

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

“HORSE RADISH” PEROKSİDAZ (Bayır Turpu peroksidazı) (HRP) VE DEKSTRAN TÜREVİNİN ÇEVRE KİRLİTİCİ BOYALARA ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Yüksek Kimyager R. Selva ÖNDER

**FBE Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programında
Hazırlanan**

DOKTORA TEZİ

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Huriye KUZU (YTÜ)

İSTANBUL, 2008

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	iv
KISALTMA LİSTESİ.....	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
ÇİZELGE LİSTESİ	ix
ÖNSÖZ	x
ÖZET	xi
1. GİRİŞ	13
2. GENEL BİLGİLER	15
2.1 Bayır turbu “Horseradish”(Armoracia rusticana) Peroksidazı (HRP, EC 1.11.1.7)15	
2.1.1 HRP Reaksiyon Mekanizması.....	16
2.2 Atık Sularda Boya Giderme	17
2.2.1 Atık Sulardan Enzim Etkisi ile Boya Giderme	17
2.2.2 Atık Sularda Mikroorganizma Etkisi ile Boya Giderme.....	18
2.2.3 Atık Sularda Boya (Renk) Gidermede Kullanılan Diğer Yöntemler.....	18
3. DENEYSEL ÇALIŞMA	22
3.1 Kullanılan Cihaz ve Malzemeler	22
3.1.1 Kullanılan Cihazlar	22
3.1.2 Kullanılan Malzemeler.....	23
3.1.3 Kullanılan UV-Vis Spektrofotometresinin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri ...	23
3.1.4 Kullanılan Protein Saflaştırma Sisteminin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri....	23
3.1.5 Kullanılan Fourier Transform Infrared Spektrometre Cihazının Teçhizat ve Çalışma Parametreleri.....	24
3.2 Kullanılan Kimyasallar	24
3.3 HRP Enziminin Saflaştırılması.....	24
3.3.1 Ticari HRP Enziminin Affinite Kromatografisi ile Saflaştırılması	24
3.3.2 Dekstran Aldehid Türevinin Sentezi.....	25
3.3.3 HRP -Dekstran Konjugatının Sentezi.....	25
3.4 HRP'nin Boyar Madde (Naftol Blue Black)'e Etkisinin İncelenmesi.....	26
3.4.1 Naftol Blue Black Boyasının Giderilmesinde Ortamda Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) ve Üre Varlığının Etkisi.....	27
3.4.1.1 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Etkisi.....	27
3.4.1.2 Üre Etkisi	27
3.5 HRP'nin Boyar Madde (Coomassie Brilliant Blue)'e Etkisinin İncelenmesi.....	28
3.6 Boyar Maddelerin (Naftol Blue Black ve Coomassie Brilliant Blue) ve HRP ile Reaksiyonlarının FT-IR ile İncelenmesi.....	28

3.7	Boyar Maddelerin (Naftol Blue Black ve Coomassie Brilliant Blue) ve HRP ile Reaksiyonlarının LC-MS ile İncelenmesi.....	28
4.	DENEY SONUÇLARI	29
4.1	Satın Alınan HRP nin Saflaştırma İşleminin İzlenmesi.....	29
4.2	HRP Enzimi ile pH 3, 4, 5, 6, 7 ve 8' de ve farklı ortam sıcaklıklarında "Naftol Blue Black" Boyar Maddesinin Giderilmesi.....	30
4.3	HRP/Dekstran: 1/10 Konjugatı ile pH 3, 4, 5, 6, 7 ve 8' de ve farklı ortam sıcaklıklarında Naftol Blue Black Boyar Maddesinin Giderilmesi.....	37
4.4	Farklı pH' larda (pH: 3, 4 5, 6, 7, 8) ve farklı sıcaklıklarda, HRP Enziminin ve Konjugatının Naftol Blue Black Boyar Maddesine Etkisinde 60. dakikada % Boya Kaybı.....	43
4.5	Farklı pH' larda (pH 3, 4, 5, 6, 7, 8) Kısa Süreli Beklemede HRP' nin % Naftol Blue Black Boyasının Giderilmesine Etkisi.....	51
4.5.1	Naftol Blue Black Boyasının Giderilmesinde Ortam Koşullarının Etkisi	56
4.5.1.1	Üre Etkisinin İncelenmesi	56
4.5.1.2	Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Etkisinin Araştırılması.....	57
4.6	Saflaştırılan HRP ile Coomassie Brilliant Blue R-250 Boyasının Giderilmesi	58
4.7	FT-IR Spektrumları.....	72
4.8	LC-MS Sonuçları.....	76
4.8.1	Naftol Blue Black Boyası ile HRP Reaksiyonun LC-MS Sonuçları.....	76
4.8.2	Coomassie Brilliant Blue R-250 Boyası ile HRP Reaksiyonun LC-MS Sonuçları.....	79
5.	TARTIŞMA, SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ	82
	KAYNAKLAR.....	84

SİMGE LİSTESİ

°C	Santigrat derece
mg	Miligram
L	Litre
mL	Mililitre
μ	Mikro
μL	Mikrolitre
M	Molar
nm	Nanometre

KISALTMA LİSTESİ

NaCl	Sodyum klorür
NaH ₂ PO ₄ . 2 H ₂ O	Sodyum dihidrojen fosfat dihidrate
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	Disodyum hidrojen fosfat heptahidrate
HRP	Horseradış Peroksidaz
NaOH	Sodyum hidroksid
NaIO ₄	Sodyum periyodat
H ₂ SO ₄	Sülfat asidi
NaBH ₄	Sodyum borhidrür
Con A	Concanavalin A- Sepharose 4B
PBS	Fosfat tamponu
GPC	Jel Filtrasyon Kromatografisi
RZ	Rain Heitszahl Değeri
FTIR	Fourier Transform Infrared
A	Absorbans
UV	Ultra Violet

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Bayır turbu (<i>Armoracia rusticana</i>) “Horseradish” bitkisi (Veitch, 2004).	15
Şekil 2.2 HRP enziminin çalışma mekanizması [2].....	16
Şekil 2.3 Elektron donör AH varlığında gerçekleşen HRP reaksiyon döngüsü. (HEM’in proksimal bölgesinde koordine edilen histidin “His” belirtilmiştir) (Degrand vd., 2001).....	17
Şekil 4.1 Satın alınan HRP’nin protein saflaştırma sisteminde affinite kolon kullanılarak saflaştırılması sırasında 280nm’de UV dedektör ile alınan kromatogramı (X eksenini tüp no; Y eksenini A ₂₈₀).	29
Şekil 4.2 pH 5.0 40 °C’ de Naftol Blue Black boyasının saf HRP enzimi ile giderilmesinin UV-VIS (620 nm) ile gözlenmesi	30
Şekil 4.3 Saf HRP enziminin pH:3.0 asetat tamponunda ve farklı sıcaklıklarda Naftol Black Boyar (NBB) maddesine etkisinde 620 nm’deki % boya kaybı.	31
Şekil 4.4 Saf HRP enziminin pH: 4.0 asetat tamponunda ve farklı sıcaklıklarda Naftol Black Boyar (NBB) maddesine etkisinde 620 nm’deki % boya kaybı.....	32
Şekil 4.5 Saf HRP enziminin pH: 5.0 asetat tamponunda ve farklı sıcaklıklarda Naftol Black Boyar (NBB) maddesine etkisinde 620 nm’deki % boya kaybı.....	33
Şekil 4.6 Saf HRP enziminin pH: 6.0 fosfat tamponunda ve farklı sıcaklıklarda Naftol Black Boyar (NBB) maddesine etkisinde 620 nm’deki % boya kaybı.....	34
Şekil 4.7 Saf HRP enziminin pH: 7.0 fosfat tamponunda ve farklı sıcaklıklarda Naftol Black Boyar (NBB) maddesine etkisinde 620 nm’deki % boya kaybı.....	35
Şekil 4.8 Saf HRP enziminin pH: 8.0 fosfat tamponunda ve farklı sıcaklıklarda Naftol Black Boyar (NBB) maddesine etkisinde 620 nm’deki % boya kaybı.....	36
Şekil 4.9 HRP/Dekstran: 1/10 konjugatının pH: 3.0 asetat tamponunda ve farklı sıcaklıklarda Naftol Black Boyar (NBB) maddesine etkisinde 620 nm’deki % boya kaybı	37
Şekil 4.10 HRP/Dekstran: 1/10 konjugatının pH: 4.0 asetat tamponunda ve farklı sıcaklıklarda Naftol Black Boyar (NBB) maddesine etkisinde 620 nm’deki % boya kaybı.....	38
Şekil 4.11 HRP/Dekstran: 1/10 konjugatının pH: 5.0 asetat tamponunda ve farklı sıcaklıklarda Naftol Black Boyar (NBB) maddesine etkisinde 620 nm’deki % boya kaybı.....	39
Şekil 4.12 HRP/Dekstran: 1/10 konjugatının pH: 6.0 fosfat tamponunda ve farklı sıcaklıklarda Naftol Black Boyar (NBB) maddesine etkisinde 620 nm’deki % boya kaybı.....	40
Şekil 4.13 HRP/Dekstran: 1/10 konjugatının pH: 7.0 fosfat tamponunda ve farklı sıcaklıklarda Naftol Black Boyar (NBB) maddesine etkisinde 620 nm’deki % boya kaybı.....	41
Şekil 4.14 HRP/Dekstran: 1/10 konjugatının pH: 8.0 fosfat tamponunda ve farklı sıcaklıklarda Naftol Black Boyar (NBB) maddesine etkisinde 620 nm’deki % boya kaybı.....	42
Şekil 4.15 Farklı pH’larda (pH: 3, 4 5, 6, 7, 8), 25°C’da, 60 dakikak sonrasında HRP enziminin ve konjugatının Naftol Blue Black boyar maddesine etkisinde 620 nm’deki % boya kaybı.....	43
Şekil 4.16 Farklı pH’larda (pH: 3, 4 5, 6, 7, 8), 30°C’da, 60. dakikada HRP enzimi ve konjugatının Naftol Blue Black boyar maddesine etkisinde 620 nm’deki boya % kaybı.....	44
Şekil 4.17 Farklı pH’larda (pH: 3, 4 5, 6, 7, 8) 35 °C’da, 60. dakikada HRP enziminin ve konjugatının Naftol Blue Black boyar maddesine etkisinde 620 nm’deki % boya kaybı.....	45
Şekil 4.18 Farklı pH’larda (pH: 3, 4 5, 6, 7, 8) 40 °C’da, 60. dakikada HRP enziminin ve	

konjugatının boyar maddesine etkisinde 620 nm' deki % boya kaybı.....	46
Şekil 4.19 Farklı pH' larda (pH: 3, 4 5, 6, 7, 8) 45 °C' da, 60. dakikada HRP enziminin ve konjugatının Naftol Blue Black boyar maddesine etkisinde 620 nm' deki % boya kaybı.....	47
Şekil 4.20 Farklı pH' larda (pH: 3, 4 5, 6, 7, 8) 50°C'da, 60. dakikada HRP enziminin ve konjugatınınNaftol Blue Black boyar maddesine etkisinde 620 nm' deki % boya kaybı.....	48
Şekil 4.21 Farklı pH' larda (pH: 3, 4 5, 6, 7, 8) 60°C'da, 60. dakikada HRP enziminin ve konjugatının Naftol Blue Black boyar maddesine etkisinde 620 nm' deki % boya kaybı.....	49
Şekil 4.22 Farklı pH' larda (pH: 3, 4 5, 6, 7, 8) 70°C'da, 60. dakikada HRP enziminin ve konjugatının Naftol Blue Black boyar maddesine etkisinde 620 nm' deki % boya madde kaybı.	50
Şekil 4.23 Farklı sıcaklıklarda saf HRP' nin 5. dk.'da Naftol Blue Black boyasının 620 nm' deki % boya kaybı.....	52
Şekil 4.24 Farklı sıcaklıklarda saf HRP' nin 10. dk.'da Naftol Blue Black boyasının 620 nm' deki % boya kaybı.....	54
Şekil 4.25 Farklı sıcaklıklarda saf HRP' nin 60. dk.'da Naftol Blue Black boyasının 620 nm' deki % boya kaybı.....	55
Şekil 4.26 Saf HRP ve konjugatı için Naftol Blue Black boyasının giderilmesine 25 °C' de, pH: 7.0 de 1.0 M üre etkisinin incelenmesi.....	56
Şekil 4.27 Saf HRP ve konjugatı için Naftol Blue Black boyasının giderilmesine 25 °C' de, pH: 7.0 de 0,25 M üre etkisinin incelenmesi.....	56
Şekil 4.28 Saf HRP ve konjugatı için Naftol Blue Black boyasının giderilmesine 35 °C' de, pH: 7.0 de 0,25 M üre etkisinin incelenmesi.....	57
Şekil 4.29 Saf HRP ve konjugatı için pH: 7.0' de Naftol Blue Black boyasının giderilmesine 25 °C ve 35 °C sıcaklıklarında 0,5 mM SDS etkisinin incelenmesi.....	57
Şekil 4.30 Saf HRP ve konjugatı için pH: 7.0' de Naftol Blue Black boyasının giderilmesine 25 °C ve 35 °C sıcaklıklarında 20 mM SDS etkisinin incelenmesi.....	58
Şekil 4.31 pH 5.0 40 °C' de Coomassie Brilliant Blue R-250 boyasının saf HRP enzimi ile giderilmesinin UV-VIS (620 nm) ile gözlenmesi.....	59
Şekil 4.32 pH:3' de saf HRP enzimi ile % boya kaybı.....	61
Şekil 4.33 pH 4' de saf HRP enzimi ile % boya kaybı.....	63
Şekil 4.34 pH 5' de saf HRP enzimi ile % boya kaybı.....	65
Şekil 4.35 pH 6' da saf HRP enzimi ile % boya kaybı.....	67
Şekil 4.36 pH 7' de saf HRP enzimi ile % boya kaybı.....	69
Şekil 4.37 pH 8' de saf HRP enzimi ile % boya kaybı.....	71
Şekil 4.38 Dekstranın ve aldehid türevinin FTIR spektrumu.....	72
Şekil 4.39 Saf HRP ve $n_{HRP}/n_D:1/10$ ($M_D:75.000$) konjugatın FTIR spektrumları.....	74
Şekil 4.40 Naftol Blue Black (NBB), HRP ve NBB Başlangıç, HRP ve NBB 45. dk. daki FT-IR Spektrumları.....	74
Şekil 4.41 Coomassie Brilliant Blue, CBB ve HRP Başlangıç, CBB ve HRP 45. dk. daki FT-IR Spektrumları.....	75
Şekil 4.42 Naftol Blue Black boyasının kimyasal formülü (616 g/mol).....	76
Şekil 4.43 Naphtol Blue Black (mavi renkli kromatogram), Naftol Blue Black + Enzim (0. dakika, siyah renkli kromatogram), Naftol Blue Black + Enzim (45. dakika, pembe renkli kromatogram=)'nın UV-VIS detektöründen (617 nm) alınan kromatogramları.....	76
Şekil 4.44 Naftol Blue Black için kromatogramın 1,86-2,29 dakikalari arasında alınan kütle spektrumu. 571,15=(M-H ⁺); 284,75=(M-2H ⁺).	77
Şekil 4.45 Naftol Blue Black + Enzimin 0. dakikada kromatogramın 1,86-2,29 dakikalari	

arasında alınan kütle spektrumu.....	77
Şekil 4.46 Naftol Blue Black + Enzimin 45. dakikada kromatogramın 1,86-2,29 dakikaları arasında alınan kütle spektrumu.....	78
Şekil 4.47 Coomassie Blue Black boyasının kimyasal formülü (826 g/mol)	79
Şekil 4.48 Coomassie Brilliant Blue R-250 (siyah renkli kromatogram), saf HRP-Coomassie Brilliant Blue R-250 (0. dak, pembe renkli kromatogram) ve saf HRP-Coomassie Brilliant Blue R-250 (45. dak, kahve renkli kromatogram)'nın UV-VIS detektöründen (550 nm) alınan kromatogramları.	79
Şekil 4.49 Coomassie Brilliant Blue R-250'nin kromatogramın 18,9-19,4 dakikaları arasında alınan kütle spektrumu. $804.20 = (M+H^+)$	80
Şekil 4.50 Saf HRP-Coomassie Brilliant Blue R-250 nin 0. dakikada kromatogramın 18,9-19,4 dakikaları arasında alınan kütle spektrumu.....	81
Şekil 4.51 Saf HRP-Coomassie Brilliant Blue R-250 nin 45. dakikada kromatogramın 18,9-19,4 dakikaları arasında alınan kütle spektrumu.....	81

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 4.1 Farklı sıcaklıklarda saf HRP' nin etkisinde, 5. dakikada Naftol Blue Black boyasının 620 nm' deki % boya kaybı.....	51
Çizelge 4.2 Farklı sıcaklıklarda saf HRP' nin 10. dk.'da Naftol Blue Black boyasının 620 nm' deki % boya kaybı.....	53
Çizelge 4.3 Farklı sıcaklıklarda saf HRP' nin 60. dk.'da Naftol Blue Black boyasının 620 nm' deki % boya kaybı.....	54
Çizelge 4.4 pH:3' de saf HRP enzimi ile Coomassie Brilliant Blue R-250 boyasının % boya kaybı.....	60
Çizelge 4.5 pH:4' de saf HRP enzimi ile Coomassie Brilliant Blue R-250 boyasının % boya kaybı.....	62
Çizelge 4.6 pH:5' de saf HRP enzimi ile Coomassie Brilliant Blue R-250 boyasının % boya kaybı.....	64
Çizelge 4.7 pH:6' de saf HRP enzimi ile Coomassie Brilliant Blue R-250 boyasının % boya kaybı.....	66
Çizelge 4.8 pH:7' de saf HRP enzimi ile Coomassie Brilliant Blue R-250 boyasının % boya kaybı.....	68
Çizelge 4.9 pH:8' de saf HRP enzimi ile Coomassie Brilliant Blue R-250 boyasının % boya kaybı.....	70
Çizelge 4.10 FTIR spektrumlarında oluşan bantlar ve gösterdikleri fonksiyonel gruplar (Erdik, 1993).....	73

ÖNSÖZ

Y.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimimden bugüne kadar bilgi birikimi ve tecrübesiyle tez çalışmamda her türlü yardımı sağlayan ve önerileriyle beni yönlendiren değerli hocam Prof. Dr. Huriye KUZU' ya teşekkür ederim.

Tezimde yararlandığım Biyomühendislik Bölümü Laboratuvarlarının oluşmasını sağlayan Değerli Bilim İnsanı, Kurucu Biyomühendislik A.B.D. Başkanı Prof. Dr. Mustafa AKDESTE'yi rahmetle anıyorum.

Deneysel çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Y.T.Ü. Biyomühendislik Bölümü Doktora Öğrencisi Mithat Çelebi'ye, Araş. Gör. Özlem ÖZTOLON' a, Arş. Gör. Murat TOPUZOGULLARI'na, Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Araş. Gör. Dr. Melda ALTIKATOĞLU' na;

Eğitim ve öğretimimde hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan maddi ve manevi desteklerinden dolayı sevgili aileme ve değerli arkadaşlarıma;

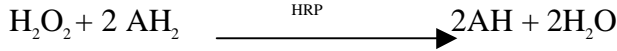
Sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Özellikle diyagnostik endüstrisinde kullanılan ticari öneme sahip enzimlerden Bayır Turpu Peroksidazı (Horseradish Peroksidase, HRP, E,C 1.11.1.7) adı geçen bitkinin (*Armoracia rusticana*) köklerinden ekstre edilmektedir. HRP yaklaşık yüzyıldır üzerinde çalışılan hem içerikli bir peroksidazdır ve çok sayıda izoenzimi bulunmaktadır. HRP'nin enzimatik aktivitesi hem grubunda bulunan demir atomunun oksidasyon ve redüksiyonundan ileri gelmektedir. Hem grubu nedeniyle HRP 403 nm'de de absorpsiyon vermektedir. Peroksidazlar yükseltgeyici olarak hidrojen peroksidi veya organik hidrojen peroksidleri kullanan oksidoredüktazlardır. H₂O₂ ile Bileşik I, II ve III olmak üzere üç farklı yapı oluştururlar.

Fenolik bileşikler tıp, gıda endüstrisi atıklarda kirleticilerin başında gelmektedir. Bu nedenle fenolik bileşiklerin hassas ve hızlı bir şekilde saptanması, çevre çalışmaları ve sağlık açısından önemlidir. Horseradish peroksidaz (HRP) fenollerin, bifenollerin ve bunlar gibi heteroaromatik bileşiklerin oksidasyonlarını katalizleyebilmektedir.

HRP geniş bir pH ve sıcaklık aralığında aktivite gösterdiğinden atık suların temizlenmesinde kullanılması uygun görülmektedir. Sulu çözeltilerden fenol ve türevlerinin HRP katalizinde giderilmesini optimize etmek amacıyla son 20 yılda birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. HRP, içinde fenol, klorofenol ve diğer sübtitüe fenollerin de bulunduğu birçok aromatik bileşiğin polimerizasyonu öncesinde serbest radikal oluşumunu katalizlediği bilinmektedir.



Toksik özellikte olan bu boyaların giderilmesi amaçlanarak kimyasal yükseltgeme, ters ozmoz, adsorbsiyon gibi çeşitli yöntemler denenmiştir. Son zamanlarda bu konuda çalışan araştırmacıların dikkati enzim etkisi ile gidermeye odaklanmıştır. Özellikle bitki peroksidazlarının üzerinde durulmaktadır.

Bu çalışmada HRP-Dekstran kovalent konjugatı sentezlendi. Öncelikle, HRP immobilize Con A kullanılarak affinite kromatografi yöntemi ile saflaştırıldı. Dekstranın (Mw 75.000 Da) aldehid türevi ve saf enzim örnekleri kullanılarak 1/10 mol oranında(mol enzim/mol dekstran) enzim-dekstran konjugatı sentezlendi.

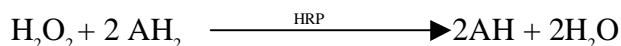
Saflaştırılan enzimin ve sentezlenen 1/10 oranlı konjugatın katalizi ile Naphtol Blue Black ve Coomassie Brillant Blue boyalarının giderilmesi 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80 °C sıcaklıklarda, pH: 3, 4, 5, 6, 7 ve 8' da incelendi. Bu reaksiyon bir saat süre ile UV-Vis. Spektrofotometre ile izlendi. "Naphtol Blue Black" ve "Coomassie Brillant Blue" in parçalanması LC-MS ve FT-IR sonuçlarına göre değerlendirildi.

Anahtar kelimeler: "Horseradish" peroksidaz (*Armoracia rusticana*), HRP-dekstran konjugatı, Naftol Blue Black, Coomassie Brillant Blue, Boya giderme, UV-VIS, LC-MS, FT-IR.

ABSTRACT

Horseshoe Peroxidase (HRP; E.C 1.11.1.7) notably used in diagnostic industry and having a great commercial importance, is extracted from the roots of *Armoracia rusticana*. HRP enzyme is a heme containing peroxidase which has been studied for a century and has so many isoenzymes. Enzymatic activity of HRP take its source from the reduction and oxidation of iron atom present in heme group. As a result of having a heme group, HRP has an absorbance at 403 nm . Peroxidases are oxidoreductases which use hydrogen peroxidase or organic hydrogen peroxidases as oxidants. Most of them are glycoprotein structured enzymes having N-linked oligosaccharides in their compositions. They have three different forms known as Compound I, II and III with H₂O₂.

Phenolic compounds are major pollutants in medicine, food and local matrix. Hence, it is important to detect phenolic compounds sensitively. Horseshoe peroxidase (HRP) can be catalyze oxidation of heteroaromatic compounds as phenols, biphenols, alinine. Because of HRP shows wide range of pH and temperature, it is seem favor to use processing to waste water. In recent 20 years in order to optimize the removal of phenol and analogous from waste water, many studies have been performed. It is known that HRP catalyze free radical existion before polymerization of phenol, chlorophenol and other substitute phenols.



Various methods were tested such as chemical oxidation, reverse osmos, adsorption to remove these toxic dyes. Recently, investigators who work in this area focus on removing these toxic substances by enzyme catalyses. Especially, it is emphasized on plant peroxidases.

In this study, Horseshoe Peroxidase-Dextran covalent conjugate was synthesized. Thus, firstly HRP was purified by affinity chromatography using immobilized Con A. Enzyme-dextran conjugate with 1/10 molar ratio was synthesized using dextran aldehyde derivative (Dextran Mw 75.000 Da) and purified enzyme.

Bleaching of Naphtol Blue Black and Coomassie Brilliant Blue dyes were observed with UV-VIS absorbance spectrophotometer for 60 minutes and results are compared. The reactions by using purified enzyme and conjugate were performed at different pHs (pH: 3, 4, 5, 6, 7, 8) in a 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, °C temperatured in UV-VIS quartz cuvette. Degredation of “Naphtol Blue Black” and “Coomassie Brilliant Blue” were evaluated using LC-MS and FT-IR spectra.

Key words: HRP, HRP-Dextran conjugate, Naphtol Blue Black, Coomassie Brilliant Blue, Dye bleaching, UV-VIS, LC-MS, FTIR

1. GİRİŞ

Peroksidazlar (donör: H_2O_2 , oksidoredüktaz, E.C 1.11.1.7) başlıca fonksiyonları hidrojen peroksid sarfiyatıyla molekülleri okside etmek olan enzimlerdir. Bu enzimlerin çoğu N-bağlı oligosakkarid bulunduran glikoproteinlerdir. Peroksidazlar başlıca tıbbi tanı kitlerinin hazırlanmasında, gıda proseslerinde oluşan reaktif oksijen türleri için indikatör, ticari amaçlı fenolik reçinelerin sentezinde katalizör ve bazen de histolojik marker olarak kullanılmaktadır. Laboratuvar immün kitlerinin % 90' ı peroksidaz-antikör konjugatı kullanılmaktadır. Peroksidazlar bitki, ailesi içinde geniş olarak yayılmış durumdadırlar (Miranda vd . , 2003).

Armoracia rusticana (bayır turpu) nin kökleri bir tioglukozid ihtiva etmektedir. Hidroliz sonucu eterik yağ allilizotiyosiyanat (hardal yağı gibi) ayrılmaktadır. Ayrıca şeker, nişasta, sakızlı maddeler de içermektedir. Taze kök özü lizozim antibiyotik tesirli madde ihtiva etmektedir. Yapraklar askorbik asid (vitamin C), kalsiyum, sodyum, magnezyum tohumlar da katı yağ içermektedir. Peroksidaz enzimi bu kökten elde edilmektedir. HRP üç önemli izoenzim içermektedir. İzoenzim A (asidik), izoenzim C (nötral yada az bazik) ve kuvvetli bazik HRP. Bunlardan en yaygın olanı C izoenzimidir. (HRP C) (Veitch, 2004). Bayır turpu (*Armoracia rusticana*) peroksidazı (HRP) günümüzde diagnostikte büyük bir öneme sahip bir enzimdir. Ayrıca H_2O_2 varlığında aromatik bileşiklerin (fenoller, bifenoller, anilinler) uzaklaştırılması ve azo boyalarının çöktürülmesinde etkili olduğu bilinmektedir. Enzim diam, nobenzidin (DAB)' yi çözünmeyen bir bileşiğe dönüştürmektedir: Bu bileşik de kanser tanısına yardımcı olmaktadır: Avidin köprüleri ile HRP'nin immobilizasyonu kuvvetli etkinliğe sahip biyokatalizörler oluşturmaktadır: Ayrıca enzim histokimyasal boyamalarda; biyosensörlerde de kullanılmaktadır. Dehidrojenasyon; aromatik bileşiklerin polimerizasyonları; heteroatom oksidasyonları ve epoksidasyon gibi oksidatif reaksiyonlarda HRP' den katalizör olarak yararlanılmaktadır. HRP aktivitesi; geniş bir pH ve sıcaklık aralığında olduğundan bu enzimin atık su sisteminde kullanılması uygundur. HRP protohemin bir haloenzimdir: Peroksidaz katalizinde akseptör olarak H_2O_2 kullanır: Protohemin nedeniyle enzimin absorpsiyon spektrumu 280 nm'den başka 403 nm'de de maksimum vermektedir: Çözeltinin 403' nm deki absorbans değerinin 280 nm'dekine oranı RZ değerini yani enzimin saflığını göstermektedir (Franco Fagus vd, 2004; Leon vd, 2002).

Protein mühendisliği, immobilizasyon teknikleri, stabilize edici katkı maddeleri ya da kimyasal modifikasyon yöntemleri kullanılarak, protein stabilizasyonu alanında etkileyici gelişmeler olduğu halde endüstriyel enzimlerin işlevsel stabiliteleri biyoteknolojide bir sorun oluşturmaya devam etmektedir. Arayüzeyler tarafından inaktivasyona karşı çözünür

enzimlerin stabilizasyonuna olanak sağlayacak yeni araçların geliştirilmesi oldukça uygun görünmektedir. Enzim yüzeyinin hidrofilik bir polimer ile minimal modifikasyonu, enzim yüzeyinde bir kılıf oluşturmak ve onu hidrofobik arayüzeyler ile etkileşime karşı korumak için iyi bir yol olabilir (Betancor vd., 2004; Zhang, 2008).

Polimer sadece enzimin küçük substrat molekülleri ile etkileşimine izin vermekle kalmamalı, ayrıca enzimin hidrofobik ara yüzeyler ile etkileşimini önleyebilecek kadar da hidrofilik olmalıdır. Seçilen polimer enzim yüzeyinde bulunan gruplar ile reaksiyona girebilmelidir. Aldehit dekstran bütün bu gereklilikleri yerine getiren esnek bir polimerdir (Betancor vd., 2004).

Aldehit dekstran, değişik molekül ağırlına sahip ticari dekstranların periyodat oksidasyonu ile elde edilebilmektedir. Bu polifonksiyonel polimer, enzim, destek ya da diğer polimerler üzerinde bulunan temel amin grupları ile kovalent olarak reaksiyon verebilmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Bayır turbu “Horseradish”(Armoracia rusticana) Peroksidazı (HRP, EC 1.11.1.7)

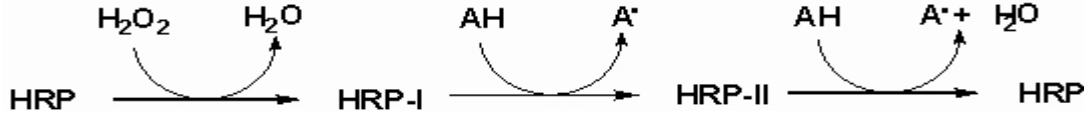
Bayır turbu (*Armoracia rusticana*), esas olarak köklerinin besin değeri sebebi ile dünyanın ılıman bölgelerinde yetiştirilen uzun ömürlü, dayanıklı bir bitkidir. Peroksidaz enzimi bu kökten elde edilmektedir (Şekil 2.1) (Veitch, 2004). *Armoracia rusticana* (bayır turbu; “horseradish” bitkisi)’nin antibiyotik özellik gösteren kökü kalsiyum, magnezyum, sodyum ve vitamin C içermektedir. ELİSA testlerinde, “immunoblotting” gibi tekniklerde işaretleyici olarak kullanılan bu enzim genellikle antikorlara, lektinlere ya da haptenlere bağlanmaktadır [1]. Yabanturpu köklerinden elde edilen peroksidaz (HRP) yeni kimyasal maddelerin sentezinde, tıbbi tanı testlerinde, biyotemizleme gibi uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Horseradish (yaban turbu) peroksidaz terimi genel olarak kullanıldığı halde bitkinin kökü birkaç tane farklı peroksidaz izoenzimi içermektedir. Bunlardan en yaygın olanı C izoenzimidir (HRP C) (Veitch, 2004).



Şekil 2.1 Bayır turbu (*Armoracia rusticana*) “Horseradish” bitkisi (Veitch, 2004).

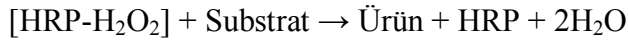
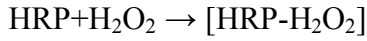
2.1.1 HRP Reaksiyon Mekanizması

Peroksidazlar, H_2O_2 ile Bileşik I, II ve III olmak üzere üç farklı yapı oluşturmaktadır. HRP'nin genel çalışma mekanizması aşağıda verildiği gibidir. HRP-I ve HRP-II, sırasıyla Bileşik I ve Bileşik II'yi, AH ise indirgenen substratı göstermektedir [2] (Deshpande, 1996; Leon vd., 2002; Carvalho vd., 2005).



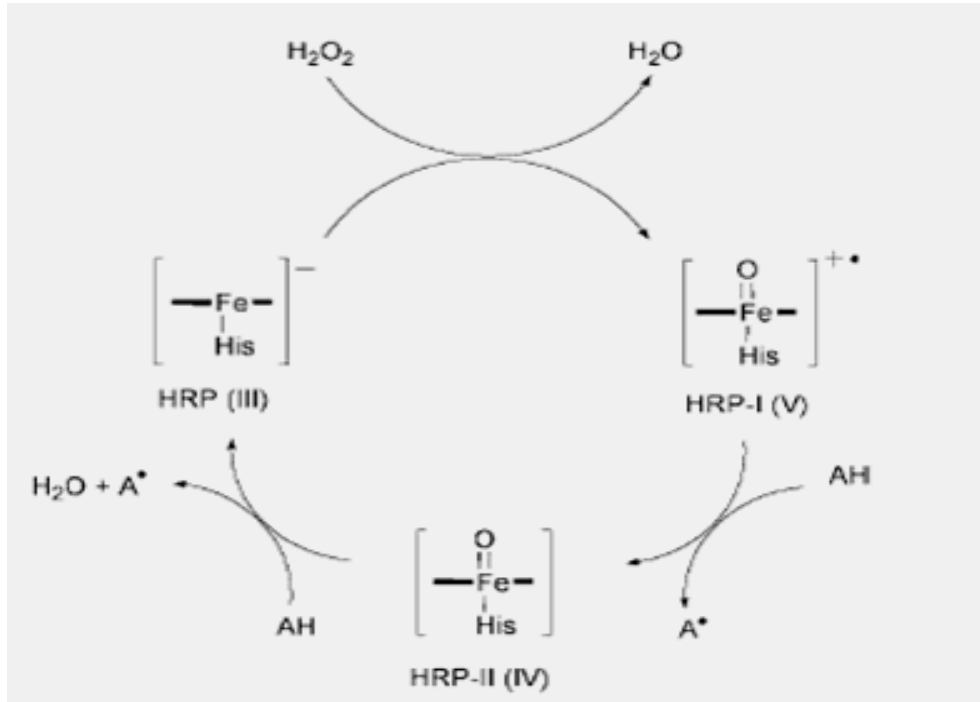
Şekil 2.2 HRP enziminin çalışma mekanizması [2].

HRP'nin enzimatik aktivitesi, hem grubunda bulunan demir atomunun oksidasyon ve redüksiyonundan ileri gelmektedir. Uygun ortamda HRP, H_2O_2 ile birleşerek $[HRP-H_2O_2]$ kompleksini oluşturmaktadır. Oluşan kompleks çeşitli elektron vericiler ile oksidlenir. Organik bileşiklerin, H_2O_2 varlığında peroksidaz oksidasyonu atık su işlenmesinde kullanılmıştır. Son zamanlarda HRP'nin aromatik hidrokarbonların oksidasyonunda da kullanıldığı bilinmektedir (Fang ve Barcelona, 2003; Carvalho vd., 2004).



Peroksidaz reaksiyon döngüsünün birinci basamağını, saf peroksidazın (HRP) ferrihem prostetik grubunun H_2O_2 ile gerçekleşen 2 elektron oksidasyonu oluşturmaktadır. Bu basamak oksiferil demir ($Fe^{+4}=O$) ve bir porfirin katyon radikali içeren HRP-I bileşiği (demirin formal oksidasyon bölgesi: V) formasyonu ile sonuçlanmaktadır.

Reaksiyonun ikinci basamağında HRP-II bileşiğinin şekillenmesi gerçekleşmektedir. Bu olay HRP-I bileşiğinin elektron donörü AH ile bir elektron redüksiyonu sonucunda oluşmaktadır (Oksidasyon bölgesi IV). Reaksiyonun son basamağında bir önceki basamakta eklenen elektron AH'dan ayrılır ve enzim tekrardan reaksiyonun başlangıç bölgesine döner (Rodríguez-Lopez vd., 2000; Degrand vd., 2001; Leon vd., 2002).



Şekil 2.3 Elektron donör AH varlığında gerçekleşen HRP reaksiyon döngüsü. (HEM'in proksimal bölgesinde koordine edilen histidin "His" belirtilmiştir) (Degrand vd., 2001).

HRP'nin H_2O_2 ile yükseltgenmesi sonucu, enzimin aktif formu olan Bileşik I ara ürünü oluşmaktadır. Bileşik I, kromojenik substratın (o-dianisidin) yükseltgenmesi sonucu Bileşik II formuna dönüşmektedir. Katalitik olarak enzimin ikinci aktif formu olan Bileşik II ise, o-dianisidin'in tekrar yükseltgenmesi sonunda enzimin doğal formunu oluşturmaktadır. Bileşik III enzimin inaktif formudur. Bu ise yavaş bir şekilde enzimin doğal formuna ya da bir elektron oksidasyonu ile Bileşik I'e dönüşebilir (Deshpande, 1996; Beklemishev vd., 2000; Ikehata vd., 2005).

2.2 Atık Sularda Boya Giderme

Farklı endüstrilerin boya artıkları tehdit oluşturmaktadır. Bunlardan bir kısmı karsinojenik ve motojenik olduklarından atık sudan giderilmeleri gerekmektedir.

2.2.1 Atık Sulardan Enzim Etkisi ile Boya Giderme

Vanadyum Haloperoksidazlar hidrojen peroksid varlığında hipohalöz aside ve sülfokside uygun organik sülfidlerin sülfoksidasyonunu katelizlemektedir.

Bu enzim grubu eğer halojenli bir bileşik yada hidrojen peroksid mevcutsa oksijen veren uygun nükleofilik akseptör ile reaksiyon veren hipohalöz aside halojenürlerin hidrojen

peroksid varlığında oksidasyonlarını gerçekleştirmektedir (Bring vd., 2000).

Vanadyum haloperoksidazlar kabiliyetlerine göre sadece iyodürü okside eden vanadyum iroduperoksidazlar, bromürü okside eden bromoperaksidazlar şeklinde adlandırılmaktadırlar.

Vanadyum kloroperoksidaz bromür ve iyodür etkisi ile klorürün oksidasyonuna aracılık etmektedir. Vanadyum haloperoksidazların aktif bölgesi vanadat ve kataliz esnasında en yüksek oksidasyon safhasında vanadyum (V) kalıntılarını içeren vanadyum metali ile kuşatılmıştır. Son zamanlarda vanadyum haloperoksidazların hidrojen peroksid varlığında sülfokside uygun organik sülfidlerin oksidasyonuna aracılık ettiği ifade edilmektedir (Bring vd., 2000).

Diğer bir peroksidaz grubu aktif bölgesinde prostetik grup olarak hem grubu içermekte, sadece halojen sülfidlerin değil farklı organik birleşiklerin oksidasyonlarında katalizlemektedir (Bring vd., 2000). Horseradish peroksidaz enzimi kimyasal , çevresel ve biyoteknolojik sanayilerde çok yönlü bir enzimdir. Enzimin aromatik bileşenleri (fenoller, bifenoller) hidrojen peroksid varlığında giderdiği ve endüstriyel azo boyalarının degradasyonunun ve çöktürülmelerini gerçekleştirdiği bilinmektedir.

2.2.2 Atık Sularda Mikroorganizma Etkisi ile Boya Giderme

Boya ve renkli maddeler tekstil, gıda ve ev eşyası üreten endüstrilerde kullanılmaktadır. Bu sanayilerde toksik ve zararlı boyaların serbest hale geçmesi insanlık için büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Boyaların sudaki yaşam için öldürücü olduğu ve arzu edilmeyen renkler oluşturduğu bilinmektedir.

Tekstil, deri, gıda, boya, kozmetik ve kağıt sanayilerinde boyalar önemli kirleticilerdir. Boyaların fazla miktarda üretilmesi ve yaygın kullanımları renkli atıklar oluşturmaktadır.

Kimyasalların mikrobiyal kütlelerde birikimleri ya da artışları biyosorpsiyon olarak adlandırılmaktadır. Mikroorganizmaların boyalar için adsorbent olarak kullanılması boyaların detoksifikasyonları açısından alternatif oluşturmaktadır. Mikroorganizmaların hücre duvarları kitin, lipit, aminoasit ve diğer selüloz bileşiklerini içermektedir. Bunlar reaktif boyaların pasif olarak giderilmesini sağlamaktadır.

2.2.3 Atık Sularda Boya (Renk) Gidermede Kullanılan Diğer Yöntemler

Boya (renk) giderilmesinde kullanılan yeni bir sorbent ekstraselüler polimerik madde (EPS Proteus mirrukilostur) dir. EPS PbO₂ ve Ni ile kompleks oluşturmaktadır. Anaerobik çamurla

oluşan sülfat indirgeyen bakterilerin altındaki Cu^{2+} nın uzaklaştırılmasında etkilidir.

pH' 10 da MoO_4^{2-} ve WO_4^{2-} ile katalizlenen H_2O_2 ile metil oranjin renginin giderilmesi kuvvetlidir. Katalizlenen her iki reaksiyon daha kompleks bir peroksidin bağlanmasıyla boya ve katalizör konsantrasyonlarına karşı ilk sıradadır. Boya (renk) giderme 2 kısımdan oluşur serbest radikalle ilgisi olmayan metal katalizi ve peroksomolibdat ile peroksotungstat sistemleri tarafından oluşan sinlet oksijen etkisi.

Farklı endüstrilerin boya atıkları çevre için tehdit oluşturmaktadır. Bunların bir kısmı karsinojenik ve mutajenik olduklarından atık sudan giderilmeleri zorunludur. Bir takım biyolojik ve fiziksel yöntemler boyaların arıtılmaları maksadıyla, atık sular için yapılan denemelerde kullanılmaktadır. Bunlar anaerobik denemeler, koagülasyon, flokulasyon, oksidasyon, ozonlama, fotokatalitik oksidasyon, membran ile ayırma ve adsorpsiyondur .

Anaerobik-aerobik denemeler, anaerobik katkı içerdiğinden bunların giderilmesi gerekmektedir. Bu boya atık suları çok yüksek konsantrasyonda ışığı kırma özelliği gösteren organik bileşikler içermektedir ve oldukça renklidir (Al – Momani et al., 2002).

Fotokatalitik yöntem, antrakinin ve fitalosiyano azo boyalarının immobilize haldeki titanyum oksid ile muamele edilmesi işlemidir. Dielektrik bariyerini kaldıran (DBD) sistemi ise, azo boyar madde Oranj II nin degradasyonunda da kullanılabilen elektrolardan biridir. Sistemde atık su denemelerinde yararlanılan DBD, ozon ve UV ışığı oluşturarak etkili olmaktadır. Bu sistem ile renkleri gidermede, boya molekülündeki benzen ve naftalen halkaları tesire maruz kalır.

Çevre uygulamalarında elektrik boşaltan plazmalarda, sonuçta ozon ve hidroksil radikali gibi kuvvetli oksidanlar oluşmaktadır. DBD sistemi suya gömülü 2 elektrodlu “pulsed corona discharged” reaktörü içermektedir. Doğrudan doğruya suyun havalandırılması ile membran oluşmaktadır. Bir elektrodu suya gömülü diğeri su yüzeyindedir. Diğer dielektrik kaplı elektrod su yüzeyindeki suda gömülü DBD reaktörü ve su yüzeyi ile dielektrik materyal arasında gaz fazında plazma oluşmaktadır . Bu sistemler fenol ve türevlerini içeren farklı organik kirleticilere, poliklorlanmış bifenil, organik boya anilin ve antrakinona uygulanmaktadır.

Fazla elektriği boşaltan plazma üzerindeki havaya ek olarak, en çok ozon bulunmaktadır . Su fazında oluşan hidrojen peroksid, hidroksil ve hidrojen peroksidin en az miktarlarına karşın gaz fazında oluşan ozon etkilidir. Ozon sudaki kontaminantların giderilmesinde yararlıdır. Su

ve gaz fazı arasındaki ara yüzeyin artışı önemlidir, ki ara yüzeyi arttırmanın bir yolu da kabarcık oluşumuyla gaz fazının dağılımıdır. Ozon sudaki kontaminantları iki türlü uzaklaştırmaktadır. Gaz ve çözülen ozon kabarcık yüzeyi ve gaz-sıvı yüzeyi arasındaki kontaminantlarla doğrudan etkileşir. Ozon yüksek oksidasyon potansiyeli olan kontaminantla hızlı reaksiyon veren hidroksil radikaline ayrışır.

Boya (renk) gidermede terz osmoz (RO) ve nanofiltrasyon (NF) metodları da kullanılmaktadır. NF mebranı düşük molekül ağırlıklı (200-1000 g / mol) organik bileşikleri ayırmaktadır. NF atık suda RO ile çok yüksek basınç uygulanarak renk gidermede etkilidir.

Adsorpsiyon ile sudan organik maddeleri uzaklaştırılması yapılmaktadır. Aktif karbon organik ve inorganik kirleticileri uzaklaştırmada etkilidir. Dezavantajı, pahalı bir madde olmasıdır. Talaş daha ucuz olması nedeni ile tercih edilmektedir. Silika partikülleri silanol grupları içeren hidrolik yüzeylere sahiptir. Gruplar zayıf asidik ve çok reaktiftir. Silikanın modifikasyonu yüzeyinin kimyasal doğası ve özelliklerini ifade etmektedir. Silika yüzeyine önceden yapışan bileşikler yüzeyin hidrofil değişimini sağlamakta ve organofilik film oluşturmaktadır.

Boyanın silika yüzeyinde adsorpsiyonu aminosilan ile modifikasyonu sonucudur. Silan yüzeye silan zinciri ile bağlanmak için boya çözeltilisi ile reaksiyona girmektedir. Bu şekilde boyanın içerdiği pikment, hidrojen ya da kovalent bağlarla bağlanmaktadır. Bu şekilde bağlı boya solventten desorbe edilmemektedir.

Azoboyalar kromoferik bağlanmalarına karşın renksiz aromatik aminlere indirgenmektedir. Kendi boyları daha toksik olan aromatik aminler oksidatif reaksiyonlara eğilimlidir. Bu aromatik aminler aerobik bozunabilirler. Kalan kısım ise otooksidasyonla ürün oluşturmakta, ki bu ürünler de polimerizasyonla uzaklaştırılmaktadır. Çevreye boşaltılan azo boyların aromatik aminleri indirgenmektedir. Bu ürün dönüşümünde oksijen kullanılmamakta ve çevrede toksik etkilere yol açmaktadır. Tekstil fabrikalarında ardışık olarak gerçekleşen anaerobik ve aerobik denemeler atık suyun toksik etkisini azaltmaktadır (Gültekin ve İnce, 2006).

Hidrojen iyonları ilave donörden oluşan elektronlarla hidroksil radikaline oksidasyonuna karşın indirgenmektedir. Metal komplekslere kıyasla organik boylar suyun fotoredüksiyonu için nadiren hassastır. Boyalar polikromatik ışığın neden olduğu fotopolimerizasyon için başlatıcı sistemlerdir. Uygun foto başlatıcı, iki farklı başlatıcı sistemi içermektedir. Görünür ışığı adsorplayan ve ayrıca sadece UV ışığa hassas olan tipik boya sistemlerinin

polimerizasyonlarını başlatacak bir başlatıcı gerekmektedir. Aminler farklı oksidasyon potansiyellerinden ötürü indirgeyici olmaya uygundur.

Miseller membran sistemleridir. Organik bileşiklerin sudaki çözünürlükleri miselle ilgili pseudo fazda, uygun reaksiyonlar ile değiştirilmektedir. Böylece boyanın miseldeki çözünürlüğü ve buna bağlı olarak misel agregatının fotoaktivasyonu değişmektedir. Misel yüzeyi ilk gruplara bağlı olarak katyonik, anyonik ve noniyonik olabilir. Kuvvetli elektrostatik etkileşimin reaksiyon hızını değiştirdiği bilinmektedir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMA

3.1 Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

3.1.1 Kullanılan Cihazlar

Kaba terazi	: Precise BJ 6100D
Hassas terazi	: Precise XB 220A
Manyetik karıştırıcı	: Heidolph MR 3001
Vorteks	: Heidolph Type REAX top
Su banyosu	: GFL 1086
Soğutmalı santrifüj	: ThermoIEC (Micromax RF) Model 230
Liyofilizatör	: Telstar Cryodos
Saflaştırılan su cihazı	: Millipore F4SN77678
pH metre cihazı	: Inolab
HPLC sistemi	: Shimadzu Program Class VP.
Protein ayırıştırma cihazı	: Model 2110 fraction collector
UV VIS Spektrofotometre	: Model UV-1700 Pharmaspec SHIMADZU
Ultrafiltrasyon Sistemi	: Millipore Stirred Ultrafiltration Cell
FTIR	: Perkin Elmer
LC-MS	: Shimadzu

3.1.2 Kullanılan Malzemeler

- Otomatik pipet : Finnpiette 0-50 µl, 100-1000 µl,
- Beher : 10 mL, 50 mL, 100 mL, 500 mL, 1 L, 2 L, 4 L
- Erlen
- Penisilin şişeleri
- Eppendorf tüpleri

3.1.3 Kullanılan UV-Vis Spektrofotometresinin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri

Optik Sistem	: Tek Monokromatör
Detektör	: Silikon fotodiod
Işık kaynağı	: Döteryum lamba : 190 to 350 nm Halojen Lamba : 390 to 1100 nm

3.1.4 Kullanılan Protein Saflaştırma Sisteminin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri

U.V. monitör	: Biorad Econo (model EM-1)
Fraksiyon toplayıcı	: Biorad model 2110 fraction collector
Kayıt edici	: Biorad chart recorder model 1327
Pompa	: Biorad Econo pump (model EP-1)

3.1.5 Kullanılan Fourier Transform Infrared Spektrometre Cihazının Teçhizat ve Çalışma Parametreleri

FT-IR : Perkin Elmer

Universal ATR Sampling Accessory : Perkin Elmer

3.2 Kullanılan Kimyasallar

Kimyasal Maddeler	Üretici Firma	Lot No.
Naftol Blue Black	Fluka	70490
Coomassie Brilliant Blue R-250	Fluka	27816
Dializ Selüloz mebranı	Sigma	D9777-BULK
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	Riedel-de Haen	4269
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	Fluka	71647
NaCl	Riedel-de Haen	13423
Asetik asit	Fluka	45754
NaOH	Riedel-de Haen	6203
NaIO ₄	Fluka	71862
HCl	Merck	1.00314.2500
NaBH ₄	Merck	S3912873 403

3.3 HRP Enziminin Saflaştırılması

Satın alınan Horseradish peroksidazın protein içeriği %50 olarak (A₂₈₀/1,34) tayin edildi. Boya giderme deneylerinde ve Enzim-Dekstran konjugatı sentezinde kullanılmak üzere, satın alınan HRP saflaştırıldı.

3.3.1 Ticari HRP Enziminin Affinite Kromatografisi ile Saflaştırılması

Asetat tamponunda (pH: 6) satın alınan HRP'nin, protein konsantrasyonu 8 mg/ml olacak şekilde çözeltisi hazırlandı. Bio-Rad marka protein saflaştırma sisteminde 1,5cm x 30cm kolon ve dolgu maddesi olarak 'Concanavalin A-Sepharose 4B' kullanılarak affinite kromatografisi gerçekleştirildi. Akma hızı 1,5 ml/dakika olacak şekilde ayarlandı. Kolon önce 0,1M pH 6.0 asetat tamponu (0,1M NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MnCl₂ bulunduran) ile yıkandı.

Hazırlanan HRP çözeltisinden 1ml kolona verildi. 30 dakika bekletildikten sonra safsızlıklar 0,1M pH 6.0 asetat tamponu ile her bir tüpte 40 damla olacak şekilde fraksiyonlar halinde toplandı. Bir süre aynı tampon ile kolonun yıkanmasına devam edildi. Eluasyon işlemi UV monitör vasıtasıyla izlendi. Alınan fraksiyonların 280 ve 403 nm'deki absorbanları okundu. Con A ya bağlanmış olan HRP' yi elüe etmek için, 0,1M metil mannopiranosid (MMP) içeren 0,1M pH 6.0 asetat tamponu kolona verildi ve fraksiyonlar aynı şekilde tüplere toplandı. Fraksiyonların A_{280} ve A_{403} değerleri okundu (Brattain vd., 1976). Saflaştırılan HRP için RZ değeri A_{280} / A_{403} hesaplandı. Satın alınan HRP'nin RZ değeri 0,85, saflaştırılan enzimin RZ değeri 2,1 dolayında hesaplandı.

MMP içeren asetat tamponu ile alınan fraksiyonlardan RZ değeri 1,9-2,3 olan örnekler bir havuzda toplandı. Havuz çözeltisinde bulunan enzim ultrafiltrasyon cihazında 2 kez destile su ile ve 2 kez de 0,01M PBS (pH 7) ile yıkandı ve konsantre edildi.

3.3.2 Dekstran Aldehid Türevinin Sentezi

Kullanılan Çözeltiler

- 1) 3,33g Dekstran 30ml destile suda çözüldü.
- 2) 8,00g NaIO_4 70ml destile suda çözüldü.

Deneyin Yapılışı

- 1) Dekstran çözeltisinin üzerine NaIO_4 yavaş yavaş karıştırılarak eklendi.
- 2) Bu çözelti karanlıkta, oda sıcaklığında 24 saat süreyle karıştırıldı.
- 3) Elde edilen yükseltgenmiş dekstran ile birlikte ortamda bulunan fazla iyonları uzaklaştırmak için ürün 24 saat karanlık ortamda, oda sıcaklığında destile suya karşı diyalize bırakıldı.
- 4) Soğutarak kurutma ile (liyofilizatörde) aldehid grupları bulunduran dekstran elde edildi (Sacco, 1988, Betancor, 2004, Dobrenchenko, 1993).

3.3.3 HRP -Dekstran Konjugatının Sentezi

Dekstranın (75.000 Da) aldehid türevinin karbonil grubu ile proteinin amin grubu arasında kondensasyon reaksiyonu gerçekleşmesi sonucu, bir schiff bazı olan HRP-Dekstran bileşiği sentezlendi.

Toplam 4 mL reaksiyon hacminde konjugasyon reaksiyonu yapıldı. pH 7.0 da 0.1 M sodyum fosfat tamponu kullanıldı. Protein konsantrasyonu $C_{\text{protein}} = 0,1 \text{ mg/ml}$ olacak şekilde saflaştırılıp konsantre edilen enzimden $0,1 \text{ mg/ml} \times 2\text{mL} = 0,2 \text{ mg}$ proteine karşılık gelen hacim alındı. Dekstran konsantrasyonu ise farklı konjugatlar için aşağıda verilen formül ile hesaplandı. Kapaklı şişelerinde protein-polimer (2ml enzim+2ml dekstran) bağlanma reaksiyonunun gerçekleşmesi için 25°C ' da 16 saat bekletildi. Daha sonra, $+4^{\circ}\text{C}$ 'daki 100 mM, pH: 8.5 olan sodyum bikarbonat çözeltisinden pH değerini yükseltmek için 5,6 mL eklendi. Sonra, 9,6 mg (1 mg/mL) sodyum borhidrür (NaBH_4) reaksiyona girmeyen aldehid gruplarını ve amino aldehid bağlarını indirgemek için eklendi (Guisan vd., 1997). Bu çözelti $+4^{\circ}\text{C}$ 'da 15 dk. süreyle karıştırıldıktan sonra tekrar aynı miktarda sodyum borhidrür eklendi. Tekrar 15 dk. $+4^{\circ}\text{C}$ 'da karıştırıldı ve pH 7.0'a ayarlandı (Betancor vd., 2004). Reaksiyon içeriği konsantre edildi. İki defa destile su ve iki defa da fosfat tamponu ile ultrafiltrasyon cihazında yıkandı. Konsantre hale getirildi. Tüm konjugatlarda yaklaşık protein konsantrasyonu 0,08 mg/mL ($A_{280/1,34}$) bulundu.

Hesaplamalar:

Saflaştırılan HRP konsantrasyonu sabit tutularak (0,1mg/ml), dekstran aldehid türevinin farklı konsantrasyonlarda çözeltileri aşağıdaki gibi hesaplandı..

$$\frac{n_{\text{HRP}}}{n_{\text{D}}} = \frac{c_{\text{HRP}} \cdot M_{\text{D}}}{c_{\text{D}} \cdot M_{\text{HRP}}} = 1/10$$

HRP konsantrasyonu= 0,1mg/ml

$M_{\text{D}}=75\ 000 \text{ Da}$

$M_{\text{HRP}}=40\ 000 \text{ Da}$

$n_{\text{HRP}}/n_{\text{D}}= 1/10$

$c_{\text{D}}= 1,84\text{mg/ml}$

3.4 HRP'nin Boyar Madde (Naftol Blue Black)'e Etkisinin İncelenmesi

Hazırlanan 0.1 M Naftol Blue Black (M_w : 616.50 g/mol) ana stok çözelti ve 0.025 M a seyreltildi. Bu çözeltinin 500 kat seyreltilmesi ile elde edilen 0.05mM boya çözeltisinden reaksiyon ortamına 12 μl ilave edildi. "Naftol Blue Black" in reaksiyon ortamında $6 \times 10^{-4} \mu\text{M}$ konsantrasyonda olması sağlandı. HRP enziminin reaksiyon konsantrasyonu 0,0033 mg/ml

alındı.

Boyanın giderilmesinde reaksiyonun gerçekleştirilmesi;

1. Farklı pH' larda Tampon çözelti 3ml' lik kuvartz küvete alındı.
2. Boya "Naftol Blue Black" tampona ilave edildi.
3. HRP enzimi veya konjugatı küvete ilave edildi.
4. 8 µl % 3' lük hidrojen peroksidin (H₂O₂) ilavesi ile reaksiyon başlatıldı.
5. Reaksiyonun ilk 5 dakikasında 1 dakika ara ile, devamında 5 dakika ara ile UV-VIS spektrum alınarak HRP enzimi ile boyanın parçalanması izlendi.

Reaksiyon;

- Saf enzim ile,
- Enzim-Dekstran konjugatı ile farklı pH ve sıcaklıklarda gerçekleştirildi.
- Ek olarak, reaksiyon ortamda enzimi denatüre eden Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) varlığında
- Üre varlığında izlendi.

3.4.1 Naftol Blue Black Boyasının Giderilmesinde Ortamda Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) ve Üre Varlığının Etkisi

3.4.1.1 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Etkisi

pH 7.0 fosfat tamponunda, 0,5 mM ve 20mM SDS varlığında reaksiyon gerçekleştirildi. İşlemden saf enzim ve HRP-Dekstran konjugatı kullanıldı.

3.4.1.2 Üre Etkisi

pH 7.0 fosfat tamponunda, 1M üre varlığında reaksiyon gerçekleştirildi. İşlemden saf enzim ve konjugatı kullanıldı.

3.5 HRP'nin Boyar Madde (Coomassie Brilliant Blue)'e Etkisinin İncelenmesi

Hazırlanan 0.0125 M (825.9 g/mol) stok çözeltilerden 600 kat seyreltme ile elde edilen çözelti denemeler için kullanıldı. Bu çözeltilerden 14.5 µl reaksiyon ortamına ilave edildi. Reaksiyon ortamında 3.016×10^{-4} µM Coomassie Brilliant Blue olması sağlandı. HRP enziminin reaksiyon konsantrasyonu 0,0033 mg/ml alındı. Boyanın giderilmesinde reaksiyonun gerçekleştirilmesi yukarıda açıklanan "Naftol Blue Black" uygulamasında olduğu gibi yapıldı.

3.6 Boyar Maddelerin (Naftol Blue Black ve Coomassie Brilliant Blue) ve HRP ile Reaksiyonlarının FT-IR ile İncelenmesi

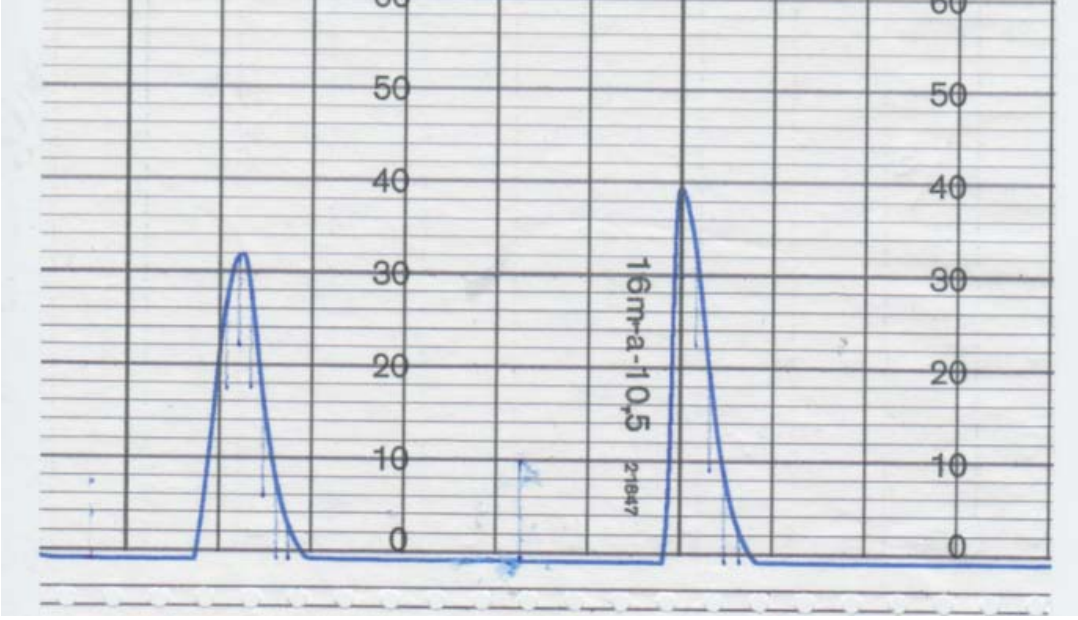
Her bir boyanın, saflaştırılan HRP ve HRP/Dekstran (1/10) konjugatının her bir boyaya etkisinde 45. dakikada oluşan ürünlerin, dekstranın ve dekstran aldehid türevinin katı toz halinde ATR başlığı altında FT-IR spektrumları alındı.

3.7 Boyar Maddelerin (Naftol Blue Black ve Coomassie Brilliant Blue) ve HRP ile Reaksiyonlarının LC-MS ile İncelenmesi

HRP enzimi etkisi ile her iki boyanın parçalanması Shimadzu marka elektrosprey iyonlaştırıcı LC-MS sistemi kullanılarak incelendi. Mobil faz olarak su ve asetonitril kullanıldı ve 0,2 mL/dak. akış hızında çalışıldı. Naphtol blue black boyası için izokratik (%50 asetonitril) mobil faz sistemi kullanılırken, Coomassie brilliant blue boyası için gradient mobil faz sistemi kullanıldı. Ayırma işlemi için Teknokroma Tracer Excel 120 ODS-A 5µm 20x0,21 marka ters faz kolon, analizler sırasında UV-VIS detektörü ve kütle spektrometre detektörü kullanıldı. Naphtol blue black boyası için 617 nm'de, coomassie brilliant blue boyası için 550 nm'de UV-VIS kromatogramları alındı. Kütle spektrumları alınırken elektrosprey iyonlaştırma sisteminde 1,5 mL/dak. akış hızında azot gazı kullanıldı. Naphtol blue black için ESI(-), coomassie brilliant blue için ESI(+) modunda analizler gerçekleştirildi.

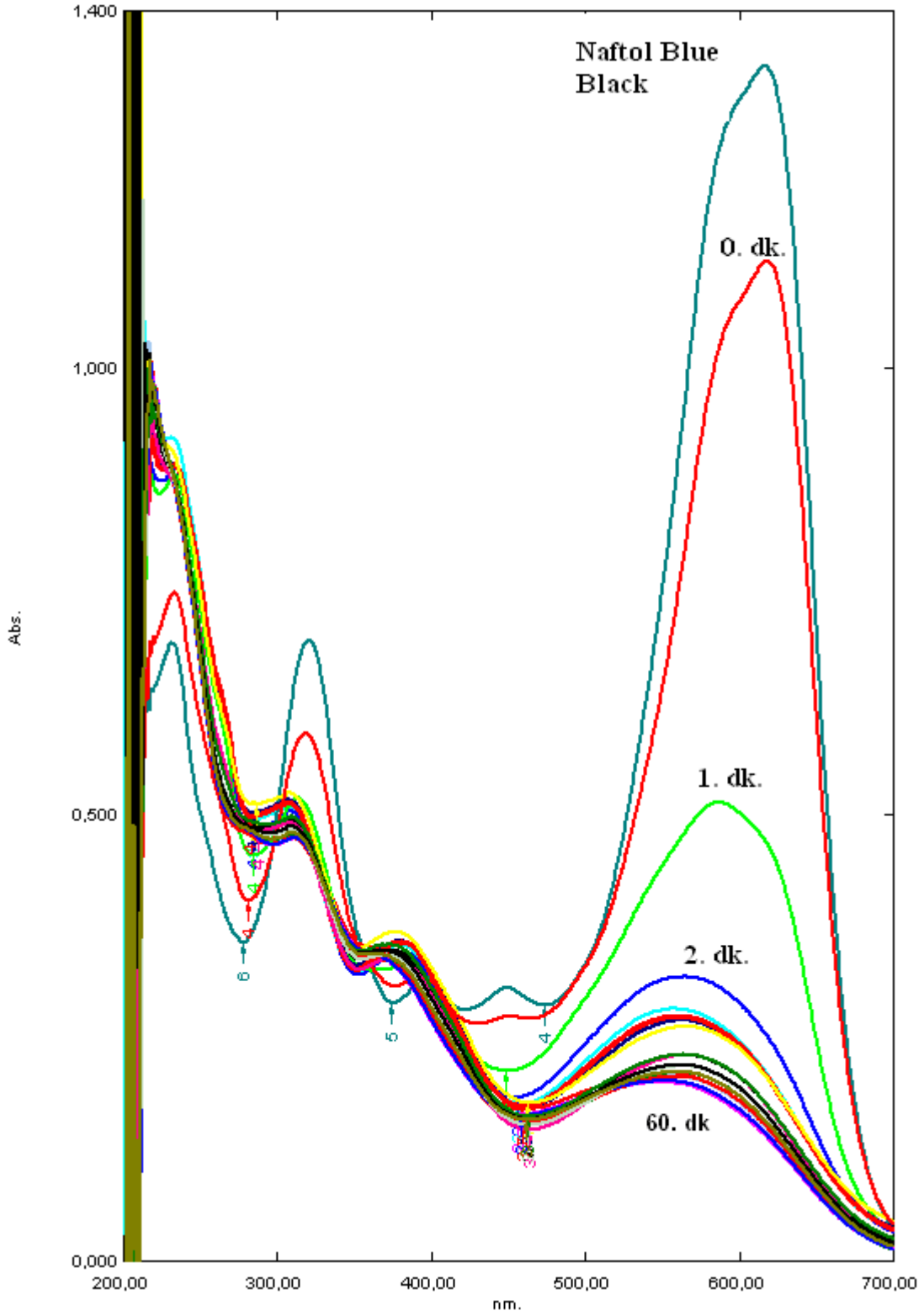
4. DENEY SONUÇLARI

4.1 Satın Alınan HRP nin Saflaştırma İşleminin İzlenmesi

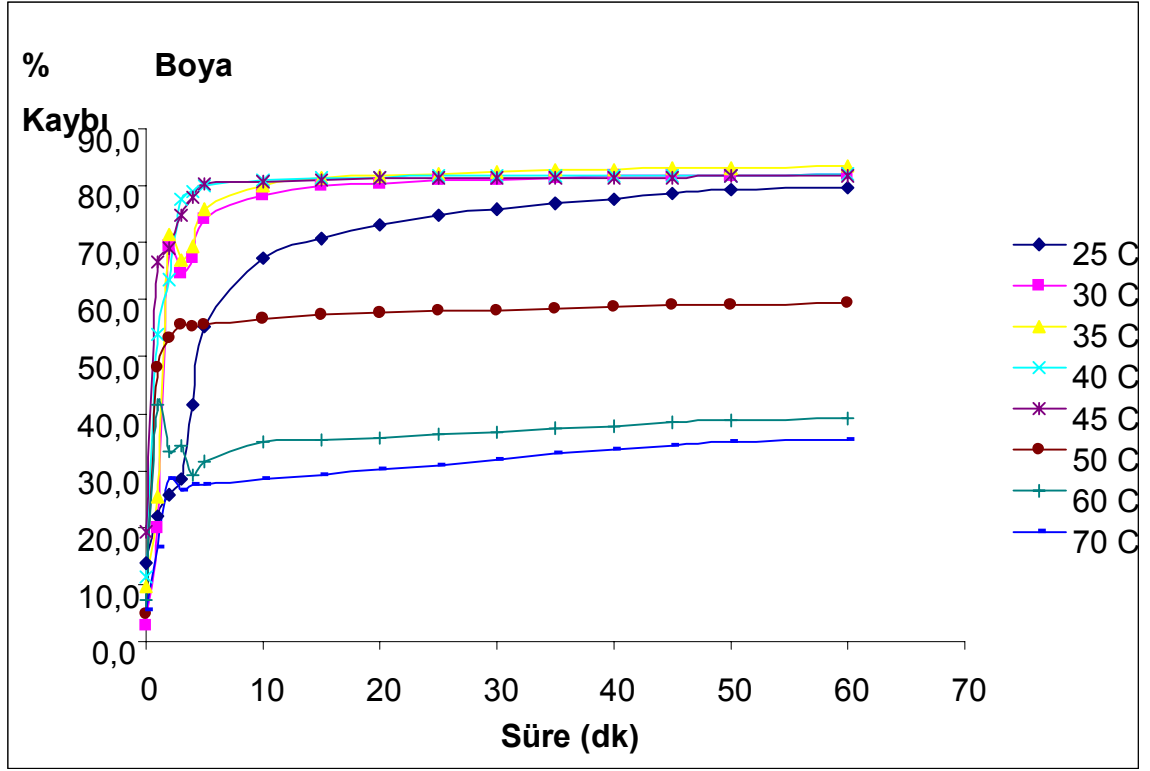


Şekil 4.1 Satın alınan HRP'nin protein saflaştırma sisteminde affinite kolon kullanılarak saflaştırılması sırasında 280nm'de UV dedektör ile alınan kromatogramı (X eksenini tüp no; Y eksenini A₂₈₀).

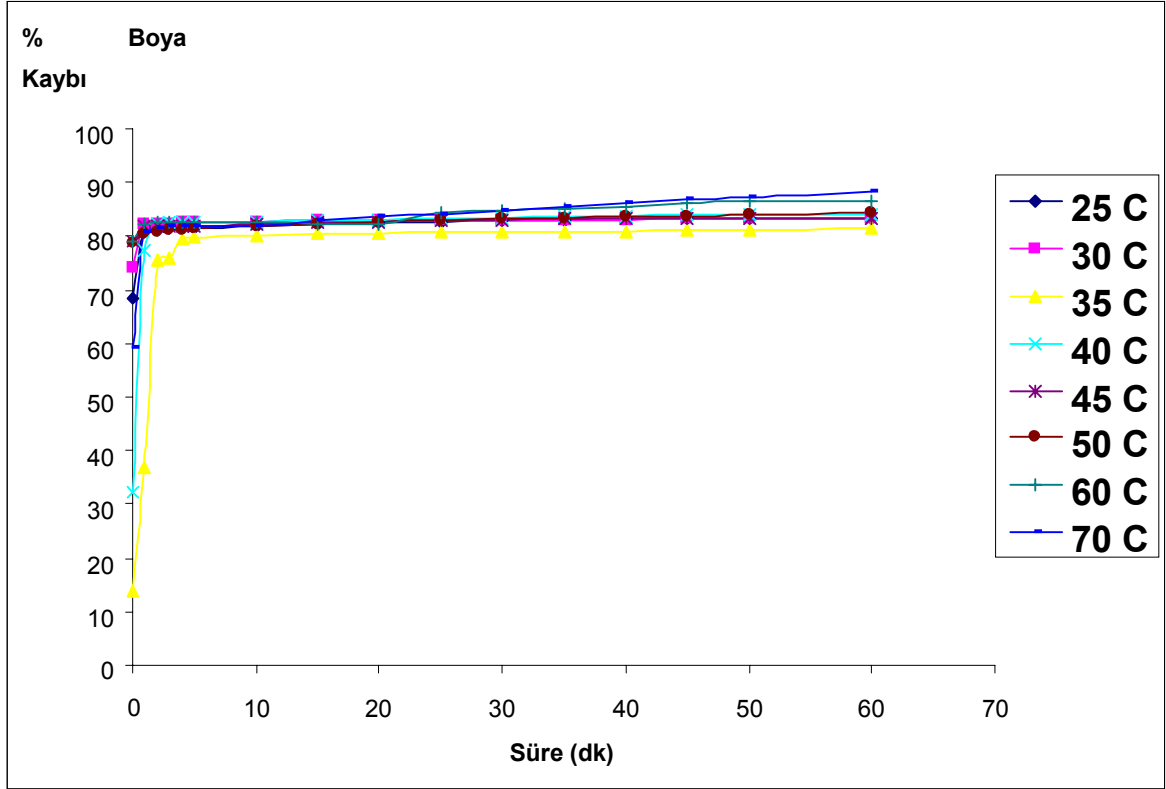
4.2 HRP Enzimi ile pH 3, 4, 5, 6, 7 ve 8' de ve farklı ortam sıcaklıklarında "Naftol Blue Black" Boyar Maddesinin Giderilmesi



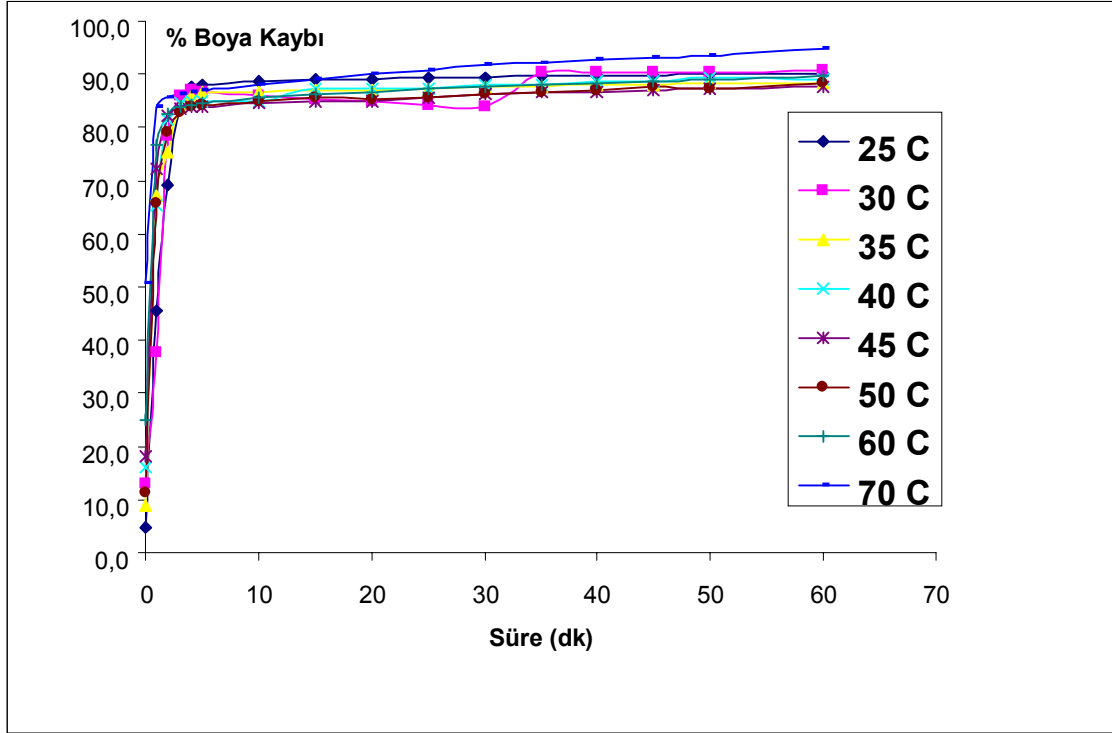
Şekil 4.2 pH 5.0 40 °C' de Naftol Blue Black boyasının saf HRP enzimi ile giderilmesinin UV-VIS (620 nm) ile gözlenmesi



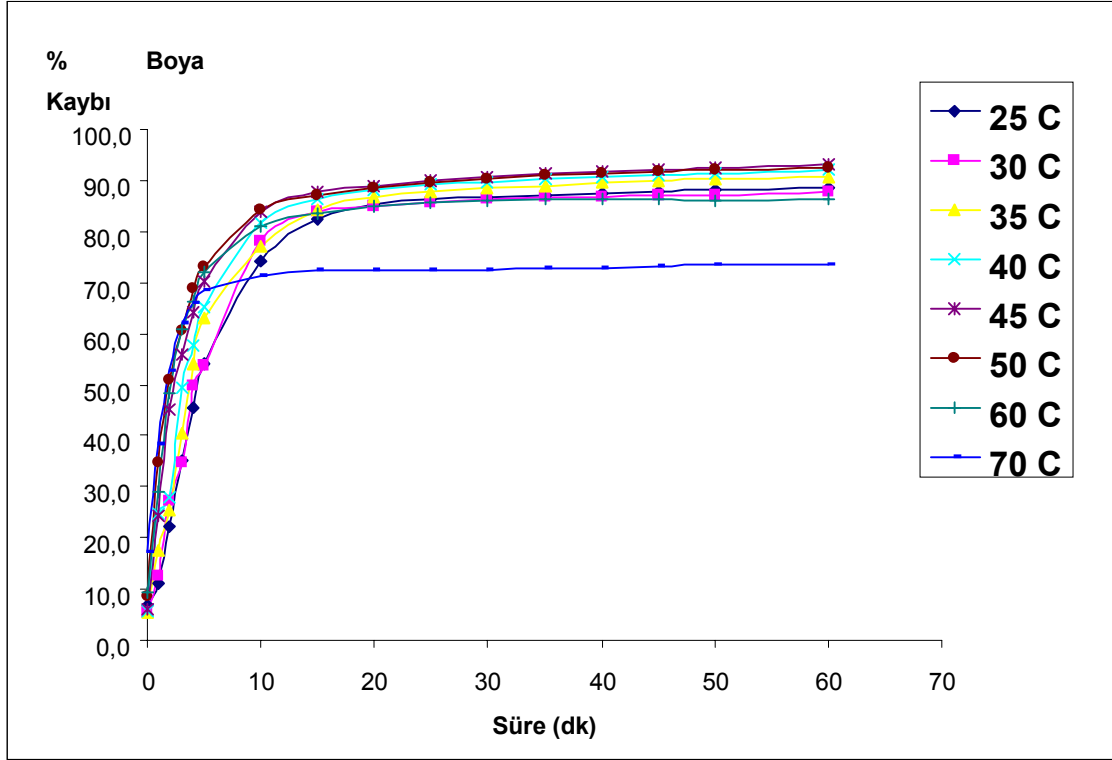
Şekil 4.3 Saf HRP enziminin pH:3.0 asetat tamponunda ve farklı sıcaklıklarda Naftol Black Boyar (NBB) maddesine etkisinde 620 nm' deki % boya kaybı.



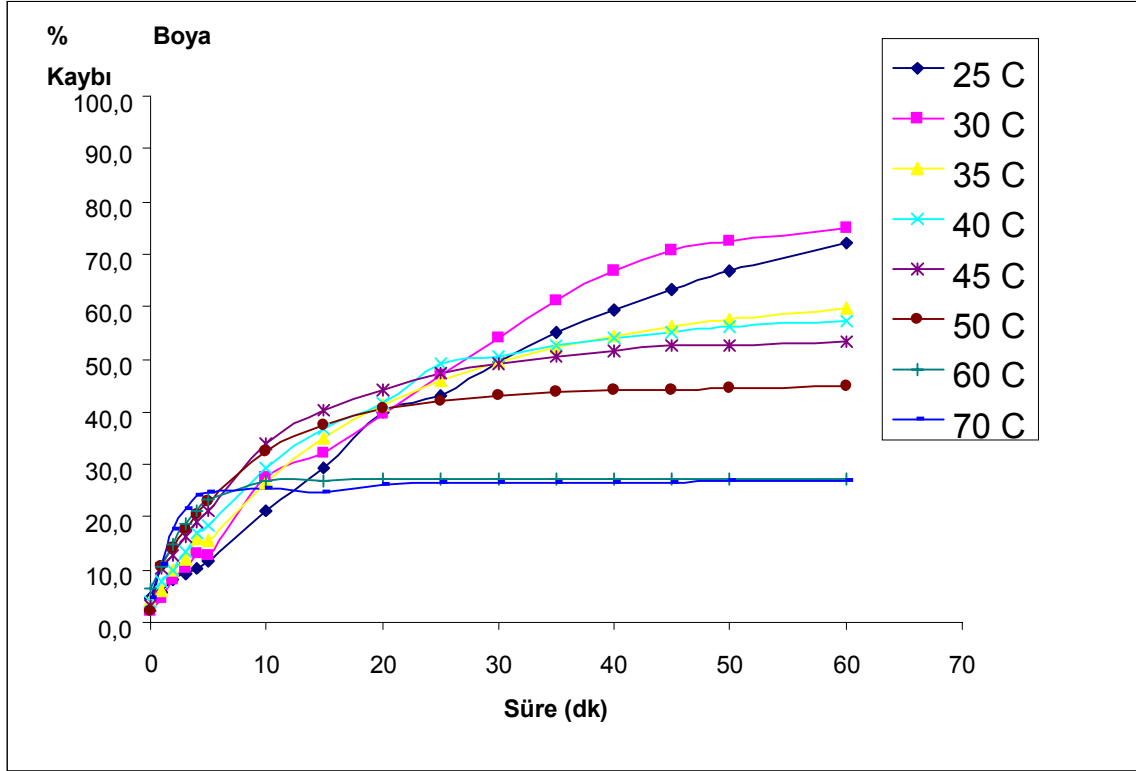
Şekil 4.4 Saf HRP enziminin pH: 4.0 asetat tamponunda ve farklı sıcaklıklarda Naftol Black Boyar (NBB) maddesine etkisinde 620 nm' deki % boya kaybı



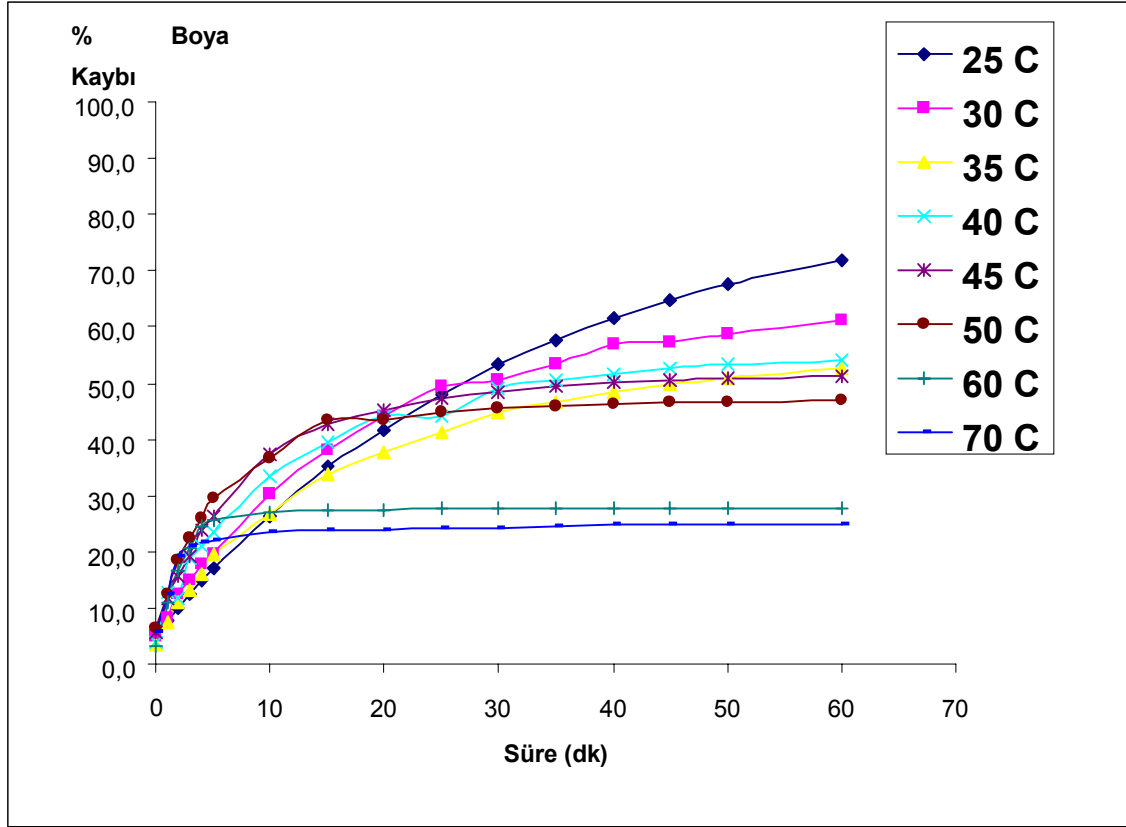
Şekil 4.5 Saf HRP enziminin pH: 5.0 asetat tamponunda ve farklı sıcaklıklarda Naftol Black Boyar (NBB) maddesine etkisinde 620 nm' deki % boya kaybı



Şekil 4.6 Saf HRP enziminin pH: 6.0 fosfat tamponunda ve farklı sıcaklıklarda Naftol Black Boyar (NBB) maddesine etkisinde 620 nm' deki % boya kaybı

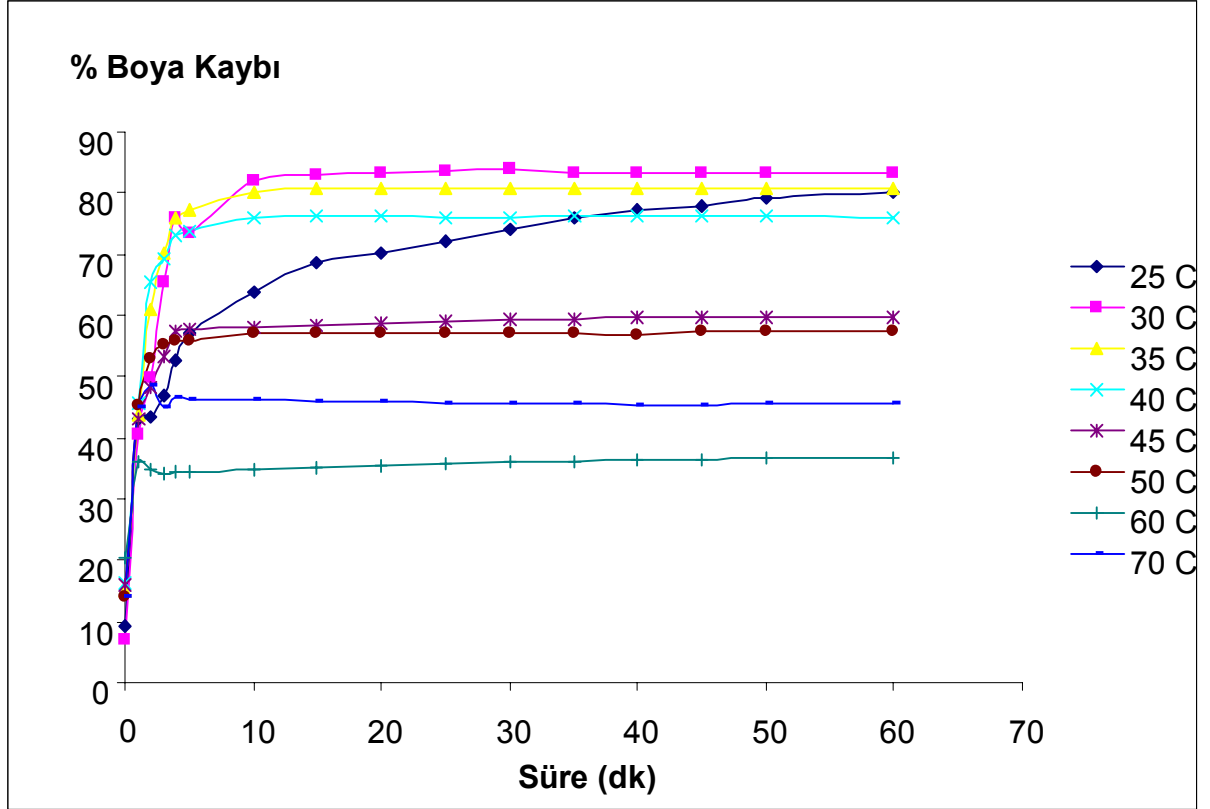


Şekil 4.7 Saf HRP enziminin pH: 7.0 fosfat tamponunda ve farklı sıcaklıklarda Naftol Black Boyar (NBB) maddesine etkisinde 620 nm' deki % boya kaybı

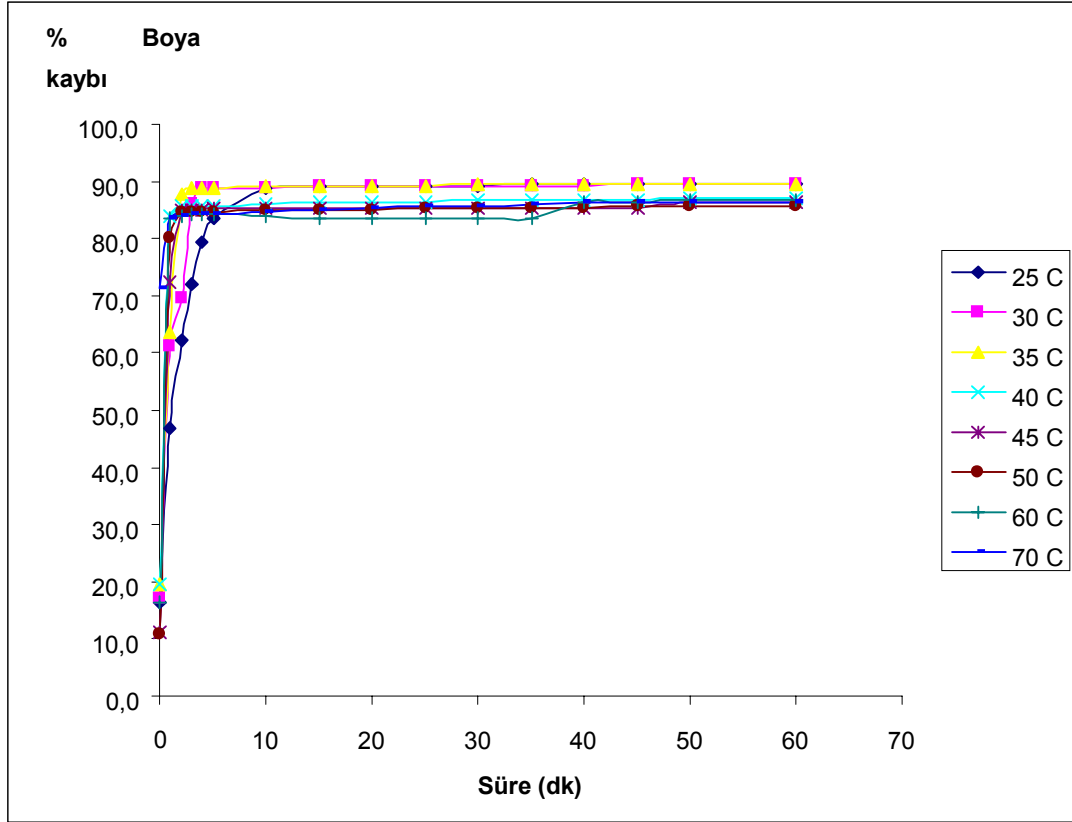


Şekil 4.8 Saf HRP enziminin pH: 8.0 fosfat tamponunda ve farklı sıcaklıklarda Naftol Black Boyar (NBB) maddesine etkisinde 620 nm' deki % boya kaybı

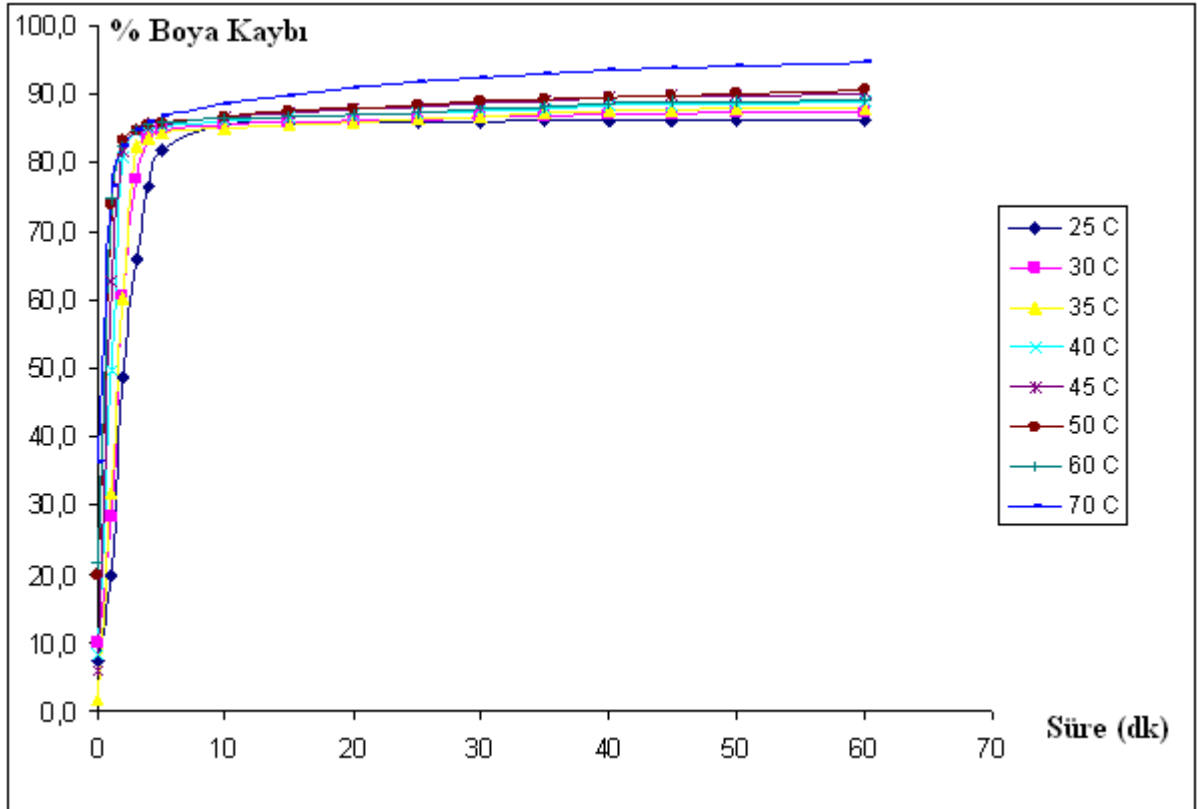
4.3 HRP/Dekstran: 1/10 Konjugatı ile pH 3, 4, 5, 6, 7 ve 8' de ve farklı ortam sıcaklıklarında Naftol Blue Black Boyar Maddesinin Giderilmesi



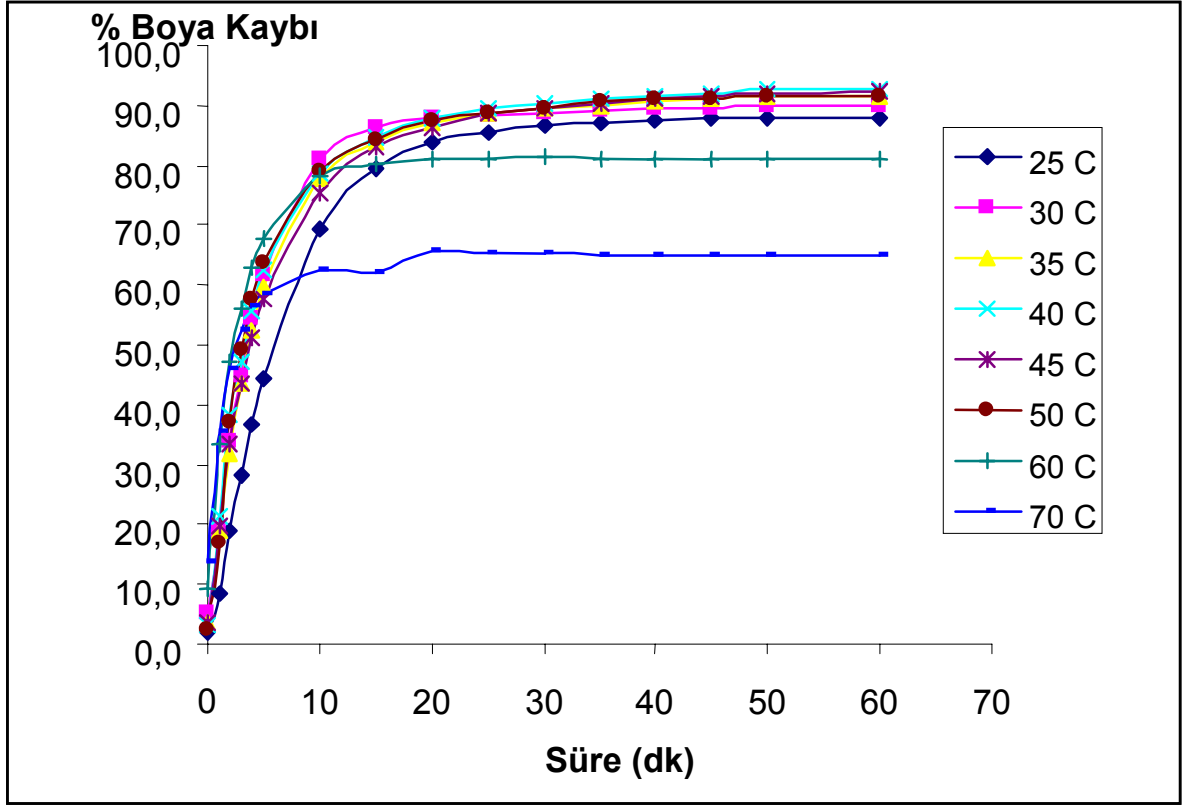
Şekil 4.9 HRP/Dekstran: 1/10 konjugatının pH: 3.0 asetat tamponunda ve farklı sıcaklıklarda Naftol Black Boyar (NBB) maddesine etkisinde 620 nm' deki % boya kaybı



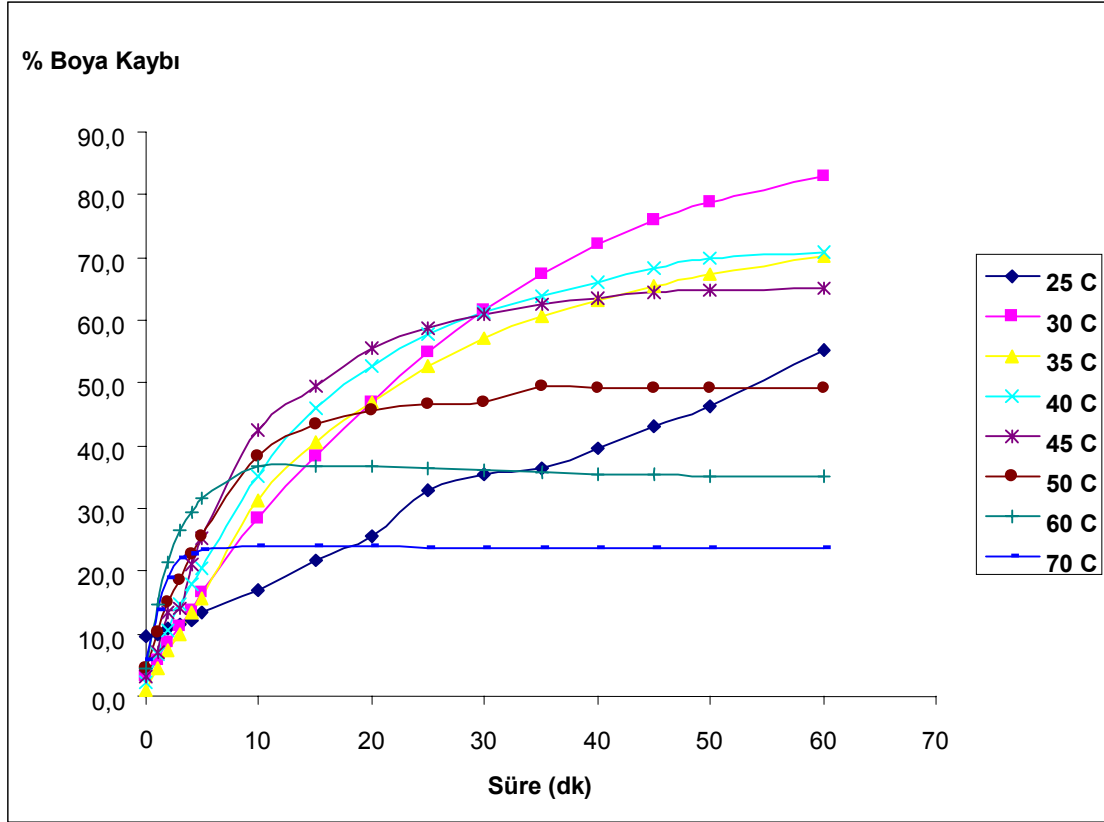
Şekil 4.10 HRP/Dekstran: 1/10 konjugatının pH: 4.0 asetat tamponunda ve farklı sıcaklıklarda Naftol Black Boyar (NBB) maddesine etkisinde 620 nm' deki % boya kaybı



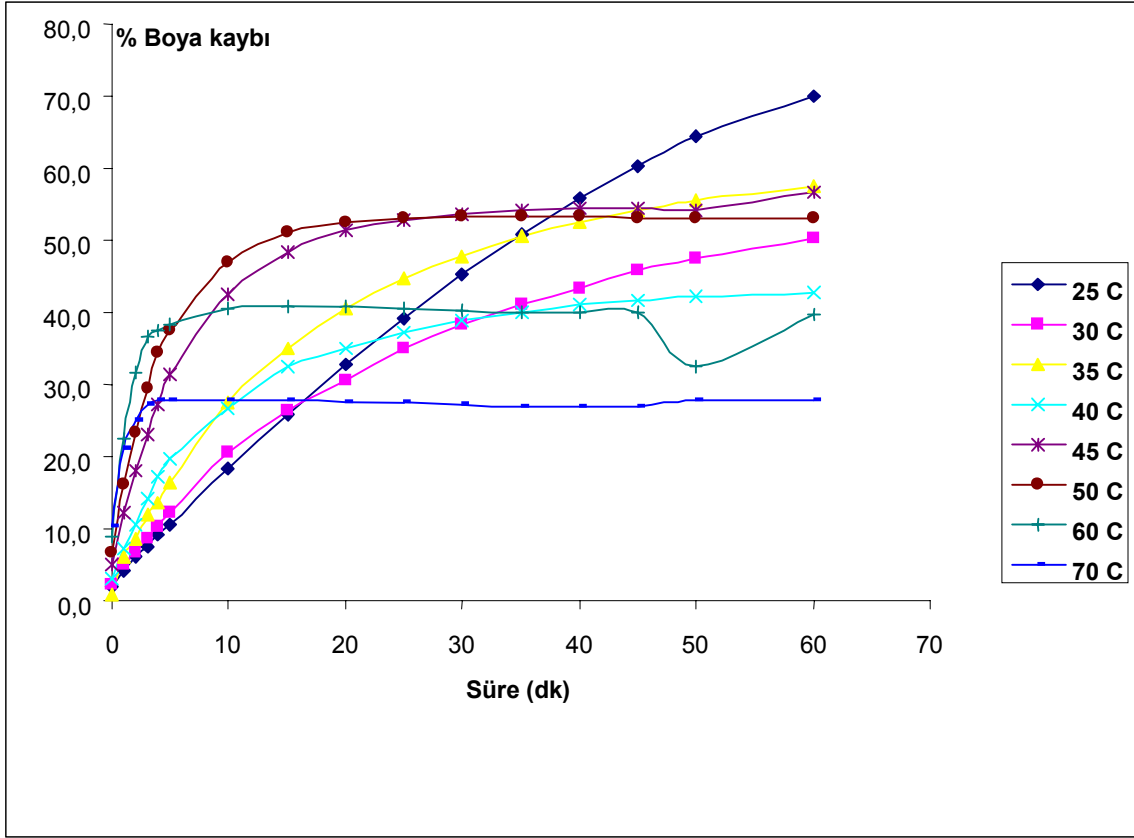
Şekil 4.11 HRP/Dekstran: 1/10 konjugatının pH: 5.0 asetat tamponunda ve farklı sıcaklıklarda Naftol Black Boyar (NBB) maddesine etkisinde 620 nm' deki % boya kaybı



Şekil 4.12 HRP/Dekstran: 1/10 konjugatının pH: 6.0 fosfat tamponunda ve farklı sıcaklıklarda Naftol Black Boyar (NBB) maddesine etkisinde 620 nm' deki % boya kaybı

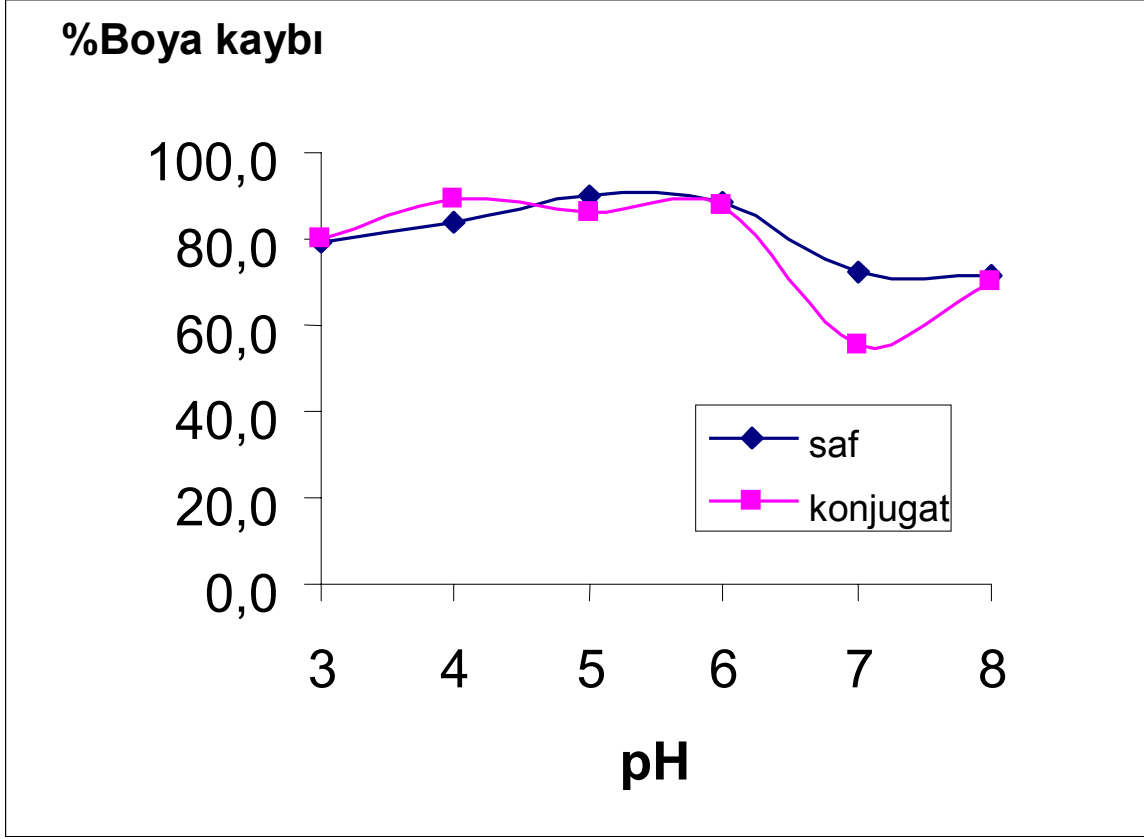


Şekil 4.13 HRP/Dekstran: 1/10 konjugatının pH: 7.0 fosfat tamponunda ve farklı sıcaklıklarda Naftol Black Boyar (NBB) maddesine etkisinde 620 nm' deki % boya kaybı

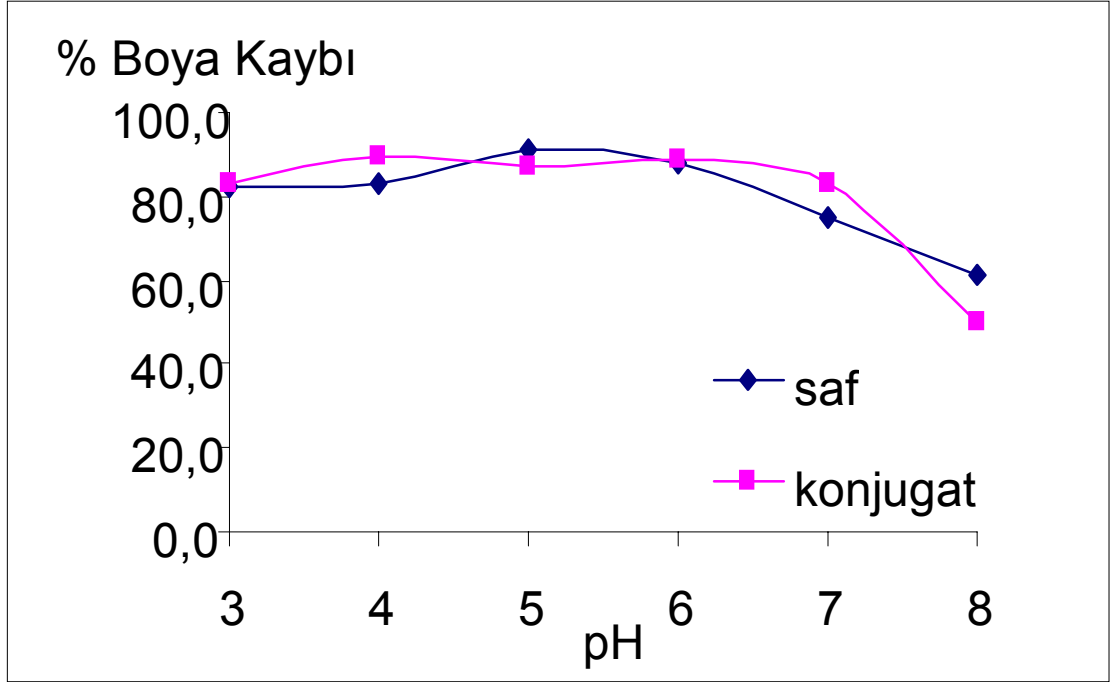


Şekil 4.14 HRP/Dekstran: 1/10 konjugatının pH: 8.0 fosfat tamponunda ve farklı sıcaklıklarda Naftol Black Boyar (NBB) maddesine etkisinde 620 nm' deki % boya kaybı

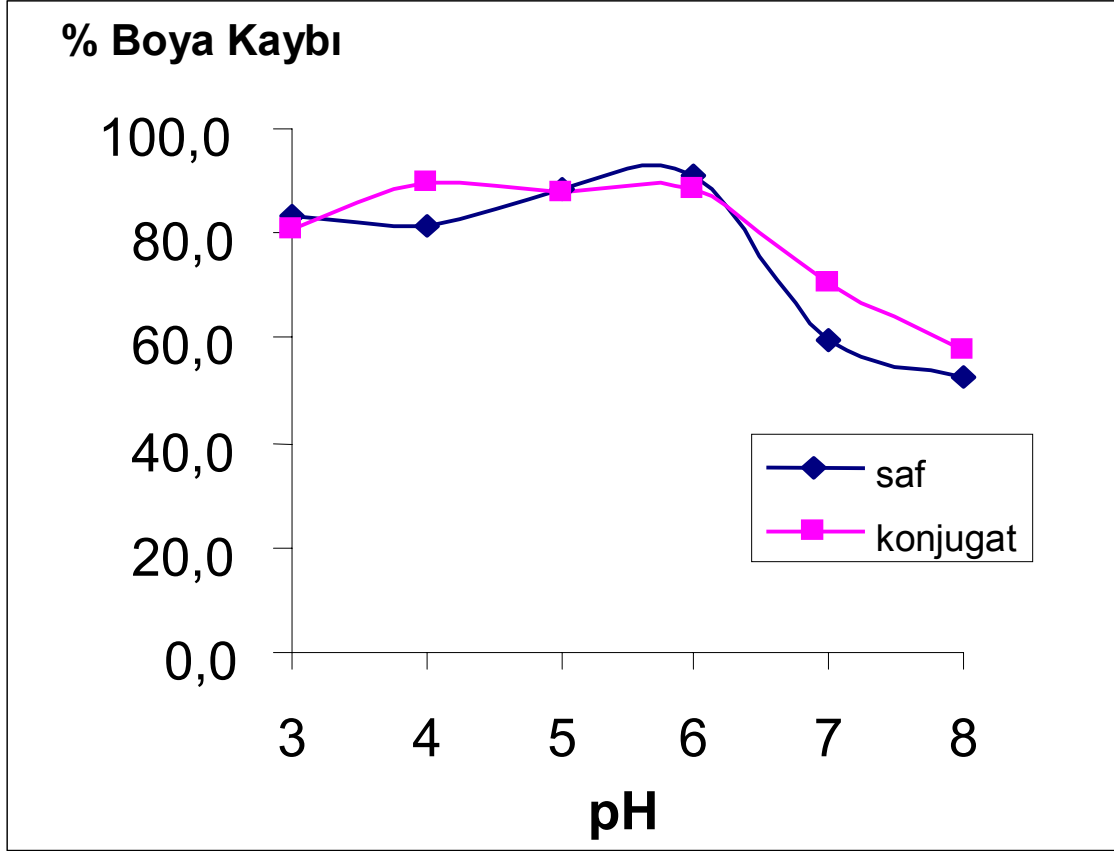
4.4 Farklı pH' larda (pH: 3, 4 5, 6, 7, 8) ve farklı sıcaklıklarda, HRP Enziminin ve Konjugatının Naftol Blue Black Boyar Maddesine Etkisinde 60. dakikada % Boya Kaybı



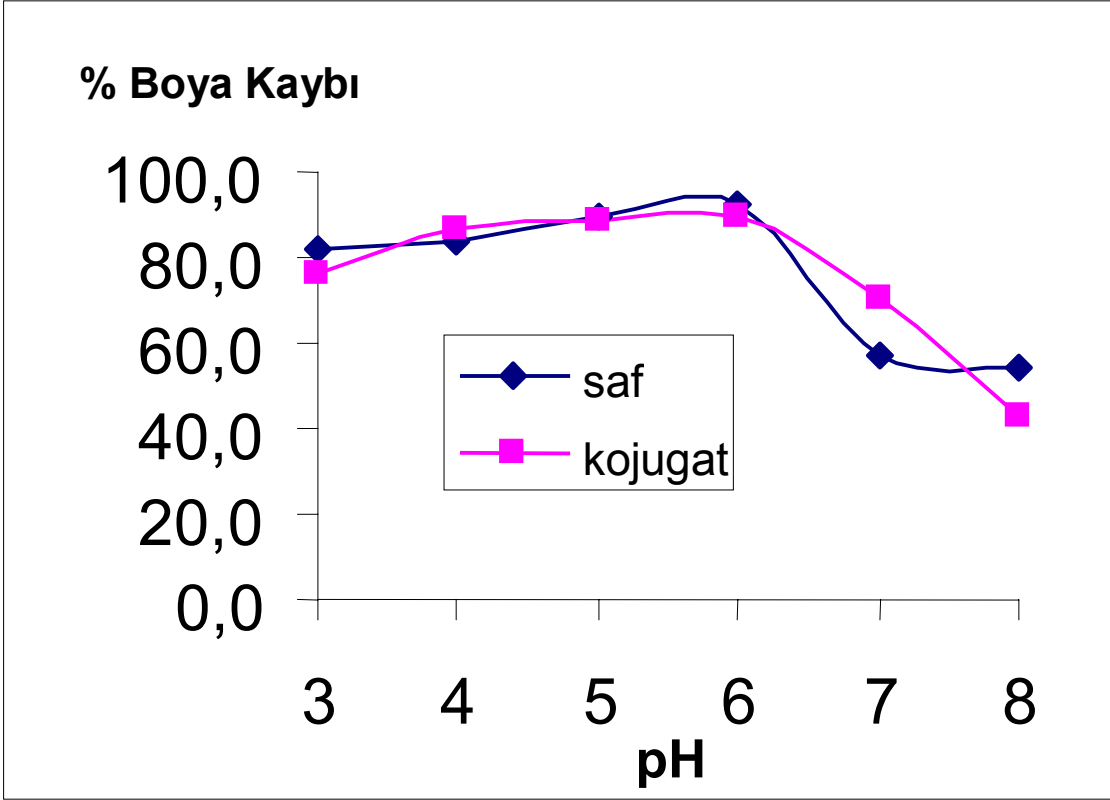
Şekil 4.15 Farklı pH' larda (pH: 3, 4 5, 6, 7, 8), 25°C'da, 60 dakikak sonrasında HRP enziminin ve konjugatının Naftol Blue Black boyar maddesine etkisinde 620 nm' deki % boya kaybı



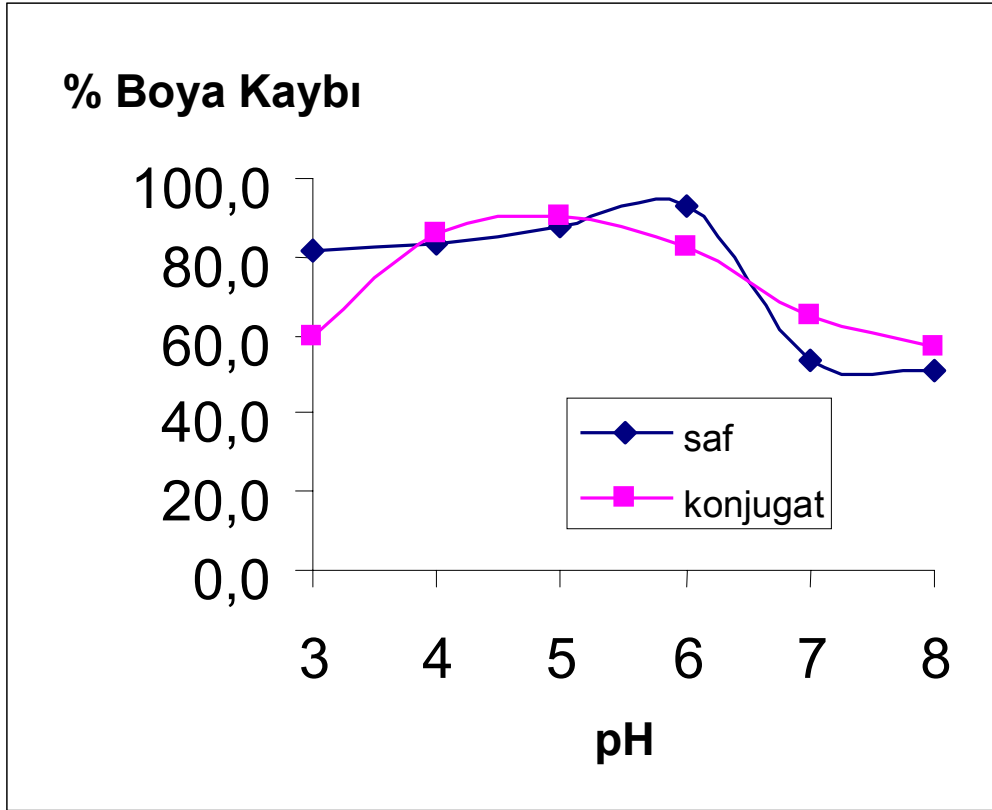
Şekil 4.16 Farklı pH' larda (pH: 3, 4 5, 6, 7, 8), 30°C'da, 60. dakikada HRP enzimi ve konjugatının Naftol Blue Black boyar maddesine etkisinde 620 nm' deki boya % kaybı



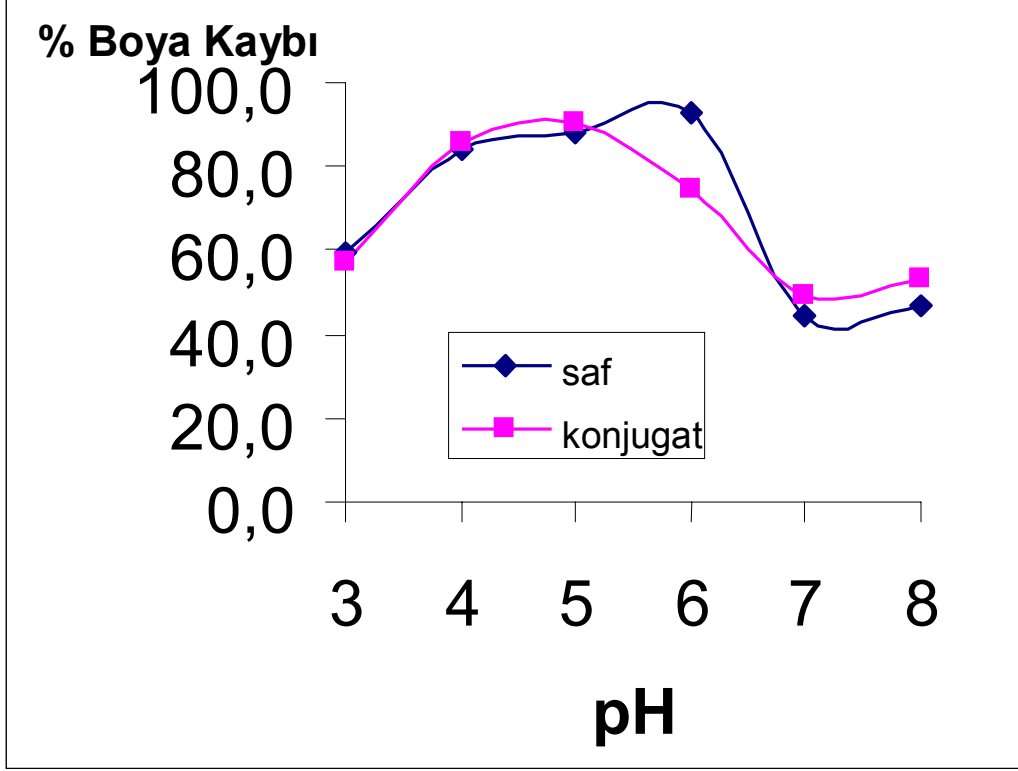
Şekil 4.17 Farklı pH' larda (pH: 3, 4 5, 6, 7, 8) 35 °C' da, 60. dakikada HRP enziminin ve konjugatının Naftol Blue Black boyar maddesine etkisinde 620 nm' deki % boya kaybı.



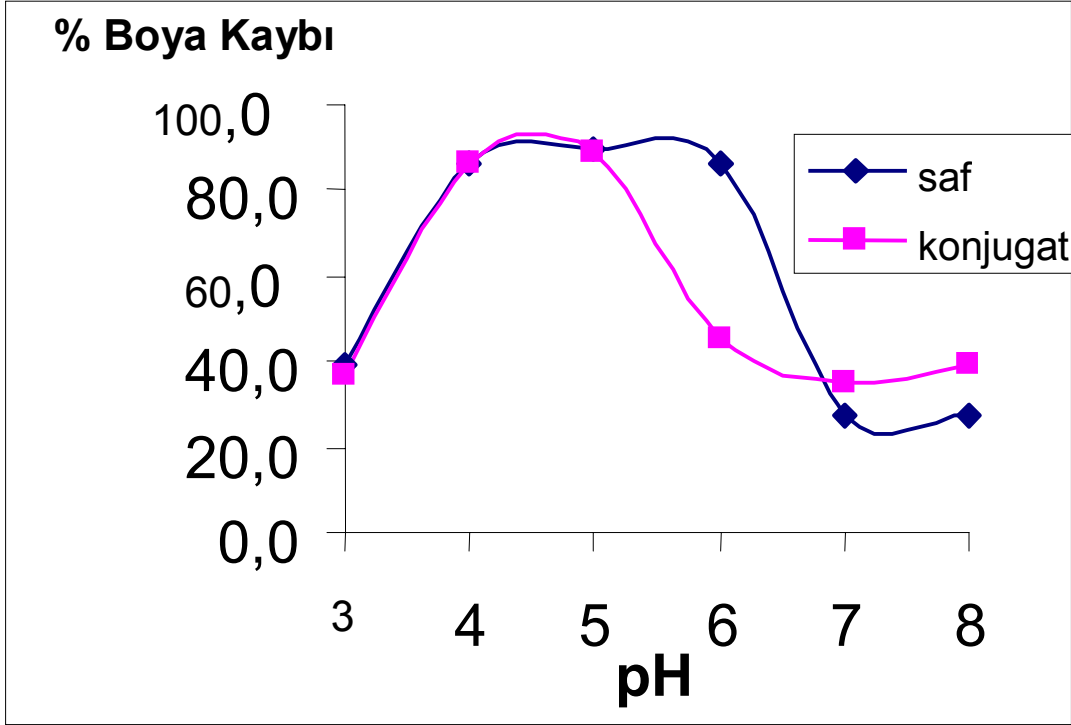
Şekil 4.18 Farklı pH' larda (pH: 3, 4 5, 6, 7, 8) 40 °C'da, 60. dakikada HRP enziminin ve konjugatının boyar maddesine etkisinde 620 nm' deki % boya kaybı.



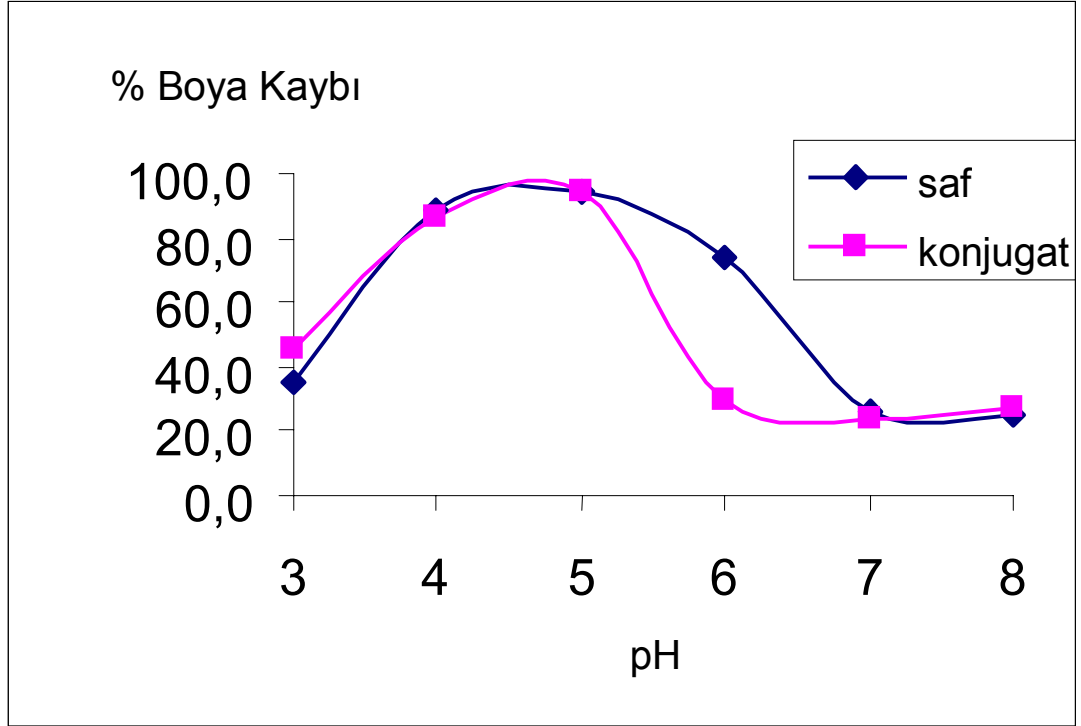
Şekil 4.19 Farklı pH' larda (pH: 3, 4 5, 6, 7, 8) 45 °C' da, 60. dakikada HRP enziminin ve konjugatının Naftol Blue Black boyar maddesine etkisinde 620 nm' deki % boya kaybı.



Şekil 4.20 Farklı pH' larda (pH: 3, 4 5, 6, 7, 8) 50°C'da, 60. dakikada HRP enziminin ve konjugatınınNaftol Blue Black boyar maddesine etkisinde 620 nm' deki % boya kaybı.



Şekil 4.21 Farklı pH' larda (pH: 3, 4 5, 6, 7, 8) 60°C'da, 60. dakikada HRP enziminin ve konjugatının Naftol Blue Black boyar maddesine etkisinde 620 nm' deki % boya kaybı.

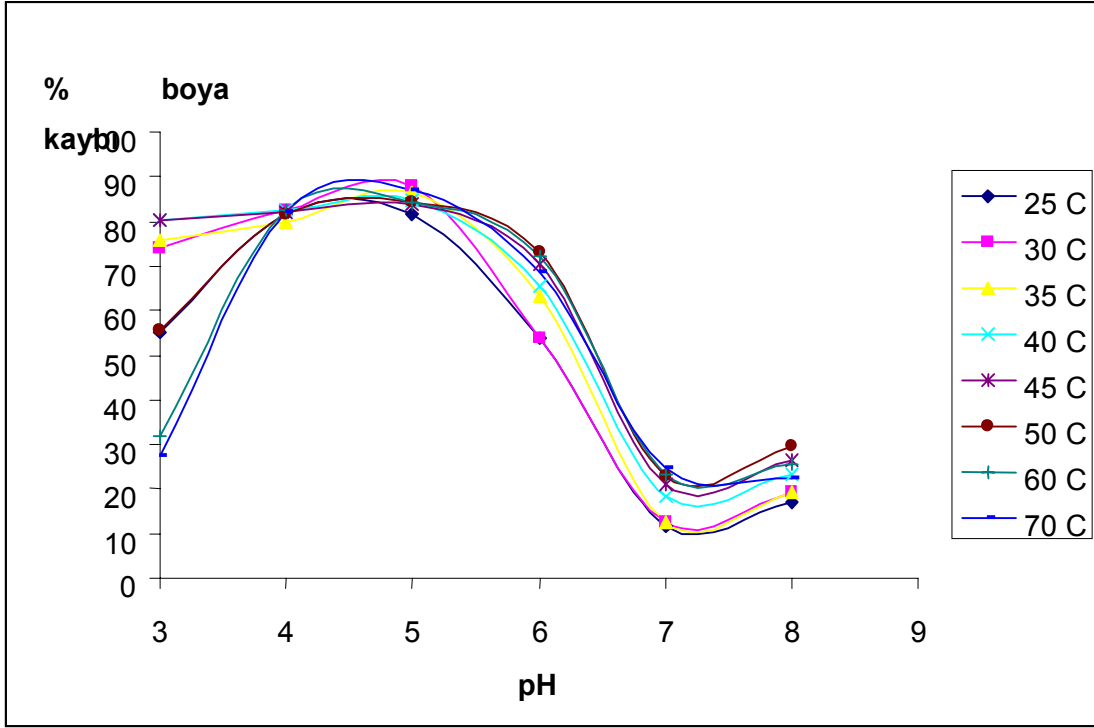


Şekil 4.22 Farklı pH' larda (pH: 3, 4 5, 6, 7, 8) 70°C'da, 60. dakikada HRP enziminin ve konjugatının Naftol Blue Black boyar maddesine etkisinde 620 nm' deki % boyar madde kaybı.

4.5 Farklı pH' larda (pH 3, 4, 5, 6, 7, 8) Kısa Süreli Beklemede HRP' nin % Naftol Blue Black Boyasının Giderilmesine Etkisi

Çizelge 4.1 Farklı sıcaklıklarda saf HRP' nin etkisinde, 5. dakikada Naftol Blue Black boyasının 620 nm' deki % boya kaybı

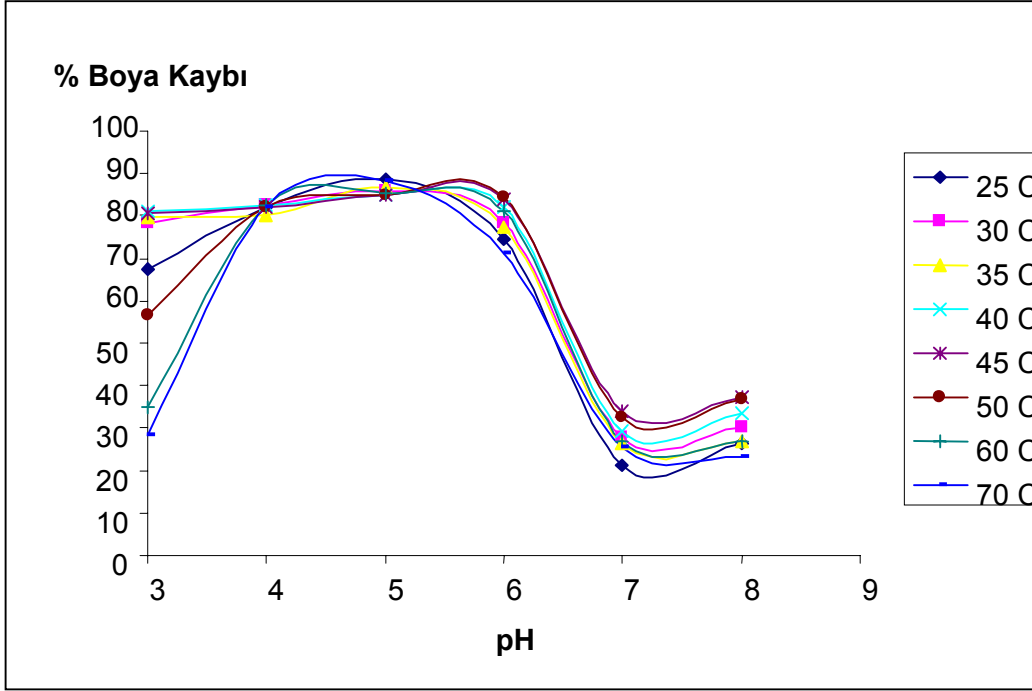
PH	25°C	30°C	35°C	40°C	45°C	50°C	60°C	70°C
3	55,2	74,1	75,9	80,1	80,4	55,7	31,7	27,4
4	81,48	82,5	79,84	82,51	82,05	81,5	82,5	82,1
5	81,8	88,1	86,5	84,9	83,9	84,2	84,5	86,9
6	54	53,8	63,2	65,3	70,4	73,1	72,1	68,5
7	11,6	12,7	12,7	18,4	21,2	22,8	23,2	24,7
8	17	19,5	19,5	23,5	26,4	29,5	25,6	22,2



Şekil 4.23 Farklı sıcaklıklarda saf HRP' nin 5. dk.'da Naftol Blue Black boyasının 620 nm' deki % boya kaybı

Çizelge 4.2 Farklı sıcaklıklarda saf HRP' nin 10. dk.'da Naftol Blue Black boyasının 620 nm' deki % boya kaybı

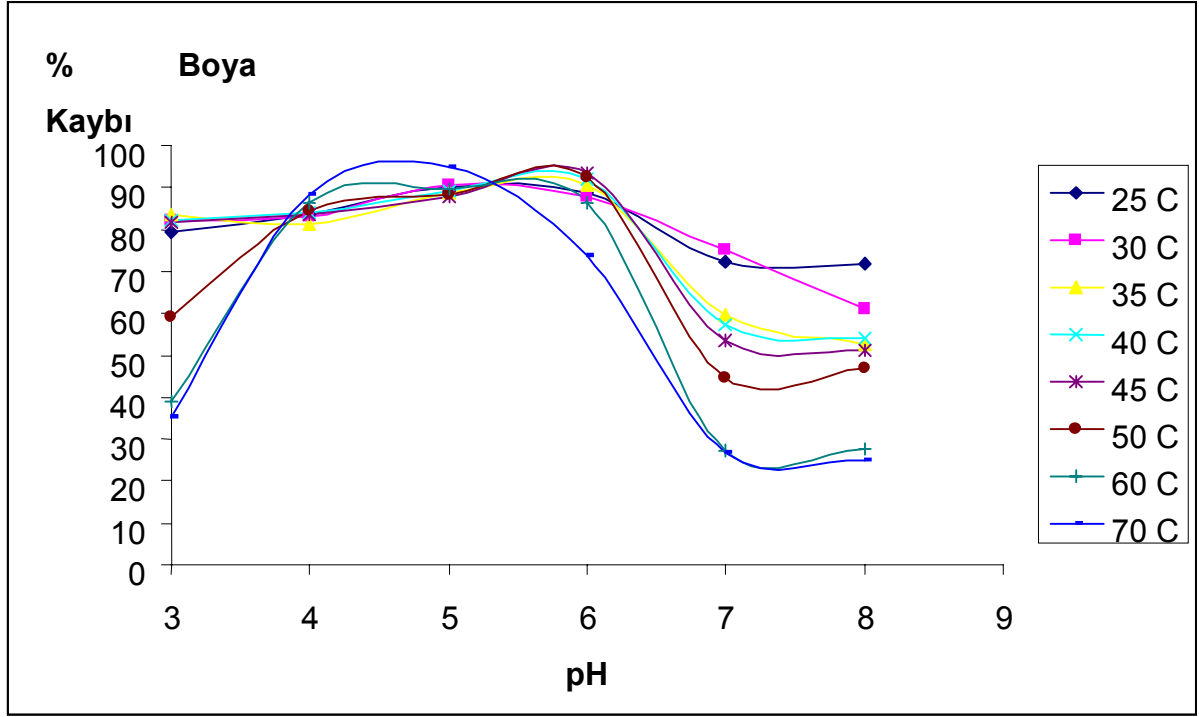
pH	25 C	30 C	35 C	40 C	45 C	50 C	60 C	70 C
3	67,3	78,3	79,9	81,2	80,8	56,7	34,9	28,5
4	81,9	82,7	80,32	82,78	82,28	81,9	82,5	82,0
5	88,6	85,9	86,7	84,9	84,7	85,1	85,5	88,1
6	74,3	78,3	77,2	81,9	83,8	84,3	81,0	71,4
7	21,3	27,6	26,4	29,4	34	32,4	26,7	25,4
8	26,4	30,1	26,8	33,4	37,4	36,7	27,1	23,3



Şekil 4.24 Farklı sıcaklıklarda saf HRP' nin 10. dk.'da Naftol Blue Black boyasının 620 nm' deki % boya kaybı

Çizelge 4.3 Farklı sıcaklıklarda saf HRP' nin 60. dk.'da Naftol Blue Black boyasının 620 nm' deki % boya kaybı

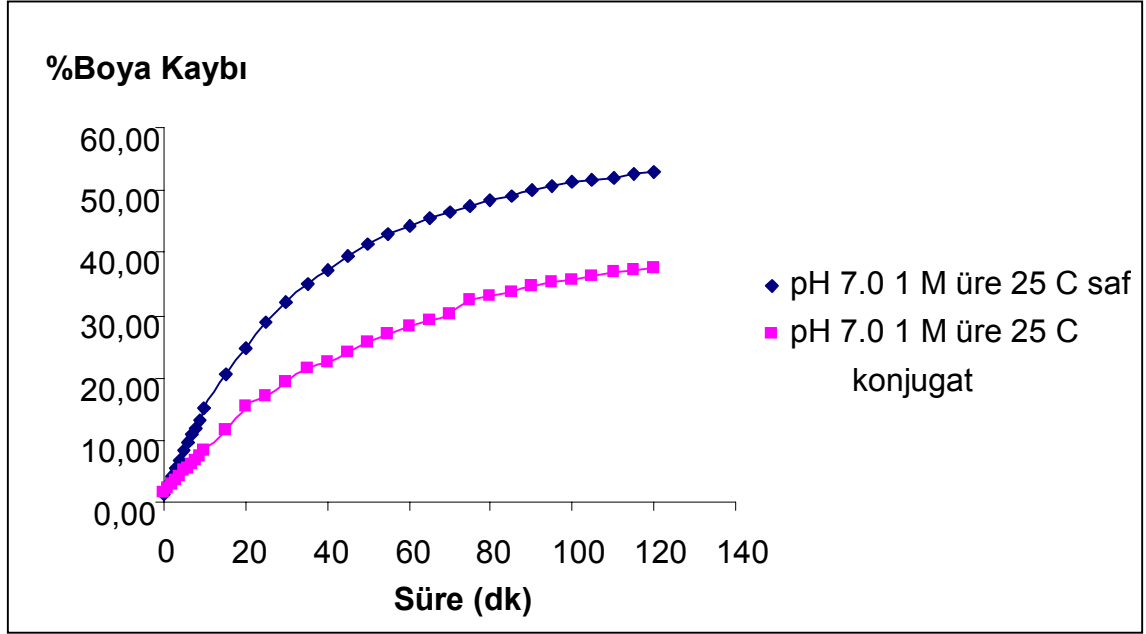
pH	25 C	30 C	35 C	40 C	45 C	50 C	60 C	70 C
3	79,5	82,1	83,4	82	81,8	59,3	39,1	35,4
4	83,47	83,31	81,43	84,09	83,44	84,4	86,5	88,2
5	90	90,8	88,5	89,1	87,7	88,2	89,7	94,7
6	88,5	87,7	90,8	92	93,2	92,6	86,2	73,5
7	72,2	74,9	59,5	57,2	53,3	44,8	27,3	26,7
8	71,9	61,2	52,6	54,2	51,2	47,0	27,7	25,0



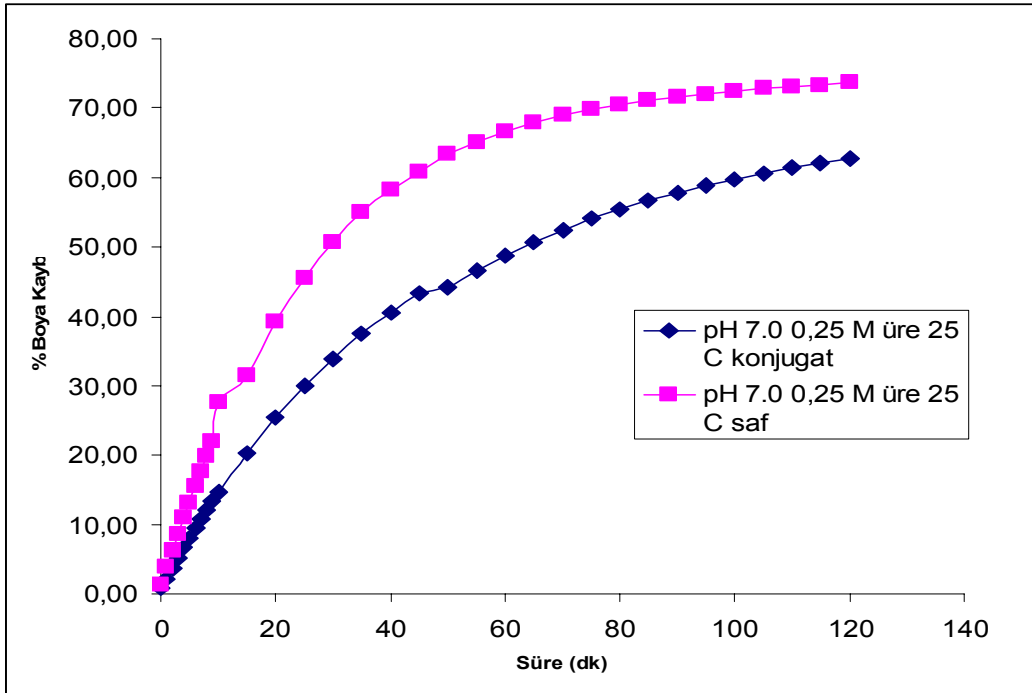
Şekil 4.25 Farklı sıcaklıklarda saf HRP' nin 60. dk.'da Naftol Blue Black boyasının 620 nm' deki % boya kaybı

4.5.1 Naftol Blue Black Boyasının Giderilmesinde Ortam Koşullarının Etkisi

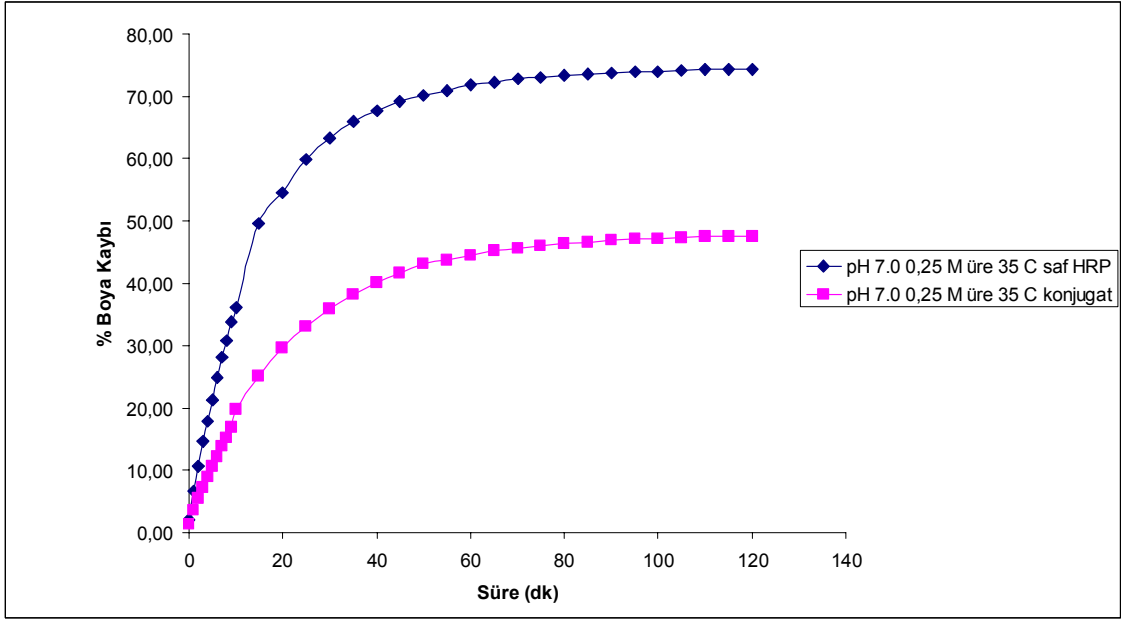
4.5.1.1 Üre Etkisinin İncelenmesi



Şekil 4.26 Saf HRP ve konjugatı için Naftol Blue Black boyasının giderilmesine 25 °C' de, pH: 7.0 de 1.0 M üre etkisinin incelenmesi

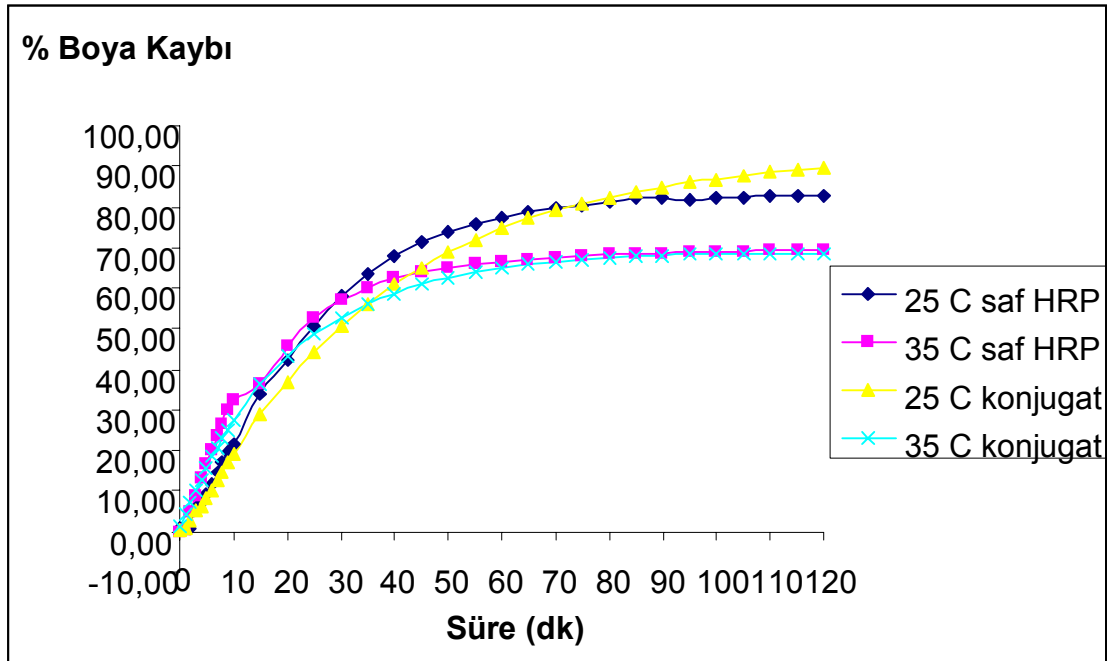


Şekil 4.27 Saf HRP ve konjugatı için Naftol Blue Black boyasının giderilmesine 25 °C' de, pH: 7.0 de 0,25 M üre etkisinin incelenmesi

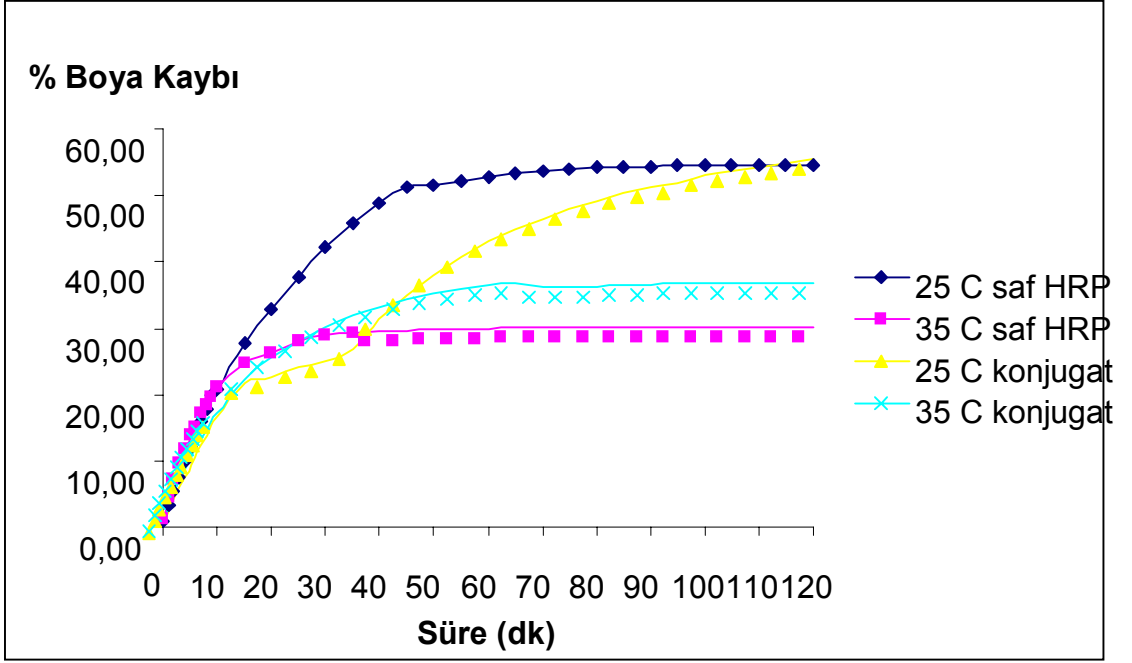


Şekil 4.28 Saf HRP ve konjugatı için Naftol Blue Black boyasının giderilmesine 35 °C' de, pH: 7.0 de 0,25 M üre etkisinin incelenmesi

4.5.1.2 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Etkisinin Araştırılması



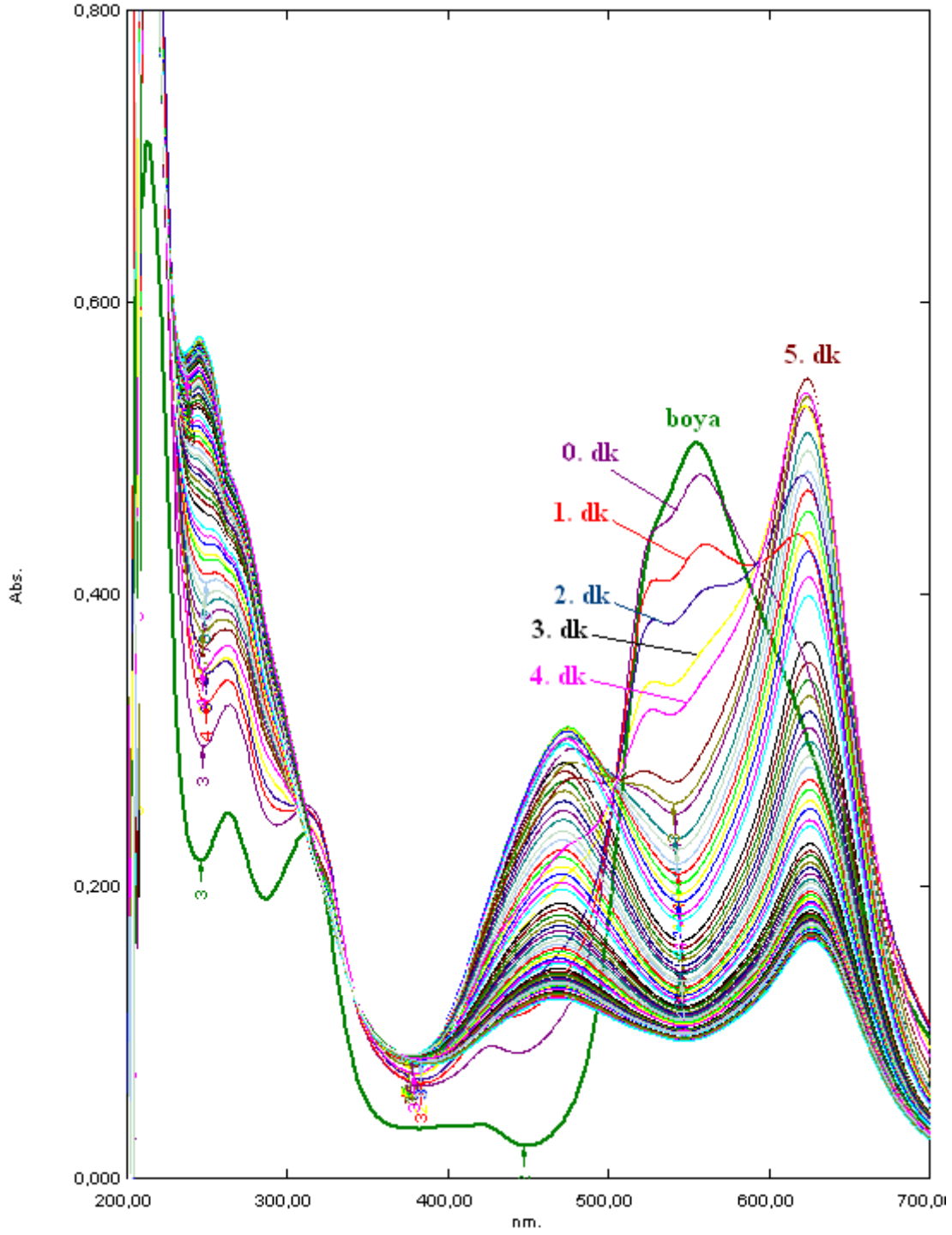
Şekil 4.29 Saf HRP ve konjugatı için pH: 7.0' de Naftol Blue Black boyasının giderilmesine 25 °C ve 35 °C sıcaklıklarında 0,5 mM SDS etkisinin incelenmesi



Şekil 4.30 Saf HRP ve konjugatı için pH: 7.0' de Naftol Blue Black boyasının giderilmesine 25 °C ve 35 °C sıcaklıklarında 20 mM SDS etkisinin incelenmesi

4.6 Saflaştırılan HRP ile Coomassie Brilliant Blue R-250 Boyasının Giderilmesi

Spektrumlardaki azalma 620 nm' e göre belirlendi.

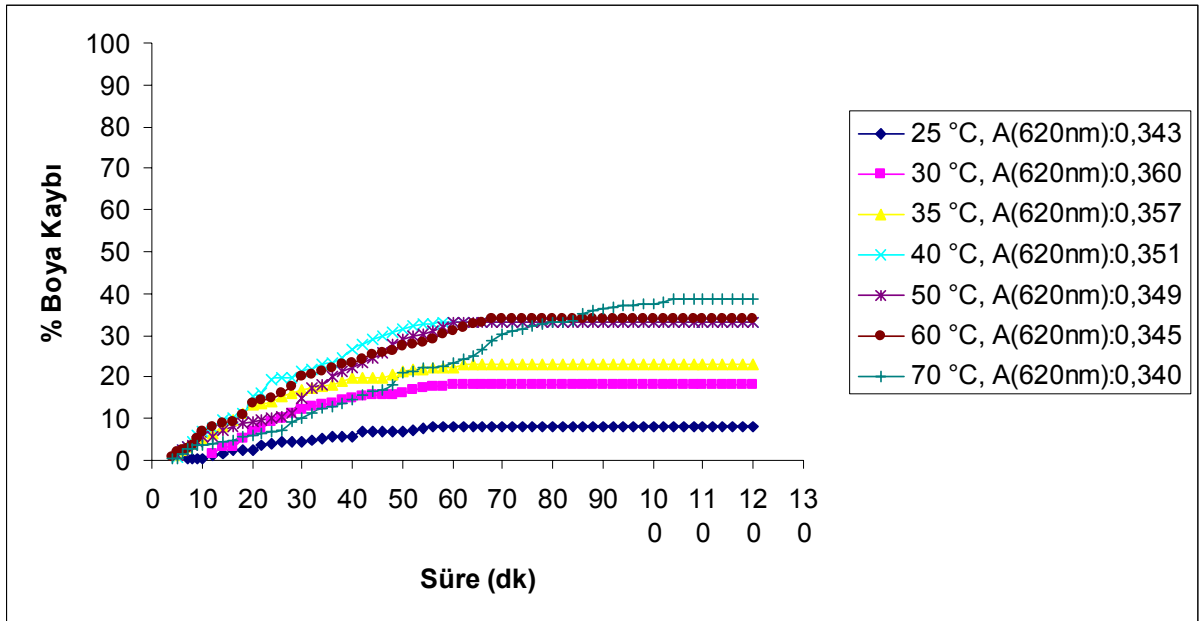


Şekil 4.31 pH 5.0 40 °C' de Coomassie Brilliant Blue R-250 boyasının saf HRP enzimi ile giderilmesinin UV-VIS (620 nm) ile gözlenmesi

Çizelge 4.4 pH:3' de saf HRP enzimi ile Coomassie Brilliant Blue R-250 boyasının % boya kaybı

Süre (dk)	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C	50 °C	60 °C	70 °C
1							
2							
3							
4						0,87	0,59
5			1,40	0,85	1,15	2,03	0,59
6			2,52	2,28	2,29	2,32	1,76
7	0,29		3,36	3,42	3,15	2,90	2,65
8	0,29		4,20	4,56	3,44	3,77	2,65
9	0,29		4,76	5,98	4,58	5,22	3,53
10	0,58		5,32	6,84	5,73	6,96	3,53
12	1,17	1,67	6,44	7,69	5,73	8,12	4,12
14	1,75	3,06	8,12	9,69	7,16	8,70	4,41
16	2,33	3,33	9,80	10,26	8,02	9,28	4,71
18	2,33	5,28	11,20	11,11	8,88	10,72	5,59
20	2,33	6,94	13,17	15,38	9,46	13,62	6,18
22	3,50	7,78	13,73	15,95	9,74	14,49	6,47
24	4,08	9,17	14,29	19,37	10,03	14,78	6,76
26	4,37	10,00	15,41	19,66	10,32	16,23	7,06
28	4,37	11,39	16,25	19,94	11,46	17,68	9,12
30	4,37	12,22	17,09	21,37	14,90	20,00	10,00
40	5,83	15,00	19,61	26,50	22,35	23,48	14,41

50	6,71	16,11	21,59	31,34	29,23	27,25	20,88
60	7,29	18,06	22,13	33,05	32,95	31,01	23,24
70	7,58	18,06	22,97	33,05	32,95	33,91	30,29
80	8,16	18,06	22,97	33,05	32,95	33,91	32,94
90	8,16	18,06	22,97	33,05	32,95	33,91	36,18
100	8,16	18,06	22,97	33,05	32,95	33,91	37,65
110	8,16	18,06	22,97	33,05	32,95	33,91	38,53
120	8,16	18,06	22,97	33,05	32,95	33,91	38,53

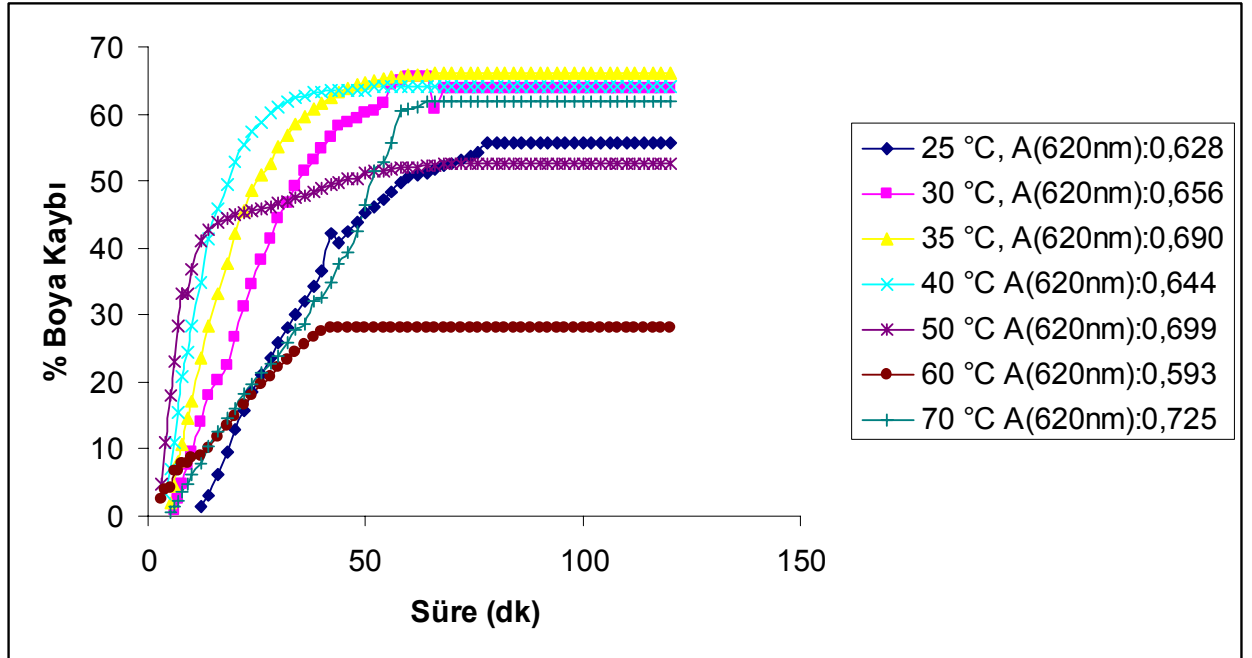


Şekil 4.32 pH:3' de saf HRP enzimi ile % boya kaybı.

Çizelge 4.5 pH:4' de saf HRP enzimi ile Coomassie Brilliant Blue R-250 boyasının % boya kaybı

Süre (dk)	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C	50 °C	60 °C	70 °C
1							
2							
3					4,86	2,53	
4				3,26	10,87	3,88	
5			2,03	6,99	17,88	4,22	0,69
6		0,91	4,49	10,87	23,03	6,75	1,52
7		2,44	8,12	15,53	28,47	6,75	2,34
8		4,88	10,72	20,81	33,05	7,76	3,59
9		7,47	14,64	24,53	33,05	7,93	4,83
10		9,45	17,10	28,26	36,77	8,60	6,07
12	1,27	14,18	23,62	34,94	41,06	8,94	7,86
14	3,18	17,99	28,41	41,46	42,78	10,12	10,34
16	6,05	20,12	33,19	45,96	43,78	11,80	12,55
18	9,55	22,56	37,68	49,53	44,35	13,49	14,48
20	13,06	26,83	42,03	52,80	44,92	15,01	16,14
22	15,76	31,25	45,65	55,43	45,35	16,69	18,21
24	18,47	34,60	48,55	57,30	45,64	18,04	19,72
26	21,02	38,11	51,01	58,85	45,92	19,56	21,38
28	23,57	41,31	52,46	60,25	46,21	20,74	22,76
30	25,80	44,36	55,07	61,02	46,78	22,09	24,00
40	36,62	54,88	61,59	63,35	48,93	27,66	32,69

50	45,22	60,06	64,78	63,66	51,07	28,16	46,34
60	50,48	65,40	65,65	63,98	51,93	28,16	60,69
70	52,71	63,87	65,94	64,13	52,65	28,16	61,79
80	55,73	63,87	65,94	64,13	52,65	28,16	61,79
90	55,73	63,87	65,94	64,13	52,65	28,16	61,79
100	55,73	63,87	65,94	64,13	52,65	28,16	61,79
110	55,73	63,87	65,94	64,13	52,65	28,16	61,79
120	55,73	63,87	65,94	64,13	52,65	28,16	61,79

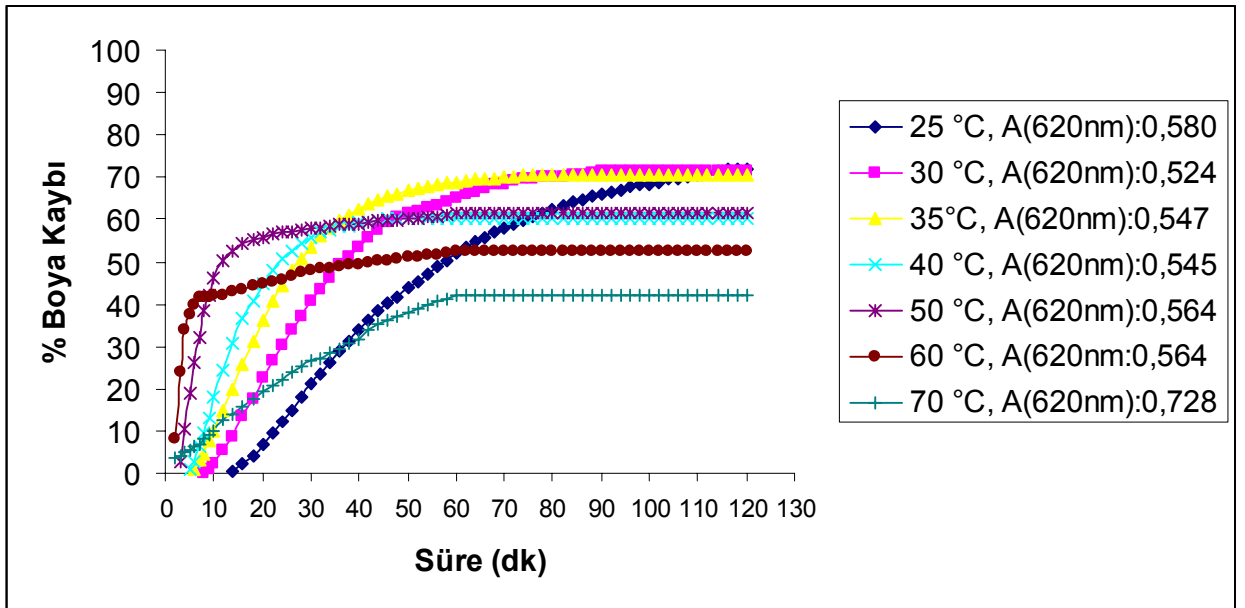


Şekil 4.33 pH 4'de saf HRP enzimi ile % boya kaybı.

Çizelge 4.6 pH:5' de saf HRP enzimi ile Coomassie Brilliant Blue R-250 boyasının % boya kaybı

Süre (dk)	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C	50 °C	60 °C	70 °C
1							
2						8,16	3,43
3					2,66	23,94	4,26
4					10,46	33,87	5,08
5				0,92	18,97	37,77	5,63
6			0,73	2,94	26,24	39,89	6,18
7			3,11	6,24	32,09	41,49	6,87
8		0,19	4,39	9,54	38,30	41,67	8,10
9		0,95	7,68	13,21	42,20	41,84	9,07
10		2,29	9,87	18,17	46,10	42,20	10,16
12		5,53	14,99	24,22	50,35	42,20	12,50
14	0,58	8,78	20,11	30,64	52,66	43,09	13,87
16	2,14	13,36	25,78	36,51	54,26	43,62	15,66
18	4,27	17,75	31,44	40,92	55,32	44,33	17,58
20	6,80	22,52	36,38	44,95	55,85	44,86	19,23
22	9,51	26,72	40,59	47,89	56,38	45,21	20,88
24	12,23	30,53	44,42	50,64	56,91	45,92	22,39
26	15,15	34,16	48,08	52,66	57,09	46,81	23,76
28	18,25	37,21	50,82	54,31	57,62	47,52	25,41
30	21,17	40,65	53,56	55,60	57,98	47,87	26,79
40	33,79	53,44	62,52	59,08	58,87	49,47	31,87

50	44,08	61,64	66,91	60,00	60,11	51,06	37,91
60	51,84	65,08	68,92	60,00	61,35	52,30	41,90
70	57,86	68,32	70,02	60,00	61,35	52,30	41,90
80	62,52	70,23	70,75	60,00	61,35	52,30	41,90
90	66,02	71,37	70,75	60,00	61,35	52,30	41,90
100	68,54	71,37	70,75	60,00	61,35	52,30	41,90
110	70,68	71,37	70,75	60,00	61,35	52,30	41,90
120	72,04	71,37	70,75	60,00	61,35	52,30	41,90

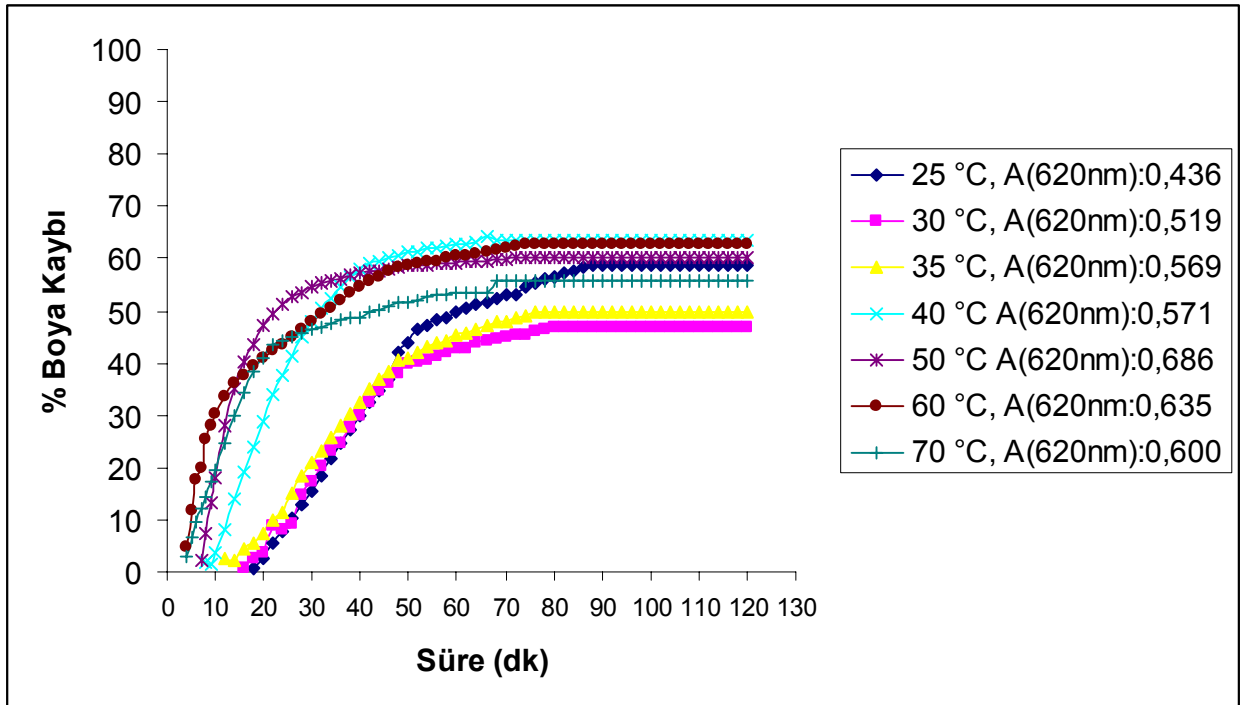


Şekil 4.34 pH 5’de saf HRP enzimi ile % boya kaybı.

Çizelge 4.7 pH:6' de saf HRP enzimi ile Coomassie Brilliant Blue R-250 boyasının % boya kaybı

Süre (dk)	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C	50 °C	60 °C	70 °C
1							
2							
3							
4						4,88	2,83
5						11,97	6,50
6						17,80	9,67
7					2,04	20,00	12,17
8				1,75	7,29	25,51	14,33
9				1,58	13,27	27,87	17,17
10				3,85	17,93	30,39	19,67
12			2,64	8,23	28,13	33,70	24,83
14			2,28	14,01	34,99	36,06	30,00
16		0,77	4,39	19,26	40,09	37,80	34,50
18	0,92	2,70	5,45	24,17	43,59	39,37	38,50
20	2,52	3,85	7,21	28,90	47,38	40,79	41,00
22	5,50	8,86	9,84	33,98	49,56	42,36	43,50
24	7,80	8,29	11,42	37,65	51,46	43,46	44,17
26	10,32	9,06	15,29	41,33	52,62	44,88	45,00
28	12,84	14,84	18,45	45,01	53,35	46,46	45,67
30	15,60	17,34	20,91	47,81	54,52	48,03	46,33
40	29,82	29,87	32,34	57,97	57,14	54,49	48,83

50	44,04	39,88	40,95	61,12	58,60	58,58	51,83
60	49,77	42,77	45,52	62,70	59,18	60,47	53,33
70	53,21	44,89	48,15	63,57	59,91	61,89	55,67
80	56,42	47,01	49,91	63,57	60,06	62,68	55,67
90	58,72	47,01	49,91	63,57	60,06	62,68	55,67
100	58,72	47,01	49,91	63,57	60,06	62,68	55,67
110	58,72	47,01	49,91	63,57	60,06	62,68	55,67
120	58,72	47,01	49,91	63,57	60,06	62,68	55,67

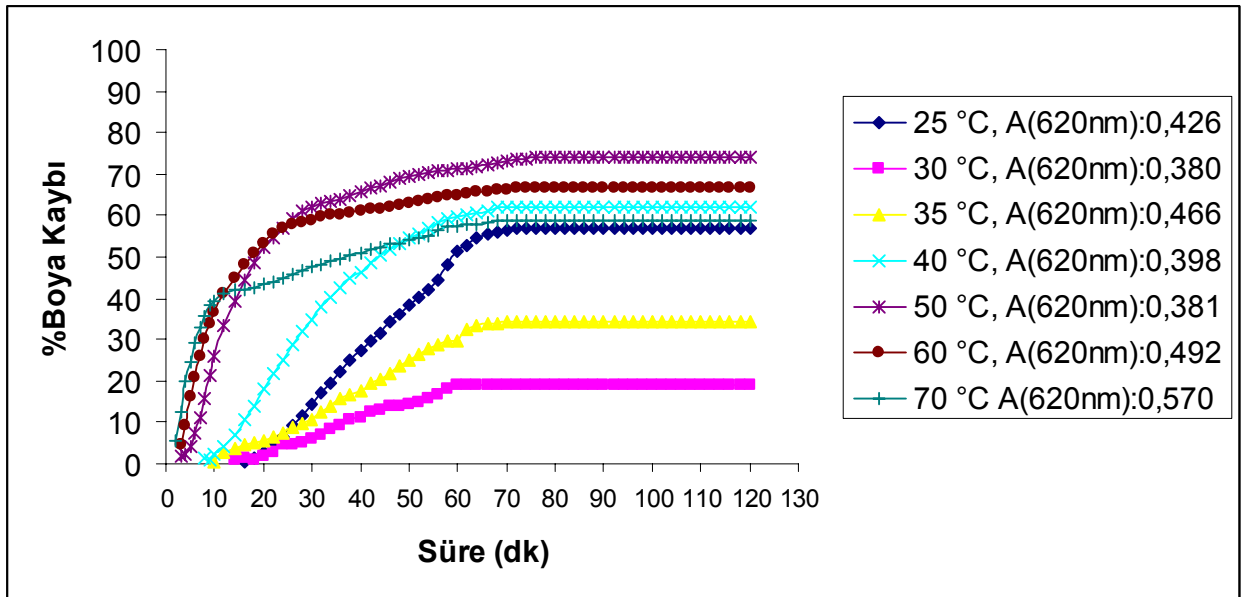


Şekil 4.35 pH 6'da saf HRP enzimi ile % boya kaybı.

Çizelge 4.8 pH:7' de saf HRP enzimi ile Coomassie Brilliant Blue R-250 boyasının % boya kaybı

Süre (dk)	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C	50 °C	60 °C	70 °C
1							
2							5,44
3					1,84	4,67	12,46
4					2,36	9,35	19,82
5					3,94	16,26	24,56
6					7,35	20,73	28,95
7					11,02	26,02	32,81
8				1,26	15,75	30,08	35,79
9				1,01	21,52	33,94	38,60
10			0,43	2,26	25,72	36,59	39,12
12			2,79	4,02	33,33	41,06	41,05
14		0,79	3,86	7,04	39,37	44,92	41,93
16	0,47	1,32	4,51	10,55	44,62	48,17	41,93
18	1,17	1,05	4,94	14,07	48,82	50,81	42,46
20	2,58	1,84	5,36	17,84	52,23	53,25	43,33
22	4,46	2,89	6,65	21,61	54,86	55,49	44,21
24	6,57	4,47	7,30	25,13	56,96	57,11	44,91
26	9,15	4,74	8,80	28,89	59,06	57,72	45,96
28	11,74	5,00	9,66	31,91	61,15	58,33	46,84
30	14,32	5,79	10,52	34,92	62,20	58,94	47,72
40	27,23	11,32	17,60	46,48	65,62	61,18	51,05

50	38,50	14,47	24,89	54,52	69,29	63,01	54,21
60	51,17	18,95	29,61	59,55	71,13	64,84	57,19
70	56,57	18,95	34,33	61,81	72,97	66,06	58,60
80	57,04	18,95	34,33	61,81	74,02	66,87	58,95
90	57,04	18,95	34,33	61,81	74,02	66,87	58,95
100	57,04	18,95	34,33	61,81	74,02	66,87	58,95
110	57,04	18,95	34,33	61,81	74,02	66,87	58,95
120	57,04	18,95	34,33	61,81	74,02	66,87	58,95

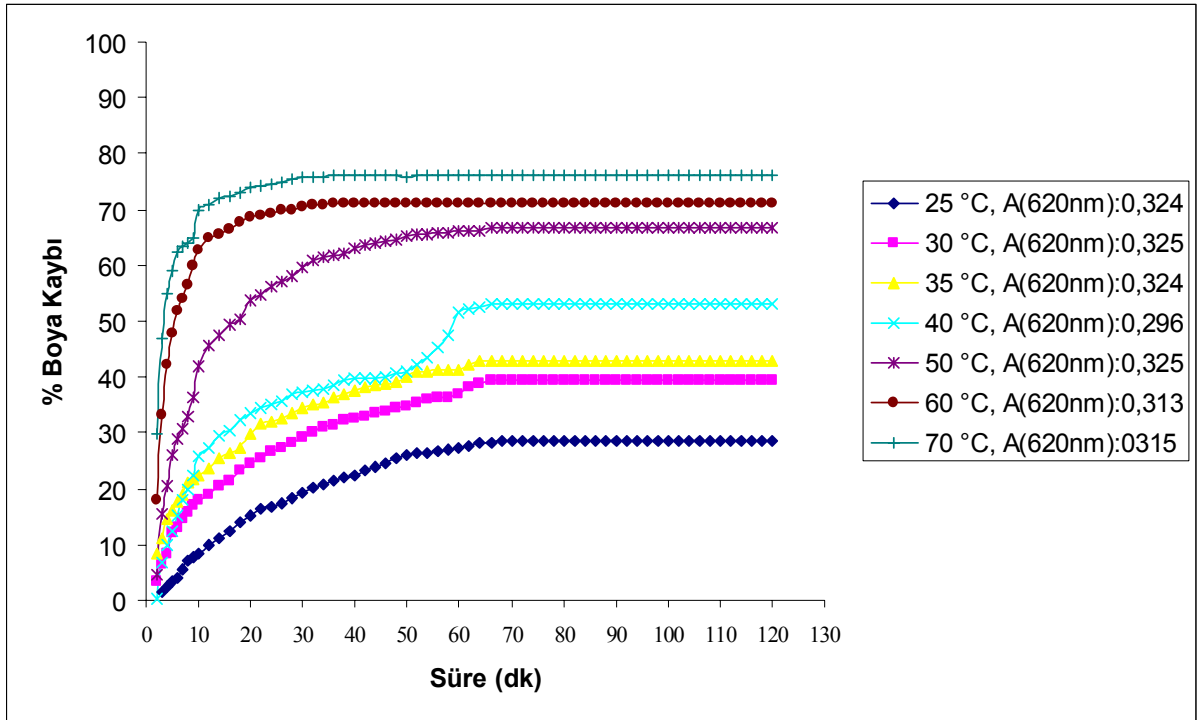


Şekil 4.36 pH 7'de saf HRP enzimi ile % boya kaybı.

Çizelge 4.9 pH:8' de saf HRP enzimi ile Coomassie Brilliant Blue R-250 boyasının % boya kaybı

Süre (dk)	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C	50 °C	60 °C	70 °C
1							
2		3,38	8,33	0,34	4,62	17,89	29,84
3	1,54	6,46	11,11	6,76	15,38	33,23	46,98
4	2,47	8,31	14,51	9,80	20,62	42,17	54,92
5	3,40	12,00	16,05	12,50	26,15	47,92	59,05
6	4,01	12,92	17,59	15,20	28,92	51,76	62,54
7	5,56	14,46	18,83	17,91	30,77	53,99	63,49
8	7,10	15,69	20,99	19,93	32,92	56,55	64,13
9	7,72	17,23	21,60	22,30	36,31	60,06	64,76
10	8,33	18,15	22,22	25,68	41,85	62,62	69,84
12	9,88	19,08	23,46	27,36	45,54	64,86	70,79
14	11,11	20,62	25,62	29,39	47,38	65,50	72,06
16	12,35	21,54	26,54	30,41	49,23	66,45	72,38
18	13,89	23,38	27,47	32,43	50,46	67,73	73,02
20	15,12	24,62	29,94	33,45	53,85	68,69	73,97
22	16,36	25,54	31,79	34,46	54,77	69,01	74,29
24	16,67	26,77	32,10	35,14	56,31	69,33	74,60
26	17,28	27,38	32,72	35,81	57,23	69,97	74,92
28	18,21	28,31	33,64	36,82	58,15	69,97	75,56
30	19,14	29,23	34,57	37,16	59,69	70,61	75,87
40	22,22	32,62	37,65	39,86	63,08	71,25	76,19

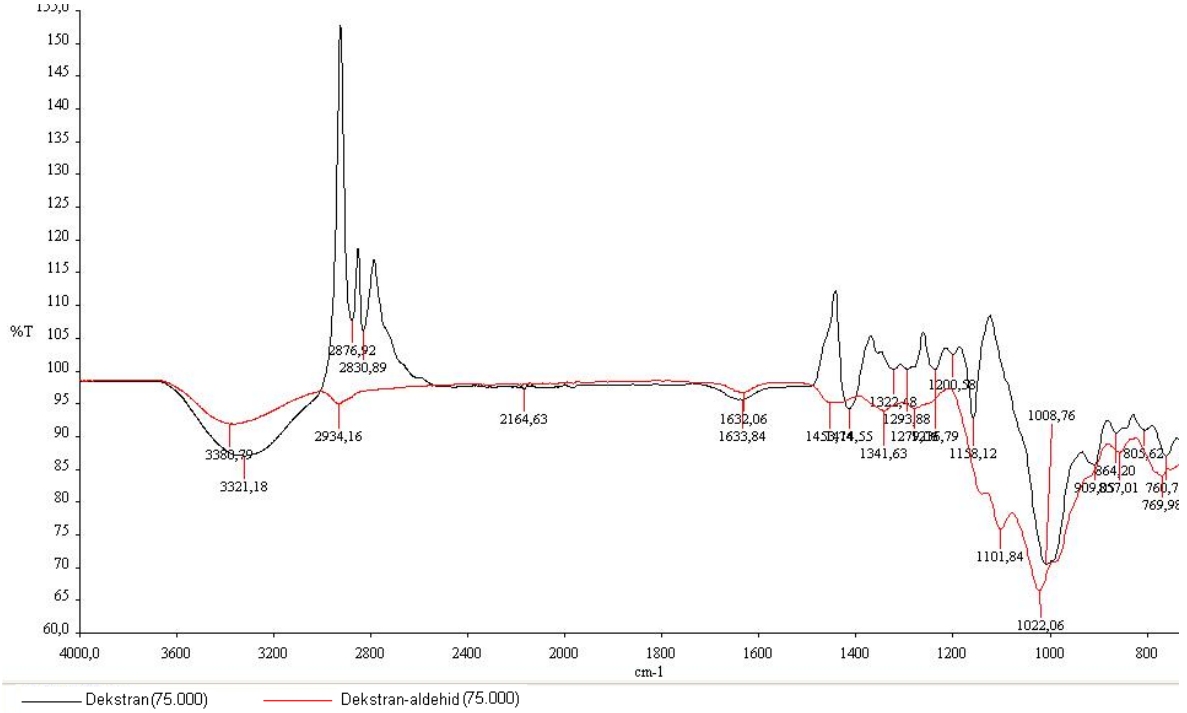
50	26,23	34,77	40,12	40,88	65,23	71,25	76,19
60	27,47	36,92	41,36	51,69	66,15	71,25	76,19
70	28,70	39,38	42,90	53,04	66,77	71,25	76,19
80	28,70	39,38	42,90	53,04	66,77	71,25	76,19
90	28,70	39,38	42,90	53,04	66,77	71,25	76,19
00	28,70	39,38	42,90	53,04	66,77	71,25	76,19
110	28,70	39,38	42,90	53,04	66,77	71,25	76,19
120	28,70	39,38	42,90	53,04	66,77	71,25	76,19



Şekil 4.37 pH 8'de saf HRP enzimi ile % boya kaybı.

4.7 FT-IR Spektrumları

Dekstran ve dekstran aldehid için alınan spektrumlarda, 3319 ve 3389 cm^{-1} dalga boylarında görülen geniş pik assosiye (O-H) alkol(polimer) bandından kaynaklanmaktadır. Dekstran aldehidin spektrumunda 2934 cm^{-1} dalga boyunda (C-H aldehid gerilmesi) aldehid grubunun, 1633 cm^{-1} dalga boyunda ise C=O aldehid gerilmesinin bandları görülmektedir.

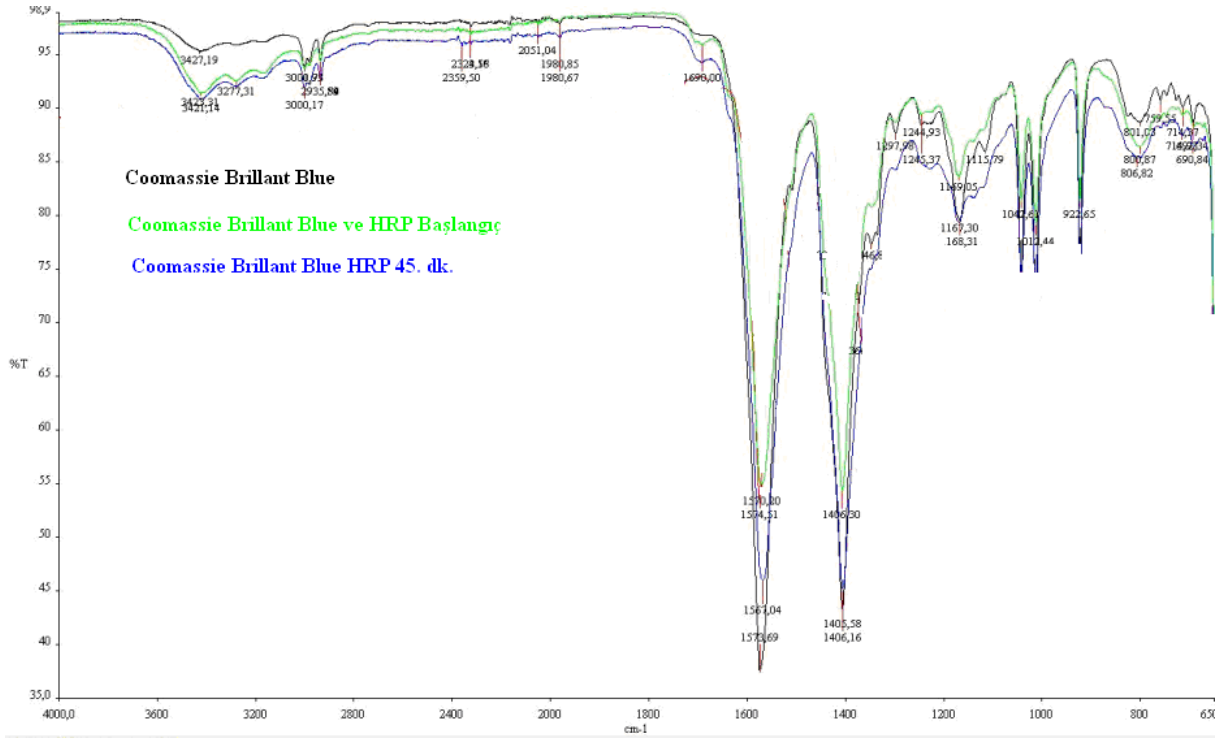


Şekil 4.38 Dekstranın ve aldehid türevinin FTIR spektrumu.

Saf HRP'nin spektrumunda 3420 ve 3283 cm^{-1} dalga boylarındaki iki pik primer amin gruplarını göstermektedir. Konjugatların spektrumlarında, 2939 cm^{-1} dalga boyundaki aldehid grubuna ait bandın kaybolduğu ve 1669 cm^{-1} dalga boyunda 1.amid (C=O), 1647 cm^{-1} 'de 2.amid(N-H), 1352 cm^{-1} dalga boyunda ise 3.amid bandının (C-N) oluştuğu görülmüştür.

Çizelge 4.10 FTIR spektrumlarında oluşan bantlar ve gösterdikleri fonksiyonel gruplar (Erdik, 1993)

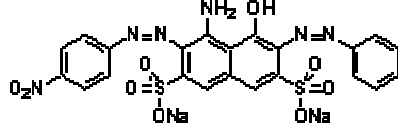
Bandlar, cm^{-1}	Fonksiyonel gruplar
3400-3200	Alkoller (polimer)
3500-3300	Primer aminler (iki pik)
3500-3300	Sekonder aminler (tek pik)
2900-2700	Aldehid C-H bağı
1715-1650	Amit C=O grubu (1. band)
1700-1600	Aldehid C=O bağı
1670-1640	Amit N-H bağı (2. band)
1640-1560	Primer aminler(-NH ₂ eğilmesi)
1400-1350	Amit C-N bağı (3. band)
1280-1180	Aromatik aminler



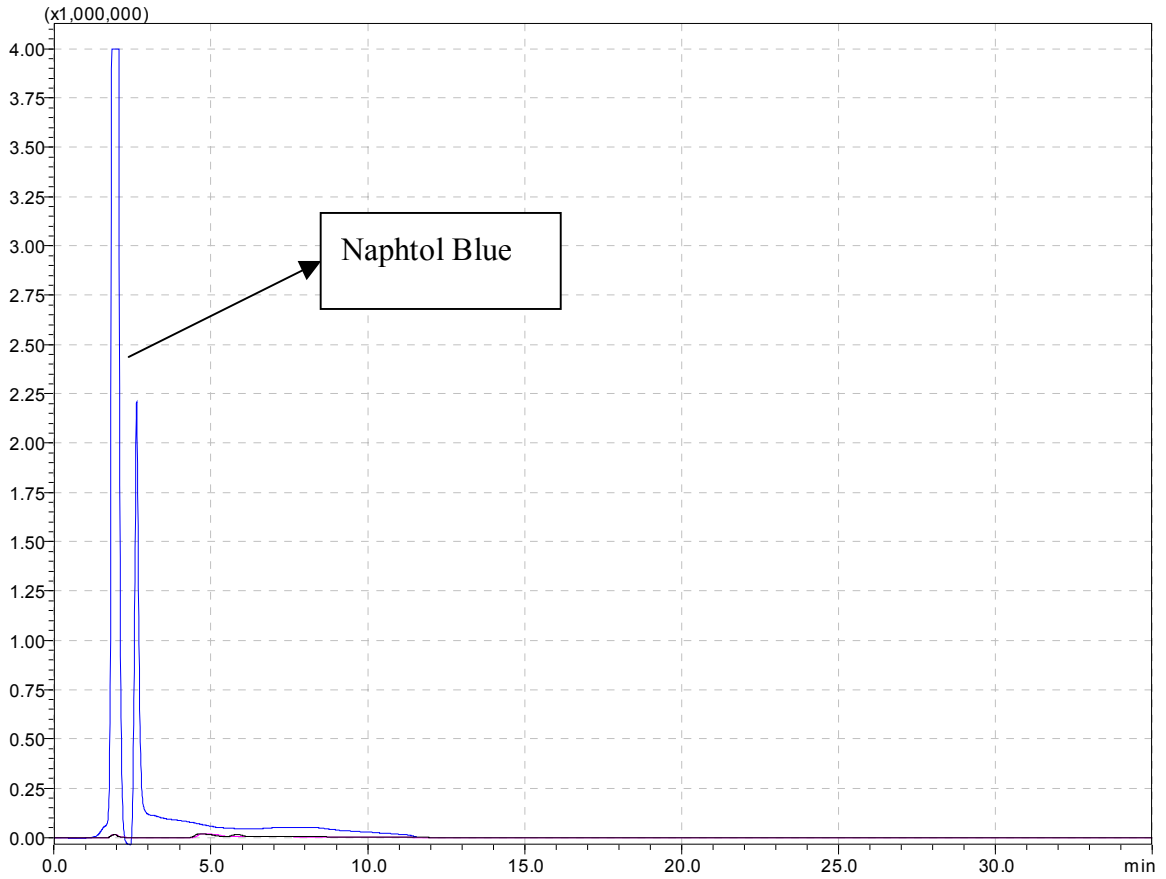
Şekil 4.41 Coomassie Brilliant Blue, CBB ve HRP Başlangıç, CBB ve HRP 45. dk. daki FT-IR Spektrumları

4.8 LC-MS Sonuçları

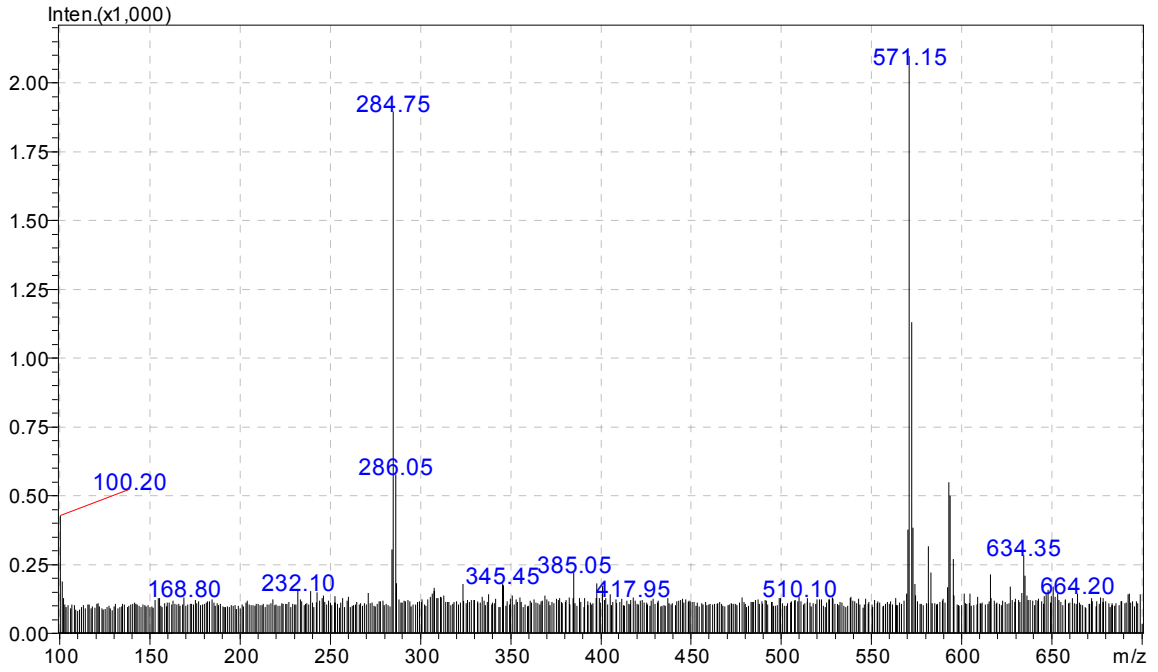
4.8.1 Naftol Blue Black Boyası ile HRP Reaksiyonunun LC-MS Sonuçları



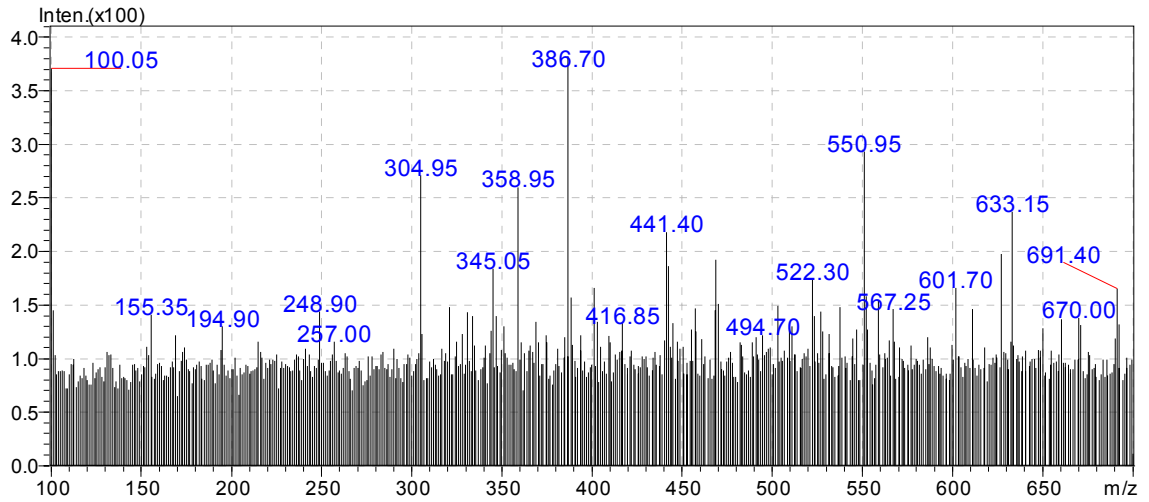
Şekil 4.42 Naftol Blue Black boyasının kimyasal formülü (616 g/mol)



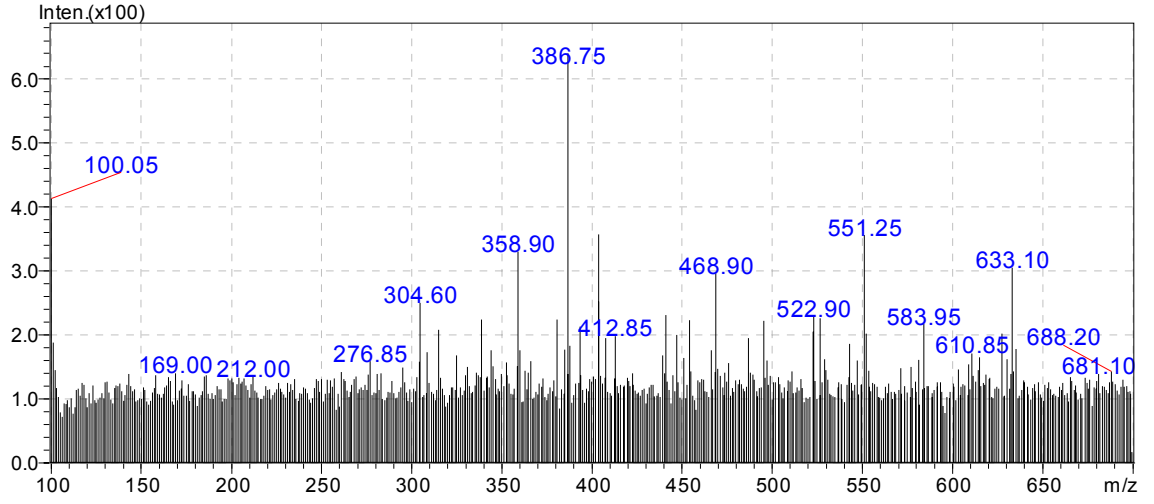
Şekil 4.43 Naftol Blue Black (mavi renkli kromatogram), Naftol Blue Black + Enzim (0. dakika, siyah renkli kromatogram), Naftol Blue Black + Enzim (45. dakika, pembe renkli kromatogram=)'nın UV-VIS detektöründen (617 nm) alınan kromatogramları.



Şekil 4.44 Naftol Blue Black için kromatogramın 1,86-2,29 dakikalari arasında alınan kütle spektrumu. 571,15= (M-H⁺); 284,75=(M-2H⁺).

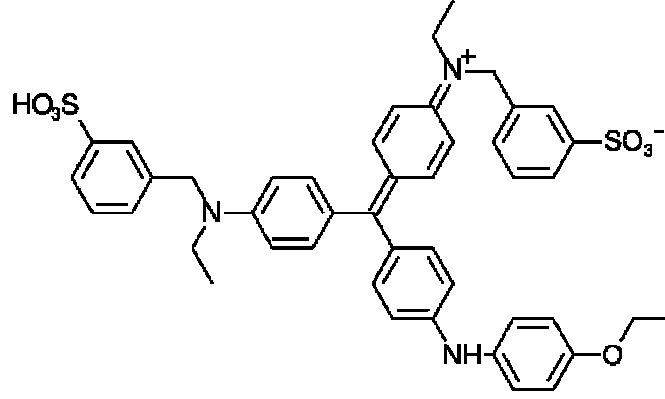


Şekil 4.45 Naftol Blue Black + Enzimin 0. dakikada kromatogramın 1,86-2,29 dakikalari arasında alınan kütle spektrumu.

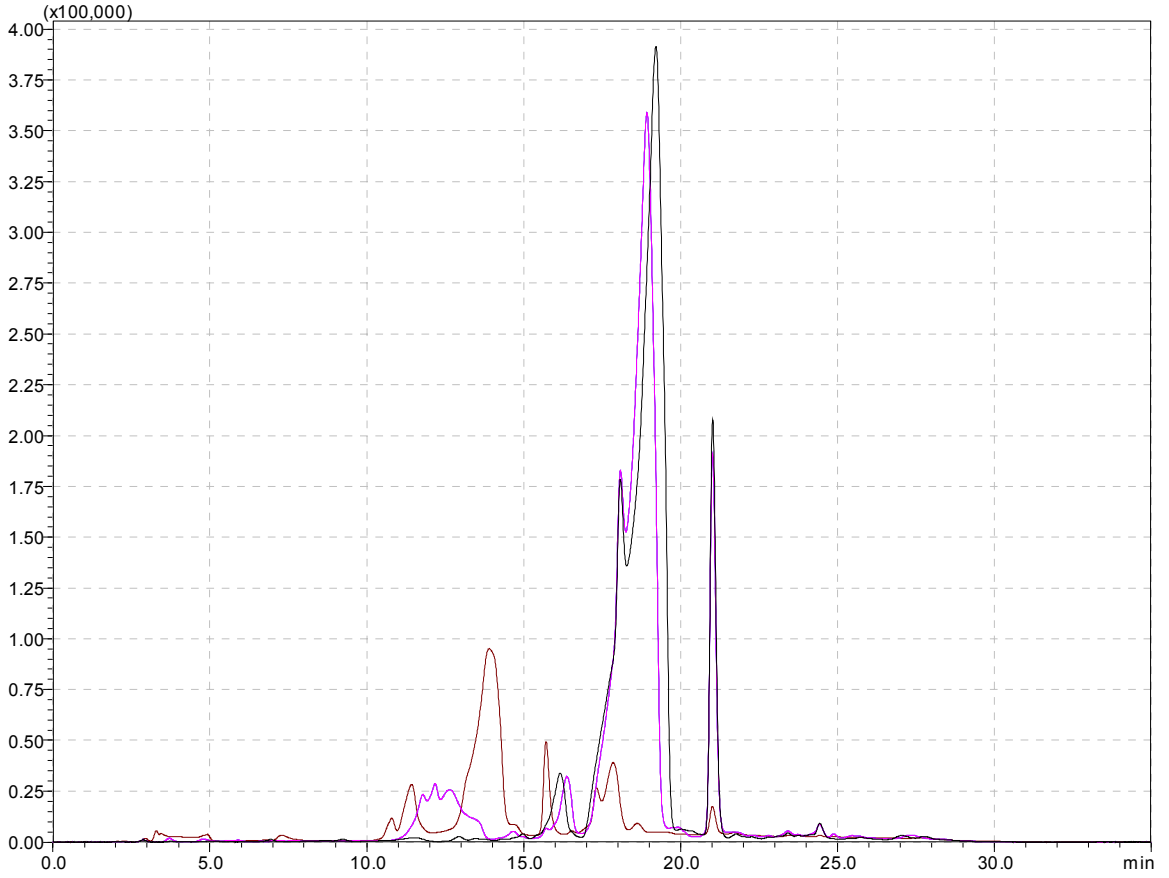


Şekil 4.46 Naftol Blue Black + Enzim'in 45. dakikada kromatogramın 1,86-2,29 dakikaları arasında alınan kütle spektrumu.

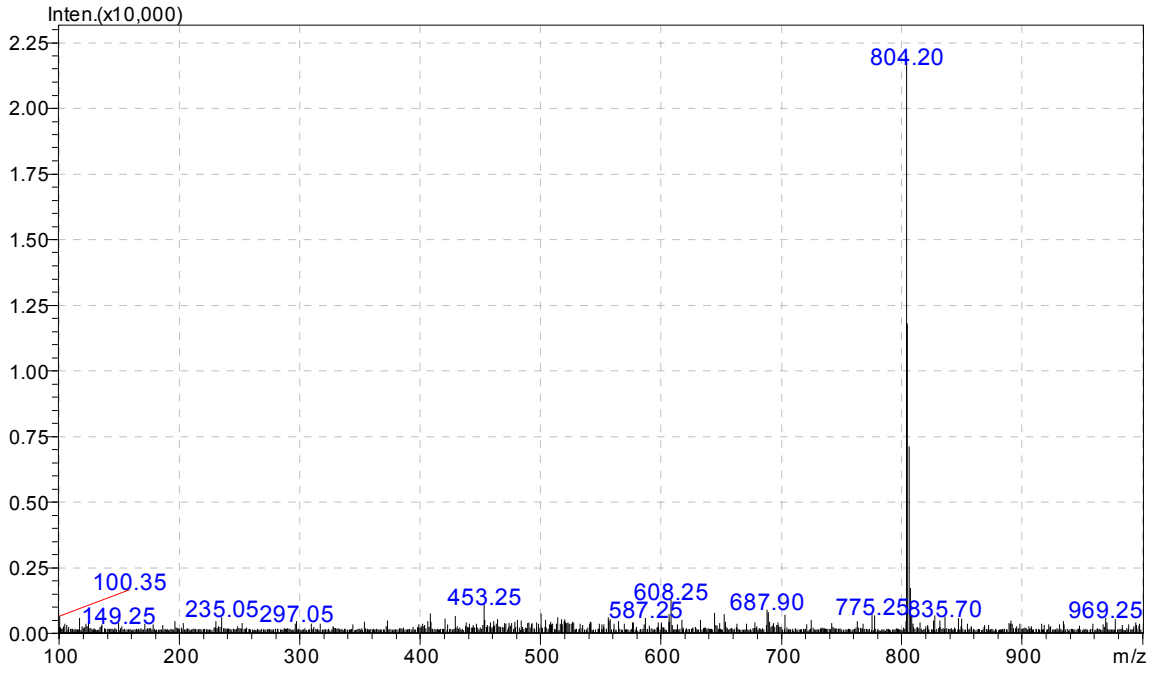
4.8.2 Coomassie Brilliant Blue R-250 Boyası ile HRP Reaksiyonunun LC-MS Sonuçları



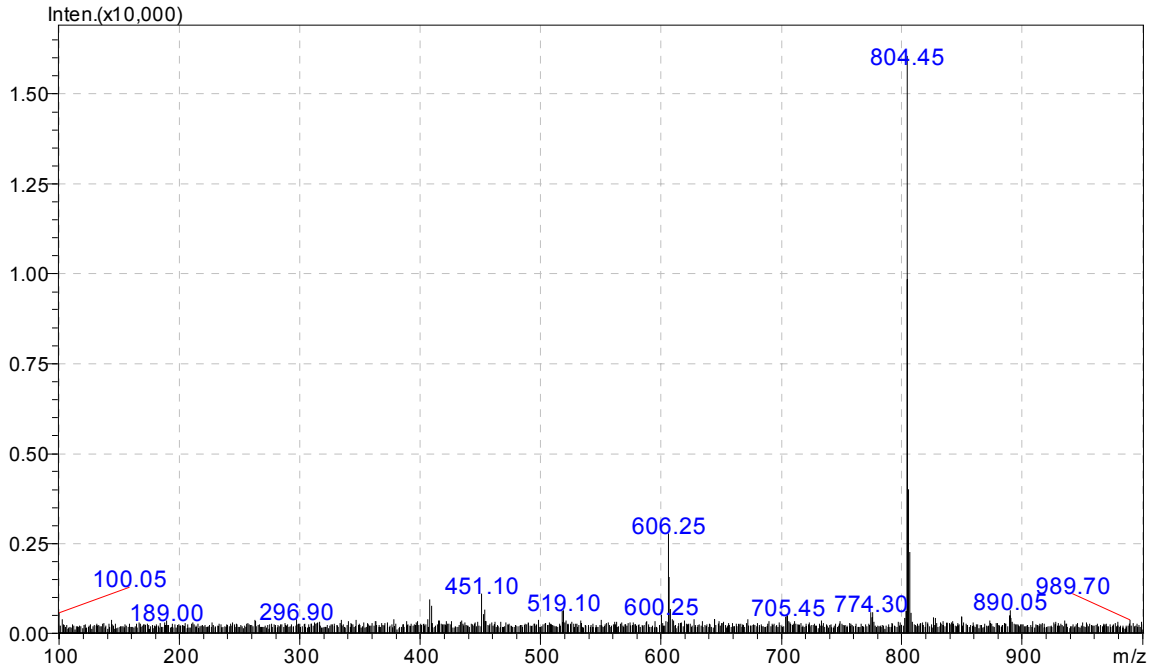
Şekil 4.47 Coomassie Blue Black boyasının kimyasal formülü (826 g/mol)



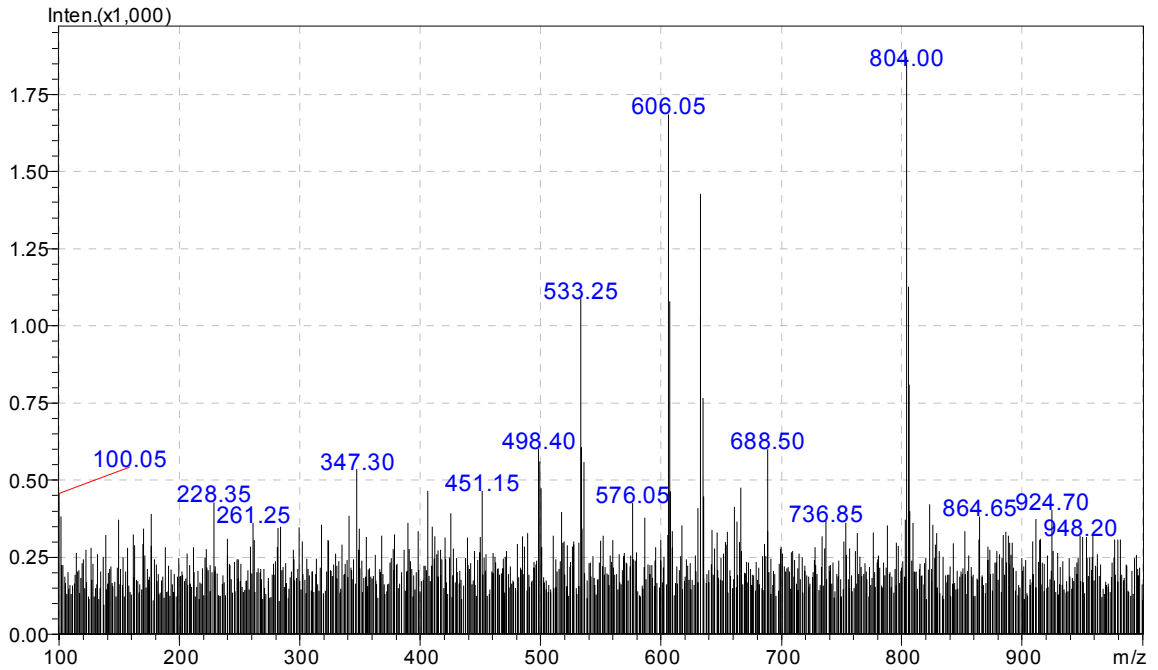
Şekil 4.48 Coomassie Brilliant Blue R-250 (siyah renkli kromatogram), saf HRP-Coomassie Brilliant Blue R-250 (0. dak, pembe renkli kromatogram) ve saf HRP-Coomassie Brilliant Blue R-250 (45. dak, kahve renkli kromatogram)'nın UV-VIS detektöründen (550 nm) alınan kromatogramları.



Şekil 4.49 Coomassie Brilliant Blue R-250'nin kromatogramının 18,9-19,4 dakikaları arasında alınan kütle spektrumu. $804.20 = (M+H^+)$



Şekil 4.50 Saf HRP-Coomassie Brilliant Blue R-250 nin 0. dakikada kromatogramın 18,9-19,4 dakikaları arasında alınan kütle spektrumu.



Şekil 4.51 Saf HRP-Coomassie Brilliant Blue R-250 nin 45. dakikada kromatogramın 18,9-19,4 dakikaları arasında alınan kütle spektrumu.

5. TARTIŞMA, SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Başlıca tekstil, deri, kağıt, kozmetik endüstrileri atıklarında bulunan boyalar, çoğu insan sağlığı için tehdit oluşturan önemli kirleticilerdir. Atık sularda boya gidermede koagülasyon, flokülasyon, ozonlama, fotokatalitik oksidasyon, membran ile ayırma, adsorpsiyon gibi yöntemler kullanılmakta ve bu konularda araştırma çalışmaları devam etmektedir. Son yıllarda, özellikle tekstil atıklarında bulunan azoboyar maddelerin enzim etkisi ile parçalanarak veya mikroorganizmalar kullanılarak giderilmesi konuları araştırma çalışmalarında yer almaktadır.

Bu çalışmada ilk defa olarak, “Horseradish” Peroksidaz-HRP- (Bayır Turru Peroksidazı) etkisi ile azo boyalardan “Naftol Blue Black” ve “Coomassie Brilliant Blue” nun giderilmesi, belirtilen enzimin ve diğer bazı peroksidazların endüstriyel atıklarda boya gidermede kullanılması dikkate alınarak incelendi. Satın alınan HRP %50 protein içerdiğinden, birlikte bulunan diğer maddeler ve özellikleri bilinmediğinden, enzim etkisinin doğru izlenebilmesi için affinite kromatografi yöntemi ile saflaştırılan enzim kullanıldı. Optimum koşulları belirlemek amacıyla reaksiyon farklı pH ve sıcaklıklarda gerçekleştirildi. Saf enzime göre ortam koşullarına daha dirençli olmalı düşüncesi ile reaksiyon sentezlenen HRP-dekstran konjugatı ile tekrarlandı. Atık sularda genellikle bulunan, proteinleri denatüre eden sodyum dodesil sülfat(SDS) ve üre varlığında reaksiyon gerçekleştirildi. Bu reaksiyonlar zamana bağlı UV-Vis. Spektrofotometrede izlendi.

HRP'nin “Naftol Blue Black”e etkisinin incelenmesinde saflaştırılan HRP ve HRP-dekstran konjugatı kullanıldı. Enzim reaksiyonun pH 4, 5, 6'da yüksek ve düşük sıcaklıklarda çok etkili olduğu görüldü. Ortamda üre veya SDS varlığında daha yavaş olmakla birlikte reaksiyonun gerçekleştiği görüldü. Enzim-dekstran konjugatı ile saf enzim kullanıldığında elde edilene benzer sonuçlar alındı. Daha önce grubumuzda yapılan çalışmada (Tez, M. Altıkatoğlu) tespit ettiğimiz dekstranın enzime termal direnç kazandırması, bu çalışmada belirgin sonuçlar ile gözlenmedi.

HRP'nin “Coomassie Brilliant Blue”e etkisi farklı pH ve sıcaklıklarda incelendi. Reaksiyonda saflaştırılmış enzim kullanıldı. Bu reaksiyonun yaklaşık ilk on dakikasında UV-Vis. spektrumlarında görünür bölgedeki absorpsiyon pikinde (620 nm) artma, daha sonra boya molekülünün parçalanması ile birlikte azalma görüldü. Reaksiyonda özellikle pH 5 olan ortamda 40°C ,50°C ,60°C sıcaklıklarda etkili oldu.

LC-MS sonuçlarına göre; “Naftol Blue Black” ve “Coomassie Brilliant Blue” boyalarının enzim etkisi olmadan önce alınan spektrumlarda mol tartılarının hesaplandığı pikler enzim reaksiyonları gerçekleştirildikten sonra görülmedi. Bu durum HRP enzimi etkisi ile boyaların parçalandığı şeklinde değerlendirildi. Sonuçlar alınan FTIR spektrumları ile desteklendi.

KAYNAKLAR

Al-Aseeri, M., Bu-Ali, O., Haji, S., Al-Bastaki, N., (2007), "Removal of Acid Red and sodium chloride mixtures from aqueous solutions using nanofiltration", *Desalination*, 206, 407–413.

Altıkatoğlu, M., HRP-Dextran Konjugatları, 2007, Doktora tezi, Y.T.Ü, Fen-Bilimleri Enstitüsü.

Andrzejewska, A., Krysztafkiewicz, A., Jesionowski, T., (2007), "Treatment of textile dye wastewater using modified silica", *Dyes and Pigments*, 75, 116-124.

Aniulyte, J., Liesiene, J., Niemeyer, (2006), "Evaluation of cellulose-based biospecific adsorbents as a stationary phase for lectin affinity chromatography", *Journal of Chromatography B*, 831, 24–30.

Betancor, L., López-Gallego, F., Hidalgo, A., Alonso-Morales, N., Fuentes, M., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J. M., (2004), "Prevention of interfacial inactivation of enzymes by coating the enzyme surface with dextran-aldehyde", *Journal of Biotechnology*, 110: 201–207.

Brink, H. B., Dekker, H. L., Schoemaker, H. E., Wever, R., (2000), "Oxidation reactions catalyzed by vanadium chloroperoxidase from *Curvularia inaequalis*", *Journal of Inorganic Biochemistry*, 80, 91–98.

Costa, F. A.P., Reis, E. M., Azevedo, J. C.R., Nozaki, J., (2004), "Bleaching and photodegradation of textile dyes by H₂O₂ and solar or ultraviolet radiation", *Solar Energy*, 77, 29–35.

Degrand, C., Martre, A., Limoges, B., Schöllhorn, B.,(2001), "Determination of horseradish peroxidase and a peroxidase-like iron porphyrin at a nafion-modified electrode", *Analyst*, 126(6), 887-891.

Franco Fragus, L., Batista-Viera F., Carlsson J., Preparation of high-density Concavalin A adsorbent and its use for rapid high-yield purification of peroxidase from horseradish roots, *J. Chromatogr. B.*, 2004, 803, 237-241.

Frijters, C.T.M.J., Vos, R.H., Scheffer, G., Mulder, R., (2006), "Decolorizing and detoxifying textile wastewater, containing both soluble and insoluble dyes, in a full scale combined anaerobic/aerobic system", *Water Research*, 40, 1249-1257.

Gong, R., Zhu, S., Zhang, D., Chen, J., Ni, S., Guan, R., (2008), "Adsorption behavior of cationic dyes on citric acid esterifying wheat straw: kinetic and thermodynamic profile", *Desalination*, 230, 220–228.

Gould, D. M., Spiro, M., Griffith, W. P., (2005), "Mechanism of bleaching by peroxides Part 6. Kinetics of the peroxide bleaching of methyl orange catalysed by MoO₄²⁻ and WO₄²⁻ at pH 10", *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 234, 145–150.

Gültekin, I., Ince, N.H., (2006), "Degradation of aryl-azo-naphthol dyes by ultrasound, ozone and their combination: Effect of α -substituents", *Ultrasonics Sonochemistry*, 13, 208-214.

Harrelkas, F., Paulo, A., Alves, M.M., El Khadir, L., Zahraa, O., Pons, M.N., van der Zee, F.P., (2008), "Photocatalytic and combined anaerobic–photocatalytic treatment of textile dyes", *Chemosphere*, 72, 1816–1822.

Ikehata, K., Buchanan, I.D., Pickard, M.A., Smith, D.W., (2005), "Purification, characterization and evaluation of extracellular peroxidase from two *Coprinus* species for

aqueous phenol treatment”, *Biosource Technology*, in pres.

Jain, R., Sikarwar, S., (2008), “Removal of hazardous dye conged from waste material”, *Journal of Hazardous Materials*, 152, 942–948.

Ju, D.J., Byun, I.G., Park, J.J., Lee, C.H., Ahn, G.H., Park, T.J., (2008), “Biosorption of a reactive dye (Rhodamine-B) from an aqueous solution using dried biomass of activated sludge”, *Bioresource Technology*, 99, 7971–7975.

Kundu, S., Panigrahi, S., Pal, A., Ghosh, S. K., Nath, S., Praharaj, S., Basu, S., Pal, T., (2006), “Dye-micelle aggregate formation for effective photobleaching”, *Dyes and Pigments*, 69, 177-184.

Kusic, H., Koprivanac, N., Srsan, L., (2006), “Azo dye degradation using Fenton type processes assisted by UV irradiation: A kinetic study”, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 181, 195-202.

Leon, J.C., Alpeeva, I.S., Chubar, T.A., Galaev, I.Y., Csoregi, E., Sakharov, I.Y., (2002), “Purification and Substrate Specificity of Peroxidase from Sweet Potato Tebers”, *Plant Science*, 163, 1011-1019.

Miranda, M.V., Magri, M.L., Cabrera, R.B., Fernandez, L. Ve Cascone, O., (2003), “Optimisation of Peroxidase Adsorption on Concanavalin A-Agarose”, *Latin American Applied Research*, 33, 67-71.

Mittal, A., Kaur, D., Mittal, J., (2008), “Applicability of waste materials-bottom ash and deoiled soya-as adsorbents for the removal and recovery of a hazardous dye, brilliant gren”, *Journal of Colloid and Interface Science*, 326, 8–17.

Mok, y. S., Jo, J., Whitehead, J. C., “Degradation of an azo dye Orange II using a gas phase dielectric barrier discharge reactor submerged in water”, (2008), *Chemical Engineering Journal*, 142, 56–64.

Nath, S., Ghosh, S. K., Panigrahi, S., Pal, T., (2004), “Photolytic color bleaching of cationic dyes in presence of selenious acid in aqueous and micellar environments”, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 244, 31–37.

Rodriguez-Lopez, J.N., Gilabert, M.A., Tudela, J., Thorneley, R.N., Garcia-Canovas, F.,(2000), “Reactivity of Horseradish Peroxidase Compound II toward Substrates: Kinetic Evidence for a Two-Step Mechanism”, *Biochemistry*, 39, 13201-13209.

Tatsumi K, Wada K, Ichikawa H. (1996), “Removal of chlorophenols from wastewater by immobilized horseradish peroxidase”, *Biotechnol Bioeng* 51:126–130.

Ulson de Souza, S. M. A. G., Forgiarini, E., Ulson de Souza, A. A., (2007), “Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP)”, *Journal of Hazardous Materials*, 147, 1073–1078.

Veitch, N.C. ve Nigel, C., (2004), “Horseradish Peroxidase: A Modern View of a Classic Enzyme” *Phytochemistry*, 65,3:249-259.

Wagner, M., Nicell, J. A., (2002), “Detoxification of phenolic solutions with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide”, *Water Research*, 36, 4041-4052.

Zhang, Z., Xia, S., Wang, X., Yang, A., Xu B., Chen, L., Zhu, Z., Zhao, J., Jaffrezic-Renault, N., Leonard, D., (2008), “A novel biosorbent for dye removal: Extracellular polymeric

substance (EPS) of *Proteus mirabilis* TJ-1”, Journal of Hazardous Materials.

İnternet Kaynakları

[1] http://www.thais.it/.../schedeit/sc_0028a.htm

[2] <http://www.unige.ch/LABPV/publications/silaghi/Dumitrescu.html>

ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi	21.02.1968
Doğum yeri	İstanbul
Lise	1982-1985 Şişli Terakki Lisesi
Lisans	1985-1990 Yıldız Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü
Yüksek Lisans	1994-1997 Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı
Doktora	1998-2008 Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı