

**STRES ALTINDAKİ BAZI BİTKİLERDE BİYOTEKNOLOJİK
ÖNEMİ OLAN FENİLALANİN AMONYUM LİYAZ ENZİMİNİN
AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ, OPTİMİZASYONU VE
KARAKTERİZASYONU**

Seda ŞİRİN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HAZİRAN 2013
ANKARA**

Seda ŞİRİN tarafından hazırlanan “STRES ALTINDAKİ BAZI BİTKİLERDE BİYOTEKNOLOJİK ÖNEMİ OLAN FENİLALANİN AMONYUM LİYAZ ENZİMİNİN AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ, OPTİMİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU” adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Belma ASLIM

.....

Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Uğur TAMER

.....

Temel Eczacılık Bilimleri Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Belma ASLIM

.....

Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Doç. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ

.....

Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 12.06.2013

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

Prof. Dr. Şeref SAĞIROĞLU

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Seda ŞİRİN

**STRES ALTINDAKİ BAZI BİTKİLERDE BİYOTEKNOLOJİK ÖNEMİ
OLAN FENİLALANİN AMONYUM LİYAZ ENZİMİNİN AKTİVİTESİNİN
BELİRLENMESİ, OPTİMİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU
(Yüksek Lisans Tezi)**

Seda ŞİRİN

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Haziran 2013**

ÖZET

Fenilketonuri hastalığı (PKU) otozomal resesif bir bozukluktur. Bu genetik bozukluk fenilalanin hidroksilaz (phenylalanine hydroxylase, PAH) enziminin, düşük seviyede olması nedeniyle fenilalanin aminoasidinin yüksek miktarlarda kan ve vücut sıvılarında birikmesi ile tanımlanır. Günümüzdeki araştırmalar PAH'ın alternatifi olduğu düşünülen fenilalanin amonyum liyaz (phenylalanine ammonia lyase, PAL) enzimi üzerine yoğunlaşmıştır. Çalışmada Ankara çevresi Beypazarı ilçesinden toplanan, tuz stresi koşullarında yayılış gösteren, endemik veya yaygın 13 bitki örneğinde PAL enzim ve spesifik aktivitesi taranmış ve bu sonuçlara göre PAL spesifik aktivitesi yüksek çıkan bitkilerle çalışmaya devam edilmiştir. En yüksek PAL spesifik aktivitesini *Cyathobasis fruticulosa* (64,9 U/mg), *Salsola nitraria* (55,3 U/mg), *Salsola grandis* (49,0 U/mg) ve *Salvia halophila* (47,8 U/mg) göstermiştir. Yüksek PAL spesifik aktivitesi gösteren *C. fruticulosa* ve *S. nitraria*'ya ait PAL enziminin optimizasyonu ve karakterizasyonu yapılmıştır. PAL enziminin optimum pH'sı 8,8, optimum sıcaklığı 37°C ve optimum tampon (Tris-HCl) konsantrasyonu 100 mM olarak belirlenmiştir ($p<0,05$). Yapay mide suyunda pH 4,0'de ve yapay bağırsak sıvısında pH 7,5'de enzimin aktivite kaybının en az olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Bitkilerden elde edilen PAL enziminin optimum NaCl konsantrasyonu 200 mM olarak tespit edilmiştir ($p<0,05$). Her iki bitkiden de

elde edilen PAL enzimi, oda sıcaklığında 2. günde, +4°C’de 5. günde, -20°C’de ise 12. ayda % 50’ye yakın aktivite kaybı göstermiştir ($p<0,05$). *C. fruticulosa*, *S. nitraria*, *S. grandis* ve *S. halophila*’dan elde edilen PAL enzimi yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High pressure liquid chromatography, HPLC) kullanılarak L-fenilalaninin trans-sinamik aside dönüşümü hem miktar hem de yüzde olarak tespit edilmiştir. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) ve Western Blot yöntemleri ile PAL enziminin kısmi saflaştırma sonrası, moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 70 kDa bulunmuştur. Ayrıca kısmi saflaştırma sonrası yapılan HPLC analizi ile PAL enziminin aktivitesini kaybetmediği belirlenmiştir. Sonuç olarak bu tez çalışmasında, *C. fruticulosa*, *S. nitraria*, *S. grandis* ve *S. halophila*’dan elde edilen PAL enziminin aktivitesinin yüksek olması, farklı çevresel koşullarda aktivitesini kaybetmemesi, daha kararlı ve stabil olması, vücut sıcaklığı olan 37°C’de optimum çalışması, yapay mide suyu ve bağırsak sıvısında enzimin aktivitesini sürdürmesi bakımından öne çıkmıştır. Bu enzimin özellikle gıda ve ilaç endüstrisinde ürüne yönelik kullanımlarda öne çıkmasının ve biyoteknolojik ürünlerin üretiminde kullanılmasının mümkün olacağı düşünülmektedir.

Bilim Kodu : 203.1.023

Anahtar Kelimeler : Stres bitkileri, fenilalanin amonyum liyaz (PAL), enzim aktivitesi, fenilketonüri.

Sayfa Adedi : 102

Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Belma ASLIM

**DETERMINATION OF ENZYME ACTIVITY, OPTIMIZATION AND
CHARACTERIZATION OF THE BIOTECHNOLOGICALLY IMPORTANT
PHENYLALANINE AMMONIA LYASE FROM SOME PLANTS UNDER
STRESS**

(M. Sc. Thesis)

Seda ŞİRİN

**GAZİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE
June 2013**

ABSTRACT

Phenylketonuria disease (PKU) is an autosomal recessive disorder. This genetic disorder is characterized by the accumulation of high amounts of phenylalanine amino acid in the blood and in the body fluids because of low levels of phenylalanine hydroxylase (PAH) enzyme. Today, the studies are focused on phenylalanine ammonia lyase (PAL) enzyme that is thought to be a surrogate for PKU. In the study, PAL enzyme and specific activity were screened in 13 endemic or disseminated plant samples that showed a distribution under salt-stress conditions, which have been obtained in the district of Beypazarı near Ankara and, based on these results, the analyses were continued to be performed with the plants with higher PAL specific activity. Highest PAL specific activity values were found in *Cyathobasis fruticulosa* (64.9 U/mg), *Salsola nitraria* (55.3 U/mg), *Salsola grandis* (49.0 U/mg) and *Salvia halophila* (47.8 U/mg). For PAL enzyme belonging to *C. fruticulosa* and *S. nitraria* that showed high PAL specific activity, optimization and characterization were done. For PAL enzyme, optimum pH was 8.8, optimum temperature was 37°C and optimum buffer (Tris-HCl) concentration was 100 mM ($p<0.05$). It was seen that the enzyme had the minimum activity loss at pH 4.0 in the artificial gastric fluid and at pH 7.5 in the artificial intestinal fluid ($p<0.05$). Optimum NaCl

concentration of the PAL enzyme obtained from the plants was determined to be 200 mM ($p<0.05$). PAL enzyme obtained from both plants showed an activity loss by nearly 50 % at 2nd day at room temperature, at 5th day at +4°C and at 12th month at -20°C ($p<0.05$). For PAL enzyme obtained from *C. fruticulosa*, *S. nitraria*, *S. grandis* and *S. halophila*, the conversion to L-phenylalanine trans-cinnamic acid was determined as both amount and percentage using high pressure liquid chromatography (HPLC). Following the partial purification of PAL enzyme using Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) and Western Blot methods, its molecular weight was found to be approximately 70 kDa. Furthermore, HPLC analysis performed after the partial purification revealed that PAL enzyme did not lose its activity. Consequently, in this thesis study, PAL enzyme obtained from *C. fruticulosa*, *S. nitraria*, *S. grandis* and *S. halophila* became prominent because its activity was higher, it did not lose its activity under different environmental conditions, it was more stable, it functioned at 37°C, which is the normal body temperature, and it maintained its activity in the artificial gastric fluid and intestinal fluid. This enzyme is thought to have the potential for becoming prominent with its product-intended use especially in food and pharmaceutical industry and to be likely to be used for the production of biotechnological products.

Science code : 203.1.023

Key words : Stress plants, phenylalanine ammonia lyase (PAL), enzyme activity, phenylketonuria.

Page number : 102

Adviser : Prof. Dr. Belma ASLIM

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım için bana her türlü araştırma olanağını ve desteğini sağlayan ve her aşamada bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren değerli tez danışmanım Prof. Dr. Belma ASLIM'a, yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini ve önerilerini esirgemeyen değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Selcen Seniha BABAOĞLU AYDAŞ'a, tez çalışmalarımda kullanılan bitki materyallerinin toplanmasını sağlayan Prof. Dr. Zeki AYTAÇ'a, tezimin düzeltmesinde bilgileriyle beni yönlendiren Doç. Dr. Uğur TAMER ve Doç. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ'a, laboratuvar çalışmalarım esnasında eşsiz tecrübeleri ve bilgileriyle kendilerinden çok şey öğrendiğim Moleküler Biyoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi ve Biyoteknoloji Laboratuvarı çalışanlarına, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Öğrenci İşleri personeli Doğan KARA'ya, yüksek lisansım süresince aldığım BİDEB bursundan dolayı TÜBİTAK'a, öneri ve içten yardımları ile desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Serap NİĞDELİOĞLU'na, ayrıca bugünlere gelmemde en sıkıntılı zamanlarda bile esirgemedikleri maddi, manevi desteklerini ve emeklerini asla ödeyemeyeceğim canım aileme ve arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından 46/2012-01 kodlu proje ile desteklenmiştir. Maddi desteklerinden dolayı Gazi Üniversitesi Rektörlüğü'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xiii
RESİMLERİN LİSTESİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. PKU	3
2.1.1. PKU'nin insidansı.....	4
2.1.2. PAH geninin yapısal özellikleri.....	5
2.1.3. PAH enziminin ekspresyonu	6
2.1.4. PAH genindeki mutasyonlar.....	8
2.1.5. PKU'nin tanısı	8
2.1.6. PKU'de tedavi çalışmaları.....	9
2.2. PAL.....	14
2.2.1. PAL'ın strese karşı savunma cevabı.....	16
2.2.2. PAL'ın şikimik asit metabolik yolundaki rolü	17
2.3. PAL Enzimi İle İlgili Literatürdeki Çalışmalar	18

Sayfa

2.3.1. PAL enziminin tıp ile ilgili uygulamaları.....	18
2.3.2. PAL enziminin tarım ile ilgili uygulamaları.....	20
2.3.3. PAL enziminin optimizasyonu ile ilgili çalışmalar	22
2.3.4. PAL enzimiyle ilgili HPLC uygulamaları	23
2.3.5. PAL enziminin saflaştırılması ile ilgili çalışmalar	24
2.3.6. PAL proteinin western blot ile belirlenmesi ile ilgili çalışmalar	24
2.3.7. PAL enziminin klonlanması ile ilgili çalışmalar	25
3. MATERYAL VE METOT	27
3.1. Materyal.....	27
3.1.1. Araştırmada kullanılan bitkiler ve temini	27
3.2. Metot.....	28
3.2.1. PAL enzim ekstraksiyonu ve protein miktar tayini	28
3.2.2. PAL enzim aktivitesi ölçümü	30
3.2.3. Enzimin optimizasyonu ve karakterizasyonu	31
3.2.4. PAL enziminin depolanma stabilitesinin belirlenebilmesi	33
3.2.5. PAL enzim aktivitesi sonucu oluşan trans-sinamik asit miktarının belirlenmesi.....	33
3.2.6. L-fenilalaninin PAL enzimi reaksiyonu sonucu trans-sinamik aside dönüşüm yüzdesinin belirlenmesi.....	34
3.2.7. PAL enziminin kısmi saflaştırılması	34
3.2.8. PAL proteininin western blot ile belirlenmesi.....	38
3.2.9. Kısmi saflaştırılmış PAL enzim aktivitesi sonucu oluşan trans-sinamik asit miktarının belirlenmesi	41
3.2.10. L-fenilalaninin kısmi saflaştırılmış PAL enzimi reaksiyonu sonucu	

Sayfa

trans-sinamik aside dönüşüm yüzdesinin belirlenmesi.....	41
3.2.11. İstatiksel analiz	41
4. DENEYSEL BULGULAR	42
4.1. Araştırmada Kullanılan Bitkiler	42
4.2. PAL Enzim Aktivitesi Ölçümü	43
4.3. Enzimin Optimizasyonu Ve Karakterizasyonu	44
4.4. PAL Enziminin Depolanma Stabilitésinin Belirlenmesi	53
4.5. PAL Enzim Aktivitesi Sonucu Oluşan Trans-Sinamik Asit Miktarının Belirlenmesi.....	55
4.6. L-fenilalaninin PAL Enzimi Reaksiyonu Sonucu Trans-Sinamik Aside Dönüşüm Yüzdesinin Belirlenmesi	57
4.7. PAL Enziminin Kısmi Olarak Saflaştırılması	61
4.8. PAL Proteininin Western Blot İle Belirlenmesi	64
4.9. Kısmi Saflaştırılmış PAL Enzim Aktivitesi Sonucu Oluşan Trans-Sinamik Asit Miktarının Belirlenmesi	65
4.10. L-fenilalaninin Kısmi Saflaştırılmış PAL Enzimi Reaksiyonu Sonucu Trans- Sinamik Aside Dönüşüm Yüzdesinin Belirlenmesi	67
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	72
KAYNAKLAR	89
ÖZGEÇMİŞ	103

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. PKU'nin ülkelere göre insidansı	5
Çizelge 2.2. PKU'li hastalar için üretilen düşük proteinli tıbbi besinlerin fenilalanin, protein ve enerji değerleri	11
Çizelge 3.1. PAL enzim aktivitesi bakımından taranan bitki örnekleri, özellikleri ve herbaryum numaraları	27
Çizelge 4.1. Bitki örneklerindeki protein miktarının, PAL enzim ve spesifik aktivitesinin kıyaslanması	43
Çizelge 4.2. <i>C. fruticulosa</i> 'ya ait PAL enzim ve spesifik aktivitesine pH'nın etkisi	45
Çizelge 4.3. <i>S. nitraria</i> 'ya ait PAL enzim ve spesifik aktivitesine pH'nın etkisi.....	45
Çizelge 4.4. <i>C. fruticulosa</i> 'ya ait PAL enzim ve spesifik aktivitesine sıcaklığın etkisi	47
Çizelge 4.5. <i>S. nitraria</i> 'ya ait PAL enzim ve spesifik aktivitesine sıcaklığın etkisi..	47
Çizelge 4.6. <i>C. fruticulosa</i> 'ya ait PAL enzim ve spesifik aktivitesine tampon konsantrasyonunun etkisi	49
Çizelge 4.7. <i>S. nitraria</i> 'ya ait PAL enzim ve spesifik aktivitesine tampon konsantrasyonunun etkisi	49
Çizelge 4.8. L-fenilalaninin trans-sinamik aside dönüşüm yüzdesinin belirlenmesi	58
Çizelge 4.9. Kısmi saflaştırma basamaklarında elde edilen değerler.....	63
Çizelge 4.10. L-fenilalaninin trans-sinamik aside dönüşüm yüzdesinin belirlenmesi	68

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. L-fenilalaninin PAH enzimiyle reaksiyonu sonucunda L-tirozin oluşumu .	3
Şekil 2.2. PAH enziminin homotetramer görünümü.....	7
Şekil 2.3. PAH enziminin domainleri	7
Şekil 2.4. PAL proteininin homotetramer görünümü.....	15
Şekil 2.5. L-fenilalaninin PAL enzimiyle reaksiyonu sonucunda trans-sinamik asit ve amonyak oluşumu	15
Şekil 2.6. Bitkilerde şikimik asit yolu.....	18
Şekil 3.1. BSA protein standart eğrisi.....	29
Şekil 3.2. Trans-sinamik asit standart eğrisi	30
Şekil 3.3. Diyaliz kasedinin çalışma prensibi	35
Şekil 3.4. Western blot'un çalışma prensibi	39
Şekil 4.1. PAL enzim aktivitesine yapay mide suyu ve bağırsak sıvısı pH'sının etkisi..	51
Şekil 4.2. PAL enzim aktivitesine NaCl konsantrasyonunun etkisi	52
Şekil 4.3. PAL enzim aktivitesinin oda sıcaklığındaki depolanma stabilitesi	53
Şekil 4.4. PAL enzim aktivitesinin +4°C'de ki depolanma stabilitesi	54
Şekil 4.5. PAL enzim aktivitesinin -20°C'de ki depolanma stabilitesi	55
Şekil 4.6. Trans-sinamik asit miktarına enzim miktarının etkisi	56
Şekil 4.7. Trans-sinamik asit miktarına substrat konsantrasyonun etkisi	57
Şekil 4.8. Trans-sinamik asit miktarına reaksiyon süresinin etkisi.....	57
Şekil 4.9. <i>C. fruticulosa</i> 'da reaksiyon öncesi ve sonrasında L-fenilalanin ve trans-sinamik asit arasındaki ilişkiyi gösteren kromatogram.....	59

Şekil	Sayfa
Şekil 4.10. <i>S. nitraria</i> 'da reaksiyon öncesi ve sonrasında L-fenilalanin ve trans-sinamik asit arasındaki ilişkiyi gösteren kromatogram.....	60
Şekil 4.11. <i>S. grandis</i> 'de reaksiyon öncesi ve sonrasında L-fenilalanin ve trans-sinamik asit arasındaki ilişkiyi gösteren kromatogram.....	60
Şekil 4.12. <i>S. halophila</i> 'da reaksiyon öncesi ve sonrasında L-fenilalanin ve trans-sinamik asit arasındaki ilişkiyi gösteren kromatogram.....	61
Şekil 4.13. Trans-sinamik asit miktarına enzim miktarının etkisi	66
Şekil 4.14. Trans-sinamik asit miktarına substrat konsantrasyonunun etkisi	67
Şekil 4.15. Trans-sinamik asit miktarına reaksiyon süresinin etkisi.....	67
Şekil 4.16. <i>C. fruticulosa</i> 'da reaksiyon öncesi ve sonrasında L-fenilalanin ve trans-sinamik asit arasındaki ilişkiyi gösteren kromatogram.....	69
Şekil 4.17. <i>S. nitraria</i> 'da reaksiyon öncesi ve sonrasında L-fenilalanin ve trans-sinamik asit arasındaki ilişkiyi gösteren kromatogram.....	70
Şekil 4.18. <i>S. grandis</i> 'de reaksiyon öncesi ve sonrasında L-fenilalanin ve trans-sinamik asit arasındaki ilişkiyi gösteren kromatogram.....	70
Şekil 4.19. <i>S. halophila</i> 'da reaksiyon öncesi ve sonrasında L-fenilalanin ve trans-sinamik asit arasındaki ilişkiyi gösteren kromatogram.....	71

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Bradford yönteminde protein miktarındaki artışa bağlı olarak meydana gelen renk değişimi	29
Resim 3.2. Dikey jel elektroforez sistemi ve jel transfer cihazı	39
Resim 4.1. <i>C. fruticulosa</i> 'nın gövde ve yaprağı	42
Resim 4.2. <i>S. nitraria</i> 'nın gövde ve yaprağı	42
Resim 4.3. <i>S. grandis</i> 'in gövde ve yaprağı	42
Resim 4.4. <i>S. halophila</i> 'nın yaprağı.....	42
Resim 4.5. Çeşitli kısmi saflaştırma basamağındaki enzimlerin elektroforetik profili.....	64
Resim 4.6. PAL proteinin membran görüntüsü	65

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
g	Gram
g/100g	Gram/100 gram
g/L	Gram/litre
kg	Kilogram
kkal/100g	Kilokalori/100 gram
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
mg/100g	Miligram/100 gram
mg/dL	Miligram/desilitre
mg/kg	Miligram/kilogram
mg/mL	Miligram/mililitre
mL	Mililitre
mL/dak	Mililitre/dakika
mM	Milimolar
mmol/L	Milimol/litre
nanokatal/mg	Nanokatal/miligram
nm	Nanometre
°C	Santigrat derece
pH	Asitlik bazlık birimi
U	Ünite
U/mg	Ünite/miligram

V	Volt
µg/mL	Mikrogram/mililitre
U/mg	Ünite/miligram
U/mL	Ünite/mililitre
µmol/L	Mikromol/litre
µmol/mL	Mikromol/mililitre

Kısaltmalar

APS

BH₂

BH₄

bp

BSA

CHS

Dak

ddH₂O

EDTA

ERT

Fe⁺²

FeCl₃

FH

H₂O

HCl

HPLC

HRGPs

kb

kDa

KOH

LNAA

LOX

MES

Açıklama

Amonyum per sülfat

Dihidrobiyopterin

Tetrahidrobiyopterin

Baz çifti

Bovin serum albümin

Şalkon sentaz

Dakika

Ultra distile su

Etilendiamintetraasetik asit

Enzim replasman tedavisi

+2 değerlikli demir

Demir klorür

Flavonoid 3-hidroksilaz

Su

Hidroklorik asit

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

Hidroksiprolince zengin glikoproteinler

Kilobaz

Kilodalton

Potasyum hidroksit

Büyük nötral amino asit desteği

Lipoksijenaz

2-(N-morfolino) etan sülfonik asit

MT	o-metiltransferaz
NaCl	Sodyum klorür
NADH	Nikotinamit adenin dinükleotit
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NaOH	Sodyum hidroksit
NH₂	Amino grubu
NH₃	Amonyak
(NH₄)₂SO₄	Amonyum sülfat
OD	Optik dansite
PAH	Fenilalanin hidroksilaz
PAL	Fenilalanin amonyum liyaz
PKU	Fenilketonüri
PPO	Polifenoloksidaz
PVDF	Poliviniliden florür
PVP-40	Polivinilpirolidon-40
RACE	Rapid amplification of mRNA ends by PCR
rpm	Devir sayısı
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi
sp	Tür
subsp	Alttür
TAİL	Thermal asymmetric interlaced
TAL	Tirozin amonyum liyaz
TCA	Trikloroasetik asit
TEMED	N, N, N', N', -tetrametilenetilendiamin
TL	Türk lirası
UDPG	Üridin-difosfat glikoz
UV	Ultraviyole
α	Alfa
β	Beta

1. GİRİŞ

Fenilketonüri (PKU) otozomal resesif bir bozukluktur. Bu genetik bozukluk PAH enziminin yokluğu, düşük seviyede olması ya da yetersizliği nedeniyle yüksek miktarlarda fenilalanin aminoasitinin kan ve vücut sıvılarında birikmesi ile tanımlanır. Hastalık ilerledikçe çocuklar, zeka geriliği ve büyüme bozuklukları riskleriyle karşı karşıya kalmaktadırlar. PKU ile yaşamak mümkün değildir, çok düşük seviyede fenilalanin ve yeterli miktarda tirozin alımını sağlayan sıkı ve yoğun bir diyet gerektirmektedir [Türel, 2006]. Ülkemizde Sağlık Bakanlığı 2010 verilerine göre PKU sıklığı 1/1270 olup, 2009 yılında toplam 6196 hasta bebek tespit edilmiştir.

Günümüzde PKU için kullanılan enzim yer değiştirme tedavileri PAL enzimi üzerine yoğunlaşmıştır. PAL enziminin insan vücudunda fenilalanini parçalamak üzere var olan PAH enzimine göre pek çok avantajları vardır; Kofaktöre ihtiyacı yoktur, reaksiyon ürünü çok düşük bir toksikliğe sahip olan trans-sinamik asittir ve bu ürün karaciğerde benzoik aside çevrilmektedir, daha sonra da idrar yoluyla temel olarak hippurat şekliyle atılmaktadır. PAL enzimi özellikle endüstriyel üretimlerde, vücutta PAH yerine geçmek üzere tercih edilebilir [Gamez ve ark., 2004].

Bitkilerde çevresel stresler, başta fenolik bileşiklerin birikimi ve oksidasyonu, savunma ile ilgili genlerin aktivasyonu, sekonder metabolit sentezinin uyarılması olmak üzere pek çok fizyolojik ve biyokimyasal süreçteki değişiklikleri başlatmaktadır. PAL enzimi, abiyotik strese karşı üretilen fenolik bileşiklerin biyosentez yolunda yer alan ilk enzimdir. Fenolik bileşikler bitkilerde antioksidan etki de gösterdiklerinden, PAL enziminin bu süreçte yer alması ayrı bir önem taşımaktadır [Kelebek, 2009].

Çalışmada, bitkilerde var olduğunu literatürlerle desteklenen ve Türkiye'deki bitkiler üzerinde hiç çalışılmamış bir enzim olan PAL enzimini, özellikle Ankara çevresi Beypazarı ilçesinde, tuz stresi koşullarında yetişen, endemik veya yaygın bazı bitkilerde taramayı amaçlıyoruz. Ayrıca, bu çalışmada; 1. En yüksek PAL spesifik aktivitesine sahip olan bitki enzimlerinin optimizasyonunun ve karakterizasyonunun

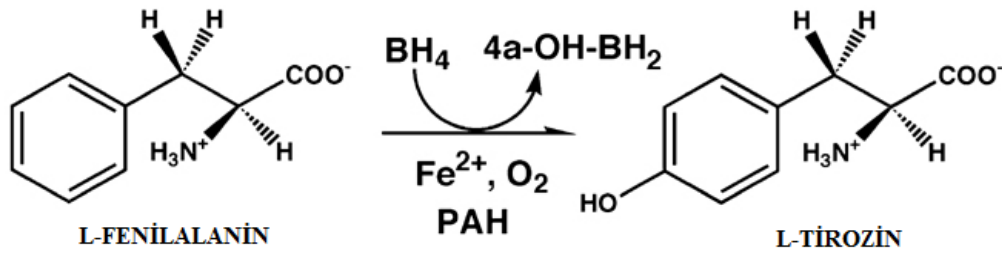
yapılması (pH, sıcaklık, tampon konsantrasyonu, yapay mide suyu ve bağırsak sıvısı, NaCl konsantrasyonu), 2. PAL enziminin depolanma stabilitesinin belirlenmesi, 3. PAL enziminin kısmi saflaştırılmasının gerçekleştirilmesi, 4. PAL proteininin western blot ile belirlenmesi ve 5. Kısmi saflaştırılmış PAL enzim aktivitesi sonucu oluşan trans-sinamik asit miktarının ve L-fenilalanin kısmi saflaştırılmış PAL enzimi reaksiyonu sonucu trans-sinamik aside dönüşüm yüzdesinin tespit edilmesi planlanmıştır.

Türkiye jeolojik özellikleri ve farklı iklimleri bir arada bulundurması bakımından çok farklı stres koşullarına sahiptir. Bitkilerde PAL enzim aktivitesinin çok çeşitli abiyotik ve biyotik stres uyaranına karşı artmakta olduğu görülmüştür. Aynı zamanda, Türkiye pek çok endemik bitkinin yayılış menşei ve geçiş bölgesidir, bitki kaynakları açısından da oldukça zengin bir ülkedir. Çalıştığımız bitki örneklerinin PAL enzimi bakımından tarandığı bir çalışma yoktur. Bütün bunlar dikkate alındığında PAL enzimi açısından yeni gen kaynaklarını bulmak mümkün olacaktır. Bu yolla belirleyeceğimiz umut vaad eden bir bitkiden elde edeceğimiz yüksek enzim aktivitesine sahip yeni bir enzim, birçok farklı ürünün geliştirilmesinde kullanım potansiyeline sahip olacaktır. Çalışmada farklı çevresel koşullara dayanıklı, aktivitesi yüksek, stabil bir PAL enzimi elde etmeyi hedeflemekteyiz. Bu çalışma ile bitkisel PAL kaynakları belirlenecek ve bu kaynaklardan biyoteknolojik olarak yararlanmak mümkün olabilecektir. Bu sayede enzimin PKU tedavisine yönelik tıp ve gıda alanında potansiyel kullanımının da önü açılacak ve enzimden pek çok ithal gıdanın yerine kullanabileceğimiz gıdaların eldesinde yararlanılabilecektir ve bu çalışma ile elde edebilecek enzim tüm bu üretimler için kaynak olabilecektir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. PKU

Fenilalaninin tirozine dönüşümünü sağlayan PAH enziminin eksikliğine bağlı olarak ortaya çıkan hastalık grubu PKU olarak adlandırılmaktadır [Scriver ve Kaufman, 2001]. PAH, fenilalanini tirozine çevirmek için tetrahidrobiopterin (BH_4), moleküler oksijen ve aktif bölgeye bağlanan +2 değerlikli demire (Fe^{+2}) gerek duyar (Şekil 2.1). Tetrahidrobiopterin nikotinamit adenin dinükleotit'ten (NADH) elektron transferi ile dihidrobiopterine indirgenir. Bu nedenle NADH, fenilalaninin tirozine çevirilmesi için ikincil elektron donörüdür [Xavier, 2012].



Şekil 2.1. L-fenilalaninin PAH enzimiyle reaksiyonu sonucunda L-tirozin oluşumu [Kim ve ark., 2004].

Fenilalanin esansiyel bir amino asittir ve proteinlerde bulunan amino asitlerin % 10-15 kadarını oluşturmaktadır [Coşkun, 2003]. Vücuda yiyeceklerle alınan fenilalaninin büyük bir kısmı karaciğer hücrelerinde sentezlenen PAH enzimi tarafından okside edilerek tirozine dönüştürülmektedir. Tirozin ise, ketekolamin, melanin ve hormonlar gibi diğer metabolitlerin yapısına katılmaktadır. Bunun yanı sıra fenilalanin, norepinefrin, dopamin, epinefrin, tiroid hormonu, somatostatin, vazopresin, melanotropin gibi beyin için önemli nöropeptidlerin sentezine de katılmaktadır [Scriver ve, Kaufman, 2001; Scriver ve ark., 1985]. Normalde plazmadaki fenilalanin miktarı <2 mg/dL ($120 \mu\text{mol/L}$)'dir. PKU hastalarında bu oran 3 veya 3'ün üzerindedir [Smith ve Lee, 2000]. Tirozine dönüştürülemeyen fenilalanindeki amino grubu (NH_2), transaminazlar tarafından α -ketoglutarat'a transfer edilerek fenilpürivat oluşmasına neden olmaktadır [Reis ve ark., 2013;

Cedaerbaum ve ark., 1997]. Transaminasyon sonucu oluşan fenilpürivat ise, fenillaktik asit, fenilasetat, feniletilamin, fenilasetil glutamin gibi metabolitlerin oluşumuna neden olmaktadır. Serumda fenilalanin ve fenilpirüvik asit metabolitlerinin artması PKU'lerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır [Türel, 2006].

A) PKU'nin çeşitleri

I) Klasik PKU

PAH enzim aktivitesi $<1\%$ olup, kan fenilalanin düzeyi >20 mg/dL (>1200 $\mu\text{mol/L}$)'dir. Hastaların tolere edebildikleri günlük fenilalanin miktarı 20 mg/kg'dır [Öztürk, 2008].

II) Orta derecede PKU

PAH enzim aktivitesi $>1\%$ olup, kan fenilalanin düzeyi 15-20 mg/dL (900-1200 $\mu\text{mol/L}$)'dir. Hastaların tolere edebildikleri günlük fenilalanin miktarı 20-25 mg/kg'dır [Bakırel, 2008].

III) Hafif PKU

PAH enzim aktivitesi $>5\%$ olup, kan fenilalanin düzeyi 10-15 mg/dL (600-900 $\mu\text{mol/L}$)'dir. Hastaların tolere edebildikleri günlük fenilalanin miktarı 25-50 mg/kg'dır [Türel, 2006].

2.1.1. PKU'nin insidansı

Avrupa ve Kuzey Amerika toplumlarında bildirilen PKU insidansı beyaz ırkta ortalama 1/10000'dir [Zschocke, 2003]. Hastalığın ülkemizde görülme sıklığı diğer ülkelere göre çok yüksek olup, 2001 yılında PKU insidansı 1/5049, 2010 yılında ise 1/1270 olarak rapor edilmiştir [Özalp ve ark., 2001] (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. PKU'nin ülkelere göre insidansı [Türel, 2006].

Ülke	İnsidans	Yıl
Türkiye	1/5049	2001
ABD	1/13000	
İngiltere	1/10000	
Almanya	1/9000	
İrlanda	1/6110	
İtalya	1/7000	
Fransa	1/18800	
Japonya	1/60000	

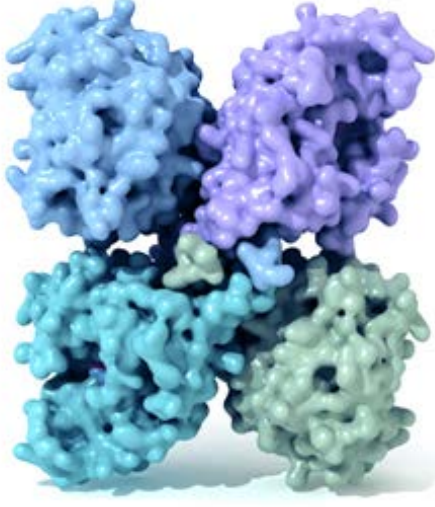
Her 20-25 kişiden birinin hastalığı taşıyor olması ve ülkemizde akraba evliliklerinin yüksek oranda olması PKU'nin sık görülmesine neden olmaktadır [Coşkun, 2004; Zeybek, 2003].

2.1.2. PAH geninin yapısal özellikleri

İnsan PAH cDNA'sının (phPAH247) tam dizisi 1985 yılında Kwok ve ark. tarafından tamamlanmış ve proteinin amino asit dizisi belirlendiğinde fonksiyonel bir enzim için gereken tüm bilgiyi bu amino asit dizisinin içerdiği gösterilmiştir [Kwok ve ark., 1985]. PAH geni 12. kromozomda q22-q24.1'de yer almaktadır. Gen 13 ekzon içermekte ve yaklaşık olarak 100 kb'lık bir DNA bölgesini kapsamaktadır. PAH geninden kodlanan olgun mRNA 2,4 kb uzunluğundadır ve translasyon sonucunda oluşan PAH enzimi ise, 452 amino asit içermektedir [Öztürk, 2008].

2.1.3. PAH enziminin ekspresyonu

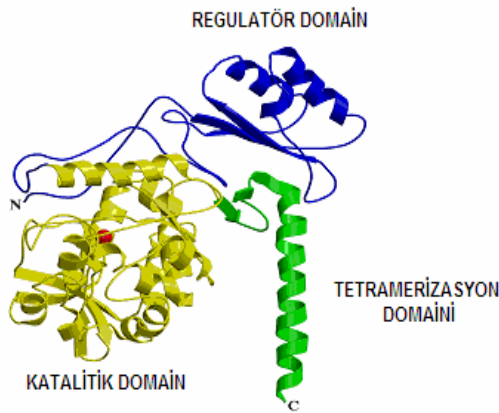
İnsanda PAH temel olarak karaciğerde eksprese olmaktadır. Çeşitli immünohistokimyasal analizler sonucunda bu enzimin böbrekte de eksprese olduğu gösterilmiştir [Moller ve ark., 2000; Ledley ve ark., 1988]. Ayrıca fibroblast hücrelerinde, deride keratinosit hücrelerinde de PAH mRNA'larının varlığı gösterilmiştir. Farelerde yapılan çalışmalar sonucunda, pankreas ve beyin dokusunda da PAH aktivitesi bulunduğu gösterilmiştir. Fenilalaninin vücuttaki yıkımı fenilalanin alımına, hidroksilasyonuna, protein sentezi için kullanım miktarına, fenilalanin transaminasyonuna ve fenilalanin dekarboksilasyonuna göre değişiklik göstermektedir. İnsan ve faredeki böbrek PAH enziminin kinetik özellikleri açısından aynı oldukları ve karaciğerdeki izomerik formlarının da büyük oranda benzerlik gösterdiği rapor edilmiştir [Fazeli ve Vallian, 2011; Lichter-Konecki ve ark., 1989]. Farelerde, böbrek dokusunda bulunan PAH enzimi ile karaciğer dokusunda bulunan PAH enzimi arasında kortizol ve glukagon aracılığı ile dokuya özgül regülasyonlarında, substratla aktivasyonlarında ve posttranslasyonel modifikasyonla aktivasyonlarında (fosforilasyon gibi) belirgin farklılıklar bulunmaktadır [Lichter-Konecki ve ark., 1999]. Ayrıca yapısal açıdan da, bu iki enzim arasında büyük farklılıklar gözlenmektedir. Fenilalanin ile aktivasyonda karaciğer PAH enzimi dimerik formdan aktif formu olan tetramerik forma dönüşmektedir. Böbrek dokusundaki PAH enzimi ise, dimerik formda daha aktiftir. Kuaterner formdaki bu fark böbrekteki izoenzimin tetramerizasyon domaininde farklı bir amino asit dizisinin bulunmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca amino asit dizisindeki farklılığının yanı sıra pH, glikozilasyon, farklı ligandların bulunması da bu durumu etkileyebilmektedir. Ancak insanda karaciğer ve böbrek dokusunda bulunan PAH enzimleri arasında regülasyonda, aktivasyonda ve konformasyonda böyle bir fark gözlenmemiştir. Böbrek bozukluklarında fenilalanin hidroksilasyonunda problemler gözlenmektedir. Bu PKU fenotipinde rezidüel enzim aktivitesinin sadece karaciğer PAH'ından değil böbrekteki PAH'dan da etkilendiğini göstermektedir. X-ray analiz çalışmaları, tam uzunluktaki insan PAH enziminin aktif formunun tetramerik yapıda olduğunu göstermektedir [Harding ve Blau, 2010; Rao ve Kaufman, 1986] (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. PAH enziminin homotetramer görünümü [Dutta ve Goodsell, 2005].

Dimerik formlar substrat varlığında bir araya gelerek tetramerleri oluşturur. Fosfat tamponu içinde pH 8,0'de, tetramerler tekrar dimerik forma dönebilmektedir. Tetramerik ve dimerik formları oluşturan monomerlerin herbiri ise 3 domainden oluşmaktadır [Erlandsen ve Stevens, 2001].

- a. N-terminal; düzenleyici (regülâtör) domain (1-142 amino asitler arası)
- b. Katalitik domain (143-410 amino asitler arası)
- c. C-terminal; tetramerizasyon domain (411-452 amino asitler arası) (Şekil 2.3)



Şekil 2.3. PAH enziminin domainleri [Erlandsen ve Stevens, 1999].

Mutasyonların büyük çoğunluğu PAH enziminin katalitik bölgesinde bulunmaktadır. Tetramerizasyon bölgesi, dimerlerin tetramer forma dönüşümlerini sağlar. Bu bölge 2 antiparalel β tabakası ve C-terminalde tetramer oluşumunda görev alan bir α -heliks bölgesi içermektedir. Regülatör bölge ise, aktif bölgenin işlev görmesini düzenlemektedir [Türel, 2006].

2.1.4. PAH genindeki mutasyonlar

PAH enziminin aktivitesine göre mutasyonlar 3 değişik kategoriye ayrılmaktadır.

- a. Enzimin hem kinetiğini hem de yapısal özelliklerini etkileyen mutasyonlar
- b. Yapısal olarak bir değişime sebep olmayan ama enzim kinetiğini etkileyen mutasyonlar
- c. Enzimin kinetiğini etkilemeyen ancak yapısında değişime neden olan mutasyonlar [Wang ve ark., 2010; Müslümanoğlu, 1996].

2.1.5. PKU'nin tanısı

İlk zamanlarda PKU'nin tanısı için idrarda fenilpirüvatın demirklorür (FeCl_3) ile verdiği reaksiyona dayalı tarama testi yapılmıştır [Clague ve ark., 2002; Moissio ve ark., 1998]. Günümüzde ise en yaygın olarak kullanılan yöntem Guthrie testidir [Guthrie, 1963]. Ancak bu test sadece kalitatif bilgi vermektedir ve duyarlılığı düşüktür. Dolayısıyla kanda ve plazmada fenilalanin veya tirozin miktarını tayin edebilen yeni metotlara ihtiyaç duyulmaktadır. Guthrie testinin önemli dezavantajları uzun ve zahmetli bir süreç izlemesi, testten alınan sonuca göre hastaya tanı konulamaması ve % 5 gibi yüksek oranda yanlış pozitif sonuç vermesidir [Clague ve ark., 2002]. Guthrie testi, *Bacillus subtilis*'in fenilalanin içermeyen ortamda ürememesi esasına dayanmaktadır. *B. subtilis*, fenilalanini çeper oluşumunda kullanılır. Besiyerine ilave edilen β -tienilalanin kanda normalde bulunan fenilalaninin etkisini yok eder. Böylece üreyen bakterinin oluşturduğu zon büyüklüğü ile hastalığın teşhisi yapılır. Bu üremenin alanı fenilalanin miktarına bağlıdır [Özalp, 2000; Peker ve ark., 2000]. PKU hastalığının ön tanısı bu testin

pozitif sonucuna göre yapılmaktadır. Fakat PKU tanısı konulabilmesi için kandaki fenilalanin düzeyinin belirlenmesi gerekmektedir. Fenilalanin tayini için; Guthrie testi, iyon kromatografik [Allard, 2004], spektrofotometrik [Dorota ve ark., 2006; Campell ve ark., 1992; Wendel, 1990; Wendel, 1989; Atherton, 1988; Hilton, 1982; Spierto, 1982] ve florometrik metotlar [Allen ve ark., 1999; Kiba ve ark., 1997] geliştirilmiştir. Bu metotların zaman alıcı olması, yeterli duyarlılıkta olmaması, çoğunun karmaşık enstrümantasyon içermesi, özel laboratuvar imkânları ve oldukça tecrübeli insan gücü gereksinimi rutin analizlerde kullanımını sınırlamaktadır. Fenilalanin dehidrogenaz ve tirozin dekarboksilaz enzimlerine dayalı enzimatik metotlar da geliştirilmiştir [Dorota ve ark., 2006; Wibrand, 2004; Donahue ve ark., 1996; Wendel, 1990; Wendel, 1989]. Geliştirilen enzimatik metotların önemli dezavantajları spektrofotometrik veya kolorimetrik ölçümlere ihtiyaç göstermesidir. Bu nedenle yeni analiz yöntemleri üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Özellikle son yıllarda yapılan araştırmalar elektrokimyasal biyosensörler üzerine yoğunlaşmıştır. Fenilalanin dehidrogenaz ile amperometrik, PAL enzimi ile potansiyometrik fenilalanin biyosensörler hazırlanarak fenilalanin tayininde kullanılması üzerine çalışmalar yapılmıştır. Fenilalanin dehidrogenaz koenzim olarak NAD^+ kullanılmaktadır. Bu koenzim, enzim izolasyonu sırasında enzim yapısından ayrıldığı için çalışmalarda NAD^+ eklenmesi (satın alınması) gerekmektedir. Bu da maliyeti artıran bir faktördür [Weiss ve ark., 2007; Wang ve ark., 2005; Huang ve ark., 1998].

2.1.6. PKU’de tedavi çalışmaları

PAH enzimi fenilalaninin tirozine dönüşümünden sorumludur ve bu enzimdeki bozukluklar PKU hastalarında beyinde fenilalaninin birikmesi sonucunda zihinsel aktivite kaybına neden olmaktadır. Diyet ile tedavisinin mümkün olması nedeni ile erken tanısının önemli olduğu PKU, tedavi edilmediği takdirde mental-motor geriliğin dışında hastalarda epilepsi, mikrosefali, egzema ve skleroderma benzeri deri lezyonları gibi bulgular da göstermektedir. Enzim replasman ve gen tedavisi henüz araştırma safhasındadır [Huttenlocher, 2000; Bezanson ve ark., 1970].

PKU’de diyet tedavisi

PKU’li hastalarda günümüzde uygulanan tedavi, fenilalanin alınınının kısıtlanmasını sağlayan yarı sentetik özel bir diyetdir [Woolf ve ark., 2004]. Diyet tedavisinin amacı; santral sinir sisteminin korunması, normal büyüme gelişmenin sağlanması, biyokimyasal parametrelerin düzeltilmesi, diyetle yeterli miktarda protein, enerji, vitamin, mineral ve eser elementlerin verilmesidir. Diyet tedavisi, tıbbi protein kaynağı ve hazır düşük proteinli özel gıdaların kullanımını gerektirir [Centerwall ve Centerwall, 2000] (Çizelge 2.2). Tüm doğal protein gıdalar yaklaşık % 15 fenilalanin içerir, bu yüzden yenidoğanlar için özel hazırlanmış mamalar reçete edilir. Büyük çocuklarda fenilalanin içermeyen daha doğal, düşük fenilalaninli gıdaların değişimine izin veren ürünler kullanılır. Her çocuk için günlük miktar bireysel olarak; iştaha, büyüme ve gelişime, kan fenilalanin ve tirozin seviyesine göre değişir [Wong ve Eaton, 2001].

Fenilalanin tüm proteinli besinlerde bulunan elzem bir amino asittir ve diyetten tümünden çıkarılması sakıncalıdır. Yetersiz alınması da büyüme geriliği, protein malnütrisiyonu, deri döküntüleri, megaloblastik anemi, osteolitik lezyonlar, konvülsiyon, ishal, saçlarda dökülme gibi ciddi semptom ve bulguların gelişmesine yol açar. Diyetle protein ve fenilalanin içeriği yüksek et, balık, tavuk, yumurta, süt, peynir, yoğurt gibi bazı besinler yer almamalıdır [Özalp, 1999]. Çocuğun büyümesi için gerekli ve metabolize etme yeteneğine göre fenilalanin doğal kaynaklardan (sebze, meyve gibi) karşılanmalı, kalan protein gereksinmesi fenilalanin içermeyen ya da protein içeriği düşük, enerji içeriği yüksek, tirozin ve diğer elzem aminoasitler eklenmiş, vitamin, mineral ve eser elementlerle zenginleştirilmiş, özel olarak üretilmiş aminoasit karışımlarından sağlanmalıdır. PKU’li çocuklarda eser element ve minerallerin ana kaynağı olan doğal protein kaynakları sınırlandırıldığı için, selenyum, çinko, bakır, demir, kalsiyum ve içme suyu florlanmamış ise flor yetersizliği görülmektedir. Hastaya vitamin ve mineraller yönünden destek verilebilir [Demir, 2005].

Çizelge 2.2. PKU’li hastalar için üretilen düşük proteinli tıbbi besinlerin fenilalanin, protein ve enerji değerleri [Tunç, 2006].

Besinler	Fenilalanin (mg/100g)	Protein (g/100g)	Enerji (kkal/100 g)
Aglutella pirinç	<40	0,5	354
Hammermühle un	18-20	0,41	354
Hammermühle yumurta	63,5	1,25	555
Loprofin ekmek	25	0,8	244
Loprofin un	7	0,4	356

Ancak bireylerde yaş ilerledikçe bu tedavinin uygulanması güçleşmektedir. Özellikle adolesan döneminde birçok ergen diyet tedavisine dikkat etmemektedir. Hamile olan PKU’li anneler fötüsün yüksek seviyedeki fenilalanininden etkilenmemesi için diyetlerine çok dikkat etmelidirler (maternal PKU) [Küçükkasap, 2006].

PKU hastaları için kullanılan ürünlerin fenilalanin ve toplam protein miktarını azaltmak için özel işlemler gerekir. Bu işlemler genel olarak kimyasal ve mekanik işlemlerdir. Kimyasal işlemlerde papain, pepsin ve *Aspergillus oryzae*’den elde edilen proteaz kullanılarak hazırlanan enzimatik hidrolizatlar ve mekanik işlemlerde ise ultrafiltrasyon tekniği kullanılır. Ultrafiltrasyon sistemi basınç uygulanacak özel bir üniteden, moleküllerin ayrılmasında kullanılacak farklı gözenekli membranlardan (1-300 kDa) ve basınç sağlayan aletlerden oluşmaktadır. Ultrafiltrasyon tekniği ile protein gıdalardan uzaklaştırılır. Papain, pepsin ve *Aspergillus oryzae*’den elde edilen proteaz ile hazırlanan enzimatik hidrolizatlar kullanılarak gıdalardaki proteinlerin denatüre edilmesi sağlanır. Gıdalarda sadece su, şeker ve bazı mineraller kalır. Bu gıdalara dışarıdan yağ ve protein (fenilalanin içermeyen ya da azaltılmış) kaynakları eklenir. Kimyasal işlemlerde kullanılan yardımcı maddelerin uzaklaştırılması ve mekanik işlemlerdeki sorunlar için ileri teknoloji gerekir. Bu gibi sorunlar maliyeti arttırır [Abdel-Salam ve Effat, 2010; Soares ve ark., 2006].

Maliyeti yüksek olan ve tümü ithal edilen düşük fenilalaninli ürünlerin ülkemizde gümrük sorunları nedeniyle temininde ve ailelerin ekonomik satın alma güçlerinde sorunlarla karşılaşmaktadır. Yaş gruplarına göre tüketilen diyet tedavisinin yıllık olarak ülkemize getirdiği kişi başına yük, ürün seçeneklerine göre; ilk 6 ayda aylık 3742 TL (sadece süt ile beslenen); ilk 5 yaşta ortalama aylık 15520 TL, 5-8 yaş arası aylık ortalama 15520 TL, 8-16 yaş arası aylık ortalama 15571 TL, 18 yaşından büyük çocuklar ve erişkinler için aylık ortalama 16613 TL olarak hesaplanmıştır. Hatta hesaplama dahil edilen ürünlerin sadece sosyal güvenlik sistemi tarafından karşılanan miktarları temel alınarak hesaplanmıştır. Ancak değişen uygulamalar ile bu güvence kapsamına alınma miktarları azalabilmekte, aileye düşen yük artabilmektedir. Bu hastalar 18 yaşını bitirdiğinde toplam diyet tedavisi için kişi başına 215344 TL harcanmış olmaktadır. Her sene en az bu kadar yeni masraf eklenecek ve yaş büyüdükçe de katlanarak artacaktır. Ülkemizde Sağlık Bakanlığı 2010 verilerine göre PKU sıklığı 1/1270 olup, 2009 yılında toplam 6196 hasta bebek tespit edilmiştir. Ülkemizdeki sıklık oranı ve nüfusumuz düşünüldüğünde ülkemizde yaklaşık 16000 PKU hastası olduğu anlamına gelir. Bunun anlamı tüm PKU'li hastalarımızı layıkıyla tedavi edersek PKU hastalarının toplamının 18 yaş sonunda ülkemiz için maliyeti yaklaşık 3,5 milyar TL olarak hesaplanmıştır. Tüm bu ödemelerin ithal ürünlere yapılması da işin başka bir boyutudur. Bu uygulama güçlükleri nedeniyle araştırmacılar diyet tedavisine alternatif tedaviler geliştirmeye çalışmaktadırlar.

Büyük nötral amino asit desteği (Large neutral amino acids, LNAA)

PKU hastalarının diyetlerine büyük nötral amino asitlerin (fenilalanin, tirozin, triptofan, treonin, izolösin, lösin, valin, metionin, histidin) eklenmesi PKU'li bireylerde beyinde biriken fenilalanin miktarının azalmasını sağlamaktadır. Çünkü bu LNAA'ler kan-beyin bariyerini geçerken fenilalanin ile birlikte ortak bir taşıyıcı kullanmakta ve fenilalanin ile bu açıdan yarışa girmektedir [Koch ve ark., 2003; Matalon, 1999].

PKU'de gen tedavisi

Diyet tedavisine alternatif olarak geliştirilen başlıca tedavi yöntemi gen tedavisi yöntemidir. Gen tedavisi yöntemlerinin ortak amacı PAH'ın ekspresyon seviyesini normal koşullara çıkartabilmek veya PKU hastalarının somatik hücrelerindeki mutant PAH geninin değiştirilmesidir. Farklı metodlar kullanılarak PAH genini içeren çeşitli vektörlerin (adeno-assosiyasyon virüsü) hepatik hücrelere veya dokulara gönderilmesi ile azalmış olan gen ekspresyonunun tersine döndürülmesi hedeflenmiştir. PAH geni ile ilgili saptanmış 105 mutasyonun tanımlanmış olması gen tedavisini oldukça güç kılmaktadır [Ding ve ark., 2004; Eisensmith ve Woo, 1996].

BH₄'e cevap veren PKU

Son çalışmalara göre bazı hafif PKU hastalarında kilogram başına 10-20 mg'lık BH₄'in oral yolla verilmesi ile kan fenilalanin seviyesinde azalma gözlenmiştir. Bu nedenle PKU diyetine alternatif olarak BH₄'in normal diyetle eklenmesi düşünülmektedir. BH₄ eklenmesinin avantajı ise, oral olarak alınmasıdır. Ancak BH₄ çok pahalıdır ve yarı-ömürünü çok çabuk tamamlaması nedeniyle de günde en azından 2 veya 3 defa verilmesi gerekmektedir [Fiege, 2004].

Enzim replasman tedavisi

Günümüzde metabolik hastalıklar için enzim replasman tedavisi (ERT) uygulamaları hızla artmaktadır. PKU'nin tedavisi için 2 enzim sistemi geliştirilmiştir; 1. PAH enzimi, 2. PAL enzimi [Sarkissian ve Gamez, 2005; Hoskins ve Gray, 1982].

PAH enzimi doğal olarak kararsız ve proteazlara karşı duyarlı bir yapıya sahiptir. Enzim kofaktöre gereksinim göstermektedir. Enzimin işlev görebilmesi için ya oral yolla BH₄ verilmelidir ya da BH₂'ni (dihidrobiyopterin) BH₄'e dönüştüren dihidropteridin redüktaz enzimi verilmelidir. PAH sentezi kompleks bir işlem olduğundan sentetik üretimi pahalıdır. PAH enzimi PKU'li bireyde immünojenik

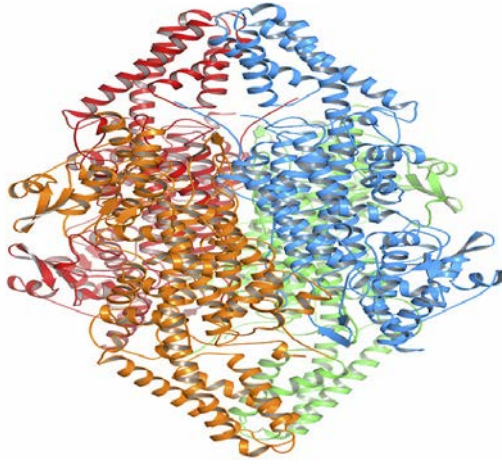
cevaba yol açmaktadır. Bu yüzden tedavide PAH enziminin nonimmünojenik bir formu tercih edilmektedir. İmmün reaksiyonunun baskılanması açısından çeşitli müdahaleler (polietilen glikolizasyon gibi) yapılmaktadır [Gamez ve ark., 2004].

PAL'ın fenilalanini kullanması sonucunda oluşan trans-sinamik asidin toksisitesi çok düşüktür ve test edilen hayvanlarda da embriyotoksik etkisi görülmemiştir. Trans-sinamik asit karaciğerde benzoik aside çevrilmektedir, daha sonra da idrar yoluyla temel olarak hippurat şekliyle atılmaktadır. Ayrıca PAL sıcaklıktan etkilenmemektedir ve çok geniş bir sıcaklık aralığında oldukça stabil kalabilmesinin yanı sıra kofaktöre de gereksinim göstermemektedir. PAL enziminin çalıştığı optimum pH ve sıcaklık enteral yol ile uyumludur. Ancak enzim korunmazsa intestinal lümende proteolitik degradasyona uğramaktadır. Degradasyonu engellemek amacıyla protein kapsüllere immobilize edilir. PAL enzimi bireye enjekte edildiğinde bireyde immünojenik cevap oluşmaktadır. İmmünojeniteyi bastırmak için protein çeşitli yöntemlerle modifiye edilir (polietilen glikolizasyon gibi) [Sarkissian ve Gamez, 2005; Camm ve Towers, 1973].

2.2. PAL

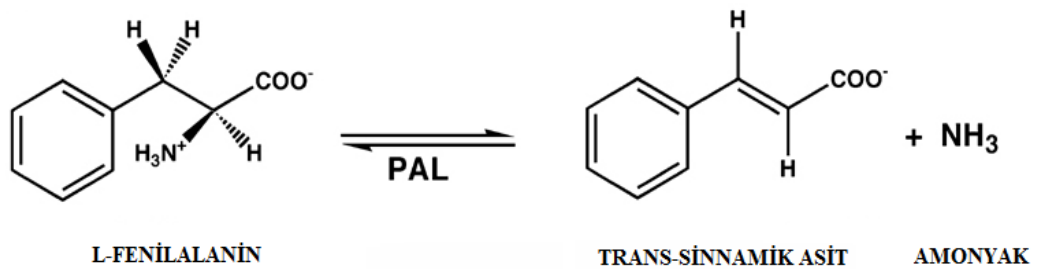
PAL, liyaz enzim sınıfından bir enzimdir. Enzim komisyonu tarafından E.C.4.3.1.5 fenilalanin amonyum liyaz şeklinde adlandırılmıştır. 1961 yılında Koukol ve Conn tarafından keşfedilen bu enzime güncel ilgi halen devam etmektedir [Koukol ve Conn, 1961]. PAL enzimi bakteri ve hayvan dokularında bulunmaz; ancak bitkilerden, bazı funguslardan, mayalardan ve prokaryotlardan elde edilebilir [Hyun ve ark., 2011; Bezanson ve ark., 1970; Koukol ve Conn, 1961]. PAL enziminin molekül ağırlığı izole edildiği kaynağa göre değişir. Örneğin *Rhodotorula glutinis*'ten elde edilen PAL enziminin molekül ağırlığı 330 kDa, *Rhizoctonia solani*'den elde edilen PAL enziminin molekül ağırlığı 340 kDa, *Sporobolomyces pararoseus*'dan elde edilen PAL enziminin molekül ağırlığı ise 320 kDa'dır [Wieder ve ark., 1979; Kalghatgi ve Subra Rao, 1975; Parkhurst ve Hodgins, 1971]. PAL, dört grubu da aynı özelliğe sahip tetramer yapıda bir proteindir [Gamez ve ark., 2007] (Şekil 2.4). Ancak bazı organizmalardan elde edilen PAL proteinin

heterotetramer yapıda olduğu belirlenmiştir [Reichert ve ark., 2009; Kalgathi ve Subra Rao, 1975; Nari ve ark., 1972].



Şekil 2.4. PAL proteininin homotetramer görünümü [Gamez ve ark., 2007].

PAL tarafından katalizlenen reaksiyon trans-sinamik asit ve amonyak (NH_3) veren L-fenilalanin deaminasyonudur [Wang ve ark., 2012] (Şekil 2.5). PAL enzimi kofaktöre ihtiyaç duymayan güçlü bir biyokatalizördür [Sarkissian ve ark., 2011; Snapper ve ark., 1940]. Ancak dihidroalanin prostetik grup olarak PAL enzimi yapısında yer almaktadır [Hyun ve ark., 2011; Gilbert ve ark., 1983]. Enzim reaksiyonunun geri dönüşümlü olduğu gösterilmiştir. Tepkimenin denge sabiti L-fenilalaninin parçalanması yönünde büyük olmasına rağmen, yüksek NH_3 derişimi ve pH değerlerinde tepkime trans-sinamik asitten L-fenilalanin oluşumu yönünde de gerçekleşebilir [Mac Donald ve Cunha, 2007; Akay, 1992].



Şekil 2.5. L-fenilalaninin PAL enzimiyle reaksiyonu sonucunda trans-sinamik asit ve amonyak oluşumu [Kim ve ark., 2004].

PAL, birçok bitkinin sekonder metabolik yolunda kullanılan birinci ve anahtar enzimdir ve fenolik bileşiklerin sentezini sağlar [Ritter ve Schulz, 2004; Koukol ve Conn, 1961]. Bu tür fenolik bileşiklere örnek olarak lignin ve flavonoidler sayılabilir. Lignin odunun temel bileşeni, flavonoidler de birçok çiçeğin renkli maddesidir [Dixon ve ark., 2002; Hahlbrock ve Scheel, 1989].

Son zamanlarda yapılan çalışmalarla *Streptomyces maritimus*'tan elde edilen PAL enziminin izolasyonu ve özellikleri belirlenmiştir. Bu bilinen tek bakteriyel PAL'dır ve trans-sinamat ve benzoil-CoA yoluyla antibiyotik enterosin sentezinde kullanılır [Xiang ve Moore, 2002].

2.2.1. PAL'ın strese karşı savunma cevabı

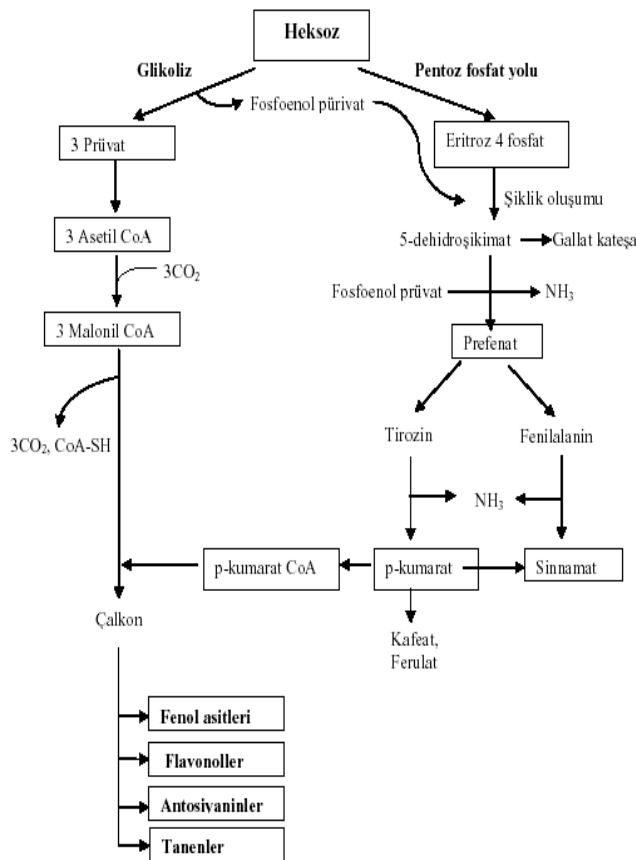
Stres faktörleri, bitkilerin yaşam süreçlerinin herhangi bir döneminde ortaya çıkarak farklı etkilere yol açan çevresel etmenlerdir. Strese dayanıklılık mekanizması bitkilerde iki şekilde etkili olmaktadır. Bitkiler ya geliştirdikleri önleyici mekanizmalarla stres faktörlerinin etkinliğini önlemekte ya da tolerans mekanizmalarıyla karşı koymakta ve yaşamlarını sürdürmektedirler. Stres faktörleri biyotik ve abiyotik olarak gruplanmaktadır. Stres çeşitleri; kuraklık, tuz, sıcaklık, soğuk, don, ışık, hastalık, su taşkını (fazla su), oksidatif, hava kirliliği ve ağır metal stresi şeklindedir [Shabala, 2012].

Bitkilerde savunma cevaplarının bir bölümü çeşitli fonksiyonel gruplara ayrılmaktadır. İlk olarak PAL, şalkon sentaz (CHS) ve şalkon izomeraz gibi fenilpropanoid metabolizmasıdır [Singh ve ark., 2009; Baron ve Zambryski, 1995]. Bu metabolizmanın birçok son ürünü gibi fitoaleksinler, hücre duvarı yapısına katılan lignin gibi doğrudan antimikrobiyal etki göstermektedir. Fenilpropanoid ürünleri farklı biyotik ve abiyotik uyarımlara karşı bitki savunmasında farklı rollere sahiptirler. İkinci savunma cevabı hidroksiprolince zengin glikoproteinler (HRGPs)'in sentezi ve peroksidazlardır. Üçüncü savunma cevabını ise kitinaz, glukanaaz, pektinaz enzim sentezleri oluşturmaktadır. Son olarak çeşitli bitki sistemlerinde lipoksijenaz (LOX) aktivitesinde meydana gelen artıştır. LOX ürünleri

jasmonik asit gibi patojen ve yaralanmalara karşı oluşan genel cevaplardandır. Ayrıca bitki dokularının ultraviyole (UV), yaralanma, don gibi streslere maruz bırakılması da fitoaleksinin sentezlenmesine neden olmaktadır [Deepak ve ark., 2010; Koç ve Üstün, 2008; Kodame ve ark., 1992].

2.2.2. PAL'ın şikimik asit metabolik yolundaki rolü

Aromatik amino asitlerin mikroorganizmalar ve bitkilerdeki temel sentez yolu, adını ilk bulunduğu şikimi-no-ki bitkisinden alan ve benzen halkalı şikimik asidin ve biri açılmış çift halkalı korizmik asidin L-fenilalanin, tirozin veya triptofana dönüştüğü şikimik asit veya şikimat yoludur [Harborne ve Williams, 2001; Merken ve Beecher, 2000] (Şekil 2.6). Fosfoenol piruvat ile eritroz-4-fosfat tetrozunun kondansasyonundan sentezlenen ara maddeler üzerinden şikimik asit korizmik aside ve sonra üç farklı organik aside dönüşerek aromatik amino asitleri verdiği için sonraları korizmik asit yolu adını alan sentez yoludur [Kelebek, 2009; Roggero ve ark., 1986; Hrazdina ve ark., 1984]. Bakterilerde salisilik asit gibi maddeler, yüksek bitkilerde lignin, alkaloidler, fenol asitleri, flavonoller, antosiyaninler, tanenler ve flavonoidler bu aromatik amino asitlerden ve özellikle triptofandan sentezlenir. Bu bileşiklerin sentezinde PAL ve CHS enzimleri önemli rol oynamaktadır. PAL enzimi sinamik asidin sentezlenmesinde, CHS ise iki benzen halkasının kondansasyonunda etkili olur [Ribéreau-Gayon ve ark., 2000].



Şekil 2.6. Bitkilerde şikimik asit yolu [Toprak, 2011].

2.3. PAL Enzimi İle İlgili Literatürdeki Çalışmalar

2.3.1. PAL enziminin tıp ile ilgili uygulamaları

Bourget ve Chang [1985], PAL enzimini yarı-geçirgen mikrokapsüllere immobilize etmiş ve farelere oral yoldan vermişlerdir. Sonuçta kan fenilalanin seviyesinin 2 günde yaklaşık olarak % 35 ve 7 günde % 75 azaldığını belirtmişlerdir.

Habibi-Moini ve D'mello [2001], selüloz nitrat mikrokapsüllere immobilize edilmiş PAL enziminin aktifliğindeki düşüşün nedenlerini araştırmışlardır. Kapsüllenmiş PAL enziminin aktifliğinin % 80'ini kaybettiğini görmüşlerdir. Aktivite kaybının olduğu basamakları tanımlamışlardır. Mikrokapsüllerin içsel çevresinin aktivite kaybına neden olmadığını, selüloz nitrat membranların substrat moleküllerinin

geçişinde difüzyon engeli göstermediğini, aktiflik kaybının % 30'unun PAL enziminin mikrokapsüllere eksik tutuklanmasından olduğunu, % 50'lik aktiflik kaybının ise mikrokapsül oluşurken PAL enziminin denatürasyonu ile meydana geldiğini ileri sürmüşlerdir.

Sarkissian ve Gamez [2005], ilk olarak deneklere enjeksiyonla PAL enzimini vermişler ve kandaki fenilalanin seviyesinin azaldığını görmüşlerdir. Sonrasında ağızdan PAL enzimini vermişler ve bunu iki yoldan yapmışlardır. Birincisi, hücrelere sızmayan proteazdan korumalı şekilde enzim bakteriyal membran (patojenik olmayan *Escherichia coli*) içinde taşınmış, PAL enzimi fenilalanini trans-sinamik aside çevirmiş, 2 saatte fenilalanin seviyesinde % 44 azalma sağlamıştır. İkincisinde PAL enzimi, proteaz inhibitör ile birlikte verilmiş ve 2 saatte fenilalanin seviyesinde % 54 azalma gözlenmiştir.

Gamez ve ark. [2007], protein ve peptit terapötiklerinin immün cevabı indüklemelerine çözüm aramışlardır. *Rhodosporium toruloides* PAL enziminin immünojenik bölgeleri bulunarak, bu bölgeler pegilasyon metodu ile kaplanmıştır. İmmünojenik etkisi azaltılmış olan PAL enziminin PKU tedavisinde terapötik ajan olarak kullanılmasını amaçlamışlardır.

Shah ve D'mello [2007], kapsüllenmiş PAL enziminin aktivitesinin % 23'ünü koruduğunu bulmuşlardır. Kapsüller suyla doyurulmuş eter ve % 10'luk hemoglobin emülsiyonuna, eter-etanol karışımında çözölmüş selöloz nitratin ilavesi ile hazırlanmıştır. PAL enzim aktivitesinin azalmasının sebebini PAL enziminin eter-etanol karışımında çözölmüş selöloz nitrat ilavesi sırasında ortaya çıktığını bulmuşlardır. Suyla doyurulmuş eter ve % 10'luk hemoglobin emülsiyonun PAL enzim aktivitesinin azalmasına etkisinin olmadığını ileri sürmüşlerdir.

PAL enziminin biyosensör ile ilgili uygulamaları

Wang ve ark. [2005], PKU'nin teşhisini sağlamak amacıyla kandaki fenilalanin miktarını ölçen amonyum elektroda immobilize edilmiş PAL enzimine dayalı bir

biyosensör sistemi sunmuşlardır. Bu biyosensörün 10-5000 μM aralığında iyi bir doğrusallık gösterdiğini ve tepki süresinin yalnızca iki dakika olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Doğan [2008], immobilize enzimin aktifliğine depolama süresinin etkisini incelemiştir. İki ay depolama süresi sonunda enzim aktifliğinde önemli değişme olmamıştır. Immobilize enzim iki ay süreyle PKU'li bebeklerde idrarda fenilalanin tayininde aktivitesini kaybetmeksizin kullanılabilmiştir. Üçüncü ayın sonunda enzim aktifliği % 35'e kadar düşmüştür. İki aylık depolama süresince immobilize enzim değişik zamanlarda 17 kez kullanılmasına rağmen immobilize enzim aktifliğinde değişme gözlenmemiştir. Immobilize PAL enzimi ile idrarda fenilalanin tayini yapılmıştır. İdrardaki fenilalanin miktarı azaldıkça % hatanın arttığı görülmüştür. Fakat PKU'li hastada idrardaki fenilalanin derişimi 0,6-3,5 mM aralığında olacağından çalışmanın az bir hatayla sonuç verebileceği öngörülmüştür.

Sarıboğa [2008], PKU hastalarında fenilalanin düzeyini tespit edebilecek mikro boyutlarda kompozit biyosensörler üretmiştir. Fenilalanin biyosensör, plazmada normal ve hastalık sırasındaki fenilalanin değerleri olan 100-2000 μM aralığında tayin edilebilmektedir. Ayrıca, 30 saniye gibi kısa cevap zamanına sahip olması bir başka önemli özelliğidir. Fenilalanin biyosensörün diğer bir önemli özelliği ise yapısının tek kullanımlık formunda seri bir şekilde üretilmeye uygun olmasıdır. Geliştirilen fenilalanin biyosensörler fenilalanin ilavesi yapılmış fosfat tamponu ve plazma numunelerine hareketli ve durgun ortamlarda başarıyla uygulanmıştır. Durgun ve hareketli ortamlarda biyosensörler kullanılarak elde edilen fenilalanin miktarları, HPLC yöntemi kullanılarak plazma örneklerinde elde edilen fenilalanin miktarlarıyla karşılaştırılmıştır. Biyosensörle elde edilen değerlerin yapılan istatistiksel analizler sonucu HPLC ile elde edilen değerlerle uyumlu olduğu gözlenmiştir.

2.3.2. PAL enziminin tarım ile ilgili uygulamaları

Bitkilerin hasadı sırasında taze üretimin fiziksel hasarlar görmesi, hasat sonrası taşıma ve minimal işleme pek çok fizyolojik ve biyokimyasal sürecin başlatılmasına

neden olmaktadır. Bu değişimler artan solunum oranları ve etilen üretimi, sekonder metabolitlerin indüklenen sentezi, membran hasarı ve savunma ile alakalı genlerin aktivasyonudur [Karakurt ve Huber, 2007].

Chalutz ve Stahmann [1972], PAL'ın etilen uyarmasıyla aktif hale geçtiğini ve bu enzimin de hastalıklara dayanıklılıkta önemli rolleri olan fitoaleksine ve fenoliklerin sentezi için anahtar rolü oynadığını bildirmişlerdir. Bitki büyüme düzenleyicileri (oksin, sitokin, giberellin, etilen) bitki fizyolojisini değiştirerek dayanıklılık veya hassaslığa neden olabilmektedirler. Ayrıca patojenlerin patogenezi için alan enzim aktivitelerini engelleyerek, pektin metabolizmasında önemli rol oynayarak, bitki dokularında fungitoksik fenoliklerin birikmesine neden olarak, bitkilerde şeker metabolizmasını değiştirerek, fitoaleksine, fenolikler ve lignin sentezi için anahtar enzim rolüne sahip olan PAL miktarında artışa neden olarak, peroksidaz ve polifenoloksidazı (PPO) aktif hale geçirerek de bitkilerde hastalıklara karşı dirençte etkili olabileceğini vurgulamışlardır.

Chakraborty ve Som [2010], *Camellia sinensis*'in 18 varyetesinin *Glomerella cingulata*'ya karşı oluşturduğu cevabı değerlendirmişlerdir. *G. cingulata* kahverengi yıkım hastalığına sebep olan ajandır. İnfeksiyon prosesi süresince fenol metabolizmasında savunma enzimleri olan PAL, tirozin amonyum liyaz (TAL), PPO'nun zamana bağlı aktivite profilleri belirlenmiştir. İnfekte olan dokularda kontrole göre oldukça yüksek PAL aktivitesi belirlenmiştir ve dirençli varyetelerde inokülasyondan 24 saat sonra pik yapmıştır. TAL aktivitesi 48 saat sonra pik yapmıştır. PPO ise en yüksek aktivitesini 72 saat sonra göstermiştir. Kahverengi yıkım hastalığından *C. sinensis*'i korumada bu üç enzimin rol aldığını bulmuşlardır.

Bauer ve ark. [2011], *Coleus blumei* bitki türündeki fenol üretimine PAL aktivitesinin etkisini değerlendirmişlerdir. *C. blumei*'nin transgenik kökleri CaMV 35S promotorunun kontrolünde, boş vektörle birlikte *Arabidopsis thaliana* PAL1 genini içermektedir. Transgenik kök hatlarının PAL aktiviteleri yabanıl tip köklerle karşılaştırıldığında % 67 ile % 350 arasında farklılık göstermektedir. Yüksek PAL aktivitesi gösteren transgenik köklerde düşük büyüme oranı, düşük miktarda

rosmarinik asit ve klorojenik asit bulunmuştur. Ancak kafeik asidin miktarı yüksektir. Kazein enzim hidrolizatı ve L-tirozin ile beslenen transgenik köklerde total fenol ve rosmarinik asit miktarında artış görülmemiştir. Transgenik köklerde artmış PAL aktivitesi büyümeyi ve fenol metabolizmasını inhibe etmektedir. Bu olayların muhtemel düzenleyicisinin trans-sinamik asit olduğunu varsaymışlardır.

2.3.3. PAL enziminin optimizasyonu ile ilgili çalışmalar

Enzimatik bir reaksiyonun hızını etkileyen birçok faktörden bazıları şunlardır: pH, sıcaklık, iyonların konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu ve zamandır. Her enzimin maksimum aktivite gösterdiği koşulları belirlemek amacıyla optimizasyon çalışmaları yapılmaktadır.

Literatürde yapılan çalışmalarla PAL enziminin optimum pH aralığının 7,5 ile 10,6 arasında değiştiği bulunmuştur. Kim ve ark. [1996], *Ustilago maydis* bitki türüne ait PAL enzimi için, Nagai ve ark. [1988], *Nicotiana tabacum* bitki türüne ait PAL enzimi için en uygun pH değerinin 8,8 olduğunu bildirmişlerdir.

Lim ve ark. [1998], *Brassica rapa* subsp. *campestris* bitki türü için pH 7,0'de enzim aktivitesinde % 70, pH 10,0'da % 35, Sarma ve ark. [1998], *Solanum lycopersicum* bitki türü için pH 7,0'de % 70, pH 10,5'de % 10, Lim ve ark. [1997], *Brassica juncea* bitki türü için pH 7,0'de enzim aktivitesinde % 60, pH 10,0'da % 15, Kim ve ark. [1996], *Ustilago maydis* bitki türü için pH 6,5'de enzim aktivitesinde % 50, Koukol ve Conn [1961], *Hordeum vulgare* bitki türü için pH 7,0'de % 65, pH 10,5'de % 30 azalma olduğunu tespit etmişlerdir.

Literatürde yapılan çalışmalarla PAL enziminin optimum sıcaklık aralığının 25°C ile 60°C arasında değiştiği bulunmuştur. Chen ve ark. [2008], *Musa* sp. bitki türüne ait PAL enzimi için, Lam ve ark. [2008], *Triticum aestivum* bitki türüne ait PAL enzimi için en uygun sıcaklık değerinin 37°C olduğunu bildirmişlerdir.

Lim ve ark. [1998], *Brassica rapa* subsp. *campestris* bitki türü için 15°C’de enzim aktivitesinde % 75 azalma olduğunu tespit etmişlerdir. 60°C’de ise enzim aktivitesi saptanamamıştır. Lim ve ark. [1997], *Brassica juncea* bitki türü için 30°C’de enzim aktivitesinde % 55, 60°C’de enzim aktivitesinde % 70 azalma olduğunu tespit etmişlerdir.

El-Shora [2002], *Cucurbita pepo* bitki türüne ait PAL enzimi için, Jorin ve Dixon [1990], *Medicago sativa* bitki türüne ait PAL enzimi için, Havir [1981], *Glycine max* bitki türüne ait PAL enzimi için en uygun tampon konsantrasyonu değerinin 100 mM olduğunu bildirmişlerdir.

2.3.4. PAL enzimiyle ilgili HPLC uygulamaları

HPLC günümüzde kimya, biyokimya, biyoteknoloji, farmakoloji, tıp kimyası, bitki kimyası, tarım ve kimya mühendisliğini içeren alanlarda ayırma ve analiz için vazgeçilmez bir araç olarak kabul edilmektedir. Bilhassa diğer kromatografik tekniklere uygun olmayan bileşiklerin ayrılması ve analizi için uygundur. Çevre sıcaklığında termal olarak kararsız bileşikleri ve yüksek polarlıktaki bileşikleri herhangi bir türevlendirme olmaksızın ayırabilir ve analiz edebilir [Snyder ve ark, 2009].

Blume ve Saunders [1981], bitki fenol biyosentezinde yer alan birkaç enzimin aktivitesini HPLC tekniği ile ölçmüşlerdir. Bu enzimler PAL, TAL, trans-sinamik asit 4-hidroksilaz ve p-koumarik hidroksilazdır. Bu tekniğin spektrofotometri, gaz kromatografisi ve florometriye göre daha hızlı ve hassas olduğunu öngörmüşlerdir.

Spierto ve ark. [1982], PKU ve tirozinemi hastalarının tanısını koymak amacıyla, insan serumunun fenilalanin ve tirozin içeriğini değerlendirecek yeni bir metod bulmuşlardır. Bunu değerlendirmek amacıyla seruma PAL enzimini eklemişlerdir. Oluşan trans-sinamik asit ve p-koumarik asit miktarını HPLC ile 280 nm’de belirlemişlerdir. Bu metodun florometri ve iyon değişim kromatografisine göre daha kullanışlı ve ucuz olduğunu tespit etmişlerdir.

2.3.5. PAL enziminin saflaştırılması ile ilgili çalışmalar

Enzimlerin saflaştırılması, endüstriyel kullanım ya da proteinin yapı, kompozisyon ve amino asit dizisinin belirlenmesi amacıyla yapılır. Enzim saflaştırmasında göz önünde bulundurulması gereken ana kriterler; yüksek verim ve saflık, aynı zamanda düşük fiyattır.

Whetten ve Sederoff [1992], *Pinus taeda* bitki türünün PAL enzimine saflaştırma işlemi uygulamışlardır. Enzimin saflaştırılması için ham ekstrakt % 40-70 amonyum sülfat $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ ile çöktürülmüştür. DEAE-sephacel ve Sephacryl S-300 kolonları kullanılmıştır. Sephacryl S-300 kolonu kullanımı sonucu elde edilen örneğin PAL spesifik aktivitesinin, ham ekstraktın PAL spesifik aktivitesine oranlanmasıyla saflaştırma katsayısı 400, PAL enzim aktivitelerinin birbirine oranlanmasıyla verim % 11 olarak belirlenmiştir.

El-Shora [2002], *Cucurbita pepo* bitki türünün PAL enzimine saflaştırma işlemi uygulamıştır. Enzimin saflaştırılması için ham ekstrakt % 35-55 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile çöktürülmüştür. DEAE-selüloz, Sephadex G-100 ve Q-Sepharose kolonları kullanılmıştır. Q-Sepharose kolonu kullanımı sonucu elde edilen örneğin PAL spesifik aktivitesinin, ham ekstraktın PAL spesifik aktivitesine oranlanmasıyla saflaştırma katsayısı 83,1, PAL enzim aktivitelerinin birbirine oranlanmasıyla verim % 8,7 olarak belirlenmiştir.

2.3.6. PAL proteinin western blot ile belirlenmesi ile ilgili çalışmalar

Western blot, protein karışımının jel elektroforezi ile ayrıştırıldıktan sonra uygun bir membrana transferini kapsar. Protein spesifik olarak işaretli antikor veya antijenle reaksiyona girerek tanımlanabilir. Bu yöntem ile özel bir proteinin moleküler ağırlığı bilgisi ve işlenmiş ürünlerden izoformların ayırımı mümkündür. Protein uygun bir membrana transfer edildikten sonra görüntüleme için boyanabilir, N-ucundan sekanslanarak direkt olarak tanımlanabilir, kütle spektrofotometri ya da immüntespit yapılabilir. Blotlama tekniği, bir antijenin varlığı ve miktarı, moleküler ağırlığı ve

antijen izolasyonunun etkinliđi gibi protein antijenlerinin önemli özelliklerini belirlemede kullanılabilir [Karaarslan, 2008].

Gao ve ark. [2012], *Phyllostachys edulis* PAL'ında dokuya spesifik ekspresyonu göstermişlerdir. PAL sırasıyla en çok gövdede, kılıfda, yaprakta ve kökte eksprese olmuştur. PAL proteinlerinin dört organdaki birikimi western blot ile belirlenmiştir. Birikimin en yüksek yaprakta olduğu saptanmıştır. İmmünohistokimyasal çalışma, PAL'ın birincil olarak vasküler damarlarda ve yapraktaki sklerenkima hücrelerinin bir kısmında, kılıfta ve kökte lokalize olduğunu göstermiştir. Diğer bitkilerdeki PAL'larla benzer ekspresyon modeli ve biyokimyasal özellikler gösterdiğini bu sonuçlar göstermiştir.

Farklı literatürlerde incelenen farklı bitkiler için PAL protein büyüklükleri de değişebilmektedir. Western blot tekniği ile PAL proteinin büyüklüğü belirlenmiştir. *Bambusa oldhamii* bitkisi 80 kDa PAL büyüklüğüne sahipken [Hsieh ve ark, 2011], *Oryza sativa* bitkisinde PAL protein büyüklüğü 84 kDa olarak bulunmuştur. Yine *Solanum lycopersium* bitkisinde PAL protein büyüklüğü 80 kDa olarak hesaplanmıştır [Sarma ve Sharma, 1999].

2.3.7. PAL enziminin klonlanması ile ilgili çalışmalar

Günümüzde gen klonlaması çalışmaları; gen izolasyonu, gen bankalarının oluşturulması, genlerin güvenlik altına alınarak onların yapı ve fonksiyonları üzerinde araştırmalar yapılması, klonlanan genlerin üzerinde mutasyonlar yapılarak fonksiyonel bölgelerin belirlenmesi, DNA dizi analizlerinin kolaylaştırılması, DNA aşılmasının oluşturulması ve rekombinant proteinlerin açıklatılması gibi amaçlarla yapılmaktadır [Lewin, 2000; Alberts ve ark., 1994; Brown, 1990].

Singh ve ark. [2009], *Camelia sinensis*'den elde edilen PAL'ı kodlayan cDNA'yı polimeraz zincir reaksiyonunu kullanarak klonlamışlardır. PAL ve sinamat-4-hidroksilaz ekspresyonunun odunlaşma sırasında arttığını bulmuşlardır.

Tuan ve ark. [2010], *Allium sativum*'dan elde edilen PAL'ı kodlayan cDNA'yı dejeneratif primerler ile ters polimeraz zincir reaksiyonunu kullanarak klonlamışlardır. Elde edilen amino asit sekanslarını diğer bitkilerdeki PAL'larla karşılaştırılarak % 70'den daha fazla homoloji gösterdiğini belirlemişlerdir.

Hsieh ve ark. [2011], *Bambusa oldhamii*'den elde edilen BoPAL1'i (*Bambusa oldhamii* PAL 1 geni) kodlayan cDNA'yı TAIL (Thermal asymmetric interlaced)-PCR ile klonlamışlardır. BoPAL1'in açık okuma çerçevesinin 2139 bp ve 712 amino asitlik polipeptidi kodladığını bulmuşlardır. Angiosperm bitkilerinde bulunan ilk intronsuz PAL geni BoPAL1'dir. Rekombinant BoPAL1 proteinini *Pichia pastoris*'de eksprese edilmiştir.

Pombo ve ark. [2011], *Fragaria x ananassa*'dan 5'RACE (Rapid amplification of mRNA ends by PCR) ve kütüphane tarama tekniklerini kullanarak, 720 amino asitlik bir proteini kodlayan 2611 baz çifti uzunluğunda bir tam boy dizi elde etmişlerdir. Bu büyüklük çeşitli bitki türlerine ait diğer PAL proteinleri ile uyumludur. Genin ekspresyonu tüm meyvede ve farklı meyve dokularında farklı antosiyanin birikimine sahip iki çilek kültüründe karşılaştırılmıştır. Aynı zamanda daha yüksek toplam PAL aktivitesi gösteren, Camarosa kültüründeki daha yüksek antosiyanin miktar birikimi ve FaPAL6 (*Fragaria x ananassa* PAL 6 geni) gen ekspresyonu arasında pozitif bir korelasyon ortaya koymuşlardır.

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Araştırmada kullanılan bitkiler ve temini

Bu araştırmada PAL enzim aktivitesi bakımından taranan 13 bitki örneği ile çalışılmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. PAL enzim aktivitesi bakımından taranan bitki örnekleri, familyaları, özellikleri ve herbaryum numaraları

Bitki Örnekleri	Familya	Özellik	Herbaryum Numaraları
<i>Anabasis aphylla</i>	Chenopodiaceae	Yaygın	ZA10444
<i>Artemisia santonicum</i>	Asteraceae	Yaygın	ZA10434
<i>Atriplex nitens</i>	Chenopodiaceae	Yaygın	ZA10445
<i>Chenopodium</i> sp.	Chenopodiaceae	Yaygın	ZA10442
<i>Cyathobasis fruticulosa</i>	Chenopodiaceae	Endemik	ZA10439
<i>Echinophora tenuifolia</i>	Apiaceae	Yaygın	ZA10446
<i>Echinophora tournefortii</i>	Apiaceae	Yaygın	ZA10433
<i>Gypsophila eriocalyx</i>	Caryophyllaceae	Endemik	ZA10435-41
<i>Krascheninnikovia ceratoides</i>	Chenopodiaceae	Yaygın	ZA10438
<i>Salsola grandis</i>	Chenopodiaceae	Endemik	ZA10443
<i>Salsola nitraria</i>	Chenopodiaceae	Yaygın	ZA10436A-B
<i>Salvia halophila</i>	Lamiaceae	Endemik	ZA10437
<i>Verbascum gypsicola</i>	Scrophulariaceae	Endemik	ZA10440

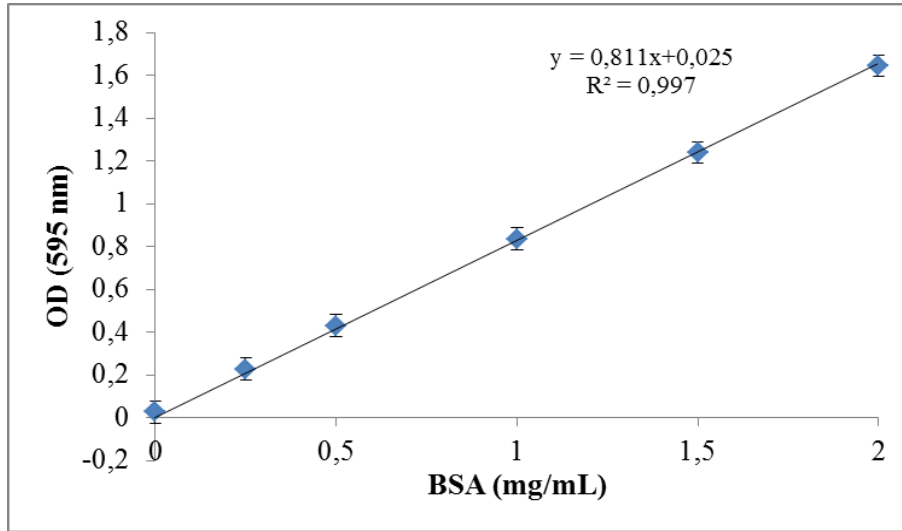
Tüm bitki örnekleri Ankara çevresi Beypazarı ilçesinden toplanmıştır. Bitki örneklerini tuz stresi koşullarında yayılış gösteren endemik veya yaygın bitki

örnekleri oluşturmuştur. Bitkiler araziden 2011 yaz döneminde Prof. Dr. Zeki AYTAÇ ve Yrd. Doç. Dr. Seniha Selcen BABAOĞLU AYDAŞ tarafından toplandıktan sonra Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Herbaryumuna getirilerek, teşhisleri Gazi Üniversitesi öğretim üyesi Prof. Dr. Zeki AYTAÇ tarafından yapılmış, herbaryum numarası verilmiştir. Çalışmada kullanılan bitki numunelerinin taze olmasına dikkat edilmiştir. Gelen bitki örneklerinden enzim aktivite tayini için hemen numune alınmıştır.

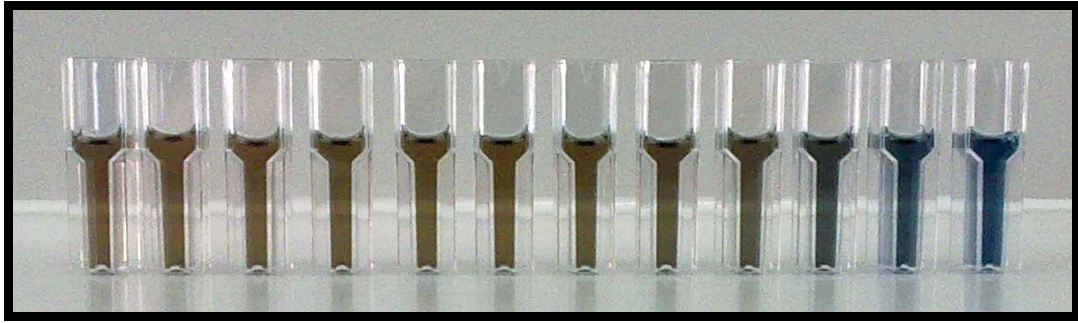
3.2. Metot

3.2.1. PAL enzim ekstraksiyonu ve protein miktar tayini

Bitkiler taze olarak laboratuvar ortamına getirildikten sonra sıvı azot ile 10 mM 2-β-merkaptotanol (Sigma-Aldrich), 1 mM etilendiamintetraasetik asit (EDTA) (Sigma-Aldrich), % 2,5 polivinilpirolidon-40 (PVP-40) (Sigma-Aldrich) içeren Tris (Sigma-Aldrich)-hidroklorik asit (HCl) (Merck) (pH 8,8) tamponunda havan ile ezilerek homojenize edilmiştir. Dokular 15,200 rpm’de 20 dak. soğutmalı santrifüjde (Sigma 3-30K) santrifüjlenerek çöktürüldükten sonra elde edilen örnek Amicon 50 kDa (Millipore) ile filtre edilmek için 7,500 rpm’de 20 dak. daha santrifüjlenmiştir ve ölçümlerde kullanılabilecek kadar -20°C’de saklanmıştır. Bitkilerden PAL enzim ekstraksiyonu gerçekleştirildikten sonra, 0-2000 µg/mL arasında değişen konsantrasyonlarda bovin serum albümin (BSA) (Amresco) kullanılarak standart eğri oluşturulmuştur (Şekil 3.1). Standarda göre protein miktarları mg/mL olarak Bradford (Sigma-Aldrich) yöntemine göre belirlenmiştir [Chen ve ark. 2009; Olsen ve ark. 2008; Goldson ve ark. 2008] (Resim 3.1).



Şekil 3.1. BSA protein standart eğrisi



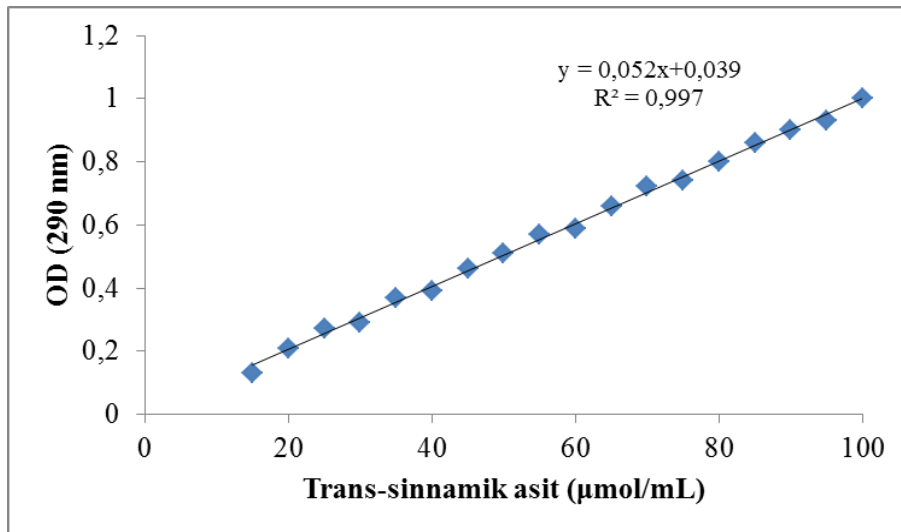
Resim 3.1. Bradford yönteminde protein miktarındaki artışa bağlı olarak meydana gelen renk değişimi

Bitki enzim ekstraksiyon tamponu

6,1 g Tris 375 mL distile suda çözüldükten sonra 1 M HCl ile pH 8,8'e ayarlanmıştır. Son hacim 500 mL'ye tamamlanmıştır. 700 µL 2-β-merkaptolanol 150 mL distile suya eklendikten sonra son hacim 200 mL'ye tamamlanmıştır. 0,4 g EDTA 15 mL distile suda çözüldükten sonra son hacim 20 mL'ye tamamlanmıştır. PVP-40'dan 25 g tartılmıştır. Daha sonra tüm bu hazırlananlar karıştırılmıştır ve son hacim 1000 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

3.2.2. PAL enzim aktivitesi ölçümü

Reaksiyon tamponu olarak 100 mM Tris-HCl (pH 8,8) ve substrat tamponu olarak da 100 mM Tris-HCl-40 mM L-fenilalanin (Sigma-Aldrich) (pH 8,8) kullanılmıştır. Reaksiyon 30 dak. sonunda 4 M HCl ile durdurulmuştur. Çalışma sıcaklık kontrollü bir spektrofotometrede yapılmıştır (UV-1800, Shimadzu). PAL enzim aktivitesi 37°C’de 290 nm dalga boyunda enzimin fenilalanini parçalayarak oluşturduğu trans-sinamik asit ölçülerek belirlenmiştir. 0-100 µmol/mL arasında değişen konsantrasyonlarda trans-sinamik asit (Sigma-Aldrich) standart olarak kullanılmıştır (Şekil 3.2). PAL spesifik aktivitesi U/mg protein olarak hesaplanmıştır. Bu aşamada yüksek PAL spesifik aktivitesine sahip bitki enzimleri seçilmiştir [Pombo ve ark., 2011; Reichert ve ark., 2009].



Şekil 3.2. Trans-sinamik asit standart eğrisi

Reaksiyon tamponu

1,2 g Tris 75 mL distile suda çözüldükten sonra 1 M HCl ile pH 8,8’e ayarlanmıştır. Son hacim 100 mL’ye tamamlanmıştır.

Substrat tamponu

0,7 g L-fenilalanin 30 mL distile suda çözüldükten sonra son hacim 40 mL'ye tamamlanmıştır. 1,2 g Tris 32,5 mL distile suda çözüldükten sonra 1 M HCl ile pH 8,8'e ayarlanmıştır. Son hacim 50 mL'ye tamamlanmıştır. Daha sonra tüm bu hazırlananlar karıştırılmıştır ve son hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır.

3.2.3. Enzimin optimizasyonu ve karakterizasyonu

Yüksek PAL spesifik aktivitesi gösteren bitkilere ait enzimler seçildikten sonra PAL'ın sahip olduğu çeşitli özellikler belirlenerek enzim optimize ve karakterize edilmiştir. Enzimin optimum pH'sı, sıcaklığı ve tampon konsantrasyonu, yapay mide suyu ve bağırsak sıvısındaki stabilitesi ve NaCl konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi tespit edilmiştir.

pH'nın etkisi

Farklı pH'lardaki aktivitelerin belirlenebilmesi için 4 M sodyum hidroksit (NaOH) (Merck) ve 4 M HCl kullanılarak, 100 mM Tris-HCl reaksiyon tamponu ve 100 mM Tris-HCl-40 mM L-fenilalanin substrat tamponunun pH'sı 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 8,8; 10,0; 12,0'ye ayarlanmış ve reaksiyon 37°C'de gerçekleştirilmiştir.

Sıcaklığın etkisi

Farklı sıcaklıklardaki aktivitelerin belirlenebilmesi için 4 M NaOH ve 4 M HCl kullanılarak, 100 mM Tris-HCl reaksiyon tamponu ve 100 mM Tris-HCl-40 mM L-fenilalanin substrat tamponunun pH'sı 8,8'e ayarlanmış ve reaksiyon 10; 20; 30; 37; 40; 50; 60; 70°C sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir.

Tampon konsantrasyonunun etkisi

Farklı tampon konsantrasyonlarındaki aktivitelerin belirlenebilmesi için 4 M NaOH ve 4 M HCl kullanılarak, Tris-HCl reaksiyon tamponu ve Tris-HCl-40 mM L-fenilalanin substrat tamponunun pH'sı 8,8'e ayarlanmıştır. Reaksiyon 5; 10; 25; 50; 100; 250; 500 mM tampon konsantrasyonlarında 37°C'de gerçekleştirilmiştir.

Yapay mide suyu ve bağırsak sıvısının etkisi

Yapay mide suyu ve bağırsak sıvısındaki aktivitelerin belirlenebilmesi için, pepsin (Sigma-Aldrich) % 0,5'lik serum fizyolojik solüsyonunda son konsantrasyonu 3 g/L olacak şekilde çözülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan yapay mide suyunun pH'sı 4 M NaOH ve 4 M HCl ile 2,0; 4,0'e ayarlanmıştır. Pankreatin (Sigma-Aldrich) % 0,5'lik serum fizyolojik solüsyonunda son konsantrasyonu 1 g/L olacak şekilde çözülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan yapay bağırsak sıvısına % 0,30 oranında safra tuzu (Difco) eklendikten sonra pH'sı 4 M NaOH ve 4 M HCl ile 5,5; 7,5; 9,5'e ayarlanmıştır. Reaksiyon 37°C'de gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon 30 dak. sonunda 4 M HCl ile durdurulmuştur. Oransal aktivite, kontrol grubu göz önüne alınarak hesaplanmıştır. Kontrol grubu hazırlanırken 100 mM Tris-HCl reaksiyon tamponu ve 100 mM Tris-HCl-40 mM L-fenilalanin substrat tamponunun pH'sı 8,8'e, reaksiyonun gerçekleştiği sıcaklık ise 37°C'ye ayarlanmıştır. Kontrol grubunun oransal aktivitesi % 100 olarak kabul edilmiştir.

NaCl konsantrasyonunun etkisi

NaCl (Sigma-Aldrich) konsantrasyonunun aktiviteye etkisinin belirlenebilmesi için 4 M NaOH ve 4 M HCl kullanılarak, 100 mM Tris-HCL reaksiyon tamponu ve 100 mM Tris-HCl-40 mM L-fenilalanin substrat tamponunun pH'sı 8,8'e ayarlanmıştır. Reaksiyon ve substrat tamponundaki NaCl konsantrasyonları 50; 100; 150; 200; 250; 300 mM'a ayarlanarak, reaksiyon 37°C'de gerçekleştirilmiştir [Cunha, 2005; El-Shora, 2002; Koukol ve Conn, 1961].

3.2.4. PAL enziminin depolanma stabilitesinin belirlenebilmesi

Depolanma stabilitesinin belirlenebilmesi için 3.2.1’de anlatıldığı şekilde hazırlanan PAL enzim ekstraktları oda sıcaklığında ve +4°C’de 5 gün boyunca bekletilmiştir. Her gün PAL enzim aktivitesi ölçülerek aktivitedeki değişiklik belirlenmiştir. -20°C’de ise 1 yıl boyunca bekletilmiştir. Her ay PAL enzim aktivitesi ölçülerek aktivitedeki değişiklik belirlenmiştir. 4 M NaOH ve 4 M HCl kullanılarak, 100 mM Tris-HCl reaksiyon tamponu ve 100 mM Tris-HCl-40 mM L-fenilalanin substrat tamponunun pH’sı 8,8’e ayarlanmış ve reaksiyon 37°C’de gerçekleştirilmiştir. [Lam ve ark., 2008].

3.2.5. PAL enzim aktivitesi sonucu oluşan trans-sinamik asit miktarının belirlenmesi

Bölüm 3.2.1’de anlatıldığı şekilde hazırlanan PAL enziminin farklı miktarlarının (100; 200; 300 µL), farklı substrat derişimleri (40; 80; 160 mmol/L) ve değişen sürelerde (30; 60; 90 dak.) reaksiyonu sonucu ortaya çıkan trans-sinamik asit miktarı HPLC (Agilent Technologies 1200 Series) ile belirlenmiştir. Trans-sinamik asit miktarı 280 nm’de UV dedektör yardımıyla tespit edilmiştir. Trans-sinamik asit miktarı µg/mL cinsinden belirlenmiştir. µL cinsinden belirlenen sonuçlar mL dönüşümü yapıldıktan sonra verilmiştir. 250/4,6 ACE C18 100-5 kolon oda sıcaklığında kullanılmıştır. 20 µL hacme sahip sıvı örnek kolona manuel enjekte edilmiştir. Mobil faz % 35 H₂O, % 65 metanol (Merck) içermiştir. Mobil fazın % 35 H₂O içeren kısmının pH’sı asetik asit (Merck) ile pH 4,0’e ayarlanmıştır. Akış hızı 1 mL/dak.’dır. HPLC analizi Gazi Üniversitesi Moleküler Biyoloji Araştırma ve Uygulama Merkezinde yaptırılmıştır [Okada ve ark., 2008; Spierto ve ark., 1982; Blume ve Saunders, 1981].

3.2.6. L-fenilalaninin PAL enzimi reaksiyonu sonucu trans-sinamik aside dönüşüm yüzdesinin belirlenmesi

300 µL PAL enziminin 160 mmol/L L-fenilalanin ile 60 dak. reaksiyonu sonucunda azalan L-fenilalanin konsantrasyonu ve oluşan trans-sinamik asit miktarı 280 nm’de HPLC ile belirlenmiştir. L-fenilalaninin PAL enzimi reaksiyonu sonucu trans-sinamik aside dönüşüm yüzdesi, reaksiyon öncesinde ve sonrasındaki L-fenilalanin konsantrasyonundaki azalışa bağlı olarak belirlenmiştir.

3.2.7. PAL enziminin kısmi saflaştırılması

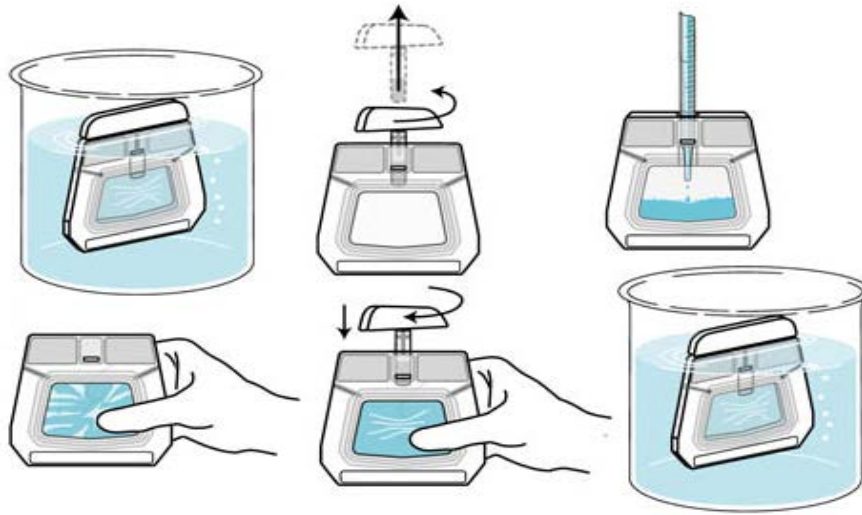
(NH₄)₂SO₄ çöktürmesi

Manyetik karıştırıcı üzerinde, beherin içindeki 50 mL ekstrakte edilmiş enzim , +4 C°’deki bir dolaba yerleştirilmiştir. % 60 oranında (NH₄)₂SO₄ konsantrasyonun sağlanması için gereken (NH₄)₂SO₄ miktarı, (NH₄)₂SO₄ hesap makinesi programı (Encor Biotechnology Inc.) ile belirlenmiştir. Toz haline getirilen (NH₄)₂SO₄’tan (Merck), çözeltiye % 60 oranında yavaş yavaş eklenmiştir. Tuz ilavesinin ardından 20 dak. daha karıştırılan çözeltiye 10,000 rpm’de 30 dak. +4 C°’de santrifüj işlemi uygulanmış ve çözeltinin üst kısmı atılmıştır. Pellet, 100 mM Tris-HCl (pH 8,8) reaksiyon tamponu ile süspanse hale getirilmiştir. Santrifüj işlemi sonunda çözülen numunenin protein konsantrasyonu Bradford yöntemi ile belirlenmiştir.

Diyaliz

(NH₄)₂SO₄ çöktürmesi ile elde edilen pellet, 100 mM Tris-HCl (pH 8,8) reaksiyon tamponu ile çözündükten sonra Slide-A-Lyzer G2 20 kDa (Thermo Scientific) diyaliz kasedinin içerisine koyulmuştur. Diyaliz kasedi, içerisinde 100 mM Tris-HCl (pH 8,8) reaksiyon tamponu bulunan erlene yerleştirilmiş ve manyetik karıştırıcı ile çok yavaş bir şekilde karıştırılarak +4C°’de 1-2 saat bekletilmiştir. Bu aşama 2 defa tekrarlanmıştır. Diyaliz kasedi, içerisinde 100 mM Tris-HCl (pH 8,8) reaksiyon tamponu bulunan erlene yerleştirilmiş ve manyetik karıştırıcı ile çok yavaş bir şekilde

karıştırılarak $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 1 gün daha bekletilmiştir. Beher içine örneğin 200 katından daha fazla olacak şekilde 100 mM Tris-HCl (pH 8,8) reaksiyon tamponu konmuş ve elde edilen diyalizat, Amicon 50 kDa ile filtre edilmiştir [Whetten ve Sederoff, 1992; Jorin ve Dixon, 1990; Kalgathi ve Subra Rao, 1975] (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Diyaliz kasedinin çalışma prensibi [<http://www.piercenet.com>, 2013].

PAL enziminin kısmi saflaştırma sonrası moleküler ağırlığının belirlenmesi (SDS-PAGE)

PAL enziminin kısmi olarak saflaştırılıp saflaştırılmadığının ve moleküler ağırlığının belirlenmesi amacıyla SDS-PAGE yöntemi kullanılmıştır. Buna göre proteinlerin Bradford yöntemi ile konsantrasyonları ölçüldükten sonra, yığma (% 30 akrilamid (Sigma-Aldrich)- N, N' metilen-bis-akrilamid (Sigma-Aldrich), 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, % 10 sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma-Aldrich), % 10 amonyum per sülfat (APS) (Sigma-Aldrich), N, N, N', N', -tetrametilenetilendiamin (TEMED) (Sigma-Aldrich) ve ayırma jeli (% 30 akrilamid- N, N' metilen-bis-akrilamid, 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, % 10 SDS, % 10 APS, TEMED) olarak, dikey elektroforeze (Biorad) iki aşamalı döküldükten sonra, jelin polimerize olması için 15-30 dak. beklenmiştir. Tankın 2/3'ünü dolduracak kadar yürütme tamponu eklendikten sonra, jele protein markerı (Thermo Scientific Prestained Protein Marker 10-170 kDa) ve proteinler yüklenmiştir. İlk başta 80 voltta, daha sonra 120 voltta yaklaşık 60 dak. yürütülmüştür. Elektroforez işleminin hemen ardından jeller, tespit çözeltisi

içerisinde bir gece bekletilmiştir. Tespitleme işleminden sonra jeller boyama çözeltisine alınmış ve ortalama bir gün bekletilerek boyanmıştır. Daha sonra jeller distile suda bekletilerek jellerin zemininde bulunan boyanın çıkması sağlanmıştır.

Molekül ağırlıkları bilinen standart proteinlerin Rf değerleri aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır:

$Rf = \text{Proteinin göç uzaklığı} / \text{Protein karışımının göç uzaklığı}$

Rf değerleri ve standart proteinlerin moleküler ağırlıkları log10 değerleri kullanılarak bir kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Moleküler ağırlığının hesaplanması istenen proteinin Rf değeri bu kalibrasyon eğrisine yerleştirilerek bulunmuştur [Demiralp ve ark., 2000; Bushuk ve ark., 1997; Laemmli, 1970].

Ayırma jelinin hazırlanması (% 10'luk)

dH ₂ O	1,9 mL
% 30'luk Akrilamid	1,7 mL
1,5 M Tris HCl (pH 8,8)	1,3 mL
% 10'luk SDS	50 µL
% 10'luk APS	50 µL
TEMED	2 µL

Yığılma jelinin hazırlanması (% 4'lük)

dH ₂ O	2,8 mL
% 30'luk Akrilamid	330 µL
0,5 M Tris HCl (pH 6,8)	250 µL
% 10'luk SDS	20 µL
% 10'luk APS	20 µL
TEMED	2 µL

Akrilamid çözeltisi (% 30'luk)

29,2 g akrilamid, 0,8 g N, N' metilen-bis-akrilamid 100 mL distile su içerisinde çözülmüştür. Hazırlanan çözelti filtre kâğıdından (Whatman) geçirilerek, süzölmüş ve +4°C'de muhafaza edilmiştir. Kullanım süresi 1 aydır.

Ayırma jel tamponu (1,5 M Tris HCl, pH 8,8)

18,2 g Tris 75 mL distile suda çözüldükten sonra, 1 M HCl ile pH 8,8'e ayarlanmıştır. Son hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Yığılma jel tamponu (0,5 M Tris HCl, pH 6,8)

6 g Tris 75 mL distile suda çözüldükten sonra, 1 M HCl ile pH 6,8'e ayarlanmıştır. Son hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır.

SDS çözeltisi (% 10'luk)

0,1 g SDS 1 mL distile su içerisinde çözümlenerek hazırlanmıştır.

APS çözeltisi (% 10'luk)

0,1 g APS 1 mL distile su içerisinde çözümlenerek hazırlanmıştır.

Stok yürütme tamponu (pH 8,3) (5X)

94 g glisin, 15,1 g Tris, 100 mL % 10 SDS 1000 mL distile su içerisinde çözülmüştür.

Yükleme tamponu (5X)

5,1 mL 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 8 mL gliserol (Sigma-Aldrich), 4 mg brom fenol mavisi (Sigma-Aldrich), 2 g SDS, 4 mL 2-β-merkaptoetanol, 3 mL distile su karıştırılarak hazırlanmıştır.

Tespit çözeltisi

25 mL % 100 (w/v) trikloroasetik asit (TCA) (Merck), 82,5 mL metanol, 142,5 mL distile su karıştırılarak hazırlanmıştır.

Stok boya çözeltisi

1 g coomassie brillant mavisi G-250 (Sigma-Aldrich), 46,5 mL HCl ile karıştırılarak, distile su ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır. Boya çözüldükten sonra filtre kağıdından süzölmüş ve renkli cam şişede oda sıcaklığında saklanmıştır.

Boyama çözeltisi

300 mL stok boya çözeltisi, 35 mL 10 M (w/v) potasyum hidroksit (KOH) (Merck), 25 mL % 100 (w/v) TCA karıştırılarak hazırlanmıştır. Boya çözüldükten sonra filtre kağıdından süzölmüş ve renkli cam şişede oda sıcaklığında saklanmıştır.

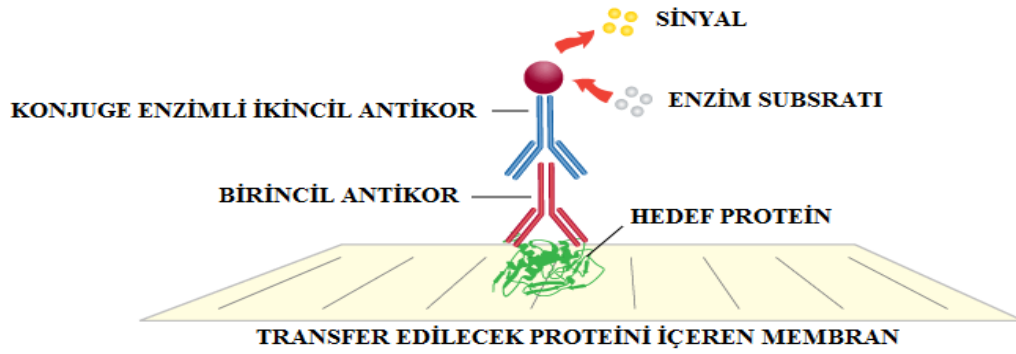
3.2.8. PAL proteininin western blot ile belirlenmesi

Ekstraksiyon sonucu elde edilen proteinlerin Bradford yöntemi ile konsantrasyonları belirlenmiştir. Proteinler ve protein markerı (10-170 kDa) % 4-12'lik hazır bis-tris jele (NuPAGE®) yüklendikten sonra dikey jel elektroforez sisteminde (XCell SureLock™; İnvitrogen) 120 voltta yaklaşık 60 dakika yürütölmüştür. iBlot® jel transfer cihazı kullanılarak (iBlot®; İnvitrogen), proteinler jelden poliviniliden florür (PVDF) membrana (NuPAGE®) kuru transferle aktarılmıştır (Resim 3.2).



Resim 3.2. Dikey jel elektroforez sistemi ve jel transfer cihazı

Bundan sonraki aşamalar Western Breeze kiti (Invitrogen) kullanılarak yapılmıştır. Kit bloklama solüsyonunu, birincil antikor seyrelticiğini, ikincil antikor solüsyonunu (anti-tavşan), kromojenik substratı ve yıkama solüsyonlarını içermektedir. Membran; deterjan içeren konsantre salin tampon solüsyonu ve Hammerstein kazein solüsyonu ile 30 dak. bloke edilmiştir. Daha sonra PAL proteini ile bağışıklanmış tavşan kanından elde edilen poliklonal birincil antikor (Tübitak MAM) ile 1 saat boyunca işaretlenmiştir. Membran deterjan içeren konsantre salin tampon solüsyonu ile yıkandıktan sonra PAL proteinine özgü birincil antikora bağlanacak olan alkalın fosfataz bağlı ikincil antikor (anti-tavşan IgG) ile 30 dak. muamele edilmiştir. Fazla ikincil antikor, deterjan içeren konsantre salin tampon solüsyonu yıkamaları ile uzaklaştırıldıktan sonra kromojenik substrat ile membranda mor bantlar oluşana kadar muamele edilmiştir. Mor bantların oluşumu 1 ile 60 dak. arasında gerçekleşir. Kromojenik substrat, alkalın fosfataz için 5-bromo, 4-kloro, 3-indolfosfat/nitro-mavi tetrazoliyum (BCIP/NBT) substratıdır. Oluşan kromojenik bant, görüntüleme sisteminde tespit edilmiştir (UVP Biospectrum 410). İstenilen proteinin moleküler ağırlığı Gel-Pro® Analyzer programı (MediaCybernetics) ile bulunmuştur [Hsieh ve ark., 2011; Noda ve ark., 2011; Campbell ve Ellis, 1992] (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Western blot'un çalışma prensibi [<http://www.leinco.com>, 2013].

2-(N-morfolino) etan sülfonik asit (MES) SDS yürütme tamponu (20x)

50 mL MES SDS yürütme tamponu (20X)'den (NuPAGE®) alınmıştır. Son hacim 1000 mL'ye tamamlanmıştır.

Bloklama solüsyonu

5 mL ddH₂O, 2 mL bloklayıcı seyreltici (A), 3 mL bloklayıcı seyreltici (B) karıştırılarak hazırlanmıştır. Toplam hacim 10 mL'dir.

Birincil antikor seyreltici

7 mL ddH₂O, 2 mL bloklayıcı seyreltici (A), 1 mL bloklayıcı seyreltici (B) karıştırılarak hazırlanmıştır. Birincil antikor 1:1000-1:5000 dilüsyon oranlarında kullanılmıştır. Toplam hacim 10 mL'dir.

Antikor yıkama solüsyonu

150 mL ddH₂O, 10 mL antikor yıkama solüsyonu (16X) karıştırılarak hazırlanmıştır. Toplam hacim 160 mL'dir.

3.2.9. Kısmi saflaştırılmış PAL enzim aktivitesi sonucu oluşan trans-sinamik asit miktarının belirlenmesi

Kısmi saflaştırılmış PAL enziminin farklı miktarlarının, farklı substrat derişimleriyle ve değişen sürelerde reaksiyonu sonucu ortaya çıkan trans-sinamik asit miktarı 3.2.5’de belirtilen yöntemle belirlenmiştir.

3.2.10. L-fenilalanin kısmi saflaştırılmış PAL enzimi reaksiyonu sonucu trans-sinamik aside dönüşüm yüzdesinin belirlenmesi

300 µL kısmi saflaştırılmış PAL enziminin 160 mmol/L L-fenilalanin ile 60 dak. reaksiyonu sonucunda azalan L-fenilalanin konsantrasyonu ve oluşan trans-sinamik asit miktarı 280 nm’de HPLC ile belirlenmiştir. L-fenilalaninin PAL enzimi reaksiyonu sonucu trans-sinamik aside dönüşüm yüzdesi, reaksiyon öncesinde ve sonrasındaki L-fenilalanin konsantrasyonundaki azalışa bağlı olarak belirlenmiştir.

3.2.11. İstatiksel analiz

Tüm çalışmalar 3 paralelli ve 3 tekerrürlü olarak yapılmış ve çalışmaların ortalama sonuçları verilmiştir. İstatiksel analizlerde SPSS Inc. Software (15.0 versiyonu; SPSS Inc.) kullanılmıştır. pH, sıcaklık, tampon konsantrasyonu ile PAL spesifik aktivitesi ve yapay mide suyu, bağırsak sıvısı, NaCl konsantrasyonu, depolanma stabilitesi ile oransal aktivite arasındaki korelasyona bakılmıştır. Sonuçlar Spearman Brown korelasyon katsayısı ile hesaplanmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0,05$ alınmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak belirlenmiş ise, bulunan ilişki manidardır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p>0,05$ olarak belirlenmiş ise bulunan ilişki manidar değildir.

4. DENEYSEL BULGULAR

4.1. Araştırmada Kullanılan Bitkiler



Resim 4.1. *C. fruticulosa*'nın gövde ve yaprağı



Resim 4.2. *S. nitraria*'nın gövde ve yaprağı



Resim 4.3. *S. grandis*'in gövde ve yaprağı



Resim 4.4. *S. halophila*'nın yaprağı

Bu araştırmada PAL enzim aktivitesi bakımından taranan 13 bitki örneği ile çalışılmıştır. Ankara çevresi Beypazarı ilçesinden toplanan bitki örneklerini tuz stresi koşullarında yayılış gösteren endemik veya yaygın bitki örnekleri oluşturmuştur. PAL enzim aktivitesi bakımından taranan bitki örnekleri, familyaları, özellikleri ve herbaryum numaraları Çizelge 3.1'de verilmiştir. *C. fruticulosa*, *S. nitraria*, *S. grandis* ve *S. halophila* yüksek PAL spesifik aktivitesi göstermiştir (Resim 4.1; Resim 4.2; Resim 4.3; Resim 4.4).

4.2. PAL Enzim Aktivitesi Ölçümü

Çalışmada yer alan bitki örneklerinin PAL enzim aktiviteleri L-fenilalanininin substrat olarak kullanılmasıyla, 37°C’de 290 nm’de ürün olarak trans-sinamik asit oluşumu esas alınarak belirlenmiştir. Bitki örneklerindeki protein miktarları, PAL enzim ve spesifik aktiviteleri tespit edilmiştir (Çizelge 4.1). Protein miktarları, Bradford yöntemine göre BSA protein standart eğrisine göre belirlenmiştir. PAL enzim aktivitesi trans-sinamik asit eğrisine göre belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. Bitki örneklerindeki protein miktarının, PAL enzim ve spesifik aktivitesinin kıyaslanması

Bitki Örnekleri	Protein Miktarı (mg/mL)	Enzim Aktivitesi (U/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg)
<i>A. aphylla</i>	1,416±0,063	38,4±0,1	27,1±0,1
<i>A. santonicum</i>	1,261±0,046	38,7±0,1	30,7±0,1
<i>A. nitens</i>	1,554±0,064	43,0±0,1	27,7±0,1
<i>Chenopodium</i> sp.	1,010±0,052	39,3±0,1	35,9±0,1
<i>C. fruticulosa</i>	0,583±0,040	37,9±0,0	64,9±0,1
<i>E. tenuifolia</i>	1,035±0,046	39,6±0,1	38,3±0,0
<i>E. tournefortii</i>	1,190±0,063	29,5±0,1	24,8±0,0
<i>G. eriocalyx</i>	1,337±0,025	15,7±0,0	11,8±0,0
<i>G. eriocalyx</i>	1,342±0,034	31,2±0,0	23,3±0,1
<i>K. ceratoides</i>	1,426±0,071	37,9±0,1	26,6±0,1
<i>S. grandis</i>	0,782±0,052	38,3±0,1	49,0±0,1
<i>S. nitraria</i>	2,226±0,016	38,1±0,1	17,1±0,1
<i>S. nitraria</i>	0,679±0,032	37,5±0,0	55,3±0,0
<i>S. halophila</i>	0,462±0,053	22,1±0,0	47,8±0,0
<i>V. gypsicola</i>	0,674±0,078	30,9±0,0	45,9±0,1

Yapılan çalışma sonucunda *C. fruticulosa* (64,9 U/mg), *S. nitraria* (55,3 U/mg), *S. grandis* (49,0 U/mg) ve *S. halophila* (47,8 U/mg) yüksek PAL spesifik aktivitesi, *A.*

nitens (43,0 U/mL), *E. tenuifolia* (39,6 U/mL), *Chenopodium* sp. (39,3 U/mL) ve *A. santonicum* (38,7 U/mL) yüksek PAL enzim aktivitesi göstermişlerdir. *S. nitraria* (2,226 mg/mL), *A. nitens* (1,554 mg/mL), *K. ceratoides* (1,426 mg/mL) ve *A. aphylla*'da (1,416 mg/mL) ise protein miktarı yüksek bulunmuştur. Tüm bitkilerde 0,462-2,226 mg/mL protein miktarı, 15,7-43,0 U/mL PAL enzim aktivitesi, 11,8-64,9 U/mg PAL spesifik aktivitesi tespit edilmiştir. PAL spesifik aktivitesinin yüksek ve düşük olmasında protein miktarlarının etkili olduğu görülmüştür. Yüksek PAL enzim aktivitesine sahip ancak protein miktarı düşük olan bitkilerde PAL spesifik aktivitesinin yüksek olduğu belirlenmiştir.

4.3. Enzimin Optimizasyonu Ve Karakterizasyonu

C. fruticulosa ve *S. nitraria* yüksek PAL spesifik aktivitesi gösterdiğinden enzim optimizasyonu ve karakterizasyonu çalışmalarında kullanılmak üzere seçilmişlerdir. Enzimin optimum pH'sı, sıcaklığı ve tampon konsantrasyonu, yapay mide suyu ve bağırsak sıvısındaki stabilitesi ve NaCl konsantrasyonun PAL enzim aktivitesine etkisi tespit edilmiştir.

pH'nın etkisi

100 mM Tris-HCl reaksiyon tamponu ve 100 mM Tris-HCl-40 mM L-fenilalanin substrat tamponunun pH'sı 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 8,8; 10,0; 12,0'ye ayarlanarak, *C. fruticulosa* ve *S. nitraria*'nın PAL enzim ve spesifik aktiviteleri belirlenmiştir.

Değişen pH'larda *C. fruticulosa*'dan elde edilen enzimin protein miktarı 0,686 mg/mL, PAL enzim aktivitesi 31,0-37,7 U/mL ve PAL spesifik aktivitesi 45,3-54,9 U/mg olarak tespit edilmiştir. Aynı şekilde *S. nitraria*'dan elde edilen enzimin pH'ya bağlı protein miktarı 0,763 mg/mL, PAL enzim aktivitesi 28,6-34,5 U/mL ve PAL spesifik aktivitesi ise 37,5-45,3 U/mg olarak belirlenmiştir. Her iki enziminde değişen pH'larda aktivitesini kaybetmediği, asidik (pH 2,0) ve bazik pH'ya (pH 12,0) dayanıklı olmakla birlikte, genel olarak bazik pH'ya daha dayanıklı olduğu görülmüştür. Her iki bitkiden elde edilen PAL enziminin optimum pH'sı 8,8 olarak

belirlenmiştir (Çizelge 4.2; Çizelge 4.3). *C. fruticulosa* ve *S. nitraria* için pH ile PAL spesifik aktivitesi arasında pozitif yönlü, orta düzeyde 0,536 olan bir ilişki bulunmuştur ($p>0.05$).

Çizelge 4.2. *C. fruticulosa*'ya ait PAL enzim ve spesifik aktivitesine pH'nın etkisi

pH	Protein Miktarı (mg/mL)	Enzim Aktivitesi (U/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg)
2,0	0,686±0,063	31,0±0,1	45,3±0,0
4,0	0,686±0,063	33,4±0,1	48,7±0,1
6,0	0,686±0,063	34,8±0,1	50,8±0,1
8,0	0,686±0,063	36,4±0,1	53,0±0,1
8,8	0,686±0,063	37,7±0,1	54,9±0,1
10,0	0,686±0,063	35,9±0,1	52,3±0,1
12,0	0,686±0,063	34,5±0,1	50,4±0,0

Çizelge 4.3. *S. nitraria*'ya ait PAL enzim ve spesifik aktivitesine pH'nın etkisi

pH	Protein Miktarı (mg/mL)	Enzim Aktivitesi (U/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg)
2,0	0,763±0,034	28,6±0,1	37,5±0,1
4,0	0,763±0,034	31,0±0,1	40,6±0,0
6,0	0,763±0,034	32,7±0,1	42,8±0,0
8,0	0,763±0,034	33,9±0,0	44,5±0,0
8,8	0,763±0,034	34,5±0,0	45,3±0,0
10,0	0,763±0,034	33,1±0,0	43,4±0,1
12,0	0,763±0,034	31,9±0,1	41,9±0,1

Sıcaklığın etkisi

100 mM Tris-HCl reaksiyon tamponu ve 100 mM Tris-HCl-40 mM L-fenilalanin substrat tamponunun pH'sı 8,8'e, reaksiyonun gerçekleştiği sıcaklık ise 10; 20; 30; 37; 40; 50; 60; 70°C'ye ayarlanarak *C. fruticulosa* ve *S. nitraria*'nın PAL enzim ve spesifik aktiviteleri belirlenmiştir.

60 ve 70°C'de *C. fruticulosa* ve *S. nitraria*'nın sahip oldukları enzimlerin aktivitesini kaybettiği belirlenmiştir. 10-50°C arası sıcaklıkta *C. fruticulosa*'dan elde edilen enzimin protein miktarı 0,686 mg/mL, PAL enzim aktivitesi 28,0-37,7 U/mL, PAL spesifik aktivitesi 40,9-54,9 U/mg olarak bulunmuştur. *S. nitraria*'dan elde edilen enzimin protein miktarı 0,763 mg/mL, PAL enzim aktivitesi 23,4-34,5 U/mL, PAL spesifik aktivitesi 30,6-45,3 U/mg olarak tespit edilmiştir. Her iki bitkiden elde edilen PAL enziminin optimum sıcaklığının 37°C olduğu, hem düşük sıcaklıkta (10°C), hem de yüksek sıcaklıkta (50°C) aktivitesini kaybetmediği belirlenmiştir. *C. fruticulosa*'dan elde edilen enziminin daha yüksek PAL spesifik aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.4; Çizelge 4.5). *C. fruticulosa* için sıcaklık ile PAL spesifik aktivitesi arasında negatif yönlü, orta düzeyde -0,566 olan bir ilişki bulunmuştur ($p>0,05$). *S. nitraria* için sıcaklık ile PAL spesifik aktivitesi arasında negatif yönlü, orta düzeyde -0,587 olan bir ilişki bulunmuştur ($p>0,05$).

Çizelge 4.4. *C. fruticulosa*'ya ait PAL enzim ve spesifik aktivitesine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Protein Miktarı (mg/mL)	Enzim Aktivitesi (U/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg)
10	0,686±0,063	30,5±0,1	44,5±0,1
20	0,686±0,063	32,4±0,1	47,2±0,1
30	0,686±0,063	34,6±0,0	50,5±0,1
37	0,686±0,063	37,7±0,1	54,9±0,1
40	0,686±0,063	34,6±0,1	50,5±0,1
50	0,686±0,063	28,0±0,1	40,9±0,1
60	0,686±0,063	a	a
70	0,686±0,063	a	a

a: Aktivite kaybı

Çizelge 4.5. *S. nitraria*'ya ait PAL enzim ve spesifik aktivitesine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Protein Miktarı (mg/mL)	Enzim Aktivitesi (U/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg)
10	0,763±0,034	27,9±0,1	36,6±0,0
20	0,763±0,034	30,1±0,0	39,5±0,1
30	0,763±0,034	32,4±0,1	42,4±0,1
37	0,763±0,034	34,5±0,0	45,3±0,0
40	0,763±0,034	30,9±0,0	40,5±0,1
50	0,763±0,034	23,4±0,0	30,6±0,1
60	0,763±0,034	a	a
70	0,763±0,034	a	a

a: Aktivite kaybı

Tampon konsantrasyonunun etkisi

Tris-HCl reaksiyon tamponu ve Tris-HCl-40 mM L-fenilalanin substrat tamponunun pH'sı 8,8'e, reaksiyonun gerçekleştiği tampon konsantrasyonları ise 5; 10; 25; 50; 100; 250; 500 mM'a ayarlanarak *C. fruticulosa* ve *S. nitraria*'nın PAL enzim ve spesifik aktiviteleri belirlenmiştir.

Farklı tampon konsantrasyonlarında *C. fruticulosa*'dan elde edilen enzimin protein miktarı 0,686 mg/mL, PAL enzim aktivitesi 26,8-37,7 U/mL, PAL spesifik aktivitesi 39,1-54,9 U/mg olarak bulunmuştur. Değişen tampon konsantrasyonlarında *S. nitraria*'dan elde edilen enzimin protein miktarı 0,763 mg/mL, PAL enzim aktivitesi 23,6-34,5 U/mL, PAL spesifik aktivitesi 31,0-45,3 U/mg olarak tespit edilmiştir. Her iki bitkiden elde edilen PAL enziminin optimum tampon konsantrasyonunun 100 mM olduğu, hem düşük tampon konsantrasyonunda (5 mM), hem de yüksek tampon konsantrasyonunda (500 mM) aktivitesini kaybetmediği ancak düşük tampon konsantrasyonlarında aktivitesinin daha düşük olduğu görülmüştür. *C. fruticulosa*'dan elde edilen enziminin tüm tampon konsantrasyonlarında daha yüksek PAL spesifik aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.6; Çizelge 4.7). *C. fruticulosa* ve *S. nitraria* için tampon konsantrasyonu ile PAL spesifik aktivitesi arasında pozitif yönlü, orta düzeyde 0,536 olan bir ilişki bulunmuştur ($p>0,05$).

Çizelge 4.6. *C. fruticulosa*'ya ait PAL enzim ve spesifik aktivitesine tampon konsantrasyonunun etkisi

Tampon Konsantrasyonu (mM)	Protein Miktarı (mg/mL)	Enzim Aktivitesi (U/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg)
5	0,686±0,063	26,8±0,1	39,1±0,1
10	0,686±0,063	29,1±0,0	42,4±0,1
25	0,686±0,063	32,6±0,0	47,5±0,1
50	0,686±0,063	34,6±0,1	50,5±0,0
100	0,686±0,063	37,7±0,1	54,9±0,1
250	0,686±0,063	33,6±0,1	49,0±0,0
500	0,686±0,063	30,6±0,0	44,6±0,1

Çizelge 4.7. *S. nitraria*'ya ait PAL enzim ve spesifik aktivitesine tampon konsantrasyonunun etkisi

Tampon Konsantrasyonu (mM)	Protein Miktarı (mg/mL)	Enzim Aktivitesi (U/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg)
5	0,763±0,034	23,6±0,1	31,0±0,0
10	0,763±0,034	25,9±0,1	34,0±0,0
25	0,763±0,034	29,7±0,0	38,9±0,0
50	0,763±0,034	31,8±0,1	41,7±0,1
100	0,763±0,034	34,5±0,1	45,3±0,1
250	0,763±0,034	30,3±0,0	39,7±0,1
500	0,763±0,034	27,7±0,1	36,4±0,1

Yapay mide suyu ve bağırsak sıvısının etkisi

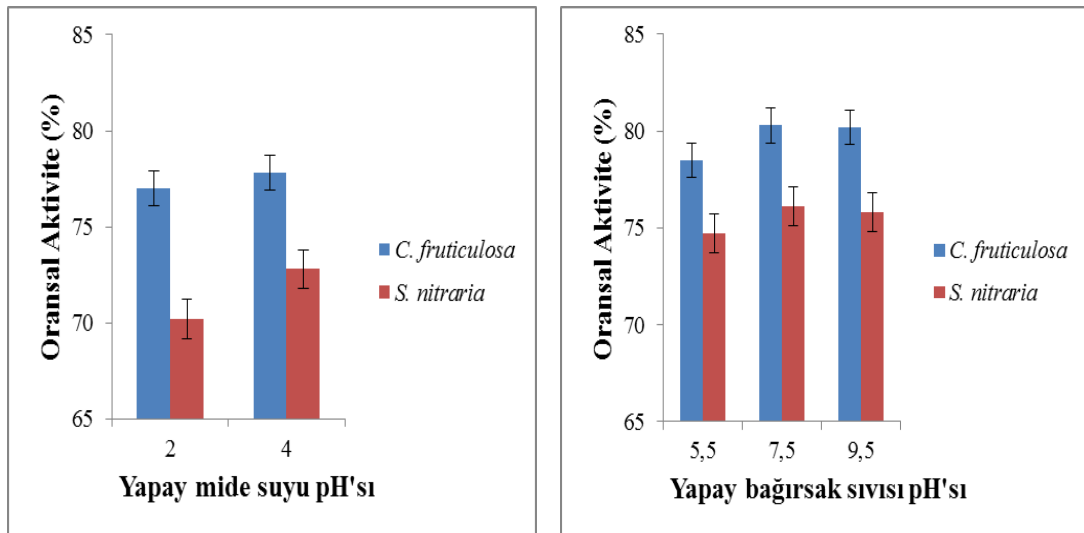
Yapay mide suyundaki PAL enzim aktivitesinin belirlenebilmesi için, pepsin % 0,5'lik serum fizyolojik solüsyonunda son konsantrasyonu 3 g/L olacak şekilde çözülerek yapay mide suyu hazırlanmıştır. Hazırlanan yapay mide suyunun pH'sı 4 M NaOH ve 4 M HCl ile 2,0; 4,0'e ayarlanarak, *C. fruticulosa* ve *S. nitraria*'nın PAL enzim aktiviteleri belirlenmiştir.

Yapay mide suyunda her iki bitkiden de elde edilen PAL enziminin aktivitesine göre önemli olabilecek düzeyde oransal azalma tespit edilmemiştir. Farklı pH'lardaki iki yapay mide suyu denemesinde oransal aktivitesinde en az azalma ile *C. fruticulosa*'dan elde edilen PAL enziminin daha dayanıklı olduğu gözlenmiştir. Bu bitkinin PAL enzimi pH 4,0'de ki yapay mide suyunda % 77,8 oransal aktivite ile % 22,2'lik bir aktivite kaybına uğradığı, pH 2,0'de ise bu kaybın % 77 oransal aktivite ile % 23 olduğu belirlenmiştir. *S. nitraria*'nın PAL enzimi pH 4,0'de ki yapay mide suyunda % 72,8 oransal aktivite ile % 27,2'lik bir aktivite kaybına uğradığı, pH 2,0'de % 70,2 olarak belirlenen oransal aktivite ile, aktivite kaybının % 29,8 olduğu belirlenmiştir. Her iki PAL enzimi de pH 4,0'de aktivitesini daha az kaybederken, pH 2,0'deki azalmanın pH 4,0'e göre çok büyük farklılık göstermediği tespit edilmiştir (Şekil 4.1).

Yapay bağırsak sıvısındaki PAL enzim aktivitesinin belirlenebilmesi için, pankreatin % 0,5'lik serum fizyolojik solüsyonunda son konsantrasyonu 1 g/L olacak şekilde çözülerek yapay bağırsak sıvısı hazırlanmıştır. Hazırlanan yapay bağırsak sıvısına % 0,30 oranında safra tuzu eklendikten sonra pH'sı 4 M NaOH ve 4 M HCl ile 5,5; 7,5; 9,5'e ayarlanarak *C. fruticulosa* ve *S. nitraria*'nın PAL enzim aktiviteleri belirlenmiştir.

Yapay bağırsak sıvısında her iki bitkiden de elde edilen PAL enziminin aktivitesine göre önemli olabilecek düzeyde oransal azalma tespit edilmemiştir. Farklı pH'lardaki üç yapay bağırsak sıvısı denemesinde oransal aktivitesinde en az azalma ile *C. fruticulosa*'dan elde edilen PAL enziminin daha dayanıklı olduğu gözlenmiştir. Bu

bitkinin PAL enzimi pH 7,5’de ki yapay bağırsak sıvısında % 80,3 oransal aktivite ile % 19,7’lik bir aktivite kaybına uğradığı, pH 5,5’de ise bu kaybın % 78,5 oransal aktivite ile % 21,5 olduğu belirlenmiştir. *S. nitraria*’nın PAL enzimi pH 7,5’de ki yapay bağırsak sıvısında % 76,1 oransal aktivite ile, % 23,9’luk bir aktivite kaybına uğradığı, pH 5,5’de % 74,7 olarak belirlenen oransal aktivite ile aktivite kaybının % 25,3 olduğu tespit edilmiştir. Her iki PAL enzimi de pH 7,5’de aktivitesini daha az kaybederken, pH 5,5’deki azalmanın pH 7,5’e göre çok büyük farklılık göstermediği tespit edilmiştir (Şekil 4.1). *C. fruticulosa* ve *S. nitraria* için yapay mide ve bağırsak sıvısı pH’sı ile oransal aktivite arasında pozitif yönlü, yüksek düzeyde 0,900 olan bir ilişki bulunmuştur ($p<0,05$).

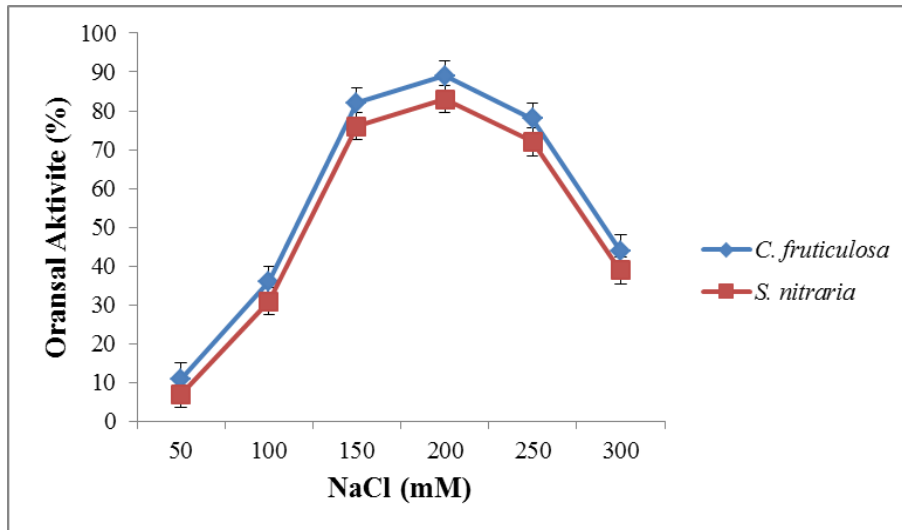


Şekil 4.1. PAL enzim aktivitesine yapay mide suyu ve bağırsak sıvısı pH'sının etkisi

NaCl konsantrasyonunun etkisi

NaCl konsantrasyonunun PAL enzim aktivitesine etkisinin belirlenebilmesi için 4 M NaOH ve 4 M HCl kullanılarak, 100 mM Tris-HCl reaksiyon tamponu ve 100 mM Tris-HCl-40 mM L-fenilalanin substrat tamponunun pH'sı 8,8'e ayarlanmıştır. Reaksiyon ve substrat tamponundaki NaCl konsantrasyonları 50; 100; 150; 200; 250; 300 mM'a ayarlanarak, reaksiyon 37°C'de gerçekleştirilmiştir.

Her iki bitkiden elde edilen PAL enziminin aktivitesine NaCl konsantrasyonunun etkisi benzer bulunmuştur. Her iki enzimde de düşük ve yüksek NaCl konsantrasyonunun oransal aktiviteyi düşürdüğü ve 200 mM NaCl konsantrasyonunda enzimin aktivitesinde kayda değer bir düşüş olmadığı belirlenmiştir. *C. fruticulosa*'da en yüksek oransal aktivite 200 mM NaCl konsantrasyonunda (% 89,0), en düşük oransal aktivite ise 50 mM NaCl konsantrasyonunda (% 11,0) bulunmuştur. 50 mM NaCl konsantrasyonunda enzimin aktivitesinde % 89'luk kayıp belirlenmiştir. *S. nitraria*'da en yüksek oransal aktivite 200 mM NaCl konsantrasyonunda (% 83,0), en düşük oransal aktivite ise 50 mM NaCl konsantrasyonunda (% 7,0) bulunmuştur. 50 mM NaCl konsantrasyonunda enzimin aktivitesinde % 93'lük kayıp belirlenmiştir. Her iki bitkiden elde edilen PAL enziminin optimum NaCl konsantrasyonunun 200 mM olduğu tespit edilmiştir. Her iki bitkide de 50 mM NaCl konsantrasyonunda enzim aktivitesinde kayıp gözlenmesiyle, bu enzimin daha çok tuzlu ortamda aktivite gösterdiği sonucu çıkarılmıştır (Şekil 4.2). *C. fruticulosa* ve *S. nitraria* için NaCl konsantrasyonu ile oransal aktivite arasında pozitif yönlü, orta düzeyde 0,486 olan bir ilişki bulunmuştur ($p>0,05$).

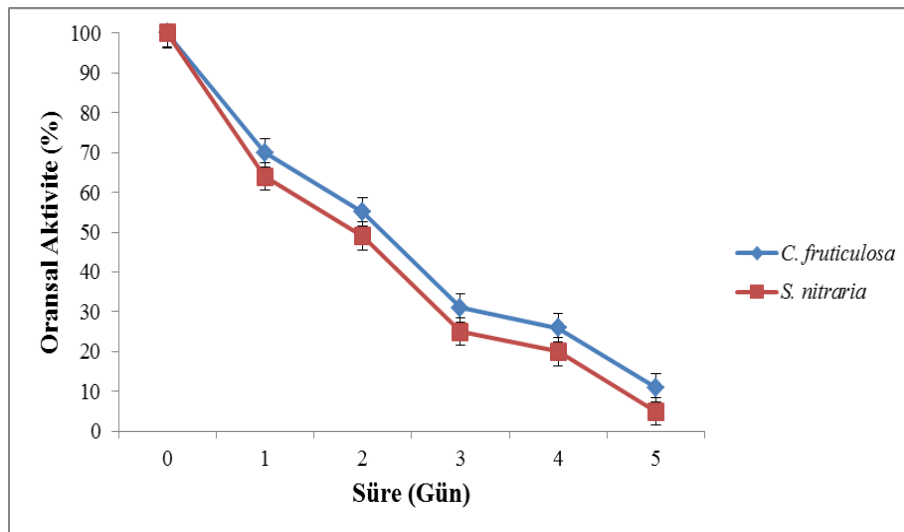


Şekil 4.2. PAL enzim aktivitesine NaCl konsantrasyonunun etkisi

4.4. PAL Enziminin Depolanma Stabilitésinin Belirlenmesi

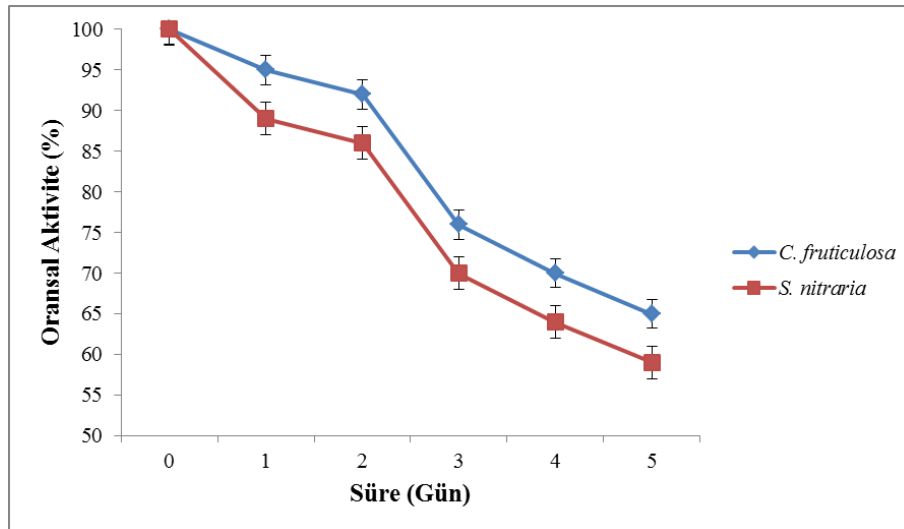
Depolanma stabilitésinin belirlenmesi için PAL enzimi oda sıcaklığında ve +4°C’de 5 gün boyunca bekletilmiştir. Her gün PAL enzim aktivitesi ölçülerek aktivitedeki değişiklik belirlenmiştir. -20°C’de ise 1 yıl boyunca bekletilmiştir. Her ay PAL enzim aktivitesi ölçülerek aktivitedeki değişiklik belirlenmiştir. 4 M NaOH ve 4 M HCl kullanılarak, 100 mM Tris-HCl reaksiyon tamponu ve 100 mM Tris-HCl-40 mM L-fenilalanin substrat tamponunun pH’sı 8,8’e ayarlanmış ve reaksiyon 37°C’de gerçekleştirilmiştir.

Oda sıcaklığında bekletilen *C. fruticulosa*’ya ait PAL enziminin en yüksek oransal aktivitesi 1. günde (% 70,0), en düşük oransal aktivitesi ise 5. günde (% 11,0) bulunmuştur. PAL enzim aktivitesi 5 gün sonunda % 89 azalma göstermiştir. Oda sıcaklığında bekletilen *S. nitraria*’ya ait PAL enziminin en yüksek oransal aktivitesi 1. günde (% 64,0), en düşük oransal aktivitesi ise 5. günde (% 5,0) bulunmuştur. PAL enzim aktivitesi 5 gün sonunda % 95 azalma göstermiştir. Her iki bitkiden de elde edilen enzimin % 50’ye yakın aktivite kaybı, oda sıcaklığında 2. günde belirlenmiştir (Şekil 4.3). *C. fruticulosa* ve *S. nitraria* için süre ile oransal aktivite arasında negatif yönlü, yüksek düzeyde -1,000 olan bir ilişki bulunmuştur ($p<0,05$).



Şekil 4.3. PAL enzim aktivitesinin oda sıcaklığındaki depolanma stabilitesi

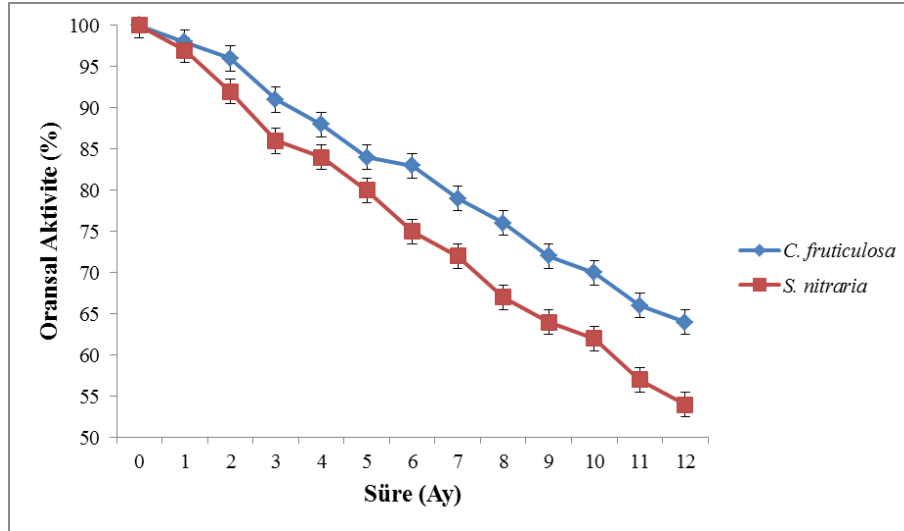
+4°C’de bekletilen *C. fruticulosa*’ya ait PAL enziminin en yüksek oransal aktivitesi 1. günde (% 95,0), en düşük oransal aktivitesi ise 5. günde (% 65,0) bulunmuştur. PAL enzim aktivitesi 5 gün sonunda % 35 azalma göstermiştir. +4°C’de bekletilen *S. nitraria*’ya ait PAL enziminin en yüksek oransal aktivitesi 1. günde (% 89,0), en düşük oransal aktivitesi ise 5. günde (% 59,0) bulunmuştur. PAL enzim aktivitesi 5 gün sonunda % 41 azalma göstermiştir. Her iki bitkiden de elde edilen enzimin % 50’ye yakın aktivite kaybı, +4°C’de 5. günde belirlenmiştir (Şekil 4.4). *C. fruticulosa* ve *S. nitraria* için süre ile oransal aktivite arasında negatif yönlü, yüksek düzeyde - 1,000 olan bir ilişki bulunmuştur ($p<0,05$).



Şekil 4.4. PAL enzim aktivitesinin +4°C’de ki depolanma stabilitesi

-20°C’de bekletilen *C. fruticulosa*’ya ait PAL enziminin en yüksek oransal aktivitesi 1. ayda (% 98,0), en düşük oransal aktivitesi ise 12. ayda (% 64,0) bulunmuştur. PAL enzim aktivitesi 12 ay sonunda % 36 azalma göstermiştir. -20°C’de bekletilen *S. nitraria*’ya ait PAL enziminin en yüksek oransal aktivitesi 1. ayda (% 97,0), en düşük oransal aktivitesi ise 12. ayda (% 54,0) bulunmuştur. PAL enzim aktivitesi 12 ay sonunda % 46 azalma göstermiştir. Her iki bitkiden de elde edilen enzimin % 50’ye yakın aktivite kaybı, -20°C’de ise 12. ayda belirlenmiştir. PAL enziminin - 20°C’de depolanarak daha uzun süre aktivitesini koruyacağı belirlenmiştir ve *C. fruticulosa*’dan elde edilen enziminin daha yüksek PAL enzim aktivitesi gösterdiği

tespit edilmiştir (Şekil 4.5). *C. fruticulosa* ve *S. nitraria* için süre ile oransal aktivite arasında negatif yönlü, yüksek düzeyde -1,000 olan bir ilişki bulunmuştur ($p<0,05$).



Şekil 4.5. PAL enzim aktivitesinin -20°C’de ki depolanma stabilitesi

4.5. PAL Enzim Aktivitesi Sonucu Oluşan Trans-Sinamik Asit Miktarının Belirlenmesi

Yüksek PAL spesifik aktivitesi gösteren *C. fruticulosa*, *S. nitraria*, *S. grandis* ve *S. halophila*’nın PAL enzim aktivitesi sonucu oluşan trans-sinamik asit miktarı HPLC ile tespit edilmiştir.

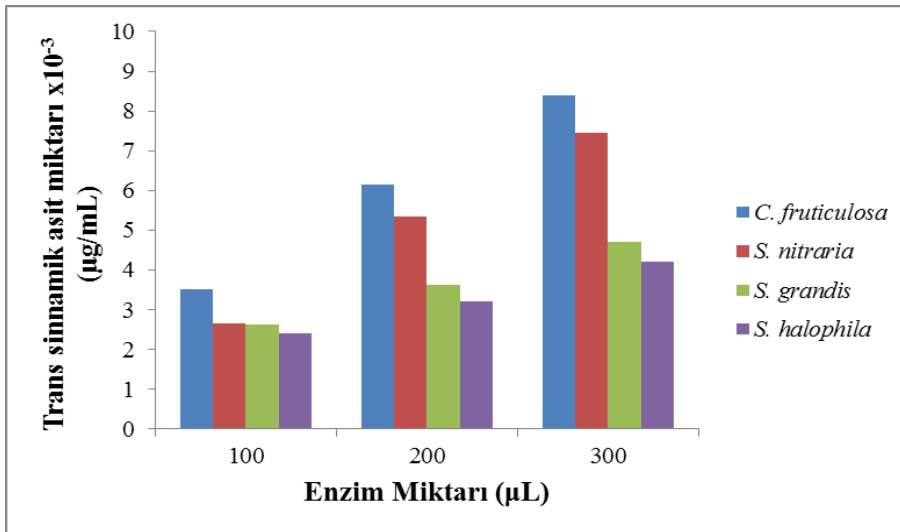
Dört bitkide de en yüksek trans-sinamik asit miktarı 300 µL enzim miktarında bulunmuştur. Sonuçlar Şekil 4.6’da gösterilmiştir. Bu enzim miktarında en iyi sonuç *C. fruticulosa* ($8,4 \times 10^{-3}$ µg/mL) ve *S. nitraria*’dan ($7,5 \times 10^{-3}$ µg/mL) elde edilen enzimde bulunmuştur.

40, 80, 160 mmol/L substrat konsantrasyonlarında dört bitkide de 160 mmol/L konsantrasyonunda enzim aktivitesinde artış gözlenirken, bu artışın dikkate değer oranda olmadığı belirlenmiştir. Bu deney sonuçlarında da en fazla trans-sinamik asit

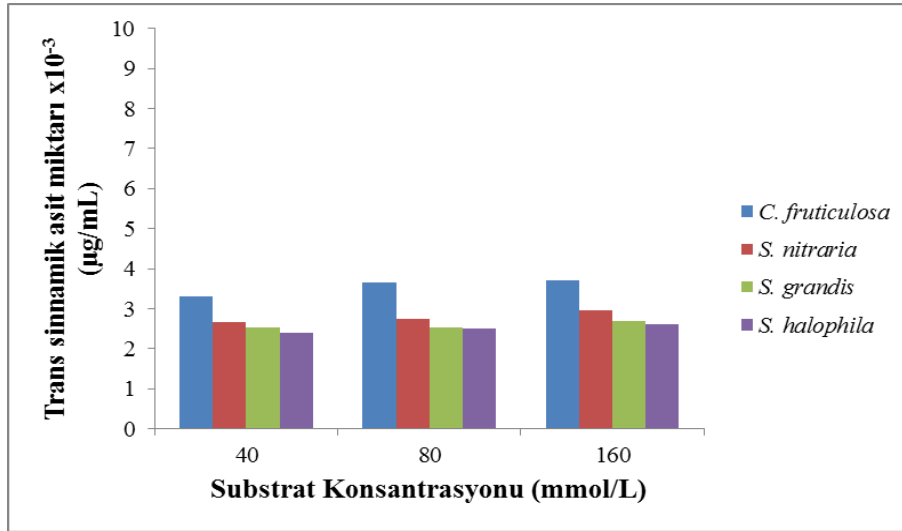
oluşumu *C. fruticulosa* ($3,7 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$) ve *S. nitraria*'dan ($3,0 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$) elde edilmiş enzimlerde görülmüştür (Şekil 4.7).

Dört bitkide de en yüksek trans-sinamik asit miktarı 90 dak. reaksiyon süresinde bulunmuştur. Sonuçlar Şekil 4.8'de gösterilmiştir. Bu reaksiyon süresinde en iyi sonuç *C. fruticulosa* ($6,2 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$) ve *S. nitraria*'dan ($6,1 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$) elde edilen enzimde tespit edilmiştir.

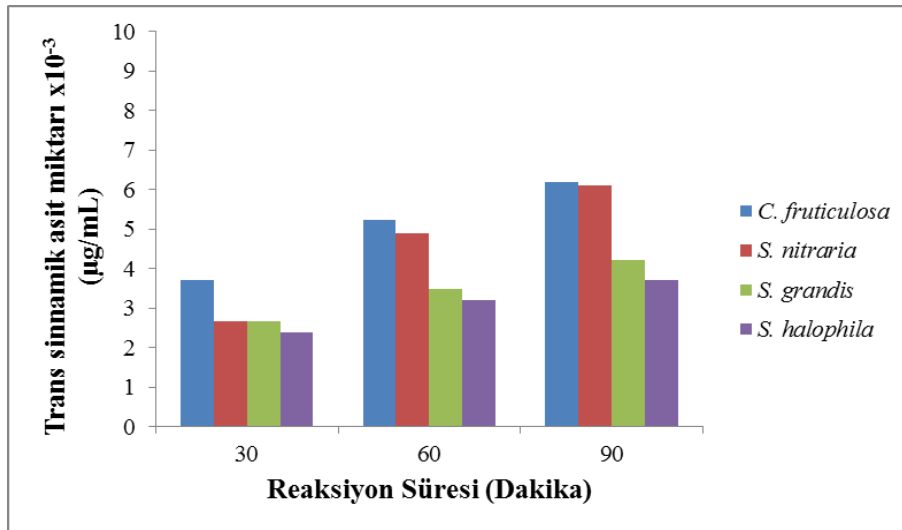
Her dört bitkinin enzimleriyle yapılan çalışma sonuçları enzim miktarı, substrat konsantrasyonu ve reaksiyon süresi arttıkça oluşan trans-sinamik asit miktarının da arttığını göstermiştir. Tüm çalışmalarda en iyi sonucu *C. fruticulosa* ve *S. nitraria*'ya ait enzimlerin göstermesi en yüksek PAL spesifik aktivitesine sahip olmaları ile uyumlu bulunmuştur.



Şekil 4.6. Trans-sinamik asit miktarına enzim miktarının etkisi



Şekil 4.7. Trans-sinamik asit miktarına substrat konsantrasyonunun etkisi



Şekil 4.8. Trans-sinamik asit miktarına reaksiyon süresinin etkisi

4.6. L-fenilalaninin PAL Enzimi Reaksiyonu Sonucu Trans-Sinamik Aside Dönüşüm Yüzdesinin Belirlenmesi

Yüksek PAL spesifik aktivitesi gösteren *C. fruticulosa*, *S. nitraria*, *S. grandis* ve *S. halophila*'da L-fenilalaninin PAL enzimi reaksiyonu sonucu trans-sinamik aside dönüşüm yüzdesinin belirlenmesi HPLC ile tespit edilmiştir.

Dört bitkide de 300 µL PAL enziminin 160 mmol/L L-fenilalanin ile 30 dak. reaksiyonu sonucunda oluşan trans-sinamik asit miktarı 280 nm’de HPLC ile belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.8’de gösterilmiştir. Reaksiyon öncesinde L-fenilalanin konsantrasyonu 160 mmol/L iken, reaksiyon sonrasında L-fenilalanin konsantrasyonunun azaldığı bulunmuştur. L-fenilalanin konsantrasyonundaki azalışa bağlı olarak L-fenilalaninin trans-sinamik aside dönüşüm yüzdesi hesaplanmıştır. Reaksiyon öncesinde trans-sinamik asit miktarı 0 µg/mL iken, reaksiyon sonrasında trans-sinamik asit miktarının arttığı bulunmuştur. L-fenilalaninin trans-sinamik aside dönüşüm yüzdesi ve trans-sinamik asit miktarı en yüksek *C. fruticulosa* ve *S. nitraria*’dan elde edilen enzimde tespit edilmiştir.

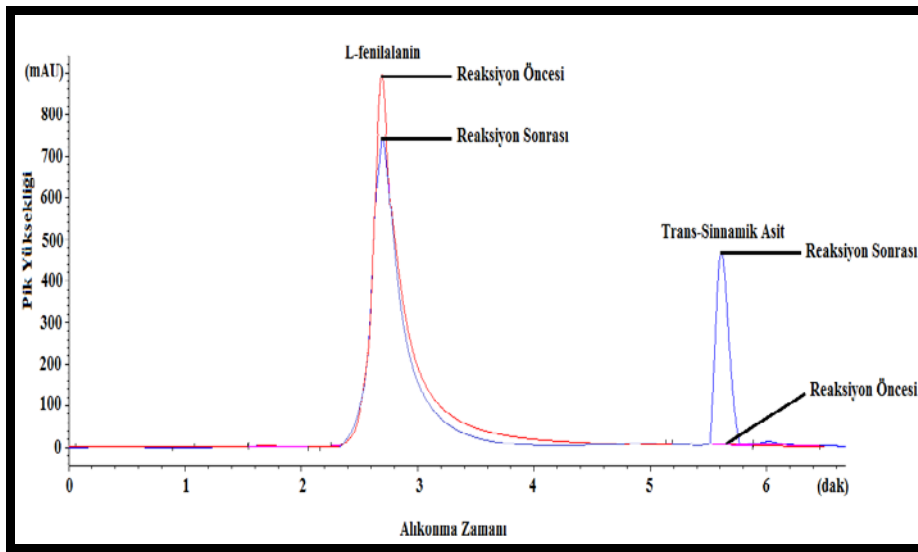
Çizelge 4.8. L-fenilalaninin trans-sinamik aside dönüşüm yüzdesinin belirlenmesi

Bitki örnekleri	<i>C. fruticulosa</i>	<i>S. nitraria</i>	<i>S. grandis</i>	<i>S. halophila</i>
Sonuçlar				
L-fenilalanin konsantrasyonu (mmol/L) ¹	160	160	160	160
L-fenilalanin konsantrasyonu (mmol/L) ²	124	126	139	145
L-fenilalaninin trans-sinamik aside dönüşüm yüzdesi (%)	22,5	21,3	13,1	9,4
Trans-sinamik asit miktarı x 10 ⁻³ (µg/mL) ¹	0	0	0	0
Trans-sinamik asit miktarı x 10 ⁻³ (µg/mL) ²	12,3	7,4	5,8	3,2

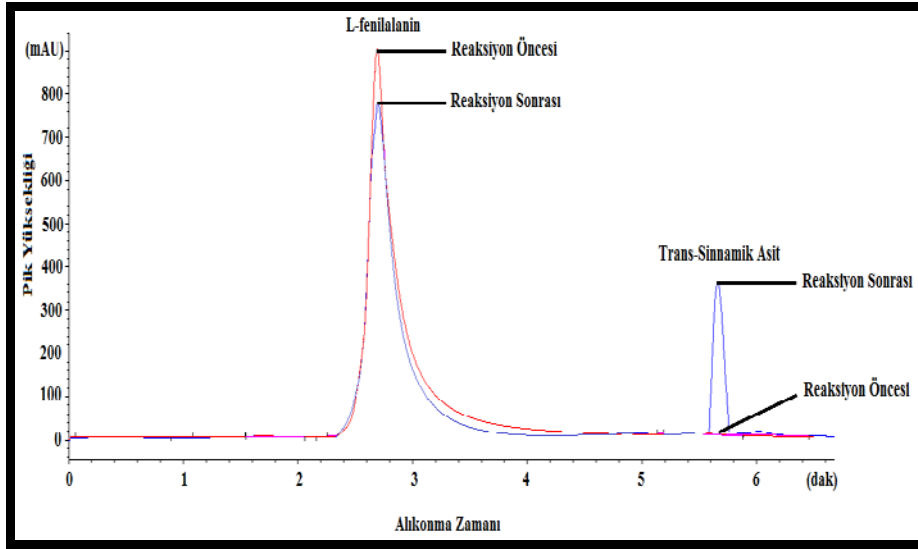
¹ Reaksiyon öncesinde

² Reaksiyon sonrasında

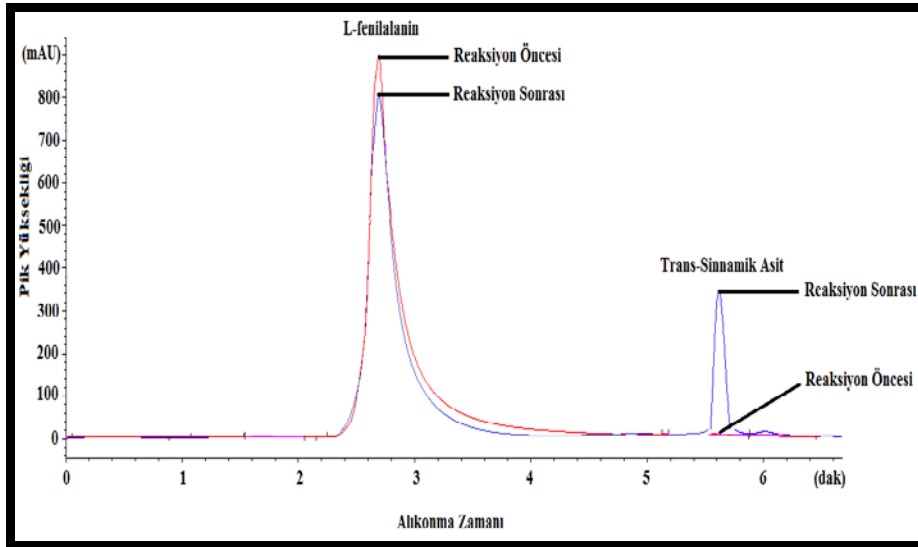
Her dört bitkide reaksiyon öncesinde ortamda sadece L-fenilalanin bulunurken, reaksiyon sonrasında ortamda L-fenilalanin azalırken trans-sinamik asitte de aynı oranda artışın olduğu gözlenmiştir. Buda tüm bitkilerdeki PAL enzim aktivitesinin göstergesidir. Yine bu sonuçlara göre trans-sinamik asit dönüşüm yüzdesi hesaplandığında, en iyi sonucu *C. fruticulosa* ve *S. nitraria*'dan elde edilen enzimlerin göstermesi bu enzimlerin en yüksek PAL spesifik aktivitesine sahip olmaları ile uyumludur (Şekil 4.9; Şekil 4.10; Şekil 4.11; Şekil 4.12).



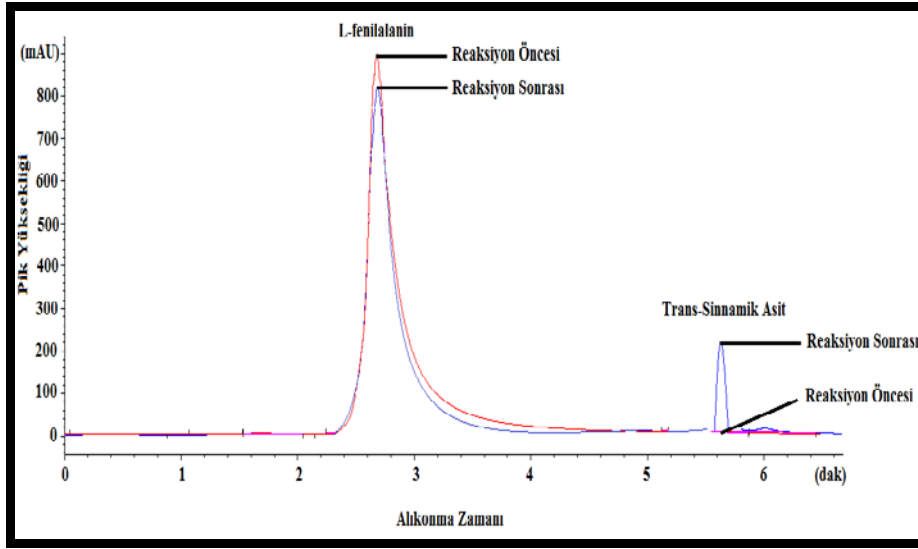
Şekil 4.9. *C. fruticulosa*'da reaksiyon öncesi ve sonrasında L-fenilalanin ve trans-sinamik asit arasındaki ilişkiyi gösteren kromatogram



Şekil 4.10. *S. nitraria*'da reaksiyon öncesi ve sonrasında L-fenilalanin ve trans-sinamik asit arasındaki ilişkiyi gösteren kromatogram



Şekil 4.11. *S. grandis*'de reaksiyon öncesi ve sonrasında L-fenilalanin ve trans-sinamik asit arasındaki ilişkiyi gösteren kromatogram



Şekil 4.12. *S. halophila*'da reaksiyon öncesi ve sonrasında L-fenilalanin ve trans-sinamik asit arasındaki ilişkiyi gösteren kromatogram

4.7. PAL Enziminin Kısmi Olarak Saflaştırılması

Dört bitkide de PAL enziminin kısmi saflaştırılması amacıyla önce % 60 amonyum sülfat çöktürmesi ardından Slide-A-Lyzer G2 20 kDa diyaliz kasediyle diyaliz işlemi yapılmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.9'da gösterilmiştir.

Ham *C. fruticulosa*'nın protein miktarı 0,775 mg/mL, PAL enzim aktivitesi 40,78 U/mL, PAL spesifik aktivitesi 52,62 U/mg olarak belirlenmiştir. Enzime herhangi bir saflaştırma işlemi uygulanmadığı için saflaştırma katsayısı 0, verim ise % 100 olarak kabul edilmiştir. Enzimin kısmi saflaştırılması için ham ekstrakt % 60 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile çöktürülmüştür. Çöktürme işlemi sonucu protein miktarı 0,635 mg/mL, PAL enzim aktivitesi 40,25 U/mL, PAL spesifik aktivitesi 63,39 U/mg olarak belirlenmiştir. Saflaştırma katsayısı, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'la çöktürülen örneğin PAL spesifik aktivitesinin, ham ekstraktın PAL spesifik aktivitesine oranlanmasıyla elde edilerek 1,21 olarak tespit edilmiştir. Verim ise, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'la çöktürülen örneğin PAL enzim aktivitesinin, ham ekstraktın PAL enzim aktivitesine oranlanmasıyla elde edilerek % 98,70 olarak tespit edilmiştir. Ortamdaki $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'ın uzaklaştırılması için uygulanan diyaliz işlemi sonunda protein miktarı 0,404 mg/mL, PAL enzim

aktivitesi 39,82 U/mL, PAL spesifik aktivitesi 98,56 U/mg olarak tespit edilmiştir. Diyaliz sonucu saflaştırma katsayısı 1,87, verim % 97,65 olarak belirlenmiştir.

Ham *S. nitraria*'nın protein miktarı 0,890 mg/mL, PAL enzim aktivitesi 39,87 U/mL, PAL spesifik aktivitesi 44,80 U/mg olarak belirlenmiştir. Enzime herhangi bir saflaştırma işlemi uygulanmadığı için saflaştırma katsayısı 0, verim ise % 100 olarak kabul edilmiştir. Enzimin kısmi saflaştırılması için ham ekstrakt % 60 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile çöktürülmüştür. Çöktürme işlemi sonucu protein miktarı 0,750 mg/mL, PAL enzim aktivitesi 39,56 U/mL, PAL spesifik aktivitesi 52,75 U/mg olarak belirlenmiştir. Saflaştırma katsayısı, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'la çöktürülen örneğin PAL spesifik aktivitesinin, ham ekstraktın PAL spesifik aktivitesine oranlanmasıyla elde edilerek 1,18 olarak tespit edilmiştir. Verim ise $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'la çöktürülen örneğin PAL enzim aktivitesinin, ham ekstraktın PAL enzim aktivitesine oranlanmasıyla elde edilerek % 99,22 olarak tespit edilmiştir. Ortamdaki $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'ın uzaklaştırılması için uygulanan diyaliz işlemi sonunda protein miktarı 0,433 mg/mL, PAL enzim aktivitesi 39,12 U/mL, PAL spesifik aktivitesi 90,35 U/mg olarak tespit edilmiştir. Diyaliz sonucu saflaştırma katsayısı 2,02, verim % 98,12 olarak belirlenmiştir.

Diyaliz kasedi sayesinde ortamdan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ tuzu ve 20 kDa moleküler ağırlığından küçük proteinler uzaklaştırılmıştır. Saflaştırma katsayısı PAL spesifik aktivitelerinin, verim ise PAL enzim aktivitelerinin oranlanmasıyla bulunmuştur. Kısmi saflaştırma sonucunda *C. fruticulosa* ve *S. nitraria*'dan elde edilen enzimin daha yüksek PAL enzim ve spesifik aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir. En yüksek saflaştırma katsayısı *S. grandis* ve *S. halophila*'da, en yüksek verim ise *C. fruticulosa* ve *S. nitraria*'da bulunmuştur.

Çizelge 4.9. Kısmi saflaştırma basamaklarında elde edilen değerler

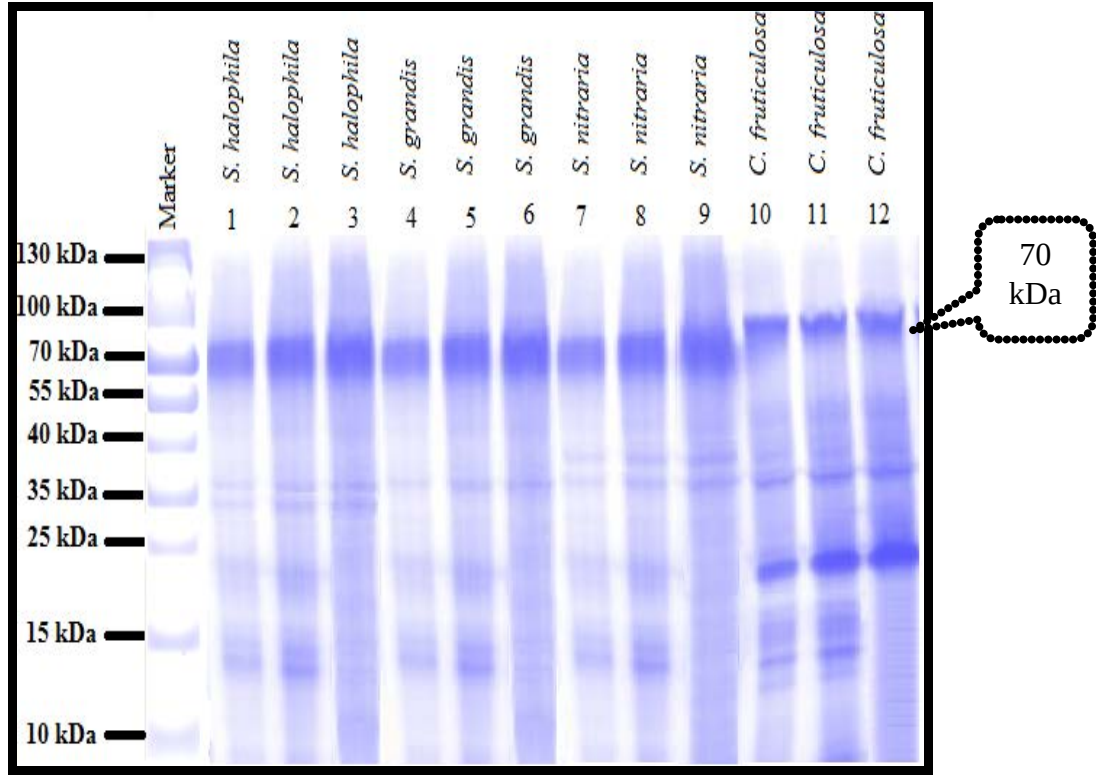
Saflaştırma Basamağı	Protein Miktarı (mg/ml)	Enzim Aktivitesi (U/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma Katsayısı	Verim (%)
Ham Ekstrakt ¹	0,775	40,78	52,62	0	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ ¹	0,635	40,25	63,39	1,21	98,70
Diyaliz ¹	0,404	39,82	98,56	1,87	97,65
Ham Ekstrakt ²	0,890	39,87	44,80	0	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ ²	0,750	39,56	52,75	1,18	99,22
Diyaliz ²	0,433	39,12	90,35	2,02	98,12
Ham Ekstrakt ³	0,987	38,87	39,38	0	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ ³	0,836	38,12	45,60	1,16	98,07
Diyaliz ³	0,432	37,82	87,55	2,22	97,30
Ham Ekstrakt ⁴	0,990	38,30	38,69	0	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ ⁴	0,843	37,80	44,84	1,16	98,69
Diyaliz ⁴	0,461	37,10	80,48	2,08	96,87

¹ *C. fruticulosa*² *S. nitraria*³ *S. grandis*⁴ *S. halophila*

PAL enziminin kısmi saflaştırma sonrası SDS-PAGE ile moleküler ağırlığının belirlenmesi

C. fruticulosa, *S. nitraria*, *S. grandis* ve *S. halophila*'nın çeşitli kısmi saflaştırma basamağındaki enzimleri jelle yüklenerek yürütülmüştür. Elektroforez işleminin hemen ardından jeller tespit edilip, boyanmıştır. Daha sonra bitki örneklerinin jel üzerinde oluşturduğu protein bantları UVP dijital görüntüleme sistemi kullanılarak değerlendirilmiş ve enzimin moleküler ağırlığı hakkında bilgi edinilmiştir. Diyaliz işlemi sonrasında ortamdan 20 kDa moleküler ağırlığından küçük proteinlerin

uzaklaştırıldığı tespit edilmiştir. Dört bitkiye ait PAL enziminin moleküler ağırlığının yaklaşık olarak 70 kDa olduğu bulunmuştur (Resim 4.5).

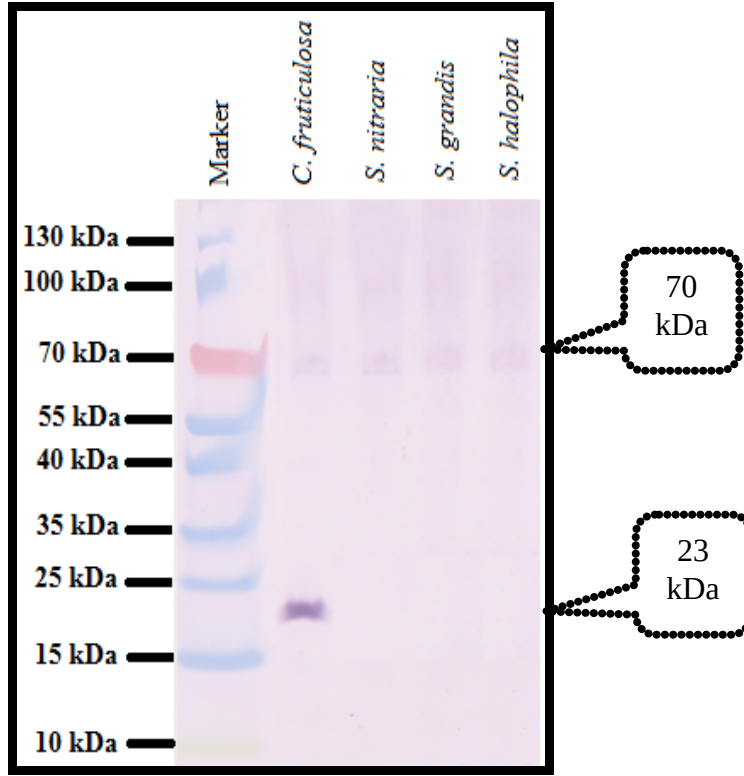


Resim 4.5. Çeşitli kısmi saflaştırma basamağındaki enzimlerin elektroforetik profili: 1-4-7-10. Ham ekstrakt; 2-5-8-11. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi; 3-6-9-12. Diyaliz.

4.8. PAL Proteininin Western Blot İle Belirlenmesi

C. fruticulosa, *S. nitraria*, *S. grandis* ve *S. halophila*'dan elde edilen proteinler SDS-PAGE jelde yürütülerek transferde kullanılacak olan jeller elde edilmiştir. Proteinler jel transfer cihazı kullanılarak, jelden PVDF membrana kuru transferle aktarılmıştır. Bundan sonraki aşamalar Western Breeze kiti kullanılarak yapılmıştır. Membran bloke edildikten sonra birincil antikor ile işaretlenmiştir. Daha sonra ikincil antikor ve kromojenik substrat ile muamele edilmiştir. Bitki örneklerinin membran üzerinde oluşturduğu kromojenik protein bantları UVP dijital görüntüleme sistemi kullanılarak değerlendirilmiş ve proteinin moleküler ağırlığı hakkında bilgi edinilmiştir. Bütün bitkilerde PAL proteinin moleküler ağırlığının yaklaşık olarak 70

kDa olduğu bulunmuştur. *C. fruticulosa*'da ise 23 kDa ağırlığında bir protein bandı daha bulunmuştur (Resim 4.6).



Resim 4.6. PAL proteinin membran görüntüsü

4.9. Kısmi Saflaştırılmış PAL Enzim Aktivitesi Sonucu Oluşan Trans-Sinamik Asit Miktarının Belirlenmesi

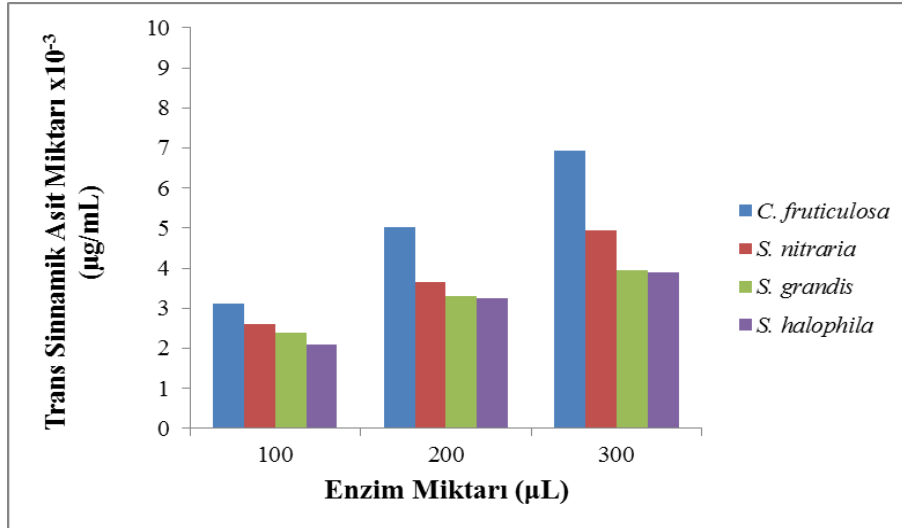
Yüksek PAL spesifik aktivitesi gösteren *C. fruticulosa*, *S. nitraria*, *S. grandis* ve *S. halophila*'nın kısmi saflaştırılmış PAL enzim aktivitesi sonucu oluşan trans-sinamik asit miktarı HPLC ile tespit edilmiştir.

Dört bitkide de en yüksek trans-sinamik asit miktarı 300 µL enzim miktarında bulunmuştur. Sonuçlar Şekil 4.13'de gösterilmiştir. Bu enzim miktarında en iyi sonuç *C. fruticulosa* ($6,9 \times 10^{-3}$ µg/mL) ve *S. nitraria*'dan ($4,9 \times 10^{-3}$ µg/mL) elde edilen enzimde bulunmuştur.

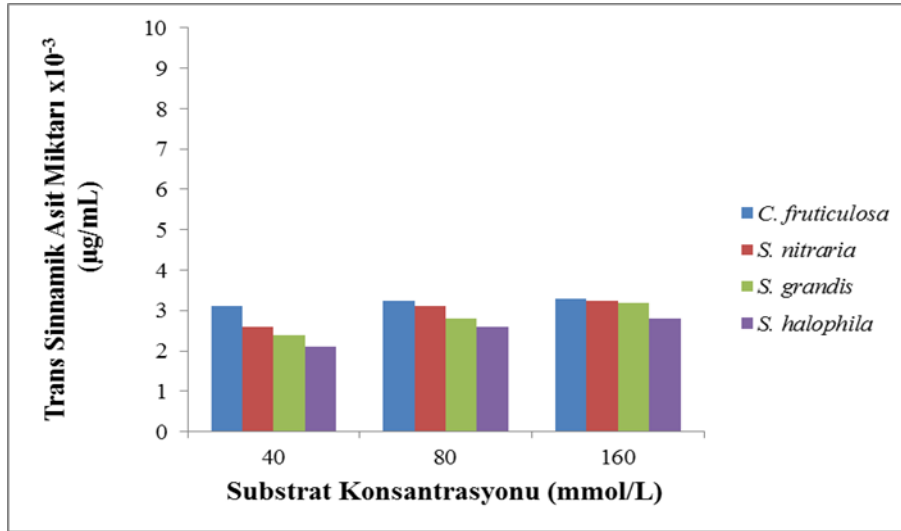
40, 80, 160 mmol/L substrat konsantrasyonlarında dört bitkide de 160 mmol/L konsantrasyonunda enzim aktivitesinde artış gözlenirken, bu artışın dikkate değer oranda olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.14). Bu deney sonuçlarında da en fazla trans-sinamik asit oluşumu *C. fruticulosa* ($3,3 \times 10^{-3}$ µg/mL) ve *S. nitraria*'dan ($3,3 \times 10^{-3}$ µg/mL) elde edilmiş enzimlerde görülmüştür.

Dört bitkide de en yüksek trans-sinamik asit miktarı 90 dak. reaksiyon süresinde bulunmuştur. Sonuçlar Şekil 4.15'de gösterilmiştir. Bu reaksiyon süresinde en iyi sonuç *C. fruticulosa* ($6,3 \times 10^{-3}$ µg/mL) ve *S. nitraria*'dan ($6,2 \times 10^{-3}$ µg/mL) elde edilen enzimde tespit edilmiştir.

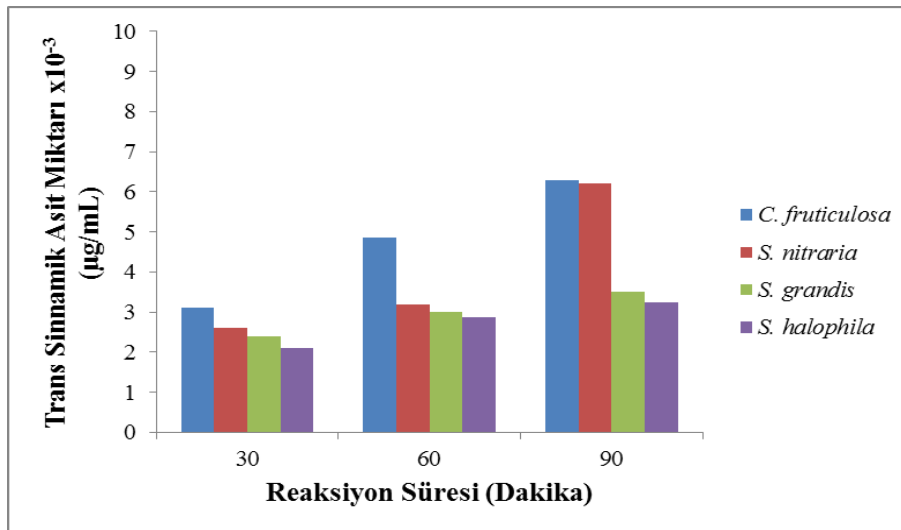
Her dört bitkinin enzimleriyle yapılan çalışma sonuçları enzim miktarı, substrat konsantrasyonu ve reaksiyon süresi arttıkça oluşan trans-sinamik asit miktarının da arttığını göstermiştir. Tüm çalışmalarda en iyi sonucu *C. fruticulosa* ve *S. nitraria*'ya ait enzimlerin göstermesi en yüksek PAL spesifik aktivitesine sahip olmaları ile uyumlu bulunmuştur.



Şekil 4.13. Trans-sinamik asit miktarına enzim miktarının etkisi



Şekil 4.14. Trans-sinamik asit miktarına substrat konsantrasyonunun etkisi



Şekil 4.15. Trans-sinamik asit miktarına reaksiyon süresinin etkisi

4.10. L-fenilalaninin Kısmi Saflaştırılmış PAL Enzimi Reaksiyonu Sonucu

Trans-Sinamik Aside Dönüşüm Yüzdesinin Belirlenmesi

Yüksek PAL spesifik aktivitesi gösteren *C. fruticulosa*, *S. nitraria*, *S. grandis* ve *S. halophila*'da L-fenilalaninin kısmi saflaştırılmış PAL enzimi reaksiyonu sonucu trans-sinamik aside dönüşüm yüzdesinin belirlenmesi HPLC ile tespit edilmiştir

Dört bitkide de 300 µL PAL enziminin 160 mmol/L L-fenilalanin ile 30 dak. reaksiyonu sonucunda oluşan trans-sinamik asit miktarı 280 nm’de HPLC ile belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.10’da gösterilmiştir. Reaksiyon öncesinde L-fenilalanin konsantrasyonu 160 mmol/L iken, reaksiyon sonrasında L-fenilalanin konsantrasyonunun azaldığı bulunmuştur. L-fenilalanin konsantrasyonundaki azalışa bağlı olarak L-fenilalaninin trans-sinamik aside dönüşüm yüzdesi hesaplanmıştır. Reaksiyon öncesinde trans-sinamik asit miktarı 0 µg/mL iken, reaksiyon sonrasında trans-sinamik asit miktarının arttığı bulunmuştur. L- fenilalaninin trans-sinamik aside dönüşüm yüzdesi ve trans-sinamik asit miktarı en yüksek *C. fruticulosa* ve *S. nitraria*’dan elde edilen enzimde tespit edilmiştir.

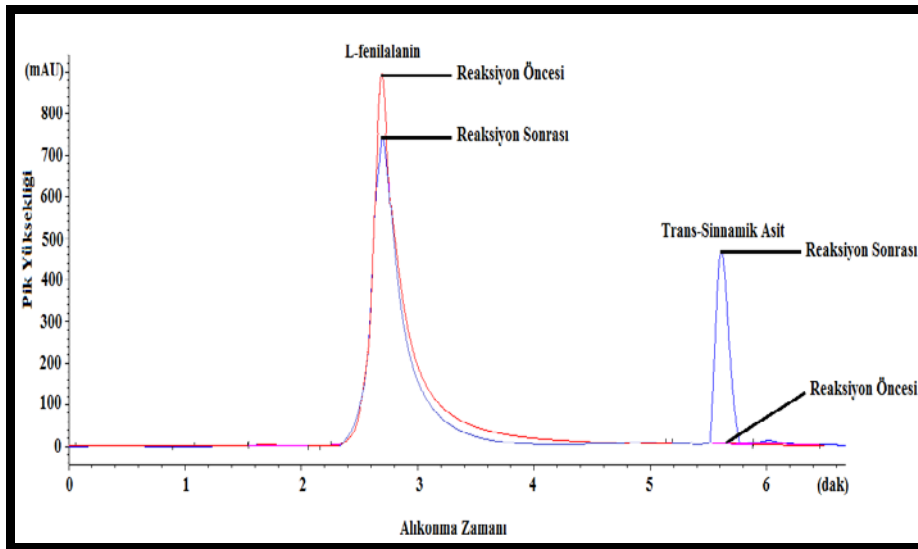
Çizelge 4.10. L-fenilalaninin trans-sinamik aside dönüşüm yüzdesinin belirlenmesi

Bitki örnekleri	<i>C. fruticulosa</i>	<i>S. nitraria</i>	<i>S. grandis</i>	<i>S. halophila</i>
Sonuçlar				
L-fenilalanin konsantrasyonu (mmol/L) ¹	160	160	160	160
L-fenilalanin konsantrasyonu (mmol/L) ²	122	130	139	147
L-fenilalaninin trans-sinamik aside dönüşüm yüzdesi (%)	23,8	18,8	13,1	8,1
Trans-sinamik asit miktarı x 10 ⁻³ (µg/mL) ¹	0	0	0	0
Trans-sinamik asit miktarı x 10 ⁻³ (µg/mL) ²	13,0	7,8	6,3	3,5

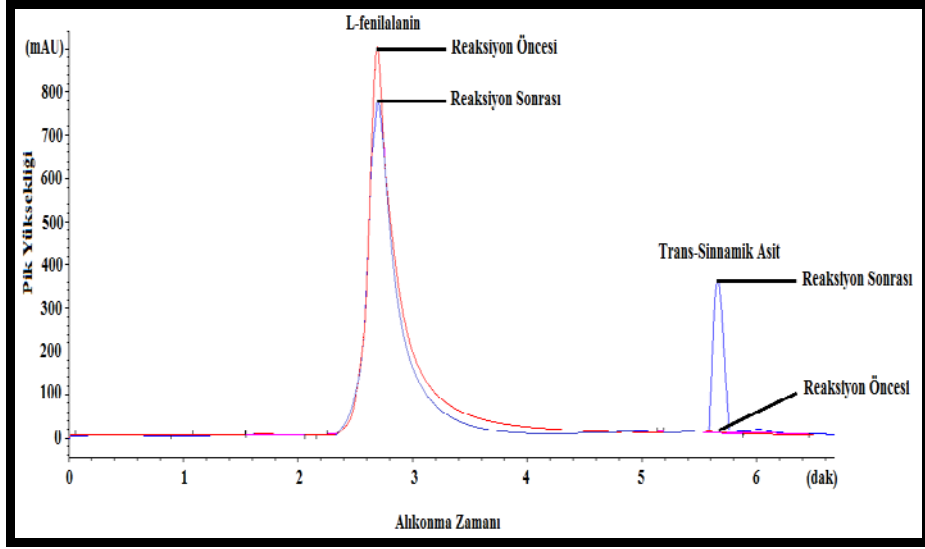
¹ Reaksiyon öncesinde

² Reaksiyon sonrasında

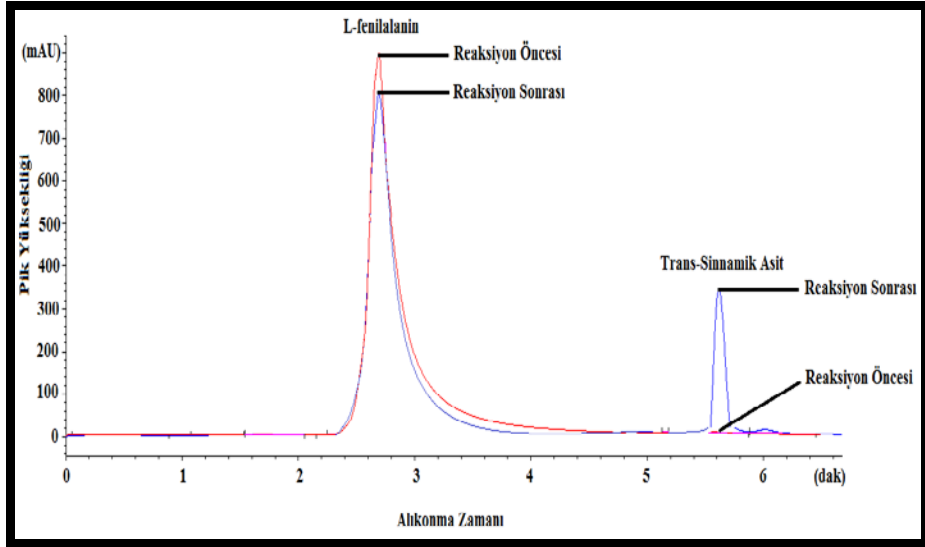
Her dört bitkide reaksiyon öncesinde ortamda sadece L-fenilalanin bulunurken, reaksiyon sonrasında ortamda L-fenilalanin azalırken trans-sinamik asitte de aynı oranda artışın olduğu gözlenmiştir. Buda tüm bitkilerdeki PAL enzim aktivitesinin göstergesidir. Yine bu sonuçlara göre trans-sinamik asit dönüşüm yüzdesi hesaplandığında en iyi sonucu *C. fruticulosa* ve *S. nitraria*'dan elde edilen enzimlerin göstermesi bu enzimlerin en yüksek PAL spesifik aktivitesine sahip olmaları ile uyumludur. Kısmi saflaştırmadan önce yapılan HPLC analizi sonuçları, kısmi saflaştırma yapıldıktan sonraki HPLC analizi sonuçlarıyla uyuşmaktadır. Bu sayede kısmi saflaştırılmış PAL enziminin aktivitesini kaybetmediği tespit edilmiştir. (Şekil 4.16; Şekil 4.17; Şekil 4.18; Şekil 4.19).



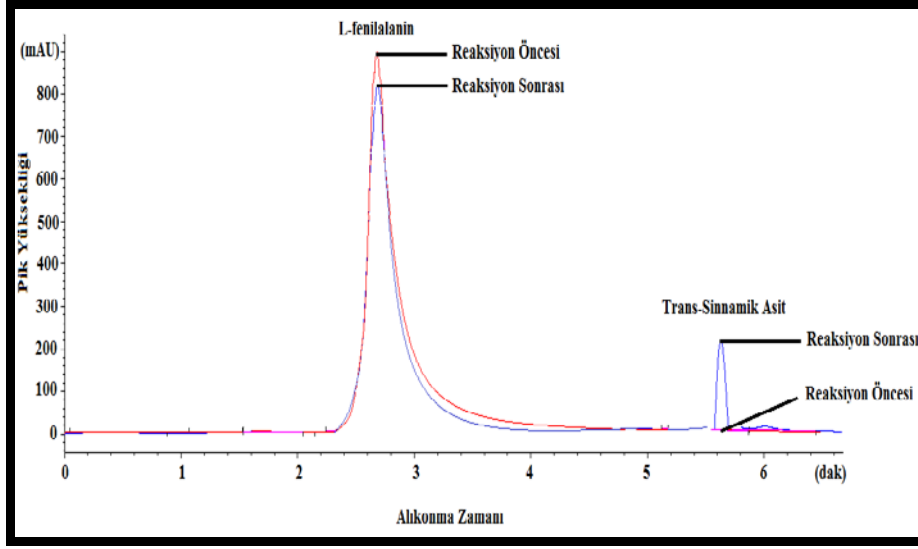
Şekil 4.16. *C. fruticulosa*'da reaksiyon öncesi ve sonrasında L-fenilalanin ve trans-sinamik asit arasındaki ilişkiyi gösteren kromatogram



Şekil 4.17. *S. nitraria*'da reaksiyon öncesi ve sonrasında L-fenilalanin ve trans-sinamik asit arasındaki ilişkiyi gösteren kromatogram



Şekil 4.18. *S. grandis*'de reaksiyon öncesi ve sonrasında L-fenilalanin ve trans-sinamik asit arasındaki ilişkiyi gösteren kromatogram



Şekil 4.19. *S. halophila*'da reaksiyon öncesi ve sonrasında L-fenilalanin ve trans-sinamik asit arasındaki ilişkiyi gösteren kromatogram

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

PKU hastalığı Türkiye’de diğer Avrupa ülkeleri, Amerika ve Asya’dan çok daha sıklıkla görülen bir hastalıktır. Ülkemizde Sağlık Bakanlığı 2010 verilerine göre PKU sıklığı 1/1270 olup, 2009 yılında toplam 6196 hasta bebek tespit edilmiştir. PKU hastalarının çok özel bir diyetle beslenmeleri gerekmektedir. Ancak bu beslenme yöntemleri büyüme ve gelişme için vücudun ihtiyaç duyduğu her şeyi sağlamaktan yoksun olmakla birlikte, uzun laboratuvar çalışmalarını gerektiren, pahalı yöntemlerdir. Ayrıca bu tür özel üretim mamalara ulaşım farklı ülkelerde, farklı ödeme politikalarına tabidir. Ülkemizde de 11 Mart 2011’de devreye giren Sağlık Bakanlığı’nın yeni uygulaması ile bu tür gıdaların reçete ile verilmesine yönelik destek kalkmıştır. Dolayısı ile bu özel formülasyonlar bakımından yurt dışına bağımlılığımız oldukça fazladır. Tüm bunlar ciddi oranda bir maddi kaynağımızın yurt dışı firmalara aktarılmasına neden olurken, PKU’li bireylerin ailelerine de maddi ve manevi yükler getirmektedir. Son yıllarda PKU hastalığında diyet tedavisine alternatif geliştirilen yeni yöntemler arasında yer alan PAL enzimi üzerine Türkiye’de hiç çalışılma yapılmamış, var olan az sayıda çalışma ise genelde bitkilerde çevresel strese karşı geliştirilen cevaplar kapsamında incelenmiştir. Bu tez çalışması klinik önemi çok yüksek olan bu hastalığa yönelik çeşitli biyoteknolojik uygulama alanlarında kullanımı mümkün olabilecek PAL enzimi ile bu düzeyde yapılmış ilk çalışmadır. Enzim replasman tedavisinde kullanılan PAL enzimi bitkilerden, bazı funguslardan, mayalardan ve prokaryotlardan elde edilmektedir.

Bitkilerin yenilenebilir, hali hazırda ulaşılabilir ve kolayca kontrol edilebilir olması PAL kaynağı olarak kullanılmaları bakımından onları oldukça kullanışlı kılmaktadır. Mevcut enzimler ise farklı uygulama alanları için yeterli değildir. Bu nedenle yeni enzim kaynaklarının bulunmasına, enzim üretiminin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Farklı enzimolojik özellikler gösteren yeni PAL kaynağı arayışları hızla devam etmektedir ve bu amaçla bir çok kaynaktan, en iyi enzim aktivitesine sahip PAL enzimi elde etmeye yönelik tarama çalışmalarının yapılmasının gerekliliğini bu enzimle çalışan bir çok araştırmacı öngörmektedir [Wall ve ark., 2008; Wang ve ark, 2008]. Bitkiden elde edilen PAL enziminin kofaktör

gerektirmemesi ve reaksiyonu sonucunda önemsiz miktarlarda trans-sinamik asit ve amonyum üretmesi onu oral enzim terapisinde kullanılabilir kılmaktadır. Ayrıca, reaksiyon ürünü trans-sinamik asidin zararsız olması da bir diğer tercih sebebidir [Lam ve ark., 2008]. Bu kaynak bilgileri de, yeni bitkilerden elde edilecek yeni PAL enzimlerinin taranmasının gerekliliğini ve daha fazla ve etkin kullanım alanı olabileceğini desteklemektedir.

Bu çalışma Türkiye topraklarında tuz stresi koşullarında yayılış gösteren endemik veya yaygın bitki örneklerinin PAL enzim aktivitesi bakımından taranması, PAL enzimine ait optimizasyon ve karakterizasyon çalışmaları ile aktivitesi yüksek bitkilerden elde edilebilecek PAL enziminin PKU hastalığının tedavisinde kullanılabilecek potansiyel organizmaları oluşturabilmesi ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilmesi bakımından diğer çalışmalardan farklılık göstermektedir.

Çalışmada, tuz stresi koşullarında yayılış gösteren endemik veya yaygın bitki örnekleri olmak üzere toplam 13 bitki örneği kullanılmıştır (Bkz. Çizelge 3.1) ve bu bitki örneklerinin protein miktarı, PAL enzim ve spesifik aktivitesi belirlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda *C. fruticulosa* (64,9 U/mg), *S. nitraria* (55,3 U/mg), *S. grandis* (49,0 U/mg) ve *S. halophila* (47,8 U/mg) yüksek PAL spesifik aktivitesi göstermişlerdir. Tüm bitkiler 0,462-2,226 mg/mL protein miktarı, 15,7-43,0 U/mL PAL enzim aktivitesi, 11,8-64,9 U/mg PAL spesifik aktivitesi göstermişlerdir (Bkz. Çizelge 4.1).

PAL enzim aktivitesi, bir mikromol L-fenilalanini optimal şartlarda bir dakikada trans-sinamik aside çeviren enzim miktarıyken, PAL spesifik aktivitesi ise bir miligram protein başına düşen enzim ünite sayısıdır. Dolayısıyla PAL spesifik aktivitesinin yüksek ve düşük olmasında protein miktarlarının etkili olduğu görülmüştür. Yüksek PAL enzim aktivitesine sahip ancak protein miktarı düşük olan bitkilerde PAL spesifik aktivitesinin yüksek olduğu belirlenmiştir.

Çalışmada farklı familyalarda bulunan bitki örnekleri kullanılmış ve familyalarına göre enzim aktivitelerinde de farklılıklar gözlenmiştir. Genel olarak bitkilerin PAL spesifik aktiviteleri değerlendirildiğinde, Chenopodiaceae familyası üyelerinin yüksek PAL spesifik aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. PAL enzim ve spesifik aktivitesi bitki örnekleri arasında karşılaştırıldığında aktivitenin örnekler arasında önemli değişiklikler gösterdiği belirlenmiştir. PAL enzim ve spesifik aktivitesinin bitki örnekleri arasında farklı olmasının sebebinin yaşadıkları ortamdaki maruz kaldıkları strese ve laboratuvar ortamındaki pH, sıcaklık ve tampon konsantrasyonundan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Babaoğlu Aydaş ve ark. [2013], *Synechocystis* sp. BASO444 siyanobakteri türü için 20,5 U/mg, *Synechocystis* sp. BASO673 siyanobakteri türü için 17,2 U/mg, Ateş ve Doğan [2010], *Rhodotorula glutinis* maya türü için 39×10^{-2} U/mg, Cao ve ark. [2010], *Fragaria x ananassa* bitki türü için 44,5 U/mg, Hsieh ve ark. [2011], *Bambusa oldhamii* bitki türü için 19×10^{-2} U/mg, El-Shora [2002], *Cucurbita pepo* bitki türü için 26,6 U/mg, Havir [1981], *Glycine max* bitki türü için $42,5 \times 10^{-2}$ U/mg PAL spesifik aktivitesi belirlemişlerdir. Yapılan benzer çalışmalardaki farklı kaynaklardan elde edilen enzimlere göre, bu çalışmadaki *C. fruticulosa*, *S. nitraria*, *S. grandis* ve *S. halophila*'dan elde edilen enzimin daha yüksek aktiviteye sahip olması dikkat çekicidir.

PAL fenilpropanoid metabolizmasının anahtar enzimidir ve fenilpropanoidlerin biyosentezinde ilk basamak olan fenilalaninin trans-sinamik aside çevrilmesini katalizler. PAL, primer ve sekonder metabolizmanın tam ayrılma noktasında bulunduğundan, birçok fenolik bileşiğin oluşumunda önemli bir düzenleyici basamağı katalizler [Taiz ve Zeiger, 2002]. Bu basamak ligninler, fitoaleksinler ve flavonoidler gibi farklı gruplarda sekonder bitki metabolitlerine öncülük eder. Fenolik bileşikler nekrozlarda ve hücre canlılığının devamında önemli rol oynarlar. Fenoller antioksidan bileşikler olarak bilinirler [Sala ve Lafuente, 2000].

Bitkilerin strese karşı oluşturduğu savunma cevaplarının bir bölümü çeşitli fonksiyonel gruplara ayrılmaktadır. İlk olarak PAL, CHS ve şalkon izomeraz gibi

fenilpropanoid metabolizmasıdır [Baron ve Zambryski, 1995]. PAL bitkilerin ilk sırada gelen savunmalarıdır. PAL mRNA'sındaki birikim ve artan enzim aktivitesi çok çeşitli abiyotik ve biyotik stres uyaranına karşı artmaktadır (ör; tuz stresi, düşük veya yüksek sıcaklık, UV-B'ye maruziyet, yaralanma, fungal ve patojen saldırılar) [Dixon ve Paiva, 1995].

Tuz stresi, ozmotik etkileri sonucu su eksikliğine neden olmakta ve su eksikliği çeşitli reaktif oksijen türlerinin oluşumunu tetiklemektedir [Parida ve Das, 2005]. Bitkiler, tuz stresi ile meydana getirilen reaktif oksijen türlerinden hücreyi korumak için, çeşitli antioksidanları ve antioksidatif enzimleri kullanmaktadırlar [Zhu, 2005]. Tuz stresine maruz kalmış bitkilerin antioksidan enzim aktivitesindeki değişimlerle ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. Mısır bitkisinin duyarlı ve toleranslı genotiplerine 100 mM NaCl uygulanmış, her iki çeşidin yapraklarında süperoksit dismutaz, askorbat peroksidaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz aktiviteleri kontrole nazaran artmıştır ve enzim aktivitesindeki artış toleranslı genotiplerde daha belirgindir. Katalaz aktivitesi, toleranslı genotiplerde önemli artış göstermezken tuza duyarlı genotiplerde azalmıştır. Tuza toleranslı genotiplerin köklerinde, süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitesi artarken, enzim aktivitelerindeki artış toleranslı buğday genotiplerinde daha fazla ortaya çıkmıştır [Sairam ve Tyagi, 2004].

Çalışmada, tuz stresi koşullarında yayılış gösteren bitki örnekleri kullanıldığı için bitkilerde tuz stresine karşı PAL enzim aktivitesinin arttığını düşünmekteyiz. Literatür kaynakları düşüncemizi doğrular niteliktedir.

PAL'ın büyük ölçüdeki endüstriyel uygulamaları için yüksek miktarlarda üretilmesi gereklidir. Bu koşulların belirlenmesi için optimizasyon ve karakterizasyon çalışmalarının yapılması gerekli görülmektedir. Bu bakımdan, enzimin stabil olduğu koşulların belirlenmesi için pH, sıcaklık ve tampon ile ilişkili olarak aktivite ve stabilite profillerinin çıkarılması gerekmektedir [Wall ve ark. 2008; Wang ve ark, 2008; Yan ve ark., 2008; El-Shora, 2002]. Özellikle termostabil, asit veya alkali ortamlarda stabilitesini koruyabilen PAL endüstriyel alanda daha etkin ve geniş bir kullanıma sahip olacaktır [Wang ve ark., 2008; Shah ve D'Mello, 2007; Wieder ve

ark.,1979]. Çalışmalarda karşılaşılan en büyük problem depolama sürecinde PAL aktivitesinin hızlı kaybıdır. Bu da enzimin uzun süreli saklama ve tekrar kullanımında sorun yaratmaktadır. Bu yüzden enzim stabilizasyonu enzimin ticari kullanımında çok önemlidir [Goldson ve ark., 2008; Wall ve ark., 2008]. PAL'ın stabil olduğu koşullar dikkate alınarak enzimin kullanılabileceği endüstriyel alanlar belirlenebilir [Lam ve ark., 2008].

Enzim reaksiyonları hidrojen iyon konsantrasyonu, sıcaklık, tampon konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu ve zaman gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. Bu çalışmada, enzimin optimum pH'sı, sıcaklığı, tampon konsantrasyonu, yapay mide suyu ve bağırsak sıvısındaki stabilitesi ve NaCl konsantrasyonunun PAL enzim aktivitesine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda enzim aktivitelerinin optimizasyon ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

Çalışmada seçilen bitkilerde pH'nın PAL enzim ve spesifik aktivitesi üzerindeki etkisini gözlemlemek amacıyla 100 mM Tris-HCl reaksiyon tamponu ve 100 mM Tris-HCl-40 mM L-fenilalanin substrat tamponunun pH'sı 2,0-12,0'ye ayarlanmıştır. Farklı pH değerlerinde, bitkiler 0,686-0,763 mg/mL protein miktarı, 28,6-37,7 U/mL PAL enzim aktivitesi ve 37,5-54,9 U/mg PAL spesifik aktivitesi göstermişlerdir. Bitkilerin pH 2,0'den pH 8,8'e kadar PAL enzim ve spesifik aktivitesinde artış gözlenmiş ve en yüksek PAL enzim ve spesifik aktivitesi pH 8,8'de belirlenmiştir. Optimum pH değerinden sonra PAL enzim ve spesifik aktivitesinde düşüş gözlenmiştir. Bütün bu sonuçlar doğrultusunda, PAL enzim ve spesifik aktivitesinin belirlenmesinde en uygun pH değerinin 8,8 olduğu söylenebilir (Bkz. Çizelge 4.2; Çizelge 4.3).

Literatürde yapılan çalışmalarla PAL enziminin optimum pH aralığının 7,5 ile 10,6 arasında değiştiği bulunmuştur. Nagai ve ark. [1988], *Nicotiana tabacum* bitki türü için, Kim ve ark. [1996], *Ustilago maydis* bitki türü için, Pridham ve Woodhead [1974], *Alternaria* sp. mantar türü için, Camm ve Towers [1973], *Ustilago hordei* bitki türü için, Koukol ve Conn [1961], *Hordeum vulgare* ve *Medicago sativa* bitki

türleri için en uygun pH değerinin 8,8 olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmalar çalışmamızı doğrular niteliktedir.

Lim ve ark. [1998], *Brassica rapa* subsp. *campestris* bitki türü için pH 7,0'de PAL enzim aktivitesinde % 70, pH 10,0'da % 35, Sarma ve ark. [1998], *Solanum lycopersicum* bitki türü için pH 7,0'de PAL enzim aktivitesinde % 70, pH 10,5'de % 10, Lim ve ark. [1997], *Brassica juncea* bitki türü için pH 7,0'de PAL enzim aktivitesinde % 60, pH 10,0'da % 15, Kim ve ark. [1996], *Ustilago maydis* bitki türü için pH 6,5'de PAL enzim aktivitesinde % 50, Koukol ve Conn [1961], *Hordeum vulgare* bitki türü için pH 7,0'de PAL enzim aktivitesinde % 65, pH 10,5'de % 30 azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Diğer kaynaklardan elde edilen PAL enzimleri için en uygun pH değerinin 8,8 olduğu ve genel olarak bazik pH'larda aktivitesini daha az kaybetmesi bakımından sonuçlarımızla benzerlik göstermektedir. Çalışmadaki *C. fruticulosa* için PAL enzim aktivitesinde pH 6,0'da % 7,5, pH 8,0'de % 3,5, pH 10,0'da ise % 4,7 azalma olduğu gözlenmiştir. *S. nitraria* için PAL enzim aktivitesinde pH 6,0'da % 5,5, pH 8,0'de % 1,8, pH 10,0'da ise % 4,2 azalma olduğu belirlenmiştir. Elde ettiğimiz PAL enziminin pH değişimlerine karşı daha dayanıklı (pH tolerant) olduğu görülmektedir.

Yapılan çalışmalarda PAL enzim ve spesifik aktivitesi için uygun olan bazik pH'ların benzer olduğu, bu çalışmada da pH'ya bağlı olarak PAL enzim ve spesifik aktivitesinin değiştiği görülmektedir. Bitkilerden elde edilen PAL enziminin hem asidik pH'da (pH 2,0), hem de bazik pH'da (pH 12,0) aktivitesini bir miktar azalsada kaybetmediği tespit edilmiştir. Bu durum enzimin endüstriyel uygulamalarda (tıp, gıda, tarım) kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmada seçilen bitkilerde sıcaklığın PAL enzim ve spesifik aktivitesi üzerindeki etkisini gözlemlemek amacıyla 100 mM Tris-HCl reaksiyon tamponu ve 100 mM Tris-HCl-40 mM L-fenilalanin substrat tamponunun pH'sı 8,8'e ayarlanmış ve reaksiyon 10-70°C sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir. Farklı sıcaklık değerlerinde, bitkiler 0,686-0,763 mg/mL protein miktarı, 23,4-37,7 U/mL PAL enzim aktivitesi, 30,6-54,9 U/mg PAL spesifik aktivitesi göstermişlerdir. Bitkilerin 10°C'den 37°C'e

kadar PAL enzim ve spesifik aktivitesinde artış gözlenmiş ve en yüksek PAL enzim ve spesifik aktivitesi 37°C’de belirlenmiştir. Optimum sıcaklık değerinden sonra PAL enzim ve spesifik aktivitesinde düşüş gözlenmiştir. Bütün bu sonuçlar doğrultusunda, PAL enzim ve spesifik aktivitesinin belirlenmesinde en uygun sıcaklık değerinin 37°C olduğu söylenebilir (Bkz. Çizelge 4.4; Çizelge 4.5).

Literatürde yapılan çalışmalarla PAL enziminin optimum sıcaklık aralığının 25°C ile 60°C arasında değiştiği bulunmuştur. Chen ve ark. [2008], *Musa* sp. bitki türü için, Lam ve ark. [2008], *Triticum aestivum* bitki türü için, Okada ve ark. [2008], *Ephedra sinica* bitki türü için, Shah ve D’Mello [2008], *Rhodotorula glutinis* mantar türü için, Wen ve ark. [2008], *Vitis vinifera* bitki türü için en uygun sıcaklık değerinin 37°C olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmalar çalışmamızla paralellik göstermektedir.

Lim ve ark. [1998], *Brassica rapa* subsp. *campestris* bitki türü için 15°C’de PAL enzim aktivitesinde % 75 azalma olduğunu tespit etmişlerdir. 60°C’de ise PAL enzim aktivitesi saptanamamıştır. Lim ve ark. [1997], *Brassica juncea* bitki türü için 30°C’de PAL enzim aktivitesinde % 55, 60°C’de ise % 70 azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmadaki *C. fruticulosa* için PAL enzim aktivitesinde 10°C’de % 19, 30 °C’de % 8 azalma olduğu görülmüştür. *S. nitraria* için PAL enzim aktivitesinde 10°C’de % 19, 30°C’de % 6 azalma olduğu saptanmıştır. Her iki bitkide 60°C’de ise PAL enzim aktivitesi belirlenememiştir. Bu sonuçlara göre elde ettiğimiz PAL enziminin soğuğa karşı daha dayanıklı ve termostabil olduğu görülmektedir.

Yapılan çalışmalarda PAL enzim ve spesifik aktivitesi için uygun sıcaklıkların benzer olduğu, bu çalışmada da sıcaklığa bağlı olarak PAL enzim ve spesifik aktivitesinin değiştiği görülmektedir. Bitkilerden elde edilen PAL enziminin hem düşük sıcaklıkta (10°C), hem de yüksek sıcaklıkta (50°C) aktivitesini bir miktar azalsada kaybetmediği tespit edilmiştir. Bu durum enzimin endüstriyel uygulamalarda daha etkin ve yaygın olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmada seçilen bitkilerde tampon konsantrasyonunun PAL enzim ve spesifik aktivitesi üzerindeki etkisini gözlemlemek amacıyla Tris-HCl reaksiyon tamponu ve

Tris-HCl-40 mM L-fenilalanin substrat tamponunun pH'sı 8,8'e ayarlanmıştır. Reaksiyon 5-500 mM tampon konsantrasyonlarında 37°C'de gerçekleştirilmiştir. Farklı tampon konsantrasyonlarında, bitkiler 0,686-0,763 mg/mL protein miktarı, 23,6-37,7 U/mL PAL enzim aktivitesi, 31,0-54,9 U/mg PAL spesifik aktivitesi göstermişlerdir. Bitkilerin 5 mM'dan 100 mM'a kadar PAL enzim ve spesifik aktivitesinde artış gözlenmiş ve en yüksek PAL enzim ve spesifik aktivitesi 100 mM'da belirlenmiştir. Optimum tampon konsantrasyonundan sonra PAL enzim ve spesifik aktivitesinde düşüş gözlenmiştir. Bütün bu sonuçlar doğrultusunda, PAL enzim ve spesifik aktivitesinin belirlenmesinde en uygun tampon konsantrasyonunun 100 mM olduğu söylenebilir (Bkz. Çizelge 4.6; Çizelge 4.7).

Yapılan çalışmalarda PAL enzim ve spesifik aktivitesi için uygun tampon konsantrasyonlarının benzer olduğu, bu çalışmada da tampon konsantrasyonuna bağlı olarak PAL enzim ve spesifik aktivitesinin değiştiği görülmektedir. Bitkilerden elde edilen PAL enziminin hem düşük tampon konsantrasyonunda (5 mM), hem de yüksek tampon konsantrasyonunda (500 mM) aktivitesini bir miktar azalsada kaybetmediği tespit edilmiştir. Bu durum enzimin ticari uygulamalarda ön plana çıkabileceğini göstermektedir.

El-Shora [2002], *Cucurbita pepo* bitki türü için, Jorin ve Dixon [1990], *Medicago sativa* bitki türü için, Havir [1981], *Glycine max* bitki türü için en uygun tampon konsantrasyonu değerinin 100 mM olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmalar çalışmamızı destekleyen özelliktedir.

Yapay mide suyu ve bağırsak sıvısında bitkilerin PAL enzim aktivitelerini belirlemek için ortam çeşitli pH değerlerine ayarlanmıştır. Yapay mide suyunda pH 4,0'de, yapay bağırsak sıvısında ise pH 7,5'de bitkilerin yüksek PAL enzim aktivitesine sahip oldukları tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 4.1).

Enzimin mide ve bağırsak ortamında aktivitesini koruyarak yüksek PAL aktivitesi göstermesi, yapay mide suyunun asit ortamını, yapay mide suyunda bulunan pepsini, yapay bağırsak sıvısının bazik ortamını ve yapay bağırsak sıvısında bulunan safra

tuzu ve pankreatini tolere edebilmesi bakımından enzim replasman tedavisinde kullanılabilme özelliğine alternatif bir bakış açısı getirmiş olacaktır.

Lam ve ark. [2008], *Triticum aestivum* bitki türü için 1 saat pH'sı 2,5 olan mide suyuyla inkübasyondan sonra PAL enzim aktivitesinde % 30 azalma, 2 saat pH'sı 7,5 olan bağırsak sıvısıyla inkübasyondan sonra % 34 azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Gilbert ve Jack [1981], *Rhodotorula glutinis* mantar türü için 3 dakika bağırsak sıvısıyla inkübasyondan sonra PAL enzim aktivitesinde % 50 azalma olduğunu bildirmişlerdir. 30 dakika bağırsak sıvısıyla inkübasyondan sonra PAL enzim aktivitesi saptanamamıştır. Çalışmada *C. fruticulosa* için PAL enzim aktivitesinde pH 2,0'de % 23, pH 7,5'de % 19,7 azalma olduğu görülmüştür. *S. nitraria* için PAL enzim aktivitesinde pH 2,0'de % 29,8, pH 7,5'de % 23,9 azalma olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre elde ettiğimiz PAL enziminin Gilbert ve Jack [1981]'inkine göre yapay mide suyu ve bağırsak sıvısına daha dayanıklı ancak Lam ve ark. [2008]'inkine göre daha dayanıksız olduğu belirlenmiştir.

Çalışmada seçilen bitkilerde NaCl konsantrasyonunun PAL enzim aktivitesi üzerindeki etkisini gözlemlemek amacıyla 100 mM Tris-HCl reaksiyon tamponu ve 100 mM Tris-HCl-40 mM L-fenilalanin substrat tamponunun pH'sı 8,8'e ayarlanmıştır. Reaksiyon ve substrat tamponundaki NaCl konsantrasyonları 50-300 mM'a ayarlanarak, reaksiyon 37°C'de gerçekleştirilmiştir. Bitkilerin 50 mM'dan 200 mM'a kadar PAL enzim aktivitesinde artış gözlenmiş ve en yüksek PAL enzim aktivitesi 200 mM'da belirlenmiştir. Optimum NaCl konsantrasyonundan sonra PAL enzim aktivitesinde düşüş gözlenmiştir. Bütün bu sonuçlar doğrultusunda, PAL enzim aktivitesinin belirlenmesinde en uygun NaCl konsantrasyonunun 200 mM olduğu söylenebilir (Bkz. Şekil 4.2).

Yapılan çalışmalarda PAL enzim aktivitesi için uygun NaCl konsantrasyonlarının benzer olduğu, bu çalışmada da NaCl konsantrasyonuna bağlı olarak enzim aktivitesinin değiştiği görülmektedir. Bitkilerden elde edilen PAL enziminin hem düşük NaCl konsantrasyonunda (50 mM), hem de yüksek NaCl konsantrasyonunda (300 mM) aktivitesini bir miktar azalsada kaybetmediği tespit edilmiştir. Bu durum

enzimin tıp, gıda ve tarım gibi endüstriyel uygulamalarda kullanılabileceğini desteklemektedir.

Guo ve Wang [2009], *Solanum lycopersicum* bitki türü için, El-Shora [2002], *Cucurbita pepo* bitki türü için en uygun NaCl konsantrasyonu değerinin 200 mM olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmalar çalışmamızla uygunluk içerisindedir.

NaCl'ün yüksek konsantrasyonları enzim aktivitesinin ilerleyen inhibisyonuna ve histerezisine neden olabilir. Dolayısıyla enzimin inaktivasyonu sonucunda aktivitesinde de düşme gözlemlenir. Optimum konsantrasyonlardaki NaCl, protein molekülü içerisindeki hidrofobik reaksiyonları arttırarak, amino asit rezidülerinin negatif yüklenmelerini sağlar. Bunun sonucunda proteinin stabilitesi artar [El-Shora, 2002]. Radi ve ark. [2013], optimal konsantrasyondaki NaCl'ün seçilen buğday ve fasulye kültürlerinin yapraklarındaki PAL aktivitesini etkilemediğini bulmuşlardır.

Depolanma stabilitesinin belirlenmesi için PAL enzimi oda sıcaklığında ve +4°C'de 5 gün boyunca bekletilmiştir. Her gün PAL enzim aktivitesi ölçülerek aktivitedeki değişiklik belirlenmiştir. -20°C'de ise 1 yıl boyunca bekletilmiştir. Her ay PAL enzim aktivitesi ölçülerek aktivitedeki değişiklik tespit edilmiştir. Oda sıcaklığında ve +4°C'de bekletilen bitkilere ait PAL enziminin en yüksek oransal aktivitesi 1. günde, en düşük oransal aktivitesi ise 5. günde bulunmuştur. Oda sıcaklığında PAL enzim aktivitesi 5 gün sonunda % 89-95 azalma göstermiştir. Her iki bitkiden de elde edilen enzimin % 50'ye yakın aktivite kaybı, oda sıcaklığında 2. günde belirlenmiştir. +4°C'de PAL enzim aktivitesi 5 gün sonunda % 35-41 azalma göstermiştir. Her iki bitkiden de elde edilen enzimin % 50'ye yakın aktivite kaybı, +4°C'de 5. günde belirlenmiştir. -20°C'de bekletilen bitkilere ait PAL enziminin en yüksek oransal aktivitesi 1. ayda, en düşük oransal aktivitesi ise 12. ayda belirlenmiştir. -20°C'de PAL enzim aktivitesi 12 ay sonunda % 36-46 azalma göstermiştir. Her iki bitkiden de elde edilen enzimin % 50'ye yakın aktivite kaybı, -20°C'de ise 12. ayda belirlenmiştir. PAL enziminin -20°C'de depolanarak daha uzun süre aktivitesini koruyacağı belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.3; Şekil 4.4; Şekil 4.5).

Lam ve ark. [2008], -20°C’de saklanan *Triticum aestivum* bitki türü için 3 ay sonra PAL enzim aktivitesinde % 38 azalma olduğunu tespit etmiştir. Havir [1981], 6°C’de saklanan *Glycine max* bitki türü için 1 hafta sonra PAL enzim aktivitesinde % 100 azalma olduğunu tespit etmiştir. Koukol ve Conn [1961], -10°C’de saklanan *Hordeum vulgare* bitki türü için 3,5 ay sonra PAL enzim aktivitesinde % 25 azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmadaki +4°C’de saklanan *C. fruticulosa* için 5 gün sonra PAL enzim aktivitesinde % 35 azalma, -20°C’de saklanan *C. fruticulosa* için 12 ay sonra PAL enzim aktivitesinde % 36 azalma olduğu belirlenmiştir. +4°C’de saklanan *S. nitraria* için ise 5 gün sonra PAL enzim aktivitesinde % 41 azalma, -20°C’de saklanan *S. nitraria* için 12 ay sonra PAL enzim aktivitesinde % 46 azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre elde ettiğimiz PAL enziminin depolanma stabilitesi ve saklama ömrü diğer kaynaklardan elde edilen PAL enzimlerine göre yüksektir. Enzimin aktivitesini uzun süre kaybetmemesi (6 ay), elde edilen enzimin stabil ve kararlı olması ticari uygulamalarda da avantajlı olabileceğini göstermiştir.

HPLC analizi ile PAL enzim aktivitesi sonucu oluşan trans-sinamik asit miktarı ve L-fenilalaninin PAL enzimi reaksiyonu sonucu trans-sinamik aside dönüşüm yüzdesi belirlenmiştir. Çalışmada seçilen bitki örneklerinde PAL enzim aktivitesi sonucu oluşan en yüksek trans-sinamik asit miktarı 300 µL enzim miktarında, 160 mmol/L substrat konsantrasyonunda ve 90 dak. reaksiyon süresinde belirlenmiştir. Her dört bitkinin enzimleriyle yapılan çalışma sonuçları enzim miktarı, substrat konsantrasyonu ve reaksiyon süresi arttıkça oluşan trans-sinamik asit miktarının da arttığını göstermiştir. Her dört bitkide reaksiyon öncesinde ortamda sadece L-fenilalanin bulunurken, reaksiyon sonrasında ortamda L-fenilalanin azalırken trans-sinamik asitte de aynı oranda artışın olduğu gözlenmiştir. Buda tüm bitkilerdeki PAL enzim aktivitesinin göstergesidir. Kısmi saflaştırmadan önce yapılan HPLC analizi sonuçları (Bkz. Şekil 4.5; Şekil 4.6; Şekil 4.7; Çizelge 4.8), kısmi saflaştırma yapıldıktan sonraki HPLC analizi sonuçlarıyla uyushmaktadır (Bkz. Şekil 4.13; Şekil 4.14; Şekil 4.15; Çizelge 4.10). Bu sayede kısmi saflaştırılmış PAL enziminin aktivitesini kaybetmediği tespit edilmiştir.

Literatürde PAL enzimiyle ilgili HPLC uygulamaları PKU hastalarının tanısını koymak ya da bitki fenol biyosentezinde yer alan birkaç enzimin aktivitesini değerlendirmek amacıyla [Okada ve ark., 2008; Spierto ve ark., 1982; Blume ve Sanders, 1981]. PAL enzim aktivitesi sonucu oluşan trans-sinamik asit miktarı ve L-fenilalaninin PAL enzimi reaksiyonu sonucu trans-sinamik aside dönüşüm yüzdesi belirlemeye yönelik herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışma, bu konuda yapılan ilk çalışmadır.

Genel olarak laboratuvar çalışmaları ve enzimin sanayideki kullanımı için enzim saflaştırma işlemi gereklidir. Laboratuvar çalışmaları için az fakat saflık derecesi oldukça yüksek, sanayideki kullanımı için ise çok fakat saflık derecesinin yüksekliği pek de fazla olmayan enzim örnekleri gereklidir. Saflaştırma basamaklarında önemli olan enzim kaybını en aza indirerek yüksek düzeyde saf, aktivitesi yüksek enzimin elde edilmesidir. Çalışmada kullanılacak enzimin ortamda istenmeyen diğer proteinlerden uzaklaştırılması ve enzimin molekül ağırlığına yakın diğer enzimlerden ayırt edilebilmesi için kısmi saflaştırma işlemi uygulanmıştır.

Çalışmada seçilen bitkilerin PAL enzimlerinin, kısmi olarak saflaştırılması için uygulanan saflaştırma işlemi sonucunda, *C. fruticulosa*'da enzimin $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile çöktürülmesi sonucu 1,21 kat daha saf enzim olduğu ve bu işlem sonucu enzimin % 98,70'inin kurtarılabildiği, diyaliz işlemi ile enzimin 1,87 kat daha saflaştırıldığı ve enzimin % 97,65'inin kurtarılabildiği gözlenmiştir. *S. nitraria*'da enzimin $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile çöktürülmesi sonucu 1,18 kat daha saf enzim olduğu ve bu işlem sonucu enzimin % 99,22'sinin kurtarılabildiği, diyaliz işlemi ile enzimin 2,02 kat daha saflaştırıldığı ve enzimin % 98,12'sinin kurtarılabildiği saptanmıştır. Diyaliz işlemi ile enzim kaybının az olduğu ve enzimin diğer saflaştırma basamaklarına kıyasla daha saf elde edildiği gözlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.9). Diyaliz işlemi sonrasında ortamdan 20 kDa moleküler ağırlığından küçük proteinlerin uzaklaştırıldığı tespit edilmiştir.

El-Shora [2002], *Cucurbita pepo* bitki türünün PAL enzimine saflaştırma işlemi uygulamıştır. Ham *Cucurbita pepo* bitki türünün protein miktarı 280 mg, PAL enzim

aktivitesi 92,0 U, PAL spesifik aktivitesi 0,32 U/mg olarak belirlenmiştir. Enzimin % 35-55 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile çöktürülmesi sonucu protein miktarı 78,8 mg, PAL enzim aktivitesi 57,4 U, PAL spesifik aktivitesi 0,72 U/mg olarak görülmüştür. Saflaştırma katsayısı 2,3, verim ise % 62,4 olarak tespit edilmiştir. DEAE-selüloz kolon kullandıklarında protein miktarı 21,0 mg, PAL enzim aktivitesi 40,4 U, PAL spesifik aktivitesi 1,92 U/mg olarak belirlenmiştir. DEAE-cellulose kolon kullanımı sonucu saflaştırma katsayısı 12,0, verim % 43,9 olarak bulunmuştur. Sephadex G-100 kolonu kullandıklarında protein miktarı 6,0 mg, PAL enzim aktivitesi 22,8 U, PAL spesifik aktivitesi 3,80 U/mg olarak tespit edilmiştir. Sephadex G-100 kolonu kullanımı sonucu saflaştırma katsayısı 11,9, verim % 24,8 olarak belirlenmiştir. Q-Sepharose kolonu kullandıklarında protein miktarı 0,3 mg, PAL enzim aktivitesi 8,0 U, PAL spesifik aktivitesi 26,60 U/mg olarak tespit edilmiştir. Q-Sepharose kolonu kullanımı sonucu saflaştırma katsayısı 83,1, verim % 8,7 olarak bulunmuştur.

Whetten ve Sederoff [1991], *Pinus taeda* bitki türünün PAL enzimine saflaştırma işlemi uygulamıştır. Ham *Pinus taeda* bitki türünün protein miktarı 470 mg, PAL spesifik aktivitesi 130 nanokatal/mg olarak belirlenmiştir. Enzimin % 40-70 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile çöktürme işlemi sonucu protein miktarı 260 mg, PAL spesifik aktivitesi 200 nanokatal/mg olarak tespit edilmiştir. Saflaştırma katsayısı 1,5, verim ise % 85 olarak bulunmuştur. DEAE-sephacel kolon kullandıklarında protein miktarı 4,5 mg, PAL spesifik aktivitesi 3800 nanokatal/mg olarak görülmüştür. DEAE-sephacel kolon kullanımı sonucu saflaştırma katsayısı 29, verim % 28 olarak belirlenmiştir. Sephacryl S-300 kolonu kullandıklarında protein miktarı 0,13 mg, PAL spesifik aktivitesi 51500 nanokatal/mg olarak tespit edilmiştir. Sephacryl S-300 kolonu kullanımı sonucu saflaştırma katsayısı 400, verim % 11 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre elde ettiğimiz PAL enziminin saflaştırma katsayısı daha düşükken, verimi daha yüksektir. PAL enziminin daha iyi saflaştırılabilmesi için kolon kromatografi yöntemlerinin birkaçının birarada kullanılması gerekmektedir.

Çalışmada seçilen bitkilerden elde edilen ham ekstrakt ve kısmi saflaştırma sonucu elde edilen örneklerle, SDS-PAGE uygulanarak PAL enziminin moleküler ağırlığı belirlenmiştir. Bütün bitkilerde PAL enziminin moleküler ağırlığı 70 kDa olarak

tespit edilmiştir (Bkz. Resim 4.5). Yapılan diğer çalışmalarla enzimlerin moleküler ağırlıkları yakın bulunmuştur.

Farklı literatürlerde incelenen farklı bitkiler için PAL protein büyüklükleri de değişebilmektedir. *Bambusa oldhamii* bitkisi 80 kDa PAL büyüklüğüne sahipken [Hsieh ve ark, 2010], pirinç bitkisinde PAL protein büyüklüğü 84 kDa olarak bulunmuştur [Sarma ve Sharma, 1999]. Yine domates bitkisinde PAL protein büyüklüğü 80 kDa olarak hesaplanmıştır. Bu çalışmalar çalışmamızı doğrular niteliktedir.

Çalışmada seçilen bitkilerden elde edilen proteinlere, Western blot uygulanarak PAL proteininin moleküler ağırlığı belirlenmiştir. Bütün bitkilerde PAL proteininin moleküler ağırlığının yaklaşık olarak 70 kDa olduğu bulunmuştur. *C. fruticulosa*'da ise 23 kDa ağırlığında bir protein bandı daha bulunmuştur (Bkz. Resim 4.6). Elde edilen sonuçlar SDS-PAGE yöntemiyle elde edilen sonuçlarla uyumaktadır.

PAL enzimi homotetramer yapıya sahip bir proteindir. Literatürdeki çalışmalar bazı organizmalardaki PAL enziminin heterotetramer yapıda olduğunu göstermektedir. *Rhizoctania solani* mantar türünün PAL enzimi heterotetramer yapıdadır. Alfa zinciri 70 kDa iken, beta zinciri 90 kDa'dır [Kalgathi ve Subra Rao, 1975]. Aynı şekilde *Triticum aestivum* bitki türünün PAL enzimi heterotetramer yapıdadır [Nari ve ark., 1972]. Alfa zinciri 75 kDa moleküler ağırlığına sahipken, beta zinciri 85 kDa moleküler ağırlığına sahiptir. *S. nitraria*, *S. grandis* ve *S. halophila*'ya ait PAL enziminin homotetramer yapıda olduğunu düşünmekteyiz. Ancak Western blot sonucunda *C. fruticulosa*'ya ait 23 kDa ağırlığında bir protein bandı daha bulunmuştur. Bu nedenle *C. fruticulosa*'ya ait PAL proteininin heterotetramer yapıda olduğunu düşünmekteyiz. Kesin bir yargıya varmak için daha ileri protein analizlerinin yapılması gerekmektedir.

Tez çıkarımı ve öngörüler

-Vücut sıvısı ve kanda birikimi PKU hastalığına sebep olan fenilalanini parçalayabilen PAL enzimi, enzim replasman tedavisinde kullanılabilen PAH enziminin alternatifidir. PAH enzimi gibi katalitik etkisini gösterirken, kofaktöre ihtiyaç duymaz ve fenilalaninin PAL ile reaksiyonu sonucu açığa çıkan trans-sinamik asidin toksik etkisi çok düşüktür. Bu ürün karaciğerde benzoik aside çevrilmektedir ve daha sonra da idrar yoluyla temel olarak hippurat şekliyle atılmaktadır.

-PAL enzimi bakteri ve hayvan dokularında bulunmaz, ancak bitkilerden, bazı funguslardan, mayalardan ve prokaryotlardan elde edilebilir. Bitkilerin yenilenebilir, hali hazırda ulaşılabilir ve kolayca kontrol edilebilir olması PAL kaynağı olarak kullanılmaları bakımından onları oldukça kullanışlı kılmaktadır.

-Bitkilerin strese karşı oluşturduğu savunma cevaplarının bir bölümü çeşitli fonksiyonel gruplara ayrılmaktadır. İlk olarak PAL, CHS ve şalkon izomeraz gibi fenilpropanoid metabolizmasıdır [Baron ve Zambryski, 1995]. (ör; tuz stresi, düşük veya yüksek sıcaklık, UV-B'ye maruziyet, yaralanma, fungal ve patojen saldırılar) [Dixon and Paiva, 1995]. PAL bitkilerin ilk sırada gelen savunmalarıdır. PAL mRNA'sındaki birikim ve artan enzim aktivitesi çok çeşitli abiyotik ve biyotik stres uyaranına karşı artmaktadır. Çalışmada tuz stresi koşullarında yayılış gösteren bitkiler kullanıldığı için, bitkilerde tuz stresine karşı PAL enzim aktivitesinin arttığını düşünmekteyiz.

-Tuz stresine maruz kalan *C. fruticulosa*, *S. grandis* ve *S. halophila* bitkileri endemik (Türkiye'ye özgü bitkiler), *S. nitraria* bitkisi ise yaygındır. Bu bitkilerden elde edilen yeni bir PAL enzimi bulunmuştur. Bu çalışmayla bulunan, şu ana kadar yapılan PAL enzim çalışmalarından daha yüksek aktiviteye sahip olan bu bitkiler, PAL enzimi açısından önemli bir gen kaynağıdır. Yapılacak çalışmalarla bu bitki türlerinin farklı coğrafik bölgelerde ve daha yoğun stres altında kalmış bireylerinde, daha yüksek PAL enzim aktivitesi elde etmek mümkün gözükmektedir. Bu enzime ait gen

kaynaklarının belirlenerek, klonlanması ve ticari üretim yollarının geliştirilmesi gereklidir.

-Düşük ve yüksek hidrojen iyon konsantrasyonlarında (pH 2,0-12,0), farklı sıcaklıklarda (10-50°C), farklı tampon (5-500 mM) ve NaCl konsantrasyonlarında (50-300 mM) enzimin aktivitesini bir miktar azalsada kaybetmemesi sonucu olarak, enzim pH'ya, sıcaklığa, tampon ve NaCl konsantrasyonlarına bağlı farklı çevresel koşullarda kullanılabilir. Yapay mide suyundaki pepsine, proteolitik degradasyona ve asidik pH'ya, yapay bağırsak sıvısındaki pankreatine, safra tuzuna ve bazik pH'ya karşı dayanıklıdır. Ayrıca PAL enzimi tuza karşı toleranslıdır. Bu sonuçlara göre enteral yolla uyumlu olduğu ve oral yolla kullanımının mümkün olabileceği belirlenmiştir. Aynı zamanda enzim vücut sıcaklığı olan 37°C'de ve bağırsak pH'sına yakın pH 8,8'de optimum çalışmaktadır. Bu yüzden bağırsakta salınımlı ilaç modelleme çalışmaları ile özellikle fenilalaninli gıda sindirimini kolaylaştırmasını mümkün kılabilir.

-Enzimin depolanma stabilitesi ve saklama ömrü yüksektir. -20°C'de saklanan enzimin aktivitesini uzun süre kaybetmemesi (6 ay), elde edilen enzimin stabil ve kararlı olması ticari uygulamalarda da avantajlı olabileceğini göstermiştir.

-Enzim saflaştırılabilir ve kısmi saflaştırma sonrası aktivitesini kaybetmez.

-Yukarıda sayılan özellikleri bakımından, enzimin özellikle gıda ve ilaç endüstrisinde ürüne yönelik kullanımlarda öne çıkacağı olasıdır. Ayrıca, elde edilen bu yeni PAL enzimi PKU tanısı için potansiyometrik fenilalanin biyosensörler geliştirilerek fenilalanin tayininde, PKU hastaları için diyet tedavisinde düşük proteinli gıda üretiminde ve enzim replasman tedavisinde kullanılabilir. Çalışma bu bağlamda tüm bu üretimler için bir modelleme örneği olacaktır.

KAYNAKLAR

- Abdel-Salam, A. M., Effat, L. K., “Preparation and evaluation of a novel therapeutic dairy-based drink for phenylketonuria”, *North American Journal of Medical Sciences*, 2: 66-70 (2010).
- Akay, B., “L-Fenilalaninin biyodönüşümle üretim kinetiğinin incelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 5-10 (1992).
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D., “Molecular biology of the cell 3rd ed. ”, *Garland Publishing Inc.*, New York (1994).
- Allard, P., “Determination of phenylalanine and tyrosine in dried blood specimens by ion-exchange chromatography using the Hitachi L-8800 analyzer”, *Clinical Biochemistry*, 37(10): 857-862 (2004).
- Allen, K. R., Degg, T. J., Rushworth, P. A., Smith, M., Henderson, M. J., “Measurement of phenylalanine and tyrosine in plasma by high performance liquid chromatography using the inherent fluorescence of aromatic amino acids”, *Annals of Clinical Biochemistry*, 36: 207–211 (1999).
- Ateş, S., Doğan, N. S., “Properties of immobilized phenylalanine ammonia lyase and investigation of its use for the prediagnosis of phenylketonuria”, *Turkish Journal of Biochemistry*, 35 (1): 58–62 (2010).
- Atherton, N. D., Green, A., “HPLC Measurement of phenylalanine in plasma”, *Clinical Chemistry*, 34(11): 2241–2244 (1988).
- Babaoğlu Aydaş, S., Öztürk, Ş., Aslım, B., “Phenylalanine ammonia lyase (PAL) enzyme activity and antioxidant properties of some cyanobacteria isolates”, *Food Chemistry*, 136(1): 164-9 (2013).
- Bakırel, N. A., “Okul öncesi çağı klasik fenilketonürlü çocukların malnutrisyon durumunun saptanması”, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 9-12 (2008).
- Baron, C., Zambryski, P. C., “The plant response in pathogenesis, symbiosis, and wounding: Variations on a common theme?”, *Annual Review of Genetics*, 29: 107-129 (1995).
- Bauer, N., Fulgosi, H., Jelaska, S., “Overexpression of phenylalanine ammonia-lyase in transgenic roots of *Coleus blumei* alters growth and rosmarinic acid synthesis”, *Food Technology and Biotechnology*, 49(1): 24–31 (2011).

Bezanson, G. S., Desaty, D., Emes, A. V., Vining, L. C., “Biosynthesis of cinnamamide and detection of phenylalanine ammonia-lyase in *Streptomyces verticillatus*”, ***Canadian Journal of Microbiology***, 16(3): 147–151 (1970).

Blume, D. E., Saunders, J. A., “High-Pressure liquid chromatography for assaying several plant phenolic enzymes”, ***Analytical Biochemistry***, 114: 97-102 (1981).

Bourget, L., Chang, T. M. S., “Phenylalanine ammonia-lyase immobilized in semipermeable microcapsules for enzyme replacement in phenylketonuria”, ***Federation of European Biochemical Societies Letter***, 180(1): 5-8 (1985).

Brown, T. A., “Gene cloning second edition”, ***Chapman & Hall***, Londra, 3-11 (1990).

Bushuk, W., Hay, R. L., Larsen, N. G., Simmons, L. D., Sutton, K. H., “Effect of mechanical dough development on the extractability of wheat storage proteins from bread dough”, ***Cereal Chemistry***, 74: 389-395 (1997).

Camm, E. L., Towers, G. H. N., “Review Article Phenylalanine Ammonia Lyase”, ***Phytochemistry***, 12: 961-973 (1973).

Campbell, M. M., Ellis, B. E., “Fungal elicitor-mediated responses in pine cell cultures”, ***Plant Physiology***, 98: 62-70 (1992).

Campell, R. S., Brearley, G. M., Varsani, H., Morris, H. C., Milligan, T. P., Hall, S. K., Hammond, P. M., Price, C. P., “Development and validation of a robust specific enzyme mediated assay for phenylalanine in plasma”, ***Clinici Chimica Acta***, 197-210 (1992).

Cao, S., Hu, Z., Zheng, Y., Lu, B., “Effect of BTH on anthocyanin content and activities of related enzymes in strawberry after harvest”, ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, 58(9):5801-5 (2008).

Cedaerbaum, S. D., Scott, C. R., Wilcox, W. R., “Amino acid metabolism in”, Emery and Romoin’s Principles and Practice of Medical Genetics 3rd ed., Rimoin, D. L., Connor, J. M., Pyeritz, R. E., ***Churchill Livingston***, New York, 1867-1870 (1997).

Centerwall, S. A., Centerwall, W. R., “The discovery of phenylketonuria: The story of a young couple, two retarded children, and a scientist”, ***Pediatrics***, 105: 89-103 (2000).

Chakraborty, B. N., Som, R., “Time-course accumulation of phenylalanine ammonia lyase, tyrosine ammonia lyase and polyphenol oxidase triggered by *Glomerella*

cingulata in tea varieties'', **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, 1(4): 524-535 (2010).

Chalutz, E., Stahmann, M. A., Induction of pisatin by ethylene, **Phytopathology**, 59(12): (1972).

Chen, J., He, L., Jiang, Y., Kuang J., Lu, C., Joyce D. C., Macnish, A., He, Y., Lu, W., "Expression of PAL and HSPs in fresh cut banana fruit", **Environmental and Experimental Botany**, 66(1): 31-37 (2009).

Chen, J., He, L., Jiang, Y., Wang, Y., Joyce, D.C., Ji, Z., Lu, W., "Role of phenylalanine ammonia-lyase in heat pretreatment-induced chilling tolerance in banana fruit", **Physiologia Plantarum**, 132: 318-328 (2008).

Clague, A., Thomas A., "Neonatal biochemical screening for disease", **Clinica Chimica Acta**, 315: 99-110 (2002).

Coşkun, T., "Amino asit metabolizması ve bozuklukları", T. Coşkun, **Alp Ofset**, Ankara, 181-286 (2003).

Çoskun, T., "Kalıtsal metabolizma hastalıklarının taranması", M. Yurdakök., G. Erdem, **Alp Ofset**, Ankara (2004).

Cunha, G. B. D., "Enrichment of phenylalanine ammonia lyase activity of *Rhodotorula* yeast", **Enzyme and Microbial Technology**, 36: 498-502 (2005).

Deepak, S., Shailasree, S., Kini, R. K., Muck, A., Mithofer, A., Shetty, S. H., "Hydroxyproline-rich glycoproteins and plant defence", **Journal of Phytopathology**, 158(9): 585-593 (2010).

Demir, G., "Metabolik hastalıklarda beslenme", **Türkiye Klinikleri Journal of Pediatric Sciences**, 1(7): 81-88 (2005).

Demiralp, H., Çelik, S., Köksel, H., "Effects of oxidizing agents and defatting on the electrophoretic patterns of flour proteins during dough mixing", **European Food Research and Technology**, 211: 322-325 (2000).

Ding, Z., Harding, C. O., Thony, B., "State-of-the-art 2003 on PKU gene therapy", **Molecular Genetics and Metabolism**, 81: 3-8 (2004).

Dixon, R. A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C., Srinivasa Reddy, M. S., Wang, L., "The phenylpropanoid pathway and plant defence-a genomics perspective", **Molecular Plant Pathology**, 3(5): 371-390 (2002).

Dixon, R. A., Paiva, N. L., "Stress-induced phenylpropanoid metabolism", **Plant Cell**, 7: 1085-1097 (1995).

Doğan, N., “İmmobilize enzimin fenilketonüri teşhisinde kullanılması”, Yüksek Lisans Tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 24-26 (2008).

Donahue, P. E., Griffith, C., Richter, H. M., Bier, F. F., Ehrentreich-Forster, E., Makower, A., Scheller, F. W., “An enzymatic amplification cycle for high sensitive immunoassay”, **Sensors and Actuators B: Chemical**, 33: 5–12 (1996).

Dorota, G., Pijanowska, D. G., Remiszewska, E., “pH-based detection of phenylalanine by potentiometric and colorimetric methods”, **Sensors**, 6: 428-434 (2006).

Dutta, S., Goodsell, D., “Phenylalanine hydroxylase”, **Molecule of the Month**, 5: 100-102 (2005).

Eisensmith, R. C., Woo, S. L. C., “Gene therapy for phenylketonuria”, **European Journal of Pediatrics**, 155(1): 16-19 (1996).

El-Shora, H.M., “ Properties of phenylalanine ammonia-lyase from marrow cotyledons”, **Plant Science**, 162: 1–7 (2002).

Erlandsen, H., Stevens, R. C., “The structural basis of phenylketonuria”, **Molecular Genetics and Metabolism**, 68(2): 103-125 (1999).

Erlandsen, H., Stevens, R. C., “A structural hypothesis for BH₄ responsiveness in patients with mild forms of hyperphenylalaninaemia and phenylketonuria”, **Journal of Inherited Metabolic Disease**, 24: 213-230 (2001).

Fazeli, Z., Vallian, S., “Phenylketonuria from genetics to clinics: an Iranian prospect”, **Iranian Journal of Biotechnology**, 9(3): 163-172 (2011).

Fiege, B., “Plasma tetrahydrobiopterin and its pharmacokinetic following oral administration”, **Molecular Genetics and Metabolism**, 81: 45 – 51 (2004).

Gamez, A., Wang, L., Sarkissian, C. N., Wendt, D., Fitzpatrick, P., Lemontt, J. F., Scriber, C. R., Stevens, R. C., “Structure-based epitope and PEGylation sites mapping of phenylalanine ammonia-lyase for enzyme substitution treatment of phenylketonuria”, **Molecular Genetics and Metabolism**, 91(4): 325-334 (2007).

Gamez, A., Wang, L., Straub, M., Patch, M. G., Stevens, R. C., “Toward PKU enzyme replacement therapy: PEGylation with activity retention for three forms of recombinant phenylalanine hydroxylase”, **Molecular Therapy**, 9: 124-129 (2004).

Gao, Z. M., Wang, X. C., Peng, Z. H., Zheng, B., Liu, Q., “Characterization and primary functional analysis of phenylalanine ammonia-lyase gene from *Phyllostachys edulis*”, **Plant Cell Reports**, 31: 1345-1356 (2012).

Gilbert, H. J., Jack, G. W., “The effect of proteinases on phenylalanine ammonia-lyase from the yeast *Rhodotorula glutinis*”, **Biochemical Journal**, 199: 715-723 (1981).

Gilbert, H. J., Stephenson, J. R., Tully, M., “Control of synthesis of functional mRNA coding for phenylalanine ammonia-lyase from *Rhodospiridium toruloides*”, **Journal of Bacteriology**, 153(3): 1147-1154 (1983).

Goldson, A., Lam, M., Scaman, C. H., Clemens, S., Kermode, A., “Screening of phenylalanine ammonia lyase in plant tissues and retention of activity during dehydration”, **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 88(4): 619-625 (2008).

Guo, J., Wang, M., “Characterization of the phenylalanine ammonia-lyase gene (SIPAL5) from tomato (*Solanum lycopersicum* L.)”, **Molecular Biology Reports**, 36: 1579–1585 (2009).

Guthrie, R., “Simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants”, **Pediatrics**, 32: 338–343 (1963).

Habibi-Moini S., D’mello A. P., “Evaluation of possible reasons for the low phenylalanine ammonia lyase activity in cellulose nitrate membrane microcapsules”, **International Journal of Pharmaceutics**, 215: 185-196 (2001).

Hahlbrock, K., Scheel, D., “Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism”, **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 40: 347-369 (1989).

Harborne, J. B., Williams, C. A., “Anthocyanins and other flavonoids”, **Natural Product Reports**, 18: 310-333 (2001).

Harding, C. O., Blau, N., “advances and challenges in phenylketonuria”, **Journal of Inherited Metabolic Disease**, 33: 645-648 (2010).

Havir, E. A., “Phenylalanine ammonia-lyase: purification and characterization from soybean cell suspension cultures”, **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 211: 556-563 (1981).

Hilton, M. A., “Liquid-chromatographic direct determination of phenylalanine and tyrosine in plasma or plasma, with application to patients with phenylketonuria clinical”, **Chemistry**, 28(5): 1215–1218 (1982).

Hoskins, J. A., Gray, J., “Phenylalanine ammonia-lyase in the management of phenylketonuria: the relationship between ingested cinnamate and urinary hippurate in humans”, **Research Communications in Chemical Pathology & Pharmacology**, 35: 275-282 (1982).

Hrazdina, G., Parsons, F. G., Mattick, R. L., “Physiological and biochemical events during development and maturation of grape berries, *American Journal of Enology and Viticulture*, 35(4): 220-227 (1984).

Hsieh, L., Hsieh, Y., Yeh, C., Cheng, C., Yang, C., Lee, P., “Molecular characterization of a phenylalanine ammonia-lyase gene (BoPAL1) from *Bambusa oldhamii*”, *Molecular Biology Reports*, 38: 283-290 (2011).

Huang, T., Warsinke, A., Kuwana, T., Scheller, F. W., “Determination of L-phenylalanine based on an NADH-detecting biosensor analytical chemistry”, *Analytical Chemistry*, 70(5): 991-997 (1998).

Huttenlocher, P. R., “The neuropathology of phenylketonuria: human and animal studies, *Journal of Pediatrics*, 159: 102-106 (2000).

Hyun, M. W., Yun, Y. H., Kim, J. K., Kim, S. H., “Fungal and plant phenylalanine ammonia-lyase”, *Mycobiology*, 39(4): 257-265 (2011).

İnternet : “Western blot’un çalışma prensibi”
<http://www.leinco.com> (2013).

İnternet : “Diyaliz kasedinin çalışma prensibi”
<http://www.piercenet.com> (2013).

Jorin, J., Dixon, R. A., “Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) II. Purification, characterization, and induction of phenylalanine ammonia-lyase isoforms from elicitor-treated cell suspension cultures”, *Plant Physiology*, 92: 447-455 (1990).

Kalghathi, K. K., Subra Rao, P. V., “Microbial L-phenylalanine ammonia-lyase, purification, subunit structure and kinetic properties of the enzyme from *Rhizoctania solani*”, *Biochemical Journal*, 149: 65-72 (1975).

Karaarslan, Ç., “Western Blott Tekniği”, *Astım Allerji İmmünoloji*, 6(1): 38-40 (2008).

Karakurt, Y., Huber, D. J., “Characterization of wound-regulated cDNAs and their expression in fresh cut and intact papaya fruit during low temperature storage”, *Postharvest Biology and Technology*, 44: 179-183 (2007).

Kelebek, H., “Değişik bölgelerde yetiştirilen öküzgözü, boğazkere ve kalecik karası üzümlerinin ve bu üzümlerden elde edilen şarapların fenol bileşikleri profili üzerinde araştırmalar”, Doktora Tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Adana (2009).

Kiba, N., Itagaki, A., Furusawa, M., “Determination of L-phenylalanine in plazma by flow-injection analysis using immobilized phenylalanine dehydrogenase and fluorimetric detection”, **Talanta**, 44(1): 131–134 (1997).

Kim, W., Erlandsen, H., Surendran, S., Stevens, R. C., Gamez, A., Michols-Matalon, K., Tying, S. K., Matalon, R., “Trends in enzyme therapy for phenylketonuria”, **Molecular Therapy**, 10: 220–224 (2004).

Kim, S. H., Kronstad, J. W., Ellis, B. E., “Purification and characterization of phenylalanine ammonia-lyase from *Ustilago maydis*”, **Phytochemistry**, 43(2): 351–357 (1996).

Koch, R., Moseley, K. D., Yano, S., Nelson, M., Moats, R. A., “Large neutral amino acid therapy and phenylketonuria: a promising approach to treatment”, **Molecular Genetics and Metabolism**, 79(2): 110–113 (2003).

Koç, E., Üstün, A. S., “Patojenlere karşı bitkilerde savunma ve antioksidanlar”, **Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi**, 24(1-2): 82–100 (2008).

Kodame, O., Li, W. X., Tamogami, S., Akatsuka, T., “Oryzaalexin S, a novel stemarane-type diterpene rice phytoalexin”, **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 56: 1002–1003 (1992).

Koukol J., Conn E. E., “The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*”, **The Journal of Biological Chemistry**, 236: 2692–2698 (1961).

Küçükcasap, T., “Fenilketonürde ailenin bilgi düzeyinin hastalığın metabolik kontrolü üzerine etkisinin araştırılması ve uygun bir eğitim modeli geliştirme”, Yüksek Lisans Tezi, **Hacettepe Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 19–45 (2006).

Kwok, S. C., Ledley, F. D., DiLella, A. G., Robson, K. J., Woo, S. L., “Nucleotide sequence of a full-length complementary DNA clone and amino acid sequence of human phenylalanine hydroxylase”, **Biochemistry**, 24(3): 556–561 (1985).

Laemmli, U. K., “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4”, **Nature**, 227: 680–684 (1970).

Lam, M., Scaman, C. H., Clemens, S., Kermode, A., “Retention of phenylalanine ammonia-lyase activity in wheat seedlings during storage and in vitro digestion”, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56(23): 11407–11412 (2008).

Ledley, F. D., Koch, R., Jew, K., Beaudet, A., O' Brien, W. E., Bartos, D. P., Woo, S. L. C., “Phenylalanine hydroxylase expression in liver of a fetus with Phenylketonuria”, **Journal of Pediatrics**, 113: 463–468 (1988).

Lewin, B., “Gene VII”, **Oxford University Press**, New York, 52–60 (2000).

Lichter-Konecki, U., Hipke, C. M., Konecki, D. S., “Human phenylalanine hydroxylase gene expression in kidney and other nonhepatic tissues”, ***Molecular Genetics and Metabolism***, 67(4): 308-16 (1999).

Lichter-Konecki, U., Schlotter, M., Yaylak, C., Özgüç, M., Coskun, T., Özalp, İ., Wendel, U., Batzler, U., Trefz, K., Konecki, D., “DNA haplotype analysis at the phenylalanine hydroxylase locus in the Turkish population”, ***Human Genetics***, 81: 373-376 (1989).

Lim, H. W., Park, S. S., Lim, C. J., “Purification and properties of phenylalanine ammonia-lyase from leaf mustard”, ***Molecules and Cells***, 7: 715-720 (1997).

Lim, H.W., Sa, J.H., Kim, T.S., Park, S.S., Lim, C.J., “Purification and properties of phenylalanine ammonia-lyase from Chinese cabbage”, ***Journal of Biochemistry and Molecular Biology***, 31: 31-36 (1998).

MacDonald, M. J., D’Cunha, G. B., “A modern view of phenylalanine ammonia lyase”, ***Biochemistry and Cell Biology***, 85(3): 273-282 (2007).

Matalon, R., “Future role of large neutral amino acids in transport of phenylketonuria”, ***Trends in Genetics***, 15(7): 267-272 (1999).

Merken, H. M., Beecher, G., “Measurement of food flavonoids by high performance liquid chromatography: A review”, ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, 48(3): 577-599 (2000).

Moisio, M. A., Moisio Elmer, W., “Understanding laboratory&diagnostic tests” ***Delmar Publishers***, New York (1998).

Moller, N., Meek, S., Bigelow, M., Andrews, J., Nair, S., “The kidney is an important site for *in vivo* phenylalanine-to-tyrosine conversion in adult humans: A metabolic role of the kidney”, ***Proceedings of the National Academy of Sciences***, 97: 3, 1242-1246 (2000).

Müslümanoğlu, M. H., “Fenilketonürlü hastalarda PAH genindeki mutasyonun VNTR ile bağlantısının saptanması ve Ddel enzimi direk mutasyon analizi bulguları ile karşılaştırılması”, Doktora Tezi, ***Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü***, Eskişehir, 3-4 (1996).

Nagai, N., Kojima, Y., Shimosaka, M., Okazaki, M., “Effects of kinetin on L-phenylalanine ammonia-lyase activity in tobacco cell culture”, ***Agricultural and Biological Chemistry***, 52: 2617-2619 (1988).

Nari, J., Mouttet, C., Pinna, M. H., Ricard, J., “Some physico-chemical properties of L-phenylalanine ammonia-lyase of wheat seedlings”, ***Federation of European Biochemical Societies Letters***, 23: 220-224 (1972).

Noda, S., Miyazaki, T., Miyoshi, T., Miyake, M., Okai, N., Tanaka, T., Ogino, C., Kondo, A., “Cinnamic acid production using *Streptomyces lividans* expressing phenylalanine ammonia lyase”, ***Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology***, 38: 643-648 (2011).

Okada, T., Mikage, M., Sekita, S., “Molecular characterization of the phenylalanine ammonia-lyase from *Ephedra sinica*”, ***Biological and Pharmaceutical Bulletin***, 31:2194-2199 (2008).

Olsen, K. M., Lea, U. S., Slimestad, R., Verheul, M., Lillo, C., “Differential expression of four Arabidopsis PAL genes; PAL1 and PAL2 have functional specialization in abiotic environmental-triggered flavonoid synthesis”, ***Journal of Plant Physiology***, 165: 1491-1499 (2008).

Özalp, İ., “Fenilketonürlü hastanın tedavi ve izlemi”, ***Katkı Pediatri Dergisi***, 20(4): 409-21 (1999).

Özalp, İ., “Yenidoğanda fenilketonüri ve hiperfenilalaninemilerin taranması”, ***Katkı Pediatri Dergisi***, 21(2): 175–184 (2000).

Özalp, İ., Coskun, T., Tokatlı, A., Kalkanoglu, S., Dursun, A., Tokol, S., Köksal, G., Özgüç, M., Köre, R., “New born PKU screening in Turkey: at present and organisation for further”, ***The Turkish Journal of Pediatrics***, 43: 97-101 (2001).

Öztürk, Y., “Fenilketonüri”, ***İzmir Sağlık***, 2: 22-25 (2008).

Parida, A. K., Das, A. B., “Salt tolerance and salinity effects on plants: a review”, ***Ecotoxicology and Environmental Safety***, 60: 324-349 (2005).

Parkhurst, J. R., Hodgins, D. S., “Phenylalanine and tyrosine ammonia-lyase activity in *Sporobolomyces pararoseus*”, ***Phytochemistry***, 10: 2997–3000 (1971).

Peker, İ., Afşar, K. A., “Fenilketonüri hastalığının rutin teşhisi için analiz kiti üretimi” ***XVI. Ulusal Kimya Kongresi***, Diyarbakır (2000).

Pombo, M. A., Martinez, G. A., Civello, P. M., “Cloning of FaPAL6 gene from strawberry fruit and characterization of its expression and enzymatic activity in two cultivars with different anthocyanin accumulation”, ***Plant Science***, 181: 111-118 (2011).

Pridham, J. B., Woodhead, S., “Multimolecular forms of phenylalanine-ammonia lyase in *Alternaria*”, ***Biochemical Society Transactions***, 2: 1070-1072 (1974).

Radi, A. A., Farghaly, F. A., Hamada, A. M., “Physiological and biochemical responses of salt-tolerant and salt-sensitive wheat and bean cultivars to salinity”, ***Journal of Biology and Earth Sciences***, 3:1 (2013).

Rao, D. N., Kaufman, S., “Purification and state of activation of rat kidney phenylalanine hydroxylase”, *The Journal of Biological Chemistry*, 261(19): 8866-8876 (1986).

Reichert, A. I., He, X., Dixon, R. A., “Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) from tobacco (*Nicotiana tabacum*): characterization of the four tobacco PAL genes and active heterotetrameric enzymes”, *Biochemical Journal*, 424: 233-242 (2009).

Reis, E. A., Rieger, E., Souza, S. S., Rasia-Filho, A. A., Wannmacher, C. M. D., “Effects of a co-treatment with pyruvate and creatine on dendritic spines in rat hippocampus and posterodorsal medial amygdala in a phenylketonuria animal model”, *Metabolic Brain Disease*, 10(1007): 11011-11013 (2013).

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D., “Handbook of enology second edition: The chemistry of wine and stabilization and treatments”, *John Wiley and Sons Ltd.*, England (2000).

Ritter, H., Schulz, G. E., “Structural Basis for the Entrance into the Phenylpropanoid Metabolism Catalyzed by Phenylalanine Ammonia-Lyase”, *The Plant Cell*, 16, 3426–3436 (2004).

Roggero, J. P., Coen, S., Larice, J. L., “Etude comparative de la composition anthocyanique des cepages”, *Groupe Polyphenols Bulletin de Liaison*, 13: 380-388 (1986).

Sairam, R. K., Tyagi, A., “Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants”, *Current Science*, 86 (10): 407-421 (2004).

Sala, J. M., Lafuente, M. T., “Catalase enzyme activity is related to tolerance of mandarin fruits to chilling”, *Postharvest Biology and Technology*, 20: 81-89 (2000).

Sarıboğa, B., “Fenilketonüri (PKU) teşhisinde potansiyometrik biyosensörler geliştirilmesi”, Doktora Tezi, *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Samsun, 110-111 (2008).

Sarkissian, C. N., Gamez, A., “Phenylalanine ammonia lyase, enzyme substitution therapy for phenylketonuria, where are we now?”, *Molecular Genetics and Metabolism*, 86: 22-26 (2005).

Sarkissian, C. N., Kang, T. S., Gamez, A., Scriver, C. R., Stevens, R. C., “Evaluation of orally administered PEGylated phenylalanine ammonia lyase in mice for the treatment of phenylketonuria”, *Molecular Genetics and Metabolism*, 104(3): 249-254 (2011).

Sarma, A., Sharma, R., “Purification and characterization of UV-B induced phenylalanine ammonia-lyase from rice seedlings”, *Phytochemistry*, 50: 729-737 (1999).

Sarma, A. D., Sreelakshmi, Y., Sharma, R., “Differential expression and properties of phenylalanine ammonia-lyase isoforms in tomato leaves”, *Phytochemistry*, 49: 2233-2243 (1998).

Scriver, C. R., Gregory, D. M., Sovetts, D., Clow, C. L., Tissenbaum, G., “Normal plasma free amino acid values in adults: the influence of some common physiological variables”, *Metabolism*, 34: 868-873 (1985).

Scriver, C. R., Kaufman, S., “Hyperphenylalaninemia phenylalanine hydroxylase deficiency”, The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease 8th ed., **Mc Graw-Hill Medical Publishing Division**, New York, 1667-1724 (2001).

Shabala, S., “Plant Stress Physiology”, **CABI**, UK (2012).

Shah, R. M., D'mello, A. P., “Stabilization of phenylalanine ammonia lyase against organic solvent mediated deactivation”, *International Journal of Pharmaceutics*, 331(1):107-115 (2007).

Shah, R. M., D'Mello, A. P., “Strategies to maximize the encapsulation efficiency of phenylalanine ammonia lyase in microcapsules”, *International Journal of Pharmaceutics*, 356: 61-68 (2008).

Singh, K., Kumar, S., Rani, A., Gulati, A., Ahuja, P. S., “Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and cinnamate 4-hydroxylase (C₄H) and catechins (flavan-3-ols) accumulation in tea”, *Functional & Integrative Genomics*, 9(1): 125-134 (2009).

Smith, I., Lee, P., “Inborn Metabolic Diseases”, Diagnosis and Treatment 2nd ed., Fernandes, J., Saudubray, J. M., Van Den Berghe, G., **Springer-Verlag Berlin Heidelberg**, New York, 171-184 (2000).

Snapper, J., Chiang, T. F., Chiang, T. Y., “Cinnamic acid metabolism in man”, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 44: 30-34 (1940).

Snyder, L.R., Kirkland, J. J., Dolan, J. W., “Introduction to modern liquid chromatography third edition”, **Wiley**, Canada (2009).

Soares, R. D. L., Biasutti, E. A. R., Capobianco, M., Vieira, C. R., Silva, V. D.M., Morais, H. A., Januario, J. N., Aguiar, M. C. B., Silvestre, M. P. C., “Preparation of Enzymatic Skim Milk Hydrolysates with Low Phenylalanine Content”, *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 25 (3): 325-32 (2006).

Spierto, F. W., Whitfield, W., Apetz, M., Hannon, W. H., “Liquid-Chromatographic measurement of phenylalanine and tyrosine in seum”, *Clinical Chemistry*, 28(11): 2282-2286 (1982).

Taiz, L., Zeiger, E., “Plant physiology third edition”, *Sinauer Associates Inc. Publishers*, Sunderland , Massachusetts, 690 (2002).

Toprak, F. E., “Ankara ve Nevşehir illerinde yetiştirilen kalecik karası üzüm çeşidinin fitokimyasal özellikleri üzerine araştırmalar”, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara (2011).

Tuan, P. A., Park, N. I., Li, X., Xu, H., Kim, H. H., Park, S. U., “ Molecular cloning and characterization of phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase in the phenylpropanoid biosynthesis pathway in garlic (*Allium sativum*)”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 10911-10917 (2010).

Tunç, C., “Aydın il merkezinde fenilketonüri tarama programını yürüten hemşire ve ebelerin fenilketonüri konusundaki bilgi düzeylerinin saptanması”, Yüksek Lisans Tezi, *Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Afyonkarahisar (2006).

Türel, B., “Türk hiperfenilalaninemi hastalarında fenilalanin hidroksilaz gen mutasyonlarının taranması, mini haplotiplerin oluşturulması ve genotip-fenotip ilişkisinin kurulması”, Yüksek Lisans Tezi, *Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 3-25 (2006).

Wall, M. J., Quinn, A. J., D’Cunha, G. B., “Manganese (Mn²⁺)-dependent storage stabilization of *Rhodotorula glutinis* phenylalanine ammonia-lyase activity”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 894–902 (2008).

Wang, Z., Chen, Y., Zhang, S., Zhou, Z., “Investigation of a phenylalanine biosensor system for phenylketonuria detection”, *Engineering in Medicine and Biology Society*, 1-4 (2005).

Wang, L., Gamez, A., Archer, H., Abola, E. E., Sarkissian, C. N., Fitzpatrick, P., Wendt, D., Zhang, Y., Vellard, M., Bliesath, J., Bell, S. M., Lemontt, J. F., Scriver, C. R., Stevens, R. C., “Structural and biochemical characterization of the therapeutic *Anabaena variabilis* phenylalanine ammonia lyase”, *Journal of Molecular Biology*, 380: 623–635 (2008).

Wang, F. Y., Shao, C. J., Feng, H. G., Li, C. M., “The mutation spectrum of phenylalanine hydroxylase gene in patients with phenylketonuria in Henan province”, *Chinese Journal of Medical Genetics*, 27(6):644-649 (2010).

Wang, Q., Tao, S., Dube, C., Tury, E., Hao, Y. J., Zhang, S., Zhao, M., Wu, W., Khanizadeh, S., “Postharvest changes in the total phenolic content, antioxidant

capacity and L-Phenylalanine ammonia-lyase activity of strawberries inoculated with *Botrytis cinerea*”, ***Journal of Plant Studies***, 1(2): 11-18 (2012).

Weiss, D. J., Dorris, M., Loh, A., Peterson, L., “Dehydrogenase based reagentless biosensor for monitoring phenylketonuria”, ***Biosensors and Bioelectronics***, 22(11): 2436-2441 (2007).

Wen, P., Chen, J., Wan, S., Kong, W., Zhang, P., Wang, W., Zhan, J., Pan, Q., Huang, W., “Salicylic acid activates phenylalanine ammonia-lyase in grape berry in response to high temperature stress”, ***Plant Growth Regulation***, 55: 1-10 (2008).

Wendel, U., Hummel, W., Langenbeck, U., “Monitoring of phenylketonuria: A colorimetric method for the determination of plasma phenylalanine using L-phenylalanine dehydrogenase”, ***Analytical Biochemistry***, 180: 91–94 (1989).

Wendel, U., Özalp, I., Langenbeck, U., Hummel, W., “Phenylketonuria in Turkey: experience with an enzymatic colorimetric test for measurement of plasma phenylalanine”, ***Journal of Inherital Metabolic Disease***, 13: 295–297 (1990).

Whetten, R. W., Sederoff, R. R., “Phenylalanine ammonia-lyase from loblolly pine, purification of the enzyme and isolation of complementary DNA clones”, ***Plant Physiology***, 98: 380-386 (1992).

Wibrand, F., “A microplate-based enzymatic assay for the simultaneous determination of phenylalanine and tyrosine in plasma”, ***Clinica Chimica Acta***, 347(1–2): 89–96 (2004).

Wieder, K. J., Paleyuk, N. C., Es, T. van E., Davis, F. F., “Some properties of polyethylene glycol: phenylalanine ammonia lyase adducts”, ***The Journal of Biological Chemistry***, 254(24): 12579-12587 (1979).

Wong, D., Eaton, M., “Essentials of pediatric nursing sixth edition”, ***Mosby***, St. Louis (2001).

Woolf, L. I., Griffiths, R., Moncrieff, A., Coates, S., Dillistone, F., “The dietary treatment of phenylketonuria”, ***Archives of Disease in Childhood***, 33: 31- 45 (2004).

Xavier, A. J., “Cell encapsulation as a potential non-dietary therapy for maternal phenylketonuria”, Yüksek Lisans Tezi, ***Iowa Üniversitesi Biomedikal Mühendisliği***, Iawo (2012).

Xiang, L., Moore, B. S., “Inactivation, complementation, and heterologous expression of encP, a novel bacterial phenylalanine ammonia-lyase gene”, ***The Journal of Biological Chemistry***, 277: 32505-32509 (2002).

Yan, R., Gao, S., Yang, W., Cao, M., Wang, S., Chen, F., ‘‘Nickel toxicity induced antioxidant enzyme and phenylalanine ammonia-lyase activities in *Jatropha curcas* L. cotyledons’’, ***Plant Soil Enviroment***, 54(7): 294–300 (2008).

Zeybek, ., ‘‘Fenilketonüri Tarama Programı’’, ***İ.Ü. Cerrahpasa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri***, 35, 65-71 (2003).

Zschocke, J., ‘‘Phenylketonuria mutations in Europe’’, ***Human Mutation***, 21: 345-356 (2003).

Zhu, J-K., ‘‘Understanding and improving salt tolerance in plants’’, ***Crop Science***, 45: 437-448 (2005).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ŞİRİN, Seda
 Uyruğu : T. C.
 Doğum tarihi ve yeri : 11.06.1989, Altındağ
 Medeni hali : Bekar
 Ev telefonu : 0 (312) 417 26 23
 Cep telefonu : 0 (536) 616 10 98
 e-mail : sdasirin@hotmail.com

Eğitim Bilgileri

Derece	Eğitim birimi	Mezuniyet tarihi
Lisans	Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (3,80/4)	2011
Lise	Öğretmen Necla Kızılbağ Anadolu Lisesi	2007

Yabancı Dil

İngilizce

Burslar

Tübitak 2210-Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı 2012-Normal Dönem Bursiyeri

Ulusal Sempozyum Bildirileri

1. Seda Şirin, Selcen Babaoğlu Aydaş ve Belma Aslım, ‘‘Fenilalanin Amonyum Liyaz’ın Biyoteknolojik Kullanımı İçin Bazı Bitkilerde Taranması ve Farklı Koşullarda Aktivitesinin Belirlenmesi’’, 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, 3-7 Eylül 2012, İzmir, PC-116, Sayfa: 786 (Poster).

