



Araştırma Makalesi / Research Article
THE EFFECT OF HORSERADISH PEROXIDASE (HRP)-DEXTRAN
CONJUGATE ON NAPHTOL BLUE BLACK

R. Selva ÖNDER¹, Mithat ÇELEBİ², Melda ALTIKATOĞLU¹, Huriye KUZU^{*2}

¹Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Esenler-İSTANBUL

²Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalurji Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Esenler-İSTANBUL

Received/Geliş: 05.09.2008 Revised/Düzeltilme: 15.01.2009 Accepted/Kabul: 04.02.2009

ABSTRACT

The removal of azo dye Naphtol Blue Black in aqueous media with the catalysis of HRP-dextran conjugate was studied. HRP was purified by affinity chromatography using immobilized Con A. Enzyme-dextran conjugate with 1/10 molar ratio was synthesized using dextran aldehyde derivative (Dextran Mw 75.000 Da) and purified enzyme. The reaction was carried out at pH 3, 4, 5, 6, 7 and 8 in a 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70 °C temperatured crystal cuvette of UV-Vis spectrophotometer. The bleaching of the dye depending on the time was observed with the absorption spectra recorded regularly for one hour. The best results were obtained at pH 4 and 5 for all temperatures studied.

Keywords: HRP, dextran, conjugate, naphtol blue black, dye bleaching.

“HORSERADISH” PEROKSİDAZ-DEKSTRAN KONJUGATININ “NAPHTOL BLUE BLACK” ÜZERİNE ETKİSİ

ÖZET

Bu çalışmada azo boyar madde “Naphtol Blue Black” ’in sulu ortamda HRP-Dekstran konjugatı katalizi ile giderilmesi incelendi. HRP immobilize Con A kullanılarak affinite kromatografi yöntemi ile saflaştırıldı. Dekstran aldehyd türevi (Dekstran Mw 75.000 Da) ve saf enzim kullanılarak 1/10 oranında enzim-dekstran konjugatı sentezlendi. Reaksiyon pH 3, 4, 5, 6, 7 ve 8’de UV-Vis. spektrofotometrenin 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70 °C sıcaklığa ayarlanmış kristal küvetinde gerçekleştirildi. Zamana bağlı olarak boyada renk giderme düzenli bir şekilde alınan absorpsiyon spektrumları ile bir saat süreyle izlendi. En iyi sonuçlar çalışılan bütün sıcaklıklar için pH 4 ve 5’de elde edildi.

Anahtar Sözcükler: HRP, dekstran, konjugat, naftol blue black, boya giderme, UV-VIS.

1. GİRİŞ

“Horseradish” Peroksidaz (HRP, E,C 1.11.1.7), (bayır turpu peroksidazı) başlıca tıbbi tanı kitlerinde kullanılmaktadır. Fenoller, bifenoller, anilinler gibi aromatik bileşiklerin ve azo boyalarının giderilmesinde etkili olduğu da bilinmektedir [1-4].

“Horseradish” Peroksidaz molekülünde ferriprotoporfirin (protohemini) içeren bir haloenzimdir [5,6]. Peroksidazlar H₂O₂ ile Bileşik I, II ve III olmak üzere üç farklı yapı

*Corresponding Author/Sorumlu Yazar: e-mail/e-ileti: huriyekuzu@yildiz.edu.tr, tel: (212) 383 46 28

oluşturmaktadır. HRP'nin genel çalışma mekanizması aşağıda verildiği gibidir. HRP-I ve HRP-II, sırasıyla Bileşik I ve Bileşik II'yi, AH ise indirgenen substratı göstermektedir [6-8].



Şekil 1. HRP enziminin çalışma mekanizması [3]

Enzimler protein mühendisliği, immobilizasyon teknikleri, stabilize edici katkı maddeleri ya da kimyasal modifikasyon yöntemleri ile uygulama koşullarında daha dirençli bir yapıya getirilmektedir. Kimyasal modifikasyon amacıyla doğal ve sentetik polimerler başlıca kullanılmaktadır. Enzimlerin hidrofilik yapıda doğal bir polimer olan dekstranın çoklu kovalent bağlanması ile modifikasyonu, onlara başlıca termal direnç kazandırmaktadır [9,10].

Tekstil, deri, gıda, boya, kozmetik ve kağıt sanayilerinde boyalar önemli kirleticilerdir. Zehirli atıklar olarak değerlendirilen boyaların giderilmesi çevre çalışmaları yönünden önemlidir [11]. Boyaların giderilmesinde biyolojik ve fiziksel yöntemlerin uygulanmasına yönelik araştırma çalışmaları yapılmaktadır [12,13]. Naftol Blue Black'in giderilmesi ile ilgili gerçekleştirilen çalışmalarda başlıca fotokatalitik yöntemler uygulanmıştır [14-17]. Peroksidaz enzimleri katalizi ile sulu ortamda boyaların giderilmesi ayrı bir araştırma alanı olarak değerlendirilmektedir [18,19].

Bu çalışmada, enzim/dekstran mol oranı 1/10 olan HRP-dekstran konjugatının etkisi ile azo boyalardan Naftol Blue Black'in sulu ortamda giderilmesi farklı pH ve sıcaklıklarda incelendi. Boyanın giderilmesi, dolayısıyla ağartma etkisi UV-Vis. spektrofotometrede okunan λ_{620} değerlerinden hesaplandı.

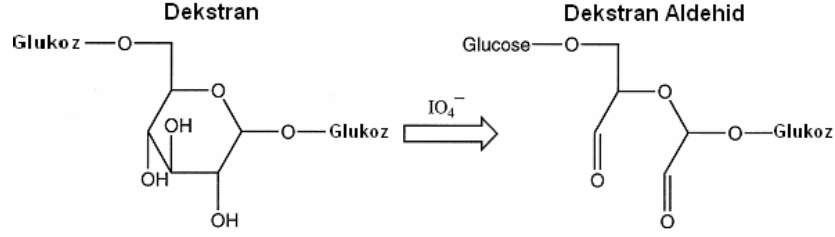
2. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

2.1. Ticari HRP Enziminin Affinite Kromatografisi ile Saflaştırılması

Protein konsantrasyonu 8 mg/ml olacak şekilde hazırlanan HRP çözeltisi Bio-Rad marka protein saflaştırma sisteminde 1,5 cm x 30 cm kolonda, dolgu maddesi 'Concanavalin A-Sepharose 4B' kullanılarak affinite kromatografi yöntemi ile saflaştırıldı. Enzim 0,1M asetat tamponu (pH 6) ile kolona verildi. Bağlanmayan materyalin 0,1M NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MnCl₂ içeren asetat tamponu ile yıkanıp uzaklaştırılmasından sonra, bu maddelere ek olarak 0,1M metil mannopiranosid (MMP) bulunduran tampon kullanılarak, 1,5 ml/ dakika akış hızı ile saf HRP fraksiyonlar halinde kolondan alındı. Fraksiyonların saflığının bir ölçüsü olarak RZ değeri $\lambda_{280}/\lambda_{403}$ hesaplandı [20].

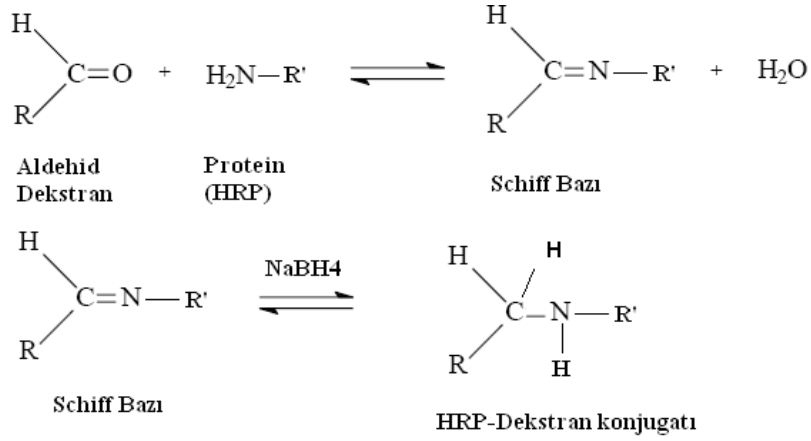
2.2. HRP -Dekstran Konjugatının Sentezi

Dekstranın (75.000 Da) destile sudaki çözeltisine NaO₄ çözeltisi yavaş yavaş ve karıştırılarak eklendi. Dekstan aldehid türevini elde etmek üzere reaksiyonun gerçekleşmesi için çözelti içeriği karanlıkta, oda sıcaklığında 24 saat süreyle karıştırarak bekletildi. Elde edilen yükseltgenmiş dekstran ile birlikte ortamda bulunan fazla iyonları uzaklaştırmak için ürün 24 saat karanlıkta, oda sıcaklığında destile suya karşı diyalize bırakıldı. Liyofilizatörde kurutma ile katı halde dekstranın aldehid türevi elde edildi [10, 21].



Şekil 2. Dekstran aldehid türevinin sentezi

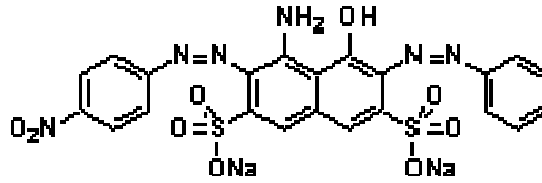
Dekstran türevinin karbonil grubu ile proteinin amin grubu arasında kondensasyon reaksiyonu gerçekleşti ve bir schiff bazı olan HRP-Dekstran bileşiği sentezlendi.



Şekil 3. HRP-dekstran konjugatının sentezi

Bu reaksiyon 4 ml, 0,1 M pH 7 sodyum fosfat tamponunda, $C_{\text{protein}} = 0,1$ mg/ml ve enzim/dekstran mol oranı 1/10 alınarak gerçekleştirildi. Schiff bazı oluşması aşamasında belirtilen çözelti 25°C 'da 16 saat bekletildi. Reaksiyonun durdurulması amacıyla ortamın pH değerini yükseltmek üzere 4 ml reaksiyon çözeltisine $+4^{\circ}$ C'daki 100 mM sodyum bikarbonat çözeltisinden 5,6 mL eklendi. Daha sonra reaksiyona girmeyen aldehid gruplarının ve schiff bazının indirgenmesi için 9,6 mg sodyum borhidrür (NaBH_4) ortama ilave edildi. 0.1M HCl ile çözeltinin pH değeri 7' ye ayarlandıktan sonra elde edilen konjugat ultrafiltrasyon cihazında konsantre edildi [20].

2.3. Boyanın Giderilmesi İşlemi



Şekil 4. Naftol Blue Black

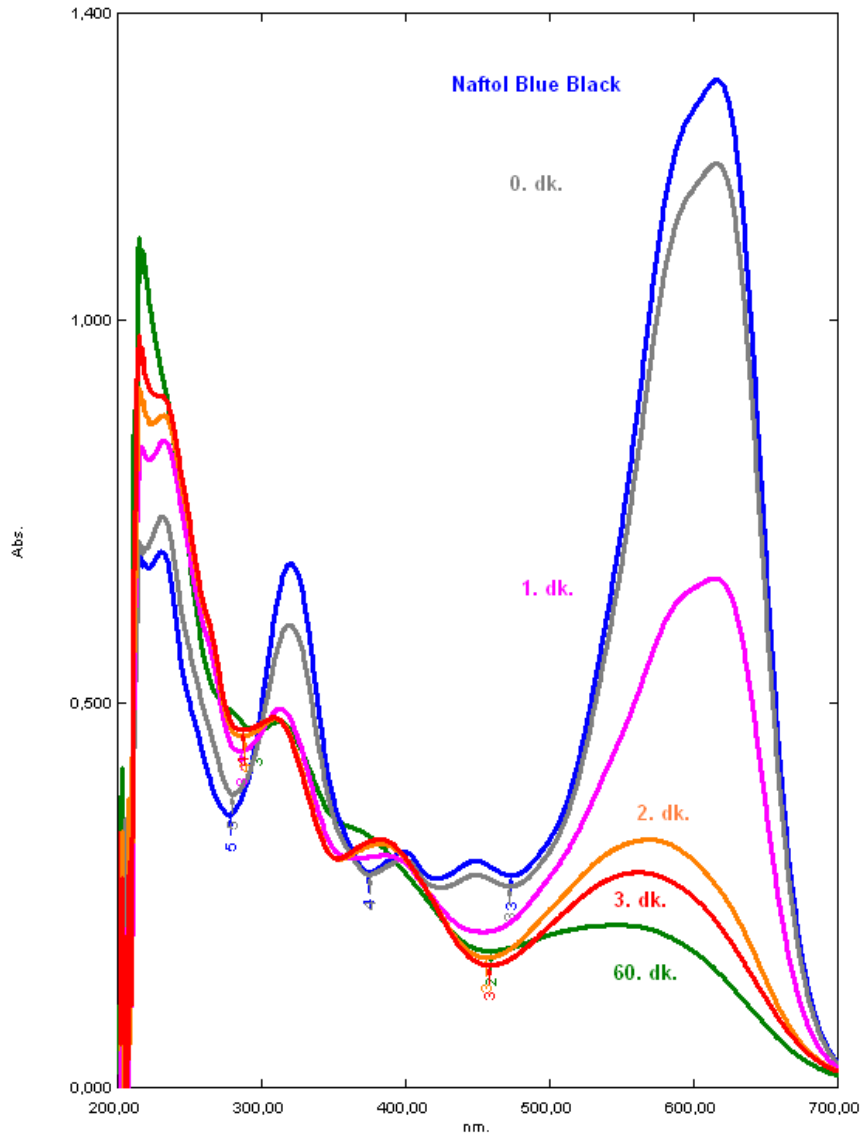
0.1 M Naftol Blue Black (M_w : 616.50 g/mol) stok çözeltisi 0.025 M' a seyreltildi. Bu çözeltinin 500 kat seyreltilmesi ile elde edilen 0.05 mM boya çözeltisinden reaksiyon ortamına 12 µl ilave edildi. "Naftol Blue Black"ın reaksiyon ortamında 6×10^{-10} M konsantrasyonda olması sağlandı. HRP enziminin reaksiyon ortamındaki konsantrasyonu ise 0, 0033 mg/ml alındı.

Farklı pH' larda tampon çözeltiden gerekli miktar 3 ml'lik kuvarz küvete alındı. Naftol Blue Black boyası ve HRP-dekstran konjugatı ilave edildikten sonra 10 µl % 3' lük Hidrojen peroksit (H_2O_2) ile reaksiyon başlatıldı. Reaksiyonun ilk 5 dakikasında 1 dakika ara ile, devamında 5 dakika ara ile UV-Vis. spektrofotometrede (Model UV-1700 Pharmaspec Shimadzu) absorpsiyon spektrumları alınarak boyanın farklı pH ve sıcaklıklarda HRP-dekstran konjugatı katalizinde parçalanması izlendi.

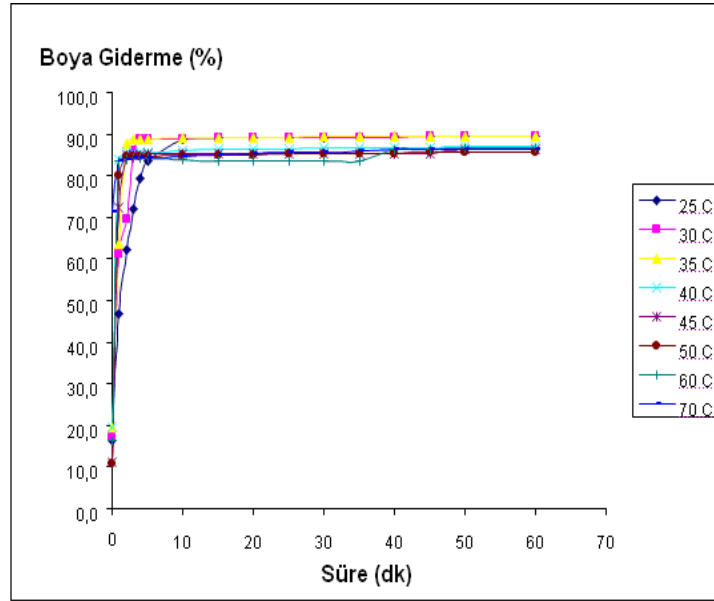
3. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada ilk defa, horseradish peroksidaz etkisi ile azo boyar madde "Naftol Blue Black"ın giderilmesi incelendi. İşlemlerde saf enzime göre ortam koşullarına daha dirençli olan HRP-dekstran kovalent konjugatı kullanıldı. Reaksiyon zamana bağlı olarak alınan absorpsiyon spektrumları vasıtasıyla izlendi (Şekil 5). Boyanın giderilmesi bu spektrumların 620 nm'de okunan absorpsiyon değerlerinden hesaplandı.

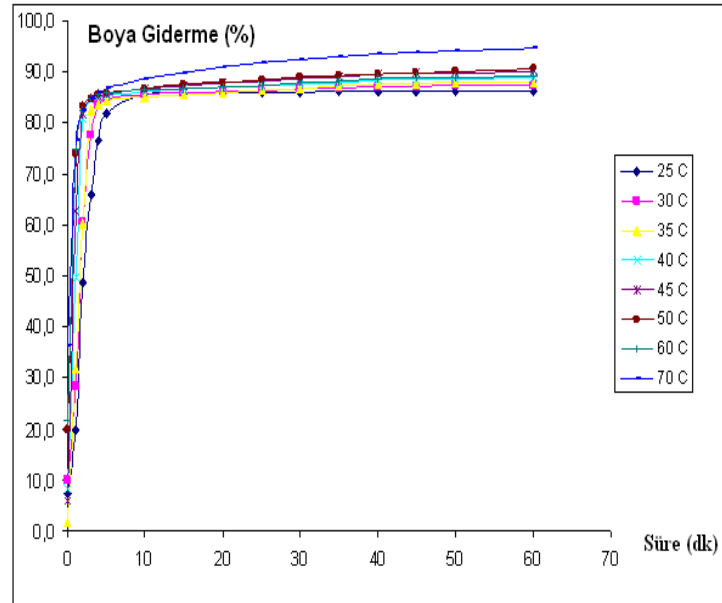
Optimum koşulları belirlemek amacıyla reaksiyon farklı pH (3–8) ve sıcaklıklarda (25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70°C) incelendi. pH 6, 7 ve 8'de reaksiyon 50°C'ın altındaki sıcaklıklarda yavaş olarak gerçekleşti, yüksek sıcaklıklarda ise enzimin kısa sürede denatürasyonu sebebiyle olmalı, boya giderme izlenmedi. pH 3'de yalnız düşük sıcaklıklarda ilk 10 dakikada boya giderme sağlandı. En iyi sonuç, çalışılan bütün sıcaklıklar için % 85 dolayında boya gidermenin ilk 5 dakikada gerçekleştiği pH 4 ve 5'de alındı (şekil 6).



Şekil 5. "Naftol Blue Black" in HRP-dekstran konjugatı katalizinde giderilmesi işleminde (pH 5, 40°C) zamana bağlı olarak alınan absorpsiyon spektrumları



(A)



(B)

Şekil 6. HRP/Dekstran konjugatı ile asetat tamponunda pH: 4,0 (A) ve 5,0 (B)'de, farklı sıcaklıklarda azo boyar madde Naftol Blue Black'in giderilmesi. % Boyar (NBB) madde kaybı 620 nm'de ölçülen absorbans değerlerinden hesaplanmıştır.

REFERENCES / KAYNAKLAR

- [1] Klibanov, A. M., Stabilization of enzymes against thermal inactivation, *Adv. Appl. Microbiol.*, 29, 1-28, 1983.
- [2] Dec J, Bollag J-M., Use of plant material for the decontamination of water polluted with phenols, *Biotechnol Bioeng* 44:1132–1139, 1994.
- [3] Bhunia, A., Durani, S., Wangikar, P.P., Horseradish Peroxidase Catalyzed Degradation of Industrially Important Dyes, *Biotechnology And Bioengineering*, 72:5, 562-567, 2001.
- [4] Liu, J.Z., Wang, T.L., Ji, T.L., Enhanced dye decolorization efficiency by citraconic anhydride-modified horseradish peroxidase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 41, 81–86, 2006.
- [5] Franco Fraguas, L., Batista-Viera F., Carlsson J., Preparation of high-density Concavalin A adsorbent and its use for rapid high-yield purification of peroxidase from horseradish roots, *J. Chromatogr. B.*, 803, 237-241, 2004.
- [6] Leon, J.C., Alpeeva, I.S., Chubar, T.A., v.d., Purification and Substrate Specificity of Peroxidase from Sweet Potato Tubers, *Plant Science*, 163, 1011-1019, 2002.
- [7] Desphande, S.S., *Enzyme Immunoassays*, chapter 5, Chapman & Hall, New York, 1996.
- [8] Carvalho, A.S.L., Neves-Petersen, M.T., Peterson, S.B., v.d., Formation of a misfolded conformation during refolding of HRP A1 in the presence of calcium, *Biochim. Et Biophys. Acta*, 1747, 99-107, 2005.
- [9] Marshall, J.J., Manipulation of the Properties of Enzymes by Covalent Attachment of Carbohydrate, *TIBS*, 3, 79-83, 1978.
- [10] Betancor, L., Gallego, F., L., Hidalgo, A., v.d., Prevention of interfacial inactivation of enzymes by coating the enzyme surface with dextran-aldehyde, *Journal of Biotechnology*, 110, 201-207, 2004.
- [11] Abian, O., Wilson, C., Fernandez-Lorente, G., v.d., Preparation of Artificial Hydrophilic Micro-Environments (Polymeric salts) Surrounding Enzyme Molecules New Enzyme Derivatives to be Used in any Reaction Medium, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 19-20, 295-303, 2002.
- [12] Al-Momani, F., Touraud, E., Degorce-Dumas, J.R., v.d., Biodegradability enhancement of textile dyes and textile wastewater by VUV photolysis, *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 153, 191-197, 2002.
- [13] Stolz, A., Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56, 69-80, 2001.
- [14] Borke, P., Salker, A. V., Solar assisted photocatalytic degradation of Naphthol Blue Black dye using $Ce_{1-x}Mn_xO_2$, *Materials chemistry and physics*, 103, 336-370, 2007.
- [15] Troupis, A., Gkika, E., Triantis, T., vd., Photocatalytic reductive destruction of azo dyes by polyoxometallates: Naphthol blue black, *Journal of photochemistry and photobiology*, 188, 272-278, 2007.
- [16] Chunjie, J., Yihang, G., Changwen, H., vd., Photocatalytic degradation of dye naphthol blue black in the presence of zirconia-supported Ti-substituted Keggin-type polyoxometalates, *Materials Research Bulletin*, 39, 251-261, 2004.
- [17] Jin, L., Maria, H., Photoelectrochemical degradation of naphthol blue black diazo dye on WO_3 film electrode, *Electrochimica Acta*, 46, 2913-2922, 2001.
- [18] Gültekin, I., Ince, N.H., Degradation of aryl-azo-naphthol dyes by ultrasound, ozone and their combination: Effect of α -substituents, *Ultrasonics Sonochemistry*, 13, 208-214, 2006.
- [19] Bring, H. B., Dekker, H. L., Schoemaker, H. E., v.d., Oxidation reactions catalyzed by vanadium chloroperoxidase from *Curvularia inaequalis*, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 80, 91–98, 2000.

- [20] Altıkatoğlu, M., HRP-Dextran Konjugatları, Doktora tezi, Fen-Bilimleri Enstitüsü, Y.T.Ü, 2007.
- [21] Sacco, D., Bonneaux, F., Dellacherie, E., Interaction of haemoglobin with dextran sulphates and the oxygen-binding properties of the covalent conjugates, J. Biol. Macromol., 10, 305-310, 1988.