

**ALJİNAT JEL BONCUKLARI VE POLİ(AKRİLAMİT-ko-AKRİLİK  
ASİT) HİDROJELLERLE TİROSİNAZ  
ENZİMİNİN BİNARİ YÖNTEMİYLE İMMOBİLİZASYONU**

**Ayşe YAHŞİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TEMMUZ 2005**

**ANKARA**

Ayşe YAHŞİ tarafından hazırlanan ALJİNAT JEL BONCUKLARI VE POLİ(AKRİLAMİT-ko-AKRİLİK ASİT) HİDROJELLERLE TİROSİNAZ ENZİMİNİN BİNARİ YÖNTEMİYLE İMMOBİLİZASYONU adlı bu tezin Yüksek Lisans Tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Yrd. Doç. Dr. Hayrettin TÜMTÜRK  
Tez Yöneticisi

Bu çalışma, jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Serpil Aksoy

Üye : Yrd. Doç. Dr. Haydar Altınok

Üye : Yrd. Doç. Dr. Hayrettin Tümtürk

Bu tez, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygundur.

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

|                                                               |      |
|---------------------------------------------------------------|------|
| ÖZET .....                                                    | iii  |
| ABSTRACT .....                                                | iv   |
| TEŞEKKÜR .....                                                | v    |
| ÇİZELGELERİN LİSTESİ .....                                    | vi   |
| ŞEKİLLERİN LİSTESİ .....                                      | vii  |
| SİMGELER VE KISALTMALAR .....                                 | viii |
| 1. GİRİŞ .....                                                | 1    |
| 2. TİROSİNAZ .....                                            | 3    |
| 2.1. Tirosinazın Moleküler Özellikleri .....                  | 5    |
| 2.2. Tirosinazın Katalizlediği Tepkimeler .....               | 6    |
| 2.3. Tirosinazın Substrat İlgisi .....                        | 8    |
| 2.4. Enzimatik Tepkime Mekanizması ve Bakırın Rolü .....      | 8    |
| 2.5. Enzimatik Tepkimeye Bağlı İnaktivasyon Mekanizması ..... | 11   |
| 2.6. Tirozinazın Endüstriyel Uygulama Alanları .....          | 12   |
| 2.7. Tirosinazın Gıda Endüstrisindeki Önemi .....             | 12   |
| 2.8. Tirosinazın Tıbbi Uygulama Alanları .....                | 14   |
| 2.9. Tirosinazın Fenollerin Gideriminde Kullanımı .....       | 14   |
| 3. İMMOBİLİZASYON HAKKINDA GENEL BİLGİLER .....               | 16   |
| 3.1. Enzim İmmobilizasyonu .....                              | 17   |
| 3.2. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri .....                    | 18   |
| 3.2.1. Kimyasal metotlar .....                                | 19   |
| 3.2.2. Fiziksel metotlar .....                                | 21   |
| 4. DENEYSEL KISIM .....                                       | 26   |
| 4.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....                       | 26   |
| 4.2. Kullanılan Aletler .....                                 | 28   |
| 4.3. Kullanılan Çözeltiler .....                              | 29   |
| 4.4. Ca-aljinat Kullanılarak Enzim İmmobilizasyonu .....      | 30   |
| 4.5. P(AAm-ko-AA) Kullanılarak Enzim İmmobilizasyonu .....    | 30   |

|                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.6. L-DOPA Kalibrasyon Grafiği.....                                                   | 31 |
| 4.7. Tirosinazın Aktiflik Tayini .....                                                 | 32 |
| 4.7.1. Serbest tirosinazın aktiflik tayini .....                                       | 32 |
| 4.7.2. İmmobilize tirosinazın aktiflik tayini.....                                     | 32 |
| 4.8. Aktifliğe pH'nın Etkisi .....                                                     | 32 |
| 4.8.1. Serbest tirosinazın aktifliğine pH'nın etkisi .....                             | 32 |
| 4.8.2. İmmobilize tirosinazın aktifliğine pH'nın etkisi.....                           | 33 |
| 4.9. Aktifliğe Sıcaklığın Etkisi.....                                                  | 33 |
| 4.9.1. Serbest tirosinazın aktifliğine sıcaklığın etkisi.....                          | 33 |
| 4.9.2. İmmobilize tirosinazın aktifliğine sıcaklığın etkisi .....                      | 33 |
| 4.10. Aktifliğe Substrat Derişiminin Etkisi.....                                       | 33 |
| 4.10.1. Serbest tirosinazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi .....              | 33 |
| 4.10.2. İmmobilize tirosinazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi .....           | 34 |
| 4.11. Depolanma kararlılığı .....                                                      | 34 |
| 4.11.1. Serbest tirosinazın depolanma kararlılığı .....                                | 34 |
| 4.11.2. İmmobilize tirosinazın depolanma kararlılığı.....                              | 34 |
| 4.12. Termal İnaktivasyonun.....                                                       | 34 |
| 4.12.1 Serbest tirosinazın termal inaktivasyonu.....                                   | 34 |
| 4.12.2. İmmobilize tirosinazın termal inaktivasyonu .....                              | 35 |
| 4.13. İmmobilize Tirosinazın Tekrar Kullanım Sayısı .....                              | 35 |
| 5. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....                                                 | 36 |
| 5.1. Serbest ve İmmobilize Tirosinazın Aktifliğine pH'nın Etkisi.....                  | 36 |
| 5.2. Serbest ve İmmobilize Tirosinazın Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi .....             | 37 |
| 5.3. Serbest ve İmmobilize Tirosinazın Aktifliğine Substrat<br>Derişiminin Etkisi..... | 38 |
| 5.4 Serbest ve İmmobilize Tirosinazın Aktifliğine Depolanma<br>Süresinin Etkisi .....  | 40 |
| 5.5. Serbest ve İmmobilize Tirosinazın Termal Kararlılığı.....                         | 42 |
| 5.6. İmmobilize Tirosinazın Tekrar Kullanım Sayısı .....                               | 43 |

**Sayfa**

|                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| 6. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ ..... | 45 |
| KAYNAKLAR .....                       | 47 |
| ÖZGEÇMİŞ .....                        | 53 |

**ALJİNAT JEL BONCUKLARI ve POLİ(AKRİLAMİT-ko-AKRİLİK ASİT)  
HİDROJELLERLE TİROSİNAZ ENZİMİNİN BİNARİ  
YÖNTEMİYLE İMMOBİLİZASYONU  
(Yüksek Lisans Tezi)**

**Ayşe YAHŞİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TEMMUZ 2005**

**ÖZET**

Bu çalışmada, tirosinaz enzimi (E.C. 1.14.18.1) Ca-aljinat ve poli(akrilamit-ko-akrilik asit) kullanılarak binari yöntemi ile immobilize edilmiştir. Serbest ve immobilize enzimlerin maksimum hızı ( $V_{maks.}$ ) ve Michaelis-Menten sabiti ( $K_m$ ) incelendi. Aynı zamanda serbest ve immobilize enzim üzerine pH, sıcaklık, depolanma kararlılığı, tekrar kullanım sayısı ve termal kararlılık incelenmiştir. Serbest ve binary yöntemiyle Ca-alginate ve P(AAm-co-AA) üzerine immobilize edilen enzimin pH'sı 7 ve 5,5 olarak bulunmuştur. Serbest ve immobilize enzim için optimum sıcaklık ise 30 ve 35°C olarak tespit edilmiştir. Serbest enzim için  $K_m$  ve  $V_{mak}$  değerleri sırasıyla 0,6 mM ve 0,07 mM.dakika<sup>-1</sup>, ve immobilize enzimler için ise  $K_m$  değerleri 0,78 mM ve 1,41 mM, ve  $V_{maks.}$  değerleri 0,07 mM.dakika<sup>-1</sup>, 0,01 mM.dakika<sup>-1</sup> ve 0,01 mM arasında bulunmuştur. Enzimin tekrar kullanım sayısı, depolama ve termal kararlılığı ikili immobilizasyon ile arttırılmıştır.

**Bilim Kodu : 405**  
**Anahtar Kelimeler : Tirosinaz; Binari immobilizasyon; Aljinat; Poli(akrilamit- ko-Akrilikasit)**  
**Sayfa Adedi : 53**  
**Tez Yöneticisi : Yrd. Doç. Dr. Hayrettin TÜMTÜRK**

**BINARY IMMOBILIZATION OF TYROSINASE BY USING ALGinate  
GEL BEADS AND POLY(ACRYLAMIDE-CO-ACRYLIC ACID)  
HYDROGELS  
(M. Sc. Thesis)**

**Ayşe YAHŞİ**

**UNIVERSITY OF GAZİ  
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY  
JULY 2005**

**ABSTRACT**

**In the present study, binary immobilization of tyrosinase (E.C. 1.14.18.1) by using Ca-alginate and poly(acrylamide-co-acrylic acid) [P(AAm-co-AA)] was achieved. Maximum reaction rate ( $V_{max}$ ) and Michaelis–Menten constant ( $K_m$ ) were investigated for free and binary immobilized enzymes. The effect of pH, temperature, storage stability, reuse number and thermal stability on the free and immobilized tyrosinase were also examined. For free and binary immobilized enzymes on Ca-alginate, P(AAm-co-AA), optimum pH was found to be 7 and 5, respectively. As for optimum temperature of free and immobilized enzymes was observed to be 30 and 35°C. For free enzyme maximum reaction rate ( $V_{max}$ ) and Michaelis–Menten constant ( $K_m$ ) values were found 0,6 mM and 0,07 mM.min<sup>-1</sup> as respectively the same values for binary immobilized enzyme were found in the range of 0,78 mM – 1,41 mM and 0,01 mM.min<sup>-1</sup> - 0,01 mM.min<sup>-1</sup>, respectively. Reuse number, storage and thermal stability of free tyrosinase was increased by binary immobilization.**

**Science Code : 405  
Key Words : Tyrosinase; Binary immobilization; Alginate;  
Poly(acrylamide-co- acrylic acid).  
Page Number : 53**

**Adviser : Asst.Prof.Dr. Hayrettin TÜMTÜRK**

## **TEŖEKKR**

alışmalarım boyunca bilgi ve deneyimleriyle beni ynlendiren, karşılaştığımız zorlukları aşabilmemiz için yakın ilgi ve desteğini esirgemeyen çok değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Hayrettin TÜMTÜRK 'e

Laboratuvar araştırmalarım esnasındaki yardımlarından dolayı Gökhan Demirel'e ve Ferhat şahin'e,

Çalışmamın bir bölümünü oluşturan seminerimdeki, katkılarından dolayı değerli arkadaşım Sanem Ağakanlı 'ya,

Çalışmamın her aşamasında manevi destekten dolayı beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan çok değerli aileme;

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

| Çizelge                                                                         | Sayfa |
|---------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Çizelge 3.1. Enzim immobilizasyonu için kullanılan destek materyalleri.....     | 18    |
| Çizelge 3.2. Serbest ve immobilize enzim özelliklerinin karşılaştırılması ..... | 25    |
| Çizelge 5.1. Serbest ve immobilize tirozinazın termal kararlılığı .....         | 43    |

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

| Şekil                                                                                                                     | Sayfa |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil 2.1. Tirosinaz enziminin katalizlediği tepkimeler.....                                                              | 7     |
| Şekil 2.2. Tirosin substratının tirosinaz enzimi ile biyolojik pigmentlere dönüşümü .....                                 | 8     |
| Şekil 2.3. Tirosinazın bakır merkezli şekli.....                                                                          | 9     |
| Şekil 2.4. Oksijen varlığında tirosinin difenol ve monofenolün o-kinonlara oksitlenme katalitik dönüşüm mekanizması ..... | 10    |
| Şekil 2.5. o- Difenolün dehidrojenasyonu sırasında açığa çıkan serbest radikal ..                                         | 12    |
| Şekil 3.1. Enzim immobilizasyonunda kullanılan immobilizasyon yöntemleri....                                              | 19    |
| Şekil 4.1. L-DOPA kalibrasyon grafiği .....                                                                               | 31    |
| Şekil 5.1. Serbest ve immobilize tirosinazın maksimum aktifliğinin pH ile değişimi .....                                  | 37    |
| Şekil 5.2. Serbest ve immobilize enzimin maksimum aktifliğinin sıcaklıkla değişimi .....                                  | 38    |
| Şekil 5.3. Serbest ve immobilize enzimin aktifliğinin substrat konsantrasyonuyla değişimi.....                            | 40    |
| Şekil 5.4. Serbest ve immobilize enzimin aktifliğinin depolanma süresiyle değişimi.....                                   | 41    |
| Şekil 5.5. Serbest ve immobilize tirosinazın maksimum aktifliğinin zamanla değişimi.....                                  | 43    |
| Şekil 5.6. Immobilize enzimin aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi .....                                             | 44    |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

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

### Simgeler

kD

$V_{maks}$

$K_m$

$k_i$

$t_{1/2}$

### Açıklama

Kilo Dalton

Maksimum hız

Michaelis-Menten

İnaktivasyon sabiti

Yarılanma süresi

### Kısaltmalar

AA

AAm

DOPA

ECH

EDTA

P

TEMED

Alj

P(AAm-ko-AA)

### Açıklama

Akrilik asit

Akrilamit

3,4-dihidroksi fenilalanin

Epiklorhidrin

Etilen diamin tetra asetik asit

Poli

N, N, N,'N'-tetrametiletilediamin

Aljinat

Poli(akrilamit-ko-akrilik asit)

## 1. GİRİŞ

Son 25 yıl içerisinde, atıkların arıtımında enzimlerin kullanımına yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bu konudaki çalışmalar halen yoğun bir şekilde devam etmektedir. Enzimlerin atık arıtımında kullanılmasının en önemli nedeni daha ucuz, daha hızlı, daha güvenilir ve daha kolay elde edilebilir olmasıdır.

Fenol ve aromatik aminleri içeren aromatik bileşikler önemli bir kirletici grubunu oluştururlar ve bu kimyasalların yarattığı çevre kirlilikleri birçok ülkede sıkı bir şekilde kontrol altında tutulmaktadır. Fenolik kirleticiler kömür, petrol, odun, metal kaplama, boya ve plastik gibi çok çeşitli endüstrilerin atık sularında bulunurlar.

Endüstriyel atık sulardaki fenollerin gidermede kullanılan başlıca enzimler peroksidaz ve fenoloksidaz grubuna giren enzimlerdir. Peroksidazlar oksidoredüktaz sınıfından enzimleri içeren bir grup olup, hidrojen peroksidi oksitleyici olarak kullanmak suretiyle fenollerin okside edebilirler.

Kompleks canlı sistemlerinde çalışan enzimler spesifiktir ve yan ürün oluşumuna neden olmadan yüksek verim elde etmesini sağlarlar. Enzimlerin spesifikliğı ve çok düşük konsantrasyonlarda bile substrat reaksiyonlarını katalizlemelerinden dolayı sanayide önemli kullanım alanları vardır. Enzim katalizli reaksiyonlar inhibitörlerin, aktivatörlerin ve substratların konsantrasyonlarını tayin etmek için uzun zaman analitik amaçlı kullanılmıştır. Birçok avantaja sahip olmalarına karşın endüstriyel uygulamalarda kullanılan enzimler sınırlıdır. Analitik reaktif olarak kullanılan enzimler deney şartlarına ve çevre koşullarına çok duyarlı olup yüksek sıcaklıklarda, asidik ve bazik çözeltilerde aktifliklerini kaybederler (28). Çünkü enzimlerin pek çoğu kararsızdır. Enzimlerin izolasyonu ve arıtılması ekonomik değildir. Bu nedenle enzimlerin bir kez kullanımı yerine immobilize edilerek tekrarlanabilir kullanımlara girmeleri ekonomik açıdan büyük önem taşır.

Bu çalışmada tirozinaz enzimi Ca-aljinat ve P(AAm-ko-AA) polimerleri kullanılarak hapsetme ve kovalent bağlama yöntemi ile immobilize edildi. İmmobilize ve serbest tirosinazın aktifliğine etki eden çeşitli parametreler incelenerek, birbiri ile karşılaştırıldı.

## 2. TİROSİNAZ

Bourquelot ve Bertrand (5) tarafından yapılan çalışmalarda, bazı mantar çeşitlerinin (*Russula fortens* ve *R. Nigricinas*) ekstraktlarının renginin oksidasyon sürecinde önce kırmızıya, daha sonra koyu kahverengi veya siyaha döndüğünü gözlemlemişlerdir (38). Bu araştırmacılar, yaptıkları daha sonraki araştırmalarda *R. Nigricans*'ın ekstraktından, ekstrakttaki bir oksidaz sisteminin varlığında melanin benzeri ürünler oluşturan bir maddeyi kristalize etmişlerdir. Bu madde, daha sonraları Bertrand tarafından tirozin amino asidi olarak tanımlanmıştır. Tirosinaz, moleküller oksijeni kullanarak monofenollerin o-difenollere hidroksilasyonlarını ve o-difenollerin o-kinonlara dehidrojenasyonlarını katalizler ve oluşan kinon bileşikleri enzimatik olmayan bir polimerizasyona uğrarlar (28). Yani tirosinaz, pigment yapmak için tirozin amino asidini DOPA'ya (3,4-dihidroksi fenilalanin) çevirmeye yardım eden bir çeşit enzim yada özelleşmiş proteindir.

Tirosin ise bir amino asit yada protein yapı taşıdır. Tirosin genelde yiyeceklerden alınır ve sistem bunu melanin yapmakta kullanır.

Tirosinaz, afinite kromatografisi ile saflaştırılan ilk enzim olma özelliğine sahip olmasının yanı sıra, moleküler oksijeni, organik (fenolik) bir molekülün yapısına doğrudan katılabilme özelliğine sahip enzimler arasında da ilk tanımlanan enzimdir. Poli fenol oksidaz, fenolaz, kateşol oksidaz, monofenol oksidaz, kresolaz (monofenolaz) ve kateşolaz (difenolaz) olarak da bilinen tirosinaz (EC.1.14.18.1) birçok bitki dokusunda (31), bazı mantarlarda (26), böceklerde, bazı organizmalarda, bakterilerde, memeli hayvanların organlarında ve insanlarda bulunur. Yüksek yapılı bitkilerde enzim, bitkiyi böcek ve mikroorganizma atıklarına karşı korur; bitki yaralandığında mikroorganizmaların daha ileri ataklarına olanak tanımayan ve korumayı önleyici bir melanin tabakası oluşturur.

Tirosinaz böceklerde dış iskeletin sertleşmesine yardımcı olurken, diğer taraftan mikroorganizmalara karşı sentezlediği melanin içerisinde hapsederek koruma

sağladığı ileri sürülmüştür (30). İnsanlarda ise tirosinaz cildin, saçın ve gözün pigmentlerinden sorumludur.

Tirosinaz meyve ve sebzelerin işlenmesi ve depolanması süreçlerinde ürünün kalitesini ve ekonomik değerini belirleyen çok önemli bir enzimdir (26). Kararma yüzünden bazı meyvelerde her yıl yarıya yakın verim kaybı olmaktadır. Birçok meyve ve sebze oksijenin içeriye girişine yol açan zedelenme, kesik ve diğer mekanik hasarlar sonucunda melanin oluşumuna bağlı olarak kararır. Hasarlı ürünün rengi, kötü tadı ve besinsel değer kaybı tüketici açısından istenmeyen sonuçlardır. Şeftali, kaysı, muz v.b. diğer bazı tropik meyve ve suları, patates, marul ve diğer lifsi sebzeler kararmaya açıktırlar. Karideste siyah lekelerin oluşması önemli bir ekonomik sorundur. Tirosinaz aktivitesi çay, kahve, kuru erik, kuru incir, siyah üzüm gibi bazı ticari ürünlerin kalitesi açısından istenen bir özelliktir. Ayrıca, tirosinaz tarafından oluşturulan melanin; güneşin zararlı ışınlarına karşı mükemmel bir koruyucudur. Buna ek olarak, tirosinaz aktivitesi ile oluşan bazı, çözünür pigmentlerin gıda renklendiricisi olarak kullanılabilme olanakları vardır (42).

Melanin koyu içerikli ve ışıktan koruyucu diye bilinen renklendirici bir madde ya da bir çeşit pigmenttir. Melanin pigmentinin derideki temel görevi güneşten gelen ultraviyole ışınları soğurarak derinin hasar görmesini engeller. Güneş derideki melanin pigmentinin artmasına neden olarak bronzlaşmaya sebep olur. Çoğu albinizimli insanın derisinde melanin pigmenti yoktur ve güneşe maruz kalınca bronzlaşmazlar. Bunun sonucunda derileri güneş ışığına karşı çok duyarlıdır ve yanıklar oluşur. Melanin pigmenti göz ve beyin gibi vücudun diğer bölgelerinde de etkilidir; fakat melaninin buralarda tam olarak ne yaptığı bilinmemektedir. Melanin retinada ve retinanın fovea denilen bölgesinde bulunmakta ve gelişme sırasında melanin pigmentinin eksikliğinde tam olarak gelişmemektedir. Retinanın diğer bölgeleri melaninin varlığında ya da yokluğunda normal olarak gelişmektedir. Gelişim sırasında retinada melanin yoksa gözle beyin arasındaki sinirlerin bağlantısı da değişmektedir. İriste de melanin vardır ve bu irise ışık geçirmez bir özellik kazandırır. Albinizmde, iristeki pigment azdır ve bu yüzden iris ışığa karşı yarı saydamdır yine de iris tam olarak gelişir ve işlevini yerine getirir. Melanin melanosit denilen özel hücrelerde oluşur. Bu hücre deride,

saçta, gözün iris ve retina bölgelerinde bulunur. Tirosinaz melanine dönüşümü iki türdür. Bunlar siyah-kahverengi eumelanin ve kırmızı-sarı pheomelanindir.

Tirosinaz melaninin oluşumunda temel enzimdir. Tirosinaz tirosini DOPA' ya (3,4-dihidroksi fenilalanin) onu da DOPA quinone'ye dönüştürmekle görevlidir. Sonra DOPA quinone siyah-kahverengi eumelanin ya da kırmızı-sarı pheomelanini oluşturur. Tirosinaz enzimi kromozom 11 üzerindeki tirosinaz geni tarafından üretilir ve bu genin mutasyonu bir çeşit albinisme neden olur, çünkü değişmiş gen tarafından üretilen enzim doğru çalışmaz.

Albinizm; sadece gözde ya da hem göz hem de deride pigment miktarının azlığını içeren bir grup kalıtsal durumdur. Albinisimli insanların gözlerinde, derisinde ve saçlarında ya çok az pigment bulunur ya da hiç bulunmaz (bazen sadece gözlerde bulunabilir) onlar ebeveynlerinden bir genin değişmiş kopyasını alırlar ki bu genlerde doğru çalışmamaktadır. Değişmiş gen vücudun melanin denilen bir pigmenti normal miktarda üretmesini engeller. Ayrıca zeka geriliği, duyma bozukluğu, kan pıhtılaşmaması gibi değişik sorunları olan başka albinizm çeşitleride vardır.

## **2.1. Tirosinazın Moleküler Özellikleri**

Tirosinaz tipi fenol oksidazların moleküler ağırlıkları izole edildikleri kaynaklara göre oldukça değişkenlik göstermektedir. Dört farklı bitki türünden izole edilen tirosinaz enziminin moleküler ağırlıkları 33.0 kD ile 200.0 kD arasında değişmektedir. Mantar kaynaklı tirosinaz enziminin genel olarak kabul gören moleküler ağırlığı 128.0 kD'dir.

Patates, domates, bakla ve üzüm tirosinazlarının sentezinden sorumlu genlerin cDNA'larından primer aminoasit dizilimi tespit edilmiştir. Yüksek yapılı bitkilerden elde edilen tirosinazların moleküller ağırlıkları 40.680 - 58.082 kD arasında değişmesine karşın, bakla bitkisinden elde edilen tirosinazın moleküller ağırlığının dönüşüm sonrası işlemler sonucunda 40.0 - 42.0 kD'a düştüğüne dair kanıtlar bulunmuştur. Streptomyces glaucescens ve S. Antibioticus mantarlarından elde edilen tirosinaz enziminin moleküler ağırlıkları sırasıyla 30.900 ve 30.736 kD iken,

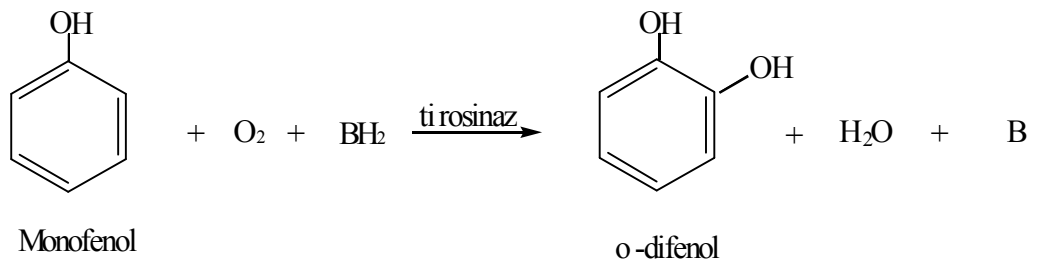
*Neurospora crassa* mantarından elde edilen tirozinaz enziminin moleküler ağırlığı 46.000 kD olarak saptanmıştır. Mantar kaynaklı tirozinaz'ın moleküler ağırlığı 128.0 kD, insan ve fare kaynaklı yüksek yapılı hayvan tirozinaz'ının moleküler ağırlığı ise sırasıyla 62.610 ve 57.872 kD olarak bulunmuştur (7).

Çeşitli kaynaklardan izole edilen tirozinazın jel elektroforezi, jel filtrasyon çalışmaları enzimin değişik biçimlerinin bulunduğunu göstermiştir. Enzimin değişik biçimlerinin olması, enzim ve diğer proteinler arasındaki etkileşimler kadar, benzer veya farklı alt birimlerin birleşmesine, ayrılmasına, enzimin izolasyona ve saflaştırılmasına da bağlıdır.

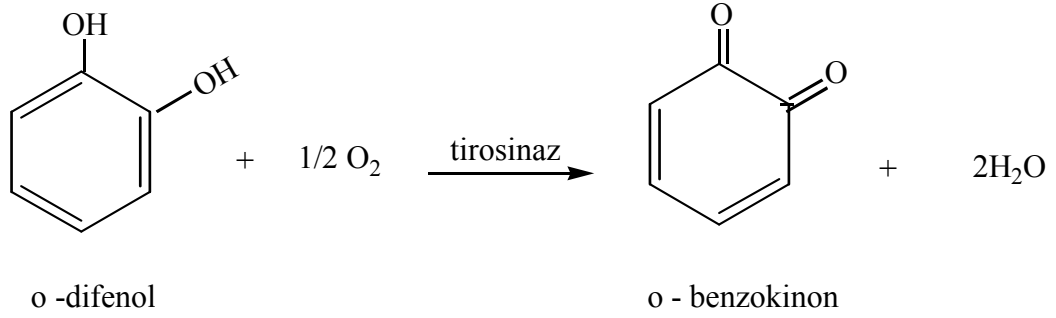
## 2.2. Tirozinazın Katalizlediği Tepkimeler

Tirozinaz aktif merkezinde bakır atomu bulunan iki fonksiyonlu bir enzim olup, birbirini takip eden iki tepkimeyi katalizler (Şekil 2.1). Bu tepkimelerden birincisi (a) monofenollerin o-difenollere hidroksilasyonu, ikincisi (b) ise o-difenollerin o-kinonlara dehidrojenasyonlarıdır. Tepkime sonucu oluşan kinonlar daha sonra enzimatik olmayan bir tepkimeyle polimerize olurlar. Söz konusu bu polimerler suda çözünmezler.

a)



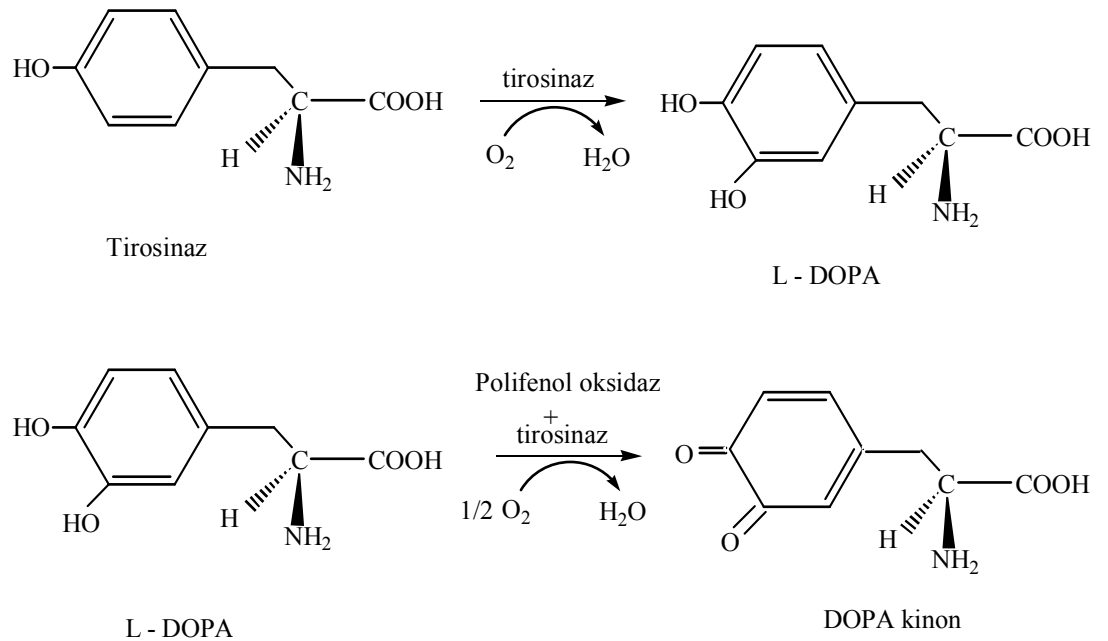
b)

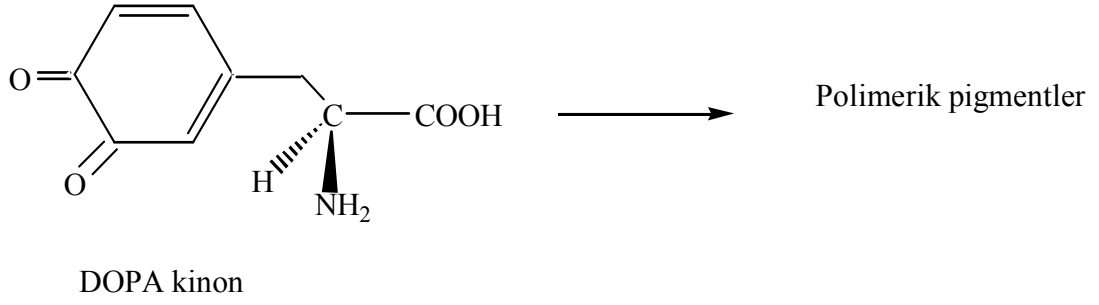


Şekil 2.1. Tirosinaz enziminin katalizlediği tepkimeler

Tepkime a'daki  $\text{BH}_2$ ; NADH,  $\text{NH}_2\text{OH}$  ve  $\text{H}_2\text{O}$  gibi kimyasal maddelere gereksinim duyulan bir o-difenoldür. Eğer tepkime başlangıcında ortama  $\text{BH}_2$  eklenmezse monofenolaz veya hidroksilaz (kresolaz) aktiviteye sahip tirosinazlar bir duraksama fazı geçirirler. Enzim, ihtiyaç duyduğu kofaktörü, monofenollerin o-hidroksilasyonlarını katalizleyerek yavaş yavaş kendisi oluşturabilir. Tepkime ortamını  $\text{BH}_2$  olarak  $1.10^{-7}\text{M}$  o-difenol (Kateşol) eklendiğinde enzim normal kinetiğini gösterir (42).

Eğer tepkimedeki substrat tirozin aminoasidi ise oluşacak polimer melanindir.





Şekil 2.2. Tirosin substratının tirosinaz enzimi ile biyolojik pigmentlere dönüşümü

### 2.3. Tirosinazın Substrat İlgisi

Yüksek yapılı bitkilerden ve mantarlardan elde edilen tirosinazlar birçok fenolik bileşik (hem mono- hem de o-difenoller) üzerine etkide bulunabilirler. Enzimin kaynağına ve saflığına bağlı olarak, aynı substratlar için bile kinetik parametrelerde ( $K_m$  ve  $V_{maks.}$ ) büyük farklılıklar gözlenmiştir (41).

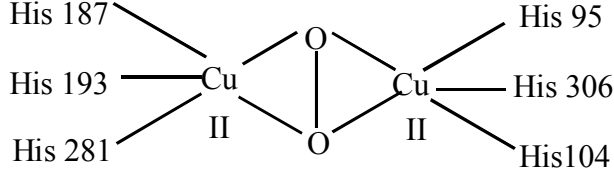
Zawistowski ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, yer elmasından saflaştırılan yüksek moleküller ağırlıklı tirosinazın monohidroksi, o-dihidroksi ve polihidroksi fenollere karşı aktifken, düşük molekül ağırlıklı alt birimlerinden sadece o-dihidroksifenollere karşı etkin olduklarını bildirmişlerdir.

Meyve ve sebzelerde bulunan en önemli doğal fenolik tirosinaz substratları kateşinler (difenolaz veya oksidaz), şinnamik asit esterleri, 3,4-dihidroksi fenilalanin (DOPA) ve tirozindir.

### 2.4. Enzimatik Tepkime Mekanizması ve Bakırın Rolü

Tirosinaz bakır içeren bir proteindir. Kimyasal ve spektroskopik çalışmalarda aktif merkezin her biri üç histidin grubuna bağlı iki bakır atomu bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 2.3). Sekiz farklı organizmadan saflaştırılan tirosinaz ile *N.crassa*'dan elde edilen tirosinazın aminoasit dizilimi karşılaştırıldığında, aynı pozisyonda bulunan en azından beş histidin aminoasidinin korunduğu görülmüştür (38). Bu nedenle,

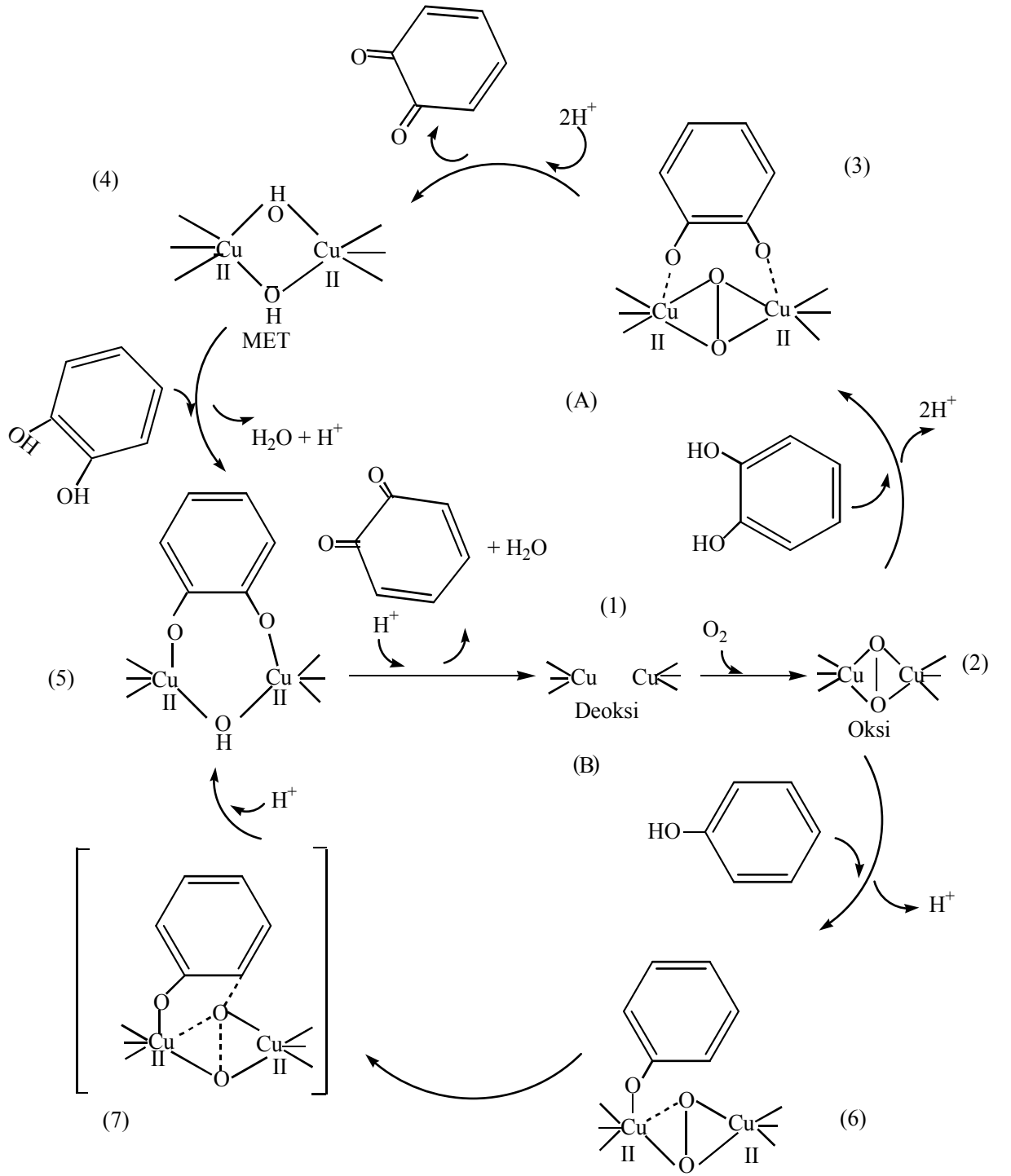
tirosinazın tepkime mekanizmasına yönelik olarak öne sürülecek herhangi bir modelde, bakır atomunun rolünün göz önünde bulundurulması gerekmektedir.



Şekil 2.3. Tirosinazın bakır merkezli şekli

Kubowitz tarafından yapılan bir deneyde, tirosinaz aktivitesi için bakırın gerekli olduğu göstermiştir. Bu deneyde önce potasyum siyanür yardımıyla enzimdeki bakır atomunu uzaklaştırmış ve bunun sonucunda enzimin aktivitesinin kaybolduğu, uzaklaştırılan bakır atomunun yenilendiğinde ise aktivitenin yeniden kazanıldığı gözlenmiştir (13).

N.crassa tirosinazı için önerilen tepkime mekanizması (29) diğer tirosinazlarla yapılan çalışmalardan elde edilen bilgiler ile uyumaktadır. o-difenol oksidasyonunun metabolik reaksiyonundaki ara ürünler Şekil 2.4 A'da gösterilmektedir. Öncelikle  $O_2$ 'nin deoksi-tirosinazın iki  $Cu^{+2}$  grubuna bağlanmasıyla oksitirosinaz oluşur (Şekil 2.4 A2). Oksitirosinaz (A2); tetrahedral yapıda olup,  $N_{His}$  ligandlarından biri eksenel bölgeye zayıf bağlarla, diğer ikisi ise ekvatorial bölgeye kuvvetli bağlarla bağlanır. Daha sonra oksitirosinazın iki  $Cu^{+2}$  grubu kateşolün iki hidroksil grubuna bağlanarak  $O_2$ -kateşol-enzim kompleksini oluşturur. Kateşol benzokinin'a okside olurken, açığa met-tirosinaz çıkar. Açığa çıkan met-tirosinaza başka bir kateşol molekülü bağlanır (Şekil 2.4 A3). Sonuçta, kateşol benzokinin'a okside olurken enzim deoksi-tirosinaz biçimine döner (Şekil 2.4 A4). Böylece döngü tamamlanmış olur. Tam bir döngü sonucunda iki molekül kateşol okside olurken, iki  $O_2$  atomu harcanmış olur. (32, 19)



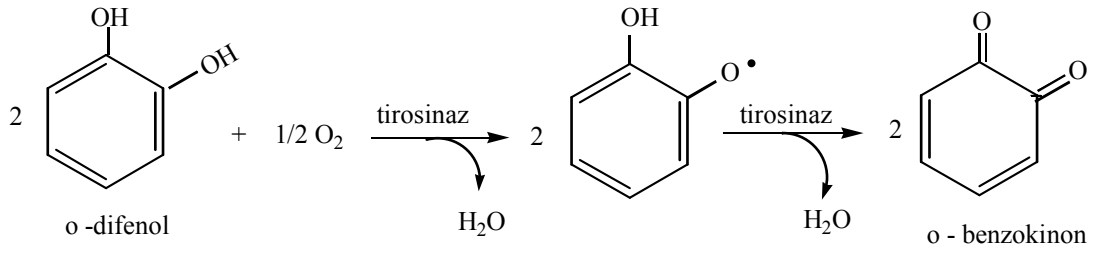
Şekil 2.4. Oksijen varlığında tirozinin difenol ve monofenolün o-kinonlara oksitlenme katalitik dönüşüm mekanizması

Tirosinazın monofenol hidroksilasyon mekanizması Şekil 2.4 B’de gösterilmektedir. Tepkime in vitro olarak incelendiğinde, tepkimeye giren ilk enzim biçiminin met-tirosinaz olduğu gözlenmiştir. Wilcox ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada dinlenme halindeki *N.crassa* tirosinazını % 85 met ve % 15 oksitirosinaz biçimlerinin bir karışımı olduğu gösterilmiştir (36). Bu nedenle; daha önceden de belirtildiği gibi tepkime ortamına BH<sub>2</sub> (Şekil 2.4 A) eklenmesi monofenol hidroksilasyonunu hızlandırmaktadır. Çünkü ortama dışarıdan eklenen BH<sub>2</sub> okside olurken, met-tirosinazı deoksi biçimine dönüştürür (Şekil 2.4 A1). Açığa çıkan deoksi-tirosinaz O<sub>2</sub> ile birleşerek oksi-tirosinazı oluşturur (Şekil 2.4 A2). Oksitirosinaz Cu<sup>+2</sup> atomlarından biri aracılığıyla monofenole bağlanır (Şekil 2.4 B6). Takip eden basamakta, monofenol ve O<sub>2</sub> bağının stearik oryantasyonu, monofenolün oksi-tirosinazdaki diğer Cu<sup>+2</sup> atomuna komşu olan orto pozisyonu ile yer değiştirir (Şekil 2.4 B7). Böylece, monofenolün orto pozisyonu hidroksile edilmiş olur. Monofenolden oluşan ilk ürün kateşol olup, enzimdeki her iki Cu<sup>+2</sup> atomuna da O<sub>2</sub> atomları aracılığı ile bağlı olarak bulunur (Şekil 2.4. A5) . Kateşol hali hazırda enzime bağlı iken benzokinona okside olur ve enzim deoksi forma indirgenir (Şekil 2.4 A1). Böylece enzim, yeniden oksijene bağlanarak yeni bir döngüye girebilir. Bu döngüde ilginç olan nokta, monofenolün hidroksilasyonu sonucunda açığa çıkan o-difenolün oksidasyon basamağına (Şekil 2.4 A)’daki diğer iki o-difenol oksidasyon basamağına (Şekil 2.4 A3 ve A4) benzememektedir. Bu nedenle Şekil 2.4 ‘de görüldüğü gibi, tirosinazın o-difenol oksidasyonuna yönelik üç ayrı mekanizma söz konusudur.

## 2.5. Enzimatik Tepkimeye Bağlı İnaktivasyon Mekanizması

o-Difenolün o-benzokinona oksidasyonu sırasında tirosinaz nispeten yavaş olan geri dönüşümlü bir inaktivasyona uğramaktadır (5). İlk önceleri bu inaktivasyonun enzimin aktivitesi için gerekli olan bir ε-amino grubunun o-benzokinon ile tepkimeye girmesi sonucu ortaya çıktığı düşünülmekteydi. Daha sonra yapılan çalışmalarda inaktivasyonun, tepkime sırasında açığa çıkarılan serbest bir radikal nedeniyle olduğu ve bu radikalın enzimin aktif merkezindeki histidin bölgelerinin bir veya daha fazla parçalanmayı katalizlediği gösterilmiştir. Bu durum tepkime sırasında oluşan histidin kaybının ve bakır salınışının nedenini açıklamaktadır. Sonuç olarak, o-

difenollerin tirosinaz enzimi tarafından katalizlenen dehidrojenasyonları sırasında ara ürün olarak serbest bir radikal oluşmakta ve bu serbest radikal enziminin inaktivasyonuna neden olmaktadır (Şekil 2.5). Tepkime sırasında açığa çıkan semikinon radikalın doğrudan saptanabilmesi, muhtemelen çok hızlı bir şekilde o-kinona dönüştürüldüğünden, ancak son yıllarda tespit edilebilmiştir (42).



Şekil 2.5. o- Difenolün dehidrojenasyonu sırasında açığa çıkan serbest radikal

## 2.6. Tirozinazın Endüstriyel Uygulama Alanları

Tirosinaz enzimi endüstriyel atık sularının ve çevre kirliliğine neden olan biyolojik ilaçların (6) arıtılmasında, fenol ve türevlerinin tayini için enzim elektrotlarının yapılmasında (2), meyve sularının berraklaştırılmasında kullanılmaktadır. Meyve ve sebzelerin işlenmesinin ardından enzimatik kararmaya yol açması nedeniyle ilk olarak gıda sektörüne yönelik araştırmalar yapan araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Özellikle çay fermentasyonunda tirosinaz aktivitesi çok önemli bir işleve sahiptir. Tirosinaz aktivitesinin yüksek olması çayın kalitesini arttıran bir özelliktir. Kozmetik ve tıbbi uygulamalara yönelik önemi ise son zamanlarda giderek artan bir yoğunlukta devam etmektedir.

## 2.7. Tirozinazın Gıda Endüstrisindeki Önemi

Çoğu tarımsal kökenli gıda maddesi tirosinaz içeriği nedeniyle enzimatik kararmaya maruz kalır ve bunun sonucunda ürünün kalitesi düşer. Özellikle meyve ve sebzelerin işlenmesi sürecinde O<sub>2</sub> temasına neden olabilecek herhangi bir durum, tirosinaz aktivitesine bağlı olarak kararmaya yol açmakta ve maddi kayıplara neden olmaktadır. Bu nedenle gıda sektörü için çeşitli inhibitörler kullanılarak tirosinaz enziminin

aktivitesinin kontrolü ve buna bağılı olarak enzimatik kararmanın önlenmesi oldukça önemlidir. Tirosinaz aktivitesini inhibe etme yeteneğinde olan birçok bileşik bilinmesine karşın, bu inhibitörlerin enzimatik kararmayı kontrol edebilme yetenekleri inhibitör, substrat, O<sub>2</sub> derişimine, pH'ya, sıcaklığa ve enzimin kaynağına bağılı olarak farklılık gösterir. Ayrıca enzimatik kararmayı önleyen etkili inhibitörlerin kullanımı yiyeceğin tat, koku ve hazmedilebilirliği üzerine olan etkileri ve yarattıkları toksite sorunları nedeniyle kısıtlanmıştır. Tirosinaz metal içeren bir protein olduğundan, siyanür karbonmonoksit, trpolon, 2-merkaptobenzotiyazol, asit ve EDTA gibi çeşitli metal uzaklaştırıcı ajanlar tarafından inhibe edilebilmektedir. Ayrıca tuzlarda dahil olmak üzere bazı inorganik iyonlar da tirosinazı inhibe edebilmekle birlikte, NaCl hariç bu bileşiklerin bir çoğı toksik olduklarından, kullanımları sınırlıdır. Taze soyulmuş sebze ve meyvelerin kararmasını önlemek için kullanışlı olan NaCl, düşük konsantrasyonlarda zayıf bir inhibitördür (38). Tirosinaz aktivitesi bazı gıda ürünleri açısında önlenmesi gereken bir aktivite olmakla birlikte aktif tirosinaz; çay, kahve, kakao, kuru üzüm, kuru incir gibi gıda ürünleri açısından oldukça önemlidir.

Dünyada en çok tüketilen içeceklerden biri olan çay, çay bitkisinin taze filizlerinden üretilir. Üretim sürecinde işleniş biçimine göre fermente edilmiş çay (siyah çay) ve fermente edilmemiş çay (yeşil çay) olarak sınıflandırılır. Siyah çayın fermantasyonu sırasında, poli fenoller oksitleyebilen tirosinaz kritik bir rol oynar. Çayda en çok bulunan poli fenoller kateşin ve türevleridir. Fermantasyon sürecinde öncelikle kateşinler o-kinonlara okside olurlar. Açığa çıkan o-kinonlar daha sonra ikinci bir oksidasyonla sarı renkteki pigmentlere dönüşürler. Bu pigmentler ileri bir oksidasyona uğrayarak, çaya rengini veren koyu kahverengi pigmentlere dönüşürler. Kafein, sarı ve koyu kahverengi rengi veren pigmentlerin içeriğı çayın kalitesini belirleyen en önemli bileşendir. Çayın kalitesi toplam sarı rengi veren pigment ile ilişkili olup, çaydaki sarı rengi veren pigmentin içeriğinin az ya da çok olması tirosinaz aktivitesine bağılıdır. (35) yüksek kaliteli hibrit çay bitkilerindeki tirosinaz aktivitesinin, düşük kaliteli bitkilere göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

## 2.8. Tirosinazın Tıbbi Uygulama Alanları

Tirosinaz, melanin oluşumunda görev alması nedeniyle tıbbi alanda da dikkatleri üzerine çekmiştir. Suda çözünmeyen heteropolimer yapıdaki melanin, özellikle kozmetik sanayi tarafından güneşin ultraviyole ışığından korunmak amacıyla üretilir. Ayrıca, ilaç tutuklamada biyopolimer olarak da melaninden yararlanılmaktadır.

Tirosinaz enziminden 3,4 dihidroksifenilalanin (L-DOPA) sentezlenir. (31, 42).

L-DOPA 1967'den beri Parkinson hastalığının tedavisindeki ilaç üretiminde kullanılmaktadır. Günümüzde ise L-DOPA'nın çoğu kimyasal olarak üretilmesine karşın, son çalışmalar *Erwinia herbicola* ve *Escherichia coli* (15) bakterilerinin mikro biyolojik yolla, tirosinaz hidroksilaz ve tirosinaz üretimi üzerine yoğunlaşmıştır. L-DOPA'yı mikrobiyolojik yollarla üretmek daha pahalıdır. Çünkü *E. Coli* ve *E. herbicola* tarafından üretilen hormonların ve proteinlerin saflaştırma işlemlerinin pahalı olmasıdır.

Bundan başka bazı kanser türlerinde kanserli hücrede tirosinaz aktivitesinin oldukça arttığı gözlemlenmiş ve bu kanser türlerinin tedavisinde enzimin bu özelliğinden faydalanılması gündeme gelmiştir.

## 2.9. Tirosinazın Fenollerin Gideriminde Kullanımı

Atık sulardaki fenoller ve aromatik aminleri gidermek için peroksidaz ve hidrojen peroksidin kullanılır. Peroksidaz enzimlerinin çeşitli fenolik bileşikler değişik pH ve sıcaklık koşulları altında arıtma özellikleri bulunmasına karşın (24), hidrojen peroksidin yüksek maliyeti endüstriyel ölçekte kullanılmasına engel oluşturmaktadır. Bu nedenle peroksidazlara alternatif olarak bakterilerde, meyvelerde, sebzelerde, mantarlarda ve hayvanlarda oldukça yaygın olarak bulunan ve oksitleyici ajan olarak  $O_2$  'ni kullanan tirosinaz enziminin kullanılması fikri ağırlık kazanmıştır. Atlow ve arkadaşları atık sulardaki fenol ve onun türevlerini immobilize tirosinaz kullanarak o-kinonlara ve düşük molekül ağırlıklı polimerlere dönüştürmüşlerdir (28).

Tirosinaz enziminin oksitleyici ajan olarak oksijeni kullanması bir avantaj olmakla birlikte, şapkalı mantarlardan saflaştırılan tirsoinazın maliyeti oldukça yüksektir. Bu nedenle ucuz enzim üretimi ve saflaştırma yöntemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

### 3. İMMOBİLİZASYON HAKKINDA GENEL BİLGİLER

Enzimler, canlı hücreler tarafından oluşturulup belirli kimyasal reaksiyonları, kendileri herhangi bir değişikliğe uğramaksızın hızlandıran protein yapısındaki maddelerdir. Kompleks canlı sistemlerinde çalışan enzimler spesifiktir ve yan ürün oluşumuna neden olmadan yüksek verim eldesini sağlarlar. Enzimlerin bu özellikleri, onların biyokimyasal, endüstriyel ve analitik alanlarda uygulamalarına yol açmıştır.

Enzimlerin spesifikliğı ve çok düşük konsantrasyonlarda bile substrat reaksiyonlarını katalizlemelerinden dolayı sanayide önemli kullanım alanları vardır. Enzim katalizli reaksiyonlar inhibitörlerin, aktivatörlerin ve substratların konsantrasyonlarını tayin etmek için uzun zaman analitik amaçlı kullanılmıştır. Analitik reaktif olarak kullanılan enzimler deney şartlarına ve çevre koşullarına çok duyarlıdır. Bu nedenle yüksek sıcaklıklardan, asidik ve bazik çözeltilerden kaçınılmalıdır (27).

Enzimler, gıda ve kimya gibi endüstriyel, temizlik gibi günlük yaşam ve bir sağlık alanı olan tıp, teşhis ve tedavi, ziraat ve hatta biyolojik savaş gibi pek çok kullanım alanlarında büyük rol oynarlar.

Enzimler başlıca; nişasta, deri, tekstil, petrol, deterjan, çay, soya, et-balık, ve ekmek sanayinde süt ve mamulleri, alkol ve bira, aroma tat maddelerinin üretiminde meyve ve sebze işlemede ve son yıllarda atık maddelerin arıtılmasında kullanılırlar. En önemli kullanım alanlarından bir diğeri de tıp ve eczacılıktaki uygulamalarıdır. Birçok avantaja sahip olmalarına karşın endüstriyel uygulamalarda kullanılan enzimler sınırlıdır. Çünkü enzimlerin pek çoğı kararsızdır. Enzimlerin izolasyonu ve arıtılması ekonomik değildir. Bu nedenle enzimlerin bir kez kullanımı yerine immobilize edilerek tekrarlanabilir kullanımlara girmeleri ekonomik açıdan büyük önem taşır.

### 3.1. Enzim İmmobilizasyonu

Enzim immobilizasyonu, katalitik proseslerde enzim moleküllerinin katalitik aktifliğini koruyarak tekrar ve sürekli kullanımını sağlamak amacıyla bir destek maddesine fiziksel ve kimyasal bağlanması olarak tanımlanabilir.

İmmobilizasyon, 1916 yılında Nelson ve Griffin sakkarozu hidrolize etmek için maya invertaz enzimini mangal kömürüne adsorbe ederek immobilizasyonun temelini atmışlardır. İmmobilize enzim sistemlerinin pratik kullanımı Grobhofer ve Schleith ile başlamıştır. Araştırmalarında, karboksipeptidaz, diastaz, pepsin ve ribonükleaz enzimlerini poliaminostiren reçinesine kovalent bağlama ile immobilize etmişlerdir. İlk olarak hücre immobilizasyonunu Chibata ve arkadaşları 1973 yılında yüksek seviyede aspartaz aktivitesine sahip *E.coli* bakterisini P(AAm-ko-AA) jeli içerisinde hapsedmişlerdir.

Enzimlerin çeşitli metotlarla inert ve genellikle katı polimerik desteklere tutturularak immobilize edilmesi halen pek çok bilim adamının ilgilendiği araştırma alanlarından birini oluşturmaktadır. Genellikle sentetik kimyasal maddeler ve sentetik makro moleküller destek materyali olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, destek için kullanılan kimyasallar, bazı durumlarda enzimleri kısmen veya tamamen çalışamaz hale getirebilir. Bu sebeple endüstride polimer-enzim çiftinin kullanımı halen başlangıç aşamasında olup, kararlı formda polimerik materyallerin ve çeşitli amaçlar için yeni immobilizasyon metotlarının geliştirilmesi araştırmaları devam etmektedir. Enzim immobilizasyonun da kullanılan çeşitli sentetik ve doğal materyaller Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Enzim immobilizasyonu için kullanılan destek materyalleri

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

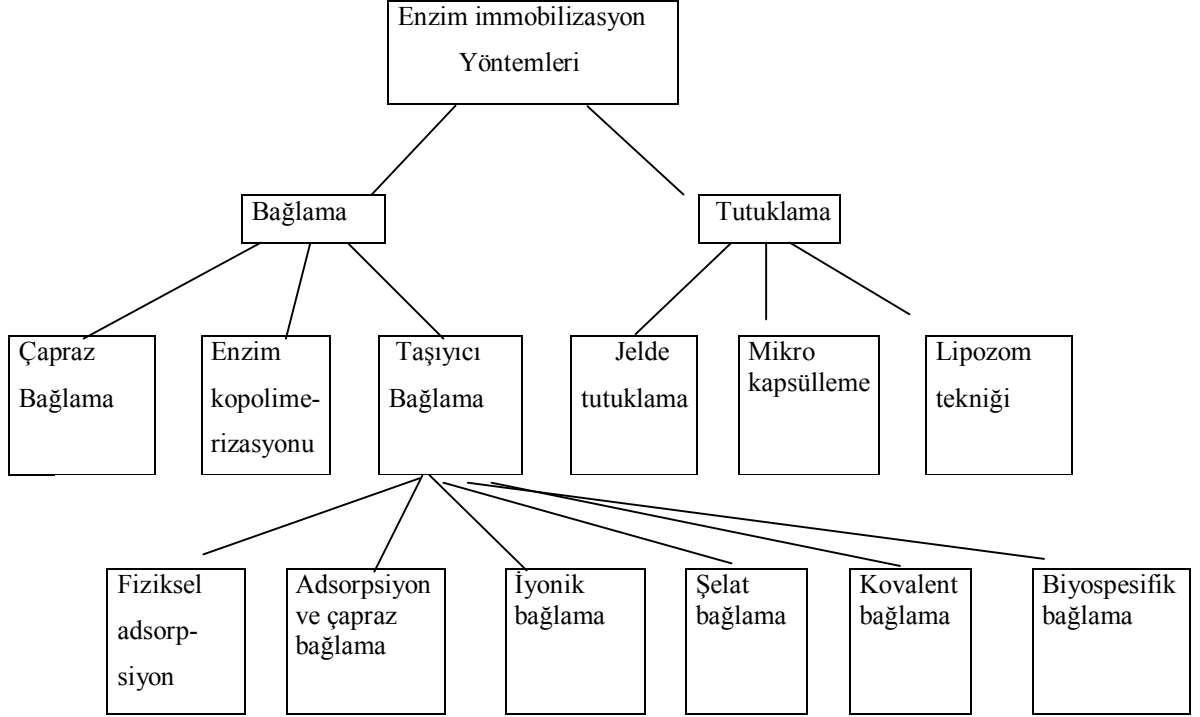
Enzim immobilizasyon tekniklerinin sayısı arttıkça, immobilize enzimlerin geçerli uygulama alanları da artmaktadır. Bu alanların kısa bir özeti aşağıda verilmiştir.

- 1) Stereospesifik bir dönüşüm yoluyla faydalı bileşiklerin üretimi,
- 2) Enerji ve kaynak üretimi (bio kütle dönüşümü, azot sabitleştirme, suni fotosentez gibi),
- 3) Çevresel problemlerin çözümü için havayı veya suyu kirleten kimyasal maddelerin tayini,
- 4) Yüksek spesifik özelliklere sahip çeşitli bileşiklerin sürekli analizi,
- 5) Biomedikal alanda kullanımı (kontrollü ilaç salım sistemler biyosensörler gibi).

### 3.2. Enzim immobilizasyon yöntemleri

Enzim immobilizasyon yöntemleri çok farklı kaynaklarda değişik şekillerde sınıflandırılmalarına karşı kimyasal ve fiziksel olmak üzere iki ana başlık altında toplanabilir. Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Şekil 3.1. Enzim immobilizasyonunda kullanılan immobilizasyon yöntemleri



#### 1) Kimyasal yöntemler

##### a) Kovalent bağlama

##### b) Çapraz bağlama

#### 2) Fiziksel yöntemler

##### a) Adsorpsiyon ile immobilizasyon

##### b) Hapsetme ile immobilizasyon

-Mikrokapsül ile hapsetme yöntemi

-Kafes tipi hapsetme yöntemi

#### 3.2.1. Kimyasal metotlar

Kimyasal bağlama yönteminde suda çözünmeyen fonksiyonlu polimer ile enzim molekülü arasında kovalent bağ oluşumuna dayanır. Bu yöntemler çoğunlukla tersinmezdir yani serbest enzimin yeniden geri kazanılması mümkün değildir.

Kimyasal yöntemle immobilize edilen enzimin kimyasal ve fiziksel özellikleri değişebilir. Kararlılık ve dayanıklılık açısından pek çok üstünlük ortaya çıkarken kinetik özelliklerinde farklılıklar görülebilir.

Kimyasal yöntemle immobilize edilen enzimin, serbest haline göre farklı aktiviteye sahip olmasında, enzim ve destek maddesinden başka reaksiyon şartlarına da bağlıdır. Elde edilen enzim destek sistemi, serbest enzime göre daha düşük katalitik etkinlik gösterebilir. Bu durumun büyük molekül ağırlıklı substratların ve makro moleküllerin sterik etkisinden ileri geldiği öne sürülmüştür (3).

*a) Kovalent Bağlama:*

Kovalent bağlama, genellikle enzim yapısının ve fonksiyonel gruplarının bilindiği durumlarda kullanılır. Enzim immobilizasyonunda, enzimin özellikleri, aktif ucunun yapısı, pH, sıcaklık ve organik çözücüler gibi faktörlerden dolayı sınırlı sayıda yöntem kullanılabilir.

Kovalent bağlama ile immobilizasyon iki basamakta gerçekleşir. Birinci basamak destek maddesinin aktifleştirilmesi, ikinci basamak enzimin kovalent bağlanması şeklindedir. Destek maddesi; karboksil, hidroksil, amino gibi fonksiyonel gruplar taşımalıdır. Bu fonksiyonel grupların yapısına bağlı olarak epiklor hidrin, karbodiimide, gibi çeşitli aktifleyici maddeler kullanılabilir.

Kovalent bağlama yönteminin en büyük avantajı, bağların çok kuvvetli olması nedeniyle her türlü ortamda kullanılabilir. Enzim destek materyali üzerinde yer aldığından substrat ile teması kolaydır. Ayrıca enzim molekülü ve destek materyali birlikte genellikle ısıl kararlılık gösterirler. Yöntemin dezavantajı, destek materyali ile enzim arasında sıkı etkileşim enzimin doğal konformasyonunu bozar (17).

#### *b) apraz Bağlama:*

Küçük molekül   iki veya çok fonksiyonlu maddeler, enzim molek  leriyle aralarında bağlar yaparak suda çözünmeyen komplekslerin oluşmasını sağlarlar. Molekül içi bağlanmalar yanında molek  ler arası bağlanmalarda söz konusudur (38). Çapraz bağlanma ile enzimlerin immobilizasyonu çok basit olmasına rağmen enzimlerdeki özel fonksiyonel grupların çapraz bağlayıcı olarak kullanılabilmesi için gereken şartların seçimi ve oluşturulması zordur.

Enzim aktifliği; reaksiyon süresi, iyonik şiddet, pH, sıcaklık, çapraz bağlayıcı madde ve enzim konsantrasyonu gibi faktörler ve bunlar arasındaki dengeye bağlıdır. Bu yöntemin en önemli avantajı; tek bir işlemden enzimleri immobilize etmek için çok fonksiyonlu maddelerin kullanılabilmesidir. Yöntemin dezavantajı ise molek  ler arası çapraz bağlanma reaksiyonunun kontrol edilmesindeki g  kl klere bağlıdır. Çapraz bağlanma reaksiyonu çok ılımlı şartlarda gerçekleşmediğinden bazı durumlarda önemli ölçüde aktivite kaybı söz konusudur.

#### **3.2.2. Fiziksel metotlar**

Fiziksel yöntemler kovalent bağ oluşmasına dayanmayan, enzimin belirli bir yere tutturulmasını içerir. Enzim immobilizasyonu elektrostatik etkile me, iyonik bağ oluşumu, enzimler arası etkile me gibi belirli fiziksel kuvvetlere bağlı kalmaktadır. Immobilizasyon, enzimin destek maddesindeki mikro bölmeler içerisinde veya gözenekli membranlara tutturulmasıyla sağlanır. Bu yöntemin kovalent bağlama ve çapraz bağlama ile immobilizasyondan ayrılan en önemli özelliği enzim molek  l n n kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır.

*a) Adsorpsiyon ile immobilizasyon:*

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

Bu yöntem, suda çözünmeyen katı matriksin (adsorban) enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının yıkanarak uzaklaştırılması temeline dayanır. Fiziksel adsorpsiyonda immobilizasyondan sorumlu kuvvetler; hidrojen bağları, van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik etkileşimlerdir (10). İyonik bağlanma ile immobilizasyon proteinin yüklü grupları ile destek materyalinin karşıt yükleri arasındaki çekim kuvvetlerine dayanır. Enzim ile adsorban (destek maddesi) arasındaki zayıf bağlardan dolayı adsorplanan enzimin kullanım esnasında taşıyıcıdan uzaklaşması bir dezavantajdır. Bu yöntemde enzim aktifliğini büyük ölçüde korur. Adsorpsiyon ile immobilizasyonun tersinir olması bu destek maddesinin ve enzimin başka amaçlar için tekrar kullanımını sağlar.

*b) Hapsetme İle Immobilizasyon:*

Bu metot polimerik matriks yapısında veya yarı geçirgen membranlarda enzimin hapsedilmesine dayanır. Polimerik matriks yapısının, substrat ve ürünün difüzyonuna izin verirken proteinin difüzyonunu engellemesi için yeterli derecede sıkı olması gerekir. Bu metot her çeşit enzimi, diğer biyokatalizörleri, bütün hücreleri veya farklı çaptaki mikroorganizmaları hapsetmek için çok genel kullanılabilir (43). Bu yöntemi, kovalent bağlama ve çapraz bağlama ile immobilizasyondan ayıran en önemli özellik enzim molekülünün fiziksel ve kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır. Hapsetme metodu mikrokapsül ve kafes tipi olmak üzere iki gruba ayrılır.

### Mikrokapsül ile hapsetme metodu

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

Yarı geçirgen mikrokapsüllerin hazırlanmasında iki genel metot uygulanmaktadır. Bunlardan birincisi koagülasyona dayalı olup kimyasal bir reaksiyon içermeyen basit bir yöntemdir. Faz ayrımı polimerizasyonu diye adlandırılır. Çözücü içinde enzim ve membran maddesi çözülür ve bu çözelti, mikro damlacıklar halinde çöktürücü maddeye ilave edilir. (8, 9). Tekniğin spesifik olmayışı ve basitliğinden dolayı bu yöntem bütün enzimlere uygulanabilmektedir.

Diğer mikrokapsülleme metodu, kimyasal özellik taşıyan ara yüzey polimerizasyon metodudur. Bu metot da çöktürücü madde içinde enzim çözeltisinin mikro damlacıkları hazırlanır. İki sıvının birleşme noktalarında polimerleşme görülür. Yarı geçirgen mikrokapsül membranı iyi bilinen poliamid sistemi ile yapılır ve çok çeşitli diaminlerle, diasit halojenürleri kullanılarak amid kopolimerleri elde edilir (8). Bu yarı geçirgen mikro kapsül membranın gözenek çapları; substrat moleküllerinin kapsül içine girişine ve ürün moleküllerinin dışarı çıkışına olanak verecek büyüklükte olmalıdır.

Mikrokapsülleme ile hapsetme yönteminde herhangi bir modifikasyon olmadığından enzim aktivitesi serbest enzim aktivitesine çok yakındır. Bu yöntemin dezavantajları; mikrokapsül oluşumu sırasında yüksek protein konsantrasyonuna gerek olması ve yüksek molekül ağırlıklı substrat ve ürünler için sınırlı olmasıdır.

### Kafes tipi hapsetme metodu

Bu yöntem; yüksek derecede çapraz bağlı bir polimerin enzim çözeltisi içinde oluşturulması temeline dayanır. Bu amaçla en çok kullanılan polimer N,N'-metilenbisakrilamid ile çapraz bağlanmış poliakrilamiddir.

Polimerleşme sonucu enzim molekülleri çapraz bağları arasında tutuklanmakta ve böylece çözeltiye geçmeleri engellenmektedir. Kafes tipi immobilizasyonda; çapraz bağ yüzdesi öyle ayarlanmalıdır ki, enzim molekülleri tutuklanabilsin ama substrat moleküllerinin enzim moleküllerine ulaşmasına engel olmasın. Çapraz bağ yüzdesinin aşırı olması substratın enzim aktif merkezlerine ulaşmasını engellemekle kalmayıp enzimin zincir yapısını da zorlayıp aktivite kaybına neden olabilir. Bu oran enzime ve taşıyıcıya bağlı olarak değişir. Bu yöntemle immobilize edilecek enzimin substratının küçük molekül olması gerekir (11).

Bu yöntemin avantajları:

- Çok kolay kullanılabilir olması,
- Gerçek bir fiziksel yöntem olması,
- Çok az miktar enzim ile gerçekleşmesi,
- Çapraz bağ oluşumunda kullanılan gama ve UV ışınları enzim yapısını ve aktifliğini kimyasal proseslerden daha az etkilemesi,
- Ortamdaki çapraz bağlayıcı ve monomer derişimini değiştirmek suretiyle farklı büyüklükte gözenek içeren polimerik kafes üretebilmesi,
- Polimerleşmenin genelde hem kolay hem de hızlı bir şekilde gerçekleşmesidir (4).

Yöntemin dezavantajları ise; immobilizasyon işleminde, jel oluşumu sırasında yürüyebilecek kimyasal olayların ve reaksiyon sıcaklığının enzimi inaktif hale getirmesi olasılığının bulunmasıdır. Ayrıca çapraz bağlı polimerin ağ örgüsünden enzimin sızma ihtimali de vardır.

Enzimlerin immobilize edilmesinin en önemli avantajları Çizelge 3.3’de özetlenmiştir.

Çizelge 3.2. Serbest ve immobilize enzim özelliklerinin karşılaştırılması

| Serbest enzim                                               | İmmobilize enzim                                                         |
|-------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| 1. Reaksiyon sonunda ortamdan uzaklaştırılması güçtür.      | 1. Süzme, santrifüjleme gibi basit yöntemlerle ortamdan kolayca ayrılır. |
| 2. Ürünlerde azda olsa kirlilik yapar.                      | 2. Tamamen ayrıldığından ürünlerde kirlilik söz konusu olmaz.            |
| 2. Çevre koşullarından daha kolay etkilenirler.             | 3. Çevre koşullarına daha dayanıklıdır.                                  |
| 4. Her örnek bir kere ve kısa süre kullanılır.              | 4. Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir                                |
| 5. Kararsız ve dayanıksızdır.                               | 5. Daha dayanıklı ve kararlıdır.                                         |
| 6. Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlarda kullanılmaz. | 6. Çok adımlı reaksiyonlara uygundur.                                    |
| 7. Aktivitesini çabuk kaybeder.                             | 7. Basit immobilizasyon yöntemleri aktiviteyi artırır.                   |
| 8. Kendi kendini parçalayabilir.                            | 8. Kendi kendini parçalama minimuma indirgenir.                          |

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

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

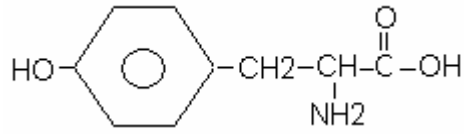
Enzimlerin immobilizasyonu sırasında aktif gruplar korunmalı ve enzim aktifliğini yitirmemelidir.

## 4. DENEYSEL KISIM

### 4.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

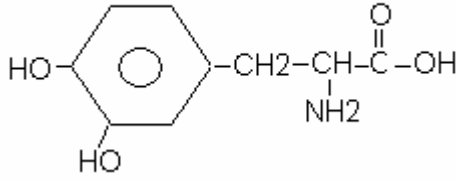
Tirosinaz (Mantar kaynaklı polifenol oksidaz E.C.1.14.18.1),

- L-Tirosin,



Molekül Kütlesi :181 g/mol

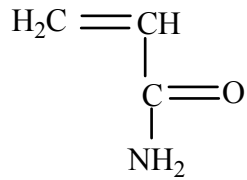
- L-DOPA,



Molekül Kütlesi :198 g/mol

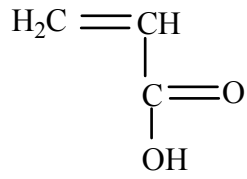
Tirosinaz, L- Tirosin ve L-DOPA Sigma (Almanya) firmasından temin edildi.

- Akrlamit (AAm),



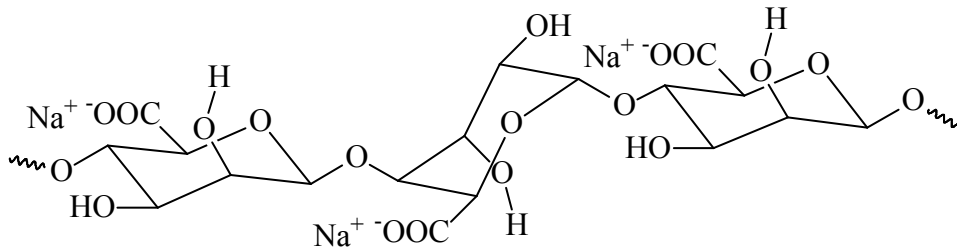
Molekül Kütlesi :198 g/mol

- Akrilik asit (AA),

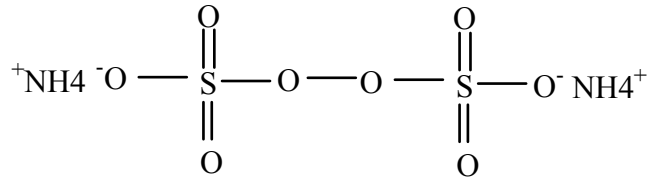


Molekül Kütlesi :100 g/mol

- Na-aljinat,



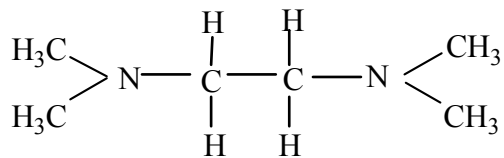
- Amonyum persülfat (APS),



Molekül Kütlesi :228 g/mol

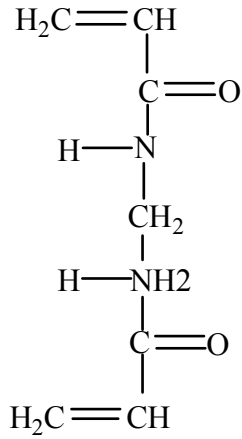
Yoğunluğu :1,98 g/mol

- *N, N, N', N'*-tetrametil etilendiamin (TEMED),



Molekül Kütlesi :116,2 g/mol

- *N,N'*-metilen-bis-akrilamid (MBAAm),



Molekül Kütlesi : 156 g/mol

- Amonyum dimolibdat:  $(\text{NH}_4)_2\text{Mo}_2\text{O}_7$ , M.A: 339,88 g/mol
- Asetik asit:  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , M.A: 60 g/mol
- Fosforik asit:  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , M.A: 97,99 g/mol
- Borik asit:  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , M.A: 61,83
- Hidroklorik asit:  $\text{HCl}$ , M.A: 36,5 g/mol
- Sodyum hidroksit:  $\text{NaOH}$ , M.A: 40 g/mol
- Askorbik asit:  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ , M.A: 176,13 g/mol
- Sodyum nitrit:  $\text{NaNO}_2$ , M.A: 69 g/mol
- Kalsiyum klorür:  $\text{CaCl}_2$ , M.A: 111 g/mol
- Epikolorhidrin:  $\text{C}_3\text{H}_5\text{ClO}$ , M.A: 92,53 g/mol

Merck (Almanya) firmasından temin edildi.

#### 4.2. Kullanılan Aletler

Spektrofotometre : UNICAM UV/Vis Spektrofotometre UV2

pH : Orion pH metre 420 A

Çalkalamalı su banyosu : ST 402 NÜVE marka sıcaklık kontrollü su banyosu

#### 4.3. Kullanılan çözeltiler

1. HCl çözeltisi: 2M 100mL HCl çözeltisi 2,28 mL %37'lik HCl ( $d=1,18\text{g/L}$ ) alındı hacmi saf su ile 100 mL' ye tamamlandı.
2. NaOH çözeltisi: 2M 50mL NaOH çözeltisi hazırlamak için 3,84 g NaOH bir miktar suda çözüldükten sonra hacmi saf su ile 50 mL' ye tamamlandı.
3. Askorbik asit çözeltisi: 2,5 mM 50mL askorbik asit çözeltisi hazırlamak için 0,0219 g askorbik asit ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ) bir miktar suda çözüldükten sonra hacmi saf su ile 50 mL' ye tamamlandı.
4. Sodyum nitrit çözeltisi : %15 (w/v) 50 mL  $\text{NaNO}_2$  çözeltisi hazırlamak için 7,5g  $\text{NaNO}_2$  bir miktar suda çözüldükten sonra hacmi saf su ile 50 mL' ye tamamlandı.
5. BRT tamponu çözeltisi: 2,3 mL asetik asit, 2,7 mL fosforik asit, 2,5 g borik asit bir miktar suda çözüldükten sonra hacmi saf su ile 50 mL' ye tamamlandı.
6. L-Tirosin substrat çözeltisi: 2,5 mM 25 mL L-Tirosin çözeltisi hazırlamak için 0,0113 g L-Tirosin bir miktar BR tamponunda çözüldükten sonra hacmi tampon çözeltisi ile 50 mL' ye tamamlandı.
7. Enzim çözeltisi: 0,002 g tirosinaz enzimi bir miktar BR tamponunda çözüldükten sonra hacmi tampon çözeltisiyle 25 mL' ye tamamlandı.
8. Kalsiyum klorür çözeltisi: 0,3 M 500 mL  $\text{CaCl}_2$  çözeltisi hazırlamak için 16,65 g  $\text{CaCl}_2$  bir miktar suda çözüldükten sonra hacmi saf su ile 500 mL' ye tamamlandı.

9. Amonyum dimolibdat çözeltisi: %15 (w/v) 50 mL amonyum dimolibdat çözeltisi hazırlamak için 6,375g amonyum dimolibdat 5,1mL derişik  $\text{NH}_3$  çözüldükten sonra hacmi saf su ile 50 mL' ye tamamlandı.

#### **4.4. Ca-aljinat Kullanılarak Enzim İmmobilizasyonu**

1 g Na-aljinat üzerine 95 mL saf su ilave edildikten sonra bir saat magnetik karıştırıcı üzerinde karıştırılarak homojen bir karışım elde edildi. Bu homojen karışım içerisine 5 mL ( 2 mg/25mL ) enzim çözeltisini ilave edildikten sonra 0,3 M'lık  $\text{CaCl}_2$  çözeltisi içerisine 5 mL'lik pipet ile Na-aljinat enzim çözeltisi damlatılarak enzimin immobilize edildiği Ca-aljinat kürele

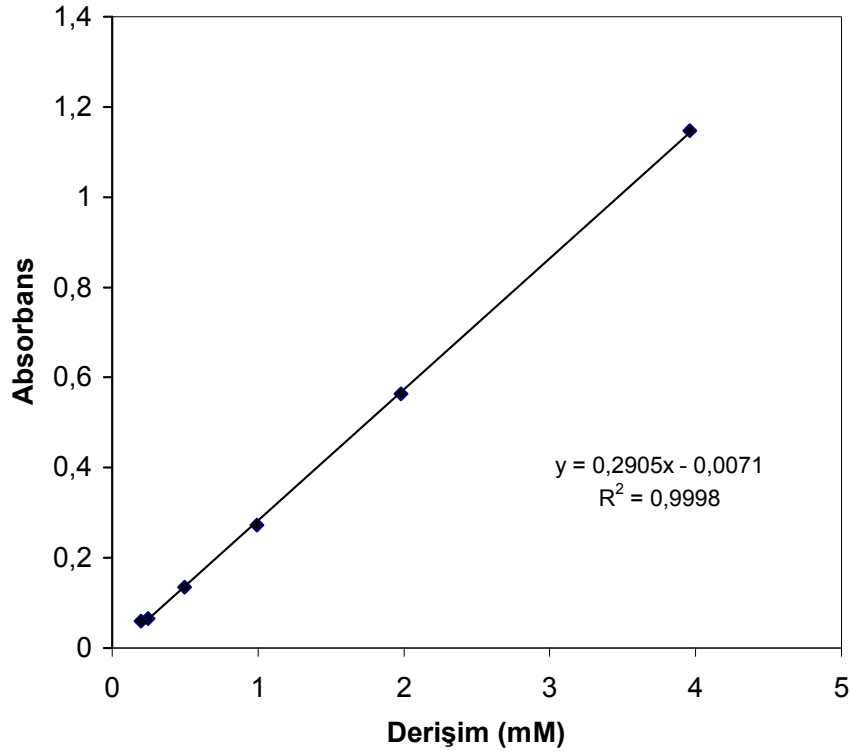
ri elde edildi. Elde edilen aljinat küreleri saf su ile 3 kez yıkandıktan sonra Ca-aljinat küreleri 0,03 M'lık  $\text{CaCl}_2$  çözeltisi içerisinde 24 saat buzdolabında bekletildi. Ca-aljinat küreleri epiklorhidrin ile 40  $^{\circ}\text{C}$  'de 12 saat magnetik karıştırıcı üzerinde aktifleştirildi. Epiklorhidrin ortamdan uzaklaştırıldı ve saf su ile 3 kez yıkandıktan sonra ortama 100 mL (8 mg) enzim çözeltisi ilave edildi. 35  $^{\circ}\text{C}$ 'a 12 saat magnetik karıştırıcı üzerinde immobilizasyon işlemi gerçekleştirildi. İmmobilize enzim kullanılmak üzere buzdolabında (4  $^{\circ}\text{C}$ ) saklandı.

#### **4.5. P(AAm-ko-AA) Kullanılarak Enzim İmmobilizasyonu**

20 mL su üzerine 2,85 g P(AAm-ko-AA), 2 mL akrilik asit, 0.15 g bisakrilamid, 10 mg amonyum persülfat ilave edildikten sonra çözünene kadar magnetik karıştırıcı üzerinde karıştırılarak homojen bir karışım elde edildi. Bu homojen karışım içerisine 5 mL ( 2 mg/25mL ) enzim çözeltisini ilave edildikten sonra petri kabına döküldü. Daha sonra petri kabı buzla dolu bir kap içerisine yerleştirilip üzerine 1mL TEMED ilave edildi. Polimerizasyon gerçekleştirildikten sonra küp (5x5x5) mm boyutunda kesildi. P(AAm-ko-AA) epiklorhidrin (ECH) ile 40  $^{\circ}\text{C}$  'de 12 saat magnetik karıştırıcı üzerinde aktifleştirildi. Epiklorhidrin ortamdan uzaklaştırıldı ve saf su ile 3 kez yıkandıktan sonra ortama (8 g/100 mL) enzim çözeltisi ilave edildi. 35  $^{\circ}\text{C}$ 'a 12 saat magnetik karıştırıcı üzerinde immobilizasyon işlemi gerçekleştirildi. İmmobilize enzim kullanılmak üzere buzdolabında (4  $^{\circ}\text{C}$ ) saklandı.

#### 4.6. L-DOPA Kalibrasyon Grafiği

1 g L-DOPA 25mL 5M'lık HCl çözeltilisinde çözüldü. Bu çözeltiliden seyreltilerek çeşitli konsantrasyonlarda ( $3,96 \times 10^{-1}$  mM –  $1,24 \times 10^{-5}$  mM) L-DOPA çözeltileri hazırlandı ve kalibrasyon grafiği çizildi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. L-DOPA kalibrasyon grafiği

#### 4.7. Tirosinazın Aktivlik Tayini

##### 4.7.1. Serbest tirosinazın aktivlik tayini

Tirosinaz aktivliğini ölçmek amacıyla Munjal ve Sawhney tarafından önerilen yöntem kullanıldı (25). Bunun için reaksiyon balonuna 8 mL BR tamponu (pH 7), 5mL (2,5

mM) L-Tirosin, 5mL (2,5 mM) askorbik asit konu ve 40 °C’de 10 dakika su banyosunda çalkalandı. Su banyosundan alınıp balon içerisine 2 mL (2,5 mM) tirosinaz enzimi ilave edilerek tekrar çalkalamalı su banyosunda çalkalandı ve bu sıcaklıkta 10 dakika bekletildi. Su banyosundan çıkartılan bu çözeltiye 1 mL (2 M) HCl, 1 mL (2 M) NaOH, 1 mL %15 (w/v) amonyum dimolibdat, 1 mL % 15 (w/v) sodyum nitrit ilave edilerek 1 saat bekletildikten sonra oluşan sarı renkli L-DOPA ‘nın UV spektrofotmetre yardımıyla 460 nm dalga boyunda absorbansı okundu.

#### **4.7.2. İmmobilize tirosinazın aktiflik tayini**

Ca-aljinat ve P(AAm-ko-AA) kullanılarak immobilize edilen tirosinazın aktifliği Kısım 4.7.1.belirtilen metoda göre gerçekleştirildi.

### **4.8. Aktifliğe pH’nın Etkisi**

#### **4.8.1. Serbest tirosinazın aktifliğine pH’nın etkisi**

Serbest tirosinazın aktifliğine pH etkisini araştırmak amacıyla çeşitli pH’lar da (4,0 - 8,0) BR tamponu ile hazırlanan L-Tirosin (5 mL, 2,5 mM) özeltileri kullanıldı. Kısım 4.7.1 ‘de belirtilen yöntemle aktiflikler tayin edildi.

#### **4.8.2. İmmobilize tirosinazın aktifliğine pH’nın etkisi**

Ca-aljinat ve P(AAm-ko-AA) kullanılarak immobilize edilen tirosinazın aktifliğine pH’nın etkisini incelemek amacıyla çeşitli pH’larda (4,0 - 8,0) Kısım 4.7.1 ‘de belirtilen yöntemle aktiflikler tayin edildi.

#### **4.9. Aktifliğe Sıcaklığın Etkisi**

##### **4.9.1. Serbest tirosinazın aktifliğine sıcaklığın etkisi**

Serbest tirosinazın aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla çeşitli sıcaklıklarda (20 - 55 °C) Kısım 4.7.1 'de belirtilen yöntemle aktiflikler tayin edildi.

##### **4.9.2. İmmobilize tirosinazın aktifliğine sıcaklığın etkisi**

Ca- aljinat ve P(AAm-ko-AA) kullanılarak immobilize edilen tirosinazın aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla çeşitli sıcaklıklarda (20 - 55 °C) Kısım 4.7.1 'de belirtilen yöntemle aktiflikler tayin edildi.

#### **4.10. Aktifliğe Substrat Derişiminin Etkisi**

##### **4.10.1. Serbest tirosinazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi**

Serbest tirosinazın aktifliğine substrat derişiminin incelemek amacıyla çeşitli derişimlerde (0,75 – 2 mM) hazırlanan substrat çözeltileriyle Kısım 4.7.1 'de belirtilen yöntemle aktiflikler tayin edildi.

##### **4.10.2. İmmobilize tirosinazın aktifliğine substrat derişiminin etkisi**

Ca-aljinat ve P(AAm-ko-AA) kullanılarak immobilize edilen tirosinazın aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek amacıyla çeşitli derişimlerde (0,75 – 2 mM) hazırlanan substrat çözeltileriyle Kısım 4.7.1 'de belirtilen yöntemle aktiflikler tayin edildi.

#### **4.11. Depolanma Kararlılığı**

##### **4.11.1. Serbest tirosinazın depolanma kararlılığı**

Serbest tirosinazın depolanma kararlılığını incelemek amacı ile BR tamponunda (pH:7) hazırlanan enzim çözeltisi 4°C de saklandı. Belirli aralıklarda enzim çözeltisinden alınan örneklerle Kısım 4.7.1 'de belirtilen yöntemle aktiflikler tayin edildi.

##### **4.11.2. İmmobilize tirosinazın depolanma kararlılığı**

Ca-aljinat ve P(AAm-ko-AA) kullanılarak immobilize edilen tirosinazın depolanma kararlılığını incelemek amacıyla buzdolabında 4°C de saklanan kürelerden belirli aralıklarla alınan örnekler kullanılarak Kısım 4.7.1 'de belirtilen yöntemle aktiflikler tayin edildi.

#### **4.12. Termal İnaktivasyon**

##### **4.12.1 Serbest tirosinazın termal inaktivasyonu**

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

##### **4.12.2. İmmobilize tirosinazın termal inaktivasyonu**

Ca-aljinat ve P(AAm-ko-AA) kullanılarak immobilize edilen tirosinazın termal inaktivasyonunu incelemek amacı ile farklı sıcaklıklarda ve farklı zaman aralıklarında (45 - 65 °C ve 10; 30; 60 dakika) inkübe edilen enzim çözeltilerinin aktiflikleri Kısım 4.7.1 'de belirtilen yöntemle aktiflikler tayin edildi.

#### **4.13. İmmobilize Tirosinazın Tekrar Kullanım Sayısı**

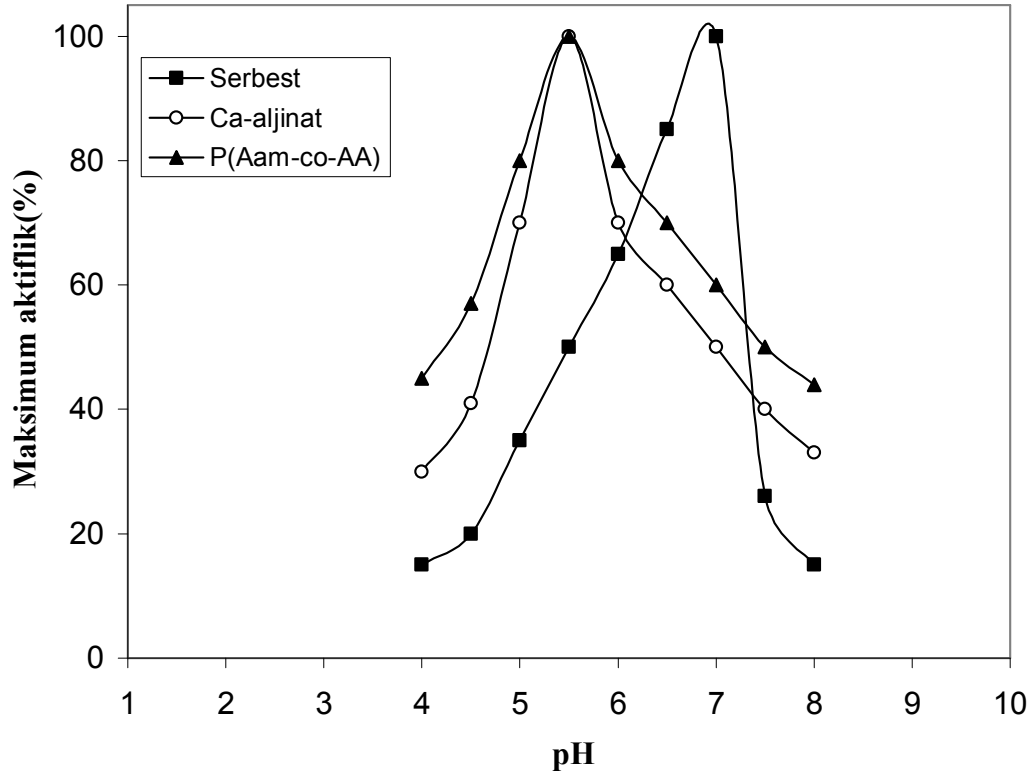
Ca-aljinat ve P(AAm-ko-AA) kullanılarak immobilize edilen tirosinazın tekrar kullanım sayısını ölçmek amacı ile Ca-aljinat 15 kez, P(AAm-ko-AA) 31 kez 60 dakika kullanılarak Kısım 4.7.1 'de belirtilen yöntemle aktiflikler tayin edildi.

## 5. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Çalışmamızda öncelikle tirozinazın aktifliğine etki eden pH, sıcaklık gibi çeşitli parametreler incelendikten sonra hapsetme ve kovalent bağlanma yöntemleri kullanılarak Ca-aljinat ve P(AAm-ko-AA) polimerler üzerinde enzim immobilizasyonunu gerçekleştirildi. İmmobilize enzim üzerine etki eden çeşitli parametreler incelenerek serbest enzimin aktifliği ile karşılaştırıldı.

### 5.1. Serbest ve İmmobilize Tirozinazın Aktifliğine pH'nın Etkisi

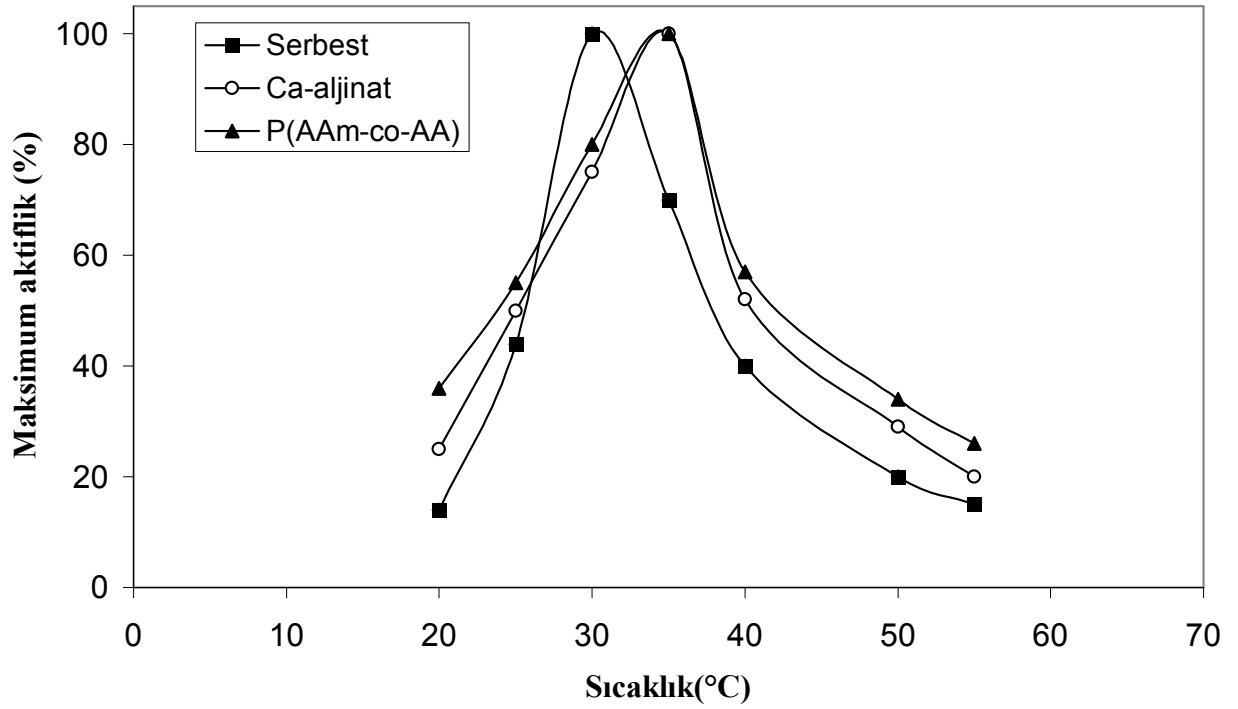
Serbest, Ca-aljinat ve P(AAm-ko-AA) kullanılarak immobilize edilen tirozinazın aktifliğine pH'nın etkisini incelemek amacıyla, çeşitli pH'lar da gerçekleştirilen reaksiyonlara ait maksimum aktiflik değerleri Şekil 5.1'de verilmiştir. Serbest tirozinaz için optimum pH 7, Ca-aljinat ve P(AAm-ko-AA) kullanılarak immobilize edilen tirozinazın optimum pH 5,5 olarak bulunmuştur. Yapılan bir çalışmada serbest tirozinaz için pH 6,5 iken poli(metil metakrilat-gliseril metakrilat-divinil benzen) destek maddesi üzerine tirozinaz enzimi immobilize edildiğinde ise pH 7 olarak gözlenmiştir (21). Başka bir çalışmada da serbest tirozinaz için pH 6,5, tirozinaz enzimi poli(2-hidroksi etil metakrilat-ko-gliseril metakrilat) destek maddesi üzerine poli etilen imin ile kovalent bağlanarak immobilize edildiğinde pH 7 olarak gözlenmiştir (23). Diğer çalışmalarda ise serbest tirozinaz için pH 6 iken mantar kaynaklı tirozinaz enzimi selüloz destek maddesi üzerine immobilize edildiğinde pH 5,5-6 arasında gözlenmiştir (1). Tirozinaz enzimi Cu-aljinat, poliakrilamit ve jelatin jelleri üzerine hapsetme yöntemi ile immobilize edildiğinde pH 6-8 arasında iken serbest tirozinaz enzimi için pH 7 olarak gözlenmiştir (25). Enzimler elektrolit karakterli oldukları için, enzim aktifliği pH ile değişme gösterir. Çok asidik veya çok bazik ortamlarda enzim denatüre olacağından reaksiyon hızı tersinmez olarak azalır ve sıfıra kadar düşebilir. Şekil 5.1'de de görüldüğü gibi immobilize tirozinazın aktifliğinin bazik bölgelere kaydıka azaldığı gözlenmiştir.



Şekil 5.1. Serbest ve immobilize tirosinazın maksimum aktifliğinin pH ile değişimi

## 5.2. Serbest ve İmmobilize Tirosinazın Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi

Serbest, Ca-aljinat ve P(AAm-ko-AA) kullanılarak immobilize edilen tirosinazın aktifliğine sıcaklığın (15 –60 °C) etkisini incelemek amacıyla çeşitli sıcaklıklarda gerçekleştirilen reaksiyonlara ait maksimum aktiflik değerleri Şekil 5.2’de verilmiştir. Serbest enzim için optimum sıcaklık 30°C iken immobilize enzim için 35°C olarak bulunmuştur. Sıcaklığın artmasıyla moleküllerin kinetik enerjilerinin arttığı ve böylece tüm kimyasal ve biyokimyasal reaksiyon hızlarının da arttığı bilinmektedir. Sıcaklığın 10 °C artmasıyla, reaksiyon hızlarında yaklaşık olarak iki kat artar. Biyokimyasal reaksiyonlarda da aynı durum gözlenmektedir. Serbest tirosinaz üzerine yapılan çalışmalarda maksimum aktiflik 20 -30 °C, immobilize tirosinaz için ise 30 -40 °C olarak bulunmuştur (1, 21, 23, 25).



Şekil 5.2. Serbest ve immobilize enzimin maksimum aktifliğinin sıcaklıkla değişimi

Enzim ile polimerik destek arasında önce hapsetme sonra kovalent bağların oluşması sonucunda optimum sıcaklıkta bir artış gözlenebilir. Dolayısıyla enzim katalitik aktifliğini gösterebilmek için daha büyük aktifleşme enerjisine sahip olabilir. Şekil 5.1’de de görüldüğü gibi immobilize tirozinaz için optimum sıcaklık değerlerinin daha yüksek sıcaklığa kaydığı gözlenmiştir.

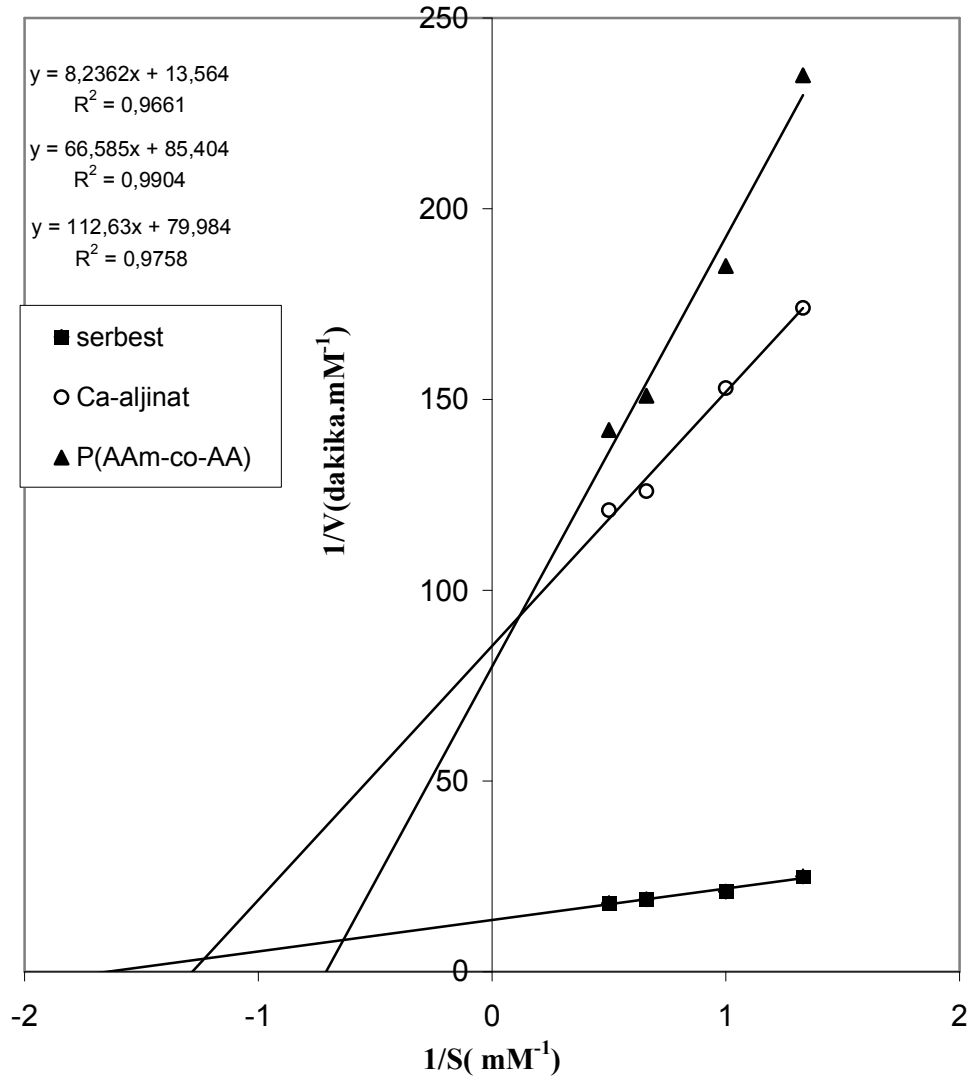
### 5.3 Serbest ve İmmobilize Tirozinazın Aktifliğine Substrat Derişiminin Etkisi

Serbest, Ca-aljinat ve P(AAm-ko-AA) kullanılarak immobilize edilen tirozinazın aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek amacıyla çeşitli substrat derişimlerinde (0,75mM – 2mM) gerçekleştirilen reaksiyonlar ve kalibrasyon grafiği yardımıyla elde edilen hızların tersi substrat derişiminin tersine karşı grafiğe geçirilmek suretiyle Lineweaver- Burk grafiği çizildi. Serbest enzim için  $K_m$  0,61 mM,  $V_{maks}$  0,07 mM.dakika<sup>-1</sup>; Ca-aljinat ile immobilize edilen enzim  $K_m$  0,78 mM,  $V_{maks}$  0,01 mM.dakika<sup>-1</sup> iken P(AAm-ko-AA) ile immobilize edilen enzim  $K_m$  1,41 mM,

$V_{maks}$  0,01 mM.dakika<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur. Ca-aljinat ve P(AAm-ko-AA) kullanılarak immobilize edilen enzimin  $K_m$  değeriindeki artış destek, enzim ve substrat arasındaki etkileşim, enzimdeki yapısal değişimler ve difüzyonel sınırlamalar nedeniyle yaklaşık 7-9 kat bir artış gözlenmiştir.

İmmobilizasyonla enzimlerin  $K_m$  değerlerinde bir artma gözlemlendiği literatürlerde verilmiştir. Yapılan bir çalışmada serbest ve immobilize tirozinaz için  $K_m$  0,65 mM;  $V_{maks}$  1890 U/mg enzim, immobilize tirozinaz enziminin  $K_m$  0,87 mM;  $V_{maks}$  760 U/mg enzim olarak bulunmuştur (22). Başka bir çalışmada da serbest enzimin  $K_m$  0,58 mM;  $V_{maks}$  2065 U/mg enzim, farklı destek maddeleri üzerine immobilize edilen tirozinazın  $K_m$  1,44 mM ve 0,97 mM;  $V_{maks}$  1055 U/mg enzim ve 1404 U/mg enzim olarak bulunmuştur (21).

Substrat olarak *p*-kresol ve fenol kullanıldığında  $K_m$  değerleri 1,22 mM ve 5,42 mM bulunmuştur (14).

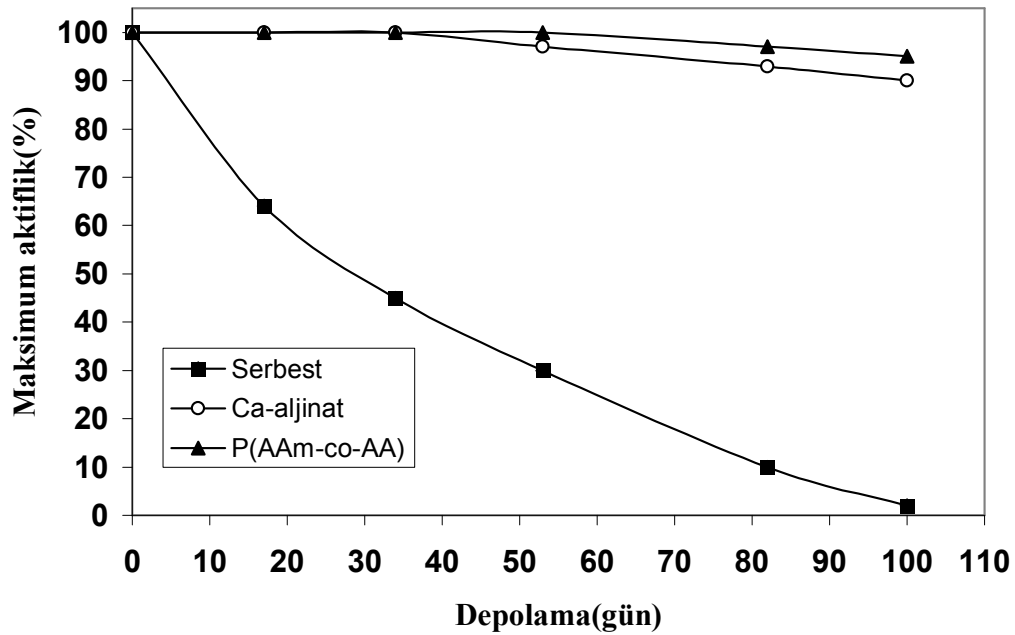


Şekil 5.3. Serbest ve immobilize enzimin aktifliğinin substrat derişimi ile değışimi

#### 5.4. Serbest ve İmmobilize Tirosinazın Aktifliğine Depolanma Süresinin Etkisi

Serbest, Ca-aljinate ve P(AAm-ko-AA) kullanılarak immobilize edilen tirosinazın aktifliğine depolanma süresinin etkisini incelemek için çözeltiler 4°C’de buzdolabında saklandı. 100 gün sonunda serbest enzim aktifliğinin %98’ini kaybederken, Ca-aljinate ile immobilize edilen enzim %90, P(AAm-ko-AA) ile immobilize edilen enzim %95 aktifliğini koruduğu görülmüştür (Şekil 5.4). Tirosinaz  $\text{Al}_2\text{O}_3$  sol-jel üzerine immobilize edildiğinde 2. ayın sonunda aktifliğinde yaklaşık %20 bir azalma

gösterdiği belirtilmiştir (37). Tirosinaz enzimi, Poli(2-hidroksi etil metakrilat-co-glisil metakrilat) destek maddesi üzerine poli etilen imin ile kovalent bağlanarak immobilize edildiğinde ise 5 günün sonunda %82, 3 ayın sonunda aktifliğinin %46'sının koruduğu bildirilmiştir (23). Bu bilim adamlarının bir başka çalışmasında da poli(metil metakrilat-glisil metakrilat-divinil benzen) destek maddesi üzerine tirosinaz enzimi immobilize edildiğinde serbest enzim dört hafta sonunda daha düşük aktiflik gösterirken immobilize enzim ise iki ay sonunda aktifliğinin %36'sını koruduğu bildirilmiştir (21). Yapılan diğer çalışmalarda ise Citosan kullanılarak immobilize edilen tirosinaz enziminin 70 gün sonunda aktifliğinin %75'ni koruduğu bildirilmiştir (16). Gözenekli cam boncuklar üzerinde (amino[fenil]trimetoksisilan)-diazot kullanılarak kovalent bağlama yöntemi ile immobilize edilen enzim 3 ayın sonunda aktifliğinin %83'nü koruduğu bildirilmiştir (39).



Şekil 5.4. Serbest ve immobilize enzimin aktifliğinin depolanma süresiyle değişimi

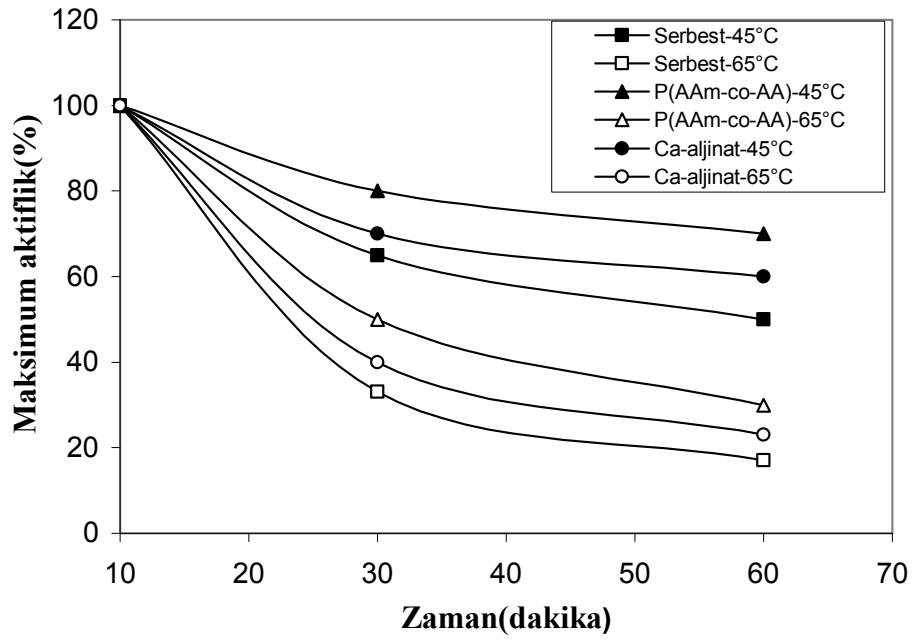
### 5.5. Serbest ve İmmobilize Tirosinazın Termal Kararlılığı

Serbest, Ca-aljinat ve P(AAm-ko-AA) kullanılarak immobilize edilen tirosinazın maksimum aktifliğinin zamanla değişiminin etkisini incelemek amacıyla değişik sıcaklıklarda ve değişik zaman aralıklarında kullanılan enzim çözeltileri Kısım 4.7.1 'de belirtilen yöntemle aktiflikleri tayin edildi. (Şekil 5.5). Serbest tirosinaz 45 °C 60 dakikada inkübe edildiğinde yaklaşık %50'sini, Ca-aljinat kullanılarak immobilize edilen tirosinaz %60, P(AAm-ko-AA) kullanılarak immobilize edilen tirosinaz yaklaşık %70, aktifliğini koruduğu gözlemlendi. Serbest tirosinaz 65 °C 60 dakikada inkübe edildiğinde yaklaşık %17, Ca-aljinat kullanılarak immobilize edilen enzimin %23, P(AAm-ko-AA) kullanılarak immobilize edilen enzimin yaklaşık %30 aktifliğini koruduğu gözlemlenmiştir. Yapılan bir çalışmada 50 °C 120 dakikada serbest tirosinaz %45'lik aktiflik gösterirken, tirosinaz enzimi poli(2-hidroksi etil metakrilat-ko-glisil metakrilat) destek maddesi üzerine poli etilen imin ile kovalent bağlanarak immobilize edildiğinde %86 'lık aktiflik göstermiştir. Sıcaklık 60 °C olduğunda ise serbest enzimin aktifliği immobilize enzime göre daha hızlı bir düşüş göstermiştir (23). Yapılan bir başka çalışmada ise 50 °C 120 dakikada serbest ve immobilize enzim %44 ve %79'luk bir aktivite gösterirken, sıcaklık 55 °C olduğunda immobilize enzimin aktivitesinde bir düşüş gözlemlenmiştir (22).

Enzimler, sıcaklık ve süre arttıkça konformasyon değişimine uğrarlar ve buna bağlı olarak aktifliklerinde azalma ve tümüyle yok olma gözlemlenebilir. Şekil 5.5'de görüldüğü gibi immobilize enzimler serbest enzim daha yavaş inaktive olmuştur. Çizelge 5.1 de ise sıcaklık arttıkça ki değerlerinin arttığı, yarılanma süresinin, kısaldığı, aktifleşme enerjisinin ise azaldığı gözlemlenmiştir. Ayrıca immobilize enzimlerin ki değerleri serbest enzime göre daha yüksektir. Benzer şekilde immobilize enzimlerin  $t_{1/2}$  değerleri serbest enzime göre daha düşük olduğu gözlemlenmiştir.

Çizelge 5.1. Serbest ve immobilize tirosinazın termal kararlılığı

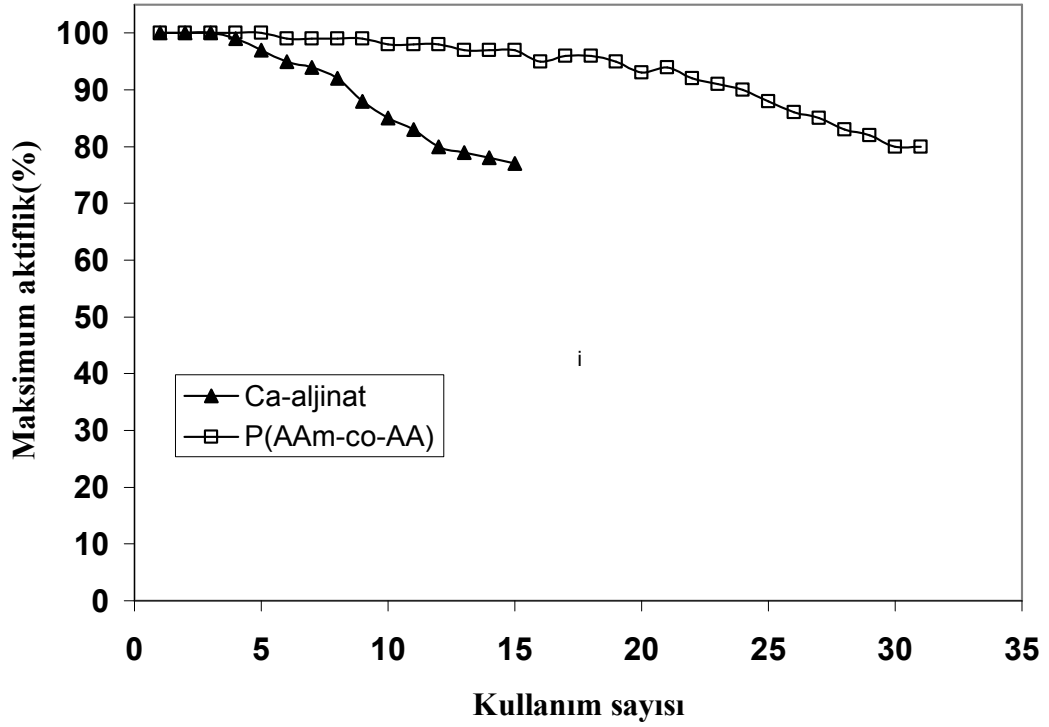
|               | 45 °C                | 55 °C                | 60 °C                | 65 °C                | 45 °C            | 55 °C            | 60 °C            | 65 °C            |
|---------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|               | ki                   | ki                   | ki                   | ki                   | t <sub>1/2</sub> | t <sub>1/2</sub> | t <sub>1/2</sub> | t <sub>1/2</sub> |
|               | (dak <sup>-1</sup> ) | (dak <sup>-1</sup> ) | (dak <sup>-1</sup> ) | (dak <sup>-1</sup> ) | (dak)            | (dak)            | (dak)            | (dak)            |
| Serbest enzim | 0,42                 | 0,62                 | 0,66                 | 0,72                 | 1,67             | 1,12             | 1,06             | 0,96             |
| Ca-aljinat    | 0,72                 | 0,72                 | 0,74                 | 0,79                 | 0,97             | 0,96             | 0,94             | 0,87             |
| P(AAm-ko-AA)  | 0,70                 | 0,72                 | 0,74                 | 0,79                 | 0,99             | 0,96             | 0,94             | 0,87             |



Şekil 5.5. Serbest ve immobilize tirosinazın maksimum aktifliğinin zamanla değişimi

## 5.6. İmmobilize Tirosinazın Tekrar Kullanım Sayısı

Ca-aljinat ve P(AAm-ko-AA) kullanılarak immobilize edilen tirozinazın tekrar kullanım sayısını incelemek amacı ile Kısım 4.7.1'de belirtilen yöntemle aktiflikleri tayin edildi. Ca-aljinat için 3 kez kullanım sonunda %100, 7 kez kullanım sonunda %94, 15 kez kullanım sonunda ise yaklaşık %77, aktiflik gösterirken; P(AAm-ko-AA) için 3 kez kullanım sonunda %100, 7 kez kullanım sonunda %99, 15 kez kullanım sonunda %97, 31 kez kullanımın sonunda ise yaklaşık %80 aktiflik gösterdiği bulundu (Şekil 5.6).



Şekil 5.6. İmmobilize enzimin aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

## 6. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Serbest ve immobilize tirosinaz enziminin aktifliğine etki eden çeşitli parametreler incelendi ve elde edilen sonuçlar aşağıda gösterildi.

1. Serbest tirosinaz için optimum pH değeri 7 olarak bulunmuştur. Ca-aljinat ve poli(akrilamit-ko-akrilik asit) kullanılarak immobilize edilen tirosinaz için peğeri 5,5 olarak bulunmuştur.
2. Serbest tirosinaz için optimum sıcaklık 30°C iken Ca-aljinat ve poli(akrilamit-ko-akrilik asit) kullanılarak immobilize edilen tirosinaz için bu sıcaklık değeri 35°C bulunmuştur.
3. Serbest tirosinaz için  $K_m$  değeri 0,6072 mM, Ca-aljinat ve poli(akrilamit-ko-akrilik asit) kullanılarak immobilize edilen tirosinaz için  $K_m$  değerleri sırasıyla 0,779 mM ve 1,408 mM olarak bulunmuştur.
4. Serbest tirosinaz için  $V_{mak}$  değeri 0,0737 mM.dakika<sup>-1</sup>, Ca-aljinat ve poli(akrilamit-ko-akrilik asit) kullanılarak immobilize edilen tirosinaz için  $V_{mak}$  değerleri sırasıyla 0,0117 mM.dakika<sup>-1</sup> ve 0,0125 mM.dakika<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur.
5. Serbest tirosinazın 4°C da depolandığında 100 gün sonunda serbest enzim aktifliğinin %98’ni kaybederken, Ca-aljinat ve poli(akrilamit-ko-akrilik asit) kullanılarak immobilize edilen tirosinaz enzimi ise %90 ve %95 aktifliğini korumuştur.
6. Serbest tirosinaz 45 °C 60 dakikada inkübe edildiğinde yaklaşık %50, Ca-aljinat ve P(AAm-ko-AA) kullanılarak immobilize edilen tirosinaz ise yaklaşık %60 ve %70 aktifliğini koruduğu gözlemlendi. Serbest tirosinaz 65 °C 60 dakikada inkübe edildiğinde yaklaşık %17, Ca-aljinat ve P(AAm-ko-AA) kullanılarak immobilize edilen tirosinaz ise yaklaşık %23 ve %30 aktifliğini koruduğu gözlemlendi.
7. Ca-aljinat 3 kez kullanım sonunda %100, 7 kez kullanım sonunda %94, 15 kez kullanım sonunda ise yaklaşık %77, aktiflik gösterirken; P(AAm-ko-AA) 3 kez kullanım sonunda %100, 7 kez kullanım sonunda %99, 15 kez kullanım

sonunda %97, 31 kez kullanımın sonunda ise yaklaşık %80 aktiflik gösterdiği bulundu.

## KAYNAKLAR

1. Amajad, A.K., Shuail, A., Qayyum, H., “Simultaneous and immobilization of mushroom tyrosinase on an immunoaffinity support” , *Process Biochemistry*, 40: 2379-2386 (2005).
2. Yaropolov, A.I., Kharybin, A. N., Emneus, J., Marko-Varga, G., Gorton, L., “Flow-injection analysis of phenols at a graphite electrode modified with co-immobilised laccase and tyrosinase” *Analytica Chimica Acta* 308: 137-144 (1995).
3. Axen, N., Ernbock, S., “Chemical fixation of enzyme to cyonogen hailide activated polysacchoride carrier” , *European Journal of Biochemistry*, 18: 351-357 (1971).
4. Arica, Y. M., Hasirci, V. N., “İmmobilization for the prouction of membranes” , *Biomaterials*,8: 489 (1987).
5. Brooks, D. W. and Dawson, C.R., “Aspects of tyrosinase chemistry.”, The biochemistry of copper ed. J. Peisach., P. Aisen., W. E. Blumberg., *Academic Press*, New York, 343-357 (1966).
6. Crecchio, C., Ruggiero, P., Pizzigallo, MDR., Curci, M., “Potential utilization of phenoloxidases immobilized in organic gels for decontamination of polluted sites” , *Developments in Plant and Soil Science.*, 71: 545-52 (1997).
7. Cary, J. W., Lax, A.R. and Flukey, W.H., “Cloning and characterization of cDNA coding fr Vicia faba polyphenol oxidase” , *Plant Molecular Biology.*, 20: 245-253, (1992).
8. Chang, T. M. S., “Microcapsules of artifical cells” , *Science.*, 146: 524-530 (1964).
9. Chang, T. M. S., “Microencaosulation of enzymes and biologicals methods in enzymology” , *Academic Press Inc.*, New york, 44: 201-218 (1976).
10. Cabral, J. M. and Kennedy, J. F., “Covalent and coordination immobilization of proteins in immobilized proteins” , *Bioprocess Technology*, 14:73-138, (1991).
11. Degani, Y., Miran, T., “Immobilization of cholinesterase in cross-linked polyacrylamide” , *Biochim Biophys Acta*, 212: 362-364 (1970).

12. Dietler, C. and Lerch, K., "Reaction inactivation of tyrosinase" , In oxidases and related redox systems ed. T.E. King, H.S. Mason and M. Morrison., *Permagon Press*, New York, 305-317 (1982).
13. Ducros, V., Brzozowski, AM., Wilson, KS., Brown, SH., Ostergaard, P., Schneider. P., et al., "Crystal structure of the Type 2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 Å resolution" , *Nature Structural Biology*., 5: 310-6 (1998).
14. Estrada, P., Sanchez- Muniz, R., Acebal, C., Arche, R., Castillon, M.P. "Characterization and optimization of immobilized polyphenol oxidase in low water organic solvents" , *Biotechnology Applied Biochemistry*.,14: 12-20 (1991).
15. Foor, F., Morin, N., Bostain, K.A., "Production of L-DOPA in *Escherichia coli* with the Tyrosin phenol lyase gene cloned from *Erwinia herbicola*." , *Applied Environmental Microbiology*., 59: 3070-5 (1993).
16. Wang, G., Xu, J.J., Ye, L.H., Zhu, J.J., Chen, H.Y., "Highly sensitive sensors based on the immobilization of tyrosinase in chitosan" , *Bioelectrochemistry*., 57: 33-38 (2001).
17. Scouten, W.H. and Mosbach, K. " Methods in Enzymology", *Academic Press*, Orlando, 135:30-65 (1987) .
18. Hamann, M.C.J., Saville, B.A., "Enhancement of tyrosinase stability by immobilization on Nylon-66", *Food Bioproducts Processing*., 74: 47-52 (1996).
19. Kalbunde, T., Eicken, C., Sacchettini, JC., Krebs, B., "Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center" , *Nature Structural Biology*., 5: 1084-90 (1998).
20. Fenol, L.G., Rodriguez-Lopez, J.N., Varon, R., Garcia-Ruiz, P.A., Garcia-Canovas, F., Tudela, J., "Kinetic characterisation of the reaction mechanism of mushroom tyrosinase on tyramine/dopamine and L-Tyrosin methyl ester/L-dopa methyl ester" , *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*., 34: 1594-1607 (2002).

21. Arica, M.Y., Bayramoğlu, G., and Bıçak, N., “Characterisation of tyrosinase immobilised onto spacer-arm attached glycidyl methacrylate-based reactive microbeads” , *Process Biochemistry*, 39: 2007-2017 (2004).
22. Arica, M.Y., “Immobilization of polyphenol oxidase on carboxymethylcellulose hydrogel beads: preparation and characterization” , *Polymer International*, 49: 775-781 (2000).
23. Arica, M.Y. and Bayramoğlu, G., “Reversible immobilization of tyrosinase onto polyethyleneimine-grafted and Cu(II) chelated poly(HEMA-co-GMA) reactive membranes” , *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 27: 255-265 (2004).
24. Nicell, J.A., Al-Kassim, L., Betra, J.K. and Taylor, K.E., “Wastewater treatment by enzyme catalysed polymerisation and preccipitation” , *Biodeterioration Abstracts*, 7: 1-8 (1993).
25. Munjal, N. and Sawhney. S.K., “Stability and properties of mushroom tyrosinase entrapped in alginate, polyacrylamide and gelatin gels” , *Enzyme and Microbial Technology*, 30: 613-619 (2002).
26. Osuga, D., van der Schaaf, A. and Whiateker, J. R., “Control of polyphenol oksidase activitiy using a catalytic mechanism” , Protein structure-function elationships in foods ed. R.L. Jackman and J.L. Smith., *Blackie Academic & Professional*, Scotland, 62-88 (1994).
27. Park, T.G., Hoffmann, A.S., “Thermal cycling effects on the bioreactor performances of immobilized  $\beta$ - Galactosiade in temparature sensitive hydrogel beads” , *Enzyme Microbial Technology*, 15: 476 1556 (1993).
28. Atlow, S.C., Bonadonna-Aparo, L., Klibanow, A.M., “Dephenolization of industrial wastewaters catalysed by polyphenol oxidase” , *Biotechnology Bioengineering*, 26, 599-603 (1984).
29. Solomon, E.I., Baldwin, M.J. and Lowrey, M.D., “Electronic strutures of active sites in copper proteins: Contributions to reactivity” , *Chemical Reviews*, 92: 521-542 (1992).
30. Srere, P. A., Uyeda, K., “Functional groups on enzymes suitable for binding to matrices” *Methods in Enzymology*, Academic Press, Inc, New York, 44: 11-19, (1976).

31. Sugurman, M., "Prophenol oxidase activation and insect immunity" , Defense molecules ed. J. J. Marchaloins and E. L. Reinisch., **Wiley-Liss**, New York, 47-62 (1990).
32. Sherman, T. O., Vaughn, K.C. and Duke, S. O., "A limited survey of the phylogenetic distribution of polyphenol oxidase" , **Phytochemistry.**, 30: 2499-2506 (1991).
33. Sinchez-Ferrer, A., Rodriguez-Lopez, JN., Garcia-Canovas, F., Garcia-Carmona, F., "Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism" , **Biochimica et. Biophysica Acta (BBA) Protein Structure and Molecular Enzymology.**, 1247: 1-11 (1995).
34. Sun, W.Q., Payne G.F., Moas. M.S.G.L., Chu, J.H., Wallace, K.K., "Tyrosinase reaction/chitosan adsorption for removing phenol from wastewater" , **Biotechnology Progress.**, 8:179-186 (1992).
35. Van Leyveld, L.J., Rooster, K., "Browning potential of tea clones seedlings" , **Science.**, 61: 545-547 (1986).
36. Wilcox, D.E., Porras, A.G., Hwang, Y.T., Lerch, K., Winkler, M.E. and Solomon, E.I., "Substrate analogue binding to the coupled binuclear copper active site in tyrosinase" , **Journal of the American Chemical Society.**, 107: 4015-4027 (1985).
37. Zhenjiu, Liu., Jiaqi, Deng., Ding, Li., "A new tyrosinase biosensor based on tailoring the porosity of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> sol-gel to co-immobilize tyrosinase and the mediator " , **Analytica Chimica Acta.**, 407: 87-96 (2000).
38. Zawitowski, J., Biliaderis, C.G. and Eskin, N.A.M., "Phenol oxidase. In: Oxidative enzymes in foods, D.S., Robinson and N.A.M., Eskin, eds" , **Applied Science**, London and Newyork, 217-273 (1991).
39. Zachariah, K., Mottola, H.A., "Continuous-flow determination of phenol with chemically immobilized polyphenoloxidase (tyrosinase)." **Analytical Letters**, 22:1145-58 (1989).
40. Gloger, M., Tischer, W., "Determination of catalytic activity of immobilized enzymes" , **Methods of Enzymatic Analysis.**, 142-154 (1981).
41. Vamos-Vigyazo, L., "Polyphenoloxidase and peroxidase in fruits and vegetables" , CRC Critic. Rev. **Food Science Nutr.**, 15:49-127 (1981).

42. Whitaker, J. R., "Polyphenol oxidase. In: Food enzymes: Structure and mechanism, Dominic W. S. Wong, ed." , *Chapman and Hall*, Newyork, 271-307 (1995).
43. Dumitriu, S., Popa, M., Dumitriu, M., "Polymeric biomaterials as enzyme and drug carriers" , *Journal of. Bioavtive and Competible Polymers*, 3: 243-312 (1988).

## **ÖZGEÇMİŞ**

Ayşe YAHŞİ, 1980 yılında Nevşehir’de doğdu. İlk, orta, lise öğrenimini yurdumuzun çeşitli yerlerinde tamamladı ve 2002 yılında Selçuk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümünden mezun oldu. 2003 yılında Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde Kimya Anabilim dalında yüksek lisans eğitimine başladı.