

**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ENGİNAR POLİFENOL OKSİDAZİNİN
ALGİNAT ve KARRAGENAN JELLERDE İMMOBİLİZASYONU
ve BAZI BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ**

**Selin KOCATÜRK
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Danışman
Yrd. Doç. Dr. Hülya YAĞAR
EDİRNE-2008**

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ENGİNAR POLİFENOL OKSİDAZININ
ALGİNAT ve KARRAGENAN JELLERDE İMMOBİLİZASYONU
ve BAZI BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ**

Selin KOCATÜRK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Hülya YAĞAR

EDİRNE-2008

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENGİNAR POLİFENOL OKSİDAZININ
ALGİNAT ve KARRAGENAN JELLERDE İMMOBİLİZASYONU
ve BAZI BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ

Selin KOCATÜRK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Bu tez 23 / 05 / 2008 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Ayten SAĞIROĞLU

Yrd. Doç. Dr. Figen ERTAN

Yrd. Doç. Dr. Hülya YAĞAR
Danışman

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	i
SUMMARY	iii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Polifenol Oksidazlar	3
2.2. Polifenol Oksidaz Enziminin Ekstraksiyonu	7
2.2.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi	8
2.1.2. Dializ	9
2.3. Polifenol Oksidaz Enziminin İmmobilizasyonu	9
2.3.1. Adsorbsiyon ile İmmobilizasyon	10
2.3.2. Kovalent Bağlama İle İmmobilizasyon	11
2.3.3. İyonik Bağlama İle İmmobilizasyon	11
2.3.4. Tutuklama Yöntemi ile İmmobilizasyon	12
2.3.4.1. Kalsiyum Alginat Jelde Tutuklama	13
2.3.4.2. Karragenan Jelde Tutuklama	15
2.4. Polifenol Oksidaz ile Gerçekleştirilen İmmobilizasyon Çalışmaları	16
2.5. Polifenol Oksidaz Kaynağı Olarak Enginar	19
3. MATERYAL VE METODLAR	21
3.1. Materyaller	21
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar Maddeler	21
3.1.2. Kullanılan Aletler	22
3.1.3. Hazırlanan Çözeltiler	23
3.2. Metot	24
3.2.1. Protein Tayini	24
3.2.1.1. Lowry Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini	24
3.2.2. Enzimatik Aktivite Tayinleri	25
3.2.2.1. Krezolaz Aktivite Tayini	25

3.2.2.2. Kateşolaz Aktivite Tayini	25
3.2.3. Enginardan PPO Enziminin İzolasyonu	26
3.2.4. Amonyum Sülfat Çöktürmesi	26
3.2.5. Dializ	27
3.2.6. Alginat Jelde Tutuklama	27
3.2.7. Karragenan Jelde Tutuklama	27
3.2.8. Karragenan+Alginat Jelde Tutuklama	28
3.2.9. İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu	28
3.2.9.1. Damlatma Çözeltisinin Belirlenmesi	28
3.2.9.2. Alginat Konsantrasyonu Optimizasyonu	29
3.2.9.3. CuCl ₂ Konsantrasyonu Optimizasyonu	29
3.2.9.4. Enzim Miktarı Optimizasyonu	29
3.2.9.5. Boncuk Boyutu Optimizasyonu	30
3.2.9.6. Boncuk Miktarı Optimizasyonu	30
3.2.10. İmmobilize Enginar Polifenoloksidazının Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi	30
3.2.10.1. Optimum pH Çalışması	30
3.2.10.2. Optimum Sıcaklık Çalışması	31
3.2.10.3. Termal Kararlılık Çalışması	31
3.2.10.4. K _m ve V _{max} Değerlerinin Belirlenmesi	31
3.2.10.5. İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanılabilirliği	32
3.2.10.6. İmmobilize Enzimin Depo Kararlılığı	32
4. DENEY SONUÇLARI VE BULGULAR	33
4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri	33
4.2. Enginar Baş Kısmından Ham Ekstrakt Hazırlanması	33
4.3. Enginar PFO Enziminin Çöktürülmesi ve Dializ	34
4.4. Enginar PFO'nun Alginat, Karragenan ve Alginat+Karragenan Jellerde Tutuklanması	34
4.5. Enginar PFO'nun Alginat Jelde İmmobilizasyonunun Optimizasyonu	36
4.5.1. Damlatma Çözeltisinin Belirlenmesi	36
4.5.2. Alginat Konsantrasyonunun Optimizasyonu	37
4.5.3. CuCl ₂ Konsantrasyonu Optimizasyonu	38
4.5.4. Enzim Miktarı Optimizasyonu	40

4.5.5. Boncuk Boyutu Optimizasyonu	41
4.5.6. Boncuk Miktarı Optimizasyonu	43
4.6. Alginat ve Alginat+Karragenan Jellerde Tutuklu Enginar PFO'nun Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi	45
4.6.1. Optimum pH	45
4.6.2. Optimum Sıcaklık Tayini	45
4.6.3. Termal Kararlılık Çalışması	48
4.6.4. Enginar PFO'ı için K_m ve V_{max} Değerlerinin Bulunması	51
4.6.5. İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanılabilirliği	53
4.6.6. İmmobilize Enzimin Depo Kararlılığı	55
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	56
6. KAYNAKLAR	66
7. TEŞEKKÜR	72
8. ÖZGEÇMİŞ	73

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
		No
Şekil 2.1	Polifenol oksidazın gösterdiği kateşolaz ve krezolaz aktivitelere ilişkin reaksiyonlar	4
Şekil 2.2	Polifenol Oksidaz kaynağı enginar	20
Şekil 4.1	Lowry yöntemine göre protein standart grafiği	33
Şekil 4.2	Enginar PFO'sunun alginat jelde tutuklanması ile elde edilen boncuklar	35
Şekil 4.3	Enginar PFO'sunun karragenan jelde tutuklanması ile elde edilen boncuklar	35
Şekil 4.4	Enginar PFO'sunun alginat + karragenan jelde tutuklanması ile elde edilen boncuklar	35
Şekil 4.5	Kateşolaz aktivitesine alginat konsantrasyonunun etkisi	37
Şekil 4.6	Krezolaz aktivitesine alginat konsantrasyonunun etkisi	37
Şekil 4.7	Kateşolaz aktivitesine $CuCl_2$ konsantrasyonunun etkisi	39
Şekil 4.8	Krezolaz aktivitesine $CuCl_2$ konsantrasyonunun etkisi	39
Şekil 4.9	Kateşolaz aktivitesine yüklenen enzim miktarının etkisi	40
Şekil 4.10	Krezolaz aktivitesine yüklenen enzim miktarının etkisi	41
Şekil 4.11	Kateşolaz aktivitesine boncuk boyutunun etkisi	42
Şekil 4.12	Krezolaz aktivitesine boncuk boyutunun etkisi	42
Şekil 4.13	Kateşolaz aktivitesine boncuk miktarının etkisi	43
Şekil 4.14	Krezolaz aktivitesine boncuk miktarının etkisi	44
Şekil 4.15	Serbest ve immobilize PFO 'ların pH 'a bağlı kateşolaz aktivitelerinin değişimleri	46
Şekil 4.16	Serbest ve immobilize PFO 'ların pH 'a bağlı krezolaz aktivitelerinin değişimleri	46
Şekil 4.17	Serbest ve immobilize PFO 'ların sıcaklığa bağlı kateşolaz aktivitelerinin değişimleri	47
Şekil 4.18	Serbest ve immobilize PFO 'ların sıcaklığa bağlı krezolaz aktivitelerinin değişimleri	47
Şekil 4.19	Alginat boncuklara immobilize ve serbest PFO 'nun kateşolaz aktivitesine ait termal kararlılık grafiği	48
Şekil 4.20	Alginat + Karragenan boncuklara immobilize ve serbest PFO 'nun	49

	kateşolaz aktivitelere ait termal kararlılık grafiği	
Şekil 4.21	Alginat boncuklara immobilize ve serbest PFO 'nun krezolaz aktivitesine ait termal kararlılık grafiği	50
Şekil 4.22	Alginat + karragenan boncuklara immobilize ve serbest PFO 'nun krezolaz aktivitelere ait termal kararlılık grafiği	50
Şekil 4.23	Serbest ve immobilize PFO 'ların kateşolaz aktivitesi için Lineweaver-Burk Grafiği	51
Şekil 4.24	Serbest ve alginat boncuklara immobilize PFO 'nun krezolaz aktivitesi için Lineweaver-Burk Grafiği	52
Şekil 4.25	Alginat + Karragenan boncuklara immobilize PFO 'nun krezolaz aktivitesi için Lineweaver-Burk Grafiği	52
Şekil 4.26	Alginat boncuklara immobilize PFO 'nun kesikli proseste yeniden kullanılabilirliği	54
Şekil 4.27	Alginat + Karragenan boncuklara immobilize PFO 'nun kesikli proseste yeniden kullanılabilirliği	54
Şekil 4.28	Alginat ve alginat + karragenan boncuklarda immobilize ve serbest PFO'nun PPFO'nun kateşolaz aktivitesi için depo kararlılık grafiği	55
Şekil 4.29	Alginat ve alginat + karragenan boncuklarda immobilize ve serbest PFO'nun PPFO'nun krezolaz aktivitesi için depo kararlılık grafiği	55

TABLULAR DİZİNİ

		Sayfa
		No
Tablo 4.1	Enginar PFO 'sunun izolasyonu sırasında belirlenen protein ve enzim aktiviteleri	34
Tablo 4.2	Alginat, karragenan ve alginat + karragenan jellerde yapılan immobilizasyonların immobilizasyon yüzdeleri ve enzim aktiviteleri	36
Tablo 4.3	Enginar PFO 'sunun alginat jelde immobilizasyonunda damlatma çözeltisinin belirlenmesi	36
Tablo 4.4	Enginar PFO 'sunun alginat jelde tutuklanmasının optimizasyon sonuçları	44
Tablo 4.5	Serbest ve immobilize enzimlerin krezolaz aktivitesi için kinetik değerleri	53
Tablo 4.6	Serbest ve immobilize enzimlerin kateşolaz aktivitesi için kinetik değerleri	53

ÖZET

Bu çalışmada; enginardan (*Cynara scolymus*) izole edilen polifenol oksidaz (EC.1.14.18.1) alginat, karragenan ve alginat + karragenan jellere immobilize edildi. Elde edilen immobilize enzimlerin optimum pH ve sıcaklık, K_m ve V_{max} kinetik sabitleri, termal ve operasyonel kararlılık, yeniden kullanılabilirlik ve depo kararlılığı gibi bazı biyokimyasal özellikleri belirlendi ve serbest enziminkiyle karşılaştırıldı.

Antalya Gaziosmanpaşa'dan sağlanan taze enginarların baş kısmından polifenol oksidaz enzimi Tris - HCl tamponu (pH 7.0) varlığında izole edildi, sonrasında % 10-90 'lık $(NH_4)_2SO_4$ çöktürmesi ve dializ uygulandı. Dializ işlemi +4 °C 'de 1 gün boyunca aynı tampona karşı gerçekleştirildi. Elde edilen dializat enzim kaynağı olarak kullanıldı. Enginar polifenol oksidazı alginat, karragenan ve alginat + karragenan jellerde tutuklandı. Damlatma çözeltisi olarak alginat jeller için $CuCl_2$ ve karragenan jeller için KCl kullanıldı. Protein tayinleri Lowry yöntemi uygulanarak gerçekleştirildi. İmmobilizasyon yüzdeleri alginat boncuklar için % 70, alginat + karragenan boncuklar için % 60 ve karragenan boncuklar için % 37 olarak belirlendi. En yüksek kateşolaz aktivitesi alginat jelde gözlenirken (370 U/gr boncuk dak) en yüksek krezolaz aktivitesi ise alginat+karragenan jelde gözlendi (90 U/gr boncuk dak). Cu - alginat boncuklarda enginar polifenol oksidazının immobilizasyon koşullarının optimizasyonunda; optimum alginat konsantrasyonu % 3, $CuCl_2$ konsantrasyonu % 2, optimum yüklenen enzim miktarı 1/5 D, optimum boncuk boyutu 3 mm ve optimum boncuk miktarı 0.1 gr olarak belirlendi.

Alginat ve alginat + karragenan jellerde tutuklanan enginar polifenol oksidazı için; kateşolaz aktivitesinde serbest enzim ve immobilize formlar için optimum pH değeri 7.0, krezolaz aktivitesi için ise 4.0 olarak bulundu. Alginatta tutuklanmış enzim için kateşolaz aktivitesinin optimum sıcaklığı 70 °C, alginat + karragenanda tutuklanmış enzim için 40 °C, serbest enzim için ise 5 °C olarak belirlendi. Alginat boncuklardaki immobilize enzimin krezolaz aktivitesi için en iyi sıcaklık 30 °C olarak, alginat + karragenan boncuklar için ise 20 °C, serbest enzim için ise optimum sıcaklık değeri 50 °C olarak bulundu. İmmobilize enginar polifenol oksidazının varolan termal kararlılığını

tutuklama sonrasında da büyük oranda koruduğu gözlemlendi. Serbest enzim ve alginat boncuklarda tutuklanan enzimin krezolaz aktivitesine ait K_m ve V_{max} kinetik sabitleri sırasıyla, 1.58×10^{-3} mM ile 142.85 U/mL'de ve 1.92×10^{-3} mM ile 99 U/mL'de, alginat + karragenan boncuklarda 5.0×10^{-3} mM ile 111.1 U/mL'de olarak bulundu. Kateşolaz aktivitesinde K_m ve V_{max} kinetik sabitleri sırasıyla, 2.32×10^{-3} mM ile 1613 U/mL'de ve 6.66×10^{-3} mM ile 1000 U/mL'de, alginat+karragenan boncuklarda 8.0×10^{-3} mM ile 1282 U/mL'de olarak tespit edildi. Yeniden kullanılabilirlik çalışmasında; alginat ve alginat + karragenan boncukların 8 döngü süresince her iki aktivitesinin yaklaşık tamamını koruduğu gözlemlendi. Depolama kararlılığı çalışmasında serbest enzim aktivitesini yaklaşık 7 - 9 gün korurken immobilize formlar aktivitelerini yaklaşık 30 gün boyunca koruduğu gözlemlendi.

SUMMARY

In this study, polyphenol oxidase (EC.1.14.18.1) isolated from artichoke (*Cynara scolymus*) was immobilized in alginate, carrageenan and alginate+carrageenan gels. Some properties of obtained immobilized enzymes such as optimum pH and temperature, kinetic parameters (K_m and V_{max}), thermal and operational stability, reuse and storage stability were determined and compared to these of free enzyme.

Polyphenol oxidase was isolated from fresh artichokes heads obtained from Gaziosmanpaşa-Antalya in the presence of Tris - HCl buffer (pH 7.0), then was applied 10 - 90 % $(NH_4)_2SO_4$ precipitation and dialysis. Dialysis was carried out in the same buffer changing the buffer at 4 °C throughout one day. The obtained dialysate was used as enzyme source. Artichoke polyphenol oxidase was entrapped in alginate, carrageenan and alginate+carrageenan gels. $CuCl_2$ and KCl were used for alginate and carrageenan gels as dropping solution, respectively. Protein determinations were done by using Lowry method. Immobilizations percentages were determined to be 70 % , 60 % and 37 % for alginate, alginate+carrageenan and carrageenan beads, respectively. The highest catecholase activity was observed in alginate gel (370 U/g bead min) while the highest cresolase activity was in alginate+carrageenan gel (90 U/g bead min). The optimization of immobilization conditions was done for artichoke polyphenol oxidase immobilized Cu-alginate beads. Optimum alginate and $CaCl_2$ concentration were found to be 3 % and 2 % (w/v), respectively. The loading enzyme concentrations are 1/5 D. Optimum bead diameter is 3 mm. Optimum bead' amount was determined to be of 0.1 g.

The optimum pHs of free polyphenol oxidase and polyphenol oxidases entrapped in alginate and alginate+carrageenan gels were determined to be 7.0 and 4.0 for catecholase and cresolase activities, respectively. Optimum temperatures for catecholase activity were determined to be 40 °C, 70 °C, and 5 °C for enzyme entrapped alginate beads, alginate+carrageenan beads, and free enzyme, respectively. These values for cresolase activity were 30 °C, 20 °C, and 50 °C, respectively. It was observed that immobilized artichoke polyphenol oxidases greatly preserved their thermal stability which exists anyway. K_m and V_{max} values for cresolase activity were determined to be

1.58×10^{-3} mM and 142.85 U/mL min for free enzyme, respectively. These values were 1.92×10^{-3} mM and 99 U/g beads min for immobilized enzyme in alginate beads, 5.0×10^{-3} mM and 111.1 U/g beads min for alginate + carrageenan beads. K_m values for catecholase activity were 2.32×10^{-3} mM, 6.66×10^{-3} mM, and 8.0×10^{-3} mM for free enzyme, alginate beads, and alginate + carrageenan beads, respectively. V_{max} values were 1613 U/mLmin, 1000 U/g beads min, and 1282 U/g beads min, respectively. In the reusing study, alginate and alginate + carrageenan beads saved about whole activities during 8 cycles for both activities. It was observed in storage stability study that free enzyme saved its activity during 7 - 9 days whereas immobilized forms saved during 30 days.

1. GİRİŞ

Enzimlerin endüstride ve biyoteknolojide çeşitli amaçlarla kullanılmaya başlanması, bilim adamlarını bu katalizörleri daha geniş ve daha kullanışlı hale getirme olanaklarını araştırmaya yöneltmiştir. Serbest enzimlerin endüstriyel uygulamalarda kullanımlarına ilişkin ortaya çıkan pekçok sorunu olumlu yönde çözümlenebilmek ve enzimleri endüstri için daha çekici hale getirmek için enzim immobilizasyonlarına olan ilgi son yarım yüzyıldır çok artmıştır (Telefoncu, 1997).

Enzimlerin immobilizasyonu biyoteknolojinin önemli olanaklarından biridir. Enzimler endüstriden tıba kadar geniş bir yelpazede ve kimyasal proseslerde katalizör olarak önemli potansiyele sahiptirler. Spesifiteleri, düşük sıcaklıkta yüksek katalitik etkinlikleri, biyobozunur olmaları nedeniyle önemli avantajlar sunarlar. Reaksiyon ortamından kolaylıkla ayrılabilmeleri ve böylece bir çok kez ve sürekli olarak kullanılabilmeleri nedeniyle immobilize enzimlerin kullanımı üretim maliyetlerini düşürür (Munjal ve Sawhney, 2002).

L-DOPA (3,4-dihidroksifenilalanin) 1967 yılından beri Parkinson hastalığının tedavisinde yaygın olarak tercih edilen bir ilaçtır. Bu hastalık nörotransmitter dopamin eksikliği nedeniyle olur. L-DOPA dopaminin öncülüdür ve kan beyin bariyerinden geçebilir. Günümüzde L-DOPA üretimi ticari skalada Knowles yöntemiyle kimyasal olarak gerçekleştirilmektedir. Yüksek üretim maliyeti ve yüksek ticari değeri nedeniyle çoğu araştırmacı bu ilacın alternatif üretimini araştırmaktadır. Alternatif yöntemlerden biri; immobilize polifenol oksidaz (PFO, tirozinaz) ile L-Tirozin'den L-DOPA'nın üretimidir. Polifenol oksidazın pahalı bir enzim olması nedeniyle; enzimin olası yeniden kullanılabilirliğini sağlamak amacıyla immobilizasyon çalışmaları yürütülmektedir (Ateş vd., 2006).

Polifenol oksidaz (EC. 1.14.18.1) bitkiler, bakteriler ve memeliler dahil olmak üzere çok geniş bir canlı gruplarında bulunmaktadır. Krezolaz ve kateşolaz aktivitesi olmak üzere iki ayrı aktiviteye sahiptir (Yahşi vd., 2005).

Tirozinazın L-DOPA sentezi haricinde kullanımı ile ilgili çeşitli araştırmalar yapılmaktadır. Bunlardan bazıları: endüstriyel atık suların fenolsüzleştirilmesi (defenolizasyon), fenol ve türevlerinin tayininde kullanılan enzim elektrodunun bir parçası olması, kirlenmiş toprakların biyoyileştirilmesi, meyve sularının berraklaştırılmasıdır. Bu nedenle polifenol oksidaz (tirozinaz) endüstriyel olarak önemli bir biyomoleküldür.

Polifenol oksidaz için basit ve güvenilir bir immobilizasyon uygulamasının belirlenmesi araştırmacılar için bir ilgi alanı olmaktadır. Polifenol oksidazın çeşitli immobilizasyon metotları literatürde rapor edilmektedir (Batra ve Gupta, 1994, Estrada vd., 1991, Ho vd., 2003, Naidja vd., 1997, Pialis vd., 1996, Schiller ve Liu, 1976, Yahsi vd., 2005).

Tutuklama metodu en basit immobilizasyon metotlarından biridir. Bu metotla enzim immobilizasyonu nispeten daha ılımlı koşullarda gerçekleştirilir. Alginat ve karragenan jeller tutuklama metodunda sık kullanılan polimerlerdir (Bickerstaff, 1997).

Polifenol oksidaz, pek çok bitkisel dokuda çalışılmıştır. Bu bitkisel dokulardan biri enginar olup yüksek Polifenol oksidaz aktivitesine sahip olduğu literatürde ve ayrıca grubumuzca da belirlenmiştir (Leventer, 2005).

Bu tez kapsamında, polifenol oksidaz enzimi açısından zengin bir bitkisel kaynak olan enginardan (*Cynara scolymus*) izole edilen polifenol oksidaz enziminin immobilizasyonu amaçlanmış olup, immobilizasyon alginat, karragenan ve alginat + karragenan jellerde gerçekleştirilmiş ve serbest ve immobilize tirozinazın optimum pH ve sıcaklık, K_m ve V_{max} kinetik sabitleri, termal kararlılık, yeniden kullanılabilirlik ve depo kararlılığı gibi bazı biyokimyasal özellikleri incelenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Polifenol Oksidazlar

Polifenol oksidazlar (PFO - EC.1.14.18.1) oksido - redüktaz sınıfı enzimlerdir. Cu kofaktörlüdürler. Moleküler oksijen varlığında orto ve vicinal -OH gruplu (3,4,5-trihidroksi) fenolik bileşikler oksitlemelerinin yanı sıra monofenollerin o-dihidroksi fenollere çevrilmesinde de rol oynadıkları bildirilmektedir (Vamos-Vigyazo, 1981).

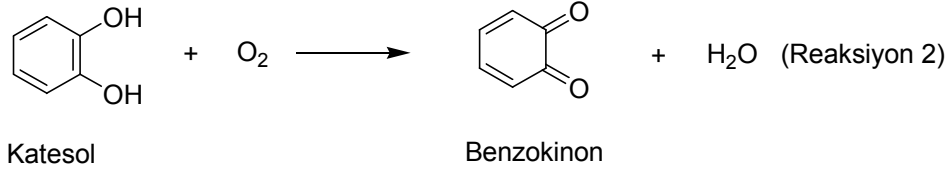
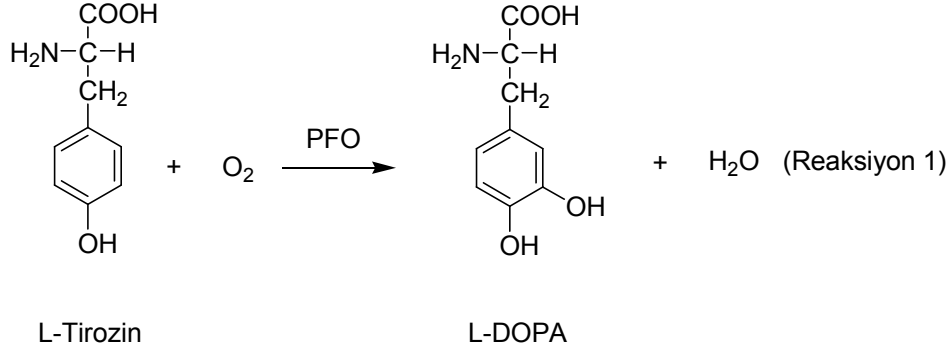
İlk olarak 1856 yılında Schoenbein tarafından yemeklik mantarlarda bulunmuştur. Bundan sonra pek çok meyve ve sebze polifenol oksidaz belirlenmiş ve karakterize edilmiştir (Keleş, 1987).

Polifenol oksidazın etkilediği substrata göre enzim ile ilgili farklı isimlendirmelere rastlanmaktadır. Bunlar: o-difenoloksidaz, o-difenol oksidoredüktaz, o-difenol:oksijen oksidoredüktaz, o-difenolaz, kateşol oksidaz, kateşolaz, klorojenikasit oksidaz, krezolaz, difenol oksidaz, DOPA oksidaz, monofenoldihidroksi fenilalanin: oksijen oksidoredüktaz, monofenol oksidaz, monofenoldihidroksi-L-fenilalanin:oksijen oksidoredüktaz, monofenolaz, fenoloksidaz, fenolaz, poliaromatik oksidaz, polifenol oksidaz, polifenolaz, pirokateşol oksidaz, tirozinaz, tirozin-DOPA oksidaz 'dır. (<http://www.ebi.ac.uk>)

Polifenol oksidaz enziminin tamamen iki farklı reaksiyonu katalizlediği bilinmektedir (Vamos-Vigyazo, 1981):

- a-) Monofenollerin uygun o-hidroksi bileşiklere hidroksilasyonu (krezolaz aktivitesi)
- b-) o-hidroksi fenollerin o-kinonlara oksidasyonu (kateşolaz aktivitesi)

Tüm bu reaksiyonlar moleküler oksijen varlığında olmaktadır.



Şekil 2.1. Polifenol oksidazın gösterdiği krezolaz (reaksiyon 1) ve kateşolaz (reaksiyon 2) aktivitelerine ilişkin reaksiyonlar

Polifenol oksidaz enziminin krezolaz aktivitesi 1. denklemde, kateşolaz aktivitesi 2. denklemde gösterilmiştir (Şekil 2.1). Denklem 2 'nin ürünü olan Dopakinon çok reaktif bir molekül olup, halkalaşma ve polimerizasyon reaksiyonlarıyla melanine dönüşür. Melanin kompleks, heterojen bir biyopolimerdir.

Farklı kaynaklardan elde edilen enzim ekstraktlarının her iki aktiviteye farklı oranlarda sahip oldukları bildirilmektedir. Patates, elma, şeker pancarı yaprağı, bakla ve mantar gibi birçok polifenol oksidaz ekstraktları her iki aktiviteye de sahip iken, çay yaprağı, tütün, hint kirazı, muz, armut ve kiraz polifenol oksidazlarının mono hidroksi fenollere etki etmediği saptanmıştır (Erzengin, 2002). Enginar polifenol oksidazlarının da her iki aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir (Espin vd., 1997).

Polifenol oksidazlar doğada yaygın olarak bulunurlar. Bitkiler aleminde yaygın olarak bulunmasının yanı sıra mikroorganizmalarda özellikle funguslarda ve memelilerde de polifenol oksidaz enzimine rastlandığı rapor edilmiştir (Vamos-Vigyazo, 1981; Keleş, 1987).

Bitki hücrelerinde enzimin lokalizasyonu bitkinin türüne, yaşına; meyve ve sebzelerde ise olgunluğa bağlıdır. Bazı araştırmacılar enzimin yeşil yapraklılarda hücrede kloroplastlarda, bazı türlerde mitokondri ve plastid membranlarında lokalize olduğunu bildirmektedirler (Vamos Vigyazo, 1981; Keleş, 1987).

Polifenol oksidazların doğadaki rolü konusunda bazı tezler öne sürülmektedir. Yüksek bitkilerin solunum zincirinde görev alan terminal oksidazlardan biri olduğu bildirilmektedir. Fakat bu görevin önemi hala çözülememiştir.

Polifenol oksidazlar, bitkilerin mikrobiyal veya viral enfeksiyonlara karşı direnç göstermesinde önemli bir role sahiptirler. Aynı zamanda, bitkilerin olası kötü iklim koşullarına karşı dayanıklı olmalarının bir nedeni de polifenol oksidazların varlığıdır.

Polifenol oksidaz bitkilerin Enfeksiyonlara karşı direncinde önemli rol oynar. Enzim etkisiyle oluşan kinonların ikincil polimerleşme reaksiyonları ile meydana gelen koyu renkli, çözünmeyen polimerler. Bu polimerler dokularda enfeksiyona karşı bariyer olarak rol oynamaktadırlar. Bazı araştırmacılar bunun polifenol oksidaz enziminin temel fonksiyonu olduğunu belirtmektedirler. Lipid içeriğindeki azalma da membran geçirgenliğini arttırdığından substratlara enzimin ulaşmasını kolaylaştırdığı ve böylelikle bariyerlerin oluşumunun da hızlandırıldığı düşünülmektedir (Vamos - Vigyazo, 1981). Diğer bir teoriye göre de polifenollerin oksidatif polimerizasyonu sırasında oluşan ara ürünler enzimi inaktif hale getirmekte ve aynı zamanda bu ürünler virüs ve kararsız enzimlere de bağlanabilmektedirler.

Gıda teknolojisi açısından polifenol oksidaz önemli bir enzimdir. Enzimatik kahverengileşme gıda teknolojilerini çok uğraştıran bir olaydır. Elma, armut, şeftali, muz gibi meyvelerde, patates, yemeklik mantar gibi sebzelerde saklanma ve işlenmeleri

sırasında enzim problem yaratmaktadır. Enzimatik kahverengileşme her zaman istenmeyen bir olay değildir. Siyah çay, çekirdeksiz kuru üzüm, incir ve hurmaların beğenilen güzel renkleri, açık renkli meyvelerden elde edilen meyve suyu ve içkilerin altın sarısı renkleri ılımlı ve kontrollü bir kahverengileşme ile elde edilir (Keleş, 1987).

Meyve ve sebzelerin taşınması veya işlenmesi sırasında meydana gelen zedelenmeleri, kesilmiş yüzeylerinin hava ile temas etmesi ya da dondurulma işleminden sonra çözdürülmesi enzimatik kararmaya yol açar. Bu durum, kesinlikle istenmez ve engellenmelidir.

Pek çok bitkisel kaynaktan polifenol oksidaz enzimi izole edilip saflaştırılmaya çalışılmış; yapısı ve reaksiyon mekanizması aydınlatılmaya çalışılmıştır: Armut (Halim vd., 1987, Wisseman vd., 1985), muz (Galeazzi vd., 1981, Yang vd., 2000), kivi (Park ve Luh, 1985), kuşburnu (Şakiroğlu vd.,1996), patates (Cho ve Ahn, 1998), yerelması (Ziyan ve Pekyardımcı, 2001), patlıcan (Gilabert ve Carmona, 2000), fasulye (Beena ve Gowda, 2000), ayçiçeği (Singh vd.1999), ayva (Yagar ve Sagiroglu, 2002), kereviz (Yagar, 2004, Aydemir ve Akkanli, 2006).

Meyve ve sebzeler fenolik bileşiklerin büyük bir karışımını içerir. Ancak bu bileşiklerin çok az bir kısmı polifenol oksidaz enzimine substrat olabilmektedir. Polifenol oksidazın meyve ve sebzelerdeki doğal substratları kateşinler, sinnamik asit esterleri, 3,4-dihidroksifenilalanin (L- DOPA) ve tirozindir. Değişik kaynaklardan izole edilen polifenol oksidaz enzimleri için; 4-metil kateşol, kafeik asit, kateşol, klorojenik asit, (+)- kateşin, L- DOPA, p- krezol, tirozin, pirogallol, adrenalin, noradrenalin, dopamin - HCl, gallik asit *in vitro* da denenmiş substratlardır.

Substrat spesifikliğı yalnız meyve ve sebzenin cinsine bağlı değildir. Aynı zamanda belli bir ölçüye kadar enzimin meyve ve sebzenin ekstrakte edildiğı kısma ve yetiştirilişine bağlıdır. Aktivitenin araştırıldığı pH da substratın kullanılabilirliğini etkiler (Erzengin, 2002).

Polifenol oksidaz aktivitesinin optimum pH 'ı, enzimin kaynaklarına ve substratlarına göre genellikle pH 4.0 - 7.0 arasında değişir. Birçok kaynaktan elde edilen polifenol oksidazın, pH 4.0 altında inaktif olduğu belirtilmiştir (Aydemir, 2004, Park ve Luh, 1985, Şakiroğlu vd., 1996, Yagar, 2004).

Optimum sıcaklık üzerine yapılan araştırmalar, enzimin optimum pH 'ına etki eden bütün faktörlerin optimum sıcaklığı da etkilediğini göstermiştir. Polifenol oksidaz aktivitesinin optimum sıcaklığı, enzimin kaynaklarına ve substratlarına göre genellikle 15 – 50 °C arasında değişir (Aydemir ve Akkanli, 2006, Beena ve Gowda, 2000, Cho ve Ahn, 1998, Doğan vd., 2005).

Polifenol oksidaz enzimleri çok yüksek sıcaklıklara karşı dayanıklı değildirler. Doku ve çözeltilerdeki enzim, kısa süre de olsa 70 - 90 °C gibi yüksek bir sıcaklıkta bırakıldığında katalitik aktivitesinin tamamını ya da çoğunu geri dönüşümsüz olarak kaybedebilir. Aynı zamanda 0 °C 'nin altındaki sıcaklık değerleri de enzim aktivitesini etkileyebilir.

Polifenol oksidaz enziminin ısıya dayanıklılığını, substrat, optimum pH, optimum sıcaklık ve enzim kaynağı etkiler.

2.2. Polifenol Oksidaz Enziminin Ekstraksiyonu

Polifenol oksidazın bitki materyallerinden ekstraksiyonu işleminde üç problem ile karşılaşılır;

- Enzimin inaktif formda olması,
- Hücre organellerine bağlı enzimin çözünürleştirilmesi
- Bitkilerde bulunan bazı fenollerin enzim ile oksidasyonu sonucu polimerizasyonu ve enzim üzerine çökmesinin engellenmesi.

Birçok bitki türünde polifenol oksidaz aktif formda bulunmaktadır, hücre organellerine bağlı inaktif enzim formunda ise; sodyum dodesil sülfat (SDS), Tween-

80, Triton X-100 gibi deterjanlarla ve kafein-sodyum benzoat ile çözme ile aktif hale getirilebilir.

Çözünür bir polifenol oksidaz eldesinde görülen en büyük zorluk; bitki materyalinin ekstraksiyonu ve taşınması sırasında pigment oluşumu ve enzimatik fenol oksidasyonunun engellenmesidir. Pigmentler, enzim proteini üzerine çökebilirler ve enzimin çözünmesini engelleyebilirler. Buna ek olarak enzimin dönüşümsüz inaktivasyonuna sebep olabilirler. Bu tehlikeleri en aza indirmek için öncelikle ekstraksiyon adımları mümkün olduğu kadar düşük sıcaklıklarda yapılmalıdır.

Ekstraksiyon sistemini enzimatik polifenol oksidasyonundan korumak için, ortama dönüşümlü enzim inhibitörleri katılabildiği gibi indirgeyici bileşikler ya da kinon bağlayıcı reaktifler de katılabilir. Genellikle askorbik asit, sistein, sodyum metabisülfid ve sukroz veya bu bileşiklerden oluşturulan bir karışım kullanılmaktadır.

Enzim ekstraksiyonu sırasında fenol oksidasyonunu ve polimerizasyonunu önlemenin en etkili yollarından biri de ortamdaki substratların çözünmeyen bir polimere bağlanarak ortamdaki uzaklaştırılmasıdır. Fenol bağlamada kullanılan en yaygın madde polivinilpirolidon (PVP) 'dir. PVP fenollerin iyonlaşmadığı nötral ya da asidik pH ortamında çok kuvvetli bir proton alıcısıdır (Erzengin, 2002).

2.2.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Nötral tuzların ilavesiyle proteinlerin çöktürülerek fraksiyonlara ayrılması yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemle proteinler denatürasyon, proteoliz ve bakteriyel kontaminasyona karşı stabilize olur. Amonyum sülfat doygunluk konsantrasyonu (20 °C 'de 4 M) yüksek olduğundan pek çok proteinin çökmesine neden olur. Çözünme ısısı düşük olup, kolaylıkla dağılır. Doygun amonyum sülfat çözeltisindeki proteinin santrifüjle uzaklaştırılması diğer tuzlarınkine göre daha kolaydır (Tarhan, 1997).

2.2.2. Dializ

Dializ; proteinlerden küçük moleküllü bileşenlerin genellikle tuzların uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır. Özellikle amonyum sülfat fraksiyonlaması sonrası düşük iyon şiddetli bir tamponla değişim zorunludur. Dializ işleminde küçük moleküllerin geçişi membranın her iki yüzeyinde kimyasal potansiyel fark eşitleninceye kadar devam eder (Tarhan, 1997).

2.3. Polifenol Oksidaz Enziminin İmmobilizasyonu

Enzimler endüstride çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Bu nedenle enzimlerden maksimum oranda yararlanmak için immobilizasyon çalışmaları yapılmaktadır. Enzimler suda çözünen spesifik katalizörlerdir. Genellikle sulu ortamda gerçekleştirilen endüstriyel uygulamalarda katalizör olarak kullanılan serbest enzim kullanıldığında enzimin aktivitesini yitirmeden geri kazanılması olanaksızdır. Serbest enzim reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılmadığından reaksiyon kontrolü çok zordur. İnhibitör kullanılarak reaksiyonun durdurulması ise reaksiyon ürünlerine yeni bir kirlilik unsurunun eklenmesine neden olur. Bilindiği gibi endüstriyel uygulamalarda ürünlerin saflaştırılması maliyeti çok arttırmaktadır. Serbest enzim reaksiyon ortamından geri kazanılamadığı için yeniden kullanılabilmesi de söz konusu değildir. Bu yüzden çok spesifik ama pahalı katalizörler olan enzimlerin endüstriyel üretimde kullanılması; üretim maliyetlerini yükseltmektedir. Ayrıca serbest enzimler sürekli üretim sistemlerinde de kullanılamazlar. Tüm bu sorunları olumlu yönde çözümlenebilmek ve enzimleri endüstri için daha çekici hale getirmek için enzim immobilizasyonlarına olan ilgi son kırk yıldır çok artmıştır.

İmmobilizasyon, enzimlerin suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanması, suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak katılması ve suda çözünmeyen bir matris veya suda çözünmeyen mikrokapsüllerde tutuklanması olarak tanımlanabilir (Telefoncu, 1997).

Enzimlerin immobilizasyonu biyoteknolojinin önemli olanaklarından biridir. Spesifiteleri, düşük sıcaklıkta yüksek katalitik etkinlikleri, biyobozunur olmaları nedeniyle önemli avantajlar sunarlar. Reaksiyon ortamından kolaylıkla ayrılabilmeleri ve böylece bir çok kez ve sürekli olarak kullanılabilmeleri nedeniyle immobilize enzimlerin kullanımı üretim maliyetlerini düşürür. Çevre koşullarına (pH, sıcaklık vb.) karşı daha dayanıklı olmaları, doğal enzime göre daha kararlı olmaları, enzimin kendi kendini parçalaması olasılığının az olması, ürün oluşumunun kontrol altında tutulabilmesi ve birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlarda kullanılabilmeleri immobilize enzimlerin avantajlarındandır.

Ayrıca enzim üretiminde hammadde problemi mikrobiyal kaynaklar sayesinde büyük ölçüde çözülmüş olmasına rağmen enzimlerin bu kaynaklardan izolasyonu ve saflaştırılması oldukça masraflı bir iştir. Bu nedenle enzim kaynağı ister bitkisel, ister hayvansal isterse mikrobiyal olsun bu biyokatalizatörlerin potansiyellerinden olabildiğince yararlanmak gerekir. Immobilizasyon tekniklerinin uygulanması bu problem için bir çözüm olmaktadır.

Enzim immobilizasyonunda doğal veya sentetik bir çok organik ve inorganik materyal taşıyıcı olarak kullanılmaktadır. Taşıyıcı suda çözünmeyen katı bir madde veya polimer olabilir.

Enzim immobilizasyonunda kullanılan birkaç farklı metot vardır:

1. Suda çözünmeyen taşıyıcıya adsorbsiyon ve kimyasal bağlanma
2. Polimer jellerde tutuklama
3. Membranda enkapsülasyon
4. Bifonksiyonel veya multifonksiyonel reaktiflere çapraz bağlanma (Bickerstaff, 1997).

2.3.1. Adsorbsiyon ile İmmobilizasyon

Adsorbsiyon ile immobilizasyon en basit metottur ve enzim ile taşıyıcı arasında tersinir yüzey etkileşimleri ile olur. Adsorbsiyon ile immobilizasyonda hidrofobik etkileşimler de söz konusu olsa da en çok Van der Waals, iyonik ve hidrojen bağı

etkileşimleri gibi elektrostatik güçler etkindir. Yöntem suda çözünmeyen, adsorbsiyon özelliklerine sahip bir yüzey aktif taşıyıcı ile enzim çözeltisinin uygun koşullarda (pH, iyonik güç, vb.) bir süre inkübasyonu ve sonrasında tutunmamış enzimin aşırısının iyice yıkanarak uzaklaştırılması şeklinde uygulanır. İmmobilizasyon işleminin basit, hızlı ve ucuz oluşu, değişik biçim ve yükteki taşıyıcıları seçme olanağı vermesi yöntemin avantajlarıdır. Yöntemin sakıncaları ise; optimum koşulları saptamak zordur, enzim ile taşıyıcı arasında kuvvetli bir bağlanma yoksa enzim serbest halde reaksiyon ortamına geçerek ürünleri kirletebilir.

2.3.2. Kovalent Bağlama ile İmmobilizasyon

Bu immobilizasyon yöntemi enzim ile taşıyıcı arasında kovalent bir bağ oluşumuna dayanır. Taşıyıcı yüzeyindeki fonksiyonel gruplarla enzim yüzeyindeki amino asit artıklarına ait fonksiyonel gruplar arasında oluşur. Genellikle sulu ortamda gerçekleşir. Kullanılacak taşıyıcılar reaktif değilse yardımcı bir reaktif ile aktive edilmeleri gerekmektedir. İmmobilizasyon çok yumuşak koşullarda (oda sıcaklığı, nötral pH vb.) gerçekleştirilmelidir. Yöntemin gerçekleştirilmesi zordur. Ancak enzim ve taşıyıcı arasındaki bağlanma yüksek olduğundan bazen enzimatik aktivitenin arttığı da görülmektedir.

2.3.3. İyonik Bağlama ile İmmobilizasyon

Bu yöntem iyon değiştirme yeteneğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik bağlanması temeline dayanır. Bazı durumlarda iyonik bağlama yanında fiziksel adsorbsiyon da etkili olmaktadır.

İyonik bağlama çok yumuşak koşullarda gerçekleştiğinden enzimin konformasyonunda ve aktif merkezde değişikliğe neden olmaz. Ancak enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ kovalent bağ kadar güçlü olmadığından enzim kaçıışı söz konusudur.

2.3.4. Tutuklama Yöntemi ile İmmobilizasyon

Prensip olarak tutuklama enzim molekülünü belirli bir mekanda durmaya zorlamaktır. Tutuklama polimer matriks içindeki kafeslerde gerçekleştirilebileceği gibi yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ve miseller ile de gerçekleştirilebilir. Yöntemde enzim molekülü fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamaktadır. Bu metotta enzim molekülleri çözeltide serbest olup jelin kafes yapısı tarafından sadece hareketi kısıtlanmıştır. Jel kafesin geçirgenliği enzim veya hücrelerin kaçışını önleyecek, ancak aynı zamanda substrat ve ürünün serbest hareketine izin verecek kadar sıkı bir yapı oluşturularak kontrol edilir.

Polimerizasyon ve çapraz bağlanmanın olduğu ortamda enzim de bulunduğu takdirde enzim çapraz bağlama sonucu oluşan odacıklarda (kafes) tutuklanmaktadır. Kolay uygulanması, gerçek bir fiziksel yöntem oluşu ve çok az enzimle gerçekleştirilmesi yöntemin avantajlarıdır. İmmobilizasyon işlemi sırasında inaktivasyonun deney koşullarına çok bağlı oluşu yöntemin sakıncalarıdır.

Tutuklamanın birkaç temel metodu vardır:

1. Çok değerlikli katyonlarla makro moleküllerin iyonotropik değişmesi (örneğin, alginat jel).
2. Sıcaklıkla indüklenmiş jelleşme (örneğin, jelatin, agaroz jel)
3. Kimyasal/fotokimyasal reaksiyon ile organik polimerleşme (örneğin, poliakrilamid jel)
4. Karışmayan bir çözücünden çöktürme (örneğin, polistren)

Tutuklama poliyonik polimer materyali ile enzimin karıştırılmasına ve sonra enzim veya hücreleri tutuklayan kafes dokuyu oluşturmak üzere iyon değiştirici bir reaksiyonda multivalent katyonlarla polimerin çapraz bağlanmasıyla gerçekleştirilir (iyonotropik jelleşme).

Sıcaklık değişimi agaroz veya jelatinin % 1 - 4 'lük çözeltileri kullanılarak faz geçişi ile jelleşmenin basit bir metodudur. Bununla birlikte oluşan jeller yumuşak ve

kararsızdır. Bu alandaki önemli bir gelişme iyonotropik jelleşme ve sıcaklıkla indüklenmiş faz geçişi ile jeller oluşturabilen κ - karragenan polimerleri ile tanışılmasıdır. Böylece immobilizasyon için jel sistemlerde yüksek derecede esneklik söz konusu olmuştur.

Alternatif olarak çapraz bağlı polimerik bir ağ oluşturmak üzere polimerize olabilen kimyasal monomerlerle enzimi karıştırmak da mümkündür. Enzim örgünün iç boşluklarında tutuklanır. Bu metot oldukça yaygın olarak kullanılır. Çok sayıda akrilik monomerler hidrofilik kopolimerler oluşturmak için mevcuttur. Örneğin, akrilamid monomeri polikrilamid oluşturmak üzere polimerize edilir, metilakrilamid ise polimetakrilat oluşturmak üzere polimerize edilir. Polimer zincirleri arasında çapraz bağlar oluşturmak için; polimerizasyon sırasında monomere bir çapraz bağlama ajanı katılır. Bu madde üç boyutlu ağ yapının oluşturulmasına yardımcı olur. Jelin gözenek boyutu ve mekaniksel özellikleri monomer ve çapraz bağlama ajanınının relatif miktarları ile belirlenir. Bunların konsantrasyonları değiştirilerek kafesin yapısı düzenlenebilir. Oluşturulan polimerler istenilen boyutta parçalara ayrılır veya polimerizasyon istenilen boyutta boncuklar oluşturacak şekilde düzenlenebilir.

Çöktürme kimyasal reaksiyondan ziyade faz ayrılması ile oluşur ama su ile karışabilir bir organik çözücü ile temastaki hücre/enzimlerle yürütülür. Çoğu hücre/enzim böyle çözücülere toleranslı değildir bu nedenle bu metodun kullanımı yüksek derecede kararlı/ya da önceden stabilize edilmiş enzimler veya canlı olmayan hücrelerle sınırlıdır (Bickerstaff, 1997).

2.3.4.1. Kalsiyum Alginat Jelde Tutuklama

Enzimlerin ve/veya hücrelerin alginata tutuklanması immobilizasyonun en basit metotlarından biridir. Alginatlar, suda çözünür sodyum alginatlar olarak ticari formada mevcuttur. Gıda ve farmosötik endüstrilerinde kıvamlaştırıcı, emülsiyede edici, film oluşturucu ve jelleşme ajanı olarak altmış beş yıldan daha uzun zamandan beri kullanılmaktadır. Çözünmeyen kalsiyum alginat jelde tutuklama enzimlerin ve hücrelerin immobilizasyonu için hızlı, toksik ve pahalı olmayan ve çok yönlü bir metottur.

Alginik asit; deniz yosunlarından elde edilen bir poliüronik asittir. 1 - 4 bağılı β -D- mannuronik (M) ve α -L- guluronik asidin (G) farklı miktarlarından oluşur. G, M miktarları kaynağa göre değişir. Heteropolimerik bölgelerin (MG blokları) değişen bölgelerinin aralarına katılmış homopolimerik (MM blokları ve GG bloklar) bölgelerinden oluşmuş blok kalıplarında düzenlenir. İki değerli katyonların bağlanması ve jel oluşumu artık blokların kompozisyonlarına ve düzenlenmelerine bağlıdır. Özellikle jel dayanıklılığı G içeriği ile ilgilidir. Deniz yosunu kaynağına göre (G formu) % 20 - 75 arasında değişir GG blokları arasında Ca^{2+} gibi divalent katyonlar için seçimli bağlanma bölgeleri vardır ve bağlanmış iyonlar jel oluşumuna neden olan bağlanmaları oluşturmak üzere diğer GG blokları ile etkileşir.

Elde edilen jel biyokimyasal olarak inerttir ve hücre immobilizasyonu için uygun olan küçük ve dar boşluklar ile mekaniksel olarak kararlıdır. Jel boncuklardan sızıntı meydana gelebilir. Bunu başlangıç alginat konsantrasyonu, boncukların mekaniksel uygulaması, eğer bölünen hücreler immobilize edilmişse, hücre üretimini etkiler. Fiziksel çalkalama kolonda paketlenmiş boncuklardan daha fazla kaçışa neden olur. %2 lik kalsiyum alginat boncukların elektron mikroskopileri 5 - 200 nm çapında değişen gözenekler göstermiştir. Ca iyonlarını uzaklaştıran şelatlama ajanları ve Ca iyonları ile yerdeğiştirebilen başka iki değerli katyonlar kalsiyum alginatın kararlılığının bozulmasına neden olur. Fosfat, sitrat, EDTA ve Mg^{2+} 'dan kaçınılmalıdır.

Cu^{2+} ve Pb^{2+} gibi diğer divalent katyonlar alginat için yüksek affiniteye sahiptirler ve daha stabil jeller üretirler. Bununla birlikte bu iyonların hücre immobilizasyonu için sık kullanılırken, toksisite nedeniyle enzim immobilizasyonu için kullanımı sınırlıdır. Ba^{2+} katyonu maya hücrelerinin immobilizasyonu için, Cu^{2+} ise polifenoloksidaz immobilizasyonu için kullanılmaktadır. Ca- alginatın stabilizasyonu şelatlayıcı/iyon değiştiricilerden etkilenmeyen kimyasal maddelerle ilave çapraz bağlayıcılar yapılarak artırılabilir. Özellikle iyileştirilmiş sızıntı özelliklerine sahip daha kararlı ve düşük poroziteli kompleksler üretmek üzere alginat; çitosan, poliakrilamid, polivinilalkol, protein ve polietilen imin ile çapraz bağlanabilir (Fraser ve Bickerstaff, 1997).

2.3.4.2. Karragenan Jelde Tutuklama

κ -Karragenan deniz yosunlarından izole edilen ve doğal olarak meydana gelen bir polisakkarittir. β -D-galaktoz sülfat ve 3,6-anhidro- α -D-galaktoz birimlerinin tekrarlanmasıyla oluşmuş yüksek molekül ağırlıklı, toksik olmayan kolay elde edilebilir bir polimerdir. κ -Karragenan metal iyonları, aminler, amino asit türevleri ve suda çözünür organik çözücüler varlığında kolayca jele dönüşebilir (Dessai vd., 2004).

Jel tutuklama metotlarından biri olan karragenanda immobilizasyon; genellikle hücre immobilizasyonu için; ucuz, basit ve ılımlı koşullarda tekrarlanabilir olması nedeniyle yaygın olarak kullanılan metotlardan biridir. Yüksek hücre yoğunluğu, ılımlı immobilizasyon koşulları, destekten hücrelerin sızıntısının düşük riski tutuklama metodunun en önemli avantajlarından biridir. Karragenana immobilizasyon alginat immobilizasyonuna benzerdir. Jel tutuklamasının prensibi biyokatalizörün prejel çözeltisi ile karıştırılması ve jelleşme sonrasında biyokatalizörün jel materyalince çevresinin sarılmasıdır. Sağlam jeller oluşturmak için konsantrasyon yeterli olmak zorundadır. Karragenan konsantrasyonu kullanılan karragenanın tipine bağlıdır. Biyokatalizör ve karragenan çözeltisinin karışımı bir vana yardımıyla (çekme metodu) veya bir şırınga vasıtasıyla (damlatma metodu) ile çekilir veya sıvıda ya da havada yayılır (dispersiyon metodu). İmmobilize edilmiş biyokatalizörün değişik şekilleri (küp, boncuk veya membran) özel uygulamalar için şekillendirilir. Örneğin küresel boncuklar yatak reaktörlerinde iyi akış özelliği gösterir. Karragenanın jelleşmesi; K^+ gibi genellikle katyon karakterli jel indükleme ajanlarının varlığında çözelti uygun jelleşme sıcaklığına soğutulduğunda gerçekleşir. İmmobilize hücrelerin enzim aktiviteleri ve verimleri genellikle nispeten yüksektir. Jel oluşumu termal olarak tersinirdir, yüksek sıcaklıklarda jeller yumuşayabilirler veya parçalanabilirler. Örneğin termofilik mikroorganizmaların iş yaptığı yüksek sıcaklık reaksiyonlarını içeren uygulamalarda yeterince uygun değildir. Karragenan jelin diğer bir dezavantajı reaksiyon karışımında jel indükleme maddesi olmadığında jel çözülmesi meydana gelir ve biyokatalizör serbest kalır, ayrıca jel indükleme maddesi istenen enzim aktivitesini inhibe edebilir (Iborra vd., 1997).

İmmobilizasyonun damlatma metodu laboratuvar uygulamalarında boncuk oluşumu için en basit prosedürdür. Hücre immobilizasyonu için rutin olarak

kullanılmaktadır. Sulu jel çözeltisi bir şırıngayla düşük akış hızında basılır, iğnenin ucunda damlalar oluşur. Daha uniform boyutlu damlalar iğnenin çevresine hava akımı uygulandığında elde edilebilir. Bu prosedürde büyük miktarda hücre homojen olarak karragenan jele immobilize edilir. Hücreler büyüme, dinlenme veya otolizlenmiş durumda olabilir. Jel matriksin gözenek boyutu jel kafesten enzimlerin kaçışını önleyecek kadar küçük, ama substrat ve ürünlerin jel duvarını kolaylıkla geçmelerine izin verecek boyutta olmalıdır.

Büyük skalalı jel boncuk üretimi iki temel prosedürle başılır. Bunlar, çekme metodu ve dispersiyon metodudur. Çekme tekniğinde sulu jel çözelti, küçük bir vana ile yüksek akış hızında basılır. Bir membranla belirli frekansın sinusoidal vibrasyonu sıvıya transfer edilir. Bu sinyal uniform damlacıklarda fişkırmının sona ermesine neden olur. Damlatma metodu ile karşılaştırıldığında akış hızının yüz katı kadar artış elde edilebilir. Böylece daha küçük immobilize biyokatalizör üretimi gerçekleşir ve diğer bir yararı da uniform damlacıkların üretimidir. Dispersiyon metodunda; sulu κ - karragenan çözeltisi soya yağında dağıtılır. Sıcaklık düşürülerek sertleştirilir ve potasyum klorürde boncuklar ıslatılır. Dispersiyon metodu ile elde edilen damlacık oluşumu ve boyuttaki uniformluluğun tekrarlanabilirliği çekme tekniğinkinden önemli ölçüde daha düşüktür (Iborra vd., 1997).

2.4. Polifenol Oksidaz ile Gerçekleştirilen İmmobilizasyon Çalışmaları

Polifenol oksidazın (tirozinaz) kullanımı ile ilgili çeşitli immobilizasyon çalışmaları yapılmakta olup bu araştırmalar gelecek vadetmektedir. Bu araştırmalardan bazıları; L- DOPA üretimi, endüstriyel atık suların fenol ve aromatik amin gibi zehirli kimyasallarca zehirsizleştirilmesinde (defenolizasyon), fenol ve türevlerinin tayini için biyosensörlerde bir bileşen olarak kullanımı, kirlenmiş toprakların biyoyiyileştirilmesi, meyve sularının berraklaştırılmasıdır. Bu nedenle polifenol oksidaz endüstriyel olarak önemli bir biyomoleküldür.

L- DOPA (3,4-dihidroksifenilalanin) 1967 yılından beri Parkinson hastalığının tedavisinde yaygın olarak tercih edilen ilaçtır. Parkinson hastalığı nörolojik bir hastalıktır, beyin hücrelerinin kaybı nedeniyle titreme, bükülmezlik ve konuşma yavaşlığı ve nihayetinde bunama belirtileri ile karakterize edilir. Bu hastalık

nörotransmitter dopamin eksikliği nedeniyle olur. L- DOPA dopaminin öncülüdür ve kan beyin bariyerinden geçebilir. Şu anda Knowles tarafından ticari skalada kimyasal olarak L- DOPA üretilmektedir.

Yüksek üretim maliyeti ve yüksek ticari değeri nedeniyle çoğu araştırmacı bu ilacın alternatif üretimini araştırmaktadır. Fava fasulyesi gibi bazı fasulye türlerinin veya bitki hücrelerinin çeşitli matrikslere tutuklanması L- DOPA üretimi için kullanılmaktadır. Son araştırmalar *Erwinia herbicola* ve *Escherichia coli* 'den L- DOPA 'nın mikrobiyal üretimi üzerinde merkezlenmiştir. Bununla birlikte, L- DOPA 'nın mikrobiyolojik üretimi mikroorganizma hücreleri tarafından üretilen başka protein ve hormonların uzaklaştırılması nedeniyle pahalı olabilir. Bu nedenle diğer alternatif yöntem immobilize polifenol oksidaz (tirozinaz) ile L- Tirozin 'den L- DOPA 'nın üretimidir. Polifenol oksidazın pahalı bir enzim olması nedeniyle; enzimin olası yeniden kullanılabilirliğini sağlamak için enzimin immobilizasyonu zahmete değerlidir (Vilanova vd., 1984, Pialis vd., 1996, Carvalho vd., 2000, Seetharam ve Saville, 2002, Ho vd., 2003, Ateş vd., 2006).



İçme suları ve endüstriyel atık sulardan toksik kimyasalların uzaklaştırılmasında enzimatik yaklaşım son yıllarda oldukça fazla ilgi çekmektedir. Peroksidaz, lakkaz ve tirozinaz gibi polifenol oksidaz enzim ailesinin üyeleri bu amaçla araştırılmaktadır. Sularda renk kirliliğine sebep olan ve memelilerle balıklar için toksik olan fenolik endüstriyel atıklar, kağıt, kömür, petrokimya, boya ve tekstil endüstrilerince üretilmektedir. Farklı taşıyıcılara immobilize edilmiş mantar tirozinazı, fenollerin ve aromatik aminlerin sulardan uzaklaştırılması ve fenolik kirleticilerin dekolorizasyonu amacıyla çeşitli araştırmalarda kullanılmıştır (Wada vd., 1992, Wada vd., 1993).

İmmobilize polifenol oksidazların araştırıldığı çalışmaların bir kısmı biyosensör teknolojisi ile ilgilidir. Polifenol oksidaz enzimleri ile klinik açıdan önem arzeden kateşolaminlerin belirlenmesinde, kırmızı şaraplarda fenolik maddelerin tayin

edilmesinde kullanılmak üzere biyosensörler dizayn edilmiştir (Mazzei vd., 1992, Yıldız vd., 2005, Yıldız vd., 2006).

Polifenol oksidazın çeşitli immobilizasyon metotları literatürde rapor edilmektedir: Fiziksel adsorbsiyon, kovalent, çapraz bağlama, polimer filmlerde immobilizasyon, polimerlerde ve bazı jel matrislerde tutuklama gibi. Bununla beraber, bu metotların bazıları tirozinazın biyoaktivitesinin ve kararlılığının korunmasında zayıftır ve başarıyla kullanımları oldukça zordur. Polifenol oksidaz için basit ve güvenilir bir immobilizasyon uygulamasının belirlenmesi araştırmacılar için bir ilgi alanı olmaktadır.

Literatürde yer alan immobilizasyon çalışmalarında; değişik kaynaklardan izole edilmiş polifenol oksidazlar, farklı immobilizasyon teknikleri kullanılarak çeşitli desteklere immobilize edilmişlerdir.

Sarkar vd. (1989) mantar tirozinazını bentonit ve kaolinite; Estrada vd. (1991) mantar polifenol oksidazını cam boncuklara, zeolit ve sepiolite; yine Burton vd. (1993) taze mantar polifenol oksidazını gözenekli olmayan cam boncuklara, Batra vd. (1994) patates polifenol oksidazını kitine, Payne vd. (1992) mantar tirozinazını kitosana, Buttersack vd. (1994) şeker pancarından izole ettikleri polifenol oksidazı kile (Na-bentonit), Naidja vd. (1997) tirozinazı alüminyum hidroksitle kaplanmış kile adsorbsiyon yöntemi ile immobilize etmişlerdir.

Pialis vd. (1996) mantar tirozinazını kimyasal olarak modifiye edilmiş naylon 6,6 membranlara, Ho vd. (2003) mantar tirozinazını modifiye edilmiş poli stiren-poli amino stiren ve polimetilklorür stirene, Vilanova vd. (1984) kurbağa epidermis tirozinazını enzakril-AA ve CPG-AA 'ya, Seetharam ve Saville (2002) mantar tirozinazını kimyasal olarak modifiye edilmiş iki farklı zeolit türü olan sodyum alümina silikat ve kalsiyum alümina silikata, Carvalho vd. (2000) mantar tirozinazını hekza metilen diamin ve glutar aldehit ile aktive edilmiş kitin pulcuklarına ve glutaraldehit, polivinilprolidon varlığında kitosan pulcuklarına immobilize etmişler ve bu immobilize enzimler katalizörlüğünde L- DOPA üretimini araştırmışlardır.

Schiller ve Liu (1976) tirozinazı poliakrilamid jellerde, Munjal ve Sawhney (2002) mantar tirozinazını alginat, poliakrilamid ve jelatin jellerde, Ateş vd. (2006) mantar tirozinazını Cu- alginat jellerde tutuklamışlardır. Yahşi vd. (2005) mantar tirozinazının kalsiyum alginat ve poli(akrilamid-ko-akrilikasit) kullanarak binary immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir.

Smith, vd. (1990) *Nocardia* polifenol oksidazını CNBr ile aktive edilmiş agaroz; Manjon, vd. (1984) kurbağa epidermis tirozinazını CNBr ile aktive edilmiş sepharoz 4B 'ye kovalent bağlama yoluyla immobilize etmişlerdir.

Wada, vd. (1993) mantar tirozinazını Diaion WK-20 isimli zayıf asidik katyon değiştirici reçineye iyonik bağlama yoluyla immobilize etmişlerdir.

2.5. Polifenol Oksidaz Kaynağı Olarak Enginar

Enginar (*Cynara scolymus* L.) Akdeniz diyetinde yaygın olarak tüketilen bir sebzedir. Enginar tarımı çoğunluklu Avrupa ve Amerika kıtalarında yapılır. Enginarın baş kısmı bu sebzenin yenilebilir kısmını oluşturur. Enginar sadece iyi bir besin maddesi olmayıp, ilginç ve çok kullanılan bitkisel bir ilaç olarak da kabul edilir ve halk ilacı olarak da kullanılır. Enginar kafeik asit, mono ve di-kafeoil kuinik asit (örneğin sinarin) ve klorojenik asit gibi fenolik asitlerce zengin bir bitkidir. Bu bileşikler safra arttırıcı, kolesterol düşürücü, karaciğer koruyucu, antikarsinogenik ve antioksidan özellikleri taşırlar (Pierluigi ve Piergiorgio, 2000, Schütz vd.2006).



Şekil 2.2 Polifenoloksidaz kaynağı enginar

Enginardan polifenol oksidaz izolasyonu, saflaştırması ve karakterizasyonları ile ilgili çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda; enginar başının polifenol oksidazın hem krezolaz hem de kateşolaz aktivitelerini yüksek oranda gösterdiği belirlenmiştir (Leoni vd., 1990, Lattanzio vd., 1994, Espin vd., 1997, López-Molina vd., 2003, Aydemir, 2004, Doğan vd., 2005, Leventer, 2005).

Enginar polifenol oksidazının saflaştırması ve karakterizasyonları ile ilgili bu çalışmalar yapılmış olmasına rağmen, enginar polifenol oksidazının immobilizasyonu ile ilgili literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu tez kapsamında; enginar başından polifenol oksidaz enzimi izole edilmiş, ilk kez alginat, karragenan ve alginat + karragenan boncuklara tutuklama yöntemiyle immobilizasyonları gerçekleştirilmiştir. Her iki polimerde tutuklanmış enginar polifenol oksidazının hem krezolaz hem kateşolaz aktivitelerini gösterdiği belirlenmiş, immobilize enzimlere ait optimum pH ve sıcaklık, K_m ve V_{max} kinetik sabitleri, termal kararlılık, yeniden kullanılabilirlik ve depo kararlılığı gibi bazı biyokimyasal özellikleri araştırılmıştır.

3. MATERYAL VE METOTLAR

3.1. MATERYALLER

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneysel çalışmada aşağıdaki kimyasal maddeler kullanıldı. Kullanılan kimyasallar analitik saflıktadır.

Sodyum alginat (Fluka)
κ-Karragenan (Fluka)
Gluter aldehit (Merk)
Kalsiyum klorür (Merck)
Bakır (II) klorür (Merck)
Potasyum klorür (Merck)
Askorbik asit (Merck)
Polivinilpirolidon-PVP (Sigma)
Triton X-100 (Sigma)
Amonyum sülfat (Merck)
Dializ membranı (Sigma)
Kateşol (Merck)
L- DOPA (Sigma)
Tirozin (Fluka)
Sığır serum albümini-BSA (Sigma)
Bakır sülfat $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merk)
Sodyum potasyum tartarat (Merck)
Sodyum karbonat (Merck)
Folin reaktifi (Sigma)
Sodyum hidroksid (Merck)
Hidroklorik asit % 37 (Merck)
Sodyum molibdat (Merk)
Sodyum nitrit (Merk)

Borik asit (Merck)
Asetik asit %100 (Merck)
Tris (Sigma)
Maleik anhidrit (Sigma)
Glisin (Merck)

3.1.2. Kullanılan Aletler

Blender (ev tipi)
pH-metre Jenway 3010; Aynı marka Ag/AgCl elektrodu
Soğutmalı santrifüj (Heraeus/Biofuge Stratos)
UV Spektrofotometre; Shimadzu UV-160 A
Etüv; Elektromag marka (100 °C termostatlı)
Vortex; Fisons Whirli Mixer
Çalkalayıcı; Clifton marka (100-400 rpm; 0-100 °C termostatlı)
Terazi; Gec avery marka
Derin Dondurucu; Sanio Medical Freezer (-20↔-40 °C)
Isıtıcı ve manyetik karıştırıcı; Chiltern ve Kermanlar (0-100 °C aralığında ısıtıcı ve manyetik karıştırıcı)
Buzdolabı (ev tipi)
Termostat (Grant W14)
Su banyosu (Clifton)

3.1.3. Hazırlanan Çözeltiler

Deneyisel çalışmalarda kullanılmak üzere aşağıdaki çözeltiler hazırlandı. Çözeltilerin hazırlanması distile su ve çalışma tamponları ile yapıldı.

Tirozin çözeltisi (Suda 2.5 mM)

Askorbik asit (Suda 2.5 mM)

Hidroklorik asit çözeltisi (Suda 2 M)

Sodyum hidroksit çözeltisi (Suda 2 M)

Sodyum nitrit çözeltisi (Suda % 15 'lik)

Sodyum molibdat çözeltisi (Suda % 15 'lik)

Sodyum karbonat çözeltisi (0.1 N NaOH çözeltisinde % 2 'lik)

Bakır sülfat çözeltisi (Suda % 1 'lik)

Sodyum potasyum tartarat çözeltisi (Suda % 2 'lik)

Alkali bakır çözeltisi: 1 mL %1 'lik $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve 1 mL % 2 'lik sodyum potasyum tartarat çözeltilerinin 1:1 karışımından 1 mL alınarak 0.1 N NaOH 'te % 2 'lik olarak hazırlanmış Na_2CO_3 çözeltisinin 50 mL si ile karıştırıldı. Çözelti her deneme için taze olarak hazırlandı.

Folin-Ciocalteu-Fenol reaktifi: Denemelerimizde ticari olarak satılan Folin-Ciocalteu-Fenol reaktifi (2 N) kullanıldı.

Kateşol çözeltisi (0.02 M malat tamponunda)

L-DOPA çözeltisi (0.1 M asetat tamponunda 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 ve 0.4 mM)

Stok protein çözeltisi: Sığır serum albümini (suda %0.1 'lik)

Bakır (II) klorür çözeltisi (Suda 1 mM ve 2 mM)

Tris-HCl tamponu (pH 7.0)

Glisin-HCl tamponu (pH 2.0, 3.0)

Asetat tamponu (pH 4.0, 5.0)

Malat tamponu (pH 6.0, 7.0)

Borat Tamponu (pH 8.0, 9.0)

3.2. METOTLAR

3.2.1. Protein Tayini

Çalışmada enginardan polifenol oksidaz izolasyonu, tuz çöktürmesi ve dializ işlemleri sırasında tüm basamaklarda ve ayrıca enginar polifenol oksidazının tutuklanması sırasında immobilize enzimin damlatıldığı CuCl_2 , CaCl_2 ve KCl çözeltilerinde ve yıkama sularında protein tayinleri Lowry Yöntemiyle yapıldı.

3.2.1.1. Lowry Yöntemi ile Kantitatif Protein Tayini

Protein tayininde en yaygın kullanılan metot Folin-Lowry yöntemidir. Metot alkali koşullar altında Biüre reaksiyonu ve aromatik aminoasitlerin bakır katalizli oksidasyonundan sonra fosfomolibdikfosfotungstik asit ile heteropolimolibden mavisine indirgenmeyi içeren Folin-Ciocalteu reaksiyonunun bir kombinasyonudur. Koyu mavi renk oluşumu karakteristiktir. Yöntem çok duyarlıdır (0.10 - 1 mg protein/mL) ancak pH'a bağımlıdır (pH 10.0 - 10.5). Bu nedenle uygun bir pH 'ın sağlanabilmesi için Folin-Ciocalteu reaktifinin seyreltilmesi gerekir. Lowry yöntemine amino asit kompozisyonunun etkisi orta düzeydedir. Ancak amino asitler, amino türevleri, tamponlar, deterjanlar, ilaçlar, lipitler, şekerler, nükleik asitler ve sülfhidril reaktifleri önemli derecede girişim etkisine yol açarlar. Yöntemin yüksek duyarlılığı analizlenecek örneğin seyreltilmesi yoluyla bu girişim etkilerinin giderilmesine imkan verir.

Yöntemde kullanılacak standart eğrinin yüksek konsantrasyonlarda lineer olmaması bir dezavantajdır. Cam ya da polistiren küvetler kullanılarak 500-750 nm 'de absorbans okuması yapılır (Dinçkaya, 1996).

Enzim çözeltilerimizin protein içeriği Lowry Yöntemi ile belirlendi (Lowry, vd. 1951). Bu amaçla öncelikle standart protein çözeltileri hazırlandı. Şahit numune olarak 0.5 mL distile su kullanıldı. Stok protein çözeltisi kullanılarak 0.5 mL de 25, 50, 100, 150, 200, 250 mg protein (sığır serum albumini) içeren çözeltiler hazırlandı.

Hazırlanan standart protein çözeltilerine ve izolasyonda elde edilen ve protein tayini yapılacak tüm çözeltilere ve yıkama sularına 3 mL alkali bakır çözeltisi eklenip çalkalandı. 10 dakika beklendi. Sonra her bir çözeltiye 0.1 mL Folin reaktifi eklendi, vorteksle iyice çalkalandı. 30 dakika sonra 500 nm 'de şahit numuneye karşı absorbansları okundu. Standart protein çözeltilerinin absorbans değerleri ile konsantrasyonları arasında grafik hazırlandı. Bu standart grafik yardımıyla, protein konsantrasyonu bilinmeyen protein örneklerinin absorbans değerlerinden protein miktarları belirlendi.

3.2.2. Enzimatik Aktivite Tayinleri

3.2.2.1. Krezolaz Aktivite Tayini

Taze enginardan % 90 'lık amonyum sülfat çöktürmesi ve dializ ile izole edilen polifenol oksidaz enziminin krezolaz aktivitesi, spektrofotometrik olarak tayin edildi. 0.05 mL enzim çözeltisi üzerine 5 mL 2.5 mM tirozin (0.1 N Tris-HCl tamponda hazırlanmış, pH 7.0) ve 5 mL 2.5 mM askorbik asit (0.1 N Tris-HCl tamponda hazırlanmış, pH 7.0) ilave edildi. Optimum sıcaklıkta 30 dakika inkübasyondan sonra reaksiyon 1 mL 2M HCl ile durduruldu. Üzerine 1 mL 2 M NaOH, 1 mL % 15 'lik $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 mL % 15 'lik NaNO_3 ilave edildi. Bir saat sonra spektrofotometrede 460 nm 'de suya karşı absorbansları okundu (Ateş vd., 2006).

1 Enzim Ünitesi, 1 dakikada 1 μmol L-DOPA üreten enzim miktarı olarak tanımlandı.

3.2.2.2. Kateşolaz Aktivite Tayini

Taze enginardan % 90 'lık amonyum sülfat çöktürmesi ve dializ ile ekstrakte edilen polifenol oksidaz enziminin kateşolaz aktivitesi, spektrofotometrik olarak tayin edildi. 0.05 mL enzim çözeltisi, 0.02 M 2.95 mL kateşol çözeltisi (0.2 M malat tamponda hazırlanmış, pH 7.0) ile karıştırılarak spektrofotometrede 420 nm 'de zamana karşı absorbansları okundu. Şahit küveti sadece 3 mL 0.02 M substrat çözeltisi içermekteydi.

1 Enzim Ünitesi, örnek küvette bir dakikada absorbansta meydana gelen 0.001 'lik artış olarak tanımlandı (Park ve Luh., 1985).

Her iki enzim aktivitesi için hacimsel aktivite ve spesifik aktivite değerleri aşağıdaki formüllerle belirlendi:

$$\text{Hacimsel aktivite (U/mL)} = \text{Ünite} / \text{Enzim Hacmi (mL)}$$

$$\text{Spesifik Aktivite (U/mg)} = \text{Hacimsel Aktivite/mL deki mg protein miktarı}$$

3.2.3. Enginardan Polifenol Oksidaz Enziminin İzolasyonu

Taze enginarların yaprakları soyuldu ve sap kısımları çelik bir bıçak ile kesildi. Elde edilen 156 gr et kısmı küçük parçalar halinde doğrandı ve üzerine 312 mL Tris-HCl tamponu (0.1 N pH 7), 0.03 gr askorbik asit, 1.5 mL Triton X-100, 0.33 gr katı polivinilpirolidon (PVP) ilave edilerek birkaç dakika ev tipi blender ile homojenize edildi. Elde edilen homojenat, tülbent bez ve cam pamuğundan süzöldükten sonra soğutmalı santrifüjde 10000 rpm 'de, + 4°C 'de, 30 dakika santrifüjlendi. Bitki duvarlarını ve selülozik lifli kısmı içeren çökelti atıldı. Santrifüj sonrası elde edilen bu çözeltiler ham ekstrakt olarak isimlendirildi. (Galeazzi vd., 1981; Halim ve Montgomery, 1987; Park ve Luh, 1985). Ham ekstraktlara protein tayini ve enzimatik aktivite tayini yapıldı ve sonra tuz çöktürmesi basamağına geçildi.

3.2.4. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Ekstraksiyon sonrası elde edilen ham ekstrakta (307 mL) amonyum sülfat çöktürmesi uygulandı. 17.192 gr amonyum sülfat eklenerek % 10 'luk doyunluğa getirildi ve karıştırılarak bir süre soğukta bekletildi. Daha sonra 10000 rpm 'de + 4 °C 'de, 30 dakika santrifüjlendi. Elde edilen çökelek 0.1 N Tris-HCl tampona alındı, süzöntü (298 mL) bu kez 176.416 gr amonyum sülfat ile % 90 'lık doyunluğa getirildi ve tekrar santrifüjlendi.

Ham ekstrakt, % 10 'luk ve % 90 'lık çöktürme yapılan protein çözeltilerinde protein tayini ile enzimatik aktivite tayini yapıldı. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi sonrası elde edilen fraksiyonlarda yüksek enzimatik aktiviteler gözlemlendiği için aynı tamponla beş kat seyreltme yapılarak kullanıldı.

3.2.5. Dializ

Elde edilen amonyum sülfatla çöktürülmüş çözeltiler beş kat seyreltikten sonra dializ membranına konuldu. Çözeltiler, çalışma tamponuna karşı (0.1 N Tris-HCl tamponu, pH 7.0) tampon üç defa değiştirilmek suretiyle bir gece dializlendi. Dializ işlemi magnetik karıştırıcı üzerinde buzdolabında (+ 4 °C) gerçekleştirildi (Park ve Luh, 1985).

3.2.6. Alginat Jelde Tutuklama

5 mL dializlenmiş ve 1/5 oranında seyreltilmiş enzim çözeltisi, 0.1 gr olarak tartılan sodyum alginata yavaş yavaş ilave edilerek hassas bir şekilde alginat tamamen çözününceye kadar karıştırıldı. Oluşan kabarcıkların giderilmesi için bir saat buz banyosunda bekletildi. Enjektör yardımıyla buz içerisine oturtulmuş % 2 'lik CuCl_2 çözeltisine damlatıldı (Palmieri vd., 1994). İki saat buzdolabında bekletildi ve sonra süzülerek distile suyla yıkandı. Süzüntü ve yıkama suyu atılmayıp protein tayini için saklandı. İmmobilize tirozinaz, üzerini örtecek kadar tampon (0.1 N Tris-HCl tampon, pH 7.0) ilave edilerek aktivite tayini için saklandı.

3.2.7. Karragenan Jelde Tutuklama

0.10 gr olarak tartılan κ -karragenan önce 1 mL distile suda 50 °C 'de çözüldü. Sonra 5 mL dializlenmiş ve 1/5 oranında seyreltilmiş enzim çözeltisi, yavaş yavaş ilave edilerek hassas bir şekilde karragenan tamamen çözünene kadar karıştırıldı. Enjektör yardımıyla buz içerisine oturtulmuş % 2 'lik KCl çözeltisine damlatıldı. İki saat buzdolabında bekletildi ve sonra süzülerek distile suyla yıkandı. Süzüntü ve yıkama

suyu atılmayıp protein tayini için saklandı. İmmobilize tirozinaz, üzerini örtecek kadar tampon (0.1 N Tris-HCl tampon, pH 7.0) ilave edilerek aktivite tayini için saklandı (Hamarat Baysal ve Karagöz, 2005).

3.2.8. Karragenan + Alginat Jelde Tutuklama

Enginar polifenol oksidazının alginat ve karragenan jel karışımında immobilizasyonu Şahin'in metoduna göre yapıldı (Şahin vd., 2005). Bu amaçla, 0.10 gr olarak tartılan κ -karragenan önce 1 mL distile suda 50 °C 'de çözüldü. Sonra 0.10 gr olarak tartılan alginat ilave edilerek çözüldü. 5 mL dializlenmiş ve 1/5 oranında seyreltilmiş enzim çözeltisi, yavaş yavaş ilave edilerek hassas bir şekilde bu karragenan-alginat karışımına ilave edildi. Enjektör yardımıyla buz içerisine oturtulmuş % 2 'lik KCl + CuCl₂ çözeltisine damlatıldı. İki saat buzdolabında bekletildi ve sonra süzülerek distile suyla yıkandı. Süzüntü ve yıkama suları atılmayıp protein tayini için saklandı. İmmobilize tirozinaz, üzerini örtecek kadar tampon (0.1 N Tris-HCl tampon, pH 7.0) ilave edilerek aktivite tayini için saklandı.

3.2.9. İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

3.2.9.1. Damlatma Çözeltisinin Belirlenmesi

0.1 gr sodyumalginat 1/5 oranında seyreltilmiş 5 mL enzim çözeltisinde çözüldü, kabarcıklarının giderilmesi için bir saat kadar buzda bekletildi. Bir enjektör yardımıyla buza oturtulmuş olan bir beher içerisindeki 50 mL % 2 'lik CaCl₂ çözeltisine damlatıldı. Damlatma çözeltisi olarak % 2 'lik CuCl₂ kullanılmak üzere aynı işlem tekrarlandı. Çözelti içindeki immobilize boncuklar iki saat buzdolabında bekletildikten sonra süzülerek distile suyla yıkandı. Süzüntü ve yıkama suyu protein tayini için saklandı. Boncukların krezolaz ve kateşolaz aktiviteleri belirlendi.

3.2.9.2. Alginat Konsantrasyonu Optimizasyonu

4 mL enzim çözeltisi için sırasıyla % 1, 2, 3 ve 4 'lük oranlarda olacak şekilde 0.04, 0.08, 0.12 ve 0.16 gr sodyum alginat tartıldı ve enzim çözeltisi içerisinde çözüldü. Gaz kabarcıklarının giderilmesi için bir saat kadar buzda bekletildi. Bir enjektör yardımıyla manyetik karıştırıcı üzerinde bulunan buz banyosu içindeki 50 mL % 2 'lik CuCl_2 çözeltisine damlatıldı. İmmobilize boncuklar iki saat buzdolabında bekletildikten sonra süzülerek distile suyla yıkandı. Süzüntü ve yıkama suyu protein tayini için saklandı. Boncukların krezolaz ve kateşolaz aktivitelerine bakıldı.

3.2.9.3. CuCl_2 Konsantrasyonu Optimizasyonu

Sırasıyla % 1, 2, 3 ve 4 konsantrasyonlarda olmak üzere CuCl_2 çözeltileri hazırlandı. 5 mL enzimde çözülen % 3 'lük 0.15 gr sodyum alginat jel bir saat buzda bekletildikten sonra tutuklanan enzim bir enjektör yardımıyla, manyetik karıştırıcı üzerinde bulunan buz banyosu içindeki % 1 lik CuCl_2 çözeltisine damlatıldı. Aynı işlem diğer CuCl_2 çözeltileri için de tekrarlandı. Farklı konsantrasyondaki CuCl_2 çözeltisine damlatılmış immobilize boncuklar iki saat buzdolabında bekletildikten sonra süzülerek distile suyla yıkandı. Süzüntü ve yıkama suyu protein tayini için saklandı. Boncuklarda ise krezolaz ve kateşolaz aktiviteleri belirlendi.

3.2.9.4. Enzim Miktarı Optimizasyonu

Dializat (D), 1/2 oranında seyreltilmiş dializat (1/2 D), 1/5 oranında seyreltilmiş dializat (1/5 D) ve 1/10 oranında seyreltilmiş dializat (1/10 D) olacak şekilde enzim çözeltileri hazırlandı. Her birinde % 3 'lük 0.15 gr sodyum alginat çözümlenerek bir saat buzda bekletildi. Tutuklanan enzim bir enjektör yardımıyla, manyetik karıştırıcı üzerinde bulunan buz banyosu içindeki % 2 'lik CuCl_2 çözeltisine damlatıldı. Farklı konsantrasyondaki enzim içeren immobilize boncuklar iki saat buzdolabında bekletildikten sonra süzülerek distile suyla yıkandı. Süzüntü ve yıkama suyu protein tayini için saklandı. Boncuklarda ise krezolaz ve kateşolaz aktiviteleri belirlendi.

3.2.9.5. Boncuk Boyutu Optimizasyonu

Boncuk boyutu optimizasyonu için; siyah enjektör ucu, yeşil enjektör ucu ve pastör pipeti kullanıldı. 0.15 gr sodyum alginat (% 3), 5 mL enzim çözeltisinde (1/5 D) çözüldü. Bir saat buzda bekletildikten sonra tutuklanan enzim siyah uçlu enjektör yardımıyla manyetik karıştırıcı üzerinde bulunan buz banyosu içindeki % 2 'lik CuCl_2 çözeltisine damlatıldı. Aynı işlem yeşil uçlu enjektör ve pastör pipeti ile de tekrarlandı. Farklı çaplardaki immobilize boncuklar iki saat buzdolabında bekletildikten sonra süzülerek distile suyla yıkandı. Süzüntü ve yıkama suyu protein tayini için saklandı. Elde edilen boncukların çapları bir kumpasla ölçüldü. Boncuklarda krezolaz ve kateşolaz aktiviteleri belirlendi.

3.2.9.6. Boncuk Miktarı Optimizasyonu

0.15 gr sodyum alginat 5 mL enzim çözeltisinde tutuklandı. Bir saat buzda bekletildikten sonra tutuklanan enzim yeşil uçlu enjektör yardımıyla manyetik karıştırıcı üzerinde bulunan buz banyosu içindeki % 2 'lik CuCl_2 çözeltisine damlatıldı. İmmobilize boncuklar iki saat buzdolabında bekletildikten sonra süzülerek distile suyla yıkandı. Süzüntü ve yıkama suyu protein tayini için saklandı. Aktivite tayinleri için 0.1, 0.2, 0.25 ve 0.5 gr boncuk kullanıldı.

3.2.10. Enginar Polifenoloksidaz Enziminin Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi

3.2.10.1. Optimum pH Çalışması

Serbest ve immobilize enginar polifenol oksidazının maksimum aktivite gösterdiği optimum pH değerlerini belirlemek amacı ile farklı pH tamponları kullanıldı. pH 2.0 ve 3.0 için glisin - HCl tamponu; pH 4.0 ve 5.0 için asetat tamponu, pH 6.0 ve 7.0 için malat tamponu; pH 8.0 ve 9.0 için borat tamponu kullanıldı. Kateşolaz aktivitesi için; substrat olarak yukarıdaki tamponlarda 0.02 M olarak hazırlanmış kateşol çözeltisi kullanıldı. Krezolaz aktivitesi için substrat olarak kullanılan 2.5 mM tirozin

çözeltileri adı geçen tamponlarda hazırlandı. Elde edilen değerlerden yararlanarak aktiviteler 3.2.2 'de anlatıldığı gibi hesaplandı.

3.2.10.2. Optimum Sıcaklık Çalışması

Serbest ve immobilize enginar polifenol oksidazının maksimum kateşolaz aktivitesi gösterdiği sıcaklığı belirlemek için substrat olarak 0.02 M kateşol çözeltisi kullanılarak 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 ve 70 °C 'de çalışıldı. Krezolaz aktivitesi için substrat olarak 2.5 mM tirozin çözeltisi kullanılarak 20, 30, 40, 50, 60, ve 70 °C 'de çalışıldı. Elde edilen değerlerden yararlanarak aktiviteler 3.2.2'de anlatıldığı gibi hesaplandı.

3.2.10.3. Termal Kararlılık Çalışması

Elde edilen enginar polifenol oksidazının termal kararlılığını belirlemek için; serbest enzim çözeltisi ve immobilize enzim ayrı ayrı 40, 50, 60 ve 70 °C sıcaklıklarda ısıtılarak 15 'er dakika aralıklarla 0., 15., 30., 45. ve 60. dakikalarda 0.2 M malat tamponunda (pH 7.0) hazırlanan 0.02 M kateşol substratına karşı kateşolaz aktiviteleri belirlendi. Aynı koşullarda asetat tamponunda (pH 4.0) 2.5 mM tirozin substratı kullanılarak krezolaz aktiviteleri de belirlendi.

3.2.10.4. K_m ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi

Enginar polifenol oksidazı için K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi amacıyla, kateşol substratı 0.2 M malat tamponunda (pH 7.0) 0.002, 0.004, 0.006, 0.008 ve 0.01 M 'lık olmak üzere beş farklı konsantrasyonda hazırlanarak kateşolaz aktivitesi için kullanıldı. Krezolaz aktivitesi için; substrat olarak tirozin 0.1 M asetat tamponunda (pH 4.0) 0.0010, 0.0025, 0.0050, 0.0075 ve 0.01 M 'lık beş farklı konsantrasyonda hazırlanarak aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlardan Lineweaver-Burk grafikleri yardımıyla K_m ve V_{max} sabitleri belirlendi.

3.2.10.5. İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanılabilirliği

Elde edilen immobilize enginar polifenol oksidazının yeniden kullanılabilirliğini belirlemek için; 1 gr boncuk tartıldı. Krezolaz aktivitesi için, 0.1 M asetat tamponunda (pH 4.0) 0.0025 M konsantrasyonda tirozin substratı hazırlandı. Kateşolaz aktivitesi için ise, 0.2 M malat tamponunda (pH 7.0) 0.02 M kateşol substratı hazırlanarak aktiviteleri ölçüldü.

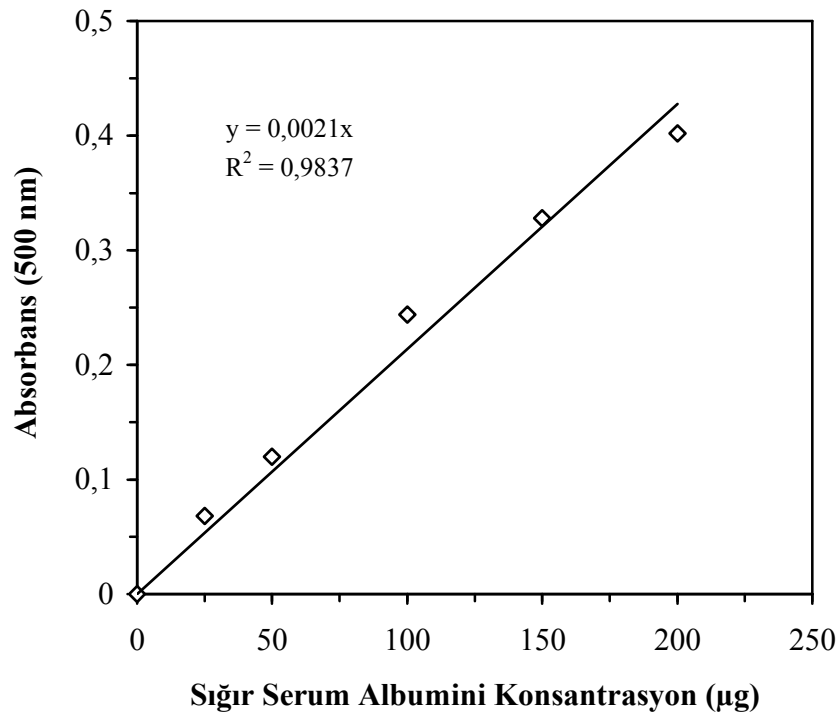
3.2.10.6. İmmobilize Enzimin Depo Kararlılığı

İmmobilize enginar polifenol oksidazının depo kararlılığını belirlemek amacıyla, üç gün aralıklarla serbest ve immobilize enzimin krezolaz ve kateşolaz aktiviteleri ölçüldü. Serbest enzim için 0.1 mL, immobilize boncuklar için 0.1 gr alınarak aktivite tayinleri optimum koşullarda gerçekleştirildi.

4. DENEYLER VE BULGULAR

4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri

Kantitatif protein tayini için Lowry Yöntemi kullanıldı. Protein standart grafiği Bölüm 3.2.1.1 açıklandığı gibi hazırlandı (Şekil 4.1). Ekstraksiyon sonrası elde edilen ham ekstrakt, tuz çöktürmesi ve dializ sonrası elde edilen dializat çözeltilerinin ve yıkama sularının protein miktarları bu standart grafikten belirlendi.



Şekil 4.1. Lowry yöntemine göre protein standart grafiği

4.2. Enginar Baş Kısmından Ham Ekstrakt Hazırlanması

Antalya-Gaziosmanpaşa'dan alınan enginarların baş kısımlarından Bölüm 3.2.3'de anlatıldığı gibi polifenol oksidaz enzimi izole edildi. Elde edilen homojenat, soğutmalı santrifüjde santrifüjlendikten sonra bitki duvarlarını ve selülozik lifli kısmı içeren çökelti atıldı. Santrifüj sonrası elde edilen süzöntü ham ekstrakt olarak saklandı.

4.3. Enginar Polifenol Oksidaz Enziminin Çöktürülmesi ve Dializ

Enginarın baş kısmının polifenol oksidaz enzimi, Bölüm 3.2.3 'de belirtildiği şekilde izole edildi. Elde edilen ham ekstrakta % 10-90 lık amonyum sülfat çöktürme işlemi Bölüm 3.2.4 'de anlatıldığı şekilde uygulandı. Elde edilen çöktürmeler 0.1 M Tris-HCl tamponunun küçük hacimleri ile (pH 7.0) çözüldükten sonra aynı tampona karşı bir gece 4 °C 'de dializ edildi (Bölüm 3.2.5.). Dializat beş kat seyreltilerek -20 °C 'de saklandı. Bu izolasyon sırasında elde edilen fraksiyonların protein ve enzim aktiviteleri Tablo 4.1 'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Enginar PFO 'sunun izolasyonu sırasında belirlenen protein içerikleri ve enzim aktiviteleri

	Toplam Protein (mg/ml)	Toplam Kateşolaz akt. (Ünite)	Toplam Krezolaz akt. (Ünite)	Spesifik Akt. Kateşolaz (U/mg protein)	Spesifik Akt. Krezolaz (U/mg protein)
Ham ekstrakt	1650	7368000	3684	4465.4	2.3
% 90 'lık tuz çöktürmesi dializatı	884.6	5645400	3362	6381.5	3.8

4.4. Enginar Polifenol Oksidazının Alginat, Karragenan ve Alginat Karragenan Jellerde Tutuklanması

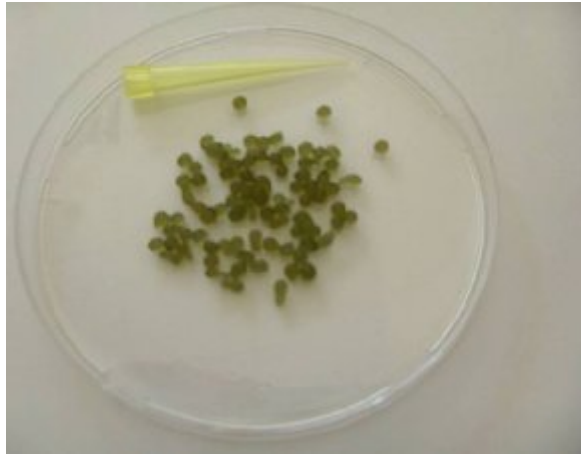
Enginardan izole edilen polifenol oksidaz enziminin alginat, karragenan ve alginat + karragenan jellerde tutuklanması Bölüm 3.2.6, Bölüm 3.2.7 ve Bölüm 3.2.8'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Gerçekleştirilen immobilizasyonların immobilizasyon yüzdeleri, krezolaz ve kateşolaz aktiviteleri Tablo 4.2 'de verilmiştir.



Şekil 4.2. Enginar PFO 'sunun alginat jelde tutuklanması ile elde edilen boncuklar
(Damlatma çözeltisi % 2 'lik CuCl_2)



Şekil 4.3. Enginar PFO 'sunun karragenan jelde tutuklanması ile elde edilen boncuklar
(Damlatma çözeltisi % 2 'lik KCl)



Şekil 4.4. Enginar PFO 'sunun alginat + karragenan jelde tutuklanması ile elde edilen
boncuklar (Damlatma çözeltisi % 2 'lik $\text{KCl} + \text{CuCl}_2$)

Tablo 4.2. Alginat, karragenan ve alginat + karragenan jellerde yapılan immobilizasyonların immobilizasyon yüzdeleri ve enzim aktiviteleri

	İmmobilizasyon yüzdesi	Kateşolaz akt. (U/gr boncuk dak)	Krezolaz akt. (U/gr boncuk dak)
Alginat jelde tutuklama	70	370	13.33
Karragenan jelde tutuklama	37	120	2.66
Alginat + karragenan jelde tutuklama	60	320	90

4.5. Enginar Polifenol Oksidazının Alginat Jelde İmmobilizasyonunun Optimizasyonu

4.5.1. Damlatma Çözeltisinin Belirlenmesi

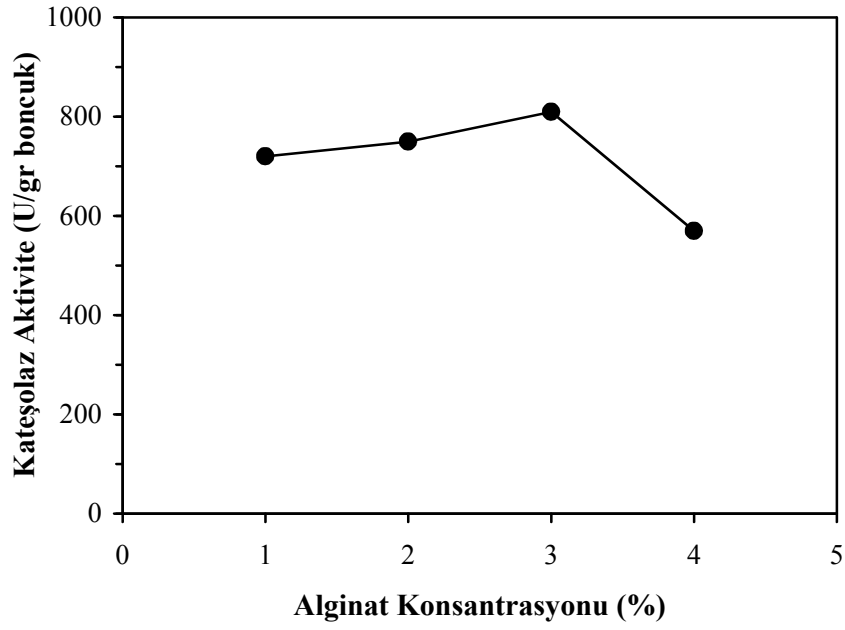
Enginar polifenol oksidazının alginat jelde immobilizasyonunda damlatma çözeltisinin belirlenmesi için; damlatma çözeltisi olarak % 2 'lik CaCl_2 ve % 2 'lik CuCl_2 kullanıldı. Tutuklama işlemi Bölüm 3.2.9.1 'de belirtildiği gibi yapıldı. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.3 'de verilmiştir.

Tablo 4.3. Enginar PFO 'sunun alginat jelde immobilizasyonunda damlatma çözeltisinin belirlenmesi

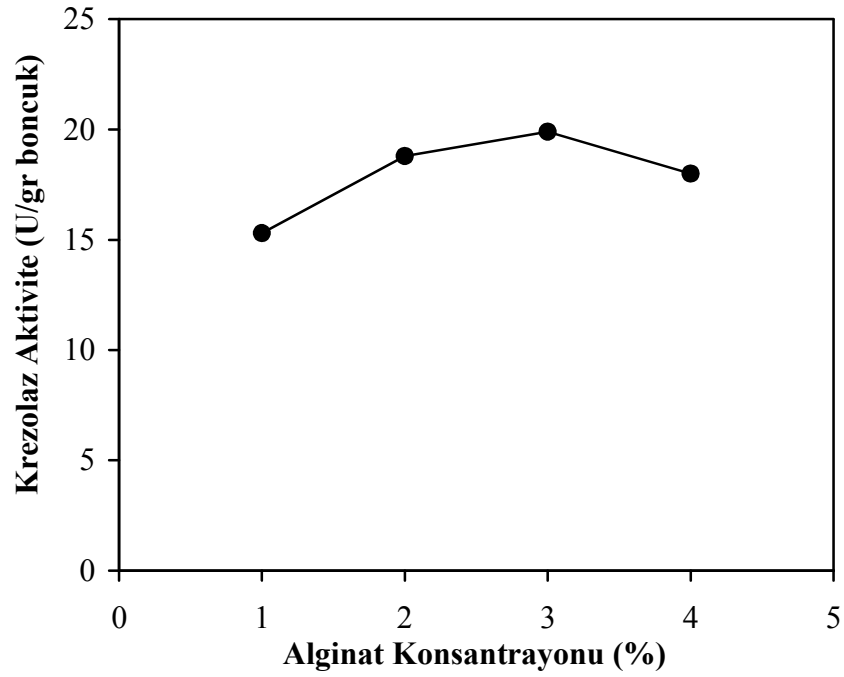
Damlatma çözeltisi	İmmobilizasyon yüzdesi	Kateşolaz akt. (U/gr boncuk dak)	Krezolaz akt. (U/ gr boncuk dak)
% 2 'lik CuCl_2	80	620	6.6
% 2 'lik CaCl_2	57	430	4

Tablo 4.3 'te görüldüğü gibi; alginat jelde gerçekleştirilen immobilizasyonlarda damlatma çözeltisi olarak CuCl_2 kullanıldığında hem immobilizasyon yüzdesi hem de enzim aktiviteleri daha yüksek bulundu. Bu nedenle bundan sonraki immobilizasyonlarda damlatma çözeltisi olarak CuCl_2 kullanılmasına karar verildi.

4.5.2. Alginat Konsantrasyonunun Optimizasyonu



Şekil 4.5. Kateşolaz aktivitesine alginat konsantrasyonunun etkisi



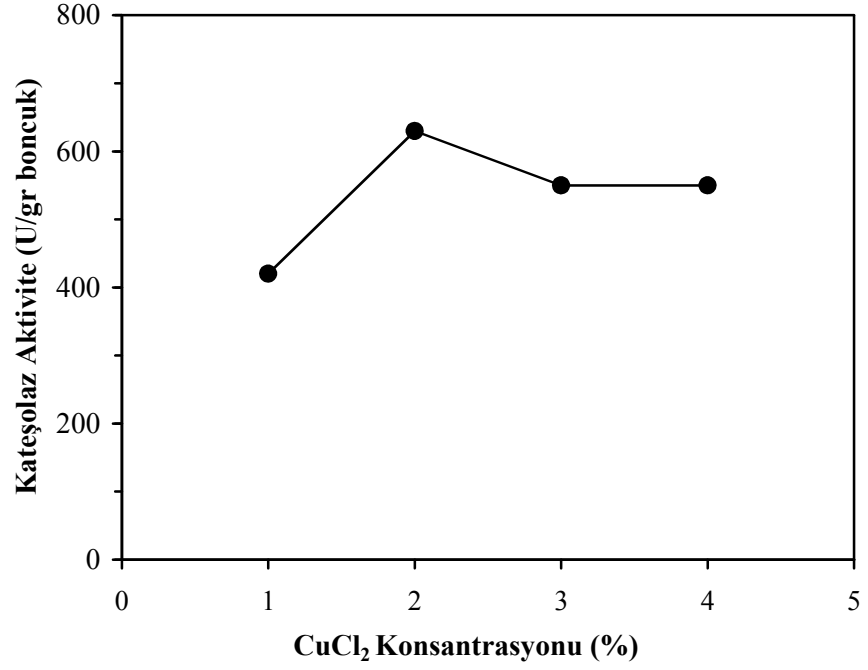
Şekil 4.6. Krezolaz aktivitesine alginat konsantrasyonunun etkisi

Enginar polifenol oksidazının alginat jelde immobilizasyonunda optimum alginat konsantrasyonunun belirlenmesi için; % 1, 2, 3 ve 4 'lük konsantrasyonlarda hazırlanan alginat jellerde immobilizasyonlar gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.5 ve 4.6 'de verilmiştir.

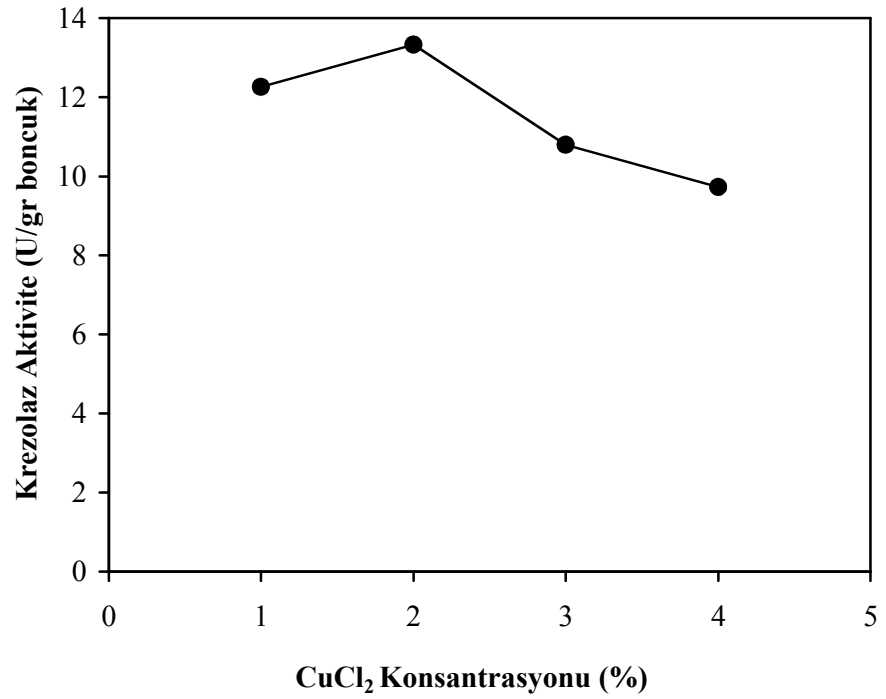
Yapılan protein tayini, krezolaz ve kateşolaz aktivite tayinlerinin sonuçları değerlendirildiğinde; en yüksek enzim aktiviteleri % 3 konsantrasyonluk alginat jel kullanıldığında gözlemlendi (Şekil 4.5 ve 4.6). Bundan sonraki immobilizasyonlarda alginat konsantrasyonunun % 3 olarak çalışılmasına karar verildi.

4.5.3. CuCl₂ Konsantrasyonu Optimizasyonu

Enginar polifenol oksidazının alginat jelde immobilizasyonunda optimum CuCl₂ konsantrasyonunun belirlenmesi için; % 1, 2, 3 ve 4 'lük konsantrasyonlarda hazırlanan damlatma çözeltilerinde immobilizasyonlar Bölüm 3.2.9.3 'de belirtildiği gibi gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.7 ve 4.8 'de verilmiştir. En yüksek enzim aktiviteleri % 2 konsantrasyonluk CuCl₂ damlatma çözeltisi olarak kullanıldığında belirlendi (Şekil 4.7 ve 4.8). Bundan sonraki immobilizasyonlarda CuCl₂ konsantrasyonu % 2 olarak çalışılmasına karar verildi.



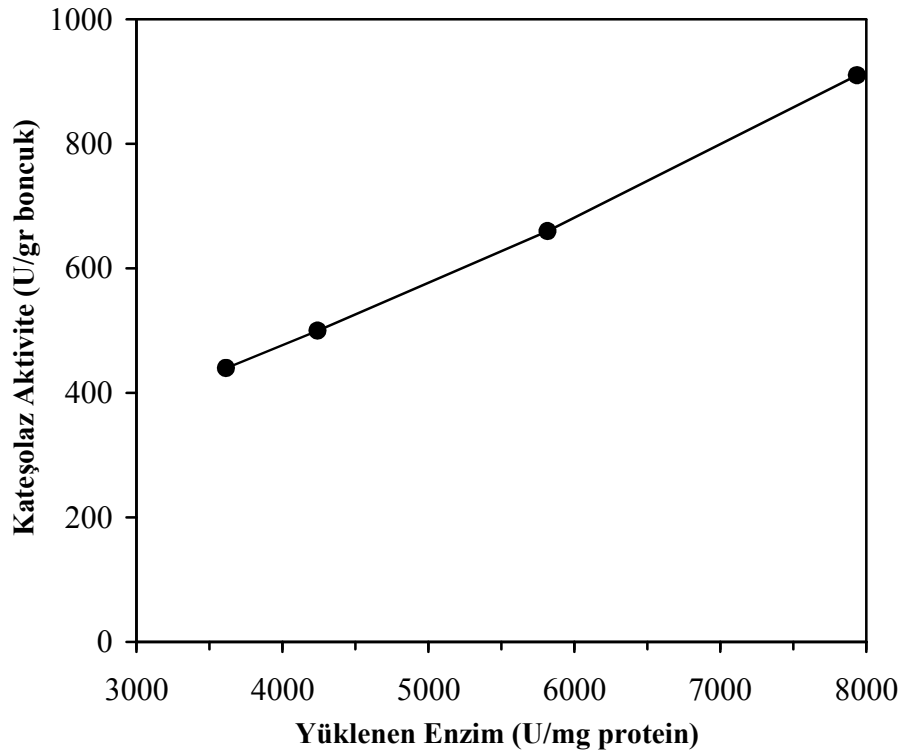
Şekil 4.7. Kateşolaz aktivitesine CuCl_2 konsantrasyonunun etkisi



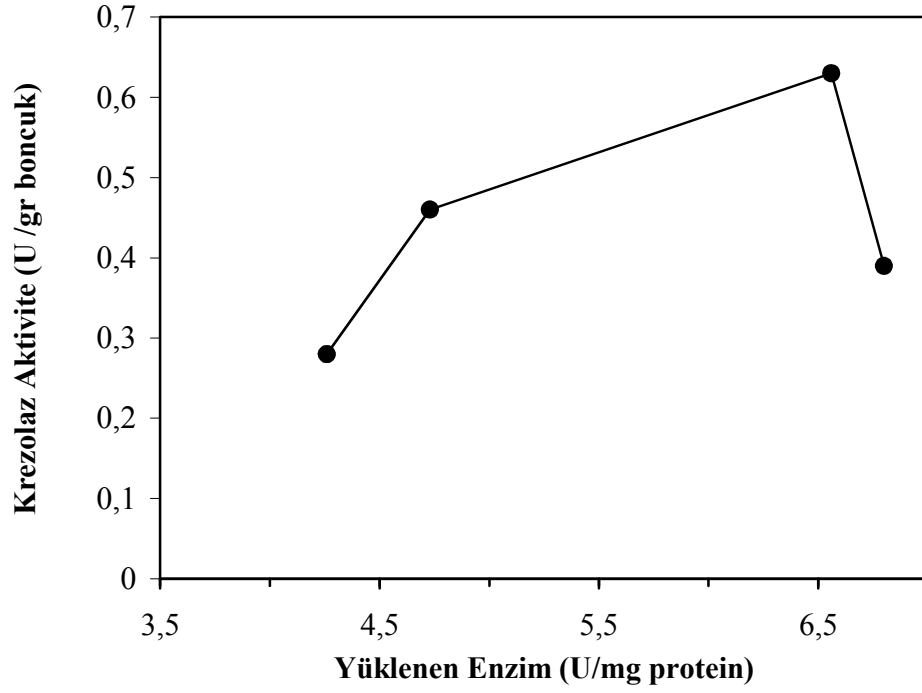
Şekil 4.8. Krezolaz aktivitesine CuCl_2 konsantrasyonunun etkisi

4.5.4. Enzim Miktarı Optimizasyonu

Dializat (D), 1/2 oranında seyreltilmiş dializat (1/2 D), 1/5 oranında seyreltilmiş dializat (1/5 D) ve 1/10 oranında seyreltilmiş dializat (1/10 D) olacak şekilde enzim çözeltileri kullanılarak immobilizasyonlar gerçekleştirildi. Elde edilen boncukların krezolaz ve kateşolaz aktiviteleri belirlenerek oluşturulan grafiklerde en uygun enzim miktarının kateşolaz aktivitesi için 1/10 D, krezolaz aktivitesi için 1/5 D olduğu gözlemlendi (Şekil 4.9 ve 4.10). Bundan sonraki çalışmalar ortak olacağı için 1/5 D ile devam edildi.



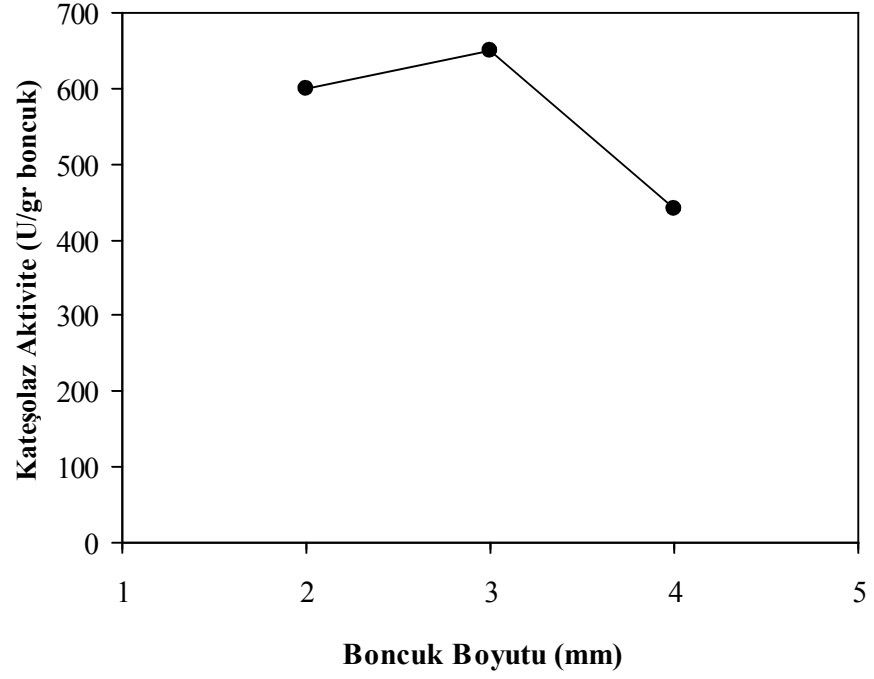
Şekil 4.9. Kateşolaz aktivitesine yüklenen enzim miktarının etkisi



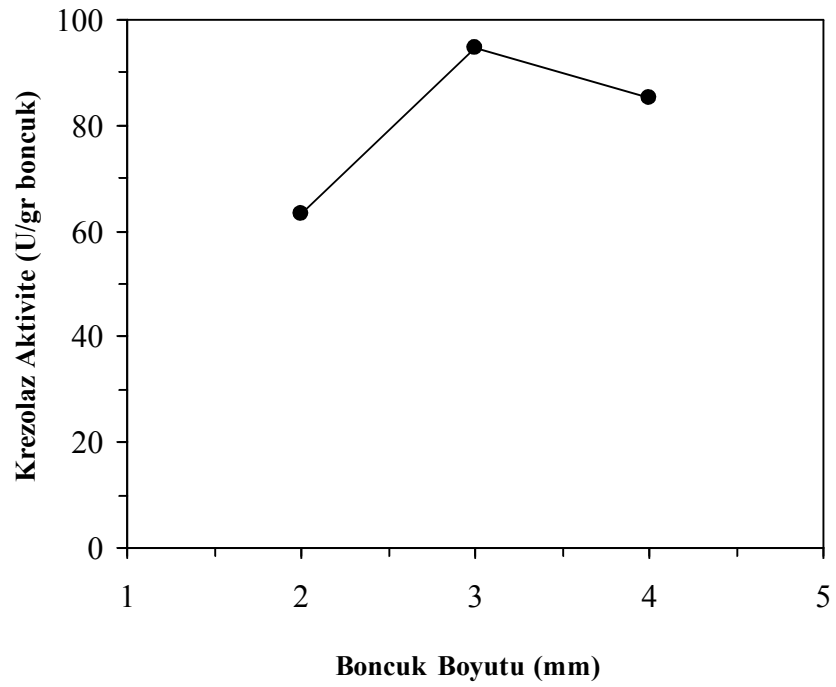
Şekil 4.10. Krezolaz aktivitesine yüklenen enzim miktarının etkisi

4.5.5. Boncuk Boyutu Optimizasyonu

Boncuk boyutu optimizasyonu için; siyah enjektör ucu, yeşil enjektör ucu ve pastör pipeti kullanıldı. Kumpasla yapılan ölçümlerde boncukların çapları sırasıyla 2 mm, 3 mm ve 4 mm olarak belirlendi. En yüksek enzim aktiviteleri yeşil enjektör uç (3 mm) kullanıldığında belirlendi (Şekil 4.11 ve 4.12).



Şekil 4.11. Kateşolaz aktivitesine boncuk boyutunun etkisi

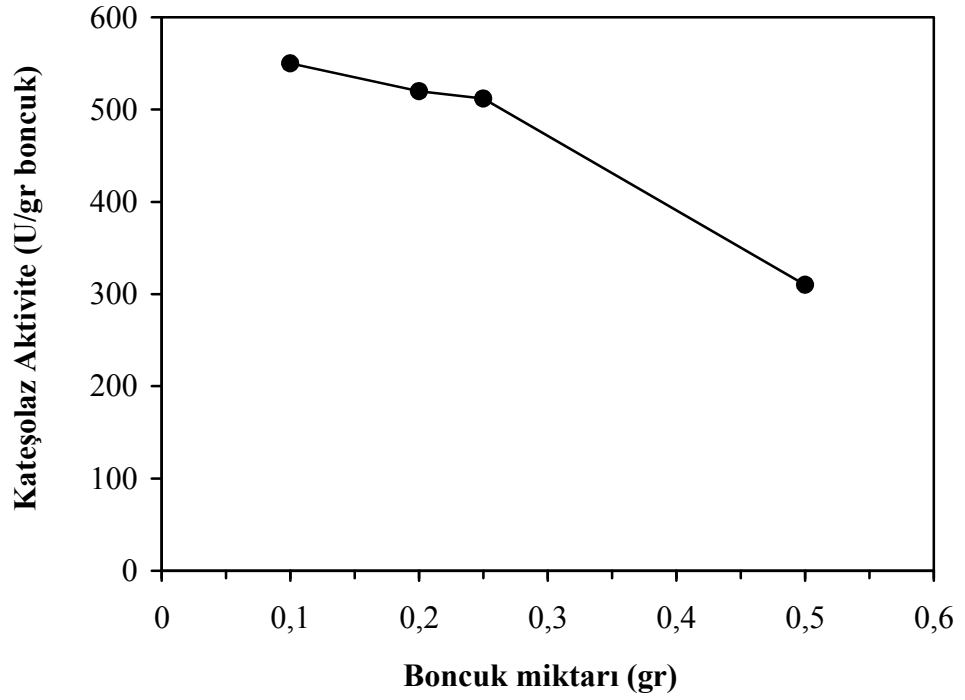


Şekil 4.12. Krezolaz aktivitesine boncuk boyutunun etkisi

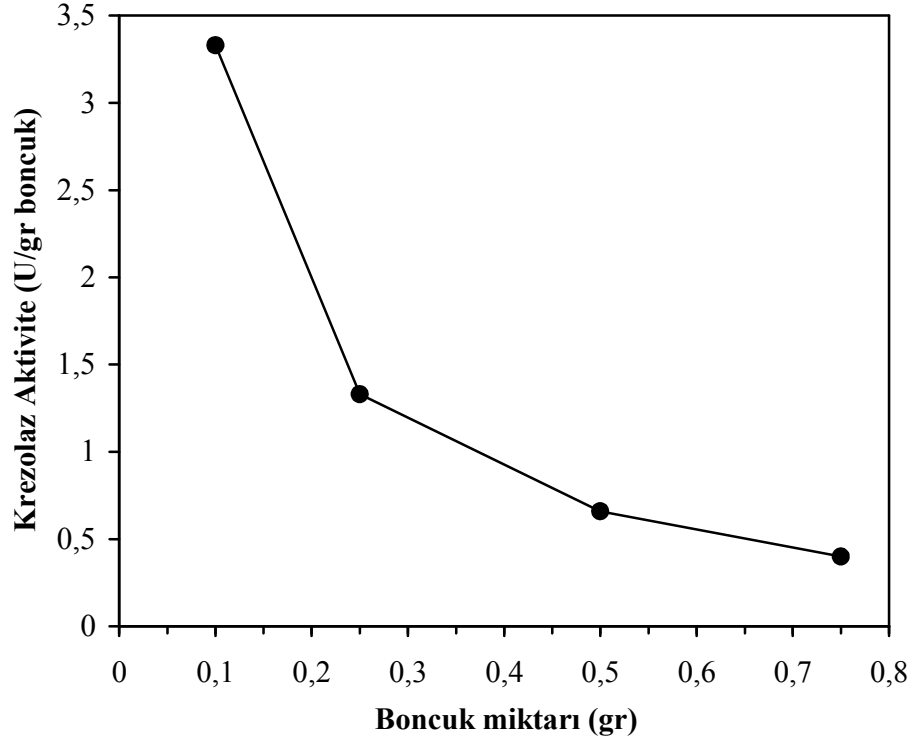
4.5.6. Boncuk Miktarı Optimizasyonu

1/5 oranında seyreltilmiş enginar polifenol oksidazı % 3 'lük alginat jele tutuklanarak % 2 'lik CuCl_2 damlatma çözeltisine yeşil uçlu enjektörle damlatılarak boncuklar elde edildi. Aktivite tayinlerinde kullanılacak optimum boncuk miktarının belirlenmesi için; 0.1, 0.2, 0.25 ve 0.5 gr boncuk kullanıldı.

Elde edilen sonuçlar Şekil 4.13 ve 4.14 'de verilmiştir. Optimum boncuk miktarı 0.1 gr olarak belirlendi (Şekil 4.13 ve 4.14).



Şekil 4.13. Kateşolaz aktivitesine boncuk miktarının etkisi



Şekil 4.14. Krezolaz aktivitesine boncuk miktarının etkisi

Tablo 4.4. Enginar PFO 'sunun alginat jelde tutuklanmasının optimizasyon sonuçları

Alginat Konsantrasyonu	% 3
CuCl₂ Konsantrasyonu	% 2
Enzim Miktarı	1/5 D
Boncuk Boyutu	3 mm
Boncuk Miktarı	0.1 gr

Enginar polifenol oksidazının alginat jelde tutuklanma koşulları Tablo 4.4 'de görüldüğü gibi optimize edilmiştir. Alginat + karragenan ve karragenan jellerde polifenol oksidaz immobilize edilirken de boncuklar yukarıdaki optimizasyon koşullarında hazırlandı. Çalışmanın devamında her üç jelden hazırlanan immobilize boncukların optimum pH, optimum sıcaklık, termal ve depo kararlılığı, yeniden kullanılabilirlik gibi bazı biyokimyasal özellikleri çalışıldı ve serbest enziminki ile karşılaştırıldı. Ancak karragenan jelde tutuklanmış polifenol oksidazının biyokimyasal

özellikleri çalışılırken; boncuklar ortam şartlarından olumsuz etkilenerek bozuldu. Bu durum deney tekrarlarında anlamlı sonuçlar elde edilmemesine neden oldu. Bu nedenle sadece alginat ve alginat + karragenan boncuklara ait karakterizasyon sonuçları verildi.

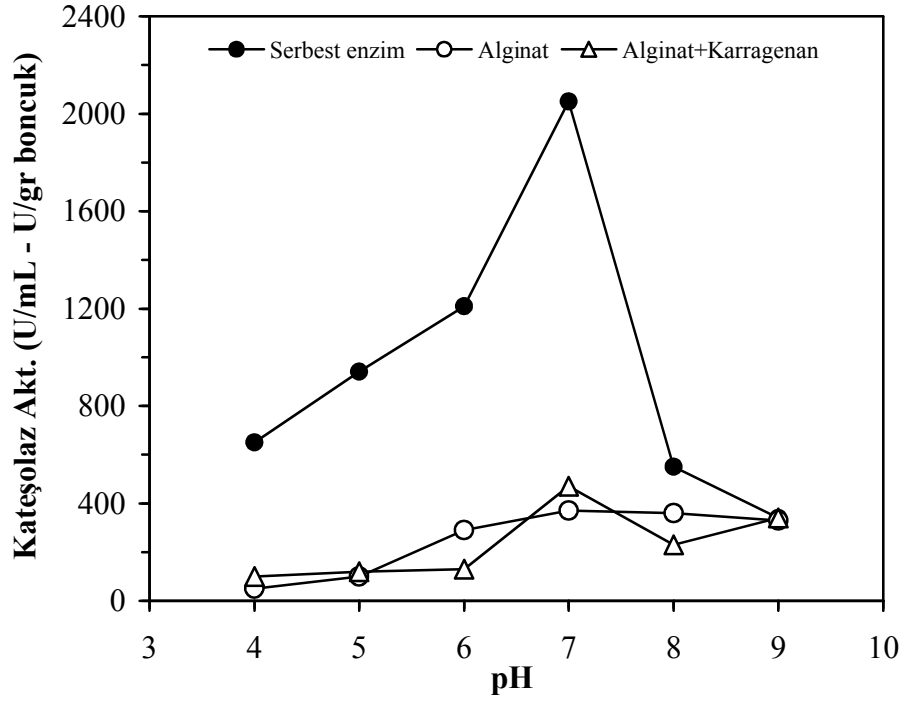
4.6. Alginat ve Alginat + Karragenan Jellerde Tutuklu Enginar Polifenol Oksidazının Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi

4.6.1. Optimum pH

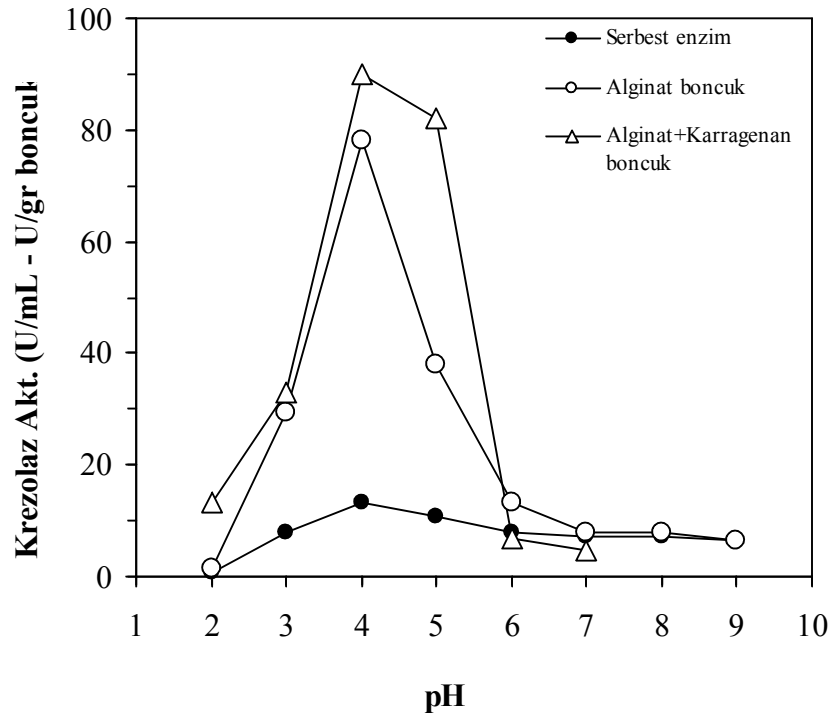
Enginar polifenol oksidazının optimum pH 'larını belirlemek üzere farklı pH değerlerinde (2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0) farklı tamponları hazırlandı. Kateşolaz aktivitesi için; yukarıdaki tamponlarda 0.02 M kateşol çözeltisi, krezolaz aktivitesi için 2.5 mM tirozin çözeltisi substrat olarak kullanıldı. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda immobilize ve serbest enzim için aktivite - pH grafikleri oluşturuldu (Şekil 4.15 ve Şekil 4.16). Kateşolaz aktivitesi için hem immobilize hem de serbest enzim için optimum pH 7.0, krezolaz aktivitesi için ise pH 4.0 olarak belirlendi.

4.6.2. Optimum Sıcaklık Tayini

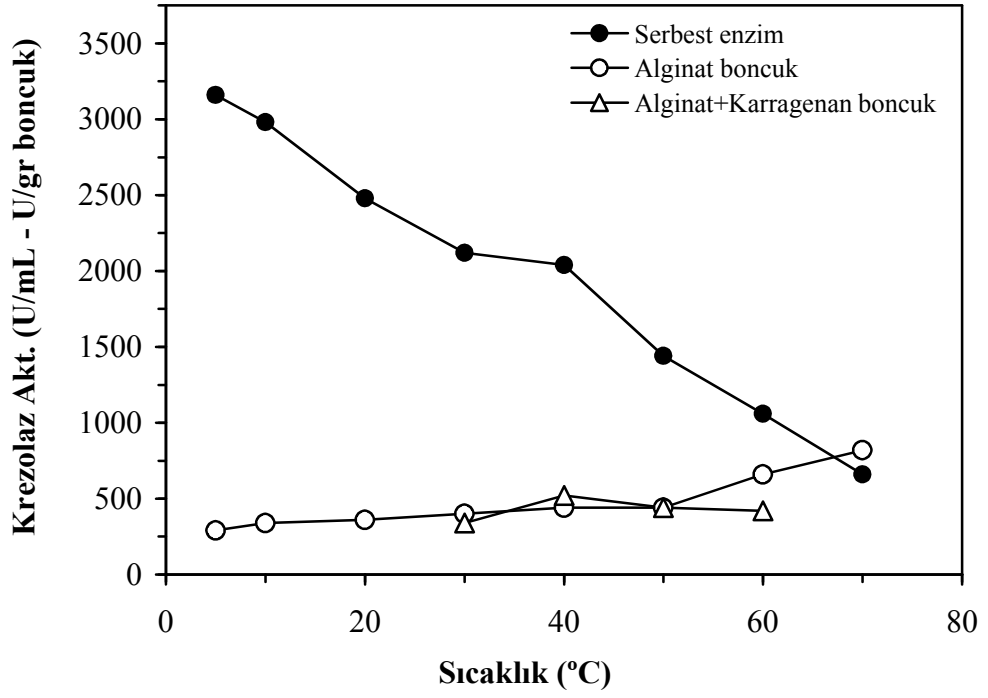
Enginardan elde edilen polifenol oksidazın optimum sıcaklıklarını belirlemek üzere kateşolaz aktivitesi için substrat olarak 0.02 M kateşol çözeltisi kullanılarak 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, ve 70 °C 'de çalışıldı. Krezolaz aktivitesi için substrat olarak 2.5 mM tirozin çözeltisi kullanılarak 20, 30, 40, 50, 60, ve 70 °C 'de çalışıldı. Bu sıcaklıklarda enzimatik aktiviteler belirlendi ve aktivite-sıcaklık grafikleri çizildi (Şekil 4.17 ve Şekil 4.18). Kateşolaz aktivitesi için alginatta tutuklanmış enzimin optimum sıcaklığı 70 °C, alginat + karragenanda tutuklanmış enzimin optimum sıcaklığı 40 °C, serbest enzim için ise 5 °C olarak belirlendi. Krezolaz aktivitesi için alginatta tutuklanmış enzimin optimum sıcaklığı 30 °C, alginat + karragenanda tutuklanmış enzimin optimum sıcaklığı 20 °C, serbest enzim için ise 50 °C olarak belirlendi.



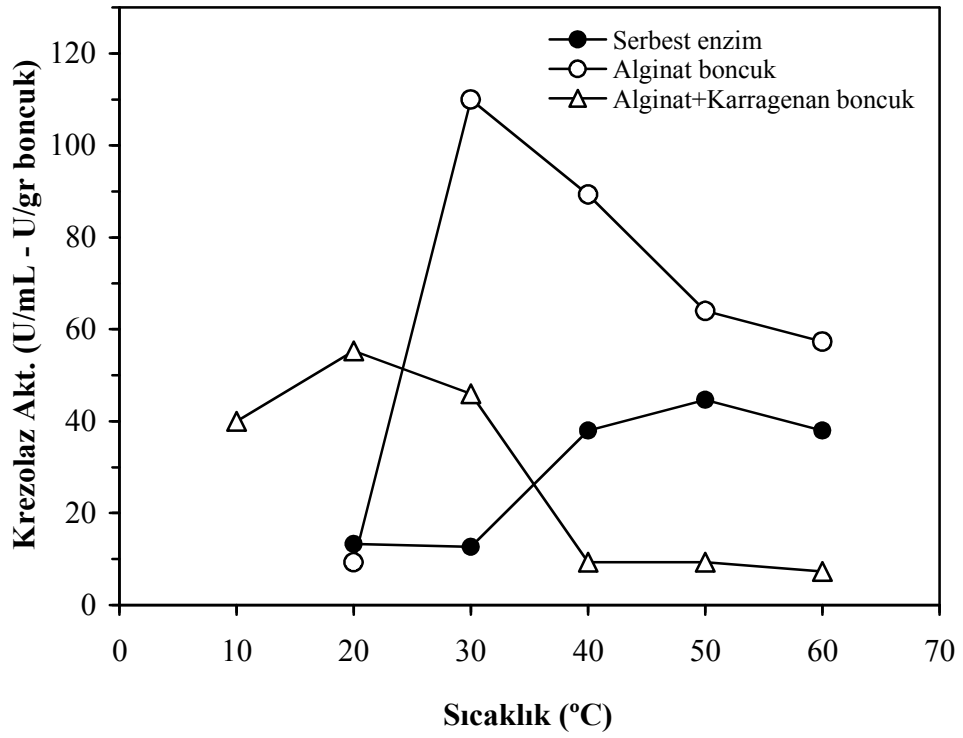
Şekil 4.15. Serbest ve immobilize PFO 'ların pH 'a bağlı kateşolaz aktivitelerinin değişimleri



Şekil 4.16. Serbest ve immobilize PFO 'ların pH 'a bağlı krezolaz aktivitelerinin değişimleri



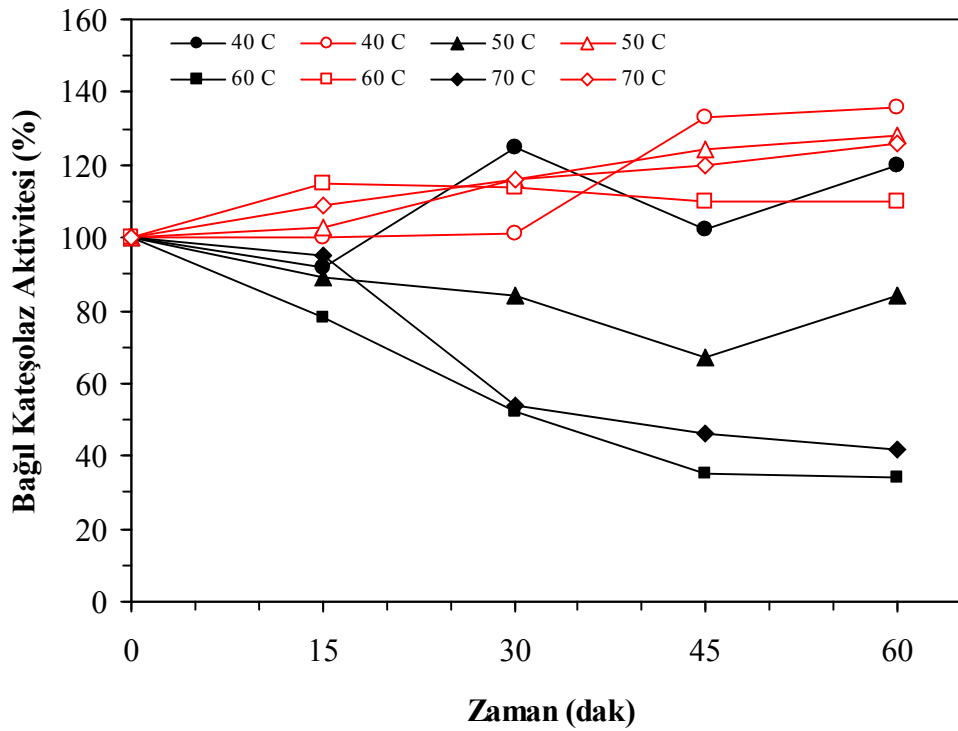
Şekil 4.17. Serbest ve immobilize PFO 'ların sıcaklığa bağlı kateşolaz aktivitelerinin değişimleri



Şekil 4.18. Serbest ve immobilize PFO 'ların sıcaklığa bağlı krezolaz aktivitelerinin değişimleri

4.6.3. Termal Kararlılık Çalışması

Enginar polifenol oksidaz enziminin sıcaklığa karşı dayanıklılık özelliğinin araştırılması için öncelikle optimum şartlarda kateşol ve tirozin substratına karşı aktivite tayinleri yapıldı. Enzim çözeltisi 1 saat süre ile 40, 50, 60 ve 70 °C 'lerde inkübe edildi. İnkübe edilen çözelti 0., 15., 30., 45. ve 60. dakikalarda olmak üzere her 15 dakika sonunda buz banyosuna alındı ve sonra da ilgili aktivite tayini yapıldı. Serbest enzim ve immobilize enzim için optimum sıcaklıkta ölçülen aktivite değerleri % 100 olarak alındı. Elde edilen aktivite değerleri % aktiviteye dönüştürülerek % aktivite-zaman grafikleri çizildi (Şekil 4.19, 4.20, 4.21 ve 4.22).

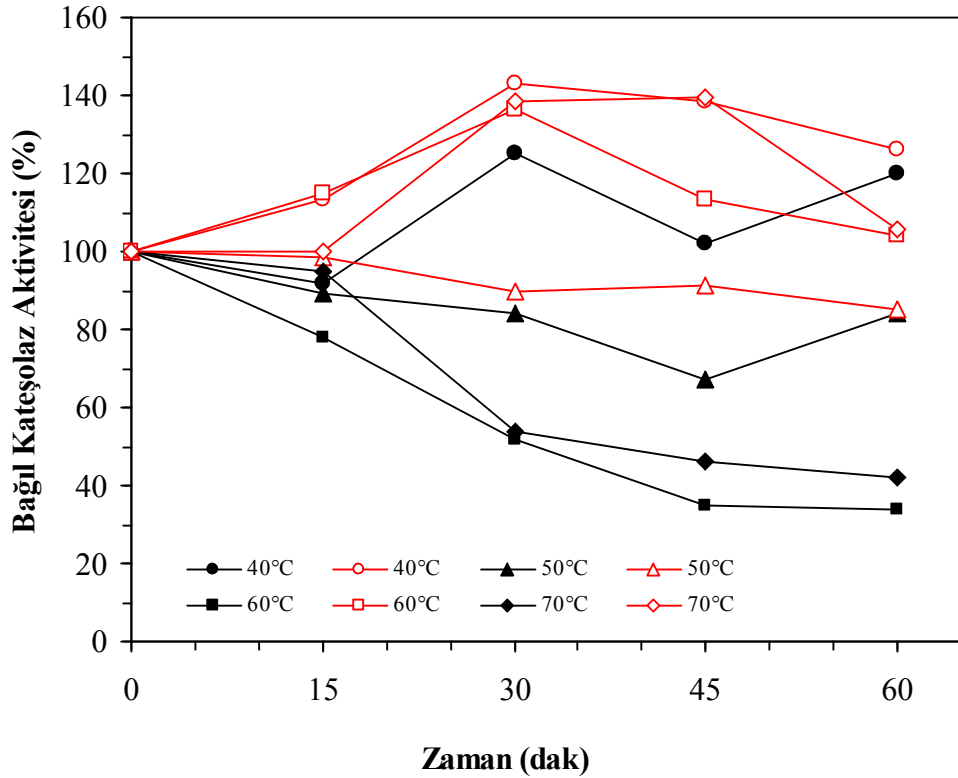


Şekil 4.19. Alginat boncuklara immobilize (kırmızı) ve serbest PFO 'nun (siyah) kateşolaz aktivitesine ait termal kararlılık grafiği

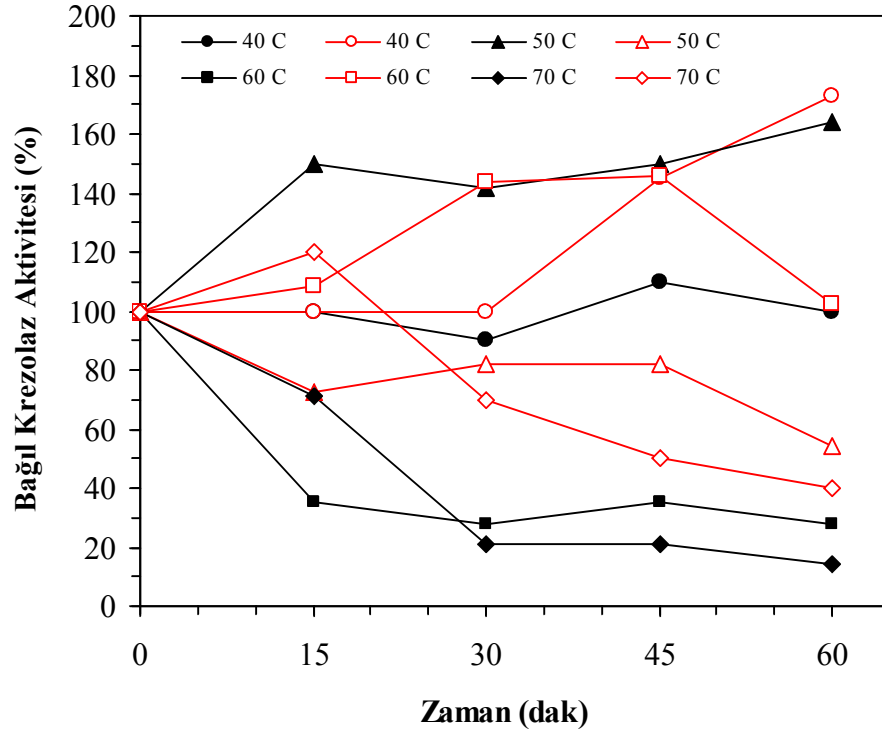
Serbest polifenol oksidazın ve alginat jele tutuklanmış immobilize polifenol oksidazın kateşolaz aktiviteleri incelendiğinde; serbest enzimin 40 ve 50 °C 'lerde

aktivitesini tamamen, 60 ve 70 °C 'lerde de yaklaşık % 40 kadarını koruduğu gözlemlendi. İmmobilize formun ise serbest enzime göre tüm sıcaklıklar için aktivitesini % 100 korumuş olduğu hatta aktivite bile kazandığı gözlemlendi (Şekil 4.19). Alginat + karragenan boncuklara tutuklanmış immobilize enzim de alginat boncuklara benzer bir termal kararlılık grafiği gösterdi. Ancak 50 °C deki aktivite değerleri diğer sıcaklıklara göre daha düşük olarak belirlendi. Benzer sonuçlar 60 °C için de gözlemlendi (Şekil 4.20).

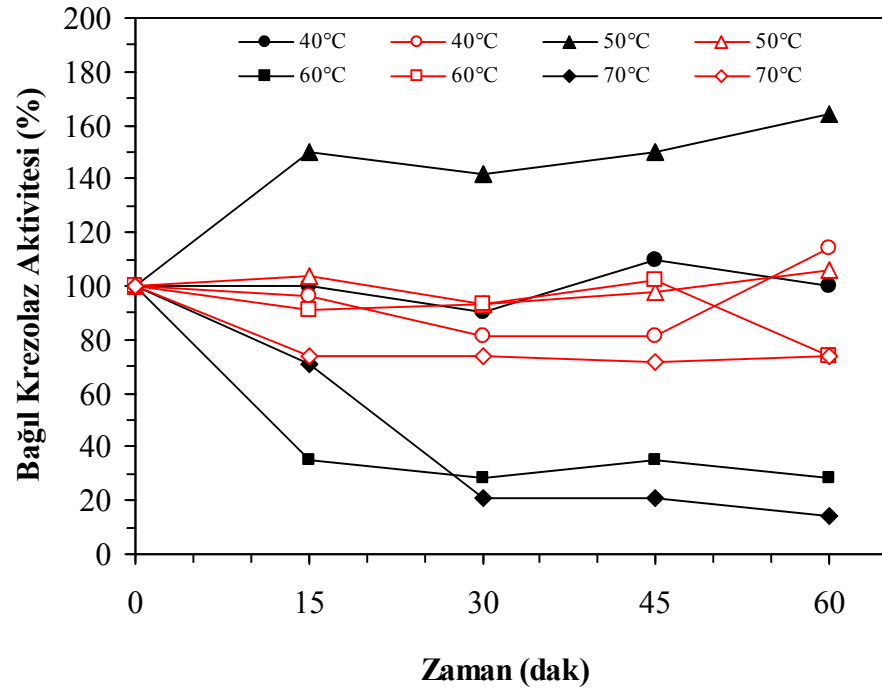
Bu immobilize formların ve serbest enzimin kateşolaz aktivitesine ait termal kararlılık grafikleri incelendiğinde ise; serbest enzimin 1 saatin sonunda 40 °C de aktivitesinin tamamını koruduğu gözlemlendi. 50 °C de ise aktivite artışı belirlendi. 60 ve 70 °C 'lerde ise bu süre sonunda aktivitesinin ancak yaklaşık % 20 sini koruyabildi.



Şekil 4.20. Alginat + Karragenan boncuklara immobilize ve serbest PFO 'nun kateşolaz aktivitelerine ait termal kararlılık grafiği



Şekil 4.21. Alginat boncuklara immobilize ve serbest PFO 'nun krezolaz aktivitesine ait termal kararlılık grafiği

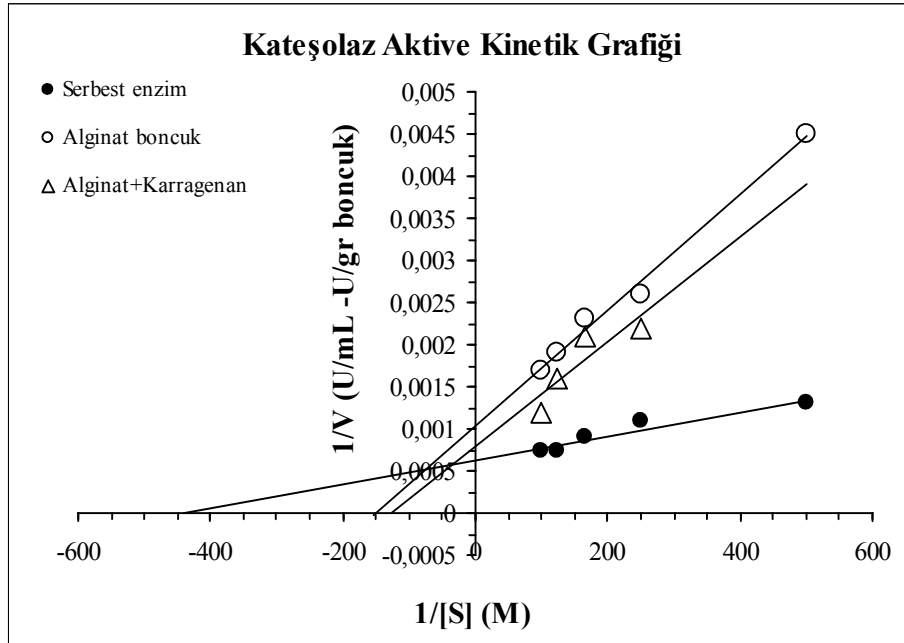


Şekil 4.22. Alginat + karragenan boncuklara immobilize ve serbest PFO 'nun krezolaz aktivitesine ait termal kararlılık grafiği

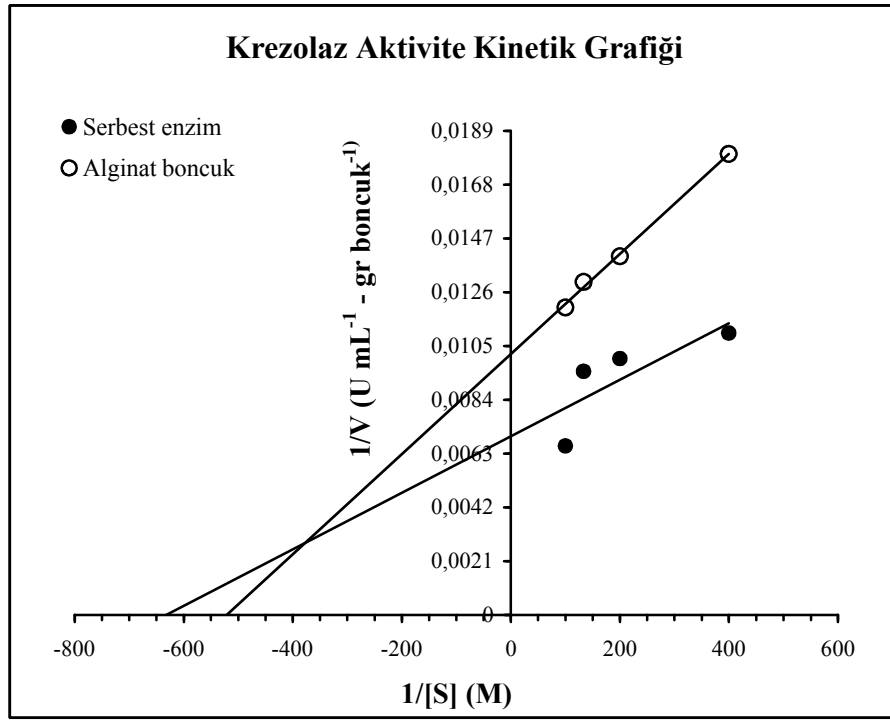
İmmobilize formlar ise 1 saatin sonunda tüm sıcaklıklarda aktivitelerinin tamamını, hatta 70 °C 'de yaklaşık % 75 'ni koruduğu gözlemlendi (Şekil 4.21ve Şekil 4.22).

4.6.4. Enginar Polifenol Oksidazı için K_m ve V_{max} Değerlerinin Bulunması

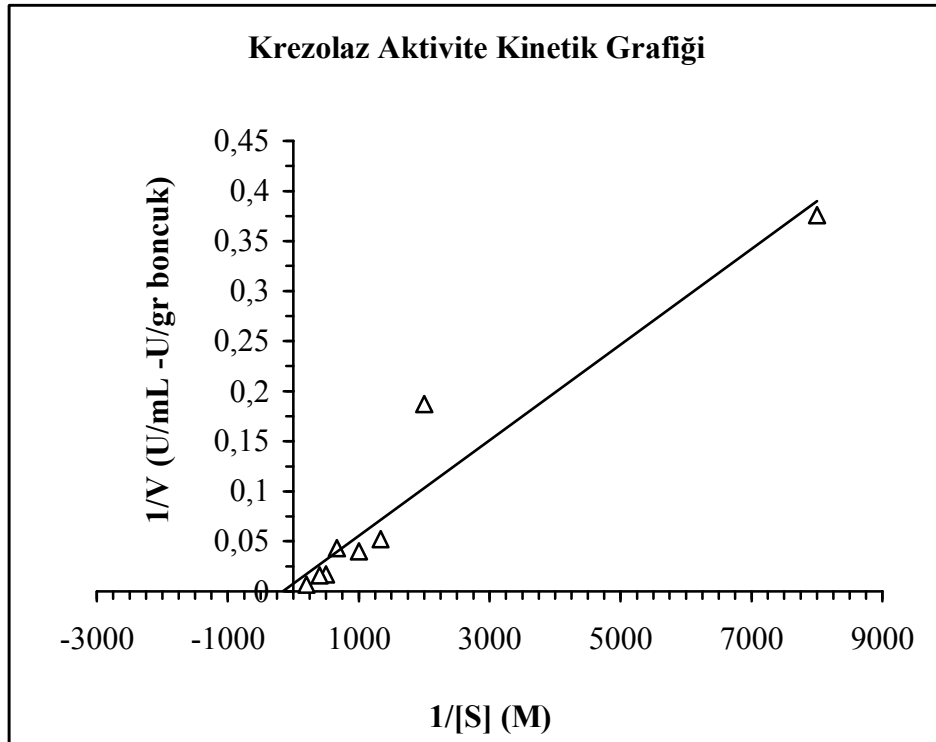
K_m ve V_{max} değerlerinin tespit edilmesi amacıyla, optimum şartlarda kateşol substratından 0.002, 0.004, 0.006, 0.008 ve 0.01 M 'lık; tirozin substratından 0.0010, 0.0025, 0.0050, 0.0075 ve 0.01 M 'lık olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlandı ve serbest ve immobilize polifenol oksidazların enzim aktiviteleri ölçüldü. Ölçülen aktivite değerleri (U/mLdak ve U/gr boncuk) cinsinden ifade edildi. $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulunarak her bir substrat için Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Şekil 4.23-4.24 ve 4.25). K_m ve V_{max} değerleri, grafiklerden yararlanarak hesaplandı.



Şekil 4.23. Serbest ve immobilize PFO 'ların kateşolaz aktivitesi için Lineweaver-Burk Grafiği



Şekil 4.24. Serbest ve alginat boncuklara immobilize PFO 'nun krezolaz aktivitesi için Lineweaver-Burk Grafiği



Şekil 4.25. Alginat + Karragenan boncuklara immobilize PFO'nun krezolaz aktivitesi için Lineweaver-Burk Grafiği

Tablo 4.5. Serbest ve immobilize enzimlerin krezolaz aktivitesi için kinetik değerleri

	K_m (mM)	V_{max}	V_{max}/K_m
Serbest enzim	1.58×10^{-3}	142.85 (U/mL dak)	90411
Alginat boncuk	1.92×10^{-3}	99 (U/g boncuk dak)	51562
Alginat-Karragenan boncuk	5.0×10^{-3}	111.1 (U/g boncuk dak)	22220

Tablo 4.6. Serbest ve immobilize enzimlerin kateşolaz aktivitesi için kinetik değerleri

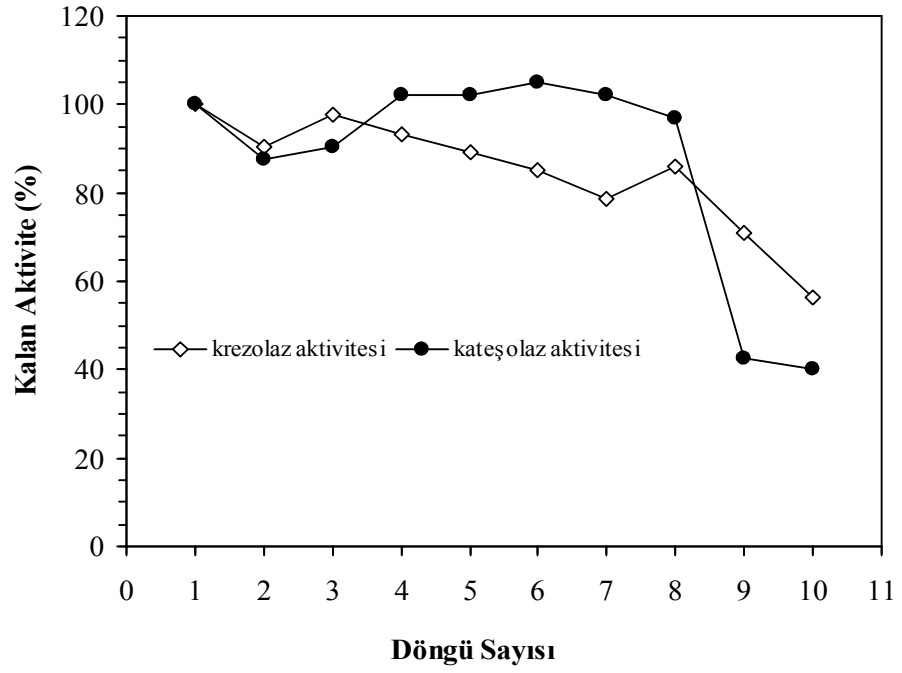
	K_m (mM)	V_{max}	V_{max}/K_m
Serbest enzim	2.32×10^{-3}	1613 (U/mL dak)	695 258
Alginat boncuk	6.66×10^{-3}	1000 (U/g boncuk dak)	150 150
Alginat-Karragenan boncuk	8.0×10^{-3}	1282 (U/g boncuk dak)	160 250

4.6.5. İmmobilize Enzimlerin Tekrar Kullanılabilirliği

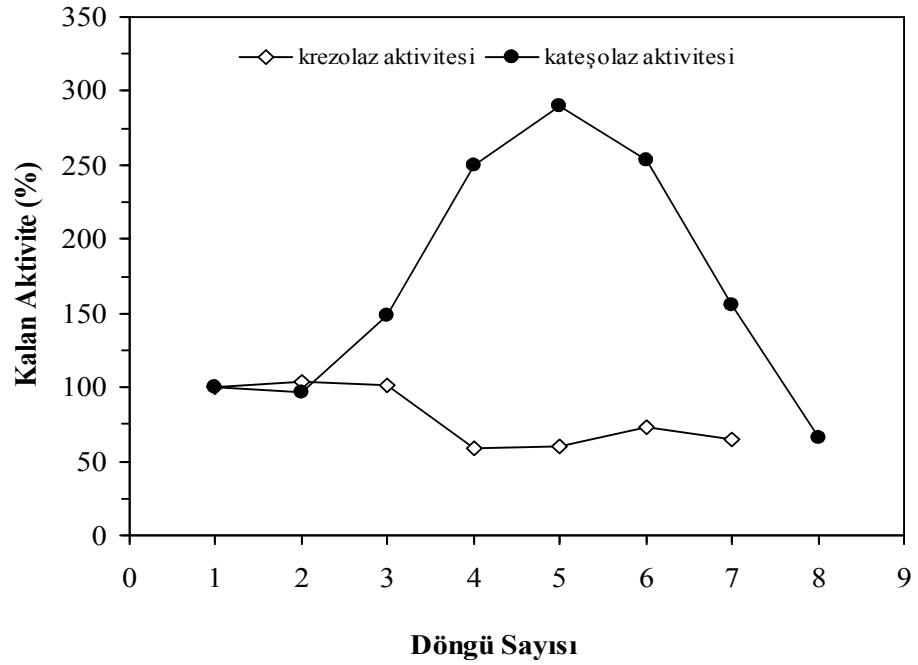
Alginat ve alginat + karragenan boncuklara immobilize edilmiş enginar polifenol oksidazının yeniden kullanılabilirliğini belirlemek için; tartılan 1 gr boncuk ile krezolaz ve kateşolaz aktivite tayinleri aynı boncuklarla tekrarlanarak gerçekleştirildi.

Alginat boncuklarla hem krezolaz hem kateşolaz aktiviteleri aynı boncuklar kullanılarak 10 döngü için çalışılabilir. 8 döngü süresince boncukların kateşolaz aktivitesini tamamen koruduğu, 9. ve 10. döngülerde yaklaşık % 40 kadar aktif olduğu görüldü. Benzer şekilde krezolaz aktivitesi için de 8 döngü süresince aktivitesinin yaklaşık % 80 - 90 'ını, 10. döngüde % 56 'sını koruduğu gözlemlendi (Şekil 4.26).

Alginat + karragenan boncuklarda kateşolaz aktivitesinde önemli oranda artış gözlemlendi. 5. döngüde aktivite yaklaşık 3 kat artarken, 8. döngüde aktivitenin % 65 inin korunduğu görüldü. Boncuklar 3 döngüde krezolaz aktivitelerini korurken 7. döngü sonunda aktivitenin yine % 65 olduğu görüldü (Şekil 4.27).



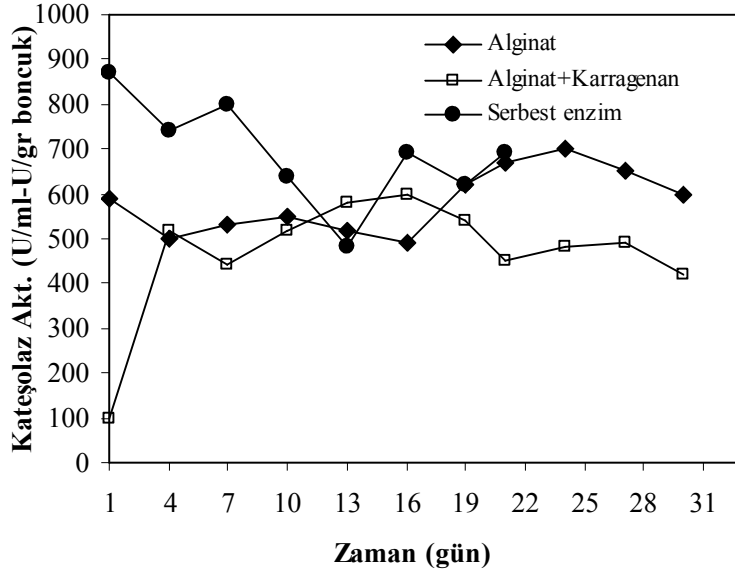
Şekil 4.26. Alginat boncuklara immobilize PFO 'nun kesikli proseste yeniden kullanılabilirliği



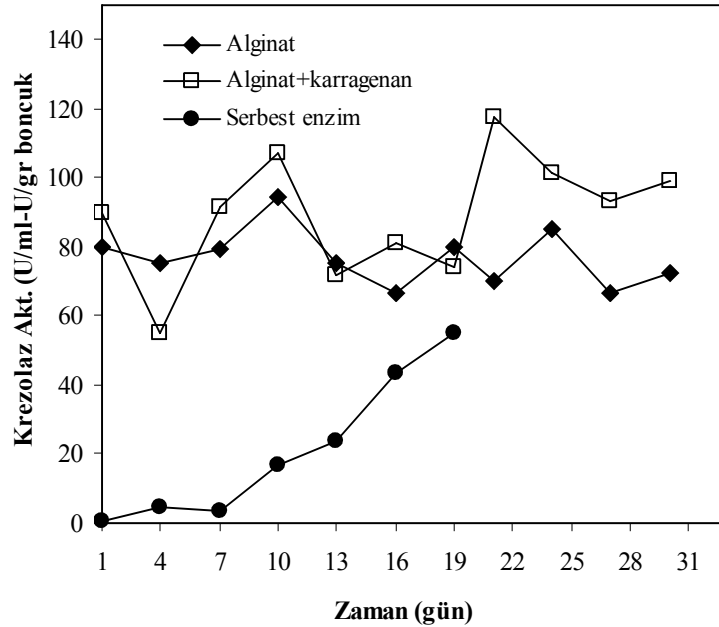
Şekil 4.27. Alginat + Karragenan boncuklara immobilize PFO 'nun kesikli proseste yeniden kullanılabilirliği

4.6.6. İmmobilize Enzimin Depo Kararlılığı

Alginate ve alginate + karragenan boncuklara immobilize edilmiş enginar polifenol oksidazının ve serbest enzimin depo kararlılığını belirlemek amacıyla, serbest ve immobilize enzimlerin kateşolaz ve krezolaz aktivitesi 3 gün aralıklarla ölçüldü.



Şekil 4.29. Alginate ve alginate + karragenan boncuklarda immobilize ve serbest PFO'nun kateşolaz aktivitesi için depo kararlılık grafiği



Şekil 4.28. Alginate ve alginate + karragenan boncuklarda immobilize ve serbest PFO'nun krezolaz aktivitesi için depo kararlılık grafiği

5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

İmmobilizasyon tekniklerinden biri olan tutuklama tekniği, bir boşluğa veya ağ içine enzimin fiziksel olarak hapsedilmesi olarak tanımlanabilir. Multivalent karşıt iyonların eklenmesiyle polianyonik veya polikatyonik polimerlerin jelleşmesi şeklinde uygulanan enzim tutuklaması enzim immobilizasyonunda kullanılan basit ve yaygın bir metottur (Mammeralla ve Rubiolo, 2005). Çalışma kapsamında, PFO enzimi açısından zengin bir bitkisel kaynak olan enginar (*Cynara scolymus*) izole edilen PFO enziminin immobilizasyonu amaçlanmış olup, immobilizasyon alginat, karragenan ve alginat + karragenan jellerde gerçekleştirilmiş ve serbest ve immobilize tirozinazın optimum pH ve sıcaklık, K_m ve V_{max} kinetik sabitleri, termal kararlılık, yeniden kullanılabilirlik ve depo kararlılığı gibi bazı biyokimyasal özellikleri incelenmiştir.

Oksido - redüktaz enzim sınıfına ait olan polifenol oksidazlara (EC.1.14.18.1) muz, elma, armut, dut, enginar, patlıcan, patates, yerelması, kahve, kakao tohumu vb. pek çok meyve ve sebze rastlamak mümkündür. Bizim çalışmamızda polifenol oksidazca zengin bir kaynak olan enginar kullanılmıştır (Leoni vd., 1990, Lattanzio vd., 1994, Espin vd., 1997, López-Molina vd., 2003, Aydemir, 2004, Leventer, 2005, Doğan vd., 2005).

Enzim izolasyonu sırasında pek çok farklı tampon kullanılmaktadır. Çalışmamızda izolasyon için Tris - HCl tamponu (pH 7.0) kullanılmıştır. Bir çok literatürde polifenol oksidaz izolasyonunda sodyum-potasyum fosfat tamponu kullanılmasına rağmen, fosfat tamponları Ca^{+2} iyonlarını jelden uzaklaştırıp polimerde bozulmalara neden olabileceği literatürde bildirildiği için bu çalışmada bu tampondan kaçınılmıştır (Fraser ve Bickerstaff, 1997).

Enginar başından enzim ekstraksiyonu Bölüm 3.2.3. 'te belirtildiği gibi yapılmıştır. Enzimatik kararmayı engellemek amacıyla PVP (polivinilpirolidon) kullanılmıştır. PVP, fenollerin iyonlaşmadığı nötral ya da asidik pH 'da çok kuvvetli bir proton alıcısıdır ve PFO 'nun kısmi yarışmalı inhibitörüdür. Kinon indirgeyici ajan olarak askorbik asit ve hücre organellerine bağlı haldeki inaktif enzimi çözmek amacıyla % 0.1 'lik Triton X-100 ekstraksiyon tamponuna dahil edilmiştir (Leventer, D., 2005).

Enginar başından izole edilen polifenol oksidaz enzimi, % 10 'luk amonyum sülfat çöktürmesi uygulanmıştır. Süpernatantta yüksek aktivite gözlenmesi nedeniyle bu kez % 90 'lık amonyum sülfat çöktürmesi yapılmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesi proteinleri çöktürmek ve ayrıca enzim kararlılığını korumak amacıyla uygulanan bir işlemdir. İzole edilen polifenol oksidaz enzimi daha sonra Tris - HCl tamponunda (pH 7.0) dializ edilmiştir. Dializ işlemi Bölüm 3.2.5. 'de anlatıldığı gibi uygulanmıştır. Dializ işlemi ile ortamdaki küçük moleküller ve tuzlar enzim çözeltisinden uzaklaştırılmıştır. En yüksek PFO aktivitesi % 90 'lık tuz çöktürmesi sonrası dializatta belirlenmiş olup, bu fraksiyon enzim kaynağı olarak kullanılmıştır (Tablo 4.1).

% 90 'lık tuz çöktürmesi sonrası elde edilen dializat alginat, karragenan ve alginat + karragenan jel karışımlarında tutuklanmış ve bazı biyokimyasal özellikleri serbest enzimle karşılaştırılmıştır. Sodyum alginat jelde immobilizasyon, hızlı ve kolay uygulanabilir bir metot olması nedeniyle immobilizasyon çalışmalarında büyük kolaylık sağlamaktadır. Alginat jel enzim kaçışını önleyecek fakat substratın enzime erişimini engellemeyecek gözenek yapısına sahiptir. Karragenan jeller ise ılımlı immobilizasyon koşulları sağlar ve karragenan jelden enzim ve hücre kaçış riski oldukça düşüktür.

Bu tez kapsamında protein tayinleri Lowry metodu ile yapılmıştır. Lowry yönteminde standart protein olarak % 0.001 'lik sığır serum albümini kullanılmış, standart grafik çizilmiştir (Şekil 4.1). Çalışmada *ham ekstraktın*, tuz çöktürmesi ve dializ sonrası elde edilen *dializat çözeltilerinin* ve immobilize enzimin damlatıldığı *CuCl₂*, *CaCl₂* ve *KCl çözeltilerinin* ve *yıkama sularının* protein miktarları bu standart grafiklerden yararlanılarak belirlenmiştir. Bulunan protein miktarlarından, tutunmayan protein ve tutunan protein miktarları hesaplanarak immobilizasyon yüzdeleri tayin edilmiştir (Tablo 4.2). Tabloda görüldüğü gibi alginat, karragenan ve alginat +

karragenan jeller için immobilizasyon yüzdeleri sırasıyla % 70, % 37 ve % 60 olarak bulunmuştur. En yüksek kateşolaz aktivitesi alginat jelde gözlenmiştir (370 U/gr boncuk dak). En yüksek krezolaz aktivitesi ise alginat + karragenan jelde gözlenmiştir (90 U/gr boncuk dak). Katalitik aktivitesinin yüksek ve tutuklama yüzdesinin de oldukça iyi olmasından dolayı alginat ve alginat + karragenan jellerin polifenol oksidaz immobilizasyonu için uygun birer matriks tabaka olduğu belirlenmiştir. Karragenanla yaptığımız çalışmada alginat ve alginat + karragenanda olduğu kadar başarılı aktivite sonuçları alınamamıştır. Bu yüksek sıcaklıklarda jelin yapısında bozulmaların olması ve enzimin serbest kalarak ortama geçmesi ile açıklanabilir.

Jel indükleyici sistem olarak çeşitli polimerler için KCl, CaCl₂ ve CuCl₂ çözeltileri gibi katyonik çözeltiler kullanılmaktadır. Çalışmada literatürde belirtildiği gibi alginat ve alginat + karragenan jeller için CuCl₂, karragenan jel için ise KCl jel indükleme ajanı olarak kullanılmıştır (Tablo 4.3). Tablo 4.3 'te görüldüğü gibi; alginat boncuklar hazırlanırken damlatma çözeltisi olarak CuCl₂ kullanıldığında immobilizasyon yüzdesi ve elde edilen aktivite sonuçları CaCl₂ 'den daha iyidir. Literatürde bu durum polifenol oksidaz enziminin bakır kofaktörlü olmasıyla ve ayrıca alginat için Cu⁺²'nin Ca⁺²'den daha yüksek bir affiniteye sahip olması ile açıklanmaktadır (Palmieri vd., 1994, Ateş vd., 2006).

Tutuklama materyali olarak kullanılan polimerin yani jelin konsantrasyonu ve tutuklama çözeltisinin konsantrasyonu enzimin tutuklamasında önemli parametrelerdir. Bu nedenle öncelikle PFO 'ın her iki aktivitesi üzerine alginat ve CuCl₂ konsantrasyonunun etkisi, ayrıca enzim miktarı, boncuk boyutu ve boncuk miktarının etkileri de araştırılmış ve optimum değerleri belirlenmiştir Sırasıyla % 1, 2, 3 ve 4 'lük konsantrasyonlardaki alginat jellere immobilize edilen PFO 'nun krezolaz ve kateşolaz aktivite tayinleri yapılarak, alginat konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Her iki aktivite tayini sonucunda optimum alginat konsantrasyonu % 3 olarak bulunmuştur (Şekil 4.5 ve 4.6). PFO enzimin alginat jeldeki tutuklamaları için uygun bir damlatma çözeltisi olduğu belirlenen CuCl₂ çözeltisinin konsantrasyonunun enzim aktiviteleri üzerine etkileri incelenmiş ve hem krezolaz hem de kateşolaz aktivitesi için optimum CuCl₂ konsantrasyonunun % 2 olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.7 ve 4.8). Alginat boncuklara yüklenen enzim miktarının katalitik aktivite üzerine

etkisi dört farklı enzim konsantrasyonu çalışılarak incelenmiştir. Enzim miktarıyla orantılı olarak aktivitenin de arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.9 ve 4.10). Boncuklara yüklenecek enzim miktarının optimizasyon çalışmasında her iki enzimatik aktivite için 1/5 D konsantrasyonunun (5 kat seyreltilmiş dializat çözeltisi) optimum olduğu gözlenmiştir. Boncuk boyutunun aktivite üzerine etkisi çalışıldığında; en yüksek aktivite yeşil uçlu enjektörle hazırladığımız boncuklarda belirlenmiştir (Şekil 4.11 ve 4.12). Yeşil uçlu enjektör kullanılarak elde edilen 3 mm 'lik boncukların çapı optimum boncuk boyutu olarak belirlenmiştir. Kullanılacak optimum boncuk miktarını belirlemek için gerçekleştirilen çalışmada 0.1, 0.2, 0.25 ve 0.5 gr olmak üzere dört farklı boncuk miktarı ile çalışılmış; 0.1 gr boncuk miktarının en yüksek enzimatik aktiviteyi gösterdiği görülmüştür (Şekil 4.13 ve 4.14). Bu optimizasyon çalışmasının sonuçları Tablo 4.4 'te verilmiştir.

Tezin ikinci kısmında; alginat ve alginat + karragenan jellerde tutuklanan polifenol oksidazlara ait optimum pH ve sıcaklık, K_m ve V_{max} kinetik sabitleri, termal ve operasyonel kararlılık, yeniden kullanılabilirlik ve depo kararlılığı gibi bazı biyokimyasal özellikleri araştırılmıştır ve bunlara ait veriler raporlanmıştır.

PPO enziminin optimum pH değeri ekstraksiyon metoduna, substrata, enzimin hücre içindeki yerine ve enzim kaynağına bağlı olarak geniş bir aralıkta değişir. Genellikle pH 4.0 ve 7.0 arasındadır (Beena ve Gowda, 2000). İmmobilizasyon işlemi enzimin çalışma koşullarını daha ılımlı hale getiren bir metottur ve enzimin pH çalışma aralığını değiştirebilir veya genişletebilir. Serbest ve immobilize tirozinaz için optimum pH çalışması pH 2.0 - 9.0 aralığında yapılmıştır. Alginat ve alginat + karragenan jellerde tutuklanan enginar polifenol oksidazı için; kateşolaz aktivitesinde serbest ve immobilize enzim formlar için optimum pH değeri 7.0 olarak, krezolaz aktivitesi için ise optimum pH değeri 4.0 olarak bulunmuştur. (Şekil 4.15 ve 4.16). Şekil 4.15 ve 4.16 'da görüldüğü gibi serbest ve immobilize formlar için optimum pH değerleri aynı kalmıştır. Bu veriler gerçekleştirilen immobilizasyon uygulamasının PFO 'ın optimum pH 'ı üzerinde olumlu veya olumsuz bir değişiklik yapmadığını göstermektedir.

Ortam pH 'ının, enzimlerin iyonlaşabilen grupları üzerinde önemli bir etkisi olduğu için enzim aktivitesindeki rolü büyüktür. Aktif merkezin konformasyonunu koruyup işlevini yerine getirebilmesi için bu grupların iyonik formda olması gerekir. pH substrattaki iyonlaşabilen grupları etkileyebilmektedir. İmmobilizasyon çalışmalarında optimum pH 'ın değişimi enzimin yüküne veya kullanılan matrikse bağlıdır. Bu değişim, enzimin yapı - fonksiyon ilişkisinin anlaşılmasında yardımcı olur. Alginat ve poli(akrilamid-ko-akrilikasit) hidrojellerde ikili immobilizasyonun optimum pH 'ı alginat için 7.0 ve poli(akrilamid-ko-akrilikasit) hidrojeli için 5.0 olarak bulunmuştur (Yahsi vd., 2005). Palmieri ve ark. tarafından Cu - alginat jeller kullanılarak gerçekleştirilen fungal polifenol oksidaz immobilizasyonunda immobilize enzim için optimum pH 4.0 olarak belirlenmiştir (Palmieri vd., 1994). Munjal ve Sawhney ise alginat boncuklara immobilize ettikleri mantar tirozinazının geniş bir pH aralığında maksimum aktivite göstermesine rağmen optimum pH 'ı 6.5 olarak tespit etmişlerdir (Munjal ve Sawhney, 2002). Yıldız ve ark. ise üç farklı iletken kopolimere immobilize ettikleri PFO 'ların optimum pH 'larını 8.0, 9.0, ve 10.0 olarak belirlemişlerdir (Yıldız vd., 2005).

Alginat ve alginat + karragenan jellere tutuklanmış polifenol oksidaz enzimine sıcaklığın etkisi belirlemek amacıyla; kateşolaz aktivitesi için 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, ve 70 °C 'de, krezolaz aktivitesi için ise 20, 30, 40, 50, 60, ve 70 °C 'de sıcaklıklarda çalışılmıştır. Kateşolaz aktivitesinde alginatta tutuklanmış enzimin optimum sıcaklığı 70 °C, alginat + karragenanda tutuklanmış enzimin optimum sıcaklığı 40 °C, serbest enzim için ise 5 °C olarak belirlenmiştir (Şekil 4.17). Krezolaz aktivitesi için alginat boncuklardaki immobilize enzimin optimum sıcaklığı 30 °C, alginat + karragenan boncuklardaki için 20 °C, serbest enzim için ise 50 °C olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.18). Tutuklama yöntemi, bilhassa krezolaz aktivitesinde, immobilize enzim için serbest enzime göre daha düşük sıcaklıklarda çalışma imkanı sağlamıştır. Böylelikle bu immobilizasyon yönteminin endüstriyel açıdan daha düşük sıcaklıklarda ve daha düşük maliyetle çalışabilme imkanı sağlayabileceği düşünülmektedir.

Kurbağa epidermis PFO'nun krezolaz aktivitesi için optimum sıcaklık değeri 20 °C olarak ölçülmüştür (Vilanova vd., 1984). Yahsi vd., Ca - alginat ve poli(akrilamid-ko-akrilikasit) hidrojeline immobilize ettikleri tirozinazın optimum reaksiyon sıcaklığını 35 °C serbest enzim için ise 30 °C olarak belirlemişlerdir. Optimum sıcaklıktaki bu yükselmeyi, enzimin substrata bağlanması için optimum konformasyonunun yeniden düzenlenmesinde gereken aktivasyon enerjisinin enzimler ve polimerik matriks arasındaki çok yönlü iyonik etkileşimi olarak açıklamışlardır (Yahsi vd., 2005). Munjal ve ark. alginat ve jelatin jeller için immobilize enzimin optimum sıcaklığını sırasıyla 35 °C ve 40 °C olarak bulunmuşlardır (Munjal ve Sawhney, 2002).

İmmobilize enginar polifenol oksidazının termal kararlılık çalışması 40, 50, 60 ve 70°C sıcaklıklarda yapılmıştır. Krezolaz aktivitesi sonuçları incelendiğinde serbest enzimin 1 saatin sonunda 40 °C de aktivitesinin tamamını koruduğu, 50 °C de aktivitesinin arttığı, 60 ve 70 °C 'lerde ise aktivitesinin ancak yaklaşık % 20 sini koruyabildiği gözlemlendi. Alginat jele immobilize edilmiş enginar PFO'nun tüm sıcaklıklarda krezolaz aktivitelerini koruduğu ve hatta 40°C 'de aktivitesini % 60 arttırdığı gözlemlenmiştir. Alginat + karragenan'a immobilize edilmiş enzimin krezolaz aktivitesi, alginat jelinkine benzer sonuçlar göstermiş, ayrıca serbest enzime göre aktivitelerini korumada daha kararlı olduğu gözlemlenmiştir.

Kateşolaz aktiviteleri incelendiğinde serbest enzimin 40 ve 50 °C 'lerde aktivitesini tamamen, 60 ve 70 °C 'lerde de yaklaşık % 40 kadarını koruduğu gözlemlendi. Alginatta immobilize enzimin inkübasyon süreleri sonunda aktivitelerini korudukları hatta % 20 oranında arttırdıkları söylenebilir. Alginata + karragenana immobilize edilmiş enzim için ise alginat boncuklara benzer bir termal kararlılık grafiği gösterdi. Ancak 50 °C deki aktivite değerleri diğer sıcaklıklara göre daha düşük olarak belirlendi. Benzer sonuçlar 60 °C için de gözlemlendi. İmmobilize formlar ise 1 saatin sonunda tüm sıcaklıklarda aktivitelerinin tamamını, hatta 70 °C 'de yaklaşık % 75 'ni koruduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.21 ve 4.22).

Serbest enzimin ilgili aktivitelerde optimum ve/veya optimuma en yakın olan sıcaklık değerinde termal stabilitesinin de daha kararlı olduğu görülmektedir. Genel olarak optimum sıcaklık aralıklarının dışında serbest enzim üç boyutlu yapısının denatüre olması nedeniyle aktivitesini kaybedebileceği düşünülür. İmmobilizasyon ise enzim uygulamalarında onlara termal stabilite kazandıran bir uygulamadır. Bu çalışmada da immobilize formlara bakıldığında, genel olarak aktivitesini korudukları hatta arttığı dahi gözlenmiştir. Sonuç olarak enzim polifenol oksidazının alginat ve alginat + karragenan jellerde tutuklanması enzimin var olan termal kararlılığını olumlu yönde geliştirdiği söylenebilir.

Termal stabilite immobilize enzim uygulamalarında en karakteristik bilgilerinden biridir. Genelde immobilize enzimin aktivitesi, özellikle kovalent bağlı bir sistem ise, sıcaklığa ve denatürasyon ajanlarına karşı serbest enzime daha dirençlidir. Yahsi vd., serbest enzim, kalsiyum alginat ve poli(akrilamid-ko-akrilik asit) hidrojeline ikili immobilize edilen enzim için 1 saatlik inkübasyon süresi sonunda 45 °C 'deki kalan aktivite başlangıçtaki aktivitenin serbest enzim için % 50, kalsiyum alginat için % 60 ve poli(akrilamid-ko-akrilik asit) hidrojeli için ise % 70 'i kadar olduğunu gözlemişlerdir. 65 °C 'de ise bu değerlerin % 17, 23 ve 30 olduğu belirlenmiştir. Bu durumda immobilize enzimin düşük oranda denatürasyona uğradığı düşünülmüştür. (Yahsi, vd., 2005). Diğer bir çalışmada alginata tutuklanmış mantar tirozinazının aktivitesi 20 °C 'de stabil kalmıştır. 20 - 30 °C aralığında aktivitesinin % 20 azaldığı ve 30 - 60 °C aralığında ise kalan aktivitesini koruduğu belirlenmiştir. (Munjal ve Sawhney, 2002).

V_{max} reaksiyon hızı ve K_m Micheals Menten sabiti Lineweaver - Burk grafiğinden yararlanılarak bulunmuştur. K_m enzimin substrata olan ilgisiyle ters orantılı bir parametredir (Yıldız vd., 2006). K_m kinetik sabiti enzim ile substrat arasındaki ES kompleksinin sağlamlık ölçüsüdür. Bu değer küçüldükçe enzim ve substrat o kadar zor dissosiyasyon olur. V_{max} sabiti ise enzimin aktifliğinin bir ölçüsüdür. Enzim ne kadar aktif ise V_{max} o derece yüksektir. Serbest enzim ve alginat boncuklarında tutuklanan enzimin krezolaz aktivitesine ait K_m ve V_{max} kinetik sabitleri sırasıyla 1.58×10^{-3} mM ile 142.85 U/mL'de ve 1.92×10^{-3} mM ile 99 U/mL'de olarak hesaplanmıştır. Aynı değerleri alginat + karragenan boncuklarında 5.0×10^{-3} mM ile 111.1 U/mL'de olarak bulunmuştur. Öte yandan kateşolaz aktivitesinde serbest enzim ve alginat boncuklarında

tutuklanan enzimin K_m ve V_{max} kinetik sabitleri sırasıyla 2.32×10^{-3} mM ile 1613 U/mL'de ve 6.66×10^{-3} mM ile 1000 U/mL'de olarak hesaplanmıştır. Bu değerler alginat + karragenan boncuklarda 8.0×10^{-3} mM ile 1282 U/mL'de olarak bulunmuştur. Serbest enzimle karşılaştırıldığında krezolaz aktivitesi için özellikle alginat + karragenan jellerde immobilize enzimin çok düşmüş olan K_m değeri, immobilize boncukların iyi bir ara ürün kompleksi oluşturduğunu düşündürmektedir.

İmmobilize formlarda K_m değerinin artması enzimin substratına karşı serbest enzimden daha düşük bir affiniteye sahip olduğunu açıkça gösterir. Katı bir destek üzerine immobilize edilmiş serbest enzim için farklı kinetik davranışlarının birkaç sebebi olduğu gözlenmiştir: Öncelikle immobilizasyon, enzimin molekül yapısında bazı konformasyonel değişimlere neden olabilir. İkinci olarak, immobilize enzim serbest çözeltide olduğundan farklı bir ortama yerleştirilmiştir ve bu kinetik üzerine belirgin bir etki edebilir. Son olarak, çözelti ve destek arasında bir bölünme vardır bu nedenle enzimin çevresindeki substrat konsantrasyonu toplam çözelti hacminden önemli derecede farklı olabilir (Şahin vd., 2005).

Palmieri vd. Cu - alginat jelde immobilize ettikleri PFO için ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sülfonikası) substratı kullanarak kinetik sabitlerini belirlemişlerdir. Serbest enzim için K_m değeri 0.28 mM ve V_{max} değeri ise 3.6×10^{-3} mM/dk, immobilize enzim için K_m değeri 0.3 mM ve V_{max} değeri de 5.7×10^{-3} mM/dk olarak bulunmuştur ve bu değerlerin serbest ve immobilize enzim için çok benzer olduğunu görmüştür. Ca - alginat ve alginat/ κ -karragenan içerisinde immobilize enzimin K_m değeri sırasıyla 8.68 mM ve 12.7 mM, V_{max} değerleri de 39.7 ve 52.9 mM/dk olarak bulunmuştur. Serbest enzimin K_m değeri 6.35 mM ve V_{max} değeri de 50 mM/dk'dır (Şahin vd., 2005).

Biyokatalizör serbest enzim formunda kullanıldığında biyokatalizörün yeniden kullanılabilirliğinden söz edilemez. Bu nedenle endüstriyel açıdan önemli enzimler için immobilizasyon formları tasarlanmakta ve bu formlar ile üretim çalışmaları planlanmaktadır. Alginat ve alginat + karragenan boncuklara immobilize enzim polifenol oksidazının yeniden kullanılabilirlik çalışmasında alginat boncuklar her iki aktivite için 10 kez aktif halde kullanılabilirliği gözlenmiştir. Boncukların katekolaz aktivitesini 8 döngü süresince tamamen koruduğu, 9. ve 10. döngülerde başlangıçtaki

yaklaşık % 40 aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Krezolaz aktivitesi için de 8 döngü süresince aktivitesinin yaklaşık % 80 - 90 'ını, 10. döngüde % 56 'sını koruduğu gözlenmiştir (Şekil 4.26). Alginat + karragenan boncuklarda ise kateşolaz aktivitesinde önemli oranda artış gözlenmiştir. 5. döngüde aktivite yaklaşık 3 kat artarken, 8. döngüde aktivitenin % 65 'inin korunduğu görülmüştür. Boncuklar 3 döngüde krezolaz aktivitelerini korurken 7. döngü sonunda aktivitenin yine % 65 olduğu görülmüştür (Şekil 4.27). Bu artışın nedeni tam olarak açıklanamasa da boncukların aktivite ölçümleri arasında saf suyla birkaç kez yıkanmalarına rağmen boncukların üzerinde substrat ve ürün birikmeleri olabileceği ve bu yüzden aktivitede yanıltıcı bir artış olabileceği düşünülmüştür.

Serbest enzim çözeltisi depolama sırasında genelde kararlı değildir ve aktivitesi yüksek oranda azalır (Şahin vd., 2005). İmmobilizasyon, tutuklanan enzimi (aktivite kaybında kabul edilebilir bir fark olmadan) serbest enzime oranla daha uzun bir süre depolanmasına imkan kılar. Periyodik aralıklarla yapılan ölçümler sonucunda alginat jelde tutuklanan immobilize enzimin yaklaşık 30 gün boyunca her iki aktivitesini de kaybetmeden uzun süre kullanılabilirliği gözlenmiştir (Şekil 4.28 ve 4.29). 4 °C 'de depolanan serbest enzim çözeltisi için 20 gün boyunca kateşolaz ve krezolaz aktivitesi ölçümleri yapılmış, kateşolaz aktivitesi için ilk 15 günden sonra aktivitenin yaklaşık % 45 azaldığı gözlenmiştir. Krezolaz aktivitesi için ise ilk 7 gün boyunca birbirine yakın aktivite değerleri gözlenirken, sonraki günlerde yüksek aktivite sonuçları gözlenmiştir. Bu sürelerin sonunda her iki aktivite için enzim çözeltisinde mikrobiyal üreme olabileceği düşünülerek aktivite tayini sona erdirilmiştir. Enginar polifenol oksidazının depolama kararlılığının immobilizasyon ile arttığı bulunmuştur. Alginat + karragenan jelde tutuklanan immobilize formun her iki aktivitelerinin ise benzer değerlerde olduğu gözlenmiştir.

Substrat olarak tirozin kullanılarak gerçekleştirilen dönüşüm çalışmasında ilk 25 dakikada başlangıçtaki tirozin miktarının % 55 'inin L- DOPA 'ya dönüştüğü, 125. dakikada bu miktarın % 90 olduğu görülmüştür. Devam eden reaksiyonda ortamda kalan tirozinin daha yavaş bir reaksiyon hızıyla da olsa L- DOPA 'ya dönüşmekte olduğu grafikten görülmüştür (Şekil 4.30).

Sonuç olarak; bu tez kapsamında; enginar PFO 'ı izole edilmiş ve tutuklama yöntemiyle alginat ve alginat + karragenan jellere başarıyla immobilize edilmiş, optimum çalışma koşulları belirlenmiştir. Çalışmanın devamında, alginat ve alginat + karragenanda tutuklanmış enginar PFO 'ları için basit reaktör tasarımları ve optimize edilmiş bu reaksiyon koşullarında reaktörlerde L- Tirozin 'den L- DOPA retim verimi HPLC yöntemiyle incelenmesi düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. (<http://www.ebi.ac.uk>)
2. Ates, S., Cortenlioglu, E., Bayraktar, E., Mehmetoglu, U., 2006, "Production of L-DOPA using Cu-alginate gel immobilized tyrosinase in a batch and packed bed reactor", *Enzyme and Microbial Technology*, **40(4)**, 683-687.
3. Aydemir, T., & Akkanli, G. (2006). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from celery root (*Apium graveolens L.*) and the investigation of the effects on the enzyme activity of some inhibitors, *International Journal of Food Science and Technology*, 41(9), 1090-1098.
4. Aydemir, T., (2004). "Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus L.*) heads. *Food Chemistry*, 87(1), 59-67.
5. Batra, R., Gupta, M. N., (1994), "Non-covalent immobilization of potato (*Solanum tuberosum*) polyphenol oxidase on chitin" *Biotech. Appl. Biochem.*, **19**, 209-215.
6. Beena, P., & Gowda, L. R. (2000). Purification and characterization of a polyphenol oxidase from the seeds of field bean (*Dolichos lablab*). *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 48, 3839-3846.
7. Bickerstaff, G.F., 1997 "Immobilization of enzymes and cells", *Methods in enzymology*, Humana Press, New Jersey, 1-11.
8. Burton, S.G., Duncan, J. R., Kaye, P. T., Rose, P. D., (1993), "Activity of mushroom polyphenol oxidase in organic medium", *Biotechnology and Bioengineering*, **42**, 938-944.
9. Buttersack, C., Nowikow, K., Schaper, A. Ve Buchholz, C., (1994), "Enzyme production from sugarbeets", *Zuckerind*, **119 (4)**, 284-291.
10. Carvalho, G.M.J., alves, T.L.M., Freire, D.M.G., 2000, L-DOPA production by immobilized tyrosinase, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84-86, 791-800.
11. Cho, Y. K., & Ahn, H. K. (1998). Purification and characterization of polyphenol oxidase from potato: I. Purification and properties. *Journal of Food Biochemistry*, 23, 577-592.

12. Dessai, P. D., Dave, A. M, Devi, S., (2004), "Entrapment of lipase into κ -carrageenan beads and its use in hydrolysis of olive oil in biphasic system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **V 31**, 143-150.
13. Dinçkaya, E., (1996), "Genel metodlar" Protein Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu, 22-28 Eylül 1996, Çeşme-İZMİR, 27.
14. Doğan, S., Turan Y., Ertürk, H., & Arslan, O. (2005). Characterization and purification of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 53(3), 776-785.
15. Erzenin, M., (2002), "Farklı kaynaklardan affinite kromatografisi ile polifenol oksidaz enziminin saflaştırılması kinetik ve elektroforetik özelliklerinin incelenmesi", Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
16. Espin, J. C., Tudela, J., & Canovas, F. G. (1997). Monophenolase activity of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads. *Lebensm.-Wiss. u.-Technology*, 30, 819-825.
17. Estrada, P., Sanchez-Muniz, R., Acebal, C., Arche, R., Castillon, M. P., (1991), "Characterization and optimization of immobilized polyphenol oxidase in low water organic solvents", *Biotech. and Applied Biochemistry*, **14**, 12-20.
18. Fraser, J.E., Bickerstaff, G.F., 1997 "Entrapment in Calcium Alginate", *Methods in enzymology*, Humana Press, New Jersey, 61-65.
19. Galeazzi, M. A. M., Sgarbieri, V. C. & Costantinides, S. M. (1981). Isolation, purification and physicochemical characterization of polyphenol oxidase (PPO) from a dwarf variety of banana (*Musa cavendishii* L.). *Journal of Food Science*, 46, 150-155.
20. Gilabert, M. P., & Carmona, F G. (2000). Characterization of catecholase and cresolase activities of eggplant polyphenol oxidase. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 48, 695-700.
21. Halim, D.H., Montgomery, M.W., (1987), "Polyphenol oxidase of d'Anjou pears (*Pyrus communis* L.)", *Journal of food Science*, **43**, 603-608.
22. Hamarat Baysal, Ş., Karagöz, R. (2005) Preparation of characterization of κ -carrageenan immobilized urease. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 35, 135-143.

23. Ho, P.Y., Chiou, M.S., Chao, A.C., 2003, Production of L-DOPA by tyrosinase immobilized on modified polystyrene, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 111, 139-152.
24. Iborra, J.L., Manjon, A., Canovas, M., 1997 “Immobilization in Carrageenans”, *Methods in enzymology*, Humana Press, New Jersey, 53-60.
25. Keleş, F., (1987), “Gıdalarda enzimatik esmerleşme ve kontrolü”, *Doğa Dergisi*, 11, 105-121.
26. Lattanzio, V., Cardinali, A., Divenere, D., Linsalata, V., Palmieri, S., (1994). Browning phenomena in stored artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads-Enzymatic or chemical reactions. *Food Chemistry*, 50 (1), 1-7.
27. Leoni, O., Palmieri, S., Lattanzio, V., Sumere, & C. F. V. (1990). Polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Food Chemistry*, 38, 27-39.
28. Leventer, D., (2005), “Enginardan polifenoloksidaz enziminin izolasyonu, saflaştırılması ve bazı özelliklerinin incelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
29. López-Molina, D., Hiner, A. N. P., Tudela, J., García-Cánovas, F., & Rodríguez-López J. N., (2003). Enzymatic removal of phenols from aqueous solution by artichoke (*Cynara scolymus* L.) extracts. *Enzyme and Microbial Technology*, 33(5), 738-742.
30. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.;Randall, R.J. 1951, Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
31. Mammarella, E.J., Rubiolo, A.M., (2005), Study of the deactivation of β -galactosidase entrapped in alginate-carrageenan gels, *Journal of Molecular Catalysis: Enzymatic*, 34, 7-13.
32. Manjon, A., Ferragut, J. A., Garcia-Borron, J. C., Iborra, J. L., (1984), “Conformational studies of soluble and immobilized frog epidermis tyrosinase by fluorescence”, *Applied Biochem. and Biotech.*, 9, 173-185.
33. Mazzei, F., Botre, F., Lanzi, M, Lorenti, G., Porcelli, F. Ve Botre, C., (1992), “Plant methobolism as an analytical tool: some applications of plant tissue electrodes for the selective determination of catecholamines”, *Sensors and Actuators*, 7, 427-430.

34. Munjal, N., Sawhney, S.K., 2002, Stability and properties of mushroom tyrosinase entrapped in alginate, polyacrylamid, and gelatin gels, *Enzyme and Microbial Technology*, 30, 613-619.
35. Naidja, A., Huang, P.M., Bollog, J.M., (1997), "Activity of tyrosinase immobilized on hydroxylaluminum-Montmorillonite complexes", *Journal of Molecular Catalysis*, **115**, 305-316.
36. Palmieri, G., Giardina, P., Desiderio, B., Marzullo, L., Giamberini, M., Sonnia, G., 1994, A new enzyme immobilization procedure using cupper alginate gel: Application to a fungal phenol oxidase, *Enzyme and Microbial Technology*, 16, 151-158.
37. Park, E. Y., & Luh, B. S. (1985). Polyphenol oxidase of kiwifruit. *Journal of Food Science*, 50, 678-684.
38. Payne, G. F., Sun, W. Q., Sohrabi, A., (1992), "Tyrosinase reaction/chitosan adsorbtion for selectively removing phenol from aqueous mixtures". *Biotechnology and Bioengineering*, **40**, 1011-1018.
39. Pialis, P., Jimenez Hamann, M.C., Saville, B.A., 1996, L-DOPA production from Tyrosinase immobilized on Nylon 6,6, *Biotechnology and Bioengineering*, 51, 141-147.
40. Pierluigi, M., & Piergiorgio, P. (2000). Electrospray characterization of selected medicinal plant extracts. *J Pharmaceut Biomed*, 23, 61-68.
41. Sarkar, J. M., Leonowicz, A., Bollog, J. M., (1989), "Immobilization of enzymes on clays and soils", *Soil Biol. Biochem.*, **21 (2)**, 223-230.
42. Schiller, J.G., Liu, C.C., 1976, Immobilization of tyrosinase within polyacrylamide gels, *Biotechnoolgy and Bioengineering*, XVIII, 1405-1412.
43. Schütz, K., Persike, M., Carle, R., & Schieber, A. (2006). Characterization and quantification of anthocyanins in selected artichoke (*Cynara scolymus* L.) cultivars by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ. *Anal Bioanal Chem* 384: 1511-1517.
44. Seetharam, G., Saville, B.A., 2002, L-DOPA production from tyrosinase immobilized on zeolite, *Enzyme and Microbial Technology*, 1, 747-753.
45. Singh, N., Singh, R., Kaur, K., & Singh, H. (1999). Studies of the physico-chemical properties and polyphenol oxidase activity in seeds from hybrid

- sunflower (*Helianthus annuus*) varieties grown in India. *Food Chemistry*, 66, 241-247.
46. Smith, M. R., Ratledge, C., ve Crook, S.; (1990), "Properties of cyanogen bromide-activated, agarose-immobilized catechol 1,2-dioxygenase from freeze-dried extracts of *Nocardia* sp. NCIB 10503", *Enzyme Microb. Technol.*, **12**, 945-949.
 47. Şahin, F., Demiral, G., Tümtürk, H., 2005, A novel matrix for the immobilization of acetylcholinesterase, *International Journal of Biological Macromolecules*, 37, 148-153.
 48. Şakiroğlu, H., Küfrevioğlu, O., Kocaçalışkan, I., Oktay, M., & Onganer, Y. (1996). Purification and characterization of dog-rose (*Rosa dumalis* Rechst.) polyphenol oxidase. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 44, 2982-2986.
 49. Tarhan, L., 1997, "Ekstaktın deriştirilmesi" Enzimoloji Lisansüstü Yaz Okulu Kuşadası-AYDIN, 78-108.
 50. Telefoncu, A., 1997, "İmmobilize enzimler" Enzimoloji Lisansüstü Yaz Okulu Kuşadası-AYDIN,193-247.
 51. Vamos-Vigyazo, L., (1981), "Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables", *CRC Critical Rewievs in Food Science and Nutrition*, **14**, 49-129.
 52. Vilanova, E., Manjon, A., Iborra, J.I., 1984, Tyrosine Hydroxylase activity of immobilized tyrosinase on Enzacryl-AA and CP-AA supports: Stabilization and properties, *Biotechnology and Bioengineering*, XXVI, 1306-1312.
 53. Wada, S, Ichikawa, H., Tatsumi, K., 1992, Removal of phenols with tyrosinase immobilized on magnetite, *Wat. Sci. Tech.*, **26(9-11)**, 2057-2059.
 54. Wada, S., Ichikawa, H., Tatsumi, K., (1993), "Removal of phenols from wastewater by soluble and immobilized tyrosinase", *Biotechnology and Bioengineering*, **42**, 854-858.
 55. Wisseman, K. W., & Montgomery, M. W. (1985). Purification of d'Anjou pear (*Pyrus communis* L.) polyphenol oxidase. *Plant Physiology*, 78, 256-262.

56. Yagar H., (2004). Some biochemical properties of polyphenol oxidase from celery. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 34(4), 387-397.
57. Yagar, H., & Sagiroglu, A. (2002). Partially purification and characterization of polyphenol oxidase of quince. *Turkish Journal of Chemistry*, 26(1), 97-103.
58. Yahsi, A., Sahin, F., Demirel, G., Tümtürk, H. 2005, Binary immobilization of tyrosinase by using alginate gel beads and poly(acrylamide-co-acrylic acid) hydrogels, *International Journal of Biological Molecules*, 36, 253-258.
59. Yang, C. P., Fujita, S., Ashrafuzzaman, M. D., Nakamura, N., & Hayashi, N. (2000). Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum L.*) Pulp. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 48, 2732-2735.
60. Yıldız, H. B., Kiralp, S., Toppare, L., Yagci, Y. (2005), "Immobilization of tyrosinase in poly(ethyleneoxide) electrodes and determination of phenolics in red wines" *Reactive and Functional Polymers*, 63, 155-161.
61. Yıldız, H. B., Toppare, L., Hepuzer Gursel, Y. Yagci, Y. (2006), "Immobilization of polyphenol oxidase in conducting graft copolymers and determination of phenolic amount in red wines with enzyme electrodes" *Enzyme and Microbial Technology*, 39(4), 945-948.
62. Ziyen, E., & Pekyardımcı, Ş., (2001). Characterization of polyphenol oxidase from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*). *Turkish Journal of Chemistry*, 27, 217-225.

7. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimle daha da yakından tanıma fırsatı bulduğum ve tez çalışmam boyunca beni destekleyen, sabırla bekleyen, tecrübesi, bilgisi, azmi ve çalışkanlığıyla her daim örnek alacağım sevgili danışman hocam Sayın Hülya YAĞAR'A,

Çalışmamın $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi ile ilgili bölümünde “soğutmalı santrifüjlerini” kullanmama izin veren Trakya Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı çalışanlarına,

Bölümdeki tüm hocalarıma,

Bu uzun süre boyunca yanımda olan ve desteğini esirgemeyen biyokimya ve diğer anabilimdallarında yüksek lisans yapan tüm arkadaşlarıma,

Edirne'lere bile gelip orada da bana yardımcı olan ve manevi desteklerini sürekli hissettiren çocukluk arkadaşlarım Lütfiye ve Sebahat'a,

Yazım aşamasında yardımcı olan minik yardımcım, bitanem Aysun'a

Tez çalışmam için enginar bulmada yardımcı olan ve çalışmam süresince desteğini asla esirgemeyen Neco'ya,

Bugünlere gelmemi sağlayan, her başarımda gözlerindeki gururlu mutluluğu her defa görebileceğim sevgili aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Selin KOCATÜRK

8. ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Lüleburgaz'da doğdum. İlk öğrenimi Lüleburgaz, orta öğrenimimi Silivri'de tamamladım. 2001 yılında Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümün'de lisans eğitimime başladım. 2005 yılında mezun oldum. Aynı yıl gıda sektöründe nişasta üretimi yapan bir firmada bir süre çalıştım. Bir süre de MEB'e bağlı olarak ücretli fen bilgisi öğretmenliği yaptım. 2006 yılında Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilimdalı Biyokimya Bölümü'nde yüksek lisans eğitimime başladım.

2007 yılında özel bir çevre laboratuvarında kimyager olarak çalışmaya başladım halen devam ediyorum.

Selin KOCATÜRK