

**T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI**



**MUZ POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN  
İMMOBİLİZASYONU VE BAZI ÖZELLİKLERİNİN  
İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ŞEYMA ERİK**

**BALIKESİR, MAYIS - 2016**

**T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI**



**MUZ POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN  
İMMOBİLİZASYONU VE BAZI ÖZELLİKLERİNİN  
İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ŞEYMA ERİK**

**Jüri Üyeleri : Doç. Dr. Nahit GENÇER (Tez Danışmanı)**

**Prof. Dr. Oktay ARSLAN**

**Yrd. Doç. Dr. Dudu DEMİR**

**BALIKESİR, MAYIS - 2016**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

ŞEYMA ERİK tarafından hazırlanan “MUZ POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU VE BAZI ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 30.05.2016 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.




Jüri Üyeleri

İmza

Danışman  
Doç.Dr Nahit GENÇER

Üye  
Prof. Dr Oktay ARSLAN

Üye  
Yrd. Doç. Dr Dudu DEMİR

  
.....  
  
.....  
  
.....

Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Doç. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

**Bu tez çalışması Balıkesir Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma  
Projeler Birimi tarafından 2016/142 nolu proje ile desteklenmiştir.**

## ÖZET

**MUZ POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU VE  
BAZI ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
ŞEYMA ERİK  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI  
(TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR NAHİT GENÇER)**

**BALIKESİR, MAYIS - 2016**

Bu çalışmada; Sepharose 4B-L-tirozin-*p*-aminobenzoik asit afinite jeli kullanılarak polifenol oksidaz (PPO) enzimi muz (*Musa cavendishii*) meyvesinden saflaştırılmıştır. Saflaştırılan PPO enziminin  $\omega$ -aminoheksil agaroz jeli üzerine glutraldehit ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen immobilize enzimin optimum pH ve sıcaklık,  $K_m$  ve  $V_{max}$  sabitleri, termal kararlılık, depo kararlılığı gibi bazı biyokimyasal özellikleri belirlendi ve serbest enzimle karşılaştırıldı. İmmobilize ve serbest enzimin  $K_m$  değerleri sırasıyla 12 mM, 13.8 mM ile  $V_{max}$  değerleri sırasıyla 84724.22 U/mL'de, 37887 U/mL'de olarak elde edilmiştir.

PPO'nun klasik inhibitörlerinden olan *p*-aminobenzoik asit, kafeik asit, kojik asit, L-askorbik asit ve gallik asitin serbest ve immobilize enzim üzerine inhibisyon etkileri çalışıldı. *p*-aminobenzoik asit ve kafeik asit immobilize enzim için daha kuvvetli bir inhibitör iken gallik asit ise serbest enzim için daha kuvvetli bir inhibitördür. L-askorbik asit ve kojik asit inhibitörleri ise her iki enzim içinde benzer etki göstermiştir. Yapılan inhibisyon çalışmasının tamamına bakıldığında; L-askorbik asit serbest ve immobilize enzim için en kuvvetli inhibitör olarak belirlenmiştir.

**ANAHTAR KELİMELELER:** Polifenol Oksidaz Enzimi (PPO), Fenolik bileşikler, İnhibisyon, Afinite kromatografisi, İmmobilizasyon

## ABSTRACT

### IMMOBILIZATION OF BANANA POLYPHENOL OXIDASE ENZYME AND INVESTIGATION OF ITS SOME PROPERTIES

MSC THESIS

ŞEYMA ERİK

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

CHEMISTRY

(SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. NAHİT GENÇER )

BALIKESİR, MAY 2016

In this study, polyphenol oxidase enzyme (PPO) were purified from banana (*Musa cavendishii*) by using affinity gel comprised of Sepharose 4B-L-tyrosine-*p*-amino benzoic acid. The immobilization of the purified PPO enzyme with glutaraldehyde was performed on  $\omega$ -aminoethyl agarose gel.

Some of properties of obtained immobilized enzyme such as optimum pH and temperature, kinetic parameters ( $K_m$  and  $V_{max}$ ), thermal stability, storage stability were determined and compared to its free enzyme.  $K_m$  values of immobilized and its free enzyme were obtained 12 mM, 13.8 mM, respectively.  $V_{max}$  values of immobilized and its free enzyme were obtained 84724.22 U/mLmin, 37887 U/mLmin, respectively.

Inhibitory effects were studied on the immobilized enzyme and its free enzyme of *p*-aminobenzoic acid, caffeic acid, kojic acid, L-ascorbic acid and gallic acid which are the classic inhibitors of PPO. While *p*-aminobenzoic acid and caffeic acid being a more powerful inhibitor for immobilized enzyme, gallic acid is a more powerful inhibitor for free enzyme. As for the inhibitors which are L-ascorbic acid and kojic acid found to have the same effect for both free immobilized enzyme. According to the complete inhibition study, L-ascorbic acid has been determined as the most powerful inhibitor for both free and immobilized enzyme.

**KEYWORDS:** Polyphenol Oxidase enzyme (PPO), Phenolic Compounds, Inhibition, Affinity Chromatography, Immobilization

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
İÇİNDEKİLER .....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ .....	vi
SEMBOL LİSTESİ.....	vii
ÖNSÖZ.....	viii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1 Polifenol Oksidaz Enziminin Biyokimyası .....	2
1.1.1 Polifenol Oksidaz Enziminin Adlandırılması .....	2
1.1.2 Polifenol Oksidaz Enziminin Doğada Bulunuşu ve Molekül Yapısı. 2	
1.1.3 Polifenol Oksidaz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar ve Mekanizması .....	3
1.1.4 Polifenol Oksidaz Enziminin Substratları.....	6
1.1.5 Polifenol Oksidaz Enziminin Tıptaki Kullanım Alanları.....	7
1.1.6 Polifenol Oksidaz Enziminin Endüstride Kullanım Alanları.....	8
1.2 Enzim İmmobilizasyonu.....	9
1.2.1 İmmobilizasyon Yöntemleri.....	10
1.2.1.1 Tutuklama .....	12
1.2.1.2 Çapraz Bağlama .....	13
1.2.1.3 Taşıyıcı Bağlama.....	14
1.2.2 İmmobilize Enzimin Özellikleri.....	19
1.2.3 PPO Enziminin İmmobilizasyonu İle İlgili Çalışmalar .....	20
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....</b>	<b>24</b>
2.1 Materyaller .....	24
2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	24
2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar.....	25
2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması .....	25
2.2 Yöntemler .....	29
2.2.1 Ham Ekstraktın Hazırlanması .....	29
2.2.2 Amonyum Sülfat Çöktürmesi .....	30
2.2.3 Diyaliz.....	30
2.2.4 PPO Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması.....	31
2.2.4.1 Afinite Jelinin Hazırlanması .....	31
2.2.4.2 PPO'ın Afinite Kolonuna Tatbiki ve Enzimin Elüsyonu.....	32
2.2.5 SDS-PAGE ile Enzim Saflığının Kontrolü .....	33
2.2.6 Protein Tayini.....	34
2.2.6.1 Kalitatif Protein Tayini .....	34
2.2.6.2 Bradford Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini .....	34
2.2.7 Saflaştırılan Enzimin İmmobilizasyonu .....	35
2.2.8 İmmobilize ve Serbest Enzimin Aktivite Tayini.....	37
2.2.9 İmmobilize ve Serbest Enzimin Zaman, Sıcaklık, pH Değişimleri ile Termal Stabiliteleri.....	37
2.2.9.1 İmmobilize ve Serbest Enzimin Termal Stabiliteleri.....	37
2.2.9.2 İmmobilize ve Serbest Enzimin Optimum pH Çalışmaları.....	37

2.2.9.3	İmmobilize ve Serbest Enzimin Optimum Sıcaklık Çalışmaları	38
2.2.10	Optimum Şartlarda $K_m$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunması	38
2.2.11	İmmobilize ve Serbest Enzim Üzerine Bazı İnhibitörlerin $IC_{50}$ Değerlerinin bulunması	38
2.2.12	Serbes ve İmmobilize Enzimin Depolama Kararlılığı	38
<b>3.</b>	<b>BULGULAR</b>	<b>39</b>
3.1	Enzimin Saflaştırılması	39
3.2	Kantitatif Protein Tayini için Hazırlanan Standart Eğri	41
3.3	İmmobilizasyon Veriminin Hesaplanması	41
3.4	Polifenol Oksidaz Enziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi	42
3.5	Polifenol Oksidaz Enziminin İmmobilizasyonu	43
3.6	Optimum Şartlarda Serbest Enzimin $K_m$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunması	44
3.7	İmmobilize Enzimin $K_m$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunması	45
3.8	İmmobilize ve Serbest Enzimin Termal Stabilitesi	47
3.9	Serbest ve İmmobilize Enziminin Aktivitelerinin pH ile Değişimleri	48
3.10	Serbest ve İmmobilize Enziminin Aktivitelerinin Sıcaklıkla Değişimi	49
3.1	Serbest ve İmmobilize Enziminin Depolama Kararlılığı	50
3.1	Serbest ve İmmobilize Enzimin Farklı İnhibitörler için $IC_{50}$ Değerlerinin Bulunması	50
<b>4.</b>	<b>SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>57</b>
<b>5.</b>	<b>KAYNAKLAR</b>	<b>63</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 1.1: Vamos Vigyazo tarafından önerilen polifenol oksidaz enzimi katalizi.	3
Şekil 1.2: Polifenol Oksidaz enziminin kresolaz aktivitesinin reaksiyon mekanizması.....	4
Şekil 1.3: Polifenol oksidazın katekolaz aktivitesinin mekanizması.....	5
Şekil 1.4: Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı.....	6
Şekil 1.5: İyonik bağlama, biyospesifik bağlama, adsorpsiyon ve şelat bağlama ile ilgili şematik gösterim (En: Enzim) (Cao, 2005).....	15
Şekil 1.6: Kovalent Bağın Enzim Aktivitesi Üzerine Olan Etkileri [41].	18
Şekil 1.7: İmmobilize polifenol oksidaz enzimi ile su arıtma tekniği.	22
Şekil 2.1: PPO'nun glutraldehit ile $\omega$ - Aminohexyl-Agorose jeline immobilizasyonu.	36
Şekil 3.1: Afinite kolonundan PPO enziminin elüsyonu.	40
Şekil 3.2: Bradford yöntemine göre protein standart grafiği.	41
Şekil 3.3: Sepharose 4B-L-tirozin- <i>p</i> -amino benzoik asit jeli ile saflaştırılan muz PPO enziminin SDS poliakrilamid jel elektroforezi.	42
Şekil 3.4: FT-IR spektrumu.	43
Şekil 3.5: Muz PPO enziminin katekol substratına karşı Linewear-Burk grafiği.	45
Şekil 3.6: Muz İmmobilize PPO enziminin katekol substratına karşı Linewear-Burk grafiği.	46
Şekil 3.7: Serbest ve İmmobilize enzimin 35 °C'de %Aktivite-Zaman grafiği.....	47
Şekil 3.8: Serbest ve İmmobilize enzimin 50 °C'de % Aktivite- Zaman grafiği.	47
Şekil 3.9: Serbest ve İmmobilize enzimin 70 °C'de % Aktivite-Zaman grafiği.	48
Şekil 3.10: Serbest ve İmmobilize Enzimin Aktivite-pH Grafiği.....	48
Şekil 3.11: Serbest ve İmmobilize enzimin 10°C ve 70 °C' de aralığındaki sıcaklıkla değişimi.....	49
Şekil 3.12: Serbest ve immobilize enzimin depolama kararlılığı.	50
Şekil 3.13: İmmobilize Enzimin <i>p</i> -aminobenzoik asit inhibitörüne karşı % aktivite grafiği.	51
Şekil 3.14: Serbest Enzimin <i>p</i> -aminobenzoik asit inhibitörüne karşı % Aktivite grafiği.	51
Şekil 3.15: İmmobilize enzimin Kafeik Asit inhibitörüne karşı % Aktivite grafiği.	52
Şekil 3.16: Serbest enzimin Kafeik asit inhibitörüne karşı % Aktivite grafiği. ...	52
Şekil 3.17: İmmobilize enzimin Kojik asit inhibitörüne karşı % Aktivite grafiği.	53
Şekil 3.18: Serbest enzimin Kojik asit inhibitörüne karşı % Aktivite grafiği. ....	53
Şekil 3.19: İmmobilize enzimin L-askorbik asit inhibitörüne karşı % Aktivite grafiği.	54
Şekil 3.20: Serbest enzimin L-askorbik asit inhibitörüne karşı % Aktivite grafiği.	54
Şekil 3.21: İmmobilize enzimin Gallik Asit inhibitörüne karşı %aktivite grafiği.	55
Şekil 3.22: Serbest enzimin Gallik Asit inhibitörüne karşı % aktivite grafiği. ....	55

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 1.1:</b> İmmobilize enzimlerin teknik özellikleri.....	10
<b>Tablo 1.2:</b> İmmobilize enzim kullanılarak elde edilen önemli ürünler. ....	10
<b>Tablo 2.1:</b> SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları.28	
<b>Tablo 3.1:</b> PPO Enziminin Saflaştırma Tablosu.....	40
<b>Tablo 3.2:</b> İmmobilize enzimin % Verim hesabı. ....	42
<b>Tablo 3.3:</b> PPO enzimin katekol substratı kullanılarak $K_m$ ve $V_{max}$ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilenin hacimleri, U aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri.....	44
<b>Tablo 3.4:</b> Serbest enzimin $K_m$ ve $V_{max}$ değerleri. ....	45
<b>Tablo 3.5:</b> İmmobilize edilmiş PPO enzimin katekol substratı kullanılarak $K_m$ ve $V_{max}$ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilenin hacimleri, U aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri. ....	46
<b>Tablo 3.6:</b> İmmobilize enzimin $K_m$ ve $V_{max}$ değerleri. ....	46
<b>Tablo 3.7:</b> İnhibitörlerin serbest ve immobilize polifenol oksidaz enzimi için $IC_{50}$ değerleri.....	56

## SEMBOL LİSTESİ

<b>PPO</b>	:	Polifenol oksidaz enzimi
<b>U</b>	:	Enzim ünitesi
<b>SDS</b>	:	Sodyum dodesil sülfat
<b>PAGE</b>	:	Poliakrilamid jel elektroforezi
<b>TEMED</b>	:	N,N,N,N',-tetrametil etilendiamin
<b>IC<sub>50</sub></b>	:	Yüzde elli inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonu
<b>PEG</b>	:	Polietilen glikol
<b>K<sub>m</sub></b>	:	Enzimin substrata karşı ilgisinin bir ölçüsü
<b>V<sub>max</sub></b>	:	Enzimin aktif bölgesinin substratla tamamen dolu olduğu andaki hızı

## ÖNSÖZ

Çalışmalarımın ilk gününden itibaren anlayışını, ilgi ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Sayın Doç. Dr. Nahit Genç'er'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında her zaman destek olan, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım çok sevgili hocam Sayın Prof. Dr. Oktay Arslan'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisansımı yaptığım bu süreçte görüş ve düşünceleriyle beni destekleyen ve cesaretlendiren sevgili hocam Dr. Nurcan Dedeoğluna, bir telefon kadar uzağımda olan her zaman bana destek olan sevgili hocam Dr. Çiğdem Bilen'e, her zaman yanımda olan sevgili hocam Zübeyde Sackes'e, yardım ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili hocam Beste Şipal'e çok teşekkür ederim.

En sıkıntılı zamanlarımda yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen sevgili hocam Sayın Yrd. Doç, Dr. Başak Gökçe'ye çok teşekkür ederim.

Her zaman manevi desteğini gördüğüm, başım sıkışınca yanına gidebildiğim dünya tatlısı Yrd. Doç. Dr. Semra Işık'a biyokimya grubumuzdaki hocalarımız Doç. Dr. Serap Beyaztaş, Dr. Adem Ergün'e desteklerinden dolayı çok teşekkür ederim.

Bana evinin kapısını açan dertlerimi dinleyen sevgili dostum Sinem Sümersan'a, çektiğim bütün sıkıntıları sabırla dinleyen can dostlarım Zübeyde Şahin, Merve Sofuoğlu ve Türker Arpacı'ya ve bu süreçte yanımda olan diğer dostlarıma çok teşekkür ederim.

Telefonla aradığım da bir kere de beni mutluyken ara diyen dertlerimle üzölen ablam Gülcan Erik'e desteğinden dolayı çok teşekkür ederim.

Bana yardımcı olur musun dediğimde gece saat kaç olursa olsun yardım ve desteklerini gördüğüm abilerim Zafer Erik, Şemsettin Erik'e çok teşekkür ederim.

Son olarak Her zaman maddi ve manevi destek sağlayan sevgili annem Habibe Erik'e, sevgili babam Mehmet Emin Erik'e, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

# 1. GİRİŞ

Enzimlerin buldukları kaynaklardan saflaştırılması maliyet gerektiren bir işler. Saflaştırmanın zor olması ve endüstride kullanılacak olan enzimlerin daha uzun ömürlü ve daha kararlı olması için farklı yöntemlerle enzimlerin immobilize edilerek kullanılması gerekmektedir. Bu çalışmada daha önceden bilinen afinite jeli kullanılarak polifenol oksidaz enziminin saflaştırılması amaçlanmıştır. Elde edilen saf polifenol oksidaz enziminin bazı özelliklerinin incelenmesi ve immobilizasyonu amaçlanmıştır. Polifenol oksidaz ile yapılan bu çalışmada, enzimlerin  $\omega$ -Aminohexyl-Agrose'daki amin gruplarıyla bağlanması geleneksel glutaraldehit ile bağlanma metodu kullanılarak enzimin immobilizasyonu sağlanmıştır. Bu amaçla aşağıdaki hedefler belirlenmiştir.

- Muz meyvesinden bilinen afinite jeli ile polifenol oksidaz enziminin saflaştırılması,
- SDS (Sodyum dodesil sülfat) jel elektroforezi ile polifenol oksidaz enziminin yaklaşık moleköl ağırlıklarının tespit edilmesi,
- Saflaştırılan PPO enzimin,  $\omega$ - Aminohexyl-Agrose jel üzerine glutaraldehit ile kovalent bağlama sonucu immobilizasyonu,
- İmmobilize ve serbest enzimin optimum pH, sıcaklık,  $K_m$  ve  $V_{max}$  sabitleri, termal kararlılık ve depo kararlılığı gibi bazı biyokimyasal özelliklerinin bulunması,
- Serbest ve immobilize enzimin farklı inhibitörlere karşı ilgisinin araştırılması amaçlanmıştır.

## **1.1 Polifenol Oksidaz Enziminin Biyokimyası**

### **1.1.1 Polifenol Oksidaz Enziminin Adlandırılması**

Aktif merkezinde bakır bulunduran polifenol oksidaz enzimi oksidoredüktaz sınıfının bir üyesidir. Schoenbein tarafından 1856'da keşfedilmiş olup, tirozinaz, kresolaz, katekoloksidaz, katekolaz, o-difenoloksidaz, mono-fenoloksidaz ve fenolaz olarak da bilinir. Tirozinaz (Polifenol Oksidaz) Uluslararası Biyokimya Birliği'nin sınıflandırılmasına iki kez girmiştir. EC 1.10.3.1 (1,2-benzendiol: oksijen oksidoredüktaz) o-dihidroksifenollerini okside eder ve hidroksil grubundan hidrojenleri uzaklaştırarak benzokinonları oluşturur. EC 1.14.18.1 (monofenol, L-dopa:oksijen oksidoredüktaz) monohidroksifenollerini o-pozisyonuna hidroksil eder [1].

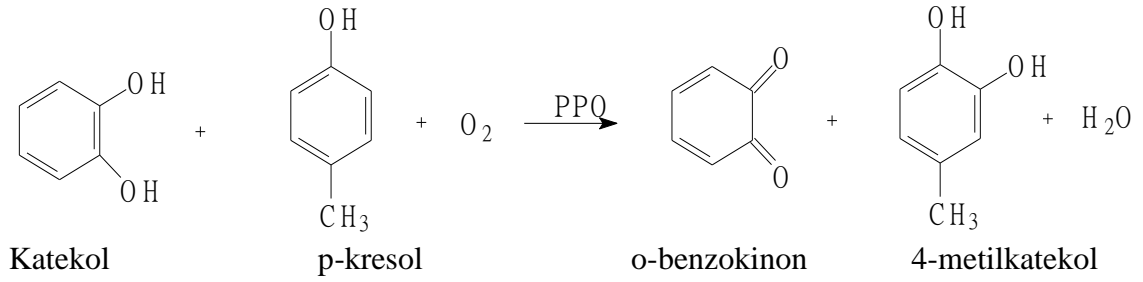
### **1.1.2 Polifenol Oksidaz Enziminin Doğada Bulunuşu ve Molekül Yapısı**

İlk olarak polifenol oksidaz enzimi 1856 yılında Schoenbein tarafından yemeklik mantarlarda bulunmuştur [2]. Tirozinaz doğada yaygın olarak bulunur. Tirozinazın bitkiler aleminde bulunmasının yanı sıra mikroorganizmalarda özellikle funguslarda, bazı hayvansal organlar ve ayrıca kabuklu deniz hayvanlarında bulunan bir enzimdir. Bunlara ek olarak bazı toprak türlerinde glikoz oksidaz gibi oksidoredüktaz enzimlerinin yanı sıra polifenol oksidaz enziminin varlığı ve aktivitesi bildirilmektedir [3-5].

Birçok kaynaktan elde edilen polifenol oksidaz enziminin farklı moleküler yapılarda olduğu bilinmektedir. Bu yapıların sayısı enzim kaynağına ve enzimin ekstraksiyonunda ve saflaştırılmasında uygulanan metotlara göre belirlenir [6]. Muz ve şeker kamışı kloroplastlardan elde edilen polifenol oksidaz enzimleri oldukça düşük molekül ağırlıklarına (12000-10000) sahipken, genelde polifenol oksidaz monomerinin 30000 dalton civarında molekül ağırlığına sahip olduğu ve bir bakır atomu içerdiği kabul edilir [7].

### 1.1.3 Polifenol Oksidaz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar ve Mekanizması

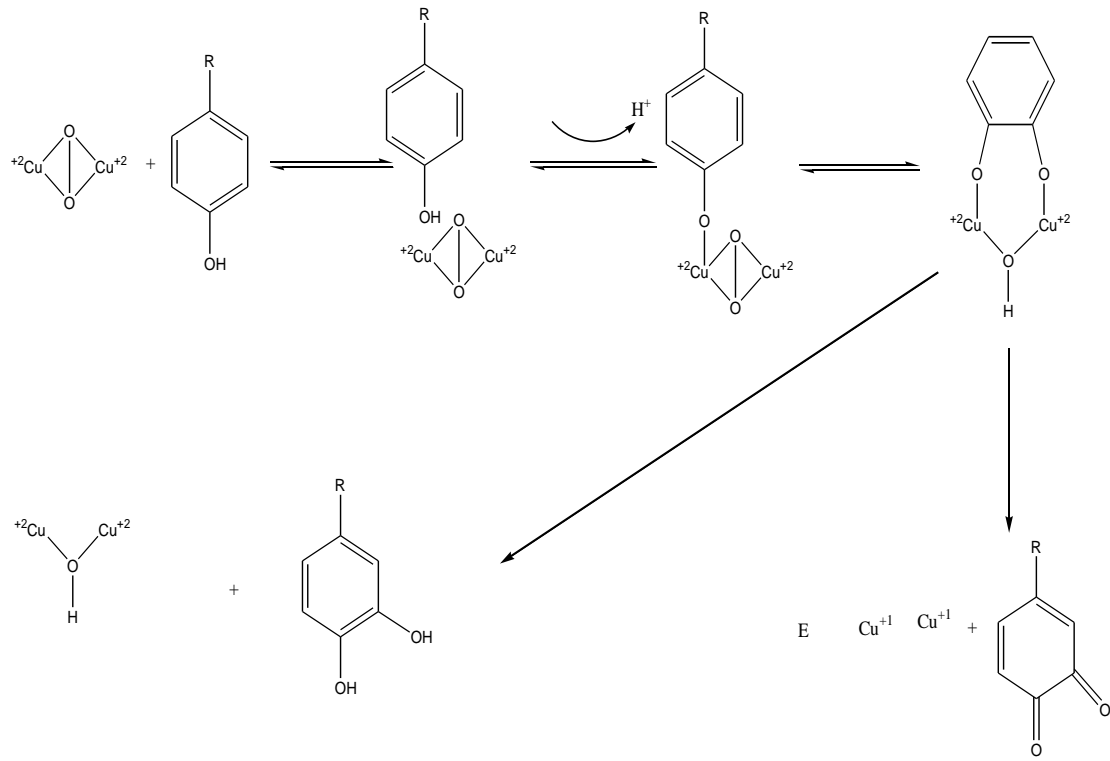
Polifenol oksidaz enziminin kataliz reaksiyonu Vamos-Vigyazo tarafından önerilmiş ve Şekil 1.1’ de verilmiştir.



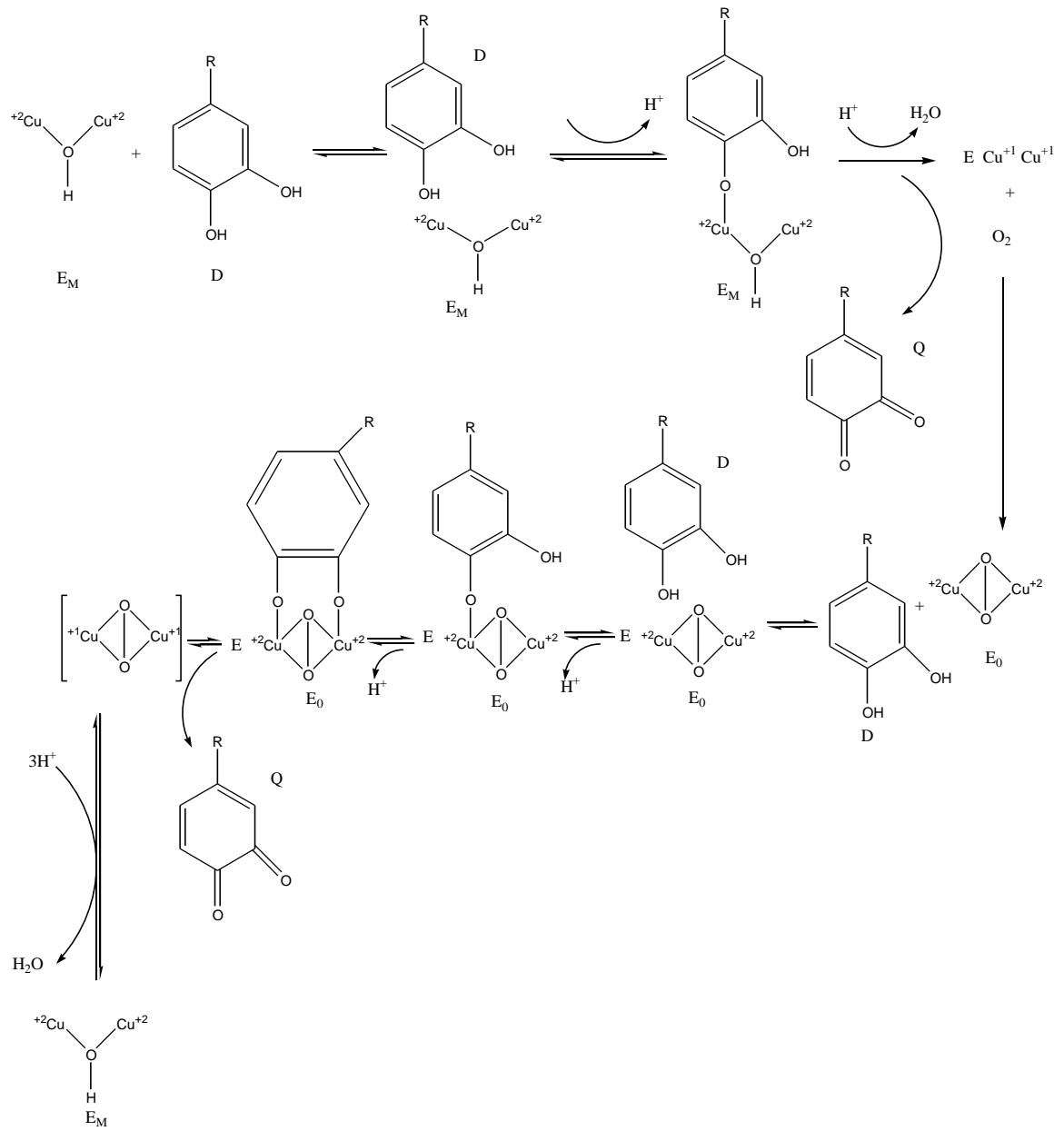
**Şekil 1.1:** Vamos Vigyazo tarafından önerilen polifenol oksidaz enzimi katalizi [6].

Polifenol oksidaz enzimi moleküler oksijen ihtiva eden iki farklı oksijen katalizler. Bunlardan birincisi monofenollerin o-difenollere o-hidroksilasyonu (kresolaz aktivitesi)’ dir. İkincisi ise o-difenollerin o-kinonlara oksidasyonu (katekolaz aktivitesi)’ dur [8].

Polifenol oksidaz enzimi tarafından katalizlenen monofenollerin hidroksilasyonu ve o-dihidroksi fenollerin o-kinonlara oksidasyonu için Wilcox, Solomon ve arkadaşları tarafından önerilen reaksiyon mekanizmaları Şekil 1.2 ve Şekil 1.3’ de verilmektedir [9].



**Şekil 1.2:** Polifenol Oksidaz enziminin kresolaz aktivitesinin reaksiyon mekanizması [9].



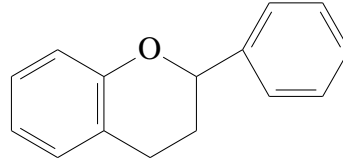
**Şekil 1.3:** Polifenol oksidazın katekolaz aktivitesinin mekanizması [9].

#### 1.1.4 Polifenol Oksidaz Enziminin Substratları

Meyve ve sebzeler çeşitli fenolik bileşik ihtiva ederler. Bununla birlikte bu bileşiklerin çok az bir kısmı PPO enzimine substrat olabilmektedir [10].

Polifenol bileşikleri meyve ve sebzelerde enzim katalizli reaksiyon sonucu renk bozulmalarına neden olur. Ayrıca meyvelerin tatlarına da etkileri vardır. Bu bileşikler enzimatik olmayan reaksiyonlarla da renk bozulmalarına neden olurlar. Polifenol bileşiklerinden bazıları oldukça kolay bir şekilde kendiliğinden otooksidasyona uğrar ve bunun sonucunda oluşan bileşikler polimerleşip koyu renkli makro molekülleri oluştururlar [11-12].

Birçok araştırmacı farklı bitki dokularındaki polifenol oksidaz enzimlerinin farklı substrat spesifikliğı ve inhibisyon derecesi gösterdiğini belirtmişlerdir [13]. Polifenol oksidaz enziminin meyve ve sebzelerdeki en önemli doğal substratları flavonoid tipi fenollerle basit fenollerdir (Şekil 1.4). Bu fenollerden bazıları; katekinler, tirozin, sinamik asit esterleri, DOPA (3,4-dihidroksifenil alanin), dopamin (3,4-dihidroksifenil etilamin)'dir [14].



Şekil 1.4: Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı.

Fenolik bileşikler doğal antimikrobiyal ajan ve hasat öncesi tohum çimlenme inhibitörleri olarak da davranırlar [15-16]. Ayrıca fenolik bileşikler nemli maddelerin, tanen ve ligninin doğal bozunmaları süresince herbisit ve insektisitlerin metabolik bozunmaları süresince oluşurlar [17].

Fenolik bileşikler, 50'den fazla kimyasalın üretimde rol oynar. Genel olarak reçinelerin, polimerlerin, boyaların, farmasotik ürünler ve herbisitlerin imalatında kullanılırlar [18].

Polifenollerin parçalanması sonucu oluşan bazı fenolik bileşiklerin düşük konsantrasyon seviyelerinde belirlenmesi, onların toksitesinin verilmesi açısından çok önemlidir. Fenolik bileşiklerin geneli bitki ve hayvanlar üzerinde zehirli etkilere sahiptirler ve akut çevresel problemlere sebep olabilirler. Fenolik bileşiklerden bazıları düşük konsantrasyon seviyelerinde bile sulara toksisite oluşturarak suda yaşayan organizmalar ve insan için dikkate alınacak ölçüde kirliliğe neden olduğu belirlenmiştir. Bu kirliliklerin izlenmesi ve kontrolü çevrenin korunması için oldukça önemlidir [19].

### **1.1.5 Polifenol Oksidaz Enziminin Tıptaki Kullanım Alanları**

Polifenol oksidaz enzimi, melanin oluşumunda görev alması sebebiyle tıbbi alanda dikkatleri üzerine çekmiştir. Suda çözünmeyen heteropolimer yapıdaki melanin, 5,6-dihidroksiindol ile 5,6-dihidroksiindol-2-karboksilik asit birimlerinden oluşur. Özellikle kozmetik sanayi tarafından güneşin ultraviyole ışığından korunmak gayesiyle üretilir. Bununla birlikte, bazı kanser türlerinde kanserli hücrede tirozinaz aktivitesinin oldukça arttığı gözlemlenmiştir. Bu kanser türlerinin tedavisinde polifenol oksidaz enziminin bu özelliğinden yararlanılması gündeme gelmiştir [20].

Memelilerde tirozinazın aktif biçimi melanositlerin içinde bulunan özelleşmiş sitoplazmik granüller olan melanozomlarda bulunur. Tirozinazın bir substratı olan 4-hidroksianizolün farelerde Harding-Pasey melonamasının gerilemesine neden olduğu belirlenmiştir [20].

Tirozinazın kullanıldığı diğer bir önemli alan parkinson hastalığının tedavisinde kullanılan L-DOPA'nın üretimidir [20].

### 1.1.6 Polifenol Oksidaz Enziminin Endüstride Kullanım Alanları

Günümüze kadar dünyada ve ülkemizde hızlı bir endüstriyel gelişim meydana gelmiştir. Bu gelişimde öncelik üretime verilmiş, fakat çevreye verilen atıkların çevre ve canlı hayatı üzerinde bıraktığı etkileri düşünülmemiştir. Çevreye atılan endüstriyel atıkların artmasıyla beraber atık türlerinde doygunluğa ulaşılmış bunun sonucunda da zararları görülmeye başlanmıştır. Çevreye atılan endüstriyel atıkların en önemlilerinden birisi de fenol ve fenol türevleridir [21].

Dünya ve ülkemizde önemli bir endüstriyel atık olan fenolün kullanım alanlarından en önemlisi fenolik reçine üretimidir. Bu fenolik reçineler, kauçuk işletme endüstrisi ve yalıtım ile yüksek sürtünmeye dayanıklı malzeme üretiminde, kağıt endüstrisinde kullanılmaktadır. Fenoller ise; ilaç endüstrisinde, temizlik ürünlerinin imalatında kullanılmaktadır [21].

Fenoller zehirli olduklarından dolayı tüm canlı hücre türlerine zarar verirler. Fenollerin fazla miktarları deri tarafından absorblanabilir. Fenolün varlığı, suda tat ve koku olarak anlaşılabilir. Fenollü suların içilmesi böbrek bozukluklarına, ağır sarsıntılara ve ölümlere sebep olabilir. Klor ihtiva eden fenollerin zehirleyici etkisi izomere bağlı olarak değişebilir [21].

Çevreye ve insan sağlığına zararları olan fenollerin ortadan kaldırılması için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Özellikle polifenol oksidaz çeşidi olan tirozinazın toksik olan fenolik bileşikleri kinonlara çevirerek uzaklaştırabileceği düşünülmüştür ve bu alanda geniş ölçüde çalışmalar yapılmıştır [21].

Araştırmalar neticesinde; Atlow ve arkadaşları endüstriyel atık sularından 0,01-1,0 g/L konsantrasyon aralığında ki fenollerin çöktürülerek başarıyla ortamdaki uzaklaştırılacağını söylemişlerdir. Fakat Wada ve arkadaşları bu araştırmacılar da ki sonuçlarla uyuşmayan yeni sonuçlar bildirmişlerdir. Wada ve arkadaşları “polifenollerin tirozinazla polimerizasyonundan sonra, çökelek oluşmadığını ve çözeltinin renginin, renksizden kahverengiye dönüştüğünü” açıklamışlardır. Wada ve diğer araştırmacılar, tirozinazın saflığının çökmesinde büyük bir rol oynadığını savunmuşlardır [21].

## 1.2 Enzim İmmobilizasyonu

Enzim immobilizasyonunun kelime anlamı, enzim hareketini sınırlandırma olarak tanımlanır. Enzimler, suda çözünebilen biyolojik katalizörlerdir. Endüstriyel uygulamaların çoğunluğu sulu çözeltilerde gerçekleştirildiğinden katalizör olarak kullanılan serbest enzimlerin aktivitesini kaybetmeden geri kazanılması olanaksızdır. Serbest enzim, reaksiyon ortamından istenilen zamanda uzaklaştırılmadığı için reaksiyonun kontrolü çok zordur. Reaksiyonun istenilen zamanda durdurulması için ortama inhibitör katılması düşünülebilir. Fakat serbest enzim tarafından kirletilmiş olan reaksiyon ürünlerine yeni bir kirlilik unsuru daha eklenmiş olacaktır. Bu kirlilik unsurlarından arıtılması maliyeti çok arttırmaktadır. Katalizör olarak kullanılan serbest enzimi reaksiyon ortamından aktivitesini yitirmeden çıkarabilmek olanaksız olduğu için enzimin yeniden kullanılabilmesi de söz konusu değildir. Bu da enzimlerin çok spesifik ama bir o kadar da pahalı katalizör olmaları sebebiyle maliyeti yükselten önemli bir etmendir [22]

Enzim immobilizasyonu, enzimlerin fiziksel olarak belirli bir yere yerleştirilmesi ya da hapsedilmesinin yanında katalitik aktivitenin de korunması ve bu sayede tekrarlanabilir ve sürekli uygulanabilir olmasını sağlamak olarak da tanımlanır [23-24]. İmmobilize olan enzimler endüstriyel uygulamalarda katalitik özelliklerinin yanı sıra, ekonomik olarak da son derece geliştirilmiş olmasının önemi oldukça fazladır (Çizelge 1.1) [25].

Enzimlerin ilk kez endüstriyel olarak kullanımı, 1969 yılında Japonya'nın Tanebe Seiyaku Limited şirketinde Chibata ve arkadaşları tarafından, sentetik rasemik D-L amino asitlerin çözünmesi için *Aspergillus oryzae* aminoasilaz'ın immobilizasyonunu uygulamışlardır [26]. İmmobilize enzimlerin bir başka önemli uygulamalarına şekerler, amino asitler ve ilaçların endüstriyel ürünleri örnek olarak gösterilebilir. (Çizelge 1.2) Ayrıca bazı endüstriyel proseslerde, istenilen enzimi ihtiva eden bütün mikrobiyal hücreler immobilize edilir ve katalizör olarak işlev görürler [27].

İmmobilize enzimlerin, endüstriyel olarak uygulamalardan başka, biyosensörler, biyoafinite kromatografisi ve tıpta kullanılan ilaçlardaki pek çok biyoteknolojik ürünlerde büyük önemi vardır [28].

**Tablo 1.1:** İmmobilize enzimlerin teknik özellikleri.

<b>Avantajları</b>	<b>Dezavantajları</b>
Katalizin tekrar kullanımı	Aktivitede azalma
Kolay reaktör kullanımı	Difüzyonel sınırlama
Kolay ürün ayrılması	Ek maliyet

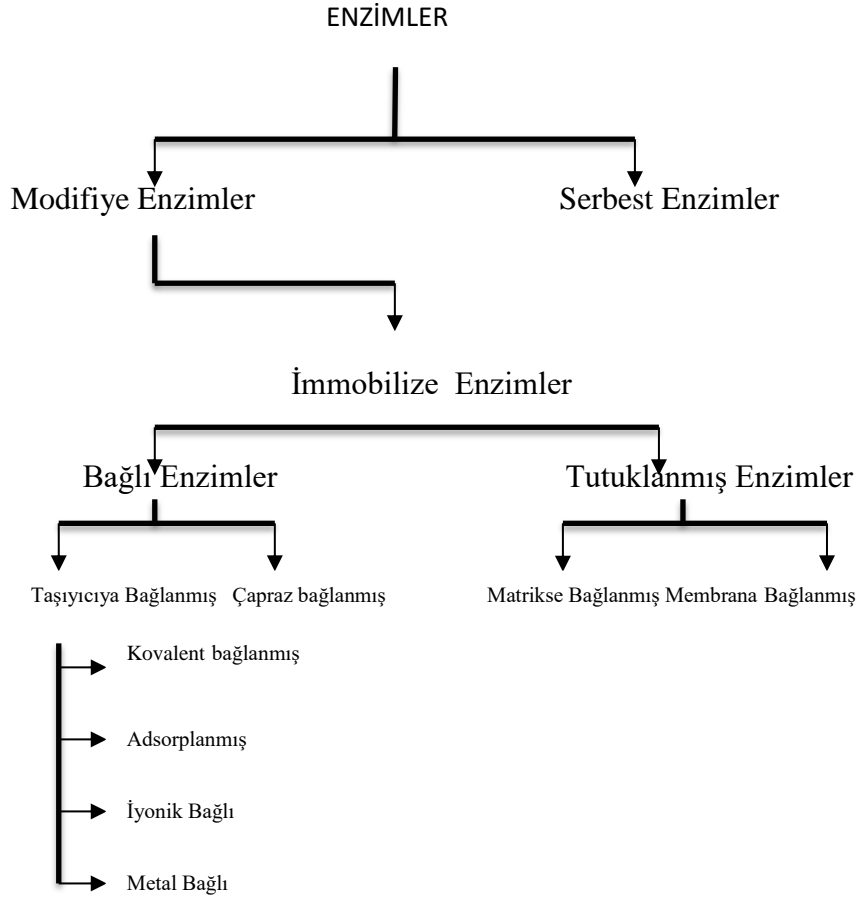
**Tablo 1.2:** İmmobilize enzim kullanılarak elde edilen önemli ürünler.

<b>Enzim</b>	<b>Ürün</b>
Glukoz izomeraz	Yüksek miktarda fruktoz şurup
Aminoasit amidaz	Aminoasit ürünü
Pensilin amidaz	Yarı-sentetik pensilin
Nitril hidrataz	Akrilamid
$\beta$ -Galaktosidaz	Laktoz

### 1.2.1 İmmobilizasyon Yöntemleri

Henniker, New Hampshire’da (ABD) 1971 yılında yapılan “Enzim Mühendisliği” toplantısında ilk olarak enzim immobilizasyonunun olasılığı tartışılmıştır. Sonuç olarak immobilizasyon dört farklı sınıfa ayrılmıştır. Günümüzde kullanılan immobilizasyon teknikleri aşağıdaki şekilde gösterilmiştir [29].

İmmobilize enzimlerin uygulamalarında, en önemli nokta gereken aktivite ve karakterizasyonları göstermeleridir. Ayrıca destekleyici malzemelerin uygun kombinasyonunun ve immobilizasyon metodunun seçilmesi ve ikisinde kullanılan enzim için elverişli olması gerekmektedir. Günümüzde henüz enzimler için uygun immobilizasyon yönteminin tasarımında izlenecek sistematik bir yöntem bulunmamaktadır [29].



İmmobilizasyon yönteminin seçimi amaçlanan sonuç esas alınarak ve enzimin, reaksiyonun ve reaktörün tipi göz önünde bulundurularak yapılmalıdır. Enzimi başka bir yüzeye immobilize ederken dikkat edilmesi gereken en önemli nokta; enzimin katalitik aktivitesinin kaybolmasına neden olmayan, doğal yapısını veya bağlanma bölgelerindeki reaktif grupları değiştirmeyen en uygun metodun seçilmesi gerekir. Enzimin aktif bölgesinde herhangi bir reaksiyonun oluşmasını engellemek hedeflenmelidir. İmmobilizasyon sırasında aktif bölge korunabilir ve korumaya yardımcı olan maddeler, daha sonra aktivite kaybına neden olmadan ortamdaki uzaklaştırılabilirler. Bazı durumlarda ise bu koruma fonksiyonunu bir substrat veya enzimin yarışmalı inhibitörü sağlayabilir. Enzimin immobilize edildiği yüzey, enzimin yapısını, elektron geçiş komplekslerinin oluşumuyla ya da hidrojen bağlarıyla, korumak durumundadır [29].

İmmobilize enzimlerin özellikleri, enzim ile taşıyıcı materyalin özelliklerine bağlıdır. Enzim ve taşıyıcı materyal ile immobilize enzim kimyasal, biyokimyasal,

mekanik ve kinetik özellik kazanır. Bu sayede immobilize enzimin verimini ve performansını etkiler [30].

İmmobilize enzimin verimi, bağlanma sırasında olan kayıplardan dolayı ve enzimin moleküllerinin gözeneklerden sızması ile azalır. Bu sayede verim düşer. Reaksiyon verimini artırmak için;

- Taşıyıcının parçacık boyutlarını düşürmek,
- Yüksek spesifik aktivitesi olan enzimlerin enzim yükleme miktarını azaltmak
- Enzimi taşıyıcı materyalin dış yüzeyine bağlamak [30].

### **1.2.1.1 Tutuklama**

Tutuklanmış enzimler beş farklı kategoride tanımlanırlar.

- i. Lattice tipi: Enzimler, polisakkarit, protein ve sentetik polimerlerden hazırlanan jel matrislerde tutuklanırlar.
- ii. Mikro kapsül tipi: Enzimler yarı-geçirgen sentetik polimerlerde tutuklanırlar.
- iii. Lipozom tipi: Enzimler fosfolipitlerden hazırlanan sıvı membranlarda tutuklanırlar.
- iv. Hoolow-fiber tipi: Enzimler ortamdan hollow-fiberler ile ayrılırlar.
- v. Membran tipi: Enzimler harcanan reaksiyon çözeltisinden ultrafiltrasyon membranlarıyla ayrılırlar.

Tutuklama metodunun avantajı sadece tekil enzimlerin değil, değişik tipte enzimlerin, organeller ile hücrelerin aynı prosedüre göre immobilize edilebilmeleridir. Ayrıca enzimler çeşitli modifikasyonlara uğramazlar. İmmobilizasyon yüksek molekül ağırlığındaki enzim inhibitörlerinin etkisini elimine eder [31].

Tutuklama metodunun dezavantajı ise, yüksek molekül ağırlığındaki substratlar enzime güçlükle tutunurlar ve taşıyıcılar yeniden elde edilemezler. Ultrafiltrasyon membranıyla tutuklama yapıldığında, aktive olmayan enzim molekülleri membran yüzeyine yapışıp reaksiyon çözeltisine geçişte azalmaya sebep olabilir fakat yöntemin dezavantajları önlenebilir. Lattice tipi yöntem enzim immobilizasyonunun tutuklama yönteminde en çok kullanılan tiptir [31].

### 1.2.1.2 apraz Bağlama

Çapraz bağlama immobilizasyon yönteminde, küçük moleküllü bi-fonksiyonel reaktifler veya multi-fonksiyonel reaktifler enzim molekülleri arasında bağlar yaparak suda çözünmeyen kompleksler oluşturmaktadır [32]. Çapraz bağlanma derecesi ile immobilizasyon, protein ve reaktif derişimine, pH'ya ve immobilize edilecek enzime bağlıdır. Gluteraldehit, kloroformat, ve karbonildiimidazol, heterosiklik halojenürler, bioksiranlar ve epiklorohidrinler çapraz bağlamada en çok kullanılan reaktiflerdir.

Çapraz bağlı immobilize enzimler;

- CLE (cross-linked dissolved enzyme); çapraz bağlı çözünmüş enzim,
- CLEC (cross-linked enzyme crystal); çapraz bağlı enzim kristali,
- CSDE (cross-linked spray-dried enzyme); çapraz bağlı püskürtülerek kurutulmuş enzim,
- CLEA (cross-linked aggregate enzyme); çapraz bağlı enzim agregatları olmak üzere dört farklı Şekilde hazırlanabilmektedir [33].

### 1.2.1.3 Taşıyıcı Bağlama

Taşıyıcıya bağlamada enzim molekülünün yapısından yararlanır. Taşıyıcı bağlamada, molekül yüzeyindeki fonksiyonel gruplar, iyonik gruplar ile hidrofobik bölgeler rol oynar. Enzim immobilizasyonunda kullanılacak olan taşıyıcıda olması gereken özellikler şunlardır:

- Hidrofobik karakter,
- Suda çözünmeme,
- Gözenekli yapı,
- Mekanik kararlılık,
- Uygun tanecik şekli,
- Kimyasal ve termal kararlılık,
- Kovalent bağlamada kullanılacak taşıyıcılar yumuşak koşullarda reaksiyona girebilen fonksiyonel gruplar taşımali,
- Mikroorganizmalara karşı dirençlilik,
- Ucuzluk,
- Zehirsizlik,
- Rejenere olabilme.

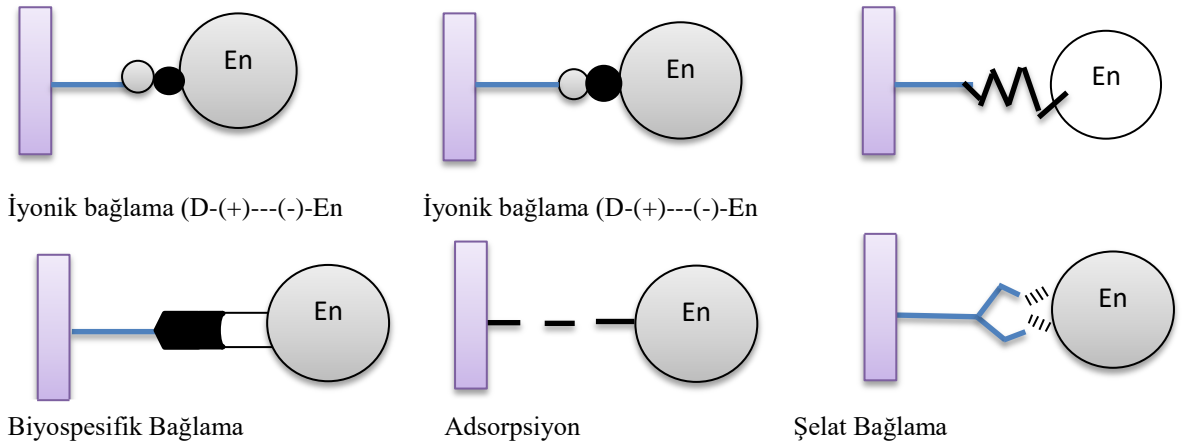
Taşıyıcıya bağlama yöntemleri; iyonik bağlama, biyospesifik bağlama, adsorpsiyon, şelat bağlama ile kovalent bağlama olmak üzere beş gruba ayrılır.

**İyonik bağlama:** İyonik bağlama yöntemi, iyon değiştirme yeteneğine sahip, suda çözünmeyen taşıyıcılara, enzimin iyonik bağlanması temeline dayanır [34]. İyonik bağlama yanında bazen de fiziksel adsorpsiyon da etkili olabilir. İyonik bağlama çok yumuşak şartlarda gerçekleştiğinden enzim konformasyonunda ve aktif merkezde değişikliğe sebep olmaz. Fakat enzim ve taşıyıcı arasındaki bağ kovalent bağ kadar güçlü olmadığından enzimin kaçıışı söz konusu olmaktadır.

**Biyospesifik Bağlama:** Enzimler ve antikorlar ile lektinler arasındaki biyospesifik etkileşimden yararlanarak enzimin immobilizasyonu sağlanabilir [35]. Spesifik karbohidrat artıklarını içeren enzimlere, lektinler kuvvetlice bağlanırlar (Şekil 1.5).

**Adsorpsiyon:** Enzim immobilizasyonunda kullanılan en eski ve en basit yöntemlerden birisidir. Adsorpsiyon yöntemi; yüzey aktif, suda çözünemeyen bir adsorbanın, enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının iyice yıkanarak ortamdaki uzaklaştırılması esasına dayanır [36]. Van der Waals kuvvetleri, enzimin taşıyıcıya bağlanmasında etkindir (Şekil 1.5).

**Şelat Bağlama:** Şelat bağlama yönteminde, enzimi destek materyaline bağlamak için ve destek katısının yüzeyini aktifleştirmek için geçiş elementleri olan Titan(III), Titan(IV), ve Zirkonyum(IV) kullanılır (Şekil 1.5).

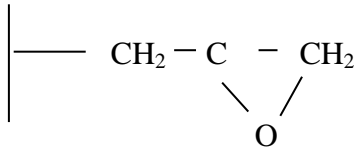


**Şekil 1.5:** İyonik bağlama, biyospesifik bağlama, adsorpsiyon ve şelat bağlama ile ilgili şematik gösterim (En: Enzim) [37].

**Kovalent Bağlama:** Kovalent immobilizasyon, immobilize edilecek enzimin, aktif bölgesinde veya substratla bağlanma bölgesinde bulunmayan fonksiyonel gruplarla gerçekleştirilir. Kovalent bağlanma genellikle, enzimin nükleofilik gruplarının, destek malzemesinin fonksiyonel grubu ile reaksiyonu sonucunda meydana gelir. Enzim üzerindeki tiol ve aminohidroksil gruplara bağlanmada rol alırlar. Sistein, lisin, tirozin ve histidin artıkları en aktif yapılar olarak bilinirler. Buna benzer moleküler arası bağlar, enzimin kullanım süresinin genişlemesini sağlarlar.

Taşıyıcı üzerindeki fonksiyonel grupların tanıtılması elzemdir. Bunun için fonksiyonel monomerler ile kopolimerizasyon veya polimer tipi reaksiyon kullanılabilir. Bu amaçla kullanılan yöntemlerden bazıları şöyledir:

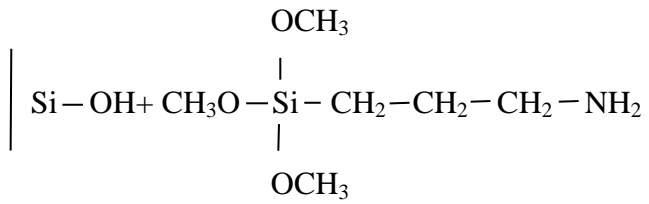
- Epoksidasyon metodu



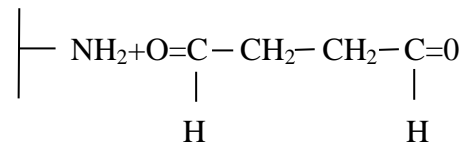
- Karbodiimid metodu



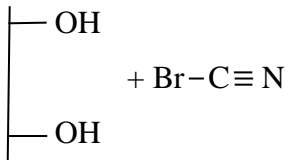
- Silinizasyon metodu



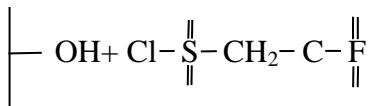
- Gluteraldehit (çapraz bağlama)



- Siyonejen bromür



- Tresil klorid metodu



Kovalent bağlı immobilize enzimin avantajları;

- ❖ Oluşan kuvvetli bağ sonucu, kullanım aşamasında sızıntı veya parçalanma gibi sıkıntılar çıkmaz.
- ❖ İmmobilize olan enzim substratla çok kolay bağlantı kurabilmektedir. Bunun sebebi enzim desteğin yüzeyinde olmasıdır.
- ❖ Enzim molekülleriyle destek madde arasındaki kuvvetli etkileşim sebebiyle genellikle ısı kararlılığında bir artış gözlemlenebilir.

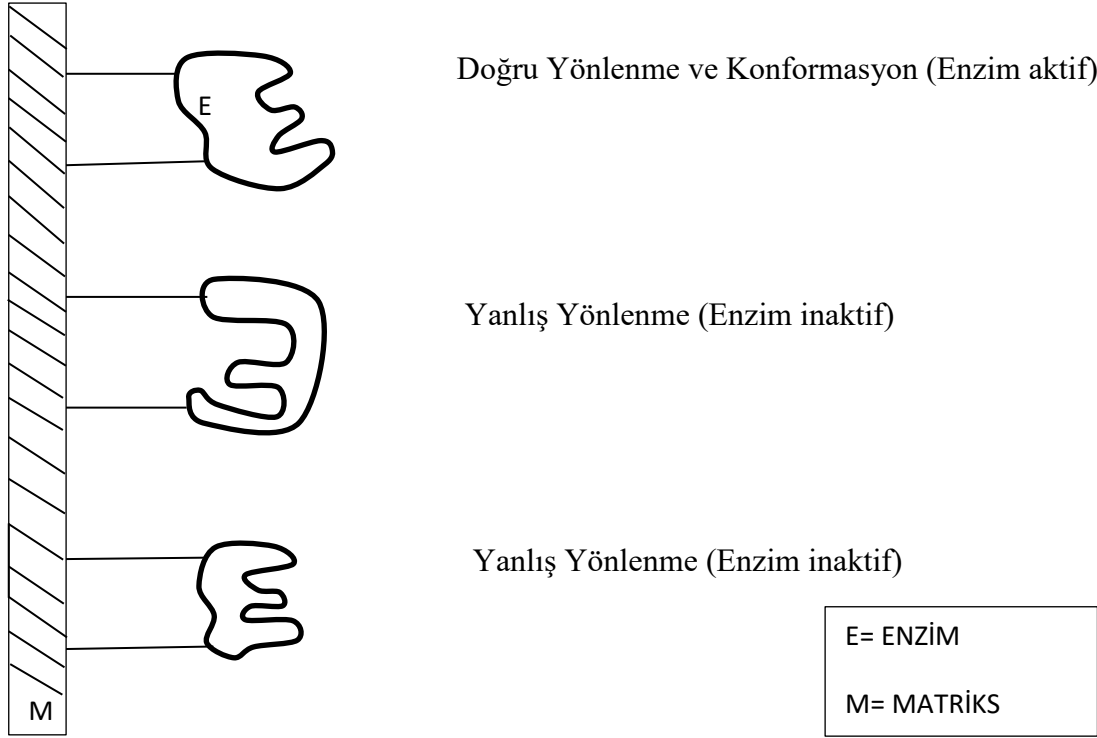
Kovalent bağlı immobilize enzimin dezavantajları;

- ❖ Enzim moleküllerinin aktif yapısı kısmi modifikasyonlara uğrayabilir.
- ❖ Enzim molekülleriyle destek arasındaki güçlü etkileşimler, enzim moleküllerinin serbest hareketine engel olabilir. Bunun sonunda enzim aktivisinde bir azalmaya neden olur.
- ❖ İmmobilizasyonun optimum koşullarını bulmak oldukça güçtür.
- ❖ Destekler çoğunlukla yenilenebilir türden değildir. Bu sebeple bu metot daha çok, kararlılığın kovalent bağlanma metoduyla arttığından emin olunan enzimler için daha uygun olur.

Kovalent bağlanma, bütün bu dezavantajlara rağmen analitik amaçlı immobilizasyonlarda kullanılır.

Bahsedilen immobilizasyon yöntemlerini bir arada değerlendirmek gerekirse, adsorpsiyon; kolay, ucuz ve efektiftir fakat genellikle kararlı değildir ve geriye dönüşüm gözlemlenir. Tutuklama ve mikrokapsülleme metodundaysa difüzyon problemi gözlemlenir. Enzimin kovalent bağlanmayla bir taşıyıcıya bağlanması endüstriyel açıdan en uygun metot olarak ön plana çıkmaktadır. Bunun sebebi kovalent bağlanma özelliğe çapraz bağlanmayla birlikte uygulandığı takdirde efektif ve de kararlıdır. Çapraz bağlama ajanı olarak en güzel sonuçlar glüteraldehit ile yapılan çalışmalarda gözlemlenmiştir [31, 38, 39, 40].

Enzimdeki spesifik aktif bölgenin taşıyıcı ile etkileşmesi sonucunda, kovalent bağlı immobilizasyonda enzimde belli bir dereceye kadar aktivite kaybı gözlemlenebilir [41].



**Şekil 1.6:** Kovalent Bağı Enzim Aktivitesi Üzerine Olan Etkileri [42].

Enzim immobilizasyonundaki yönlendirme etkisi ile oluşan durumda aktif bölgenin durumu oldukça önemlidir. Bu da enzimde aktiviteyi azaltabileceği gibi aktivitenin tamamen kaybolmasına sebep olabilmektedir [43]. Özellikle yönlendirme etkisi ile aktivite kaybını en aza indirmek için şu metotlar yapılabilir:

- Enzim immobilizasyonu yalnızca doymuş substrat konsantrasyonunda,
- Yarışmalı inhibisyon kullanılması [44].

## 1.2.2 İmmobilize Enzimin Özellikleri

Enzim immobilizasyonunun sonucunda enzim molekülünün termal stabilitesi ve katalitik aktivitesi gibi bazı özellikleri, çözünebilir eşleniklerine göre değişiklik gösterebilmektedir [45]. İmmobilizasyonların katalitik özelliklerinde gözlenen bu değişim proteinlerin üç boyutlu yapılarındaki (konformasyonlardaki) değişimle ve enzim ile substrat arasındaki bağlanmayla ilgili olabileceği ileri sürülmüştür [46].

Enzimler immobilize edildiğinde, enzimin çalışma stabilitesi artırılabilir. Bir çok durumda gözlenen stabilizasyon, enzimin bağlanma sonucu ile ilgilidir. Fakat, moleküler seviyedeki doğru stabilizasyonun gösterilmesi, proteinlerin immobilizasyonunun bir çok noktadan kovalent olarak bağlanmasıyla gerçekleşmektedir [47]. Farklı metodların kullanımı ile ilgili bir çok bilim adamı tarafından yürütülen çalışmalarda, stabilizasyon ve matrikse enzimin kovalent bağlarla bağlanma sayıları arasında önemli bir bağlantı olduğu tespit edilmiştir. İmmobilize enzimlerin kullanımı ile ilgili en önemli problemlerden birisi, özellikle enzimlerin makromoleküler substratlarıyla gösterdiği katalitik aktivite kaybının gözlemlenmesidir [48].

Enzimin aktif bölgesine substratların ulaşımının sınırlanmasından dolayı, substratın yalnızca yüzeydeki gruplara ulaşması sonucunda aktivite düşebilmektedir. Bu sterik sınırlama zamanla makromoleküler substratlardan türeyen ürünlerin karakteristik özelliklerini de değiştirebilmektedir. Sterik problemlerden uzaklaşmak için birçok strateji geliştirilmiş olup bunlardan bazıları şöyledir:

- İzole makromoleküler zincirlerin ağlarından oluşmuş taşıyıcıların seçimi,
- İmmobilize olacak enzim rezidülerinin dikkatli seçimi ve hidrofilik ya da inert uzantı kollarının kullanılmasıdır [49].

### 1.2.3 PPO Enziminin İmmobilizasyonu İle İlgili Çalışmalar

Polifenol oksidaz enziminin ( tirozinaz) kullanımı ile ilgili farklı şekillerde immobilizasyon çalışmaları yapılmaktadır.

- Bu araştırmalardan bazıları; L-DOPA üretimi,
- Endüstriyel atık suların fenol ve aromatik amin gibi zehirli kimyasallarca zehirsizleştirilmesinde (defonolizasyon),
- Fenol ve türevlerinin tayini için biyosensörlerde bileşen olarak kullanımı, kirlenmiş toprakların biyoyileştirilmesi,
- Meyve sularının berraklaştırılmasıdır.

Bu sebeple PPO endüstriyel olarak önemli bir biyomoleküldür.

Carvallo ve arkadaşları (2000), Mantar tirozinazı hekza metilen diamin ve gluteraldehit ile aktive edilmiş kitin pulcuklarına ve polivinipirolidin varlığında kitosan pulcuklarına immobilize etmişlerdir. İmmobilize enzimler katalizörlüğünde L-DOPA üretimini araştırmışlardır [50].

Khan ve arkadaşları (2006), patates proteinlerini amonyum sülfatla çöktürdükten sonra bir adsorbant olan celite-545 üzerine polifenol oksidazı direkt immobilizasyonunu araştırmışlardır [51].

Dinçer ve arkadaşları (2012) tirozinazı gluteraldehit ile çapraz bağlayarak kitosan-kil kompozit boncuklar üzerinde immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada optimum pH, optimum sıcaklık ve kinetik sabitler ( $K_m$  ve  $V_{max}$ ) araştırılmıştır [52].

Yağar ve Sağıroğlu (2001), ayvadan elde ettikleri polifenol oksidaz enzimini bentonit kiline immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada termal ve depo kararlılığı araştırılmıştır. Bir yıllık zaman süresinde depo kararlılığı ölçülmüş ancak yeniden kullanıma sahip olmadığını belirlemişlerdir [53].

Demir ve arkadaşları (2007), Iğdır kayısılarından polifenol oksidaz enziminin kil üzerine immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Enzimin optimum pH ve sıcaklığı saptanmış ve immobilize polifenol oksidaz enzimi için termal kararlılık ile depo kararlılığı araştırılmıştır. Bu çalışmada Bradford yöntemi ile serbest ve

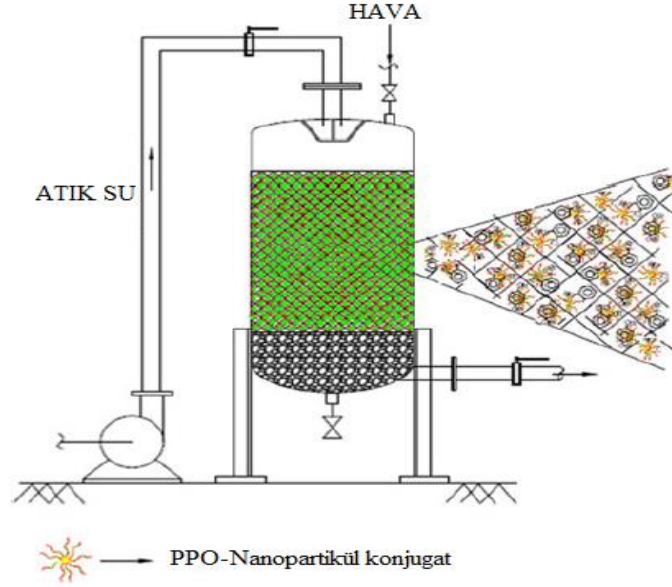
immobilize enzimin protein tayinleri yapılmış ve  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri araştırılmıştır [54].

Shao ve arkadaşları (2007), patatesten elde ettikleri polifenol oksidaz enziminin kitosan-SiO<sub>2</sub> jeline immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada immobilize edilen enzimin en yüksek aktivitesi pH 7.4'de gösterdiğini ifade etmişlerdir. Ayrıca immobilize edilen enzimin aktivitesi (30°C) 10. ve 20. günde %73 ve %58 olarak ölçülmüş, serbest enzim ise aktivitesini 7. günde kaybetmiştir [55].

Sutay (2003), dut yapraklarının 4-metil katekol substratı ile mantarla karşılaştırılabilir düzeyde yüksek polifenol oksidaz enzim aktivitesine sahip olduğunu saptamış ve bu enzimi polipirol matrisine tutuklamıştır. Serbest dut yaprağı için PPO'ların ortalama  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri 7 mM ve 218 U/ml, immobilize enzim içinse değerleri 35 mM ve 3 U/ml olarak tespit edilmiştir [56].

Kocatürk (2008), enginar polifenol oksidazı izole ederek ve tutuklama metoduyla alginat ve alginat+karragenan jellere immobilizasyonunu araştırmıştır. Ayrıca optimum pH, sıcaklık,  $K_m$  ve  $V_{max}$  kinetik sabitleri, termal kararlılık, yeniden kullanılabilirlik ve depo kararlılığı gibi bazı biyokimyasal özellikleri araştırılmıştır [57].

Ekinci (2006) Glukoz oksidaz ve polifenol oksidaz enzimlerini polipirol (Ppy) ve pirol uçlu polistirenin pirol ile oluşturulan kopolimerinde tutuklamıştır ve oluşan enzim elektrotları  $V_{max}$  ve  $K_m$  kinetik parametreleri ile karakterizasyonu araştırılmış. Ayrıca enzim elektrotlarının sıcaklık ve pH değişimine göre davranışları araştırılmıştır [58].



**Şekil 1.7:** İmmobilize polifenol oksidaz enzimi ile su arıtma tekniği [59].

Mukherjee ve arkadaşları, endokrin gibi zor ayrışabilir kirleticilerin ya da mikrokirletici karışımların arıtılması için silika nanopartiküllerin üzerine lakkaz immobilizasyonu ile biyoreaktörlerdeki atık suların kimyasalları bozarak su arıtma bazlı PPO-nanomateriyallerin önemli bir başarı alanı sağlayacağını öngörmüşlerdir. Böylece nanoenzim teknolojisi, geleneksel bir yöntemle yeniden kullanılabilir olmakla birlikte daha iyi performans gösteren uygun maliyetli enzimatik su arıtma yaklaşımlarından biri olacağı düşünülmüştür (Şekil 1.7) [59].

### 1.3 Çalışmanın Amacı

Fenolik bileşiler; patlayıcı, ilaç, gübre, boya, tekstil ve plastik gibi birçok materyalin üretiminde kullanılmakta olup ayrıca yüksek oranda da çevreye salınan kirleticilerdendir. Bu bileşikler deri ve mukoz membran yolu ile kolayca adsorbe olurlar ve akciğer, karaciğer, böbrek ile üreme sisteminde hasarlara sebep olabilirler. Bu yüzden çevre, gıda ve endüstriyel alanlarda fenolik bileşiklerin tayini son derece önem arz eder [60-62].

İçme suları ve endüstriyel atık sulardan toksik kimyasalların uzaklaştırılmasında enzimatik yaklaşım son yıllarda oldukça fazla ilgi konusu olmuştur. PPO enzim ailesinin üyeleri olan, peroksidaz, lakkaz ve tirozinaz içme suları ve endüstriyel atık sulardan toksik kimyasalların uzaklaştırılması amaçlı araştırılmaktadır. Fenolik endüstriyel atıklar, kağıt, kömür, petrokimya, boya ve tekstil endüstrilerince üretilmektedir ve memeliler ile balıklar için toksik özellik gösterirken sularda ise renk kirliliğine sebep olmaktadır. Çeşitli taşıyıcılara immobilize edilmiş mantar tirozinazı, fenollerin ve aromatik aminlerin sulardan uzaklaştırılması ve fenolik kirleticilerin dekolarizasyonu amacıyla çeşitli araştırmalarda incelenmiştir [63, 64].

Bu çalışma kapsamında dizayn edilen kovalent bağlanmış polifenol oksidaz enziminin fenolik bileşikleri, biyosorpsion ve biyolojik parçalama yolu ile atık sulardan uzaklaştırılması için ileride kullanılabilir.

Bu amaçla polifenol oksidaz enziminin immobilizasyonu, enzimlerin,  $\omega$ -Aminoheksyl-Agrose' daki amin gruplarına gluteraldehit ile bağlanma metodu kullanılarak gerçekleştirilmesi planlanmıştır.

İmmobilize ve serbest enzimin optimum pH, optimum sıcaklık, termal kararlılık, kinetik sabitler ( $K_m$  ve  $V_{max}$ ) ve beş farklı inhibitöre karşı etkisi çalışılmıştır.

## 2. MATERYAL VE YÖNTEMLER

### 2.1 Materyaller

#### 2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasallar;

- Sepharose-4B,
- *p*-aminobenzoik asit (  $C_7H_7NO_2$  )
- L-tirozin,
- Standart serum albumin,
- N,N,N,N' tetrametilendiamin (TEMED),
- Diyaliz torbaları Sigma Chemical Comp'den;
- Sodyum hidroksit (NaOH)
- Sodyum klorür (NaCl)
- Sodyum karbonat ( $Na_2CO_3$ )
- Sodyum sitrat ( $C_6H_5Na_3O_7$ )
- Siyonejen bromür (BrCN)
- Trihidroksimetil aminometan (Tris),
- Amonyum sülfat ( $(NH_4)_2SO_4$ )
- Sodyum sülfat ( $Na_2SO_4$ )
- Sodyum bikarbonat ( $NaHCO_3$ )
- Askorbik asit ( $C_6H_8O_6$ )
- Polietilenglikol (PEG),
- Katekol Merck A.G'den;
- Akrilamid,
- Bisakrilamid,
- Amonyum persülfat,
- SDS,
- Bromtimol mavisi,
- Gliserol,
- Sülfirik asit,
- Glisin,
- Fosforik asit ( $H_3PO_4$ )
- Asetik asit ( $CH_3COOH$ )
- Etil alkol ( $C_2H_5OH$ )
- Hidroklorik asit (HCl)
- Coomassie brillat blue G-250  
Merck ve sigma'dan sağlandı.

## 2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar

➤ Soğutmalı santrifüj: ➤ Sigma, EBA-12R	➤ Peristaltik Pompa: ➤ Sigma	➤ Homejenize edici: Ev tipi blender
➤ pH metre: ➤ Orion-model 920A	➤ Kronometre: ➤ Hanhard, Elektronisch Digital Stoppuhr	➤ Elektroforez tankı: ➤ Hofer, HIS
➤ UV Spektrofotometre: ➤ Biotek Power Wax XS	➤ Terazı: ➤ Libror, AEG-220 (Shimadzu)	➤ Kromotografi Kolonu: ➤ Sigma (1,5x 10 cm)
➤ Manyetik Karıştırıcı: IKA Combimag RCO	➤ Otomatik pipetler: ➤ Fischer	➤ Çalkalyıcı: ➤ Clifon
➤ Sabit sıcaklık sirkülatörü: ➤ Techne-Tempette junior TE-8J	➤ Vortex: ➤ Fisons Whirli Mixer	

## 2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

- **Ekstraksiyon tamponu:** 8.7 g (0.05 mol)  $K_2HPO_4$ , 0.5 g polietilenglikol, 0.176 g (0.001 mol)  $C_6H_8O_6$  tartıldıktan sonra 80 mL saf suda çözülür ve pH metre yardımıyla 1 M HCl ile pH 7.3' e getirilir. Daha sonra çözelti saf su ile hacmi 100 mL'ye tamamlanır.
- **Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda oluşan çökeleği çözmek için kullanılan ve diyalizin yapıldığı tampon:** 5 mM fosfat tamponu pH: 6.3; 0.87 g (0.005 mol) potasyum fosfat dibazik ( $K_2HPO_4$ ) 950 mL saf suda çözülür ve 1 M hidroklorik asit (HCl) ile pH: 6.3'e getirildikten sonra hacmi 1000 mL'ye tamamlanır.
- **Afinite jeli sentezinde kullanılan tamponlar:**
  - **0,1 M  $NaHCO_3$ , pH: 10.0 tamponu:** 8.401 g (0.1mol) sodyumbikarbonat ( $NaHCO_3$ ) 950 ml saf suda çözülerek, 1 N sodyum hidroksit (NaOH) ile pH'sı 10.0'a getirilir ve hacmi 1 mL'ye tamamlanır.
  - **0.2 M  $NaHCO_3$  pH: 8.8 tamponu:** 8.401 g (0.1 mol) sodyum bikarbonat ( $NaHCO_3$ ) 450 mL saf suda çözülerek, 1 N sodyum

hidroksit (NaOH) ile pH'sı 8.8'e getirilir ve hacmi 500 mL'ye tamamlanır.

- **0,01 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH: 6.0 tamponu:** 1.42 g (0.01 mol) sodyum fosfat dibazik (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 950 mL saf suda çözülerek, 1 N sodyum hidroksit (NaOH) ile pH'sı 6.0'a getirilir ve son hacmi 1 L'ye tamamlanır.
- **Afinite jelinin dengelenmesi ve yıkanması için kullanılan tamponlar:** 0,05 M fosfat tamponu pH: 5.00; 3.55 g (0.025 mol) sodyum fosfat dibazik (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 450 mL saf suda çözülerek pH'sı 5.00'a getirilir ve son hacmi 500 mL'ye tamamlanır.
- **Afinite kromotografisinde PPO enzimin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti:** 0,05 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/1 M NaCl, pH:7 fosfat tamponu; 3.55 g (0.025 mol) sodyum fosfat dibazik (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) ve 29.25 g (0.5 mol) sodyum klorür (NaCl) 450 mL saf su içinde çözülerek pH'sı 7.00'a getirilir son hacmi 500 mL'ye tamamlanır.
- **Aktivite Tamponu:** 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH: 6,80 fosfat tamponu; 7.1 g (0.05 mol) sodyumfosfat dibazik (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 450 mL saf su içinde çözülerek pH'sı 6.80'e ayarlanır ve son hacmi 500 mL'ye tamamlanır.
- **Substrat Çözeltisi:** 0.11 gram katekol tartılır son hacmi 10 mL' ye tamamlanır.
- **Protein tayininde kullanılan standart serum albumin çözeltisi (1mg/ml):** 25 mg standart serum albümin tartıldıktan sonra 25 mL saf suda çözülür.
- **Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti:** 100 mg coomassie brillant blue G-250 tartıldıktan sonra 50 mL etonolde çözülür. Bu çözeltiliye 100 mL %95'lik fosforik asit eklenerek son hacmi saf su ile 1 L' ye tamamlanır.

**SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan numune tamponunun hazırlanışı:**

<b>0.5 M Tris-HCl (pH: 6.8)</b>	<b>→</b>	<b>2.5 ml</b>
<b>%10'luk SDS</b>	<b>→</b>	<b>4.0 ml</b>
<b>Gliserol</b>	<b>→</b>	<b>2.0 ml</b>
<b><math>\beta</math>-merkapto etanol</b>	<b>→</b>	<b>1.0 ml</b>
<b>Bromfenol mavisi</b>	<b>→</b>	<b>0.01 g</b>
<b>Destile su</b>	<b>→</b>	<b>0.5 ml</b>

**SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan yürütme tamponunun hazırlanışı:**

<b>Tris-HCl</b>	<b>→</b>	<b>3.0 g</b>
<b>Glisin</b>	<b>→</b>	<b>14.4 g</b>
<b>SDS</b>	<b>→</b>	<b>1.0 g</b>

**Tablo 2.1:** SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları.

	Ayrırma Jeli	Yığıma Jeli
	% 10	% 3
<b><u>Akril amid/ Bis (%30)</u></b>		
Akril amid 15 g Bis 0.4 g Son hacim destile su ile 50 ml'ye tamamlanır.	16.65 ml	2.6 ml
<b><u>Destile su</u></b>	20.1 ml	12.2 ml
<b><u>1.5 M Tris-HCl (pH:8.8)</u></b>		
Tris-HCl 11.82 g pH: 8.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim destile su ile 50 ml'ye tamamlanır.	12.5 ml	—
<b><u>0.5 M Tris-HCl (pH: 6.8)</u></b>		
Tris-HCl 3.94 g pH: 6.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacmi 50 ml olacak şekilde ayarlanır.	—	5 ml
<b><u>%10'luk SDS</u></b>		
SDS 1 g alınarak son hacmi 10 ml olacak şekilde ayarlanır.	0.5 ml	200 µL
<b><u>TEMED</u></b>	25 µL	20µL
<b><u>%10'luk amonyum sülfat</u></b>		
1 g alınarak son hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlanır.	750 µL	400µL

- **SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renklendirme çözeltilerinin hazırlanışı:** 0.66 g Coomassie brilliant blue R-250 tartıldıktan sonra 120 mL metanolde çözülür. Daha sonra üzerine 24 mL saf asetik asit ile 120 mL destile su ilave edilir.
- **SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renk açma çözeltilisinin hazırlanışı:** %7.5 CH<sub>3</sub>COOH (asetik asit), %5 (CH<sub>3</sub>OH) metanol ve %87.5 mL saf su içermektedir. Bu sebeple 75 ml CH<sub>3</sub>COOH (asetik asit) ve 50 mL CH<sub>3</sub>OH (metanol), 875 mL destile su ile karıştırılır.

## 2.2 Yöntemler

### 2.2.1 Ham Ekstraktın Hazırlanması

Yapılan bu çalışmada ithal muz kullanılmıştır ve muzlar ticari bir işletmeden alınmıştır. Ham ekstrakt hazırlanması amacıyla 50 g muz tartıldı ve 100 mL (%0.5 PEG ve 10 mM askorbik asit içeren) 0.5 M, pH: 7.30, fosfat tamponu içerisinde ev tipi blender ile 2 dakika kadar homojenize hale getirildi. Homojenat tülbenten süzöldükten sonra süzöntü teflon tüplere alınarak 2000 x g'de +4 °C'de 1 saat santrifüj edildi. Santrifüj bittikten sonra, bitki duvarlarını ve selülozik lifli kısmı içeren çökelek atılırken sıvı kısım ham ekstrakt olarak kullanıldı.

### 2.2.2 Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Amonyum sülfatla çöktürme işlemi %0-80 arasında doygunlukta yapıldı ve çöktürme işlemleri sırasında kullanılacak olan katı amonyum sülfat miktarı aşağıda verilen formüle göre tespit edildi [65].

$$g (NH_4)_2SO_4 = \frac{1.77 \times V_x (S_2 - S_1)}{3.54 - S_2}$$

V= supernatant hacmi

S<sub>1</sub>= 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

S<sub>2</sub>= 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

Amonyum sülfat miktarı belirlendikten sonra ham ekstrakta yavaş ve azar azar amonyum sülfat eklenerek % 80 doygunluğa getirilen süspansiyon 2000 x g'de 1 saat soğutmalı santrifüjde santrifüjlendi. Santrifüj işleminden sonra tüplerin üzerinde sıvı kısımlar atıldı ve tüpte kalan çökelek 5 mM fosfat tamponunda pH: 6.3 çözünebileceği en az miktarda çözüldü [65].

### 2.2.3 Diyaliz

Amonyum sülfat çöktürmesinden sonra elde edilen numune, diyaliz torbası (Sigma Diagnostics, dialysis sacks) içine alınarak, +4 °C' de diyaliz tamponuna karşı bir kaç defa tampon değiştirilerek yaklaşık 24 saat diyaliz edildi.

## 2.2.4 PPO Enziminin Afinite Kromotografisi ile Saflaştırılması

Polifenol oksidaz enziminin saflaştırılması için uygulanan metodlardan birisi de afinite kromotografisidir. Bu kromotografi, bir çeşit adsorpsiyon kromotografisidir. Ayrıca saflaştırılması istenen molekülün veya biyolojik ünitenin matriks adı verilen ve çözünmeyen bir kolon maddesine kovalent olarak immobilize edilmiş bir liganda spesifik ve tersinir olarak bağlandığı bir tekniktir. Afinite kromotografisi tekniği sayesinde, zor ve bazı hallerde imkansız olan bir çok ayırma işlemleri kısa zamanda gerçekleşmektedir [66].

### 2.2.4.1 Afinite Jelinin Hazırlanması

Sepharose-4B, siyonejen bromür (CNBr) ile aktifleştirildi ve tirozinle kovalent bağlandı. Reaktif türevde tirozine diazolanmış *p*-amino benzoik asidin bağlanması gerçekleştirildi ve burada tirozin afinite jelinin uzantı kolunu oluştururken, *p*-amino benzoik asit ise enzimi spesifik bağlayan kısmını oluşturmaktadır. PPO enziminin spesifik bir inhibitörü olan *p*-amino benzoik asit, afinite jelinin yapısına girerek PPO'nun yüksek oranda saflaştırılmasında kullanılmıştır [65, 67].

#### 2.2.4.1.1 Sepharose-4B'nin Aktifleştirilmesi ve Tirozin Bağlanması

10 ml Sepharose-4B jeli, destile su ile iyice yıkanarak dekante edildi. Daha sonra eşit miktarda destile su ile birleştirildi. Karıştırılmakta olan jel süspansiyonuna 4 g toz haline getirilmiş CNBr katıldı. Daha sonra pH metre yardımı ile çözeltinin pH'sı 4 M sodyum hidroksit (NaOH) ile 11'e çıkarılarak sabitlendi. Fazla miktarda buz süspansiyona eklendikten sonra karışım buchner hunisine aktarıldı. 250 ml soğuk 0.1 M sodyum bikarbonat (NaHCO<sub>3</sub>) tampon çözeltisi ile (pH: 10) yıkandıktan sonra 20 ml'sinde 15 mg tirozin ihtiva eden aynı tamponun soğuk çözeltisi eklendi ve 90 dakika beklendi. Daha sonra çözelti 16 saat +4°C'de beklemeye bırakıldı. Bu süresinin sonunda yıkama suyu 280 nm'de absorban gözlemlenmeyene dek saf su ile yıkandı. Böylece reaksiyona girmeyen Tirozin ortamdan tamamen uzaklaştırıldı. Yıkama işlemi 100 ml 0.2 M sodyum bikarbonat (NaHCO<sub>3</sub>) tamponu ile (pH:8.8)

tekrarlandıktan sonra tirozinle modifiye edilmiş Sepharose-4B, aynı tamponun 40 mL' si içine alındı.

#### **2.2.4.1.2 *p*-aminobenzoik Asidin Bağlanması**

25 mg *p*-aminobenzoik asit tartıldıktan sonra 0 °C civarında 10 mL 1 M hidroklorik asit (HCl) içerisinde çözülerek, 75 mg sodyum nitrit (NaNO<sub>2</sub>) içeren 0 °C' deki 5 mL çözelti, *p*-amino benzoik asit çözeltisine damla damla katıldı. Diazolanmış *p*-aminobenzoik asit 10 dakika sonra, 40 ml Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna eklendi. pH'sı 9.5'a çıkarılarak sabit tutuldu. 3 saat oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra 1 L saf su ile ardından da 200 ml 0.01 M sodyum fosfat dibazik (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (pH:6.0) tamponu ile yıkanarak aynı tamponda +4 °C' de saklandı.

#### **2.2.4.2 PPO'nın Afinite Kolonuna Tatbiki ve Enzimin Elüsyonu**

Afinite jeli, 1,5x10 cm boyutundaki bir kolona paketlenmiştir. 0.05 M fosfat tamponu ile üstten ilave edilen ve alttan toplanan tamponun 280 nm'de absorbanları 0,002 oluncaya kadar yıkanarak dengeleme sağlandı. Dengeleme işlemi bittikten sonra diyalizden alınan enzim çözeltisi kolona yüklendi ve 0.05 M fosfat tamponu pH:5 ile yıkanarak polifenol oksidaz enziminin büyük bir kısmı afinite jeline bağlanırken diğer safsızlıklar da ortamdan uzaklaştırılmış oldu. Son olarak 0.05 M pH:7 tamponu ile enzim elüsyonu yapılarak ve 2 mL'lik epondorflara toplandı. Toplanan elüatlarda, Coomassie blue yöntemiyle kantitatif protein tayini belirlenirken, 280 nm'de kalitatif protein, ve 420 nm' de enzim aktivite tayini yapıldı.

### 2.2.5 SDS-PAGE ile Enzim Saflığının Kontrolü

Muz polifenol oksidaz enziminin afinite kromatografisiyle saflaştırılması işleminden sonra yığıma jeli %3, ayırma jeli %10 konsantrasyonlarında olacak şekilde kesikli sodyum dodesil sülfat jel elektroforezi Laemelli yöntemiyle yapılarak PPO enziminin saflık derecesi kontrol edildi [68].

İlk önce elektroforez cam plakaları saf su ile yıkandıktan sonra etil alkolle de yıkanarak iyice temizlendi. Daha sonra plakalar arasına plastik aralık oluşturucusu yerleştirildi ve iki cam plaka birbiri üzerine konuldu. Kısaçlarla tutturularak jel hazırlama cihazına yerleştirildi. Tablo 2.1'de ki gibi ayırma jeli hazırlandı ve plakalar arasında üstten birkaç cm kalacak şekilde 10'luk mikropipetle tatbik edildi. Daha sonra jel yüzeyinin daha düzgün olması için n-bütanol ile ince bir tabaka oluşturuldu ve polimerizasyonun tamamlanması beklendi. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra n-bütanol döküldü ve ayırma jelinin üzerine yığıma jeli eklendikten sonra tarak dikkatlice yerleştirilerek yığıma jelinin polimerleşmesi beklendi. Yığıma jeli de polimerleştikten sonra tarak dikkatlice çıkarıldı. Kuyucuklar saf su ile yıkandıktan sonra tank tamponu ile de yıkandı. Polimerleşmiş olan jellerin bulunduğu kaset elektroforez tankına yerleştirildikten sonra tankın altına ve üstüne yürütme tamponu konuldu.

Yüksek aktiviteye sahip olan enzimin toplam hacimi 100 µL olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponu ile karıştırıldı. Standart protein çözeltisi içerisinde her birinden 20 µg protein içerecek şekilde hazırlandı ve toplam hacim 100 µL olmak üzere 1:1 oranında numune tamponu ile karıştırıldı. Numuneler 3 dakika kaynatıldıktan sonra biraz soğumaları beklendi ve kuyucuklara yüklendi. Elektroforez 150 volt'a ayarlandı. Yürüme işlemi mavi bant jelin 1 cm'den daha az kalana kadar devam ettikten sonra akım kesilerek yürüme durduruldu. Jel cam plakalar arasından dikkatlice çıkarıldıktan sonra renklendirme çözeltisi içine konuldu. 30 dakika kadar çalkayıcıda bekletildi. Renklendirme çözeltisinden alınan jelin üzerine renksizleştirme çözeltisi konuldu ve belirli aralıklara değiştirilerek protein bantları belirginleşinceye kadar renksizleştirme çözeltisi içinde bekletildi. Renksizleştirme çözeltisinden çıkarılan jelin son halinin fotoğrafı çekildi.

## 2.2.6 Protein Tayini

### 2.2.6.1 Kalitatif Protein Tayini

Kromatografi işlemleri sonucunda elde edilen elüatlar eşit hacimde alındıktan sonra her biri için kalitatif protein tayini yapıldı. Bu yöntemin temel prensibi, proteinin yapısında bulunan fenilalanin, tirozin ve triptofan gibi amino asitlerin 280 nm’de UV ışınları absorblamaları esasına dayanmaktadır [69]. Kuvartz küvetlere alınan fraksiyonların absorpsanları spektrofotometrede 280 nm’de köre karşı ölçüldü ve kör olarak elüsyon (proteinin içinde bulunduğu) tamponu kullanıldı.

### 2.2.6.2 Bradford Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini

Saflaştırma basamaklarından ayrılmış olan enzim çözeltilerindeki protein miktarı tayinleri, Bradford yöntemi ile belirlendi. Yöntemin temel prensibi, Coomassie brillant-blue G-250 reaktifi ile fosforik asit içeren ortamda proteinlerin, kompleks oluşturması ve oluşan bu kompleksin 595 nm’de maksimum absorpsan göstermesi esasına dayanmaktadır [70].

Bradford yönteminin diğer protein tayini yöntemlerine göre avantajı,

- Çok kısa sürede uygulanabilir olması,
- Bozucu faktörlerin az olması,
- Protein-boya kompleksinin çözeltide uzun süre kalmamasıdır.

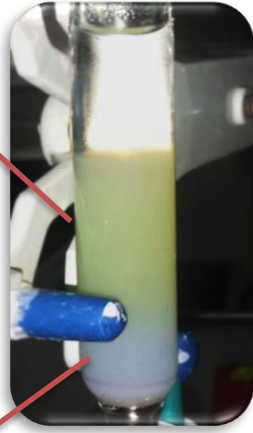
Bradford yöntemiyle kantitatif protein tayini işlemi şu şekilde gerçekleştirildi: 1 ml’inde 1 mg protein içeren standart sığır albumin çözeltilisinden 0’dan 100 µL’ye kadar tüplere alındı ve 5 mM fosfat tamponu (pH: 6.3) ile tüm tüplerin hacimleri 100 µL’ye tamamlandı. Her tüpe 5 ml Coomassie brillant blue G-250 reaktifi ilave edildikten sonra tüpler vorteks ile karıştırılarak 10 dakika sonunda 595 nm’de absorpsan değerleri okunarak kayda geçildi. Standart grafik, absorpsan değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri ile hazırlandı.

Enzim çözeltilerinden 0.1'er ml iki farklı tüpe alınarak üzerlerine 5'er ml Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi eklendi ve vortekste karıştırıldı. 595 nm'de 10 dakika sonra absorbansları ölçüldü ve iki ölçümün ortalama absorbansına karşılık gelen protein miktarı standart grafik yardımı ile hesaplandı.

### **2.2.7 Saflaştırılan Enzimin İmmobilizasyonu**

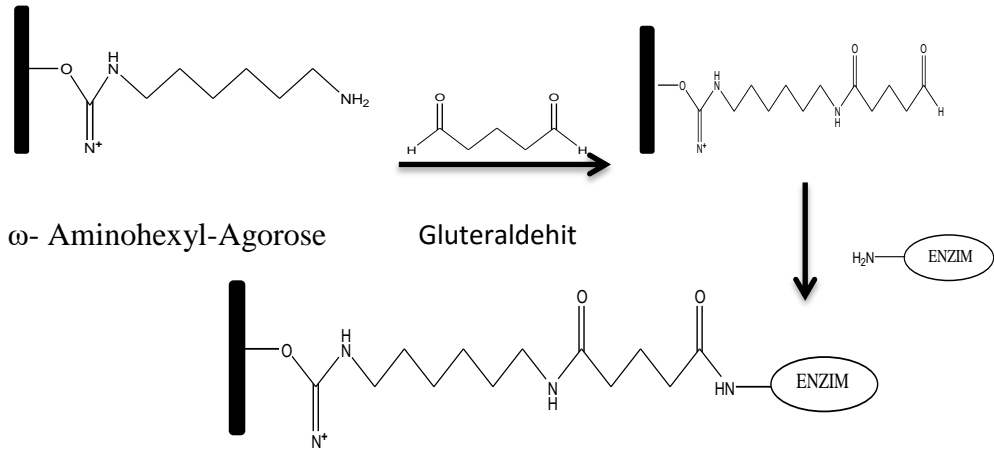
Saflaştırılan polifenol oksidaz enziminin protein miktarı en yüksek olan tüpler birleştirildi. Kolona primer amin içeren jel ( $\omega$ - Aminohexyl-Agrose) konuldu ve pH:8 fosfat tampon ile yıkandı. Ardından kolona %3'lük gluteraldehit çözeltisi eklenerek 30 dakika beklendi. Yarım saat sonunda musluk açıldı ve bağlanmayan gluteraldehit saf su ile iyice yıkanarak ortamdan uzaklaştırıldı. Kolondaki çözeltinin tamamen boşaltıldığından emin olunduktan sonra kalitatif protein tayini ile protein miktarı belirlenmiş hacmi belli enzim çözeltisi eklendi +4 °C'de 2 saat bekletildi ve kovalent bağlanmanın gerçekleşmesi sağlandı. Kolon musluğu açılarak bağlanmayan enzim çözeltisi 15'lik falkon tüpte toplandı ve bu çözeltinin protein miktarı belirlendi. Daha sonra çift bağları indirgemek için redüksiyon ajanı olan NaBH<sub>4</sub> kullanıldı.

$\omega$ - Aminoheksyl-Agoros +  
Gluteraldehit



NaBH<sub>4</sub> ilavesinden  
sonra jelin son hali

$\omega$ - Aminoheksyl-Agorose



**Şekil 2.1:** PPO'nun gluteraldehit ile  $\omega$ - Aminoheksyl-Agorose jeline immobilizasyonu.

## **2.2.8 İmmobilize ve Serbest Enzimin Aktivite Tayini**

İmmobilize ve serbest enzimin aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edildi. Serbest enzim için aktivite ölçümü, 40 µL enzim çözeltisi alınıp daha önceden hazırlanmış olan 830 µL fosfat tamponu+ 130 µL çözeltisine hızlı bir şekilde ilave edildikten sonra 420 nm’de köre karşı bir dakikada absorbansda meydana gelen değişimi okunarak aktivite belirlendi.

1 Enzim Ünitesi: Reaksiyonun oluştuğu küvette 1 dakikada meydana gelen 0.001’lik artış olarak tanımlandı ve aktivite birimi olarak EU kullanıldı [71]. İmmobilize enzim için de 100 µL immobilize enzimi çeren kolondan elüat alınıp daha önceden hazırlanan 1640 µL fosfat tamponu + 260 µL substrat çözeltisine ilave edilerek cam deney tüplerinde 1 dakika kadar ters düz edilip reaksiyona girmesi sağlandıktan sonra 1000 µL alınarak küvete konuldu ve 420 nm’de köre karşı aktivite ölçümü okundu.

## **2.2.9 İmmobilize ve Serbest Enzimin Zaman, Sıcaklık, pH Değişimleri ile Termal Stabiliteleri**

### **2.2.9.1 İmmobilize ve Serbest Enzimin Termal Stabiliteleri**

İmmobilize edilmiş enzimin ve serbest enzimin termal stabilitelerinin belirlenmesi için 35 °C, 50 °C, 70 °C sıcaklıklardaki aktivitesinin 30 dakika arayla ölçüm yapıldı.

### **2.2.9.2 İmmobilize ve Serbest Enzimin Optimum pH Çalışmaları**

İmmobilize ve serbest enzim için farklı pH aralıklarında ( pH= 4, 5, 6, 6.8, 7, 8, 9, 10, 11) enzim aktivite değişimi belirlendi.

### **2.2.9.3 İmmobilize ve Serbest Enzimin Optimum Sıcaklık Çalışmaları**

İmmobilize ve serbest enzimin sıcaklıkla olan aktivite değişimlerini görmek amacıyla hem immobilize enzim için hem de serbest enzim için 10 °C ve 70 °C arasındaki aktivite değerleri belirlendi.

### **2.2.10 Optimum Şartlarda $K_m$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunması**

Kinetik sabitlerin ( $K_m$  ve  $V_{max}$ ) belirlenmesi amacı ile optimum şartlarda farklı substrat (katekol) konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümleri iki kez yapılarak ortalaması alındı.

$1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri hesaplanarak Linewear-Burk grafikleri çizildi ve grafiklerin denklemlerinden yararlanılarak  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri bulundu.

### **2.2.11 İmmobilize ve Serbest Enzim Üzerine Bazı İnhibitörlerin $IC_{50}$ Değerlerinin bulunması**

Farklı inhibitörlerin (*p*-aminobenzoik asit, kafeik asit, gallik asit, L-askorbik asit, kojik asit)  $IC_{50}$  değerlerini bulmak amacıyla, optimum şartlarda katekol substratının 10 mM sabit konsantrasyonunda çalışma yapıldı. %100 aktivite olarak, inhibitörsüz ortamda bulunan enzim aktivitesinin değeri kullanıldı. Farklı inhibitor konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbanslar 420 nm'de ölçüldü. Belirlenen absorbans değerlerinden % aktivite hesaplandı. Çizilen %Aktivite grafiklerinden her bir inhibitor için  $IC_{50}$  değerleri hesaplandı.

### **2.2.12 Serbes ve İmmobilize Enzimin Depolama Kararlılığı**

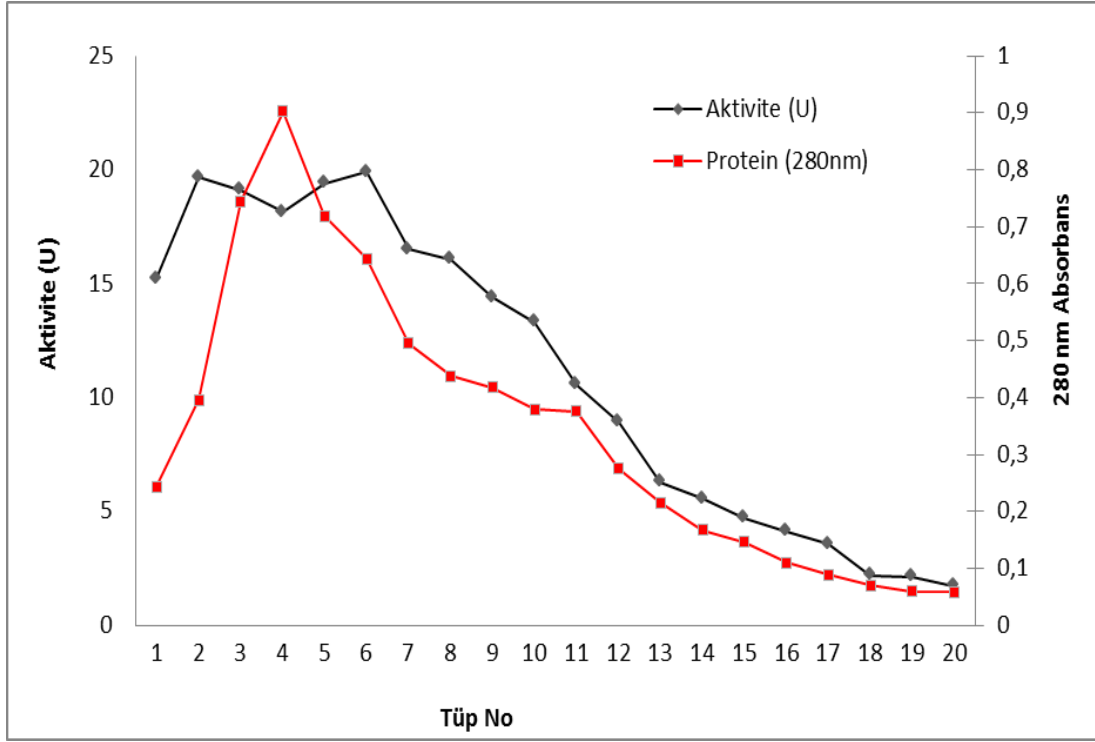
İmmobilize ve serbest enzimin depo kararlılığını belirlemek amacıyla belirli aralıklarla serbest ve immobilize enzimin aktiviteleri ölçüldü.

### 3. BULGULAR

#### 3.1 Enzimin Saflaştırılması

Bölüm 2.2.4.2’de belirtildiği gibi hazırlanan afinite kolonu öncelikle 0.05 M sodyum fosfat dibazik ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) tamponu (pH:5.00) ile dengelendi ve hemen sonra diyaliz işleminden elde edilen enzim çözeltisi kolona tatbik edildi ve kolon sodyum fosfat dibazik ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) tamponuyla yıkandı. Yıkama çözeltisi 2 ml’lik epondorflara toplandı. Yıkama işlemi 280 nm’de ki absorbans 0.02 oluncaya kadar devam edildi.

Yıkamadan sonra elüsyon işlemi gerçekleştirildi. Kolondan 0.05 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ / 1 M NaCl elüsyon tamponu (pH:7.00) geçirildi. Alınan elüatlar 2 mL olan epondorflara toplandı. Elüsyon işlemi 280 nm’de ki absorbans 0.02 oluncaya kadar devam edildi. Elüsyon tamponu kör olarak kullanıldı ve her tüpte 280 nm’de kalitatif protein tayini yapıldı. Ayrıca her tüp için 420 nm’ de aktivite tayinine bakıldı. Elde edilen değerlerin tüp numarasına karşı grafiği çizildi (Şekil 3.1) ve afinite kromotografisi sonunda enzim aktivitesi olan tüpler birleştirildi. Kolona tatbik edilen numune ve elüat çözeltileri için kantitatif protein ve aktivite tayinleri yapıldı. Böylece spesifik aktivite ve saflaştırma oranları tespit edildi.



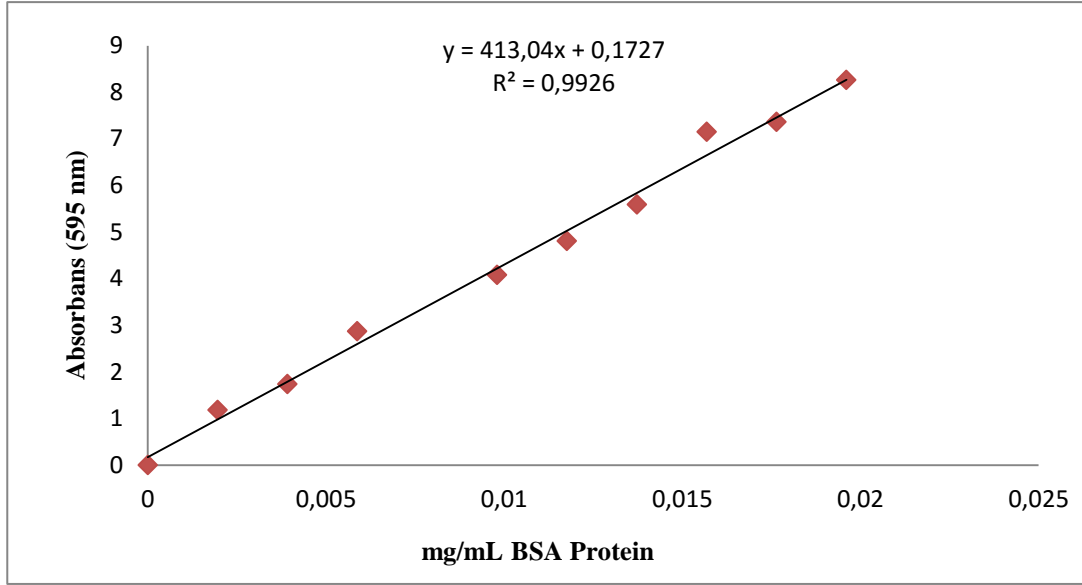
**Şekil 3.1:** Afinite kolonundan PPO enziminin elüsyonu.

**Tablo 3.1:** PPO Enziminin Saflaştırma Tablosu.

Saflaştırma basamağı	Hacim (ml)	Aktivite (U/mL/dak)	Toplam Aktivite (unit)	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (unit/mg)	Saflaştırma Derecesi	Verim
Ham Ekstrakt	78	12700	990600	0.00203	0.15834	6256536	—	100
Amonyum Sülfat	8	13325	106600	0.0077	0.616	1730519	0.27	10.70
Afinite kromotografisi	2	14650	29300	0.00428	0.00856	342289719	54.70	2.95

### 3.2 Kantitatif Protein Tayini için Hazırlanan Standart Eğri

Kantitatif protein tayininde Bradford yöntemi kullanıldı ve standart grafik 2.2.6.2’de açıklandığı gibi hazırlandı.



Şekil 3.2: Bradford yöntemine göre protein standart grafiği.

### 3.3 İmmobilizasyon Veriminin Hesaplanması

İmmobilizasyon veriminin hesaplanması için, bradford yöntemi ile hazırlanan standart grafiğinden yararlanılarak protein miktarları bulundu.

$$x = \frac{y + 0,1727}{413,04}$$

Denklemden y yerine, serbest ve immobilize enzimin absorbans değerleri yazılarak x değeri bulundu. Bulunan x değeri serbest ve immobilize enzim için protein miktarını verdi. Aşağıdaki eşitlikten % verim olarak bulundu.

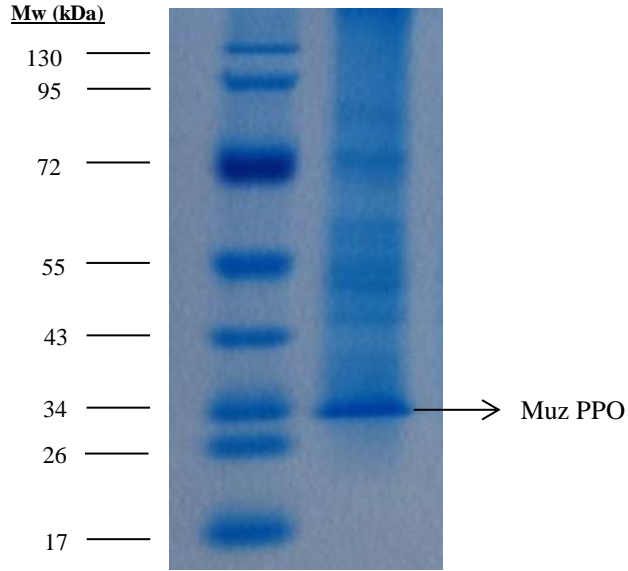
$$\% \text{ Verim} = \frac{\text{Bağlanan Protein Miktarı}}{\text{İmmobilizasyon öncesi protein miktarı}} \times 100$$

**Tablo 3.2:** İmmobilize enzimin % Verim hesabı.

İmmobilizasyon öncesi protein miktarı ( $\mu\text{g}$ ) X	İmmobilizasyon sonrası protein miktarı ( $\mu\text{g}$ ) Y	Bağlanan protein miktarı ( $\mu\text{g}$ ) (X-Y)	% Verim
0.0070	0.0030	0.0040	57.14

### 3.4 Polifenol Oksidaz Enziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi

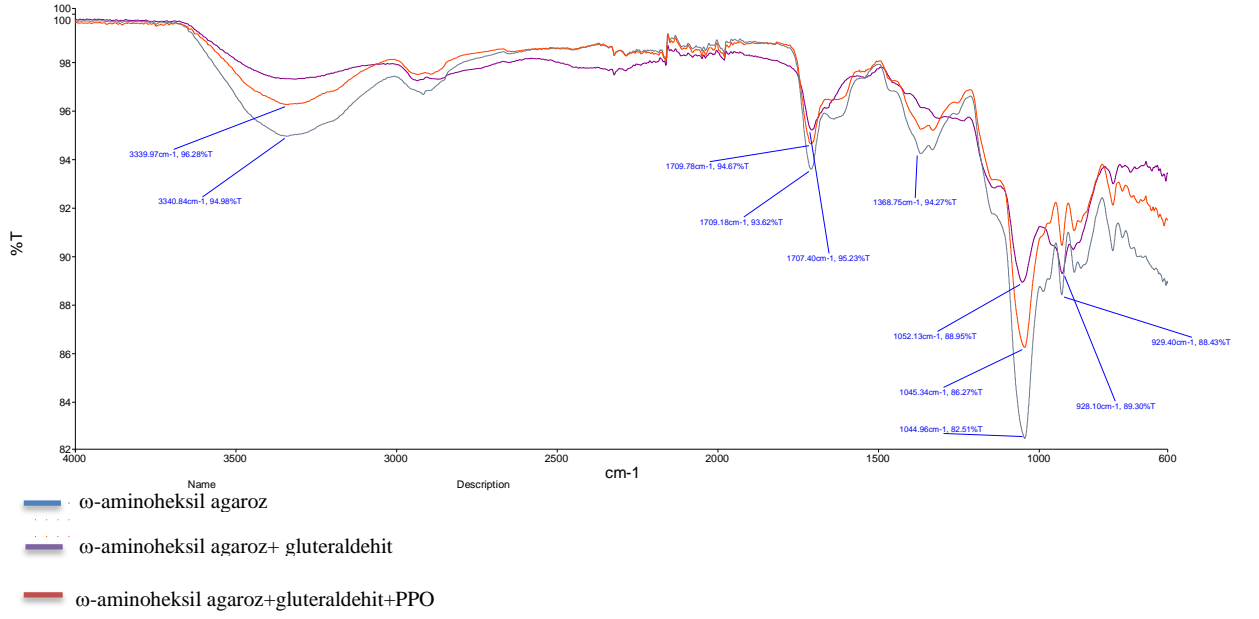
Saflaştırılan polifenol oksidazın saflık kontrolünü yapmak amacıyla bölüm 2.2.5’de belirtildiği gibi hazırlanan jel elektrofrezine saflaştırılmış olan PPO’ın numuneleri tatbik edildi ve protein bantlarını içeren jelin fotoğrafı çekildi.



**Şekil 3.3:** Sepharose 4B-L-tirozin-*p*-amino benzoik asit jeli ile saflaştırılan muz PPO enziminin SDS poliakrilamid jel elektrofrezisi.

### 3.5 Polifenol Oksidaz Enziminin İmmobilizasyonu

Polifenol oksidaz enziminin immobilizasyonundan sonra karakterizasyonu için FT-IR spektrum çalışması yapıldı. Bu amaçla  $\omega$ -aminoheksil agaroz jeli,  $\omega$ -aminoheksil agaroz+gluturaldehit ve  $\omega$ -aminoheksil agaroz+gluturaldehit+PPO enziminin yapıları FT-IR spektrumları Şekil 3.4’de gösterildiği gibi bulundu.



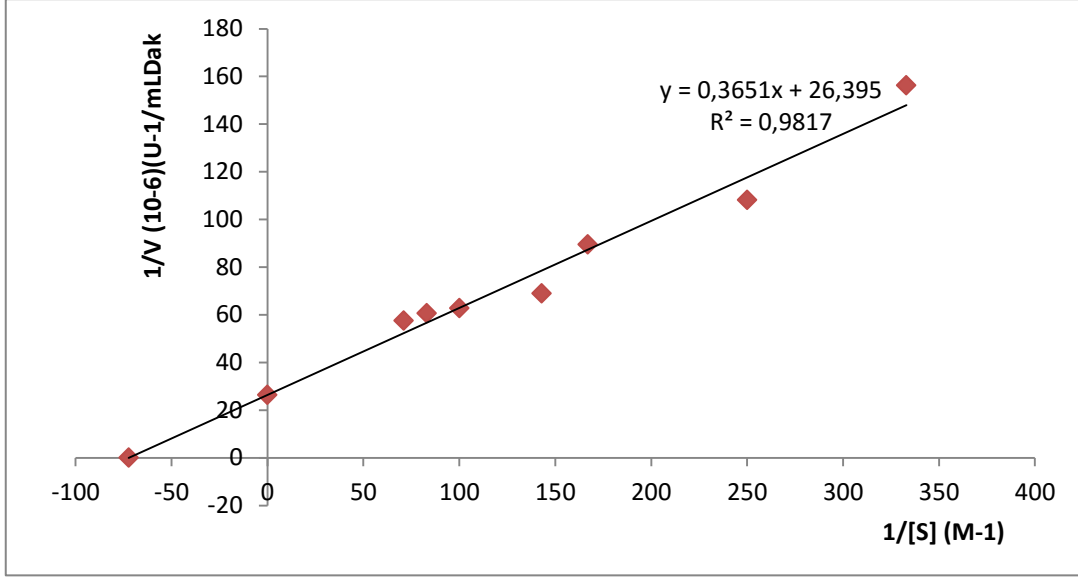
Şekil 3.4: FT-IR spektrumu.

### 3.6 Optimum Şartlarda Serbest Enzimin $K_m$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunması

Serbest enzimin  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerinin bulunması amacıyla, optimum şartlarda polifenol oksidaz enziminin substratı olan katekolun değişen konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı. Her ölçüm iki kez tekrarlandı ve bu ölçümlerin ortalaması alındı. 420 nm'de ölçülen aktivite değerleri reaksiyon hızı (U/ml dakika) olarak alındı.  $1/V$ 'ye  $1/[S]$  değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Grafikten yararlanılarak  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri bulundu.

**Tablo 3.3:** PPO enzimin katekol substratı kullanılarak  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözümlerin hacimleri, U aktivite,  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri.

0.1 M $Na_2HPO_4$ Tamponu(ml)	Enzim Çözeltisi Hacmi(ml)	Substrat Çözeltisi Hacmi (ml)	Küvetteki Toplam Hacim (ml)	Küvetteki Substrat Kons. [S] (M)	$\Delta OD$ (420 nm)	Aktivite (U/mLdak)	1/V	1/S
0.93	0.04	0.03	1	0.03	0.256	6400	150	333
0.92		0.04		0.04	0.370	9250	110	250
0.91		0.05		0.05	0.447	11175	89	167
0.9		0.06		0.06	0.580	14500	68	143
0.89		0.07		0.07	0.638	15950	61	100
0.87		0.08		0.08	0.660	16500	54	83
0.86		0.09		0.09	0.696	17400	49	71



**Şekil 3.5:** Muz PPO enziminin katekol substratına karşı Lineweaver-Burk grafiği.

**Tablo 3.4:** Serbest enzimin  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri.

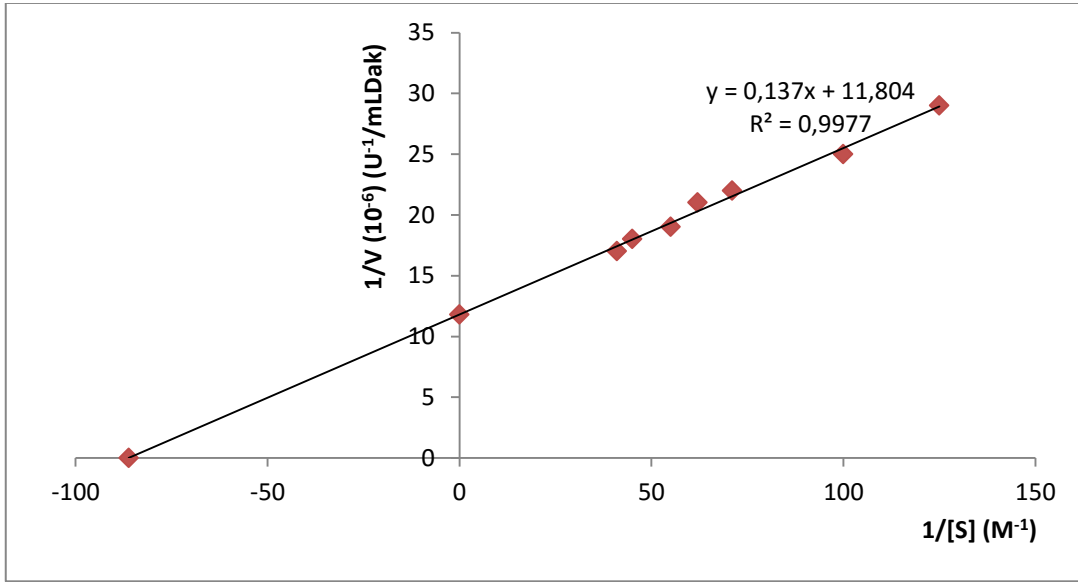
Substrat	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (U/mLdak)	$V_{max}/K_m$
Katekol	13.8	37887	2738.975

### 3.7 İmmobilize Enzimin $K_m$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunması

İmmobilize enzimin kinetik sabitlerin ( $K_m$  ve  $V_{max}$ ) bulunması için, optimum şartlarda polifenol oksidaz enziminin substratı olan katekolun değişen konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümleri iki kez yapılarak ortalaması alındı.. 420 nm'de ölçülen aktivite değerleri reaksiyon hızı (U/ml dakika) olarak alındı.  $1/V$ 'ye  $1/[S]$  değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Grafikten yararlanılarak  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri bulundu.

**Tablo 3.5:** İmmobilize edilmiş PPO enzimin katekol substratı kullanılarak  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilenin hacimleri, U aktivite,  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri.

0.1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ Tamponu (mL)	İmmobilize Enzimin Hacmi (mL)	Substrat Çözeltilisi Hacmi (ml)	Küvetteki Toplam Hacim (ml)	Küvetteki Substrat Kons. [S] (M)	$\Delta\text{oD}$ (420 nm)	Aktivite (U/mLdak)	$1/V$	$1/S$
1.84	0,1	0.06	1000	0.06	0.099	2475	29	125
1.82		0.08		0.08	0.134	3350	25	100
1.80		0.1		0.1	0.159	3975	22	71
1.76		0.14		0.14	0.179	4475	21	62
1.74		0.16		0.16	0.188	4700	19	55
1.72		0.18		0.18	0.201	5025	18	45



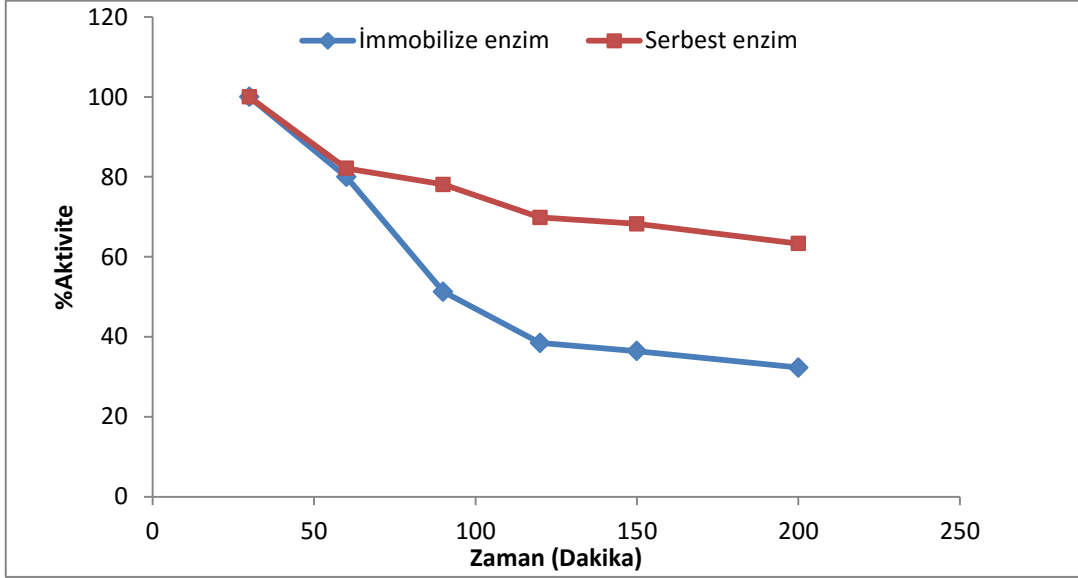
**Şekil 3.6:** Muz İmmobilize PPO enziminin katekol substratına karşı Lineweaver-Burk grafiği.

**Tablo 3.6:** İmmobilize enzimin  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri.

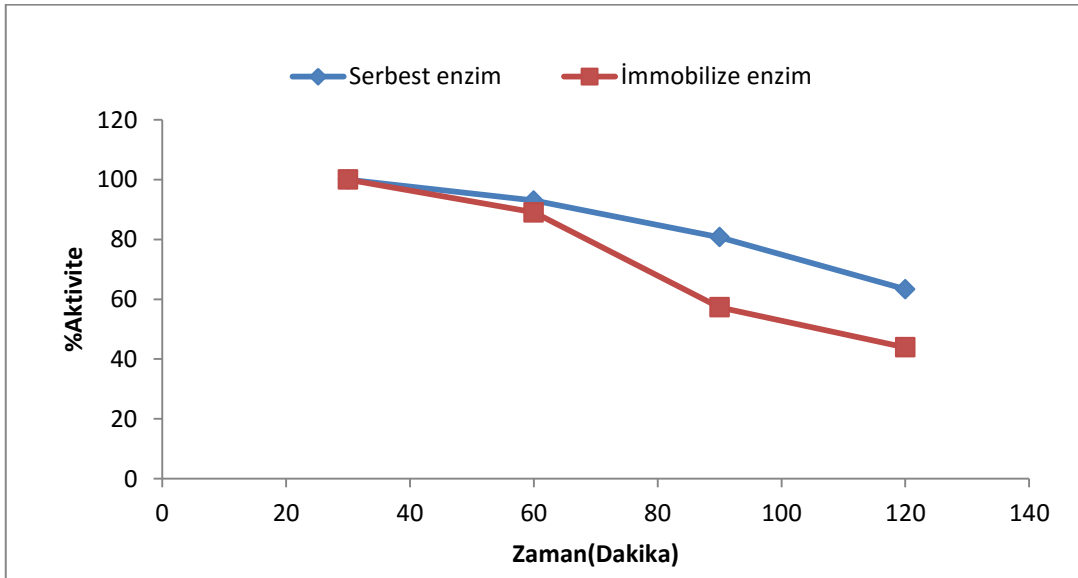
Substrat	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (U/mLdak)	$V_{max}/K_m$
Katekol	12	84724.22	7060.4

### 3.8 İmmobilize ve Serbest Enzimin Termal Stabilitesi

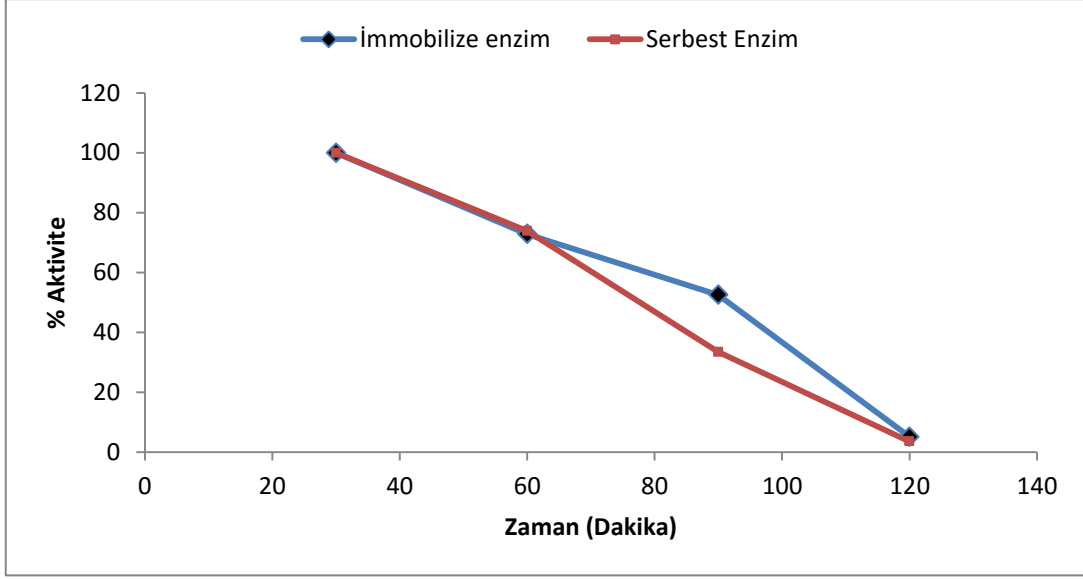
Serbest ve immobilize enzimin termal stabilitelerini belirlemek amacıyla bölüm 2.2.9.1’ de anlatıldığı gibi uygulanmış olup şekil 3.7, şekil 3.8 ve şekil 3.9’de ki sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 3.7: Serbest ve İmmobilize enzimin 35 °C’de %Aktivite-Zaman grafiği.



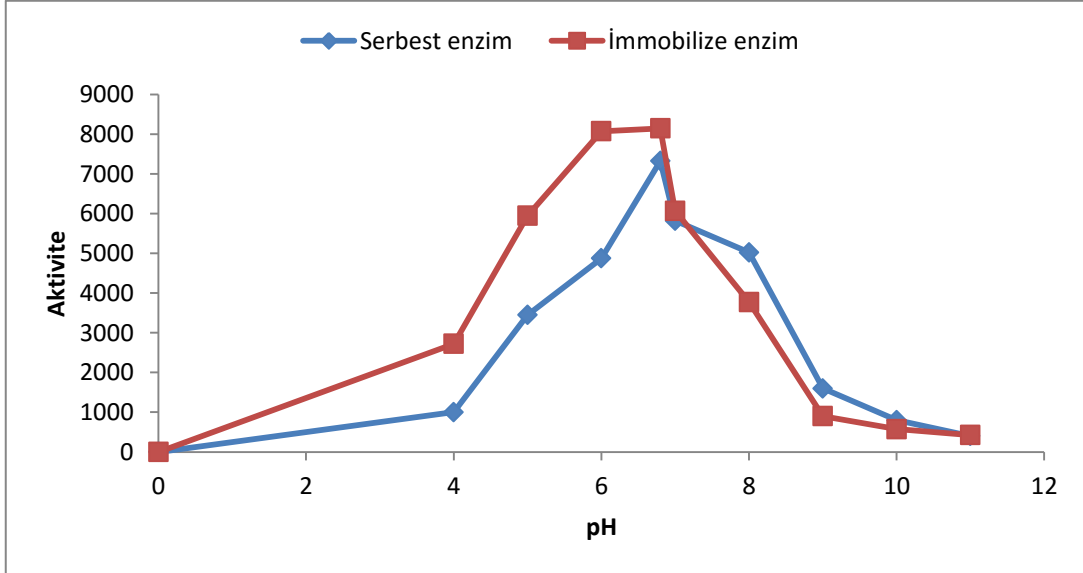
Şekil 3.8: Serbest ve İmmobilize enzimin 50 °C’de % Aktivite- Zaman grafiği.



Şekil 3.9: Serbest ve İmmobilize enzimin 70 °C’de % Aktivite-Zaman grafiği.

### 3.9 Serbest ve İmmobilize Enziminin Aktivitelerinin pH ile Değişimleri

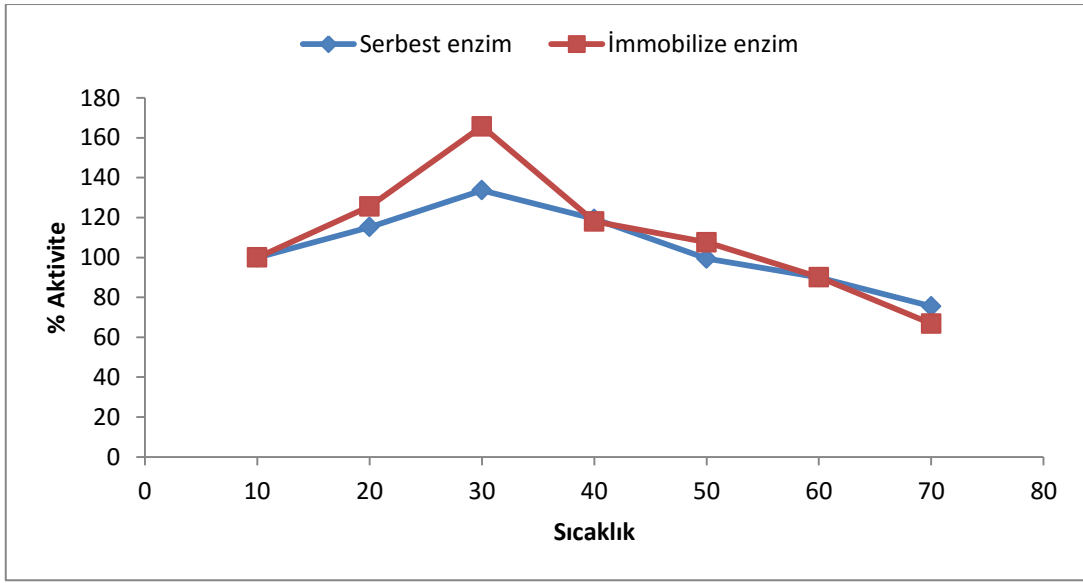
pH’ın serbest enzime ve immobilize enzime etkilerini belirlemek amacı ile 2.2.9.2’de belirtildiği gibi uygulanmış olup sonuçlar Şekil 3.10’da ki gibidir.



Şekil 3.10: Serbest ve İmmobilize Enzimin Aktivite-pH Grafiği.

### 3.10 Serbest ve İmmobilize Enziminin Aktivitelerinin Sıcaklıkla Değişimi

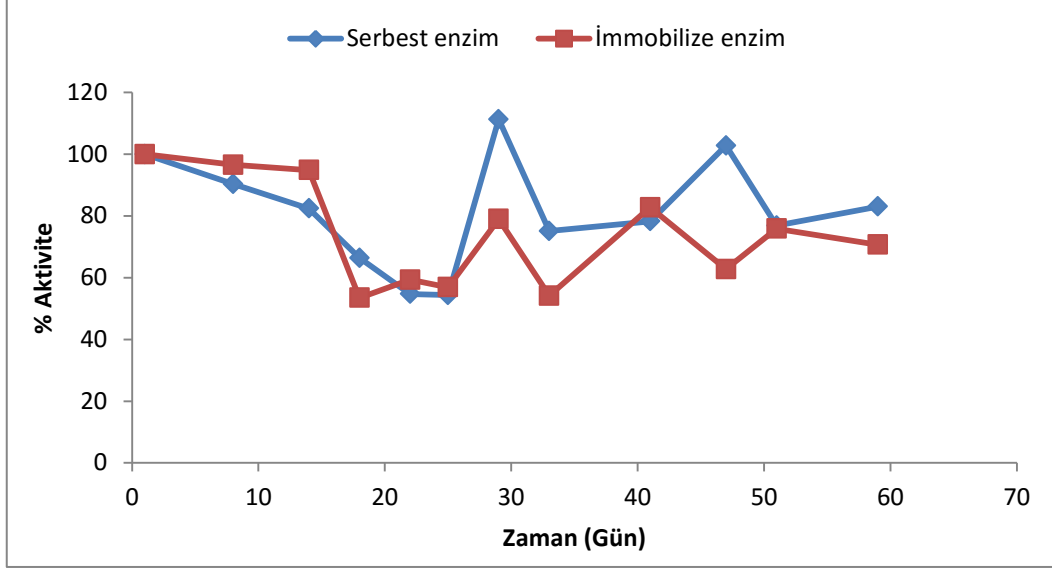
Bölüm 2.2.9.3’de ifade edildiği gibi serbest ve immobilize enzimin sıcaklıkla olan aktivite değişimlerini gözlemlemek amacıyla her ikisinin de 10 °C ve 70 °C arasındaki aktivite değerleri incelendi ve serbest ve immobilize enzim için Şekil 3.11’de ki sonuçlar elde edildi.



**Şekil 3.11:** Serbest ve İmmobilize enzimin 10 °C ve 70 °C’ de aralığındaki sıcaklıkla değişimi.

### 3.1 Serbest ve İmmobilize Enziminin Depolama Kararlılığı

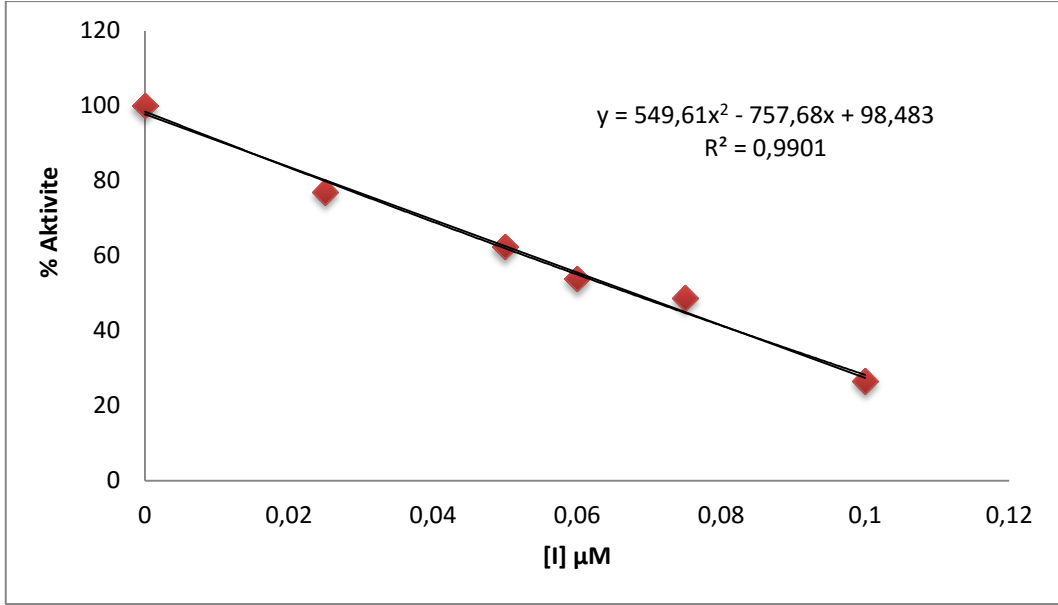
Serbest ve immobilize polifenol oksidaz enziminin depo kararlılığını belirlemek amacıyla 3-4 günde bir aktiviteleri ölçüldü.



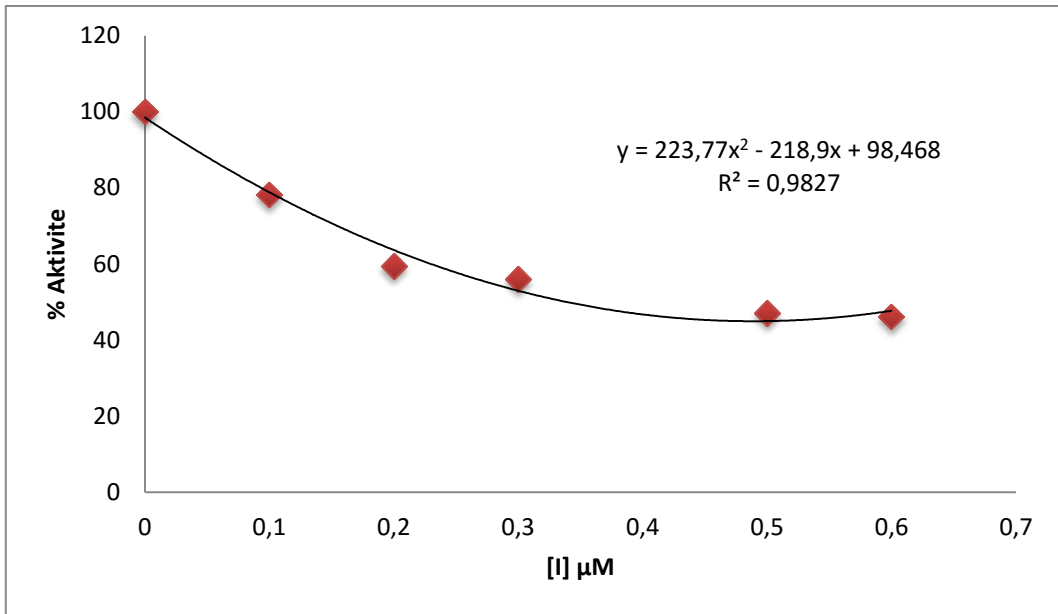
Şekil 3.12: Serbest ve immobilize enzimin depolama kararlılığı.

### 3.1 Serbest ve İmmobilize Enzimin Farklı İnhibitörler için IC<sub>50</sub> Değerlerinin Bulunması

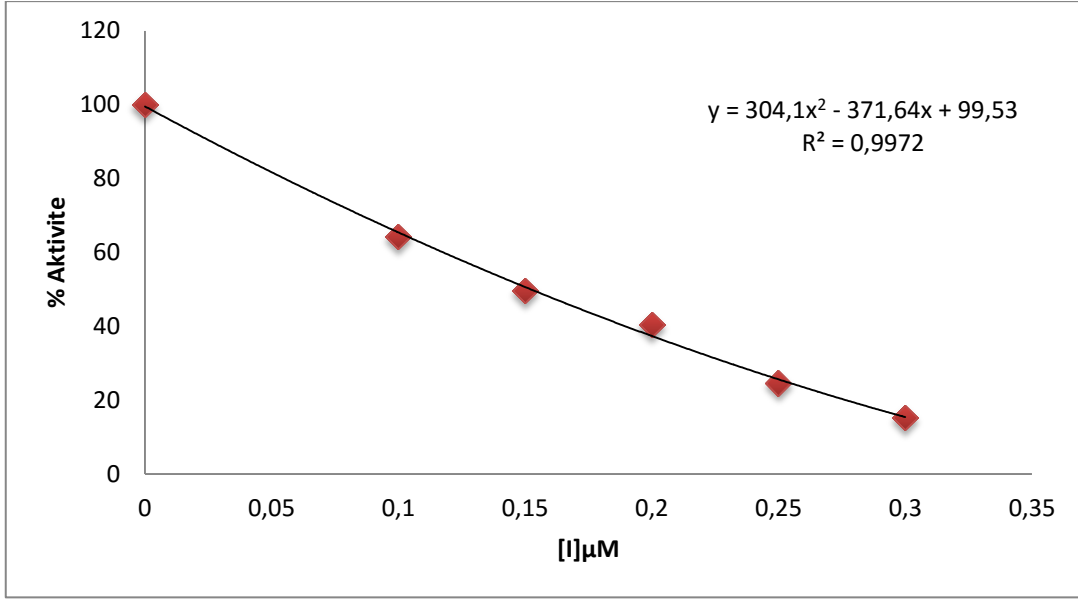
İnhibitörlerin IC<sub>50</sub> değerlerini bulmak için optimum şartlarda katekol substratının 0.1 M sabit konsantrasyonunda çalışıldı. 0.1 M katekol hazırlanarak her ölçümde 130 µL alındı. İnhibitör çözeltilerinden ise farklı hacimlerde alınarak toplam 1000 µL'lik hacim oluşturulduktan sonra, öncelikle inhibitörsüz ortamda bulunan enzim aktivitesi %100 aktivite olarak kullanıldı. Daha sonra optimum pH ve sıcaklıkta 40 µL enzim çözeltisi alınıp daha önceden hazırlanmış olan 960 µL tampon+substrat+inhibitor çözeltisine hızlı bir şekilde ilave edildikten sonra 420 nm'de bir dakikada absorbansda meydana gelen değişme okundu ve % aktivite grafikleri çizildi (Şekil 3.13, Şekil 3.14, Şekil 3.15, Şekil 3.16, Şekil 3.17, Şekil 3.18, Şekil 3.19, Şekil 3.20, Şekil 3.21, Şekil 3.22). Çizilen grafiklerden yararlanılarak IC<sub>50</sub> değerleri hesaplandı (Tablo 3.7).



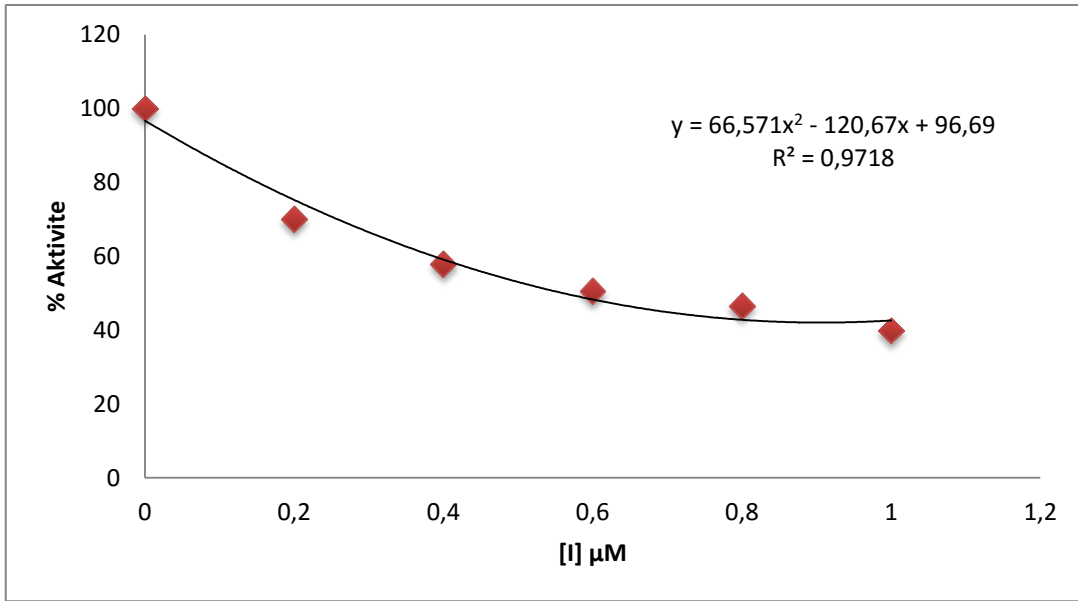
Şekil 3.13: İmmobilize Enzimin *p*-aminobenzoik asit inhibitörüne karşı % aktivite grafiği.



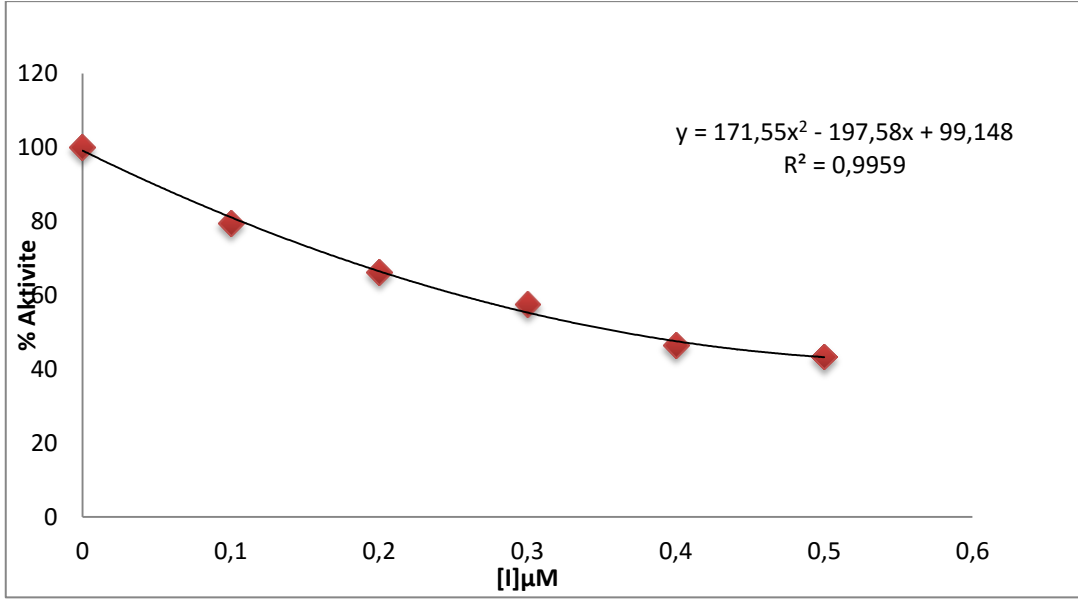
Şekil 3.14: Serbest Enzimin *p*-aminobenzoik asit inhibitörüne karşı % Aktivite grafiği.



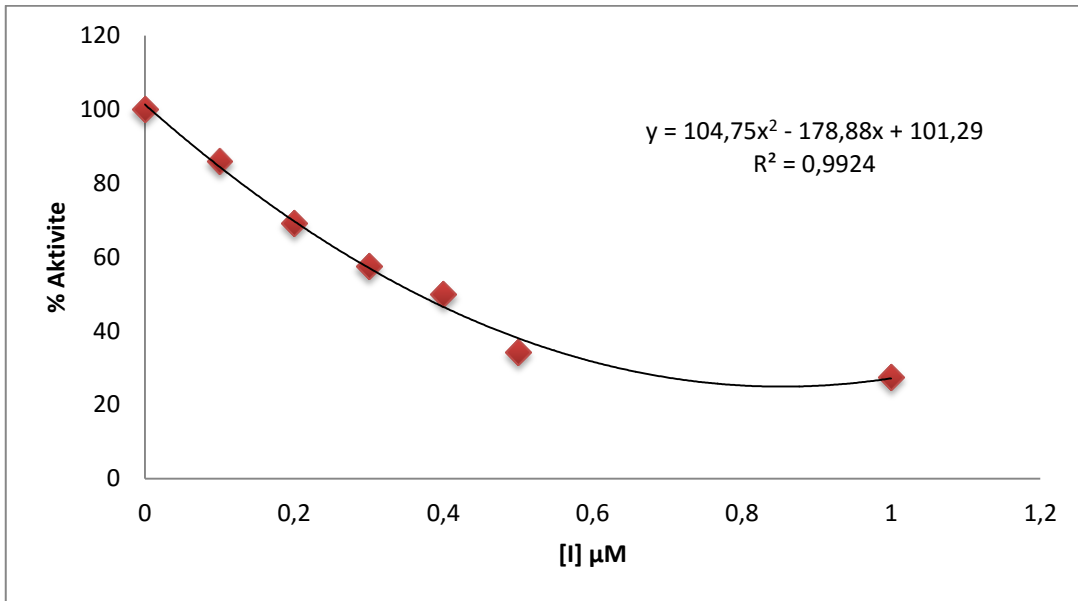
**Şekil 3.15:** İmmobilize enzimin Kafeik Asit inhibitörüne karşı % Aktivite grafiği.



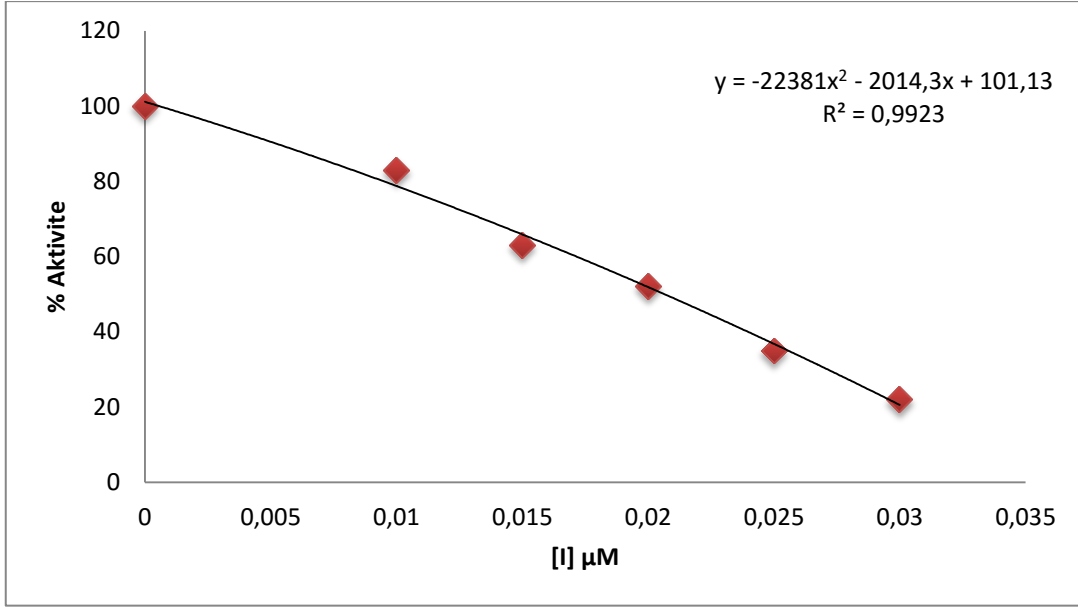
**Şekil 3.16:** Serbest enzimin Kafeik asit inhibitörüne karşı % Aktivite grafiği.



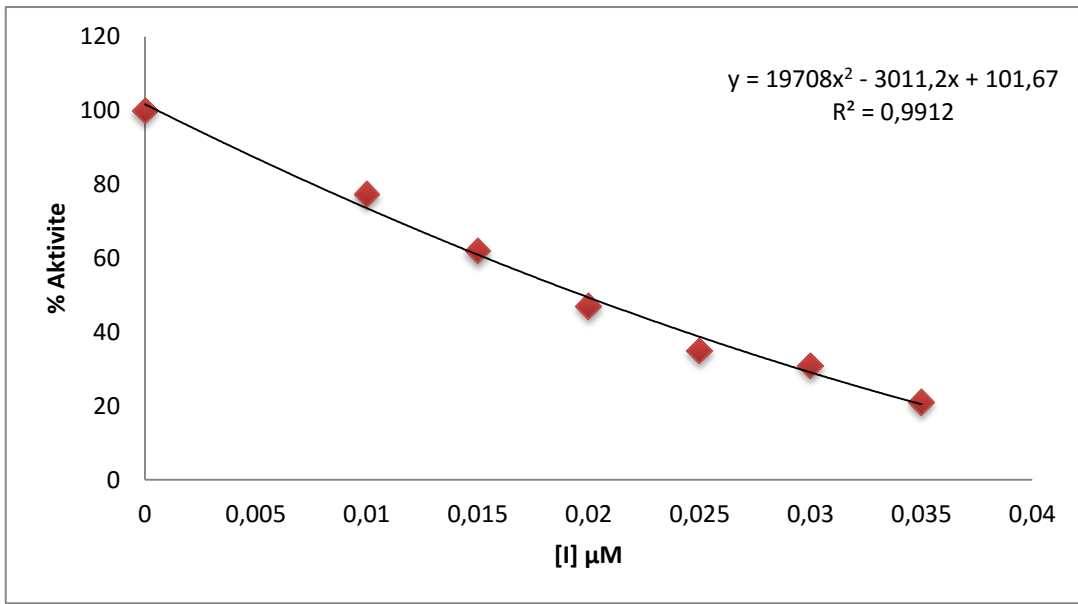
**Şekil 3.17:** İmmobilize enzimin Kojik asit inhibitörüne karşı % Aktivite grafiği.



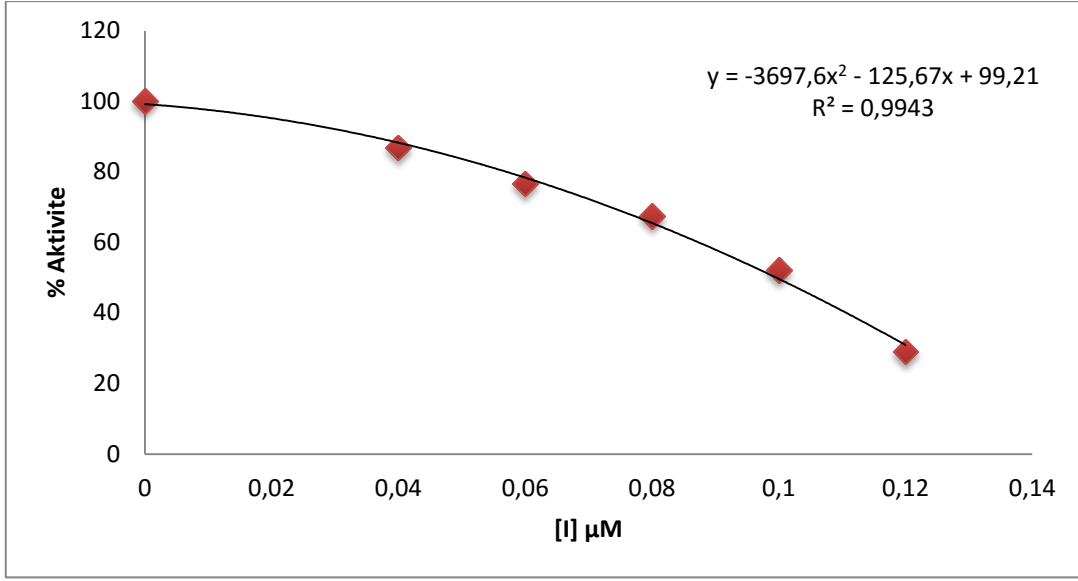
**Şekil 3.18:** Serbest enzimin Kojik asit inhibitörüne karşı % Aktivite grafiği.



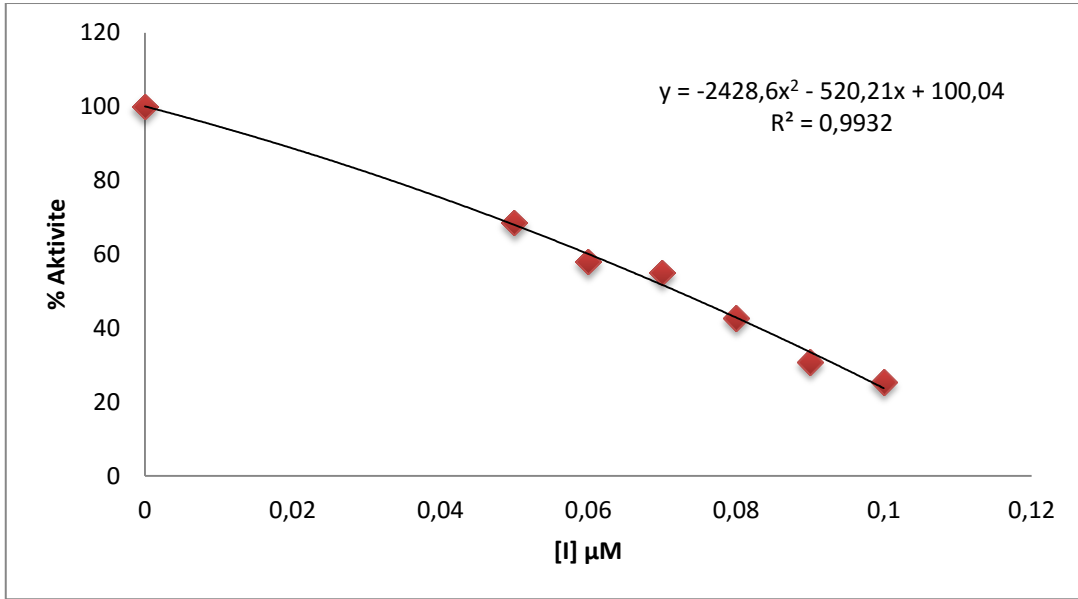
Şekil 3.19: İmmobilize enzimin L-askorbik asit inhibitörüne karşı % Aktivite grafiği.



Şekil 3.20: Serbest enzimin L-askorbik asit inhibitörüne karşı % Aktivite grafiği.



Şekil 3.21: İmmobilize enzimin Gallik Asit inhibitörüne karşı %aktivite grafiği.



Şekil 3.22: Serbest enzimin Gallik Asit inhibitörüne karşı % aktivite grafiği.

**Tablo 3.7:** İnhibitörlerin serbest ve immobilize polifenol oksidaz enzimi için IC<sub>50</sub> değerleri.

<b>İnhibitörler</b>	<b>Serbest enzim için IC<sub>50</sub> (µM)</b>	<b>İmmobilize enzim için IC<sub>50</sub> (µM)</b>
<i>p</i> -aminobenzoik asit	0.36	0.07
<b>Kafeik asit</b>	0.56	0.15
<b>Kojik asit</b>	0.36	0.36
<b>L-askorbik asit</b>	0.02	0.02
<b>Gallik asit</b>	0.07	0.13

## 4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda ilk olarak Arslan ve arkadaşlarının sentezlediği afinite jeli kullanılarak bölüm 2.2.4’de anlatıldığı gibi muzdan PPO enzimi saflaştırılmıştır [65]. Enzim saflaştırma yöntemleri içerisinde tek basamakta yüzlerce kat saflaştırmayı sağlayan afinite kromatografisi tekniği, biyoteknoloji, biyokimya, ve tıp gibi alanlarda saf enzim elde etmek için tercih edilen önemli bir uygulama alanıdır.

Literatürde PPO enziminin immobilizasyonu ile ilgili birçok çalışmada çeşitli desteklere immobilizasyonu sağlanmıştır. Ancak  $\omega$ -aminoheksil agaroz jeline immobilizasyonu bulunmamaktadır. Yapılan immobilizasyon sonucunda enzimin,  $\omega$ -aminoheksil agaroz jeline bağlanma yüzdesi 57,14 olarak bulunmuştur. Yaptığımız immobilizasyon yöntemi; gluteraldehit ile öncelikle  $\omega$ -aminoheksil agaroz jelinin yapısında bulunan  $\text{NH}_2$  gruplarını aktif hale getirip, daha sonra ortama PPO enzimi ilave ederek enzimin üzerindeki  $-\text{NH}_2$  gruplarına gluteraldehit ile kovalent bağlanması yöntemine dayanmaktadır [72].

İmmobilizasyon işleminden sonra, serbest enzimin ve immobilize enzimin, optimum pH, sıcaklık,  $K_m$  ve  $V_{max}$  kinetik sabitleri, termal kararlılıkları, depo kararlılığı ve çeşitli inhibitörlerin  $\text{IC}_{50}$  değerleri araştırılmıştır ve bunlara ait veriler raporlanmıştır.

PPO enziminin optimum pH değeri saflaştırma metoduna, substrata, enzimin hücre içindeki yerine ve enzim kaynağına bağlı olarak değişmektedir ve genellikle pH 4.0 ila 7.0 arasındadır [73]. İmmobilizasyon işlemi enzimin çalışma koşullarını daha ılımlı hale getirebilen bir metottur ve enzimin pH çalışma aralığını değiştirebilmekte veya genişletebilmektedir. Serbest ve immobilize PPO enzimi için optimum pH çalışması pH 4.0 ile 11.0 aralığında yapılmıştır.  $\omega$ -aminoheksil agaroz jeline tutuklanan PPO enzimi ve serbest enzim için optimum pH değeri 6.8 olarak bulunmuştur (Şekil 3.10). Sonuç olarak gerçekleştirilen immobilizasyon işleminin PPO’ın optimum pH’sı üzerinde herhangi bir değişiklik yapmadığını göstermektedir.

pH substrattaki iyonlaşabilen grupları etkileyebilir. İmmobilizasyon çalışmalarında optimum pH'sı enzimin yüküne ve kullanılan matrikse göre değişebilmektedir. Bu değişim, enzimin yapı-fonksiyon ilişkisinin anlaşılmasına yardımcı olmaktadır.

Yapılan literatür taramasında Arabacı ve arkadaşları ayva yapraklarından saflaştırılan PPO enziminin kalsiyum aljinat boncuklar üzerine immobilize edildiğini ve immobilize ve serbest enzimin sıcaklığını belirlemek amacıyla 4-70 °C aralığındaki sıcaklıklarda çalışıldığını ve optimum sıcaklıkları sırasıyla 35 ve 30 °C olduğu bildirilmektedir [74]. ω-aminoheksil agaroz jeline bağlanan PPO ve serbest enzimin sıcaklığa karşı duyarlılığını belirlemek amacı ile, 10 °C ve 70 °C aralığındaki sıcaklıklarda çalışılmıştır. ω-aminoheksil agaroz jeline bağlanan PPO enzimin optimum sıcaklığı 30 °C, serbest enzim için optimum sıcaklık 30 °C olarak bulunmuştur (Şekil 3.11).

Yapılan bir diğer çalışmada amonyum sülfat ile proteinleri çöktürülen mantarın Serolose-4B destek üzerine poliklonal bağıştıran bileşiğe bağlayarak tirozinazın direkt immobilizasyonunu sağlamışlardır ve çözünür ve immünafiniteye bağlı tirozinazın termal kararlılığı 55 °C' den sonra izlenmiştir. Çözünür tirozinaz aktivitesini kaybederken immobilize edilen tirozinaz 55 °C' de aktivitesinin yaklaşık %26'sını koruduğu gözlemlenmiştir [75]. ω-aminoheksil agaroz jeline tutuklanan PPO enziminin ve serbest enzimin termal kararlılık çalışması 35, 50 ve 70 °C sıcaklıklarda yapılmıştır. 35°C'de serbest enzimin sonuçları incelendiğinde 3 saatin sonunda hala aktivitesinin % 63'ünü koruduğu 50 °C'de 2 saat sonunda aktivitesinin %63'ünü koruduğu 2.5 saat sonunda ise aktivitesini tamamen kaybettiği, 70 °C'de 1 saat sonunda aktivitesinin %73'ünü koruduğu 2 saat sonunda ise aktivitesini tamamen kaybettiği gözlemlenmiştir. İmmobilize enzimin sonuçları incelendiğinde ise 35 °C'de 1 saat sonunda aktivitesinin %80'nini koruduğu 3 saat sonunda ise aktivitesinin % 34'ünü koruduğu, 50 °C'de ise 1 saat sonunda aktivitesinin % 87'sini koruduğu, 2 saat sonunda ise %43'ünü koruduğu, 70°C'de ise 1 saat sonunda aktivitesinin %73'ünü koruduğu, 2 saat sonunda ise aktivitesini tamamen kaybettiği gözlemlenmiştir (Şekil 3.7, Şekil 3.8, Şekil 3.9).

$K_m$  enzimin substrata karşı olan ilgisiyle ters orantılıdır.  $K_m$  kinetik sabiti enzim ile substrat arasındaki ES kompleksinin sağlamlık ölçüsüdür ve bu değer küçüldükçe enzim ve substrat o kadar zor ayrışır.  $V_{max}$  sabiti ise enzimin aktifliğinin ölçüsü olup enzim ne kadar aktifse  $V_{max}$  o kadar yüksektir denir [76].

Yapılan bir diğer çalışmada ise çalışmanın ilk bölümünde tirozinaz, aljinat-jel boncuklar üzerine immobilize edilmiş, ikinci bölümünde ise amino grupları sayesinde tirozinaz moleküllerinin immobilizasyonu epiklorohdirin ile aktive edilmiş tirozinaz poli(akrilamid-ko-akrilik asit) hidrojel olarak immobilizasyonunu sağlamışlardır. Yapılan çalışmanın kinetik sabitleri ise serbest enzim için  $K_m$  değeri 0,607 mM,  $V_{max}$  değeri 0,0737  $U^{-1}mL$  olarak belirlemişlerdir. İmmobilize enzimlerin ise P(AAm-Co-AA) ve Ca-aljinat için bulunan  $K_m$  değerleri sırasıyla 1.408, ve 0.779 mM,  $V_{max}$  değerleri ise sırasıyla 0.0125 ve 0.9117  $U^{-1}mL$  olarak bulmuşlardır [77]. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada ise en az beş ayrı substrat konsantrasyonunda enzim aktivite değerleri belirlenerek elde edilen  $1/V$  ve  $1/[S]$  ile Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri bulundu. Serbest ve  $\omega$ -aminoheksil agaroz jeline bağlanan PPO enziminin  $K_m$  ve  $V_{max}$  kinetik sabitleri sırasıyla; 13.8 mM ile 37887  $U/mL$  ve 12 mM ile 84724.22  $U/mL$  olarak bulunmuştur.(Şekil 3.4 ve Şekil 3.5).

İmmobilize enzimin karakterizasyonu için FT-IR spektrum çalışması yapıldı ve bu amaçla  $\omega$ -aminoheksil agaroz jeli giriş maddesi olarak,  $\omega$ -aminoheksil agaroz+gluteraldehitin bağlı yapısı ve  $\omega$ -aminoheksil agaroz+gluteraldehit+PPO'ın bağlı yapılarının FT-IR spektrumlarına Şekil 3.4'de gösterildiği gibi bulunmuştur. Verilen spektrumları göz önüne aldığımızda  $\omega$ -aminoheksil agaroz+gluteraldehit+PPO'ın keton karbonil grubunun  $1709,78\text{ cm}^{-1}$  de gözlenen karbonil gerilmesi, amin süstitüe  $\omega$ -aminoheksil agaroz+gluteraldehit karışımında aldehit grubunun elektronik çevresinin değişmesi ve bu çevrenin elektron yoğunluğunun artmasıyla  $1707,40\text{ cm}^{-1}$ 'den daha yüksek frekansa kaymıştır.  $1368\text{ cm}^{-1}$  de gözlenen simetrik ve asimetrik alkilik C-H eğilmelerinin üründe net bir şekilde görülmektedir.  $1044,96\text{ cm}^{-1}$  de gözlenen alkolik C-N gerilmesi,  $\omega$ -aminoheksil agarozdan gluteraldehit katılmasıyla oluşan molekülün konjugasyona sahip olması ve yüksek enerjili -CH=N- gerilmesi sebebiyle yüksek frekansa kayarak  $1052,53\text{ cm}^{-1}$  civarında, pik şiddetinde bir azalmayla ürünün modifiye olduğunu

göstermektedir. Ancak son üründe  $1045,34 \text{ cm}^{-1}$  de gözlenen C-N gerilmesi ürünün elektronik çevresinin değişmesi sebebiyle pik şiddetini artırmış ve  $\text{NaBH}_4$  ile muamelesinden sonra konjugasyonun azalmasıyla daha düşük frekansa kaymıştır. Bu da bize immobilizasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.

İnhibisyon çalışmalarında; inhibitör olarak; *p*-aminobenzoik asit, kafeik asit, kojik asit, L-askorbik asit ve gallik asit kullanıldı. Bu inhibitörler için serbest enzim ve immobilize enzim  $\text{IC}_{50}$  değerleri hesaplandı.

*p*-aminobenzoik asitin serbest ve immobilize enzim üzerine etkisine bakıldığında, serbest enzimin  $\text{IC}_{50}$  değeri  $0,36 \mu\text{M}$  iken immobilize enzimin  $\text{IC}_{50}$  değeri  $0,069 \mu\text{M}$ 'dır. Bu da *p*-aminobenzoik asit inhibitörünün immobilize edilen enzim üzerine etkisinin daha güçlü olduğunu göstermektedir (Şekil: 3.13-Şekil 3.14).

Kafeik asitin serbest ve immobilize enzim üzerine etkisi bakıldığında, serbest enzimin  $\text{IC}_{50}$  değeri  $0,56 \mu\text{M}$  iken immobilize enzimin  $\text{IC}_{50}$   $0,15 \mu\text{M}$ 'dır. Bu da kafeik asit inhibitörünün immobilize edilen enzim üzerine etkisinin daha güçlü olduğunu göstermektedir (Şekil 3.15- Şekil 3.16).

Kojik asitin serbest ve immobilize enzim üzerine etkisi bakıldığında, serbest ve immobilize enzimin  $\text{IC}_{50}$  değeri  $0,36 \mu\text{M}$  olarak bulunmuştur. Bu da kojik asitin serbest ve immobilize enzim üzerine etkisinin aynı olduğunu göstermektedir (Şekil 3.17- Şekil 3.18).

L-askorbik asitin serbest ve immobilize enzim üzerine etkisine bakıldığında, serbest ve immobilize enzimin  $\text{IC}_{50}$  değeri  $0,020 \mu\text{M}$  olarak bulunmuştur. Bu da L-askorbik asitin serbest enzim ve immobilize enzim üzerine etkisinin aynı olduğunu göstermektedir (Şekil 3.19-Şekil 3.20).

Gallik asitin serbest ve immobilize enzim üzerine etkisine bakıldığında, serbest enzimin  $\text{IC}_{50}$  değeri  $0,071 \mu\text{M}$  immobilize enzimin  $\text{IC}_{50}$  değeri  $0,13 \mu\text{M}$ 'dır. Bu da gallik asitin serbest enzim üzerine etkisinin daha güçlü olduğunu göstermektedir (Şekil 3.21- Şekil 3.22).

Sonuç olarak yapılan bu çalışmada aşağıdaki bulgular elde edilmiştir.

- PPO enzimi, Sepharose-4B-L-tirozin-*p*-amino benzoik asit kimyasal yapısına sahip önceden bilinen afinite jeli ile muzdan saflaştırılmıştır ve SDS-PAGE ile saflık kontrolü yapılmıştır.
- Saflaştırılan polifenol oksidaz enzimi,  $\omega$ -aminoheksil agaroz jeli üzerine gluteraldehit ile kovalent bağlanması sağlanmıştır.
- İmmobilizasyon işlemi gerçekleştirildikten sonra serbest ve immobilize polifenol oksidaz enziminin protein miktarları Bradford yöntemiyle belirlenerek, serbest enzim için saflaştırma derecesi hesaplanırken immobilize enzimin de % verimi hesaplanmıştır.
- Serbest ve immobilize PPO enzimin optimum pH değeri 6.8 olarak bulunmuştur.
- Serbest ve immobilize PPO enzimin optimum sıcaklık değeri 30°C olarak bulunmuştur.
- Serbest ve immobilize PPO enzimin termal kararlılıklarına bakıldığında serbest PPO enzimin immobilize enzime göre 35°C ve 50 °C'de aktivitesini daha iyi koruduğu görülürken, immobilize PPO enzimin serbest enzime göre 70°C'de aktivitesini daha iyi koruduğu görülmektedir.
- Serbest ve immobilize enzimin depo kararlılığı 60 gün kadar sürdürülmüştür. Serbest enzim 60 gün sonunda aktivitesini %80'nini korurken immobilize enzim aktivitesinin %70'ni korumuştur. Bu da bize enzimin aktivitesinin uzun süre koruduğunu göstermektedir.
- 4-aminobenzoik asit, kafeik asit, kojik asit, L-askorbik asit ve gallik asit inhibitörlerinin serbest ve immobilize PPO enzimi için IC<sub>50</sub> değerleri bulunmuştur. *p*-aminobenzoik asit ve kafeik asit immobilize enzim için daha kuvvetli bir inhibitör iken gallik asit ise serbest enzim için daha kuvvetli bir inhibitördür. L-askorbik asit ve kojik asit inhibitörleri ise her iki enzim içinde benzer etki göstermiştir. Yapılan inhibisyon çalışmasının tamamına bakıldığında; L-askorbik asit serbest ve immobilize enzim için en kuvvetli inhibitör olarak belirlenmiştir.

- Bu çalışma kapsamında dizayn edilen kovalent bağlanmış polifenol oksidaz enziminin fenolik bileşikleri, biyosorpsion ve biyolojik parçalama yolu ile atık sulardan uzaklaştırılması ve ayrıca meyve sularının berraklaştırılması amacıyla ileri ki çalışmalarda kullanılabileceği kanaatine varıldı.

## 5. KAYNAKLAR

- [1] Mayer, A. M., and Harel, E., "Polyphenol Oxidases in Plants", *Phytochemistry*, 18 (2), 193-215, (1979).
- [2] Whitaker. J. R., "Principles of Enzymology for the Food" *Sciences*, Marcel 201, New York: Dekker, Chapters 22 and 24, (1972).
- [3] Sarkar, J. M., Leonowicz, A. and Bollog. J. M., "Immobilization of enzymes on clays and soils Soil Biol". *Biochem*, 21 (2), 223-230, (1989).
- [4] Gul'ko, A. Y. and Khaziyev, F. K., "Soil polyphenol oxidases; their production, immobilization and activity", *Eurasian Soil Science*, 25 (4), 101-113, (1993).
- [5] Mos'ko, A. A., Shcherbakova, T. A., Glushko, N. A., and Klenitskaya, I. A., "Immobilization of polyphenol oxidase by soil humus", *Eurasion Science*, 5, 60-65, (1992).
- [6] Vamos-Vigyazo, L., "Polyphenoloxidase and peroxidase in fruits and vegetables", *CRC Critical Rewievs in Food Science and Nutrition*, 14, 44-129, (1981).
- [7] Palmer. J. K., "Banana polyphenoxidase, Prepatation and properties", *Plants Phys.*, 38, 508, (1963).
- [8] Kahn, V., "Latency properties of polyphenol oxidase in two avacado cultivars differing in their rate of browning", *J Food Agric*, 28, 233, (1977).
- [9] Espin, C. E., Garcia-Ruiz, P. A., Varon R., and Garcia-Canovas, F., "Monophenolase and Diphenolase Reaction Mechanism of Apple and Pear Oxidases", *J. Agric. Food Chem.*, 46, 2968-2975, (1998).
- [10] Herrmann, K., "Über Verfärbungen des Gemüses durch phenolische Inhaltsstoffe", *Disch. Lebensm.Rdsch*, 72, 90, (1976).

- [11] Matheis, G. And Belitz, H.D., “Studies on enzymatic browning of potatoes (*Solanum tuberosum*). Kinetics of potato phenoloxidase (E.C. 1,14,18,1 monophenol, dihydroxyphenylalanine:oxygen-oxidoreductase”, *Z.Lbensm. Unters.Forsch.*, 163, 191, (1977).
- [12] Herrmann, K., “Pflanzeninhaltsstoffe als natürliche Antioxydantein”, *Fete. Scifen.Anstrichm.*, 75, 499, (1973).
- [13] Sondheimer. E., “Chlorogenic acids and related depsides”, *Bot. Rev.*, 30, 667, (1964).
- [14] Şakiroğlu, H., “Kuşburnu Meyvasından İzole Edilen Polifenol Oksidaz Enziminin Kinetik ve Elektroforetik Özelliklerinin İncelenmesi”. Doktora Tezi, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Erzurum*, (1994).
- [15] Haslam, E., “Practical Polyphenols: From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action”. *University Press, Cambridge*, (1998).
- [16] Bravo, L., “Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance”, *Nutrition Reviews*, 56: 317–333, (1998).
- [17] Masque, N. Pocurull, E. Marce, R.M. Borrull, F. “Determination of eleven priority EPA phenolics at ng L<sup>-1</sup> levels by on-line solid-phase extraction and liquid chromatography with UV and electrochemical detection”. *Chromatographia*, 47:176–182, (1998).
- [18] Topçu, S. Sezgintürk, M.K. Dinçkaya, E., “Evaluation of a new biosensor-based mushroom (*Agaricus bisporus*) tissue homogenate: investigation of certain phenolic compounds and some inhibitor effects”. *Biosensors and Bioelectronics*, 20: 592–597, (2004).
- [19] Gutés, A. Céspedes, F. Alegret, S. Del Vale, M., “Determination of phenolic compounds by a polyphenol oxidase amperometric biosensor and artificial neural network analysis”. *Biosensors and Bioelectronics*, 20: 1668-1673, (2005).

- [20] Özçelik, D., “Mantardan (*agaricus bisporus*) tirozinaz enziminin izole edilmesi ve fenol giderilmesinde kullanılması”. Yüksek Lisans Tezi, *GAZİ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, (2005).
- [21] Köse, H., “Polifenol oksidaz enziminin farklı maddelerle immobilizasyonu ve bazı özelliklerinin incelenmesi”. Yüksek Lisans Tezi, *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Sakarya, 19-20, (2010).
- [22] MOSBACH, K., “Methods in Enzymology” Volume:44, Biochemical Division Chemical Center University of Lund Lund, Sweden, (1977).
- [23] Cabral, J.M.S., Kennedy J.F., “Immobilisation techniques for altering thermal stability of enzymes”. In: Gupta MN (Ed.) *Thermostability of enzymes*, Springer, Berlin, p.163, (2000).
- [24] Bakker, M., “Immobilisation of metalloenzymes and their application in nonnatural conversions” PhD Thesis, Technical University Delft, The Netherlands, (2000).
- [25] Clark, D.S., “ Can immobilisation be exploited to modify enzyme activity?” *Trends Biotechnol.*, 12, 439–443, (1994).
- [26] Chibata, I. Tosa, T. Sato, T. Mori, T. Matuo, Y., “Proc. of the 4th Int. Fermentation Symp”.: *Fermentation Technology Today* p. 383–389, (1972).
- [27] Schulze, B., Wubbolts, M.G., “Biocatalysis for industrial production of fine chemicals” *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10, 609–615, (1999).
- [28] Tischer, W., Kasche, V., “Immobilized enzymes: crystals or carriers” *72 Trends Biotechnol.*, 17, 326–335, (1999).
- [29] Özçömlekçi, E., “Proteaz Enzimin Glutaraldehit Kullanılarak Kovalent Bağlanma İle İmmobilizasyonunda Optimum Şartların Belirlenmesi”. Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, 16-17, (2006).

- [30] Uludag, Y.B., “İmmobilize Glukoamilaz ile Maltodekstrinden Glukoz Üretimi”. Yüksek Lisans Tezi, *Gebze İleri Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kocaeli, (2000).
- [31] Aehle, W., “Enzymes in Industry Production and Applications”, Wiley, Weinheim, (2004).
- [32] Govardhan, C.P., “Crosslinking of Enzymes for Improved Stability and Performance. Current Opinion in Biotechnology”, 10:331-335, (1999).
- [33] Twyman, R.M., “Immobilized Enzymes” *Encyclopedia of Analytical Science* 523-529, (2005).
- [34] Solas M.T, Vicente C, Xavies L, Legaz M.E., “Ionic Adsorption of Catalase on Bioskin: Kinetic and Ultrastructural Studies”, *Journal of Biotechnology* 33 63-70, (1994).
- [35] Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Smith, P.K., “Immobilized Affinity Ligand Techniques”. Academic Press, London. p: 283-284, (1992).
- [36] Klibanov, A.M., “Immobilized Enzymes and Cells as Practical Catalysts”. *Science*, 219:722-727, (1983).
- [37] Cao, L., “Carrier-bound immobilized enzymes: principles, application and design.” Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 580p, (2005).
- [38] Krajewska, B. “Application of Chitin and Chitosan Based Materials for Enzyme Immobilization”: a Review, *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 126-139, (2003).
- [39] Uhlig, H., “Industrial Enzymes and Their Applications”, pp.147-179, 202- 222, John Wiley & Sons, Canada, (1998).
- [40] Petri, A. , Gambicorti, T. and Salvadori, P., “Covalent Immobilization of Chloroperoxidase on Silica Gel and Properties of The Immobilized Catalyst”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 27, 103-106, (2003).

- [41] Suh, C.W., Choi, G.S., Lee, E.K., “Enzymic cleavage of fusion protein using immobilised urokinase covalently conjugated to glyoxyl-agarose” *Biotechnol Appl Biochem*, 37, 149–155, (2003).
- [42] Mateo, C., Abian, O., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M., “Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment” *Enzyme Microb. Technol.*, 26, 509–515, (2000).
- [43] Soni, S., Desai, J.D., Devi, S., “Immobilization of yeast alcohol dehydrogenase by entrapment and covalent binding to polymeric supports” *J. Appl Polym. Sci.*, 82, 1299–1305, (2001).
- [44] Rosell, C.M., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M., “Modification of enzyme properties by the use of inhibitors during their stabilization by multipoint covalent attachment” *Biocatal. Biotransform.*, 12, 67–76, (1995).
- [45] Kiener, A., Wubbolts, M., Witholt, B., “Industrial biocatalysis today and tomorrow”, *Nature (London)*, 409, 258–268, (2001).
- [46] Knowles, J.R., “Enzyme catalysis: not different, just better” *Nature* 350, 121–124, (1994).
- [47] Rozzell, J. D., “Biocatalysis at commercial scale: myths and realities” *Chimica Oggi*, (6/7), 42–47, (1999).
- [48] Zaks, A., “Industrial biocatalysis *Curr. Opin.*” *Chem. Biol.* 5, 130–136, (2001).
- [49] Murza, A., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M., “Essential role of the concentration of immobilised ligands in affinity chromatography: purification of guanidinobenzoatase on an ionized ligand” *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 740, 211–218, (2000).
- [50] Carvalho, G.M.J., Alves, T.L.M., Freire, D.M.G., “L-DOPA production by immobilized tyrosinase”. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84-86, 791-800, (2000).

- [51] Khan, A. A., Akhtar, S., Husain, Q., “Direct immobilization of polyphenol oxidases on Celite 545 from ammonium sulphate fractionated proteins of potato (*Solanum tuberosum*)”, *Journal of Molecular Catalysis*. 40, 58-63, (2006).
- [52] Dinçer, A., Becerik, S., Aydemir, T., “İmmobilization of tyrosinase on chitosan-clay composite beads”. *International Journal Biological Macromolecules* 815-820, (2012).
- [53] Yağar, H. Sağiroğlu, A., “Non-Covalent İmmobilization Of Quince (*Cydonia oblonga*) Polyphenol Oxidase on Alumina”. *Acta Chim. Slov.* , 49, 893–902, (2002).
- [54] Demir, H., Gür., A. Yıldız, A., Gür,T., “İğdır Kayısısından Polifenol Oksidaz Enziminin Kil İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu”. 21. Ulusal Kimya Kongresi. BIY024P, Malatya, (2007).
- [55] Shao, Jian., Ge, Huimin., Yang, Yumin., “Immobilization of polyphenol oxidase on chitosan-SiO<sub>2</sub> gel for removal of aqueous phenol”. *Biotechnol Lett*, (2007).
- [56] Sutay, D. “Dut (*morus alba*) yaprak dokularından polifenol oksidaz izolasyonu, karakterizasyonu ve tutuklanması”, Yüksek Lisans Tezi, *The Middle East Technical University*, (2003).
- [57] Kocatürk, S. “Enginar polifenol oksidazon alginat ve karragenan jellerde immobilizasyonu ve bazı biyokimyasal özelliklerinin incelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, (2008).
- [58] Ekinci, O. “Glukoz oksidaz ve polifenol oksidaz enzimlerinin pirol uçlu polisitirenin pirolle oluşturulan iletken kopolimerinde tutuklanması”, Yüksek Lisans Tezi, *Ortadoğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, (2006).
- [59] Mukherjee, S., Basak, B., Bhunia, B., Mondal B., “Potential use of polyphenol oxidases (PPO) in the bioremediation of phenolic contaminants containing industrial wastewater”, *Rev Environ Sci Biotechnol*, 12:61-73, (2013).

- [60] Wang, G. Xu, J.J, Ye, L.H. Zhu, j.j, and Chen, H.Y., “Highly sensitive sensors based on the immobilization of tyrosinase in chitosan”, *Bioelectrochemistry*, 57,33-38, (2002).
- [61] Shan, D., Zhu, M., Han, E., Xue, H., And Cosnier, S. “Calcium carbonate nanoparticles: A host for the construction of highly sensitive amperometric phenol biosensor”. *Biosensors and Bioelectronics*, 23, 648-654, (2007).
- [62] Koyuncu Zeybek, D., Zeybek, B., Özçiçek Pekmez, N., Kılıç, E, Pekyardımcı Ş., “Fenolik Bileşiklerin Tayini için Polifenol Oksidaz Temelli Amperometrik Enzim Elektrot Hazırlanması”, *Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi*, Cilt30, Sayı13. 955-978, (2010).
- [63] Wada, S, Ichikawa, H., Tatsumi, K., “Removal of phenols with tyrosinase immobilized on magnetite”, *Wat. Sci. Tech.* 26(9-11), 2057-2059, (1992).
- [64] Wada, S., Ichikawa, H., Tatsumi, K., “Removal of phenols from wastewater by soluble and immobilized tyrosinase”, *Biotechnology and Bioengineering*, 42, 854-858, (1993).
- [65] Arslan O., Erzençin, M., Sinan, S., Özensoy, Ö., “Purification of mulberry (*Morus alba* L.) PPO by affinity chromatography and investigation of its kinetic and electrophoretic properties,” *Food Chemistry* 88(3):479-484, (2004).
- [66] Cuatrecasas, P. “Protein purification by affinity chromatography derivatizations of agarose and polyacrylamide beads”. *J.Biol.Chem.* 245, 3059, (1970).
- [67] Demir. D. “Bazı üre türevlerinin polifenol oksidaz enzimi üzerine etkilerinin araştırılması”, *Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, (2011).
- [68] Laemmli, D. K. “Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage” T4, London: *Nature*, 227-680, (1970).
- [69] Jaenicke, L., “Protein Bestimmung, Einführung in the Praxis des Biochemikers”, Köln: 27, (1984).

- [70] Bradford, M., "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Anal. Biochem*, 72, 248, (1976).
- [71] Galeazzi, M.A.M., and Sgarbieri, V.C.J. "Substrate specificity and inhibition of polyphenoloxidase from a dwarf variety of banana (*Musa Cavendishii*, L.)," *Journal of Food Science*, 46, 1404 - 1406, (1981)
- [72] Saini, A.S., Tripathi, A. and Melo, J.S., "On-column enzymatic synthesis of melanin nanoparticles using cryogenic poly(AA-MCAGE) monolith and its free radical scavenging and electrocatalytic properties". *Royal Society of Chemistry, India*, (2015).
- [73] Beena, P., & Gowda, L. R., "Purification and characterization of a polyphenol oxidase from the seeds of field bean (*Dolichos lablab*)." *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 48, 3839-3846, (2000).
- [74] Arabaci, G., Usluoglu A., "The Enzymatic Decolorization of Textile Dyes by the Immobilized Polyphenol Oxidase from Quince Leaves" *Hindawi Publishing Corporation*, (2013).
- [75] Khan, A.A., Akhtar, S., Husain, Q., "Simultaneous purification and immobilization of mushroom tyrosinase on an immunoaffinity support" *Faculty of Life Science Nigarh Muslim University, India*, (2004).
- [76] Yıldız, H. B., Toppare, L., Hepuzer Gursel, Y. Yagci, Y., "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, (2006).
- [77] Yahşi, A., Şahin, G., Tümtürk, H., " Binary immobilization of tyrosinase by using alginate gel beads and poly(acrylamide-co-acrylic acid) hydrogels. Faculty of Art and Science, Gazi University, Teknikokullar" *Ankara*, (2005).