

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**EFLATUN ÇİÇEKLİ BALLIBABA (*LAMIUM PURPUREUM*)
BİTKİSİNDEN POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN
KARAKTERİZASYON VE İMMOBİLİZASYONUNUN
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Elif CERRAHOĞLU

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA
Enstitü Bilim Dalı : BİYOKİMYA
Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Gülnur ARABACI

Nisan 2014

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

EFLATUN ÇİÇEKLİ BALLIBABA (*LAMIUM PURPUREUM*)
BİTKİSİNDEN POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN
KARAKTERİZASYON VE İMMOBİLİZASYONUNUN
İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Elif CERRAHOĞLU

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Enstitü Bilim Dalı : BİYOKİMYA

Bu tez 17/04/14 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Yrd.Doç.Dr. Gülnur ARABACI
Jüri Başkanı

Yrd.Doç.Dr. Özge DEMİRKOL
Üye

Yrd.Doç.Dr. Kudret YILDIRIM
Üye

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım süresince bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Gülnur ARABACI' ya, lisans ve yüksek lisans dönemim boyunca bana yardımcı olan değerli öğretim üyelerine ve çalışmalarımda yol gösteren Araştırma Görevlisi Esmâ Hande ALICI' ya teşekkür ederim.

Hayatım boyunca hiçbir fedakârlıktan kaçınmadan beni destekleyen aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
TABLolar LİSTESİ	xii
ÖZET	xiv
SUMMARY	xiv

BÖLÜM 1.

GİRİŞ.....	1
1.1. Polifenol Oksidaz Enzimiyle Daha Önce Yapılan Çalışmalar	2
1.2. Çalışmanın Amacı	8

BÖLÜM 2.

ENZİMLER.....	9
2.1. Enzimler Hakkında Genel Bilgi	9
2.1.1. Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması.....	10
2.1.2. Enzimlerin spesifikliği	11
2.1.3. Enzimlerin kofaktörleri	11
2.1.4. Enzim aktivitesine etki eden faktörler	12
2.1.4.1. pH.....	12
2.1.4.2. Sıcaklık.....	13
2.1.4.3. Enzim konsantrasyonu	13
2.1.4.4. Substrat konsantrasyonu.....	13
2.1.4.5. Zaman.....	13
2.1.4.6. İyonik şiddet.....	14
2.1.5. Enzim aktivite birimleri	14

2.1.6. Enzim kinetiği	14
2.2. İmmobilizasyon	17
2.2.1. Enzim immobilizasyonunun avantajları	17
2.2.2. İmmobilizasyon parametreleri	18
2.2.3. İmmobilizasyon yöntemleri	19
2.2.3.1. Adsorpsiyon ile immobilizasyon.....	19
2.2.3.2. Kovalent bağlama ile immobilizasyon.....	19
2.2.3.3. İyonik bağlama ile immobilizasyon	20
2.2.3.4. Tutuklama ile immobilizasyon.....	20
2.3. Polifenol oksidaz Enzimi.....	21
2.3.1. PPO enziminin katalizlediği reaksiyonlar.....	21
2.3.2. PPO enziminin uygulamaları	21
2.4. Eflatun Çiçekli Ballıbaba (<i>Lamium purpureum</i>)	22

BÖLÜM 3.

DENEYSEL ÇALIŞMALAR	24
3.1. Kullanılan Materyal ve Maddeler	24
3.2. Polifenol Oksidaz (PPO) Enziminin İzolasyonu	25
3.3. Polifenol Oksidaz (PPO) Enziminin Karakterizasyonu	25
3.3.1. PPO aktivite tayini	25
3.3.2. Substrat spesifikliği.....	26
3.3.3. pH etkisi	26
3.3.4. Sıcaklık etkisi.....	26
3.3.5. Enzim kinetiği.....	27
3.3.6. PPO enzim aktivitesi üzerine madde etkisi.....	27
3.3.6.1. İnhibitör etkisi	27
3.3.6.2. Metallerin etkisi	27
3.3.6.3. Amino asitlerin etkisi	28
3.3.7. Enzimin pH toleransı	28
3.3.8. Enzimin depolanma kararlılığı.....	28
3.4. PPO Enziminin Bazı Taşıyıcılara İmmobilizasyonu	29
3.4.1. İmmobilizasyon koşullarının optimizasyonu	29
3.4.2. İmmobilize enzimin karakterizasyonu.....	30

3.4.2.1. İmmobilize enzimin aktivite tayini	30
3.4.2.2. Substrat spesifikliği	30
3.4.2.3. pH etkisi	30
3.4.2.4. Sıcaklık etkisi	31
3.4.2.5. Enzim kinetiği	31
3.4.2.6. Depolama kararlılığı.....	31
3.4.2.7. Yeniden kullanılabilirlik	32

BÖLÜM 4.

DENEYSEL BULGULAR ve SONUÇLAR	33
4.1. Polifenol Oksidaz (PPO) Enziminin Karakterizasyonu	33
4.1.1. pH etkisi	33
4.1.2. Sıcaklık etkisi.....	35
4.1.3. Enzim kinetiği.....	38
4.1.4. İnhibitör etkisi.....	42
4.1.5. Metal etkisi	46
4.1.6. Amino asit etkisi	47
4.1.7. Enzimin pH toleransı	48
4.1.8. Enzim depolanma kararlılığı.....	49
4.2. PPO Enziminin Bazı Taşıyıcılara İmmobilizasyonu	50
4.2.1. İmmobilizasyon koşullarının optimizasyonu.....	50
4.2.2. İmmobilize enzimin karakterizasyonu.....	52
4.2.2.1. pH etkisi	52
4.2.2.2. Sıcaklık etkisi	58
4.2.2.3. Enzim kinetiği	65
4.2.2.4. Depolama kararlılığı.....	77
4.2.2.5. Yeniden kullanılabilirlik	81

BÖLÜM 5.

SONUÇLAR ve TARTIŞMA	82
----------------------------	----

KAYNAKLAR.....	87
----------------	----

ÖZGEÇMİŞ.....	91
---------------	----

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

PPO	: Polifenol oksidaz
K_M	: Michealis-Menten sabiti
V_{max}	: Maksimum reaksiyon hızı
CHT	: Chitin
CTS	: Chitosan
HAP	: Hidroksiapatit
E.C	: Enzim komisyonu
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
CM-Sephadex	: Karboksimetil-Sephadex
FPLC	: Fast protein liquid chromatography
CMC	: Karboksimetilselüloz
ALG	: Alginat
E_a	: Aktivasyon enerjisi
EU	: Enzim ünitesi
DNA	: Deoksiribonükleik asit
RNA	: Ribonükleik asit

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Enzimlerin substratlarına spesifikliği	11
Şekil 2.2. Enzimatik reaksiyonun hızı üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi ..	13
Şekil 2.3. Michaelis-Menten grafiği.....	15
Şekil 2.4. Lineweaver-Burk grafiği.....	17
Şekil 2.5. Eflatun çiçekli ballıbaba (<i>Lamium purpureum</i>).....	23
Şekil 4.1. 4-metil katekol substratı için optimum pH grafiği.....	33
Şekil 4.2. Katekol substratı için optimum pH grafiği	34
Şekil 4.3. Pirogallol substratı için optimum pH grafiği	34
Şekil 4.4. Kafeik asit substratı için optimum pH grafiği.....	35
Şekil 4.5. 4-metil katekol substratı için optimum sıcaklık grafiği	36
Şekil 4.6. Katekol substratı için optimum sıcaklık grafiği.....	36
Şekil 4.7. Pirogallol substratı için optimum sıcaklık grafiği.....	37
Şekil 4.8. Kafeik asit substratı için optimum sıcaklık grafiği	37
Şekil 4.9. 4-metil katekol substratı için substrat doygunluk eğrisi	38
Şekil 4.10. 4-metil katekol substratı için Lineweaver-Burk grafiği.....	39
Şekil 4.11. Katekol substratı için substrat doygunluk eğrisi	39
Şekil 4.12. Katekol substratı için Lineweaver-Burk grafiği	40
Şekil 4.13. Pirogallol substratı için substrat doygunluk eğrisi.....	40
Şekil 4.14. Pirogallol substratı için Lineweaver-Burk grafiği	41
Şekil 4.15. Kafeik asit substratı için substrat doygunluk eğrisi	41
Şekil 4.16. Kafeik asit substratı için Lineweaver-Burk grafiği.....	42
Şekil 4.17. Ballıbaba PPO enzimi üzerine NaN_3 etkisi.....	43
Şekil 4.18. Ballıbaba PPO enzimi üzerine tiyoüre etkisi	43
Şekil 4.19. Ballıbaba PPO enzimi üzerine L-Sistein etkisi	44
Şekil 4.20. Ballıbaba PPO enzimi üzerine askorbik asit etkisi	44
Şekil 4.21. Ballıbaba PPO enzimi üzerine benzoik asit etkisi	45

Şekil 4.22. Ballıbaba PPO enzimi üzerine sitrik asit etkisi.....	45
Şekil 4.23. Ballıbaba PPO enzimi üzerine 2-Merkapto etanol etkisi.....	46
Şekil 4.24. Ballıbaba PPO enzimi için pH tolerans grafiği.....	49
Şekil 4.25. Ballıbaba PPO enziminin oda sıcaklığındaki aktivitesinin zamanla değişimi	50
Şekil 4.26. Ballıbaba PPO enziminin +4 °C'deki aktivitesinin zamanla değişimi	50
Şekil 4.27. CHT'e immobilize edilen enzimin 4-metil katekol substratı için optimum pH grafiği	52
Şekil 4.28. CHT'e immobilize edilen enzimin katekol substratı için optimum pH grafiği.	53
Şekil 4.29. CHT'e immobilize edilen enzimin pirogallol substratı için optimum pH grafiği	53
Şekil 4.30. CHT'e immobilize edilen enzimin kafeik asit substratı için optimum pH grafiği	54
Şekil 4.31. CTS'a immobilize edilen enzimin 4-metil katekol substratı için optimum pH grafiği	54
Şekil 4.32. CTS'a immobilize edilen enzimin katekol substratı için optimum pH grafiği	55
Şekil 4.33. CTS'a immobilize edilen enzimin pirogallol substratı için optimum pH grafiği	55
Şekil 4.34. CTS'a immobilize edilen enzimin kafeik asit substratı için optimum pH grafiği	56
Şekil 4.35. HAP'e immobilize edilen enzimin 4-metil katekol substratı için optimum pH grafiği	56
Şekil 4.36. HAP'e immobilize edilen enzimin katekol substratı için optimum pH grafiği	57
Şekil 4.37. HAP'e immobilize edilen enzimin pirogallol substratı için optimum pH grafiği	57
Şekil 4.38. HAP'e immobilize edilen enzimin kafeik asit substratı için optimum pH grafiği	58
Şekil 4.39. CHT'e immobilize edilen enzimin 4-metil katekol substratı için optimum sıcaklık grafiği.....	59

Şekil 4.40. CHT'e immobilize edilen enzimin katekol substratı için optimum sıcaklık grafiği.....	59
Şekil 4.41. CHT'e immobilize edilen enzimin pirogallol substratı için optimum sıcaklık grafiği.....	60
Şekil 4.42. CHT'e immobilize edilen enzimin kafeik asit substratı için optimum sıcaklık grafiği.....	60
Şekil 4.43. CTS'a immobilize edilen enzimin 4-metil katekol substratı için optimum sıcaklık grafiği.....	61
Şekil 4.44. CTS'a immobilize edilen enzimin katekol substratı için optimum sıcaklık grafiği.....	61
Şekil 4.45. CTS'a immobilize edilen enzimin pirogallol substratı için optimum sıcaklık grafiği.....	62
Şekil 4.46. CTS'a immobilize edilen enzimin kafeik asit substratı için optimum sıcaklık grafiği.....	62
Şekil 4.47. HAP'e immobilize edilen enzimin 4-metil katekol substratı için optimum sıcaklık grafiği.....	63
Şekil 4.48. HAP'e immobilize edilen enzimin katekol substratı için optimum sıcaklık grafiği.....	63
Şekil 4.49. HAP'e immobilize edilen enzimin pirogallol substratı için optimum sıcaklık grafiği.....	64
Şekil 4.50. HAP'e immobilize edilen enzimin kafeik asit substratı için optimum sıcaklık grafiği.....	64
Şekil 4.51. CHT'e immobilize edilen enzimin 4-metil katekol substratı için substrat doygunluk eğrisi.....	65
Şekil 4.52. CHT'e immobilize edilen enzimin 4-metil katekol substratı için Lineweaver-Burk grafiği.....	66
Şekil 4.53. CHT'e immobilize edilen enzimin katekol substratı için substrat doygunluk eğrisi.....	66
Şekil 4.54. CHT'e immobilize edilen enzimin katekol substratı için Lineweaver-Burk grafiği.....	67
Şekil 4.55. CHT'e immobilize edilen enzimin pirogallol substratı için substrat doygunluk eğrisi.....	67

Şekil 4.56. CHT'e immobilize edilen enzimin pirogallol substratı için Lineweaver-Burk grafiği	68
Şekil 4.57. CHT'e immobilize edilen enzimin kafeik asit substratı için substrat doygunluk eğrisi.....	68
Şekil 4.58. CHT'e immobilize edilen enzimin kafeik asit substratı için Lineweaver-Burk grafiği	69
Şekil 4.59. CTS'a immobilize edilen enzimin 4-metil katekol substratı için substrat doygunluk eğrisi.....	69
Şekil 4.60. CTS'a immobilize edilen enzimin 4-metil katekol substratı için Lineweaver-Burk grafiği.....	70
Şekil 4.61. CTS'a immobilize edilen enzimin katekol substratı için substrat doygunluk eğrisi.....	70
Şekil 4.62. CTS'a immobilize edilen enzimin katekol substratı için Lineweaver-Burk grafiği	71
Şekil 4.63. CTS'a immobilize edilen enzimin pirogallol substratı için substrat doygunluk eğrisi.....	71
Şekil 4.64. CTS'a immobilize edilen enzimin pirogallol substratı için Lineweaver-Burk grafiği	72
Şekil 4.65. CTS'a immobilize edilen enzimin kafeik asit substratı için substrat doygunluk eğrisi.....	72
Şekil 4.66. CTS'a immobilize edilen enzimin kafeik asit substratı için Lineweaver-Burk grafiği	73
Şekil 4.67. HAP'e immobilize edilen enzimin 4-metil katekol substratı için substrat doygunluk eğrisi.....	73
Şekil 4.68. HAP'e immobilize edilen enzimin 4-metil katekol substratı için Lineweaver-Burk grafiği	74
Şekil 4.69. HAP'e immobilize edilen enzimin katekol substratı için substrat doygunluk eğrisi.....	74
Şekil 4.70. HAP'e immobilize edilen enzimin katekol substratı için Lineweaver-Burk grafiği	75
Şekil 4.71. HAP'e immobilize edilen enzimin pirogallol substratı için substrat doygunluk eğrisi.....	75

Şekil 4.72. HAP'e immobilize edilen enzimin pirogallol substratı için Lineweaver-Burk grafiği	76
Şekil 4.73. HAP'e immobilize edilen enzimin kafeik asit substratı için substrat doygunluk eğrisi.....	76
Şekil 4.74. HAP'e immobilize edilen enzimin pirogallol substratı için Lineweaver-Burk grafiği	77
Şekil 4.75. CHT'e immobilize edilen enzimin +4 °C'deki aktivitesinin zamanla değişimi	78
Şekil 4.76. CHT'e immobilize edilen enzimin oda sıcaklığındaki aktivitesinin zamanla değişimi.....	79
Şekil 4.77. CTS'a immobilize edilen enzimin +4 °C'deki aktivitesinin zamanla değişimi	79
Şekil 4.78. CTS'a immobilize edilen enzimin oda sıcaklığındaki aktivitesinin zamanla değişimi.....	80
Şekil 4.79. HAP'e immobilize edilen enzimin +4 °C'deki aktivitesinin zamanla değişimi	80
Şekil 4.80. HAP'e immobilize edilen enzimin oda sıcaklığındaki aktivitesinin zamanla değişimi.....	81

TABLolar LİSTESİ

Tablo 4.1. PPO enziminin substrat spesifikliği ile ilgili sonuçlar.....	42
Tablo 4.2. Ballıbaba PPO enzimi üzerine etki eden inhibitörlerin I_{50} değerleri	46
Tablo 4.3. Ballıbaba PPO enzimi üzerine metallerin etkisi	47
Tablo 4.4. Ballıbaba PPO enzimi üzerine aminoasitlerin etkisi.....	48
Tablo 4.5. İmmobilizasyon yönteminin belirlenmesi için sonuç tablosu.....	51
Tablo 4.6. Enzim miktarının belirlenmesi için sonuç tablosu.....	52
Tablo 4.7. İmmobilize enzimin optimum sıcaklık ve pH değerleri	65
Tablo 4.8. İmmobilize enzimin kinetik sonuçları	77
Tablo 4.9. İmmobilize enzimin yeniden kullanılabilirlik sonuçları.....	81

ÖZET

Anahtar kelimeler: Polifenol oksidaz, *Lamium purpureum*, eflatun çiçekli ballıbababa, immobilizasyon

Bu çalışmada, *Lamium purpureum* (eflatun çiçekli ballıbababa) bitkisinden elde edilen serbest ve immobilize polifenol oksidaz (PPO) enziminin kinetik özellikleri incelenmiştir. Hem serbest hem de immobilize enzim kullanılarak yapılan karakterizasyon çalışmalarında 4-metil katekol, katekol, pirogallol ve kafeik asit substratları kullanılmıştır. Her bir substrat için Michaelis-Menten sabiti (K_M) ve maksimum reaksiyon hızı (V_{max}) hesaplanmıştır. Serbest enzim için kafeik asit en yüksek substrat spesifikliğine sahiptir. Serbest enziminin optimum pH değerleri 6,0-8,0; optimum sıcaklık değerleri ise 10-20 °C aralığındadır. PPO enzimi chitin (CHT), chitosan (CTS) ve hidroksiapatite (HAP) immobilize edilmiştir. CHT'e immobilize edilen enzimin kafeik asit substratına karşı ilgisi en fazladır. Optimum pH değerleri 6,0-7,0; optimum sıcaklık değerleri ise 5-50 °C aralığında bulunmuştur. CTS'a immobilize edilen enzim için katekol en yüksek substrat spesifikliğine sahiptir. Optimum pH değerleri 4,0-8,0; optimum sıcaklık değerleri ise 5-40 °C aralığında bulunmuştur. HAP'e immobilize edilen enzimin ise kafeik aside olan ilgisi en fazladır. Optimum pH değerleri 6,0-8,0, optimum sıcaklık değerleri ise 5-50 °C olarak bulunmuştur. Serbest PPO enzimini L-Sistein ile 2-merkaptan etanol ve Ca^{+2} , Pb^{+2} , Fe^{+3} metalleri büyük oranda inhibe etmektedir. Bazı aminoasitlerin serbest enzim üzerine etkisi incelendiğinde L-Lisin'in en yüksek aktivasyona, L-Arginin ve L-Aspartik asidin ise en yüksek inhibisyona sebep olduğu görülmüştür. Serbest PPO enziminin optimum pH'sı 7,5 olarak bulunmuştur. Yapılan PPO depolama kararlılığı sonucuna göre serbest enzim için oda sıcaklığında enzim aktivitesi 12 saat sonunda % 40,7; +4°C' de 120 saat sonunda % 27,91 olarak ölçülmüştür. Her üç materyale immobilize edilen enzimin oda sıcaklığında ve +4 °C' de serbest enzime göre daha uzun süre aktivitesini koruduğu görülmüştür. Immobilize enzimin yeniden kullanılabilirliği çalışmasında 4.kullanımda CTS % 5,16 değerinde aktivite göstermeye devam ederken, CHT ve HAP için aktivite sıfırlanmıştır.

CHARACTERIZATION AND IMMOBILIZATION ON SOME CARRIER OF POLYPHENOL OXIDASE FROM DEADNETTLE (*Lamium purpureum*)

SUMMARY

Key Words: Polyphenol oxidase, *Lamium purpureum*, red deadnettle, immobilization.

In this work, it is investigated the kinetic properties of free and immobilized polyphenol oxidase (PPO) obtained from *Lamium purpureum* (red deadnettle). 4-methylcatechol, catechol, pyrogallol and caffeic acid substrates were used in the characterization studies of free and immobilized enzyme. Michaelis-Menten constant (K_M) and maximum reaction velocity (V_{max}) were calculated for each substrate. Caffeic acid has the maximum substrate specificity for free enzyme. Free enzyme's optimum pH values were found between 6,0 and 8,0. Optimum temperatures were found as 10 - 20 °C. PPO enzyme was immobilized on chitin (CHT), chitosan (CTS) and hidroxiapatite (HAP). Caffeic acid has the maximum substrate specificity for CHT immobilized enzyme. Optimum pH values were found as 6,0-7,0. Optimum temperatures were found between 5 - 50 °C. For CTS immobilized enzyme catechol has the maximum substrate specificity. Optimum pH values were found between 4,0 and 8,0. Optimum temperatures were found between 5 - 40 °C. Caffeic acid has the maximum substrate specificity for HAP immobilized enzyme. Optimum pH values were found as 6,0-8,0. Optimum temperatures were found between 5 - 50 °C. PPO activity substantially was inhibited from L-cysteine, 2-mercaptoethanol, Ca^{+2} , Pb^{+2} , Fe^{+3} metal ions. When the effect of some amino acids on the PPO was investigated, L-Lysine led to maximum activation, L-Arginine and L-Aspartic acid maximum inhibition. pH tolerance of free PPO was found 7,5. As a result of enzyme storage stability, for free PPO activity at the room temperature after 12 hours % 40,7; at +4 °C after 120 hours % 27,91. Immobilized enzyme has more enzyme endurance at the room temperature and at +4 °C than free enzyme. As a result of enzyme's reusability, in forth use CTS has % 5,16 activity, CHT and HAP were inactive.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Tüketicinin giderek daha bilinçlenmesi sonucu tüketilen besinlerin hem çevre ve insan sağlığına, hem de damak zevkine uygun olması talep edilmektedir. Bu nedenle gıda endüstrisi alanında üretim ve pazarlama ile ilgili yeni yöntemler geliştirilmektedir [1]. Meyve ve sebzelerde ayrıca kabuklu deniz hayvanlarında çarpma, kesme, kabuk soyma ve dilimleme gibi mekanik zedelenme ve işlemlerle bazı renk değişimleri ortaya çıkmaktadır. Pembeden mavimsi-siyaha kadar olan bu renk değişimlerine “esmerleşme” denir [2].

Meyve ve sebzelerde görülen enzimatik esmerleşme, esas olarak, organizmada var olan fenolik bileşiklerin kinona dönüşmesi, kinonların polimerleşmesi ve bunun sonucu kahverengi, kırmızı, siyah pigmentlerin oluşmasından kaynaklanır. Bu olaylardan sorumlu olan enzimler genellikle Polifenol oksidazlar [EC 1.14.18.1; difenol: oksijen oksidoredüktaz; polifenol oksidaz (PPO)] ismiyle bilinir fakat ayrıca bu enzimler tirozinazlar, katekolazlar, krezolazlar ve fenolazlar olarak da isimlendirilir. Esmerleşme; fenolik substratlar ile PPO enzimi oksijen, pH, sıcaklık ve su aktivitesi açısından uygun koşullar altında bir araya geldiğinde meydana gelir [3].

PPO enziminin neden olduğu esmerleşmeler ürünün sadece renginde bozulmaya neden olmamakta, aynı zamanda lezzetini ve kalitesini de düşürmektedir. Bu nedenle olayın önlenmesi ve sınırlandırılması amacı ile PPO enziminin nitelikleri üzerinde çok çeşitli araştırmalar yürütülmektedir [2]. PPO enziminin neden olduğu bu esmerleşme reaksiyonlarının önlenmesi için bu enzimin inhibe edilmesi gerekmektedir [4].

Enzimlerin endüstride ve biyoteknolojide çeşitli amaçlarla kullanılmaya başlanması, bilim adamlarını bu katalizörleri daha geniş ve daha kullanışlı hale getirme olanaklarını araştırmaya yöneltmiştir. Serbest enzimin endüstriyel uygulamalarda kullanımlarına ilişkin ortaya çıkan pek çok sorunu olumlu yönde çözümlenebilmek ve enzimleri endüstri için daha çekici hale getirmek için enzim immobilizasyonlarına olan ilgi son yarım yüzyıldır çok artmıştır [5].

Enzimlerin immobilizasyonu biyoteknolojinin önemli olanaklarından biridir. Enzimler endüstriden tıba kadar geniş bir yelpazede ve kimyasal proseslerde katalizör olarak önemli potansiyele sahiptirler. Spesifiteleri, düşük sıcaklıkta yüksek katalitik etkinlikleri, biyobozunur olmaları nedeni ile önemli avantajlar sunarlar. Reaksiyon ortamından kolaylıkla ayrılabilmeleri ve böylece birçok kez kullanılabilmeleri nedeni ile immobilize enzimlerin kullanımı üretim maliyetlerini düşürür [6].

1.1. Polifenol Oksidaz Enzimi ile Daha Önce Yapılan Çalışmalar

Mishra ve arkadaşları, patlıcan (*Solanum melongena*) bitkisinde hasat ve kesim işlemleri sonrasında bitkinin durumunu olumsuz şekilde etkileyecek kadar yüksek miktarda PPO enzimi olduğunu belirlemiştir. Patlıcan PPO enziminin molekül ağırlığı 122 kDa olarak bulunmuştur. Enzimin substrat spesifikliği 4-metil katekol>tert-bütanol>dihirdokefeik asit>pirokatekol olarak bulunmuştur. Yapılan kinetik çalışmaya göre K_M değeri 4-metil katekole karşı 0,34 mM'dir. İnhibisyon çalışmalarının sonucunda sistein hidroklorid, potasyum metabisülfid, askorbik asit, eritorbik asit ve rezorsilik asidin yarışmalı inhibisyon; sitrik asit ve sodyum azidin ise karışık inhibisyon gösterdiği belirlenmiştir [7].

Aydemir enginar (*Cynara scolymus L.*) bulunan PPO enzimini % 1,0 polietilen glikol, % 1,5 Triton X-100 ve % 0,1 NaCl içeren 0,2 M pH 6,0 potasyum fosfat tamponu ile ekstrakte etmiştir. Poliakrilamid jel elektroforez (PAGE) ile enginar PPO enziminin üç izoenzimi tespit edilmiştir. Enzimin optimum pH değeri 5,0-7,0 aralığında, optimum sıcaklık değeri 25 °C bulunmuş ve 80 °C'de 5 dakika bekletilen enzimin aktivitesini kaybettiği belirlenmiştir.

Enzimin katekol, pirogallol, 4-metil katekol, DL-dopa, L-dopa ve gallik asit substratlarına karşı aktivite gösterdiği bulunmuş, bu substratlara karşı K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 10,2 mM, 19,662 U/ml dk; 14,3 mM, 8065 U/ml dk; 12,4 mM, 12,500 U/ml dk; 36,3 mM, 6060 U/ml dk; 37,7 mM, 5865 U/ml dk; 43,6 mM, 4620 U/ml dk olarak hesaplanmıştır. Sodyum metabisülfid ve askorbik asidin en etkili inhibitörler olduğu; Zn^{++} , Ba^{++} , Cu^{++} metal iyonlarının 10 mM konsantrasyonda en zayıf inhibisyonu gösterdikleri belirlenmiştir [8].

Waliszewski ve arkadaşları vanilya çekirdeğinden izole ettikleri PPO enzimini amonyum sülfat ilavesi, diyaliz ve jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırmıştır. Enzimin aktivitesi 4-metil katekol ve katekol substratları kullanılarak ölçülmüştür. Optimum pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla 3,0, 3,4 ve 37 °C olarak bulunmuştur. K_M ve V_{max} değerleri 4-metil katekol için 10,6 mM/L ve 13,9 OD₃₀₀ dk⁻¹; katekol için 85 mM/L ve 107,2 OD₃₀₀ dk⁻¹ olarak hesaplanmıştır [9].

Erat ve arkadaşları çakşır otundan (*Ferula sp.*) PPO enzimini ekstrakte ederek (NH₄)₂SO₄, diyaliz ve jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırmıştır. Bitkinin enzim özelliklerinin belirlenmesi çalışmalarında hem yaprak hem de sap kısımları kullanılmıştır. Substrat spesifikliğinin yaprak kısmı için en fazla katekole; sap kısmı için ise epikateşine karşı olduğu bulunmuştur. K_M ve V_{max} değerleri katekol için sırasıyla 2,34 mM ve 8541 EU/ml, epikateşin için ise 2,89 mM ve 5308 EU/ml olduğunu hesaplanmıştır. Çalışılanlar içerisinde en etkili inhibitörün yaprak kısmı için sodyum dietil ditiyokarbamat, sap kısmı için sodyum metabisülfid olduğu bulunmuştur [10].

Gawlik-Dziki ve arkadaşları brokoli çiçeğinden (*Brassica oleracea var. botrytis italica*) PPO enzimini izole ederek (NH₄)₂SO₄, iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırmıştır. Molekül ağırlığı SDS-PAGE yöntemi ile 51,3; jel filtrasyon kromatografisi ile 57 kDa bulunmuştur. Buna göre brokoli PPO enzimi monomerik bir proteindir.

Enzimin en yüksek spesifitesinin katekol substrata karşı olduğu ve K_M değerinin 12.34 ± 0.057 mM, V_{max} değerinin 2000 ± 8736 U/ml/dk olduğu belirlenmiştir. 4-metil katekol substratı için K_M ve V_{max} değerleri ise sırasıyla 21 ± 0.087 mM, 28.20 ± 0.525 U/ml/dk olarak hesaplanmıştır. Çalışılan inhibitörler içerisinde en etkili olanın sodyum sülfat olduğu belirtilmiştir [11].

Ünal, Anamur muzundan (*Musa cavendishii*) ekstrakte ettiği PPO enziminin kinetik özelliklerini çalışmıştır. Buna göre enzimin optimum sıcaklığı 30 °C, pH'ı $7,0$ bulunmuştur. Aktivasyon enerjisi (E_a) ve Z değeri sırasıyla 155 kJ mol⁻¹ ve $14,2$ °C olarak hesaplanmıştır. Yapılan çalışma sonucunda Anamur muzundan ekstrakte edilen PPO enzimi için K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla $8,5$ mM ve $0,754$ OD₄₁₀ dk⁻¹ bulunmuştur. İnhibisyon çalışmaları sonucu askorbik asit ve sodyum metabisülfid inhibitörlerinin enzim üzerine etkisinin en fazla olduğu belirtilmiştir [12].

Mdluli marula ağacından (*Sclerocarya birrea subsp. Caffra*) PPO enzimini ekstrakte ederek, enzim konsantrasyonu-reaksiyon ilişkisi, termal stabilite, pH, moleküler ağırlık, izoelektrik pH ve kinetik parametreleri belirlemek için çalışmalar yapmıştır. Enzimin molekül ağırlığı 71 kDa, pI değeri $5,43$, optimum pH'ı $7,0$ olarak bulunmuştur. K_M değerleri kateşin,4-metil katekol, 3,4-dihidroksifenilpropanoik asid (DHPPA) ve katekol için sırasıyla $1,41$, $1,43$, $3,73$ ve $4,99$ mM olarak belirlenmiştir [13].

Yang ve arkadaşları muzdan (*Musa sapientum L.*) PPO enzimini ekstrakte ederek jel filtrasyon ile molekül ağırlığını 41 kDa bulmuştur. K_M sabiti dopamin substratı için $3,9$ mM bulunmuştur. Optimum pH değeri $6,5$ olup enzim aktivitesi pH $5-11$ aralığında 48 saat için stabil durumdadır. Enzimin optimum sıcaklık değeri 30 °C olarak belirlenmiştir. Enzimin aktivitesi 1 Mm konsantrasyondaki potasyum siyanid, L-askorbik asit ve sistein ile büyük oranda inhibe olmaktadır. Ayrıca düşük tampon kapasitesinde 10 mM konsantrasyonunda sitrik asit ve asetik asit enzim aktivitesini büyük ölçüde düşürmektedir [14].

Kavrayan ve arkadaşları $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ilavesi ve diyaliz ile nane yapraklarından (*Mentha piperita*) PPO enzimini izole etmiştir. Optimum pH ve sıcaklık değerleri 7,0 ve 30 °C bulunmuştur. 70 ve 80 °C'lerde 6,5 ve 1,5 dakika sonunda enzim aktivitesinin yarısını kaybetmiştir. Kinetik çalışma sonucunda K_M değeri katekol için 6,25 mM, L-dopa için 9,00 mM olarak hesaplanmıştır. Glutasyon, askorbik asit, potasyum siyanür, tiyoüre, sodyum azid, sodyum metabisülfid, β -merkaptto etanol inhibitörleri ile çalışılmış, en yüksek inhibisyona sodyum metabisülfidin sebep olduğu belirlenmiştir [15].

Nagai ve arkadaşları Çin lahanasından PPO enzimini ekstrakte ederek $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ilavesi ve DAEA-Toyopearl 650M kolon kromatografisi ile saflaştırmıştır. Çalışma sonucunda üç izoenzim belirlenmiş, enzimin molekül ağırlığı yaklaşık olarak 65 kDa bulunmuştur. Karakterizasyon çalışmalarının sonucuna göre optimum pH 5,0, sıcaklık ise 40 °C'dir. 40 °C'den yüksek olan sıcaklıklarda enzimin aktivitesini kaybettiği görülmüştür. K_M değerleri katekol için 682,5 mM, pirogallol için 15,4 mM, dopamin için 62,0 mM bulunmuştur. En etkili inhibitörlerin β -merkapttoetanol, askorbik asit, glutasyon ve L-sistein olduğu belirlenmiştir [16].

Gülçin ve arkadaşları ısırgan otundan (*Urtica dioica L.*) PPO enzimini eskraekte ederek $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ilavesi, diyaliz ve CM-Sephadex iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Enzim katekol, 4-metil katekol, L-dopa, L-tirozin, p-krezol, pirogallol, kateşin ve trans-sinamik asit substratlarına karşı aktivite göstermiştir. Enzimin substrat spifikilğininin en fazla L-tirozine karşı olduğu belirlenmiştir. L-tirozin için optimum pH 4,5, optimum sıcaklık 30 °C, K_M değeri 0,79 mM, V_{max} değeri ise 11290 EU/mL bulunmuştur. Çalışılan inhibitörlerden sodyum dietil ditiyokarbamatın en yüksek etkiye sahip olduğu ve inhibisyonun yarışmalı olduğu belirlenmiş, K_i değeri $1,79 \cdot 10^{-9}$ M olarak hesaplanmıştır [17].

Gawlik-Dziki ve arkadaşlarının Polonya'da yetişen maruldan (*Lactuca sativa var. capitata L.*) ekstrakte etikleri PPO enziminin afinitesi en fazla 4-metil katekol ve katekol substratlarına karşıdır. K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 4-metil katekol için 1,00 mM, 5405 U/ml dk; katekol için 3,20 mM, 4081 U/ml dk olarak hesaplanmıştır.

Optimum pH değeri katekol için 5,5, 4-metil katekol için 6,8 bulunmuştur. Enzim için optimum sıcaklığın 35 °C, stabil olduğu aralığın ise 30-40 °C olduğu belirlenmiştir. Enzimin aktivitesinin yarılanması için 50, 60 ve 70 °C'de sıcaklığıyla 30, 20 ve 5 dakika inkübe edilmesi yeterlidir. SDS-PAGE ile enzimin molekül ağırlığı 60 kDa olarak bulunmuştur [18].

Halder ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada çay yapraklarından (*Camellia sinensis*) elde edilen PPO enziminin üç izoenzimi olduğu belirlenmiş, izoenzimler DAEA selüloz kolon ile ayrılmıştır. Üç fraksiyondan ikisi absorbe edilirken diğeri absorplanmamıştır. Absorplanmayan fraksiyon jel filtrasyon, hidroksiapatit, FPLC, DSD-PAGE ile saflaştırılmış, molekül ağırlığı 72 kDa bulunmuştur. Kinetik çalışmalarda enzim aktivitesi en fazla katekol substratına karşı olmuştur ve K_M değeri 0,49 mM olarak hesaplanmıştır [19].

Xu ve arkadaşları Henry kestanesinde ekstrakte ettikleri PPO enzimini $(NH_4)_2SO_4$ ilavesi, diyaliz ve jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırmış, SDS-PAGE ile molekül ağırlığını 69 kDa bulmuştur. Enzim katekol ve pirogallik aside karşı afiniteye sahipken kresol ve tirozine karşı değildir. Katekol substrat olarak kullanıldığında p-nitrofenol, tiyoüre, orsinol güçlü inhibitörlerdir. PPO enziminin pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla 5,0 ve 40 °C'dir. Enzim 70 °C'de 30 dakika inkübe edildiğinde sadece % 8 aktivite göstermiştir [20].

Dinçer ve arkadaşları PPO enzimini chitosan-kil boncukları üzerine gluteraldehit aracılığı ile çapraz bağlı olarak immobilize etmiştir. Serbest ve immobilize enzim için optimum pH 7,0 bulunmuştur. Serbest ve immobilize enzim için optimum sıcaklık ise sırasıyla 25-30 °C ve 25 °C olarak bulunmuştur. Kinetik parametrelerin belirlenmesi çalışmasında L-katekol substrat olarak kullanılmıştır. K_M değeri serbest ve immobilize enzim için sırasıyla 0,93 mM ve 1,7 mM olarak hesaplanmıştır [21].

Ayrıca karboksimetilselüloz hidrojel (CMC) boncuklarına PPO enzimini immobilize etmiştir. Serbest ve immobilize enzim için optimum pH değerleri sırasıyla 6,5 ve 7,0; optimum sıcaklık değerleri 40 °C ve 45 °C bulunmuştur.

K_M ve V_{max} değerleri serbest enzim için 0,65 mM ve 1980 U mg^{-1} ; immobilize enzim için 0,87 mM ve 760 U mg^{-1} olarak hesaplanmıştır. CMC üzerine immobilize edilen enzimin sıcaklık ve depolama kararlılığının serbest enzime göre daha iyi olduğu belirtilmiştir [22].

Shao ve arkadaşları patatesten PPO enzimini izole ederek alginat- SiO_2 (ALG- SiO_2) üzerine immobilize etmiştir. İmmobilizasyon şartlarının belirlenmesinde 20-100 mg aralığında jel boncuklar ile çalışılmış ve 60 mg boncuk kullanılarak yapılan çalışmada aktivitenin en yüksek çıktığı bulunmuştur. Karakterizasyon çalışmasında optimum pH serbest ve ALG- SiO_2 /PPO için sırasıyla 6,6 ve 7,0 bulunmuştur. K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla serbest enzim için 8,0 mmol/L, $0,096 \text{ s}^{-1}$; ALG- SiO_2 /PPO için 14,7 mmol/L, $0,0047 \text{ s}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Depolama kararlılığı çalışmasında + 4 °C' de 30 gün sonunda serbest enzim % 47,1 aktivite gösterirken bu değer immobilize enzim için % 93,3'tür. 30 °C'de serbest enzim 10 gün sonunda aktivitesini kaybederken, ALG- SiO_2 /PPO 20 gün sonunda % 61,9 aktivite göstermektedir [23].

Shao ve arkadaşları patatesten ekstrakte ettikleri PPO enzimi kısmı olarak saflaştırdıktan sonra çitosan- SiO_2 jel üzerine çapraz bağlı olarak immobilize etmiştir. optimum immobilizasyon şartlarının belirlenmesi çalışmasında en uygun pH değeri 7,0; kullanılması gereken en uygun enzim miktarı ise 4 mg/ml olarak bulunmuştur. İmmobilize enzimin K_M değeri katekol substratına karşı 12 mM olarak hesaplanmıştır. Depolama kararlılığı çalışmalarında immobilize enzimin serbest enzime göre daha kararlı olduğu belirlenmiştir. Buna göre +4 °C 'de 30 gün sonunda serbest enzim %47 aktivite gösterirken bu değer immobilize enzim için %95'dir. 30 °C' de serbest enzim 11 gün sonunda aktivite göstermezken, immobilize enzim 20 günün sonunda %58 oranında aktiviteye sahiptir [24].

Kennedy ve arkadaşları PPO enzimini MAC400 ve MAC200 olarak ifade edilen gözenek boyutlarına sahip iki farklı aktif karbona immobilize etmiştir. PPO enzimi MAC400 ve MAC200 üzerine $5 \cdot 10^4$, $10 \cdot 10^4$, $20 \cdot 10^4$, $30 \cdot 10^4 \text{ U l}^{-1}$ enzim miktarlarında; 5-8 pH aralığında ve 10-40 °C sıcaklık aralığında immobilize edilmiştir.

Bu çalışmaların sonucuna göre immobilizasyon verimi artan sıcaklık ve enzim miktarı ile artarken, artan pH değeri ile azalmıştır. Serbest ve MAC400 ve MAC200 üzerine immobilize edilen enzim için kinetik çalışmalar yapılmış buna göre Km değerleri sırasıyla 0,49, 0,41 ve 0,65 mM olarak bulunmuştur [25].

Khan ve arkadaşları patatesten (*Solanum tuberosum*) PPO enzimini ekstrakte ederek Celite 545 üzerine adsorpsiyon ile immobilize etmiştir. Karakterizasyon çalışmaları sonucunda optimum pH serbest ve immobilize enzim için 6,0 bulunmuştur. Optimum sıcaklık serbest enzim için 40 °C ve immobilize enzim için 40-50 °C'dir. Enzim üzerine üre etkisini belirlemek için yapılan çalışmada serbest enzim aktivitesini ilk 5 dakikadan kaybetmeye başlarken, immobilize enzimin aktivitesi 2 saat sonra düşmeye başlamıştır. Organik çözücülerin etkisi incelendiğinde, % 60 n-propanol ile S-PPO %75, I-PPO % 140 aktivite göstermiştir. % 60 Aseronitril ile S-PPO %19 aktivite gösterirken, bu değer I-PPO için % 40'dır [26].

1.2. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı, Sakarya Üniversitesi yerleşkesinde bulunan eflatun çiçekli ballıbabı (*Lamium purpureum*) bitkisinden PPO enziminin izolasyonu, enzimin substrat spesifikliğı, optimum pH, optimum sıcaklık, kinetik, depolanma kararlılığı, çeşitli kimyasalların etkisinin incelenmesi; enzimin chitin (CHT), chitosan (CTS) ve hidroksiapatit (HAP) materyallerine immobilize edilmesi, immobilize enzimin optimum sıcaklık, optimum pH, kinetik, depolanma kararlılığı, yeniden kullanılabilirlik özelliklerinin belirlenmesidir.

BÖLÜM 2. ENZİMLER

2.1. Enzimler Hakkında Genel Bilgi

Enzimler, canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları katalizleyen biyolojik katalizörlerdir. Katalitik RNA moleküllerinin (ribozimler) küçük bir grubu hariç olmak üzere, bütün enzimler protein yapısındadır. Laboratuarda gerçekleşmesi çok zaman alan, bazen de yüksek basınç, yüksek sıcaklık, asidik veya bazik ortam gerektiren reaksiyonlar enzimler kullanılarak çok kısa zamanda ve hücre içi koşullarda yürüyebilmektedir [27,28].

Canlıları oluşturan moleküller, yani biyomoleküller kinetik yönden oldukça kararlı olup, kendiliğinden kolayca reaksiyon vermezler. Bir hücredeki tüm kimyasal olaylar enzimler aracılığıyla gerçekleştirilir. Biyomoleküllerin kararlılığı şu önemli sonucu sağlamaktadır; hücre içinde enzimi olmayan bir reaksiyon hemen hemen vuku bulmaz, kendiliğinden reaksiyonlar meydana gelmez. Bunun anlamı “enzimler protein yapısında olduğu ve DNA tarafından şifrelendiği için, bir hücredeki tüm olaylar DNA seviyesinde düzenlenip, kontrol edilmektedir” demektir. Buradan, enzimleri sadece katalizör özelliği ile nitelemenin eksik bir tanımlama olacağı anlaşılmaktadır. Gerçekten, bu moleküller, bir hücreyi diğerlerinden farklı kılan özelliklere ait bilgilerin DNA’dan aktarılmasının en önemli araçlarıdır [28].

Enzimlerle ilgili pek çok konu aydınlatılmış olmakla birlikte, hala yeni enzimlerin saflaştırılması, özelliklerinin ve kataliz mekanizmalarının aydınlatılması için yoğun çalışmalar yapılmaktadır [29]. Bugün yaklaşık 2000 kadar enzim tanımlanmış, birçoğu saf halde elde edilip kinetikleri incelenmiş ve 200’den fazlası da kristallendirilmiştir. Ancak yapılan genetik çalışmalar daha tespit edilmemiş birçok enzimin varlığını göstermektedir [28].

2.1.1. Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması

Enzimlerin ürüne dönüştürdükleri maddelere, substrat denir. Enzimlerle ilgili yapılan ilk çalışmalarda, enzimin etki ettiği substrat adının sonuna –az eki getirilerek veya genel adlarıyla isimlendirme yapılmıştır. Zamanla, birçok enzimin daha ortaya çıkması sonucu sistematik bir isimlendirmeye ihtiyaç duyulmuştur [28]. Bunun üzerine Biyokimya Cemiyeti tarafından bir Uluslararası Enzim Komisyonu (IEC) kurulmuştur [30]. Buna göre her enzime bir sistematik kod numarası verilmiştir. Bu numara E.C (Enzyme Code) harflerinden sonra gelen dört rakamdan oluşur. Birinci rakam enzimin bağlı olduğu grubu gösterirken, ikincisi alt grubu, üçüncüsü alt alt grubu ifade eder. Dördüncü rakam ise, enzimin aynı üç rakama sahip enzimler arasındaki sırasını verir [28].

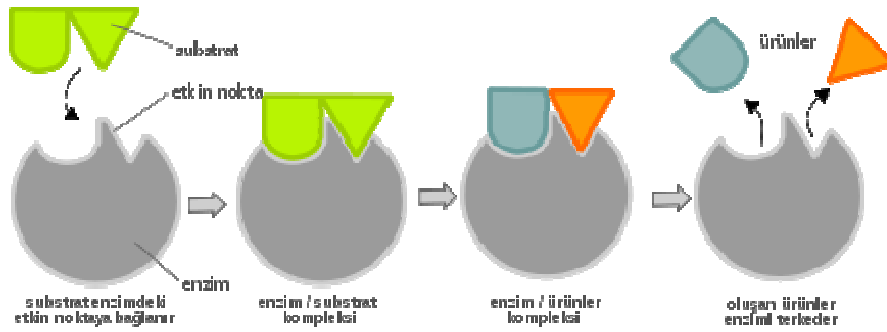
IEC katalizledikleri reaksiyon tipine göre enzimleri altı ana grupta toplamıştır. Bunlar:

1. Oksidoredüktazlar: İndirgenme ve yükseltgenme olayını katalizleyen enzimlerdir.
2. Transferazlar: Fonksiyonel grup transferinin olduğu reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir.
3. Hidrolazlar: Hidroliz reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.
4. Liyazlar: C-C, C-O ve C-N arasında çift bağ oluşturarak substrattan bazı grupların ayrılmasını katalizleyen ya da tam tersi işlev yapan enzimlerdir.
5. İzomerazlar: Substratın izomerinin olduğu reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir.
6. Ligazlar: Bağ oluşumunun gerçekleştiği reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir [30].

2.1.2. Enzimlerin spesifikliği

Enzimler hem katalizledikleri reaksiyon tiplerine, hem de ürüne dönüştürdükleri substrata karşı son derece spesifiktirler [28]. Birbirine çok benzeyen maddeler, hatta aynı maddenin stereozomerlerini bile dönüştürme uğratmazlar. Bu yüksek seçicilik sayesinde en basit hücrede bile aynı anda binlerce biyokimyasal reaksiyon meydana gelmektedir.

Substratlar enzimlerde aktif bölge denilen bir bölgeye bağlanırlar. Çoğunlukla asimetrik bir oyuk veya cep şeklinde olan aktif merkezin geometrik yapısı substrat molekülünün şekline ve onun bu bölgeye bağlanmasına uygundur. Fiziksel yapı uygunluğunun yanı sıra, aktif bölge polarlık ve elektriksel yük bakımından da substrat molekülünün kolayca bağlanmasını sağlayacak özelliktedir. Substrat molekülündeki yüklü kısımlar aktif merkezdeki zıt yüklü bölgelerle elektrostatik etkileşimler yaparlar [2,31].



Şekil 2.1. Enzimlerin substratlarına spesifikliği [31]

2.1.3. Enzimlerin kofaktörleri

Bazı enzimler katalizör olarak tek başlarına etki edebildikleri halde bazıları proteinlerden farklı yapıda gruplara ihtiyaç duyarlar. Enzimlerin aktivitesini gösterebilmesi için gereken bu maddelere “kofaktör” adı verilir [29]. Kofaktör bir metal iyonu olabildiği gibi “koenzim” adı verilen kompleks bir organik bileşik de olabilir. Bazen aktivite için ikisi de gerekebilir [28]. Kofaktör-enzim kompleksine “holoenzim”, kofaktör ayrılınca kendi başına aktiflik göstermeyen protein kısmına ise “apoenzim” denir.

Bazı kofaktörler enzime gevşek bağlanır ve diyalizle ayrılabilir; bazıları ise enzimle kovalent bağ yapar ve kolayca ayrılmazlar. Bu tip kofaktörlere “prostetik grup” denir [29,32]. Apoenzimlerin protein yapısındaki aminoasit türleri ve dizilişleri her enzimde farklılık göstermektedir. Bu nedenle enzimin özelliği ve özgüllüğünü belirleyen kısım apoenzimdir [31].

2.1.4. Enzim aktivitesine etki eden faktörler

2.1.4.1. pH

Enzimler katalitik etki gösterirken ortamın hidrojen iyonu konsantrasyonuna bağlı olarak aktiviteleri değişir [32]. Her enzim için aktivitelerin maksimum olduğu pH değerleri vardır. Bu değerlerin üzerinde ve altında aktivite düşer [28]. pH etkisi enzimlerin yapılarındaki amino asitlerin ve substratların yapılarındaki iyonik kısımların yüklerinin değişmesinden kaynaklanır. Yüklerdeki bu değişiklikler substratın bağlanmasını ve reaksiyonun gerçekleşme oranını değiştirir [33].

2.1.4.2. Sıcaklık

Sıcaklık artışı bütün kimyasal reaksiyonlarda olduğu gibi enzim kataliz reaksiyonlarında da artırıcı etki yapmaktadır. Artan sıcaklıkla enzimatik reaksiyon hızı artar fakat 50-60 °C üzerine çıktığında aktivitede düşüş gözlenir. Bu durum yüksek sıcaklıkta enzim yapısında meydana gelen denatürasyondan kaynaklanır [28].

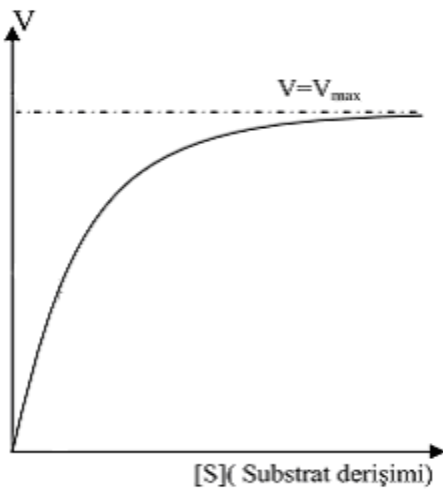
Pek çok çalışma 37°C’ de yürütülür. Bunun birinci nedeni vücut sıcaklığının enzimler için optimum sıcaklık olabileceği, ikinci nedeni ise bu sıcaklığın üzerinde enzimlerin inaktivasyon oranlarının çok fazla değişmemesidir. Uluslararası Biyokimya Birliği başlangıçta 25°C’ yi standart sıcaklık olarak tavsiye etmiş ancak sıcak iklimlerde enzimleri düşük sıcaklıkta tutmanın zor olmasından dolayı bu sıcaklık 30°C’ ye çıkarılmıştır. Ancak hala enzimlerin aktiviteleriyle alakalı sıcaklık ile ilgili çalışmalarda belli bir standardın olmadığı görülmektedir. Bunun temel nedeni enzimlerin protein yapılarının farklı olmasıdır [33].

2.1.4.3. Enzim konsantrasyonu

Enzimatik reaksiyonun hızı, enzimin substratına doymun olduğu koşullarda enzim konsantrasyonuna bağlı olarak artmaktadır. Ortamdaki enzim molekülü ne kadar çoksa reaksiyon o kadar hızlı yürür. Reaksiyon belli bir düzeye vardığında ise azalır [28].

2.1.4.4. Substrat konsantrasyonu

Enzimle katalizlenen bir reaksiyonun hızı, enzim konsantrasyonunun sabit olması koşulu ile substrat konsantrasyonu arttıkça artar [28]. Ancak enzim substratına karşı doymunluğa ulaştığında reaksiyon hızı değişmeden devam eder (şekil 2.2). Bu durumda enzim maksimum (V_{max}) ile çalışıyor demektir [32].



şekil 2.2. Enzimatik reaksiyonun hızı üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi [32]

2.1.4.5. Zaman

Bir enzim tarafından katalize edilen reaksiyon sürerken hız giderek düşer. Bunun nedeni reaksiyon devam ederken oluşan ürünlerin aksi yönde bir reaksiyon oluşturmaları, enzimin zamanla inaktive olması, substratın tükenmesi gibi olaylardır. [32].

2.1.4.6. İyonik şiddet

Protein yapısında olan enzimlerin üzerinde bulunan yüklü gruplar ile ortamda mevcut olan iyonlar etkileşerek, enzimin katalizleme fonksiyonuyla ilgili rollerine tesir edebilir. Bundan dolayı, enzim aktivitesinin maksimum olduğu bir optimum iyonik şiddet söz konusudur [28].

2.1.5. Enzim aktivite birimleri

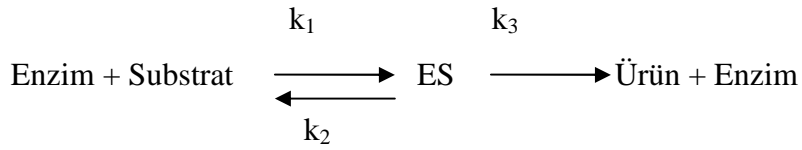
1. Turnover sayısı: Birim zamanda bir mol enzimi ürüne dönüştüren substratın mol sayısıdır.
2. Enzim aktivitesi: Optimum koşullarda, birim zamanda substratı ürüne dönüştüren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.
3. Enzim ünitesi (IU): 25 °C’de, bir dakikada, optimum koşullarda 1 mikromol substratı ürüne çeviren enzim miktarıdır.
4. Katal: 1 saniyede 1 mol substratı reaksiyona sokan enzim miktarıdır.
5. Spesifik aktivite (IU/mg protein): 1 miligram protein başına düşen enzim aktivitesidir [34].

2.1.6. Enzim kinetiği

Enzim kinetiği, enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonların hızlarının incelendiği bir konudur.

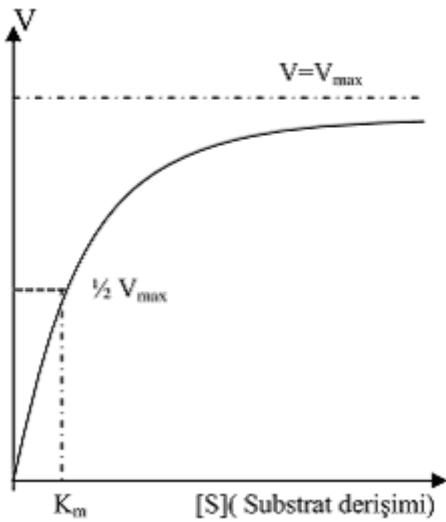
Enzim, substratı ürüne dönüştürürken önce onunla bir ‘‘Enzim-Substrat kompleksi’’ oluşturur, daha sonra da bu kompleks ürün ve enzime dönüşür.

Enzim kinetiği mekanizması Şu gibi gösterilir:



Burada ES kompleksi, E ve S'dan k_1 hızı ile oluşur. ES'nin ayrışması ise k_2 hızındaki geri reaksiyonla ve k_3 hızı ile ürün ve enzime ayrışması ile olur. Reaksiyon kararlı duruma ulaşınca ‘‘Kararlı Durum İlkesine’’göre ES'nin oluşması ayrışmasına eşit olur, yani derişimi değişmez.

Enzim reaksiyonları üzerinde ilk geniş kinetik çalışmalar 1913 yılında Michaelis-Menten tarafından yapılmıştır. Michaelis-Menten kinetiğine göre başlangıç enzim derişimi sabit alınıp reaksiyon hızının substrat derişimine bağlılığı incelenir. Sonuçta hiperbolik bir fonksiyon ve eğri elde edilir (Şekil 2.3). Bunun zm ile de Michaelis-Menten bağıntısı bulunur [35, 36].



Şekil 2.3. Michaelis-Menten grafiği [35]

Michaelis-Menten Bağıntısı Şu Şekilde tanımlanır.

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]} \quad (2.1)$$

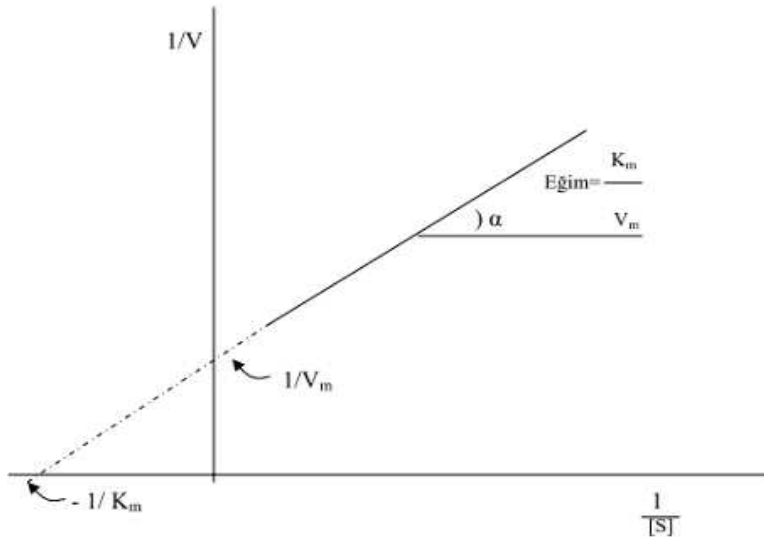
V_{\max} ; hiperbol asimtodunun y eksenini kestiği noktadır ve maksimum hız olarak belirtilir. Maksimum hızın yarısına ($V_{\max} / 2$) karşılık gelen substrat derişimi K_M (Michaelis-Menten sabiti) olarak belirtilir. V_{\max} ve K_M , bir enzimin aktivitesini belirleyen önemli enzim sabitleridir.

Michaelis-Menten grafiği 3 bölgeden oluşmaktadır. Birinci bölgede substrat konsantrasyonu düşük olacağından ($[S] \ll K_M$) grafik doğrusaldır. İkinci bölgede oldukça büyük substrat konsantrasyonlarında herhangi bir ihmal yapılamaz ve reaksiyon karışık dereceden yürür. Üçüncü bölgede $[S] \gg K_M$ 'dir. $V = V_{\max}$ olur ve reaksiyon sabit bir hızla devam eder.

Michaelis-Menten grafiği ile bir hiperbol elde edildiğinden, uygulamalarda kolaylık sağlamak amacı ile bunun bir doğru denklemi haline getirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla eksen ölçekleri uygun şekilde değiştirilerek, değişik yollardan doğru denkleme dönüştürülebilir. Bunlardan en çok kullanılanı Lineweaver-Burk denklemidir.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (2.2)$$

Bu denkleme göre ordinatta $1/V$, apsiste $1/[S]$ değerleri olmak üzere bir doğru elde edilir. Bu doğrunun eğimi ise K_M / V_{\max} 'tır (Şekil 2.4) [35, 36].



Şekil 2.4. Lineweaver-Burk grafiği [35]

2.2. İmmobilizasyon

Enzimler canlı hücrelerdeki reaksiyonları hızlandıran protein molekülleridir ve reaksiyon sonunda modifiye olmazlar. Enzim bir kereden fazla kullanılabilir ancak enzimin reaktanlar ve ürünler ile birlikte bir çözelti içinde bulunması enzimin çözüldüğüden ayrılmasını zorlaştırmaktadır. Böyle durumlarda enzimin bir katıya tutundurulması sağlanarak, ürünler ortamdaki alınmakta ve enzim tekrar kullanılabilir bir hale gelmektedir. Enzim immobilizasyonu, enzimin hareketini engelleyen bir yöntemdir, enzimin katalitik aktivitesi devam ederken, hareketin önemli derecede kısıtlandığı bir süreçtir [37].

2.2.1. Enzim immobilizasyonunun avantajları

1. Enzim birçok kere kullanılabilmekte ve bu da maliyeti düşürmektedir.
2. Enzimin ortamdaki uzaklaştırılması sonucu reaksiyonun hızlı bir şekilde durdurulması sağlanabilmektedir.
3. Enzimin kararlılığı artmaktadır.
4. Sürekli sistemde çalışabilmektedir.
5. Ürünün kolayca ayrılması sağlanmaktadır.
6. Atık sıvı miktarı azalmaktadır.
7. Oluşan ürünlerde enzim kalıntıları bulunmamaktadır.

8. Bazı durumlarda enzim aktivitesi artmaktadır.
9. Enzimin yarılanma ömrü uzamaktadır [37].

2.2.2. İmmobilizasyon parametreleri

Diğer fiziksel ve kimyasal proseslerde olduğu gibi, immobilizasyonun hızı ve verimi özellikle taşıyıcının cinsine, immobilizasyon yöntemine, konsantrasyona, pH'a, sıcaklığa ve reaksiyon süresine bağlıdır.

Çözünmez gözenekli taşıyıcılar kullanılarak enzim bağlanması yöntemi, laboratuvar çalışmaları ve endüstriyel uygulamalar için standart bir yöntemdir. Enzim dış yüzeyinin ve taşıyıcının fonksiyonel gruplarının özellikleri taşıyıcılara kimyasal bağlanma esnasında önemli rol oynar. Adsorpsiyon, yüzeyin hidrofobik ya da hidrofilik olma durumuna bağlıdır. Hakim olan iyonik gruplar ve grupların aminoasitlerle olan etkileşimleri çözeltinin pH'ı ile değişen ve tüm yüzeyin karakteristiğini belirleyen elektriksel yüke ve iyonik grupların yoğunluğuna bağlıdır [38].

Kovalent bağlanma metodunda, protein yüzeyine erişebilir olan çok sayıda fonksiyonel grup kullanılabilir. Bununla beraber özellikle lizin ve arjininin amino grupları, aspartik ve glutamik asidin karboksil grupları gibi az sayıda amino karboksil grup pratik olarak kullanılabilir.

Enzim ile taşıyıcı yüzey arasındaki iyonik, hidrofilik veya hidrofobik ve hidrojen bağlarıyla olan güçlü etkileşimler enzimin kararlılığını etkiler. Çok sayıdaki güçlü etkileşimler taşıyıcı yüzeyinde istenmeyen tersinmez adsorpsiyona neden olabilir, bu da enzim aktivitesinde kayba neden olur ve ayrıca proteinin üç boyutlu yapısında konformasyonel değişikliklere sebep olabilir.

Bazı durumlarda uygun bir miktar boşluk yaratıcı ajan olarak bilinen kimyasalların kullanılması taşıyıcıyı immobilizasyona elverişli hale getirerek enzimi korur ve enzimin inaktivasyonunun engeller [38].

2.2.3. İmmobilizasyon yöntemleri

Enzim immobilizasyonunda doğal ve sentetik birçok inorganik ve organik materyal kullanılmaktadır. Taşıyıcı membran, suda çözünmeyen katı veya polimer olabilir. Bir taşıyıcıda hidrofilik karakter, suda çözünmeme, gözenekli yapı, mekanik stabilite ve uygun partikül formu, kimyasal ve termal stabilite, mikroorganizmalara karşı dirençlilik, ucuzluk, dejenere olmama gibi özellikler aranır [39].

2.2.3.1. Adsorpsiyon ile immobilizasyon

Adsorpsiyon ile immobilizasyon enzim ve taşıyıcı arasındaki tersinir yüzey etkileşimleri ile olur. Adsorpsiyon ile immobilizasyonda hidrofobik etkileşimler de söz konusu olsa da en çok Van der Waals, iyonik ve hidrojen bağı etkileşimleri gibi elektrostatik güçler etkindir. Yöntem suda çözünmeyen, adsorpsiyon özelliklerine sahip bir yüzey aktif taşıyıcı ile enzim çözeltisinin uygun koşullarda inkübasyonu ve sonra tutunmamış enzimin yıkanarak uzaklaştırılması şeklinde uygulanır. İmmobilizasyon işleminin basit, hızlı ve ucuz oluşu, değişik biçim ve yükteki taşıyıcıları seçme olanağı vermesi yöntemin avantajlarıdır. Optimum koşulların saptanmasının zor olması, enzim ile taşıyıcı arasında kuvvetli bir bağlanma olmadığında enzimin serbest halde reaksiyon ortamına girme ihtimali ise yöntemin dezavantajlarıdır [40].

2.2.3.2. Kovalent bağlama ile immobilizasyon

Bu immobilizasyon yöntemi enzim ile taşıyıcı arasındaki kovalent bağ oluşumuna dayanır. Bağlanma taşıyıcı yüzeyindeki fonksiyonel gruplarla enzim yüzeyindeki aminoasitlere ait fonksiyonel gruplar arasında olur. Bağlanma genellikle sulu ortamda gerçekleşir ve kullanılacak taşıyıcıların reaktif olmaması durumunda yardımcı bir reaktif ilave edilerek aktif hale gelmesi sağlanır. İmmobilizasyon ılıman koşullarda gerçekleştirilmelidir. Yöntemin gerçekleşmesi zordur ancak enzim ve taşıyıcı arasındaki bağ kuvvetli olduğundan bazı durumlarda enzimatik aktivitenin artışı söz konusu olmaktadır [40].

2.2.3.3. İyonik bağlama ile immobilizasyon

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

İyonik bağlanma oldukça ılıman koşullarda gerçekleştiğinden enzimin konformasyonunda ya da aktif merkezinde bir değişikliğe neden olmaz. Ancak enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ kovalent bağ kadar kuvvetli olmadığından enzimin serbest kalma olasılığı söz konusudur [40].

2.2.3.4. Tutuklama ile immobilizasyon

Prensip olarak tutuklama enzim molekülünü belli bir alanda durmaya zorlamaktır. Tutuklama polimer matriks içindeki kafeslerde gerçekleştirilebileceği gibi yarı geçirgen membran zarlar içinde mikrokapsülleme miseller ile de gerçekleştirilebilir. Yöntemde enzim molekülü fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamaktadır. Enzim molekülleri çözeltilerde serbest olup jelin kafes yapısı tarafından hareketi kısıtlanmış durumdadır. Jel kafesin geçirgenliği enzim veya hücrelerin kaçışını önleyecek ancak substrat ve ürünün serbest hareketine izin verecek kadar sıkı durumdadır.

Polimerizasyon ve çapraz bağlanmanın oluştuğu ortamda enzim de bulunduğu takdirde enzim çapraz bağlanma sonucu oluşan kafeste tutuklanmaktadır. Kolay uygulanması, fiziksel bir işlem oluşu ve çok az enzimle gerçekleştirilebilmesi yöntemin avantajlarıdır. Tutuklamanın birkaç temel metodu vardır:

- Çok değerlikli katyonlarla makro moleküllerin iyonotropik değişmesi (örneğin alginat jel)
- Sıcaklıkla indüklenmiş jelleşme (örneğin jelatin, agaroz jel)
- Kimyasal/fotokimyasal reaksiyon ile organik polimerleşme (örneğin poliakrilamid jel)
- Karışmayan bir çözücüden çöktürme (örneğin polistren) [40]

2.3. Polifenol oksidaz Enzimi

PPO enzimi (EC 1.14.18.1) oksidoredüktaz sınıfının bir üyesidir. Doğada oldukça yaygın olarak bulunan bu enzim 1856 yılında Schoenbien tarafından mantarlarda keşfedilmiştir [41]. PPO'ların doğada çok yaygın biçimde bulunması, onların canlı hücrelerde hayati işlemler için ne kadar önemli olduğunu kanıtlamaktadır [42].

2.3.1. PPO enziminin katalizlediği reaksiyonlar

Moleküler oksijen varlığında PPO enzimi tarafından iki tip reaksiyon katalizlenmektedir. Bunlar:

- Monofenolik bileşiklerin O_2 varlığında o-difenollere hidroksilasyonu (Kresolaz aktivitesi; monofenol monooksigenaz (EC 1.14.18.1))
- o-difenollerin O_2 varlığında o-kinonlara yükseltgenme reaksiyonlarının katalizlenmesi (Katekolaz aktivitesi; o-difenol oksidaz (EC 1.10.3.2))

Monofenollerin hidroksilasyonu sonucu oluşan dihidroksi fenoller yine PPO enzimi tarafından katalizlenen bir reaksiyon ile o-kinonlara dönüştürülür. o-kinonun birimleri birleşerek kararlıyı meydana getirir [42].

2.3.2. PPO enziminin uygulamaları

PPO'ların monofenol ve difenol oksidaz aktiviteleri için substrat stereospesifiteleri pek çok endüstriyel uygulama için temel oluşturmaktadır:

- Fenollerin izlenmesinde biyosensör olarak
- Eczacılık endüstrisinde o-difenollerin üretiminde
- Biyopolimerlerin sentezinde

Sentetik melaninler radyasyon, katyon değiştiricileri, ilaç taşıyıcıları, antioksidanlar, antiviral ajanlar ve antijenlere karşı koruyucu ajanlar olarak uygulama alanı bulmaktadır.

Proteinleri çapraz bağlama yetenekleri PPO'lar için gıda endüstrisinde yeni bir uygulama pazarı başlatmıştır. PPO'lar fenollerle kontamine olmuş bölgeler için bir çevresel detoksifikasyon aracı olarak düşünülmektedir. Bu yüzden çevre uygulamalarında yer bulmaktadır [28].

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 hapsedilmesinde 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 [2].

2.4. Eflatun Çiçekli Ballıbababa (*Lamium purpureum*)

Ballıbababa, ballıbabagiller (Lamiaceae) familyasından *Lamium* cinsini oluşturan bitki türlerine verilen addır [43]. Ballıbababa 20-50 cm arasında dikine yükselen, çatallaşmayan ve köşeli bir gövdeye sahiptir. Yaprakları kalp, yumurta veya mızrak şeklinde ya da yarıya kadar kalp ve yarıdan sonra üçgen şeklinde olabilir. Çiçekleri yaprak saplarının hemen üstünde gövdenin kenarına halka gibi oturmuş ve bu halka üzerinde 6-12 adet çiçekten meydana gelir [44].

Ballıbabalar verimli topraklarda yetişir ve soğuğa oldukça dayanıklıdır. Çiçek renginde düşük ışık şiddeti ve ekim dönemi belirleyici rol oynar [43]. Avrupa, Asya ve Kuzey Amerika'nın ılıman bölgelerinde, Türkiye'de ise genellikle Marmara, Karadeniz ve Doğu Anadolu'da yabani olarak yetişir.

Ballıbabagiller ailesine dahil olan Ballıbababanın oldukça çok türü vardır, fakat bunlardan sadece ak ballıbababa tıbbi maksatlı kullanılır. Ballıbababa;

1. Solunum yolu hastalıklarına ve gaz şikayetlerine karşı etkilidir.

2. Kanı temizler.
3. İdrar yolu hastalıklarına faydalıdır.
4. İltihapları önler.
5. Kabakulak, mayasıl ve varise karşı faydalıdır.

Ballıbaba çiçeğinin birleşimindeki maddeler önemine göre şöyle sıralanabilir;

1. İridoitglikozitler; lamalbid ve caryoptosid
2. Secoiridoitglikozitler; albosid A ve albosid B
3. Biogen aminler; tyramin, histamin ve metilamin
4. Flavonitglikozitler; Quercimetrin (Quercetin-7- β -glikozit), Kâmpferol-3-diglikozit ile az miktarda Katechin taninler (Catechin taninler) içerir.
5. Ayrıca müsilaajlar, eterik yağlar, saponinler, zamk, şeker, kolin ve az miktarda alkaloit ve fenol karbonik asitler içerir.

Ülkemizde ballıbabanın 27 türü tespit edilmiştir. Bunlardan biri de eflatun çiçekli ballıbaba (*Lamium purpureum*)'dır. Bu tür 10-30 cm boyunda, çiçekleri pembe renkli ve küçüktür [44].



Şekil 2.5. Eflatun Çiçekli Ballıbaba (*Lamium purpureum*)[44]

BÖLÜM 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Materyal ve Maddeler

Bu çalışmada, eflatun çiçekli ballıbaba (*Lamium purpureum*) bitkisi enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Bitki, Sakarya Üniversitesi yerleşkesinden toplanmıştır.

Yapılan çalışmada ekstraksiyon işlemi için polivinil pirolidon (PVP), askorbik asit ve dipotasyum hidrojen fosfat ile potasyum dihidrojenfosfat kimyasalları kullanılmıştır. Sitrik asit mono hidrat, sodyum sitrat, dipotasyum hidrojen fosfat, potasyum dihidrojenfosfat, tris amino metan hidroklorid ve trizma-base kimyasalları tampon çözelti hazırlama işlemlerinde kullanılmıştır. 4-metil katekol, katekol, pirogallol, kafeik asit, gallik asit, guaiakol ve L-Tirozin substratları kinetik çalışmalarda kullanılmıştır. Sodyum azid, tiyoüre, L-Sistein, askorbik asit, sitrik asit, benzoik asit, 2-merkapt etanol, L-Histidin, L-Glutamik asit, L-Treonin, L-Lisin, L-Arginin, L-Aspartik asit, L-Prolin, L-Fenilalanin kimyasalları enzim aktivitesi üzerine madde etkisi çalışmalarında kullanılmıştır. CHT, CTS, HAP ve glutraldehit immobilizasyon aşamasında kullanılmıştır. Kimyasallar Sigma-Aldrich ve Merck firmalarından temin edilmiştir.

Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar;

1. Shimatzu UV-2401 Pc UV-VIS Spektrofotometre
2. Nüve NF 800 R Soğutmalı Santrifüj
3. Nüve NF 200 Santrifüj
4. WiseStir MSH-20D Manyetik Karıştırıcı
5. Özel yapım Soğutucu kabin
6. HANNA pH 211 pH metre

7. Thermo Scientific Owl P8DS Protein elektroforezi
8. Nüve Nb20 Su banyosu
9. Precisa XB 220A Hassas terazi
10. Microlit VVCS-200 ve 1000 Otomatik pipetler
11. Uğur UDD 100BK Derin dondurucu
12. Beko Hotmix 2155 Blender

3.2. PPO Enziminin İzolasyonu

Dondurucuda depolanmış eflatun çiçekli ballıbabası bitkisinin yaprak ve çiçek kısımlarından 10 gram alınarak, % 0,5 PVP ve 0,0001 M askorbik asit içeren 30 ml 0,1 M fosfat tamponu (pH 7,0) ile hazırlanan çözelti içerisinde blender yardımıyla 5 dakika boyunca karıştırılarak parçalanmıştır. Elde edilen homojenat 3 kat tülbetten süzölmüş ve 5.000 rpm'de 15 dk süresince santrifüjlenmiştir. Bu işlemler sonucunda ham enzim ekstratı olarak elde edilen süpernatant enzim karakterizasyonu çalışmalarında kullanılmıştır.

3.3. PPO Enziminin Karakterizasyonu

PPO enziminin kinetik özelliklerinin araştırılmasında substrat spesifikliğı, optimum pH, optimum sıcaklık, pH toleransı, depolama kararlılığı ve çeşitli kimyasalların enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi çalışmaları yapılmıştır.

3.3.1. PPO aktivite tayini

PPO enziminin aktivitesi, 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu, 3 mM 4-metil katekol çözeltisi ve ham enzim ekstratı toplam reaksiyon hacmi 3 mL olacak şekilde karıştırılarak, oda sıcaklığında 420 nm'de 60 sn süre ile absorbanstaki artışı ölçölerek belirlenmiştir. Diğer substratlar için de uygun pH değerlerinde aynı işlemler yapılmıştır. Her aktivite tayininde ölçümler 3 kez tekrarlanmıştır.

3.3.2. Substrat spesifikliği

Substrat spesifikliği çalışması enzimin hangi substratla reaksiyon verebildiğini ve hangi substrata karşı afinitesinin daha yüksek olduğu göstermektedir.

Substrat spesifikliğini belirlemek amacı ile PPO enziminin 8 farklı substrata karşı aktivitesi belirlenmiştir. Bu amaçla 4-metil katekol, katekol, pirogallol, kafeik asit, gallik asit, guaiakol ve L-Tirozin substrat olarak kullanılmıştır. Elde edilen grafiklerden her substrat için K_M ve V_{max} değeri hesaplanmış ve substratlar kıyaslanmıştır.

3.3.3. pH etkisi

PPO enzimi aktivitesine pH etkisi, 3,0 ile 9,0 arasında değişen pH değerlerinde hazırlanmış tamponlar ile 4 farklı substrat kullanılarak (4-metil katekol, katekol, pirogallol, kafeik asit) belirlenmiştir. pH 3,0-6,0 aralığında 0,1 M sitrat tamponu, pH 6,0-8,0 aralığında 0,1 M fosfat tamponu ve pH 8,0-9,0 aralığında 0,1 M tris tamponu kullanılmıştır. Enzim aktivite ölçümleri bölüm 3.3.1' de belirtildiği gibi yapılmıştır.

3.3.4. Sıcaklık etkisi

PPO enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 °C değerlerinde enzim aktivitesine bakılmıştır. Bunu belirlemek için daha önceki gibi 60 sn boyunca 420 nm'de absorbanstaki artışı izlenmiştir. Yüksek sıcaklıklar için su banyosu ve düşük sıcaklıklar için ise buz banyosu kullanılmıştır. Enzimin aktivite gösterdiği tüm substratlar (4-metil katekol, katekol, pirogallol, kafeik asit) için optimum sıcaklık çalışması yapılmıştır. Her substrat 3 mM konsantrasyonunda kullanılmıştır.

3.3.5. Enzim kinetiği

Enzimin V_{max} ve K_M değerlerinin bulunması için yapılan kinetik çalışmalarda konsantrasyonları 0,05 mM ile 20 mM arasında değişen substrat özelteleri hazırlanmıştır. Enzimin V_{max} ve K_M değerlerinin belirlenmesi için spektrofotometrik olarak 420 nm'de 60 sn aktivitesi izlenmiştir. Daha sonra absorbans-zaman grafiğinden ilk hızları hesaplanmıştır. Bu ilk hız değerleri Lineweaver-Burk grafiğinde ($1/V$ 'ye karşı $1/[S]$) yerine konularak K_M ve V_{max} değerleri bulunmuştur. Yapılan işlemler 3 kez tekrarlanmıştır.

3.3.6. PPO enzim aktivitesi üzerine madde etkisi

3.3.6.1. İnhibitör etkisi

Yapılan çalışmada sodyum azid, tiyoüre, L-Sistein, askorbik asit, sitrik asit, benzoik asit, 2-merkaptto etanol olmak üzere toplam 7 adet inhibitör kullanılmıştır. Her bir inhibitör için I_{50} değerleri hesaplanmıştır.

Çalışmada kullanılan inhibitörlerin etkilerini tespit etmek için sabit enzim miktarı ve 3 mM'lık sabit substrat konsantrasyonunda aktivite tayini baz alınarak farklı konsantrasyonlarda inhibitör aktiviteleri belirlenmiştir. Sonra her bir inhibitör için % Bağıl Aktivite - $[I]$ grafikleri çizilmiştir. Elde edilen grafiklerden enzim aktivitesini yarıya indiren substrat konsantrasyonu olan I_{50} değerleri hesaplanmıştır. Aktivite tayinleri 4-metil katekol substratı varlığında gerçekleştirilmiştir. İşlemler 3 kez tekrarlanmıştır.

3.3.6.2. Metallerin etkisi

PPO enzimine metal etkisinin incelenmesi amacıyla standart koşullarda ortama çeşitli metal özelteleri eklenerek aktivite ölçümleri yapılmıştır. Bu amaçla pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış olan enzim özelteleri, son konsantrasyonları 1 mM, 5 mM, 10 mM olacak şekilde ortama ilave edilen metaller ile +4 °C' de 30 dakika inkübe edilmiştir.

Çeşitli metallere inkübe edilen enzimin aktivitesine, 3 mM 4-metil katekol ile spektrofotometrik olarak 420 nm de 60 sn boyunca bakılmıştır. Çalışmada Fe^{+3} , Cu^{+2} , Mg^{+2} , Ba^{+2} , Ca^{+2} , Li^{+1} , Mn^{+2} , Pb^{+2} , Na^{+1} , K^{+1} , Ni^{+2} , Hg^{+2} , Cd^{+2} ve Al^{+2} metallerinin etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar metalsiz ortamda gerçekleştirilen kontrol reaksiyonu ile karşılaştırılmış ve % kalan aktivite değerleri hesaplanmıştır. Yapılan işlemler 3 kez tekrarlanmıştır.

3.3.6.3. Amino asitlerin etkisi

Yapılan çalışmada L-Histidin, L-Glutamik asit, L-Treonin, L-Lisin, L-Arginin, L-Aspartik asit, L-Prolin, L-Fenilalanin amino asitlerinin PPO enzimi üzerine etkisi incelenmiştir. Amino asit çözeltilerinden 0,5 mM, 1 mM, 5 mM olmak üzere 3 farklı konsantrasyon baz alınarak, sabit 3 mM 4-metil katekol substratı varlığında 420 nm de 60 sn süresince enzim aktivitesine etkisi spektrofotometrik olarak bakılmıştır. Elde edilen sonuçlar amino asit içermeyen kontrol reaksiyonu ile karşılaştırılarak her amino asit için % kalan aktivite değerleri hesaplanmıştır. İşlemler 3 kez tekrarlanmıştır.

3.3.7. Enzimin pH toleransı

Bu çalışmada pH değerleri 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 7,5, 8,0, 9,0 olan tampon çözeltiler kullanılmıştır. Her bir tampon çözeltiye aynı miktarda enzim ilave edilerek +4 °C de 1,5 saat inkübe edilmiştir ve süre sonunda standart koşullarda aktivite ölçümleri yapılmıştır. Ölçümler sonunda % aktivite değerleri hesaplanarak, pH-%aktivite grafiği çizilmiştir.

3.3.8. Enzimin depolanma kararlılığı

PPO enziminin depolanma kararlılığı çalışması +4 °C ve ortalama 25 °C olan oda sıcaklığı olmak üzere 2 farklı sıcaklık değerinde yapılmıştır. Enzimin oda sıcaklığında depolanma kararlılığını bulabilmek için enzim aktivitesindeki azalma 1-2 saatte bir 420 nm de 60 sn boyunca absorbans değeri ölçülerek kaydedilmiştir. Substrat olarak 3mM 4-metil katekol kullanılmıştır.

Enzimin +4 °C'de depolanmasındaki kararlılığı görmek amacıyla enzim +4 °C'de saklanarak, 1 - 2 günde bir 420 nm'de 60 sn boyunca absorbans değeri ölçülmüştür. Substrat olarak 3 mM 4-metil katekol kullanılmıştır.

3.4. PPO Enziminin Bazı Taşıyıcılara İmmobilizasyonu

Bu çalışmada eflatun çiçekli ballıbaba bitkisinden izole edilen PPO enziminin pH değişimlerine ve yüksek sıcaklığa dayanıklılığını artırmak, tekrar kullanılabilirliğini sağlamak için immobilizasyon çalışması yapılmıştır. Bu amaçla CHT, CTS ve HAP immobilizasyon materyalleri olarak kullanılmıştır.

3.4.1. İmmobilizasyon koşullarının optimizasyonu

PPO enziminin immobilizasyonu için adsorpsiyon ile bağlama ve kovalent bağlama olmak üzere iki farklı yöntem denenmiştir. Kovalent bağlama yönteminde gluteraldehit kullanılmıştır. CHT, CTS ve HAP materyallerinin her biri için asidik, bazik ve nötr ortamda hem adsorpsiyon hem de kovalent bağlama yöntemi çalışılmış, sonucu en iyi çıkan yöntem bundan sonraki immobilizasyon işlemleri için standart alınmıştır.

Enzimin adsorpsiyon ile immobilizasyonu için 2'şer ml pH 3,0 sitrat tamponu, pH 7,0 fosfat tamponu, pH 9 tris tamponu alınarak 0,1'er gram immobilizasyon materyali (CHT, CTS, HAP) ve her birine aynı miktarda enzim çözeltisi koyularak 1,5 saat karıştırılmıştır. Süre sonunda saf su ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Enzimin kovalent bağlama yöntemi ile immobilizasyonunda ise anlatılan işleme ek olarak 100µL gluteraldehit kullanılmıştır.

Koşulların optimizasyonu için ayrıca optimum enzim miktarının belirlenmesi için çalışma yapılmıştır. Bu amaçla, belirlenen standart immobilizasyon yöntemlerinde 100µL, 200µL, 300µL ve 400µL enzim çözeltileri kullanılarak immobilizasyon gerçekleştirilmiş, kullanılması gereken optimum enzim miktarı belirlenmiştir.

3.4.2. İmmobilize enzimin karakterizasyonu

Bu çalışmada üç materyale (CHT, CTS, HAP) immobilize edilen PPO enziminin kinetik özelliklerinin araştırılması için substrat spesifikliği, optimum pH, optimum sıcaklık belirlenmesi çalışmaları yapılmıştır.

3.4.2.1. İmmobilize enzimin aktivite tayini

İmmobilize PPO enziminin aktivite tayini için 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu, 3 mM 4-metil katekol çözeltisi toplam reaksiyon hacmi 3 mL olacak şekilde karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 10 dakika bekletilerek gerçekleştirilen reaksiyonun süre sonunda 420 nm'de absorbansı ölçülmüştür. Sonuçlar EU/gr dk olarak hesaplanmıştır. Bu yöntem aktivite ölçümü için standart olarak belirlenmiştir. Diğer substratlar için de uygun pH değerlerinde aynı işlemler yapılmıştır. Her aktivite tayininde ölçümler 3 kez tekrarlanmıştır.

3.4.2.2. Substrat spesifikliği

Bu çalışmada immobilize enzimin substrat spesifikliğini belirlemek amacı ile serbest enzimin aktivite gösterdiği 4 farklı substrat (4-metil katekol, katekol, pirogallol, kafeik asit) ile çalışılmıştır. Elde edilen grafiklerden her substrat için K_M ve V_{max} değeri hesaplanmış ve substratlar kıyaslanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda immobilize PPO enziminin 4-metil katekol, katekol, pirogallol, kafeik asit substratlarına karşı aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

3.4.2.3. pH etkisi

İmmobilize PPO enziminin aktivitesine pH etkisi, 3,0 ile 9,0 arasında değişen pH'larda hazırlanmış tamponlar ile 4 farklı substrat kullanılarak (4-metil katekol, katekol, pirogallol, kafeik asit) belirlenmiştir.

pH 3,0-6,0 aralığında 0,1 M sitrat tamponu, pH 6,0-8,0 aralığında 0,1 M fosfat tamponu ve pH 8,0-9,0 aralığında 0,1 M tris tamponu kullanılmıştır. Enzim aktivite ölçümleri ve hesaplamaları bölüm 3.4.2.1' de belirtildiği gibi yapılmıştır

3.4.2.4. Sıcaklık etkisi

İmmobilize PPO enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 °C' lerde enzim aktivitesine bakılmıştır. Bu amaçla immobilize enzim için standart alınan ölçüm yöntemi kullanılmıştır. Yüksek sıcaklıklar için su banyosu ve düşük sıcaklıklar için ise buz banyosu kullanılmıştır. Enzimin aktivite gösterdiği tüm substratlar (4-metil katekol, katekol, pirogallol, kafeik asit) için optimum sıcaklık çalışması yapılmıştır. Her substrat 3 mM konsantrasyonunda kullanılmıştır.

3.4.2.5. Enzim kinetiği

İmmobilize enzimin V_{max} ve K_M değerlerinin bulunması için kinetik çalışmalarda konsantrasyonları 0,001 mM ile 16 mM arasında değişen substrat çözeltileri hazırlanmıştır. İmmobilize enzimin V_{max} ve K_M değerlerinin belirlenmesi için standart olarak belirlenen ölçüm ve hesaplama yöntemi kullanılmıştır. Hesaplanan EU/gr dk değerleri Lineweaver-Burk grafiğinde ($1/V$ 'ye karşı $1/[S]$) şeklinde yerine konularak K_M ve V_{max} değerleri bulunmuştur. Yapılan işlemler 3 kez tekrarlanmıştır.

3.4.2.6. Depolama kararlılığı

İmmobilize PPO enziminin depolanma kararlılığı çalışması +4 °C ve ortalama 25 °C olan oda sıcaklığı olmak üzere 2 farklı sıcaklık değerinde yapılmıştır.

Enzimin oda sıcaklığında depolanma kararlılığını bulabilmek için enzim aktivitesindeki azalma birkaç saatte bir kaydedilmiştir. Substrat olarak 3mM 4-metil katekol kullanılmıştır. Enzimin +4 °C'de depolanmasındaki kararlılığı görmek amacıyla enzim +4 °C'de saklanarak, 1-2 günde bir 420 nm'de aktivite değeri ölçülmüştür. Substrat olarak 3 mM 4-metil katekol kullanılmıştır.

3.4.2.7. Yeniden kullanılabilirlik

İmmobilize PPO enziminin yeniden kullanılabilirliğini belirlemek amacıyla, belirlenen uygun yöntemler ile 3 materyale bağlanan enzimin 3mM 4-metil katekol substratı ile aktivite ölçümü yapılmıştır. Materyaller saf su ile birkaç defa yıkanarak yeniden reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Her seferinde yıkama işlemi yapılarak aktivite sıfırlanıncaya kadar çalışılmaya devam edilmiştir.

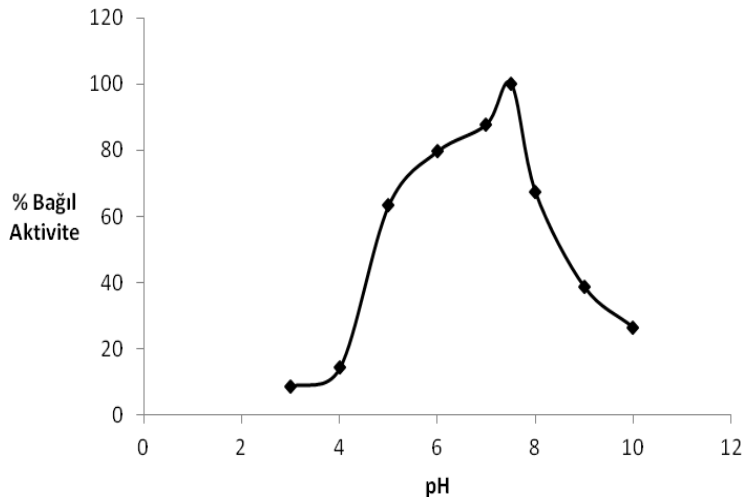
BÖLÜM 4. DENEYSEL BULGULAR ve SONUÇLAR

4.1.PPO Enziminin Karakterizasyonu

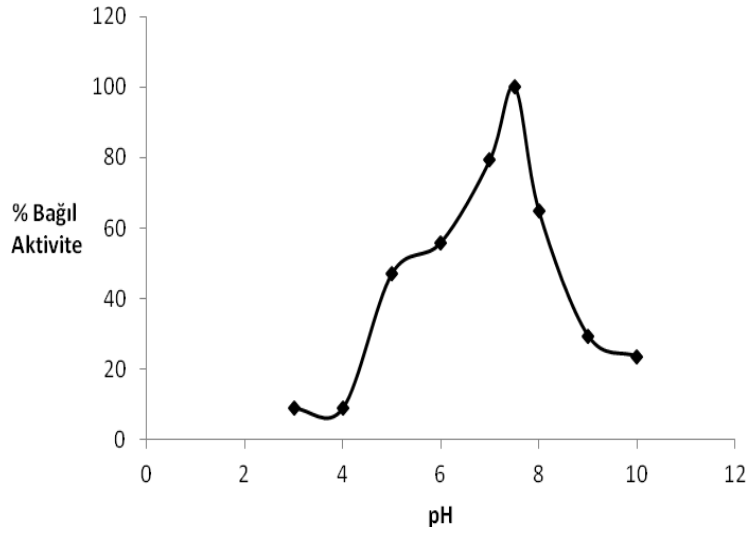
4.1.1. pH etkisi

Bu çalışmada PPO enziminin en yüksek aktivite gösterdiği pH değerini belirlemek amacıyla 4 farklı substrat kullanılarak (4-metil katekol, katekol, pirogallol, kafeik asit) aktivite ölçümleri gerçekleştirilmiştir. 3,0 ve 9,0 arasında değişen pH'larda hazırlanmış tamponlar ile yapılan çalışmada enzim aktivite tayinleri spektrofotometrik yöntemle 60 sn süresince 420 nm absorban artışları izlenerek gerçekleştirilmiştir.

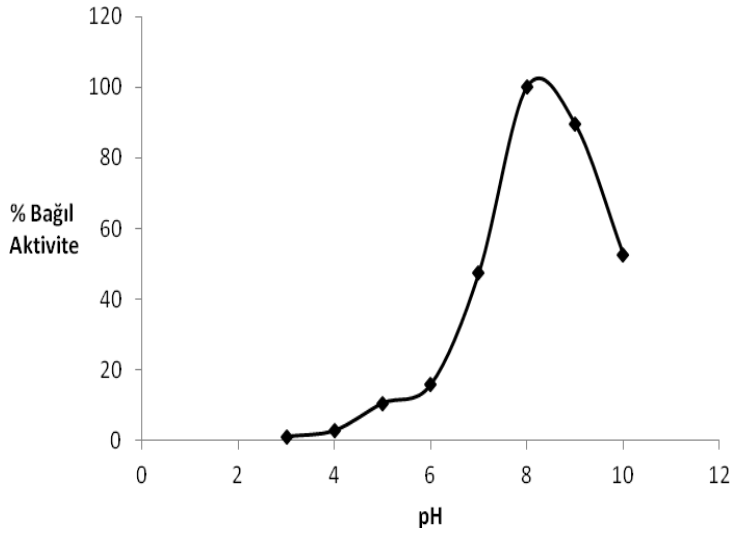
pH çalışması sonucunda PPO enziminin 4-metil katekol substratı için 7,5, katekol için 7,5, pirogallol için 8,0 ve kafeik asit için 6,0 optimum pH değerlerine sahip olduğu Şekil 4.1, 4.2, 4.3 ve 4.4'deki grafiklerde görülmektedir.



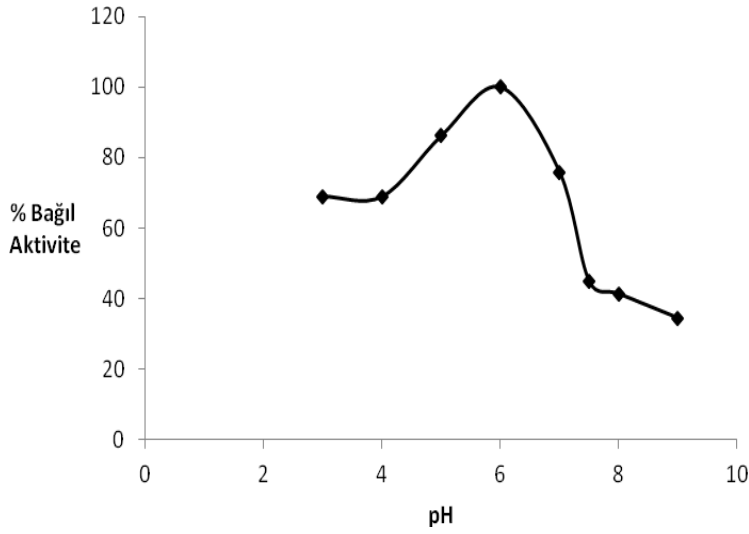
Şekil 4.1. 4-metil katekol substratı için optimum pH grafiği



Şekil 4.2. Katekol substratı için optimum pH grafiği



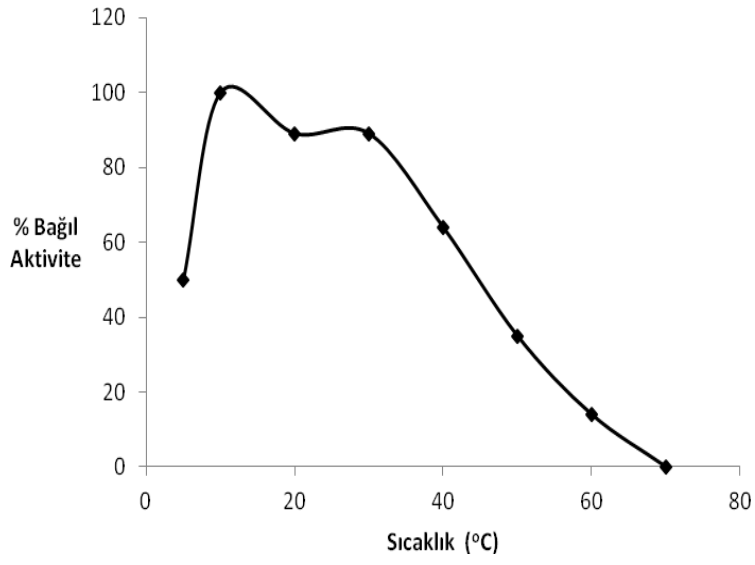
Şekil 4.3. Pirogallol substratı için optimum pH grafiği



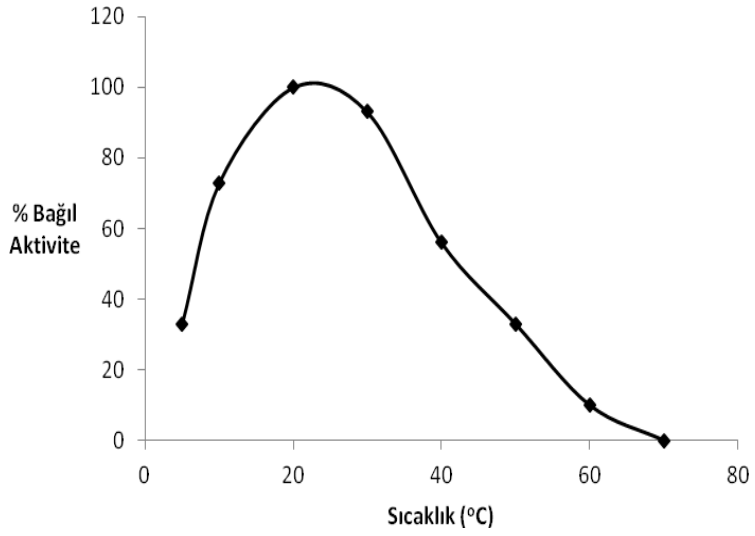
Şekil 4.4. Kafeik asit substratı için optimum pH grafiği

4.1.2. Sıcaklık etkisi

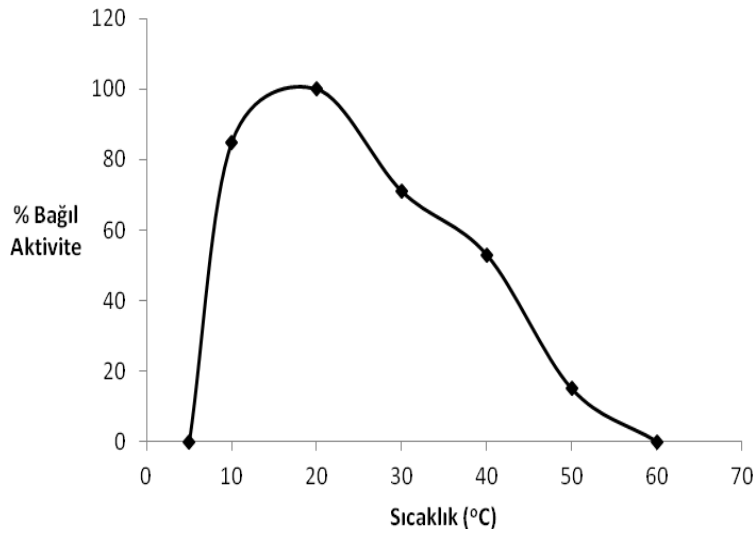
Bölüm 3.3.4.'de anlatıldığı gibi, 4-metil katekol, katekol, pirogallol ve kafeik asit substratları kullanılarak PPO enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 °C'lerde enzim aktivitesine bakılmıştır. Yüksek sıcaklıklar için su banyosu ve düşük sıcaklıklar için ise buz banyosu kullanılmıştır. Bu çalışmada substrat konsantrasyonu 3 mM olarak kullanılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda elde edilen Şekil 4.5, 4.6, 4.7 ve 4.8'deki grafikler incelendiğinde enzimin optimum sıcaklık değerlerinin sırasıyla 4-metil katekol için 10 °C, katekol için 20 °C, pirogallol için 20 °C, kafeik asit için 20 °C olduğu belirlenmiştir.



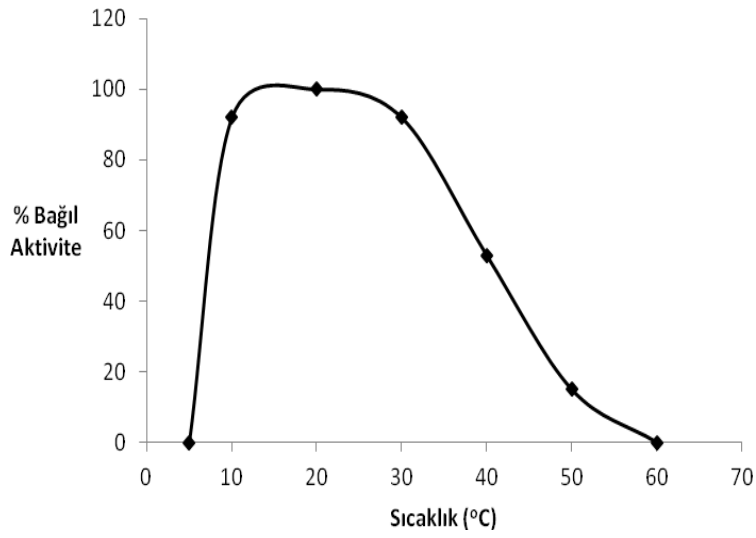
Şekil 4.5. 4-metil katekol substratının optimum sıcaklık grafiği



Şekil 4.6. Katekol substratının optimum sıcaklık grafiği



Şekil 4.7. Pirogallol substratının optimum sıcaklık grafiği

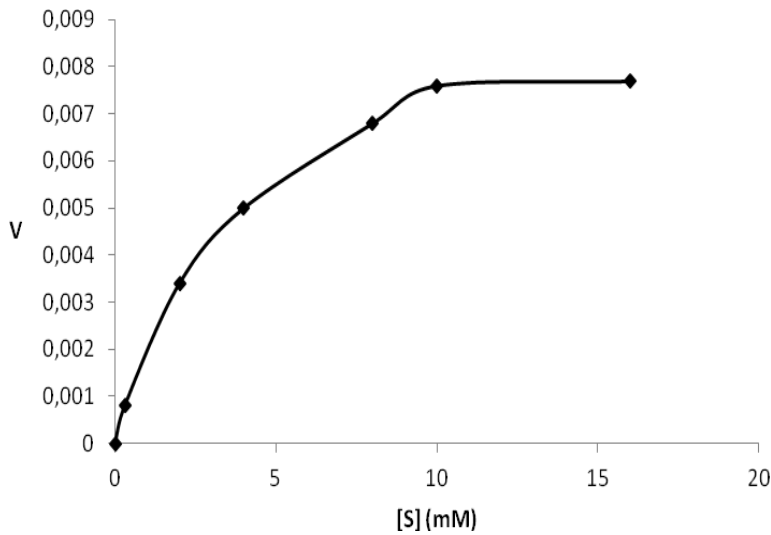


Şekil 4.8. Kafeik asit substratının optimum sıcaklık grafiği

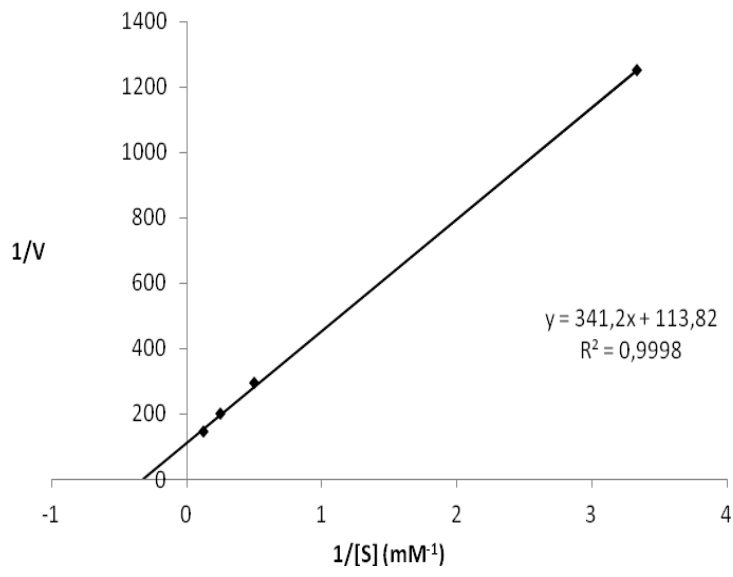
4.1.3. Enzim kinetiği

Eflatun çiçekli ballıbaba bitkisinden elde edilen PPO enzimi için kinetik çalışmalar 4-metil katekol, katekol, pirogallol ve kafeik asit substratları için yapılmıştır. Kinetik çalışmalarda enzim aktivitesi ölçümleri spektrofotometrik olarak değişen substrat varlığında, 420 nm’de yapılmıştır.

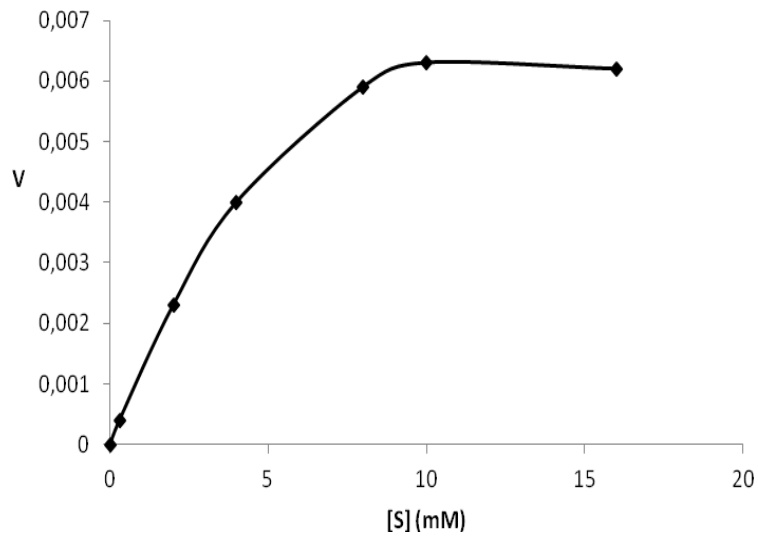
Michealis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) değerlerinin belirlenmesi için önce substrat doygunluk eğrileri (Şekil 4.9, 4.11, 4.13, 4.15) çizilmiştir ve bu grafikten Lineweaver-Burk grafiğine (Şekil 4.10, 4.12, 4.14, 4.16) geçilip hesaplamalar yapılmış ve sonuçlar Tablo 4.1’de verilmiştir.



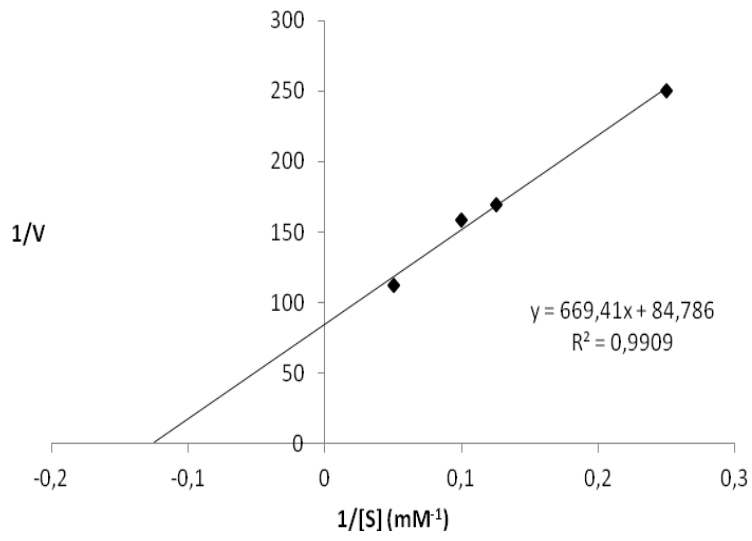
Şekil 4.9. 4-metil katekol substratı için substrat doygunluk eğrisi



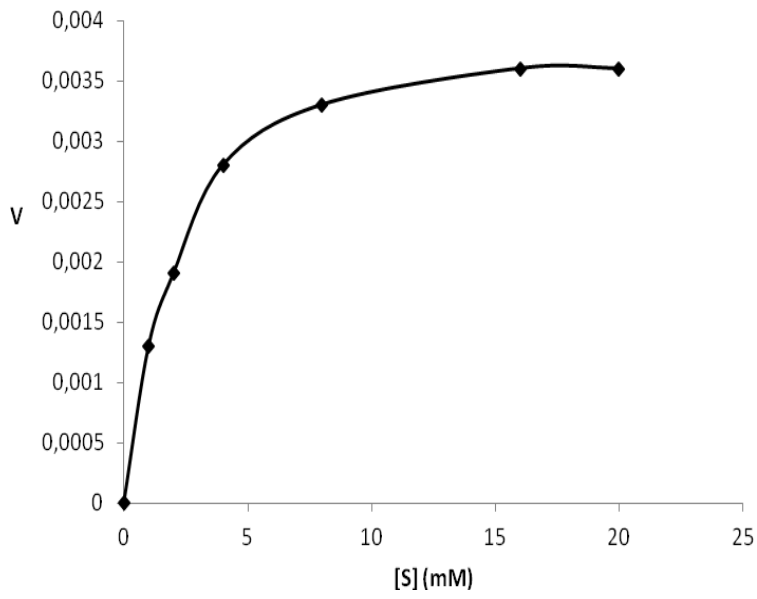
Şekil 4.10. 4-metil katekol substratı için Lineweaver-Burk grafiği



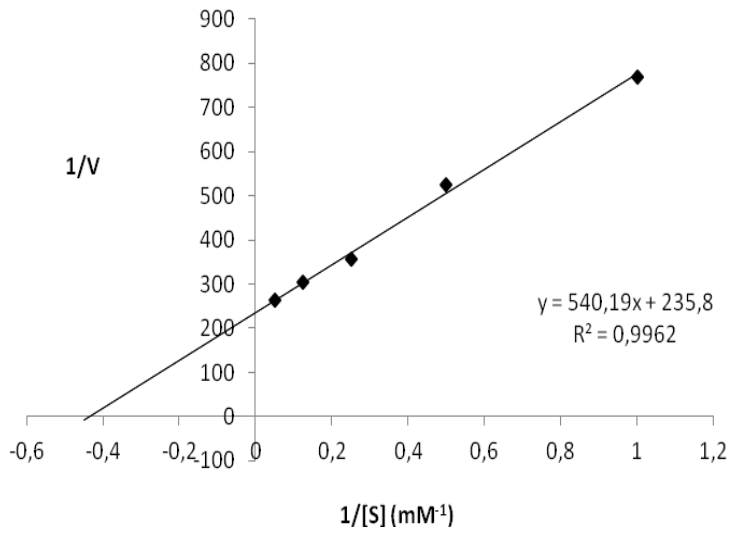
Şekil 4.11. Katekol substratı için substrat doyunluk eğrisi



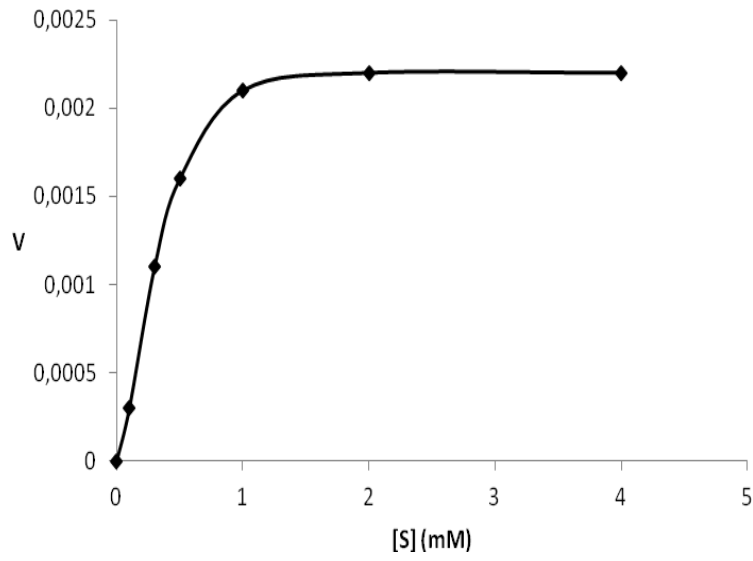
Şekil 4.12. Katekol substratı için Lineweaver-Burk grafiği



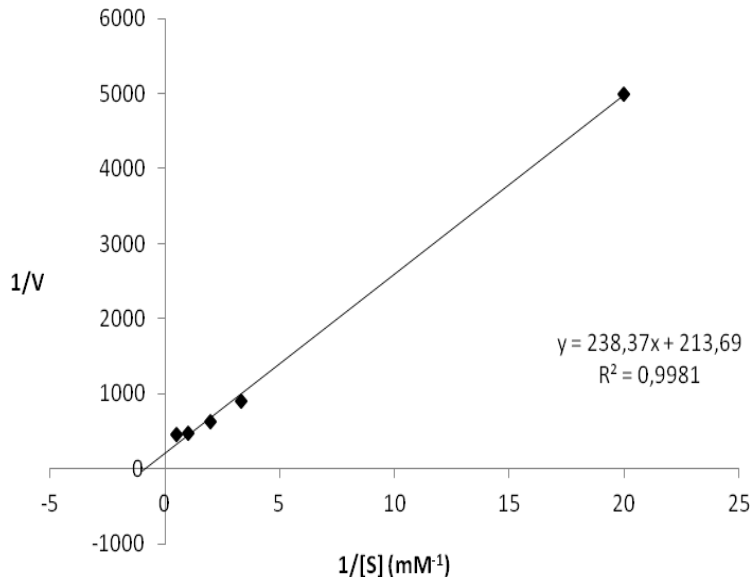
Şekil 4.13. Pirogallol substratı için substrat doygunluk eğrisi



Şekil 4.14. Pirogallol substratı için Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.15. Kafeik asit substratı için substrat doygunluk eğrisi



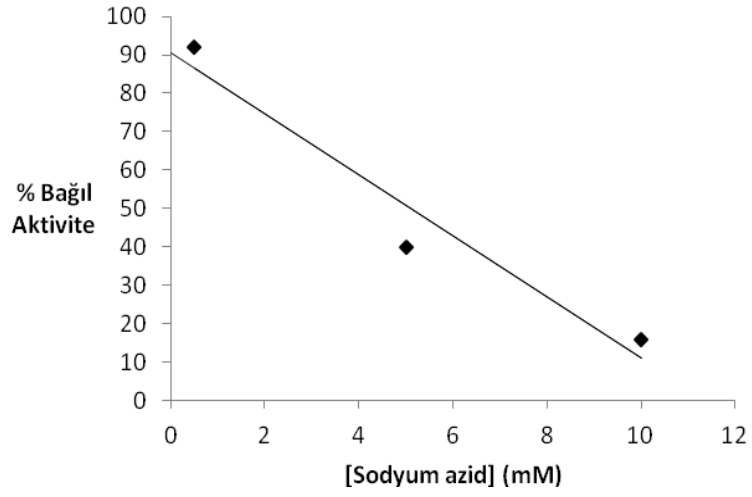
Şekil 4.16. Kafeik asit substratı için Lineweaver-Burk grafiği

Tablo 4.1. PPO enziminin substrat spesifikliğı ile ilgili sonuçlar

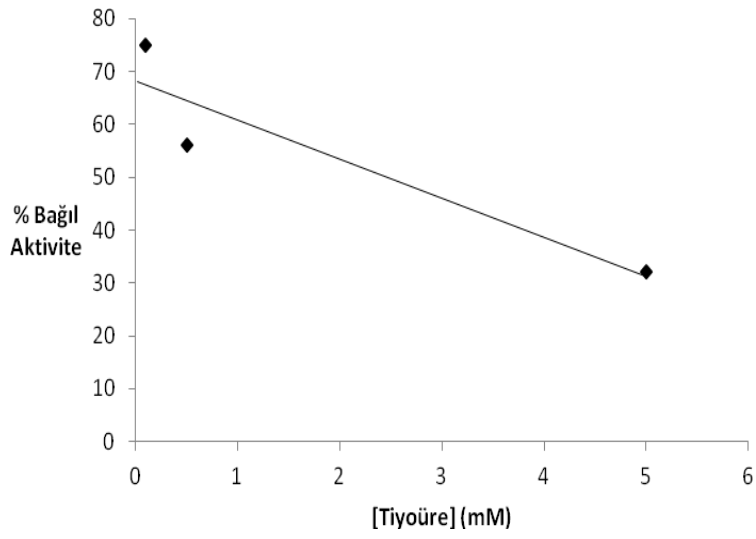
Substrat	Optimum pH	Optimum		
		Sıcaklık (°C)	K _M (mM)	V _{max} (EU/dk)
4-metil katekol	7,5	10	2,9977	0,0087
Katekol	7,5	20	7,8952	0,0117
Pirogallol	8,0	20	2,2908	0,0042
Kafeik Asit	6,0	20	1,1154	0,0046

4.1.4. İnhibitör etkisi

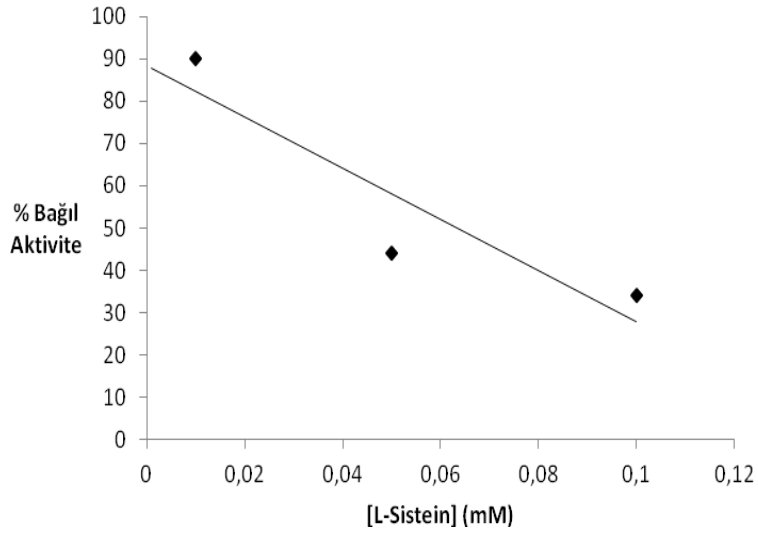
Yapılan çalışmada substrat olarak 4-metil katekol kullanılarak sodyum azid, tiyoüre, L-Sistein, askorbik asit, sitrik asit, benzoik asit, 2-merkapt etanol olmak üzere toplam 7 adet inhibitörün etkisi incelenmiştir. Elde edilen grafiklerden (Şekil 4.17, 4.18, 4.19, 4.20, 4.21, 4.22, 4.23) her bir inhibitör için I₅₀ değerleri hesaplanarak Tablo 4.2’de verilmiştir.



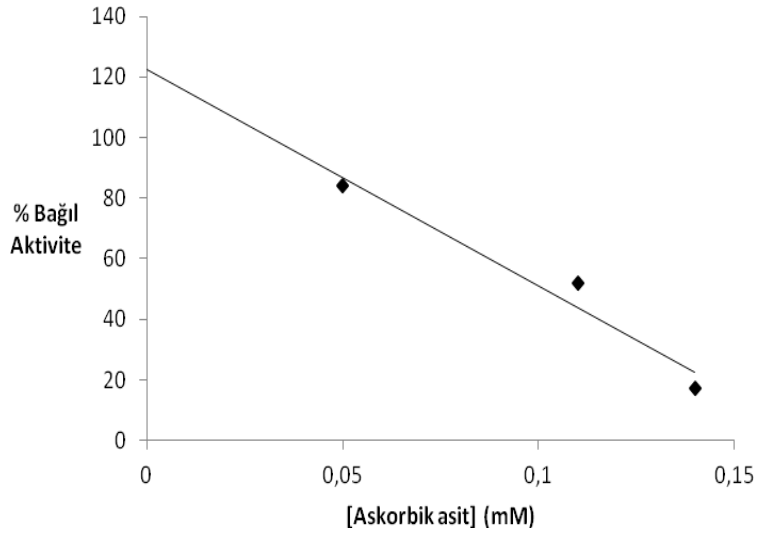
Şekil 4.17. Ballıbaba PPO enzimi üzerine sodyum azid etkisi



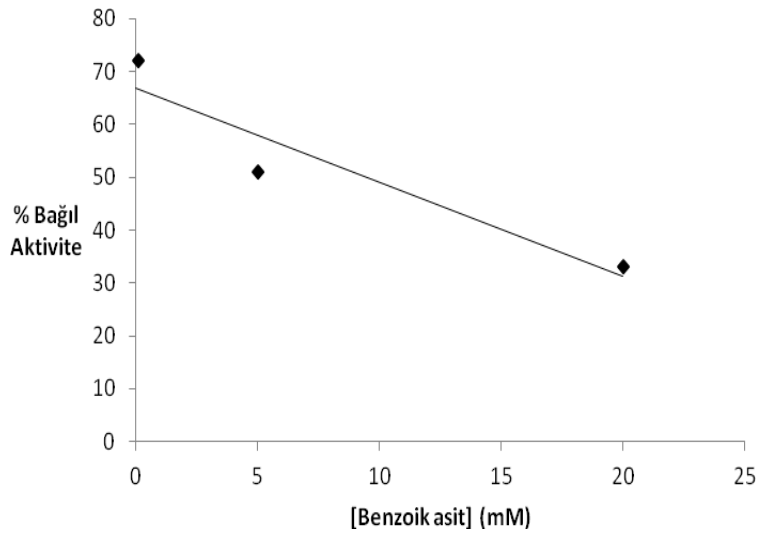
Şekil 4.18. Ballıbaba PPO enzimi üzerine tiyüre etkisi



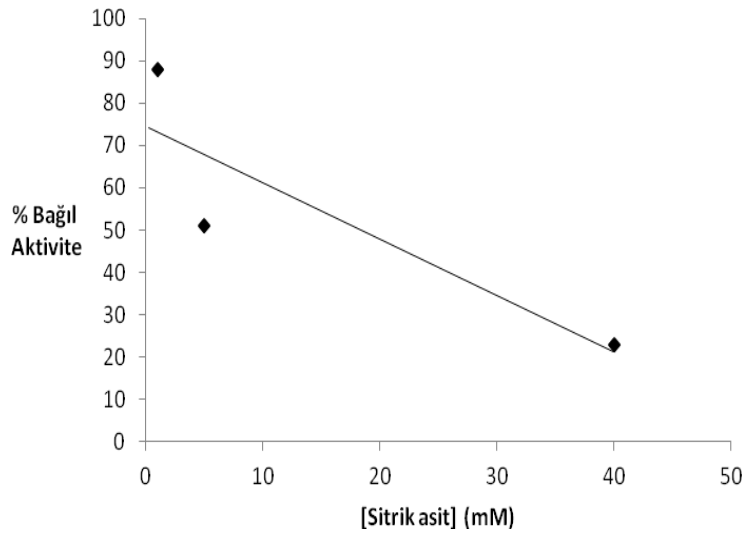
Şekil 4.19. Ballıbabada PPO enzimi üzerine L-Sistein etkisi



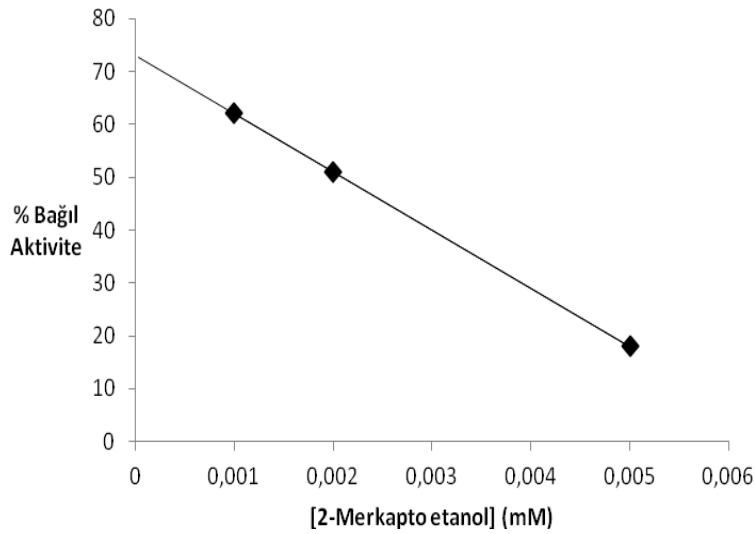
Şekil 4.20. Ballıbabada PPO enzimi üzerine askorbik asit etkisi



Şekil 4.21. Ballıbaba PPO enzimi üzerine benzoik asit etkisi



Şekil 4.22. Ballıbaba PPO enzimi üzerine sitrik asit etkisi



Şekil 4.23. Ballıbaba PPO enzimi üzerine 2-Merkapto etanol etkisi

Tablo 4.2. Ballıbaba PPO enzimi üzerine etki eden inhibitörlerin I_{50} değerleri

İnhibitör	I_{50}(mM)
Sodyum azid	5,4742
Tiyüire	3,4650
L-Sistein	0,0663
Askorbik asit	0,0966
Benzoik asit	13,3836
Sitrik asit	24,3629
2-Merkapto etanol	0,00275

4.1.5. Metal etkisi

Çeşitli metal iyonlarının Eflatun çiçekli ballıbaba bitkisinden ekstrakte edilen PPO enzimi üzerine etkisini incelemek amacıyla yapılan bu çalışma bölüm 3.3.6.2.'de anlatıldığı gibi sabit substrat ve enzim konsantrasyonlarında, 14 farklı metal varlığında enzim aktivitesi ölçülerek yapılmıştır.

1 mM, 5 mM, 10 mM metal konsantrasyonlarında çalışılmıştır. Metal varlığında gerçekleştirilen aktivite değerleri metalsiz ortamda gerçekleştirilen kontrol reaksiyonu ile karşılaştırılmış ve % kalan aktivite değerleri Tablo 4.3’de verilmiştir.

Tablo 4.3. Ballıbaba PPO enzimi üzerine metallerin etkisi

	PPO % Kalan Aktivite		
Kontrol	100	100	100
	Metal Konsantrasyon (mM)		
Metaller	1 mM	5 Mm	10 Mm
Al⁺²	41,17	35,29	35,29
Ba⁺²	58,82	52,94	35,29
Ca⁺²	29,41	23,52	0
Cd⁺²	35,29	35,29	35,29
Cu⁺²	35,29	41,17	47,05
Fe⁺³	35,29	35,29	17,64
K⁺¹	41,17	35,29	35,29
Li⁺¹	58,82	29,41	23,52
Mg⁺²	52,94	52,94	52,94
Mn⁺²	29,41	23,52	23,52
Na⁺¹	47,05	41,17	41,05
Ni⁺²	29,41	35,29	47,05
Pb⁺²	23,52	29,41	17,64
Hg⁺²	600,00	3117,64	3541,17

4.1.6. Amino asit etkisi

Eflatun çiçekli ballıbaba bitkisinden ekstrakte edilen PPO enzimi üzerine etki eden toplam 8 amino asit bölüm 3.3.6.3.’de anlatıldığı gibi sabit substrat ve enzim konsantrasyonlarında çalışılmıştır.

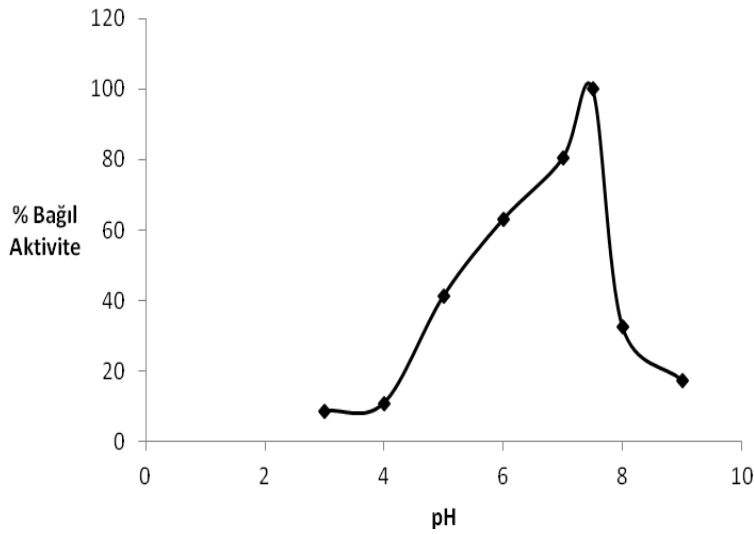
L-Histidin, L-Glutamik asit, L-Treonin, L-Lisin, L-Arginin, L-Aspartik asit, L-Prolin, L-Fenilalanin çözeltilerinden 0,5 mM, 1 mM, 5 mM alınarak enzim aktivitesindeki etkisi incelenmiştir. İncelemeler sonucu amino asitlerin 0,5, 1, 5 mM konsantrasyonlarındaki kalan aktivite yüzdeleri hesaplanmış ve Tablo 4.4' de verilmiştir.

Tablo 4.4. Ballıba PPO enzimi üzerine amino asitlerin etkisi

PPO % Kalan Aktivite			
Amino asit	Amino asit Konsantrasyon (mM)		
	0,5 mM	1 mM	5 mM
Kontrol	100	100	100
L-Arginin	88,23	88,35	88,35
L-Aspartik asit	88,23	88,23	88,35
L-Fenilalanin	100	94,11	94,11
L-Glutamik asit	117,64	111,76	88,23
L-Histidin	111,76	111,76	105,88
L-Lisin	147,05	129,41	111,76
L-Prolin	123,52	105,88	76,47
L-Treonin	94,11	94,11	88,23

4.1.7. Enzimin pH toleransı

PPO enziminin pH toleransını belirlemek amacıyla enzim bölüm 3.3.7' de anlatıldığı gibi pH değerleri 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 7,5, 8,0, 9,0 olan tampon çözeltilerde +4 °C'de 1,5 saat boyunca inkübe edilerek, 3 mM 4-metil katekol substratları varlığında enzim aktivitesine bakılmıştır. Elde edilen sonuçlar kontrol reaksiyon sonucu ile karşılaştırılarak % bağıl aktiviteleri hesaplanarak Şekil 4.24'de gösterilmiştir.



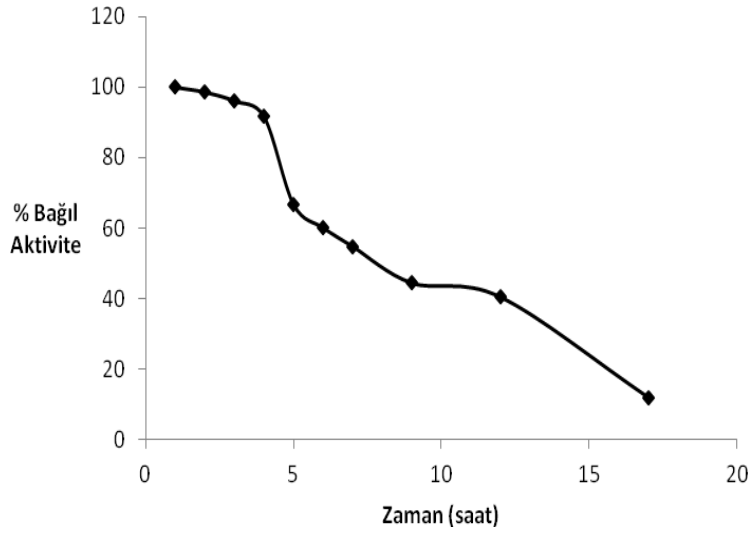
Şekil 4.24. Ballıbaba PPO enzimi için pH tolerans grafiği

4.1.8. Enzim depolanma kararlılığı

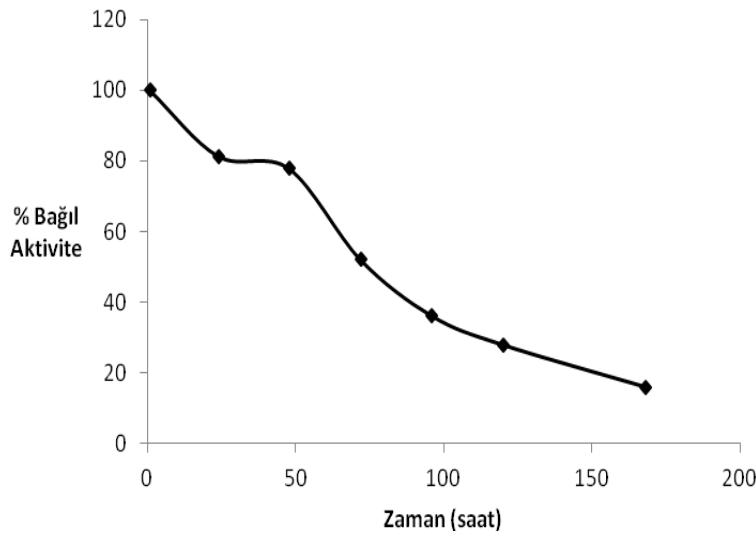
Bölüm 3.3.8.'de anlatıldığı gibi enzimin oda sıcaklığında ve +4 °C'de depolama süresince kararlılığını incelemek amacı ile 3 mM 4-metil katekol substratı ile oda sıcaklığında 1-2 saatte bir ölçüm alınırken, +4 °C' de 1-2 günde bir ölçüm alınmıştır. Her biri için enzimin % bağıl aktivitesi hesaplanmıştır.

Oda sıcaklığında yapılan depolama kararlılığı çalışması sonucunda, PPO enziminin bağıl aktivitesi ilk 5 saatte hızla azalarak % 66,67'ye düşmüştür. 12. saatte % 40,47 aktivite gösterirken bu değer 17. saatte % 12' ye düşmüştür (Şekil 4.25).

+4 °C' de ise PPO enziminin bağıl aktivitesi ilk 24 saatte % 81,36' ya düşmüştür. 72. saatte % 52 olan aktivite, 120. saatte % 27,91' e, 168. saatte de % 16' ya düşmüştür (Şekil 4.26).



Şekil 4.25. Ballıbaba PPO enziminin oda sıcaklığındaki aktivitesinin zamanla değişimi



Şekil 4.26. Ballıbaba PPO enziminin +4 °C'deki aktivitesinin zamanla değişimi

4.2. PPO Enziminin Bazı Taşıyıcılara İmmobilizasyonu

4.2.1. İmmobilizasyon koşullarının optimizasyonu

Enzimin adsorpsiyon ile immobilizasyonu için 2'şer ml pH 3,0 sitrat tamponu, pH 7,0 fosfat tamponu, pH 9 tris tamponu alınarak 0,1'er gram immobilizasyon materyali (CHT, CTS, HAP) ve her birine aynı miktarda enzim çözeltisi koyularak 1,5 saat karıştırılmıştır. Süre sonunda saf su yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.

Enzimin kovalent bağlama yöntemi ile immobilizasyonunda ise anlatılan işleme ek olarak 100µL gluteraldehit kullanılmıştır. Sonuçlar hesaplanarak aktiviteler EU/gr dk olarak Tablo 4.5’de verilmiştir. Sonuçlara göre her bir materyal için aktivite değeri en yüksek olan yöntem standart olarak kabul edilmiştir. Buna göre; CHT için pH 7,0 ortamında adsorpsiyon ile, CTS için pH 3,0 ortamında adsorpsiyon ile, HAP için pH 9,0 ortamında kovalent bağlama ile adsorpsiyon yöntemleri standart olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.5. İmmobilizasyon yönteminin belirlenmesi için sonuç tablosu

	Adsorpsiyon ile İmmobilizasyon			Kovalent Bağlama ile İmmobilizasyon		
	Aktivite EU/gr dk			Aktivite EU/gr dk		
	pH 3	pH 7	pH 9	pH 3	pH 7	pH 9
CHT	139,45	360,81	158,49	116,47	278,33	304,61
CTS	489,37	196,65	30,19	168,81	12,00	44,19
HAP	343,94	384,43	336,57	325,83	342,00	732,78

Koşulların optimizasyonu için ayrıca optimum enzim miktarının belirlenmesi için çalışma yapılmıştır. Bu amaçla, materyallerden biri seçilerek (HAP) belirlenen standart immobilizasyon yönteminde 100µL, 200µL, 300µL ve 400µL enzim çözeltileri kullanılarak immobilizasyon gerçekleştirilmiş, kullanılması gereken optimum enzim miktarı belirlenmiştir.

Sonuçlar hesaplanarak aktiviteler EU/gr dk olarak Tablo 4.6’da verilmiştir. Sonuçlara göre immobilizasyon için 300 µL enzim çözeltisi kullanmaya karar verilmiştir.

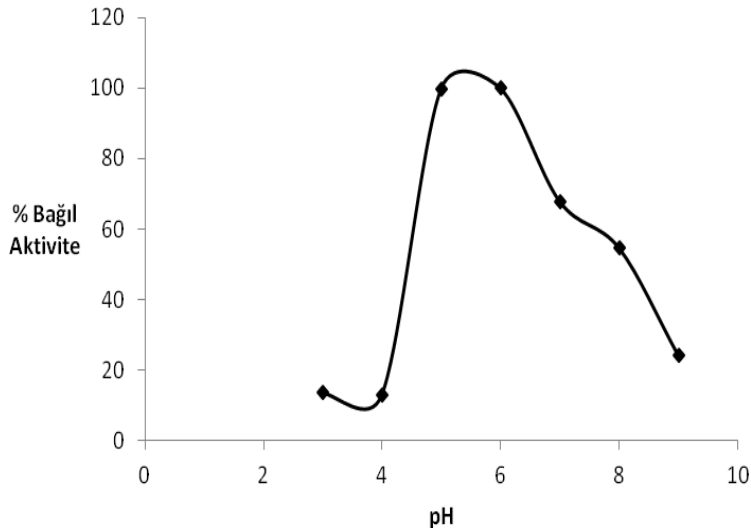
Tablo 4.6. Enzim miktarının belirlenmesi için sonuç tablosu

Enzim miktarı (μL)	Aktivite EU/gr dk
100	454,85
200	514,73
300	595,51
400	593,57

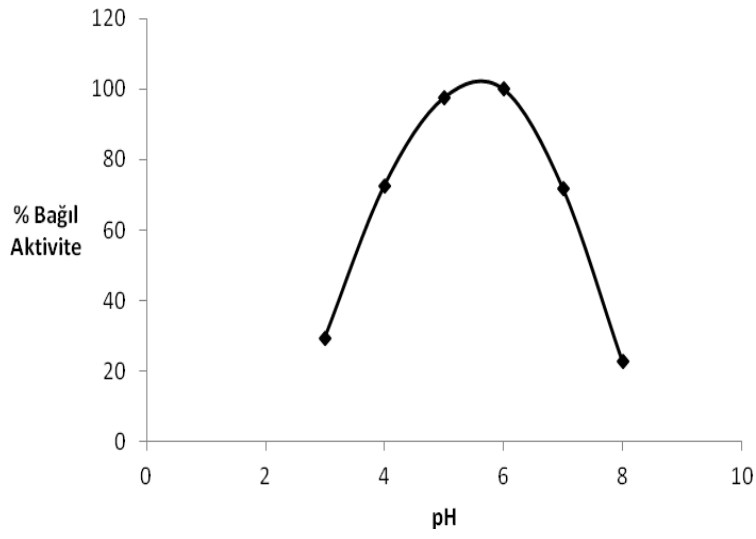
4.2.2. İmmobilize enzimin karakterizasyonu

4.2.2.1. pH etkisi

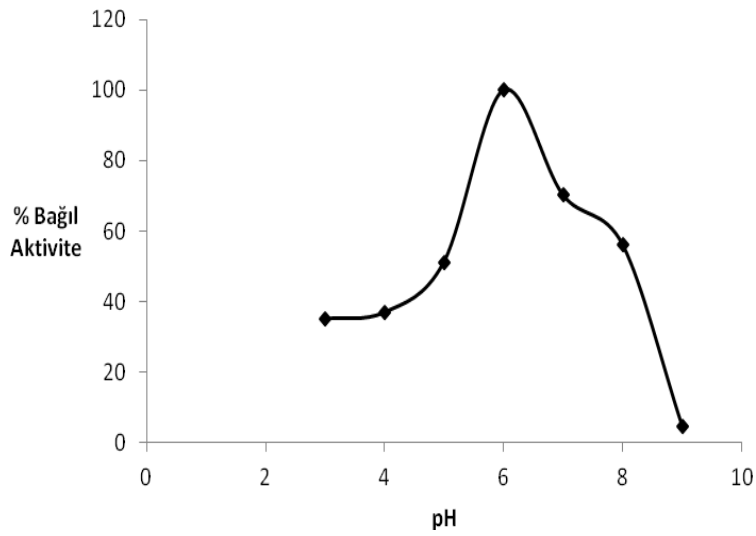
İmmobilize PPO enziminin aktivitesine pH etkisi, 3,0 ile 9,0 arasında değişen pH'larda hazırlanmış tamponlar ile 4 farklı substrat kullanılarak (4-metil katekol, katekol, pirogallol, kafeik asit) belirlenmiştir. Her üç materyale (CHT, CTS, HAP) enzim immobilizasyonu yapılarak sonuçlar EU/gr dk olarak hesaplanıp pH -%Bağıl aktivite grafikleri çizilmiştir.



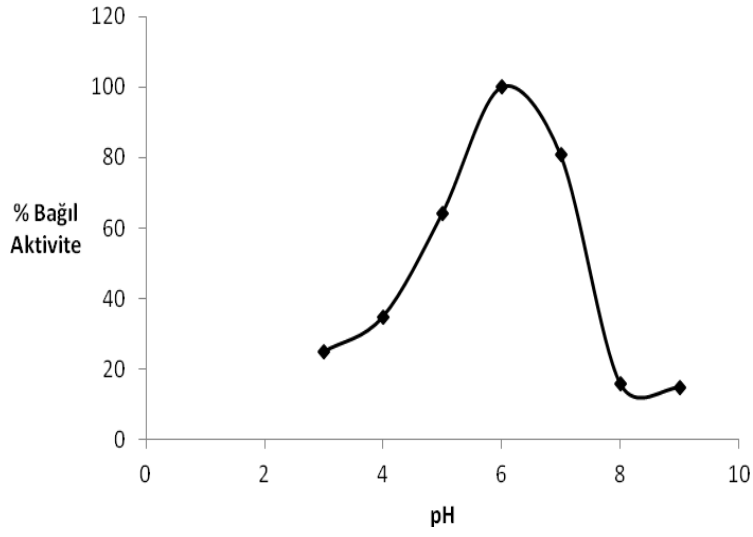
Şekil 4.27. CHT'e immobilize edilen enzimin 4-metil katekol substratı için optimum pH grafiği



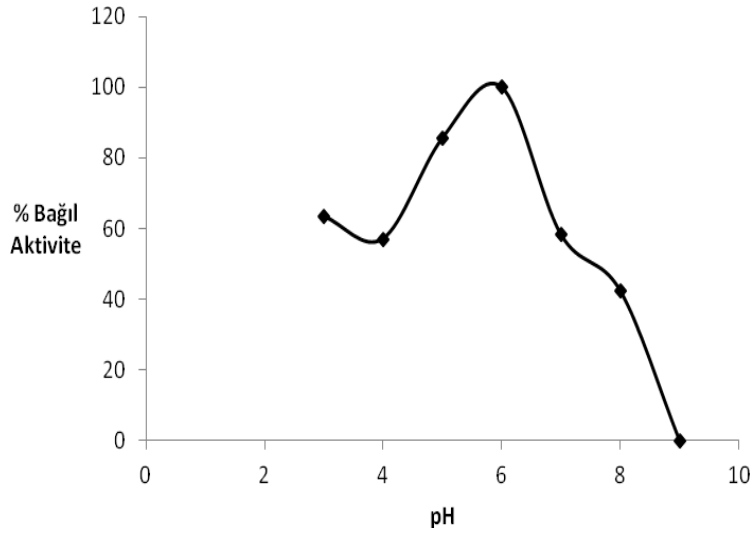
Şekil 4.28. CHT'e immobilize edilen enzimin katekol substratı için optimum pH grafiği



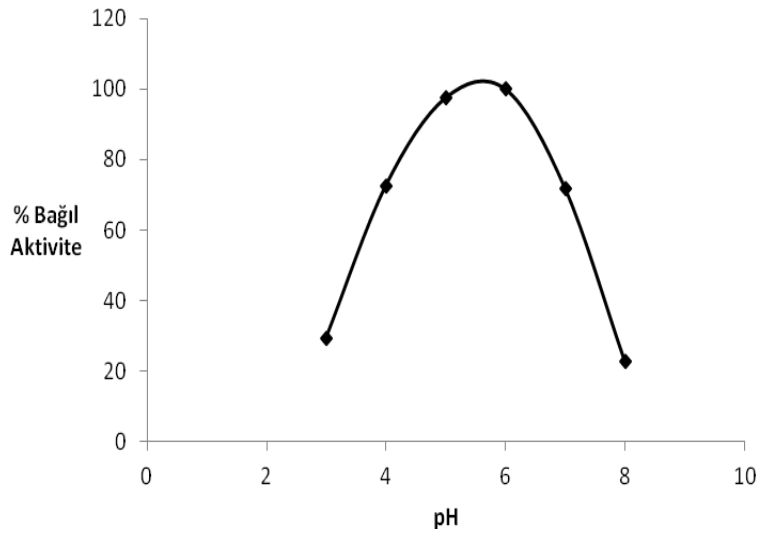
Şekil 4.29. CHT'e immobilize edilen enzimin pirogallol substratı için optimum pH grafiği



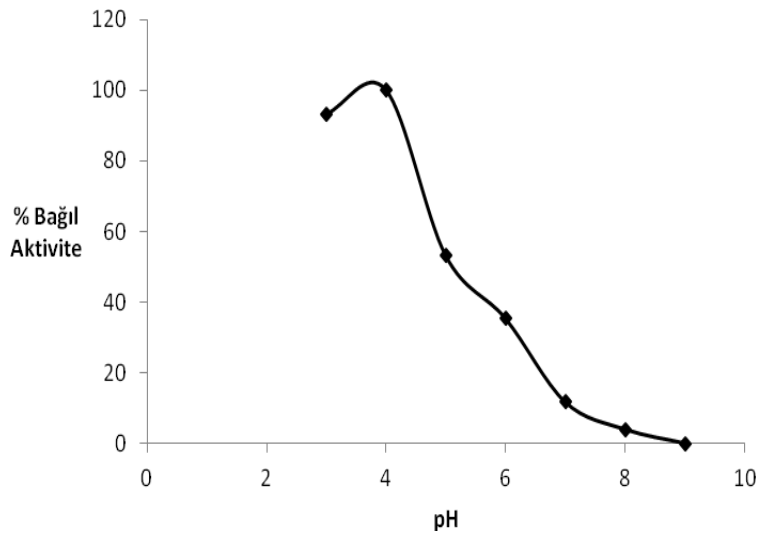
Şekil 4.30. CHT'e immobilize edilen enzimin kafeik asit substratı için optimum pH grafiği



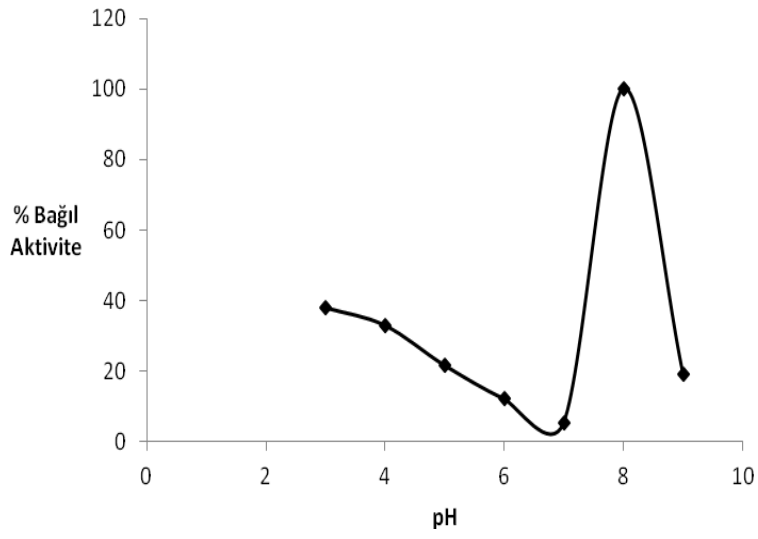
Şekil 4.31. CTS'a immobilize edilen enzimin 4-metil katekol substratı için optimum pH grafiği



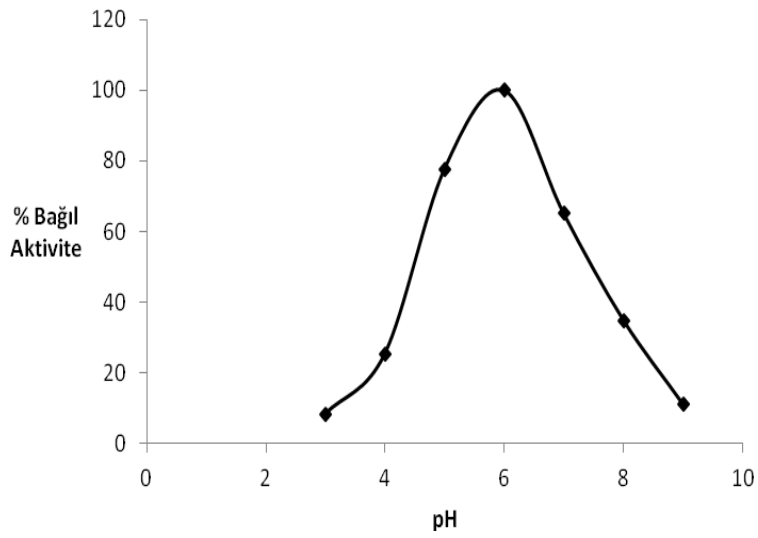
Şekil 4.32. CTS'a immobilize edilen enzimin katekol substratı için optimum pH grafiği



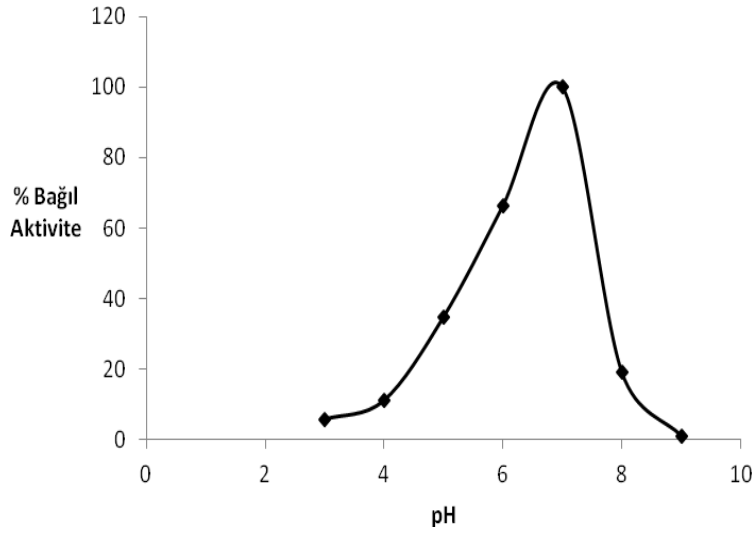
Şekil 4.33. CTS'a immobilize edilen enzimin pirogallol substratı için optimum pH grafiği



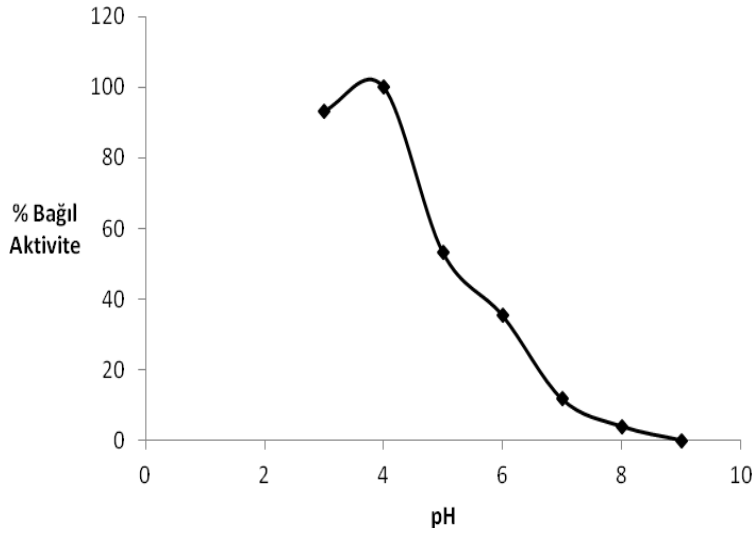
Şekil 4.34. CTS'a immobilize edilen enzimin kafeik asit substratı için optimum pH grafiği



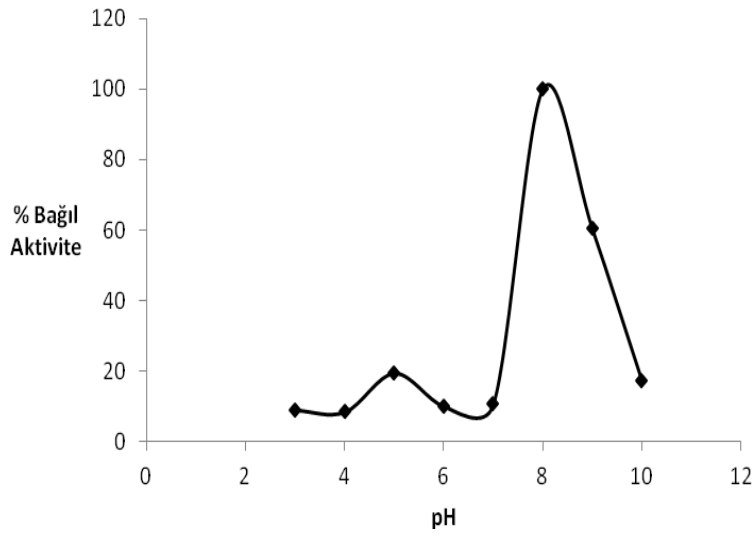
Şekil 4.35. HAP'e immobilize edilen enzimin 4-metil katekol substratı için optimum pH grafiği



Şekil 4.36. HAP'e immobilize edilen enzimin katekol substratı için optimum pH grafiği



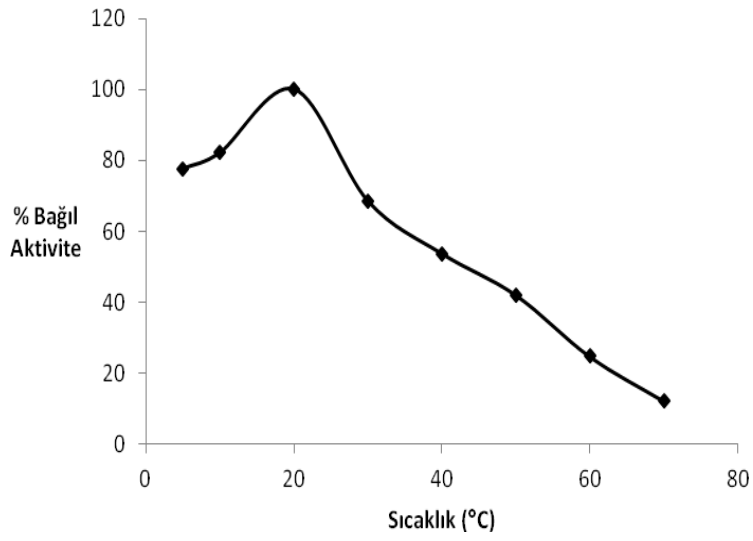
Şekil 4.37. HAP'e immobilize edilen enzimin pirogallol substratı için optimum pH grafiği



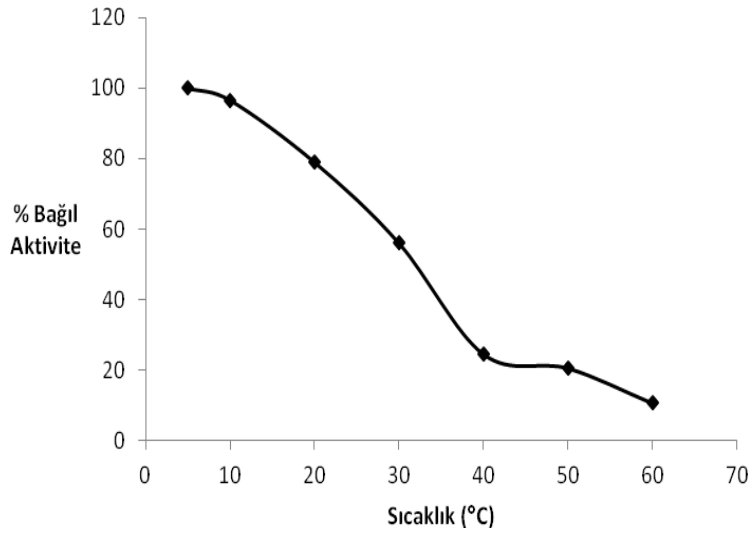
Şekil 4.38. HAP'e immobilize edilen enzimin kafeik asit substratı için optimum pH grafiği

4.2.2.2. Sıcaklık etkisi

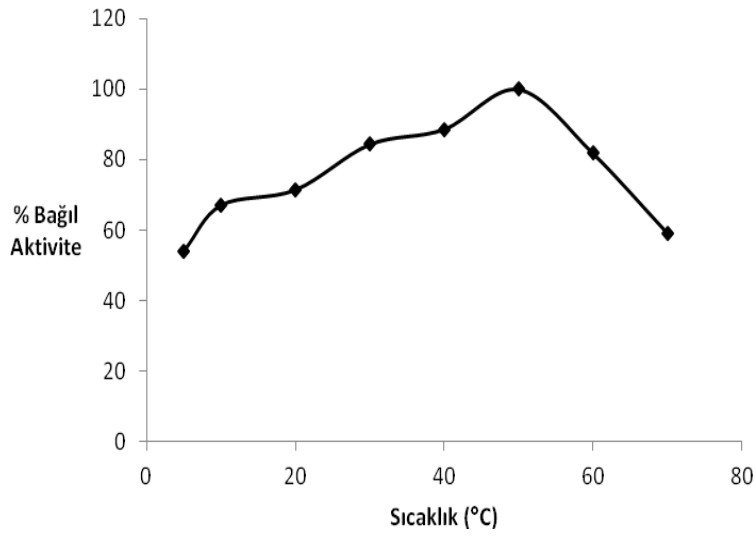
İmmobilize PPO enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 °C' lerde enzim aktivitesine bakılmıştır. Bu amaçla immobilize enzim için standart alınan ölçüm yöntemi kullanılarak sonuçlar EU/gr dk olarak hesaplanmıştır. Enzimin aktivite gösterdiği tüm substratlar (4-metil katekol, katekol, pirogallol, kafeik asit) için optimum sıcaklık çalışması yapılarak grafikler çizilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.7'de verilmiştir. Her substrat 3 mM konsantrasyonunda kullanılmıştır.



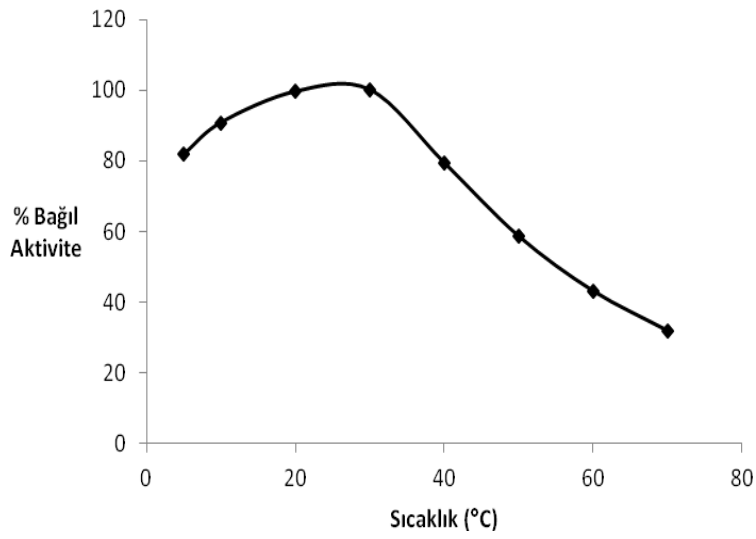
Şekil 4.39. CHT'e immobilize edilen enzimin 4-metil katekol substratı için optimum sıcaklık grafiği



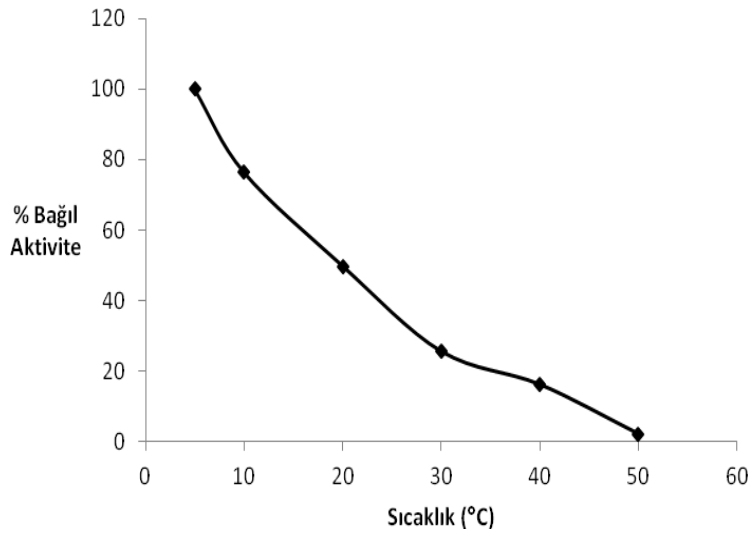
Şekil 4.40. CHT'e immobilize edilen enzimin katekol substratı için optimum sıcaklık grafiği



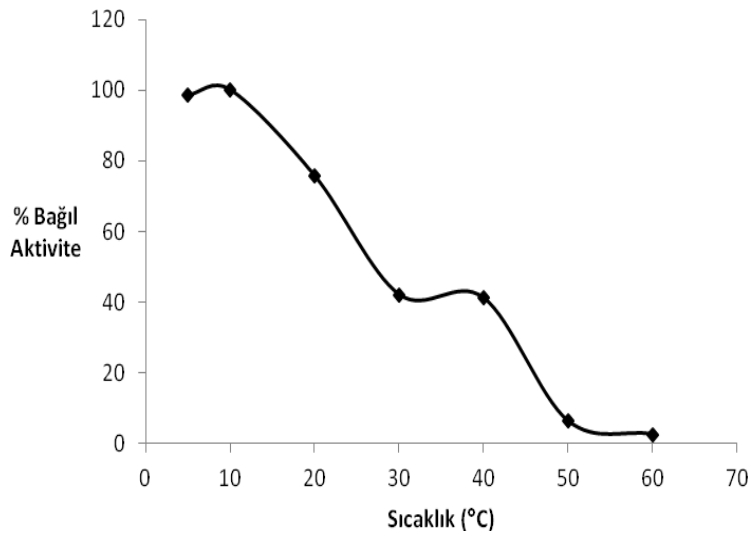
Şekil 4.41. CHT'e immobilize edilen enzimin pirogallol substratı için optimum sıcaklık grafiği



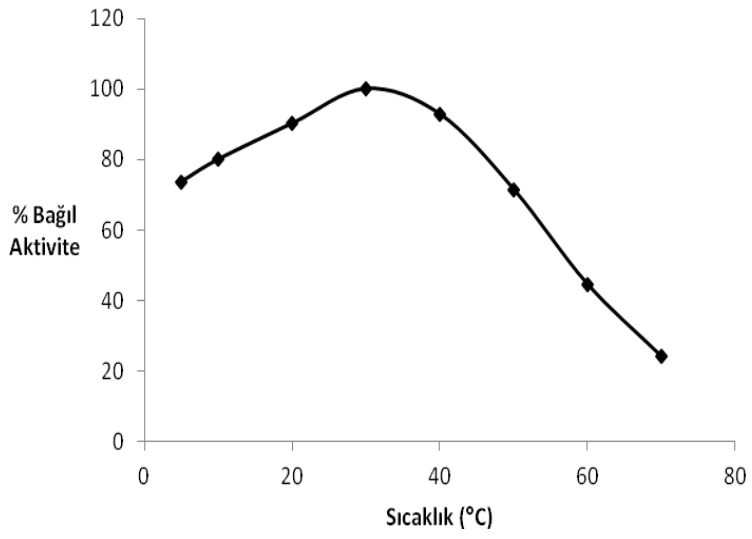
Şekil 4.42. CHT'e immobilize edilen enzimin kafeik asit substratı için optimum sıcaklık grafiği



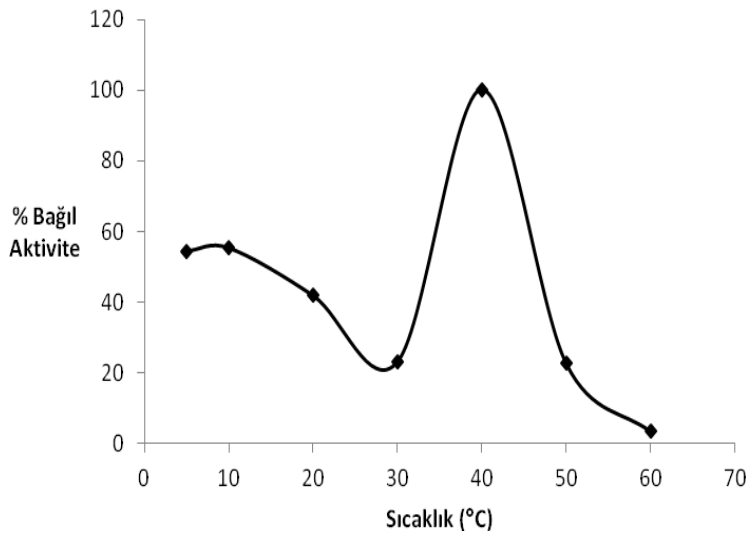
Şekil 4.43. CTS'a immobilize edilen enzimin 4-metil katekol substratı için optimum sıcaklık grafiği



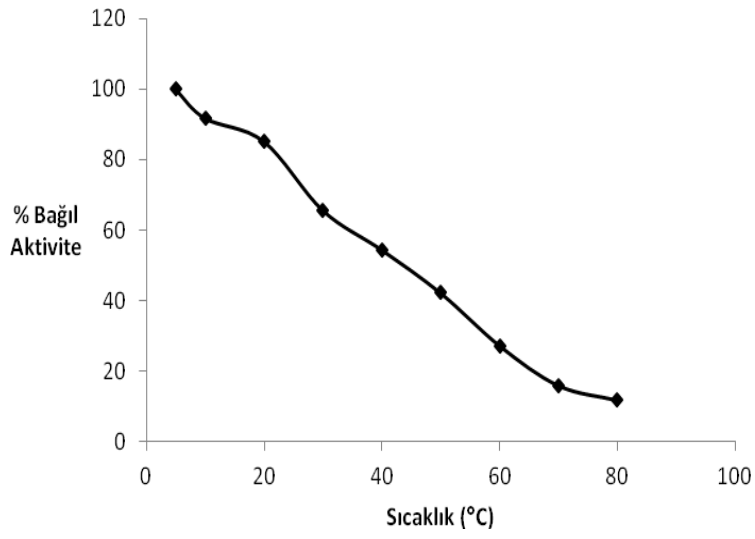
Şekil 4.44. CTS'a immobilize edilen enzimin katekol substratı için optimum sıcaklık grafiği



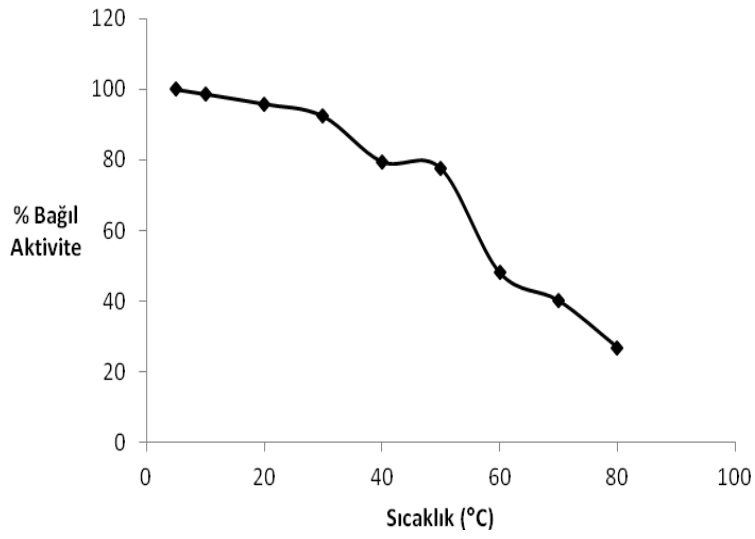
Şekil 4.45. CTS'a immobilize edilen enzimin pirogallol substratı için optimum sıcaklık grafiği



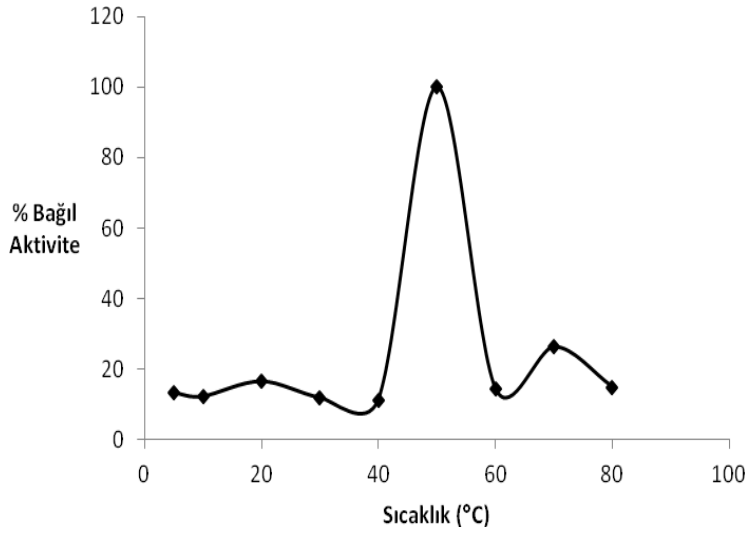
Şekil 4.46. CTS'a immobilize edilen enzimin kafeik asit substratı için optimum sıcaklık grafiği



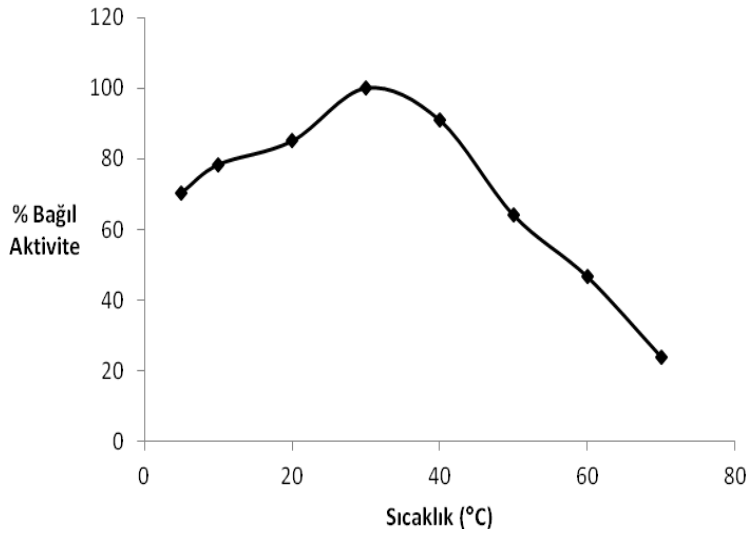
Şekil 4.47. HAP'e immobilize edilen enzimin 4-metil katekol substratı için optimum sıcaklık grafiği



Şekil 4.48. HAP'e immobilize edilen enzimin katekol substratı için optimum sıcaklık grafiği



Şekil 4.49. HAP'e immobilize edilen enzimin pirogallol substratı için optimum sıcaklık grafiği



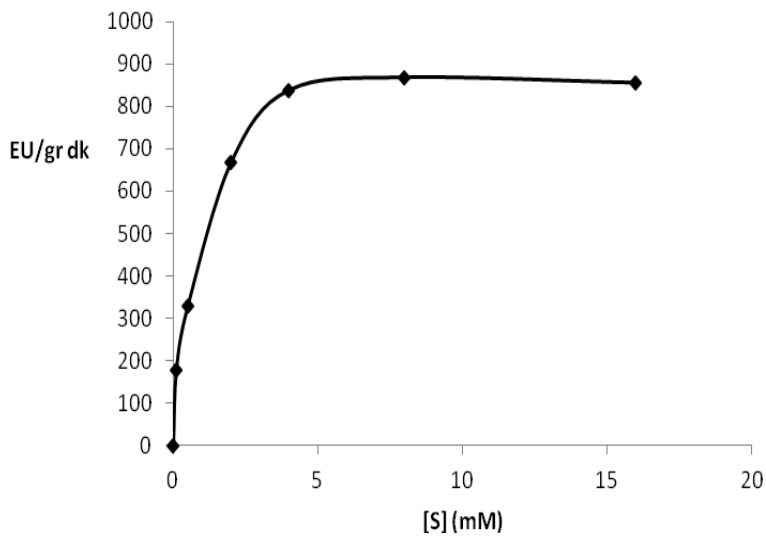
Şekil 4.50. HAP'e immobilize edilen enzimin kafeik asit substratı için optimum sıcaklık grafiği

Tablo 4.7. İmmobilize enzimin optimum sıcaklık ve pH değerleri

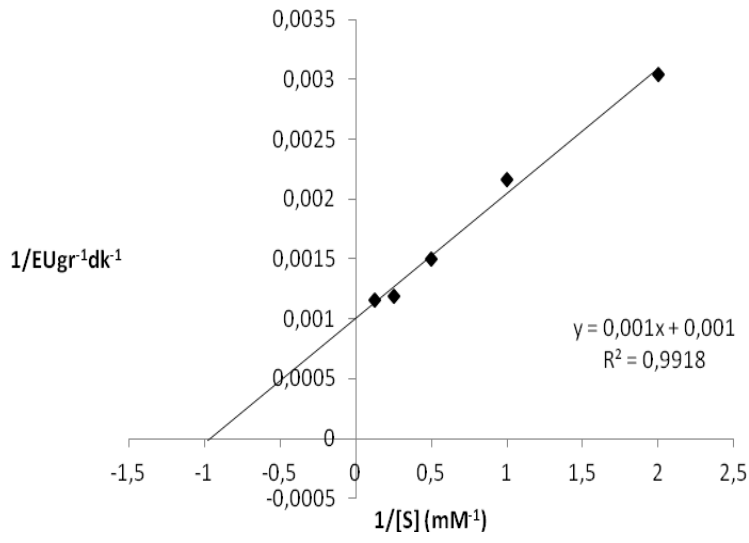
	Optimum Sıcaklık (°C)				Optimum pH			
	4-metil katekol	Katekol	Pirogallol	Kafeik asit	4-metil katekol	Katekol	Pirogallol	Kafeik asit
CHT	20	5	50	30	6,0	7,0	6,0	6,0
CTS	5	10	30	40	6,0	5,0	4,0	8,0
HAP	5	5	50	30	6,0	7,0	8,0	6,0

4.2.2.3. Enzim kinetiği

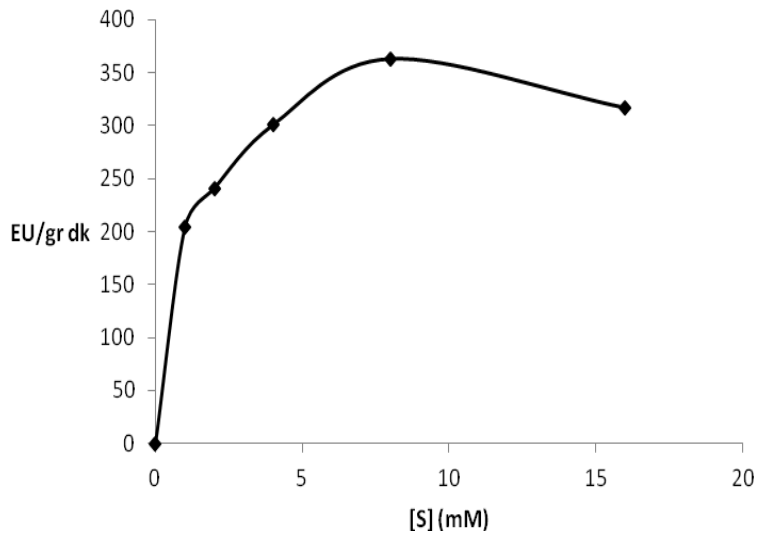
İmmobilize enzimin V_{max} ve K_M değerlerinin bulunması için kinetik çalışmalarda konsantrasyonları 0,001 mM ile 16 mM arasında değişen substrat çözeltileri hazırlanmıştır. Her bir materyale immobilize enzimin V_{max} ve K_M değerlerinin belirlenmesi çizilen substrat doygunluk grafikleri aşağıda verilmiştir. Hesaplanan EU/gr dk değerleri Lineweaver-Burk grafiğinde ($1/V$ 'ye karşı $1/[S]$) şeklinde yerine konularak K_M ve V_{max} değerleri bulunmuştur ve kinetik sonuçları Tablo 4.8'de verilmiştir.



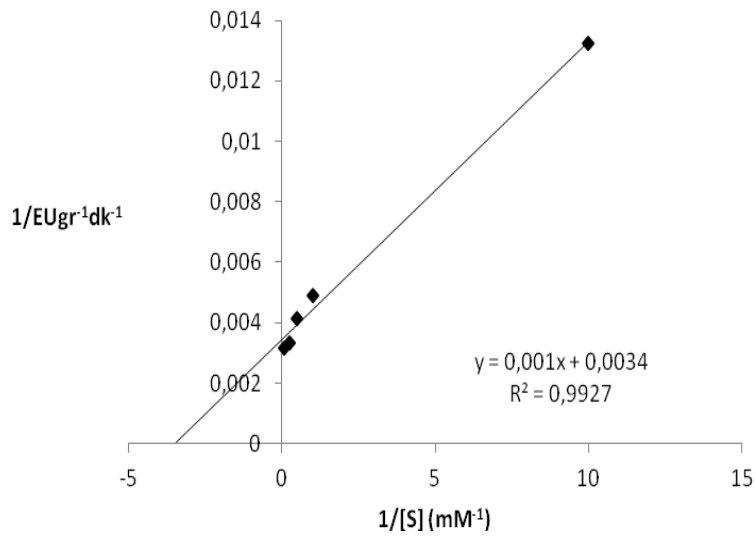
Şekil 4.51. CHT'e immobilize edilen enzimin 4-metil katekol substratı için substrat doygunluk eğrisi



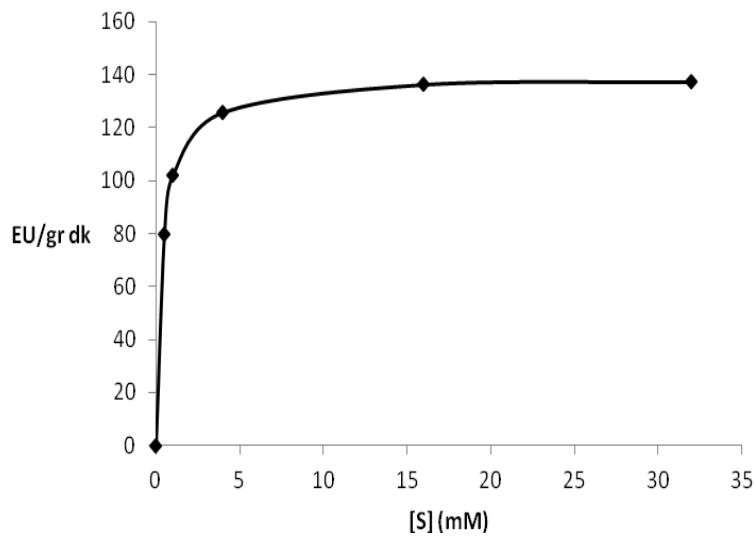
Şekil 4.52. CHT'e immobilize edilen enzimin 4-metil katekol substratı için Lineweaver-Burk grafiği



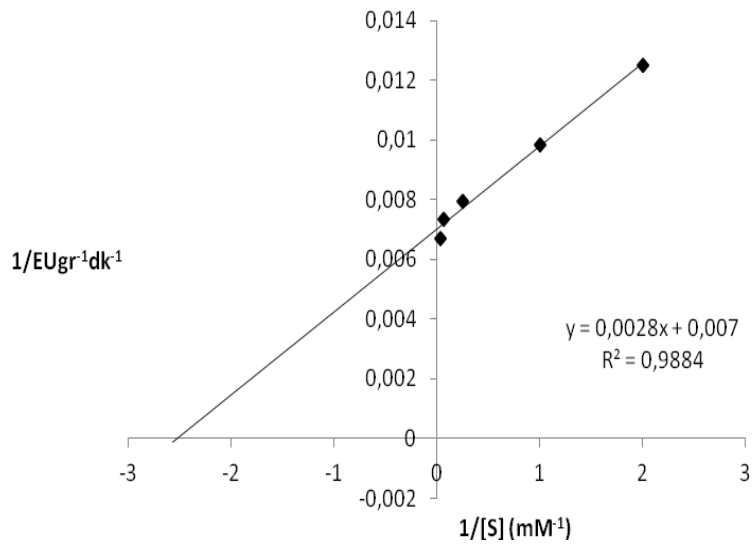
Şekil 4.53. CHT'e immobilize edilen enzimin katekol substratı için substrat doygunluk eğrisi



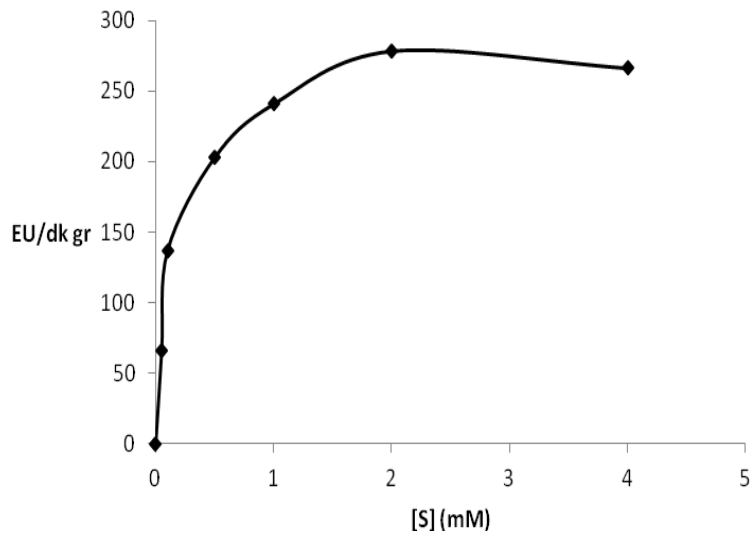
Şekil 4.54. CHT'e immobilize edilen enzimin katekol substratı için Lineweaver-Burk grafiği



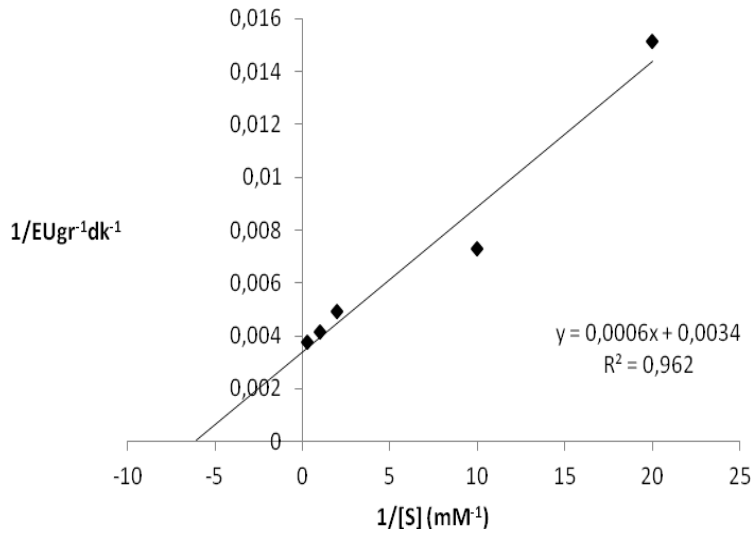
Şekil 4.55. CHT'e immobilize edilen enzimin pirogallol substratı için substrat doygunluk eğrisi



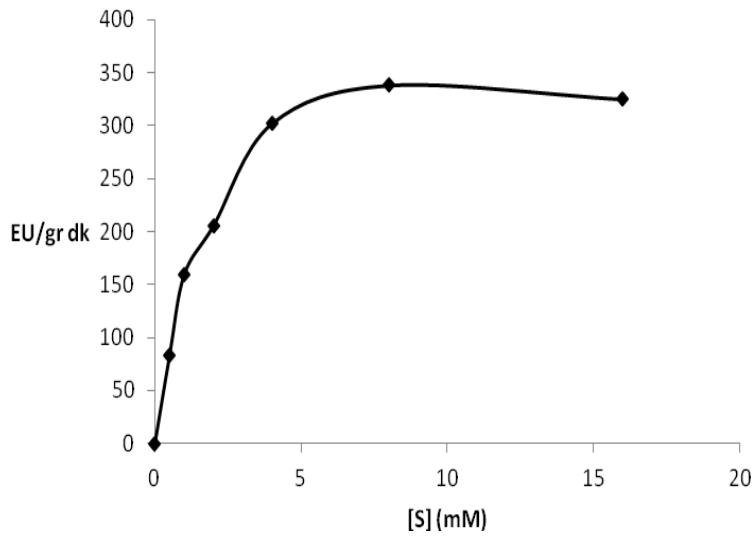
Şekil 4.56. CHT'e immobilize edilen enzimin pirogallol substratı için Lineweaver-Burk grafiği



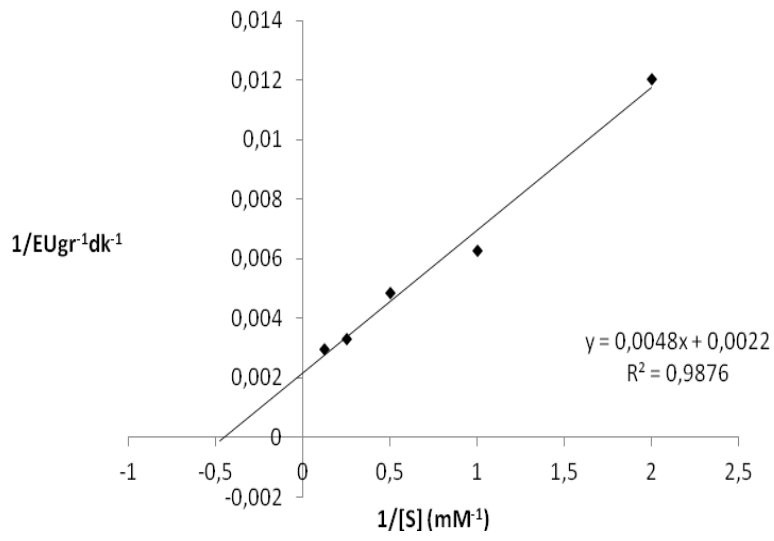
Şekil 4.57. CHT'e immobilize edilen enzimin kafeik asit substratı için substrat doygunluk eğrisi



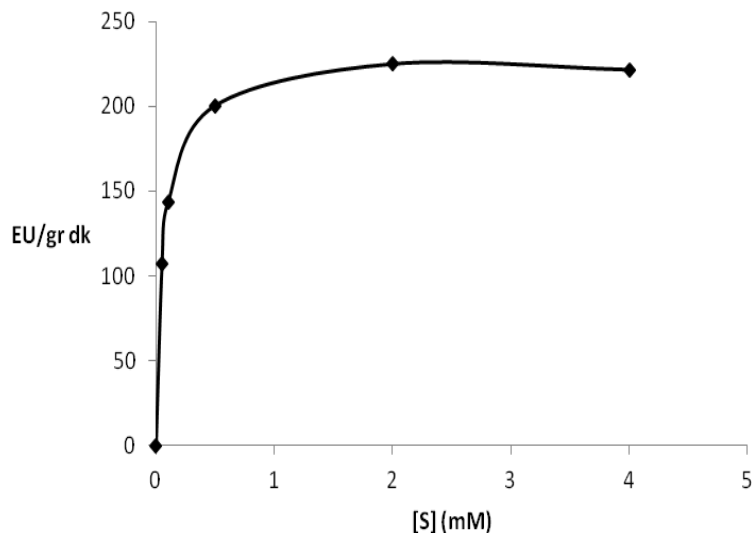
Şekil 4.58. CHT'e immobilize edilen enzimin kafeik asit substratı için Lineweaver-Burk grafiği



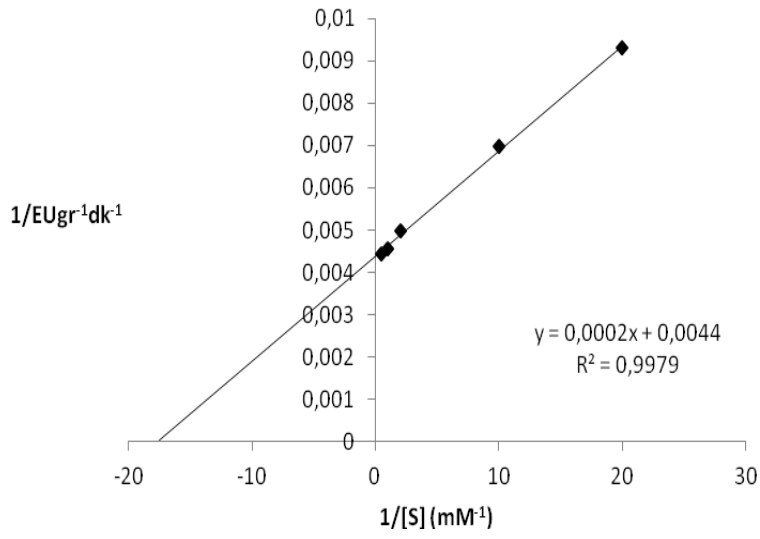
Şekil 4.59. CTS'a immobilize edilen enzimin 4-metil katekol substratı için substrat doygunluk eğrisi



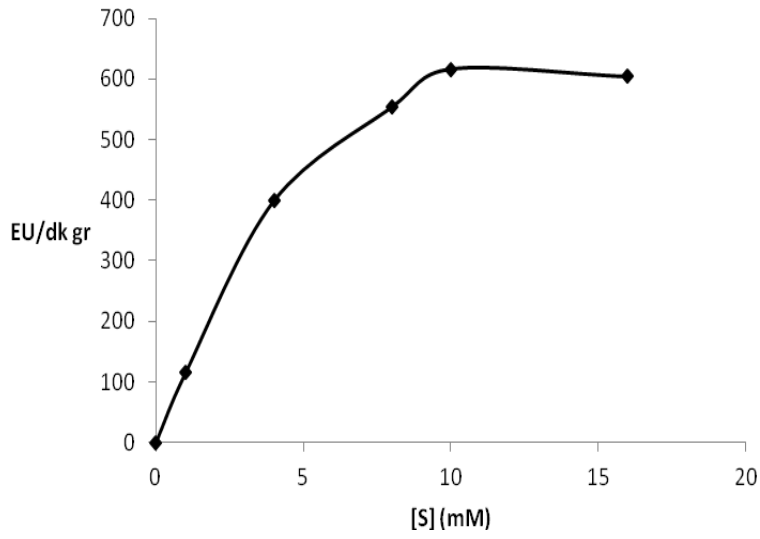
Şekil 4.60. CTS'a immobilize edilen enzimin 4-metil katekol substratı için Lineweaver-Burk grafiği



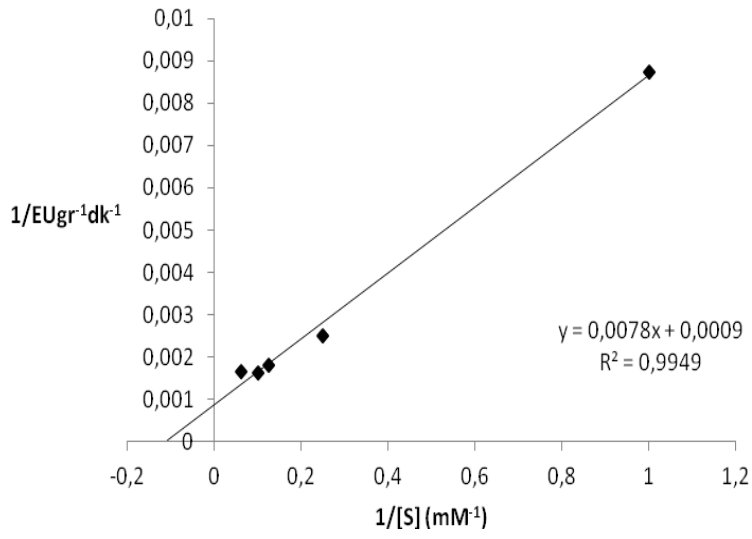
Şekil 4.61. CTS'a immobilize edilen enzimin katekol substratı için substrat doygunluk eğrisi



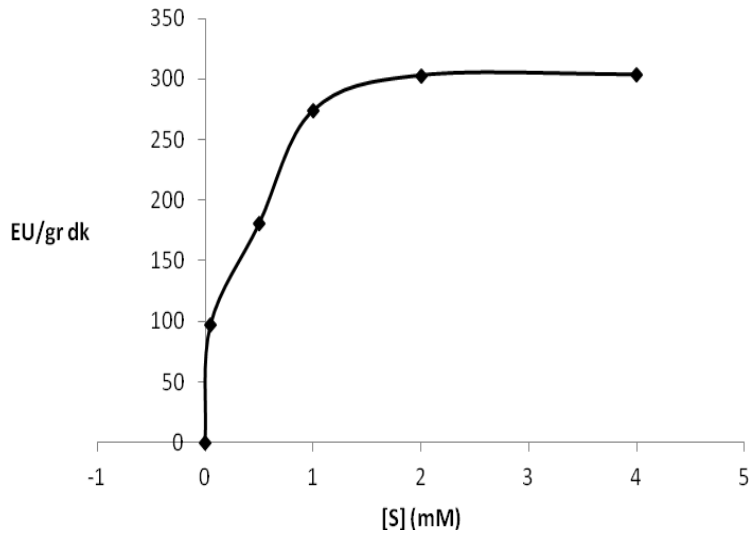
Şekil 4.62. CTS'a immobilize edilen enzimin katekol substratı için Lineweaver-Burk grafiği



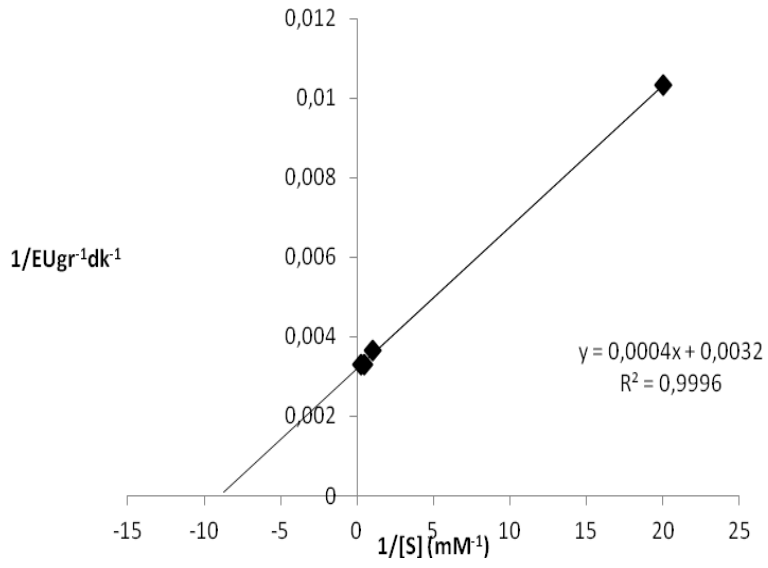
Şekil 4.63. CTS'a immobilize edilen enzimin pirogallol substratı için substrat doygunluk eğrisi



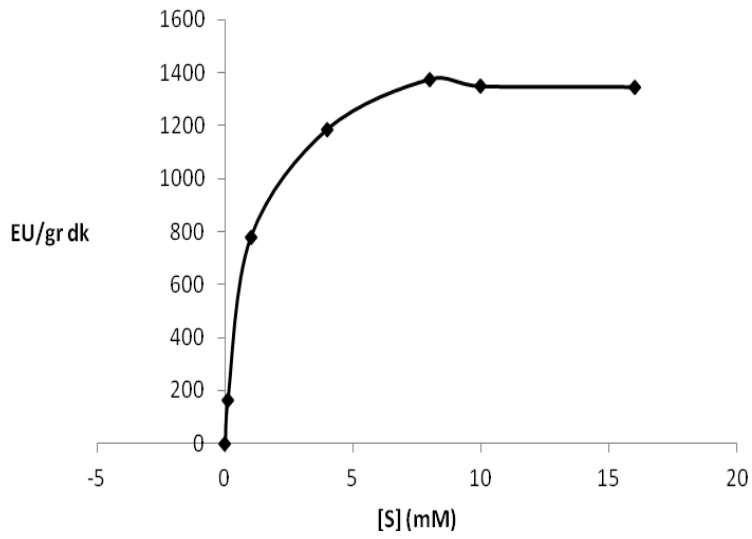
Şekil 4.64. CTS'a immobilize edilen enzimin pirogallol substratı için Lineweaver-Burk grafiği



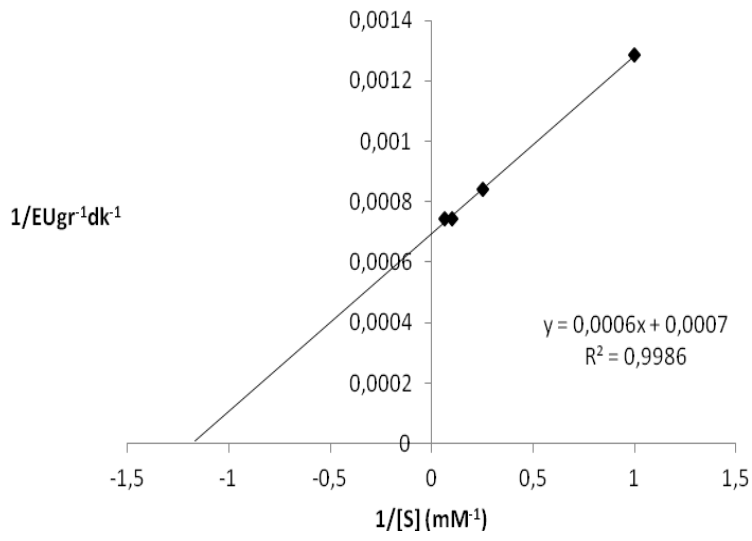
Şekil 4.65. CTS'a immobilize edilen enzimin kafeik asit substratı için substrat doygunluk eğrisi



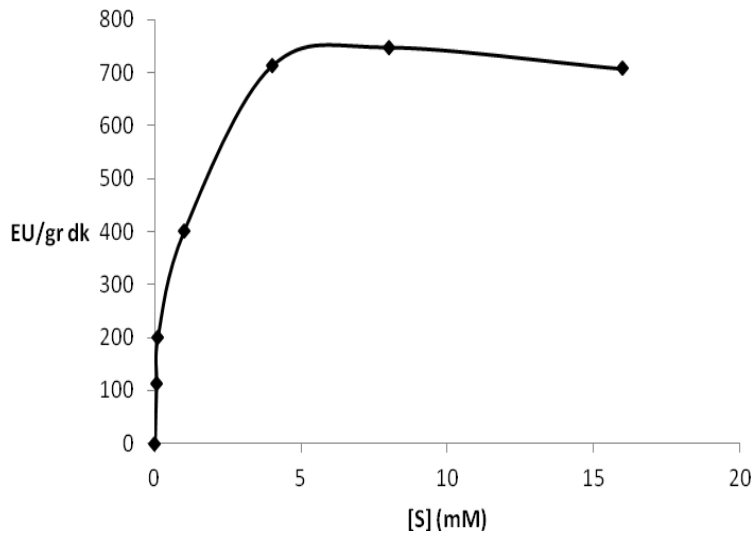
Şekil 4.66. CTS'a immobilize edilen enzimin kafeik asit substratı için Lineweaver-Burk grafiği



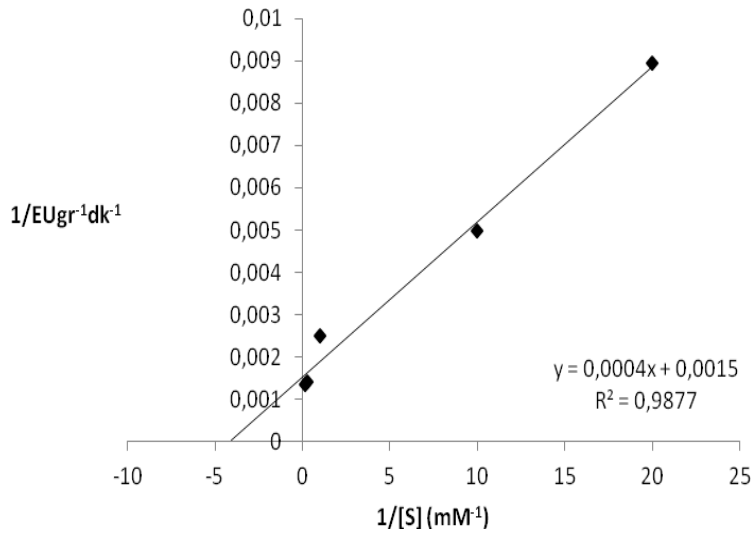
Şekil 4.67. HAP'e immobilize edilen enzimin 4-metil katekol substratı için substrat doygunluk eğrisi



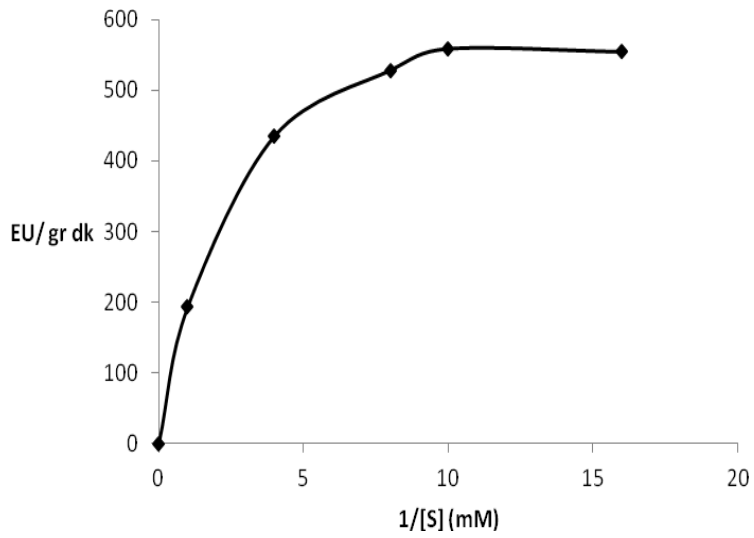
Şekil 4.68. HAP'e immobilize edilen enzimin 4-metil katekol substratı için Lineweaver-Burk grafiği



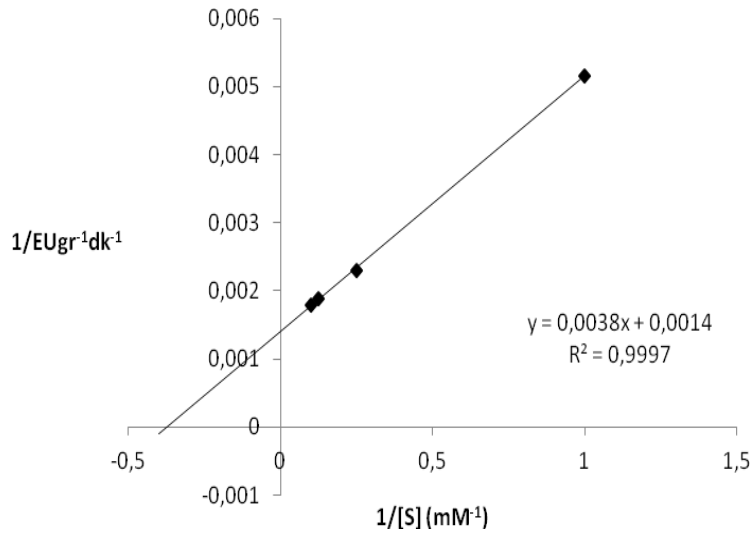
Şekil 4.69. HAP'e immobilize edilen enzimin katekol substratı için substrat doygunluk eğrisi



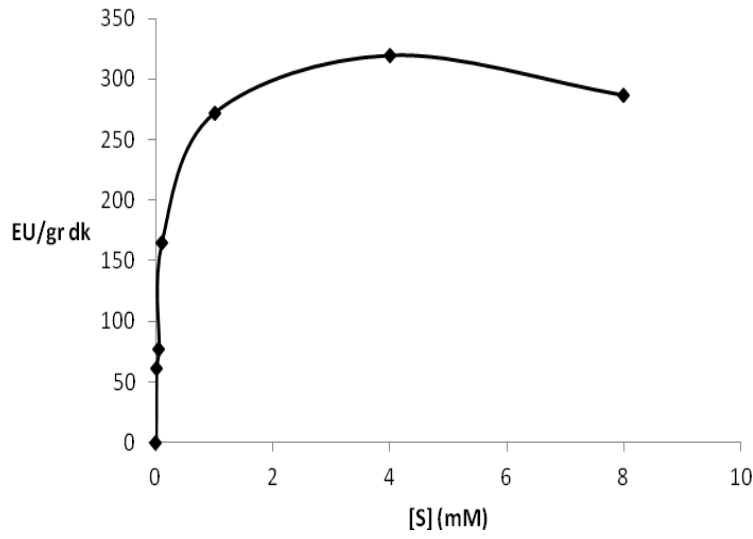
Şekil 4.70. HAP'e immobilize edilen enzimin katekol substratı için Lineweaver-Burk grafiği



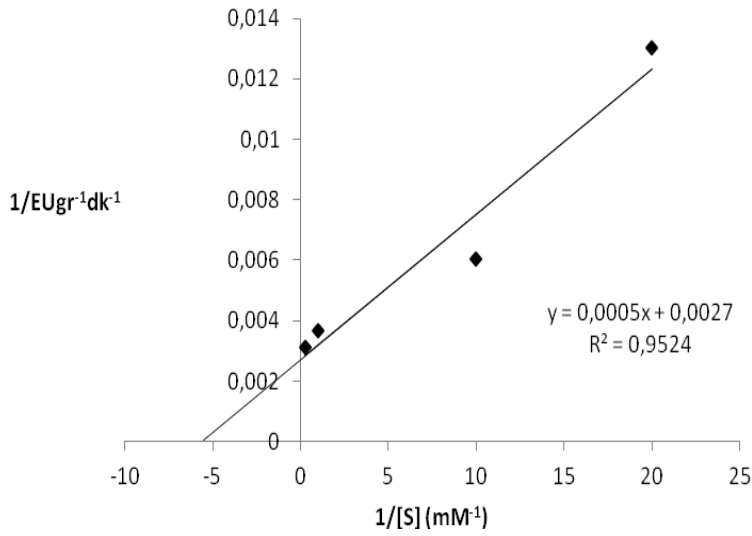
Şekil 4.71. HAP'e immobilize edilen enzimin pirogallol substratı için substrat doygunluk eğrisi



Şekil 4.72. HAP'e immobilize edilen enzimin pirogallol substratı için Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.73. HAP'e immobilize edilen enzimin kafeik asit substratı için substrat doygunluk eğrisi



Şekil 4.74. HAP'e immobilize edilen enzimin kafeik asit substratı için Lineweaver-Burk grafiği

Tablo 4.8. İmmobilize enzimin kinetik sonuçları

	CHT		CTS		HAP	
	K _M (mM)	V _{max} (EU/dk)	K _M (mM)	V _{max} (EU/dk)	K _M (mM)	V _{max} (EU/dk)
4-metil katekol	1,0000	1000	2,1818	454,5454	0,8571	1428,5714
Katekol	0,2941	294,1176	0,0454	227,2727	0,2666	666,6661
Pirogallol	0,4000	142,8571	8,6666	1111,1111	2,7142	714,2857
Kafeik asit	0,1764	294,1176	0,125	312,5	0,1851	370,3703

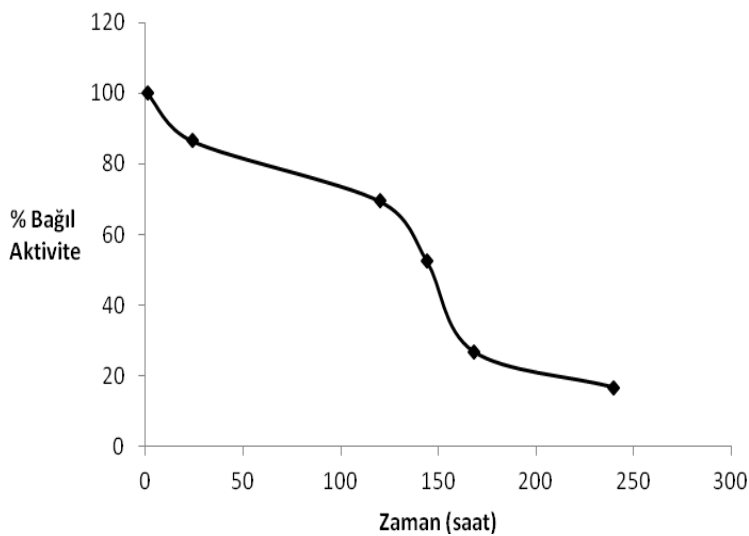
4.2.2.4. Depolama kararlılığı

İmmobilize PPO enziminin depolanma kararlılığı çalışması +4 °C ve ortalama 25 °C olan oda sıcaklığı olmak üzere 2 farklı sıcaklık değerinde yapılmıştır. Depolama kararlılığı çalışması her üç materyale immobilize edilen enzim için bölüm 3.4.2.6' de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Sonuçlar EU/gr dk olarak hesaplanmış, zaman - % bağıl aktivite grafikleri çizilmiştir.

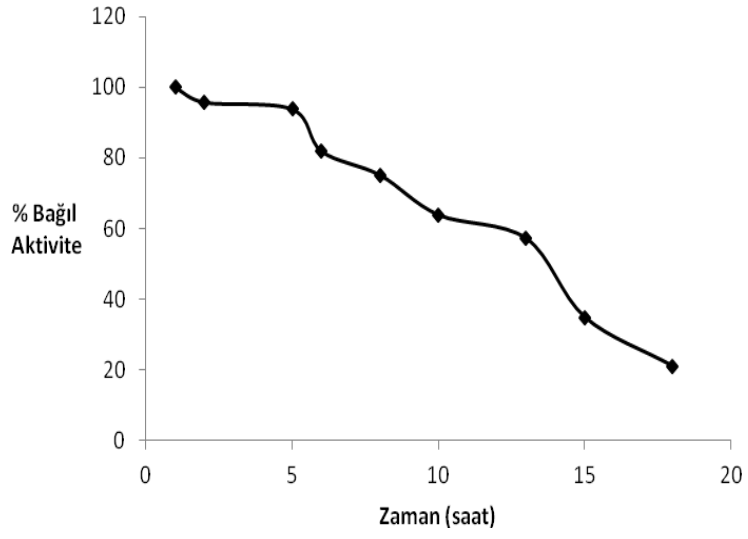
CHT'e immobilize edilen enzim için oda sıcaklığında yapılan depolama kararlılığı çalışması sonucunda, enziminin bağıl aktivitesi ilk 5 saatte büyük oranda korunarak 93,82 olarak ölçülmüştür. 10. saatte % 63,88 aktivite gösterirken bu değer 18. saatte % 21,03'e düşmüştür (Şekil 4.75). +4 °C' de ise enziminin bağıl aktivitesi ilk 24 saatte % 86,5' e düşmüştür. 144. saatte % 52,53 olan aktivite, 240. saatte % 16,7' ye düşmüştür (Şekil 4.76).

CTS'a immobilize edilen enzim için oda sıcaklığında yapılan depolama kararlılığı çalışması sonucunda, enziminin aktivitesi ilk 5 saatte büyük oranda azalarak % 79,51 olarak ölçülmüştür. 10. saatte % 53,88 aktivite gösterirken bu değer 16. saatte % 18,13'e düşmüştür (Şekil 4.77). +4 °C' de ise enziminin bağıl aktivitesi ilk 72 saatte % 87,84' e düşmüştür. 312. saatte % 40,92 olan aktivite, 432. saatte % 18,37' ye düşmüştür (Şekil 4.78).

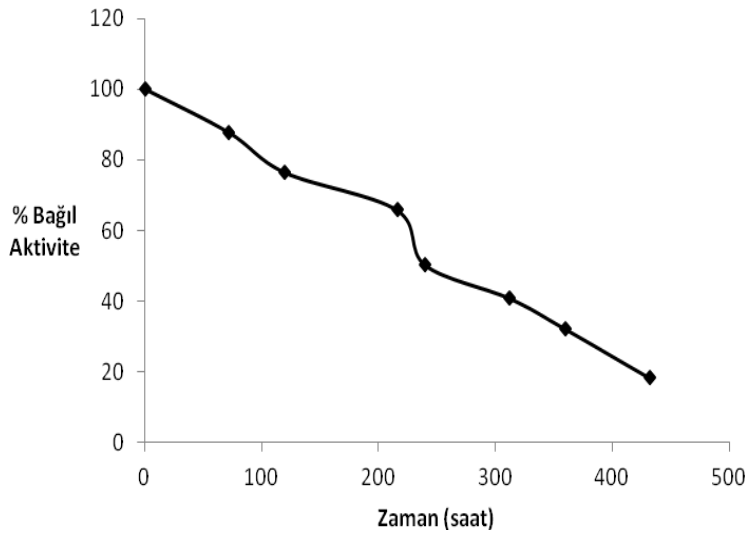
HAP'e immobilize edilen enzim için oda sıcaklığında yapılan depolama kararlılığı çalışması sonucunda, enziminin bağıl aktivitesi ilk 5 saatte % 81,51 olarak ölçülmüştür. 10. saatte % 47,11 aktivite gösterirken bu değer 18. saatte % 19,43'e düşmüştür (Şekil 4.79). +4 °C' de ise enziminin bağıl aktivitesi ilk 24 saatte % 87,87' ye düşmüştür. 168. saatte % 32,76 olan aktivite, 240. saatte % 12,7' ye düşmüştür (Şekil 4.80).



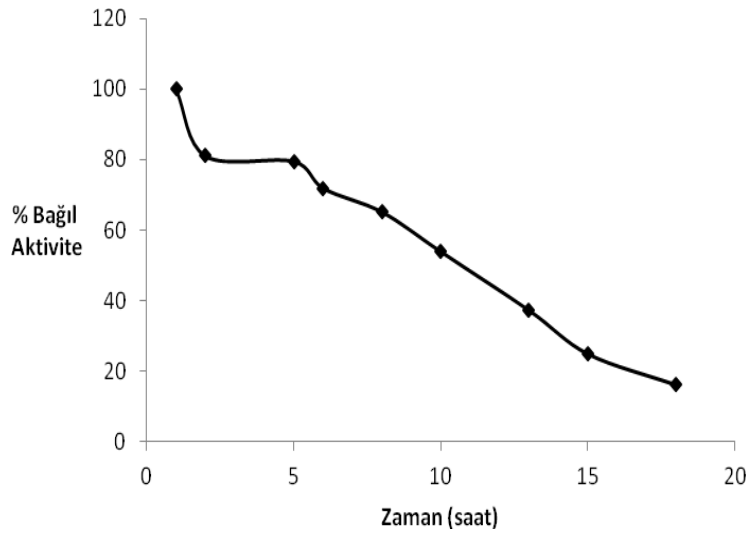
Şekil 4.75. CHT'e immobilize edilen enzimin +4 °C'deki aktivitesinin zamanla değişimi



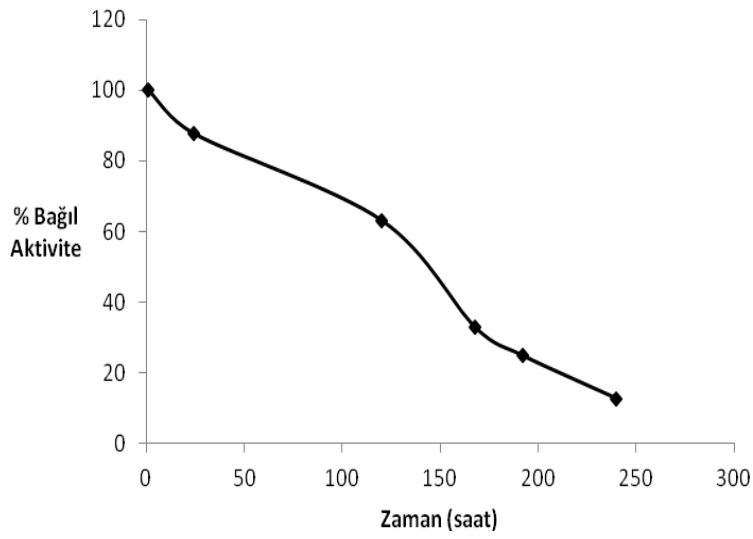
Şekil 4.76. CHT'e immobilize edilen enzimin oda sıcaklığındaki aktivitesinin zamanla değişimi



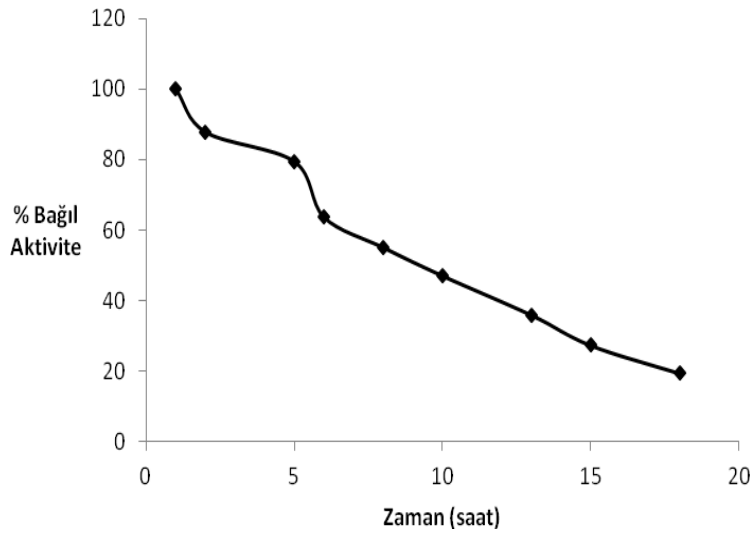
Şekil 4.77. CTS'a immobilize edilen enzimin +4 °C'deki aktivitesinin zamanla değişimi



Şekil 4.78. CTS'a immobilize edilen enzimin oda sıcaklığındaki aktivitesinin zamanla değişimi



Şekil 4.79. HAP'e immobilize edilen enzimin +4 °C'deki aktivitesinin zamanla değişimi



Şekil 4.80. HAP'e immobilize edilen enzimin oda sıcaklığındaki aktivitesinin zamanla değişimi

4.2.2.5. Yeniden kullanılabilirlik

İmmobilize PPO enziminin yeniden kullanılabilirliğini belirlemek amacıyla, belirlenen uygun yöntemler ile üç materyale bağlanan enzimin 3mM 4-metil katekol substratı ile aktivite ölçümü yapılmıştır. Reaksiyon sonunda yıkama işlemi yapılarak aktivite sıfırlanmaya kadar çalışılmaya devam edilmiştir. Sonuçlar EU/gr dk olarak hesaplanarak Tablo 4.9'da verilmiştir.

Tablo 4.9. İmmobilize enzimin yeniden kullanılabilirlik sonuçları

	% Aktivite		
	CHT	CTS	HAP
1.Kullanım	100	100	100
2.Kullanım	56,89	73,34	22,14
3.Kullanım	15,04	22,53	9,24
4.Kullanım	0	5,16	0

BÖLÜM 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada eflatun çiçekli ballıbabası (*Lamium purpureum*) bitkisinin yaprak ve çiçek kısımlarından izole edilen serbest PPO enzimi ve CHT, CTS, HAP taşıyıcılarına immobilize edilen PPO enzimi incelenmiştir.

Substrat spesifikliğı çalışmalarında hem serbest hem de immobilize enzimin gallik asit, guaiakol ve L-Tirozine karşı aktivite göstermediğı; buna karşılık 4-metil katekol, katekol, pirogallol ve kafeik asit ile reaksiyon verdiğı yani eflatun çiçekli ballıbabası PPO enziminin difenolaz ve trifenolaz aktivitesi gösterdiğı bulunmuştur. Enginar (*Cynara scolymus L.*) PPO enziminin katekol, pirogallol, 4-metil katekol, DL-dopa, L-dopa ve gallik asit substratlarına [8]; ısırgan otundaki (*Urtica dioica L.*) PPO enziminin ise bunlara ek olarak p-krezol, kateşin ve trans-sinamik aside karşı aktivite gösterdiğı bulunmuştur [16].

Eflatun çiçekli ballıbabası PPO enzimi üzerine sodyum azid, tiyoüre, L-Sistein, askorbik asit, sitrik asit, benzoik asit, 2-merkaptometanol olmak üzere toplam 7 adet inhibitörün etkisi incelenmiştir. Her bir inhibitör için enzim aktivitesini % 50'ye düşüren inhibitör konsantrasyonları (I_{50}) hesaplanmıştır. Buna göre en fazla inhibitör etkisi gösteren 2-merkaptometanol 0,00275 mM düzeyinde; sodyum azid 5,4742 mM, tiyoüre 3,4650 mM, L-Sistein 0,0663 mM, askorbik asit 0,0966 mM, sitrik asit 24,3629 mM, benzoik asit 13,3836 mM düzeyinde % 50 inhibe etmektedir.

PPO enzim aktivitesi üzerine Fe^{+3} , Cu^{+2} , Mg^{+2} , Ba^{+2} , Ca^{+2} , Li^{+1} , Mn^{+2} , Pb^{+2} , Na^{+1} , K^{+1} , Ni^{+2} , Cd^{+2} , Hg^{+2} ve Al^{+2} metal iyonlarının etkisi incelenmiştir. Buna göre Hg^{+2} iyonunun enzim üzerinde oldukça büyük bir aktivasyona; Ca^{+2} , Fe^{+3} , Pb^{+2} , Li^{+1} , Mn^{+2} iyonlarının ise büyük oranda inhibisyona sebep oldukları görülmüştür.

L-Histidin, L-Glutamik asit, L-Treonin, L-Lisin, L-Arginin, L-Aspartik asit, L-Prolin, L-Fenilalanin amino asitlerinin PPO enzimi üzerine etkisi incelenmiştir. Bazik karaktere sahip amino asitlerden L-histidin, ve L-lisinin 0,5, 1, 5 mM konsantrasyonlarında aktivasyona sebep oldukları, L-argininin ise enzim akitivitesini düşürdüğü görülmüştür. Asidik amino asitlerden olan L-glutamik asit 0,5 ve 1 mM'da aktivasyona sebep olurken, 5 mM'da enzimi inhibe etmektedir. L-aspartik asit ise her üç konsantrasyonda da yaklaşık % 11,65'lik inhibisyona sebep olmuştur. Nötral karaktere sahip L-fenilalanin 0,5 mM konsantrasyonda PPO enzimi üzerinde bir etki göstermezken 1 ve 5 mM'da % 5,89'luk inhibisyona neden olmuştur. L-prolin her üç konsantrasyonda da enzimi inhibe etmiştir.

PPO enziminin pH toleransını belirlemek amacıyla enzim pH değerleri 3,0-9,0 aralığında değişen tampon çözeltilerde 1,5 saat boyunca inkübe edilerek enzim aktivitesine bakılmıştır. % Bağlı aktiviteler ile çizilen grafik ile bu değer 7,5 olarak belirlenmiştir.

Enzim kinetiği çalışması sonuçlarına göre, serbest enzimin K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 4-metil katekol için 2,9977 mM, 0,0087 EU/dk; katekol için 7,8952 mM, 0,0117 EU/dk; pirogallol için 2,2908 mM, 0,0042 EU/dk; kafeik asit için 1,1154 mM, 0,0046 EU/dk olarak hesaplanmıştır. Buradan bu enzimin kafeik aside olan spesifikliğin daha fazla olduğu söylenebilir. Patlıcan (*Solanum melongena*) PPO enziminin K_M değeri 4-metil katekole karşı 0,34 mM'dir [7]. Çakşır otundaki (*Ferula sp.*) PPO enziminin K_M değeri katekol için $2,34 \times 10^{-3}$ M, epikateşin için ise $2,89 \times 10^{-3}$ M.'dir [10]. K_M ve V_{max} değerleri enzim kaynağına ve kullanılan substrata göre değişiklik göstermektedir.

CHT'e immobilize edilen enzim için en büyük afinite kafeik aside karşıdır ve K_M , V_{max} değerleri sırasıyla 0,1764 mM, 294,1176 EU/dk'dır. CTS'a immobilize edilen enzimin katekole karşı ilgisi en yüksektir ve K_M , V_{max} değerleri sırasıyla 0,0454 mM, 227,2727 EU/dk'dır. HAP'e immobilize edilen enzim için en fazla afinite kafeik aside karşıdır ve K_M , V_{max} değerleri sırasıyla 0,1851 mM, 370,3703 EU/dk'dır.

pH çalışmalarına göre serbest PPO pH 6,0 ile 8,0 arasında kararlıdır. Serbest PPO enziminin her substrata karşı optimum pH değerleri sırasıyla 4-metil katekol ve katekol için 7,5, pirogallol için 8,0, kafeik asit için 6,0 olarak bulunmuştur. Optimum pH anamur muzundan (*Musa cavendishii*) elde edilen PPO enzimi için 7,0 [12], Henry kestanesi PPO enzimi için 5,0 bulunmuştur [20]. Optimum pH değerleri enzim kaynağı ve substrat çeşidine göre farklılık göstermektedir.

CHT'e immobilize edilen enzim için optimum pH değerleri 4-metil katekol, katekol, pirogallol ve kafeik asit substratları için sırasıyla 6,0, 7,0, 6,0, 6,0; CTS 'a immobilize edilen enzim için 6,0, 5,0, 4,0, 8,0; HAP'e immobilize edilen enzim için ise 6,0, 7,0, 8,0, 6,0 olarak belirlenmiştir. CMC boncuklara bağlanan enzimin pH'ı 7,0 iken bu enzimin serbest haldeki optimum pH'ı 7,5'dur [22]. Patatesten ekstrakte edilen serbest PPO enziminin optimum pH değeri 6,6 iken alginat-SiO₂'ye immobilize edilen enzim için bu değer 7,0'dır [23]. Immobilize edilen enzimin konformasyonunda değişiklikler olması nedeniyle serbest enzime kıyasla farklı optimum pH değerlerinde çalışması söz konusudur.

Optimum sıcaklık çalışmalarının sonuçları serbest PPO enziminin optimum sıcaklık değerinin 4-metil katekol için 10°C; diğer substratlar için 20°C olduğunu göstermektedir. Vanilya çekirdeğinde bulunan PPO enziminin optimum sıcaklık değeri 37 °C [9] , muz (*Musa sapientum L.*) PPO enzimi için 30 °C [14]; çin lahanası PPO enzimi için ise 40 °C [16] olarak belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalara göre 4-metil katekol, katekol, pirogallol ve kafeik asit substratları için optimum sıcaklık değerleri CHT'e immobilize edilen enzim için optimum sırasıyla 20, 5, 50, 30 °C; CTS'a immobilize edilen enzim için 5, 10, 30, 40 °C; HAP'e immobilize edilen enzim için 5, 5, 50, 30 °C bulunmuştur. Buna göre, her üç materyale bağlanan enzim için pirogallol ve kafeik asit ile gerçekleştirilen reaksiyonlarda enzim daha yüksek sıcaklıklarda çalışmaktadır. Chitosan-kil boncuklar üzerine bağlanan PPO enzimi için optimum sıcaklık 25 °C iken serbest enzim için 25-30 °C'dir [21]. Patatesten (*Solanum tuberosum*) elde edilen serbest PPO için optimum sıcaklık 40 °C iken bu değer Celite 545'e immobilize edilen enzim için 40-50 °C 'dir [26].

İmmobilize enzimlerin serbest enzime göre yüksek sıcaklıklara daha dayanıklı olması immobilizasyon materyali ile enzim arasında kurulan iyonik veya kovalent bağın oluşturduğu konformasyon bütünlüğüdür.

Oda sıcaklığında yapılan depolama kararlılığı çalışması sonucunda, eflatun çiçekli ballıbabadan elde edilen serbest PPO enziminin aktivitesi ilk 5 saatte hızla azalarak % 66,67'ye düşmüştür. Enzim 12. saatte % 40,47 aktivite gösterirken bu değer 17. saatte % 12' ye düşmüştür. CHT'e immobilize edilen enziminin bağlı aktivitesi ilk 5 saatte büyük oranda korunarak 93,82 olarak ölçülmüştür. 10. saatte % 63,88 aktivite gösterirken bu değer 18. saatte % 21,03'e düşmüştür. CTS'a immobilize edilen enzim ilk 5 saatte % 79,51 aktivite göstermiştir.10. saatte % 53,88 aktivite gösterirken bu değer 16. saatte % 18,13'e düşmüştür. HAP'e immobilize edilen enziminin bağlı aktivitesi ilk 5 saatte % 81,51 olarak ölçülmüştür. 10. saatte % 47,11 aktivite gösterirken bu değer 18. saatte % 19,43'e düşmüştür. Bu sonuçlara göre, oda sıcaklığında yapılan depolama kararlılığı sonuçları ile immobilize edilen enzimin daha kararlı olduğu bilgisi birbiriyle örtüşmektedir.

+4 °C'de yapılan depolama kararlılığı çalışması sonucunda, serbest PPO enziminin aktivitesi ilk 24 saatte % 81,36' ya, 168. saatte de % 16' ya düşmüştür. CHT'e immobilize edilen enzim için +4 °C' de enziminin bağlı aktivitesi ilk 24 saatte % 86,5' e, 240. saatte % 16,7' ye düşmüştür. CTS'a immobilize edilen enzimin bağlı aktivitesi ilk 72 saatte % 87,84' e ve 432. saatte % 18,37' ye düşmüştür. HAP'e immobilize edilen enzim için ise bağlı aktivite ilk 24 saatte % 87,87' ye, 240. saatte % 12,7' ye düşmüştür. Bu sonuçlara göre, immobilize edilen enzimin serbest enzime göre daha kararlıdır.

İmmobilize enzimin yeniden kullanılabilirliği çalışmasının sonuçlarına göre 2. kullanımda HAP'e bağlanan enzim aktivitesini büyük oranda yitirirken, CHT'e bağlanan enzim aktivitesini % 56,89, CTS'a bağlanan enzim ise % 73,34 oranında korumuştur. Yalnızca CTS'a immobilize edilen enzim 4. kullanımda % 5,16 gibi düşük bir değer de olsa aktivite gösterebilmektedir.

Sonuç olarak immobilize sistemlerin serbest enzime göre daha kararlı olduğu, daha iyi termal kararlılık, saklama ve kullanım kolaylığı gibi özelliklere sahip olduğu söylenbilir. İmmobilizasyon yöntemi ile enzimler sürekli sistemlere uygun hale getirilerek endüstriyel uygulamalarda kullanılabilir.

KAYNAKLAR

- [1] ERZENGİN, M., Farklı Kaynaklardan Afinite Kromatografisi ile Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması, Kinetik ve Elektroforetik Özelliklerin İncelenmesi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Balıkesir, 2002.
- [2] ÖNEZ, Z., Üzümünden (*Vitis vinifera L.*) İzole Edilen Polifenol Oksidaz Enziminin Özelliklerinin Belirlenmesi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2006.
- [3] ALICI, E. H., Kaldirik (*Trachystemon orientalis*) Bitkisinden Polifenol Oksidaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya, 2012.
- [4] PEKYARDIMCI, Ş., BALABAN, M.O., High Pressure CO₂ Treatment on Polyphenoloxidase Activity, Turkish Journal of Chemistry, 16(2), 153-163, 1992.
- [5] TELEFONCU, A., İmmobilize Enzimler, Enzimoloji Lisanüstü Yaz Okulu, Aydın, 193-247, 1997.
- [6] MUNJAL, N., SAWHNEY, S.K., Stability and Properties of Mushroom Tyrosinase Entrapped in Alginate, Polyacrylamide and Gelatin Gels, Enzyme and Microbial Technology, 30, 613-619, 2002.
- [7] MISHRA, B., B., GAUTAM, S., SHARMA, A., Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase (PPO) from Eggplant (*Solanum melongena*), Food Chemistry, 134(4), 1855-1861, 2012.
- [8] AYDEMİR, T., Partial Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Artichoke (*Cynara scolymus L.*) Heads, Food Chemistry, 87(1), 59-67, 2004.
- [9] WALISZEWSKI, K., N., MARQUEZ, O., PARDIO, V., T., Quantification and Characterization from Polyphenol Oxidase from Vanilla Bean, Food Chemistry, 117(2), 196-203, 2009.
- [10] ERAT, M., ŞAKİROĞLU, H., KÜFREVİOĞLU, İ., Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from *Ferula sp.*, Food Chemistry, 95(3), 503-508, 2006.

- [11] GAWLIK-DZIKI, U., SZYMANOWSKA, U., BARANIAK, B., Characterization of Polyphenol Oxidase from Broccoli (*Brassica oleracea* var. *botrytis italica*), Food Chemistry, 105(3), 1047-1053, 2007.
- [12] ÜNAL, Ü., M., Properties of Polyphenol Oxidase from Anamur Banana (*Musa cavendishii*), Food Chemistry, 100(3), 909-913, 2007.
- [13] MDLULI, K., M., Partial Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase and Peroxidase from Marula Fruit (*Sclerocarya birrea* subsp. *caffra*), Food Chemistry, 92(2), 313-323, 2005.
- [14] YANG, C., FUJITA, S., KOHNO, K., KUSUBAYASHI, A., ASHRAFUZZAMAN, MD., HAYASHI, N., Partial Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Banana (*Musa sapienteum* L.) Peel, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(3), 1446-1449, 2001.
- [15] KAVRAYAN, D., AYDEMİR, T., Partial Purification and Characterization of Polyphenoloxidase from Peppermint (*Mentha piperita*), Food Chemistry, 74(2), 147-154, 2001.
- [16] NAGAI, T., SUZUKI, N., Partial Purification of Polyphenol Oxidase from Chinese Cabbage *Brassica rapa* L., Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(8), 3922-3926, 2001.
- [17] GÜLÇİN, İ., KÜFREYİOĞLU, Ö.İ., OKTAY, M., Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Nettle (*Urtica dioica* L.) and Inhibitory Effects of Some Chemicals on Enzyme Activity, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 20(3), 297-302, 2005.
- [18] GAWLIK-DZIKI, U., ZLOTEK, U., SWIECA, M., Characterization of Polyphenol Oxidase from Butter Lettuce (*Lactuca sativa* var. *capitata* L.), Food Chemistry, 107(1), 129-135, 2008.
- [19] HALDER, J., TAMULI, P., Isolation and Characterization of Polyphenol Oxidase from Indian Tea Leaf (*Camellia sinensis*), The Journal of Nutritional Biochemistry, 9(2), 75-80, 1998.
- [20] XU, J., ZHENG, T., MEGURO, S., KAWACHI, S., Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Henry Chestnuts (*Castanea henryi*), Journal of Wood Science, 50(3), 260-265, 2004.
- [21] DİNÇER, A., BECERİK, S., AYDEMİR, T., Immobilization of Tyrosinase on Chitosan-clay Composite Beads, International Journal of Biological Macromolecules, 50, 815-820, 2012.

- [22] ARICA, Y.M., Immobilization of Polyphenol Oxidase on Carboxymethylcellulose Hydrogel Beads: Preparation and Characterization, *Polymer International*, 49, 775-781, 2000.
- [23] SHAO, J., HUANG, L-L., YANG, Y-M., Immobilization of Polyphenol Oxidase on Alginate-SiO₂ Hybrid Gel: Stability and Preliminary Applications in the Removal of Aqueous Phenol, *J Chem Technol Biotechnol*, 84, 633-635, 2009.
- [24] SHAO, J., GE, H., YANG, Y., Immobilization of Polyphenol Oxidase on Chitosan-SiO₂ Gel for Removal of Aqueous Phenol, *Biotechnol Lett*, 29, 901-905, 2007.
- [25] KENNEDY, L. J., SELVİ, P. K., PADMANABHAN, A., HEMA, K. N., SEKARAN, G., Immobilization of Polyphenol Oxidase onto Mesoporous Activated Carbons – Isotherm and Kinetic Studies, *Chemosphere*, 69, 262-270, 2007.
- [26] 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 B: Enzymatic*, 40, 58-63, 2006.
- [27] CAMPBELL, M. K., *Biochemistry*, Saunders College Publishing, Chicago, 1991.
- [28] KEHA, E. E., KÜFREVİOĞLU, Ö. İ., *Biyokimya*, Aktif Yayınevi, 92-139, Erzurum, 2004.
- [29] PAMUK, F., *Biyokimya*, Gazi Kitapevi, Ankara, 2000.
- [30] TÜZÜN, C., *Biyokimya*, Palme Yayınları, 124 – 125, Ankara, 1997.
- [31] ZİYAN, E., Polifenol Oksidaz Enziminin Ankara Armudu (*Pyrus Communis*)’ndan İzole Edilmesi, Saflaştırılması ve Bazı Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Ankara, 1998.
- [32] ÖZATA, A., KUTLU, M., *Enzimoloji Ders Notları*, T.C. Anadolu Üniversitesi Yayınları No:1254, Fen Fakültesi Yayınları No:15, Eskişehir, 2000.
- [33] HOLME, D.J., PECK, H., *Analytical Biochemistry*, Prentice Hall, 259-261, England, 2005.
- [34] ROBYT, I. F., WHITE, B. J., *Biochemical Techniques: Theory and Practice*. Waveland Press, Inc. Illinois, 1990.

- [35] ÖZTAN, D., Tirosinaz Enziminin Ekstraksiyonu Saflaştırılması ve Fenollerin Giderilmesinde Kullanılması, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2007.
- [36] SAÇAK, M., Kimyasal Kinetik, Ankara Üniversitesi, Kimya Bölümü, Gazi Kitabevi, Ankara, 2002.
- [37] CASAVİ, C., Kovalent Bağlanma ve Fiziksel Adsorpsiyon Metotları ile Proteaz Enziminin İmmobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2007.
- [38] TAŞDELEN, Ç., Proteaz Enziminin Fiziksel Adsorpsiyon, Kovalent ve İyonik Bağlanma Metotları ile İmmobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2006.
- [39] URUÇ, H., Katalaz Enziminin (E.C.1.11.1.6) Montmorilonit Analsim Kili Üzerine İmmobilizasyonu ve Kinetiğinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Van, 2007.
- [40] KOCATÜRK, S., Enginar Polifenol Oksidazının Alginat ve Karragenan Jellerde İmmobilizasyonu ve Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne, 2008.
- [41] WHITAKER, J. R., Polyphenol Oxidase of in : Principles of Enzymology for the Food Sciences (Fennema, O.R.,Ed.), Marcel Dekker, 571-582, New York, 1972.
- [42] AKBULUT, N., Dereotundan (*ANETHUM GRAVEOLENS*) İzole Edilen Polifenol Oksidaz Enziminin Bazı Killerle İmmobilizasyonu ve Seçilmiş Özelliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 2011.
- [43] <http://tr.wikipedia.org/wiki/Ballıbababa>, Erişim Tarihi: 20 Mayıs 2013.
- [44] <http://web.ogm.gov.tr/birimler/merkez>, Erişim Tarihi: 20 Mayıs 2013.

ÖZGEÇMİŞ

Elif CERRAHOĞLU, 1987 yılında Konya' da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Sakarya'da tamamladı. 2006 yılında Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde lisans eğitimine, 2007 yılında aynı fakültenin Biyoloji Bölümü'nde çift anadal programına başladı. 2010' da Kimya, 2011' de Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 2011 yılında Sakarya Üniversitesi Biyokimya Ana Bilim Dalında yüksek lisansa başladı ve 2014 yılında tamamladı.