

380457

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN FARKLI
MADDELERLE İMMOBİLİZASYONU VE BAZI
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Hüseyin KÖSE

Enstitü Bilim Dalı : KİMYA

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Gülnur ARABACI

Temmuz 2010

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN FARKLI
MADDELERLE İMMOBİLİZASYONU VE BAZI
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**


YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Hüseyin KÖSE


Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Enstitü Bilim Dalı : BİYOKİMYA

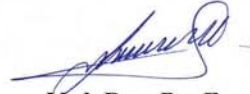
Bu tez 29/07/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.


Yrd. Doç. Dr. Gülnur
ARABACI

Jüri Başkanı


Yrd. Doç. Dr. Asude
ATEŞ

Üye


Yrd. Doç. Dr. Esra
ALTINTIĞ

Üye

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarım süresince yardımını ve desteğini esirgemeyen öğrenim hayatım boyunca sabır ve anlayıőla yanımda olan, çok değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Gülnur ARABACI'ya, her türlü yardımları ile beni destekleyen arkadaşlarım Ayőe USLUOęLU ve Belkıs DÜZCAN'a ve bugüne kadar maddi-manevi desteklerini benden esirgemeyen her őeyim olan aileme sonsuz teőekkürlerimi sunarım. "Polifenol Oksidaz Enziminin Farklı Maddelerle İmmobilizasyonu ve Bazı özelliklerinin İncelenmesi" adlı çalıőmam Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Komisyonu Tarafından (2010-50-01-021) desteklenmiőtir.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ÖZET.....	x
SUMMARY.....	xi

BÖLÜM 1.

GİRİŞ.....	1
1.1. Enzimler İmmobilizasyonu Hakkında	2
1.2. Enzim İmmobilizasyonu	3
1.3. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri	5
1.3.1. Kimyasal metotlar	6
1.3.2. Fiziksel metotlar	7
1.4. Polifenol Oksidaz Enzimi.....	11
1.4.1. Doğada bulunuşu.....	11
1.4.2. Molekül yapısı.....	13
1.4.3. PPO enziminin katalizlediği reaksiyonlar ve mekanizması.....	13
1.4.5. PPO enziminin substratları.....	16
1.4.6. PPO enzim aktivitesini etkileyen faktörler.....	18
1.4.6.1. pH'ın etkisi.....	18
1.4.6.2. Sıcaklığın etkisi.....	18
1.4.7. PPO enziminin tıptaki kullanım alanları.....	19
1.4.8. PPO enziminin endüstrideki kullanım alanları.....	19

1.4.9. PPO enzimini ile ilgili yapılan immobilizasyon		
çalışmaları.....	20	
1.4.10. Roka hakkında.....	22	
BÖLÜM 2.		
DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....		24
2.1. Polifenol oksidaz (PPO) Enziminin Karakterizasyonu.....		24
2.1.1 Polifenol Oksidaz (PPO) Enziminin İzolasyonu.....		24
2.1.2. Substrat spesifikliği.....		24
2.1.3. Optimum substrat konsantrasyonu.....		24
2.1.4. pH'ın etkisi		25
2.1.5. Sıcaklığın etkisi		26
2.1.6. Enzim kinetiği.....		26
2.2. PPO Enziminin İmmobilizasyonu		27
2.2.1. Ca-Aljinatla İmmobilizasyonu		27
2.2.2. Ba-Aljinatla İmmobilizasyon		27
2.2.3. Poliakrilamid Jelinde İmmobilizasyon.....		27
2.2.4. Aljinat-poliakrilamid jelinde immobilizasyonu.....		28
2.3. Enzimin Aktiflik Tayini.....		28
2.3.1. Serbest PPO enziminin aktiflik tayini.....		28
2.3.2. İmmobilize PPO enziminin aktiflik tayini.....		28
2.3.3. Serbest PPO enziminin aktifliğine sıcaklığın etkisi.....		29
2.3.4. İmmobilize ppo enziminin aktifliğine sıcaklığın etkisi.....		29
2.3.5. Serbest PPO enziminin aktifliğine substrat		
değişiminin etkisi.....		29
2.3.6. İmmobilize PPO enziminin aktifliğine substrat		
değişiminin etkisi		29
2.3.7. Serbest enzim kinetiği.....		30
2.3.8. İmmobilize enzim kinetiği		30
2.3.9. Serbest PPO enziminin depolanma kararlılığı.....		30
2.3.10. İmmobilize PPO enziminin depolanma kararlılığı.....		30
2.4. Termal İnaktivasyon.....		30

2.4.1. Serbest PPO enziminin termal inaktivasyonu.....	30	
2.4.2. İmmobilize PPO enziminin termal inaktivasyonu.....	31	
2.4.3. İmmobilize PPO enzim tekrar kullanım sayısı.....	31	
BÖLÜM 3.		
DENEYSSEL SONUÇLAR VE BULGULAR.....		32
3.1. PPO Enziminin Karakterizasyonu.....	32	
3.1.1. pH etkisi.....	32	
3.1.2. Sıcaklığın etkisi	35	
3.2. Enzim Kinetiği.....	37	
3.2.1. Serbest enzim çalışmaları.....	37	
3.2.2. Serbest ve İmmobilize PPO'nun aktifliğine pH'nın etkisi.....	41	
3.3. Serbest ve İmmobilize PPO Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi	41	
3.3.1. Serbest, Ca-aljinat, Ba-aljinat, aljinat Poliakrilamid ve Poliakrilamid Kullanılarak İmmobilize Edilen PPO Enziminin Kinetiği ve Grafikleri.....	42	
3.4. Serbest ve İmmobilize PPO'nun Termal Kararlılığı.....	44	
3.5. Serbest ve poliakrilamid kullanılarak İmmobilize Edilen PPO Enziminin Oda Koşullarında Aktifliğine Depolanma Süresinin Etkisi	44	
3.6. Serbest ve Poliakrilamid, Ca-aljinat Poliakrilamid ,Ca-aljinat ve Ba-aljinat Kullanılarak İmmobilize Edilen PPO Enziminin 4 °C Koşullarında Aktifliğine Depolanma Kararlılığı.....	46	
3.7. Ca-aljinat, Ba-aljinat, Aljinatlı Polimer ve Aljinatsız Polimer ile İmmobilize Edilen Enzimin Tekrar Kullanılabilirliği.....	46	
BÖLÜM 4.		
SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ		48
KAYNAKLAR		50
ÖZGEMİŞ.....		54

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

PPO	: Polifenol Oksidaz
Poli(AAm-ko-AA)	: Poliakrilamit ko akrilik asit
DOPA	: Dihidroksi Fenil Alanin
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
APS	: Amonyum Persülfat
PVP	: Polivinil Prolidon
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
TEMED	: Tetra Etil Metilen Diamin
Tris	: Tris (hidroksimetil) Amino Metan

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Enzim immobilizasyonunda kullanılan immobilizasyon yöntemleri.....	5
Şekil 2.2.	PPO'nun katalizlediği reaksiyonlar.....	14
Şekil 2.3.	PPO'nun bakır merkezleri.....	15
Şekil 3.1.	Katekol substratına karşı PPO'nun optimum pH grafiği	33
Şekil 3.2.	4-metil katekol substratına karşı optimum Ph.....	33
Şekil 3.3.	Ggallik asit substratına karşı optimum pH	34
Şekil 3.4.	L-tirozin substratına karşı optimum pH.....	34
Şekil 3.5.	Pyrogallol substratına karşı optimum pH.....	35
Şekil 3.6.	Sıcaklığın roka bitkisindeki PPO enzimi aktivitesine 4-metil katekol varlığındaki etkisi.....	35
Şekil 3.7.	Sıcaklığın roka bitkisindeki PPO enzim aktivitesine katekol substratı varlığındaki etkisi.....	36
Şekil 3.8.	Sıcaklığın roka bitkisindeki PPO enzim aktivitesine gallik asit substratı varlığındaki etkisi	36
Şekil 3.9.	Sıcaklığın roka bitkisindeki PPO enzim aktivitesine L-tirozin substratı varlığındaki etkisi	37
Şekil 3.10.	Sıcaklığın roka bitkisindeki PPO enzim aktivitesine pyrogallol substratı varlığındaki etkisi	37
Şekil 3.11.	Roka bitkisinde PPO enziminin 4-metil katekol substratına karşı Lineweaver-Burk grafiği.....	38
Şekil 3.12.	Roka bitkisinden izole edilmiş PPO enziminin katekol substratına karşı Lineweaver-Burk grafiği.....	38
Şekil 3.13.	Roka bitkisinden izole edilmiş PPO enziminin gallik asit substratına karşı Lineweaver-Burk grafiği.....	39
Şekil 3.14.	Roka bitkisinden izole edilmiş PPO enziminin pyrogallol	

	substratına karşı Lineweaver-Burk grafiği.....	39
Şekil 3.15.	Roka bitkisinden izole edilmiş PPO enziminin L-tirozin substratına karşı Lineweaver-Burk grafiği.....	40
Şekil 3.16.	PPO enzimi üzerine pH'nın etkisi.....	41
Şekil 3.17.	aljinat poliakrilamid, poliakrilamid yöntemi ile 4-metil katekol substratına karşı PPO enziminin Lineweaver-Burk grafiği.....	42
Şekil 3.18.	Serbest, Ca-aljinat, Ba-aljinat yöntemi ile 4-metil katekol substratına karşı PPO enziminin Lineweaver-Burk grafiği.....	43
Şekil 3.19.	Serbest ve immobilize PPO'nun maksimum aktifliğini zamanla değişimi.....	44
Şekil 3.20.	Oda koşullarında serbset, aljinat poliakrilamid, poliakrilamid kullanılarak 4-metil katekol substratına karşı PPO enziminin gösterdiği depolanma kararlılığı.....	45
Şekil 3.21	Şekil 3.21.Oda koşullarında serbset, Ca-aljinat, Ba-aljinat kullanılarak 4-metil katekol substratına karşı PPO enziminin gösterdiği depolanma kararlılığı.....	45
Şekil 3.22.	Serrbest ve Poliakrilamid, Ca-aljinat Poliakrilamit ,Ca-aljinat ve Ba-aljinat Kullanılarak İmmobilize Edilen PPO Enziminin 4 °C Koşullarında Aktifliğine Depolanma Kararlılığı.....	46
Şekil 3.23.	Ca-aljinat, Ba-aljinat, aljinat poliakrilamit, poliakrilamit kullanılarak immobilize edilen PPO enziminin tekrar kullanım sayısı.....	47

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1.1.	Enzim immobilizasyonu için kullanılan destek materyalleri...	4
Tablo 1.2.	Serbest ve immobilize enzim özelliklerinin karşılaştırılması..	11
Tablo 2.1.	0,1 M sitrik asit tamponun hazırlanması.....	25
Tablo 2.2.	0,1 M tris tamponunun hazırlanması.....	26
Tablo 3.1.	PPO enziminin bitki kaynağı ve bazı substratlara karşı spesifikliğı.....	40
Tablo 3.2.	PPO enziminin 4-metil katekol substratına karşı spesifikliğı ile ilgili toplu bilgiler.....	43

ÖZET

Anahtar Kelimeleri : Polifenol oksidaz, roka, *eruca vesicaria*, enzim immobilizasyonu, aljinat, poliakrilamid

Bu çalışmanın amacı, Polifenol oksidaz (PPO) enzimini Sakarya bölgesinde yetişen roka (*Eruca vesicaria*) bitkisinden karakterize ederek bu enzimi Ca-aljinat, Ba-aljinat, aljinat-poliakrilamid ve poliakrilamid kullanılarak immobilize edilip bunların özelliklerini incelemektir. Bunun için roka bitkisinden izole edilen PPO enziminin optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri beş farklı substrat kullanılarak (4-metil katekol , katekol , pyrogallol , gallik asit ,L-tirozin) belirlenmiştir. PPO enziminin en iyi substratı 4-metil katekol olarak bulunmuştur. Bu substrat için optimum pH 5.0 optimum sıcaklık ise 20 °C olarak belirlenirken Km ve Vmax değerleri sırasıyla 3,68 mM ve $16,6 \cdot 10^{-3}$ EÜ/dak olarak bulunmuştur. Karakterizasyon işleminin ardından immobilizasyon çalışmalarına geçilmiş ve roka PPO enzimi Ca-aljinat, Ba-aljinat, aljinat-poliakrilamid ve poliakrilamid kullanılarak immobilize edilmiştir. İmmobilize enzim serbest enzimle kinetik olarak kıyaslanmıştır. Buna göre Ca-aljinat, Ba-aljinat, aljinat-poliakrilamid ve poliakrilamid ile immobilize edilen enzimin 4-metil katekol substratına karşı Km değerleri sırasıyla 4,33mM , 1,45mM , 2,41mM, 2,93mM, Vmax değerleri ise $3,2 \cdot 10^{-3}$ EÜ/dak , $4,0 \cdot 10^{-3}$ EÜ/dak , $9,2 \cdot 10^{-3}$ EÜ/dak , $10,0 \cdot 10^{-3}$ EÜ/dak olarak belirlenmiştir. İmmobilize edilen PPO enziminin optimum pH ve sıcaklıkları serbest enzim çalışmaları ile paralellik göstermiştir. Depolama kararlılığı çalışmalarında ise enzimin aktifliğinin dayanıklılığı serbest çalışmalara göre oldukça artış göstermiştir. İmmobilize edilen PPO enziminin tekrar kullanılabilirliği ölçülmüş ve 12 kullanım sonunda enzimin aktifliğini % 26 oranında koruduğu görülmüştür.

IMMOBILIZATION OF POLYPHENOL OXIDASE ENZYME WITH DIFFERENT MATTERS AND INVESTIGATION OF THE SOME PROPERTIES

SUMMARY

Key Words: Polyphenol oxidase, rocket, *Eruca vesicaria*, immobilization of enzyme, alginate, polyacrylamide

The purpose of this study was the characterization of Polyphenol oxidase (PPO) enzyme from rocket (*Eruca vesicaria*) in the Sakarya region and immobilization of this isolated enzyme with different immobilization chemicals, Ca-alginate, Ba-alginate, polyacrilamide and alginate-polyacrylamide and the investigation of some properties of free and immobilized rocket PPO enzyme. Thus, optimum pH and temperatures of rocket PPO were determined for five different substrates (chatechole, 4-methylcatechol, pyrogallol, L-Tyrosine and gallic acid). The best substrate for rocket PPO was 4-methylchatecole with min Km value. Optimum pH and temperature of rocket PPO were determined 5.0 and 20 °C for 4-methylcatecole. Kinetic parameters of 4-methylchatecole were calculated 3,68 mM for Km and $16,6 \cdot 10^{-3}$ EU/min for Vmax for free rocket PPO. Then, the characterized PPO enzyme was successfully immobilized with Ca-alginate, Ba-alginate, polyacrilamide and alginate-polyacrylamide and investigated kinetically and compared with the free enzyme. Kinetic parameters were calculated as 4,33mM , 1,45mM , 2,41 mM, 2,93 mM, Vmax değerleri ise $3,2 \cdot 10^{-3}$ EU/min, $4,0 \cdot 10^{-3}$ EU/min, $9,2 \cdot 10^{-3}$ EU/min, $10,0 \cdot 10^{-3}$ EU/min for Ca-alginate, Ba-alginate, alginate-polyacrilamide and polyacrylamide immobilized enzyme. The optimum pH and temperature were parallel for free ad immobilized enzyme. The Immobilized enzyme was very stable compare to free enzyme in the same conditions at room temperature. The immobilized PPO was retained 26 % of the initial activity was used repeatedly 12 times in two days, respectively.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Dünyada ve ülkemizde günümüze kadar hızlı bir endüstriyel gelişim meydana gelmiştir. Bu gelişimle birlikte öncelik üretime verilmiş, ancak çevreye verilen atıkların çevre ve canlı hayatı üzerine etkileri pek fazla düşünülmemiştir. Çevreye atılan endüstriyel atıkların artmasıyla birlikte birçok atık türünde doygunluğa ulaşılmış ve zararları görülmeye başlanmıştır. Bu atıklardan en önemlilerinden biriside fenol ve fenol türevleridir.

Fenoller zehirli olduklarından tüm canlı hücre türlerine zarar verirler. Fenollerin öldürücü dozları deri tarafından absorblanabilir. Fenol varlığı suda tat ve koku olarak anlaşılabilir. Bu zararlı fenollerin ortadan kaldırılması için çeşitli yöntemler geliştirilmiş ve bunlarda enzimler kullanılmıştır. Özellikle PPO çeşidi olan tirozinazın toksik olan fenolik bileşikleri kinonlara çevirerek uzaklaştırabileceği düşünülmüş ve bu alanlar geniş çalışmalar yapılmıştır. üreazın immobilizasyonu aljinat-kitosan polielektrolit ve poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/K-karragenen interpolimer kompleksleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. immobilizasyon sonucu enzimin sıcaklık, pH ve termal dayanımının arttığı, depolama kararlılığı ve tekrar kullanımının olduğu görülmüştür [1].

Yine lakkaz ile ilgili yapılan çalışmalarda öncelikle aminoasit ligand içeren nano yapılar sentezlenmesi ve daha sonra da lakkaz enziminin herhangi bir aktivasyon yöntemine gereksinim duyulmadan immobilizasyonu tasarlanmıştır [2].

Bu çalışmanın amacı, PPO enziminin Sakarya bölgesinde yetiştirilen rokadan karakterize edilmesi ve immobilizasyonu ile bazı özelliklerinin incelenmesi esasına dayanmaktadır. Bu amaçla öncelikle roka bitkisinden polifenol oksidaz enzimi izole edilerek uygun substratlarla uygun pH ve sıcaklıkta karakterize edilmiştir.

Daha sonra izole edilen roka polifenol oksidaz enziminin Ca ve Ba alginatla küreciklere, poliakrilamit ve poliakrilamit-alginatla polimerik destek materyallerine, hapsedme yoluyla immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Serbest ve immobilize polifenol oksidaz enziminin aktifliğine, pH, sıcaklık, depolama süresi, substrat derişimi gibi parametrelerin etkisi araştırılmış, termal kararlılık ve kinetik parametreler belirlenmiş ve immobilize polifenol oksidaz tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir.

1.1. İmmobilizasyon Hakkında Genel Bilgiler

Endüstrinin çeşitli alanlarında genel olarak immobilize enzimler kullanılmıştır. Bu alanlarda kullanılan enzimlerin kaynakları da oldukça önemlidir. Enzim üretiminde hammadde sorunu mikrobiyal kaynaklarca büyük oranda çözülmüş görünmektedir. Bununla birlikte enzimlerin mikrobiyal kaynaklardan izolasyonu ve saflaştırılması oldukça külfetli bir iştir. Dolayısıyla bu biyokatalizörlerin potansiyellerinden olabildiğince faydalanmak gerekir. Bilindiği gibi enzimler suda çözünen, seçici katalizörlerdir. Endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştiğinden katalizör olarak kullanılan serbest enzimin aktivitesini yitirmeden geri kazanılması mümkün değildir [3].

Enzimatik reaksiyonlar sırasında serbest enzim reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılmadığından reaksiyonun kontrolü güçleşmektedir. Reaksiyonun istenilen anda durdurulması için inhibitör katılması düşünülebilir. Ancak bununla da serbest enzimin yanında yeni bir kirlilik sorunu söz konusu olabilir. Ürünlerin kirlilik unsurlarından arındırılması külfeti çok artırmaktadır. Ayrıca serbest enzimin aktivitesini yitirmeden ortamdan çıkarabilmek olanak dışı olduğundan enzimin yeniden kullanılabilmesi mümkün değildir. Bu ise enzimlerin çok özel ama aynı ölçüde pahalı katalizörler olmalarından dolayı maliyeti yükselten önemli bir etkendir [3].

Serbest enzimler sürekli üretim sistemlerine uygulamaması güçtür. Tüm bu sorunları olumlu yönde çözümlenebilmek, enzimleri endüstri için daha kullanılabilir hale getirmek için enzim immobilizasyonu üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır.

Enzim immobilizasyonu, katalitik proseslerde enzim moleküllerinin katalitik aktifliğini koruyarak tekrar ve sürekli kullanımını sağlamak amacıyla bir destek maddesine fiziksel veya kimyasal tutturulması olarak ifade edilebilir.

Enzimlerin immobilize edilmelerinin en önemli avantajları şunlardır.

- 1- İmmobilize enzimler, serbest hareket eden enzimlere göre daha işlevsel avantajlara sahiptirler.
- 2- İmmobilize enzimler ısı, pH ve organik reaktiflere karşı daha fazla direnç göstermektedir.
- 3-İmmobilize enzimler substrat ve ürünün inhibisyonuna karşı koyarlar ve enzimin aktivitesini uzun süre muhafaza ederler.
- 4- İmmobilize enzim sistemlerinin kimyasal ve fiziksel özellikleri seçimli olarak değiştirilebilir. Çeşitli proseslere uygulanabilirler.
- 5- Membrana bağlı enzimler in vivo doğal sistemleri için örnek olarak seçilebilirler.

Enzimlerin immobilize edilmelerinin bazı dezavantajları da vardır. Bunların başlıcaları ;

- 1- İmmobilizasyon işlemi boyunca enzim aktivitesi azalabilir veya kaybolabilir.
- 2- Çok basamaklı immobilizasyon işlemlerinde enzim kararlılığı sınırlıdır.
- 3- Enzim taşıyıcılarının maliyeti yüksektir [4].

1.2. Enzim İmmobilizasyonu

Enzim immobilizasyonu, enzim katalizli proseslerde enzim moleküllerinin katalitik aktifliğini koruyarak tekrar ve sürekli kullanımını sağlamak amacıyla bir destek maddesine fiziksel veya kimyasal bağlanması ile ifade edilebilir.

İmmobilizasyonla ilgili ilk çalışmalar 1916 yıllara dayanır. Bu yılda Nelson ve Griffin sakkorozu hidrolize etmek için maya invertaz enzimini mangal kömürüne adsorbe ederek enzimi immobilize etmişler ve immobilizasyonun temelini atmışlardır. İmmobilize enzim sistemlerinin pratik kullanımı Grobhofer ve Schleith'in karboksipeptidaz, diastaz, pepsin ve ribonükleaz enzimlerini poliaminostiren reçinesine kovalent bağlayarak immobilize etmeleri ile başlamıştır.

Hücre immobilizasyonunu ilk gerçekleştirenler ise Chibata ve arkadaşlarıdır. Araştırmalarında yüksek seviyede aspartaz aktivitesine sahip E.coli bakterisini P(AAm-ko-AA) jeli içerisinde hapsetmişlerdir [5].

Enzimlerin çeşitli metotlarla inert ve genellikle katı polimerik desteklere tutturularak immobilize edilmesi halen pek çok bilim adamının ilgilendiği araştırma alanlarından biri olarak görülmektedir. Genellikle sentetik kimyasal maddeler ve sentetik makro moleküller destek materyali olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, destek için kullanılan kimyasallar, bazı durumlarda enzimleri kısmen veya tamamen çalışamaz duruma getirebilir. Bu sebeple endüstride polimer-enzim çiftinin kullanımı halen başlangıç aşamasında olup, kararlı formda polimerik materyallerin ve çeşitli amaçlar için yeni immobilizasyon metotlarının geliştirilmesi için araştırmalar devam etmektedir [6]. Enzim immobilizasyonun da kullanılan çeşitli sentetik ve doğal materyaller Tablo3.1'de verilmiştir.

Tablo 1.1. Enzim immobilizasyonu için kullanılan destek materyalleri

SENTETİK MATERYALLER	DOĞAL MATERYALLER
P(AAm-ko-AA) esaslı polimerler	Agaroz
Dakron	Dekstran
Naylon	Selüloz
Polipeptitler	Cam
Stiren esaslı polimerler	Kollajen
Akrilat esaslı polimerler	Silikajel
Polivinil alkol	Alüminyum oksit

1.3. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzim immobilizasyon yöntemleri genel olarak sınıflandırılmalarına karşı kimyasal ve fiziksel olmak üzere iki ana başlık altında toplanabilir.

1) Kimyasal yöntemler

a) Kovalent bağlama

b) Çapraz bağlama

2) Fiziksel yöntemler

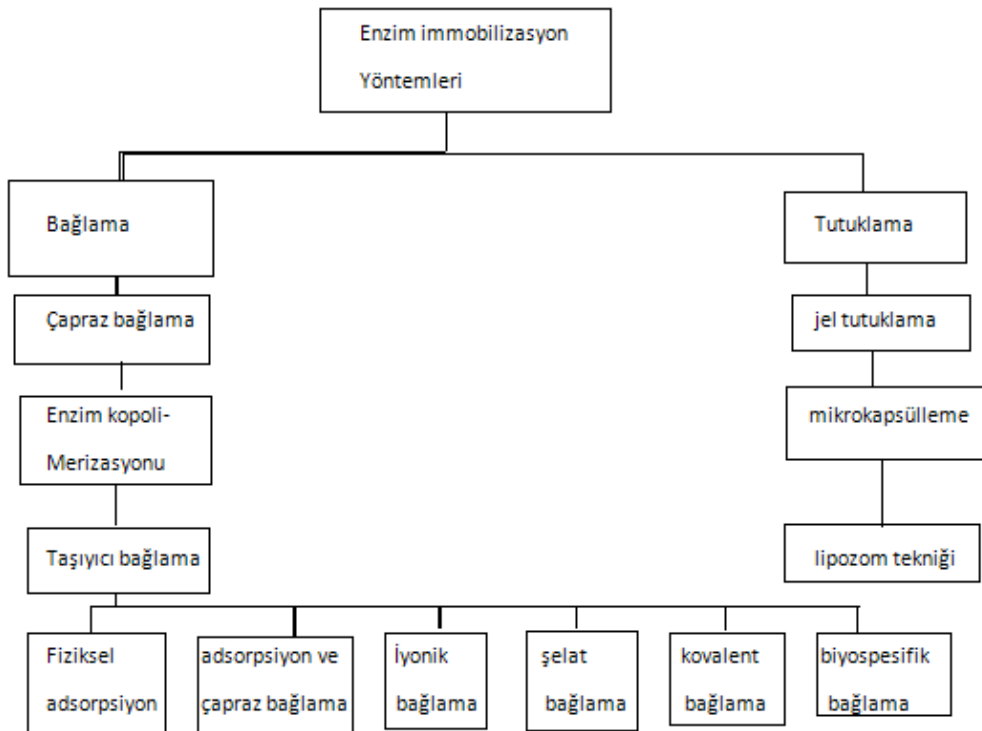
a) Adsorpsiyon ile immobilizasyon

b) Hapsetme ile immobilizasyon

-Mikrokapsül ile hapsetme yöntemi

-Kafes tipi hapsetme yöntemi

Şekil 1.1. Enzim immobilizasyonunda kullanılan immobilizasyon yöntemleri



1.3.1. Kimyasal metotlar

Suda çözünmeyen fonksiyonlu polimer ile enzim molekülü arasında kovalent bağ oluşumu esasına dayanır. Bu yöntemler esnasında serbest enzimin yeniden geri kazanılması mümkün değildir. Kimyasal yöntemle immobilize edilen enzimin kimyasal ve fiziksel özellikleri değişebilmektedir. Kararlılık ve dayanıklılık açısından pek çok üstünlükler ortaya çıkabiliyorken kinetik özelliklerinde farklılıklar görülebilmektedir.

Kimyasal yöntemle immobilize edilen enzimin, serbest haline göre farklı aktiviteye sahip olmasında, enzim ve destek maddesinden başka reaksiyon şartları etki eder. Elde edilen enzim destek sistemi, serbest enzime göre daha düşük katalitik etki gösterebilmektedir. Bu durumun büyük molekül ağırlıklı substratların ve makro moleküllerin sterik etkisinden kaynaklandığı düşünülmüştür [7].

a) Kovalent bağlama

Enzim immobilizasyonunda, enzimin özellikleri, aktif ucunun yapısı, pH, sıcaklık ve organik çözücüler gibi etken faktörlerden dolayı kısıtlı sayıda yöntem kullanılmaktadır. Kovalent bağlama ile immobilizasyon iki basamakta gerçekleşir. Birinci basamak destek maddesinin aktifleştirilmesi ile, ikinci basamak enzimin kovalent bağlanması ile gerçekleştirilir. Destek maddesi; karboksil, hidroksil, amino gibi fonksiyonel gruplar taşımaktadır. Bu fonksiyonel grupların yapısına bağlı olarak epiklorhidrin, gibi farklı aktifleyici maddeler kullanılabilir.

Kovalent bağlama yönteminin en büyük avantajı, bağların çok kuvvetli olması nedeniyle her türlü ortamda kullanılabilir. Enzim destek materyali üzerinde yer aldığından substrat ile teması oldukça mümkündür. Ayrıca enzim molekülü ve destek materyali ile birlikte genellikle termal kararlılık gösterirler. Yöntemin dezavantajı, destek materyali ile enzim arasında sıkı etkileşim enzimin doğal konformasyonunu değiştirebilir [8].

b) Çapraz bağlama

Küçük molekülü iki veya çok fonksiyonlu maddeler, enzim molekülleriyle aralarında bağlar yaparak suda çözünmeyen komplekslerin oluşmasını neden olurlar. Molekül içi bağlanmalar yanında moleküller arası bağlanmalarda söz konusudur. Çapraz bağlanma ile enzimlerin immobilizasyonu çok basit olmasına rağmen enzimlerdeki özel fonksiyonel grupların çapraz bağlayıcı olarak kullanılabilmesi için gereken şartların seçimi ve oluşturulması güçtür.

Enzim aktifliği; reaksiyon süresi, iyonik şiddet, pH, sıcaklık, çapraz bağlayıcı madde ve enzim konsantrasyonu gibi faktörler ve bunlar arasındaki dengeye bağlıdır. Bu yöntemin en önemli avantajı; tek bir işlemde enzimleri immobilize etmek için çok fonksiyonlu maddelerin kullanılabilmesidir. Yöntemin dezavantajı ise moleküller arası çapraz bağlanma reaksiyonunun kontrol edilmesinde zorluklarla karşılaşmaktadır. Çapraz bağlanma reaksiyonu çok ılımlı şartlarda gerçekleşmediğinden önemli ölçüde aktivite kaybına neden olabilmektedir [8].

1.3.2. Fiziksel metotlar

Fiziksel yöntemler kovalent bağ oluşmasına dayanmayan, enzimin belirli bir yere tutturulması ile ifade edilir. Enzim immobilizasyonu elektrostatik etkileşme, iyonik bağ oluşumu, enzimler arası etkileşme gibi belirli fiziksel kuvvetlere bağlı kalmaktadır. Immobilizasyon, enzimin destek maddesindeki mikro bölmeler içerisinde veya gözenekli membranlara tutturulmasıyla gerçekleştirilir. Bu yöntemin kovalent bağlama ve çapraz bağlama ile immobilizasyondan ayıran önemli bir fark enzim molekülünün kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır.

a) Adsorpsiyon ile immobilizasyon

Enzim immobilizasyonunda kullanılan en eski ve en basit yöntemdir. Adsorpsiyonun asıl amacı enzim immobilizasyonu olmayıp enzim saflaştırılmasıdır. Ancak son 20-25 yıldan beri suda çözünmeyen taşıyıcılarda adsorpsiyon yönteminin enzim immobilizasyonunda oldukça sık kullanıldığı görülmektedir.

Bu yöntem, suda çözünmeyen katı matriksin (adsorban) enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının yıkanarak uzaklaştırılması esasına dayanmaktadır.

Fiziksel adsorpsiyonda immobilizasyondan sorumlu kuvvetler; hidrojen bağları, van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik etkileşimlerdir. İyonik bağlanma ile immobilizasyon proteinin yüklü grupları ile destek materyalinin karşıt yükleri arasındaki çekim kuvvetlerine dayanmaktadır.

Enzim ile adsorban (destek maddesi) arasındaki zayıf bağlardan dolayı adsorplanan enzimin kullanım esnasında taşıyıcıdan uzaklaşması istenmeyen bir durumdur.

Bu yöntemde enzim aktifliğini büyük ölçüde korur. Adsorpsiyon ile immobilizasyonun tersinir olması bu destek maddesinin ve enzimin başka amaçlar için kullanılabilmesine olanak sağlamıştır [9].

b) Hapsetme ile immobilizasyon:

Bu metot polimerik matriks yapısında veya yarı geçirgen membranlarda enzimin hapsedilmesine dayanır. Polimerik matriks yapısının, substrat ve ürünün difüzyonuna izin verirken proteinin difüzyonunu engellemesi için yeterli derecede sıkı olması gerekmektedir. Bu metot her çeşit enzimi, diğer biyokatalizörleri, bütün hücreleri veya farklı çaptaki mikroorganizmaları hapsetmek için çok genel kullanılabilir

Bu yöntemi, kovalent bağlama ve çapraz bağlama ile immobilizasyondan ayıran en önemli özellik enzim molekülünün fiziksel ve kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır. Hapsetme metodu mikrokapsül ve kafes tipi olmak üzere iki gruba ayrılır [10].

Mikrokapsül ile hapsetme metodu :

Mikrokapsül ile hapsetme metodu, gözenekleri 10-1000 µm çaplı, yarı geçirgen membranlar içinde enzim moleküllerinin hapsedilmesine dayanır. Yarı geçirgen membran, büyük protein ve enzimlerin mikrokapsül dışına çıkmasına engel olurken, küçük substrat ve ürünlerin serbestçe girip çıkmasına izin verir.

Yarı geçirgen mikrokapsüllerin hazırlanmasında iki genel metot uygulanmaktadır. Bunlardan birincisi koagülasyona dayalı olup kimyasal bir reaksiyon içermeyen basit bir yöntemdir. Faz ayrımı polimerizasyonu diye isimlendirilir. Çözücü içinde enzim ve membran maddesi çözülür ve bu çözelti, mikro damlacıklar halinde çöktürücü maddeye damlatılarak işlem gerçekleştirilir.

Tekniğin spesifik olmayışı ve basitliğinden dolayı bu yöntem bütün enzimler için uygulanabilmektedir. Diğer mikrokapsülleme metodu, kimyasal özellik taşıyan ara yüzey polimerizasyon metodudur. Bu metot da çöktürücü madde içinde enzim çözeltisi mikro damlacıklar şeklinde hazırlanır. İki sıvının birleşme noktalarında polimerleşme görülür. Yarı geçirgen mikrokapsül membranı iyi bilinen poliamid sistemi ile yapılır ve çok çeşitli diaminlerle, diasit halojenürleri kullanılarak amid kopolimerleri oluşturulur.

Bu yarı geçirgen mikro kapsül membranın gözenek çapları; substrat moleküllerinin kapsül içine girişine ve ürün moleküllerinin dışarı çıkışına imkan sağlayacak büyüklükte olmalıdır.

Mikrokapsülleme ile hapsetme yönteminde herhangi bir modifikasyon olmadığından enzim aktifliği serbest enzim aktifliğine yakın ve benzemektedir.

Bu yöntemin dezavantajları; mikrokapsül oluşumu sırasında yüksek protein konsantrasyonuna gerek duyulması ve yüksek molekül ağırlıklı substrat ve ürünler için sınırlı olmasıdır [11].

Kafes tipi hapsetme metodu :

Bu yöntem; yüksek derecede çapraz bağlı bir polimerin enzim çözeltisi içinde oluşturulması esasına dayanır. Bu amaçla en çok kullanılan polimer N,N'- metilen bisakrilamid ile çapraz bağlanmış poliakrilamittir.

Polimerleşme sonucu enzim molekülleri çapraz bağları arasında tutuklanmakta ve böylece çözeltiliye geçişleri durdurulmaktadır.

Kafes tipi immobilizasyonda; çapraz bağ yüzdesi öyle ayarlanmalıdır ki, enzim molekülleri tutuklanabilsin ama substrat moleküllerinin enzim moleküllerine ulaşmasına izin versin.

Çapraz bağ yüzdesinin aşırı olması substratın enzim aktif merkezlerine ulaşmasını engellemekle kalmayıp enzimin zincir yapısını da zorlayıp aktivite kaybına neden olabilmektedir. Bu oran enzime ve taşıyıcıya bağlı olarak değişebilmektedir. Bu yöntemle immobilize edilecek enzimin substratının küçük moleküllü yapıda olması gerekmektedir [11].

Bu yöntemin avantajları:

- Çok kolay kullanılabilir olması,
 - Gerçek bir fiziksel yöntem olması,
 - Çok az miktar enzim ile gerçekleşmesi,
 - Çapraz bağ oluşumunda kullanılan gama ve UV ışınları enzim yapısını ve aktifliğini kimyasal proseslerden daha az etkilemesi,
 - Ortamdaki çapraz bağlayıcı ve monomer derişimini değiştirmek suretiyle farklı büyüklükte gözenek içeren polimerik kafes üretebilmesi,
 - Polimerleşmenin genelde hem kolay hem de hızlı bir şekilde gerçekleşmesidir.
- Yöntemin dezavantajları ise; immobilizasyon işleminde, jel oluşumu sırasında yürüyebilecek kimyasal olayların ve reaksiyon sıcaklığının enzimin aktivitesinin durdurulması ihtimalinin olmasıdır. Ayrıca çapraz bağlı polimerin ağ örgüsünden enzimin sızma ihtimali de vardır.

Tablo 1.2. Serbest ve immobilize enzim özelliklerinin karşılaştırılması

Serbest enzim	İmmobilize enzim
Reaksiyon sonunda ortamdan uzaklaştırılması oldukça zordur.	Süzme santrifüjleme gibi basit yöntemlerle ortamdan uzaklaştırılabilir.
Ürünlerde azda olsa kirlilik yapar.	Tamamen ayrıldığından ürünlerde kirlilik söz konusu değildir.
Çevre koşullarından daha kolay etkilenirler.	Çevre koşullarına dayanıklıdırlar.
Her örnek bir kere ve kısa süre kullanılır.	Bir çok kez ve uzun süre kullanılabilir.
Kararsız ev dayanıksızdırlar.	Daha dayanıklı ve kararlıdırlar.
Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlarda kullanılmazlar	Çok adımlı reaksiyonlara uygundur.
Aktivitesini çabuk kaybeder.	Basit immobilizasyon yöntemleri aktivitesini arttırır.
Kendi kendini parçalayabilir.	Kendi kendini parçalama minimuma indirgenir.

Enzimlerin immobilize edilmesinin aynı zamanda bazı dezavantajları vardır. Bunların başlıcaları aşağıda özetlenmiştir.

1. İmmobilizasyon işlemi boyunca enzim aktifliği azalabilir veya kaybolabilir.
2. Çok basamaklı İmmobilizasyon işlemlerinde enzim kararlılığı sınırlıdır.
3. Enzim taşıyıcılarının maliyeti yüksektir.

1.4. Polifenol Oksidaz Enzimi

1.4.1. Doğada bulunuşu

PPO; birçok bitki ve hayvansal organizmalar ile bazı mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunur [1, 13]. PPO hayvansal organizmalar içerisinde koyu pigmentlerin oluşması, gelişmesi, melanin pigmentinin biyosentezinin başlatılması ve polifenolik grupların korunması gibi görevlerde bulunur.

Polifenol oksidaz (PPO) (EC 1.10.3.2) enzimi, tirozinazlar (EC 1.14.18.1) ve lakkazlar (EC 1.10.3.2) olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. Meyve ve sebzelerin yüzeylerinde deformasyonundan ve kesiminden oluşan hasarlarda fenol bileşiklerinin oksitlenme ürünleri sonucu kahverenginde ve esmerleşmelere neden olan bir grup enzim için genel bir terimdir.

Bitkilerin savunma mekanizmasında yer alan PPO bitkiler kesildikleri ya da çürüdükleri zaman genel olarak fenolik bileşikler oksijenin hazır bulunduğu ortamda polimer yapılara oksitlenirler. Farklı kaynaklardan elde edilen PPO enziminin miktarı ve dağılımı, bitkinin cinsine, yaşına, yetiştirilme yerine ve olgunluğa bağlıdır. PPO enziminin, meyve ve sebzelerin değişik kısımlarındaki dağılımı oldukça farklıdır.

Elmanın çekirdeğinde bulunan enzim, diğer kısımlarında bulunan enzimden daha fazla aktiflik göstermektedir.

Armut, şeftali ve kirazda ise en yüksek PPO aktivitesi kabuk kısmında yer almaktadır. Yeşil yapraklarda bulunan PPO enzimi aktivitesinin en yüksek olduğu yerin kloroplastlar olduğu belirlenmiştir [12].

Enzimin, bitkilerin mikrobiyal veya viral enfeksiyonlara ve değişik iklim şartlarına karşı direnç göstermelerinde çok önemli rolünün olduğu düşünülmektedir.

Enzimatik kararına önemli bir problemdir, ana sorun ürünlerdeki ekonomik kayıptır, özellikle taze meyve örneğin elma, armut, muz ve üzüm, sebzelere örnek olarak patates, marul ve mantar ve deniz ürünlerine örnek olarak karides verilebilir. Ticari olarak bozulmadaki görsel etkiyi azaltmak önemlidir

PPO enzimi, fermantasyonla elde edilen içeceklerin tat ve lezzetini de etkileyebilir. Örneğin fermente edilmiş elma ve armut suyu üretiminde, meyvelerde doğal olarak bulunan fenolik bileşikler okside olarak çökelirler. Ancak bunlar süzülerek uzaklaştırılabilir.

Meyve ve sebzelerde meydana gelen PPO enzimi katalizli enzimatik kararmalar; bunların depolanmaları ve endüstriyel işlenmeleri sırasında kesilme, zedelenme, dondurulmuş meyvenin çözülmesi durumlarında hava oksijeninin etkisiyle meydana gelir. İstenmeyen bu tür kararma reaksiyonları enzim inaktive edilerek önlenmeye çalışılmaktadır.

Bazı besin teknolojilerin de ise enzimatik polifenol oksidaz enziminin neden olduğu enzimatik kararma istenen bir durumdur. Örneğin; siyah çay, siyah üzüm ve kuru erik üretiminde bu enzimatik kararma çok önemlidir [13].

1.4.2. Molekül yapısı

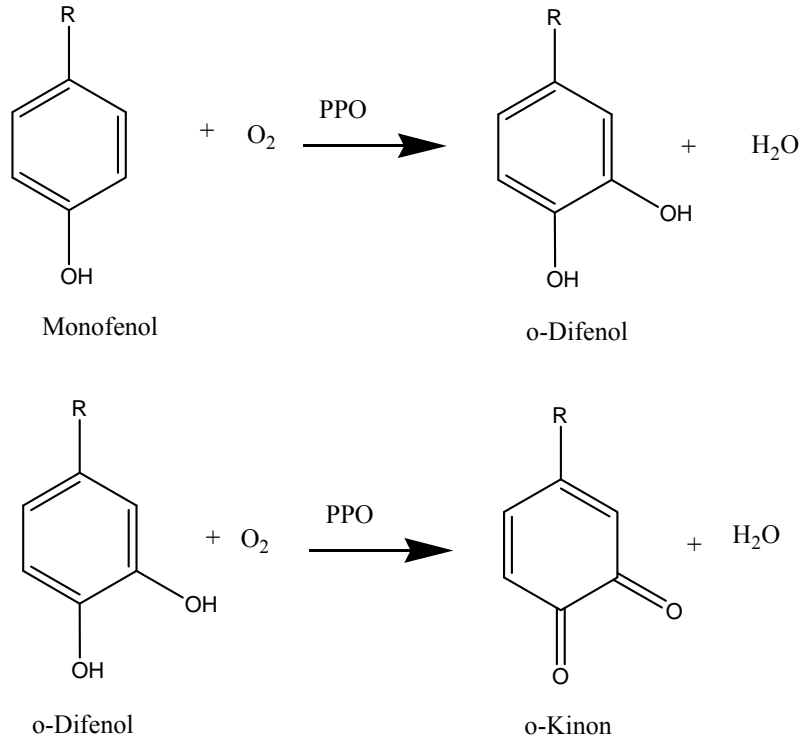
Polifenol oksidaz enzimi, birden fazla alt birimden oluşan oligomerik yapıda bir enzimdir. PPO enziminin içerdiği alt birim sayısı enzimin izole edildiği kaynağa ve substrata bağlı olarak değişmektedir.

Amasya elmasından elde edilen PPO enzimi için katekol ve L-DOPA substratları kullanılarak 3 izozim tespit edilmiştir. Yapılan araştırmalara göre patlıcan, mango ve kayısı 2 alt birim, şeftali 4 alt birime sahipken kivi 8 tane alt birime sahiptir [14].

1.4.3. PPO enziminin reaksiyonları ve mekanizması

PPO enzimi öncelikle oksijenin bulunduğu ortamda monofenolleri hidroksilasyon ile o-difenollere daha sonra o-difenolleri dehidrojenasyon ile oksijenin hazır bulunduğu ortamda o-kinonlara katalizler (Şekil 2.2.).

O-kinonların non-enzimatik polimerizasyonu, oksidatif bileşen tarafından bir seri oligamerisasyon ve polimerisasyon reaksiyonu ile melanin yada melanin benzeri bileşenleri oluşturur [14].

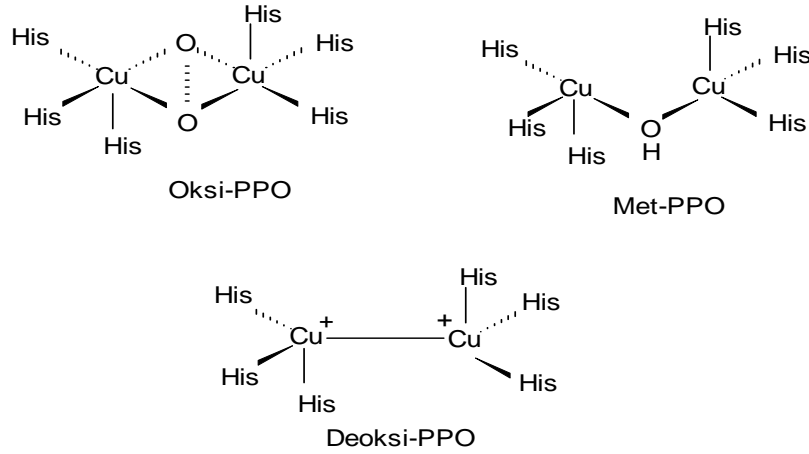


Şekil 2.2. PPO'nun katalizlediği reaksiyonlar

Mantar, patates, elma, şeker pancarı yaprağı, bakla ve mantardan elde edilen PPO enzimi her iki aktiviteyi göstermektedir. Ancak tütün yaprağı, mango, muz, armut gibi bitkilerden elde edilen PPO enziminin monofenollerle reaksiyon göstermediği belirlenmiştir [15].

PPO enzimi monofenolleri katalizlemesine krezolaz aktivitesi o-difenolleri katalizlemesine katekolaz aktivitesi denir.

PPO enziminin aktif merkezi ile ilgili yapılan kimyasal ve spektroskopik çalışmalar sonucu elde edilen bulgular aktif bölgenin iki binükleer bakır kompleksine sahip olduğunu ve tip 3 bakır merkez özelliği taşıdığını göstermektedir (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. PPO'nun bakır merkezleri

Oksijenlenmiş form (oksi-PPO), her biri iki kuvvetli ekvatoryal ve bir zayıf aksiyal N-His ligandlarıyla koordine olmuş iki tetragonal Cu(II) atomundan oluşmuştur. Eksojen oksijen molekülü peroksit olarak bağlanır ve iki bakır atomu arasında köprü oluşturur. Met-PPO formu oksiform gibi endojen köprüyle antiferromagnetik şekilde çiftleşmiş iki tetragonal Cu(II) atomu içerir.

Deoksi-PPO bikuprik yapıya sahiptir. [Cu(I)-Cu(I)] PPO'nun aktif bölgesindeki bakır içeren bu üç form monofenollerin o-hidroksilasyonu ve difenollerin oksidasyonu ile sonuçlanan reaksiyon mekanizması için bir modeldir.

Fizyolojik fonksiyonları farklı olmasına rağmen PPO ve hemosiyanin aktif bölgesi birbirine benzerlik gösterir ve bu model sistemler üzerinde yapılan çalışmalar monofenollerin PPO ile katalizlenen dönüşümlerinin substratın enzimin oksiformuna bağlanmasıyla başladığını ortaya koymaktadır [16].

Bir dizi reaksiyon sonucunda oluşan o-kinonlarla fenolik substratlar polimerizasyona uğrayarak kahverengi melanin pigmentleri oluşturmaktadır.

Çiftleşmemiş elektronlar, kolayca yeni kovalent bağlar oluştururlar ve yeni bağlanmış karbonlar üzerindeki hidrojenler tekrar oksitlenecek olan hidrokinona geç ederler. Sonuçta kompleks yapıdaki büyük polimerler oluşur [17].

Bu melaninler bariyer oluşturur ve enfeksiyonun yayılmasından yada bitki dokusunun bozulmasından koruyan antimikrobiyal özelliğe sahiptir.

İklim değişikliğine yüksek direnç gösteren bitkiler kolay etkilenenlere göre yüksek polifenoloksidaz içeriğine sahiptir ve polifenol oksidaz ayrıca hayvanlarda oluşur, böceklerde ve kabuklularda hastalık direncini arttırdığı düşünülmektedir [18].

1.4.5. PPO enziminin substratları

Spesifikliğin en önemli anlamı bir enzimin bir aktif bölgesi için yarışan substratlar arasındaki ayrımıdır. Esmerleşmede duyarlılık bir bitkiden diğerine değişir. Bu değişme nitel ve nicel özelliklerin her ikisine de bağlıdır. Meyve ve sebzelerde fenolik bileşiklerin çeşitliliği bulunur, sadece küçük bir grup direkt substrat olarak PPO enzimine etki eder; kafeik asit türevleri örnek verilebilir, klorojenik asit her zaman PPO enzimi için en iyi substratlardandır. Buna ek olarak diğer nicel önemli fenol grupları antoksiyanin, flavanol ve tanin zayıf olarak PPO enzimi tarafından oksitlenir.

Bir diğer fenol grupları kolayca PPO enzimi tarafından oksitlenir, örneğin; 3,4-dihidroksifenil asetik asit, katekol, 4-metil katekol, 3,4-dihidroksifenil propiyonik asit, m- ve p-kresol, 3,4-dihidroksi benzoik asit, L-adrenalin, D-adrenalin, L-noradrenalin ve D-noradrenalin verilebilir. Dahası bazı meyve polifenol oksidaz enzimi diğer fenolik substratları kullanır. Örneğin DOPA, dopamin muz için önemli substratlardır. DOPA, bakla yapraklarında doğal substrat olarak bulunur. Mandalina için substrat olarak pirogallol verilebilir. En önemli substratlar Şekil 3.5'te verilmektedir [19].

Son günlerdeki çalışmalarda, PPO aktivitesi için iki yeni sınıf substrat daha eklenmiştir; bunlar aromatik aminler ve o-aminofenollerdir [20].

PPO aktivitesi doğal olarak bulunan proses sonucu farklı substratlarda farklı oranlarda oksitler [21].

Enzimin, bu substratların yükseltgenmesi reaksiyonunu katalizleme hızı bitkinin neresinden izole edildiğine, bitkinin türüne ve yaşına bağlıdır. Örneğin mantardan, üzümünden ve kayısıdan izole edilen enzimlerin katekol için katalizleme hızı birbirinden farklıdır.

Ayvadan izole edilen PPO enziminin kısmen saflaştırılmış enzimin, katekol, L-DOPA, ve pirogallol ile oksitlendiği fakat L-tirozin ve p-kresol ün oksitlenmediği gösterildi. Enzimin L-tirozin ve p-kresol ile karıştırıldıktan bir saat sonrasına kadar reaksiyon gözlenmedi. Bu ayva polifenol oksidazının aktivitesinin orta-difenolle doğru ilerlediği fakat monofenole doğru ilerlemediği görüldü. Benzer aktiviteler fasulye ve armutta da not edilmiştir.

Kekikten izole edilen enzim için yine katekol pirogallol ve domamin substrat olarak denenmiş ve sırasıyla K_m değerleri 682,2, 15,4 ve 62,0 mM, olarak bulunmuştur. Kekikten izole edilen enzim için en iyi substrat pirogallol olarak bulunmuştur [22].

Literatürdeki şeftali çeşitlerinden izole edilen enzim için bazı veriler kıyaslanabilir. Buna göre; Fay Elberta çeşidi şeftalilerden ekstrakte edilmiş PPO enzimi için K_m 120 mM (katekol) ve V_{max} 16,7 Klett Ünitesi/dak. olarak saptanmıştır. Red Haven şeftalilerinde ise, K_m 29 mM (katekol), Halford şeftalilerinde K_m 15 mM (katekol) düzeyinde bulunduğu bildirilmektedir [23].

Şeker kamışından elde edilen PPO enziminin DOPA'yı yükselttiği halde L-tirozine etki göstermediği gözlenmiştir [24].

Hurmadan elde edilen PPO için substratlara olan ilgisi farklı sıcaklıklarda ve pH'larda nasıl etkilediği gözlenmiştir. PPO aktivitesi 20 °C katekol, 40 °C 4-metil katekol için, 10 °C L-DOPA için pH'ı 7,5 fosfat tamponu kullanılarak enzim aktivitesi bulunmuştur [25].

Meyve sebzelerin çoğunda fenol konsantrasyonunun dış tabakalarda daha fazla olduğu görülmüştür. Örneğin; elma ve armudun kabuk kısmının fenol içeriği etli kısmına göre daha fazladır [26].

Bir kaynaktan elde edilen PPO enzimi için en iyi substrat yine aynı kaynaktan bulunan substrat olduğu görülmüştür. [27].

1.4.6. PPO enzim aktivitesini etkileyen faktörler

1.4.6.1. pH'ın etkisi

pH Enzimlerin aktivitesine etki eden önemli faktörlerden biridir. Her kaynaktan elde edilmelerine göre farklı Ph larda aktivite gösterebilirler ve her enzime ve substrata göre farklılık gösterebilir.

1.4.6.2. Sıcaklığın etkisi

Enzimin optimum sıcaklığı da pH gibi izole edildiği kaynağa, ortamın pH'sına ve kullanılan substrata bağlıdır.

Polifenol oksidaz enziminin meyvelerde aktivasyon gösterdiği optimum sıcaklık aralığı 25-30 °C'dır [28].

Dut polifenol oksidazının aktivitesi için optimum sıcaklıkta enzim substratında değişim gözlenmiştir [29].

Buna göre, 4-metil katekol ve pirogallol için enzimin optimum sıcaklığı 20 °C aynı koşullarda katekol için 45 °C verilmiştir. Enzimin güçlü bir şekilde pirogallol'u oksitlediği gözlenmiştir [30].

Yer elmasından izole edilen PPO enzimini için optimum sıcaklık 25-30 °C olarak bulunmuştur. 40 °C'nın üzerinde enzim aktivitesinde azalma kaydedilmiş ve 75 °C'de enzim aktivitesini kaybettiği kaydedilmiştir [31].

1.4.7. PPO enziminin tıptaki kullanım alanları

PPO enzimi, melanin oluşumunda görev alması nedeniyle tıbbi alanda da dikkatleri üzerine çekmiştir. Suda çözünmeyen heteropolimer yapıdaki melanin, 5,6-dihidroksiindol ve 5,6-dihidroksiindol-2-karboksilik asit birimlerinden oluşur ve özellikle kozmetik sanayi tarafından güneşin ultraviyole ışığından korunmak amacıyla üretilir. Ayrıca, ilaç hapsedilmesi myopolimer olarak da melaninden yararlanılmaktadır. Bundan başka, bazı kanser türlerinde kanserli hücrede tirozinaz aktivitesinin oldukça arttığı gözlemlenmiş ve bu kanser türlerinin tedavisinde enzimin bu özelliğinden faydalanılması gündeme gelmiştir.

Memelilerde tirozinazın aktif biçimi, melanositler içerisinde bulunan özelleşmiş sitoplazmik granüller olan melanozomlarda bulunmaktadır. Tirozinazın bir substratı olan 4-hidroksianizolün farelerde Harding-Passey melanomasının gerilemesine sebep olduğunu bildirmişlerdir.

Tirozinazın kullanıldığı bir başka önemli alan ise Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılan L-DOPA'nın üretimidir [32].

1.4.8. PPO enziminin endüstride kullanım alanları

Dünyada ve ülkemizde günümüze kadar hızlı bir endüstriyel gelişim meydana gelmiştir. Bu gelişimle birlikte öncelik üretime verilmiş, ancak çevreye verilen atıkların çevre ve canlı hayatı üzerine etkileri pek fazla düşünülmemiştir. Çevreye atılan endüstriyel atıkların artmasıyla birlikte birçok atık türünde doygunluğa ulaşılmış ve zararları görülmeye başlanmıştır. Bu atıklardan en önemlilerinden biriside fenol ve fenol türevleridir.

Önemli bir endüstriyel atık olan fenolün dünyadaki ve ülkemizdeki kullanım alanlarından en önemlisi fenolik reçine üretimidir. Fenolik reçineler, kâğıt endüstrisi, kauçuk işletme endüstrisi ile yalıtım ve yüksek sürtünmeye dayanıklı malzeme üretiminde kullanılmaktadır. Bunun dışında fenol, ilaç endüstrisinde, temizlik ürünlerinin imalatında kullanılmaktadır [33].

Fenoller zehirli olduklarından tüm canlı hücre türlerine zarar verirler. Fenollerin öldürücü dozları deri tarafından absorblanabilir. Fenol varlığı suda tat ve koku olarak anlaşılabilir. Fenol içeren suların içilmesi böbrek bozukluklarına, ağır sarsıntılara ve hatta ölümlere neden olabilir. Klor içeren fenollerin zehirleyici etkisi ise izomere bağlı olarak değişir. Klorlu fenollerin çoğu deride ve gözde oldukça yıpratıcı özelliklere sahiptir ve yine zehirleyici miktarları deri tarafından absorblanabilir [34].

Bu zararlı fenollerin ortadan kaldırılması için çeşitli yöntemler geliştirilmiş ve bunlarda enzimler kullanılmıştır. Özellikle PPO çeşidi olan tirozinazın toksik olan fenolik bileşikler kinonlara çevirerek uzaklaştırabileceği düşünülmüş ve bu alanlar geniş çalışmalar yapılmıştır.

Araştırmalar sonucunda; Atlow ve arkadaşları endüstriyel atık sularından 0,01-1,0 g/L konsantrasyon aralığındaki fenollerin başarıyla çöktürülerek ortamdan uzaklaştırılabileceğini söylemişlerdir. Ancak Wada ve arkadaşları bu araştırmacılarla uyuşmayan sonuçlar bildirmişlerdir. Wada ve arkadaşları “polifenollerin tirozinazla polimerizasyonundan sonra, herhangi bir çökeleğin oluşmadığını ve çözeltinin renginin, renksizden kahverengiye dönüştüğünü” açıklamışlardır. Wada ve diğer araştırmacılar, tirozinazın saflığının çökeltmenin oluşmasında büyük rol oynadığını düşünmektedirler.

Çökeltme gözlenmediğine göre, reaksiyon ürünlerinin ortamdan alınması için, kitin gibi maddeleri adsorbans olarak kullanmışlardır. Yapılan araştırmalar sonucu, oksidasyon ürünü olan kinonların ve diğer yan ürünlerin adsorplanarak ortamdan uzaklaştırılması için kitosanın başarıyla kullanılabileceği görülmüştür [34]

1.4.9. PPO enziminin immobilizasyonu ile ilgili çalışmalar

Endüstri ve tıpta yaygın olarak kullanılan polifenol oksidaz enzimi kullanılmadan önce çeşitli şekillerde immobilize edilmektedir. Bu konu ile ilgili çalışmalardan bazıları şunlardır. Tirozinaz enzimi Ca-aljinat ve poliakrilamid(koakrilikasit) kullanılarak binari yöntemi ile immobilize edilmiştir. Serbest ve immobilize enzimlerin maksimum hızı (V_{max}) ve Micheals-Menten sabiti incelenmiştir. Aynı

zamanda serbest ve immobilize enzim üzerine pH, sıcaklık, depolama kararlılığı, tekrar kullanım sayısı ve termal kararlılığı incelenmiştir [35].

Başka bir çalışmada lakkaz enzimi, poliakrilamit ve poliakrilamit karragenan jelleri içine hapsedilerek immobilize edilmiştir. Optimum pH serbest enzim lakkaz için 6,0 poliakrilamit karragenan için 8,5 olarak bulunmuştur. Optimum sıcaklık ise serbest enzim için 45°C poliakrilamit karragenan için 60 °C olarak belirlendi serbest enzim 4°C depolamada 15 gün sonra başlangıç aktivitesinin ancak %35 ini korurken, 60 gün 4 °C depolamada poliakrilamit karragenan ile immobilize edilen enzim %63 ünü koruduğu gözlemlenmiştir. Serbest ve poliakrilamit karragenan ile immobilize edilen enzim için K_m değerleri sırasıyla 6,90, 7,38 mM ve V_{max} değerleri 2,7, 1,37, 1,68 ve 1,70 mM.dak⁻¹ olarak bulunmuştur [36].

Lipaz enzimi poli(N,N-dimetilakrilamit-koakrilamit) ve Poli(N-izopropilakrilamit-ko-akrilamit)/K-Kkarragenan polimerleri kullanılarak kovalent bağlanma ve hapsedilme metodu ile immobilize edilmiş, serbest enzim için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 3,58 mM ve 10,72 mM.dakika⁻¹ immobilize enzimler için ise K_m değerleri 7,36 ve 5,77 mM ve V_{max} değerleri 7,13 mM. dak⁻¹ ve 11,33 mM.dakika⁻¹ olarak bulunmuştur. Serbest ve immobilize enzim için, optimum pH 8, optimum sıcaklık 30°C olarak bulunmuştur. Enzimin tekrar kullanım sayısı depolama kararlılığı ve termal inaktivasyonu immobilizasyon işlemi ile artış göstermiştir [37].

Lakkaz enzimi poli(akrilamit-krotonik asit)/sodyum aljinat , poli(akrilamit-krotonik asit)/k-Karragenan, poli(akrilamit-sitronik asit)/k-Karragenan ile hapsedilerek immobilize edilmiştir. Serbest lakkaz ve immobilize lakkazlar için optimum pH 5,0 - 6,0 arasında değiştiği gözlemlenmiştir. Serbest lakkaz ve immobilize lakkazlar için optimum sıcaklık 40-50°C aralığında değiştiği gözlemlenmiştir. Serbest lakkaz ve poli(akrilamit-krotonik asit)/sodyum aljinat, poli(akrilamit-krotonik asit)/k-Karragenan poli(akrilamit-sitronik asit)/k-Karragenan ile hapsedilerek immobilize edilen lakkaz için 4°C 42 gün sonunda başlangıçtaki aktivitelerine göre sırasıyla %55, % 71 , %70 ve %73 Oranında korudukları gözlemlenmiştir. Ve 10 kez kullanımları sonunda başlangıç aktivitelerine göre sırasıyla %62, %56, %53, %52 oranında koruduğu gözlemlenmiştir

Serbest lakkaz ve poli(akrilamit-krotonik asit)/sodyum aljinat, poli(akrilamit-krotonik asit)/k-Karragenan, poli(akrilamit-sitrakonik asit)/k-Karragenan ile hapsedilerek immobilize edilen lakkaz için için K_m değerleri sırasıyla $6,70 \times 10^{-2}$ mM, $7,90 \times 10^{-3}$ mM, $8,40 \times 10^{-3}$ mM, $3,700 \times 10^{-3}$ mM olarak V_{max} değerleri ise $1,80 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹, $3,7 \times 10^{-3}$ dak⁻¹, $3,5 \times 10^{-3}$ dak⁻¹ $8,01 \times 10^{-4}$ dak⁻¹ olarak bulunmuştur [38]

Yine başka bir çalışmada B-galaktosidaz enzimi (Ca-aljinat-PVA), poli(N,izopropilakrilamit)-kalsiyum aljinat kürelerine hapsedme yöntemi ile immobilize edildi. Serbest enzim için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla $0,34$ mM⁻¹ $0,0259$ mM.dak⁻¹ olarak bulundu. Immobilize edilen enzimler için ise K_m değerleri $0,746$ mM⁻¹ - $4,97$ mM⁻¹ olarak değiştiği gözlemlendi. Serbest ve immobilize enzim için optimum pH değerleri sırasıyla 5,0 ; 4,5 ;5,0 olarak bulundu. Optimum sıcaklık değerleri ise sırasıyla 30°C, 35°C, 35°C, olarak bulundu. Serbest enzim 30 günün sonunda aktifliğini başlangıca göre %10 korurken immobilize enzim 70 günün sonunda aktivitesini %49 oranında koruduğu gözlemlendi. Ayrıca hapsedme ile immobilize edilen enzimin tekrar kullanım sayısı 5-10 arasında değiştiği görüldü [39].

1.4.10. Roka hakkında

Roka (*Eruca sativa*) kültür bitkisi olarak yetiştirilir. Bir veya iki yıllık otsu bitkiler. Yapraklar toplu, dişli kenarlı ve tüylüdür. Çiçekler sarımtırak veya beyazımtırak olup, üzerleri morumsu damarlıdır. Sebze olarak bahçelerde yetiştirilir.

Sert kokulu ve baharatlı bir bitkidir. Kök ve tohumdan üretilir. Birinci yıl yaprakları için sofralık olarak üretilir, düşük sıcaklıklarda kışı geçirdikten sonra ilkbaharda generatif döneme geçer ve tohum oluşturur. Yaprakları sebze olarak değerlendirilen rokanın yetiştiriciliği Akdeniz ve Güney Avrupa ülkelerinde çok yaygındır.

Bütün yıl boyunca yetiştiriciliği yapılmakta ve taze yaprakları salata ve garnitür olarak tüketilmektedir. Roka özellikle İtalya ve İspanyada çok üretilmekte ve yılın her ayında bulunabilmektedir. Uzak doğu ülkelerinde Hindistan ve Çin'de ise yağ bitkisi olarak üretilmektedir. Tohumlarından elde edilen yağlar insan beslenmesinde,

ilaç sanayinde ve değişik şekillerde değerlendirilir. Ancak *Eruca vesivaria subsp. Sativa (Mill.)* olarak bilinen rokanın değerlendirilen kısımlarında bazı farklılıklarının olduğu görülmektedir. Özellikle ülkemizde İç Anadolu Bölgesinde yetiştirilen ve Izgın olarak bilinen bitkilerde *Eruca sativa (Mill.)* olarak adlandırılmaktadır. Bu bitki sadece yağ bitkisi olarak ve hayvan beslenmesinde kullanılmaktadır. Sebze olarak değerlendirilen bitkinin genellikle sadece yaprakları tüketilir.

Roka Romalılar döneminden buyana sebze olarak değerlendirilmektedir. Bu bitkinin değişik hastalıklara iyi geldiği ve afrodisyak özellik taşıdığı bilinmektedir. Yaprakları sebze olarak tüketilen roka, eczacılıkta birçok hastalığa karşı kullanılır. Çoğu hastalığın tedavisinde etkili olduğu ve olumlu sonuçlar alındığı bildirilmektedir. İnsan sağlığı bakımından öneminin son yıllarda çoğu kişi tarafından bilinmesi bu sebzenin üretim ve tüketiminin artmasına neden olmuştur.

Özellikle büyük kentlerimizde gelir düzeyi yüksek kişilerin sebzeye olan talebi hızla artmaktadır. Ülkemizde 1.100 ton civarında roka üretimi yapılmaktadır. Rokanın anavatanı hakkında kesin bir bilgi olmamakla beraber, Akdeniz ülkeleri bu sebzenin anavatanı olduğu bildirilmektedir.

Kullanıldığı yerler: Bitkinin yaprakları yakıcı, lezzetli bir uçucu yağ ihtiva eder ve C vitamini taşır. C vitamini miktarı oldukça yüksek olup, 100 gram taze yaprakta takriben 150 mg kadar bulunur. Bunun yanında A ve B1 vitaminleri ile Fe, Ca, P ve K açısından da zengindir. Roka yaprakları daha çok sonbahar ve kış aylarında salata olarak kullanılır. Roka iştah açıcıdır. Mideyi kuvvetlendirir ve hazmı kolaylaştırır. İdrar söktürücüdür. Karaciğere faydalıdır. Karaciğer ağrılarını giderir, kanı temizler ve sarılığı keser. Uyarıcıdır. Vücuda kuvvet verir. Bağışıklık sistemini güçlendirir. Öksürüğü keser. Vücuttaki zararlı maddelerin vücuttan uzaklaştırılmasına yardımcı olur [40].

BÖLÜM 2. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

2.1. Polifenol oksidaz (PPO) Enziminin Karakterizasyonu

2.1.1 Polifenol oksidaz (PPO) enziminin izolasyonu

Sakarya bölgesinde yetişen roka bitkisi toplandıktan sonra bir ay kadar soğutucuda depolanmış daha sonra PPO enzimini izole etmek için % 0,5 pirolidon (PVP) ve 0,01 M askorbik asit içeren 0,1 M fosfat tamponu (pH 7,0) kullanılmıştır. İzolasyon aşamasında kullanılan PVP, rokada bulunan fenolik maddeleri bağlayarak, PPO enziminin aktivite göstermesini engellemek amacıyla kullanılmıştır. Çünkü fenolik maddelerin oksidasyonu sonucu oluşan kinonlar, enzimi inhibe edebilmektedir. Askorbik asit izolasyon sırasında oluşan o-kinonları azaltmak amacı ile kullanılmıştır ve kendisi yükseltgenir.

2.1.2. Substrat spesifikliğı

Optimum substratı belirleyebilmek amacı ile PPO enziminin 5 farklı substrat karşı aktivitesi belirlenmiştir. Bu amaçla, 4-metil katekol, katekol, pirogallol, gallik asit, kafeik asit, L-tirozin substrat olarak kullanılmıştır. En yüksek aktiviteyi gösteren enzim karakterizasyon deneylerinde kullanılmıştır.

2.1.3. Optimum substrat konsantrasyonu

En yüksek aktiviteyi bulabilmek için kullanılan tüm substratlar 1-50 mM gibi farklı konsantrasyonlarındaki çözeltileri kullanılarak en fazla aktivite gösterdikleri konsantrasyon belirlenmiştir.

2.1.4. pH etkisi

PPO enzimi aktivitesi farklı pH'larda 3,6-9,0 arasında hazırlanmış 5 farklı substrat kullanarak (4-metil katekol, katekol, pirogalol, gallik asit, L-tirozin,) tayin edilmiştir. 100mM'lık stok çözeltileri hazırlanarak, aktivite tayinleri spektrofotometrik yöntemle 60 sn süresince 420 nm absorbans artışları izlenerek gerçekleştirilmiştir.

pH: 4,6-9,5 arasındaki çeşitli tampon çözeltiler aşağıda anlatıldığı şekilde hazırlanılmıştır.

pH'ları 4,6-5,0 arasındaki tamponları hazırlamak için;

10,52 gram sitrik asit monohidrat saf su ile 500 ml'ye tamamlanmıştır. Bu çözelti A çözeltisidir. 14,705 gram sodyum sitrat saf su ile 500 ml' ye tamamlanmıştır. Bu çözelti B çözeltisidir.

A ve B çözeltilerinin aşağıda belirtilen miktarlarda karıştırılması ile istenilen pH'larda tamponlar hazırlanmıştır.

Tablo2.1. 0,1 M sitrik asit tamponun hazırlanması

PH	A (ml)	B (ml)
3,6	35	20
4,5	25	27
5,0	25	58

pH'ları 6,0-7,5 arasındaki tamponları hazırlamak için;

Bu tamponların hazırlanmasında $pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$ formülü kullanılmıştır.

pH'ları 7,5-9,5 arasındaki tamponları hazırlamak için;

Trizma –HCl ve Trizma-Base'dan aşağıda verilen miktarlarda tartılıp saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

Tablo 2.2. 0,1 M tris tamponunun hazırlanması

PH	Trizma –HCl	Trizma-Base
8.0	3,59 g	3,66 g
8.5	1,1 g	4,36 g
9.0	0,23 g	7,45 g

2.1.5. Sıcaklığın etkisi

Yine 4-metil-katekol , katekol , pyrogallol, gallik asit , L-tirozin kullanılarak enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için 0-80 °C' ler aralığında enzim aktivitesine bakılmıştır. Yüksek sıcaklıklar için su banyosu ve düşük sıcaklıklar için ise buz banyosu kullanılmıştır.

2.1.6. Enzim kinetiği

Enzim maksimum hızı (V_{max}) ve Mizhaelis-Menten sabiti (K_m) bulunması için kinetik çalışmalar 1-50 mM'luk 4-metil katekol, katekol, gallik asit, pyrogallol, L-tirozin substratları 100mM'luk stok çözeltiler şeklinde kullanılarak hazırlanmıştır.

Daha sonra spektrofotomerik olarak 420 nm'de 60 sn aktivitesi izlenmiştir. Daha sonra absorbans-zaman grafiğinden ilk hızları hesaplanmıştır. Bu ilk hız değerleri Linewearver-Burk grafiğinde ($1/V$ 'ye karşı $1/[S]$) yerine konularak K_m ve V_{max} değerleri bulunmuştur.

2.2. PPO Enziminin İmmobilizasyonu

2.2.1. Ca-aljinatla immobilizasyonu

1,65gr. aljinat üzerine 50 mL saf su ilave edildikten sonra yarım saat magnetik karıştırıcı üzerinde karıştırılarak homojen bir karışım elde edildi. Bu homojen karışım içerisinde 10 ml alınarak rokadandan izole edilmiş 3 mL stok PPO enzim çözeltisi ilave edildikten sonra 0,3 M'lık CaCl_2 çözeltisi içerisinde 5 mL'lik pipet ile Ca-aljinat enzim çözeltisi damlatılarak enzimin immobilize edildiği Ca-aljinat küreleri elde edildi. Elde edilen aljinat küreleri saf su ile 3 kez yıkandıktan sonra Ca-aljinat küreleri 0,03 M'lık CaCl_2 çözeltisi içerisinde 24 saat buzdolabında bekletildi. İmmobilize enzim kullanılmak üzere buzdolabında (4°C) saklandı.

2.2.2. Ba-aljinatla immobilizasyon

1,65gr. aljinat üzerine 50 mL saf su ilave edildikten sonra yarım saat magnetik karıştırıcı üzerinde karıştırılarak homojen bir karışım elde edildi. Bu homojen karışım içerisinde 10 ml alınarak rokadandan izole edilmiş 3 mL stok PPO enzim çözeltisini ilave edildikten sonra 0,3 M'lık BaCl_2 çözeltisi içerisinde 5 mL'lik pipet ile Ba-aljinat enzim çözeltisi damlatılarak enzimin immobilize edilerek Ba-aljinat küreleri elde edilmiştir. Elde edilen küreler saf su ile 3 kez yıkandıktan sonra 0,03 M'lık BaCl_2 çözeltisi içerisinde 24 saat buzdolabında bekletildi. İmmobilize enzim kullanılmak üzere buzdolabında 4°C saklandı.

2.2.3. Poliakrilamid jeline immobilizasyon

20 ml su alınarak 2,85 g P(AAm-ko-AA), 2 mL akrilik asit, 0.15 g bisakrilamid, 10 mg amonyum persülfat ilave edildi. Çözünene kadar magnetik karıştırıcı üzerinde karıştırılarak homojen bir karışım elde edildi. Bu homojen karışım içerisinde 5 mL (2 mg/25mL) enzim çözeltisini ilave edildikten sonra petri kabına döküldü. 1mL TEMED ilave edildi. Polimerizasyon gerçekleştirildikten sonra küp (5x5x5) mm boyutunda kesildi. İmmobilize enzim kullanılmak üzere buzdolabında 4°C saklandı.

2.2.4. Aljinat-poliakrilamit jeline immobilizasyon

1,65gr. aljinat üzerine 50 mL saf su ilave edildikten sonra yarım saat magnetik karıştırıcı üzerinde karıştırılarak homojen bir karışım elde edildi. Bu karışımdan 20 mL alınarak 2,85 g P(AAm-ko-AA), 2 mL akrilik asit, 0.15 g bisakrilamid, 10 mg amonyum persülfat ilave edildikten sonra çözünene kadar magnetik karıştırıcı üzerinde karıştırılarak homojen bir karışım elde edildi. Bu homojen karışım içerisine 5 mL (2 mg/25mL) enzim çözeltisini ilave edildikten sonra petri kabına döküldü. 1mL TEMED ilave edildi. Polimerizasyon gerçekleştirildikten sonra küp (5x5x5) mm boyutunda kesildi.. İmmobilize enzim kullanılmak üzere buzdolabında 4⁰C saklandı.

2.3. Enzimin Aktiflik Tayini

2.3.1. Serbest PPO enziminin aktiflik tayini

Rokadan izole edilen enzim miktarı sabit tutularak pH 5,0 fosfat tamponu varlığında 1 mM ,3 mM ,5mM,7mM,10mM,13 mM ve 15 mM olmak üzere farklı 4-metil katekol, katekol, pyrogallol, gallik asit, guaiacol substratı konsantrasyonlarında oluşturulan çözelti UV spektrofotmetre yardımıyla 420 nm dalga boyunda 60 saniye boyunca absorbansı okundu.

2.3.2. İmmobilize PPO enziminin aktiflik tayini

Serbest enzim çalışmalarında ki kullanılan enzim konsantrasyonuna denk gelecek şekilde oluşan Ca-aljinat, Ba-aljinat, poliakrilamit ve poliakrilamit-aljinatla immobilize edilmiş enzim alınarak pH: 5,0 tamponu ile birlikte 4-metil katekol substratına karşı her bir farklı immobilize enzimin aktiflik tayini yapıldı.

2.3.3. Serbest PPO enziminin aktifliğine sıcaklığın etkisi

Serbest PPO enziminin aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla çeşitli sıcaklıklarda optimum pH yani pH: 5,0 ortamında substrat ve enzim konsantrasyonları sabit tutularak 9 farklı sıcaklıkta (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 ve 80°C) aktivitesine bakılmıştır. Yüksek sıcaklıklar için su banyosu düşük sıcaklıklar için ise buz banyosu kullanılmıştır.

2.3.4. İmmobilize PPO enziminin aktifliğine sıcaklığın etkisi

Ca-aljinat, Ba-aljinat, poliakrilamit ve aljinat-poliakrilamit kullanılarak immobilize edilen PPO enziminin aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla çeşitli sıcaklıklarda optimum pH yani pH: 5,0 ortamında 4-metil katekol ve enzim konsantrasyonları sabit tutularak 9 farklı sıcaklıkta (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 ve 80°C) aktivitesine bakılmıştır. Yüksek sıcaklıklar için su banyosu düşük sıcaklıklar için ise buz banyosu kullanılmıştır.

2.3.5. Serbest PPO enziminin aktifliğine substrat derişiminin etkisi

Serbest PPO enziminin aktifliğine substrat derişiminin incelemek amacıyla enzim konsantrasyonu sabit tutularak optimum pH ve sıcaklıkta çeşitli derişimlerde (1– 15 mM) hazırlanan substrat çözeltileriyle aktiflikler tayin edildi.

2.3.6. İmmobilize PPO enziminin aktifliğine substrat derişiminin etkisi

Ca-aljinat, Ba-aljinat, poliakrilamit ve aljinat-poliakrilamit kullanılarak immobilize edilen PPO enziminin aktifliğine 4-metil katekol derişiminin etkisini incelemek amacıyla çeşitli derişimler de (1-50mM) hazırlanan substrat çözeltileriyle aktiflikler tayin edildi.

2.3.7. Serbest enzim kinetiği

Rokadan izole edilen enzim pyrogallol 4-metil katekol, katekol ,guaicol, gallik asit gibi 5 farklı substrata karşı 1-50 mM arasında ki farklı konsantrasyonlara karşı Lineweaver-Burk grafikleri çizildi.

2.3.8. İmmobilize enzim kinetiği

Ca-aljinat, Ba-aljinat, poliakrilamit ve poliakrilamit-aljinat immobilize edilen enzimin ayrı ayrı 4-metil katekol substratına karşı 1-15 mM farklı konsantrasyonlarda kinetik çalışmaları yapılmış ve Lineweaver-Burk grafiği çizilmiştir.

2.3.9. Serbest PPO enziminin depolanma kararlılığı

Serbest PPO enzimini depolanma kararlılığını incelemek amacı ile optimum pH'da (pH:5,0) hazırlanan enzim çözeltisi oda koşullarında ve 4°C de saklandı. Belirli aralıklarda enzim çözeltisinden alınan örneklerle aktiflikler tayin edildi.

2.3.10. İmmobilize PPO enziminin depolanma kararlılığı

Ca-aljinat, Ba-aljinat, poliakrilamit ve poliakrilamit-aljinat kullanılarak immobilize edilen PPO enzimi depolanma kararlılığını incelemek amacıyla buzdolabında 4°C de saklanan ve oda koşullarında saklanan kürelerden belirli aralıklarla alınan örnekler kullanılarak aktiflikler tayin edildi.

2.4. Termal İnaktivasyon

2.4.1. Serbest PPO enziminin termal inaktivasyonu

Serbest tirozinazın termal inaktivasyonunu incelemek amacı ile farklı sıcaklıklarda ve farklı zaman aralıklarında (45 - 65 0C ve 10; 30; 60 dakika) inkübe edilen enzim çözeltilerinin aktiflikleri Kısım 4.7.1 'de belirtilen yöntemle aktiflikler tayin edildi.

2.4.2. İmmobilize PPO enziminin termal inaktivasyonu

Ca-aljinat, Ba-aljinat, poliakrilamit ve poliakrilamit-aljinat kullanılarak immobilize edilen PPO enziminin termal inaktivasyonunu incelemek amacı ile farklı sıcaklıklarda ve farklı zaman aralıklarında (45 - 65°C ve 10, 30, 60 dakika) inkübe edilen enzim çözeltilerinin aktiflikleri tayin edildi.

2.4.3. İmmobilize PPO enzim tekrar kullanım sayısı

Ca-aljinat, Ba-aljinat, poliakrilamit ve poliakrilamit-aljinat kullanılarak immobilize edilen PPO enziminin tekrar kullanım sayısını ölçmek amacı ile immobilize edilen enzimin 1-12 kez tekrarlanarak aktiflikleri tayin edildi.

BÖLÜM 3. DENEYSEL SONUÇLAR VE BULGULAR

3.1. Polifenol Oksidaz (PPO) Enziminin İzolasyonu ve Karakterizasyonu

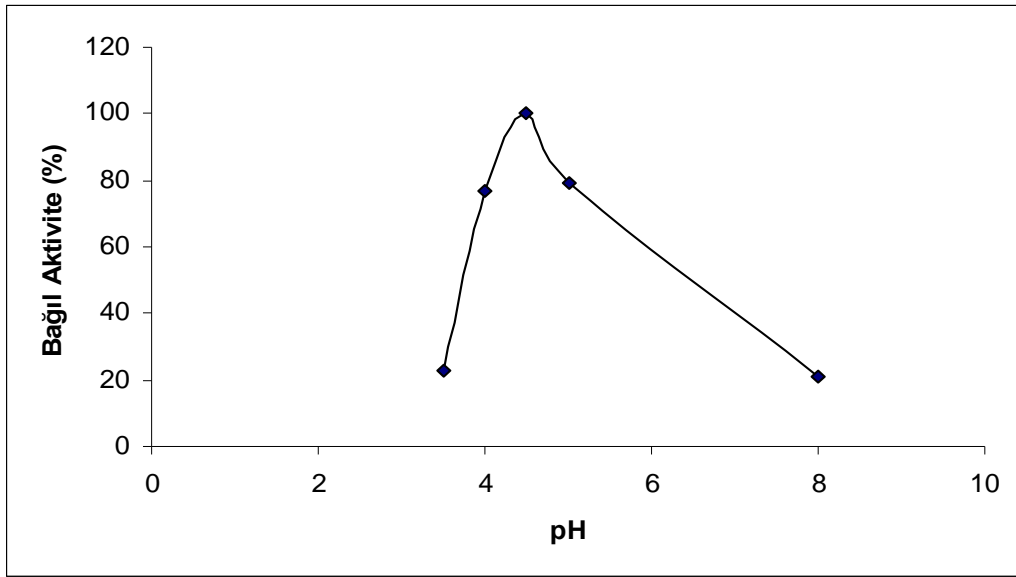
% 0,5 pirolidon (PVP) ve 0,01 M askorbik asit içeren 0,1 M fosfat tamponu (pH 7,0) kullanılarak PPO enzimi izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolasyon aşamasında kullanılan PVP, rokada bulunan fenolik maddeleri bağlamak ve PPO enziminin aktivite göstermesini engellemek amacıyla kullanılmıştır. Çünkü fenolik maddelerin oksidasyonu sonucu oluşan kinonlar, enzim aktivitesini durdurabilmektedir. İzolasyon esnasında o-kinonları azaltmak için askorbik asit kullanılmıştır. Bu kullanım sonucunda askorbik asit kendini yükseltmiştir.

PPO enzimi 5 farklı substrat kullanılarak (4-metil katekol, katekol, gallik asit, pyrogallol ve L-tirozin) spesifikliğı gözlemlenmiştir..

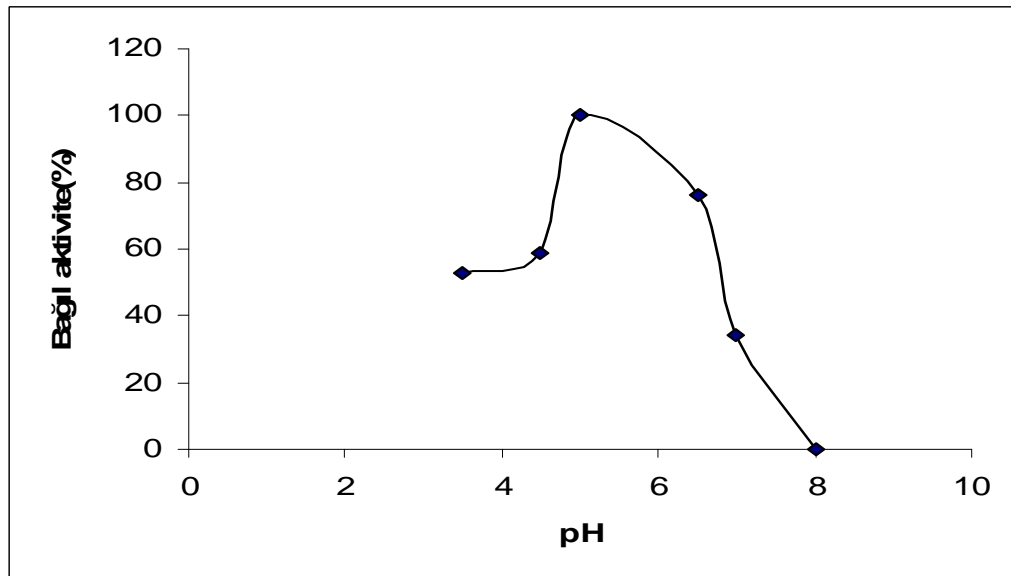
3.1.1. pH etkisi

PPO enzimi aktivitesi 3 ile 9,5 arasında değışen pH'larda hazırlanmış tamponlar ile her bir substrat için (4-metil katekol, katekol, gallik asit, pyrogallol ve L-tirozin) optimum pH'sı tayin edilmiştir. Enzim aktivite tayinleri spektrofotometrik yöntemle (UV cihazında) 60 sn süresince 420 nm absorbans artışları izlenerek gerçekleştirilmiştir.

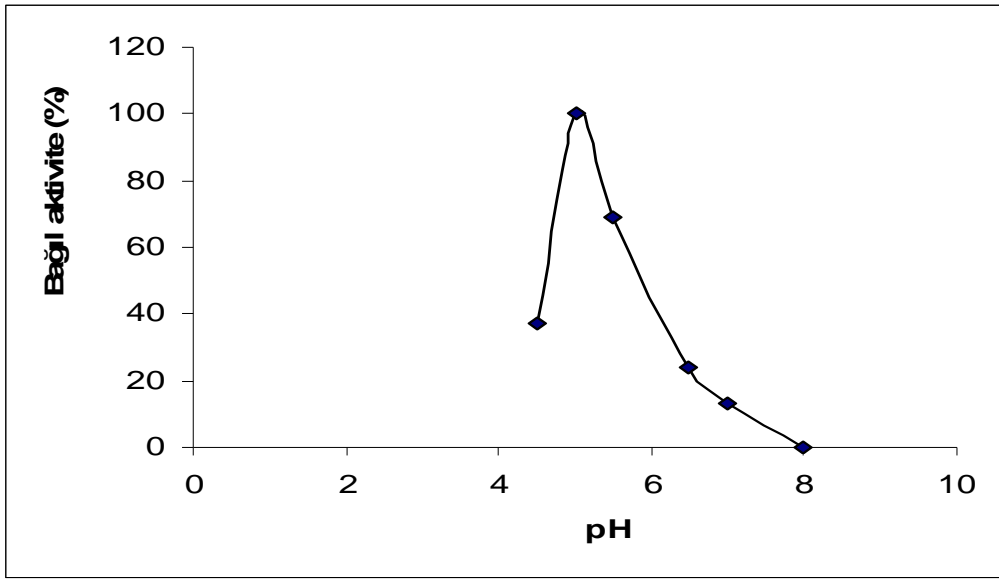
Farklı pH değıerlerinde hazırlanan fosfat tamponunun, bitkilerdeki PPO enziminin aktivitesine etkisi aşağıdaki grafiklerde ifade edilmiştir.



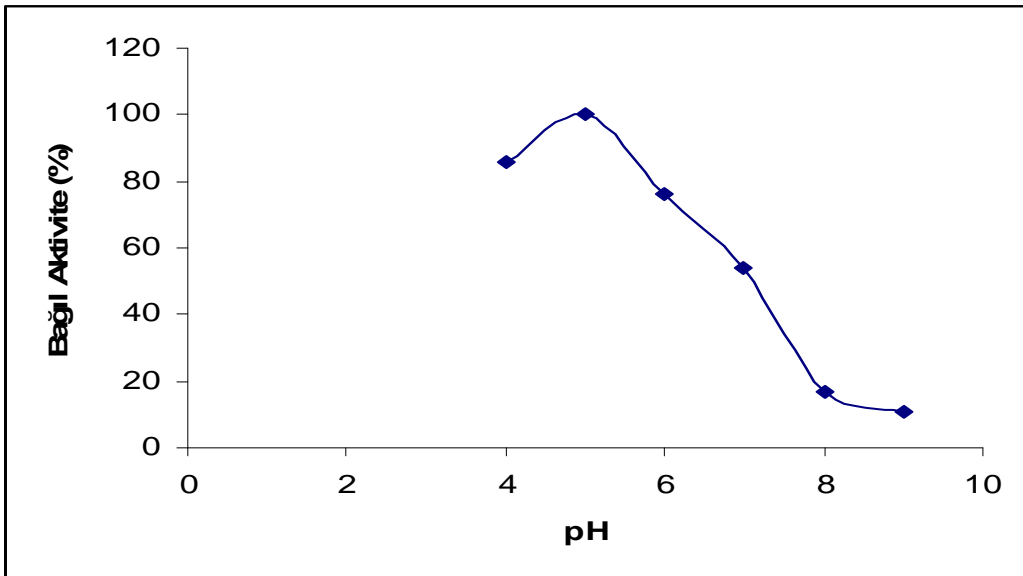
Şekil 3.1. katekol substratına karşı PPOnun optimum pH grafiği



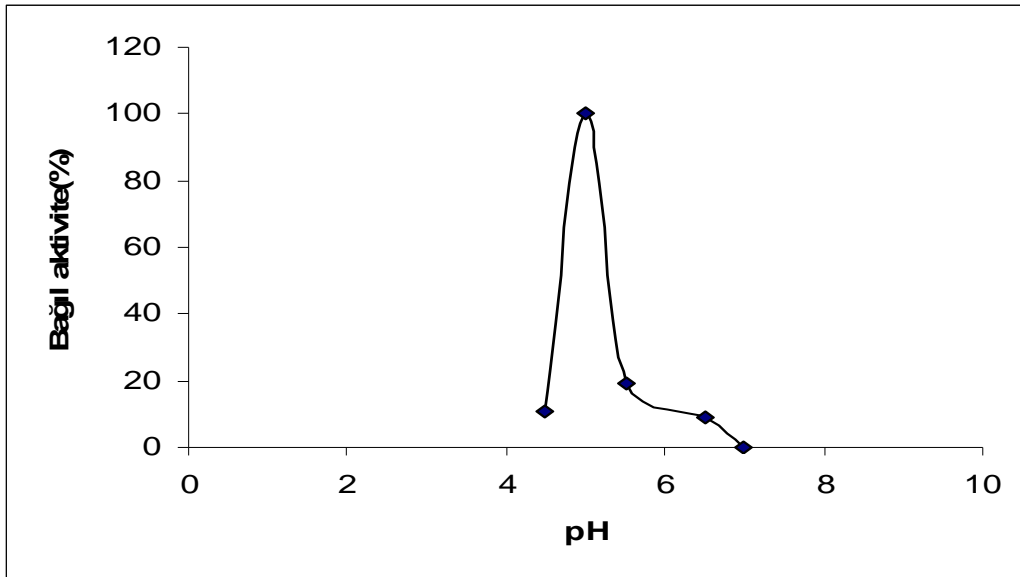
Şekil 3.2. 4-metil katekol substratına karşı optimum pH



Şekil 3.3. gallik asit substratına karşı optimum pH



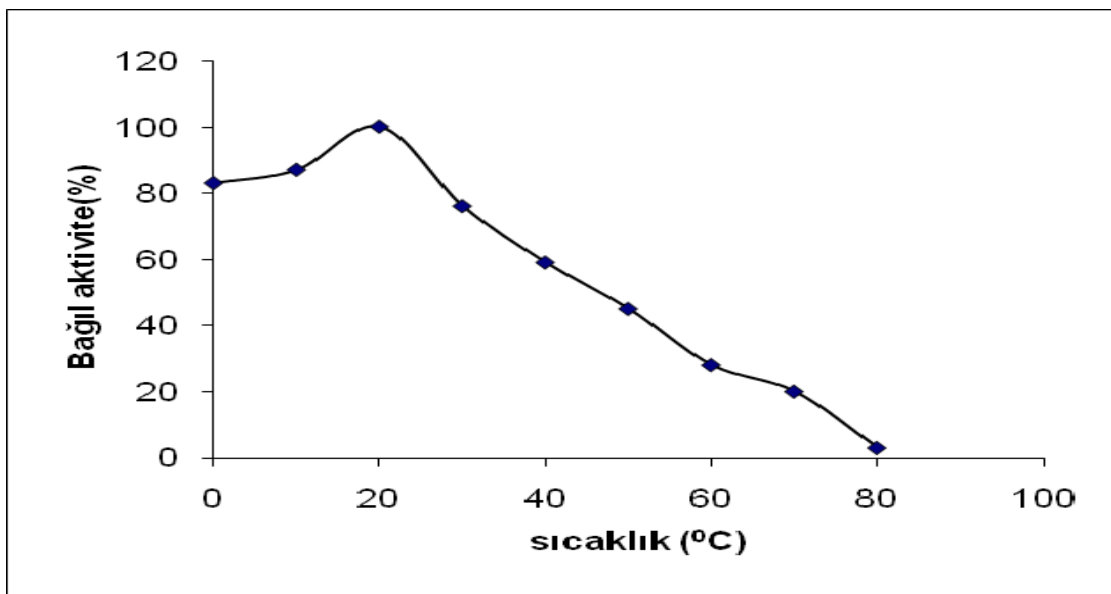
Şekil 3.4. L-tirozin substratına karşı optimum pH



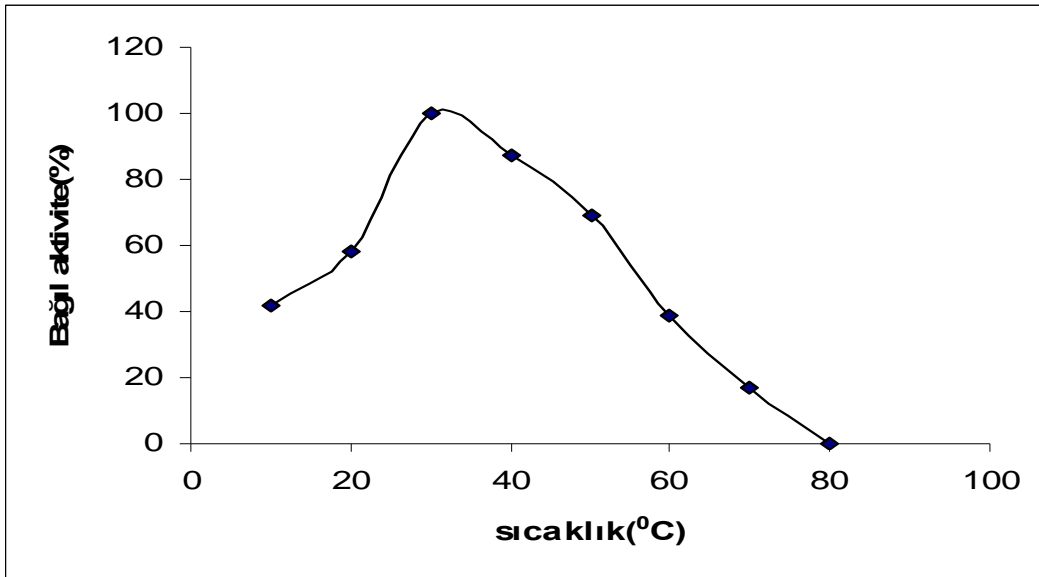
Şekil 3.5. pyrogallol substratına karşı optimum pH

3.1.2. Sıcaklığın etkisi

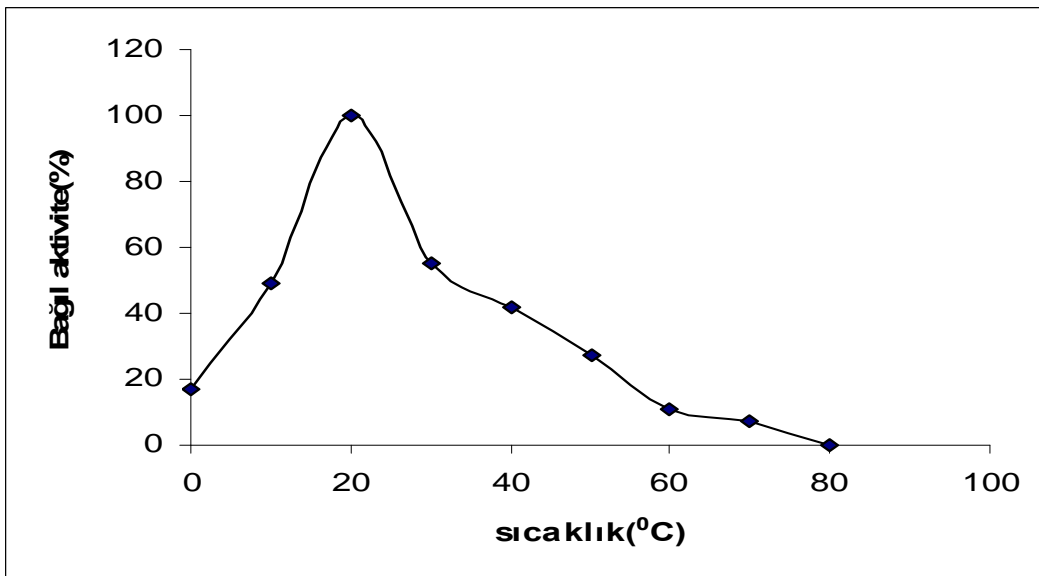
PPO enziminin optimum sıcaklığını bulabilmek için 5 farklı substrata karşı enzim aktivitesinin 7 farklı sıcaklıkta absorbans değerleri okunarak aktivitelere bakılmıştır. Deneylerden elde edilen sonuçlar sıcaklığa karşı yüzde bağıl aktivite cinsinden grafiğe alınmıştır.



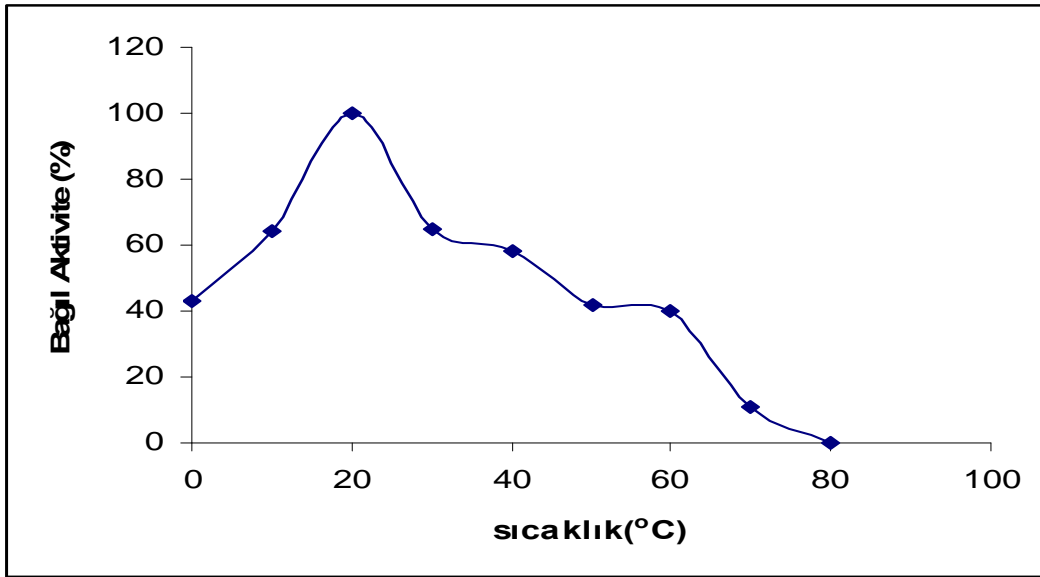
Şekil 3.6. Sıcaklığın roka bitkisindeki PPO enzimi aktivitesine 4-metil katekol varlığındaki etkisi



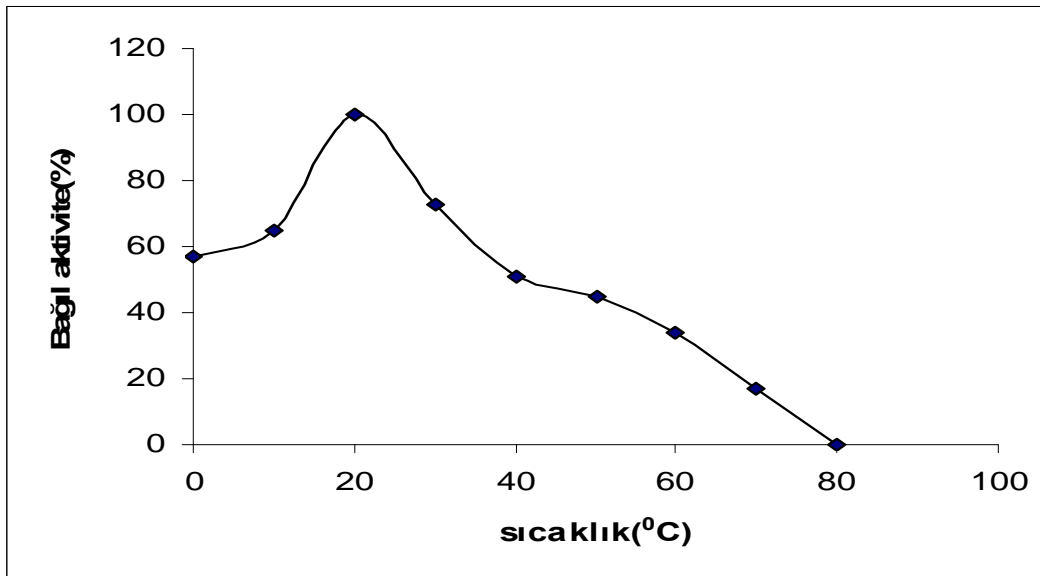
Şekil 3.7. Sıcaklığın roka bitkisindeki PPO enzim aktivitesine katekol substratı varlığındaki etkisi.



Şekil 3.8. Sıcaklığın roka bitkisindeki PPO enzim aktivitesine gallik asit substratı varlığındaki etkisi.



Şekil 3.9. Sıcaklığın roka bitkisindeki PPO enzim aktivitesine L-tirozin substratı varlığındaki etkisi



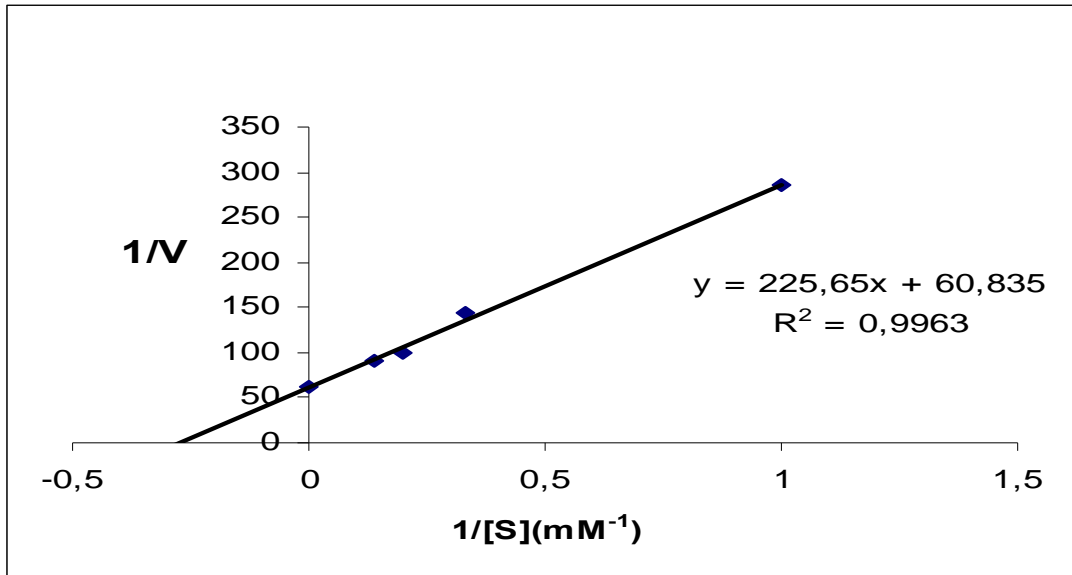
Şekil 3.10. Sıcaklığın roka bitkisindeki PPO enzim aktivitesine pyrogallol substratı varlığındaki etkisi

3.2. Enzim Kinetiği

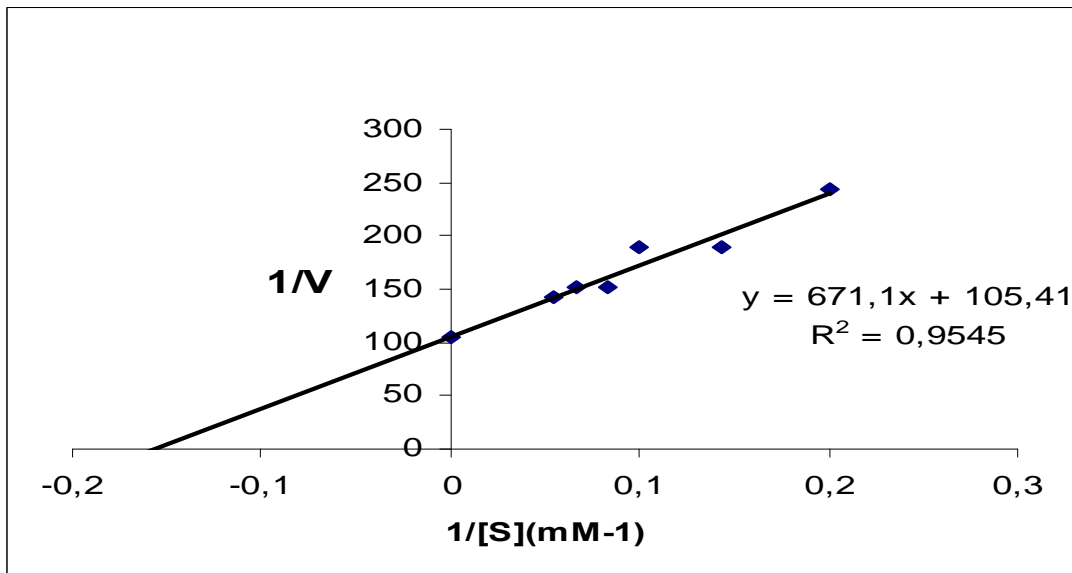
3.2.1. Serbest enzim çalışmaları

Kinetik çalışmalar 4-metil katekol, katekol, galik asit, pyrogallol, L-tirozin substratları için yapılmıştır. Her bir substrat için farklı konsantrasyonlar kullanılmıştır.

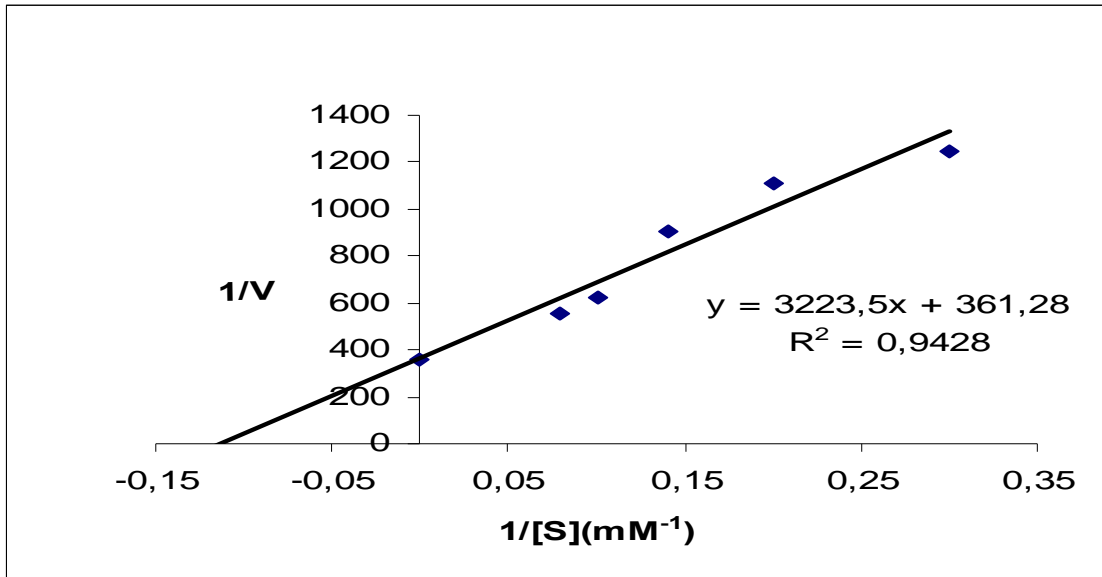
Her işlem en az üç kez tekrarlanmıştır. Optimum aktivite ölçümleri yapılmış olup Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir. Bu grafiklerden elde edilen denklemlerden yararlanılarak her bir substrat için ayrı ayrı V_{max} ve K_m değerleri hesaplanmıştır.



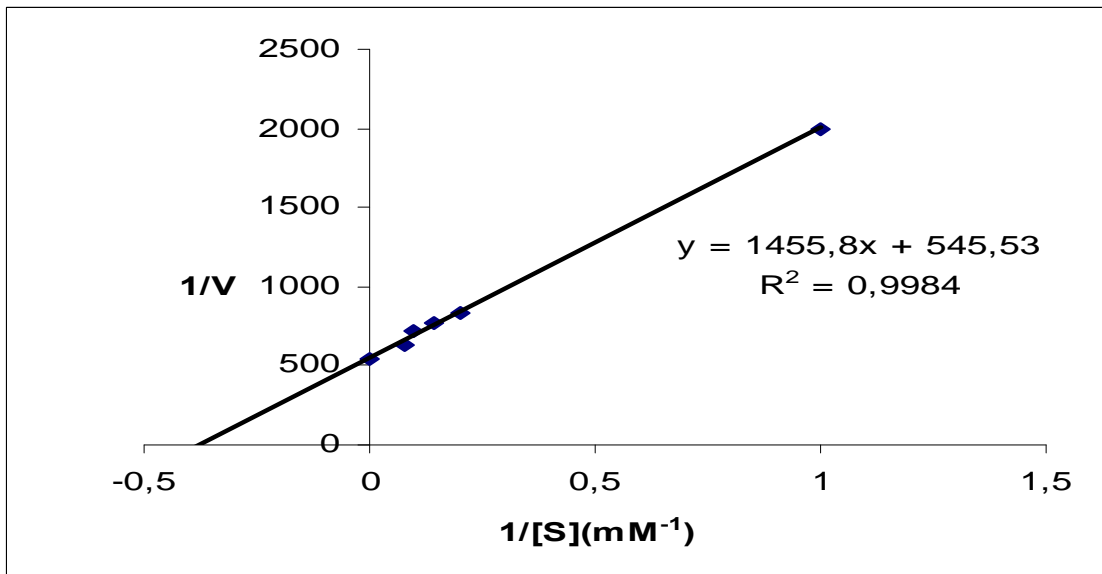
Şekil 3.11. Roka bitkisinde PPO enziminin 4-metil katekol substratına karşı Lineweaver-Burk grafiği.



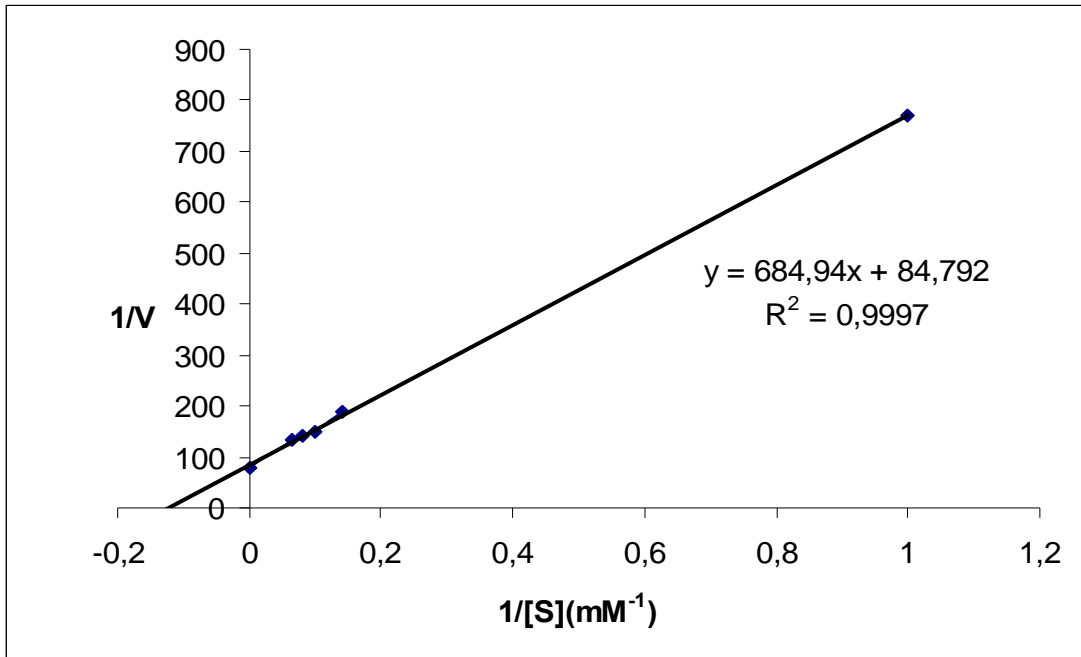
Şekil 3.12. Roka bitkisinden izole edilmiş PPO enziminin katekol substratına karşı Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 3..13. Roka bitkisinden izole edilmiş PPO enziminin gallik asit substratına karşı Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 3.14. Roka bitkisinden izole edilmiş PPO enziminin pyrogallol substratına karşı Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 3.15. Roka bitkisinden izole edilmiş PPO enziminin L-tirozin substratına karşı Lineweaver-Burk grafiği

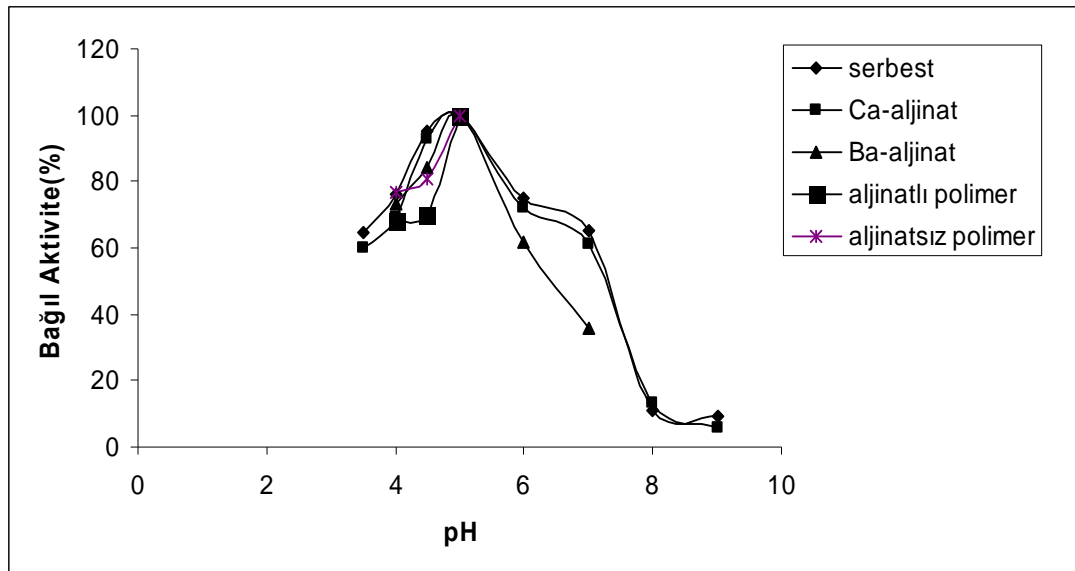
Tablo 3.1.PPO enziminin bitki kaynağı ve bazı substratlara karşı spesifikliğı

Bitki kaynağı Roka	V_{\max} (EÜ/dak)	K_m (mM)	Optimum Ph	Optimum sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)
katekol	$9,17 \times 10^{-3}$	5,36	4,5	30
4-metyl katekol	$16,6 \times 10^{-3}$	3,68	5,0	20
L-tirozin	$12,6 \times 10^{-3}$	8,68	5,0	20
pyrogallol	$1,84 \times 10^{-3}$	4,66	5,0	20
gallik asit	$2,79 \times 10^{-3}$	8,92	5,0	20

3.2.2. Serbest ve immobilize PPO'nun aktifliğine pH'nın etkisi

Serbest ve Ca-aljinat poliakrilamid ve Ca-aljinat poliakrilamid ve poliakrilamid kullanılarak immobilize edilen PPO enzimine aktifliğine pH'nın etkisini incelemek amacıyla, çeşitli pH'lar da gerçekleştirilen reaksiyonlara ait maksimum aktiflik değerleri Şekil 5.1'de verilmiştir. Serbest Ca-aljinat ile immobilize edilen enzim için optimum pH 5 olarak bulunmuştur. Enzimler elektrolit karakterli oldukları için, enzim aktifliği pH ile değişme gösterir.

Çok asidik veya çok bazik ortamlarda enzim denatüre olacağından reaksiyon hızı tersinmez olarak azalır ve sıfıra kadar düşebilir. Şekilde de görüldüğü gibi immobilize PPO'nun aktifliğinin bazik bölgelere kaydığında oldukça azaldığı gözlenmiştir.



Şekil 3.16. PPO enzimi üzerine pH'nın etkisi

3.2. Serbest ve İmmobilize PPO Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi

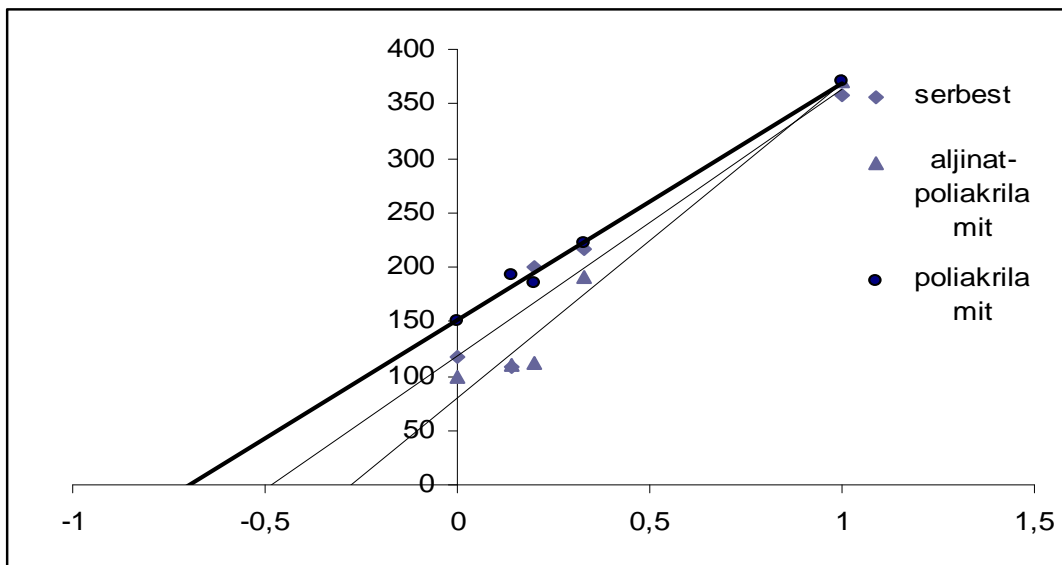
Serbest, Ca-aljinat kullanılarak immobilize edilen PPO'nun aktifliğine sıcaklığın (0–80 0C) etkisini incelemek amacıyla çeşitli sıcaklıklarda gerçekleştirilen reaksiyonlara

ait maksimum aktiflik değerleri Şekil 5.2’de verilmiştir. Serbest enzim için optimum sıcaklık 20°C iken immobilize enzim için 30°C olarak bulunmuştur.

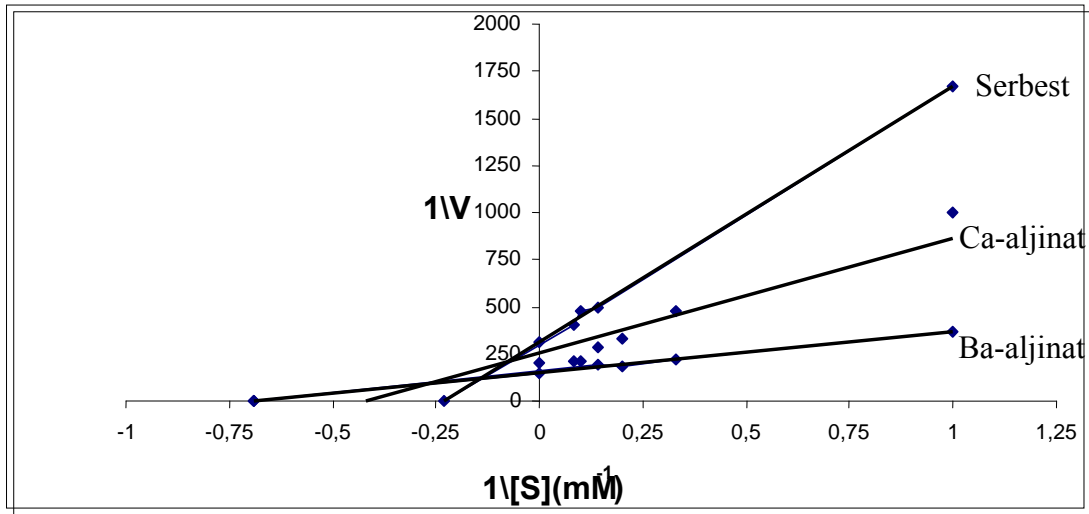
Sıcaklığın artmasıyla moleküllerin kinetik enerjilerinin arttığı ve böylece tüm kimyasal ve biyokimyasal reaksiyon hızlarının da arttığı bilinmektedir. Sıcaklığın 10 0C artmasıyla, reaksiyon hızlarında yaklaşık olarak iki kat artar. Biyokimyasal reaksiyonlarda da aynı durum gözlenmektedir. Serbest PPOnun üzerine yapılan çalışmalarda maksimum aktiflik 20 -30 oC, immobilize PPO için ise 30 -40 oC olarak bulunmuştur (1, 21, 23, 25).

3.3.1. Serbest, Ca-aljinat, Ba-aljinat, aljinat-poliakrilamid ve poliakrilamid kullanılarak immobilize edilen PPO enziminin kinetiği ve grafikleri

Rokadan izole edilen PPO enzimini 5 farklı substrata karşı uygun sıcaklık, pH ve kinetik çalışmaları yapılmış ve bu enzime en ilgili olan 4-metil katekol substratı olarak belirlenmiştir ve bundan sonraki immobilizasyon çalışmalarında sadece 4-metil katekol substrat olarak kullanılmıştır. Serbest, Ca-aljinat, Ba-aljinat, aljinat poliakrilamid ve poliakrilamid kullanılarak immobilize edilen PPO Enzimi farklı substrat konsantrasyonlarına karşı aktiviteleri okunarak Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir. Serbest PPO enzimi çalışmaları ile kıyaslanmıştır. Ayrıca grafikteki denklemlerden yararlanarak Vmax ve Km değerleri bulunmuştur.



Şekil 3.17. aljinat poliakrilamid, poliakrilamid yöntemi ile 4-metil katekol substratına karşı PPO enziminin Lineweaver-Burk grafiği



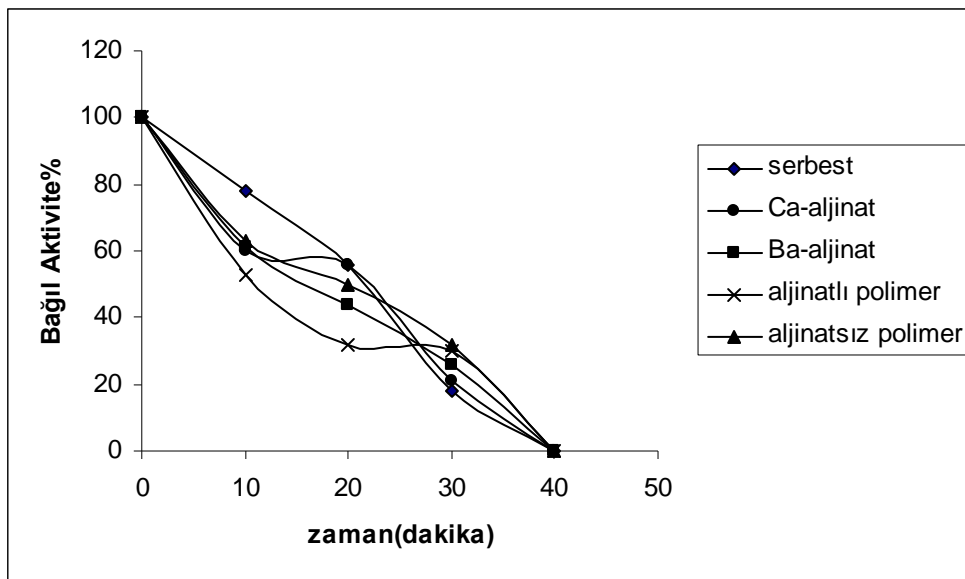
Şekil 3.18. serbest, Ca-aljinat, Ba-aljinat yöntemi ile 4-metil katekol substratına karşı PPO enziminin Lineweaver-Burk grafiği

Tablo 3.2. PPO enziminin 4-metil katekol substratına karşı spesifikliğı ile ilgili toplu bilgiler.

4-metilkatekol	V_{max} (EÜ/dak)	K_m (mM)	Optimum Ph	Optimum sıcaklık (°C)
serbest	$16,6 \times 10^{-3}$	3,68	5,0	20
Ca-aljinat	$3,2 \times 10^{-3}$	4,33	5,0	20
Ba-aljinat	4×10^{-3}	4,42	5,0	20
aljinatlı polimer	$10,1 \times 10^{-3}$	5,64	5,0	20
aljinarsız polimer	$9,2 \times 10^{-3}$	5,78	5,0	20

3.4. Serbest ve İmmobilize PPO'nun Termal Kararlılığı

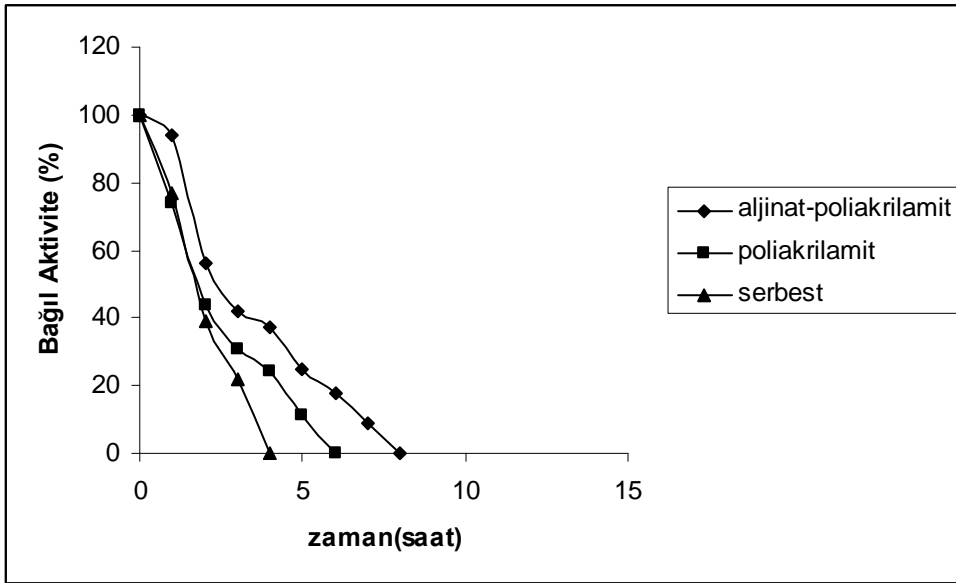
Serbest, Ca-aljinat, Ba-aljinat, aljinat-poliakrilamid, poliakrilamid kullanılarak immobilize edilen PPO enziminin maksimum aktifliğinin zamanla değişiminin etkisini incelemek amacıyla değişik sıcaklıklarda ve değişik zaman aralıklarında kullanılan enzim çözeltilerinin aktiflikleri tayin edilmiştir. Serbest PPO enziminin 45 °C 40 dakikada inkübe edildiğinde aktifliğini kaybettiği gözlenmiştir.



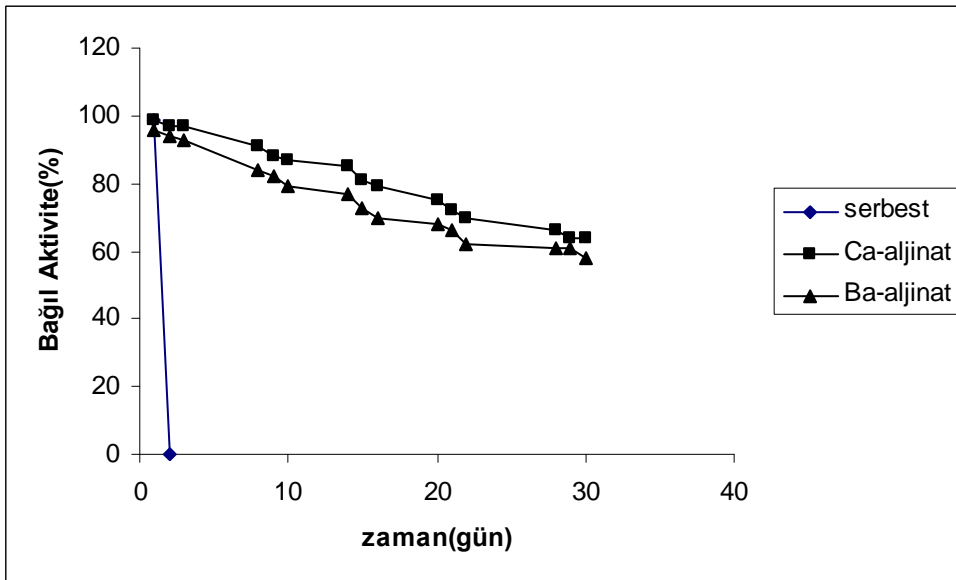
Şekil 3.19. Serbest ve immobilize PPO'nun maksimum aktifliğini zamanla değişimi

3.5. Serbest ve Poliakrilamid Kullanılarak İmmobilize Edilen PPO Enziminin Oda Koşullarında Aktifliğine Depolanma Süresinin Etkisi

Serbest, aljinat poliakrilamid, poliakrilamid, Ca-aljinat ve Ba-aljinat kullanılarak immobilize edilen PPO enziminin aktifliğine depolanma süresinin etkisini incelemek için çözeltiler oda koşullarında saklandı. Serbest enzim 4 saat sonra aktifliğini kaybederken, aljinat poliakrilamid 6 saat, poliakrilamid kullanılarak immobilize edilen PPO enziminin aktifliğini 8 saat sonra tamamen kaybettiği gözlemlenmiştir. Ca-aljinat ile immobilize edilen enzim 30 günün sonunda %64 Ba-aljinat ise %58 oranında aktifliğini koruduğu görülmüştür.



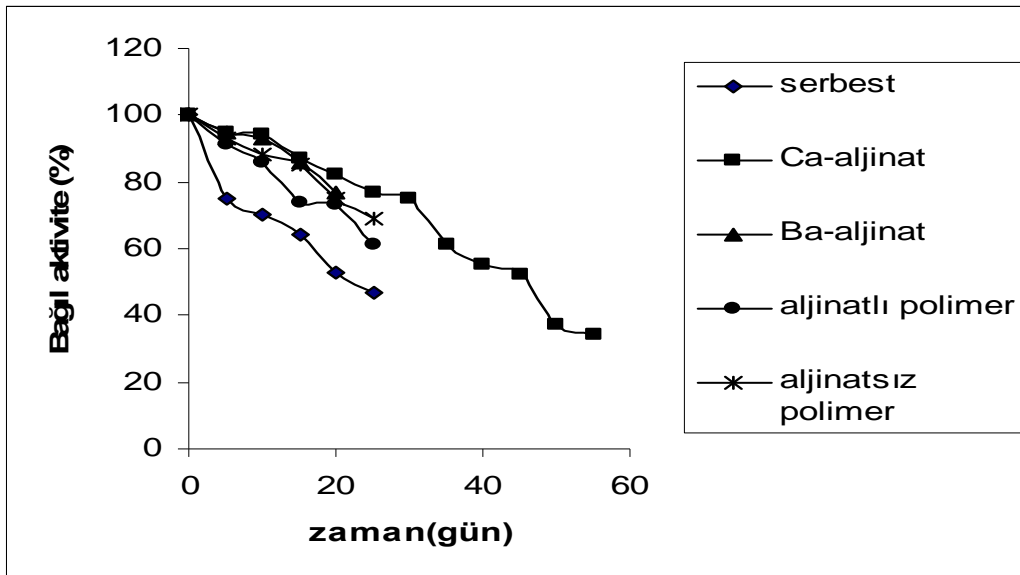
Şekil .3.20 Oda koşullarında serbest, aljinat poliakrilamid, poliakrilamid kullanılarak 4-metil katekol substratına karşı PPO enziminin gösterdiği depolanma kararlılığı



Şekil 3.21.Oda koşullarında serbest, Ca-aljinat, Ba-aljinat kullanılarak 4-metil katekol substratına karşı PPO enziminin gösterdiği depolanma kararlılığı

3.6. Serbest ve Poliakrilamid, Ca-aljinat Poliakrilamid ,Ca-aljinat ve Ba-aljinat Kullanılarak İmmobilize Edilen PPO Enziminin 4°C Koşullarında Aktifliğine Depolanma Kararlılığı

Serbest, poliakrilamid, aljinat poliakrilamid, Ca-aljinat ve Ba-aljinat kullanılarak immobilize edilen PPO enzimi 4 °C'de depolanarak her gün aktivitesi takip edilmiştir. 30 günün sonunda; serbest enzim aktifliğini % 42 korurken, Ca-aljinatlı %81, Ba-aljinatlı %83, aljinatlı polimer %60, aljinatsız polimer %64 oranında aktifliğini koruduğu gözlemlenmiştir.

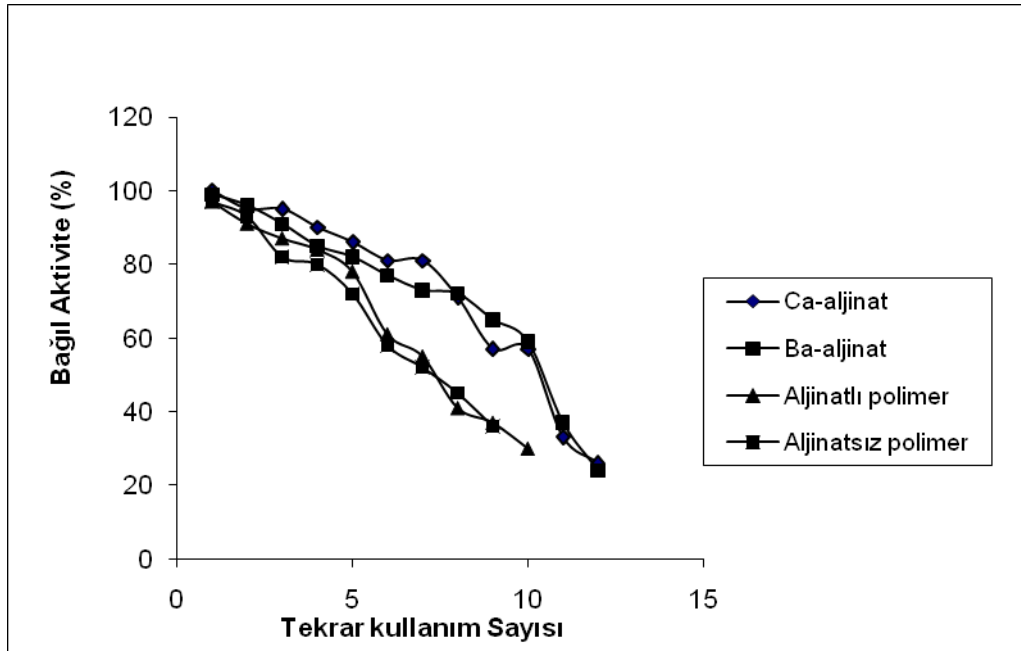


Şekil 3.22. Serbest ve Poliakrilamid, Ca-aljinat Poliakrilamid, Ca-aljinat ve Ba-aljinat Kullanılarak İmmobilize Edilen PPO Enziminin 4 °C Koşullarında Aktifliğine Depolanma Kararlılığı

3.7. Ca-aljinat, Ba-aljinat, Aljinatlı Polimer ve Aljinatsız Polimer ile İmmobilize Edilen Enzimin Tekrar Kullanılabilirliği

Ca-aljinat ve Ba-aljinat, aljinatlı poliakrilamid, poliakrilamid kullanılarak immobilize edilen PPO enziminin tekrar kullanım sayısını incelemek amacı aktiflikleri tayin edildi. Ca-aljinat için 3 kez kullanım sonunda %95, 7 kez kullanım sonunda %81, 12 kez kullanım sonunda ise yaklaşık %26, aktiflik gösterirken; Ba-aljinat için 3 kez kullanım sonunda %100, 7 kez kullanım sonunda %75, 12 kez kullanımın sonunda ise %24, aktiflik gösterdiği bulundu.

Aljinatlı poliakrilamit için 3 kez kullanım sonunda %87, 10 kez kullanım sonunda %30, aktiflik gösterdiği, poliakrilamit için ise 3 kez kullanım sonunda %97, 9 kez kullanım sonunda %36, aktiflik gösterdiği bulunmuştur.



Şekil 3.23. Ca-aljinat, Ba-aljinat, aljinat poliakrilamit, poliakrilamit kullanılarak immobilize edilen PPO enziminin tekrar kullanım sayısı

BÖLÜM 4. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Rokadan (*Eruca vesicaria*) PPO enzimi uygun şartlarda izole edilerek kinetik olarak optimum pH, sıcaklık ve substrat spesifikliği belirlenerek karakterize edilmiştir. Substratlardan 4-metilkatekol, pyrogallol, gallik asit, L-tirozin için optimum pH'ları 5,0 katekol için ise 4,5 olarak bulunmuştur. Yine.4-metil katekol pyrogallol, gallik asit, L-tirozin için enzimin optimum sıcaklığı 20 °C katekol için 30 °C olarak bulunmuştur. K_m değeri ise 4-metil katekol, katekol, pyrogallol, gallik asit, L-tirozin için sırasıyla 3,68, 5,36, 4,66, 8,92, 8,68 mM olarak bulunmuştur.

Endüstride PPO enziminin daha uzun ömürlü ve kararlı olması için çeşitli yöntemlerle farklı kaynaklardan elde edilen PPO enzimi immobilize edilmiştir. Bu çalışmada roka (*Eruca vesicaria*) bitkisinden karakterize edilen PPO enzimi Ca-aljinat, Ba-aljinat, poliakrilamit ve poliakrilamit-aljinat kullanılarak hapsedme yöntemi ile başarıyla immobilize edilmiştir.

Serbest PPO ve dört farklı şekilde immobilize edilen PPO enziminin optimum pH değeri 5.0 olarak bulunurken, optimum sıcaklık değerleri serbest, Ba-aljinat ve polimerize edilmiş PPO için 20°C iken Ca-aljinat ile immobilize edilmiş enzimin optimum sıcaklık değeri 30 °C olarak bulundu.

+4 °C de Serbest enzim, Ca-aljinat, Ba-aljinat, aljinatlı poliakrilamit ve poliakrilamit ile immobilize edilen PPO enzim depolandığında 30 gün sonunda serbest enzimin aktifliğinin %42 oranında, Ca-aljinat ve Ba-aljinatla immobilize PPO enzimin aktifliğini % 81 ve % 83 oranında, aljinatlı poliakrilamit ve poliakrilamit ile immobilize edilen PPO enzimin ise %60 ve %64 oranında aktifliğini koruduğu gözlemlenmiştir.

Oda koşullarında Serbest enzim, Ca-aljinat, Ba-aljinat, aljinatlı poliakrilamit ve poliakrilamit ile immobilize edilen PPO enzimi depolandığında 30 gün sonunda; serbest enzim aktifliğini % 42 korurken, Ca-aljinatlı %64, Ba-aljinatlı %58 oranında aktifliklerini korudukları gözlemlenmiştir. Aljinatlı polimer ve aljinatsız polimerile immobilize edilen enzim ise gün içinde Aljinatlı polimer 6 saat sonunda, aljinatsız polimer ise 8 saat sonra aktivitelerini kaybettiği gözlemlenmiştir.

Serbest enzim Ca-aljinatlı ve polimerize edilmiş enzim 45 °C de 40 dakika inkübe edildiğinde aktivitelerini yitirdikleri gözlemlendi.

Tekrar kullanım ölçümünde Ca-aljinatlı, Ba-aljinat ve poliakrilamit ve aljinat poliakrilamit ile immobilize edilen PPO enziminin Ca-aljinat ve Ba-aljinat, aljinatlı poliakrilamit, poliakrilamit kullanılarak immobilize edilen PPO enziminin, Ca-aljinat için 3 kez kullanım sonunda %95,7 kez kullanım sonunda %81, 12 kez kullanım sonunda ise yaklaşık %26, aktiflik gösterirken; Ba-aljinat için 3 kez kullanım sonunda %100, 7 kez kullanım sonunda %75,12 kez kullanımın sonunda ise %24, aktiflik gösterdiği bulundu. Aljinatlı poliakrilamit için 3 kez kullanım sonunda %87,10 kez kullanım sonunda %30, aktiflik gösterdiği, poliakrilamit için ise 3 kez kullanım sonunda %97, 9 kez kullanım sonunda %36, aktiflik gösterdiği gözlemlenmiştir.

Böylece PPO enzimi ilk defa roka bitkisinden izole edilerek Ca-aljinat, Ba-aljinat, poliakrilamit ve aljinat-poliakrilamit kullanılarak hapsedme yöntemi ile ilk defa immobilize edilerek karakterize edilmiştir. Çalışmalarımızın endüstriyel kullanım amaçlı olarak immobilize enzim uygulamalarına yeni bir kaynak sağlandığı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] ÖNEZ, Z., " Üzümden (*vitis vinifera l.*) izole edilen polifenol oksidaz enziminin özelliklerinin belirlenmesi", Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara 2006.
- [2] ZİYAN, E., "Polifenol oksidaz enziminin Ankara armudu (*pyrus communis*)'ndan izole edilmesi, saflaştırılması ve kinetik özelliklerinin incelenmesi" ,Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Ankara, 1998.
- [3] YENSON, M., "İnsan biyokimyası", İstanbul Üniversitesi Tıp Anabilim dalı, Kırklareli, 1984.
- [4] PAMUK, F., "Biyokimya", Gazi Kitapevi, Ankara, 2000.
- [5] ÖZATA, A., KUTLU, M., "Enzimoloji ders notları" T.C. Anadolu Üniversitesi Yayınları No:1254, Fen Fakültesi Yayınları No:15, Eskişehir,2000.
- [6] ERDEN İNAL., M. " Biyokimya", T.C. Anadolu Üniversitesi Yayınları No:489, Açıköğretim Fakültesi Yayınları No: 218,Eskişehir, Eylül, 1996.
- [7] www.mustafaaltinisik.org.uk, (5.5.2010)
- [8] ÖZTAN, D., "Tirozinaz enziminin ekstraksiyonu saflaştırılması ve fenollerin giderilmesinde kullanılması", Yüksak Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Temmuz, 2007.
- [9] SAÇAK. M., "Kimyasal kinetik" Ankara Üniversitesi, Kimya Bölümü, Gazi Kitapevi, Ankara, 2002.
- [10] URUÇ, H., " Katalaz enziminin (E.C.1.11.1.6) montmorillonit analsim kili üzerine immobilizasyonu ve kinetiğinin incelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Van, 2007.
- [11] ERKAYA., E. ÇAYLIKOCA, B, A., KALİNYAPRAK, F., "Enzimatik kataliz" Selçuk Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü, Konya, 2006.
- [12] MARANGONI., A, G. "Enzyme kinetics a modern approach", Department of Food Science University of Guelph, 2003.

- [13] BAO, HAIHONG., "Biocatalysis of tyrosinase in organic solvent media using phenolic substrate models" A Thesis submitted to the Faculty of Graduate Studies and Research in partial fulfillment of the requirements of the degree of Master of Science, Department of Food Science and Agricultural Chemistry, McGill University Montreal, Quebec, Canada, Mayıs, 1999.
- [14] KIRALP, S., " Synthesis of conducting block copolymers and their use in the immobilization of invertase and polyphenol oxidase enzyme", A thesis submitted to the graduate school of natural and applied sciences of the middle east technical university, in partial fulfillment of the requirements for the degree of doctor of philosophy in the department of chemistry, Mayıs, 2004.
- [15] CRUMIERE, F., " Inhibition of enzymatic browning in food products using bio-ingredient", A thesis submitted to the Faculty of Graduate Studies and Research in partial fulfillment of the requirements of the degree of Master of Science, Department of Food Science and Agricultural Chemistry McGill University Montreal, Québec, Eylül, 2000.
- [16] ASTARCI, E., "Production and biochemical characterization of polyphenol oxidase from thermomyces lanuginosus", A thesis submitted to the graduate school of natural and applied sciences of the middle east technical university, in partial fulfillment of the requirements for the degree of master of science in the department of biotechnology, Haziran, 2003.
- [17] DEMİR, Ö., " Muşmula (mespilus germanica l.) meyvelerinin olgunlaşması sırasındaki polifenol oksidazın karakterizasyonu" ,Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Trabzon, Ağustos, 2006.
- [18] MADANI, W., "Characterization of a polyphenol esterase from aspergillus niger and its role in the Inhibition of tyrosinase", a thesis submitted to the faculty of graduate studies and research in partial fulfillment of the requirements of the degree of doctor of philosophy, Department of Food Science & Agricultural Chemistry McGill University Montreal, Canada, Mayıs, 2000.
- [19] MARSHALL, M, R., KİM, J., WEI, C-I., " Enzymatic browning in fruits, Vegetables and Seafoods", 2000.
- [20] JUKANTI, A, K., " Molecular and biochemical characterization of wheat (triticum aestivum. l) polyphenol oxidases (ppos)", A dissertation submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Plant Sciences, Montana State University Bozeman, Montana, Ocak, 2005.

- [21] SAĞIROĞLU, A., YAĞAR, H., " Partially purification and characterization of polyphenol oxidase of quince" Turk J Chem, 26 (2002), 97 -103., Edirne, 2000.
- [22] DOĞAN, M., DOĞAN, S., " Determination of kinetic properties of polyphenol oxidase from thymus (thymus longicaulis subsp. chaubardii var. chaubardii)" Food Chemistry 88 (2004) 69–77, Balıkesir, 2003.
- [23] CEMEROĞLU, B., YEMENİCİOĞLU, A., " Hale haven şeftalilerinde polifenol oksidaz enzimlerinin bazı nitelikleri" Tr. J. of Agriculture and Forestry, 22 (1998) 261–265, Ankara, 1996.
- [25] KUFREVİOĞLU, İ., ŞAKİROĞLU, H., ERAT, M., "Purification and characterization of polyphenol oxidase from Ferula sp.", Food Chemistry 95 (2006) 503–508, Erzurum, 2005.
- [26] ARSLAN, O., ERZENGİN, M., SİNAN, S., ÖZENSOY, Ö., "Purification of mulberry (Morus alba L) polyphenol oxidase by affinity chromatography and investigation of its kinetic and electrophoretic properties", Food Chemistry, Balıkesir , 2004.
- [27] PEKYARDIMCI,Ş. ZİYAN, E., "Characterization of Polyphenol Oxidase from Jerusalem Artichoke (Helianthus tuberosus)", Turk J Chem, 27 (2003) , 217 .225., Ankara, 2001.
- [28] www.food-info.net/, (12.5.2010)
- [29] ÖZEN, A., COLAK, A., DİNÇER, B., GÜNER, S., AYAZ, A., " Diphenolases from two cultivars of cherry laurel (Laurocerasus officinalis Roem.) fruits at an early stage of maturation", Food Chemistry 90 (2005) 801–807, Trabzon.
- [30] ÜNAL, M. Ü., " Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (Musa cavendishii)" Food Chemistry 100 (2007) 909–913, Adana, 2005.
- [31] AYDEMİR, T., KAVRAYAN, D., ÇINAR, S., "Isolation and characterisation of polyphenoloxidase from jerusalem artichoke (Helianthus tuberosus)", S.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi, Sayı 21 (2003) 115-125, Konya.
- [32] ÖZÇELİK, D., "Mantardan (agaricus bisporus) tirozinaz enziminin izole edilmesi ve fenol giderilmesinde kullanılması", Yüksek Lisans Tezi, GAZİ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Ankara, 2005.
- [33] <http://www.forumacil.com/sifali-bitkiler-sozlugu/195184-rokanin-sagliga-yararlari-rokanin-faydasi-nedir-roka-nelere-iyi-gelir.html> (2.7.2010)

- [35] YAŞ, A., “Aljinat jel boncukları ve poli(akrilamit-ko-akrilik asit) hidrojellerle tirozinaz enziminin binari yöntemi ile immobilizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi GAZİ Üniversitesi Ankara 2005.
- [36] KÖKLÜKAYA, S., “Poli(akrilamit-krotonik asit)/sodyum aljinat, poli(akrilamit-krotonik asit)/K-karragenan, poli(akrilamit-sitrakonik asit)/K-karragenan hidrojellerinde lakkaz immobilizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, GAZİ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Ankara 2008.
- [37] KARACA, K., “Poli(N,N-dimetil akrilamit-ko-akrilamit) poli(N-izopropilakrilamit-ko-akrilamit)/k-karragenan polimerleri kullanılarak lipaz enziminin immobilizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Ankara 2006.
- [38] GÖKÖZ, M., “lakkazın poliakrilamit ve poliakrilamit K-karragenan jellerine immobilizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, KIRIKKALE Üniversitesi 2006.
- [39] TUNÇ, G., ”Poli(metilmetakrilat-ko-glisidilmetakrilat) hidrojeli kullanılarak B-galaktosidazın kovalent bağlanma ile immobilizasyonu” Yüksek Lisans Tezi GAZİ Üniversitesi Ankara 2006.
- [40] <http://www.turkcebilgi.com/roka/ansiklopedi>
<http://www.gozdekadinlar.com/roka-hakkinda-kucuk-bir-tuyo.html>
[http://www.hakkinda-bilgi-nedir.com/sifali-bitkiler-roka-faydolari-nedir+sifali-bitkiler-roka-faydolari-hakkinda-bilgi\(16.6.2010\)](http://www.hakkinda-bilgi-nedir.com/sifali-bitkiler-roka-faydolari-nedir+sifali-bitkiler-roka-faydolari-hakkinda-bilgi(16.6.2010))

ÖZGEÇMİŞ

Hüseyin KÖSE, 08.01.1984'de Adapazarı'nda doğdu. İlk ve ortaöğretimini Sakarya'nın Kaynarca ilçesinde tamamladı. 2001 yılında Erzurum Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü kazandı. 2005 yılında aynı fakültenin kimya bölümünden kimyager olarak mezun oldu. 2007 yılında ise Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı.