

T.C.

171038



GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SÜREKLİ AKIŞLI KESİKLİ YÜKLEMELİ
FENOL SENSÖRLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

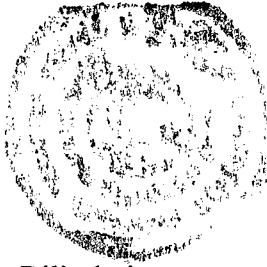
Şeyda KORKUT
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

I. Prof. Dr. Bülent KESKİNLER
II. Doç.Dr.Aziz TANRISEVEN

GEBZE

2005



Şeyda KORKUT'un tez çalışması G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 28/12/2004 tarih ve 2004/46 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından Çevre Mühendisliği Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

Bülent Keskinler

ÜYE : Prof.Dr. Bülent KESKİNLER
(1.Tez Danışmanı)

Aziz Tanriseven

ÜYE : Doç.Dr. Aziz TANRISEVEN
(2.Tez Danışmanı)

Elif Erhan

ÜYE : Doç.Dr. Elif ERHAN

Gülde Engin

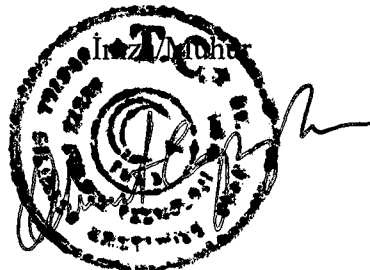
ÜYE : Yrd.Doç.Dr. Gülde ENGİN

Ahmet Karagündüz

ÜYE : Yrd.Doç.Dr. Ahmet KARAGÜNDÜZ

ONAY

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
...03.02.2005... tarih ve ...2005/6... sayılı kararı.

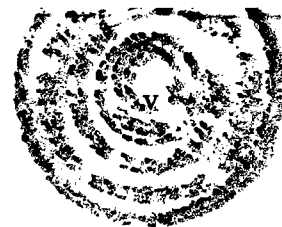




ÖZET

Çalışmada, enzim tabanlı bir fenol sensörü geliştirilmiştir. Horseradish peroksidaz enzimi, disk şeklinde kesilmiş poligluteralehit ile aktive edilmiş polistiren bir polimere kimyasal olarak bağlanmıştır. Diskten geçen sürekli akışa, bir enjektörle, 0,5-2 mM konsantrasyon aralığında fenol yüklemeleri yapılmış, UV-Spektrofotometreden fenol pikleri elde edilmiştir. Enzimatik reaksiyon için gerekli optimum hidrojenperoksit miktarı belirlenmiştir. Farklı akış debilerinde diskin davranışı incelenmiş ve diskin V_m ve K_m değerleri belirlenmiştir. Katkı maddesi olarak kullanılan tetrametilbenzidin'in sistem üzerine etkisi araştırılmıştır.

Reaksiyon ortamında, optimum hidrojen peroksit miktarının, fenolün 1,5 katı olduğu belirlenmiştir. Sistemin difüzyon ve kimyasal kontrollü bölgeleri belirlenmiştir. Serbest enzim için V_m değeri $667 \mu\text{mol/dak-mg}$ enzim, K_m değeri 6,26 mM bulunmuştur. Tetrametilbenzidin varlığında aktivitenin arttığı görülmüş, aktivitenin maksimum arttığı tetrametilbenzidin konsantrasyonu 0,64 mM olarak belirlenmiştir. Disk oda koşullarında saklandığında, 12. günün sonunda ilk aktivitesinin % 56'sını koruyabilmiştir. Sistemin fenol sensörü olarak kullanılabilmesi için, 4-aminoantiprinin gerekli olduğu belirlenmiştir.



SUMMARY

In this study, an enzymatic phenol sensor was developed. Horseradish peroxidase enzyme was chemically immobilised to a polystyrene polymer, activated by polygluteraldehyde. Phenol was injected to continuous flux of the disk between 0.5 and 2 mM concentration and phenol peaks were obtained by UV-Spectrophotometer. Optimum hydrogen peroxide amount required for enzymatic reaction was determined. The disk behavior was investigated at different flow rates and, V_m and K_m were determined. The effect of tetramethylbenzidine on the system as an additive was investigated.

It was stated that the optimum amount of hydrogen peroxide was 1.5 times the phenol amount for the reaction. Diffusion and chemical controlled regions of the system were determined. V_m and K_m values for the free enzyme was found as 667 $\mu\text{mol}/\text{min-mg}$ enzyme and 6,26 mM, respectively. It was observed that the activity was increased in the presence of tetramethylbenzidine and the maximum activity was obtained at 0,64 mM tetramethylbenzidine concentration. The disk preserved 56% of its initial activity at the end of 12 th day when stored at room temperature. It was determined that 4-Aminoantipyrine was required for the system to be used as a phenol sensor.



TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda, bana her türlü imkanı sağlayan,engin bilgilerinden yararlandığım çok kıymetli hocam Prof. Dr. Bülent KESKİNLER'e teşekkürlerimi sunarım. Çalışmamı yakinen takip edip, her zaman yardımcı olan değerli hocam Doç Dr. Aziz TANRISEVEN'e, çalışmam süresince, bilgisini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen fedakar hocam Doç Dr. Elif ERHAN'a ve gerek bana, gerekse de çalışma grubumuzdaki tüm arkadaşlarıma yardımcı olan ve yakın ilgi gösteren değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Ahmet KARAGÜNDÜZ'e teşekkür ederim.

Çalışmam süresince, bana sonuna kadar destek olan ve hiçbir yardımı esirgemeyen, her konuda her şeyimi paylaştığım kıymetli çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Derya Yüksel KÖSEOĞLU'na, Arş. Gör. Aras GEZER'e ve Arş.Gör. İbrahim DEMİR'e bu teze katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Uzakta bulunan kıymetli aileme çalışmam süresince gösterdikleri destek ve anlayış için teşekkür ederim.

Şeyda KORKUT



İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. FENOLÜN TANIMI VE ÇEVRESEL AÇIDAN ÖNEMİ	3
2.1. Fenollü Atıksu Kaynakları	3
2.2. Fenol Arıtım Metotları	4
2.2.1. Kimyasal Oksidasyon	5
2.2.2. Fizikokimyasal Metotlar	6
2.2.3. Biyolojik Metotlar	7
3. ENZİMLERE GENEL BAKIŞ	9
3.1. Enzimlerin Yapısı ve İşleyişi	9
3.2. Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması	10
3.3. Enzimlerin Çalışmasına Etki Eden Faktörler	11
3.3.1. Sıcaklık	11
3.3.2. pH	12
3.3.3. Enzim/Substrat Derişimi	12
3.3.4. Diğer Kimyasal Maddeler ve Suyun Etkisi	12
3.4. Enzim Kinetiği	13
3.5. Fenol Parçalayan Enzimler (Fenol oksidazlar)	14
3.5.1. <i>Peroxidase</i>	14
3.5.1.1. <i>Horseradish peroxidase</i> (HRP)	16
3.5.1.2. <i>Chloroperoksidaz</i> (CPO)	22
3.5.1.3. <i>Lignin peroxidase</i> (LPO)	22
3.5.1.4. <i>Manganase peroxidase</i> (MnP)	23

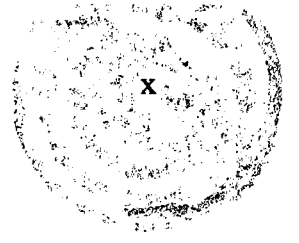


3.5.2. *Laccase*

3.5.3. *Tyrosinase*

4. BİYOSENSÖRLER	28
4.1. Biyosensörlerin Çalışma Prensibi	30
4.2. Enzim İmmobilizasyon Metotları	31
4.2.1. Fiziksel Tutuklama	32
4.2.2. Kimyasal İmmobilizasyon	32
4.2.2.1. Fonksiyonel Maddelerle Çapraz Bağlama	32
4.2.2.2. Suda Çözünmeyen Desteklere Çapraz Bağlama	33
4.2.2.3. Elektrot Yüzeyine Direkt Bağlama	33
4.3. Elektrokimyasal Sensörler	34
4.3.1. Potansiyometrik Sensörler	34
4.3.2. Amperometrik Sensörler	36
4.4. Enzim Elektrotlarının Özellikleri	36
4.4.1. Stabilite	36
4.4.2. Sinyal Süresi	37
4.4.3. Seçicilik	38
4.4.3.1. Elektrot Probu ile Etkileşim	38
4.4.3.2. Biyokatalist Reaksiyonu ile Etkileşim	38
4.4.4. pH' nın Etkisi	39
4.4.5. Nicel Belirlemeler ve Belirleme Limiti	39
4.5. Fenol Sensörleri	40
5. MATERYAL – METOT	47
5.1. Materyal	47
5.2. Metot	47
5.2.1. Biorad Protein Analizi	47
5.2.2. Enzimatik Fenol Tayini	48
5.2.3. Polimer Disklerin Hazırlanması	49
5.2.4. Enzim İmmobilizasyonu	51
5.2.5. İmmobilize Enzim Miktarının Belirlenmesi	51
5.2.6. Serbest Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi ve Serbest Enzim Kinetiği	52

5.2.7. İmmobilize Enzim Aktivitesi ve İmmobilize Enzimin Görünür Aktivitesinin Belirlenmesi	53
5.2.8. Deneylerin Yapılışı	53
5.2.8.1. Deney Düzenegi	53
5.2.8.2. İmmobilize Sistem Kullanılarak Ürün Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanışı	55
5.2.8.3. İmmobilize Sistemde Farklı Debilerde Disk Davranışının İncelenmesi	56
5.2.8.4. Tetrametilbenzidinin Etkisinin Belirlenmesi	56
6. BULGULAR VE TARTIŞMA	57
6.1. Serbest Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi ve Serbest Enzim Kinetiği	57
6.2. Sensör Çalışmaları	58
6.2.1. 4-Aminoantiprinin Etkisinin Araştırılması	58
6.2.2. İmmobilize Sistem Kullanılarak Yapılan Ürün Kalibrasyon Eğrilerinin Yorumlanması	60
6.2.3. İmmobilize Sistemde Farklı Debilerde Disk Davranışının Belirlenmesi	72
6.2.4. Tetrametilbenzidinin Etkisinin Belirlenmesi	79
6.2.5. İmmobilize Enzimin Stabilitesi	82
7. SONUÇ	83
KAYNAKLAR	84
ÖZGEÇMİŞ	90



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BOİ	Biyolojik Oksijen İhtiyacı
KOİ	Kimyasal Oksijen İhtiyacı
CPO	Kloroperoksidaz
LPO	Lignin peroksidaz
MnP	Mangan peroksidaz
BSA	Bovin Serum Albumin
TMB	Tetrametilbenzidin
S	Substrat Konsantrasyonu
V	Spesifik Aktivite
V _m	Maksimum Hız
K _m	Yarı Doygunluk Sabiti
S ₀	Başlangıç Substrat Konsantrasyonu



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. <i>Horseradish peroxidase</i> Enziminin 4-Aminoantiprin Varlığında Fenolü Kataliz Reaksiyonu	2
3.1. Anahtar-Kilit Modeli	10
3.2. <i>Peroxidase</i> Enziminin Prostetik Grubu (ferric protoporphyrin IX)	16
4.1. Biyosensör ve Ana Elamanları	29
4.2. Potansiyometrik Gaz Probu	35
5.1. Protein Kalibrasyon Eğrisi	48
5.2. Enzimatik Metoda Göre Fenol Kalibrasyon Eğrisi	49
5.3. Boş Polimerin SEM Mikrografi	50
5.4. Deney Düzeneği	54
5.5. Disk Tutucu	55
6.1. Serbest Enzim İçin Lineweaver-Burk Grafiği	58
6.2. 4-Aminoantiprinsiz Reaksiyon Ortamında İmmobilize Sistemin Davranışı	60
6.3. 0,1 mL/dak Debide Ürün Kalibrasyonu	61
6.4. 0,5 mL/dak Debide Ürün Kalibrasyonu	61
6.5. 1 mL/dak Debide Ürün Kalibrasyonu	62
6.6. 2 mL/dak Debide Ürün Kalibrasyonu	62
6.7. 2,5 mL/dak Debide Ürün Kalibrasyonu	63
6.8. 3 mL/dak Debide Ürün Kalibrasyonu	63
6.9. 3,5 mL/dak Debide Ürün Kalibrasyonu	64
6.10. 4 mL/dak Debide Ürün Kalibrasyonu	64
6.11. 6 mL/dak Debide Ürün Kalibrasyonu	65
6.12. 8 mL/dak Debide Ürün Kalibrasyonu	65
6.13. 10 mL/dak Debide Ürün Kalibrasyonu	66
6.14. 13 mL/dak Debide Ürün Kalibrasyonu	66
6.15. 14 mL/dak Debide Ürün Kalibrasyonu	67
6.16. 15 mL/dak Debide Ürün Kalibrasyonu	67
6.17. Bütün Debiler İçin Ürün Kalibrasyonu	68
6.18. Farklı Debilerde 2 mM Fenol Yüklemeleri	69



6.19.	1 mL/dak Debide Farklı Konsantrasyonlarda Fenol Yüklemeleri	
6.20.	1mL/dak Debide 0,5 mM Fenol Yüklemeleri	
6.21.	1mL/dak Debide Tekrarlanan 0,5 mM Fenol Yüklemelerinde Alanların Değişimi	71
6.22.	0,5, 1, 2, 2,5, 3 mL/dak Debilerde Lineweaver-Burk Grafikleri	75
6.23.	3,5, 4, 6, 8 mL/dak Debilerde Lineweaver-Burk Grafikleri	75
6.24.	Farklı Debiler İçin Debi-Spesifik Aktivite Grafiği	76
6.25.	Debi- V_m Grafiği	77
6.26.	Debi- K_m Grafiği	77
6.27.	İmmobilize Sistemde Akış Hızının Reaksiyon Hızı Üzerine Etkisi	78
6.28.	Farklı Debiler İçin Başlangıç Fenol Konsantrasyonu-Spesifik Aktivite Grafiği	79
6.29.	Tetrametilbenzidinin Aktiviteye Etkisi	80
6.30.	0,64 mM Tetrametilbenzidin Varlığında Lineweaver-Burk Grafiği	81
6.31.	Tetrametilbenzidin İçermeyen Ortamda Lineweaver-Burk Grafiği	82



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge

Sayfa

3.1. Enzim Sınıfları	11
3.2. Yaygın Olarak Bulunan <i>Peroxidase</i> Enzimleri	15
3.3. <i>Horseradish peroxidase</i> Enziminin Genel Özellikleri	16
3.4. Modifiye Edilmiş <i>Horseradish peroxidase</i> Enziminin Fenol Giderme Verimlerinin Karşılaştırılması	21
6.1. Serbest Enzim Kinetiği Sonuçları	57
6.2. Debi Çalışmaları Sonuç Çizelgesi	73
6.3. Tetrametilbenzidinin Aktiviteye Etkisi	81

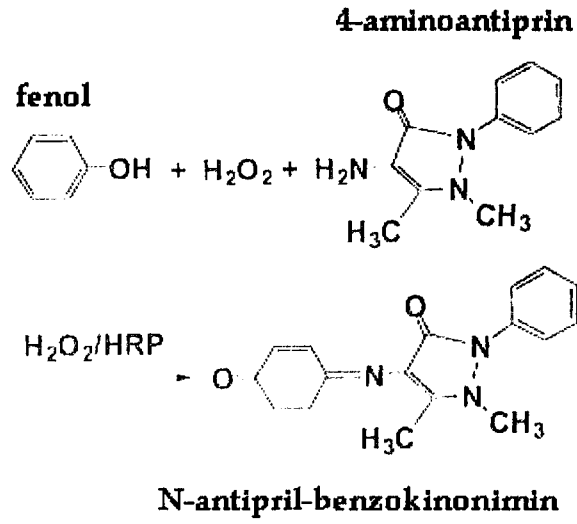


1. GİRİŞ

Enzimler hücrelerde biyokimyasal reaksiyonları katalize eden proteinlerdir. hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler artık çok çeşitli amaçlar için kullanılmak üzere günlük hayata girmişlerdir. Pekçok endüstriyel, analitik ve klinik proseslerde enzimler substrat çözeltisi ile karşılaştırılırlar ve ürüne dönüştürüldükten sonra ekonomik olarak geri kazanılamazlar. Enzimlerin sadece bir kere kullanılmaları, pahalı olmaları nedeni ile büyük masraflara neden olmaktadır. Bu nedenle immobilize olarak defalarca kullanılmaları ekonomik olarak daha makul olmakla birlikte enzimatik prosesler sürekli olarak da yapılabilmektedir. Günümüzde çok sayıda immobilize enzim endüstride ve arıtımda kullanılmaktadır.

Biyomühendislik ve biyoteknolojideki dinamik gelişmeler, atıksu ortamlarındaki substrat konsantrasyonlarının hızlı ve güvenilir olarak belirlenebilmesi ve izlenebilmesi açısından imkan sağlamaktadır. Enzim tabanlı ölçüm sistemlerinin yüksek seçiciliği, kesikli yüklemeli sistemlerin avantajlarıyla birleşerek atıksu ortamlarında ölçümü istenen substratlar için hızlı ve güvenilir bir proses izlemesi sağlar. Bu amaçla, *tyrosinase*, *laccase* ve *peroxidase* enzimleri amperometrik ve potansiyometrik sensör sistemlerinde yaygın olarak kullanılır. Sensör sistemleri, içerdikleri biyokomponentler sayesinde hızlı ve güvenilir ölçümler sağlar, taşınabilir ve pratik sistemlerdir. Kirleticinin yerinde izlenebilmesi için rahatlıkla kullanılabilirler ve ölçümleri basittir.

Bu çalışmanın amacı, *horseradish peroksidase* enzim tabanlı bir polistiren membranın fenol sensörü olarak kullanılabilirliğinin araştırılmasıdır. Çalışmada, *horseradish peroxidase* enziminin fenolü kataliz reaksiyonu standart fenol tayin metodunda belirtilen 4-aminoantipren metoduna dayalıdır. Ortamda bulunan fenol, *peroxidase* enzimi ile reaksiyona girer ve fenoksi radikallerine dönüştürülür. Oluşan bu radikaller 4-aminoantipren ile birleşerek renkli bir ürün olan N-antiptil benzokinonimini meydana getirirler (Şekil 1.1) (Wu, 1993).



Şekil 1.1. *Horseradish peroxidase* Enziminin 4-Aminoantiprin Varlığında Fenolü Kataliz Reaksiyonu

Çalışmada ayrıca reaksiyon ortamına ilave edilen katkı maddelerinin enzim aktivitesine etkisi, substrat yüklemelerindeki optimum dozlar ve enzimi saklama şartları incelenmiştir. Farklı akış hızlarında disk davranışı ve buna bağlı olarak V_m ve K_m değerleri hesaplanmıştır. Sistemin kararlılığı ve 4-Aminoantiprinin sistem için gerekliliği belirlenmiştir.

2. FENOLÜN TANIMI VE ÇEVRESEL AÇIDAN ÖNEMİ

Fenoller bir benzen yada benzenoid halkasına direkt olarak bağlanmış bir hidroksil grubu içeren bileşiklerdir. Fenol, bu grubun ana bileşiği olan monohidroksibenzen (C_6H_5OH) verilen spesifik bir isimdir. İlk olarak 1839 yılında F. Runge tarafından kömür katranından ayrılmış ve “karboksilik asit” olarak adlandırılmıştır. Bu tarihten sonra I.Dünya Savaşı yıllarında fenolün benzene sülfolanması ve sülfonun hidrolizi yoluyla ilk defa sentetik olarak elde edilmesine kadar geçen sürede kömür katranı fenol elde edilmesine kullanılan tek kaynak olma özelliğini korumuştur. Bugün fenol tamamen sentetik yöntemlerle elde edilmektedir.

Fenoller, yüksek toksiditeye, yüksek oksijen ihtiyacına (2,4 mg O_2 / mg fenol) sahip, biyolojik olarak ayrışabilir bir kirleticidir. 2 mg/L'nin üstündeki konsantrasyonlarda balıklara toksik etki yapar, 10-100 mg/L konsantrasyonları arasında da sucul yaşamın ölümüne neden olur.

Küçük molekülü fenol bileşikleri katı veya erime noktaları oda sıcaklığına yakın olan sıvılardır ve suda az çözünür. Örneğin, fenol suda yaklaşık olarak % 9 çözünür. Büyük molekülü bileşiklerin suda çözünürlüğü daha azdır, ama eter, alkol, benzen gibi organik çözücülerde çözünürler. Kaynama noktaları, aromatik hidrokarbon ve halojen bileşiklerine göre daha yüksektir. (Korkut ve ark., 2001)

2.1. Fenollü Atıksu Kaynakları

Fenol, en önemli endüstriyel atıksu içeriklerinden biridir. Fenolik atıklar kok ve petrol rafinelerindeki üretim sırasında ortaya çıkmaktadır. Ayrıca plastik ve sentetik reçine, tekstil, kimya ve boya endüstri atıksularında da istenmeyen derişimlerde fenol içermektedir. Fenol içeren atıksuların diğer kaynakları arasında orlon üretim

tesisleri, yağ rafinerileri, patlayıcı üretim tesisleri, kağıt üretim tesisleri, kostik havali temizleyiciler, azot işleri, fiberglas üretimi, dökümhaneler ve kullanılmış kauçukların geri kazanıldığı tesisler gösterilebilir.

İçme sularında ve besin endüstrisi sularında fenolün varlığı suyun tadını bozar. Fenol içeren su klorlandığında zehirli poliklorlu fenoller oluşur. EPA (Enviromental Protection Agency) yüzey sularının 1 ppb'den az fenol içerebileceğini belirtmektedir.

Fenolün sularda bulunmasına müsaade edilen maksimum konsantrasyonu Su Kirliliği Kontrol Yönetmeliği'ne göre kanalizasyon sistemleri tam arıtma ile sonuçlanan atıksu alt yapı tesislerinde 20 mg/L, deniz deşarjı ile sonuçlanan sistemlerde 10 mg/L' dir.

Fenolün antropojenik kaynakları; orman yangınları ve lingo selulozik materyallerin doğal bozunmasıdır (Korkut ve ark., 2001).

2.2. Fenol Arıtım Metotları

Fenollü atıksuların arıtılması için çeşitli arıtma teknolojileri vardır ve çoğu zaman bu metotların uygulanması birbiri içine girmektedir. Hem fizikokimyasal hem de biyolojik arıtım yöntemleri endüstriyel ölçekli tesislerde başarıyla uygulanmakta ve oldukça iyi arıtım verimlerinin elde edildiği bildirilmektedir (Yıldız, 1998).

Karbonizasyon işlemi sırasında oluşan fenollü atıksular, kimyasal ve biyolojik yöntemler kullanılarak arıtılmaktadır. Kimyasal olarak arıtma işleminin esası defenolizasyondur. Yüksek fenol kirliliği içeren atıksulardan fenolü gidermek için çeşitli ayırma işlemleri uygulanmaktadır. Bu işlemler, atık fenolün NaOH ile ekstraksiyonu, aktif karbon veya kömür külüne adsorpsiyon ve kimyasal oksidasyon olarak kısaca özetlenebilir.

Fenolün geri kazanımı, gerek suların arıtımı gerekse de endüstrinin çeşitli kollarında kullanılan bir madde olarak üretim ekonomisine yeniden kazandırılmasını sağlamakla birlikte oldukça pahalı bir işlemdir. Gerektirdiği ileri teknoloji ve teknik işletim kapasitesi açısından, ancak oldukça iyi donanımlı ve yüksek üretim kapasitesine sahip endüstriyel tesislerde fenol geri kazanılabilmektedir. Yalnızca

fenol arıtımının önerildiği durumlarda ise biyolojik yöntemler kullanılır. Biyolojik arıtma; biyofiltreler, aktif çamur yöntemi, uzun havalandırmalı aktif çamur sistemleri ve doğal sulama yatakları şeklinde farklı yöntemlerle uygulanabilmektedir (Erhan, 1995).

2.2.1. Kimyasal Oksidasyon

Su ve atıksu arıtımında kimyasal oksidasyonun kullanılmasının amacı istenmeyen kimyasal maddelerin zararsız forma dönüştürülmesidir. Çoğunlukla oksidasyon işlemi son aşamaya kadar sürdürmek uygun değildir. Fenol istenirse karbondioksit ve suya kadar oksitlenebilir. Ancak koşulların ayarlanmasıyla ara kademelerde de zararsız oksidasyon ürünleri elde edilebilir. Eğer bu ara ürünler zararsız iseler daha ileri oksitlemeye zaman ve ekonomi açısından gerek yoktur. Bu amaçla kullanılan oksidant maddeler, ozon, permanganat, klor, klor dioksit gibi maddelerdir (Şengül ve Küçükgül, 1988).

Atıksuların kolayca biyolojik ayrışmaya uğratılamayacak nitelikte olması ve fizikokimyasal arıtımın da pahalı olması nedeniyle elektrokimyasal oksidasyon son zamanlarda klasik giderim yöntemleri yerine getirilmiştir. Çünkü, Fenolün elektrokimyasal yıkımı boyunca oluşan polimer ürünler elektrotların üzerinde birikir. Bu birikim elektrotu pasifleştirerek yeni reaktantların uygulanmasını ve oluşan ürünlerin reaksiyon bölgesinden giderimini engeller. Bu aynı zamanda, reaksiyonun sürmesi için gerekli potansiyelin azalmasına neden olur. Arıtımda, ortama iletkenliği arttırıcı bir elektrolit eklenir. Literatürde Na_2SO_4 , H_2SO_4 , NaCl gibi elektrolitlerin kullanıldığı belirtilmiştir (Körbahtı ve Tanyolaç, 2003).

Islak hava oksidasyon prosesi, yüksek sıcaklık ve basınç gerektirir. Ozonlama, çok güçlü bir teknoloji olmasına rağmen, ozonun çözünürlüğü sınırlıdır ve ömrü çok azdır. Bu sebeple, proste yüksek enerji tüketilir. Ozon, bileşiklerle iki yolla reaksiyona girer; ilki, moleküler ozon doğrudan bileşiğe etki eder. İkincisi, ozonun bozulması sonucu oluşan radikaller bileşiklerle dolaylı olarak reaksiyona girer. H_2O_2 ile arıtım, alternatif kimyasal oksidasyon proseslerine yardımcıdır. Eğer hidroksil radikalleri fotokimyasal olarak oluşuyorsa, H_2O_2 'nin tüketim katsayısının düşüklüğü nedeniyle prosesin maliyeti yüksek olur (Catrinescu et al., 2003).



Fenolün ozonla oksidasyonunda, oksidatif bağlanma söz konusudur. Prosesin ilk basamağında, fenolden 1 elektron kopmak suretiyle fenoksi radikalleri oluşur. Sonra iki ya da daha çok radikal birbirleriyle bağlanarak düşük çözünürlüğe sahip polimerleri oluştururlar (Wu et al., 2000).

2.2.2. Fizikokimyasal Metodlar

Toksik organik bileşiklerin arıtımında adsorpsiyon proseslerinin kullanılması oldukça etkili sonuçlar vermektedir. Özellikle taneli aktif karbon bu alanda kullanılan en yaygın adsorbent maddedir (Korkut ve ark., 2001).

Fenoller, aktif karbon üzerine geri dönüşümsüz olarak adsorbe olurlar. Düşük pH değerlerinde, H^+ iyonları fenolün iyonizasyonunu engellediğinden dolayı fenol giderimi çok azdır. Yüksek pH değerlerinde fenol, tuzları oluşturur ki bu tuzlar fenolik grup üzerindeki negatif yükü iyonize eder. Aynı zamanda, adsorbent üzerinde OH^- iyonlarının varlığında adsorpsiyon önlenir. Proses için uygun pH 6,2'dir (Rengaraj et al., 2002).

Mangal kömürü, taş kömürü, linyit gibi hammaddelerden elde edilip, buharla aktiveleştirilen aktif karbon, atıksulardan çeşitli konsantrasyonlarda fenollerin adsorpsiyonu için uygundur.

Giusti ve arkadaşları (1999) tarafından yapılan adsorpsiyonla fenol giderimi ile ilgili bir çalışmada 5 g/L'lik karbon dozajı ve 2 saatlik bir temas süresi sonucunda 1000 mg/L'lik başlangıç fenol konsantrasyonunun 194 mg/L'ye düştüğünü ve maksimum adsorpsiyon miktarının da (x/m) 0,161 (mg/g) olduğunu bulmuşlardır.

Bugüne kadar yapılan çalışmalar incelendiğinde, adsorpsiyon üzerinde sıcaklık, pH, adsorbent ve adsorbantın cins ve konsantrasyonlarının etkin parametreler olduğu görülmüştür (Korkut ve ark., 2001).



2.2.3. Biyolojik Metodlar

Biyolojik arıtım, çözünmüş organik maddelerin mikroorganizmalar tarafından parçalanarak giderilmesi işlemidir. Çok sayıda bakteri ve fungus aromatik bileşiklerini karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilmektedir. Fenolün biyolojik olarak ayrışması gerek serbest, gerekse de immobilize mikroorganizmaların kullanılmasıyla gerçekleştirilir. Yeterli bir biyolojik arıtma verimi elde edebilmenin temel koşulu, toksik madde konsantrasyonunu belirli seviyede tutmaktır. Tesislerdeki en önemli işletim problemlerinden biri bundan kaynaklanır. Toksik madde limit değerleri tesisin toplam organik madde içeriğine ve işletme verimine bağlıdır. Doğal biyolojik arıtma (sulama ve filtre yatakları) için fenol limiti 125-500 mg/L'dir. Bununla birlikte iyi bir arıtım için katran ve yağların tamamen, azot bileşiklerinin ise kısmen arıtılması gereklidir. Gerek yağ gerekse bazı azot bileşiklerini mikroorganizmaların gelişimi açısından olumsuz etki yaratabilirler.

Kok ve Havagazı Fabrikalarından gelen fenollü atıksuların arıtımında iki kademeli damlatmalı filtreler kullanılır. Filtre yatağı, yüksek fırın cürufu veya granit mıcırı ile doldurulur. İkinci filtrenin yatağında kullanılan malzemenin çapı birincinininkinden %25-30 daha küçüktür. Birinci filtre yatağına gelen maksimum fenol konsantrasyonu 800 g/m³ den daha fazla olmamalıdır (Korkut ve ark., 2001).

Fenollü atıksuların arıtımında, aktif çamur yöntemi de kullanılmaktadır. Bunun için fenollü atıksulara evsel atıksu ilavesi gereklidir. Fenol içeriğinin arıtılmasına bağlı olarak gerekli hava miktarı ve havalandırma süresi de artar. Fenollü atıksuların biyolojik arıtımında, organik madde konsantrasyonu, pH ve arıtma derecesi önemli faktörlerdendir. Havalandırma havuzlarına gelen fenol konsantrasyonu 600 mg/L'ye kadar ulaşabilmektedir. Fenollü atıksuların arıtımı için biyolojik arıtma sistemlerinin tasarımında sadece fenol değil, BOİ ve KOİ değerleri de esas alınır. Biyolojik arıtmaya verilebilecek maksimum fenol konsantrasyonu tesisin tipine ve kapasitesine bağlıdır. Damlatmalı filtrelerle verilen organik yükleme günde 400-500 g BOİ/m³ ve aktif çamur tesislerine verilen değer günde 1000-1200 g BOİ/m³ değerinden fazla olmamalıdır.

Fenol arıtımında biyolojik saf kültür kullanımı, çok yaygın kullanım alanı bulamamıştır. Arıtma proseslerinde daha çok, karışım kültürleri kullanılmaktadır. Gelişen bakteri ve mikroorganizma türleri yalnızca fenolü değil atıksu içerisindeki diğer toksik bileşikler de ayrıştırmaya yaramaktadır. Defenolizasyon proseslerinde bakteriyel aktivite için uygun miktarda mineral tuzları, azot ve fosfor da gereklidir

Biyolojik ve biyokimyasal fenol giderme yöntemleri daha önce bahsedilen geri kazanım yöntemlerine göre pahalıdır. Kimyasal oksidasyon işlemlerine göre ise daha ekonomiktir. Yine de endüstriyel atıksularının arıtımında en az tercih edilen yöntemler olarak tanınırlar.

Biyolojik arıtma tesislerine eğilimin artması ile birlikte yüksek verimli teknolojiler de hızla gelişmektedir. Kentsel atıksularda havalandırma havuzunun birim hacmine oldukça fazla BOİ yükü düşebilir, fenollü atıksuların böyle yüksek yüklemde çalışması zor olmaktadır. Fenol giderim oranı yük artmasıyla hızla düşmektedir. Bu durum düşük fenol konsantrasyonlarında sorun olabilmektedir. Buna rağmen yükleme ayarlandığında aktif çamur tesislerinde fenolü tam olarak ayırmak mümkündür (Erhan, 1995).

Günümüzde enzimlerin birçok arıtım prosesinde uygulanmasına ilişkin çalışmalar gittikçe artmıştır. Bu sebeple gelişen biyoteknolojide, daha iyi izolasyon ve saflaştırma teknikleriyle enzimlerin ucuz ve kolay temini gerçekleştirilmektedir. Enzimlerle arıtım tekniklerinin konvensiyonel arıtım tekniklerine göre avantajları; geniş pH aralıklarında yüksek ve düşük kirletici konsantrasyonlarına rahatlıkla uygulanabilirlik, geniş bir sıcaklık ve tuzluluk aralığında uygulanabilirlik, kolay proses kontrolü şeklinde sıralanabilir (Duran and Esposito, 2000).

3. ENZİMLERE GENEL BAKIŞ

3.1. Enzimlerin Yapısı ve İşleyişi

Enzimler, biyolojik sistemlerdeki reaksiyonların canlılığa zarar vermeyecek ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan biyokatalizörler olarak tanımlanırlar. Bir başka deyişle, enzimler katalitik aktivite gösteren proteinlerdir. Her biyolojik dönüşüm bir enzim tarafından katalizlenir. Özgül, geniş kullanım alanlı ve oldukça etkin biyokatalistler olup, kimyasal katalistlere kıyasla çok daha hızlı tepkime verirler. Yeterli koşulların sağlanması durumunda etkilerini gösterebiliyor olmaları, enzimlerden doğal ortamlarının dışındaki pek çok alanda yararlanabilme imkanını ortaya çıkarmaktadır. Bu nedenle enzimlere ilişkin tüm nitelik ve özellikleri bir bütün olarak inceleyen enzimoloji bilim dalı, başta biyokimya ve moleküler biyoloji olmak üzere fizyokimya, bakteriyoloji, mikrobiyoloji, genetik, botanik, tarım, farmakoloji, toksikoloji, patoloji, fizyoloji, tıp, mühendislik, biyoteknoloji gibi bilim dalları ile çeşitli endüstriyel alanlar için büyük önem taşımaktadır.

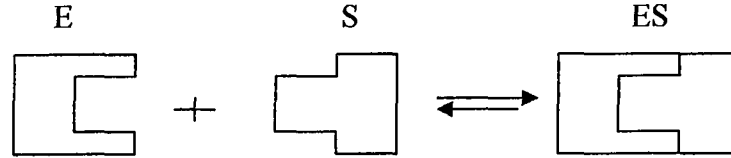
Tüm enzim proteinleri genler tarafından şifrelenir. Dolayısıyla amino asit dizilimi kendine özgüdür. Bazı enzimler (pepsin ve üreaz gibi) yalnız proteinden oluşmuştur. Fakat diğer çoğunluğu iki farklı kısımdan meydana gelmiştir. Bunlar;

- Protein kısmı (enzimin apoenzim kısmı), enzimin hangi maddeye etki edeceğini saptar.
- Koenzim kısmı, organik ya da inorganik, çok defa fosfattan meydana gelmiş, protein kısmına göre çok daha küçük moleküllü bir kısımdır. Enzimde işlev gören ve esas iş yapan kısım bu kısımdır.

Koenzim kısmı metal iyonu ise (Ca^{++} , K^{++} , Mg^{+} , Zn^{++}) buna "kofaktör" denir. Enzimin etkinlik göstermesi için gereksinim duyduğu organik moleküllere "koenzim" denir. Bazı durumlarda koenzim kısmı apoenzim kısmına kuvvetlice (kovalent) bağlanmıştır.

Enzimin apoenzim kısmıyla substrat arasında bir ilişki vardır. Enzimler

substrata bağlanarak katalizledikleri tepkimenin aktivasyon enerjisini düşürür ve hızını artırır. ES (enzim-substrat) kompleksi oluşur. ES kompleksindeki bağlar zayıf Vander Walls ya da hidrojen bağları olup, kompleks kararlı değildir. Substrat, enzimin “aktif kısım” denilen özgül bir kesimine bağlanır. Bu ilişkiye anahtar-kilit modeli adı verilir (Telefoncu, 1997).



Şekil 3.1. Anahtar-Kilit Modeli

3.2. Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması

Uluslararası Enzim Komisyonu’nun çalışmaları doğrultusunda adlandırmada 3 temel ilke göz önüne alınmıştır;

1. Enzimlerin isimleri –az son eki alırlar. Bu ilke sadece tek bir reaksiyonu katalizleyen enzimler için geçerlidir.
2. Enzimler katalizledikleri reaksiyona göre adlandırılır ve sınıflandırılır. Burada dikkate alınan enzimin katalizlediği reaksiyondur. Ara ürünler, kofaktör ya da prostetik gruplar isme dahil edilmez. Bu nedenle bir enzim katalizlediği reaksiyon tam anlamıyla tamamlanana kadar sistematik olarak isimlendirilemez.
3. Yapılan bir adlandırma, reaksiyonun geri dönüşlü olduğu deneysel olarak gösterilmiş olsa bile bütün enzim sınıflarında reaksiyonun sadece dikkate alınan yönünü ifade eder. Buna karşılık enzimlerin önerilen isimleri genelde ilgili reaksiyonların canlı ortamdaki yönlerini göz önüne almaktadır.

Enzimlerin katalizlediği 6 temel reaksiyon sınıfı vardır (Çizelge 3.1) (Telefoncu, 1997).

Çizelge 3.1. Enzim Sınıfları

REAKSİYON TİPİ	ENZİM ADI
Yükseltgenme-indirgenme reaksiyonları	Oksidoreduktazlar
Fonksiyonel grupların transferi	Transferazlar
Hidroliz reaksiyonları	Hidrolazlar
Çift bağlara ekleme	Liyazlar
İzomerizasyon reaksiyonları	İzomerazlar
ATP bölünmesiyle bağ oluşumu	Ligazlar

3.3. Enzimlerin Çalışmasına Etki Eden Faktörler

3.3.1. Sıcaklık

Sıcaklık 10°C yükseldiğinde tepkime hızı iki misli artar; yani tepkime hızının yükselmesi, sıcaklıkla doğru orantılıdır. Fakat belirli bir noktadan itibaren düşmeye başlar ve tamamen durur. Enzimin en iyi çalışabileceği sıcaklığa optimum sıcaklık denir. Yüksek sıcaklıklarda enzimler etkisizdirler (genellikle 55-60°C'de). Bazı ılıcalarda yosunlar 80°C'de yaşayabilirler; fakat bunun üzerindeki sıcaklıklarda enzimleri tamamen koagüle olur ve bir daha etkili hale geçemez. Optimum noktanın biraz üzerinde enzimler etkisiz olmasına karşın, sıcaklık düşünce tekrar etkili hale geçebilirler. Fakat bu sıcaklığın devamı ya da sıcaklığın biraz daha yükselmesi enzimlerin etkinliğini sonsuz olarak ortadan kaldırır. Enzimlerin etkisiz hale geçmeleri ile proteinlerin koagüle olması arasında büyük bir ilişkinin olması, onların, büyük bir kısmının proteinlerden yapıldığını kanıtlar. Doğal olarak enzimler, proteinlerin bir kısmı gibi üçüncül yapıya sahiptir veya en azından moleküllerinin bir kısmı bu yapıdadır. Fakat yüksek sıcaklıklarda bu helozonik ya da üçüncül yapı parçalandığından ya da birbiri üzerine yığıldığından, protein koagüle olur ve enzim etkisiz hale geçer (sütün kaynatılmasında, bakteri enzimlerinin etkisiz hale geçmesi ile ekşime önlenir; bu yoldan teknikte büyük ölçüde yararlanılır; konserve vs. yapımında). Düşük sıcaklıklar enzimin etkinliğini azaltır. 0°C'de enzim ya hiç ya da çok az işlev gösterir fakat soğğun enzimin yapısını bozduğu görülmemiştir. Sıcaklık eski hale döndüğünde etkinlik yine başlar (dondurmak suretiyle besin maddelerinin



saklanması, yine enzimlerin etkisiz hale geçirilmesiyle sağlanır). İnsan vücudunda, daha doğrusu sabit sıcaklıklı hayvanlardaki enzimler çoğunluk 37°C'de optimum etkindirler. Daha yüksek sıcaklıklarda (çocuklarda 42, yetişkinlerde 41 °C) enzimler etkisizleşirler; çok defa da koagüle olurlar (Telefoncu, 1997).

3.3.2. pH

Enzimler pH değişimine karşı çok duyarlıdırlar. Genellikle çok fazla asidik ve alkalik ortamda etkisizdirler. Bazı hallerde enzimler en yüksek etkinliği belirli bir pH derecesinde gösterirler. Bu pH derecesine "optimum pH" denir. pH'la ilgili olmasının nedeni, bazı enzimler aktif kısımlarında iyonik gruplar içerirler. Ortamın pH'sına bağlı olarak bu iyonik gruplar asidik ya da bazik olabilirler. Enzimin aktivite gösterebilmesi için asidik ya da bazik aktif kısım özelliklerine sahip olması gerektiğinden, enzim aktivitesi pH 'ya bağlı olarak değişir. Ph'ya bağlı olarak protein molekülü üzerinde çeşitli elektrik yüklenmeleri ve buna bağlı olarak dış yüz şekli meydana gelmekte ve substratla-enzim uyuşmasını sağlamaktadır. Belki de bu elektrik yüklenmesi enzim-substrat arasındaki çekiciliği artırmaktadır (Telefoncu, 1997).

3.3.3 Enzim / Substrat Derişimi

Eğer pH ve sıcaklık sabit tutulursa, enzim/substrat derişimi arasındaki orana bağlı olarak bir tepkime hızı görülür. Substratın ya da enzimin fazla olması bu hızı değişik şekillerde etkileyebilir. Bol substrat bulunan bir ortama eklenecek enzim, son ürünün miktarını artıracaktır (Telefoncu, 1997).

3.3.4 Diğer Kimyasal Maddeler ve Suyun Etkisi

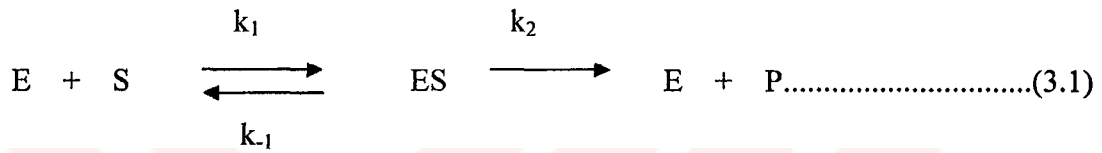
Birçok kimyasal madde enzimleri etkisiz hale getirir; örneğin, siyanit, solunumda önemli rol oynayan sitokrom oksidaz enzimini etkileyerek inhibe eder , ölüm meydana gelebilir. Florit, glikozu laktik aside çeviren enzim kademelerine etki eder. Hatta enzimin bizzat kendisi zehir etkisi yapabilir. Enzimlerin büyük bir kısmı işlevlerini su içerisinde gösterdiklerinden, suyun miktarı da enzim işlevinde etken bir



koşuldur. Genellikle %15'in altında su içeren ortamlarda, enzimler işlev göstermezler (Telefoncu, 1997).

3.4. Enzim Kinetiği

Enzimatik tepkimelerin kinetiği, “Michelis-Menten” adıyla bilinir. Substrat, enzim molekülüne bağlanarak enzim-substrat (ES) kompleksi oluşturur. Bu kompleks kararsız olup, bozunarak ürün verir ve enzim değişmeden açığa çıkar (Erarslan, 2003).



Enzimatik tepkimelerde ürün oluşum hızı aşağıdaki gibi ifade edilir:

$$V = \frac{dP}{dt} = -\frac{dS}{dt} = k_2 \times (ES) \dots\dots\dots(3.2)$$

$$\frac{dES}{dt} = k_1 \times (E) \times (S) - k_{-1} \times (ES) - k_2 \times (ES) \dots\dots\dots(3.3)$$

Enzimin korunumu:

$$(E_0) = (E) + (ES) \dots\dots\dots(3.4)$$

ES kompleksi kararsız bir molekül olup, kısa zamanda E + P ‘ ye dönüşür. Kararlı halde; $\frac{d(ES)}{dt} = 0$ olur. (3.3) eşitliğinde gerekli düzenlemeler yapılırsa,

$$0 = k_1 \times [(E_0) - (ES)] \times (S) - k_{-1} \times (ES) - k_2 \times (ES) \dots\dots\dots(3.5)$$

$$0 = k_1 \times (E_0) \times (S) - k_1 \times (ES) \times (S) - k_{-1} \times (ES) - k_2 \times (ES) \dots\dots\dots(3.6)$$

$$0 = k_1 \times (E_0) \times (S) - (ES) \times [k_{-1} \times (S) + k_{-1} + k_2] \dots \dots \dots (3.7)$$

$$(ES) = \frac{k_1 \times (E_0) \times (S)}{k_1 \times (S) + k_{-1} + k_2} \dots \dots \dots (3.8)$$

(3.2) eşitliğinden, $(ES) = \frac{V}{k_2}$ yazılıp (3.8) denkleminde yerine konursa:

$$V = \frac{k_1 \times k_2 \times (E_0) \times (S)}{k_1 \times (S) + k_{-1} + k_2} \dots \dots \dots (3.9)$$

$$V = \frac{k_2 \times (E_0) \times (S)}{(S) + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}} \dots \dots \dots (3.10)$$

(3.10) eşitliğinde $k_2 \times E_0$ yerine V_m , $\frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$ yerine K_m yazıldığında eşitlik,

$$V = \frac{V_m \times S}{K_m + S} \dots \dots \dots (\text{Michealis-Menten Eşitliği}) \dots \dots \dots (3.11)$$

şeklini alır. (3.11) denklemini çarpma işlemine göre ters çevrilip düzenlenirse,

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_m} \times \frac{1}{S} + \frac{1}{V_m} \dots \dots \dots (\text{Lineweaver-Burk Eşitliği}) \dots \dots \dots (3.12)$$

elde edilir.

3.5. Fenol Parçalayan Enzimler (Fenol oksidazlar)

3.5.1. Peroxidase

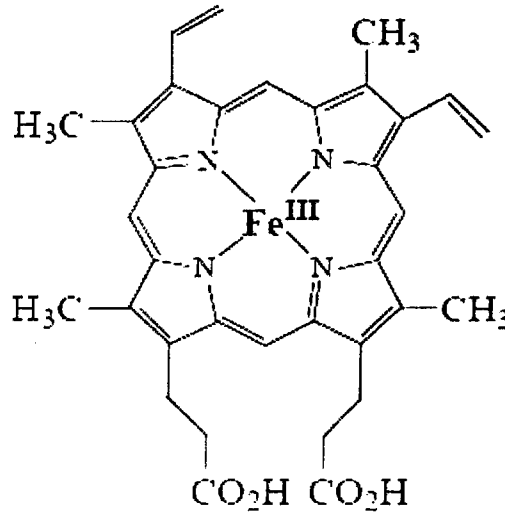
Peroxidase, bitkisel kaynaklardan ve mikroorganizmalardan üretilen, peroksit varlığında reaksiyonları katalizleyen hemoproteinlerdir. Hemoprotein, aktif bölgesinde demir bulunduran enzimlerdir. Heme enzimleri ve katalizlediği reaksiyonlar Çizelge 3.2’de görülmektedir:

Çizelge 3.2. Yaygın Olarak Bulunan *Peroxidase* Enzimleri

<i>Peroxidase</i>	Kaynak	Kataliz Reaksiyonu	Biyolojik Fonksiyon
Horseradish <i>Peroxidase</i>	<i>Armoracia rusticana</i> Kökleri	$2AH + H_2O_2 \rightarrow 2A^+ + 2H_2O$	Bitki hormonlarının biyosentezi
<i>Catalase</i>	İnek karaciğeri	$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$	Hidrojenperoksitin detoksifikasyonu
Stokromc <i>Peroxidase</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$2Cc(II) + H_2O_2 \rightarrow 2Cc(III) + 2H_2O$	Hidrojenperoksitin indirgenmesi ve stokromc nin oksidasyonu
<i>Ligninperoxidase</i>	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	$2AH + H_2O_2 \rightarrow 2A^+ + 2H_2O$	Ligninin indirgenmesi
<i>Chloroperoxidase</i>	<i>Caldariomyces Fumago</i>	$2RH + 2Cl + H_2O_2 \rightarrow 2RCl + 2H_2O$	Caldariomycin indirgenmesi
<i>Myeloperoxidase</i>	İnsan lökosit	$H_2O_2 + Cl^- + H_3O^+ \rightarrow HClO + 2H_2O$	Antimikrobiyal
<i>Laktoperoxidase</i>	İnek sütü	$2AH + H_2O_2 \rightarrow 2A^+ + 2H_2O$	Antimikrobiyal

Peroxidase enzimleri birer katalazdır. Aynı zamanda elektron vericisi olmadığı zaman hidroperoksitleri ve perasitleri ayrıştırır. Katalaz aktivitesi, H_2O_2 'yi oksijen ve suya dönüştürür.

Peroxidase enzimleri, yaygın olarak bitkilerde, hayvanlarda ve mikroorganizmalarda bulunurlar. Üretildikleri kaynaklara göre isimlendirilirler, örneğin; *horseradish peroxidase*, lacto- ya da myeloperoxidase gibi. Şimdiye kadar çalışmış *peroxidase* enzimlerinin çoğu “heme” gruplu enzimlerdir. Bununla beraber, bazı *peroxidase* enzimlerinin aktif bölgeleri Selenyum, Vanadyum, Manganez ve Flavın içerir. Şekil 3.2’de tipik bir *peroxidase* enziminin aktif bölgesinde bulunan prostetik grubu (heme grubu) gösterilmektedir;



Şekil 3.2. *Peroxidase* Enziminin Prostetik Grubu (ferric protoporphyrin IX)

Peroxidase enziminin katalizlediği reaksiyonlar genel olarak aşağıdaki gibidir;

1. Aromatik aminlerin oksidasyonu
2. Heteroatom oksidasyonu
3. Epoksidasyon
4. Hidroperoksitlerin indirgenmesi (Adam et al., 1999).

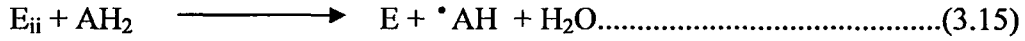
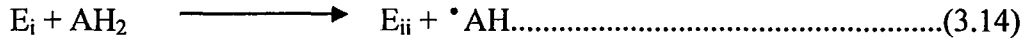
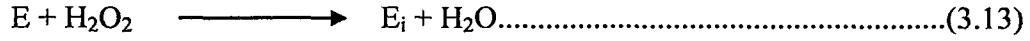
3.5.1.1. *Horseradish peroxidase* (HRP)

Horseradish peroxidase enziminin genel özellikleri Çizelge 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3.3. *Horseradish peroxidase* Enziminin Genel Özellikleri

İsimlendirme	Hidrojen-peroksit oksidoredüktaz EC 1.11.1.7
Molekül Ağırlığı	40000 Dalton
İzoelektrik Nokta	7,2
Yapı	1 mol protoheme IX içeren glikoprotein
İnhibitörleri	Siyanid, sülfid, florid, azid, hidroksilamin
Aktivatörleri	pH değerleri > 7 için amonyak, piridin, imidazol
Optimum pH	7
pH Stabilesi	4-10
Termal Stabilesi	60°C altında

Aromatik substratların *horseradish peroxidase* ile bir elektron oksidasyonu aşağıdaki mekanizma ile açıklanabilir;



Yukarıdaki reaksiyonlarda, enzim (E), peroksitle okside edilerek birinci formuna (E_i) dönüşür. Peroksitten ayrılan bir oksijen atomu, enzimin aktif bölgesinde bulunan Fe^{+3} 'ün yükseltgenmesinde rol oynar. Reaksiyona katılan peroksitler, reaksiyon sonunda suya dönüşür. (E_i), aromatik bileşiği aktif bölgesinde yakalar ve bileşiği okside eder. Oksidasyon sonucu ($\cdot AH$) radikali oluşur. Oluşan radikal reaksiyon çözeltisine bırakılırken, enzim, ikinci forma (E_{ii}) dönüşür. Enzimin bu yapısı diğer aromatik molekülü okside eder. Oluşan ikinci serbest radikal çözeltiye bırakılırken, enzim ilk yapısına (E) dönüşür. Çözeltiye geçen serbest radikaller kendi aralarında poliaromatik bileşikler oluştururlar. Bu polimerler sulu ortamda az çözünebilen özellikle olduklarından çökelirler. Eğer polimerler çökelemeyecek yapıda ise, enzimin aktif bölgesine geri dönerler. Böylelikle enzim için ürün inhibisyonu meydana gelerek, enzimin aktivitesinde düşüşler görülür (Nicell et al., 1992).

Horseradish peroxidase enzimi, H_2O_2 varlığında bazı oksijen katılma reaksiyonlarını katalizler (katılan oksijen atomunun kaynağı H_2O_2 değildir). Oksijen atomu katılması, bir co-substrat gerektirir ki bu da bir elektron transferiyle karbon radikaline dönüştürülür.

Tüyoanisollerin *horseradish peroxidase* ile oksidasyonunda, peroksidin oksijen atomu oksidasyona katılır ve sülfüre oksijen atomu transferi Enzim II'den gerçekleşir.

H_2O_2 'nin ya da hidroperoksitlerin yokluğunda *peroxidase* enzimleri, oksidaz aktivitesi gösterirler. Moleküler oksijen varlığında, indol-3-asetik asit, aldehitler, dihidroksiasitler ve NADH *peroxidase* enzimleri tarafından okside edilirler.



Fenoller (p-cresol, guaiacal, pyrogallol, catechol) ve aromatik aminler (anilin, p-tolidine, o-fenildiamin, o-dianisidin) *peroxidase* enzimlerinin tipik substratlarıdır. Bu enzimler, H_2O_2 ya da hidroperoksitler tarafından *peroxidase* katalizi altında radikaller oluşturmak için okside edilirler. Oluşan bu radikaller, enzimin aktif bölgesinden ortama difüze olduktan sonra dimerik, oligomerik ve polimerik ürünler oluştururlar. Oluşan bu polimerik ürünler, çöktürme, filtrasyon gibi katı-sıvı ayırma teknikleriyle ortamdan uzaklaştırılabilirler.

Yapılan bir çalışmada, *horseradish peroxidase* enzimi ile reaksiyon sonucu oluşan fenolik polimerik ürünler daha sonra bir flotasyon ünitesine gönderilmiş ve bu birleşik prosesin fenol gidermedeki verimliliği incelenmiştir. Polimer ayırma basamağı olarak çözünmüş hava flotasyonu uygulanmıştır. Çalışmada fenol konsantrasyonları, 1-10 mM aralığında kullanılmıştır. Proseste polimerizasyon basamağının fenol giderme verimi %99, flotasyonla polimer giderme verimi %94 olarak bulunmuştur. (Wilberg et al., 2000).

Peroxidase enziminin katalizlediği biyotransformasyonlar, yüksek biyolojik aktivitelerle modifiye edilmiş doğal ürünlere dönüştürülür. Mantar ve bitki kaynaklı *peroxidase* enzimleriyle ve diğer oksidatif enzimlerle fenollerin oksidatif bağ oluşturmaları birçok deneyle gözlenmiştir. Bu biyokatalitik yöntemin, kompleks moleküllerin sentezinde kullanılacağı belirtilmiştir.

Fenollerin ve aromatik aminlerin polimerizasyonu, reçine yapımında ve atıksulardan fenol gidermede kullanılır. Susuz ortamda, *horseradish peroxidase* enziminin fenol bağlarını katalizlemesiyle oluşan polimer ürünler, fenol ve formaldehit reçineleri için potansiyel ürünlerdir. Fenoller ve fenolik reçineler, kömür işletmesinden, kağıt yapımından ve plastik üretiminden kaynaklanan kirleticilerdir. Bu maddelerin *peroxidase* ve H_2O_2 ile transformasyonları, atıksulardan toksidite giderme prosesini oluşturur. (Adam et al., 1999)

Fenolün, 2-klorofenolün, 4-klorofenolün, 2,4-diklorofenolün ve 2-metilfenolün *peroxidase* ile reaksiyonu sonucu çözeltideki toksiditenin davranışının incelendiği bir çalışmada reaksiyon tamamlandıktan sonra oluşan ürünler çöktürülmek suretiyle çözeltiden uzaklaştırılmış. 2-metilfenollü çözelti dışındaki tüm fenollü çözeltilerin



toksiditesinin tamamen giderildiği görülmüştür. (Wagner and Nicel, 2002).

Horseradish peroxidase enziminin, aktivitesini geniş pH ve sıcaklık aralıklarında sürdürebilmesi nedeniyle atıksu arıtımı için uygun olduğu belirtilmektedir (Bhunja et al., 2001).

Yapılan bir çalışmada, atıksularda bulunan fenol ve 4-klorofenolün *peroxidase* enzimi ile katalizlenerek arıtımı, ve arıtımı etkileyen pH, reaksiyon süresi, enzim/fenol oranları detaylıca incelenmiştir. Deney sonuçlarına göre fenol ve 4-klorofenol atıksudan kısa sürede giderilmiştir. Reaksiyonun büyük bölümü ilk 10 dakikada gerçekleşmiştir. Sistemin optimum pH'sını bulmak için pH 5 ile 9 arasında deneyler yapılmış ve optimum pH'nın 9 olduğu gözlemlenmiştir. pH 5'de giderme verimi %55 iken, pH 9'da verimin %99'lara ulaştığı görülmüştür. (Tong et al., 1997).

Son 20 yılda yapılan çalışmaların çoğunda, *horseradish peroxidase* enziminin sulu çözeltilerdeki fenolü katalizleme reaksiyonlarının optimize edilmesi yönünde araştırmalar yapılmaktadır. Bu alandaki son çalışmalar, enzimatik reaksiyonlar sonucu su kalitesindeki değişimleri, 2,4,6-triklorofenolün okside edilerek 2,6-dikloro-1,4-benzokinona dönüştürülmesini, fenolün ve klorofenolün atıksulardan arıtılmasını inceleme yönündedir. *Horseradish peroxidase* enziminin katalizlediği reaksiyonlar için piston akışlı ve sürekli tam karıştırmalı reaktör modelleri geliştirilmiştir. *para*-fenollerin oksidasyonunda akım durdurma teknikleri kullanılmıştır. Enzimlerin kullanılabilir ömürlerini uzatmak ve arıtım maliyetini azaltmak için immobilizasyon tekniklerine yönelim olmuştur. *Horseradish peroxidase* immobilizasyonuna dair birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen, bunların çok azı arıtmada kullanılabilmektedir. Çalışmalarda enzimin aktif bölgesinin inhibisyona uğradığı belirlenmiştir.

Horseradish peroxidase, gerek yapısı itibari ile gerekse reaksiyonlar sonucu oluşan ürünlerin inhibe edici özellikte olmasından dolayı deneysel çalışmalarda güçlükle kullanılabilen hassas bir enzimdir. Bu sebeple, bilim adamları enzimin stabilitesini ve en az zarara uğramasını sağlama amaçlı çalışmalara yönelmişlerdir. Bu amaçla, farklı immobilizasyon teknikleri, enzim modifikasyonları ve reaksiyon ortamlarına eklenebilecek katkı maddeleri üzerine çalışmalar hız kazanmıştır



(Nozaki and Kawamoto, 2003).

Peroxidase enziminin katalizlediği fenol giderim reaksiyonlarına eklenen katkı maddelerinin bu reaksiyonlara etkisinin incelendiği bir çalışmada, katkı maddesi olarak polietilenglikol kullanılmıştır. Polietilenglikol varlığında reaksiyon için gerekli minimum enzim dozunun normalden daha az olabileceği görülmüştür. Katkı maddesi yokluğunda, aktif enzimin, reaksiyon sonucu oluşan polimerik ürünler tarafından inhibe edildiği gözlenmiştir. Katkı maddesi varlığında *horseradish peroxidase* enziminin spesifik aktivitesinin daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Deneyler boyunca, reaksiyonlar sonucu oluşan polimerik ürünlerin polietilenglikol ile bağlandığı ve bunun sonucu olarak *horseradish peroxidase* enziminin ürün inhibisyonunun daha yavaş olduğu belirlenmiştir. (Wu et al., 1998).

Petrol rafinerisi atıksularında bulunan fenol, *horseradish peroxidase* ile reaksiyona sokularak deşarj limitlerinin altına düşürülmüştür. Atıksuda bulunan fenollerin yanı sıra, %58 KOİ, %78 BOİ₅ ve %98 toksidite giderilmiştir. Reaksiyon ile fenol biyolojik olarak daha az indirgenebilen forma dönüştürülmüş, oluşan ürünler, koagülasyon ve çöktürme işlemleri ile sistemden uzaklaştırılmıştır. Polietilenglikol ve chitosan koruyucu madde olarak kullanılmış ve reaksiyon için gerekli minimum enzim dozlarını polietileglikol 4, chitosan 25 kat azalttığı görülmüştür (Wagner and Nicel, 2001). Başka bir çalışmada deneysel sonuçlar, eklenen polietilenglikol sayesinde, reaksiyon için gerekli minimum enzim dozunun 40 kat azaltıldığını göstermiştir (Wu et al., 1993).

Horseradish peroxidase yüksek sıcaklıklarda katalitik ömrünün uzatılması için, lysine e-amino gruplarından succinimide ile modifiye edilmiştir. Succinimid grupları olarak etilenglikol bis-succinimidyl succinate (EG-NHS) ve asetik asit *N*-hidroksisuccinimide esteri (AA-NHS) kullanılmıştır. Modifiye edilen enzimin farklı pH ve sıcaklık aralıklarında fenolü ve 4-klorofenolü giderme reaksiyonları çalışılmıştır. İçerisinde 1mmol/L fenolik substrat, 1U/cm³ aktivitede enzim, 1mmol/L hidrojenperoksit bulunan kesikli bir reaksiyon ortamında alınan sonuçlar Çizelge 3.4'de gösterilmiştir (Miland et al., 1996).



Çizelge 3.4. Modifiye Edilmiş *Horseradish peroxidase* Enziminin Fenol Giderme Verimlerinin Karşılaştırılması

Fenolik substrat	Optimum pH	Serbest enzim giderme verimi(37°C)	Serbest enzim giderme verimi (70°C)	EG-NHS (70°C)	AA-NHS (70°C)
Fenol	9	%50	%32	%37	%39
4-klorofenol	8	%64	%42	%58	%54

Diğer bir çalışmada, *horseradish peroxidase*, kovalent olarak AAm-HEMA (acrylamide-2-hydroxyethyl methacrylate) kopolimerine bağlanmıştır. Hidroksil ve amino grupları sırasıyla glutaraldehit ve *p*-benzokinon kullanılarak aktive edilmiş daha sonra immobilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Kopolimerin aktivasyonu, bağlı enzim üzerinde hem sinerjistik bir etki göstermiş, hem de bağlı enzim aktivitesini 2 kat artırmıştır. Serbest enzimin aktivitesi tüm aktivitesini 2 hafta sonra kaybederken, immobilize enzim 3. haftadan sonra aktivitesinin %60'ını koruduğu gözlemlenmiştir (Shukla and Devi, 2003).

Horseradish peroxidase enziminin, fitalik anhidrit ve glikosamin hidroklorid ile modifiye edilerek kullanıldığı bir başka çalışmada, doğal ve modifiye enzimin termostabilitesi ve fenol giderim etkisi araştırılmıştır. Fosfat tamponu (pH 7) içerisinde *peroxidase* enzimi ile fitalik anhidrit ve glikosamin hidroklorid karıştırılarak modifikasyon sağlanmıştır. Enzim ve fenolün bulunduğu kesikli reaksiyon ortamına H₂O₂ eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. Ortama katalaz eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Uygun alüminyum sülfat ve sodyum hidroksit ilavesiyle oluşan ürünlerin koagülasyon ve flokulasyonu gerçekleştirilmiştir. Arta kalan fenol 270 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunmuştur. Doğal ve modifiye enzim için reaksiyon pH 6-11 aralığında yapılmış ve optimum pH her ikisi için de 9 olarak tespit edilmiştir. Doğal enzim 60°C'nin üzerinde aktivitesini kaybederken, modifiye enzimin 70 °C'den sonra aktivitesini kaybettiği görülmüştür. Enzim modifikasyonu ile termostabilite 10 kat artırılmıştır. Modifiye enzim, doğal enzime göre daha az dozlarda kullanılmasına rağmen, aynı giderme verimi elde edilmiştir. Bunun nedeni olarak, modifiye edilen enzimin substrata ilgisinin arttığı

belirtilmiştir. (Liu et al., 2002).



Enzimli ortama eklenen Co^{+2} , Ni^{+2} , Cu^{+2} ve Co^{+2} metal iyonlarının enzim stabilitesi üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada ise, enzimin bu metallerle inkübasyonu, yapısal ve fonksiyonel stabilitesine olumlu etkide bulunmuştur. Bu metaller, enzimdeki aktif bölge residularını birleştirerek ikinci bir aktif bölge oluşturmuştur (Mahmoudi et al., 2003).

3.5.1.2. *Chloroperoxidase* (CPO)

Chloroperoxidase enziminin aktif bölgesinin kimyası ve moleküler modeli son yıllarda açıklığa kavuşmuştur. *Caldariomyces fumago* mantarından elde edilen *chloroperoxidase* enziminin birçok fenolik bileşikler okside ettiği ortaya çıkmıştır. Bununla beraber, etanolün aldehite oksidasyonu, tiyoanisolün oksidasyonu, immobilize *chloroperoxidase* ve glikoz elektrot kullanarak klorofenollerin ölçümü gerçekleştirilmiştir (Duran and Esposito, 2000).

Tiyoanisolün *chloroperoxidase* ile okside edildiği bir çalışmada, *chloroperoxidase* enziminin *glucoseoxidase* enzimi ile birlikte, poliüretan köpüğe immobilizasyonu sağlanmıştır. Enzimin uygulamadaki stabilitesi, H_2O_2 'yi glikoz ve oksijenden üreterek arttırılmıştır. *Chloroperoxidase* ve *glucoseoxidase* enzimlerinin karışım halinde bulunduğu reaksiyon ortamına hypol eklenmiş ve bu ortamda polimerizasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Oluşan köpük 3mm kalınlığında ve 25mm çapında silindirler şeklinde kesilmiştir. Reaksiyon ortamında, ilk olarak glikoz oksidaz oksijen kullanarak glikozu okside etmiş, hemen ardından hidroksile ederek glikonik aside çevirmiştir. Reaksiyon sonucu ortamda açığa çıkan H_2O_2 , *peroxidase* tarafından tiyoanisolü okside etmek amacıyla kullanılmıştır. Tiyoanisolün *peroxidase* ile reaksiyonunda ortama bir de H_2O_2 eklenerek paralel deneyler yapılmıştır. H_2O_2 'nin ortamda oluşturulduğu deneyde enzimin reaksiyon stabilitesinin diğerine göre 7 kat fazla olduğu görülmüştür (Velde et al., 2000).

3.5.1.3. *Lignin peroxidase* (LPO)

Özellikle *Phanerochaete chrysosporium* gibi basidiomisetlerden ve

askomisetlerden saflaştırılan *lignin peroxidase* enziminin kimyası oldukça iyi bilinir. Farklı kaynaklardan alınan *lignin peroxidase* enzimlerinin birçok aromatik bileşiği mineralize ettiği, ayrıca fenolik ve çok halkalı aromatik bileşikleri okside ettiği bilinmektedir (Duran and Esposito, 2000).

3.5.1.4. *Manganase peroxidase* (MnP)

Manganase peroxidase, *lignin peroxidase* enzimine göre daha az çalışılmıştır. *Manganase peroxidase*, çok çeşitli monoaromatik fenoller ve aromatik boyaları okside eder. Atıksu arıtımı için yüksek dozlarda enzim kullanımı, enzimin arıtım proseslerinde kullanılmasını kısıtlamıştır (Duran and Esposito, 2000).

3.5.2. *Laccase*

Laccase, *o,m,p*-benzendiolleri ve fenoller *o,m,p*-kinonlara ya da radikallerine okside ederek katalizleyen oksidoredüktaz sınıfı bir enzimdir (Freire et al., 2002). *Laccase* ve *tyrosinase*, hiçbir kofaktöre ihtiyaç duymadan moleküler oksijenle reaksiyona girer. (Duran and Esposito, 2000). Yapısında bol miktarda bakır içerir, oksijenle okside edilir, enzimin okside olmuş yapısı boya pigmentleri gibi birçok farklı molekülleri indirger (Leisola et al., 2002).

Laccase, yüksek yapılı bitkilerde, mantarlarda ve bakterilerde dağılmış olarak bulunur. Fenolik maddeleri bir elektron transferi ile katalizleyerek ariloksi radikallere dönüştürür. Reaksiyon gerçekleşirken, 4 elektron transfer mekanizması içinde oksijen suya indirgenir (Li, 2003).

Laccase enzimleri, ligninin indirgenmesinde rol oynar. Lignin, odunda ve biyosferde bol bulunan biyopolimer grupların karbohidrat olmayan kısımlarıdır. Beyaz mantarların hemen hemen hepsi lignin indirgeyen *laccase*, *lignin peroxidase* ve *manganase peroxidase* enzimlerini üretirler. Mono ve polifenollerden bir hidrojen atomu, aromatik aminlerden de bir elektron ayrılması reaksiyonlarını gerçekleştirerek, depolimerizasyon, repolimerizasyon, demetilasyon ve kinon formasyonlarına ulaşan serbest radikalleri oluştururlar. Lignin indirgenme olayı

süresince metoksihidrokinonların oksidasyonu sonucu metoksisemikinin oluşur ve bunlar ileri reaksiyonlara katılabilen süperoksit anyonik radikallerdir. *Laccase* enzimleri, klorolignin ya da fenolik bileşikler içeren birçok endüstri atıksuyunun arıtımında kullanılırlar. Atıksuların bu yöntemle arıtılması sonucu toksiditesinin azaldığı belirtilmektedir (Abadulla et al., 2000).

Laccase kullanılarak fenol gideriminin iki farklı sistem üzerinde araştırıldığı çalışmada (bunlardan ilki zeytin fabrikası atıksuyunda bulunan fenollü bileşikler kullanılarak, ikincisi ise, atıksu yerine katekol kullanılarak gerçekleştirilmiştir) iki sistemde de, uygun miktarlarda enzimatik olarak aktif özellik gösteren ve aynı fabrikadan alınan zeytin kabuğu ve *laccase* kullanılmıştır. Reaksiyonlar oda sıcaklığında ve kesikli reaktörde gerçekleştirilmiştir. Belli zaman aralıklarında örnekler alınıp reaksiyon durdurulmuştur. Zeytin kabuğu sistemden santrifuj kullanılarak atılmış ve her örnekteki katekol konsantrasyonları ölçülmüştür. İkinci sistem için, zeytin kabuğu içeren reaksiyonda yaklaşık 20 saat sonra, *laccase* içeren reaksiyonda ise yaklaşık 40 saat sonra katekol konsantrasyonunun sıfıra düştüğü görülmüştür. Birinci sistem için, zeytin kabuğu içeren reaksiyonda yaklaşık 50 saat sonra atıksudaki fenoliklerin konsantrasyonu sıfıra düşerken, *laccase* içeren ortamda fazla dozda *laccase* kullanılmasına rağmen arıtımın yeterli olmadığı sonucuna varılmıştır (Groce et al., 1999).

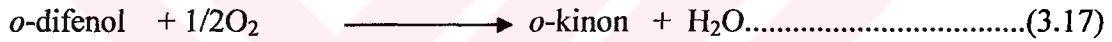
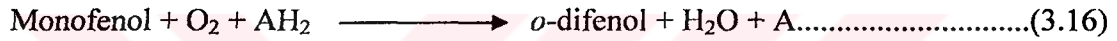
İki oksidatif enzim, *peroxidase* ve *laccase* lignofenollerin indirgenmesinde kullanılmıştır. Lignofenol, *horseradish peroxidase* ve fosfat tamponu (pH 7,5- 0,1M) içeren bir reaksiyon ortamı hazırlanmış, bu ortama her 15 dakikada bir 6 defa H₂O₂ (%30'luk) eklenerek 12 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Oluşan polimerik ürünler santrifuj edildikten sonra kurutularak ortamdan alınmıştır. Aynı deney *laccase* kullanılarak da yapılmıştır. Çalışmada her iki enzim için de substrat olarak lignokatekol ve lignokresol kullanılmış ve oluşan ürünlerin NMR spektrumlarından her iki substratın *laccase* ile katalizlenen reaksiyonda oluşan ürünlerinin molekül ağırlıklarının daha yüksek olduğu, yani indirgemenin *peroxidase* enzimine göre az olduğu görülmüştür. Ayrıca lignofenollerin enzimatik modifikasyonlarla, lignini endüstride kullanılabilecek kimyasallara dönüştürülmesinin mümkün olduğu sonucuna varılmıştır (Xia et al., 2003).

3.5.3. Tyrosinase

Tyrosinase, fenolik bileşikleri katalizleyen oksidoredüktaz (yükseltgenme-indirgenme tepkimelerini katalizleyen enzim sınıfı) sınıfı bir enzimdir. Kataliz mekanizması, ardışık iki reaksiyonla olur:

1. Bir kimyasal indirgeyici (AH₂) varlığında, moleküler oksijen kullanılarak, monofenollerin hidroksilasyonu sonucu orto-difenoller oluşur.
2. Moleküler oksijen kullanılarak, orto-difenollerin dehidrojenasyonu sonucu orto-kinonlar oluşur.

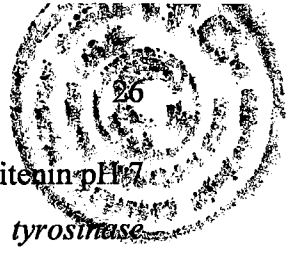
Reaksiyonlar aşağıdaki gibidir;



Kinonlar daima hızlı oluşur ve enzimatik olmayan dönüşümler sonucu daha stabil ara ürünlere dönüşürler. Bu ara ürünler sonradan yavaş oligomerizasyon reaksiyonlarına maruz kalarak, yüksek molekül ağırlıklı, suda çözünmeyen polifenoller oluştururlar (Seetharam and Saville, 2003). Oluşan polifenoller, santrifuj, filtrasyon, çöktürme gibi fiziksel metotlarla uzaklaştırılabilirler (Toscano et al., 2003).

Tyrosinase, elmada, mantarda ve patatestte bulunur, meyvelere koyu renk verir (Bevilaqua et al., 2002). Bakır içeren bir enzim olup, aktif bölgesinde prostetik gruba sahiptir (Mai et al., 2002). Enzim, reaksiyonlar tamamlandıktan sonra moleküler oksijen tarafından oksitlenerek doğal haline geri döner (Nistor et al., 1999).

Fenol dönüşümünde serbest olarak *tyrosinase* enzimi kullanılarak yapılan çalışmada katkı maddesi olarak chitosan eklenmiş ve chitosanın oluşan ürünlerin çökmesine neden olduğu belirlenmiştir. Dönüşüm reaksiyonları oda sıcaklığında, 3 saatte gerçekleştirilmiş ve bu süre sonunda çözelti santrifüjlenerek fenol tayini yapılmıştır. 0,5-10 mM başlangıç fenol konsantrasyonlarında optimum aktivitenin



%50'sinden fazlasının pH 5-8 aralığında gerçekleştiği ve maksimum aktivitenin pH 7 de olduğu belirlenmiştir. Yüksek sıcaklıklarda ve asidik koşullarda *tyrosinase* aktivitesinin stabil olmadığı ve fenollerin yanı sıra birçok klorlu fenollerin de dönüşümünün *tyrosinase* ile başarıyla gerçekleştirilebileceği belirtilmektedir (İkehata and Nicell, 2000).

Bevilaqua ve arkadaşlarının (2002) yaptığı bir çalışmada, birleşik biyolojik/enzimatik fenol dönüşüm reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Sistemde önce *tyrosinase* ile enzimatik arıtım daha sonra da konvensiyonel biyolojik arıtım gerçekleştirilmiştir. *Tyrosinase*, *Agaricus bispora* mantar türünden ekstrakte edilerek kullanılmıştır. Biyolojik arıtım, 420 mg/L fenol içeren atıksuyu etkili bir biçimde arıtmış, 48 saatlik kesikli reaksiyonlar sonunda KOİ'nin %97'si, fenolün %99'u giderilmiştir. Biyolojik arıtmadan sonra bir defa da enzimatik arıtım uygulanmış. 46 U/mL *tyrosinase*, 50 mg/L chitosan kullanılarak, 4 saatlik reaksiyon sonunda kalan fenolün %75'i giderilmiştir. Çalışmada chitosanın koagulant olarak kullanıldığı belirtilmiştir. Enzim kullanılarak yapılan ön arıtmada ise 2 saatlik reaksiyon sonunda fenolün %25'i, KOİ'nin ise %58'i arıtılmıştır. Sonraki biyolojik arıtmada, 24 saatlik reaksiyon sonunda KOİ 151 mg O₂/L'ye, fenol ise 1 mg/L'ye düşürülmüştür. Enzimatik ön arıtım, oda sıcaklığında havalandırılmış ortamda, pH 6,5 da, çözeltiye 20 U/mL *tyrosinase* ekleyip karıştırılmak suretiyle gerçekleştirilmiştir. Biyolojik arıtım için atıksu arıtma tesisinden alınan çamur 24 saat boyunca yeni ortamına bırakılmış, çamur için pH değeri 7 olan, fenol ve mikronutrient içeren bir besi ortamı hazırlanmış ve ortamın fenol içeriği 420 mg/L olana kadar işleme devam edilmiştir. Biyolojik arıtmadan çıkan atıksuda fenol konsantrasyonu 0,5 mg/L olarak ölçülmüş ve bu değer hedef değerinin üstünde olduğundan atıksu tekrar enzimatik arıtmaya tabi tutulmuştur (Bevilaqua et al., 2002).

Tyrosinase enziminin, gluteraldehit ile kimyasal olarak modifiye edilerek kullanıldığı bir başka çalışmada, enzim sodyum aluminosilikat, kalsiyum aluminosilikat ve silikajele immobilize edilerek fenol dönüşümünde kullanılmıştır. Sodyum aluminosilikat ve kalsiyum aluminosilikat üzerine enzimin yaklaşık %37'si, silikajel üzerine ise %62'sinin bağlandığı gözlenmiştir. Sodyum aluminosilikat ve kalsiyum aluminosilikat üzerine bağlanan enzim aynı aktiviteyi göstermiştir. Fenol dönüşümü, başlangıç fenol konsantrasyonuna, tutulan enzim miktarına ve pH'ya



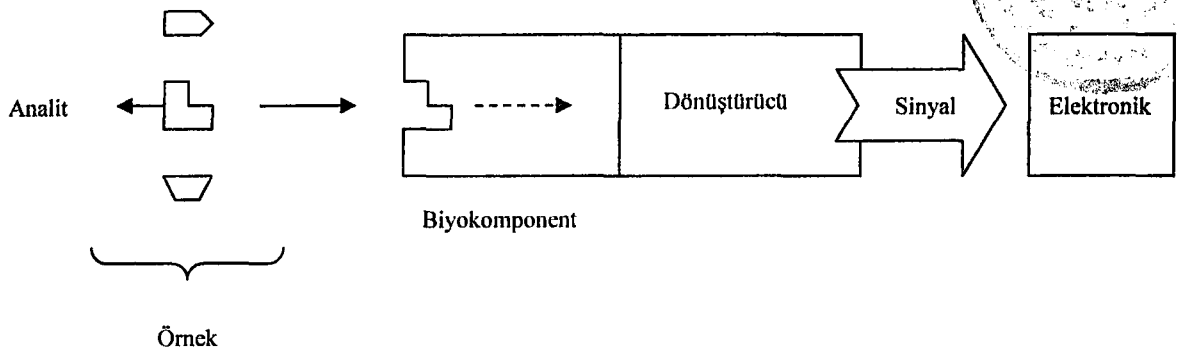
bağlı olarak %15-%60 civarında gerçekleşmiştir. Sodyum aluminosilikat ve kalsiyum aluminosilikat üzerine immobilize edilen enzim, aktivite düşüşü gözlenmeden defalarca kullanılmıştır. Fakat, pH 8’de, reaksiyonun hızlı olduğu ilk 20 dakikada önemli ölçüde enzim inhibisyonu görölmüş, 20. dakikadan sonra inhibisyon durmuş. Ayrıca pH değerini 8’den 6,8’e indirerek inhibisyon azaltılmış ve fenol dönüşümü hızlandırılmıştır. Çalışmada fenol konsantrasyonları 0,1-0,4 g/L aralığında ve reaksiyonlar oda sıcaklığında kesikli olarak gerçekleştirilmiştir. Sodyum aluminosilikat ve kalsiyum aluminosilikat üzerine bağlanan enzim ile fenolün büyük bir kısmı ilk 20 dakikada dönüşüme uğramıştır. Silikajele bağlanan enzim ile ilk 6 saatte fenolün %14’ü, 24 saatte %37’si, 75 saatte %58’i dönüşüme uğramıştır. Serbest enzimle yapılan çalışmalarda ise, pH 6,8 de fenolün %93’ünün, pH 8’de ise %75’inin dönüşüme uğradığı gözlenmiştir (Seetharam and Saville, 2003).



4. BIYOSENSÖRLER

Biyosensörler, ölçümü istenen bileşen (analit) ile uygun bir biyoajan (biyomolekül) arasındaki etkileşimin dönüştürücüler (transduser) yardımı ile elektrik sinyallerine dönüştürüldüğü ve bu sinyallerin elektronik yöntemlerle analit konsantrasyonu cinsinden ifade edildiği analitik cihazlardır. Biyosensör sistemleri genel olarak üç temel bileşenden oluşur. Bunlar, seçici tanıma mekanizmasına sahip biyoajan (biyomolekül), bu biyoajanın analit ile etkileşimi sonucu oluşan fizikokimyasal sinyalleri elektronik sinyallere dönüştüren çevirici (transduser) ve elektronik bölümler olarak sıralanabilir. Genel olarak bir biyosensörün ana elamanları Şekil 4.1’de gösterilmiştir. Bu ana elamanların en önemlisi analite karşı son derece seçimli ve tersinir etkileşmeye sahip biyoajandır. Biyoajalar, biyoafinite ve biyokatalitik olmak üzere iki grupta toplanabilir. Biyoafinite ajanları (örneğin antikorlar) analitlerle kompleks oluşturarak analitin moleküler tanımlanmasında kullanılırlar. Bu kompleks oluşumu, tabaka kalınlığı, kırılma indisi ve elektriksel yük gibi fizikokimyasal parametrelerin değişimine neden olur. Biyokatalitik ajanlar ise analitin molekül yapısında değişime neden olur ve bu dönüşüm sonucunda ortamda artan veya azalan madde miktarı takip edilerek değerlendirilir. Biyokatalitik ajan olarak enzimler, mikroorganizmalar, organlar, tüm hücreler, bitki veya hayvansal doku parçaları kullanılmaktadır.

Biyosensörün ikinci önemli elmanı çevirici kısmıdır. Çeviriciler biyoajan-analit etkileşimi sonucu oluşan fizikokimyasal sinyallerin elektrik sinyallerine dönüştürüldüğü biyosensör elamanlarıdır.



Şekil 4.1. Biyosensör ve Ana Elamanları

İlk biyosensör uygulamaları 1960 yıllarında tıp alanında başlamış ve günümüzde biyoteknoloji devriminin verdiği ivme ile birçok alanda kullanımı giderek yaygınlaşmıştır. Günümüzde biyosensörler klinik, teşhis, tıbbi uygulamalar, proses kontrol, biyoreaktörler, ilaç sanayi, madencilik, savunma sanayi, arıtım ve kontrol teknolojileri gibi birçok alanda çok yaygın kullanılmakta ve bu konularda yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Hatta son yıllarda biyosensör kavram ve tanımlarında önemli değişme ve genişlemelere paralel olarak, algılama mekanizmaları (görme, işitme, koku alma, tat alma) ideal biyosensör olarak görülmekte ve bu mekanizmaların yapay olarak üretilmesi çalışmaları hızla devam etmektedir. Biyosensör sektörünün toplam satışları incelendiğinde 1990 yılında 35 milyon dolar olan toplam satış miktarı, 1995 yılında 895 milyon dolara ve 2002 yılında 2,5 milyar dolara yükselmıştır. Biyosensör satışlarında meydana gelen baş döndürücü artışlar, özellikle bu alandaki üretici firma sayılarını arttırdığı gibi, firmaların biyosensörlerle ilgili araştırma ve geliştirme faaliyetlerini de etkilemiş ve son yıllarda firmalar tarafından patentlenmiş çalışmaların sayısında büyük artışlar meydana gelmiştir. Halen gerek akademik gerekse firma bazında biyosensör çalışmaları artan bir hızda devam etmektedir.

Elektroanalitik kimyasal teknikler, çevre koruma ve kirlenmenin sürekli izlenmesi açısından giderek önem kazanmaktadır. Özellikle elektrokimyasal sensör ve dedektörler, öncelikli kirleticilerin yerinde izlenmesi çalışmalarında önemli rol oynayan elektroaktif türlere karşı seçici, duyarlı, hızlı, hassas, kompakt, taşınabilir ve ucuz sistemlerdir.

Uzun zamandır, pH ve oksijen elektrotları gibi elektrokimyasal cihazların çevre analizlerinde kullanıldığı bilinmektedir. Elektrokimyasal sensör teknolojilerindeki son gelişmeler organik ve anorganik kirleticilerin uygun sensörler yardımı ile yerinde, hızlı ve hassas bir şekilde ölçümüne izin vermektedir. Bu sensörlerden birisi bir biyoajan kullanan biyosensörlerdir. EPA, çevresel izleme teknolojilerinin geliştirilmesini sağlamak amacıyla bu tür sensörlerin üretimi ve geliştirilmesini destekleyici teşvikler vermekte ve bu sensörlerin hava, su, toprak, atıksu ve yeraltı sularının sürekli izlenmesi çalışmalarında kullanılmasını desteklemektedir.

Biyosensörlerin çeşitli ortamlarda (toprak, hava, arıtma tesisi) kirleticilerin konsantrasyonlarını ölçme ve izleme potansiyeli yanında bu tekniklerin konvansiyonel analiz metotlarına göre daha ucuz olması ve ortamda kirleticinin davranışının sürekli izlenebilmesi gibi çok önemli avantajları vardır. Kirleticilerin anında analiz edilebilmesi, özellikle arıtma reaktörlerinin otomatik kontrolünde rahatlıkla kullanılabilir veya ortamdaki kirleticinin sürekli izlenmesi ile gerekli önlemlerin alınabilmesine izin verir. USA ve EU de giderek artan çevresel sınırlamalar hava, toprak ve özellikle sulardaki kirleticilerin güvenilir ve hızlı analizlenmesini zorunlu hale getirmiştir. Konvansiyonel analiz metotları oldukça pahalı, uzun zaman alan ve uzmanlık gerektiren tekniklerdir. Buna karşın biyosensörler düşük maliyetli ve taşınabilir olduklarından yerinde analiz imkanı sağlayan, hassas ve güvenilir biyoanalitik sistemlerdir.

4.1. Biyosensörlerin Çalışma Prensibi

İnce bir tabaka enzimin, elektrokimyasal sensör yüzeyine immobilize edilmesiyle enzim elektrotu elde edilir. Oluşturulan elektrot, uygulanacak örneğin renk ve bulanıklığından etkilenmeden yani örneği bir ön arıtmadan geçirmeden çalıştırılmalı ve kesin sonuçlar vermelidir. Enzim tabakasına difüze edip tüketilen substrat ya da bu tabakada oluşan ürün elektrokimyasal olarak izlenebilir. İzleme potansiyometrik ve amperometrik olmak üzere iki yolla olabilir. Elektrokimyasal sinyal ile substrat konsantrasyonları arasında bir korelasyon kurulur.



Bir enzim elektrotunun cevabı, hem kararlı hal metodu ile milivolt ya da mikroamper olarak, hem de elektrokimyasal sinyalin zamana karşı değişim hızını veren kinetik ölçümle belirlenebilir.

Enzimlerin kullanılmasıyla ilgili problemler (stabil olmamaları, tekrar kullanılamamaları gibi) sözkonusu olduğundan, kullanılmalarıyla ilgili kısıtlamalar meydana gelmiştir. Bu sorunları minimize etmek amacıyla enzimler katı desteklere fiziksel ve kimyasal olarak immobilize edilmektedir (Taylor, 1991).

4.2. Enzim İmmobilizasyon Metotları

Enzimin elektrot yüzeyine yüksek aktivite ile ince tabaka içerisine fiziksel olarak yerleştirilmesi kovalent ve kovalent olmayan metotlarla gerçekleştirilir. Basitçe immobilizasyon, serbest haldeki enzimi elektrot yüzeyinde yarı geçirgen bir membran kullanarak tutmak suretiyle gerçekleştirilir. Elde edilen prob, çoğunlukla kötü stabilite gösterir ve fazla miktarda enzime gereksinim duyar.

Fiziksel ya da kimyasal olarak immobilize edilen enzimler, daha iyi bir stabilite gösterir ve diğer maddelerle etkileşimi daha azdır. Tercih edilen immobilizasyon metotları aşağıdaki gibidir:

- Enzimi elektrot üzerinde, inert bir polimerik matriks içinde tutuklama
- Enzimi kendisine ya da başka makrosobik partiküllere (proteinler) fonksiyonel bağlayıcı kimyasallar vasıtasıyla, elektrot yüzeyinde ince tabaka oluşturacak şekilde çapraz bağlama
- Enzimi direkt olarak elektrot yüzeyine ya da suda çözünmeyen membranlara bağlayıcı kimyasallar vasıtasıyla bağlama (Telefoncu, 1997).

Uygun immobilizasyon seçiminde dikkat edilecek bazı hususlar vardır: Kimyasal yoldan immobilize edilen enzimler desteğin her bölgesinde açıkta iken, tutuklanan enzimler matriks içine giremeyen büyük moleküllerden izole haldedir. Bu yüzden, immobilizasyon tipine göre kinetik ve farklı maddelerle etkileşim her bir metotta farklılık gösterir. Büyük moleküllerin tayininde tutuklanan enzimlerle ölçüm



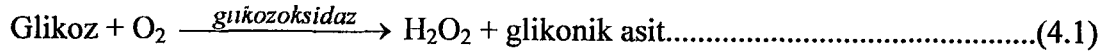
yapılamaz (Taylor, 1991).

İmmobilizasyon seçiminde dikkat edilecek diğer hususlar ise enzimin ince bir tabaka halinde ve homojen olması, yüksek aktiviteye sahip olması, hızlı ve hassas ölçüm yapabilmesi şeklinde sıralanabilir (Telefoncu, 1997).

4.2.1. Fiziksel Tutuklama

Poliakrilamid gibi bir jel içine enzimin alınarak sabitlendiği fiziksel bir yerleştirme tekniğidir. Polimer, enzim varlığında çapraz bağ formlarının oluşumuna olanak sağlar. Glikoz oksidaz, katalaz, laktik dehidrogenaz, aminoasit oksidaz, glutamik dehidrogenaz gibi pek çok enzim bu metotla bağlanır. Jellere tutuklanan enzimler, kullanılmadıkları zamanlarda, 0-4°C arasındaki sıcaklıklarda korundukları zaman 3 aydan sonra bile aktivitelerinde minimum kayıplar görülür.

Bu yolla tutuklanan glikoz oksidaz, kan içindeki glikozun belirlenmesi amacıyla bir oksijen elektrotuna bağlanır. Oksijendeki azalma monitörize edilir (Taylor, 1991).



4.2.2. Kimyasal İmmobilizasyon

4.2.2.1. Fonksiyonel Maddelerle Çapraz Bağlama

Enzimlerin fonksiyonel maddelerle çapraz bağlanması, farklı metotlarla gerçekleştirilebilir. Bu metotlar, enzimlerin direkt olarak çapraz bağlanması ya da inert proteinlerle (albumin, jelatin, kalojen) çapraz bağlanması olarak sıralanabilir. İmmobilizasyon işleminde en çok kullanılan fonksiyonel madde gluteraldehit, en çok kullanılan inert madde ise bovine serum albumindir. Teknik, basit ve hızlıdır. (Taylor, 1991).

4.2.2.2. Suda Çözünmeyen Desteklere Çapraz Bağlama

Enzim immobilizasyonunda en sık kullanılan teknik olup, yüksek stabilite ve yüksek katalitik etki sağlar. Bu teknik ile, elektroiletken taşıyıcılar da olmak üzere birçok taşıyıcı kullanılabilir. Taşıyıcının özelliği enzim immobilizasyonunun şeklini ve prob dayanıklılığını belirlediğinden oldukça önemlidir. Taşıyıcının korozyonu ve bozulması, enzimin işlevsel ömrünü kısaltabilir ve çözünabilir taşıyıcı materyaller enzimin aktif bölgesini inhibe edebilir. Kullanılacak taşıyıcılar, çözünbilme özelliklerine, fonksiyonel gruplarına, yüzey alanlarına, hidrofilik ve hidrofobik özelliklerine bakılarak seçilir.

Gerçekte, inorganikler, doğal polimerler ve sentetik polimerler olmak üzere 3 tip taşıyıcı kullanılır. Bağlanma reaksiyonları enzim denaturasyonuna (üç boyutlu yapının bozulması) neden olmayacak şartlarda gerçekleştirilmelidir. Enzimler, katalitik aktivite için gerekli olmayan fonksiyonel gruplarından bağlanır. Enzimlerin glutraldehit ile aktive edilmiş taşıyıcılara bağlanması hem kolay, hem de ucuz bir işlemdir (Telefoncu, 1997).

4.2.2.3. Elektrot Yüzeyine Direkt Bağlama

Enzimi elektrot yüzeyine direkt bağlama tekniği ile, elektrokatalitik etki, sensörden hızlı sinyal alma ve immobilize enzimi tekrar kullanabilme ihtimali büyük ölçüde artar. Metalik ve karbonlu enzim elektrotlarında, enzimatik reaksiyonlarla oluşan ürünler potansiyometrik sinyaller sonucu belirlenirler. Fakat, bu sinyaller elektrot yüzeyindeki redoks basamaklarına bağlıdır. Ayrıca, elektrotun geçirdiği ön işlemler de sensör sinyallerini etkileyici niteliktedir. Bu sebeple genelde amperometrik enzim elektrotları tercih edilir.

Fiziksel bağlamada, karbonlu materyallerin yüzeyinde bulunan çeşitli fonksiyonel gruplardan dolayı oluşmuş porozite, enzim adsorpsiyonunda etkili rol oynar. Buna rağmen, proses geri dönüşümlüdür, elektrot kötü stabilite gösterir ve sadece birkaç gün içinde aktivitede düşüşler görülür.



Kimyasal bağlamada, bir proteinin taşıyıcıya kovalent bağlanması sonucu daha stabil enzim elektrotları meydana gelir. Bu teknikte ilk adımda taşıyıcının immobilizasyon işlevselliği artırılır. Elektrot yüzeyi, etkili reaktif bölgelerin oluşumu için ısı ile, oksijen radyo-frekans plazma ile, kimyasal ya da elektrokimyasal yollarla okside edilir. Oluşan reaktif bölgeler, ya direkt olarak ya da bir bağlayıcı ajan vasıtasıyla enzimlere kovalent bağlanır. Bağlamada genel olarak gluteraldehit ve karbodiimid gibi kimyasallar kullanılır. Bu kimyasallar sayesinde, enzimler taşıyıcıya bağlanabildiği gibi birbirleri arasında da çapraz bağlar yapar. (Taylor, 1991).

4.3. Elektrokimyasal Sensörler

Uygun elektrokimyasal sensör seçiminde dikkat edilmesi gereken en önemli hususlar şöyle sıralanabilir.

1. Belirlenmesi istenen substratın yapısı (redoks ya da iyon tipleri)
2. Yapılan sensörün şekli (mikroelektrotlar)
3. Sensör seçiciliği, hassasiyeti ve ölçüm hızı
4. Sensörün doğruluğu ve stabilitesi

En sık kullanılan sensörler, potansiyometrik ve amperometrik modlarda çalışan sensörlerdir. Amperometrik enzim elektrotları genişletilmiş bir lineer sinyal aralığına ve potansiyometrik elektrota göre daha büyük Michelis-Menten sabitine (K_m) sahiptir (Telefoncu, 1997).

4.3.1. Potansiyometrik Sensörler

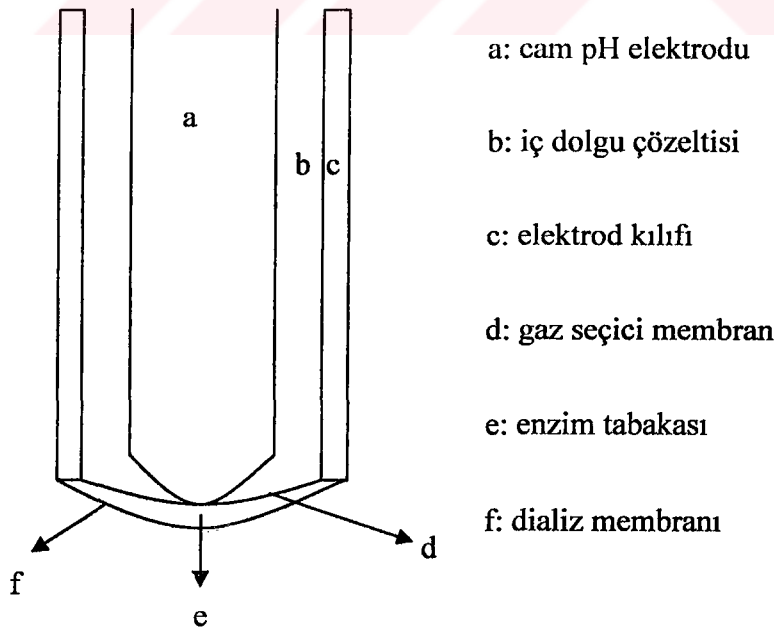
Potansiyometrik tip sensörde, membran (cam, katı, sıvı), seçici olarak yüklü taneciği membran fazın içine alır. İç kısımdaki dolgu çözeltisi ve örnek çözelti arasında potansiyel fark oluşturur. Oluşan bu potansiyel analit konsantrasyonunun logaritması ile orantılıdır. Potansiyometrik iyon seçici elektrotlar arasında, özellikle gaz problemleri kullanışsızdır. Bu tip sensörlerde bu problem, gaz seçici membranın iyon seçici elektrot üzerine çıkarılmasıyla giderilebilir.



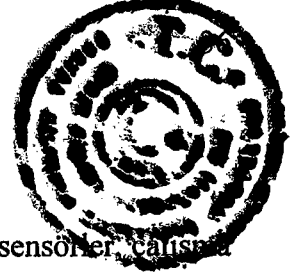
Örnek içindeki diğer çözünmüş maddeler membrandan difüze ederek iç dolgu çözeltisinin pH'sını değiştirebilir ve sensöre olumsuz etki yapabilir.

Potansiyometrik iyon seçici elektrotlar arasında daha ziyade gaz problemleri kullanışlıdır. Gaz problemleri, iyon seçici elektrotun gaz seçici membranla yer değiştirmesiyle yapılır. En sık kullanılan gaz seçici sensörler, amonyak ve karbondioksit sensörleridir.

Şekil 4.2'de tipik bir biyokatalitik potansiyometrik gaz probu gösterilmektedir. Elektrot, pH camından, referans elektrotlarından ve gaz seçici membrandan oluşur. Cam elektrot ve membran arasında karbondioksit sensörü için sodyum bikarbonat çözeltisi, amonyak sensörü için amonyum klorid çözeltisi ince bir tabaka halinde bulunur. Elektrot, analizi istenen çözeltiye daldırıldığında, enzimatik reaksiyon sonucu karbondioksit veya amonyak gazı üretilir. Oluşan gaz, analizi yapılan çözeltiden pH elektrotuna doğru difüze ederken, öncelikle gaz seçici membrandan geçer ve iç dolgu çözeltisine ulaşarak burada çözünür. Çözünmeye bağlı olarak ortam pH'sı değişir ve buna bağlı olarak sistemin potansiyometrik yanıtı artar. Potansiyometrik yanıtındaki lineerlik, 10 μ M-0,1 M substrat konsantrasyon aralığında gözlenir (Telefoncu, 1997).



Şekil 4.2. Potansiyometrik Gaz Probu



4.3.2. Amperometrik Sensörler

Amperometrik sensörler, sabit akımı ölçerler. Amperometrik sensörler, çalışma elektrotu ve referans elektrot arasındaki sabit bir potansiyelde oluşan akımı monitörize eder. Bu tip sensörlerin çalışma prensibi genellikle iki elektron konfigürasyonuna dayanır. Sensör, substrat konsantrasyonuna karşı amperometrik lineer sinyaller verir. Substrat ya da üründen herhangi biri elektrot yüzeyinde elektroaktif özellikte (yükseltgenebilir ya da indirgenebilir) olmalıdır. Bu tip sensörlerin optimizasyonu oldukça zordur.

Hidrojenperoksit oksidasyonu ve oksijen indirgenmesi ölçümlerinde genellikle platin elektrotlar kullanılır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda sıkça, modifiye edilmiş ve modifiye edilmemiş cam karbon elektrotlar kullanılmaya başlanmıştır. Amperometrik sensörlerde, elektrot yüzeyinin yapısı kimyasal maddelerle modifiye edilerek değiştirilebilir. Bu durum son yıllarda başlı başına bir çalışma sahası olmuştur. Modifiye elektrotlarda elektrokimyasal reaksiyon hızı yüksektir, modifikasyon işlemi sayesinde elektrot yüzeyinin çözeltideki farklı materyallerle kaplanması önlenir. Ayrıca modifikasyon sayesinde enzim immobilizasyon basamağı daha iyi kontrol edilir.

Enzim elektrotlarında redoks sağlayıcıların kullanılmasıyla elektrot yüzeyindeki protein yapılarının yavaş redoks davranışından oluşan problemlerin kolaylıkla üstesinden gelinebilir.

Amperometrik sensörler için en ideal enzimler, aktif bölgeleri elektroaktif olan yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir (Telefoncu, 1997).

4.4. Enzim Elektrotlarının Özellikleri

4.4.1. Stabilité

Bir elektrotun ömrü, elektrotun saklama ve işletme stabilitesi ile karakterize

edilir. Elektrot stabilitesini etkileyen en önemli faktör, enzim stabilitesidir. Genel olarak potansiyometrik iyon seçici elektrotların stabilitesi çok iyidir. Fakat potansiyometrik gaz problemlerinde iç dolgu çözeltisi düzenli olarak yenilenmelidir. Organik aminler ve karbondioksit gibi uçucu gazlar, analizi yapılacak çözelti içerisinde sensörün anormal ve yüksek sinyaller vermesini sağlar.

Amperometrik bir sensörün stabilitesi, özellikle yüksek potansiyellerde çalışırken elektrot yüzeyinin kirlenmesinden etkilenir. Reaksiyon hızını azaltmak ve yüzey kirlenmesini önlemek, ortama redoks sağlayıcıların ilavesiyle gerçekleştirilebilir.

Elektrot ömrü, kullanılan enzimin kaynağına, saflığına ve immobilizasyon metoduna da bağlıdır. Genel olarak, “çözünür” enzim elektrotlarının ömrü 25-50 kullanımlık, poliakrilamid elektrot üzerine enzimin fiziksel tutuklanmasıyla oluşan elektrot ise 50-100 kullanımlıktır. Sıklıkla kullanılmadığı zamanlarda kimyasal yollarla immobilizasyon sonucu enzimin bağlandığı elektrotlar yıllarca kullanılabilir. Çok sık kullanılan glikoz elektrotunun ömrü 1 yıl kadardır ve 1000 kullanımlıktır. Aminoasit oksidaz ve ürikaz biyosensörleri immobilizasyon tekniğine bağlı olarak 200-1000 kullanımlıktır (Telefoncu, 1997).

4.4.2. Sinyal Süresi

Bir biyoelektrotun sinyal süresi kısadır. Bu süre sensörden ziyade, enzim tabakasının kalınlığına, çözeltiyi karıştırma hızına, substrat konsantrasyonuna, enzim konsantrasyonuna, pH'ya, sıcaklığa ve dializ membranına bağlıdır. Ayrıca, substratın çözelti içinden membran yüzeyine geçme hızı, daha sonra buradan membrana difüze ederek biyokatalist ile reaksiyona girme hızı ve oluşan ürünün elektrot yüzeyine geçme hızı sinyal süresini etkileyen ana unsurlar olarak sıralanabilir.

Fazla enzim konsantrasyonlarında sinyal süresi kısalmır. Fakat aşırı konsantrasyonlarda, enzim tabaka kalınlığı artacağından, substratın membran içinden difüze etme süresi artar, dolayısıyla sensörün sinyal süresi uzar. Hızlı bir sinyal, yüksek spesifik aktiviteli enzimlerin ince tabaka halinde kullanılmalarıyla sağlanır



(Telefoncu, 1997).

4.4.3. Seçicilik

4.4.3.1. Elektrot Probu ile Etkileşim

İdeal olarak, biyokataliz reaksiyonu sonucu oluşan ürünün ya da reaktantın belirlenmesinde kullanılan biyosensörler, analizi yapılan çözeltideki başka maddelerle reaksiyona girmemelidir. Pratik olarak, potansiyometrik ve amperometrik sensörlerde bu etkileşim nadiren görülür.

Bir katyon cam sensörüyle birlikte kullanılan immobilize üreaz elektrotu, kandaki ve idrardaki NH_4^+ iyonunu belirlerken aynı zamanda Na^+ ve K^+ iyonlarına da duyarlıdır. Potansiyometrik sensörlerde cam elektrotlar ve katı antibiyotik nonaktin elektrotlar kullanılarak etkileşimlerin önüne geçilebilmiştir. Bu elektrotların özelliği, belli bir reaktant/etkileşim yaratan madde oranlarında seçicilik göstermesidir. Amperometrik sensörlerde ise etkileşimleri gidermek adına yapılan çalışmalarda karbon elektrotların başarılı olduğu bulunmuş, fakat, etkileşimlerin tamamıyla önüne geçilememiştir. Bu elektrotların seçiciliklerinin artırılması için bazı yüzey modifikasyonlarının uygulanması gerektiği belirtilmiştir (Taylor, 1991).

4.4.3.2. Biyokatalist Reaksiyonu ile Etkileşim

Bu tip etkileşimler iki sınıfta incelenir:

1. Ölçülecek bileşiğe ek olarak enzimin farklı substratlarının reaksiyona katılması
2. Enzimi aktive ya da inhibe eden maddelerin varlığı

Üricase enzimi sadece ürik asite, aspartaz enzimi ise sadece aspartik asite etki ederken diğer enzimler birçok substrata etki ederler. Örneğin, *penisilinase* enzimi amfisilin, nafisilin, penisilin G, penisilin V, dikloksasilin gibi pek çok substratla reaksiyona girer. Bu tarz enzimlerin bulunduğu elektrotlar kullanılırken, ortamda iki



ya da daha fazla substrat varsa ayırma işlemi gerçekleştirilmelidir. Alternatif olarak bir sistemde enzimlerin kombinasyonu sağlanabilir.

Enzim aktivitesi ayrıca kuvvetli olarak ortamda bulunan inhibe edici maddelerden etkilenebilir. Enzim inhibitörlerinin çoğu, Ag^+ , Hg^{+2} , Cu^{+2} iyonları gibi ağır metallerdir. Ayrıca sülfhidril gruplarıyla reaksiyona giren bazı organik bileşikler, enzimlerin aktif bölgelerindeki S-H gruplarını bloke eder. Fakat sensörler, bu tip inhibisyonlardan, immobilizasyon matriksinin koruyucu etkisinden dolayı etkilenmezler (Taylor, 1991).

4.4.4. pH' nın Etkisi

pH, gerek immobilize sistem, gerekse dedektör performansı için önemli bir parametredir. Her enzimin aktivite gösterdiği bir pH aralığı vardır. Bu aralıkta bir pH değerinde enzimin aktivitesi maksimumdur. Enzim immobilize edildiğinde, taşıyıcının yapısına bağlı olarak optimum pH değişebilir. Elektrot redoks potansiyel prosesleri pH'ya bağlıdır. Immobilize enzim tabakasının pH'sı, çözeltinin pH'sından farklı olabilir. Yüksek tampon kapasitesi genel olarak bu farkı minimize eder. Hızlı ve en hassas sonuçlara ulaşmak ya elektrottaki reaksiyonlar için optimum pH değerinde, ya da enzim reaksiyonları için optimum pH değerinde çalışmak ile gerçekleşir. Bu iki pH değeri arasında uyum gerekir. Fakat, sensör sistemleri bu amaçla fazla zorlanmamalıdır (Taylor, 1991).

4.4.5. Nicel Belirlemeler ve Belirleme Limiti

Michelis-Menten eşitliğinde olduğu gibi, bütün eğriler yüksek substrat konsantrasyonlarında düzleşir. Yüksek substrat konsantrasyonlarında reaksiyon substrattan bağımsızdır. Eğrideki düzleşme, kullanılan elektrotun substrat belirleme limitinden dolayı aynı zamanda belirleme aralığı dışında kalan çok düşük substrat konsantrasyonlarında da görülür. Amperometrik sensörlerde yüksek hassasiyet görülür, lineer sinyal aralığı uzar ve Michelis-Menten sabiti potansiyometrik sensörlere göre daha büyüktür (Taylor, 1991).

4.5. Fenol Sensörleri

Bu bölümde, literatürde yapılmış fenol sensörleri özetlenmiştir.

Laccase enzimi, polietersülfon membrana immobilize edilip Platinyum elektrotla bağlanmış ve referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrotu kullanılmıştır. Bu elektrot, genellikle kırmızı şarap içinde bulunan olifenollerin (kafeik asit, galik asit, katekin, rutin, malvidin) belirlenmesinde kullanılmaktadır. Asetat tamponunda pH 4,5 ve pH 3,5'de çalışılmış ve katekin, +100mV potansiyelde, pH 3,5'de pH 4,5'dakine göre daha iyi sonuç verirken, aynı potansiyelde kafeik asit ile çalışıldığında pH 4,5 da sonuç alınmadığı görülmüştür. pH 3,5 de katekin ve kafeik asit arasında etkileşim olmadığı ve +100 mV'da ikisinin de sensörde yanıt verdiği görülmüştür. Katekin ve kafeik asitin sensörde belirlenebilir minimum konsantrasyonu 1×10^{-6} M olarak bulunmuştur. 2×10^{-6} - 14×10^{-6} M konsantrasyonları arasında sensörde lineerlik belirlenmiştir. Üç defa üst üste yapılan substrat yüklemelerinde sensör yanıtının hemen hemen aynı olduğu belirlenmiştir (Gomes et al., 2004).

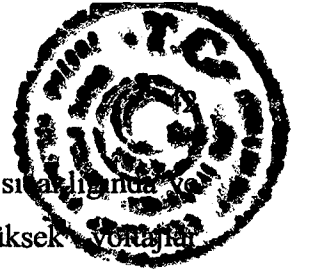
Kağıt fabrikası atıksuyunda bulunan fenolik bileşiklerin belirlenmesinde amperometrik bir sensör sistemi geliştirilmiştir. Kullanılan bu sistem, sürekli bir akış sistemi, dializ membran prosesi ve *laccase* tabanlı bir elektrotan oluşmuştur. Sistemin performansı, pH'ya, iyonik şiddete, uygulanan potansiyele ve debiye göre araştırılmıştır ve biyosensör, üç ay gibi uzun bir süre kararlı olarak çalışmıştır. Biyosensörün hassasiyeti fenol, *p*-fenol, guaiacol ve chloroguaiacol için test edilmiş. Dializ membran ünitesinin, biyosensör yüzeyini kirlenmekten koruduğu ve dolayısıyla da biyosensör performansı üzerine önemli etkide bulunduğu görülmüştür. Bu özellik sayesinde, karışık bir ortamda ön arıtım yapılmadan atıksu örneğine direkt ölçüm yapılabilmiştir. Enzim immobilizasyonu için, karbon elektrot öncelikle pH'sı 7,2 olan fosfat tamponuyla yıkanmış ve daha sonra 30 dakika boyunca, glutraldehit, bovin serum albumin ve *laccase* karışımında bekletilmiştir. 0,5-1,6 mL/dak debi aralığında, debi arttıkça sinyal artmış bu değerden sonra artan debilerde alınan sinyallerde düşüşler kaydedilmiştir. Sistemden sürekli bir şekilde pH'sı 5 olan tampon çözelti geçtiğinden dolayı sensör uygulanacak örneğin pH'sından etkilenmemiştir. 1×10^{-3} - 5×10^{-1} M aralığındaki tampon konsantrasyonlarında



çalışılmış ve bu aralıkta sensör performansında değişiklik gözlenmemiştir. Sensör kalibrasyonunda lineerliğe, 1-10 μM arasındaki konsantrasyonlarda guaiacol ve chloroguaiacol çözeltilerinden 1,6 mL/dak debide ve pH 5'de 220 μL enjekte edilerek ulaşılmıştır (Freire et al., 2002).

Laccase enzimi, fiziksel adsorpsiyon, gluteraldehit, karbodiimid, karbodiimid/gluteraldehit teknikleriyle farklı şekillerde karbon-fiber elektrota immobilize edilmiş ve en iyi sensör yanıtı karbodiimid/gluteraldehit tekniği kullanılarak bulunmuştur. Bu teknikle *laccase*, karbon-fiber elektrota karboksil gruplarından kovalent olarak bağlanmış, karbodiimid sayesinde enzim ve elektrot arasında güçlü bağlanma oluşurken gluteraldehit sayesinde de enzimler arasında ağlaşma gerçekleşmiştir. En kötü sensör yanıtı ise fiziksel adsorpsiyon metodu kullanıldığında gözlenmiştir. Substrat olarak 100 μM 'lık katekol çözeltisi kullanılmış ve bu metotta farklı gluteraldehit miktarlarının sensör üzerine etkisi araştırılmıştır. En iyi gluteraldehit oranı %10 (m/v) olarak tespit edilmiş, sensör farklı pH ve potansiyellerde çalıştırılmış ve optimum sonuca pH 5'de ve -100 mV potansiyelde ulaşılmıştır. İmmobilize *laccase* enziminin, 2 aydan fazla bir süre aktivitesinin tamamını koruduğu tespit edilmiştir (Freire et al., 2001).

Sulu çözeltilerde fenolün belirlenmesi için yeni bir amperometrik biyosensör geliştirilmiş ve *tyrosinase* enzimi, yeni bir kopolimer olan poly(N-3-aminpropyl pyrrole-co-pyrrole) film üzerine, filmin amino gruplarından kovalent olarak bağlanmıştır. Enzim bağlı film tabakası, indiyum-kalay-oksit (ITO) kaplı cam levha üzerine elektrokimyasal olarak uygulanmış ve polimer filmin poroz morfolojisi ve enzimin kovalent bağlanması, yüksek dozda enzimin tutuklanmasına ve enzim kullanım ömrünün uzamasına neden olmuştur. pH 7,2 fosfat tamponunda ve -0,2 V'luk sabit voltajda sensörden alınan amperometrik yanıt, fenol konsantrasyonlarına bağlı olarak değişim göstermiş ve fenol için 1,35-222,3 μM konsantrasyonları arasında, katekol için 1,6-118,8 μM konsantrasyonları arasında, *p*-kresol için ise 1,9-257,8 μM konsantrasyonları arasında sensörde lineerlik elde edilmiştir. Sensörde yanıt, 10 saniyeden kısa bir sürede alınmış ve bu süre içinde sistem kararlı hale geçmiş ve enzim 4 ay sonunda ilk aktivitesinin %80'ini korumuştur. Kopolimer elektrot, öncelikle 1,5 saat boyunca 0,1 M pH 7,2 fosfat tamponuna daldırılıp bekletilmiş, daha sonra 3,6 mg/mL *tyrosinase* içeren çözeltiliye daldırılmış ve yine 1,5



saat bekletilmiştir. Reaksiyonlar, oksijene doyurulmuş ortamda, oda sıcaklığında ve sabit karıştırma hızlarında gerçekleştirilmiş ve -0.2 V'tan yüksek voltajlar uygulandığında oluşan kinon tipi ürünlerin polimerleşip, elektrotu kapladığı görülmüştür. Elektrotun, kullanılmadığı süre içinde +4°C de buzdolabında korunabileceği belirtilmiştir (Rajesh et al., 2004).

Katekol ve *p*-kresolün belirlenmesi için *tyrosinase* ve *tyrosinase/peroxidase* enzimlerini içeren 2 elektrot hazırlanmış ve bu iki elektrotun substrat seçiciliği araştırılmıştır. Katekol ve *p*-kresolün beraberce bulunduğu bir reaksiyon ortamında çift enzimli elektrottan *tyrosinase* elektrotuna göre daha iyi yanıt alındığı gözlenmiştir. Çalışmada, indiyum-kalay-oksit elektrot kullanılmış, elektrot yüzeyi aseton ve 0,1 M NaOH ile yıkanarak hidrofilik hale getirilmiştir. Daha sonra elektrot, %5 oranında 3-aminopropyltriethoxysilane içeren toluene batırılarak yüzeyde amino grupları oluşturulmuştur. Modifiye edilen elektrot, içerisinde 20 g/L *peroxidase*, 5 g/L *tyrosinase* ve %2,5 oranında glutraldehit olacak şekilde hazırlanan çözeltiye daldırılıp karıştırılmıştır. Enzim molekülleri ve elektrot üzerinde bulunan amino grupları çapraz bağlanmayla bağlanmıştır. Enzim bağlı elektrotlardan 0,5-2 mL/dak debide, sürekli olarak 1/15 M konsantrasyonunda fosfat tamponu geçirilmiş ve -0,3V'luk potansiyel uygulanmıştır. Amperometrik ölçümler bir potensiyostat/galvanostat kullanılarak gerçekleştirilmiş ve sistem kararlı hale geldikten sonra, 5'er dakika aralıklarla substrat enjeksiyonları yapılmıştır. 0,5-2 mL/dak debilerde yapılan çalışmalarda her iki elektrotta da debi arttıkça sensör sinyallerinin azaldığı görülmüştür. Optimum debinin 1,5mL/dak olduğu ve *tyrosinase* elektrotunun substrat seçiciliğinin sırasıyla; katekol>*p*-kresol>pyrogallol>phenol>*m*-kresol olarak belirlenirken, çift enzimli elektrotta bu seçicilik katekol>*p*-kresol>fenol>*m*-kresol>pyrogallol şeklinde olduğu belirlenmiştir. Her iki elektrotta lineerliğe 1-20 µM substrat konsantrasyonlarında ulaşıldığı, elektrotların kullanılmadığı süre içinde +4°C de buzdolabında korunabileceği ve 1 ay sonunda elektrotların ilk hassasiyetlerinin ancak %50'sini koruyabildiği rapor edilmiştir (Notsu and Tatsuma, 2004).

Tyrosinase enzimi titanyum sol-jel matriks içerisine immobilize edilerek fenol sensörü olarak kullanılmış ve immobilizasyon işlemi, buhar toplama metoduyla yapılmıştır. Bu metotla immobilizasyon kolaylaştırılmış ve sol-jel cam matrikslerde

oluşabilecek çatlamaların önüne geçilmiştir. Kullanılan bu yeni matriks enzime, enzimin doğal yapısını ve aktivitesini koruyucu bir mikroçevre sağlamış, ayrıca substrat ile enzim arasında kütle transferinden kaynaklanan etkileşmeyi arttırmış ve enzimin etkili kullanma ömrünü uzattığı görülmüştür. Fenolün oksidasyonu sonucu oluşan ürünler -150 mV potansiyelde sensör tarafından belirlenmiş ve sensörün, 5 saniye gibi kısa sürede yanıt verdiği ve sensör duyarlılığının çok yüksek olduğu belirlenmiştir. Bunun nedeni olarak, enzimin poroz yapıya sahip matriks içinde fazla miktarda tutuklanmasından kaynaklandığı öne sürülmüştür. $1,2 \times 10^{-7}$ - $2,6 \times 10^{-4}$ M fenol konsantrasyonlarında sensörde lineerlik görülmüş ve sensör için gerekli minimum fenol konsantrasyonunun 1×10^{-7} M olduğu belirlenmiştir. Enkapsüle edilmiş *tyrosinase* enziminin Michelis-Menten sabitinin 0.29 ± 0.02 mM olduğu ve elektrotun 80 gün sonunda aktivitesinin %94'ünü koruduğu bulunmuştur (Yu et al., 2003).

Tyrosinase, altın ile modifiye edilmiş karbon elektrota immobilize edilmiş ve anyonik koloidal altının kullanılmasıyla enzim biyoaktivitesinin arttığı ve sensör aktivitesini yitirmeden defalarca kullanılabileceği tespit edilmiştir. Optimum pH değerinde, optimum koloidal altın miktarı kullanılarak hazırlanan sensörden 5 saniye gibi kısa sürede sinyal alındığı ve sensör stabilitesinin uzun bir süre korunduğu bulunmuştur. Ayrıca, 4-48 μ M fenol konsantrasyon aralığında sensörde lineerliğe ulaşıldığı ve sensör için gerekli minimum fenol konsantrasyonunun 6,1 nM olduğu belirlenmiştir (Liu et al., 2003).

Sulu çözeltilerde 4-klorofenolün belirlenmesi pH duyarlı, yarı geçirgen dönüştürücüye sahip potansiyometrik bir sensör yardımıyla gerçekleştirilmiştir. *Tyrosinase*, ilk defa doygun gluteraldehit buharı içinde immobilize edilmiş ve sistemde farklı pH'lara ve gluteraldehit buharında farklı sürelerde immobilizasyona göre çalışılmıştır. Bu şartlarda biyosensörün hassasiyeti, belirlenebilir minimum substrat konsantrasyonu ve stabilitesi araştırılmıştır. Belirlenebilir minimum substrat konsantrasyonunun 20 ppm, belirlenebilir konsantrasyon aralığının ise 20-1000 ppm arasında olduğu bulunmuştur. Sensörün kararlılığa 3-4 saatte ulaştığı ve bu kararlılığın 15 saat devam ettiği görülmüştür. En iyi sensör yanıtının pH 6'da olduğu tespit edilmiştir (Mai et al., 2002).

Peroxidase amperometrik elektrot kullanarak, ucuz ve basit bir nitrik oksit biyosensörü tasarlanmıştır. Nitrik oksit varlığında *horseradish peroxidase* aktivitesinde inhibisyon görüldüğünden aktivitedeki düşme ile nitrik oksit konsantrasyonu arasında bir ilişki kurulabileceği belirtilmiştir. Naylon, 6 mm çapında diskler halinde kesilerek, kimyasal çapraz bağlanma tekniği ile kesilen diskler üzerine, içinde *horseradish peroxidase*, BSA ve gluteraldehit bulunan çözelti püskürtülerek, yüzey homojenleştirilmiştir. Diskler, 30 dakika boyunca oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Aynı şekilde bir de elektrokimyasal çapraz bağlama tekniği kullanılarak immobilizasyon gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon için, biyosensör, *p*-benzokinon içeren fosfat tamponuna daldırılarak 10 saniye boyunca +0,2 V'luk potansiyel uygulanmıştır. Sistem kararlı hale getirildikten sonra sisteme hidrojenperoksit eklenerek reaksiyon başlatılmış ve 1 dakika sonra nitrik oksit ilavesi yapılmıştır. Akım düşüşü izlenerek nitrik oksit konsantrasyonları bulunmuştur. Kimyasal çapraz bağlanma tekniği ile immobilize edilen biyosensörün belirleyebildiği maksimum nitrik oksit konsantrasyonu $7,9 \times 10^{-6}$ M iken, elektrokimyasal çapraz bağlama tekniği ile immobilize edilen biyosensörün belirleyebildiği maksimum nitrik oksit konsantrasyonu 2×10^{-6} M olarak bulunmuştur. Tasarlanan biyosensörler, nitrik oksitten dolayı sürekli inhibisyona maruz kaldığından tek kullanımlık biyosensörler olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Casera et al., 2000).

Sulu ortamda fenolik bileşiklerin belirlenmesi için *peroxidase* elektrotu hazırlanmış ve enzim çözeltisi grafit üzerine damlatılarak, enzimin grafit üzerine +4°C'de 30 dakika boyunca adsorplanması beklenmiştir. Adsorplama işleminden sonra, elektrot yıkanmış ve teflon tutucu içine yerleştirilerek, amperometrik hücreye daldırılmıştır. Referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrotu kullanılarak elektrotlar bir potansiyostata bağlanmış ve elektrokimyasal hücre, kesikli substrat yükleme sistemine göre çalıştırılmıştır. Bu sisteme ek olarak glikoz oksidaz reaktörü kullanılarak hidrojenperoksit üretimi sağlanmıştır. Fenolün enzimatik oksidasyonu ile oluşan radikaller, elektrot üzerinde indirgenmiş ve indirgenme akımı ile fenol konsantrasyonları arasında ilişki kurulmuştur. Elektrotun çalışma stabilitesi, sisteme ard arda verilen difenol yüklemeleri ile araştırılmıştır. Tekrarlanan yüklemeler sonucu, 1 saat boyunca elektrottan alınan akım değerlerinin % 2-3 oranında azaldığı görülmüş, elektrotun 2 hafta boyunca kararlı kaldığı ve 2. haftadan

sonra aktivitede hızlı düşüşlerin meydana geldiği, ayrıca 3 haftadan sonra elektrotun bu aktivitede sabit kaldığı tespit edilmiştir (%60) (Rogers et al., 1995).

Kan testlerinde kullanılan *horseradish peroxidase* sensörlerinin stabilizasyonu için, tetrametilbenzidin (TMB), luminol, argonla doyurulmuş tampon, BSA, ve Tween 20 gibi çeşitli kimyasalların etkisi araştırılmıştır. Ayrıca reaksiyonlarda kullanılacak çözeltilerin gün ışığında ve karanlıkta korunmasının aktiviteye etkisi araştırılmıştır. TMB ve luminolün enzimi etkili bir biçimde stabilize ettiği görülmüş. Stabilize edici madde konsantrasyonlarının 0,1 mM'ın altında olmasına rağmen karanlıkta korunan çözeltiler kullanıldığında, 12 hafta boyunca aktivitede kayıp görülmemiş, aynı stabilize edici madde konsantrasyonlarında, gün ışığına maruz bırakılan çözeltiler kullanıldığında, 6 haftada aktivitede %80'e varan kayıplar görülmüştür. Bu çözeltiler argonla doyurulmuş tampon içinde kullanıldıklarında aktivitede kayıp olmadığı literatürde belirtilenin tam aksine, BSA ve Tween 20'nin stabilize edici etkisinin olmadığı görülmüştür. Stabilize edilen enzimler bu amaçla 3 ay aktivitesinde değişim söz konusu olmadan kullanılmış ve TMB'in etkili olduğu en iyi konsantrasyon 6 μ M, luminolün etkili olduğu en iyi konsantrasyon ise 0,1 μ M olarak belirlenmiştir. TMB ve luminolün, enzimin aktif bölgesine bağlanarak, oksidatif yıkımını ve üç boyutlu yapısını koruduğu ve ayrıca, çözeltide bulunan serbest radikalleri uzaklaştırdığı belirtilmiştir (Schütz et al., 1997).

Fenolik bileşiklerin analizi için hazırlanan grafit ve karbon elektrotlarla yapılan başka bir çalışmada, reaksiyon sonucu oluşan radikaller, elektrokimyasal olarak indirgenmiş ve indirgenme akımı ve fenol konsantrasyonları arasında ilişki kurulmuştur. Oluşan radikallerin grafit elektrotta indirgenmesinin karbon elektrotta göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Elektrotların, %5 metanol içeren tamponda daha kararlı olduğu belirlenmiş ve test edilen 20 fenolik bileşik arasında fenol, katekol, resorkinol, *p*-kresol, 4-klorofenol, 2,4-diklorofenol, 4-kloro-3-metilfenol, vanilin ve 2-amino-4-klorofenol belirlenebilmiştir. En iyi sensör hassasiyetine, 2-amino-4-klorofenol kullanıldığında ulaşıldığı belirlenmiştir (Ruzgas et al., 1995).

Atıksulardaki fenolün belirlenmesi için yapılan bir biyosensöre, DNA, polietilenimin (PEI) ve BSA gibi farklı katkı maddeleri eklenerek, bu maddelerin sensöre etkisi araştırılmıştır. *Peroxidase*, titanyum oksit ile modifiye edilmiş silikajel

üzerine gluteraldehit yardımıyla çapraz bağlanmıştır. İmmobilizasyon işleminde hazırlanan enzim çözeltileri içine katkı maddeleri eklenmiş ve immobilize edilen silikajel, grafit tozu ve mineral yağı homojen kıvama gelene kadar karıştırılmış ve kurutulmuştur. Oluşan aparat, platinyum disk içeren, 1 mm derinlikli cam tüpe yerleştirilmiş, kağıt atıksuyu numunesinin pH'sı 7 olacak şekilde ayarlanmış ve sisteme verilmiştir. Katkı maddesi olarak PEI ve BSA'nın eklendiği sistemde eklenmeyene göre fenol hassasiyeti bakımından bir fark olmadığı, katkı maddesi olarak DNA kullanıldığında, sensörün fenol hassasiyeti önemli derecede arttığı görülmüştür. Bu davranışın, DNA'nın elektron transferini kolaylaştırdığından kaynaklandığı belirtilmiştir. Ayrıca sensörün, DNA'lı sistemde mevcut aktivitesini 1 ay boyunca koruduğu rapor edilmiştir (Rosatto et al., 2001).



5. MATERYAL – METOT

5.1. Materyal

Deneyisel çalışmalarda kullanılan kimyasallardan, fenol, hidrojenperoksit (%35 V/V), gluteraldehit (%25 W/V), 4-aminoantiprin, Coomassie Brilliant Blue G-250, katalaz (EC 1.11.1.6), *horseradish peroxidase* (EC 1.11.1.7), Bovin Serum Albumin ve 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin Merck'den, metanol Fluka'dan, dimetil sülfoksit ise Sigma'dan temin edilmiştir.

5.2. Metot

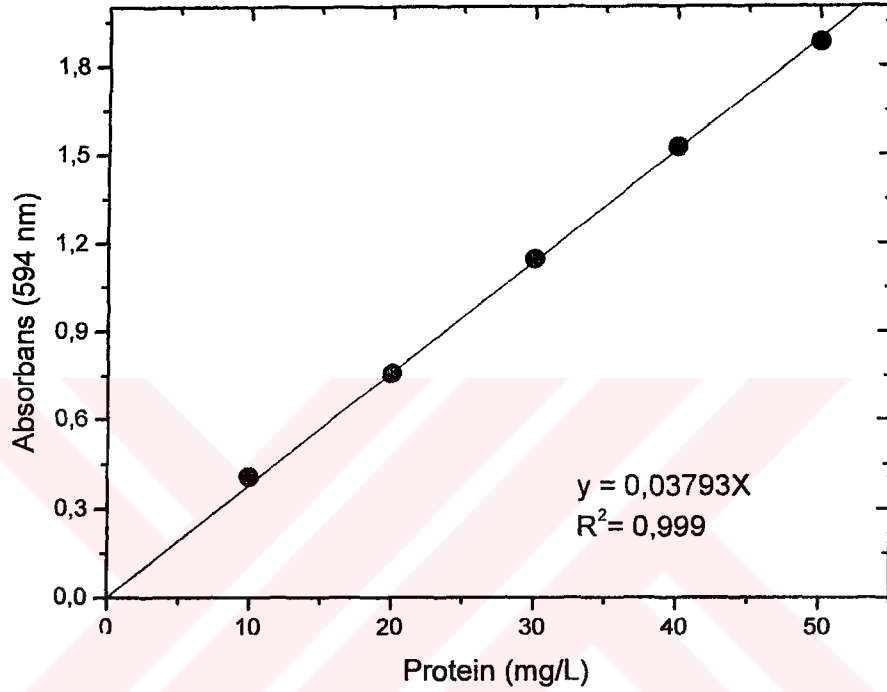
5.2.1. Biorad Protein Analizi

Metotta esas olarak Coomassie Brilliant Blue boyası kullanılır. Bu boya, ortamda bulunan proteinlerle kompleks oluşturarak ortamdaki proteinin yoğunluğuna göre açık veya koyu mavi renk verir. Metot, oluşan renklerin 595 nm dalga boyunda UV-Spektrofotometrede okunmasına dayanır. Bu analiz 0-50 ppm aralığında protein içeren çözeltilere uygulanabilmektedir.

Analizde kullanmak üzere 100 mg Coomassie Brilliant Blue, 50 mL metanolde çözülmüştür. Çözünen boya 100 mL %85'lik fosforik asite ilave edilerek karıştırılmış ve toplam hacim saf su ile 200 mL'ye tamamlanmıştır (http://www.science.smith.edu/departments/Biochem/Biochem_353/Bradford.html). Bu çözeltiden 21 mL alınmış, üzerine 27 mL saf su ile eklenerek karıştırılmış ve boya protein analizi için kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Protein kalibrasyonunda standart protein olarak Bovin Serum Albumin kullanılmıştır. Standart proteinden, konsantrasyonları 10, 20, 30, 40 ve 50 mg/L olacak şekilde 5 çözelti hazırlanmıştır. Her bir çözeltiden deney tüplerine 1,5 mL alınmış ve üzerlerine 1,5 mL hazırlanan boyadan ilave edilmiştir. Aynı bir deney tüpüne 3mL saf su ve 3 mL boya eklenip karıştırılmıştır. UV-spektrofotometre dalga

boyu 594 nm olacak şekilde ayarlanmış ve saf su içeren karışıma göre sıfırlanmıştır. Her bir örneğin 594 nm dalga boyunda absorbansları okunmuştur. Protein konsantrasyonlarına karşı okunan absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır. Protein kalibrasyon eğrisi Şekil 5.1’de gösterilmektedir.



Şekil 5.1. Protein Kalibrasyon Eğrisi

5.2.2. Enzimatik Fenol Tayini

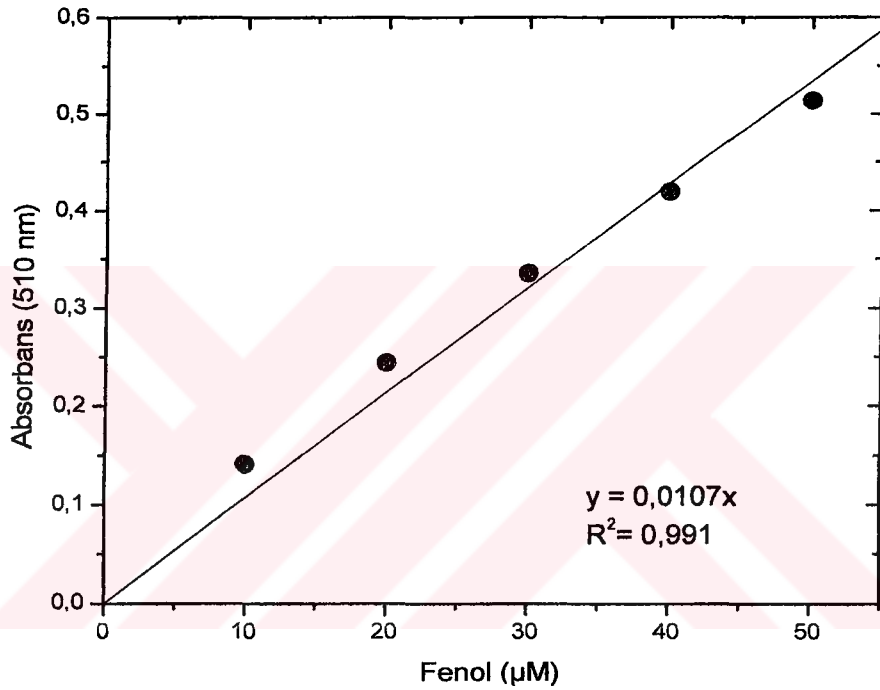
Metot, fenolün, 4-aminoantiprin varlığında horseradish peroxidase enzimi ile reaksiyona girmesi sonucu tüketilen fenolün miktarının belirlenmesine dayalıdır.

Reaksiyonda kullanılan enzim çözeltisi şu şekilde hazırlanmıştır: bir tüp enzim (52 mg), 100 mM (pH 7,4) potasyum fosfat tamponunun 10 mL’inde çözölmüştür. Bu çözöltiden 360 μ L alınmış ve aynı tampon ile hacim 3 mL’ye seyreltilmiştir.

Reaksiyon ortamındaki konsantrasyonları sırasıyla, 10, 20, 30, 40, 50 μ M olacak şekilde, 5 deney tüpüne stok fenol çözöltisinden alınmıştır. Tüplere, 100 mM



(pH 7,4) potasyum fosfat tamponundan 1,4 mL, 1 mM hidrojen peroksitten 1 mL, 9,6 mM aminoantiprinden 1 mL ve hazırlanan enzim çözeltisinden 400 μ L eklenip tüpler çalkalanmıştır. 30 dakika bekletildikten sonra UV-Spektrofotometrede 510 nm dalga boyunda absorbanslar okunmuştur. Her bir fenol konsantrasyonuna karşı okunan absorbans değerleri grafiğe geçirilip, bir fenol kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır. Fenol kalibrasyon eğrisi Şekil 5.2’de gösterilmektedir;

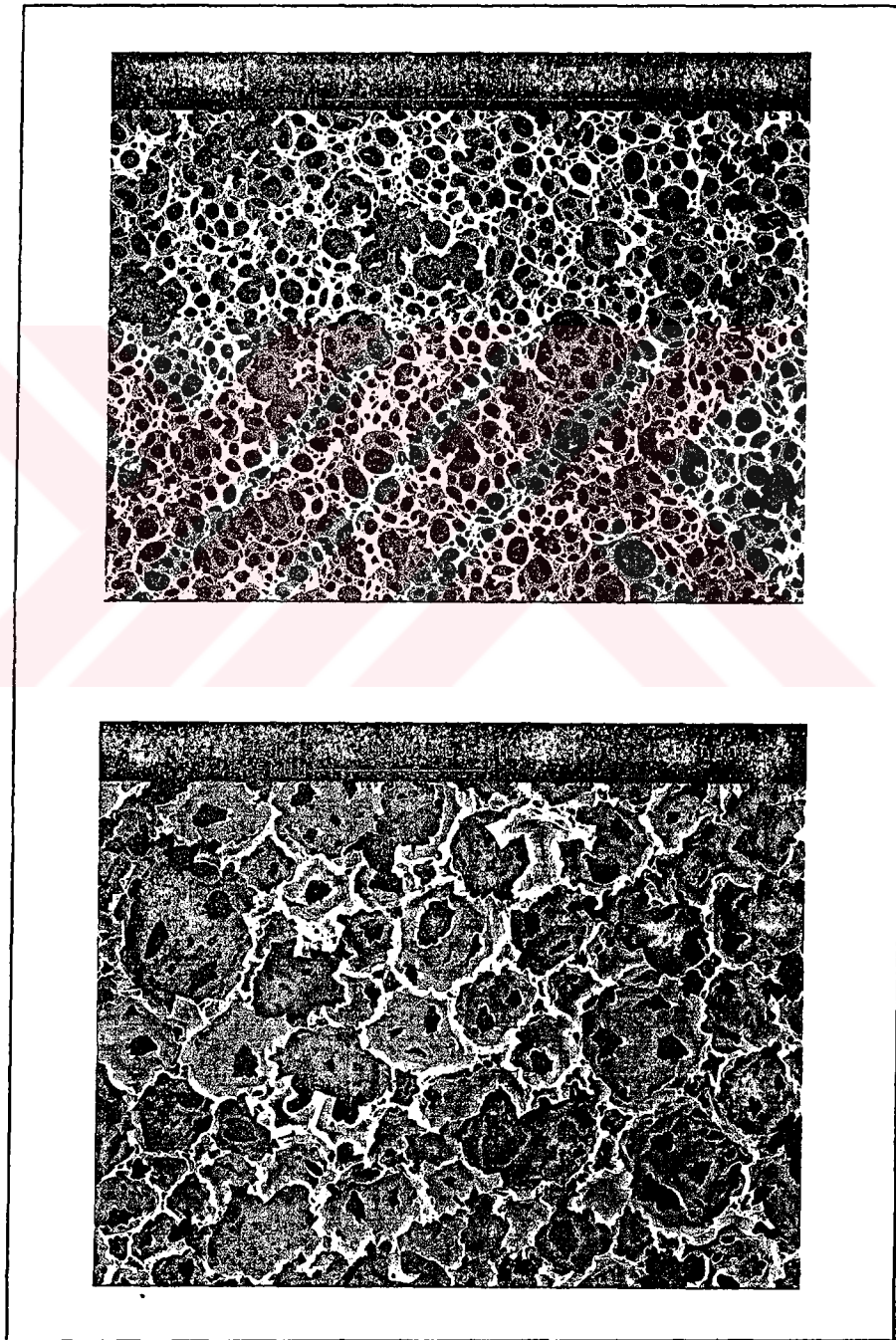


Şekil 5.2. Enzimatik Metoda Göre Fenol Kalibrasyon Eğrisi

5.2.3. Polimer Disklerin Hazırlanması

Yüksek poroziteye sahip polimer iki basamakta sentezlenmiştir. Birinci basamak polimerize gluteraldehit sentezidir. Dış hacmi 50 mL olan polimer bloğunun üretimi için % 5’lik gluteraldehitten 5 mL alınarak, 50 mL’ye seyreltilmiştir. Polimerizasyon reaksiyonunun olması için ortama 5 Ml, 0,1 M NaOH ilave edilmiş ve 30 dakika 600 rpm’de manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Daha sonra, bu reaksiyon sonucu elde edilen poligluteraldehit çözeltisinden 45 mL alınmıştır. Çözelti içine radikalik polimerizasyon reaksiyonunu başlatmak için

kullanılan başlatıcı potasyum peroksidosülfattan 0,7 g konularak çözülmüştür. Bu çözeltinin üzerine % 59 stiren, % 26 divinil benzen ve %15 span 80'den oluşan 5 mL emülsiyon faz ilave edilmiştir. Polimerizasyon reaksiyonu 80°C'de gerçekleştirilmiştir (Ünsal, 2003). Polimer blok, 0,5 cm kalınlığında ve 2 cm çapında diskler şeklinde kesilmiştir. Boş polimerin SEM mikrografı, Philips XL 30 SFEG marka taramalı elektron mikroskobu ile çekilmiştir (Şekil 5.3).



Şekil 5.3. Boş Polimerin SEM Mikrografı

5.2.4. Enzim İmmobilizasyonu

Enzim immobilizasyonu, poligluteralehit ile diske kimyasal bağlanma prosedürüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan poligluteralehit çözeltisi şu şekilde hazırlanmıştır: %25'lik gluteralehitten 25 mL alınmış ve içerisinde pH 9-10 aralığına ulaşana kadar 1 M sodyum hidroksit ilavesi yapılmıştır. Diskten geçecek enzim çözeltisi, 26,5 mg *horseradish peroxidase* enziminin, 100 mM pH 7,4 fosfat tamponunun 20 mL'sinde çözülmesiyle hazırlanmıştır.

Polimer diskin ağırlığı tartılmıştır. Disk, bir disk taşıyıcıya yerleştirilip pompaya bağlandıktan sonra 1 L saf su ile iyice yıkanmıştır. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra, 26 mL'lik poligluteralehit çözeltisi diskten 24 saat süreyle sirküle edilmiştir. Bağlanmayan poligluteralehitin sistemden uzaklaştırılması amacıyla disk 500 mL saf su ile yıkanmıştır. Hazırlanan enzim çözeltisinden 500 µL protein analizi için ayrılmış ve enzim diskten 0,3 mL/dak debide, 20 saat süre ile sirküle edilmiştir. Enzim immobilizasyonu tamamlandıktan sonra diskten sirküle edilmiş enzim çözeltisi toplanmış ve hacmi kaydedilmiştir. Disk kovalent bağlanmayan enzimin uzaklaştırılması amacıyla 300 mL saf su ile yıkanmıştır.

5.2.5. İmmobilize Enzim Miktarının Belirlenmesi

İmmobilize enzim miktarı, Bölüm 5.2.1'de açıklanan metota göre belirlenmiştir. Başlangıç, çıkış enzim çözeltilerine ve yıkama suyuna gerekli seyreltmeler yapıldıktan sonra her bir çözeltiliye eşit hacimde boya ilavesi yapılmış ve örneklerin 594 nm dalga boyunda UV- Spektrofotometrede absorbanları okunmuştur. Absorbans değerleri, protein kalibrasyon eğrisi denkleminde yerine konup örneklerdeki protein miktarları belirlenmiştir. Bağlı enzimin miktarı, başlangıç protein miktarından çıkış ve yıkama protein miktarlarının toplamı çıkarılarak belirlenmiştir.

Yukarıda açıklanan analizin kontrolü amacıyla, Bölüm 5.2.1'de açıklanan boya bağlama metoduna dayalı olarak, bir de farklı şekilde protein analizi yapılmıştır. İçerisinde enzim bulunan polimer disk pompaya bağlanmış ve sistemden Coomassie Brilliant Blue boya çözeltisi 1 saat sirküle edilmiştir. Burada amaç, disk içerisinde

geçen boyanın diskte bulunan protein ile bağlanmasını sağlamaktır. Sirkülasyon işleminden sonra, bağlanmayan boyayı sistemden uzaklaştırabilmek için, %30 metanol ve %7,5 asetik asit içeren 250 mL çözelti sistemden geçirilmiştir. Çözelti, boya ile karışınca renk maviye döner. Çıkıştaki mavi renk kaybolana kadar yıkama işlemine devam edilmiştir. Disk çıkarılmış ve aynı çözeltiye yatırılmıştır. Pompa hortumları ve disk tutucuya yapışan boyayı uzaklaştırabilmek için, %1 SDS (sodyum dodesilbenzen sülfonat) ve %1 sodyum bikarbonat içeren çözelti hazırlanmış, ekipmanlar bu çözeltiye yatırılmıştır. Disk, yeniden tutucuya yerleştirilmiştir. Bu defa, diskte bağlanmış olan boyayı sistemden uzaklaştırabilmek için, pompadan, 25 mL %1'lik SDS ve %1'lik sodyum bikarbonat içeren çözelti sirküle edilmiştir. İşlem tamamlandıktan sonra, sirküle edilmiş çözeltinin 594 nm dalga boyunda UV-Spektrofotometrede absorbansı okunmuştur. Protein kalibrasyon eğrisinde bu değer yerine konulmuş ve diskte bağlı bulunan protein miktarı belirlenmiştir.

5.2.6. Serbest Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi ve Serbest Enzim Kinetiği

Serbest enzim kinetiği için, 5 adet 50 mL'lik balonjojelere fenol konsantrasyonları sırasıyla, 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2 mM olacak şekilde tartılan fenoller eklenmiştir. Bu çözeltilerin üzerlerine toplam hacimdeki konsantrasyonu 9,6 mM olacak şekilde 4-aminoantiprin, 3 mM olacak şekilde hidrojenperoksit ilave edilmiştir. Literatürde yapılan çalışmalarda H_2O_2 / fenol oranı 1-2 aralığında olacak şekilde reaksiyonlar yapılmış, bu aralık aşıldığı takdirde enzimin inhibe olduğu belirtilmiştir ve optimum H_2O_2 / fenol oranı 1,5 bulunmuştur (Liu, 2002). Her bir balonjoje, 100 mM, pH 7,4 fosfat tamponuyla 50 mL'ye tamamlanmıştır. Bu 5 farklı fenol çözeltilerine 50 µL enzim (1,36µg) eklenerek reaksiyonlar başlatılmıştır. Reaksiyonlar 60. saniyede 50 µL katalaz ilavesiyle durdurulmuştur. Örnekler 30 dakika bekletilip, UV-Spektrofotometrede 510 nm dalga boyunda absorbanslar okunmuştur. Okunan absorbans değerleri Bölüm 5.2.2'de belirtilen fenol kalibrasyon grafiğinde yerlerine konulmuş ve her çözeltide tüketilen fenol miktarları hesaplanmıştır. Reaksiyonun 65. saniyede durduğu belirlenmiş ve bu süreye göre aktiviteler hesaplanmıştır. Hesaplanan aktiviteler ortamdaki enzim miktarına bölünmüş ve spesifik aktiviteler belirlenmiştir. 1/S'lere karşı 1/V değerlerinin

Lineweaver-Burk'e göre grafiği çizilmiştir (Şekil 6.1). Elde edilen grafikten V_m ve K_m değerleri hesaplanmıştır.

5.2.7. İmmobilize Enzim Aktivitesi ve İmmobilize Enzimin Görünür Aktivitesinin Belirlenmesi

İmmobilize enzim çalışmalarında kullanılmak üzere bir taşıyıcı ortam hazırlanmıştır. Bu ortam, 4-aminoantiprin ortamıdır. Aminoantiprin, konsantrasyonu 9,6 mM olacak şekilde 100 mM, pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde çözölmüştür. Çözelti, sabit debide bir HPLC pompası ile sürekli akışta diskten geçirilmiştir. Disk tutucunun çıkışı UV-Spektrofotometre içindeki sürekli akış mikroküvetine bağlanmıştır. UV-Spektrofotometre zamana karşı absorbans okuma modunda çalıştırılmış ve dalga boyu 510 nm olarak ayarlanmıştır. Taşıyıcı ortam diskten geçerken, sırasıyla, 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2 mM fenol ve 3 mM hidrojenperoksit içeren 1 mL'lik çözelti hacimleri bir enjeksiyon valfinden sisteme enjekte edilmiştir. Her enjeksiyon sonunda oluşan pik gelişimleri UV-Spektrofotometrede gözlenmiştir. Enjeksiyonlar yapıldıktan sonra her enjeksiyon için UV-Spektrofotometre çıkışından örnekler toplanmıştır. Her farklı fenol konsantrasyonları için yapılan enjeksiyonlardan toplanan örnek hacimleri kaydedilmiştir. Her bir örneğin, en az 30 dakika bekletilerek renk gelişimi tamamlandıktan sonra, her çözeltide tüketilen fenol miktarları hesaplanmıştır. Spesifik aktivite gram disk başına hesaplanmıştır. $1/S$ 'lere karşı $1/V$ değerlerinin Lineweaver-Burk'e göre grafikleri çizilmiştir. Elde edilen grafiklerden immobilize enzim için V_m ve K_m değerleri hesaplanmıştır.

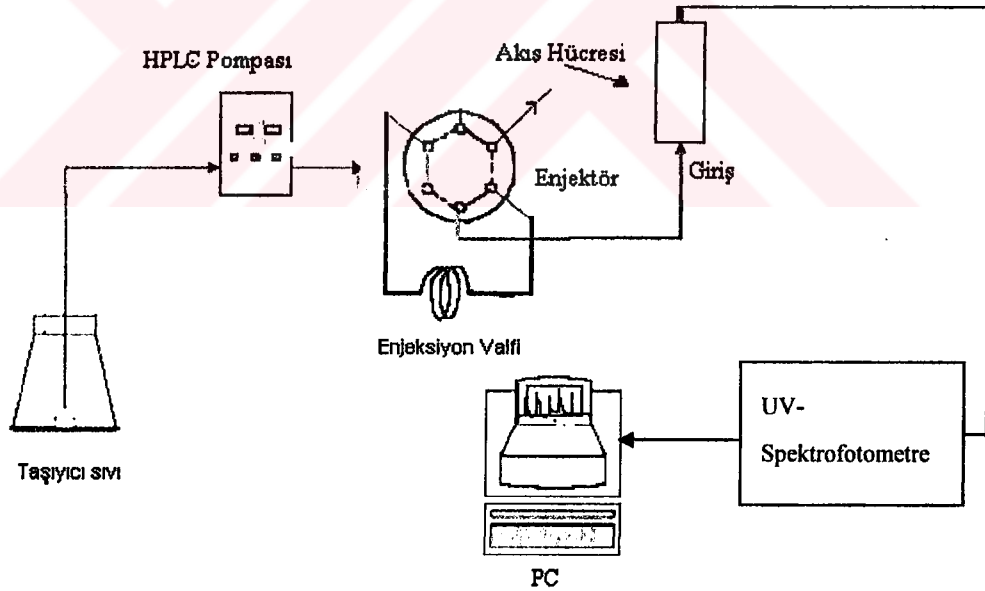
5.2.8. Deneylerin Yapılışı

5.2.8.1. Deney Düzenegi

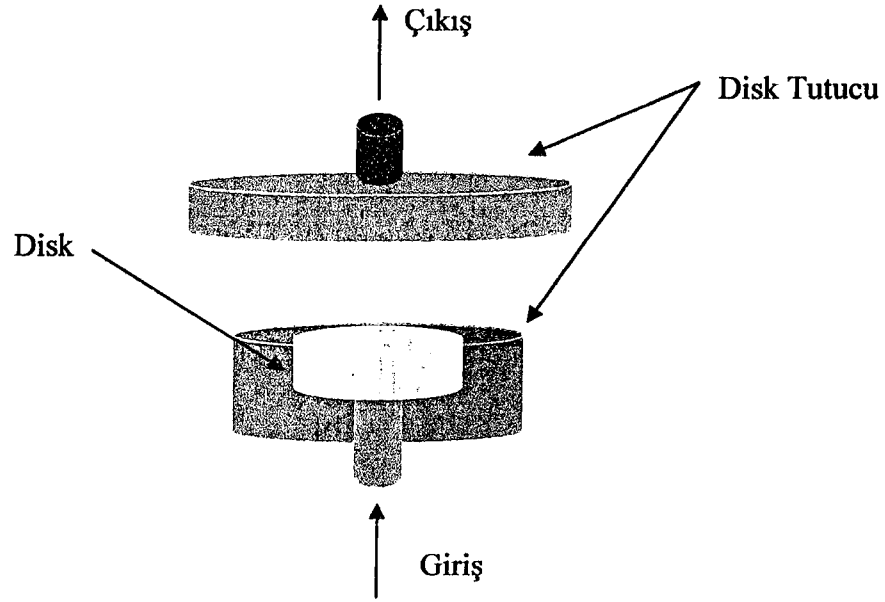
Sistem, bir UV-Spektrofotometre, 1 cm³'lük enjeksiyon valfi, HPLC pompası, disk taşıyıcı, 1 cm ışık yollu ve 80 µL hacimli mikroküvetten oluşmaktadır (Şekil 5.4). Sistemden, içinde 9,6 mM 4-aminoantiprin olan tampon çözeltisi HPLC pompası kullanılarak geçirilmiştir. Bu ortamın aynısı kör olarak kullanılmış, UV-Spektrofotometre 510 nm dalga boyunda sıfırlanmıştır. Deneysel çalışmaların amacına göre, değişik konsantrasyonlarda fenol ve hidrojenperoksit karışımları

enjeksiyon valfi yardımıyla sisteme enjekte edilmiştir. Enjeksiyon valfinde toplanan 1 cm^3 'lük karışım taşıyıcı ortama karışarak, disk tutucu içerisinde bulunan reaktöre ulaşmış ve buradaki immobilize enzimle reaksiyona girmiştir. Oluşan reaksiyon ürünleri, taşıyıcı sıvıda bulunan 4-aminoantiprin ile birleşerek pembe renkli kompleks oluşturmuştur. 1 cm^3 'lük enjeksiyonun diske girişi ve reaksiyon ürünlerinin ortamdan desorbe olması sırasında UV-Spektrofotometrede zamana bağlı ürün pikleri elde edilmiştir. Ürün piklerinin alanları sabit debide, başlangıç fenol konsantrasyonuna bağlı olarak değişim göstermiştir. Pik gelişimleri süresince, UV-Spektrofotometre çıkışından örnekler toplanmıştır.

Sistemde kullanılan disk taşıyıcı, teflon malzeme kullanılarak en düşük ölü hacimleri verecek şekilde tasarlanmıştır. Disk taşıyıcıda bulunan disk, 0,5 cm kalınlığında ve 2 cm çapındadır. Diskin boşluk oranı %90'dır. Disk taşıyıcının ayrıntılı gösterimi Şekil 5.5'da görülmektedir.



Şekil 5.4. Deney Düzenegi



Şekil 5.5. Disk Tutucu

5.2.8.2. İmmobilize Sistem Kullanılarak Ürün Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanışı

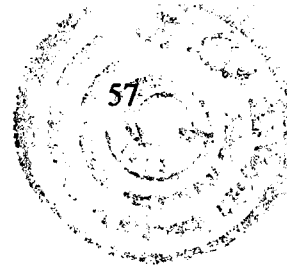
İmmobilize enzim çalışmalarında kullanılmak üzere 4-aminoantiprin taşıyıcı çözeltisi hazırlanmıştır. Aminoantiprin, konsantrasyonu 9,6 mM olacak şekilde 100 mM, pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde çözölmüştür. Çözelti, sabit debide bir HPLC pompası ile sürekli akışta diskten geçirilmiştir. Disk tutucunun çıkışı UV-Spektrofotometre içindeki sürekli akış mikroküvetine bağlanmıştır. UV-Spektrofotometre zamana karşı absorbands okuma modunda çalıştırılmış ve dalga boyu 510 nm olarak ayarlanmıştır. Taşıyıcı ortam diskten geçerken, sırasıyla, 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2 mM fenol ve 3 mM hidrojenperoksit içeren 1 mL'lik çözelti hacimleri bir enjeksiyon valfinden sisteme enjekte edilmiştir. Her enjeksiyon sonunda oluşan pik gelişimleri UV-Spektrofotometrede gözlenmiştir. Her bir pikin alanı hesaplanmıştır. Pik alanları, başlangıç fenol konsantrasyonları x ekseninde olacak şekilde grafiğe geçirilmiştir. Buradaki pik alanlarının, ortamda oluşan ürün miktarları ile orantılı olduğu gösterilmiştir.

5.2.8.3. İmmobilize Sistemde Farklı Debilerde Disk Davranışının İncelenmesi

Sistemde sırasıyla 0,1, 0,5, 1, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 6, 8, 10, 13, 14 ve 15 mL/dak debilerde çalışılmıştır. Her debi için, sisteme 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2 mM fenol ve 3 mM hidrojenperoksit karışımlarının 1 mL'si enjekte edilmiştir. Bölüm 5.2.7'de belirtilen metoda göre immobilize enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Farklı debiler için elde edilen konsantrasyon serilerine göre, görünür V_m değerleri hesaplanmıştır. Debiler x ekseninde olmak üzere elde edilen V_m ve K_m değerleri grafiğe geçirilmiştir (Şekil 6.25 ve Şekil 6.26).

5.2.8.4. Tetrametilbenzidinin Etkisinin Belirlenmesi

İçerisinde 1 mM fenol ve 3 mM hidrojenperoksit bulunan 9 adet çözeltiye konsantrasyonları sırasıyla 0,01, 0,02, 0,04, 0,08, 0,16, 0,32, 0,64, 1,28 ve 2,56 mM olacak şekilde tetrametilbenzidin ilave edilmiş ve hazırlanan bu çözeltiler 3 mL/dak debide sisteme enjekte edilmiştir. Her enjeksiyon için UV-Spektrofotometre çıkışında örnekler toplanmış ve aktivite tayini yapılmıştır. Elde edilen piklerin alanları hesaplanmıştır.



6. BULGULAR VE TARTIŞMA

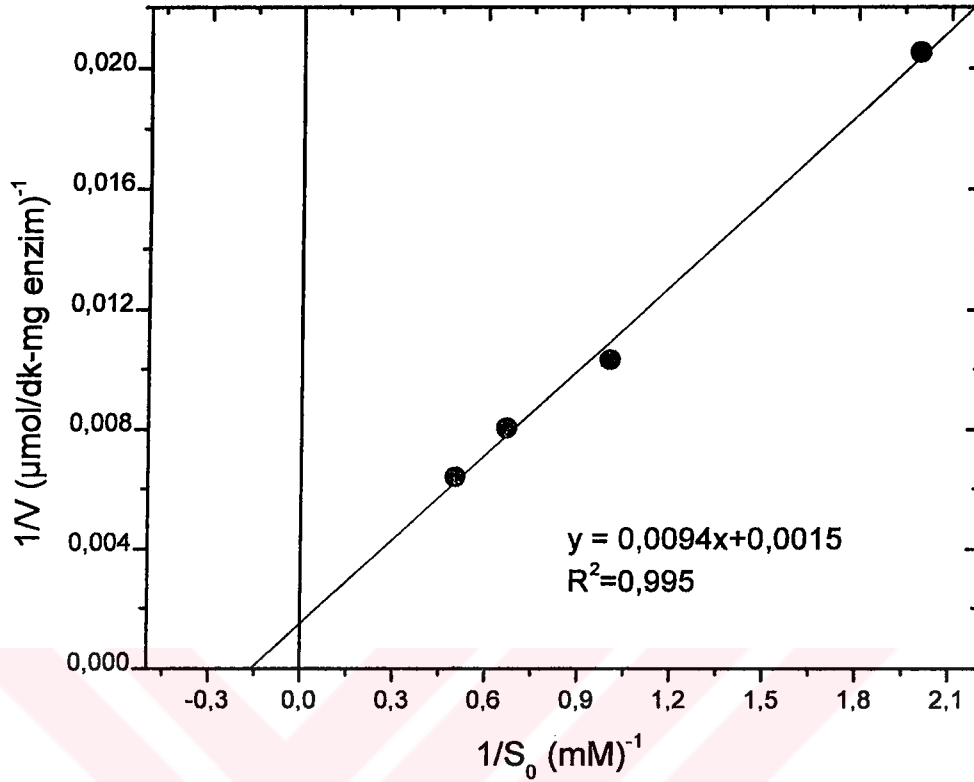
6.1. Serbest Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi ve Serbest Enzim Kinetiği

Bölüm 5.2.6'da açıklanan metoda göre yapılan serbest enzim çalışmalarında elde edilen veriler Çizelge 6.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 6.1. Serbest Enzim Kinetiği Sonuçları

S_0 (mM)	Absorbans Değerleri	Tüketilen Fenol Miktarları (μmol)	Spesifik Aktivite ($\mu\text{mol/dak-mg}$ enzim)
0,5	0,005	0,071	48,73
1,0	0,015	0,142	96,83
1,5	0,030	0,183	124,37
2,0	0,049	0,230	156,01

Çizelge 6.1'de hesaplanan değerler kullanılarak, Şekil 6.1'de görüldüğü gibi Lineweaver-Burk Grafiği çizilmiştir. V_m değeri, $667\mu\text{mol/dak-mg}$ enzim, K_m değeri ise $6,26\text{ mM}$ olarak bulunmuştur.



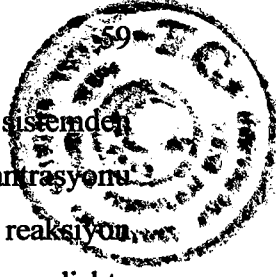
Şekil 6.1. Serbest Enzim İçin Lineweaver-Burk Grafiği

6.2. Sensör Çalışmaları

6.2.1. 4-Aminoantiprinin Etkisinin Araştırılması

İçerisinde, 1mM hidrojenperoksit bulunan ve konsantrasyonları sırasıyla 100, 200, 300, 400 ve 500 μM olan fenol çözeltileri, içerisinde 8 g polietilenglikol bulunan fosfat tamponu ile hazırlanmıştır. Reaksiyon ortamına 4-aminoantipren eklenmemiştir. Her fenol çözeltisi sabit debide sırasıyla diskten geçirilmiş ve 400 nm dalga boyunda UV-Spektrofotometrede zamana karşı absorbans taraması yapılmıştır. Sonuçlar, Şekil 6.2’de gösterilmektedir.

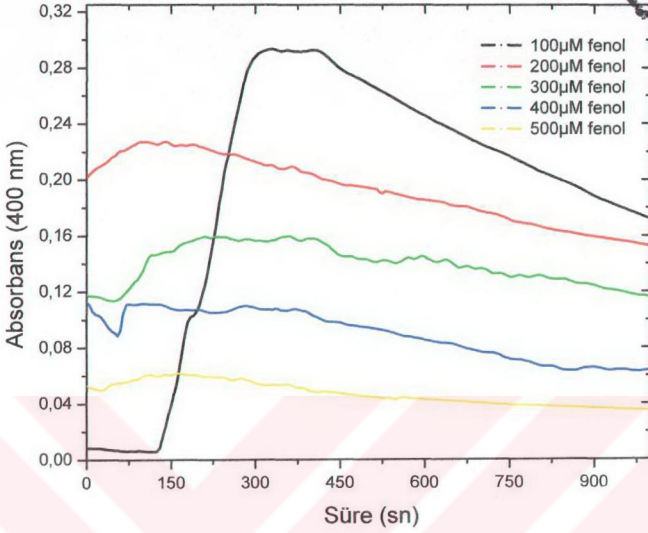
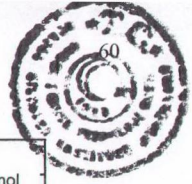
Şekil 6.2’de açıkça görüldüğü gibi, diskten 100 μM fenol geçerken oluşan ürün zamana göre artmaya başlamış, belli bir süreden sonra hızla düşmüştür. Başlangıç fenol konsantrasyonu arttıkça ortamda oluşan ürün miktarlarının zamana karşı



azaldığı görülmüştür. 4-aminoantiprinsiz ortamda yapılan çalışmalarda, sistemden sürekli olarak geçirilen her fenol konsantrasyonunda, başlangıç fenol konsantrasyonu arttıkça oluşan üründe azalma gözlenmiştir. 4-aminoantiprinin olmadığı reaksiyon ortamında oluşan fenoksi radikalleri hızlı bir şekilde polimerleşmiş ve diske tıkanmaya neden olmuştur. Disk, disk tutucudan çıkarılmış ve kırılmıştır. Diskte oluşan polimerler çıplak gözle görülebilmektedir. Reaksiyonda kullanılan polietilenglikol polimerleşmeyi önleyememiştir. Diskin tıkanması sonucu, diske bağlı immobilize enzim aktivitesi önemli ölçüde düşmüştür. Bu sorunu giderebilmek amacıyla, immobilize sistemde kullanılan reaksiyon ortamlarına 4-aminoantiprin eklenmiştir.

Fenolün enzim ile reaksiyonu sonucu oluşan radikaller, 4-aminoantiprin ile reaksiyona girerek renkli fakat çözünebilir formda ürün oluşturur. Oluşan ürün, yine bir fenol türevidir ve pembe renklidir, UV-Spektrofotometrede 510 nm dalga boyunda absorbanans gösterir.

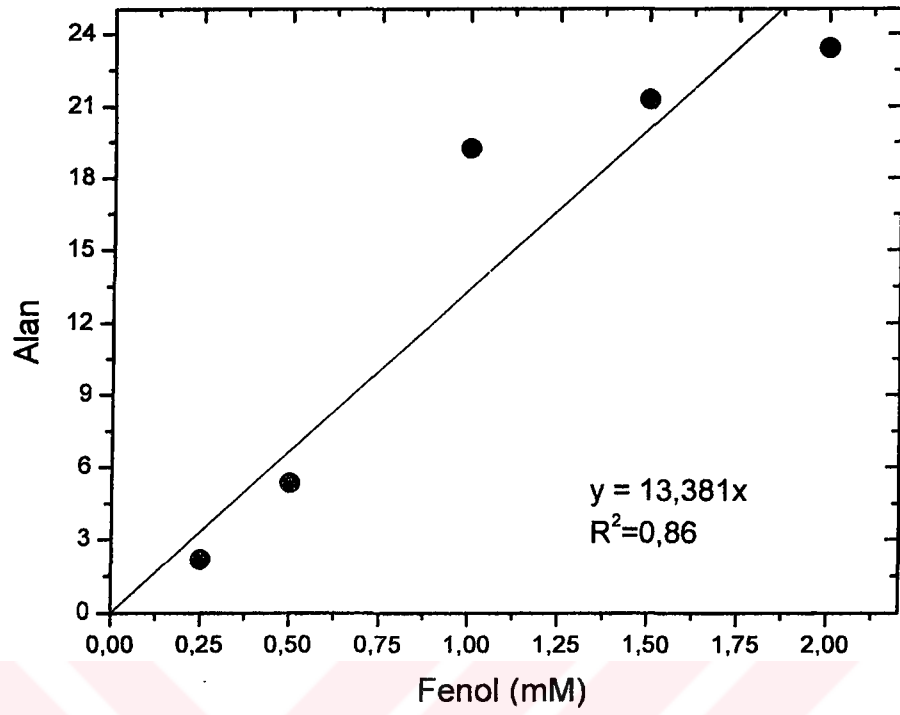
Deneysel çalışmalarda 4-aminoantiprin, konsantrasyonu 9,6 mM olacak şekilde kullanılmıştır. Serbest enzim ortamında, farklı konsantrasyonlarda 4-aminoantiprin ile gerçekleştirilen reaksiyonlarda, 4-aminoantiprin miktarının yetersiz geldiği miktarlarda renk gelişiminin az olduğu görülmüştür. Ortama aşırı miktarda 4-aminoantiprin eklendiğinde, 4-aminoantiprinin kendi renginden kaynaklanan bir girişim sözkonusu olmuş ve ürünün rengi gözlenememiştir. Reaksiyonlar için 4-aminoantiprin, konsantrasyonu 9,6 mM olacak şekilde kullanılmıştır.



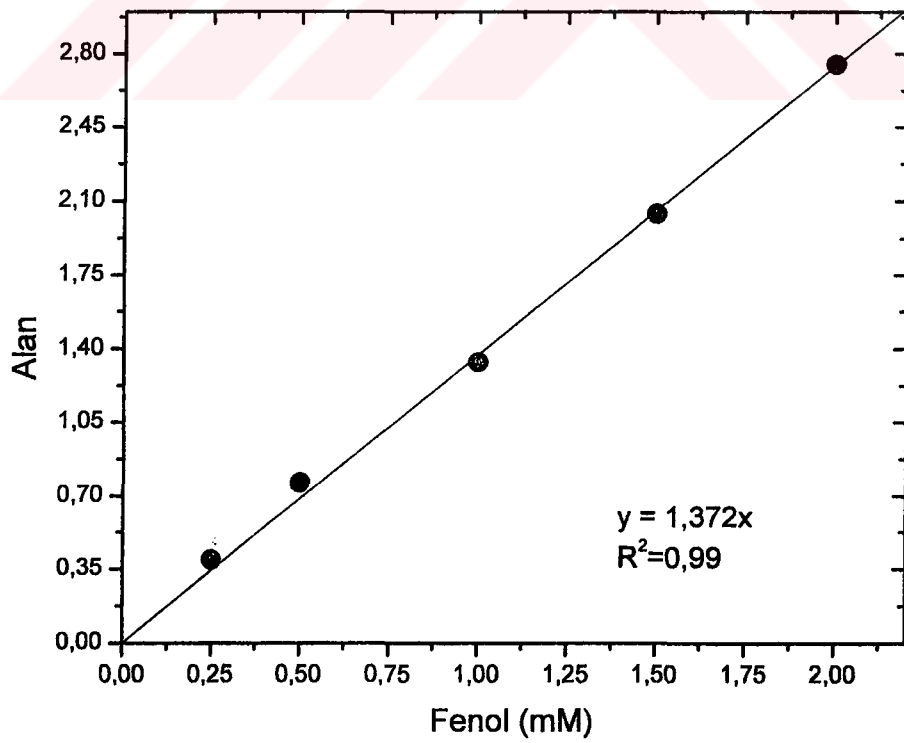
Şekil 6.2. 4-Aminoantiprinsiz Reaksiyon Ortamında İmmobilize Sistemin Davranışı

6.2.2. İmmobilize Sistem Kullanılarak Yapılan Ürün Kalibrasyon Eğrilerinin Yorumlanması

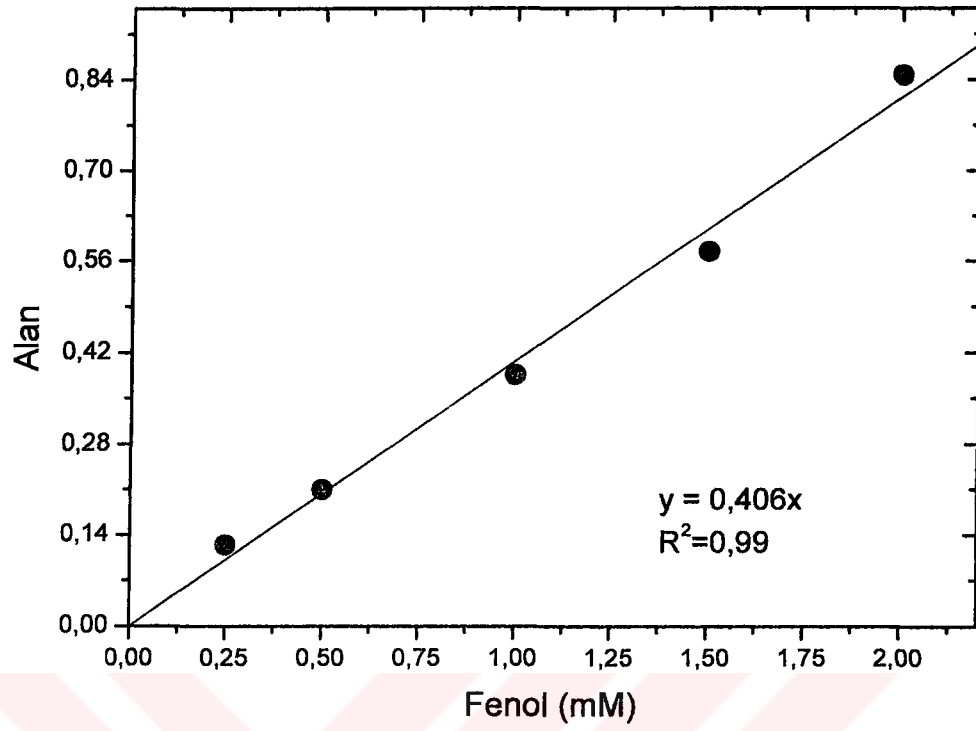
Deneyler farklı debilerde yapılmış olup, her debi için 5 farklı fenol enjeksiyonları yapılmış ve ortaya çıkan her pikin alanı hesaplanmıştır. Başlangıç fenol konsantrasyonlarına göre hesaplanmış alanlar her bir debi için grafiğe geçirilmiştir.



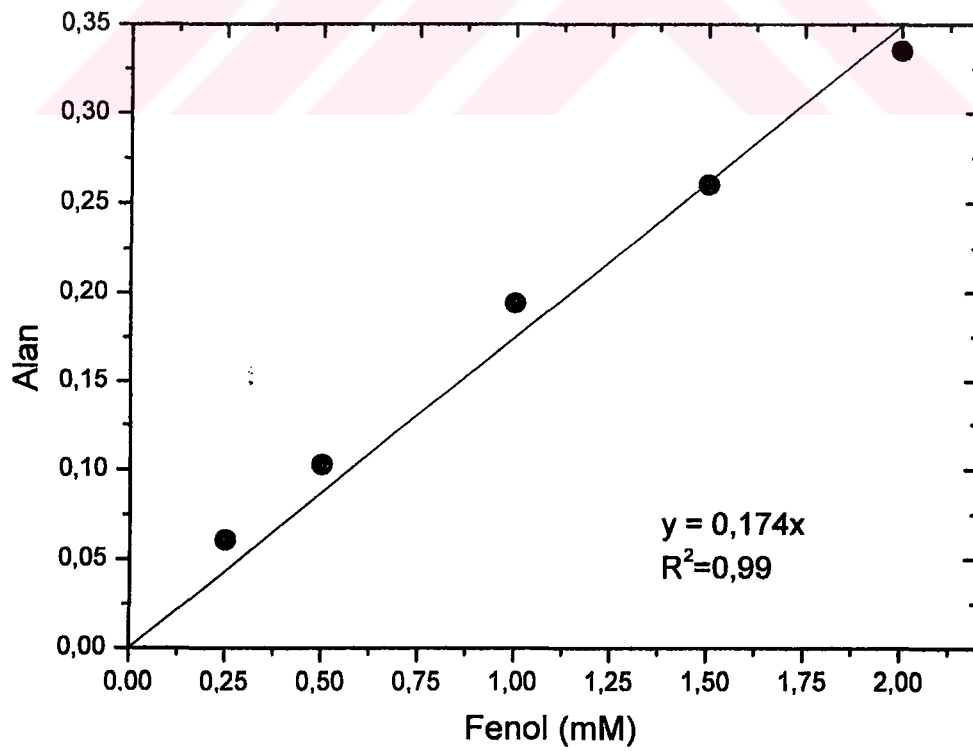
Şekil 6.3. 0,1 mL/dak Debide Ürün Kalibrasyonu



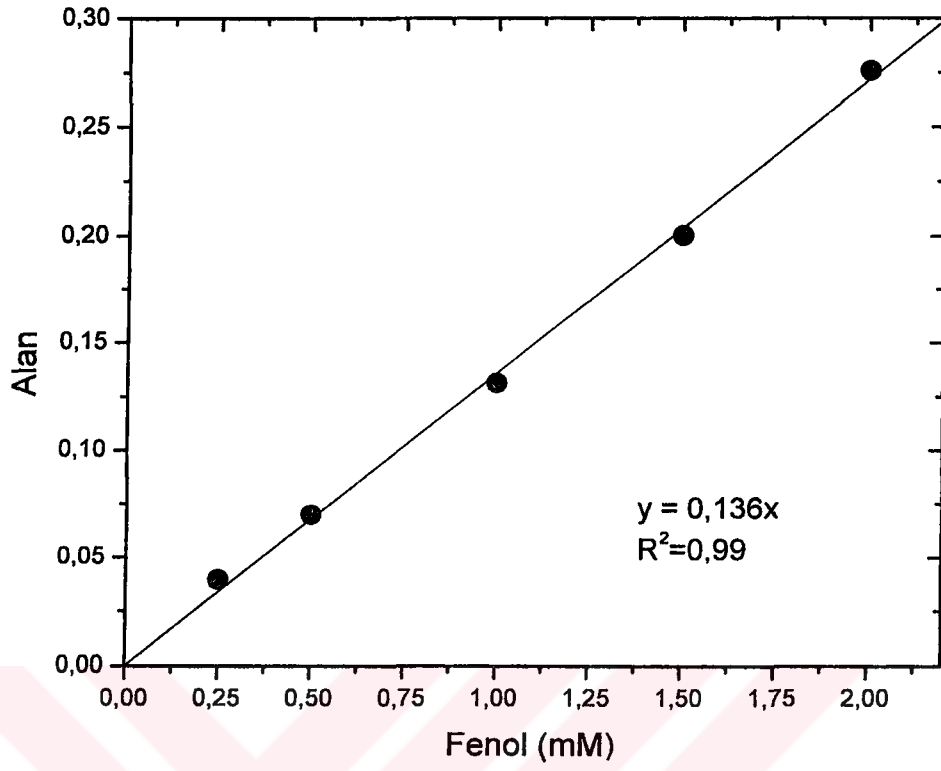
Şekil 6.4. 0,5 mL/dak Debide Ürün Kalibrasyonu



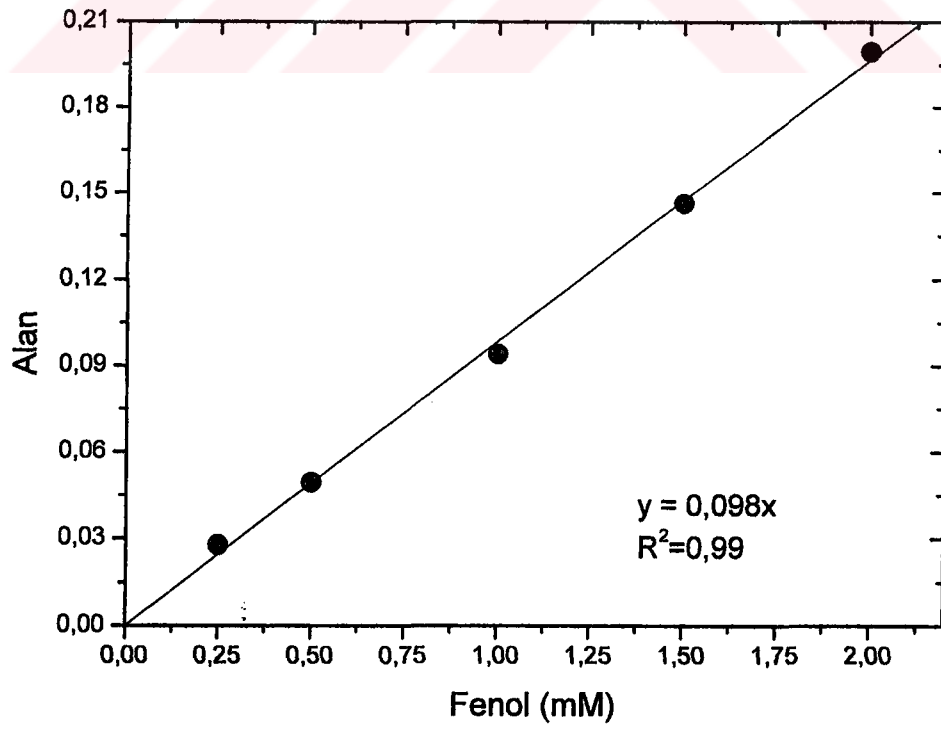
Şekil 6.5. 1 mL/dak Debide Ürün Kalibrasyonu



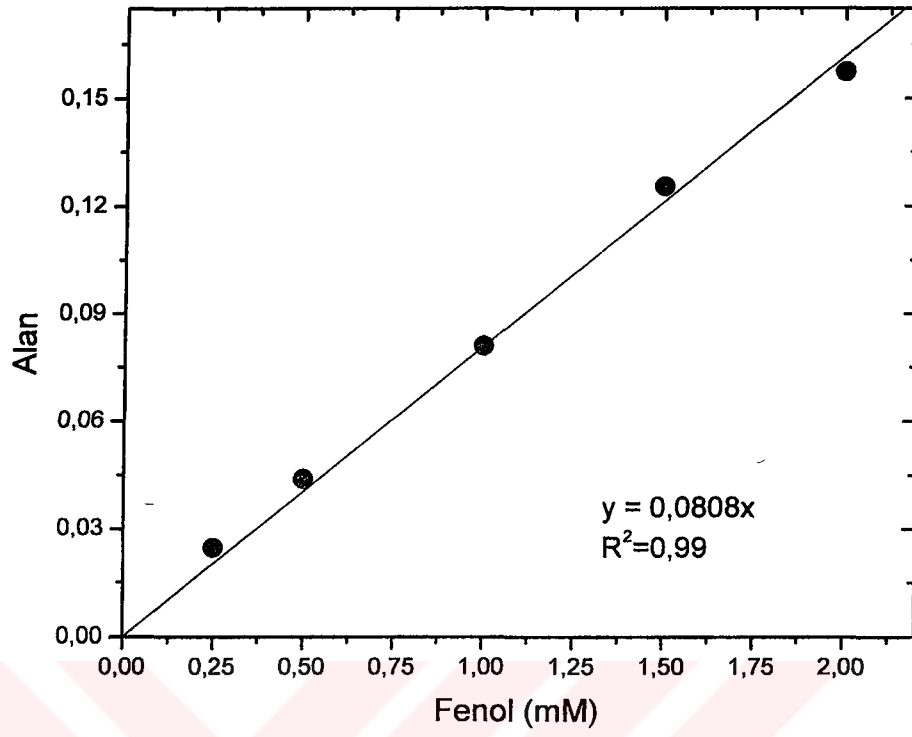
Şekil 6.6. 2 mL/dak Debide Ürün Kalibrasyonu



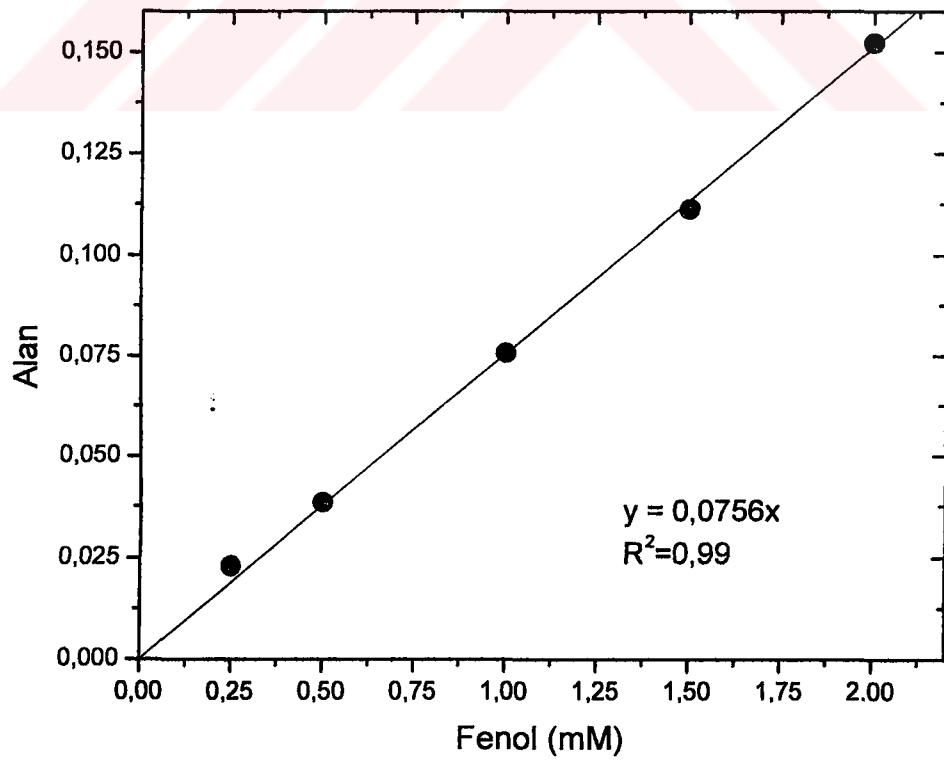
Şekil 6.7. 2,5 mL/dak Debide Ürün Kalibrasyonu



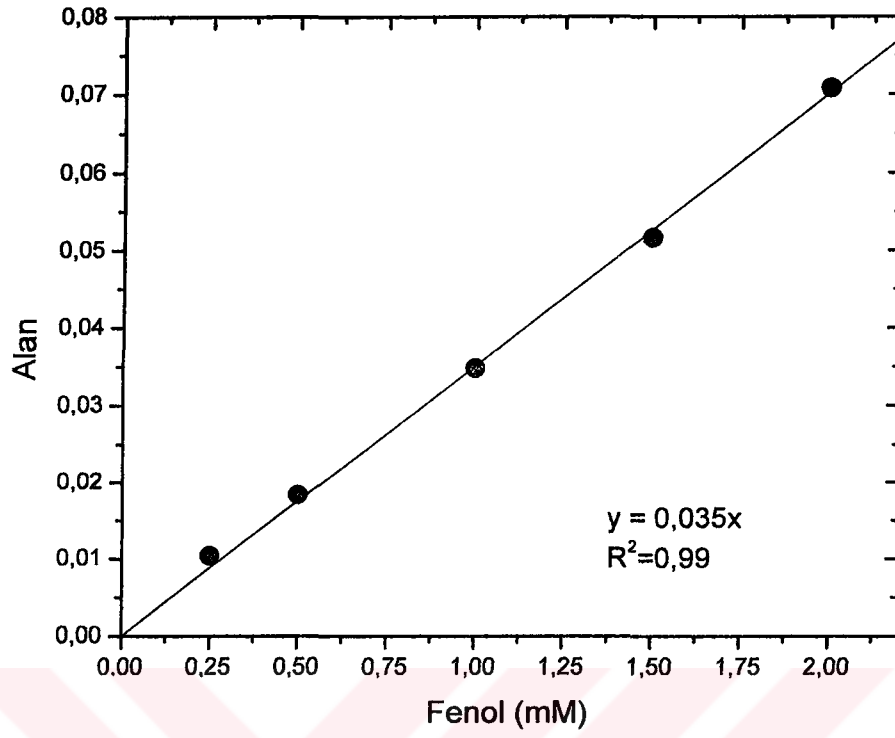
Şekil 6.8. 3 mL/dak Debide Ürün Kalibrasyonu



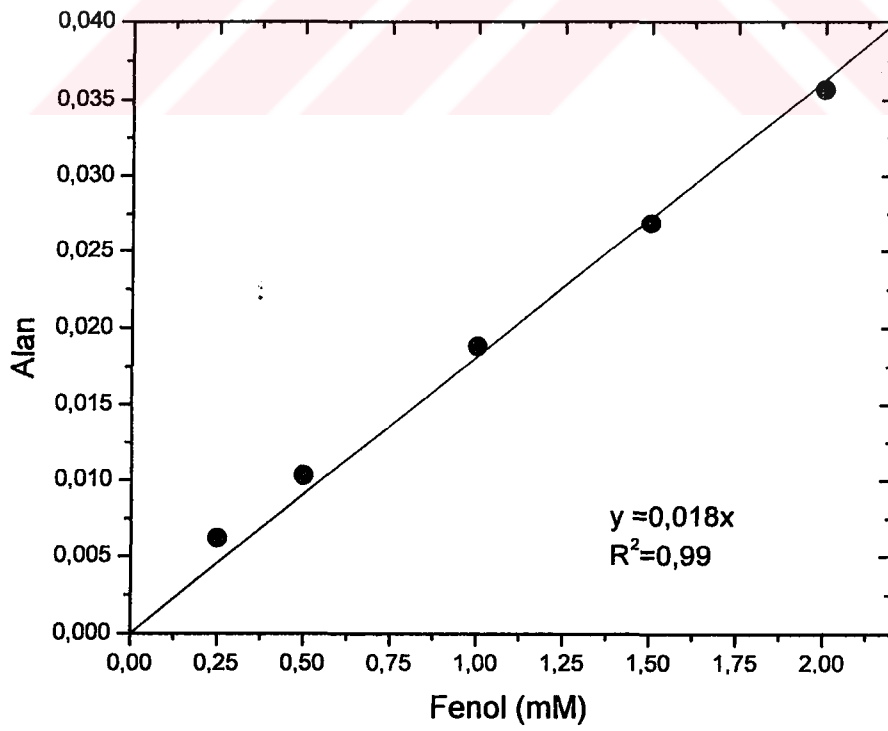
Şekil 6.9. 3,5 mL/dak Debide Ürün Kalibrasyonu



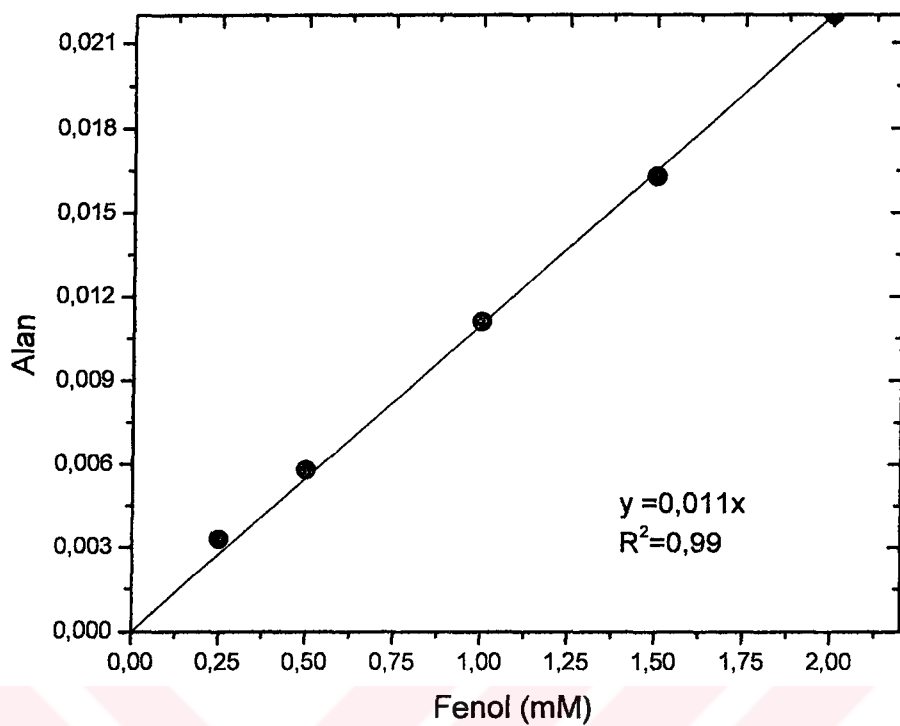
Şekil 6.10. 4 mL/dak Debide Ürün Kalibrasyonu



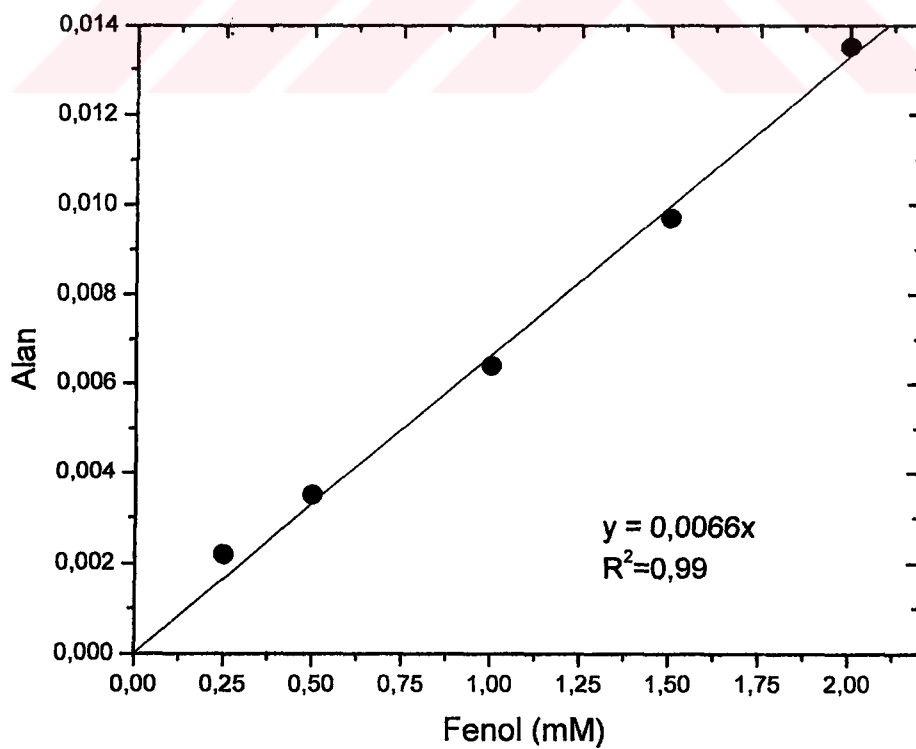
Şekil 6.11. 6 mL/dak Debide Ürün Kalibrasyonu



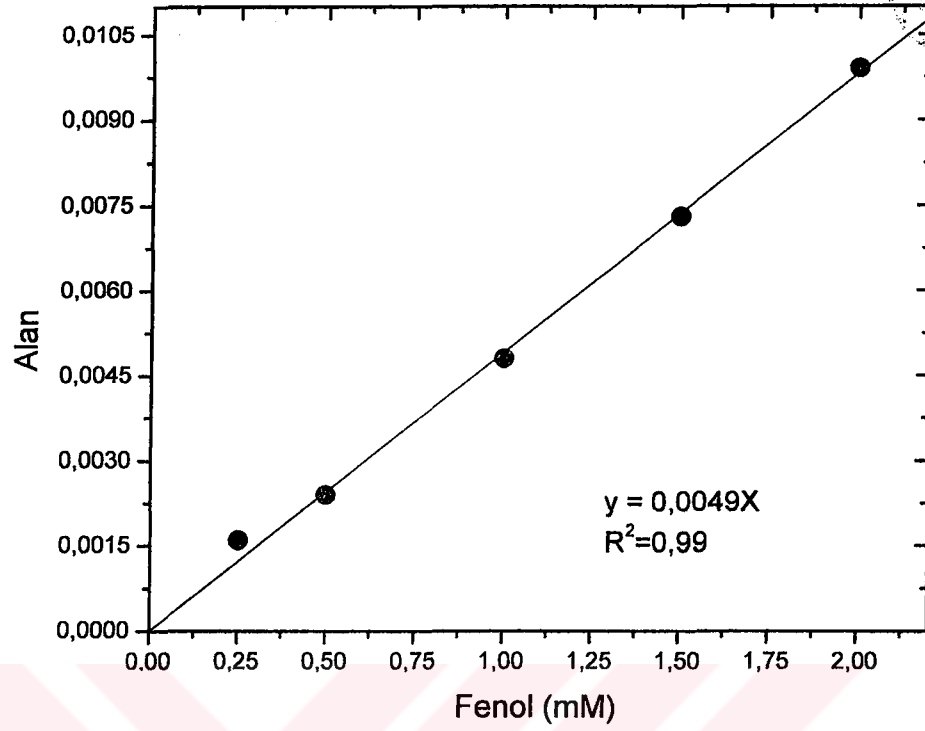
Şekil 6.12. 8 mL/dak Debide Ürün Kalibrasyonu



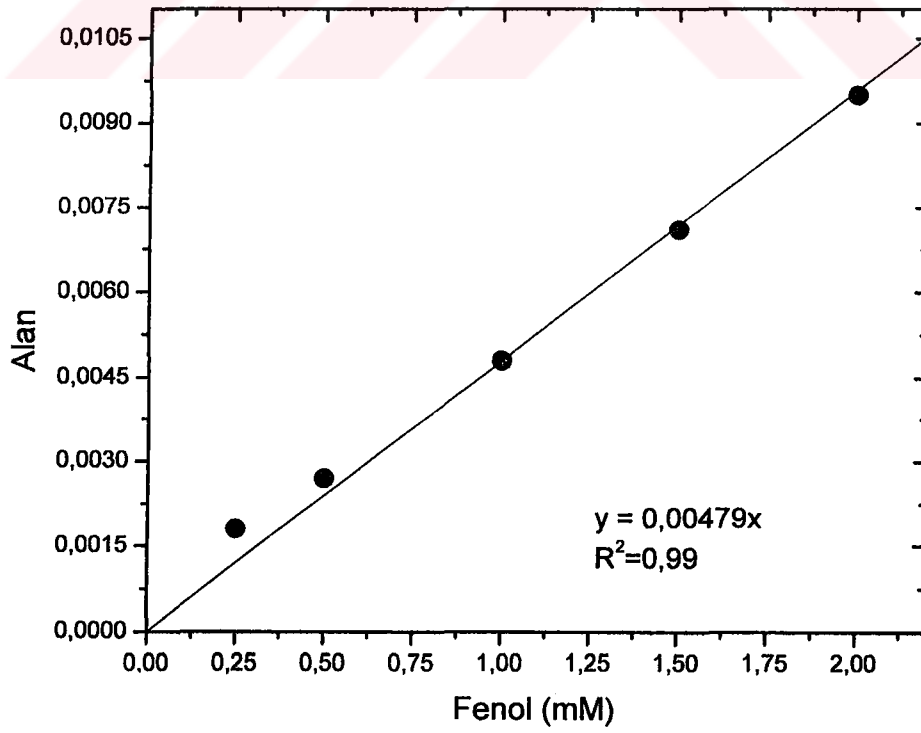
Şekil 6.13. 10 mL/dak Debide Ürün Kalibrasyonu



Şekil 6.14. 13 mL/dak Debide Ürün Kalibrasyonu

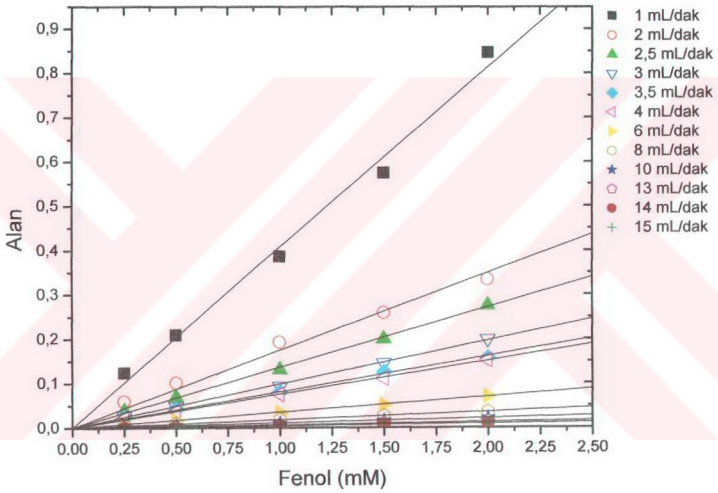


Şekil 6.15. 14 mL/dak Debide Ürün Kalibrasyonu



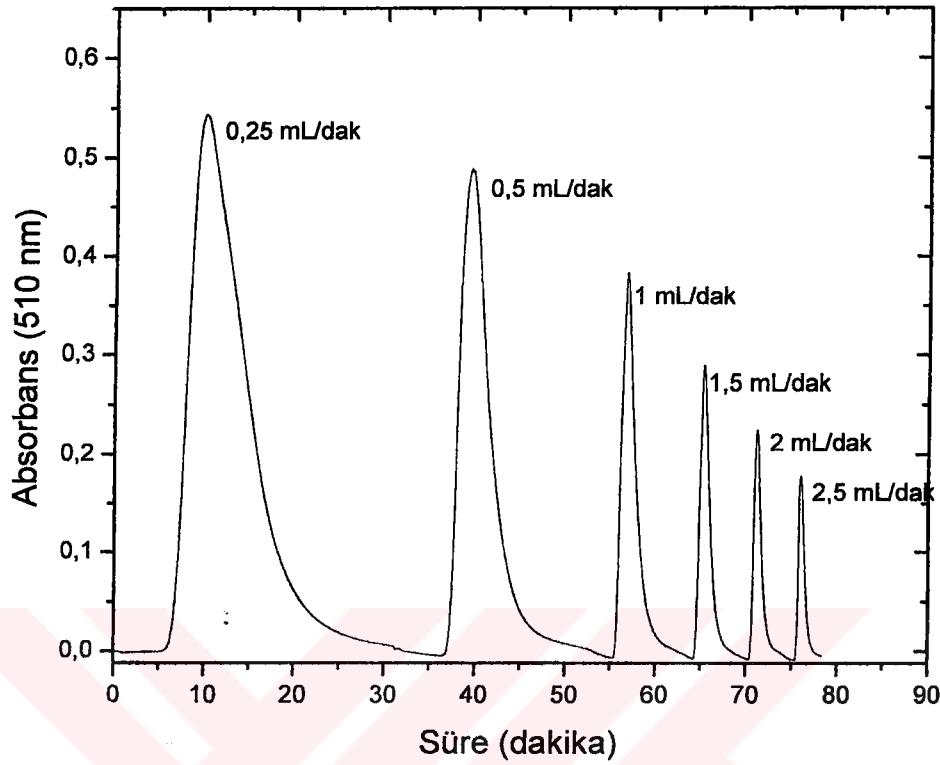
Şekil 6.16. 15 mL/dak Debide Ürün Kalibrasyonu

Yukarıda ayrı ayrı verilen konsantrasyon-alan grafiklerinin birarada gösterildiği grafik Şekil 6.17.'de verilmiştir. Debi arttıkça, sisteme enjekte edilen fenolün enzim ile yeterli sürede temas etmemesinden dolayı oluşan ürünler azalmış, dolayısıyla UV-Spektrofotometrede elde edilen pikler küçülmüştür. Her debide hesaplanan pik alanları, enjekte edilen fenol konsantrasyonlarıyla orantılı bulunmuştur. Fenol konsantrasyonlarına karşı çizilmiş alan grafiklerine göre yapılan lineer regresyonlarda, regresyon katsayıları 1'e yakın çıkmıştır. Bu sebeple, pik alanlarının hesaplanmasıyla sisteme enjekte edilen fenol konsantrasyonlarının belirlenmesinin mümkün olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 6.17. Bütün Debiler İçin Ürün Kalibrasyonu

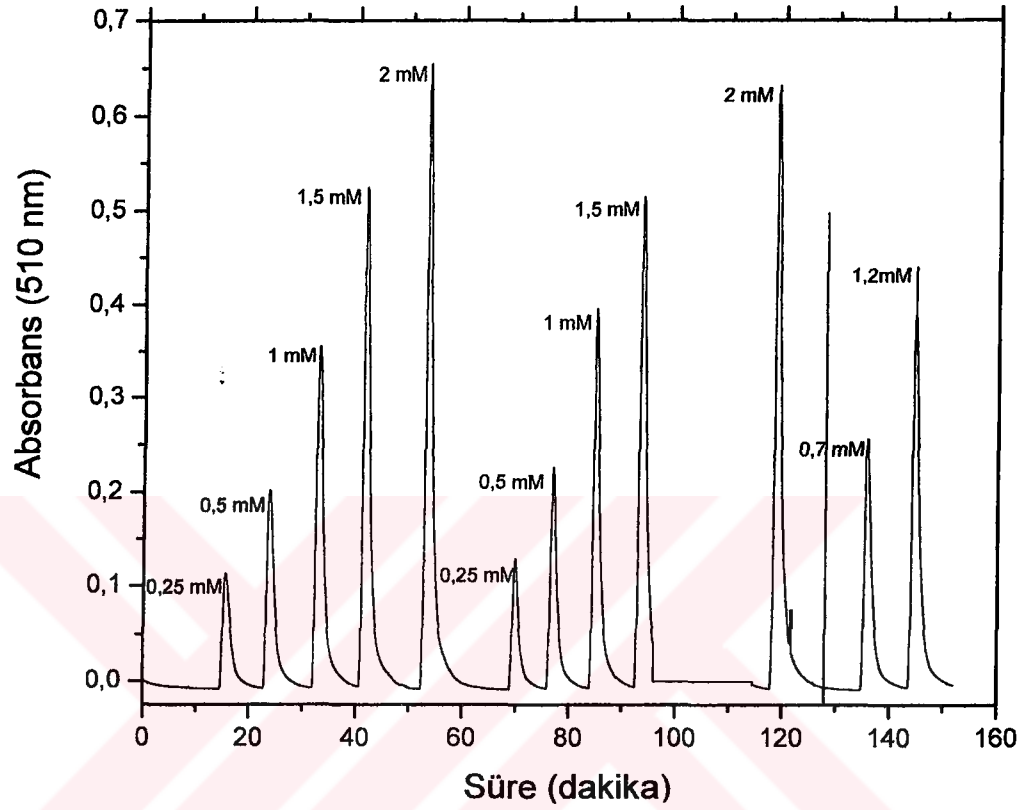
Sırasıyla; 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 mL/dak debilerde çalışılmış ve her debide sisteme 2 mM fenol enjeksiyonları yapılmıştır. UV-Spektrofotometrede zamana karşı çalışma sayfası açılmış ve dalga boyu 510 nm olarak ayarlanmıştır. Pik gelişimleri, Şekil 6.18'de gösterilmiştir. Debi arttıkça kalış süresi kısaldığından, ürün miktarı azalmıştır ve bu nedenle pik alanları ve yükseklikleri küçülmüştür.



Şekil 6.18. Farklı Debilerde 2 mM Fenol Yüklemeleri

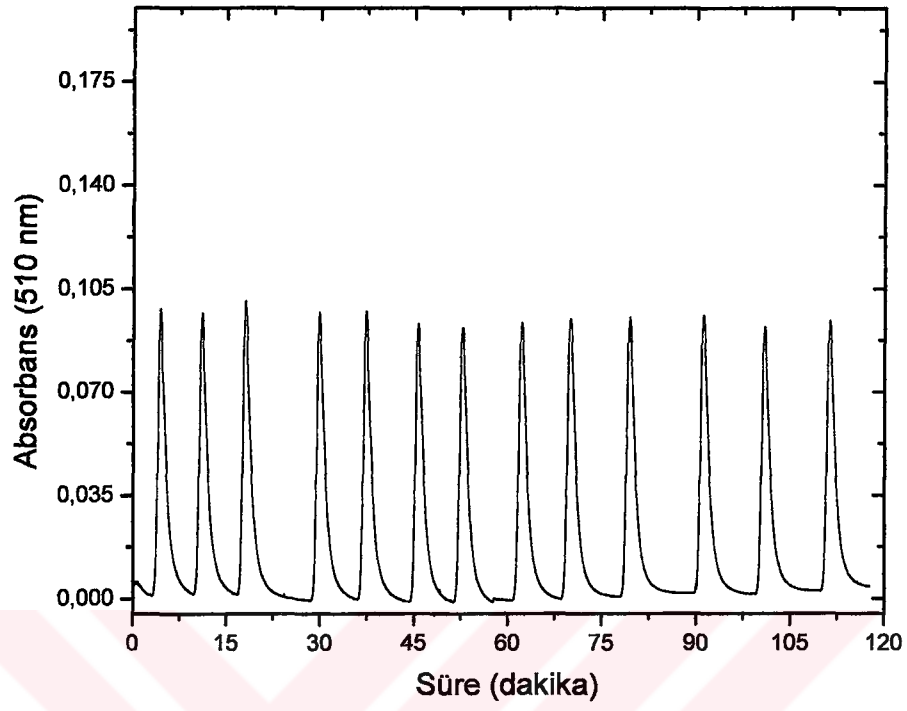
Sisteme, 1 mL/dak debide, sırasıyla 0,25, 0,5, 1, 1,5 ve 2 mM'lık konsantrasyonlarda fenol enjeksiyonları ard, arda yapılmıştır. Aynı şekilde iki kalibrasyon yapıldıktan sonra sisteme, konsantrasyonları 0,7 mM ve 1,2 mM olan fenol enjeksiyonları yapılmış ve sonuçları, Şekil 6.19'da gösterilmiştir. Sisteme enjekte edilen fenol konsantrasyonu arttıkça, ürün artışından dolayı oluşan piklerin alan ve yükseklikleri de artmıştır. 1 mL/dak debi için, piklerin başlangıç ve bitiş noktaları arasında yaklaşık 7 dakikalık bir sürenin geçtiği belirlenmiştir. 0,25 mM- 2 mM fenol aralığındaki yüklemeler tekrarlanmış ve sistemin kararlılığı araştırılmıştır. Pik alanlarına göre çizilen kalibrasyon grafiğinde 1. kalibrasyon eğrisinde standart sapma $\pm 0,1023$, 2. kalibrasyon eğrisinde standart sapma $\pm 0,1007$ olarak bulunmuştur. Tekrarlanan yüklemeler sonucu oluşan piklerin aynı olduğu ve 0,7 mM ,1,2 mM fenol yüklemelerinin kalibrasyon aralığına girdiği belirlenmiştir. 0,7 mM fenol yüklemesi sonucunda elde edilen pikin alanı kalibrasyon doğru denkleminde yerine konulduğunda enjekte edilen fenol konsantrasyonu 0,72 mM, 1,2 mM fenol

yüklemesi sonucunda elde edilen pikin alanı kalibrasyon doğru denkleminde yerine konulduğunda fenol konsantrasyonu 1,19 mM olarak belirlenmiştir.

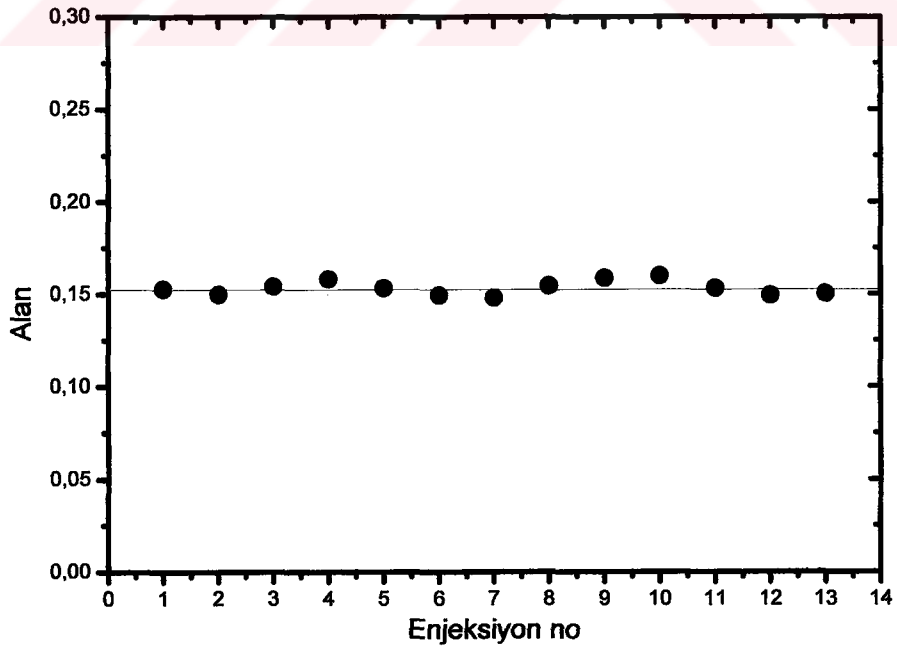


Şekil 6.19. 1 mL/dak Debide Farklı Konsantrasyonlarda Fenol Yüklemeleri

Sistem stabilitesinin belirlenmesi amacıyla, 1 mL/dak debide, ard, arda 13 defa, konsantrasyonu 0,5 mM fenol enjeksiyonları yapılmıştır. Ard arda yapılan fenol yüklemeleri, Şekil 6.20’de gösterilmektedir. Şekil 6.20’de açıkça görüldüğü gibi ortaya çıkan her pik, birbiriyle aynı karakteristiği göstermektedir. Elde edilen 13 enjeksiyon pikinin alanları hesaplanıp enjeksiyon sırasına göre grafiğe geçirilmiştir (Şekil 6.21). Grafiğin standart sapması $\pm 0,0038$ olarak bulunmuştur



Şekil 6.20. 1mL/dak Debide 0,5 mM Fenol Yüklemleri



Şekil 6.21. 1mL/dak Debide Tekrarlanan 0,5 mM Fenol Yüklemlerinde Alanların Değişimi



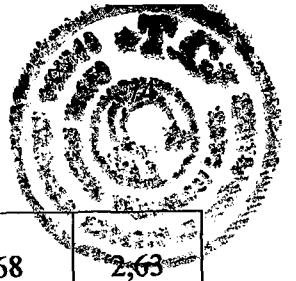
6.2.3. İmmobilize Sistemde Farklı Debilerde Disk Davranışının Belirlenmesi

Bölüm 5.2.8.3’de belirtilen metoda göre yapılan farklı debi çalışmalarında bulunan sonuçlar, Çizelge 6.2’de verilmektedir. Çizelge 6.2.’de, her bir debide yapılan 5 farklı fenol enjeksiyonlarından hesaplanan spesifik aktiviteler ve çizilen Lineweaver-Burk grafiklerinden hesaplanan V_m ve K_m değerleri gösterilmektedir. Bütün debiler için çizilen Lineweaver-Burk grafikleri Şekil 6.22 ve Şekil 6.23’de verilmiştir.



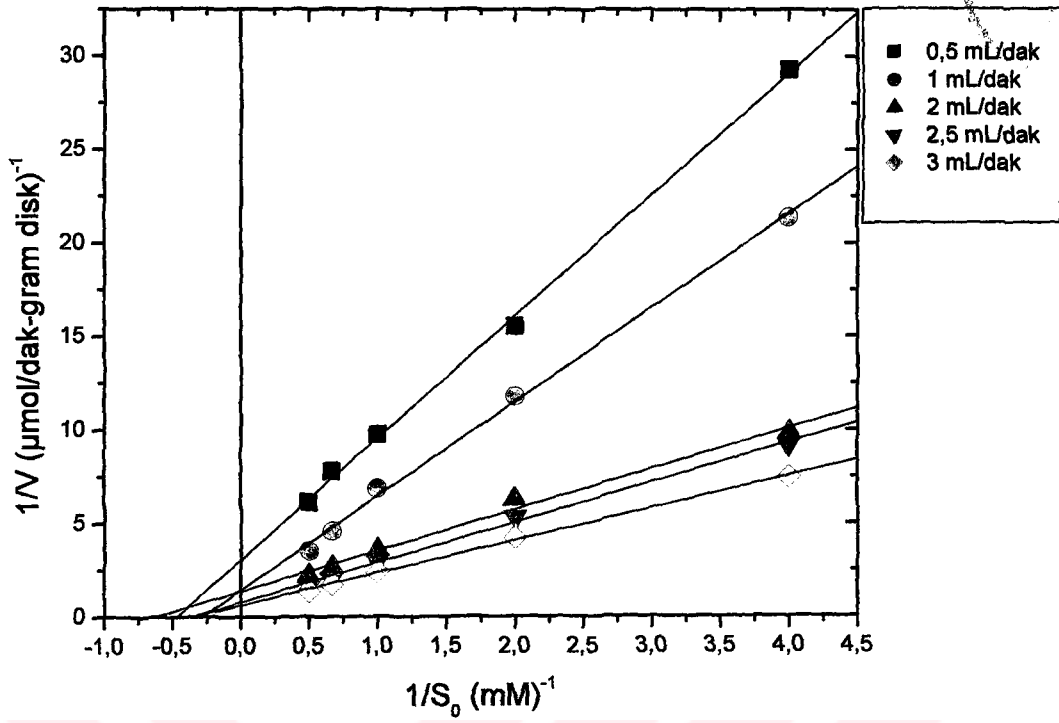
Çizelge 6.2. Debi Çalışmaları Sonuç Çizelgesi

Debi (mL/dak)	S ₀ (mM)	V (μmol/dak-gram disk)	V _m (μmol/dak-gram disk)	K _m (mM)
0,1	0,25	0,004	0,067	1,97
	0,5	0,013		
	1	0,021		
	1,5	0,029		
	2	0,035		
0,5	0,25	0,034	0,327	2,13
	0,5	0,064		
	1	0,102		
	1,5	0,128		
	2	0,163		
1	0,25	0,046	0,705	3,55
	0,5	0,084		
	1	0,145		
	1,5	0,217		
	2	0,281		
2	0,25	0,101	0,788	1,7
	0,5	0,158		
	1	0,279		
	1,5	0,374		
	2	0,447		
2,5	0,25	0,108	1,309	2,8
	0,5	0,186		
	1	0,331		
	1,5	0,479		
	2	0,598		
3	0,25	0,133	1,6	2,76
	0,5	0,235		
	1	0,414		
	1,5	0,575		
	2	0,720		
3,5	0,25	0,188	1,337	1,52
	0,5	0,305		
	1	0,475		
	1,5	0,671		
	2	0,749		

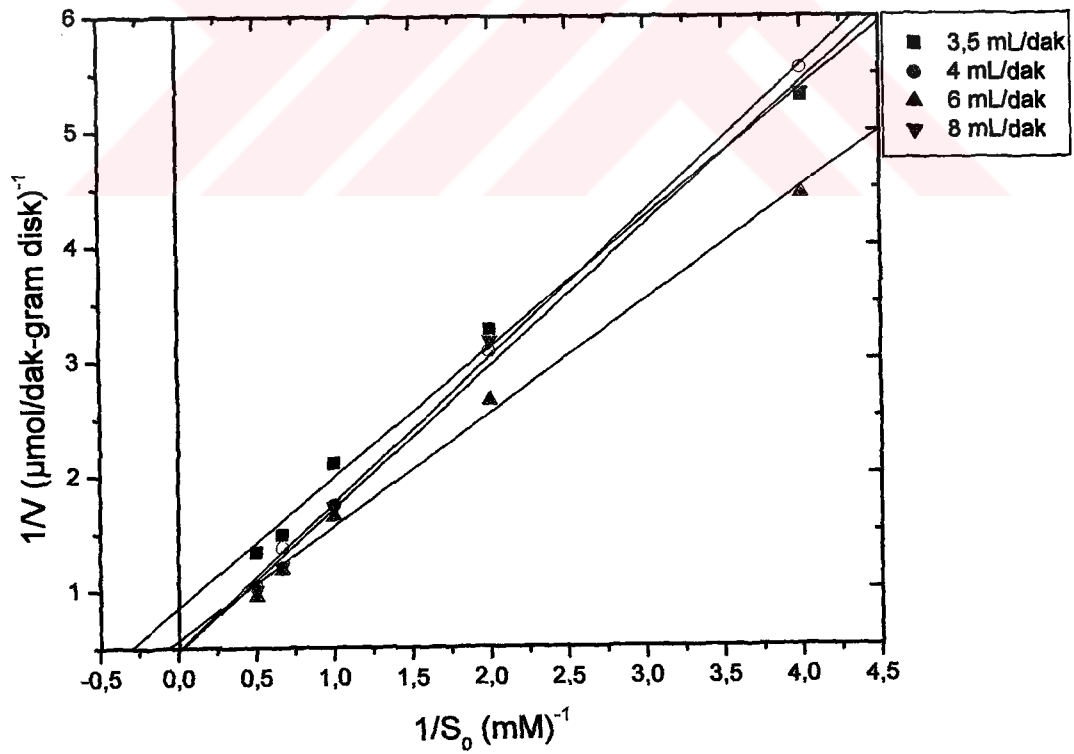


Çizelge 6.2. Debi Çalışmaları Sonuç Çizelgesi (DEVAMI)

4	0,25 0,5 1 1,5 2	0,180 0,324 0,572 0,725 0,953	2,068	2,63
6	0,25 0,5 1 1,5 2	0,224 0,376 0,606 0,841 1,052	1,757	1,73
8	0,25 0,5 1 1,5 2	0,187 0,314 0,576 0,820 0,989	2,128	2,637
10	0,25 0,5 1 1,5 2	0,201 0,372 0,633 0,807 1,107	2,11	2,36
13	0,25 0,5 1 1,5 2	0,352 0,514 0,737 0,947 1,077	2,033	1,75
14	0,25 0,5 1 1,5 2	0,292 0,532 0,687 0,895 1,102	1,978	1,428
15	0,25 0,5 1 1,5 2	0,021 0,036 0,068 0,261 0,360	2,15	2,088



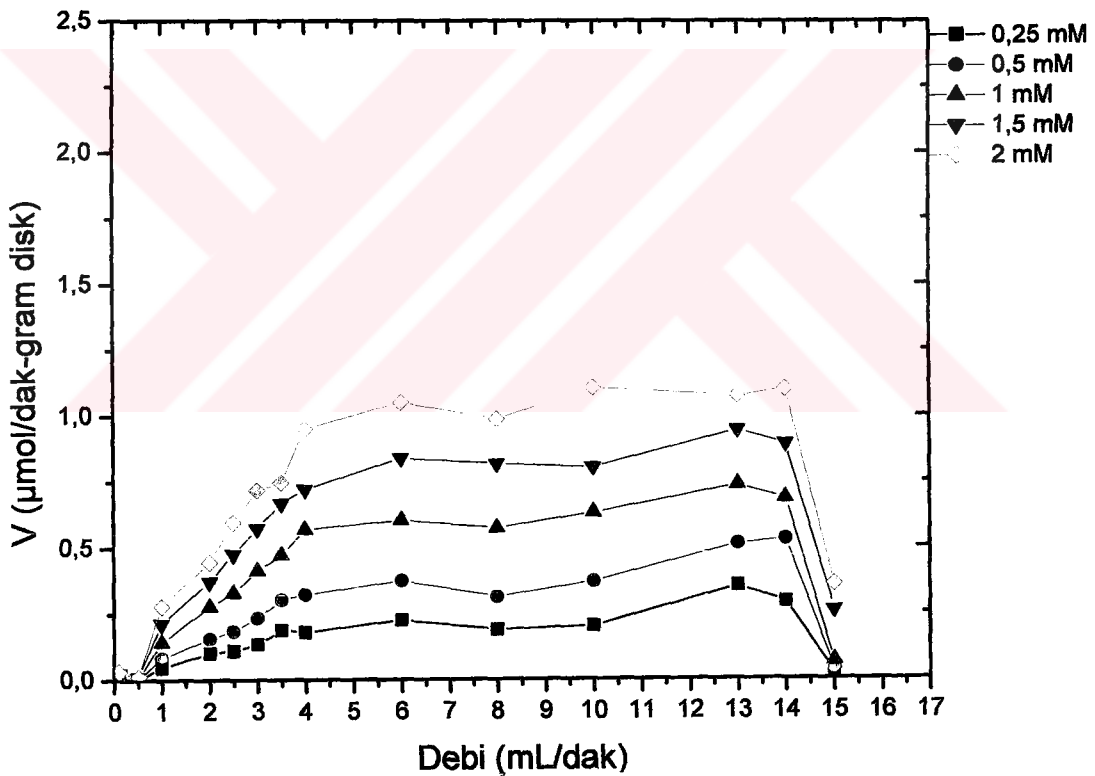
Şekil 6.22. 0,5, 1, 2, 2,5, 3 mL/dak Debilerde Lineweaver-Burk Grafikleri



Şekil 6.23. 3,5, 4, 6, 8 mL/dak Debilerde Lineweaver-Burk Grafikleri

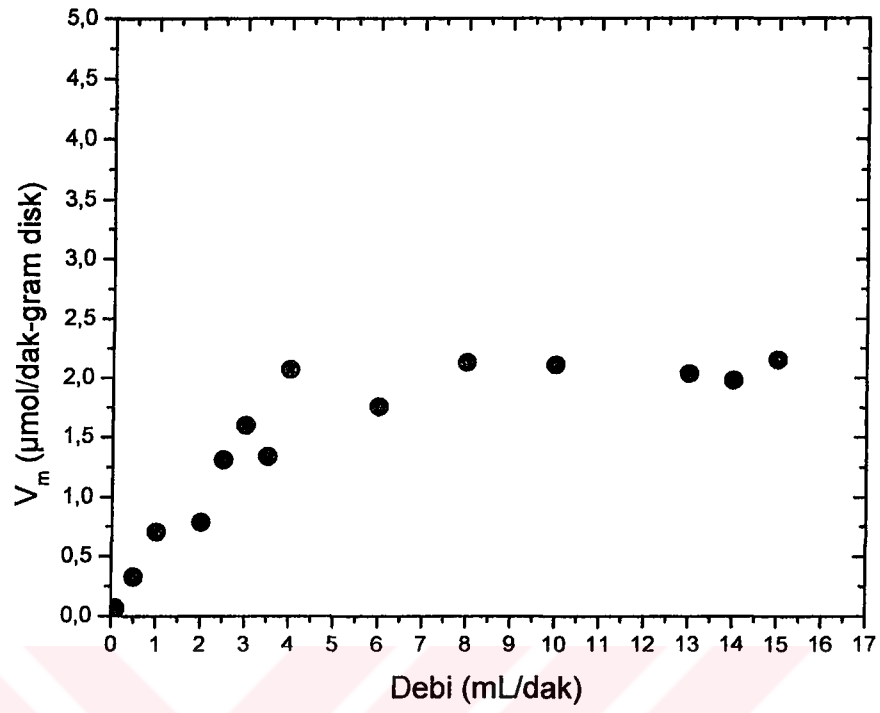
Şekil 6.22 ve 6.23’de görüldüğü gibi, her debi için çizilen eğrilerin regresyon katsayıları 1’e yakın bulunmuştur.

Çizelge 6.2’deki veriler kullanılarak, her fenol konsantrasyonunda, debi-spesifik aktivite grafiği çizilmiştir (Şekil 6.24). Sistemde diğer parametreler sabitken, debinin artırılmasıyla reaksiyon hızının da arttığı ve bu artışın 4 mL/dak debi değerine kadar olduğu belirlenmiştir. Bu değere kadar sistemin difüzyonal kuvvetlerin etkisi altında olduğu açıkça görülmektedir. 4 mL/dak debi, sistem için difüzyon kontrollü bölgenin bitip, kimyasal kontrollü bölgenin başladığı debi değeridir. Kimyasal kontrollü bölgede, her debi için ulaşılan hız değerlerinin yaklaşık olarak aynı olduğu tespit edilmiştir. Bu debide V_m 2,068 $\mu\text{mol/dak-gram}$ disk olarak belirlenmiştir. K_m değeri ise yaklaşık 2,63 mM olarak hesaplanmıştır.

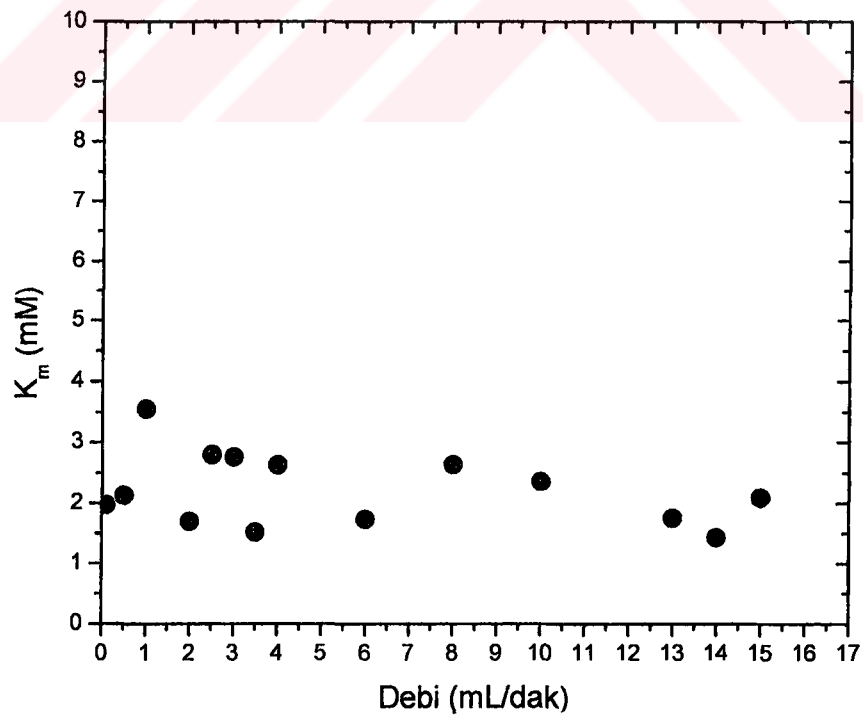


Şekil 6.24. Farklı Debiler İçin Debi-Spesifik Aktivite Grafiği

Çizelge 6.2.’deki veriler kullanılarak, her debi için hesaplanan V_m ve K_m değerleri sırasıyla grafiğe geçirilmiştir. Grafikler, Şekil 6.25’de ve Şekil 6.26’da gösterilmektedir.

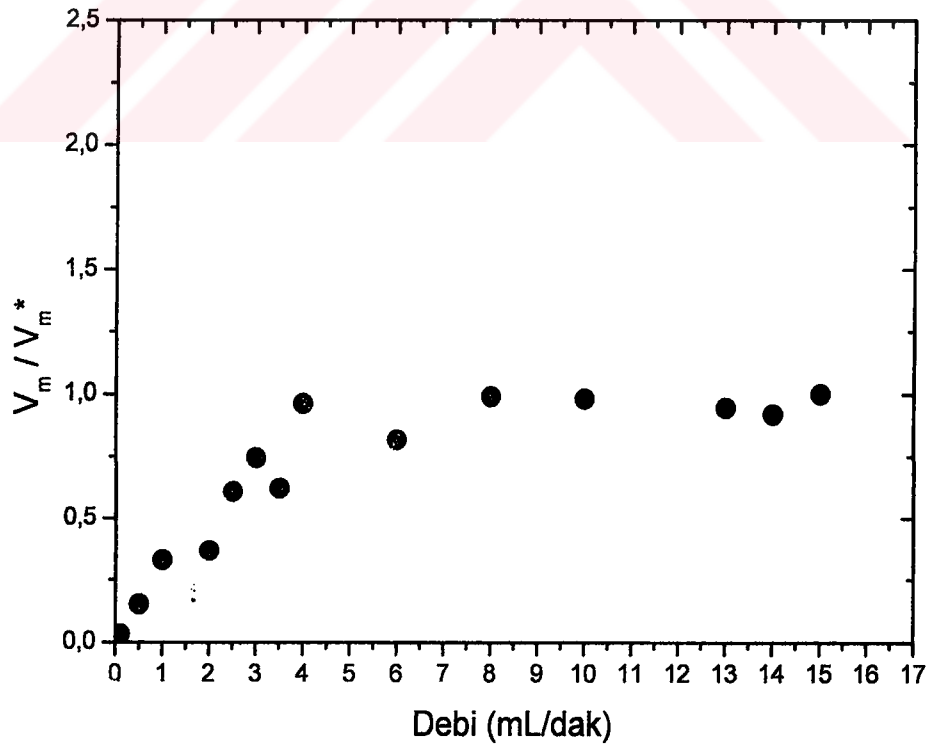


Şekil 6.25. Debi- V_m Grafiği



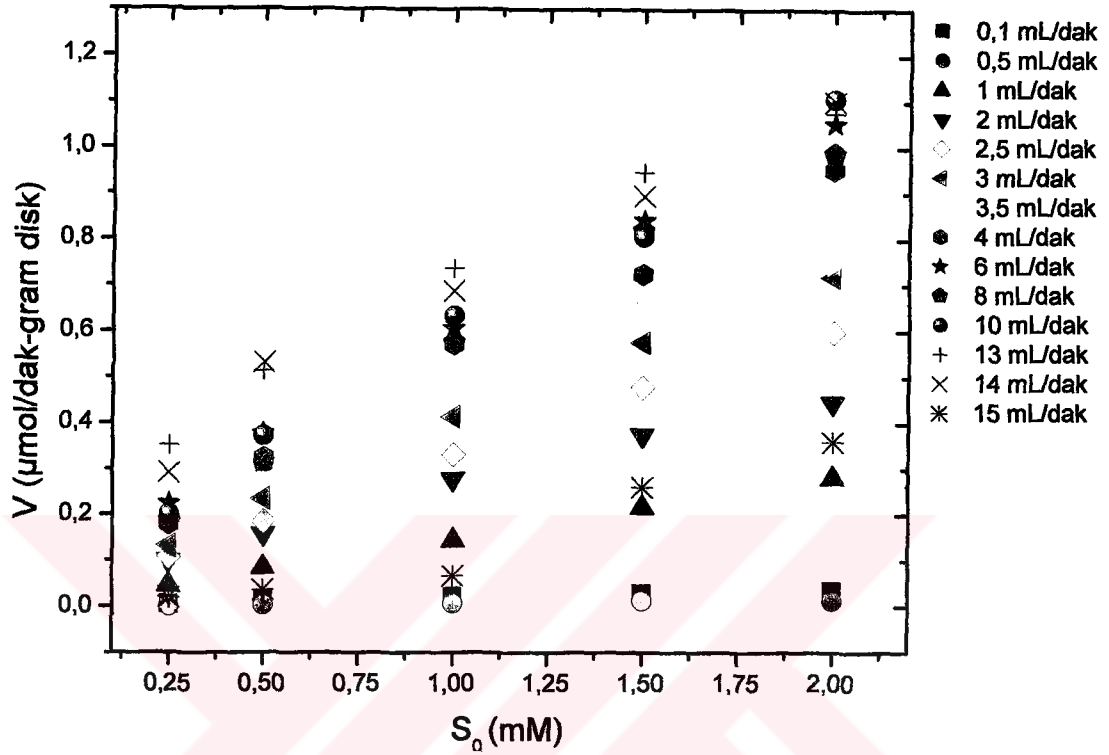
Şekil 6.26. Debi- K_m Grafiği

Literatürde, difüzyon kontrollü sistemler için akış hızlarının artırılmasına bağlı olarak reaksiyon hızlarının arttığını gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır. Böyle bir sistemde debi sürekli olarak artırıldığında, buna bağlı olarak reaksiyon hızının önce arttığı ancak bir süre sonra sabit hale gelerek değişmediği görülmüştür. Bunun nedeni akış hızlarının artırılması sonucu belirli bir değerden sonra kütle transfer dirençlerinin yenilmesi ve kütle transfer hızının reaksiyon hızını aşmasıdır. Bu durumda kinetik mekanizma, kimyasal reaksiyonun kontrolü altına girmekte ve reaksiyon hız profili klasik Michaelis Menten yaklaşımına uymaktadır. Sonuçta immobilize enzim sistemlerinde debi ne kadar artırılırsa artılsın, elde edilecek olan en yüksek reaksiyon hızı, tamamen reaksiyon kontrollü olan serbest enzimin V_m değerini aşamaz (Bailey, 1986). Immobilize sistemde, her bir debi değerinde elde edilen maksimum hız değerleri (V_m), sistemde 15 mL/dak debide elde edilen en büyük hız (V_m^*) değerine bölünmüş ve Şekil 6.27 elde edilmiştir. Sistemde bağlı enzimin miktarı belli olmadığından her bir debi değerinde elde edilen maksimum hız değerleri serbest enzimdeki maksimum hız yerine immobilize sistemde elde edilen maksimum hız değerine (V_m^*) bölünmüştür.



Şekil 6.27. Immobilize Sistemde Akış Hızının Reaksiyon Hızı Üzerine Etkisi

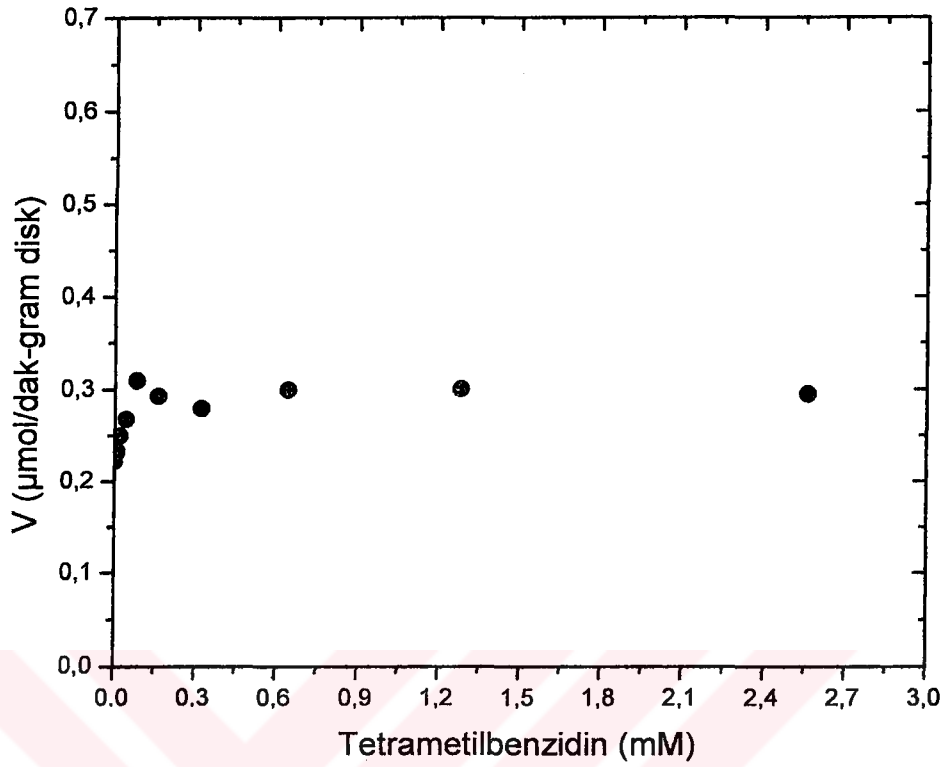
Başlangıç fenol konsantrasyonlarına karşı Çizelge 6.2’de de her debi için hesaplanan spesifik aktiviteler grafiğe geçirilmiştir. Şekil 6.28’de grafik gösterilmiştir.



Şekil 6.28. Farklı Debiler İçin Başlangıç Fenol Konsantrasyonu-Spesifik Aktivite Grafiği

6.2.4. Tetrametilbenzidinin Etkisinin Belirlenmesi

Bölüm 5.2.8.4.’de açıklanan metoda göre fenol yüklemeleri yapılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda tetrametilbenzidin içeren fenol yüklemeleri sonucu aktiviteler hesaplanmış ve Şekil 6.29’daki gibi grafiğe geçirilmiştir.



Şekil 6.29. Tetrametilbenzidin Aktiviteye Etkisi

Tetrametilbenzidin konsantrasyonları değiştirilerek yapılan 1 mM'lık fenol yüklemelerinde, Şekil 6.29'da görüldüğü gibi tetrametilbenzidin konsantrasyonu 0,64 mM'a kadar arttırıldıkça aktivitede artış görülmüş, bu konsantrasyondan sonra aktivite değişmemiştir. Tetrametilbenzidin konsantrasyonu 0,64 mM'da sabit tutularak, 0,25-0,5-1-1,5-2 mM'lık fenol yüklemeleri yapılmıştır. Buna paralel olarak aynı kalibrasyon bir de tetrametilbenzidin içermeyen ortamda yapılmış ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, Çizelge 6.3'de verilmiştir.

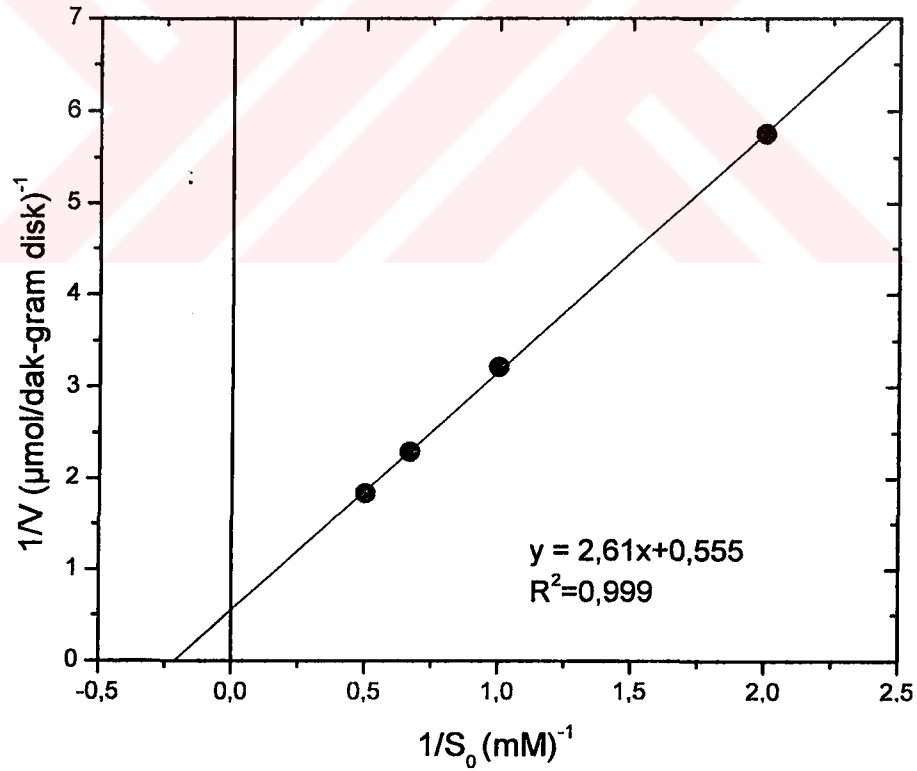
Çizelge 6.3'den görüldüğü gibi tetrametilbenzidin içeren reaksiyon ortamında ulaşılan hız değerleri tetrametilbenzidin içermeyen ortama göre yüksek çıkmıştır.



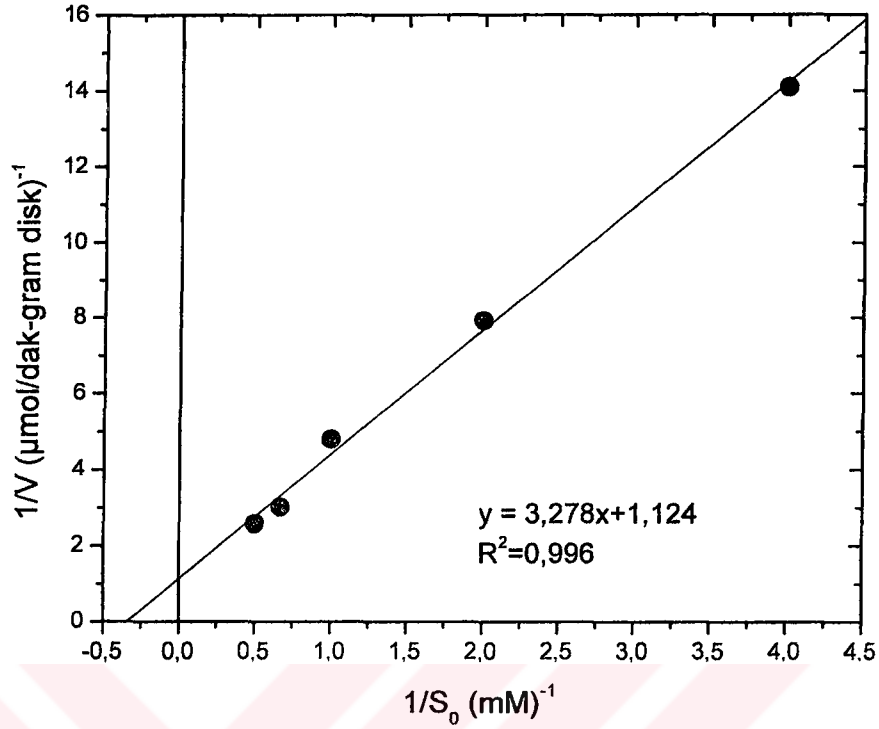
Çizelge 6.3. Tetrametilbenzidinin Aktiviteye Etkisi

Başlangıç Fenol Kons. (mM)	V (μmol/dak-gram disk) *0,64 mM Tetrametilbenzidin varlığında	V (μmol/dak-gram disk) * Tetrametilbenzidin içermeyen ortamda
0,25	0,107	0,070
0,5	0,173	0,126
1,0	0,311	0,208
1,5	0,436	0,332
2,0	0,546	0,388

Çizelge 6.3’de verilen değerler kullanılarak V_m ve K_m değerleri hesaplanmıştır. Lineweaver-Burk grafikleri Şekil 6.30 ve Şekil 6.31’de gösterilmektedir.



Şekil 6.30. 0,64 mM Tetrametilbenzidin Varlığında Lineweaver-Burk Grafiği



Şekil 6.31. Tetrametilbenzidin İçermeyen Ortamda Lineweaver-Burk Grafiği

Şekil 6.30 ve Şekil 6.31’de verilen grafiklerin yardımıyla 0,64 mM tetrametilbenzidin içeren ortamda V_m değeri 1,8 ($\mu\text{mol/dak-gramdisk}$), K_m değeri 4,7 mM olarak bulunmuştur. Tetrametilbenzidin İçermeyen Ortamda V_m değeri 0,899 ($\mu\text{mol/dak-gram disk}$), K_m değeri 2,9 mM olarak bulunmuştur.

6.2.5. İmmobilize Enzimin Stabilitesi

Sistem kapatılmadan önce diskten düşük konsantrasyonda tetrametilbenzidin içeren fosfat tamponu geçirilmiştir ve disk, disk tutucu içinde, 0,06 mM’lık tetrametilbenzidin çözeltisinde oda koşullarında saklanmıştır. İlk 4 gün, enzim aktivitesinde düşüş gözlenmemiş, 5. günün sonunda disk, aktivitesinin %90’ını korurken, 12. günün sonunda %56’sını koruyabilmiştir. Daha önce yapılan diskler, +4°C’de kuru olarak, +4°C’de yaş olarak, +4°C’de 100 mg/L’lik Bovin Serum Albumin çözeltisinde bırakılmak suretiyle farklı şartlarda muhafaza edilmiştir. Fakat aktivitedeki kayıpların önüne geçilememiştir.

7. SONUÇ

Literatürde, *horseradish peroxidase* enziminin fenol ile uygulamaları yaygın olarak serbest enzim ortamlarında gerçekleştirilmiştir. Fenolün enzim ile reaksiyonu sonucu oluşan polimerler, enzimin mikroporoz membran immobilize sistemlerde kullanımına imkan vermemektedir. Bu çalışmada reaksiyon ortamına 4-aminoantiprin ilavesiyle sorun giderilmiştir. Sistem, 4-aminoantiprin sayesinde oluşan çözünabilir formdaki ürünlerin UV-Spektrofotometrede absorbanlarının okunmasıyla sensör olarak kullanılabilmiştir. Direkt absorban okuma ölçüm için kolaylık sağlamıştır.

Sistemde kullanılan *horseradish peroxidase* enziminin yapısı bakımından yüksek substrat seçiciliğine sahip olması, bu enzimin kullanım avantajlarından bir tanesidir. Ayrıca, enzimin geniş pH aralıklarında (pH 5-9) reaksiyonları katalizleyebilen bir yapıya sahip olması avantajlar arasında sayılabilir. *Horseradish peroxidase*, fenolün yanında birçok fenol türevini de değişime uğratar. Sistem sayesinde, sürekli akışta fenol konsantrasyon değişimleri izlenebilir. Sistem aynı zamanda hidrojenperoksit sensörü olarak geliştirilebilir.

Sistem, fenol arıtımı amacıyla kullanılamaz. 4-aminoantiprin varlığında oluşan ürün en az fenol kadar toksiktir, çözünabilir formda olduğundan ortamdan alınamaz.

Sistemde kullanılan kimyasallardan fenol ve hidrojenperoksit aşırı miktarlarda enzimi inhibe eder. Bu yüzden sistemde her iki kimyasal da belirli konsantrasyonların üzerine çıkmayacak şekilde kullanılmıştır.

Enzim, yapı itibarıyla hassastır, ışık ve oksijenden olumsuz yönde etkilenir. Bu yüzden, enzimi saklama koşullarına dikkat edilmelidir. Denenen birçok saklama koşulu enzim aktivitesi kaybının önüne geçememiştir. Polimere bağlı enzim miktarı bilinmediğinden immobilize enzim aktivitesi gram disk başına hesaplanmıştır. Bu sistemde farklı debilerde ve farklı substrat konsantrasyonlarında elde edilen aktiviteler sistemin kendisi içinde kıyaslanabilir.

KAYNAKLAR

Abadulla E., Tzanov T., Costa S., Robra K., Cavaco-Paula A., and Gubitz G. M. Decolorization and Detoxification of Textile Dyes with a Laccase From *Trametes hirsuta*. *Applied and Environmental Microbiology*, 3357-3362, 2000.

Adam W., Lazarus M., Saha-Möller C. R., Weichold O., Hoch U., Haring D., Schreire P. Biotransformations with Peroxidases. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 63, 1999.

Bailey James E., Ollis David F. *Biochemical Engineering Fundamentals*. McGraw-Hill Book Company, Second Edition, 1986.

Bevilaqua J. V., Cammarota M. C., Freire D. M. G. and Sant Anna G. L. Phenol removal through combined biological and enzymatic treatments. *Brazilian journal of chemical engineering*. 19, 151-158, 2002.

Bhunia A., Durani S., Wangikar P. P. Horseradish Peroxidase Catalyzed Degradation of Industrially Important Dyes. *Biotechnology and Bioengineering*. 72(5), 562-567, 2001.

Casera E., Darder M., Pariente F., Lorenzo E. Peroxidase Enzyme Electrodes a Nitric oxide Biosensors. *Analytica Chimica Acta*. 403, 1-9, 2000.

Catrinescu C., Teodosiu C., Macoveanu M., Mische-Brendle J., Le Dred R. Catalytic Wet Peroxide Oxidation of Phenol Over Fe-exchanged Pillared Beidellite. *Water Research*. 37, 1154-1160, 2003.

Duran N., Esposito E. Potential Applications of Oxidative Enzymes and Phenol oxidase-like Compounds in Wastewater and Soil Treatment: A review. *Applied Catalysis B: Environmental*. 28, 83-99, 2000.

Erarslan A., Enzim Karakteristiği ve Stabilizasyonu Uygulamalı Eęitim Kursu, Tübitak, Gen Müh. ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü, Enzim ve Fermentasyon Teknolojisi Laboratuarı, Gebze/Kocaeli, 14-18 Temmuz 2003

Erhan E., P. Putida Yardımıyla Fenol Uzaklaştırma Kinetiği, Atatürk Üni., Müh. Fak., Çevre Müh. Böl., Yüksek Lisans Tezi, Erzurum, 1995.

Freire R. S., Duran N., Kubota L. T. Development of a Laccase-based Flow Injection Electrochemical Biosensor for the Determination of Phenolic Compounds and Its Application for Monitoring Remediation of Kraft E1 Paper Mill Effluent. *Analytica Chimica Acta*. 463, 229-238, 2002.

Freire R. S., Duran N., Kubota L. T. Effects of Fungal Laccase Immobilisation Procedures for the Development of a Biosensor for Phenol Compounds. *Talanta* 54, 681-686, 2001.

Gomes S. A. S. S., Nogueira J. M. F., Rebelo M. J. F. An Amperometric Biosensor for Polyphenolic Compounds in Red Wine. *Biosensors and Bioelectronics*. 2004.

Groce G., Toscaona G., Cioffi M., Gianfreda L. and Sannio F. Dephenolisation of Olive -mill Wastewaters by Olive Husk. *Water Research*. 33(13), 3046-3050, 1999.

http://www.science.smith.edu/departments/Biochem/Biochem_353/Bradford.html

Ikehata K., Nicell J. A. Characterization of Tyrosinase for the Treatment of Aqueous Phenols. *Bioresource Technology*. 74, 191-199, 2000.

Korkut Ş., Budak H., Yalçın Ö. B., Kimyasal Oksidasyon ile Fenol Giderimi, Atatürk Üni., Müh. Fak., Çevre Müh. Böl., Lisans Tezi, Erzurum, 2001.

Körbahtı B. K., Tanyolaç A. Continuous Electrochemical Treatment of Phenolic Wastewaters in a Tubular Reactor. *Water Research*. 37, 1505-1514, 2003.

Leisola M., Jokela J., Pastinen O., Turanen O. Industrial Use of Enzymes. Helsinki University of Technology, Laboratory of Bioprocess Engineering, Finland and Hans Schoemaker, DSM Research, MD Geleen, The Netherlands, 2002.

Li Y. Aerobic Oxidation of Alcohols Catalyzed by Laccase and Nitroxyl Radicals, Delft University of Technology, PhD Thesis, 2003.

Liu J. Z., Song H., Weng L., Ji L. Increased Thermostability and Phenol Removal Efficiency by Chemical Modified Horseradish Peroxidase. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 18, 225-232, 2002.

Liu S., Yu J., Hu H. Renewable Phenol Biosensor Based on a Tyrosinase-colloidal Gold Modified Carbon Paste Electrode. Journal of Electroanalytical Chemistry. 540, 61-67, 2003.

Mahmoudi A., Nazari K., Mohammadien N. and Moosavi-Movahedi A.A. Effect of Mn^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} , and Cu^{+2} on Horseradish peroxidase. Applied Biochemistry and Biotechnology. 104(1), 81-84, 2003.

Mai Anh T., Dzyadevych S. V., Soldatkin A. P., Chien N. D., Jaffrezic-Renault N., Chovelon J.M. Development of Tyrosinase Biosensor Based on pH-Sensitive Field-effect Transistors for Phenol Determination in Water Solutions. Talanta. 56, 627-634, 2002.

Miland E., Smyth M. R., Fagain C. O. Phenol Removal by Modified Peroxidases. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 67, 227-236, 1996.

Nicell J. A., Bewtra J. K., Taylor K. E., Biswas N. and Pierre C. St. Enzyme Catalyzed Polymerization and Precipitation of Aromatic Compounds From Wastewater. Water Science and Technology. 25, 157-164, 1992.

Nistor C., Emneus J., Gorton L., Ciucu A. Improved Stability and Altered Selectivity of Tyrosinase Based Graphite Electrodes for Detection of Phenolic Compounds. Analytica Chimica Acta. 387, 309-326, 1999.



Notsu H., Tatsuma T. Simultaneous Determination of Phenolic Compounds by Using a Dual Enzyme Electrodes System. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 566, 379-384, 2004.

Nozaki O. and Kawamoto H. Reactivation of Horseradish peroxidase with Imidazole for Continuous Determination of Hydrogen peroxide Using a Microflow Injection-chemiluminescence Detection System. *Luminescence*. 18, 203-206, 2003.

Rajesh L., Takashima W., Kaneto K. Amperometric Phenol Biosensor Based on Covalent Immobilization of Tyrosinase onto An Electrochemically Prepared Novel Copolymer Poly(N-3-aminopropyl pyrole- co-pyrole) film. *Sensors and Actuators B*. 102,271-277, 2004.

Rengaraj S., Moon S. H., Sivabalan R., Arabindoo B., Murugesan V. Agricultural Solid Waste for the Removal of Organics: Adsorption of Phenol From Water and Wastewater by Palm Seed Coat Activated Carbon. *Waste Management*. 22, 543-548, 2002.

Rogers K. R., Mukhandans A., Zhan W., *Biosensor and Chemical Sensor Technology: Process Monitoring and Control*, Washington DC: American Chemical Society, 1995.

Rosatto S. S., Neto D. O. and Kubota L. T. Effect of DNA on the Peroxidase Based Biosensor for Phenol Determination in Wastewaters. *Electroanalysis*. 13(6), 445-450, 2001.

Ruzgas T., Emneus J., Gorton L. and Marko-Varga G. The Development of a Peroxidase Biosensor for Monitoring Phenol and Related Aromatic Compounds. *Analytica Chimica Acta*. 311, 245-253, 1995.

Schütz A. J., Weller M. G., Niessner R. Stabilization of Horseradish peroxidase (HRP) for the Use in Immunochemical Sensor. *SPIE* 3105, 332-340, 1997.

Seetharam G. B., Saville B. A. Degradation of Phenol Using Tyrosinase Immobilized on Siliceous Supports. *Water Research*. 37, 436-440, 2003.

Shukla S. P., Devi S. Covalent Coupling of Peroxidase to a Copolymer of Acrylamide AAm-2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) and Its Use in Phenol Oxidation. *Process Biochemistry*. 40, 147-154, 2003.

Şengül F., Küçükgül E., Çevre Mühendisliğinde Fiziksel-Kimyasal Temel İşlemler ve Süreçler, İzmir, 1988.

Taylor R. F., Protein Immobilization, Marcel Dekker, New York, 1991.

Telefoncu A., Enzimoloji (Lisansüstü Yaz Okulu), Ege Üniv., Fen Fakültesi, Kuşadası, Aydın,Türkiye, 1997.

Tong Z., Qingxiang Z., Hui H., Qin L., Yi Z. Removal of Toxic Phenol and 4-chlorophenol From Wastewater by Horseradish peroxidase. *Chemosphere*. 34(4), 893-903, 1997.

Toscano G., Colarieti M. L., Greco G. Oxidative Polymerisation of Phenols by a Phenol oxidase From Green Olives. *Enzyme and Microbial Technology*. 33, 47-54, 2003.

Ünsal M., Membran Biyoreaktörler Kullanılarak Maltoz Üretimi, Gebze Yüksek Teknoloji Ens., Müh. ve Fen Bil. Enst., Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2003.

Velde F., Lourenço N. D., Bakker M., Rantwijk F. Improved Operational Stability of Peroxidases by Coimmobilization with Glucose Oxidase. *Biotechnology and Bioengineering*. 69(3), 286-291, 2000.

Wagner M., Nicell J. A. Peroxidase-catalyzed Removal of Phenols From a Petroleum Refinery Wastewater. *Water Science and Technology*. 43(2), 253-260, 2001.



Wagner M., Nicell J. Detoxification of Phenolic Solutions with Horseradish peroxidase and Hydrogen peroxide. Water Research. 36, 4041-4052, 2002.

Wilberg K. Q., Nunes D. G. and Rubio J. Removal of Phenol by Enzymatic Oxidation and Flotation. Brazilian Journal of Chemical Engineering. 17(4-7), 2000.

Wu J., Rudy K., Spark J. Oxidation of Aqueous Phenol by Ozone and Peroxidase. Advances in Environmental Research. 4, 339-346, 2000.

Wu J., Taylor K. E., Bewtra J. K. and Biswas N. Optimization of the Reaction Condition for Enzymatic Removal of Phenol from Wastewater in the Presence of Polyethylene Glycol. Water Research. 27(12),1701-1706, 1993.

Wu Y., Taylor K. E., Biswas N. and Bewtra J. K. A Model for the Protective Effect of Additives on the Activity of Horseradish peroxidase in the Removal of Phenol. Enzyme and Microbial Technology. 22, 315-322,1998.

Xia Z., Yoshida T., Fnaoka M. Enzymatic Degradation of Highly Phenolic Lignin-based Polymers (lignophenols). European Polymer Journal. 39, 909-914, 2003.

Yıldız Ş., Y., MF-PAC Prosesi ile Endüstriyel Atıksulardan Fenol Giderimi, Atatürk Üni., Müh. Fak., Çevre Müh. Böl., Yüksek Lisans Tezi, Erzurum,1998.

Yu J., Yu S., Ju H. Mediator-free Phenol Sensor Based on Titania sol-gel Encapsulation Matrix for Immobilisation of Tyrosinase by a Vapor Deposition Method. Biosensors and Bioelectronics. 19, 509-514, 2003.



OZGEÇMİŞ

1979 yılında Aydın'da doğan Şeyda Korkut, ilk, orta ve lise öğrenimini Aydın'da tamamladı. 1997 yılında başladığı Atatürk Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümü'nden, 2001 yılında mezun oldu. 2002 yılında, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Çevre Mühendisliği Bölümü'nde yüksek lisans eğitimine başladı. 2002 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Çevre Mühendisliği Bölümü'nde araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladı. Halen bu görevini sürdürmektedir.

