edilmesi

Michealis Menten tarafından önerilen kinetik modeldeki K_m ve v_m değerlerinin yüksek hassasiyette belirlenmesi oldukça zor olabilir. Deneysel veriler genellikle başlangıç-hız deneylerinden elde edilir ve bunun için kesikli çalışan bir reaktör bilinen miktarda substrat $[S_0]$ ve enzim $[E_0]$ ile yüklenir. Bölüm 1.1.5'te açıklandığı gibi, ürün (veya substrat) derişiminin zamana karşı grafiğı çizilip eğrinin eğimi hesaplanır. Farklı $[S_0]$ ve $[E_0]$ başlangıç değerleri için v ve $[S]$ eğrileri Şekil 1.4'deki gibi gösterilebilir. Ancak böyle bir çizimden kesin bir K_m değeri belirlemek zordur. Bundan dolayı alternatif olarak muhtelif hesaplama yöntemleri geliştirilmiştir (Shuler ve Kargi, 1992).



Şekil 1.4. Substrat derişiminin tepkime hızına etkisi (Shuler ve Kargi,1992)

1.1.8. Kinetik modelin doğrusallaştırılması

Michealis-Menten kinetik modelindeki K_m (Hız sabiti) ve v_m (maksimum hız) sabitlerinin hesaplanması sırasında, denklem doğrusal bir özellik taşımadığından doğrudan çözümü ancak ya kinetik modeli de içeren sembolik olarak gösterilen uygun eğri çizilerek doğrudan benzeştirilmesi ile (simulasyon ile) ya da denklemin öncelikle doğrusallaştırılması yapılabilir. Simulasyon karmaşık bir işlem olduğundan onun yerine doğrusallaştırma tercih edilerek işlem basitleştirilebilir, ancak yapılan basitleştirme işlemi ile tüm kinetik etkileri tam olarak gösterilemeyebilir. İster doğrusal olsun isterse olmasın tüm simulasyon eğrilerinin çizimi bir optimizasyon işlemi olup, bu noktaların çizilen eğriye olan uzaklıklarının toplamını en aza indiren (minimize eden) bir optimizasyon problemidir ve bu problemin çözümüne ilişkin olarak gerekli olan sayısal çözümlene yöntemlerine daha ayrıntılı olarak materyal ve metot bölümünde değinilecektir (Akpolat, 2010). Aşağıda kinetik modellerin doğrusallaştırılmasına ilişkin üç yaklaşımdan Line weaver-Burk Yöntemi üzerinde durulmuştur (Shuler ve Kargi, 1992).

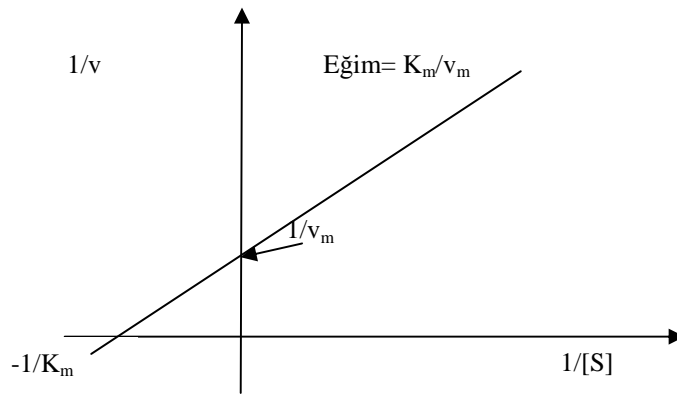
Eşitlik 1.8’de verilen Michealis-Menten kinetik modeli Line weaver-Burk formu ile doğrusallaştırılarak eşitlik 1.9 elde edilir.

$$v = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]} \quad (1.8)$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_m} + \frac{K_m}{v_m} \frac{1}{[S]} \quad (1.9)$$

bu denklemde gösterilen $1/S$ ’ye karşı $1/v$ ‘nin çizimi K_m/v_m eğimli doğrusal bir çizgi verir ve y eksenini $1/v_m$ ile Şekil 1.5’de gösterildiği gibi kesişir. Bu yaklaşımın gerçekleştirilebilmesi için farklı başlangıç derişimlerinde yapılacak denemelerden hızın doğrusal değiştiğinin bilindiği başlangıç bölgesindeki derişim farkından hesaplanabilecek hızların gerektiği unutulmamalıdır.

Line weaver-Burk çizimi v_m üzerine güzel tahminler verir, ancak K_m için aynı başarıyı veremez çünkü verilerin Line weaver-Burk çizimindeki hatası simetrik değildir ve regresyon analizini uygulamalarında bu tür çizimlerde dikkatli olunmalıdır ve düşük substrat derişimlerinde sonuçlar biraz sapabilir (Schuler ve Kargi, 1992). Şekil 1.5 'de gösterildiği gibi eğimin çizimi K_m/v_m eğimli doğrusal bir çizgi verir.



Şekil 1.5. Line weaver-burk çizimi (Schuler ve Kargi, 1992)

1.2. İmmobilizasyon

Biyokatalizörlerin teknik kimya ve biyoteknolojide çeşitli amaçlarla kullanılmaya başlanması, bu katalizörlerin daha ekonomik ve daha kullanışlı hale getirilme olanaklarının araştırılmasına yöneltmiştir. Enzim üretiminde ham madde sorunu mikrobiyal kaynaklar sayesinde büyük ölçüde çözülmüş görülmektedir. Bununla birlikte enzimlerin mikrobiyal kaynaklardan izolasyon ve saflaştırılması oldukça masraflı bir iştir. Endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştirildiğinden katalizör olarak kullanılan serbest enzimin aktivitesini yitirmeden geri kazanılması olarak dışıdır. Serbest enzim reaksiyon ortamından istenildiği anda uzaklaştırılmadığından reaksiyonun kontrolü güçtür. Reaksiyonun istenildiği anda durdurulması için inhibitör katılması düşünülebilir ancak serbest enzim tarafından kirletilmiş olan ürünlere yeni bir kirlilik unsuru eklenmiş olacaktır.

Ürün veya ürünlerin bu kirliliklerden kurtulması işlemleri maliyeti artıracaktır. Katalizör olarak kullanılan serbest enzimi reaksiyon ortamından aktivitesi yitirmeden çıkarabilmek olanaksız olduğundan enzimin yeniden kullanılması da söz konusu değildir. Bu ise enzimlerin çok spesifik ama o ölçüde pahalı katalizörler olmaları nedeniyle maliyeti yükselten önemli etmendir. Ayrıca serbest enzimler sürekli enzim sistemlerinde uygulanamazlar (Telefoncu, 1997).

Tüm bu sorunları olumlu yönde çözecek ,enzimleri endüstri için daha çekici hale getirmek için özellikle son otuz yılda enzim immobilizasyonu üzerine araştırmalar yoğunlaşmıştır (İspirli, 2008).

İmmobilizasyon yöntemi, biyokatalizörleri suda çözünmeyen bir matriks içerisinde hapsetmek veya yine suda çözünmeyen bir taşıyıcıya bağlayarak yalnızca substrat ve ürünün hareketliliğinin sağlandığı sabit katalitik sistemler oluşturmaktır (Tangüler ve Erten, 2006). Enzim üretimindeki hammadde sorunu mikrobiyal kaynaklar sayesinde büyük ölçüde çözülmüş olsa da enzimlerin bu kaynaklardan izolasyon ve saflaştırılması maliyeti yüksek bir iştir.

İmmobilizasyon için en gözle görünür neden ise eğer enzim pahalı ise enzimi yeniden kullanma ihtiyacı ve özellikle endüstriyel süreçte bunun sağlanmasıdır (Buchholz, vd., 2005; İspirli, 2008). İmmobilizasyon teknikleri, geleneksel yöntem olan taşıyıcılı immobilizasyon ile son yıllarda hızla gelişen taşıyıcısız immobilizasyon olarak iki ana grupta sınıflandırılmaktadır (Topçular, 2006).

1.2.1. Enzim immobilizasyonu

İmmobilize enzim, bağlama yoluyla tutulan veya sınırlı bölgeler içerisinde katı desteği ile sabitlenebilen enzimler olarak tanımlanmıştır. İmmobilize enzim konusu birçok alanda tam başarılı uygulamalarından hem de son zamanlarda karşılaşılan avantajlarından dolayı önemli ölçüde dikkat çekmektedir. Bu durum bu alandaki çalışmaları daha kullanışlı ve daha ekonomik biyokatalizörlerin üretimi araştırmalarının yapılmasına yönlendirilmiştir (Söylemez ve Fadiloğlu, 1996; Telefoncu, 1996). Yaklaşık 50 yıldır çözünmez immobilize sistemler geliştirmek için pek çok çaba gösterilmektedir. Bu çalışmalarda amaçlanan hedeflerin ilki heterojen biyokatalizörlerin tekrar kullanılabilirliği, üretim maliyetlerinin düşürülmesi ve sürecin daha iyi kontrol edilebilmesi, ikincisi analitik ve medikal uygulamalar için

sabit ve tekrar kullanılabilir analitik araçlar geliştirilmesi; üçüncüsü proteinler ve enzimlerin saflaştırılmasında yeni seçici adsorbantların sağlanması; dördüncüsü katı faz protein kimyası için temel araçlar oluşturulması ve beşincisi de protein ilaçlarının kontrollü salınımı için etkili mikro aygıtların sağlanmasıdır. Enzim immobilizasyonundaki metotlar genelden çok özel durumlar içindir. Yapılacak işin niteliğine bağlı olarak uygun taşıyıcılar, uygun şartlar (pH, sıcaklık, ortamın yapısı) ve enzim seçimi yapılmalıdır. Yapılan araştırmalardan immobilize enzimlerin hem akademik hem de endüstriyel alanda pek çok üstünlük sunduğu anlaşılmaktadır (Topçular ve Ayhan, 2007).

1.2.2. Taşıyıcılı immobilizasyon

Enzim immobilizasyonunda doğal veya sentetik pek çok organik ve inorganik materyal kullanılmaktadır. Taşıyıcı , suda çözünmeyen katı veya polimer olabilir. Enzim, ilaç, antijen vb. biyolojik moleküllerin immobilizasyonları da üç temel grupta toplanabilir (Topçular, 2006).

Bunlar;

- Suda çözünmeyen taşıyıcıya bağlama yöntemleri
- Çapraz bağlama yöntemleri
- Hapsetme yöntemleri

Suda çözünmeyen taşıyıcıya bağlama yöntemleri: En eski immobilizasyon yöntemidir. Bağlanma kovalent, iyonik ya da adsorbsiyon şeklinde gerçekleşmektedir. Taşıyıcı seçiminde; taşıyıcı büyüklüğü, toplam yüzey alanı, suda çözünmemesi ancak büyük oranda hidrofobik karakterli olmaması ve taşıyıcının kimyasal bileşimi dikkate alınır. En çok kullanılan taşıyıcılar olarak maleikanhidrit, nitrolanmış floroarilmetakrilik gibi polimerik yapılar gösterilebilir (Ayhan, 1997; Telefoncu, 1997).

Çapraz bağlama yöntemleri: Küçük moleüllü bi- veya multi- fonksiyonel reaktifler enzim molekülleri arasında bağlar yaparak suda çözünmeyen komplekslerin oluşmasını sağlamaktadır. En çok kullanılan çapraz bağlama reaktiflerinden bazıları glutaraldehid, kloroformat ve karbonildiimidazoldur. İşlem

koşulları ılımlı olmadığından önemli ölçüde aktivite kaybı bu yöntemin dezavantajıdır (Ayhan, 1997; Telefoncu, 1997).

Hapsetme yöntemleri: Enzim moleküllerinin belirli bir yerde tutularak hareketsizleştirilmesini temel alır. Polimer matriks içindeki kafeslerde, yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ile gerçekleştirilebilir. Yöntemde biyolojik molekül fiziksel ya da kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmaz. En çok kullanılan taşıyıcılar, hidrofilik temele dayalı poliakrilat jeli ve karbohidratlardır (Ayhan, 1997; Telefoncu, 1997). Taşıyıcıda Şekil 1.6’da verilen özelliklere sahip olmalıdır (Broun vd., 1978; Scouten vd., 1987).

1. Hidrofilik karakterde olma,
2. Suda çözünmeme,
3. Gözenekli yapıda olma
4. Uygun partikül formunda olma
5. Kimyasal ve termal stabiliteye sahip olma
6. Kovalent bağlamada kullanılacak taşıyıcılar yumuşak koşullarda reaksiyon verebilen fonksiyonel grupları taşımali
7. Mikroorganizmalara karşı dirençli olma
8. Pahalı olmama
9. Rejenere olabilme
10. Zehirli olmama

Şekil 1.6. Enzim immobilizasyonunda yararlanılan taşıyıcılarda aranan özellikler
(Telefoncu, 1997)

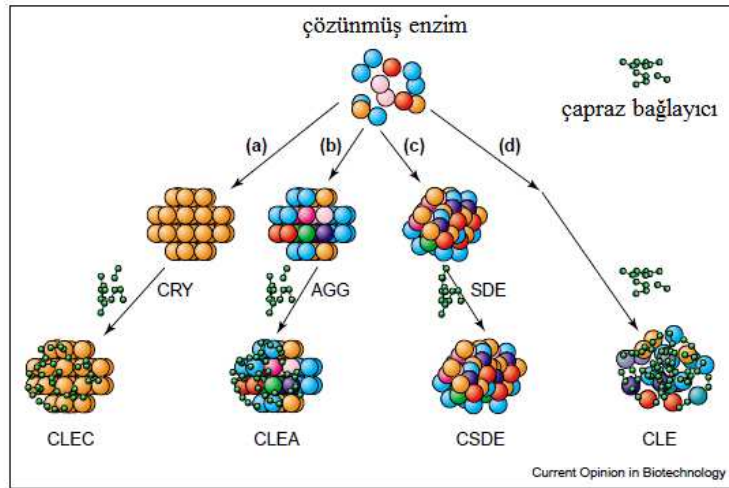
1.2.3. Taşıyıcısız immobilizasyon

İmmobilize enzimlerde taşıyıcı olarak kullanılan polimer malzeme, katalitik olmayan kütlenin %90-%99 aralığında seyretmesine bağlı olarak enzim aktifliğinde düşüşe neden olmakta, bu durumda alıkonma süresi artmakta ve verimlilikte de düşüş gözlenmektedir. Ayrıca, enzim bir taşıyıcı üzerine immobilize edildiğinde özellikle yüksek miktarda enzim yüklemesi halinde enzimin doğal aktivitesinde %50’ye varan düşüşler de görülmektedir (Ayhan, 1997; Sheldon vd., 2002).

İmmobilize enzimin istenilen performansı karşılayabilmesi için taşıyıcının yapısını ve özelliklerini belirlemeye gerek uyulduğundan taşıyıcıya bağlı immobilizasyon tasarımları çok fazla emek ve zaman harcanmasına yol açan deneme yanılma deneylerine bağlıdır. Bu sebeple, son yıllarda “*taşıyıcısız*” enzim immobilizasyonu

çalışmalarına ilgi gittikçe artmaktadır. Taşıyıcısız enzim immobilizasyonu yöntemleri olarak, çapraz bağlı çözülmüş enzimler, çapraz bağlı enzim kristalleri kullanılmaktadır (Topçular, 2006).

Taşıyıcısız immobilize enzimler çözülmüş, kristallenmiş ve fiziksel yolla agregat hale getirilmiş enzimlerin, doğrudan çapraz bağlanması ile hazırlanmaktadır. Bu sistemleri birbirinden ayıran kullanılan çapraz bağlayıcılardır. 1960'lı yılların başlarında katı faz protein kimyasındaki çalışmalar çözülmüş enzimlerin veya enzim kristallerinin, glutaraldehit gibi bifonksiyonel kimyasal çapraz bağlayıcılar ile bağlanıp, bugün aktivitelerini koruyan çapraz bağlı çözülmüş enzimler ya da çapraz bağlı enzim kristalleri oluşturmanın yolunu açmıştır. Bu sistemler birbirinden Şekil 1.6'da görüldüğü gibi kullanılan çapraz bağlayıcı ile ayrılmaktadırlar CRY kristaller, AGG agregat, SDE sprey ile kurutulmuş enzimdir (Cao vd., 2003).



Şekil 1.7. Taşıyıcısız immobilize enzim üretimine farklı yaklaşımlar: a)kristalleştirme b)agregasyon c)sprey kurutması d)direk çapraz bağlama

1.2.3.1. Çapraz bağlı çözülmüş enzim (Cross-linked dissolved enzyme-CLE)

Çözülmüş enzimlerin çapraz bağlanması ile sıcaklık, pH, iyonik kuvvet ve çapraz bağlayıcı miktarı gibi faktörler arasındaki hassas denge korunarak oluşturulmuş bu tür enzimler ile sıcaklık dayanımı geliştirilebilir. Ancak, çözünürlüğü yüksek bu enzim moleküllerinin dezavantajları; moleküller arası çapraz bağlanmanın aktiviteyi düşürmesi, tekrar kullanılabilirliğinin ve mekanik dayanıklılığının düşük olmasıdır.

Ayrıca CLE'lerin işlenmesinde ve bu enzimlerin geometrik yapılarının kontrolünde de bazı zorluklarla karşılaşmaktadır (Cao vd., 2003).

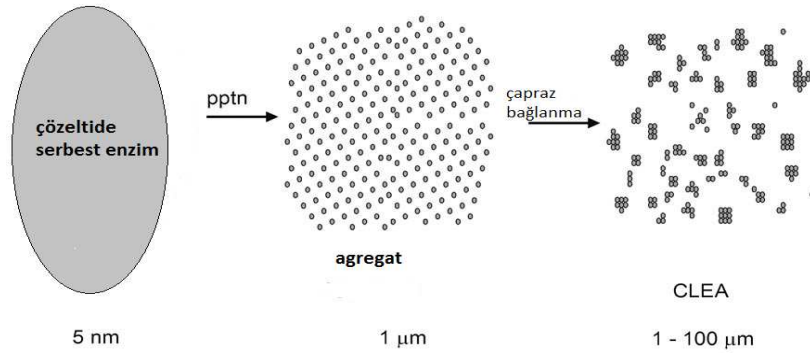
1.2.3.2. Çapraz bağlı enzim kristalleri (*Cross-linked enzyme crystal-CLEC*)

Glutaraldehid ile çapraz bağlı enzim kristalleri ilk olarak Quioco ve Richards tarafından 1964 yılında tanımlanmıştır. Temel amaçları X-ray difraksiyon çalışmaları için enzim kristallerini stabilize etmektir, ancak bununla birlikte bu enzim kristallerinin katalitik aktivitelerinin varlığını da göstermişlerdir. Çapraz bağlı enzim kristallerinin endüstriyel biyokatalizör olarak kullanımına ise 90'lı yılların başlarında Vertex Pharmaceuticals'daki bilim insanları tarafından öncülük edilmiştir ve ardından Altus Biologics tarafından ticarileştirilmiştir. İlk çalışmalar termolizinin CLEC'ler ile düşük kalorili tatlandırıcı üretiminin merakı ile gerçekleştirilmiştir fakat metodun akabinde geniş bir enzim grubuna uygulanabilir olduğu gösterilmiştir. CLEC'lerin sıcaklıkla, organik solvent ve proteolizle denatüre olmaya çözümlü karakterli enzim veya liyofilize toza göre daha dayanıklı olduğu ispatlanmıştır. CLEC'lar dayanıklıdır, ayarlanabilir molekül büyüklüğü ile yüksek aktiflikte immobilize enzimdir, boyutu 1-100µm aralığında değişir. İşlevsel güvenilirlikleri ve geri dönüşüm kolaylığı yüksek katalizörlüğü ve hacimsel verimliliği ile birleşir ve onları en iyi şekilde endüstriyel biyotransformasyonlara dönüştürür. Bir örnekle açıklanırsa *Caldariomyces fumagodon* elde edilen kloroperoksidazı serbest kloroperoksidaza göre organik solventlere daha yüksek termal dayanıklılık ve tolerans gösterir (Sheldon, 2007).

1.2.3.3. Çapraz bağlı enzim agregatları (*Cross-linked enzyme aggregate-CLEA*)

Çapraz bağlı enzim agregatları, taşıyıcısız immobilize enzim ailesine çok yakın zamanda katılmışlardır(Sheldon vd., 2000).Çözünmüş enzim molekülleri, moleküller arası uzaklığı etkileyen özellikler değiştirilerek daha sonra çapraz olarak bağlanacak fiziksel agregatlar oluşturabilirler (İspirli, 2008). CLEC'nin dezavantajı yüksek saflıkta enzim gerektirmesi, enzimi kristalize etme ihtiyacıdır. Diğer yandan proteinlerin sulu çözeltilerine tuz veya su ile çözülebilen organik çözücü veya iyonik olmayan polimer eklenmesi protein moleküllerinin fiziksel agregatları olarak çökeltilerine sebep olduğu bilinmektedir, kovalent olmayan bağlarla bozunma

olmadan tersiyer yapısını denatürasyon olmadan bir arada tutar (Sheldon, 2007). Taşıyıcısız immobilize enzim ailesine yakın zamanda katılan CLEA'ların hazırlanması Şekil 1.7'de gösterilmiştir. Moleküllerin agregat oluşturmasını sağlamak için enzim moleküllerinin ıslanılabilirlik derecesi değiştirilebilir veya çözeltinin elektrostatik sabiti, uygun agregat oluşturucu madde (genellikle bu amaçla denatüre edici olmayan protein ayırıcı kullanılır) kullanılarak farklılaştırılabilir. Bu koşullar altında oldukça çözünür olan enzim molekülleri bir araya toplanır ve doğal enzim konformasyonunda çözünmez enzim agregatları oluşturmak üzere çökelti oluştururlar. Bu fiziksel çözünmez agregatlar, enzim kristallerinin çapraz bağlanmasına benzer şekilde bi fonksiyonel çapraz bağlayıcılar ile ardı ardına bağlanır (Cabana vd. , 2007). En yüksek aktivite çapraz bağlı çözünmez enzimlerin, proteinin çoğunluğunun çöktürüldüğü durumda, en düşük aktivite herhangi bir çökeltme maddesi katılmadığında (CLE) görülmüştür. Bu gözlemler, çözünmez enzim agregatlarının oluşumunun, çapraz bağlanma boyunca enzim aktivitesini korumak için başlıca basamak olduğunu öne sürmektedir. Sıkı olan bu moleküller, çözülmüş ve dağınık halde bulunan moleküllerden daha kolay çapraz bağlar ve bu durum, enzim moleküllerinin çözelti içinde gluteraldehit eklenmesi halinde bile neden çapraz bağlanmadıklarını açıklamaktadır (İspirli, 2008).



Şekil 1.8. CLEA'nın Hazırlanması (Sheldon, 2007).

Çapraz bağı enzim agregatı oluşturmak ve protein saflaştırmak için en çok kullanılan birincil yöntem protein agregasyonudur. Bu yöntem ile agregat hazırlarken kristallendirme basamağının tersine enzimin yüksek saflıkta olmasına ve yoğun işgücüne gerek duyulmamaktadır. Bu yüzden, saflığı etkilenmiş herhangi bir enzim denatüre edici olmayan ortamda önceden hazırlanmış fiziksel agregatlar oluşturmak üzere kolaylıkla yönlendirilebilir (Topçular, 2006).

Protein kristalleriyle karşılaştırıldığında kristal formun boyut ve şekil optimizasyonu için gereken uğraşa gerek kalmadığından CLEA yardımıyla, CLEC'nin sahip olduğu yüksek saflıkta enzim kullanma gerekliliği, kristallendirme koşullarının ayarlanması, boyut ve şekil optimizasyonu zorlukları gibi dezavantajların üstesinden gelinmiştir. Diğer yöntemlerle, özellikle de CLEC ile aktivite, dayanıklılık ve temel prensip açısından benzerlik göstermektedir ancak CLEA hakkında cevaplanması gereken birçok soru bulunmaktadır. Bu bağlamda enzim agregatlarının boyutunun herhangi bir difüzyon kısıtlamasına gitmeden nasıl kontrol edileceği, enzim konformasyonunun nasıl daha esnek hale getirileceği, enzim aktivitesi ve seçiciliğinin agregasyon koşullarının farklılaştırılması ile nasıl ayarlanacağı gibi bilinmeyen konuların aydınlatılması gerekmektedir.

CLEA'lar ile ilgili yapılan çalışma konuları; geniş bir enzim aralığında uygulanabilirliği, boyut kontrolü, yeni agregasyon yöntemleri ve yeni çapraz bağlayıcılarıdır. Amaç, daha yaygın uygulamalar için güçlü çapraz bağı enzim agregatlarını seçip tasarlamak üzere esnek bir teknoloji platformu oluşturabilmektir.

Taşıyıcısız immobilize enzimlerin biyokatalizör olarak kullanılmaya başlamasının endüstriyel uygulamalar açısından avantajları; taşıyıcısız immobilize enzimin maliyetini düşürme ve pazarlamayı kolaylaştıracak şekilde hazırlama kolaylığı sunma, yaygın bir alanda, esnek kullanım fırsatları sunma olarak özetlenebilir. CLEA, birden fazla enzimin bir araya getirilmesi ile kombine edilmiş çapraz bağı enzim agregatları oluşturmaya olanak tanır (Topçular, 2006).

1.3. Deneysel Tasarım Ve Optimizasyon

Deneysel tasarım terimi genellikle deney sonuçlarını etkileyecek faktörlerin (parametrelerin) belirlenmesi, bu faktörlerin etkisinin bulunması ve kontrol edilemeyen faktörlerin etkisinin de en aza indirgenmesi olarak verilebilir. Deneysel sonuçlarını pek çok faktör etkileyebileceğinden, oldukça karmaşık deneysel tasarımlar yani deneysel çalışmaya ilişkin faktör seviyelerinin önceden saptandığı çalışmalar gerekli olmaktadır.

Deneysel tasarımın öneminin daha iyi anlaşılabilmesi için örnek olarak seçilen bir reaksiyona ilişkin reaksiyon verimini etkileyen pH ve Katalizör Konsantrasyonu faktörleri göz önüne alınsın. Geleneksel yöntemle reaksiyon verimi üzerine deneysel faktörlerin etkisi incelenseydi, önce katalizör konsantrasyonu sabit tutularak ve pH'a bağlı olarak verim ölçülürdü ardından da elde edilen en iyi (optimum) pH değeri sabit tutularak farklı konsantrasyon değerleri için verim belirlenir. Bu değerler arasından bulunan en iyi pH değeri optimum olarak bulunurdu. Ancak aynı çalışma herhangi bir deney tasarım modeli seçilerek yapılmış olsaydı, sonuçlar açısından faktörlerin birbiriyle olan etkileri de göz önüne alındığından klasik yöntemle bulunandan daha farklı olacağı açıktır.

Deneysel tasarım sonuçları itibari ile incelendiğinde ise, hem klasik yöntemle yapılan çalışmalarda bir faktörün değeri değişirken diğerleri sabit tutulduğundan zaman ve emek tasarrufu yapılacağından maliyet en aza indirgenerek optimize edilebilecek hem de tüm faktörlerin etkileşimleri matematiksel bir modelle ifade edilerek deneysel olarak bulunacak sonuçların yanında hesaplama yoluyla da tahmini bir sonuç bulunarak, beklenen sonucun deneysel olarak gerçekleştirilip gerçekleştirilemeyeceği kontrol edilebilecektir (Arifoğlu, 2005).

Faktöriyel ya da Plackett -Burman gibi tarama tasarımları deneysel bir çalışmanın sonucunu etkileyen önemli faktörleri bulmak için kullanılırken, Merkezi Kompozit Tasarımı ya da Simplex gibi optimizasyon yöntemleri ile de tarama tasarımları sonucu bulunan önemli etkin faktörlerin en iyi değerleri optimize edilerek iyileştirilebilir (Kieran vd., 2001 ; Demir ve Tokatlı vd. , 2009).

1.3.1. Tam faktöriyel tasarım

Tarama tasarımlarından olan full faktöriyel tasarım en fazla üç ya da dörde kadar olan az sayıdaki faktör için uygun olup çözüm için çok zaman harcanacağından optimizasyon düşüncesinin temelini oluşturan düşük fayda (ya da maliyet) yaklaşımından uzaklaşmaktadır. Deney sayısı 2^k formülü ile hesaplanmaktadır. Hesaplama algoritmasında öncelikle parametrelerin alt ve üst sınırları belirlenerek sırasıyla +1 ve -1 seviyelerine kodlanarak eşleştirilir. Ancak deneysel çalışmada gerçek değerler kullanılır. Optimize edilecek olan kontrol değişkeni ya da tasarım sonucu olarak seçilecek büyüklük üzerinde faktörlerin birbirleriyle olan etkileşimlerini de önerilen model denklemi içerir. İki faktörlü bir model yalnızca bir yüzey eğrisi (ya da fonksiyonu) ile ifade edilip görselleştirilebilirken, üç faktörlü bir modelde çözüm sayısal olarak yapılabilir ve ancak faktörlerden biri sabit tutularak diğer ikisinin değerleri alınıp bunlara bağlı olarak yüzey eğrileri çizilebilir. Çünkü insanoğlu Euklidien uzayda ancak üç boyutlu görüntüleri algılayabilir. Yine üç faktörlü bir tasarım modelin kendisi düşünüldüğünde 2^3 yani 8 adet deney faktörünün tarandığı bölgede deneylerin bir küpün köşelerine yerleştirildiği böylece tasarlanmış deney setinin tümüyle küp hacmi içerisinde yer aldığı düşünülebilir. Ancak daha fazla faktörlü tasarımlarda oluşturulan deney setlerinin hayal edilmesi insanoğlu için imkansızdır. Tasarım sonucunu oluşturan ve üç faktörün birbiriyle olan ilişkisini doğrusal olarak içeren model ise aşağıda verilmiştir (Demir ve Tokatlı vd. , 2009).

$$y = b_0x_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3 \quad (1.10)$$

Bu modeldeki katsayıların hesaplanması verilen yüzeyi ifade eden bu denklemin gerçek deney sonuçlarının oluşturduğu yüzeye yaklaştırılması bir optimizasyon işlemi olup en küçük kareler metodu ile iki yüzey arasındaki farkın en aza indirgenmesine dayanır. Yani buradaki minimize edilecek optimizasyon fonksiyonu

$$J = \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_{i-deneysel} - y_{i-hesaplanan})^2} \rightarrow \text{Minimum} \quad (1.11)$$

şeklinde olup, katsayıların kısmi türevleri alınıp (fonksiyona ilişkin o noktadaki eğimler) sifira eşitlenir.

$$\sum_{i=1}^n \frac{\partial J}{\partial b_i} \Big|_{b_{i-1}, j+1, \dots} = 0 \quad (1.12)$$

veya

$$\frac{\partial J}{\partial b_0} = \sum_{i=1}^n (y_i - b_0 x_{0i} - b_1 x_{1i} - \dots - b_{123} x_{123i}) = 0$$

.....

$$\frac{\partial J}{\partial b_{123}} = \sum_{i=1}^n (y_i - b_0 x_{0i} - b_1 x_{1i} - \dots - b_{123} x_{123i}) = 0 \quad (1.13)$$

Bu denklem takımının çözümü, parametreler ve çarpımlarından (faktörler ya da faktör çarpım gruplarından) oluşan (8 adet) doğrusal bağımlı denklem takımını oluşturan b katsayıları kümesi optimum yüzey fonksiyonu modelini tanımlar. Yani doğrusal bağımlı denklem takımı aşağıdaki gibi yazılıp, buradan da b katsayıları aşağıdaki gibi hesaplanır.

$$y = bX \quad b = (X'X)^{-1} X'y \quad (1.14)$$

1.3.2. Fraksiyonel faktöriyel tasarım

Tarama tasarımlarından olan full faktöriyel tasarım en fazla üç ya da dörde kadar olan az sayıdaki faktör için uygun olup çözüm için her bir faktörün tek başına ya da birbiriyle olan etkileşimlerinin tümü göz önüne alındığından çok zaman harcanmakta bu da optimizasyon düşüncesinin temelini oluşturan düşük fayda (ya da maliyet) yaklaşımından uzaklaşmaya neden olmaktadır. Deney sayısı da 2^k formülü ile hesaplanmakta ve deney sayısı oldukça fazla olmaktadır. Pek çok durumda faktörler arası etkileşimler çok önemli olmayabilir ve böyle durumlarda deney sayısı azaltılarak faktörlerin etkileri incelenebilir ve önemli olmayanlar belirlenebilir. Örneğin 5 faktörlü ($X_1, X_2, X_3, X_4, X_5(X_1*X_2*X_3*X_4)$) bir aktivite çalışmasında $2^{k-p} = 2^{5-1} = 16$ deney yapılarak faktörlerden hangisinin etkin olduğu incelenebilir. Çok sayıda faktörün olduğu durumlarda ise, sadece faktörlerin kendi etkilerinin incelendiği Plackett-Burman tasarımı yapılır. Burada deney sayısı $k-1$ 'dir (Demir ve Tokatlı vd. ,2009).

1.3.3. Deney tasarımında optimizasyon

İki seviyeli (-1 ve +1) faktöriyel tasarımlar her bir faktörün etkisini genel olarak inceleyen tasarımlar olup, önemli faktörler bulunduktan sonra ayrıntılı inceleme yapıp her bir faktörün optimum değerlerinin bulunması gerekmektedir. Bu durumda Merkezi Kompozit Tasarımı'na başvurulur. 2^k+2k+1 şeklinde verilen tasarım (deney) sayısı sırasıyla star tasarım, full faktöriyel tasarım, kısmi faktöriyel tasarım ve orta düzeydeki deney sayılarını göstermektedir. 2^k 'deki seviyeler ± 1 , $2k$ 'dekiler $\pm \alpha$ ve 1'deki ise 0 dir. α 'nın Değeri seçilecek olan dairesel ya da ortogonal tasarım yöntemine göre sırasıyla aşağıdaki seviyeleri alır (Demir ve Tokatlı vd. , 2009).

$$\alpha = \mp \sqrt{2^k} \quad \text{ve} \quad \alpha = \mp k \quad (1.15)$$

α Seviyesindeki faktörlerin değerleri de

$$\bar{\alpha} = \frac{x_{\alpha} - x_{orta}}{(x_{orta} - x_{alt})veya(x_{alt} - x_{orta})} \quad (1.16)$$

formülüyle hesaplanır.

1.4. Tekstil Enzimleri

Son yıllarda endüstride temiz üretim yollarının tercih edilmeye başlanması tekstil endüstrisinde enzimlerin kullanımının gittikçe artmasına yol açmıştır. Kolay ve hızlı şekilde biyolojik olarak parçalanan enzimlerin kullanımı kolaydır ve kontrol edilebilir. Yalnızca belirli substratlarla etkileşen enzimler kimyasalların kullanım oranını azaltarak daha çevreci bir yaklaşım ortaya koymaktadır (Erenler, 2009; Körlü ve Altay, 2009).

Kovalent bağlı yağ asitleri ve yüksek miktarda disülfid köprüleri yün lifi yüzeyini yüksek derecede hidrofob yapmaktadır. Hidrofob yapıdan dolayı da yünün baskısı ve boyanmasında yün yüzeyinin hidrofil boyar maddelerin life difüzyonu engellenir. Bu yüzden yün ön terbiye işlemlerinde yün lifi yüzeyinin hidrofiliğini arttırmak amaçlanmaktadır. Bu yüzden yün liflerinin ön terbiyesinde enzimlerin kullanılabilirliği üzerine yapılan çalışmalar karbonizasyon ve ağartma alanında yoğunlaşmıştır (Duran vd., 2007).

1.4.1. Aşındırma işlemi (Karbonizasyon)

Bu işlemin amacı pamuk liflerinin üzerinde bulunan yağ, pektin ve balmumu gibi selülozik olmayan maddelerin uzaklaştırılması ile absorbansı ve beyazlığı arttırmaktır (Topçular, 2006). Karbonizasyon işlemi yıkanmış yüne ya da yünlü kumaşlara uygulanabilmektedir. Mamulün inorganik asitlerle veya ısıtılınca asidik özellik

gösteren tuzlarla yüksek sıcaklıklarda işlem görmesi karbonizasyon işleminin esasını oluşturmaktadır. Yünün bu inorganik asitlerle karbonizasyonu da life zarar verebilmektedir (Körlü ve Altay, 2009). Genellikle alkali ortamda gerçekleştirilen aşındırma işlemi sonucunda atık suda bulunan kimyasallar çevre açısından tehdit oluşturmaktadır (Topçular, 2006).

Geleneksel alkali uygulamaları, günümüzde yerini daha yumuşak koşullarda çalışan enzimatik yöntemlere bırakmıştır. Bu durumda yün lifinin enzimatik karbonizasyonu selülaz, ligninaz, hidrolaz, lizaz ve oksidoredüktaz gibi enzimler ile yapılabilmektedir (Duran vd., 2007).

1.4.2. Ağartma işlemi

Ağartma işlemi beyaz trikotajlarda, açık tonlu boyanacak kumaşlarda, yünün doğal yapısında olan sarımsı rengi gidermede ihtiyaç duyulan bir işlemdir. Yünün ağartılmasında daha iyi bir beyazlık elde edebilmek için hidrojen peroksit kullanılmaktadır (Körlü ve Altay, 2009). Hidrojen peroksitin ağartma etkisi özellikle hidrojen ve perhidroksil iyonu meydana getirmesine ve pH değerine bağlı olarak bozunmasına dayanır. Bu perhidroksil iyonu tekrar bir hidrojen peroksit molekülü ile reaksiyona girer ve toksik bir anyon olan süperoksit radikal anyonunu meydana getirir (Şencan, 2011).

Hidrojen peroksitin hipoklorit ve sodyum klorite göre pamuk ağartılmasında kullanılmasının sebebi daha az çevre yükü oluşturmalarıdır, dolayısıyla en çok kullanılan oksidantdır. Bununla birlikte hidrojen peroksitten daha çevre dostu ağartma metotları için yapılan çalışmalar enzimatik ağartma ve ozon ile ağartma üzerinde yoğunlaşmıştır. Enzimatik ağartmada saf enzimlerle başarılı deneysel sonuçlar raporlanmış ancak saf enzimlerin aktivasyonlarını kaybetmeden taşınmasında ve depolanmasında soğuk zincire ihtiyaç olduğundan ticari uygulamalar için uygun görülmemiştir.

Enzimatik ağartma için üç farklı yaklaşım izlenmektedir. İlki lignin ve hamur özü ağartılmasında kullanılan lakkaz/mediatör bileşikler, ikincisi, enzimatik ağartmada peroksidaz enzimlerinin kullanılmasıdır. Bu enzimler, H₂O₂ gibi çok çeşitli oksidasyon maddelerini aktifleştirebilmektedirler. Ağartma işlemi esnasında bu enzimler aktivitelerini çok çabuk yitirdiklerinden dolayı yeterli beyazlık elde

edilememiştir. Üçüncü yöntem ise glukoz oksidaz enzimleri sayesinde glikoz ve oksijenden H_2O_2 ve glukonik asit oluşması esasına dayanmaktadır (İnkaya vd., 2008).

Günümüzde en yaygın kullanılan ağartıcı kimyasal hidrojen peroksit olup hidrojen peroksit, pamuk ipliklerine doğrudan uygulanabildiği gibi, glikoz oksidaz / glikoz enzim sistemiyle de üretilmektedir. Her iki durumda da iplikler üzerine fazla miktarda hidrojen peroksit uygulanmakta ve ağartma işlemi bittikten sonra dahi ortamda hidrojen peroksit bulunmaktadır. Bu sebeple, ön terbiye işlemi bitirilmeden önce ortamdaki hidrojen peroksit uzaklaştırılmalıdır. Geleneksel yöntemlerde bunu sağlayabilmek için yıkama işlemi çok sayıda tekrarlanmaktadır ancak günümüzde yapılan çalışmalarda ekolojiyi korumak önem kazandığından dolayı ağartmada enzim kullanımı yaygınlaşmaya başlamıştır (Topçular, 2006; Körlü ve Altay, 2009). Yapılan yeni çalışmalarda tekstil terbiyesinde çevre dostu alternatif bir yöntem olan ozon kullanımı görülmektedir. Bu yöntemin avantajları; doğal bir materyal olan ozonun kararsız yapısı olduğu için işlem süresi sonrasında hızla oksijene parçalanabilmesi, hiçbir zararlı ara ürün ve reaksiyona yol açmaması, zamandan, sudan ve enerjiden tasarruf sağlamasıdır (Gülümser vd., 2009).

1.4.3. Boyama atık suyunun arıtılması

Tekstil endüstrisi atık suları çok çeşitli kimyasallar ve özellikle boyarmaddeler içerdikleri için arıtılması zor olan endüstriyel atık sulardır. Bu arıtma işlemini boyarmadde ve kumaşın türüne ve özelliklerine göre boyama esnasında çeşitli yardımcı maddelerin ilave edilmesi daha da zorlaştırmaktadır. Bu maddelerin çok çeşitli türde olmaları, genelde uzun, birden fazla aromatik halka, birden fazla çift bağ ve 21 değişik fonksiyon grupları taşımaları nedeniyle biyolojik ayrışabilirlikleri düşük olmaktadır (Pekel, 2009).

Tekstil sektöründe yüksek miktarda kimyasal ve su harcayan boyama işlemi sonucunda oluşan atık su, doğaya bırakılmadan önce parçalanması gereken atıklar içermektedir (Topçular, 2006).

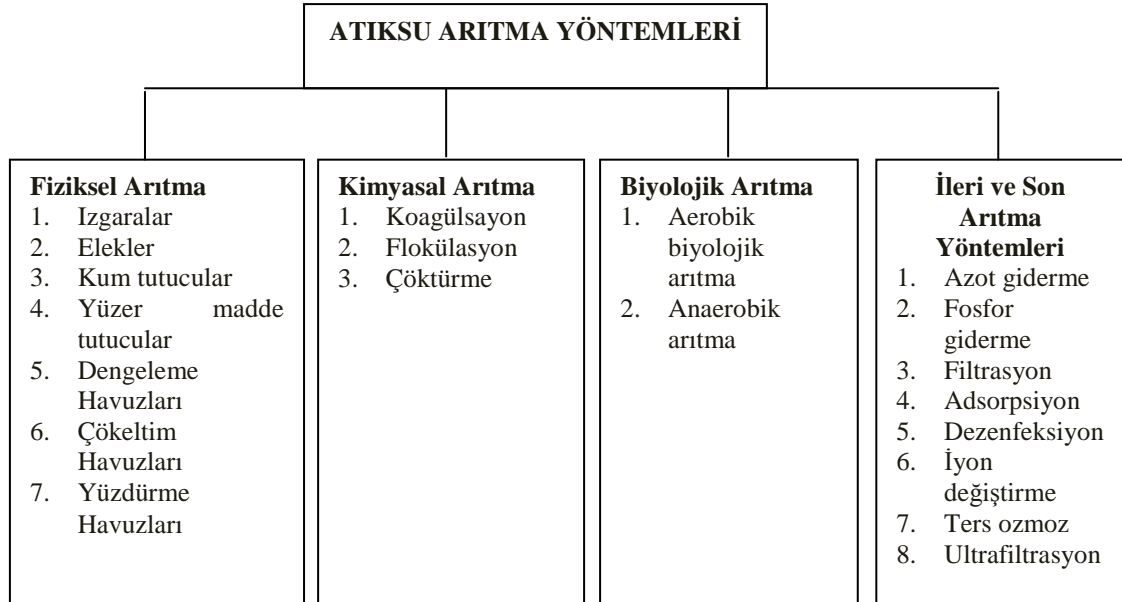
Pamuklu tekstil endüstrisi atık sularının kirlilik unsurları; organik madde içeriğinin, sıcaklığın ve pH'ın yüksek oluşu, toksik maddelerin bulunması, deterjan ve sabun içeriğinin olması, katı maddeler ve alkalinite içermesi şeklinde belirtilebilir.

Boyamada ayrışmaya karşı çok dayanıklı boyaların kullanılması istenildiği için oluşan boya artıkları da biyolojik ayrışmaya karşı dayanıklıdır ve zor ayrışmaktadır (Demirci, 2007). Atık su arıtma yöntemleri Şekil 1.8’de verildiği gibi dört ana başlık altında incelenebilir.

Fiziksel arıtma; çökeltme ve flotasyon işlemleriye çökebilen veya yüzebilen tanecikleri ayırmaktadır.

Kimyasal arıtma; kimyasal metotlar kullanılarak fiziksel arıtım işlemleri sonrası uzaklaştırılmamış, suda çözünmüş halde bulunan kirleticileri uzaklaştırır.

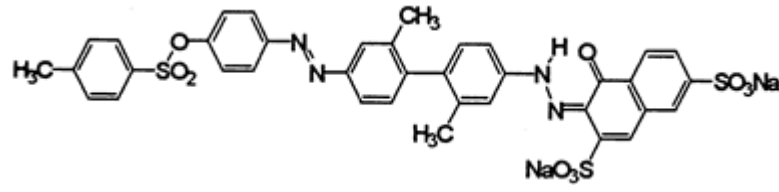
Biyolojik arıtma; atık suda olan organik esaslı katı maddeleri mikroorganizmalar ile parçalayarak atık sudan uzaklaştırır (Alp, 2005).



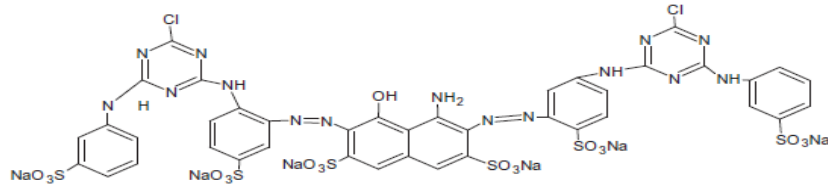
Şekil 1.9. Atıksu arıtma yöntemleri (Alp, 2005)

Son dönemlerde uygun mantarlar veya bakterilerin kullanıldığı mikrobiyal arıtım yöntemleri üzerinde çalışmalar sürdürülmektedir. Atık suyun renginin giderilmesi işlemlerinde ise oksijensiz ortamlarda, çoğunlukla çeşitli bakteri suşlarının birleşimi kullanılmaktadır (Gottlieb vd., 2003). Tekstil boyalarının oksijenli ortamda parçalanması ise küfler ve mayalardan oluşan mantarlar yardımıyla sağlanmaktadır. Atık suyun renksizleştirilmesi, bu mantarların hücre dışı enzimleri tarafından sağlanmaktadır (Qu, 2008). Tekstil atık suyunun biyolojik arıtım işlemlerinin mantarlar ve bakterilerle gerçekleştirilmesi kıyaslandığında mantarlar tarafından

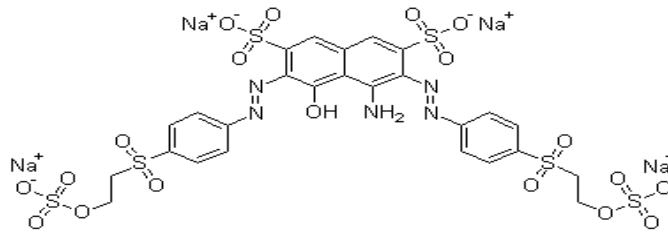
gerçekleştirilen oksidatif parçalama işleminin daha az toksik bileşik oluşturduğu görülmektedir ve durum mantarlarla yapılan arıtma işleminin bakterilerle yapılan arıtma işlemine göre daha avantajlı olduğunu gösterir. Bu amaçla literatürde kullanılan bazı mantarlar şunlardır; *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus niger*, *Bjerkandera adusta*, *Geotrichum candidum*. Bu mikroorganizmaların hücre dışı enzimleri ile parçalanan tekstil boyları literatürde, Reactive Black 5, Acid Orange7, Acid Red 111 olarak verilmiştir (Mohorcic vd., 2006). Şekil 1.9’da bazı tekstil boylarının yapısal formülleri verilmiştir.



Acid Red 111



Reactive Blue 160



Reactive Black 5

Şekil 1.10. Bazı Tekstil Boyalarının Yapısal Formülü

1.5. Peroksidaz Enzimi

Heme demir grubunda olan peroksidazlar organik substratı okside etmede kullanılırlar ve bunun için oksitleyici olarak genelde hidrojen peroksit kullanılır. Organik sentezde tek önemli enzim aromatik bileşiklerin stereo seçici oksidasyonunu katalizlediği görülen *Caldariomyces fumago*'dan elde edilen kloroperoksidazdır (Buchholz vd., 2005). Peroksidaz oksidoredüktaz grubunun bir üyesidir, oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarını katalizler. Karaturp peroksidazı (HRP) sınıf III bitki peroksidazları sınıfına aittir. Peroksidaz klinik tanı ve biyoremediasyonu içeren çeşitli araştırmaların konusu olmuştur (Topçular ve Ayhan, 2007). Tüm peroksidaz enzimleri önemli ölçüde dayanıklıdır ve analizi kolaydır. Bu peroksidaz türler arasında kıyaslama yapmak için iyi bir enzim kılar.

1.5.1. Peroksidaz enzimin yapısı

Genellikle karaturptan hazırlanan enzim 44000 moleküler kütlesi olan bir glikoproteindir. Akseptöre özgüdür (H_2O_2) fakat enzim analizlerinde pek çok sayıda donör substratı ile reaksiyon vermesi için de kullanılabilir. Örneğin o-dianizidin, pirogallol, hidrokuinon, vb. dir. Peroksidaz çeşitli konjugelerde; örneğin antikorlar enzime bağlı immünoabsorbsiyon analizlerinde (ELISA) veya hücre biyolojisinde koloidal altın çözeltisi uygulanmaktadırlar (Bisswanger, 2004).

Temelde monofonksiyonel ve bifonksiyonel olmak üzere iki farklı peroksidaz türünden bahsedilebilir. Monofonksiyonel peroksidaz türü hayvanlardan, bitkilerden, bakterilerden ve mantarlardan elde edilirken bifonksiyonel peroksidaz özellikle bazı bakteri ve mantar cinslerinden elde edilmektedir (Akhtar vd. , 2005). Yaklaşık 250 kDa molekül ağırlığına sahip olan her iki tür peroksidaz da moleküler özellikler açısından benzerlik taşımaktadır ve dört alt ünitelerden oluşmaktadırlar. Monofonksiyonel peroksidaz türü enzimler geniş bir pH aralığında çalışan, organik solventlere dayanıklı glikoprotein yapıda enzimlerken, bifonksiyonel peroksidazlar ise, glikoprotein yapıda değildirler. Tipik peroksidazların aksine aktif oldukları pH aralığı dardır ve sıcaklığa, organik çözücülere daha duyarlıdır (Topçular, 2006).

Peroksidazlar, hidrojen peroksiti elektron alıcı olarak kullanarak farklı oksidatif tepkimeleri katalizleyen enzimlerdir. Tepkime şu şekilde gerçekleşir:



1.5.2. Peroksidaz enziminin mekanizması

Üç adımdan oluştuğu saptanmıştır. Birinci adımda aktif substrat “bileşik I” oluşur.

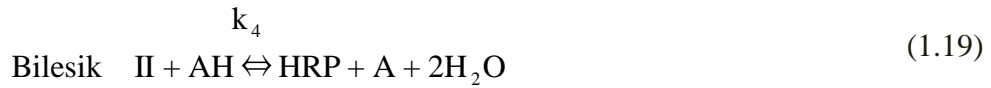


İkinci adımda, “bileşik I” aktif “bileşik II” e dönüşür.



AH: İndirgenmiş verici, A: Yükseltgenmiş verici

Üçüncü adımda , “bileşik II” nin yıkımı ile enzimin geri dönüşümü gözlenir.



Son adımda da ürün oluşumu gerçekleşir.



(Topçular, 2006).

1.5.3. Peroksidaz enziminin sınıflandırılması

Peroksidazlar aminoasit diziliş ve yapılarına göre hayvan peroksidazları ve bitki, mantar ve bakteri peroksidazları olmak üzere iki temel grupta incelenebilir. Bu peroksidaz türlerinin farkları aminoasit dizilişlerinden kaynaklanmaktadır (Topçular, 2006).

1.5.4. Kullanım alanları

Peroksidazın izoenzimleri, yapıştırıcı, bilgisayar çipleri, otomobil parçalarının üretimi, tıpta kullanılan teşhis kitlerinin üretimi ya da endüstriyel atık suların temizlenmesi gibi çeşitli alanlarda, farklı amaçlarla kullanılmaktadırlar. Petrol, kâğıt, tekstil ya da kömür işleme gibi sektörlerde kullanılan tehlikeli kimyasalların doğaya verilmeden önce, suda çözünebilen daha düşük molekül ağırlıklı bileşiklere dönüştürülmesinde de peroksidazın izoenzimleri sıkça kullanılmaktadırlar. Tekstil sektöründe ise peroksidaz enziminin atık su arıtımındaki rolü geniştir. Ayrıca, ağartma işlemlerinde kullanılan hidrojen peroksitin ve boyama işleminde kullanılan büyük molekül ağırlıklı boyaların parçalanmasında kullanılmaktadır (Topçular, 2006).

2. MALZEME VE YÖNTEM

Sunulan çalışmada; Horseradish Peroksidaz Enziminin çapraz bağlı enzim agregatları oluşturularak taşıyıcısız immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Kullanılan serbest enzim SIGMA-Aldrich Chemie'den satın alınarak temin edilmiştir. Serbest enzimin çözünmez agregatlarını oluşturmak için ise çözünmüş durumdaki enzim, uygun bir proteik feeder varlığında bifonksiyonel bir çapraz bağlayıcı ile muamele edilmiştir. Bu işlemin yapılmasının amacı protein yapısındaki molekül içi ve moleküller arası etkileşimleri değiştirerek fiziksel olarak enzimin çözünmez yapıya kavuşturulmasıdır. Son olarak da tekstil ağartma işlemindeki atık suyun içerdiği peroksitein giderimi için hazırlanan serbest ve agregat formundaki enzimlerin farklı çalışma koşullarındaki aktiviteleri tayin edilmiştir. Devamında optimum koşullarda elde edilen agregat yapısı endüstriden temin edilen Reactive blue 160 boyasının belli derişim aralıklarında renk giderimine bakılmıştır.

2.1. Peroksidaz Enziminin Taşıyıcısız Olarak Agregat Formda Eldesi

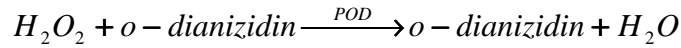
25°C ortam sıcaklığında pH'si 7 olan borat tampon çözeltisinde çözünmüş 0,05 mg enzim/mL derişimli 80µL enzim çözeltisine, 5mg BSA eklenerek ve 100 devir/dak karıştırma hızında 5 dakika süreyle karıştırılarak proteinin tamamının çözünmesi sağlanmıştır. Enzim moleküllerinin çapraz bağlanabilmesi için ortama %2 (h/h) olacak şekilde glutaraldehit (GA) eklenmiştir ve son hacim 1mL'ye tamamlanmıştır. Sonra çözeltiler ilk 15 dakika karıştırılarak toplam 2 saat 25 °C'de tutulmuştur. 2 saatin sonunda çözeltiler 4°C'de bir gece bekletilmiş ve aynı sıcaklıkta 7000 devir/dak karıştırma hızında 15 dakika süre ile santrifüjlenmiştir.

Ortamdaki fazla GA'in uzaklaştırılması amacıyla supernatant alındıktan sonra 4 defa destile su ile yıkanmıştır. Burada agregat oluştururken literatürdeki çalışmalardan optimum değerler kullanılmıştır (Topçular, 2006; İspirli, 2008).

2.2. Peroksidaz Enziminin Aktivite Tayini

Birim Tanımı: Peroksidaz enziminin 1 aktivite birimi, pH=7 ve 25°C'de 1dakika süre içinde 1µmol hidrojen peroksiti (H₂O₂) suya dönüştüren enzim miktarıdır.

Yöntem: 25° C ortam sıcaklığında H₂O₂'in o-dianizidin ile reaksiyona sokularak POD enzimi yardımıyla suya dönüşmesi esasına dayanır.

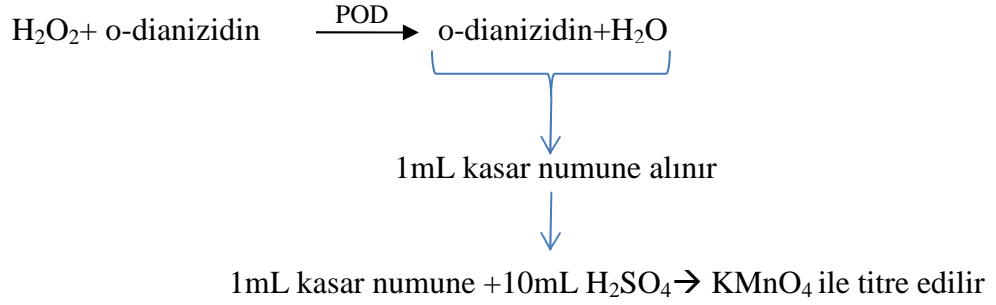


2.3. Hidrojen Peroksit Tayini

Hidrojen peroksit tayini için potasyum permanganat ve sülfürik asit çözeltisi hazırlanmıştır.

- *Potasyum permanganat çözeltisinin hazırlanması*
3.2 g KMnO₄ 1000mL suda çözülmüştür.
- *Sülfürik asit çözeltisinin hazırlanması*
100 mL H₂SO₄ 1000 mL suda çözülmüştür.

1 mL kasar numunesi alınıp 10 mL H₂SO₄ çözeltisi ile karıştırılmıştır. 0.020 M KMnO₄ ile titre edilmiş, eflatun- kırmızı renk dönüm noktası gözlenmiştir. Titrasyon H₂O₂'nin tamamı giderilene dek sürdürülmüştür. Harcanan KMnO₄ miktarları 1.7 ile çarpılarak banyodaki H₂O₂ miktarları g/ L olarak bulunmuştur. Bu işlemler hem serbest peroksidaz enzimi ile hem de çapraz bağlı enzim agregatı ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda zamana bağlı H₂O₂ derişimleri ve dönüşüm yüzde miktarlarının grafikleri çizilmiştir (Duraner, 1998).



Banyodaki H₂O₂ miktarı (g/L)=Harcanan KMnO₄ miktarı* (1.7)

olarak hesaplanmıştır.

- *Serbest peroksidaz enzimi için;*

0,5 Molar 1mL H₂O₂ üzerine 6,0 mM 1mL o-dianizidin ilave edilmiş ve 0,5 mg/mL POD enziminden 25µL enjekte edilerek tepkime gerçekleştirilmiştir. Bir dakika sonra 1mL örnek alınıp örnek 10 mL H₂SO₄ çözeltisi ile karıştırılmıştır ve eflatun-kırmızı renk dönüm noktası gözlenene kadar KMnO₄ ile titre edilmiştir ve harcanan KMnO₄ miktarları kaydedilmiştir. Aynı işlemler 5 dakika boyunca gerçekleştirilmiştir ve titrasyonda kullanılan KMnO₄ miktarları kaydedilmiştir. Harcanan KMnO₄ miktarları 1.7 ile çarpılarak banyodaki H₂O₂ miktarları g/ L olarak bulunmuştur. Elde edilen veriler doğrultusunda zamana bağlı harcanan H₂O₂ miktarlarının grafikleri çizilmiştir.

- *Agregat için;*

0,5 Molar 5 mL H₂O₂ üzerine 6,0 mM 5 mL o-dianizidin ilave edilmiş ve içerisine oluşturulan çapraz bağlı agregat daldırılarak bir dakika bekletilmiştir. Bu çözeltiden 1 mL örnek alınıp örnek 10 mL H₂SO₄ çözeltisi ile karıştırılarak eflatun-kırmızı renk dönüm noktası gözlenene kadar KMnO₄ ile titre edilmiştir ve harcanan KMnO₄ miktarları kaydedilmiştir. Bu miktarlar 1.7 ile çarpılarak banyodaki H₂O₂ miktarları g/ L olarak bulunmuştur. 2.3.1 de yapılan işlemler aynı şekilde agregatlara da uygulanmıştır.

2.4. Tam Faktöriyel Tasarım Uygulanması

Agregat hazırlanmasına ilişkin parametrelerin Tam Faktöriyel Tasarım ile optimizasyonu için seçilen faktörler, Çizelge 2.1'de belirtilmiştir. Tasarım değerlendirmesi deneysel çalışma bölgesi kapsamında değerlendirilmiştir.

Deneysel Tasarım ve Yüzey Cevap Model Denklemi ile Model

Çözüm Önerisi ($2^k = 2^3 = 8$:Deney sayısı)

Optimizasyonu sağlayan deneysel verilerin modellendiği cevap yüzey fonksiyon modelindeki katsayıların hesaplanması ya da diğer bir deyişle, yüzeyi ifade eden denklemin çizilerek oluşturulan yüzeyin gerçek deney sonuçlarını oluşturan yüzeye yaklaştırılması, bir optimizasyon işlemi olup en küçük kareler metodu ile iki yüzey arasındaki uzaklıkların toplamının en aza indirgenmesi yani minimizasyonuna dayanır. Minimize edilecek optimizasyon fonksiyonu;

$$J = \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_{i-deneysel} - y_{i-hesaplanan})^2} \rightarrow Minimum \quad (2.1)$$

şeklinde olup, katsayıların kısmi türevleri alınıp sıfıra eşitlendiğinde (yani fonksiyona ilişkin o noktadaki eğimler sıfır olduğunda), cevap yüzey fonksiyonundan oluşan doğrusal denklem takımı çözülerek katsayılar bulunmuş olur. Böylece optimizasyon çizilerek parametrelerin minimum değerlerine ulaşılmış olur. Örneğin buradaki üç parametrelili bir çalışma için bu, parametreler ve çarpımlarından (faktörler ya da faktör çarpım gruplarından) oluşan (8 adet) doğrusal bağımlı denklem takımını oluşturan b katsayıları kümesi optimum yüzey fonksiyonu modelini tanımlar. Doğrusal bağımlı denklem takımı, yani yüzey fonksiyon modelini tanımlayan $y=bX$ 'in b katsayılar kümesinin çözümü aşağıdaki gibi verilmiştir.

$$b = (X'X)^{-1} X'y \quad (2.2)$$

Bu katsayılar yardımıyla da optimum parametre çalışma bölgesi hesaplanarak insan düşünce yapısının algılayabileceği yalnızca iki parametrenin değişken diğerlerinin sabit olduğu üç boyutlu grafikler halinde görselleştirilebilmektedir.

Çalışmanın bu kısmında hesaplama algoritmasının çözümü için MATLAB programlama dili kullanılacaktır (Arifoğlu,2005; Demir ve Tokatlı vd. ,2009 ;Lübbert vd., 2000).

(MATLAB programlama dili uygulanırken Çizelge 2.1. , Çizelge 2.2. ve Çizelge 2.3.'de verilen kodlama , aralıklar ve veriler kullanıldı.)

Çizelge 2.1. Tam faktöriyel tasarımda agregat oluşumunda uygulanan çalışma aralıkları

Faktörler		(-1) Seviye	(+1) Seviye
Başlangıç enzim derişimi (mg/ml)	(BE)	0.04	0.06
Çapraz bağlayıcı oranı (v/v)	(ÇB)	1	3
Çöktürücü derişim (mg/ml)	(ÇD)	2	6
Değerlendirme Ölçütü			
Absorbans değişimi (%)	(AB)		
(Aktivite Hesaplanacaktır)	(A)	0	100

Çizelge 2.2. Tam faktöriyel tasarım deneysel tasarım gösterimi

Deneysel Tasarım:

No	Faktörler				Faktör etkileşimleri				Sonuçlar
	-	BE	ÇB	ÇD	-	-	-	-	AB (A)
	x_0	x_1	x_2	x_3	x_1x_2	x_1x_3	x_2x_3	$x_1x_2x_3$	Y
1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	0-100
2	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	0-100
3	+1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	0-100
4	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	0-100
5	+1	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	0-100
6	+1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	-1	0-100
7	+1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	0-100
8	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	0-100

Yüzey Cevap Model Denklemi

$$y = b_0x_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3$$

Çizelge 2.3. Üç faktörün ölçüm değerleri

No	-	(BE)	(ÇB)	(ÇD)	-	-	-	-	AB
1	-	0.04	1	2	-	-	-	-	0-100
2	-	0.06	1	2	-	-	-	-	0-100
3	-	0.04	3	2	-	-	-	-	0-100
4	-	0.06	3	2	-	-	-	-	0-100
5	-	0.04	1	6	-	-	-	-	0-100
6	-	0.06	1	6	-	-	-	-	0-100
7	-	0.04	3	6	-	-	-	-	0-100
8	-	0.06	3	6	-	-	-	-	0-100

2.5. Tam Faktöriyel Tasarım İle Agregat Oluşumu

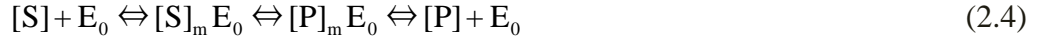
2.1 kısmında anlatılan şekilde agregat oluşumu gerçekleşmiştir. Buradaki fark enzim immobilizasyonunu etkileyen önemli parametrelerden olan başlangıç enzim derişimi, çapraz bağlayıcı oranı ve çöktürücü derişimi oranlarının alt ve üst sınırlar çerçevesinde Çizelge 2.4'deki oranlarda çalışılmıştır. Tam Faktöriyel Tasarım kapsamında üç faktöründe seçilmesiyle sekiz adet farklı agregat oluşumu gerçekleştirilmiştir. Çizelge 2.4.'de verilen parametrelerin oranlarında sekiz tane agregat oluşumu gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.4. Çalışılan parametrelerin birim gösterimi

Agregat	Başlangıç Enzim Derişimi	Çapraz Bağlayıcı	Çöktürücü Derişim
1.agregat	0.04 mg enzim/ml	%1(h/h)	2 mg
2.agregat	0.06 mg enzim/ml	%1(h/h)	2 mg
3.agregat	0.04 mg enzim/ml	%3(h/h)	2 mg
4.agregat	0.06 mg enzim/ml	%3(h/h)	2 mg
5.agregat	0.04 mg enzim/ml	%1(h/h)	6 mg
6.agregat	0.06 mg enzim/ml	%1(h/h)	6 mg
7.agregat	0.04 mg enzim/ml	%3(h/h)	6 mg
8.agregat	0.06 mg enzim/ml	%3(h/h)	6 mg

2.6. Tepkime Hızları Ve Kinetiğinin Bulunması

Genel olarak tepkime hızı tepkimeye giren bileşenlerin ya da ürünlerin zamana bağlı olarak derişiminin bir ifadesi olup S, substrat, P, ürün ve E_0 'dan başlangıçtaki enzim derişimlerini göstermek üzere genel tepkime denklemi için önerilen tepkime hızı aşağıdaki gibi Bölüm 1.1.5'de verilmiştir;



Burada tepkime hızı

$$v \quad \text{veya} \quad r = -\frac{dS}{dt} = \frac{dP}{dt} \quad (2.5)$$

olarak yazılır. Enzimatik tepkimeler için kinetik model Michealis-Menten tarafından aşağıdaki gibi önerilmiştir.

$$v = \frac{v_m [S]}{K_m + [S]} \quad (2.6)$$

Buradan k , enzimatik olmayan tepkimeler için kinetik hız sabitini gösterirken K_m enzimatik tepkimeleri için önerilmiş olan Michealis-Menten kinetik sabitini belirtmektedir. v_m ise ulaşılabilecek en yüksek tepkime hızıdır.

Tepkime hızlarının (v) ve dönüşmelerin (x) deneysel ölçümlerden sayısal olarak hesaplanması yapılmıştır. Michealis-Menten kinetik modelindeki K_m (Hız sabiti) ve v_m (maksimum hız) sabitlerinin hesaplanması sırasında, denklem doğrusal bir özellik taşımadığından doğrusallaştırma yapılır. Kinetik modellerin doğrusallaştırılmasına ilişkin olarak yapılan yaklaşımlar üzerinde ayrıntılı olarak Bölüm 1.1.8'de durulmuştur. Bunlardan en yaygın olarak kullanılan Line weaver-Burk yaklaşımıdır, ancak bu yöntemin kullanılabilmesi farklı substrat başlangıç derişimlerini gerektirir.

Çalışmanın bu bölümünde benzer araştırmaların sonuçları göz önüne alınarak ölçek büyütmenin modellenmesinde kullanılacak olan Michealis-Menten kinetik sabitleri doğrudan hesaplanmıştır.

Çizelge 2.5’de tepkime hızlarının nasıl hesaplandığını gösterilmiştir. Literatürde verilen ve Çizelge 2.6’da sunulan K_m/v_m oranları, ölçülen substrat derişimi ve tepkime hızlarıyla birlikte Michealis-Menten denkleminde taşınarak kinetik sabitler bulunmuştur (Topçular, 2006).

Çizelge 2.5. Tepkime hızlarının hesaplanması

T	Δt	[S]	$v = \Delta[S]/\Delta t$	$x = \Delta[S]/S$
$t_0=0$	t_0	S_0	$v_0=0$	$x_0=0$
$t_1=1$	$\Delta t=(t_1-t_0)$	S_1	$v_1=(S_1-S_0)/\Delta t$	$x_1=(S_1-S_0)/S_0$
$t_2=2$	$\Delta t=(t_2-t_1)$	S_2	$v_2=(S_2-S_1)/\Delta t$	$x_2=(S_2-S_1)/S_1$
....
$t_n=t_n$	$\Delta t=(t_n-t_{n-1})$	S_n	$v_n=(S_n-S_{n-1})/\Delta t$	$x_n=(S_n-S_{n-1})/S_{n-1}$

Çizelge 2.6. Peroksidaz enzimi için line weaver-burk yöntemiyle hesaplanan kinetik parametreler (Topçular, 2006)

	K_m (mmol H_2O_2/L)	v_m (mmol $H_2O_2/L.s.$)
Serbest Enzim	2.33	0.760
Taşıyıcılı İmmobilize Enzim	96.00	0.175
Taşıyıcısız İmmobilize Enzim	33.40	0.127

2.7. Aktivitelerin Hesaplanması

Farklı altı derişimde hazırlanan H_2O_2 çözeltileriyle Bölüm 2.1 ‘de uygulanan aşamalarla birlikte harcanan $KMnO_4$ miktarları ile 1.7 ile çarpılarak banyodaki H_2O_2 miktarları g/L olarak bulunmuştur. Bu işlemler sekiz agregat içinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda zaman bağılı H_2O_2 derişimleri çizelgeleri oluşturulmuştur. Devamında sekiz agregatın her biri için zamana bağılı H_2O_2 derişimleri grafikleri çizilmiştir. Çizilen grafikler iki bölgeden oluşmaktadır. Her grafiğin ikinci bölgesi aktivite gösteren alan olarak alınmıştır. Her bir agregat için bulunan değerler lineerleştirme yapılarak en yüksek korelasyona sahip olunan değer her bir agregat için aktivite değeri olarak tespit edilmiştir.

2.8. Tam Faktöriyel Tasarımın Programlanması

% MATLAB Dosyası

clc, clear, clf

'CommandWindow'

% B_Cos_Ver_H2O2_D_000_Tam_Fak_Tas_01

'% Full Faktöriyel Deney Tarama Tasarımı'

% -----

BACCompM_Data_01_01_Den_Bol=xlsread('Deney_Bolgesi01.xls');

BACCompM_Data_01_01=xlsread('Deneyisel_Tasarim01.xls');

XXD=BACCompM_Data_01_01(:,1:1);XX0=BACCompM_Data_01_01(:,2:2);

XX1=BACCompM_Data_01_01(:,3:3);XX2=BACCompM_Data_01_01(:,4:4);

XX3=BACCompM_Data_01_01(:,5:5);XXB=BACCompM_Data_01_01(:,2:9);

R =BACCompM_Data_01_01(:,10:10); nK=length(XXD);

% -----

% Grafik Yüzey Fonksiyonunun Belirlenmesi için

%(Uc Faktorlu Tasarım)

% Y_X1_X2_X3_X4= +b0*x0+b1*X1+b2*X2+b3*X3 ...

% +b12*X1*X2+b13*X1*X3+b23*X2*X3 ...

% +b123*X1*X2*X3

% -----

y=R; A=XXB; % y=bX; B=(X'*X)^-1*X'*y

% Yüzey Fonksiyon Katsayılarının Hesabi

'y', R, 'X', A, bb=inv(transpose(A)*(A))*transpose(A)*R; b=bb, K=b;

% -----

% R_01_00_X2_X3 Grafiginin çizimi için (X1 Parametresi Sabit)

X1=0; X2=XX2; X3=XX3;

% -----

figure(1) % Verilerden Grafik Cizdirilmesi

plot3(X2, X3, R, 'k*'); grid

title('X1-Baslangic Enzim Derisimi-Sabit')

xlabel('X2-Capraz Baglayici Orani');

ylabel('X3-Cokturucu Derisimi');

zlabel('R-Aktivite'); grid ; hold on

% -----

% Fonksiyondan Grafik Cizdirilmesi

xx=2;yy=xx; DelX=(xx-(-xx))/(nK-1);

DelY=DelX; XX=-xx:DelX:xx; YY=-yy:DelY:yy;

[X2 X3]=meshgrid(XX,YY);

R_X1_X2_X3 = K(1)+K(2)*X1+K(3)*X2+K(4)*X3+ ...

K(5)*X1.*X2+K(6)*X1.*X3+K(7)*X2.*X3+ ...

K(8)*X1.*X2.*X3;


```

mesh(X2,X3,R_X1_X2_X3); grid
% -----

% R_01_X1_00_X3 Grafiginin cizimi icin (X2 Parametresi Sabit)
X1=XX1; X2=0; X3=XX3;
% -----
figure(2) % Verilerden Grafik Cizdirilmesi
plot3(X1, X3, R, 'k*'); grid
title('X2-Capraz Baglayici Orani-Sabit')
xlabel('X1-Baslangic Enzim Derisimi');
ylabel('X3-Cokturucu Derisimi');
zlabel('R-Aktivite');grid ; hold on % !
% -----

% Fonksiyondan Grafik Cizdirilmesi
xx=2;yy=xx; DelX=(xx-(-xx))/(nK-1); DelY=DelX; XX=-xx:DelX:xx; YY=-
yy:DelY:yy;
[X1 X3]=meshgrid(XX,YY)

R_X1_X2_X3 = K(1)+K(2)*X1+K(3)*X2+K(4)*X3+ ...
              K(5)*X1.*X2+K(6)*X1.*X3+K(7)*X2.*X3+ ...
              K(8)*X1.*X2.*X3;
mesh(X1,X3,R_X1_X2_X3); grid
% -----

% R_01_00_X2_X3 Grafiginin cizimi icin (X3 Parametresi Sabit)
X1=XX1; X2=XX2; X3=0;
% -----
figure(3) % Verilerden Grafik Cizdirilmesi
plot3(X1, X2, R, 'k*'); grid
title('X3-Cokturucu Derisimi-Sabit')
xlabel('X1-Baslangic Enzim Derisimi'); ylabel('X2-Capraz Baglayici Orani');
zlabel('R-Aktivite');grid ; hold on % !
% -----

% Fonksiyondan Grafik Cizdirilmesi
xx=2;yy=xx; DelX=(xx-(-xx))/(nK-1); DelY=DelX; XX=-xx:DelX:xx; YY=-
yy:DelY:yy;
[X1 X2]=meshgrid(XX,YY);

R_X1_X2_X3 = K(1)+K(2)*X1+K(3)*X2+K(4)*X3+ ...
              K(5)*X1.*X2+K(6)*X1.*X3+K(7)*X2.*X3+ ...
              K(8)*X1.*X2.*X3;
mesh(X1,X2,R_X1_X2_X3); grid
% -----

```

'Deney_Bolgesi01.xls' (**Excel Dosyası**)

Faktörler		(-1) Seviye	(+1) Seviye
Başlangıç enzim derişimi (mg/ml)	(BE)	0.04	0.06
Çapraz bağlayıcı oranı (v/v)	(ÇB)	1	3
Çöktürücü derişim (mg/ml)	(ÇD)	2	6

'Deneysel_Tasarim01.xls' (**Excel Dosyası**)

Deney	x ₀	x ₁	x ₂	x ₃	x ₁ x ₂	x ₁ x ₃	x ₂ x ₃	x ₁ x ₂ x ₃	y
1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	0.1711
2	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	0.1625
3	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	0.1708
4	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	0.2188
5	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	0.2167
6	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	0.1938
7	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	0.1533
8	1	1	1	1	1	1	1	1	0.1375

2.9. Optimizasyon Çalışmaları Ve İstatistiksel Değerlendirme

Tam faktöriyel deney tasarımı çerçevesinde farklı enzim başlangıç derişimleriyle yapılan denemelerin aktivite sonuçları optimize edilmiş olup bu sonuçlar istatistiksel olarak deneysel verilerle uyumu açısından değerlendirilmiştir. Bun amaçla yazılan programlar aşağıda verilmiştir.

% MATLAB **Dosyasi**

% -----

clc, clear, clf

'CommandWindow'

% B_Cos_Ver_H2O2_D_000_Tam_Fak_Tas_01_Kod_01

'%Full Faktöriyel Deney Tarama Tasarimi Sonuclari Optimizasyonu'

```
% B_Cos_Ver_H2O2_D_000_1_5_Dak_Ara_En_Yuk_R2_Egm_Akt_01.m*
```

```
clc, clear , clf
```

```
%Akt_C Akt_Agr Akt
```

```
Akt_Mat= ...
```

```
[0.012 1 0.1711 ; ...  
0.012 2 0.1625 ; ...  
0.012 3 0.1708 ; ...  
0.012 4 0.2188 ; ...  
0.012 5 0.2167 ; ...  
0.012 6 0.1938 ; ...  
0.012 7 0.1533 ; ...  
0.012 8 0.1375 ; ...  
0.018 1 0.0972 ; ...  
0.018 2 0.1056 ; ...  
0.018 3 0.1306 ; ...  
0.018 4 0.1458 ; ...  
0.018 5 0.1444 ; ...  
0.018 6 0.1292 ; ...  
0.018 7 0.1234 ; ...  
0.018 8 0.0917 ; ...  
0.024 1 0.0341 ; ...  
0.024 2 0.0698 ; ...  
0.024 3 0.0344 ; ...  
0.024 4 0.0542 ; ...  
0.024 5 0.0509 ; ...  
0.024 6 0.0595 ; ...  
0.024 7 0.0501 ; ...  
0.024 8 0.0687 ; ...  
0.03 1 0.0657 ; ...  
0.03 2 0.0458 ; ...  
0.03 3 0.0146 ; ...  
0.03 4 0.0279 ; ...  
0.03 5 0.0637 ; ...  
0.03 6 0.0494 ; ...  
0.03 7 0.0401 ; ...  
0.03 8 0.0550 ; ...  
0.36 1 0.0296 ; ...  
0.36 2 0.0573 ; ...  
0.36 3 0.0215 ; ...  
0.36 4 0.0114 ; ...  
0.36 5 0.0215 ; ...  
0.36 6 0.0582 ; ...  
0.36 7 0.0312 ; ...  
0.36 8 0.0507 ; ...  
0.042 1 0.0270 ; ...  
0.042 2 0.0238 ; ...  
0.042 3 0.0333 ; ...  
0.042 4 0.0327 ; ...
```

```

0.042 5 0.0274 ; ...
0.042 6 0.0668 ; ...
0.042 7 0.0616 ; ...
0.042 8 0.0446 ];

```

```

Akt_C(:,:)=Akt_Mat(:,1:1); Akt_Agr(:,:)=Akt_Mat(:,2:2);Akt(:,:)=Akt_Mat(:,3:3);
X=Akt_Agr,Y=Akt_C, Z=Akt
plot3(X,Y,Z, 'k*'), xlabel('Agregat'),ylabel('Konsantrasyon'),zlabel('Aktivite')
grid
% ---

```

```

% MATLAB Dosyasi

```

```

% -----

```

```

clc, clear, clf

```

```

'CommandWindow'

```

```

% B_Cos_Ver_H2O2_D_000_Tam_Fak_Tas_01_Kod_01

```

```

'% Full Faktoriyel Deney Tarama Tasarimi Sonuclari optimizasyonu Istatistiksel
Degerlendirmesi'

```

```

% -----

```

```

BACCompM_Data_01_01_Den_Bol=xlsread('Deney_Bolgesi01.xls');
BACCompM_Data_01_01          =xlsread('Deneyisel_Tasarim01.xls');
XXD=BACCompM_Data_01_01(:,1:1);XX0=BACCompM_Data_01_01(:,2:2);
XX1 =BACCompM_Data_01_01(:,3:3);XX2=BACCompM_Data_01_01(:,4:4);
XX3=BACCompM_Data_01_01(:,5:5);XXB=BACCompM_Data_01_01(:,2:9);
R  =BACCompM_Data_01_01(:,10:10);          nK=length(XXD);

```

```

% -----

```

```

%Grafik YuzeY Fonksiyonun Belirlenmesi için

```

```

%(Uc Faktorlu Tasarim)

```

```

% Y_X1_X2_X3_X4= +b0*x0+b1*X1+b2*X2+b3*X3 ...

```

```

%          +b12*X1*X2+b13*X1*X3+b23*X2*X3 ...

```

```

%          +b123*X1*X2*X3

```

```

% -----

```

```

y=R; A=XXB; % y=bX; B=(X'*X)^-1*X'*y

```

```

% YuzeY Fonksiyon Katsayilarinin Hesabi

```

```

'y', R, 'X', A, bb=inv(transpose(A)*(A))*transpose(A)*R; b=bb, K=b;

```

```

% -----

```

```

X1=XX1;X2=XX2;X3=XX3;

```

```

R_X1_X2_X3 = K(1)+K(2)*X1+K(3)*X2+K(4)*X3+ ...

```

```

          K(5)*X1.*X2+K(6)*X1.*X3+K(7)*X2.*X3+ ...

```

```

          K(8)*X1.*X2.*X3;

```

```

% -----

```

```

% R, R_X1_X2_X3 Grafiginin cizimi

```

```

figure(1)
plot(R, R_X1_X2_X3, 'k*');
xlabel('R-Deneysel Aktivite');
ylabel('R_X1_X2_X3-Modelsel Aktivite');
title('Full Faktoriyel Deney Tasarimi'), grid
% -----
% Model Sapma Degerleri

MSD=R-R_X1_X2_X3; C=MSD; NMSD=MSD*1e16;
xmin=0.13; xmax=0.22; ymin=-1; ymax=+1;
R0=xmin:0.01:xmax; NMSD0=zeros(1,((xmax-xmin)/0.01)+1);
% -----
% Normallestirilmis verilerin hazirlanmasi

nC=size(C);          % Size of the data matrix
MeanC=mean(C);       % Means of the data columns
StdC=std(C);         % Standard deviations of the columns
Cn=[];
for i=1:nC(1)        % Row-wise standardization of the data matrix
    Cn=[Cn; (C(i,:)-MeanC)./StdC];    % Eq.1 in SimpleDat:1.doc
end
% -----
% Normallestirilmis Model Sapma Degerleri Grafiginin cizimi

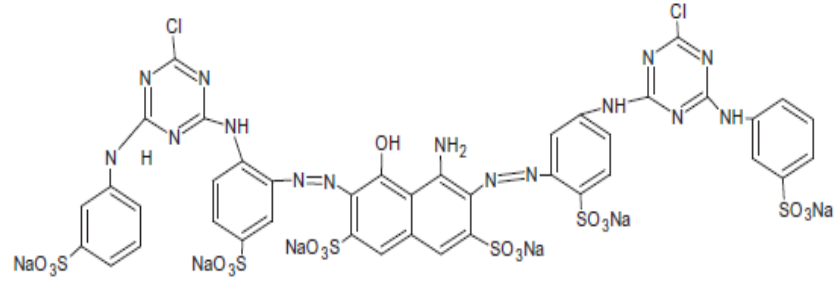
figure(2)
plot(R,Cn, '*',R0, NMSD0, 'b-'), axis([xmin xmax ymin ymax])
xlabel('R-Deneysel Aktivite'); ylabel('S-Aktivite Sapmalari');
title('Normallestirilmis Model Aktivite Sapmalari '), grid ;
% -----
% Korelasyon Katsayisi

NMSD_Top=0;
for i=1:nC(1)
    NMSD_Top=NMSD_Top+NMSD(i)^2;
end
KOR_Kat=1-(NMSD_Top/nC(1))
% -----

```

2.10. Reaktif Blue 160 Boyasının Hazırlanması

Yaygın ticari diazo boyadır. Pamuk ve viskon boyanmasında kullanılır fakat ipek, yün ve polyester için uygun değildir. Endüstride yaygın olarak kullanılmaktadır (Priti ve Dhiraj ,2012). Şekil 2.1. 'de molekül yapısı gösterilen boya çözeltisi hazırlandı.



Şekil 2.1. Reactive blue 160 molekül yapısı

2.11. Boya Çözeltisinin Hazırlanması

Molekül yapısından molekül ağırlığını hesaplayarak 10^{-6} M boya çözeltisi hazırladık ve spektrofotometre de absorbansı 1 olarak gördüğümüz değer olarak derişimi bu yüzden 10^{-6} M olarak belirledik.

2.12. Renk Gideriminin Sağlanması

Bu bölümde tam faktöriyel tasarımına göre yapılan deneysel çalışmalar çerçevesinde optimum koşulların belirlendiği aralıkta olana agregat ile 10 ml hazırlanan boya çözeltisinden alınarak 25°C 'de alınan boya çözeltisinin içerisine daldırılan agregat ile spektrofotometreden 616 nm 'de ve belli zaman dilimlerinde alınan ölçüm değerleri ile renk gideriminin sağlandığı gözlenmiştir.

3. BULGULAR VE İRDELEME

Sunulan çalışmada kapsamında; Horseradish Peroksidaz enziminin taşıyıcısız immobilizasyonu yapılmıştır.Çapraz bağlı enzim agregatları elde edilmiştir.Ve çapraz bağlı enzim agregatlarının özelliklerini etkileyen parametreler belirlenmiştir.

Çalışmada enzimin taşıyıcısız olarak immobilize edilmesi aşamasında immobilizasyon sonrası en yüksek enzim aktivitesi veren immobilizasyon koşullarının belirlenmesi amacı ile deneyler yapılmıştır. Yine bu kapsamda değişkenler ve çalışma aralıkları tam faktöriyel deney tasarımına göre belirlenmiştir. Deneylerin tamamlanmasından sonra önerilen modelin çözülmesi ve yüzey cevap analizinin yapılmasından sonra da belirlenen optimum değerler, deneysel olarak da sınanmıştır.

İmmobilizasyon için yapılacak optimizasyon sonrası kinetik parametreler hesaplanmıştır. Taşıyıcısız immobilize enzim aktivitesi optimum koşullarda tespit edilmiştir. Çalışmanın devamında endüstriyel boyutta uygulama için bir aşama olarak endüstriden temin edilen reactive blue 160 boyar maddesi içeren çözeltinin renk giderimi incelenmiştir.

3.1 Agregatların Hazırlanması

Tam faktöriyel deneysel tasarım çerçevesinde agregatlar enzim immobilizasyonunu etkileyen en önemli parametreler olan başlangıç enzim derişimi ,çapraz bağlayıcı oranı ve çöktürücü derişimiyle çalışma aralıkları Çizelge 3.1 'de belirtildiği oranlarda hazırlanmıştır. Agregat oluşturma kısım 2.1 de anlatıldığı gibi oluşturulmuştur.

3.2. Çapraz Bağlı Enzim Agregatları

Çalışmanın bu bölümünde tam faktöriyel deney tasarımına göre 6 farklı derişimde (0.012M – 0.018M – 0.024M – 0.030M – 0.036M – 0.042M)H₂O₂; başlangıç enzim derişimi, , çöktürücü derişimi ve çapraz bağlayıcı derişimi değişkenleri kapsamında tam faktöriyel deney tasarımına göre çalışma aralıkları belirlenmiştir. Belirlenen optimum değerler deneysel olarak üç paralel çerçevesinde sınanmıştır.

Bu bölümde Çizelge 3.1’de verilen üç farklı parametre oranlarında kısım 2.1 alanında anlatıldığı gibi agregat oluşumu gerçekleştirilmiştir. Tam Faktöriyel Tasarım kapsamında üç faktöründe seçilmesiyle sekiz adet farklı agregat oluşumu gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. Tam faktöriyel tasarım ‘da kullanılan parametre oranları

Agregat No	(BE)	(ÇB)	(ÇD)
1	0.04	1	2
2	0.06	1	2
3	0.04	3	2
4	0.06	3	2
5	0.04	1	6
6	0.06	1	6
7	0.04	3	6
8	0.06	3	6

3.3. Enzim Aktivite Ölçümleri

Bu bölümde oluşturulan agregatlarla yapılan deneylerde ölçülen KMnO₄ değerlerinden hesaplanan H₂O₂ derişimlerinden elde edilen aktivite değerleri her agregat için hesaplandı. Çizelge 3.2.’de hesaplanan aktivite değerleri gösterildi.

Çizelge 3.2. Sekiz agregat için hesaplanan aktivite değerleri

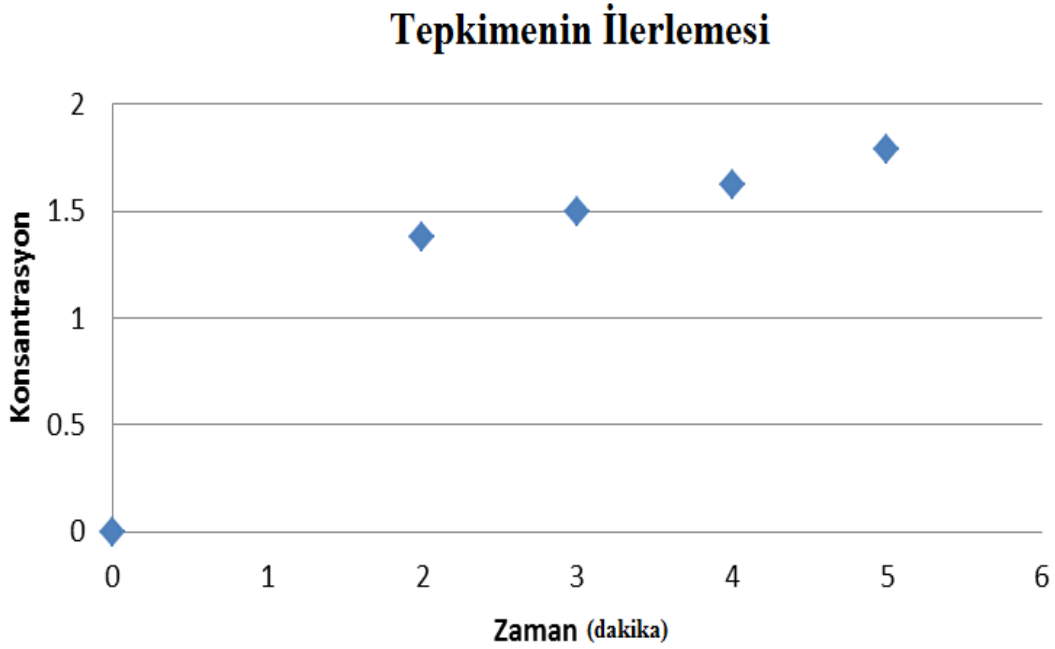
Agregat	dk	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂
		0.012	0.018	0.024	0.03	0.036	0.042
1	5	1.4583333	0.9722222	0.9166667	1.0083333	0.7777778	0.6785714
1	4	1.25	0.8333333	0.7083333	0.8416667	0.75	0.6547619
1	3	1.1458333	0.7638889	0.90625	0.825	0.6944444	0.625
1	2	0.9375	0.625	0.8125	0.8	0.6736111	0.6071429
1	1	0.875	0.5833333	0.78125	0.75	0.6597222	0.5714286
2	5	1.625	1.0833333	1.21875	0.775	0.8194444	0.5833333
2	4	1.4583333	0.9722222	1.1458333	0.7083333	0.6944444	0.5654762
2	3	1.25	0.8333333	1.09375	0.6666667	0.6805556	0.5535714
2	2	1.1666667	0.7777778	1.0104167	0.6416667	0.6041667	0.5178571
2	1	0.9791667	0.6527778	0.9375	0.6333333	0.5902778	0.4880952
3	5	1.625	1.1388889	0.875	0.7416667	0.625	0.5595238
3	4	1.7083333	1.0277778	0.8125	0.7333333	0.6111111	0.5357143
3	3	1.2916667	0.8611111	0.8020833	0.7083333	0.5833333	0.4880952
3	2	1.125	0.75	0.78125	0.6666667	0.5625	0.4642857
3	1	0.9375	0.625	0.71875	0.6833333	0.5416667	0.4285714
4	5	1.75	1.1666667	0.96875	0.8166667	0.6666667	0.5
4	4	1.5625	1.0416667	0.9479167	0.775	0.6388889	0.4702381
4	3	1.3541667	0.9027778	0.875	0.7416667	0.625	0.422619
4	2	1.125	0.75	0.84375	0.725	0.6111111	0.4047619
4	1	0.875	0.5833333	0.75	0.7083333	0.6041667	0.3690476
5	5	1.8333333	1.2222222	0.9583333	0.9833333	0.7777778	0.6428571
5	4	1.5833333	1.0555556	0.9270833	0.8333333	0.7638889	0.6190476
5	3	1.375	0.9166667	0.8333333	0.8583333	0.75	0.5833333
5	2	1.3333333	0.8888889	0.78125	0.7916667	0.7152778	0.5535714
5	1	0.9583333	0.6388889	0.7604167	0.8416667	0.6944444	0.5357143
6	5	1.9166667	1.2777778	0.90625	1.0833333	0.8611111	0.8333333
6	4	1.6666667	1.1111111	0.8645833	0.8666667	0.7916667	0.75
6	3	1.4583333	0.9722222	0.78125	0.775	0.6944444	0.7083333
6	2	1.3125	0.875	0.7291667	0.775	0.6597222	0.6547619
6	1	1.125	0.75	0.7083333	0.7166667	0.625	0.5595238
7	5	1.7083333	1.1388889	0.9791667	0.7833333	0.8888889	0.6904762
7	4	1.5625	1.0416667	0.875	0.7	0.8333333	0.6964286
7	3	1.4583333	0.9722222	0.8125	0.65	0.8263889	0.6666667
7	2	1.25	0.8333333	0.8229167	0.6583333	0.8194444	0.6190476
7	1	0.9791667	0.6527778	0.78125	0.625	0.7638889	0.5178571
8	5	1.7916667	1.1944444	0.8958333	0.7166667	0.9305556	0.6785714
8	4	1.625	1.0833333	0.8125	0.65	0.9027778	0.6190476
8	3	1.5	1	0.75	0.6	0.8888889	0.5952381
8	2	1.375	0.9166667	0.6875	0.55	0.7916667	0.5238095
8	1	1.0625	0.7083333	0.53125	0.425	0.7222222	0.5

3.4.Tepkime Hızlarının Bulunması

Tepkime aktivilerine bağı olarak tepkime hızlarını hesaplama Çizelge 3.3 'de verilmiştir. Örnek hesaplama'dan ($R^2 > 0.99$ olacak şekilde noktalar alınmıştır). Şekil 3.1.'de gösterilen grafikte tepkimenin ilerlemesi zamana karşı (dakika) konsantrasyon değerleri baz alınarak sunulmuştur.

Çizelge 3.3 . Aktivitelerin bağı olduğu tepkime hızı

Agregat Numarası	Başlangıç Enzim Derişimi	Çapraz Bağlayıcı	Çöktürücü Derişim	Zaman	0.012 M
8	0.06	30	6	5	1.792
8	0.06	30	6	4	1.625
8	0.06	30	6	3	1.500 *
8	0.06	30	6	2	1.375 *
8	0.06	30	6	1	1.0625



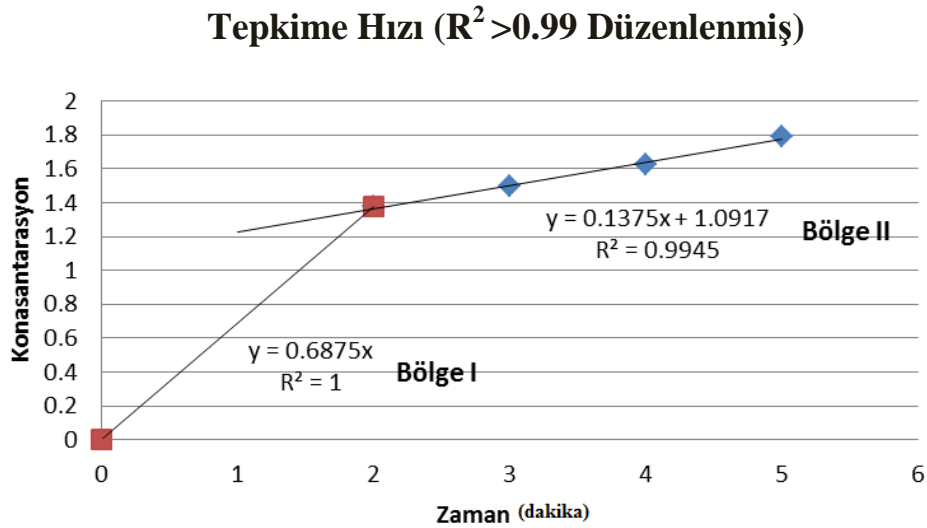
Şekil 3.1. Tepkimeye İlişkin Olarak Ölçülen Zaman- Konsantrasyon Değerleri

Çizelge 3.4 'de gösterildiği gibi düzenlenerek hazırlanan tepkime hızları iki bölgede hesaplanmıştır.

Başlangıç Konsantrasyonu	II.Bölge			I.Bölge	
	m2	n2	R22	m1	R12
0.012	0.1479	0.6896	0.9747	0.875	1
0.018	0.0986	0.4597	0.9747	0.5833	1
0.024	0.0167	0.775	0.0905	0.7812	1
0.03	0.0558	0.6775	0.8174	0.75	1
0.036	0.0313	0.6174	0.9498	0.6597	1
0.042	0.0262	0.5488	0.9918	0.57142	1

Çizelge 3.4. Düzenlenmiş şekilde hesaplanan bölge I ve bölge II değerler

Tepkimenin hızının hesaplanmasında korelasyon 0.99 'dan büyük olacak şekilde noktalar yeniden seçilmiştir. Şekil 3.2 'de korelasyon 0.99 'dan büyük olacak durumda grafiksel olarak bölgelere ayrılmıştır.



3.5. Optimizasyon Çalışmaları

Optimizasyon çalışmalarında aktivite olarak tepkimenin II. bölgesindeki hızlar alınmıştır. Tüm bu koşullar deney tasarımına uygun hazırlanan agregatlar için uygulanmıştır. Hesaplanmış aktiviteleri Çizelge 3.5.'de gösterilmektedir.

Çizelge 3.5. Aktivite olarak tepkime hızı (Bölge II – Tüm hesapmalar için $R^2 > 0.99$)

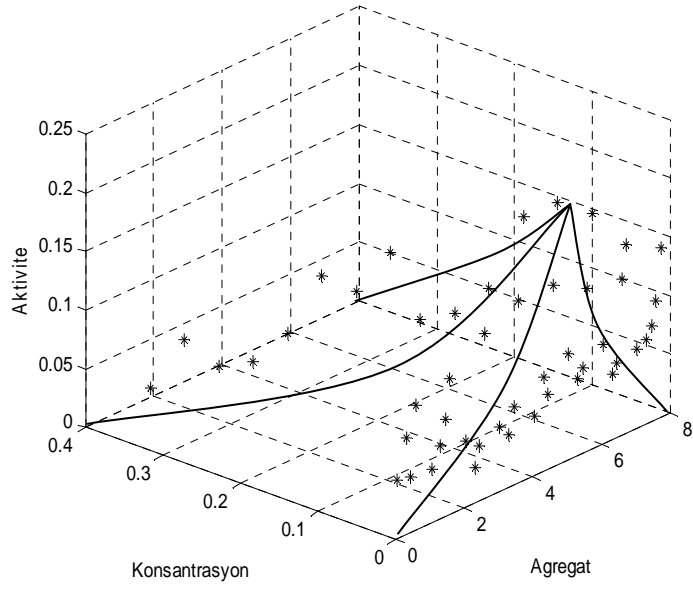
H ₂ O ₂ derişimi	1. agregat	2.agregat	3. agregat	4.agregat	5.agregat	6. agregat	7. agregat	8. agregat
0.012	0.1711	0.1625	0.1708	0.2188	0.2167	0.1938	0.1533	0.1375
0.018	0.0972	0.1056	0.1306	0.1458	0.1444	0.1292	0.1234	0.0917
0.024	0.0341	0.0698	0.0344	0.0542	0.0509	0.0595	0.0501	0.0687
0.03	0.0657	0.0458	0.0146	0.0279	0.0637	0.0494	0.0401	0.055
0.36	0.0296	0.0573	0.0215	0.0114	0.0215	0.0582	0.0312	0.0507
0.042	0.027	0.238	0.0333	0.0327	0.0274	0.0668	0.0616	0.0446

Dördüncü agregat ve 0.012 M başlangıç konsantrasyonu için bulunan tepkime hızı en yüksek değeri verilmiştir. Buna bağlı olarak optimum koşulları sağlayan agregat dört numaralı agregat olarak belirlenmiştir. Dört numaralı agregatın oluşumunda etkili olan parametrelerin oranları ise şöyledir;

- Başlangıç Enzim Derişimi :0.06 mg enzim /ml
- Çapraz Bağlayıcı %3 (h/h)
- Çöktürücü Derişim 2 mg

bu oranlarda en yüksek aktiviteyi sağlamıştır.

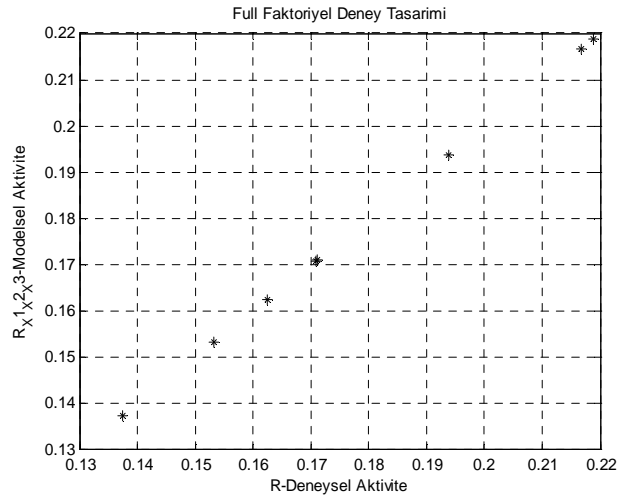
Tam faktöriyel tasarıma göre Mat Lab 'ta görsel olarak tasarımını Şekil 3.3'de verilmiştir. Şekilden de anlaşılacağı gibi dört numaralı agregat en yüksek aktivite değerini vermiştir.



Şekil 3.3. Bölge II için aktivite gösterimi

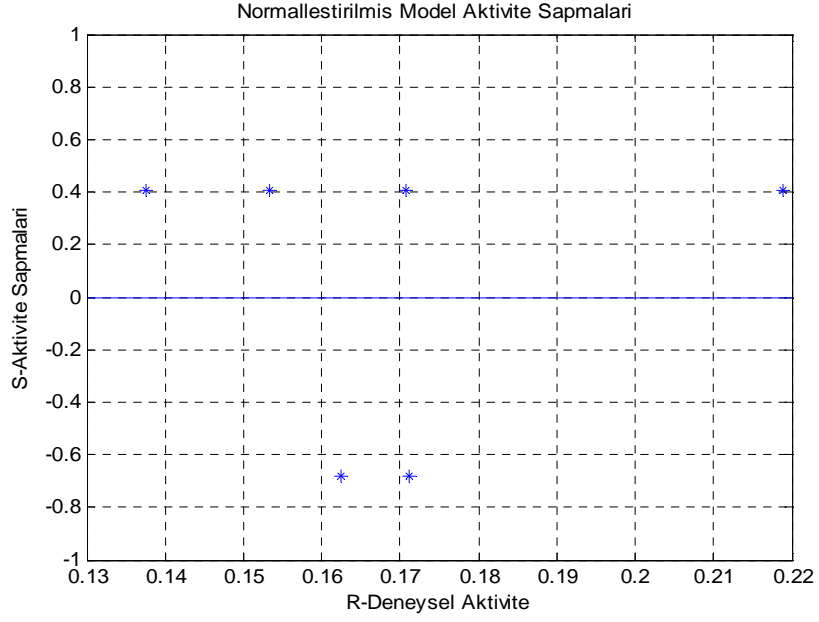
3.6. İstatistiksel Değerlendirme

Şekil 3.4.'de modelsel aktivitenin ve deneysel aktivitenin tam faktöriyel tasarımda görünümü şekilsel olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.4 . Modelsel aktivite ve deneysel aktivitenin tam faktöriyel tasarımda gösterilişi

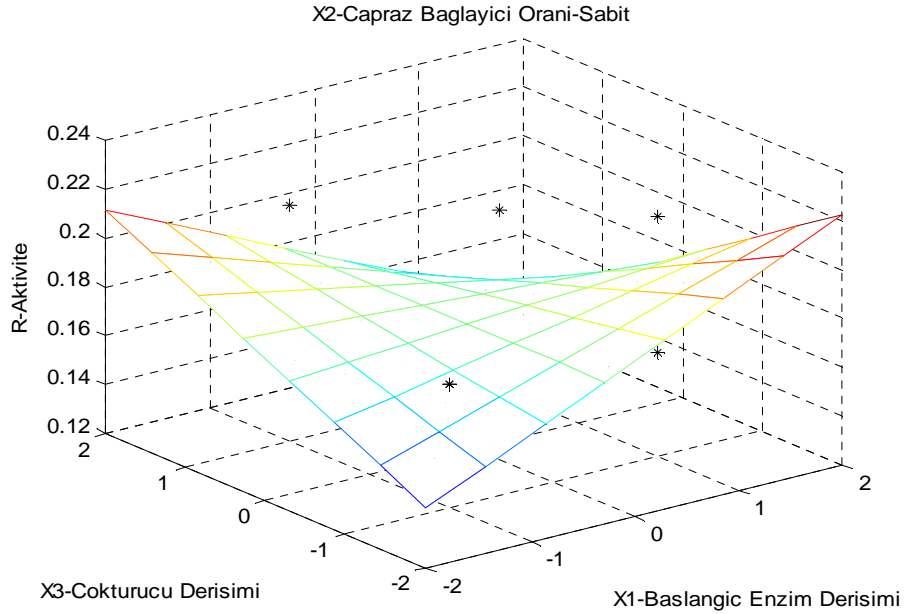
Tüm sonuçların optimizasyonu istatistiksel olarak incelendiğinde noktaların deneysel uyumu gösterilmiştir. Grafik incelendiğinde elde edilen noktaların istatistiksel uyumu Korelasyon Katsayısı=0.9133 olarak verilmiştir. Şekil 3.5 'de ise istatistiksel uyum sapma analizi verilmiştir.



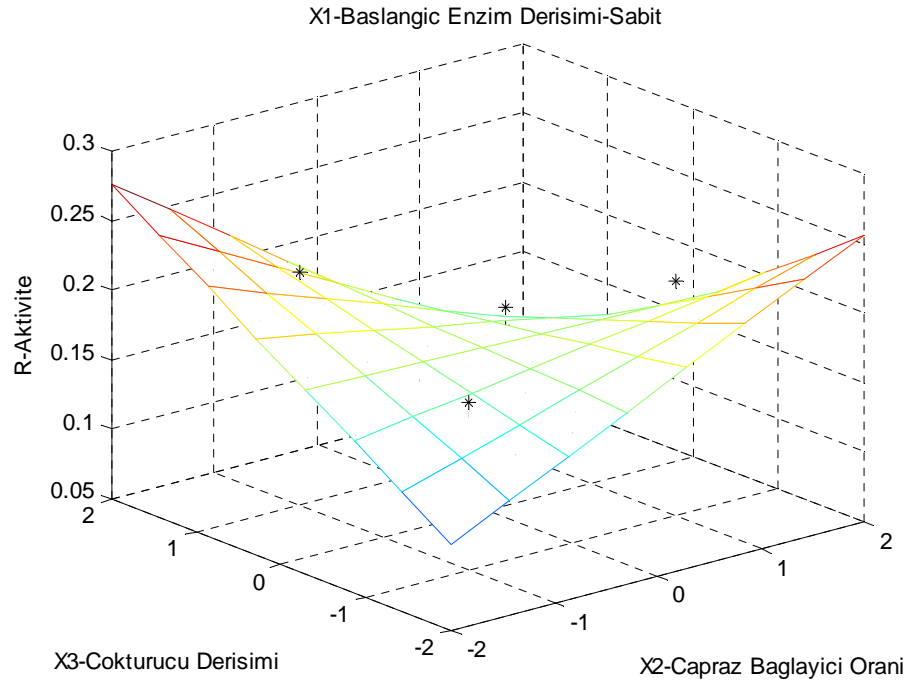
Şekil 3.5 . Deneysel Aktivitelerin Modelde Aktivite Sapmalari

3.7. Cevap Yüzey Fonksiyonları (0.012 Baş. Der. Den. İçin)

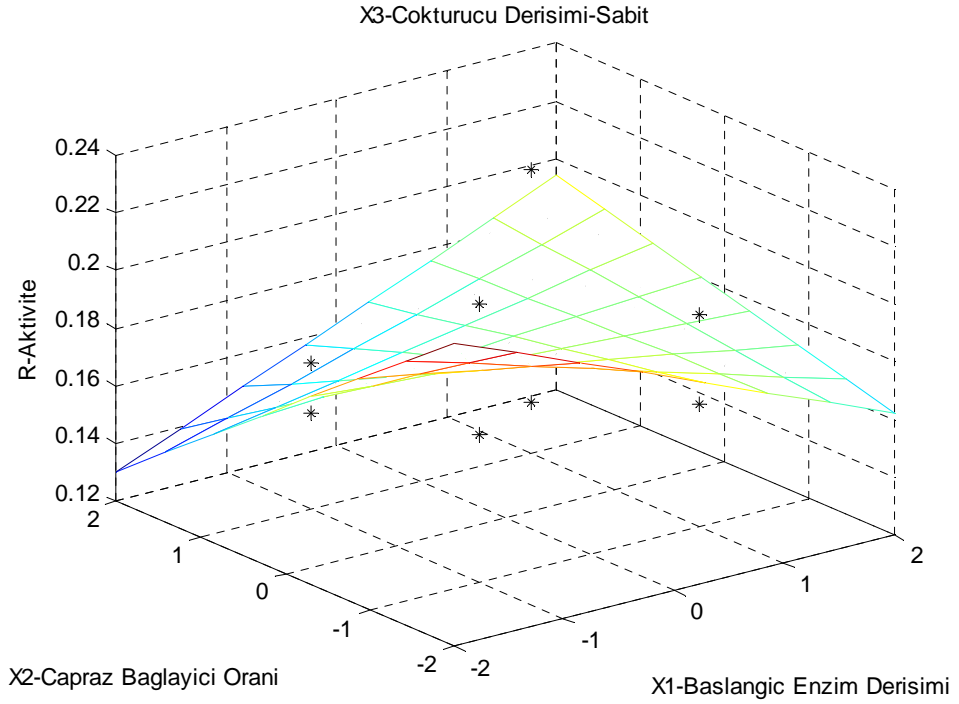
Şekil 3.6., 3.7.ve 3.8. 'de agregat yapısı oluşumunda kullanılan parametrelere bağlı olarak cevap yüzey fonksiyonları çizilmiştir.



Şekil 3.6. Cevap yüzey fonksiyonunda çapraz bağlayıcı oranı parametresi sabittir.



Şekil 3.7 . Cevap yüzey fonksiyonunda başlangıç enzim derişimi parametresi sabittir.



Şekil 3.8. Cevap yüzey fonksiyonunda çöktürücü derişimi parametresi sabittir.

Cevap yüzey fonksiyon grafikleri incelendiğinde yapılan optimizasyon çalışması sonuçları görsel olarak sunumunu içermektedir.

3.8. Renk Giderimi

Tam faktöriyel tasarımına göre yapılan deneysel çalışmalar çerçevesinde optimum koşulların belirlendiği aralıkta olana agregat ile 10^{-6} M hazırlanan boya çözeltisinden 10 ml alınarak çözeltinin içerisine daldırılan agregat ile spektrofotometreden 616 nm 'de ve belli zaman dilimlerinde alınan ölçüm değerleri ile renk gideriminin sağlandığı gözlenmiştir Çizelge 3.6.'da giderim gösterilmektedir. Boya çözeltisine agregatı daldırmadan önce ölçülen absorbans değeri 1'dir.

Çizelge 3.6. 25°C'de zamana bağlı renk gideriminin absorbans değerlendirilmesi.

Süre (saat) Bekletilen Süre	Oda Sıcaklığında % Renk Giderimi
0 saat	%0
8 saat	%16.5
16 saat	%22.2
24 saat	%29.4
32 saat	%36.6
40 saat	%43.9
48 saat	%52.6
56 saat	%63.5
64 saat	%71
72 saat	%82.2
80 saat	%90.2
90saat	%100

Hesaplanan renk giderimleri Reactive Blue 160 endüstri boyasının 10^{-6} M değerinde hazırlanan çözeltisinde ölçülmüştür. 616 nm 'de 10^{-6} M çözelti ilk ölçümünde agregatsız şekilde 1.000 absorbansı kayıt edilmiştir. Belli saat aralıklarıyla yapılan ölçünler sonucunda bu değerler yüzde ifadelere çevrilerek gideriminde yüzde oranda gösterimi sunulmuştur.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Peroksidaz enziminin serbest hali ve taşıyıcısız immobilizasyonu gerçekleştirerek oluşturulan agregat formu ile yapılan bu çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıda sırasıyla sunulmuştur.

Çalışmanın birinci bölümünde farklı sekiz CLEA oluşturularak gerçekleştirilen taşıyıcısız enzim immobilizasyonunun performans gücü incelenmiştir. İmmobilize enzim gruplarının tekstil sektöründeki boyalı suda gösterdiği performans gücünün değerlendirilebilmesi için endüstriden temin edilen Reactive Blue 160 tekstil boyası çözeltisi ile çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar taşıyıcısız olarak immobilize çapraz bağlı enzim agregatlarının endüstriyel boyutta uygulanabilirliği açısından önemli sonuçlara ulaşılmıştır. Tam faktöriyel deneysel tasarımda optimum koşulları sağlayan agregat yapısında %100 boya çözeltisinde renk giderimi sağlanmıştır.

Aynı zamanda çapraz bağlı enzim agregatlarının hazırlanmasında peroksidaz kullanılması ve agregatın hazırlanmasının da bir deneysel tasarım modeli ile optimizasyonu ve enzim boyar maddelerin renk gideriminde kullanılması literatüre önemli yenilik katmıştır.

Çapraz bağlı enzim agregatları yöntemi için optimum koşullar ; başlangıç enzim derişimi için 0.06 mg/ml ,çöktürücü derişimi 2 mg/ml , çapraz bağlayıcı derişimi için %3 (h/h) olarak bulunmuştur.

KAYNAKLAR

- Akhtar, S., Khan, A., Husain, Q. (2005) Potential of immobilized bitter gourd (Momordica charantia) peroxidase in the decolorization and removal of textile dyes from polluted wastewater and dyeing effluent, 60(3):291-301.
- Akpolat, O. (2010) *Kimyacılar ve Biyokimyacılar için MATLAB Uygulamaları ve Bilişim Teknolojileri*, Muğla Üniversitesi Yayınları , 141-148s.
- Alp, Ö. (2005) *Atık suların Arıtılması*. Yüksek Lisans, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul, 66s.
- Arifoğlu, U. (2005) *Matlab 7.04 Simulink ve Mühendislik Uygulamaları*, Alfa Ltd.
- Ayhan, F. , Doğaç, Y. ve Ayhan, H. (2011) Cross-linked Glucose oxidase aggregates: Synthesis and Characterization. *Hacet j chem*, 39 (3) 241-251.
- Ayhan, H. (1997) *Hücre Affinitesi İçin Spesifik Sorbentler*. Doktora, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 142s.
- Bhunja, A. Durani, S., Wangikar, P.P (2001) Horseradish Peroxidase Catalyzed Degradation of Industrially Important Dyes, *Biotechnol*, 72(5): 562–567.
- Bisswanger, H. (2004) *Practical Enzymology*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGa, Weinheim, 80s.
- Bailey, J.E ve Ollis, D.F. (1986) *Biochemical Engineering Fundamentals*. McGraw-Hill Book Company, Singapore, 82s.
- Broun, G. B., Mancke, G., Wingard, L. B., (1978) *Enzyme Engineering*, Plenum Press, 141s.
- Buchholz, K. , Kasche, V. ve Bornscheuer, U.T. (2005) *Biocatalysts and Enzyme Technology*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA, Weinheim, 29-30, 126, 244s.
- Bugg, T. (1997) *An Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry*, Blackwell Science Ltd, United Kingdom, 141s.

- Cabana, H., Jones, J.P., Spiros, N.,(2007) Agathos, Preparation and characterization of cross-linked laccase aggregates and their application. *J. Biotechnol* ,132:23–31.
- Cao, L., Langen, L. ve Sheldon, R.A. (2003) Immobilised Enzymes: Carrier-Bound Or Carrier-Free, *J. Biotechnol* (14): 387-394.
- Demir C.,Tokatlı F.,Ertuş H. ,Özdemir D.(2009) *II Kemometri Yaz Okulu*, İzmir İleri teknoloji Enstitüsü Yayınları, 56-69s.
- Demirci, C. (2007) *Pamuklu Tekstil Endüstrisi Atıksularındaki Rengin Foto-Fenton Prosesiyle Giderimi*. Yüksek Lisans, Fırat Üniversitesi, Elazığ, 47s.
- Duran, K., Bozacı, E. ve Karahan, A. (2007) *Protein Esaslı Mamüllerin Enzimatik Ön Terbiyesi. Tekstil ve Konfeksiyon* (3): 187-192.
- Duraner (1998) *Kasar Çözeltilisinde Peroksit Miktarı Tayini*. TSEK
- Erenler, A. (2009) *Biyoenzimler ve Biyoenzimlerin Örme Kumaş Özelliklerine Etkisi*. Yüksek Lisans, Çukurova Üniversitesi, Adana, 100s.
- Gottlieb, A., Shaw, C., Smith, A., Wheatley, A. ve Forsythe, S. (2003) The Toxicity of Textile Eactive Azo Dyes After Hydrolysis and Decolourisation. *J. Biotechnol*. 101: 49–56.
- Gülümser, T., Akça, C. ve Bahtiyari, M.İ. (2009) Yün Terbiyesinde Ozonla İşlemin Beyazlık Derecesine Etkisinin Araştırılması. *Tekstil ve Konfeksiyon*. 19 (1): 52-55s.
- İnkaya, T., Eren, H.A. ve Anış, P. (2008) Pamuk Ağartılmasında Lakkaz/ Mediatör Sistemlerinin Oksijen ve Ozon İle Kombine Edilmesi. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi* 14(1), 77-82s.
- İspirli, Y. (2008) *Taşıyıcısız İmmobilizasyon Yöntemiyle Çapraz Bağlı Glukoz Oksidaz (GOD) Enzim Agregatlarının ve Kristallerinin Sentezi ve Karakterizasyonu*. Yüksek Lisans, Muğla Üniversitesi, Muğla, 79s.

- Kalaycıoğlu, L., Serpek, B., Nizamlıoğlu, M., Başınar, N. ve Tiftik, A.M. (2010) *Biyokimya*. Nobel Yayınları, Ankara, 237s.
- Kariminiaae-Hamedaaani, H-R., Sakurai, A., ve Sakakibara, M. (2007) Decolorization of synthetic dyes by a new manganese peroxidase-producing white rot fungus. *Dyes Pigments* 72 : 157–162s.
- Kieran, P.ve Berovic, M. (Edit). (2001) *Bioprocess Engineering Course Note*. The European Federation of Biotechnology, 286-288s.
- Körlü, A. ve Altay, P. (2009) Enzimatik Yün Terbiyesi. *Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi*. 3(2): 81-91s.
- Levin, L., Forchiassin, F., Viale, A. (2005) Ligninolytic enzyme production and dye decolorization by *Trametes trogii*: application of the Plackett–Burman experimental design to evaluate nutritional requirements. *Process Biochem*, 40:1381–1387s.
- Lübbert, A., Simutis, R., Volk, N.S.ve Galvanuskas, V. (2000).*Biochemical Process Optimization and Control, Hands-on Course*. Martin Luther Universitat, Germany
- Mohan, D., Charles. U., ve Pittman, Jr. (2006) Activated carbons and low cost adsorbents for remediation of tri- and hexavalent chromium from water. *J. Hazard Mater.* , 137(2):762-811.
- Mohorcic, M., Teodorovic, S., Golob, V. ve Friedrich, J. (2006) *Fungal and Enzymatic Decolourisation of Artificial Textile Dye Baths*. Elsevier Ltd., 63: 1709-1717.
- Nelson, D.L ve Cox, M.M. (2005) *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*, Palme Yayıncılık, Ankara, 244s.
- Özata, A. ve Kutlu, M. (2000) *Enzimoloji Ders Notları*. T.C:Anadolu Üniversitesi Yayınları, Eskişehir,1-8s.
- Pekel, L.C. (2009) *Çöktürme Yönteminin Kullanıldığı Boya Atıksu Arıtma Sisteminin Genelleştirilmiş Tahmin Edici Kontrol (GPC) ile pH Kontrolü*. Yüksek Lisans, Ankara Üniversitesi, Ankara, 97s.

- Qu, J. (2008) Research progress of novel adsorption processes in water purification. *J. Environ Sci.*, 20 (1):1-13.
- Rafatullah, M., Sulaiman, O., Hashim, R., Ahmad, A. (2010) Adsorption of methylene blue on low-cost adsorbents. *J. Hazard Mater*, 177:70-80.
- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R., Nigam, P. (2001) Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technol*, 77:247-255.
- Roger, S. (2011) *Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs)*, 35:1583-1587.
- Schoevaart, R., Wolbers, M., Golubovic, M., Ottens, M., Kieboom, A.P.G, (2004) Preparation Optimization, and Structures of Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEAs), *Biotechnol Bioeng*, 87(6):754-762.
- Scouten, W.H., Mosbach, K., (1987) *Methods in Enzymology*, Academic Press, 135:30-65.
- Shah, S., Sharma, A., Gupta, M.N. (2006) Preparation of cross-linked enzyme aggregates by using bovine serum albumin as a proteic feeder . *Analytical Biochemistry*, 351(2):207-213.
- Shuler, M.L. ve Kargi, F. (1992) *Bioprocess Engineering Basic Concepts*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 64-67s.
- Sheldon, R.A. (2007) *Enzyme Immobilization. The Quest for Optimum Performance*, Adv. Synth. Catal Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA, Weinheim, 1298-1300s.
- Smith, J.M. (1970) *Chemical Engineering Kinetics*. McGraw-Hill, Newyork.
- Söylemez, Z. ve Fadiloğlu, S. (1996) *Laboratory Manual Enzyme Purification and Immobilization*, Gaziantep Üniversitesi Yayınları, Gaziantep, 47s.
- Sözbilir, B.N ve Bayşu, N. (2008) *Biyokimya*. Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara, 293s.

- Şencan, A. (2011) Tekstil Atık Suyunda Kimyasal Yöntemle Renk Giderimi, *Tekstil Teknolojileri. Elektronik Dergisi*, 5(1): 48-53s.
- Tangüler, H. ve Erten, H. (2006) Şarap Üretiminde İmmobilizasyon Uygulamaları, *Türkiye 9. Gıda Kongresi*, 24-26 Mayıs 2006, Bolu, Bildiriler: 257-260
- Telefoncu, A. (1997) *Enzimoloji, Lisansüstü Yaz Okulu*. Aydın, Türkiye, 1-4, 8-11, 197, 213-216s.
- Topçular, C. (2006) *Taşıyıcılı ve Taşıyıcısız Sistemlerde İmmolize Peroksidaz Enziminin Karakterizasyonu*. Yüksek Lisans, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 71s.
- Topçular, C. ve Ayhan H. (2008) Carrier free cross-linked peroxidase aggregates Synthesis and Characterization. *Hacettepe Journal of Chemistry*, 36(3):255-261.
- Topçular, C. ve Ayhan, H. (2007) Immobilisation of Horseradish Peroxidase Onto Monodisperse Poly. Microspheres. *J.Biomater. Sci.Polymer Edn.* 18(5): 595-596.
- Walsh, G. ve Headon, D. (1994) *Protein Biotechnology*. John Wiley & Sons Ltd, England, 303-304s.
- Vijayaraghavan, K. Ve Yun, Y. (2008) Bacterial biosorbents and biosorption Review Article, *Biotechnology Advances*, 26(3), 266-291.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad Soyad :Banuay Coşkun
Uyruk :T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi :01/01/1985
Medeni Hali :Bekar
Telefon :0-554 845 4946
E-posta :banu_simya_@windowlive.com

Eğitim

Alınan Derece	Aldığı Kurum/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lise	Akhisar Lisesi	2006
Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2010
Yüksek Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2012

İş Tecrübesi

Yıl	Yer	Pozisyon/Görev
2011	Muğla	Sorumlu Müdür
2012	Muğla	Sorumlu Müdür

Yabancı Diller

İngilizce	Başlangıç	Orta	İleri
Yazma		X	
Konuşma		X	
Okuma		X	
Anlama		X	

Bilimsel Faaliyetler

Akademik Bilişim, Malatya, İnönü Üniversitesi, 2-4 Şubat 2011

Ulusal Kimya Kongresi, Muğla, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, 1-6 Ekim 2012

Yayınlar

Odabaş, S.Ç.; Özevci, G.; Coşkun, B.; Ayhan, F.; Ayhan, F.;Akpolat, O.,
“Fotoçaprazbağlı Hemahidrojenlerin Dinamik Şişme Davranışının Modellenmesi”,
Akademik Bilişim 2011, Malatya