

TİROZİNAZ ENZİMİ KULLANILARAK L – DOPA ÜRETİMİ

Esra ÇÖRTENLİOĞLU

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OCAK 2006
ANKARA**

Esra ÇÖRTENLİOĞLU tarafından hazırlanan TİROZİNAZ ENZİMİ KULLANILARAK L – DOPA ÜRETİMİ adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof.Dr. Selma ATEŞ
Tez Yöneticisi

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

Başkan :-----

Üye :-----

Üye :-----

Üye :-----

Üye :-----

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

TİROZİNAZ ENZİMİ KULLANILARAK L-DOPA ÜRETİMİ
(Yüksek Lisans Tezi)

Esra ÇÖRTENLİOĞLU

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Ocak 2006

ÖZET

Bu çalışmada, tirozinaz enzimi kullanılarak L-DOPA (3,4- Dihidroksifenil alanin) üretimi yapılmıştır. L-DOPA, 1967'den beri Parkinson hastalığının tedavisinde tercih edilen bir ilaçtır. Parkinson, beyin hücrelerinin kaybı sonucu titreme, kasılma, hareket yavaşlığı ile karakterize edilir. Tirozinaz enzimi kullanılarak immobilizasyon işlemi yapılmıştır. Enzim bakır-alginat jeller içine hapsetme yöntemi kullanılarak, immobilize edilmiştir. İmmobilize enzim, çalkalamalı erlenlerde ve sabit yataklı reaktörde, L-Tirozin'den L-DOPA üretilmesi için kullanılmıştır.

Bilim Kodu : 201.1.020
Anahtar Kelimeler : Tirozinaz, L-DOPA üretimi, immobilize enzim
Sayfa Adedi : 50
Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Selma ATEŞ

PRODUCTION OF L-DOPA BY USING TYROSINASE ENZYME
(M.Sc. Thesis)

Esra ÇÖRTENLİOĞLU

GAZİ UNİVERSTY
İNSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
January 2006

ABSTRACT

In this study, L-DOPA (L - 3,4 - Dihydroxyphenylalanine) was produced by using tyrosinase enzyme. L-DOPA, has been the preferred drug for treatment of Parkinson's disease since 1967. Parkinson is being characterized with tremors, rigidity, slowness of speech as a result loss of brain cells. Immobilization has been made by using tyrosinase enzyme. Enzyme has been immobilized by using the method of entrapment in copper-alginate gels. Immobilized enzyme has been used for L-DOPA production from L-Tyrosine in batch reactor and plug flow reactor.

Science Code : 201.1.020
Key Words : Tyrosinase,L-DOPA production, immobilized enzyme
Page Number : 50
Adviser : Prof. Dr. Selma ATEŞ

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, sadece çalışmalarına değil, hayatıma ışık tutan danışman hocam Prof. Dr. Selma ATEŞ'e, laboratuvar çalışmalarında bana önderlik eden, tecrübe ve bilgilerini benden esirgemeyen, güler yüzleri ve samimi destekleriyle hep yanımda olan Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümündeki çok değerli hocalarım Prof.Dr.Ülkü MEHMETOĞLU ve Doç.Dr.Emine BAYRAKTAR'a teşekkürü bir borç bilirim..

Sevgisi ve pozitif enerjisiyle, çalışmalarım boyunca destek veren, laboratuvarlarda malzeme ve cihazlar dışında, hayatımızı da paylaştığımız Araş.Gör. Müge GÖKDERE ve güzel dostum Dilek ÖZÇELİK'e, deneyimlerini tereddütsüz paylaşarak, yol gösteren, HPLC analizlerinde yardımcı olan Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümündeki Araş.Gör.Özlem AYDOĞAN, Araş.Gör. Çiğdem BABAARSLAN ve Biyoteknoloji Araştırma grubundaki fedakar arkadaşlarıma çok teşekkür ederim..

Ve en büyük teşekkürüm, şükranım, minnetim; tüm dert ve sıkıntılarımin yanında mutlu anlarımda da yalnız bırakmayan, benim için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayarak, bana olan güven ve inançlarını sonsuz hissettiren, varlıklarıyla her zaman güç veren, hayatımın anlamı, yaşam kaynağım çok kıymetli babam Çetin ÇÖRTENLİOĞLU, annem Canfidan ÇÖRTENLİOĞLU ve kardeşim Serhat ÇÖRTENLİOĞLU'na.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	x
RESİMLERİN LİSTESİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL VE TEORİK BİLGİLER	2
2.1. Enzimlerin Genel Özellikleri	2
2.2. Tirozinaz	3
2.2.1. Tirozinaz'ın moleküler özelliği	5
2.3. Levodopa (L-DOPA) Özellikleri	8
2.4. Enzimlerin İmmobilizasyonu	11
2.5. İmmobilizasyon metotları	12
2.5.1. Hapsetme (Entrapment) ile immobilizasyon	13
2.5.2. Enzimlerin bakır-alginat ile immobilizasyonu	14
2.6. Reaktörler	15
2.6.1. Süreksiz (kesikli) reaktörler	15
2.6.2. Sürekli karıştırmalı reaktörler	17

Sayfa

2.6.3. Sabit yataklı reaktörler.....	18
2.7. Biyotransformasyon.....	19
2.7.1. Biyotransformasyonun özellikleri.....	19
2.7.2. Biyotransformasyon tepkimeleri.....	20
2.7.3. Biyotransformasyon türleri.....	21
2.8. L-DOPA Üretim Çalışmaları.....	23
2.8.1. Kimyasal yolla yapılan L-DOPA üretim çalışmaları.....	23
2.8.2. Hücre kullanılarak yapılan L-DOPA üretim çalışmaları.....	26
2.8.3. Enzim kullanılarak L-DOPA üretim çalışmaları.....	28
3. KULLANILAN MATERYAL ve METOTLAR.....	30
3.1. Materyaller.....	30
3.2. Enzim Aktivliğinin Ölçülmesi.....	30
3.3. Enzim İmmobilizasyonu- Cu-Alginat Taneciklerin Hazırlanması.....	30
3.4. L-DOPA Üretim Koşulları.....	32
3.4.1. Çalkalamalı erlenlerde serbest enzim kullanılarak L-DOPA üretim koşulları.....	32
3.4.2. Çalkalamalı erlenlerde immobilize enzim kullanılarak L-DOPA üretim koşulları.....	32
3.4.3. Sabit yataklı reaktörde L-DOPA üretim koşulları.....	32
3.5. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	33
3.6. Analiz Yöntemi.....	34
3.7. L-DOPA Kalibrasyon Grafiği.....	34

Sayfa

4. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	36
4.1. L-DOPA Üretimi.....	36
4.1.1. Çalkalamalı erlenlerde serbest enzim kullanılarak L-DOPA üretimi.....	37
4.1.2. Çalkalamalı erlenlerde immobilize enzim kullanılarak L-DOPA üretimi.....	38
4.1.3. Sabit yataklı reaktörde farklı substrat derişimlerinde L-DOPA üretimi.....	39
4.1.4. Sabit yataklı reaktörde zamanın L-DOPA üretimine etkisi.....	40
4.1.5. Sabit yataklı reaktörde havalı ortamda L-DOPA üretimi.....	41
4.1.6. Sabit yataklı reaktörün verimliliği.....	42
5. SONUÇLAR	44
KAYNAKLAR.....	46
ÖZGEÇMİŞ.....	50

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Farklı kaynaklardan izole edilmiş tirozinaz enzimini oluşturan alt birimlerin sayısı ve uygulanan ayırma metotları.....	7
Çizelge 3.1. HPLC özellikleri.....	34
Çizelge 4.1. Çeşitli enzim reaktörleri kullanılarak, oluşan L-DOPA verimliliklerinin karşılaştırılması.....	43

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Tirozinaz'ın bitkisel tirozinaz tarafından katalizlenen oksidasyonu.....	4
Şekil 2.2. Bakır merkezli tirozinaz şekli.....	5
Şekil 2.3. L-DOPA'nın molekül ve üç boyutlu yapısı.....	8
Şekil 2.4. L-Tirozin'den katekolaminlerin oluşum mekanizması.....	10
Şekil 2.5. Çeşitli immobilizasyon metodlarının şemaları.....	13
Şekil 2.6. Süreksiz (kesikli) reaktörler.....	16
Şekil 2.7. Yarı süreksiz (yarı kesikli) reaktörler.....	16
Şekil 2.8. Sürekli karıştırmalı reaktörler.....	17
Şekil 2.9. Sürekli karıştırmalı n-dizi reaktörler.....	17
Şekil 2.10. Sabit yataklı reaktörler.....	18
Şekil 2.11. Biyotransformasyonun şematik gösterimi.....	19
Şekil 2.12. Vanilin'den L-DOPA üretim mekanizması.....	23
Şekil 2.13. L-Tirozin'den L-DOPA üretim mekanizması.....	24
Şekil 2.14. Asimetrik indirgenme yolu ile L-DOPA üretimi.....	25
Şekil 2.15. Benzen'den L-DOPA üretiminin hibrit yolu.....	27
Şekil 3.1. Na-alginat ile enzimlerin immobilizasyonu.....	31
Şekil 3.2. L-DOPA kalibrasyon grafiği.....	35
Şekil 4.1. L-Tirozin'den L-DOPA oluşumunda askorbik asitin etkisi.....	36
Şekil 4.2. L-DOPA üretiminin enzim miktarı ile ilişkisi.....	37
Şekil 4.3. İmmobilize enzim kullanılarak çalkalamalı erlenlerde L-DOPA üretimi	38
Şekil 4.4. Sabit yataklı reaktörde L-DOPA üretimi.....	39

Şekil	Sayfa
Şekil 4.5. Sabit yataklı reaktörde zamanın L-DOPA üretimine etkisi.....	40
Şekil 4.6. Sabit yataklı teaktörde havalı ortamda L-DOPA derişimleri.....	41
Şekil 4.7. Sabit yataklı reaktörde verimliliğin karşılaştırılması.....	42

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Sabit yataklı immobilize enzim reaktörü.....	53

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklama
α	Alfa
β	Beta
D	Dalton
μL	Mikro Litre
IU	Ünite
UV	Ultraviyole
Q	Çözelti akış hızı
Kısaltmalar	Açıklama
EC	Enzim Komisyonu
GF	Jel filtrasyonu
IF	İzoelektrik odaklama
IEC	Uluslararası Enzim Komisyonu
L – DOPA	L – 3,4 – Dihidroksi fenilalanin
L – Tirozin	4 – hidroksi – L - fenilalanin
MM	Molekül kütlesi
PEG	Polietilen glikol
PGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PVP	Polivinilpirolidin
SDS	Sodyum dodesil sülfat

1. GİRİŞ

Parkinson hastalığı, algılama yeteneği ve karar mekanizmasının zayıflamasına neden olan, beyin ve sinir sistemini etkileyen nörolojik bir bozukluktur. Parkinson hastalığının tedavisinde yıllardır L-3,4-dihidroksifenil alanin (L-DOPA) kullanılmaktadır. Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılan hiçbir ilaç henüz L-DOPA'nın yerini alamamıştır. Büyüme hormonu miktarını artırması sebebiyle, L - DOPA'nın Parkinson hastalığındaki tedavi edici etkisi yanında yaşlanmayı geciktirici etkisi de mevcuttur.

L-DOPA'nın diğer enantiyomeri olan D- formunun ilaç olarak etkinliği yoktur, hatta alınması halinde yan etkiler gözlenir. Bu nedenle sadece L- DOPA enantiyomerini elde etmek için çalışmalar yapılmaktadır. Enzimler spesifik yapıda olduklarından sadece bir enantiyomerin oluşmasını sağlarlar. L-DOPA üretiminde tirozinaz enzimi kullanılmaktadır.

Tirozinaz, affinite kromatografisi ile saflaştırılan ilk enzim olma özelliğine sahip olmasının yanında, moleküler oksijeni organik bir molekülün yapısına doğrudan katabilme özelliğine sahip enzimler arasında da ilk tanımlanan enzimdir.

Bu çalışmanın amacı, Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılan L-DOPA adlı ilacın biyotransformasyonla elde edilmesidir. Biyotransformasyon mikroorganizma ya da enzim kullanılarak, organik bir maddenin başka bir organik maddeye dönüştürülmesi işlemidir.

Bu çalışmada, Sigma firmasından temin ettiğimiz tirozinaz enzimi kullanılarak immobilizasyon işlemi yapıldı. Enzim bakır alginat jeller içine hapsedme yöntemi kullanılarak, immobilize edildi. İmmobilize enzim, çalkalamalı erlenlerde (kesikli sistem) ve sabit yataklı reaktörde (sürekli sistem), L- Tirozinden L-DOPA üretilmesi için kullanıldı.

2. GENEL VE TEORİK BİLGİLER

2.1. Enzimlerin Genel Özellikleri

Enzimler, canlı organizmadaki biyokimyasal olayların ılıman koşullarda gerçekleşmesini sağlayan, belirli kimyasal reaksiyonları hızlandıran protein yapısındaki bileşiklerdir.

Enzimlerin etkinlikleri kimyasal katalizörlerden $10^6 - 10^{16}$ kat daha fazladır. Enzimler sadece bir substrata veya aynı fonksiyonlu grubu olan substrat serisine karşı etkindirler. Hatta aynı maddenin izomerlerinden sadece biriyle reaksiyon verebilen çok spesifik enzimlerde vardır. Bu seçicilik özelliklerinden dolayı, en basit hücrede bile aynı anda çok sayıda biyokimyasal reaksiyon meydana gelebilir.

Hücredeki reaksiyonlar yan ürün oluşturmazlar, reaksiyonlar %100 verimle sonuçlanır. Enzimatik reaksiyonlar fizyolojik pH'da ve canlının vücut sıcaklığında gerçekleşir. Biyokimyasal reaksiyonlar az enerji ve düşük sıcaklıkta gerçekleşir. Normal laboratuvar koşullarında yüksek sıcaklık ve fazla enerji gerektiren pek çok reaksiyon, enzimlerin kullanılmasıyla daha düşük sıcaklıkta ve enerjide gerçekleştirilebilir (1).

Enzimler spesifik oluşları ve çok düşük derişimlerde bile substrat reaksiyonlarını katalizlemelerinden dolayı sanayide önemli kullanım alanına sahiptirler.

Enzimler gıda ve kimya endüstrisinde; tıp, eczacılık, ziraat, gibi alanlarda teşhis, tedavi ve biyolojik savaş gibi amaçlarla kullanılırlar (2).

Uluslararası Enzim Komisyonu (IEC), katalizledikleri reaksiyon tipine göre enzimleri altı ana grupta toplamıştır. Bunlar:

1. Oksidoredüktazlar: Redoks reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Tirozinaz enzimi oksidoredüktaz sınıfı bir enzimdir.
2. Transferazlar: Fonksiyonel grupların transferinin olduğu reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir.
3. Hidrolazlar: Hidroliz reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.
4. Liyazlar: C-C, C-O, C-N gibi gruplar arasında çift bağ oluşturarak substrattan bazı grupların ayrılmasını katalizleyen enzimlerdir, veya tam tersi bazı grupların çift bağa katılma reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.
5. İzomerazlar: Substratın izomerinin olduğu reaksiyonları katalizleme özelliğine sahip enzimlerdir.
6. Ligazlar (Sentazlar): Bağ oluşumunun gerçekleştiği reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir (1).

2.2. Tirozinaz

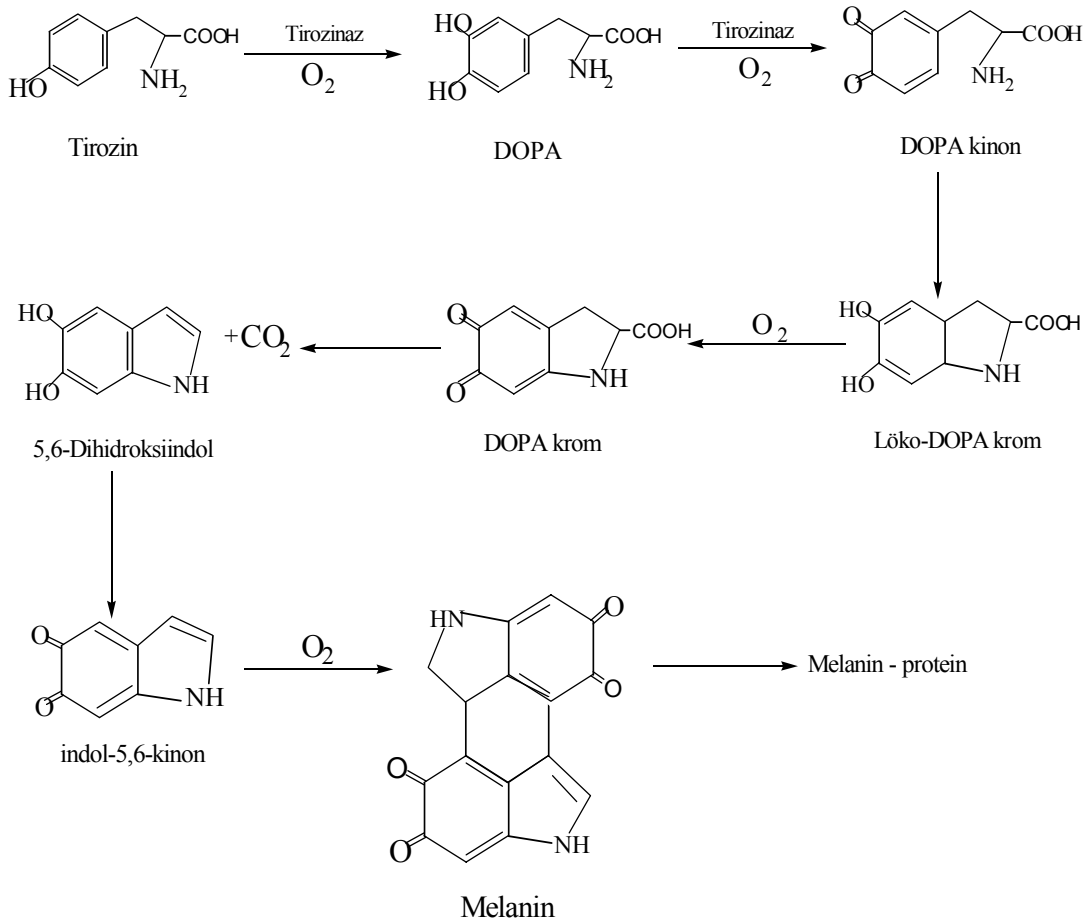
Tirozinaz (EC 1.14.18.1) polifenol oksidaz, monofenol oksidaz, fenolaz veya katekolaz olarak da adlandırılabilir. Birçok bitki dokusunda, bazı funguslarda ve insanlarda dahil olmak üzere hayvansal organizmaların özellikle deri, saç ve göz pigmentlerinde bulunur. Tirozinaz'ın özellikle mantar, yumru patates, elma, avokado, muz, şeftali, kahve tohumları, çay yapraklarındaki konsantrasyonu oldukça yüksektir. Ayrıca prinç, ıspanak, buğday, yulaf, bezelye, kayısı, üzüm, armut, zeytin, fasulye, domates, bakla yaprağı, mısır yaprakları gibi sebze ve meyvelerde de tirozinazın bulunduğu tespit edilmiştir (3-6).

Tirozinaz, melanin oluşumunda görevli temel bir enzimdir. Bazı kanser türlerinde kanserli hücrede tirozinaz aktivitesinin artması bu kanser türlerinin tedavisinde tirozinazın önemine dikkati çekmiştir. Tirozinaz tirozinin, DOPA ve DOPA kinona oksidasyonunu katalizler. Takip eden tepkimeler sonucunda

melanin oluşumu gerçekleşir. Melaninin proteinlerle olan etkileşimi enzimatik değildir (7). Şekil 2.1’de tirozinden, melanin oluşumu görülmektedir.

Tirozinaz, melanin eldesindeki biyokimyasal yolda aşağıda gösterildiği şekilde görev alır:

- 1) Tirozinin, dihidroksifenil alanine (DOPA) hidroksilasyonu
- 2) DOPA’ nın DOPA kinona oksidasyonu
- 3) 5 ,6 - dihidroksi indolün, indol - 5 ,6 - kinona oksidasyonu



Şekil 2.1. Tirozinin, bitkisel tirozinaz tarafından katalizlenen oksidasyonu

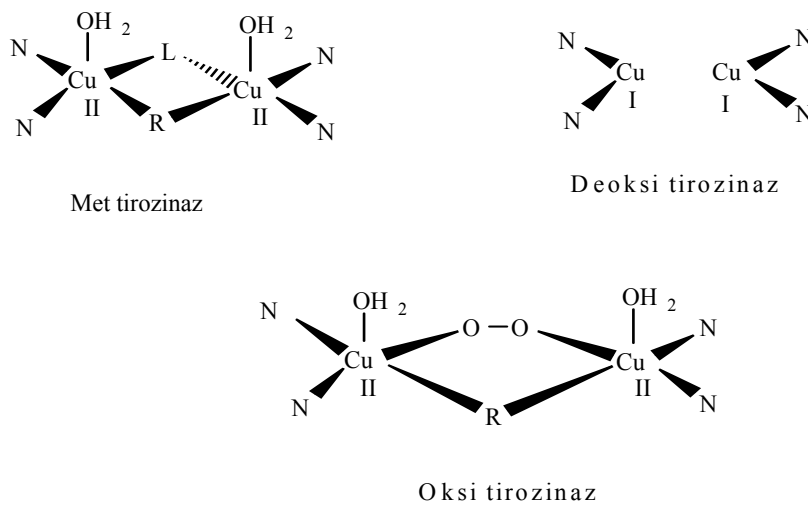
Melanin koyu içerikli ve ışıktan koruyucu diye bilinen renklendirici bir madde veya bir çeşit pigmenttir. Melanin pigmentinin derideki temel görevi güneşten gelen ultraviyole ışınlarını soğurarak derinin zarar görmesini engeller. Güneş

derideki melanin pigmentinin artmasına neden olarak bronzlaşmaya sebep olur. Melanin pigmenti göz ve beyin gibi vücudun diğer bölgelerinde de etkilidir. Gözdeki retina ve retinanın fovea denilen bölgesinde bulunur. Ayrıca ilaç tutuklamada biyopolimer olarak da melaninden yararlanılır.

Tirozinaz enzimi kromozom 11 üzerindeki tirozinaz geni tarafından üretilir. Bu genin mutasyonu bir çeşit albinizme neden olur. Çünkü değişen gen tarafından üretilen enzimde doğru çalışmaz. Albinizimli insanların gözlerinde, derilerinde ve saçlarında ya çok az pigment bulunur, ya da hiç bulunmaz. (Bazen sadece gözlerde de bulunabilir.) Bu yüzden derileri, saç – tüy – kıl gibi keratin yapıları beyaz renkli ve gözleri kırmızıdır. Beyaz renkli hayvanların albino olup olmadıkları, göz renklerine bakılarak anlaşılır. Ayrıca kanın pıhtılaşmaması, duyma bozukluğu, zeka geriliği gibi problemleri olan birçok albinizm türleri de mevcuttur.

2.2.1. Tirozinaz'ın moleküler özelliği

Tirozinaz substratlarıyla reaksiyona girmemiş halde iken %85 met tirozinaz, %15 oksitirozinaz halindedir. Reaksiyon sırasında bunlar deoksitirozinaz üzerinden birbirlerine dönüşerek katalizör görevlerini yerine getirirler. Şekil 2.2'de Met tirozinaz, oksitirozinaz ve deoksitirozinazın yapıları görülmektedir (8,9).



Şekil 2.2. Met tirozinaz, oksitirozinaz ve deoksitirozinazın yapıları

Tirozinaz aktivitesi için bakırın gerekli olduğunu, Kubowitz 1938' de yaptığı bir deneyle göstermiştir. Önce potasyum siyanür ile enzimdeki bakır atomunu uzaklaştırdığında enzimin aktivitesinin kaybolduğunu ve uzaklaştırdığı bakır atomu yenilendiğinde ise aktivitenin tekrar kazanıldığını gözlemlemiştir (10).

Tirozinaz oligomerik yapıya sahip bir enzimdir. Bu yapıyı oluşturan alt birimlerin sayısı enzim kaynağına göre farklılık gösterir. Tirozinazın molekül kütlesi 30000 D dolaylarında olan ve her biri birer bakır atomu içeren özdeş 4 alt kısımdan oluştuğu ileri sürülmektedir. Bu görüşü destekleyen deneyler Jolley ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. *S. nigrifaciens*'den saflaştırılan her bir molekül başına bir bakır atomu içeren tirozinazın molekül kütlesi 18000 D iken *Streptomyces glaucescens*'den saflaştırılan tirozinazın molekül kütlesi 29000 D olduğu bildirilmiştir (11).

Fungiler dışındaki diğer türlerden elde edilen aktif monomerik tirozinazın bir bakır atomu içerdiği görülmüştür. Araştırmalar mantar ve fungi kaynaklı tirozinazının bir çift bakır atomu içerdiğini göstermiştir. Aktif merkezdeki bakır atomlarının sayısı mekaniksel ve fonksiyonel önem taşımaktadır (12).

Duckworth ve arkadaşları 1970 yılında mantardan saflaştırdıkları tirozinaz enziminin tam olarak aminoasit analizini yapmışlar ve enzimin özellikle aspartik asit ve glutamik asit bakımından zengin olduğunu bulmuşlardır. Çizelge 2.1' de farklı kaynaklardan izole edilmiş tirozinaz enzimini oluşturan alt birimlerin sayısı ve uygulanan ayırma metodları görülmektedir.

Çizelge 2.1. Farklı kaynaklardan izole edilmiş tirozinaz enzimini oluşturan alt birimlerin sayısı ve uygulanan ayırma metotları (13).

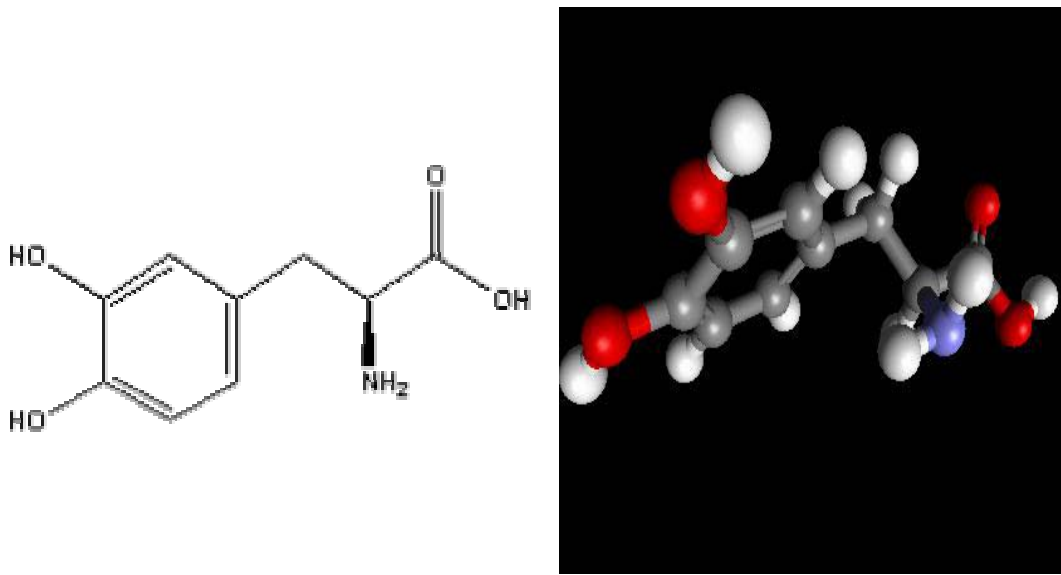
Enzim Kaynağı	Alt Birimlerin Sayısı ¹	Ayırma Metodu
Elma kabuğu	2	PEG, PVP, Triton X-100, DEAE-Selüloz ² , SGE
Elma	3	PGE, % 8, pH 8,6
Elma Kloroplastı	3 (134000; 67000; 24000)	Triton X-100, DEAE-Selüloz ² ; Agar jel elektroforezi; Sefadeks G-100 ²
Armut	2	Sefadeks G 25 ² , DEAE-Selüloz ² ; Hidroksilapatit ² ; PGE (pH 9,3)
Kiraz	3	PEG + aseton, DEAE-Selüloz ² , PGE
Şeftali	4	Tampon ekstraktı, aseton çöktürmesi, DEAE-Selüloz ²
kayısı	2	Tampon ekstraktı (sırasıyla pH 5 ve pH 7),
Üzüm kloroplastı	3	PGE, IF
Üzüm suyu ve kabuğu	2 – 5	PGE
Muz	2 (60000; 12000)	Tampon ekstraktı, aseton çöktürmesi, (NH ₄) ₂ SO ₄ , Sefadeks G-100 ² ; PGE
Patates1	11	PGE % 8
Patates2	10 (132000)	Tampon ekstraktı, pH 5,3 ile birlikte benzoik ve askorbik asit,sodyum sülfat fraksiyonu; Sefadeks G-200 ² ; PGE
Bakla	4	Aseton çöktürme, (NH ₄) ₂ SO ₄ ile doyurma, SGE
Patlıcan	2	(NH ₄) ₂ SO ₄ fraksiyonu, DEAE-Selüloz ²
Domates (7 kültür)	3 – 5	PGE
Salatalık (2 kültür)	2 – 3	PGE
Soğan (2 kültür)	5 – 7	PGE
Şeker kamışı	2 (130000; 32000)	Sefadeks G-200 ²
Mantar	4 (α , β , γ , δ) (SDS ile birlikte 119000; 34500)	Dondurma, aseton çöktürmesi, (NH ₄) ₂ SO ₄ ile doyurma, elektroforez, hidroksilapatit

PEG = Polietilen glikol; PVP = Polivinilprolidin; SGE = Nişasta jel elektroforezi;
PGE = Poliakrilamit jel elektroforezi; IF = İzoelektrik odaklama;
GF = Jel filtrasyonu; SDS = sodyum dodesil sülfat; MM = Molekül kütlesi

1: Molekül kütleleri parantez içindedir 2: Kromatografik basamaktır

2.3. Levodopa (L-DOPA) Özellikleri

2001 Nobel Kimya Ödülü sahibi W. Knowles, 2000 Nobel Tıp Ödülü sahibi A.Carlssoon ve ünlü boksör Muhammed Ali' yi bir araya getiren ortak bir nokta vardır ki o da Levodopa (L - DOPA)' dır. Şekil 2.3'de L-DOPA'nın molekül ve üç boyutlu yapısı görülmektedir.



Şekil 2.3. L-DOPA'nın molekül ve üç boyutlu yapısı

Sistemantik adı : L - 3,4 - dihidroksifenil alanin

Kapalı formülü : $C_9H_{11}O_4N$

Molekül kütlesi : 197,19 g/mol

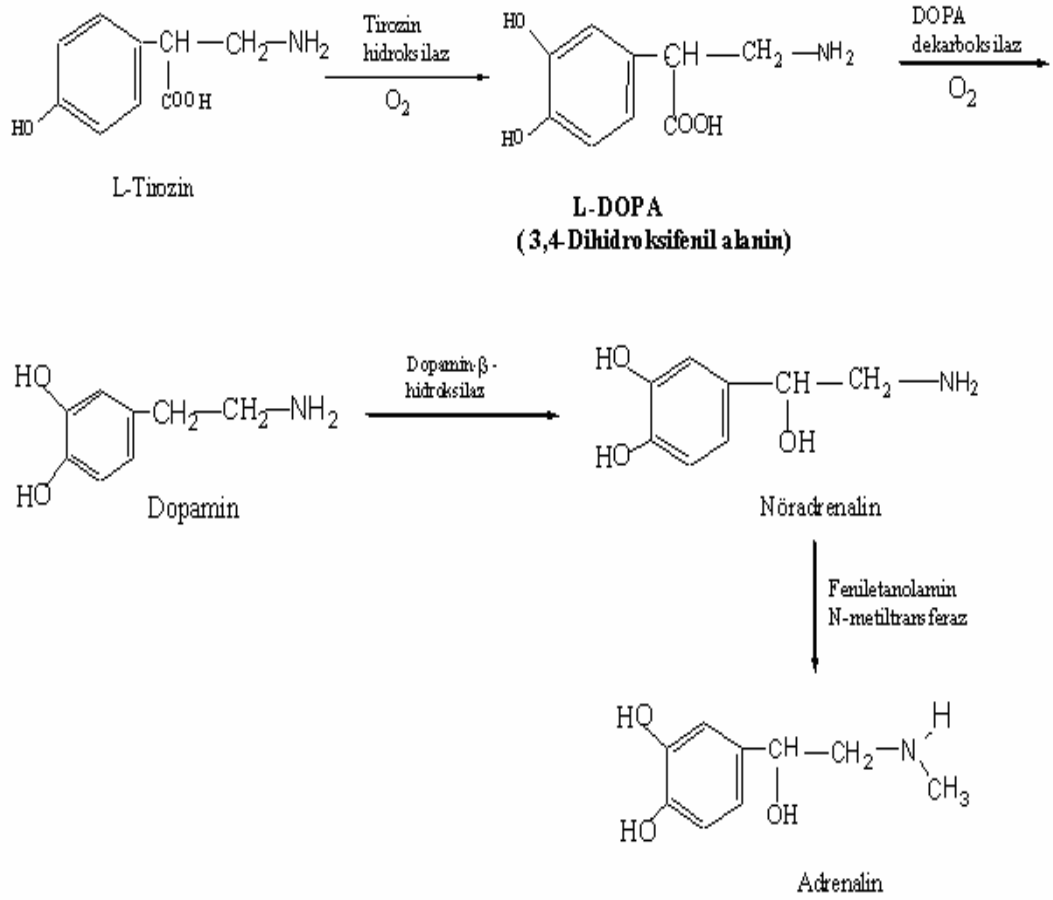
Erime noktası : 276 – 278 °C

Beyaz renkli, kokusuz, tatsız, kristal toz halindedir. Yapısında (-OH, -COOH ve $-NH_2$ gibi) polar grupların bulunması, sudaki çözünürlüğünü artırır. HCl ve formik asitte kolayca çözünürken, etanol, benzen, kloroform ve etil asetatda çözünmez. Atmosferik oksijen ile hızla oksidasyona uğrar ve kararır (14).

L-DOPA bitki ve hayvanlarda bulunan, yapısından da açıkça görülebildiği gibi bir aminoasit türevidir. Aynı zamanda yapısında, çikolata da bulunan ve beyinde mutluluk hormonu olarak bilinen feniletilamin'i görmek mümkündür.

Tirozin aminoasidi insan kanında $5,5 \cdot 10^{-5}$ M derişiminde bulunur. Tirozin hayvansal organizmada elzem amino asit olan fenil alaninden sentezlenir. Fenil alaninin fenil alanin hidroksilaz enzimiyle hidroksillenmesi sonucu tirozin oluşur, dolayısıyla tirozin elzem amino asit değildir.

Tirozin, kandan nörona geçerek hidroksilasyonla önce L – DOPA' ya sonra dekarboksilasyon tepkimesi ile dopamin'e dönüşür. Bu reaksiyon Şekil 2.4'de gösterilmektedir. L-DOPA, bir nörotransmitter madde olan dopaminin öncü maddesidir. Dopamin, katekolaminler (nöradrenalin, adrenalin diğer katekolamin bileşikleridir) grubuna giren bir amin türevidir; kimyasal olarak monoamin yapısında olan bir bileşiktir. Sinir hücrelerinin (nöron) birbirlerine temas ettiği (sinaps) bölgelerde, uyarıların (impulsların) iletilmesinde rol oynayan kimyasal moleküllere nörotransmitter madde denir. Şekil 2.4'de L-Tirozin'den, katekolaminlerin oluşum mekanizması görülmektedir.



Şekil 2.4. L-Tirozin'den katekolaminlerin oluşum mekanizması

Dopamin, beyinden gelen hareketin yönelimi ve kontrolüyle ilgili komutların kaslara ulaşmasına yardımcı olur. Yumuşak ve amaçlı kas hareketlerinin, titreme ya da sarsılma olmadan gerçekleşmesini sağlar. Parkinson hastalığının nedeni; kas aktivitesinde doğrudan görev alan aynı zamanda dopamin adlı kimyasal maddeyi üreten, beyin hücrelerinin kaybıdır. Beyinde hareketlerimizden sorumlu olan hücrelerin ufak bir bölümünün hasara uğraması, eksilmesi ve dejenerasyonu sonucu ortaya çıkar. Hastalarda titreme, kaslarda sertlik, konuşma zorluğu gibi semptomlar görülür.

2.4. Enzimlerin İmmobilizasyonu

Enzimlerin reaksiyonları spesifik olarak ve yüksek bir hızla katalizlemelerinden faydalanmak amacıyla onları canlı organizma dışında kullanabilmek düşüncesi bilim adamlarını faaliyete geçirmiştir. İlk olarak 1926 yılında Sumner tarafından üreaz enzimi kristal halde elde edilmiştir. Daha sonraları çok sayıda enzim çeşitli kaynaklardan izole edilmiş ve oldukça saf preparatlar şeklinde ve çoğu kristalize halde piyasaya sürülmüştür.

Enzim saflaştırılması özel teknikler gerektirdiğinden maliyetide oldukça yüksektir. Bunun yanı sıra, serbest enzimin aktifliğini kaybetmeden istenildiği anda reaksiyon ortamından uzaklaştırılması çok güçtür. Bu durum pahalı olan enzimlerin tekrar tekrar kullanılmasına engel olur. Reaksiyonun istenilen anda durdurulması için inhibitör katılması durumunda ise zaten enzim tarafından kirletilmiş olan reaksiyon ürünlerine yeni bir kirlilik unsuru eklenmiş olacaktır. Ürünlerin bu kirlilikten arıtılması için kompleks ayırma işlemlerine gerek vardır ki bu da maliyeti bir kat daha artırır. Yukarıda sayılan teknik ve ekonomik problemlerden dolayı serbest enzim yerine tutuklanmış enzim kullanılmasının daha uygun olabileceği düşünülmüş ve bu amaçla tutuklanmış enzim sistemlerinin hazırlanması ve teknolojiye kullanımı son senelerde büyük önem kazanmıştır (15).

İmmobilizasyon kelime anlamı olarak, " tutuklanmış, hareketi sınırlandırılmış, çözünmez hale getirilmiş " demektir. Enzimlerin ya da mikroorganizmaların fiziksel ve / veya kimyasal yöntemlerle katalitik aktifliğini koruyarak, tekrar, sürekli kullanımını sağlamak amacıyla organik veya inorganik taşıyıcılara (destek maddesi) tutturulmasıdır (16).

İmmobilize enzimlerin sağladığı avantajlar şunlardır (15) :

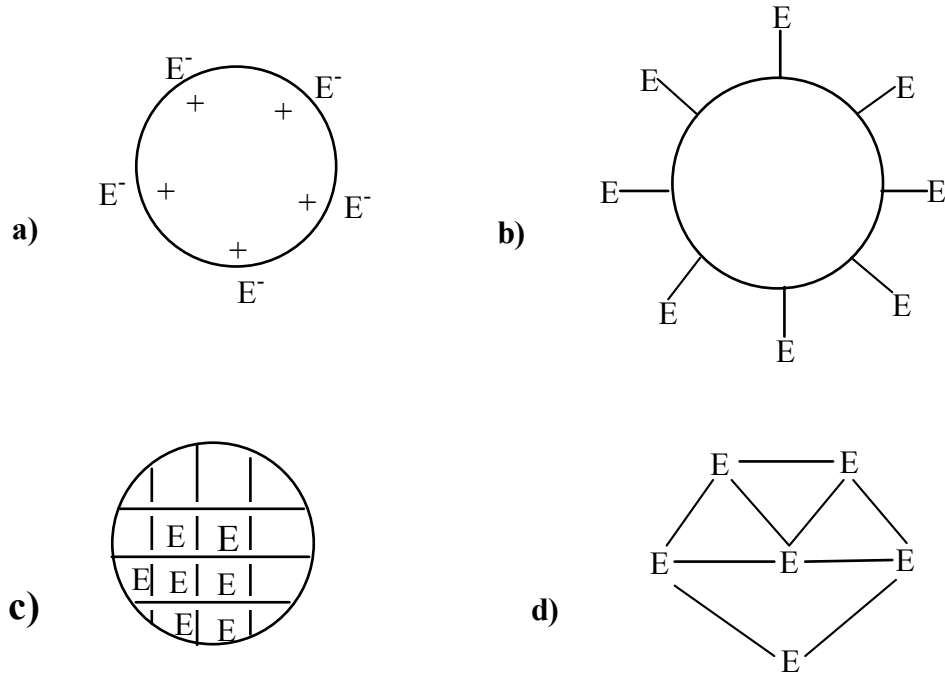
- * Defalarca kullanılabilmekte bu da üretim maliyetini düşürmektedir.
- * İstenildiği anda ortamdan uzaklaştırılması mümkün olduğundan reaksiyonların kontrollü yürütülmesini sağlamaktadır.
- * Serbest enzime göre kararlılığı artmaktadır.
- * Sürekli proseslerde kullanılabilir.

Son yıllarda immobilize enzim sistemleri tedavi amacıyla yapay hücre ve organ yapımında kullanılmaya başlanması bu alanda çok büyük bir aşamadır. Tıp ve eczacılık gibi sağlık alanlarının yanı sıra immobilize enzim sistemleri gıda, çevre ve kimya endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle enzim elektrodların yapımı ile analitik amaçlı kullanımı yaygınlaşmıştır. İmmobilize enzimler organik sentezler gibi çok daha spesifik alanlarda da kullanılmaktadır.

2.5. İmmobilizasyon Metotları

- 1) Adsorbsiyon
- 2) Kovalent bağlanma
- 3) Hapsetme (Entrapment)
- 4) Enzimlerin birbirine bağlanması

Şekil 2.14’de immobilizasyon metotları şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 2.5. Çeşitli immobilizasyon metotlarının şemaları a) Adsorpsiyon b) Kovalent bağlama c) Hapsetme d) Enzimlerin birbirine bağlanması

Bu immobilizasyon tekniklerinden hangisinin seçileceği, enzimin aktivitesine, kararlılığına, cinsine, immobilizasyon amacına, metodun basitliğine ve ekonomik oluşuna göre belirlenir.

Biz çalışmamızda immobilizasyonun fiziksel temele dayalı metodlarından ‘Hapsetme’ yöntemini kullandık.

2.5.1. Hapsetme (Entrapment) ile immobilizasyon

Bu yöntemde enzimler, suda çözünmeyen polimerik matriks veya yarı geçirgen membranlarda hapsedilirler. Bu amaçla kalsiyum aljinat, κ -karojen gibi polimerler kullanılır. Değişik çeşitleri vardır. Polimer matriks içinde immobilizasyon için, enzim çözeltisi polimer çözeltisiyle polimerleşmeden önce karıştırılır. Polimerleşme esnasında enzim molekülleri polimere bağlanmaz ama fiziksel olarak polimerin içinde kalır. Kimyasal bir bağlanma olmaması yöntemin önemli avantajıdır..

Yöntemin dezavantajı substratın polimer kılıfı geçerek polimerin boşluklarına yerleşmiş enzim molekülüne ulaşmasındaki (difüzlenmesindeki) güçlütür, dolayısıyla difüzyon problemi vardır. Anlaşılabileceği gibi substratın büyük moleküllü olması halinde yöntem sonuç vermez. Yöntem küçük moleküllü substratlar için uygundur (15,17,18).

2.5.2. Enzimlerin bakır –alginat ile immobilizasyonu :

Alginatlar

Alginatlar, alginik asit tuzları olup, kahverengi yosunda, hücre içi maddesi olarak bulunurlar (19). Bu deniz bitkilerinin, ortamda belirli divalent katyonların bulunması halinde jel oluşturma özellikleri vardır.

Alginik asit, iki ayrı tipte monosakkaritten meydana gelmiştir. Bunlar α -L-Glukuronik asit (G) ile β -D-Mannuronik asitin (M) $\beta(1 \rightarrow 3 \rightarrow 4)$ şeklinde bağlanmasıyla meydana gelmiştir. O halde alginik asit ve tuzları MM ve GG homopolimer blokları ile düzensiz M ve G birimlerinden oluşan dizelere de sahip blok kopolimerleridir.

Aljinat jelleri enzim immobilizasyonunda antibiyotik üretimi ve çok sayıda organik maddelerin sentezi amacıyla kullanılmaktadır. Ayrıca enzim elektrodların yapımı da bu doğal polimerle başarıyla gerçekleştirilmektedir.

Genellikle hücrelerin immobilizasyonunda kullanılan bu metod enzimler için kullanıldığında bazı özel tekniklerin kullanılması gerekir. Aljinat ile enzimlerin immobilizasyonunda; Sodyum aljinat çözeltisine enzim ilave edildikten sonra, bu çözelti 0,2 M CuCl_2 çözeltisine damla damla ilave edilir. Sodyum aljinat CuCl_2 ile temas ettiğinde Na - Cu değişimi nedeniyle suda çözünmeyen bakır aljinat kürecikleri meydana gelir. Enzim molekülleri serbest halde bu kürecikler içinde bulunur. Zamanla enzim molekülleri bu jellerden dışarı sızarlar. Bu durumu önlemek

için çapraz bağlayıcılar (glutaraldehit, hekzametilen diamin gibi) kullanılmaktadır (15,17,18).

2.6. Reaktörler

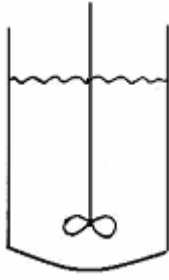
Kimyasal reaksiyonların meydana geldiği kaplara genel olarak reaktör (ya da tepkime kabı) denilmektedir. Başlıca reaktör çeşitleri olarak;

- 1) Süreksiz (kesikli) ve yarı süreksiz (yarı kesikli) reaktörler
- 2) Sürekli karıştırmalı reaktörler
- 3) Sabit yataklı reaktörler

sayılabilir. Özellikle immobilize enzimlerle veya immobilize mikroorganizmalarla çalışılırken kullanılan reaktörler, çoğunlukla sabit ve akışkan yataklı reaktörlerdir.

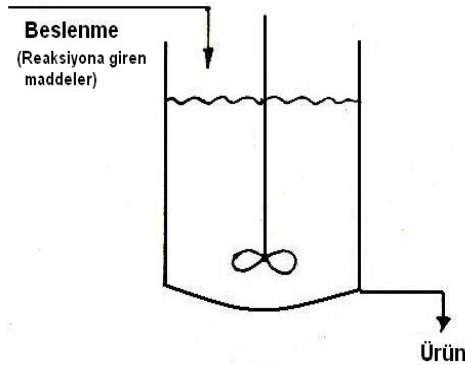
2.6.1. Süreksiz (kesikli) reaktörler

Bu tür reaktörler, genellikle basit bir tepkime kabı veya tepkime tankından oluşmaktadır. Reaksiyona girecek maddeler ve katalizör bu kabın içine konularak istenilen oranda ürün oluşuncaya kadar, uygun koşullarda ve iyice karıştırılarak bekletilir. Reaksiyon bitiminde karışım, reaktörden çıkarılarak istenilen ürünler ayrılır ve saflaştırılır. Bu arada reaktör temizlenerek yeni bir işlem için kullanılmaya hazırlanır. Şekil 2.6' da süreksiz (kesikli) bir reaktörün şeması görülmektedir.



Şekil 2.6. Süreksiz (kesikli) reaktörler

Reaksiyona giren maddelerin yavaş yavaş katıldığı ve zamanla oluşan ürünlerin belirli sürelerde alındığı yarı süreksiz (yarı kesikli) reaktörler de bu grubun alt türü olarak kabul edilmektedir. Şekil 2.7’de böyle bir reaktör şeması görülmektedir.



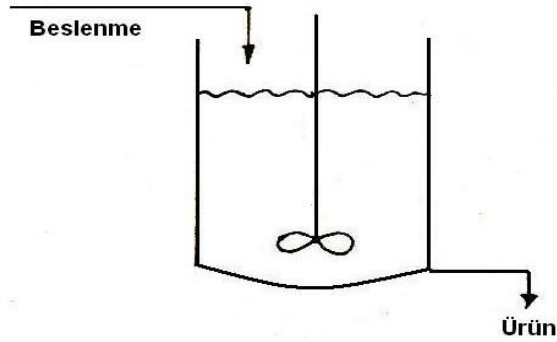
Şekil 2.7. Yarı süreksiz (yarı kesikli) reaktörler

Süreksiz reaktörde istenilen verimde ürün oluşabilmesi için geçen süreye, reaksiyona giren maddelerin reaktörde kalış süresi adı verilir. Bu süre reaksiyonun mekanizması ile hızına, çevresel koşullara, reaksiyon ortamının karıştırılma derecesine ve reaktörün hidrodinamik karakterine bağlıdır.

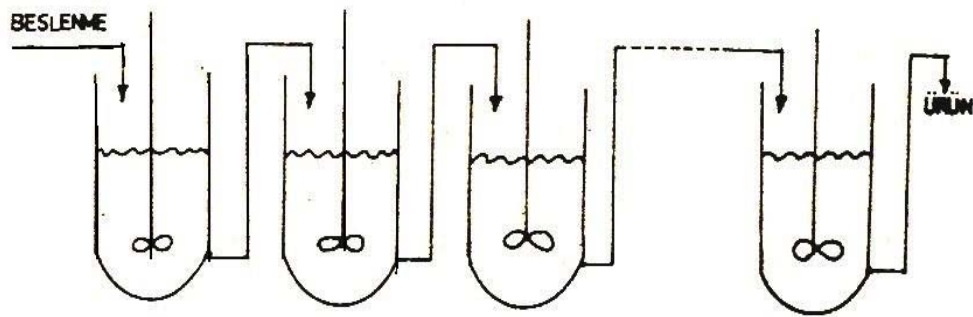
2.6.2. Sürekli karıştırılmalı reaktörler

Bu tür reaktörlerde besleme ile ürün alım işlemleri sürekli olarak yapılmakta ve tepkime sırasında ortamın ideal olarak karıştırılması sağlanmaktadır. Bu ilkeye göre çalışan reaktörler tekli ya da çoklu (dizi reaktörler) olabilir. Dizi reaktörlerdeki hızlı karıştırma, reaksiyon karışımının bir reaktörden ötekine homojen bir şekilde kolayca akmasını sağlamaktadır.

Bu tür reaktörler Şekil 2.8 ve Şekil 2.9' da şematik olarak gösterilmektedir.



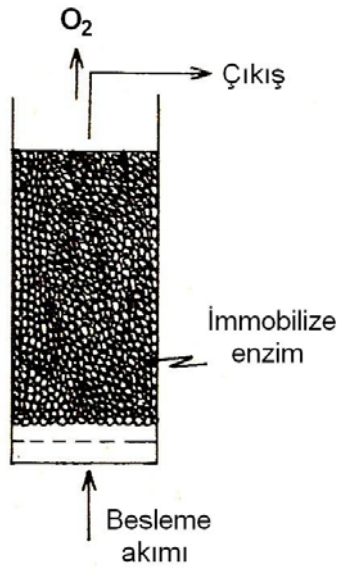
Şekil 2.8. Sürekli karıştırılmalı reaktörler



Şekil 2.9. Sürekli karıştırılmalı n - dizi reaktörler

2.6.3. Sabit yataklı reaktörler

Bu tür reaktörlerde reaksiyona giren maddeler önce karıştırılır ve kolon biçimindeki bir reaktörden pompalanarak kolonun öteki ucundan ürünler alınır.

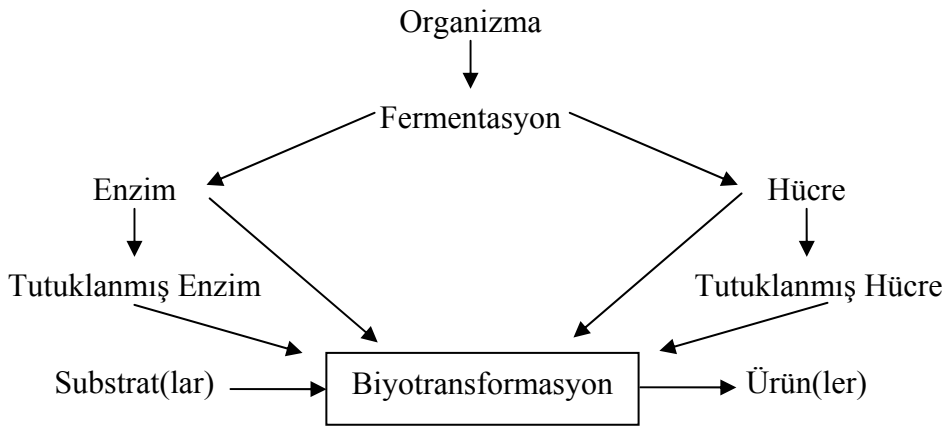


Şekil 2.10. Sabit yataklı reaktörler

Bu tür reaktörler çoğunlukla atık suların arıtılması işlemlerinde kullanılabilmektedir. Ayrıca homojen reaksiyon karışımlarının katalizatörler üzerinde reaksiyona girdiği durumlarda da uygun sonuçlar vermektedir. Bu nedenle, özellikle immobilize enzimler için kullanılır. Bu ilkeye göre çalışan önemli reaktörler arasında yer almaktadır (20).

2.7. Biyotransformasyon

Biyokatalizör olarak enzim ya da mikroorganizma kullanılarak bir A substratından istenen B ürünün bir ya da birkaç basamakta oluşumuna biyotransformasyon denir. Biyotransformasyonun şematik gösterimi şekil 2.11’de gösterilmiştir.



Şekil 2.11. Biyotransformasyonun şematik gösterimi

2.7.1. Biyotransformasyonun özellikleri

1. Tepkime spesifikliği : Enzim tek bir biyotransformasyon tepkimesi gerçekleştirir ve yan tepkimeler olmaz.
2. Bölgesel spesifiklik : Eğer substrat molekülünde eşdeğer birkaç grup ya da benzer reaktif bulunuyor ise enzim belirli bir bölgeyi katalizler.
3. Stereospesifiklik : Enzim aktif merkezi asimetric çevre sağlar. Bu da rasemik substratların enantiyomerleri arasında ayırım yapmaya izin verir. Böylece sadece bir ya da tercih edilen enantiyomerlerden en az olanı katalizlenir.
4. Ilımlı tepkime koşulları : Tepkimenin aktivasyon enerjisi enzim ve substratın ara tepkimeleri ile oldukça düşürülmektedir. Böylece biyotransformasyon en fazla 40 °C sıcaklıkta, yaklaşık nötral pH ve normal basınç altında gerçekleşmektedir. Hatta kararsız moleküller diğer yan tepkimeler ya da arzu edilmeyen bozunmalar olmaksızın gerçekleşmektedir.

2.7.2. Biyotransformasyon tepkimeleri

Optikçe aktif bileşenlerin üretilmesi: Biyotransformasyon proseslerin pek çoğunda optikçe aktif (kiral) moleküllerin oluşumu söz konusudur. Kimyasal üretimler sonunda rasemik karışımlar elde edilir. Bu karışımdan optikçe aktif olan bileşenin ayrılması enzimler yoluyla olur. Mikroorganizma kullanılarak yapılan üretim sonucu ise tek bir enantiyomer elde edilir.

Rasemik karışımların ayrılması: Rasemik karışımların enantiyomerlerini ayırmak için enantiyoseçimli enzimler kullanılmaktadır. Kimyasal yöntemlerle bu ayırmanın yapılabilmesi oldukça zordur. İki enantiyomerin birbirinden ayrıldığı ayırma proseslerinde, istenen enantiyomerin maksimum verimi % 50 ile sınırlıdır. Rasemik karışımda istenmeyen enantiyomer rasemizasyonla istenilen enantiyomere dönüştürülür. Hidrolitik enzimlerin çoğu, enantiyoseçimli hidroliz ile rasemik bir karışımın ayrılması sonunda optikçe aktif bileşenlerin elde edilmesinde kullanılmaktadırlar.

Benzer reaktif gruplar arasındaki fonksiyonel grup seçimi: Kimyasal tepkimelerle karşılaştırıldığında enzimler aynı moleküldeki benzer reaktif fonksiyonel gruplar arasında seçim yapabilirler.

Seçimli olarak yapıya fonksiyonel grup katılması: Mikrobiyal tepkimelerle, seçimli olarak yapıya istenilen pozisyonda fonksiyonel gruplar katılabilir. Bu işlemi kimyasal yöntemlerle yapmak çok güçtür.

Ilımlı tepkime koşulları: Kimyasal tepkimeler birkaç adımda gerçekleşirler ve çevre için zararlı yan tepkimeler oluşturabilirler. Tepkime koşulları ılımlı değildir. Bunun aksine biyotransformasyon proseslerinde tepkime, ılımlı koşullarda ve tek bir adımda gerçekleşmektedir.

Mutasyon ile biyosentez: Mutasyona uğratılan mikroorganizmalar ile gerçekleştirilen biyokimyasal tepkimelerdir.

2.7.3. Biyotransformasyon türleri

Biyotransformasyonlar, büyüyen hücreler, önceden büyütülmüş hücreler, tutuklanmış hücreler ya da saf enzimler ile gerçekleştirilebilirler.

Büyüyen hücreler ile biyotransformasyon: Mikrobiyal üreme sırasında tepkime ortamına eklenen substrat için optimum ekleme zamanı belirlenmelidir. Biyotransformasyon, aşılama sonras maksimum verime ulaşınca kadar sürdürülmelidir.

Önceden büyütülmüş hücreler ile biyotransformasyon: İlk adımda mikroorganizma optimum koşullar altında çoğalır. Biyokütle, filtrasyon ile ya da santrifüj ile ayrılır. İkinci adımda hücreler substrat içeren optimum pH değeriindeki destek çözeltisi ya da su eklenerek süspansiyon hale getirilir. Bu sistemin avantajları şunlardır;

- * Substratın ya da ürünün mikroorganizma büyümesine olan negatif etkisi ortadan kaldırılır.
- * Her adımda substrat optimizasyonu yapılmaktadır.
- * Ortam bileşenleri mikroorganizma kontaminasyonuna neden olmaz ve steril olmayı gerektirmez.
- * Optimum dönüşüm oranını hızını veren hücre derişimi kolaylıkla belirlenir.
- * Ortam karmaşık olmadığından ürün uzaklaştırması kolaydır.

Tutuklanmış hücreler ile biyotransformasyon: Tutuklanmış hücreler ile gerçekleştirilen biyotransformasyonlar, serbest hücreler ile gerçekleştirilenlere göre daha kararlı işletme olanağına sahiptir. Tutuklanmış hücreler biyotepkime ortamından kolayca kolaylıkla uzaklaştırılabilir ve tekrar kullanılabilirler. Tutuklanmış biyokütle ortamda tutulabiliyorsa biyotransformasyon sürekli olarak gerçekleştirilebilir. Ürün oluşum hızı yüksektir ve inhibisyon etkisi minimumdur. Böylece biyokatalizörün kararlılığı ve maksimum etkinliği korunur. Tutuklamanın ek maliyet getirmesi ve difüzyon kısıtlamaları bu yöntemin dezavantajlarındandır.

Saf enzimler ile biyotransformasyon: Biyotransformasyonda saf enzim kullanımının nedenleri aşağıda belirtilmiştir;

1. Hücre membranı uygun substrat ve ürünün geçmesini önlüyor ise,
2. Ürünlerin bozunmasına ya da arzu edilmeyen yan tepkimelere diğer enzimlerin varlığı neden oluyor ise,
3. İlgili enzim hücre tarafından salgılanıyor ve biyokütleden uzaklaştırıldıktan sonra kolayca saflaştırılabilir ise,
4. Enzim hayvan ya da bitki dokularından elde ediliyor ise,
5. Kullanılan enzim ticari bir kullanıma sahip ise.

Enzim saflaştırma işlemi uzun zaman alan, yorucu ve pahalı bir yöntemdir ve hücrenin parçalanması, ekstraksiyon, deriştirme, fraksiyonlama, çöktürme ve kurutma gibi basamakları gerektirir.

Çok fazlı sistemler ile biyotransformasyon: Çok fazlı sistemlerin avantajları genel olarak aşağıdaki gibidir:

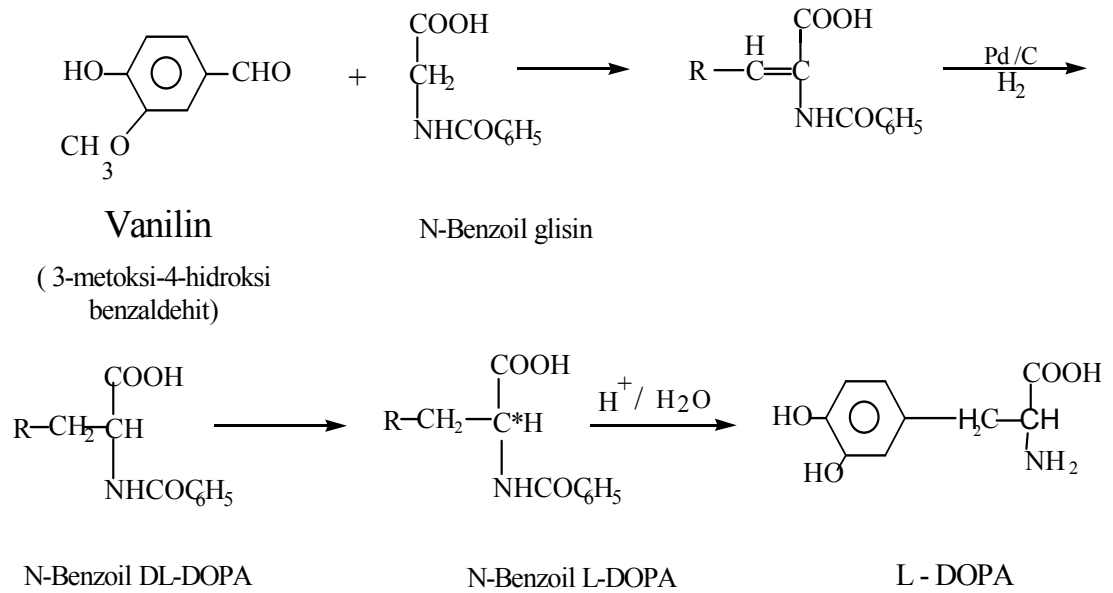
1. Sudaki çözünürlüğü düşük olan substrat ve/ya da ürünlerin yüksek derişimlerinde çalışılır.
2. Tepkime dengesi, ilgili fazlar arasında ürün ve substrat dağılımı ile değıştirilebilir.
3. Su aktivitesinin azalmasıyla tepkime dengesi değışir.
4. Substrat ve ürün inhibisyonu azaltılır.
5. Biyokatalizör ya da ürün uzaklaştırma kolaydır.
6. Mikroorganizma bulaşma riski düşüktür.
7. Biyokatalizörler daha kararlıdır.
8. Tepkime hızı yüksektir.

Farklı mikroorganizmalarla katalizlenen ardışık biyotransformasyon adımının birleştirilmesi: İki ardışık basamak gerektiren biyotransformasyon farklı mikroorganizmalar tarafından katalizlenebilir. Bazı ardışık biyotepkimeler tek bir biyoreaktörde mikroorganizma karışımı kullanımı ile gerçekleştirilebilir (21).

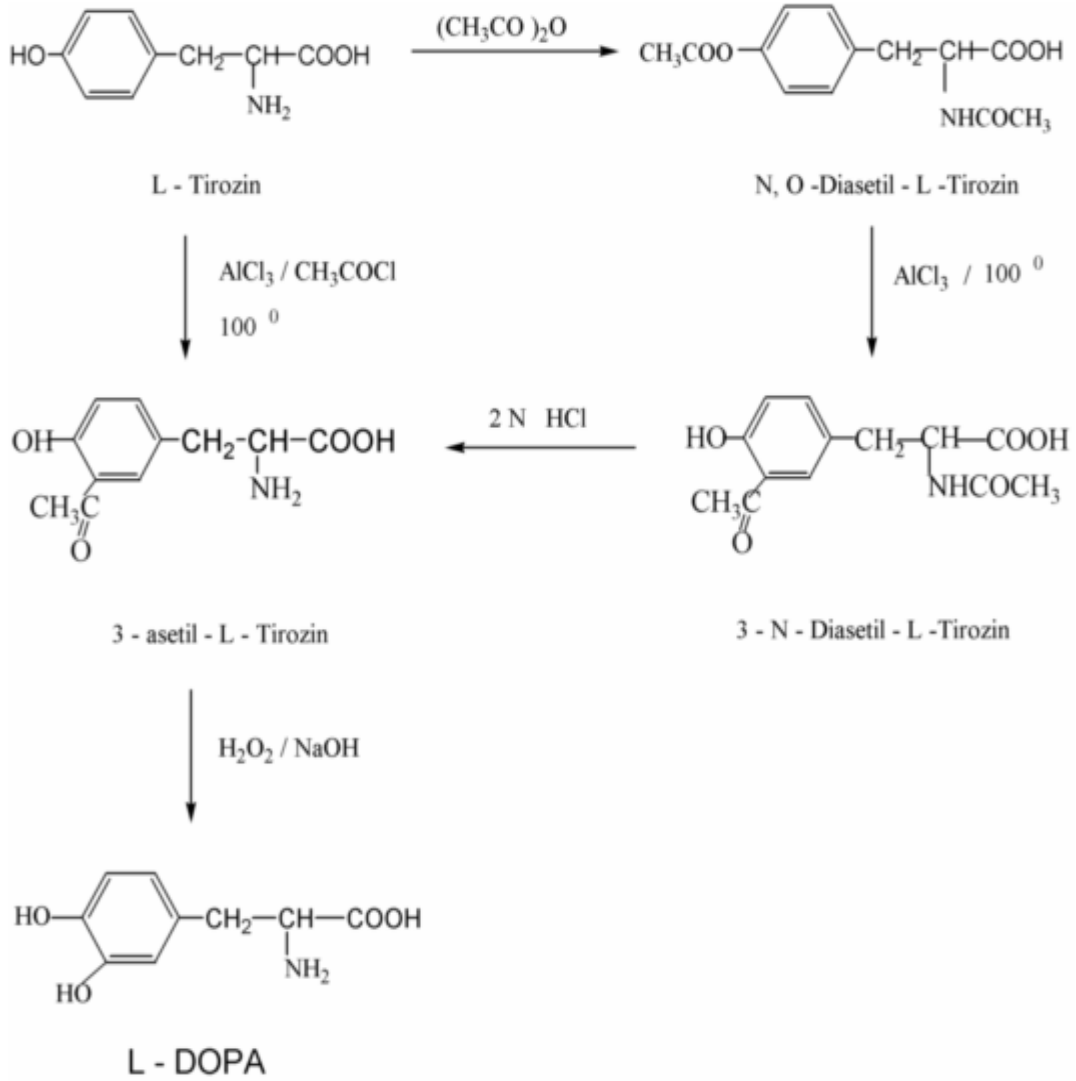
2.8. L – DOPA Üretim Çalışmaları

2.8.1. Kimyasal yolla yapılan L – DOPA üretim çalışmaları

DOPA, asimetrik C atomu taşıdığından, DL enantiyomerlerine sahiptir. D - formunun ilaç olarak etkinliği yoktur, hatta alınması halinde yan etkileri gözlenebilir. Bu nedenle sadece DOPA'nın L-enantiyomerini elde etmek için çalışmalar yapılmaktadır (22,23). Şekil 2.12'de Vanilin'den ve Şekil 2.13'de L-Tirozin'den L-DOPA üretim mekanizması görülmektedir.

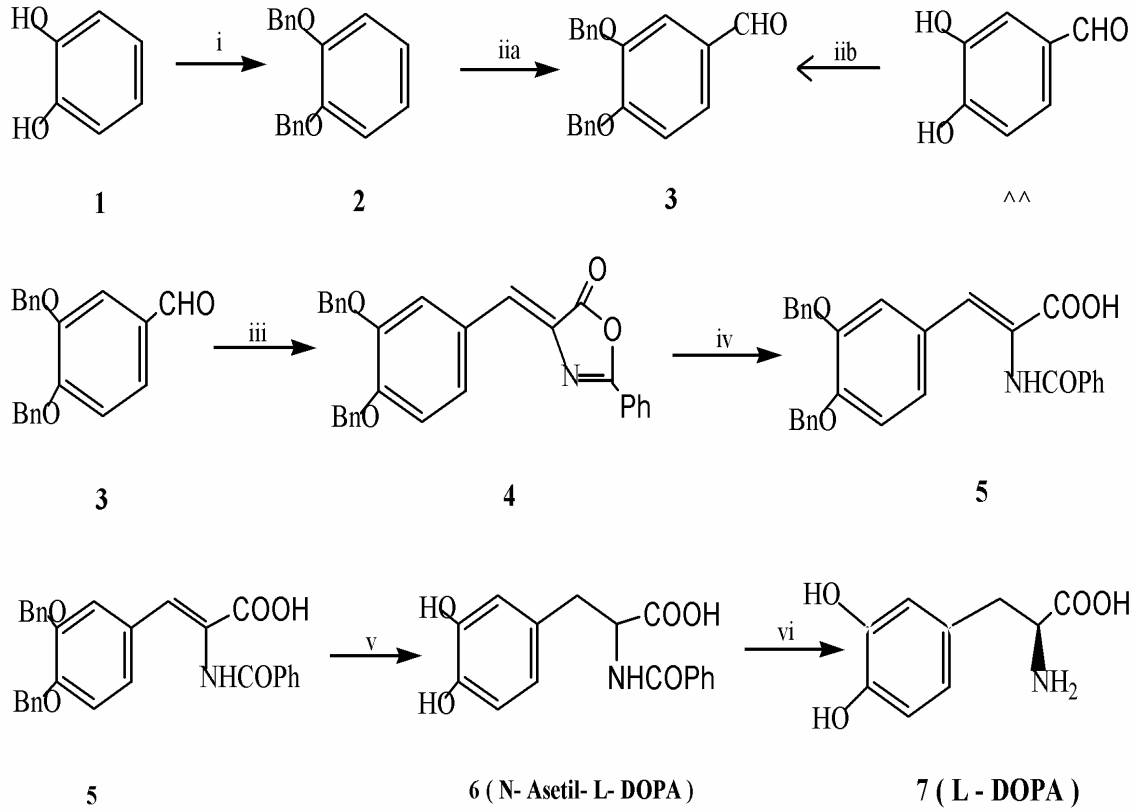


Şekil 2.12. Vanilin'den, L-DOPA üretim mekanizması



Şekil 2.13. L-Tirozin'den L-DOPA üretim mekanizması

Kimyasal olarak, L- izomerini elde etme çalışmalarından biriside asimetrik kataliz kullanmaktır. Asimetrik kataliz kullanılan çalışmalar çok basamaklı ve zahmetlidir. Asimetrik kataliz olan bu çalışmada, Sinkonin - Pd / C kullanılmıştır. Şekil 2.14'de asimetrik indirgenme yolu ile L-DOPA üretimi görülmektedir.



Şekil 2.14. Asimetrik indirgenme yolu ile L-DOPA üretimi

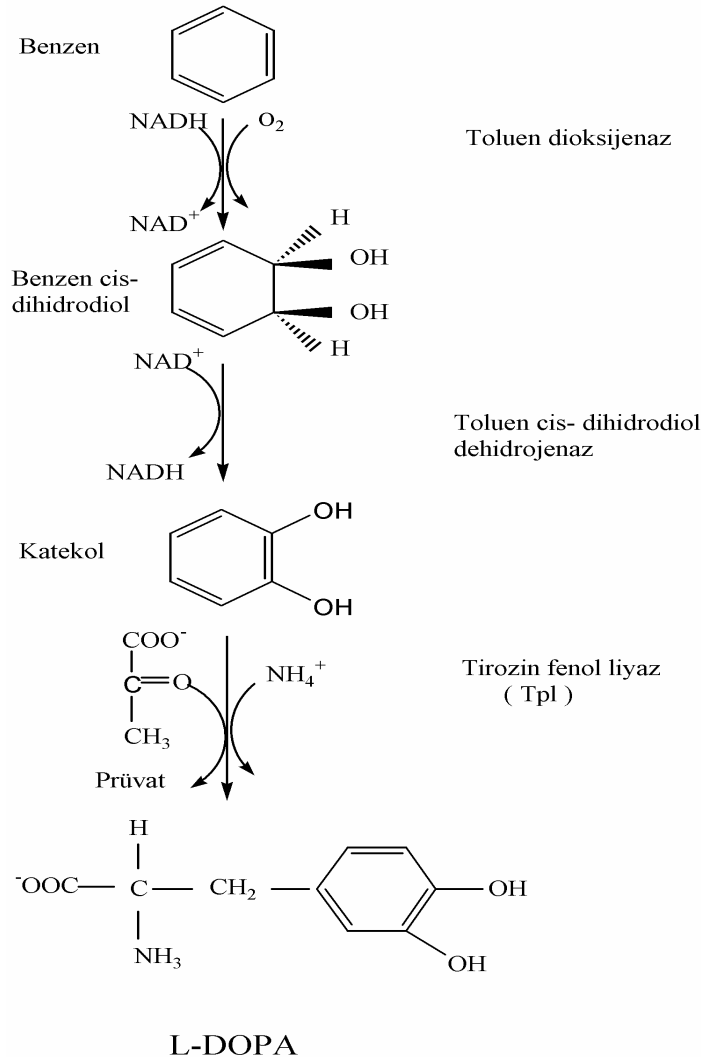
(i: aseton / K_2CO_3 , BnCl, % 75 ; iia: DMF, $POCl_3$, % 42 ; iib: DMSO, NaH % 80, mineral yağı, BnCl₂, % 40 ; iii: Ac_2O , NaOAc, N- benzoilglisin, % 77 ; iv: a- NaOH, 2 M, b- HCl, %93 ; v: THF, Pd / C, sinkonin, H_2 , % 65 ; vi: HBr, % 60)

L – DOPA üretiminde diğer bir yol da, bitkisel kaynaklardan *Vicia faba* ve *Mucuna pruriens* gibi bakla türlerinin organik çözücüyle ekstraksiyonudur (24-26).

2.8.2. Hücre kullanılarak yapılan L – DOPA üretim çalışmaları

Her ne kadar ihtiyacı karşılamak için L-DOPA üretiminin çoğu kimyasal olarak yapılsa da, son zamanlardaki araştırmalar , tirozinaz ve tirozin hidroksilaz enzimlerinin kullanıldığı enzimatik, *Escherichia coli* ve *Erwinia herbicola* 'nın kullanıldığı mikrobiyolojik üretimine yoğunlaşmıştır.

Ucuz bir hammadde olan benzenden L - DOPA üretimi toluen dioksijenaz, toluen cis - glikol dehidrojenaz ve tirozin fenol liyaz (Tpl, EC 4.1.99.2) enzimlerini içeren *E.coli* kullanılarak, hibrid metabolik yolları gerçekleştirmiştir. Bu yöntemde, toluen dioksijenaz ve toluen cis – glikol dehidrojenazın ardışık aktivitesi ile benzenden katekol sentezlendi. Ancak benzenin hücreler üzerindeki toksik etkisi nedeniyle 4 saatlik sürede 3 mM' dan daha az sentezlendi . Bu yüzden benzene karşı daha dirençli olan *Pseudomona aeruginosa* alternatif olarak kullanıldı ve L – DOPA üretimi 9 saatlik sürede 14 mM olarak elde edilmiştir (27). Şekil 2.15'de Benzen'den L-DOPA üretiminin hibrit yolu görülmektedir.



Şekil 2.15. Benzenden, L-DOPA üretiminin hibrit yolu

L – DOPA iki hidroksil grubu taşıyan bir fenolik asittir ve filizlenmekte olan bakla tohumlarında oldukça bol bulunan sekonder metabolittir. Bakla (*vicia faba*) bitkisinin tohum, kabuk ve meyveleri yüksek oranda fenolik asit içerir. Ultraviyole ışınlarına maruz bırakılarak yetiştirilen bakla tohumlarında, pentoz - fosfat yolunun ilk basamağında görevli bir enzim olan Glukoz -6 - fosfat dehidrojenaz (G6PDH) uyarılır. Böylece pentoz - fosfat yolunun çalışması ile, fenolik bileşiklerin ve L - DOPA'nın üretimi de artırılmış olmaktadır (28).

Her yıl 250 tonun üzerinde L - DOPA üretilmektedir. Bu miktarın yaklaşık yarısı Tirozin fenol liyaz (Tpl, EC 4.1.99.2) aktivitesine sahip *Erwinia herbicola*

hücreleri kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Tpl enzimi L-Tirozin içeren ortamlarda sentezlenir ve bu yüzden hücreler çoğalırken ortama L - Tirozin eklenmesi zorunlu hale gelmektedir. Ortama eklenen L - Tirozin , son ürün olan L – DOPA'yı kirletir. Böylece reaksiyon karışımından L - DOPA'nın ayrılması gerekir. Bu dezavantajı önlemek için, genetik yapısı değiştirilen *E.herbicola* hücreleri kullanılmaktadır.

Rekombinant *E.herbicola* hücrelerinin L - Tirozin eklenmeden önemli seviyede L - DOPA ürettiği gözlenmiştir ($12 \text{ g L}^{-1}\text{sa}^{-1}$). Bu miktar L – Tirozin içeren ortamda gelişen hücreler için ($15 \text{ g L}^{-1}\text{sa}^{-1}$)' dir (29).

L-DOPA , *Mucuna pruriens* gibi bitki hücreleri kullanılarak da üretilmektedir (30,31).

2.8.3. Enzim kullanılarak yapılan L – DOPA üretim çalışmaları

Mikrobiyolojik üretimde hücreler tarafından üretilen hormon ve proteinlerin ortamda bulunması nedeniyle ürün saf değildir; oysa enzimatik üretimde üretim çok daha ekonomik ve istenilen ürün saf olarak elde edilir (32).

1984 yılında Vilanova ve Iborra kurbağa derisinden izole ettikleri, tirozinaz enzimini Enzacryl - AA ve CPG - AA (poliakrilamit ve gözenekli cam destekler) üzerine immobilize etmişlerdir. Immobilize enzimin kararlılığını değişik özellikteki reaktörlerde incelemişlerdir (33).

1996 yılında Pialis ve Saville Nylon 6,6 membranına tutuklanan mantar tirozinaz enzimi ile tirozinden L - DOPA üretimini kesikli reaktörde çalışmışlardır. Tirozinaz enzimi çapraz bağlayıcı glutaraldehit kullanarak Nylon 6,6 üzerine immobilize edilmiştir. Bu çalışmada 500 mL hacimdeki kesikli reaktörde 170 saatte L - DOPA ($1,70 \text{ mg/ L.sa}$) üretilmiştir (34).

2000 yılında Carvalho ve arkadaşları kitozan jellerine tirozinaz enzimini kovalent bağlama yöntemiyle immobilize etmişlerdir. Kesikli reaktörde L-DOPA üretimi (53,97 mg / L.sa) gerçekleştirilmiştir (35).

2002 yılında Seetharam ve Saville zeolit üzerine tirozinazı immobilize etmişler ve kesikli reaktörde 31 - 36 mg/ L.sa aralığında L – DOPA üretimini gerçekleştirmişlerdir (32).

2002 yılında Munjal ve Sawhney jelatin, bakır alginat ve poliakrilamit jellere, mantardan elde ettikleri tirozinaz enzimini immobilize etmişlerdir. İmmobilizasyon verimleri jelatin için % 88, bakır aljinat için % 67 ve poliakrilamit için % 57 olarak saptanmıştır. Reaktörde L – DOPA üretimi araştırılmamıştır. Bu çalışmada Ca^{+2} , Cu^{+2} , Ba^{+2} aljinat olmak üzere üç farklı immobilizasyon çalışılmıştır. En yüksek immobilizasyon aktivitesi % 67 verimle Cu alginatta gözlenmiştir (36).

2003 yılında Ho ve arkadaşları polistiren üzerine glutaraldehit çapraz bağlayıcı kullanarak, kovalent bağlama yöntemiyle immobilize işlemini gerçekleştirmişlerdir. 50 mL' lik kesikli reaktörde 36 saat sonunda 30 °C' de L - DOPA (1,4 mg / L.sa) üretmişlerdir (37).

2003 yılında Sharma ve arkadaşları tarafından tirozinaz enzimi jelatine hapsetme yöntemi ile immobilize edilmiştir. İmmobilizasyon verimi % 98'dir. Bu çalışmada immobilize tanecikler L - DOPA üretiminde kullanılmamıştır (38).

3. KULLANILAN MATERYAL VE METOTLAR

3.1. Materyaller

L – Tirozin, L – DOPA, Tirozinaz, Glutaraldehit, Na - alginat Sigma firmasından, HAc (Asetik asit), $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$, Na_2HPO_4 , H_3PO_4 , NaOH, Askorbik asit, Katekol, CuCl_2 , Tris (Hidroksimetil aminometan) Merck firmasından temin edildi.

Absorbans ölçümleri için Shimadzu-1601 model UV/VIS spektrofotometre, pH ölçümleri için Jenco 6173 model pH-metre, Libror EB-330 HU model analitik terazi, Perista Bio-minipump marka peristaltik pompa, kolonunu sıcaklığını sabit tutmak için Haakecaon – Haakp5 marka sirkülatör, Nüve ST 400 markalı çalkalamalı su banyosu, Spectra System marka HPLC cihazı ve HPLC’de kullanılan hareketli fazın vakum altında süzüldüğü Nuçe hunisi ve erleni kullanıldı.

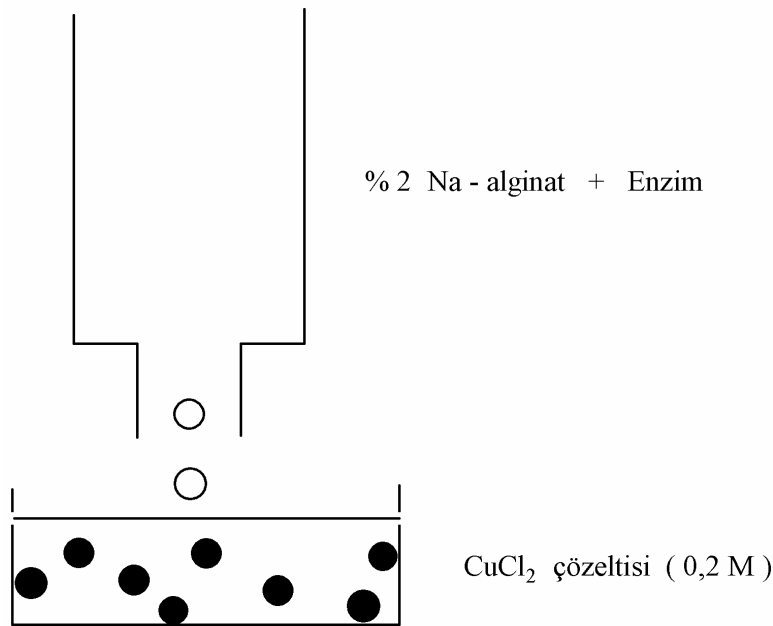
3.2. Enzim Aktifliğinin Ölçülmesi

Enzim aktifliği birimi olarak 420 nm’de bir dakikada absorbansta 0,001 birimlik değişime neden olan enzim miktarı alındı ve bu ünite (IU) olarak tanımlandı. Tirozinaz enziminin aktifliği ölçülürken 0,1 mL enzim çözeltisi alındı ve üzerine 2,9 mL 10 mM’lık katekol çözeltisinden eklendi. 1 dakika sonra 420 nm de absorbans okundu (6).

3.3. Enzim İmmobilizasyonu – Cu-Alginat Taneciklerin Hazırlanması

% 2’ lik (w/v) Na-alginat, 3 mL saf su içinde, magnetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılarak, homojen bir karışım elde edildi. Bu homojen karışım içine 2 mL (1,650 Ünite/ mL) enzim çözeltisi ilave edildi. Bir ucuna 2 mL’lik pipet takılan peristaltik pompa yardımıyla, 10 mL, 0,2 M CuCl_2 çözeltisinin içine, Na – alginat + Enzim çözeltisi yavaş yavaş damlatıldı. Düzgün küresel tanecikler oluşturabilmek için, CuCl_2 çözeltisinin karıştırılma hızı, peristaltik pompa hızı ve pipet damlatma yüksekliği ayarlandı. Na – alginat, CuCl_2 çözeltisi ile temas

ettiğinde Na – Cu değişimi nedeniyle suda çözünmeyen 3 mm çapında küresel bakır- alginat tanecikleri oluşturuldu. Elde edilen bakır -alginat tanecikleri, 0,2 M CuCl_2 çözeltisi içinde 2 saat boyunca (+ 4 °C)' de buzdolabında bekletildi. 2 saatin sonunda, 3 kez saf su ile yıkanıp süzildükten sonra, çapraz bağlayıcı % 1' lik glutaraldehit çözeltisi içinde 3 dk bekletildi. Böylece taneciklerin daha kararlı olmaları ve enzimlerin jellerin arasından sızmaları engellenmiş oldu. Tanecikler, glutaraldehit çözeltisinden alındı, saf su ile yıkandı ve iyice süzildükten sonra tartıldı. Bu şekilde 2,46 g bakır- alginat tanecikler elde edildi. Böylece Tirozinaz enzimi 'hapsetme' yöntemi ile bakır – alginat jeller içine immobilize edilmiş oldu. Şekil 3.1'de Na-alginat ile enzim immobilizasyonu şekli görülmektedir.



Şekil 3.1. Na- alginat ile enzimlerin immobilizasyonu

3.4. L – DOPA Üretim Koşulları

3.4.1. Çalkalamalı erlenlerde serbest enzim kullanılarak L – DOPA üretim koşulları

L- DOPA üretimi için 2,5 mM L-Tirozin, 2,5 mM Askorbik asit, 0,02 M CuCl₂ ve değişik hacimlerde serbest enzim içeren (aktivitesi: 0,283 ünite/mL), 25 ml'lik çözelti kullanıldı. Üretim 22° C 'de 130 rpm'de çalkalamalı erlenlerde (kesikli sistem) gerçekleştirildi. 1 saat boyunca belirli aralıklarla örnekler alındı. HPLC'de analizi yapılarak, üretilen L-DOPA derişimi hesaplandı.

3.4.2. Çalkalamalı erlenlerde immobilize enzim kullanılarak L – DOPA üretim koşulları

L- DOPA üretimi için L-Tirozin, Askorbik asit, CuCl₂ ve 2 g immobilize enzim içeren 25 mL'lik çözelti kullanıldı. Üretim 22 °C'de 100 rpm'de çalkalamalı erlenlerde gerçekleştirildi. 1 saat boyunca belirli aralıklarla örnekler alındı. HPLC' de analizi yapılarak, üretilen L-DOPA derişimi hesaplandı.

3.4.3. Sabit yataklı reaktörde L – DOPA Üretim koşulları

Bu çalışmada, 15 cm boyunda, 1 cm çapında ve 12 cm³ hacminde, çift cidarlı sabit yataklı reaktör kullanıldı. 9,706 g Cu-Alginat tanecikler bu reaktör içine dolduruldu. Substrat çözeltisi olarak; pH 7,2 olan Tris-HCl tamponunda çözerek hazırladığımız eşit hacimlerde ki 2,5 mM L-Tirozin, 2,5 mM Askorbik asit kullanıldı. Bu çözeltiye 0,02 M CuCl₂ katı halde eklendi. CuCl₂, Cu-Alginat jellerinin dayanıklılığını sağlamak için kullanılmıştır. Substrat çözeltisi 0,6 mL /dak akış hızıyla bir peristaltik pompa vasıtasıyla sabit yataklı reaktöre verildi. Diğer taraftan, sıcaklığın 22 °C'de kalmasını sağlayan bir sirkülatör sabit yataklı reaktöre bağlandı. Aynı çalışma, ortama 1500 mL / dak akış hızı ile hava verilerek tekrarlandı. Kullanma işlemlerinin sonunda her seferinde, Tris-HCl tamponunda çözünmüş askorbik asit ve

CuCl_2 çözeltisi reaktörden geçirilerek Cu-Alginat tanecikler yıkandı. Tanecikler, Tris-HCl tamponunda çözünmüş CuCl_2 çözeltisi içinde, buzdolabında ($+4^\circ \text{C}$)'de bekletildi. Toplam 1,5 saat süre içinde belirli zamanlarda alınan örnekler, Çizelge 3.1 de özellikleri verilen HPLC'de analizlendi. Elde edilen kromatogramlardan, üretilen L-DOPA derişimleri hesaplandı. Kullanılan düzenek Resim 3.1'de gösterilmektedir.



Resim 3.1. Sabit yataklı immobilize enzim reaktörü

3.5. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi, bir kolona silikajel gibi bir adsorban koymak ve ayrılacak bileşiği bir sıvı fazla beraber tabii akışıyla bu kolondan geçirmek suretiyle yapılan kolon kromatografisinden kavram olarak çok farklıdır. Burada taşıyıcı sıvı, pompalarla kolona basılarak yüksek hareketli faz hızı sağlanmakta, ayırma çabuk ve tam olarak gerçekleşmektedir. Ayrılan bileşik, kolon çıkışına bağlanan uygun bir dedektörle tespit edilip kaydedilmektedir. Böyle yüksek hızda gerçekleştirilen ayırmaların yapıldığı sıvı kromatografi sistemlerine "yüksek işlevli sıvı

kromatografisi " denir. (İng. High Performance Liquid Chromatography, HPLC) Çok yaygın kullanım alanı olan HPLC’ de analizlenebilecek bazı maddeler arasında vitaminler, lipid peroksitleri, ilaç ve katekolaminler sayılabilir (39).

3.6. Analiz Yöntemi

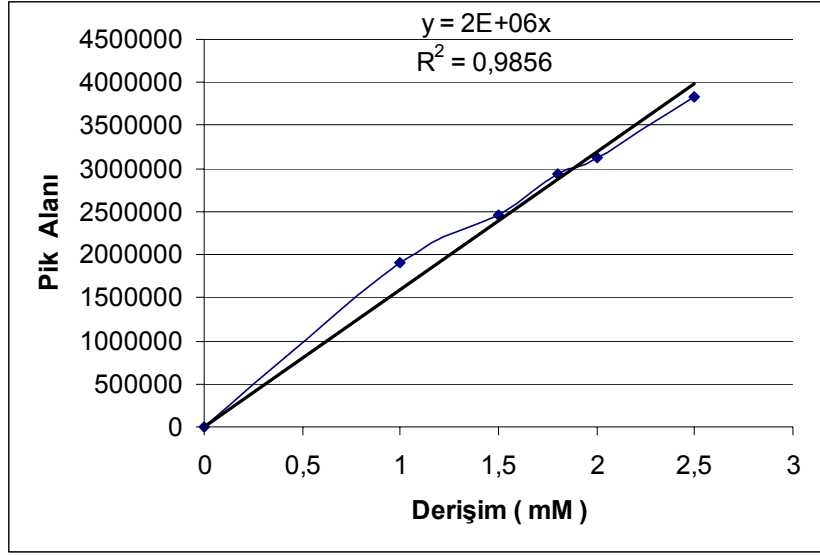
Çalışmada kullanılan HPLC sisteminin özellikleri çizelge 3.1’de verilmiştir. Hareketli faz olarak, pH 2,5 olan 25 mM fosfat tamponu kullanıldı. Hareketli faz, analize başlamadan önce, kolonu korumak amacıyla vakum altında süzüldü.

Çizelge 3.1 HPLC özellikleri

HPLC	Kolon	Çözücü	Akış Hızı	Enjeksiyon Hacmi	Kolon Sıcaklığı	UV Dedektör Dalga boyu
Spectra SYSTEM	Polaris C – 18 A	25 mM pH: 2,5 Fosfat Tamponu	1 mL/dak	5 µL	25 °C	270 nm

3.7. L - DOPA Kalibrasyon Grafiği

2,5 mM 50mL stok L - DOPA çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden seyreltme yapılarak 0,5 mM / 0,7 mM / 1 mM / 1,5 mM / 1,8 mM / 2 mM / 2,5 mM 10 mL’lik L - DOPA çözeltileri hazırlandı. Her birine 0,02 M CuCl₂ katı olarak eklendi ve çözüldü. Daha sonra HPLC’ de 5 µL enjeksiyon hacmi, 1 mL / dk akış hızı ve 270 nm UV dedektör dalga boyunda pik alanları okundu. Şekil 3.2’ deki derişim – pik alanı grafiği çizilerek, L-DOPA kalibrasyon grafiği oluşturuldu.

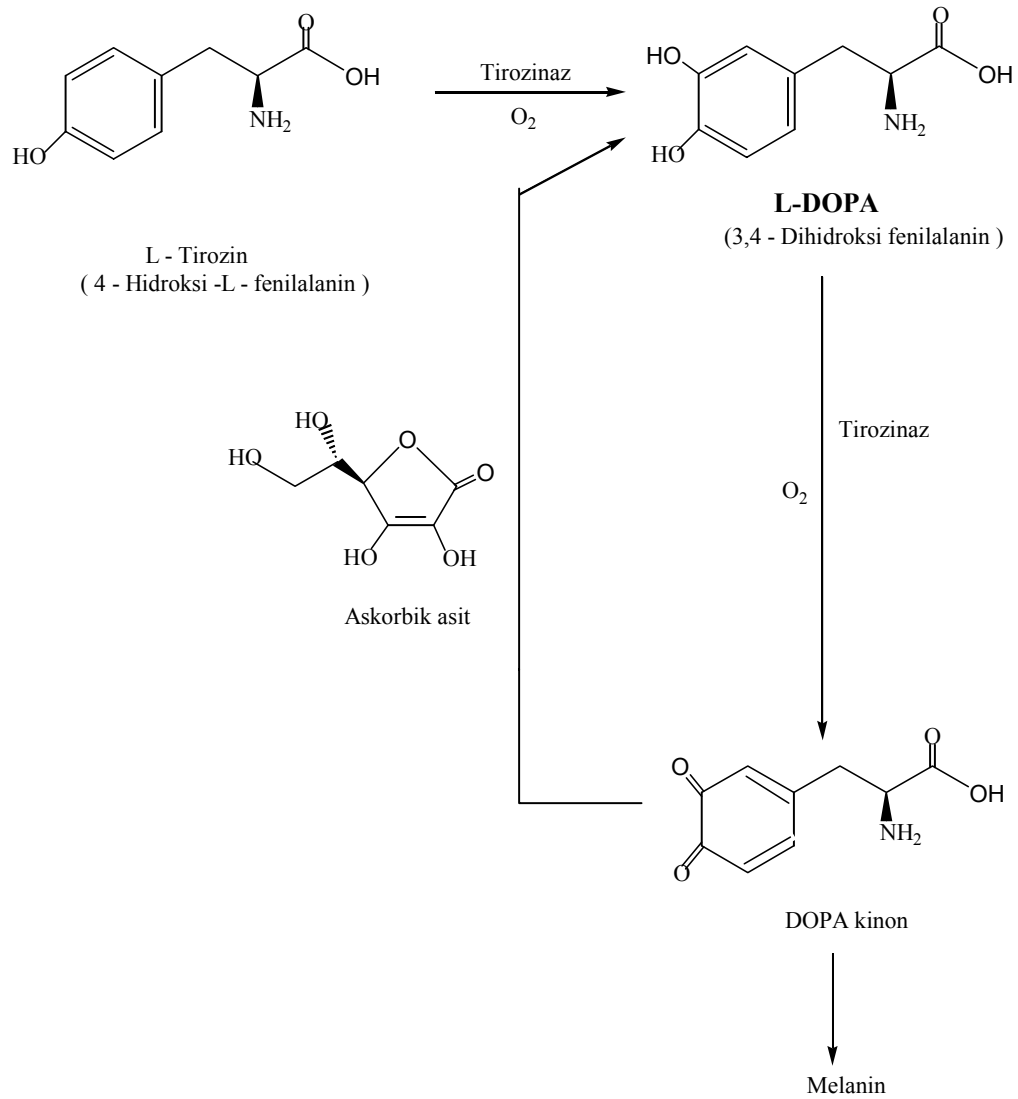


Şekil 3.2. L-DOPA kalibrasyon grafiğı

4. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

4.1. L – DOPA Üretimi

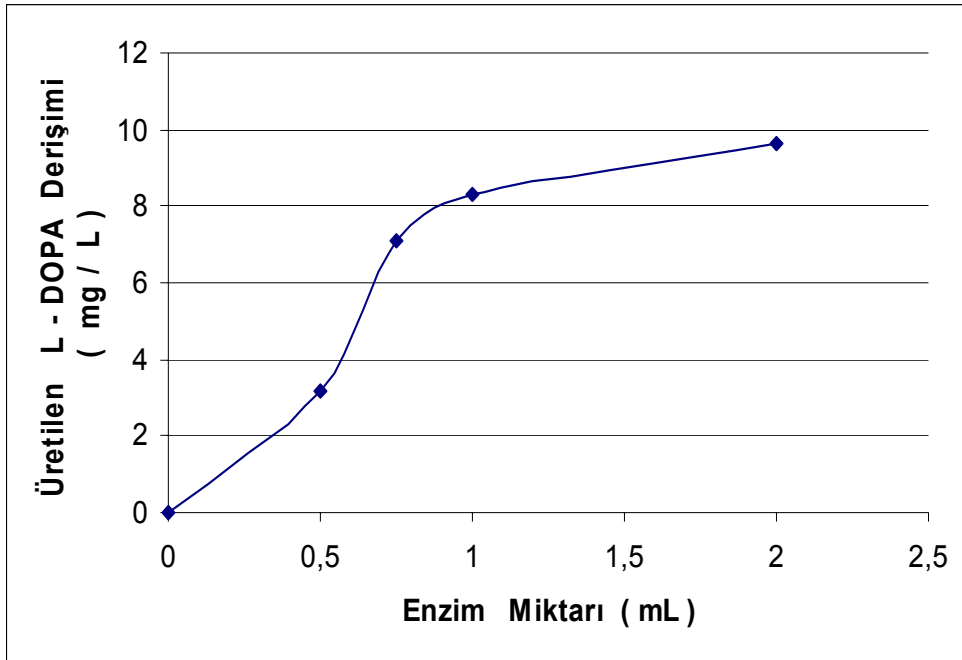
L – DOPA üretimi bölüm 3.4’de belirtilen koşullarda gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon denklemi aşağıda verilmiştir. Denklemden de görüldüğü gibi askorbik asit DOPA kinon ve melanin oluşumunu engellemektedir. Şekil 4.1’de askorbik asitin L-DOPA oluşumundaki etkisi görülmektedir.



Şekil 4.1. L-Tirozin’den L-DOPA oluşumunda askorbik asitin etkisi

4.1.1. Çalkalamalı erlenlerde serbest enzim kullanılarak L – DOPA üretimi

Bölüm 3.4.1’de anlatıldığı şekilde, serbest enzim kullanılarak çalkalamalı erlenlerde L – DOPA üretimi gerçekleştirildi. Bunun için, ayrı ayrı 0,5 mL / 0,75 mL / 1 mL / 2 mL hacimlerdeki tirozinaz enzimi ortama ilave edildi. Alınan örneklerin, Bölüm 3.6’da belirtilen HPLC analiz yöntemi ile kromatogramları alındı. Üretilen L – DOPA derişimleri hesaplandı. Şekil 4.2’de enzim miktarlarına karşı üretilen L – DOPA derişimleri grafiğe geçirildi.

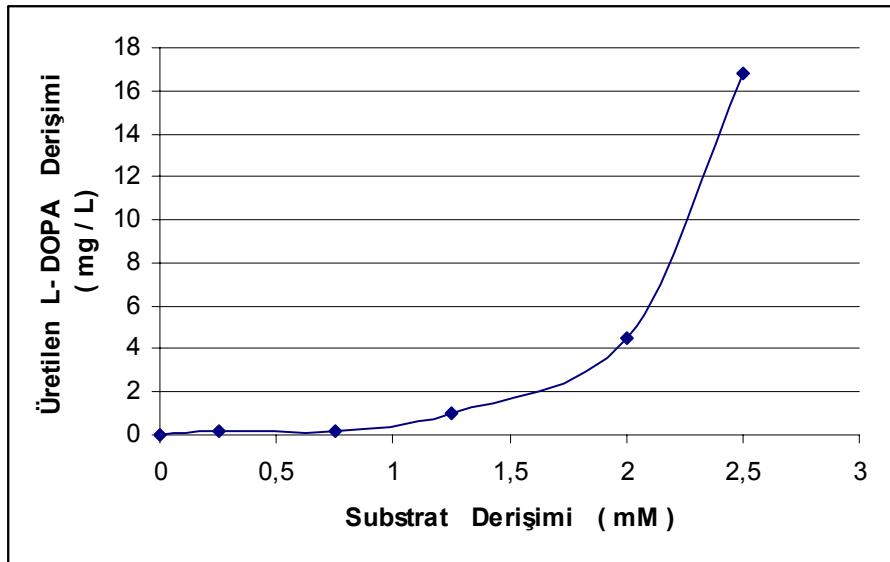


Şekil 4.2. L – DOPA üretiminin enzim miktarı ile ilişkisi (Substrat Derişimi: 2,5 mM, T: 22 ° C, V: 50 mL)

Grafikten de görüldüğü gibi enzim miktarı arttıkça üretilen L – DOPA derişimi de artmaktadır.

4.1.2. Çalkalamalı erlenlerde immobilize enzim kullanılarak L – DOPA üretimi

Bölüm 3.4.2’de anlatıldığı şekilde, immobilize enzim kullanılarak çalkalamalı erlenlerde L-DOPA üretimi gerçekleştirildi. 0,25 mM/ 0,75 mM/ 1,25 mM/ 2 mM 2,5 mM derişimdeki substratlar için, belirli zamanlarda örnekler alındı. Bölüm 3.6’da belirtilen HPLC analiz yöntemi ile kromatogramları alındı. Üretilen L – DOPA derişimleri hesaplandı. Şekil 4.3’de substrat derişimlerine karşı üretilen L – DOPA derişimleri grafiğe geçirildi.



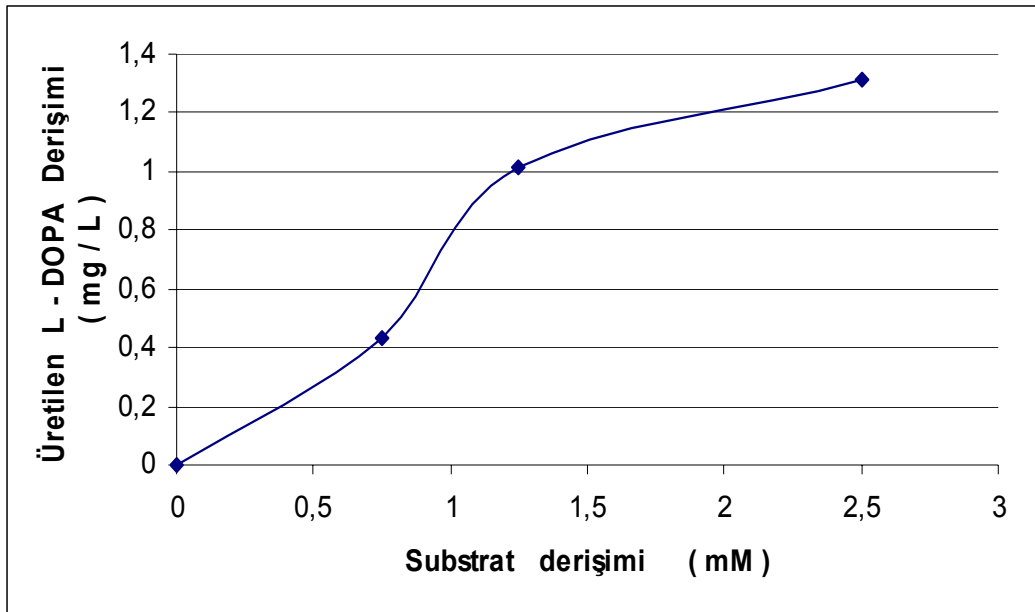
Şekil 4.3. İmmobilize enzim kullanılarak çalkalamalı erlenlerde L - DOPA üretimi (Substrat Derişimi: 2,5 mM, T: 22 ° C, V: 50 mL)

Alginat jelleriyle yapılan immobilizasyon işleminde CaCl_2 kullanılması çok yaygın olmasına rağmen bu çalışmada CuCl_2 kullanılmıştır. Bunun nedenlerini şu şekilde sıralayabiliriz.

- 1) Cu – Alginat jeller mekanik olarak daha dayanıklıdır. Enzim jellerden kolaylıkla sızamaz (36).
- 2) Tirozinaz enziminin aktif merkezinde Cu^{+2} iyonları vardır ve dolayısıyla Cu^{+2} iyonları enzimi inaktive etmez (8).

4.1.3. Sabit yataklı reaktörde farklı substrat derişimlerinde L –DOPA üretimi

Resim 3.1’de görüldüğü ve bölüm 3.4.3’de anlatıldığı gibi bir düzenek oluşturuldu. 0,75 mM/ 1,25 mM/ 2,5 mM derişimlerdeki substratlar için örnekler alındı. Bölüm 3.6’da belirtilen HPLC analiz yöntemi ile kromatogramları alındı. Üretilen L – DOPA derişimleri hesaplandı. Şekil 4.4’de substrat derişimlerine karşı, üretilen L – DOPA derişimleri grafiğe geçirildi.

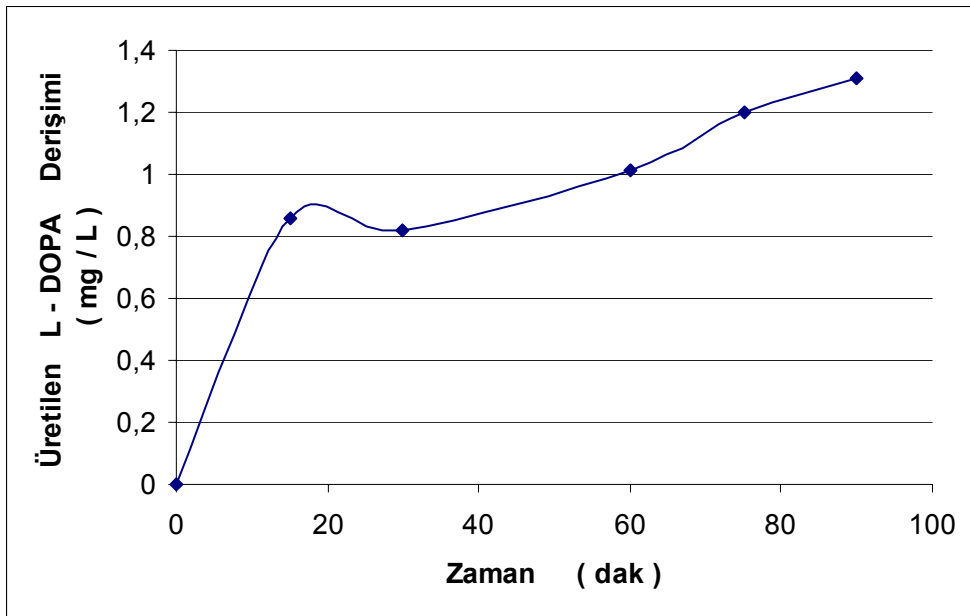


Şekil 4.4. Sabit yataklı reaktörde L – DOPA üretimi
(T: 22 ° C, Q: 0,6 mL / dak)

Grafikten de görüleceği gibi 2,5 mM derişiminde substrat çözeltisi kullanıldığında üretilen L- DOPA derişimi 1,3 mg / L’ye kadar yükselmiştir. L-Tirozin, en fazla 2,5 mM derişiminde hazırlanabildiği için daha yüksek substrat derişimlerinde çalışılamadı.

4.1.4. Sabit yataklı reaktörde zamanın L- DOPA üretimine etkisi

Şekil 4.4'deki grafikten de görüldüğü üzere, sabit yataklı reaktörde üretilen en yüksek L - DOPA derişimi, 2,5 mM substrat derişiminde gözlemlendi. Cu-Alginat jelleri içeren sabit yataklı reaktörden 2,5 mM substrat çözeltisi, 0,6 mL / dak akış hızı ile geçirildi. Değişik zamanlarda örnekler alındı. Bölüm 3.6'da belirtilen HPLC analiz yöntemi ile kromatogramları alındı. Üretilen L-DOPA derişimleri hesaplandı. Şekil 4.5'de zamana karşı üretilen L – DOPA derişimleri grafiğe geçirildi.

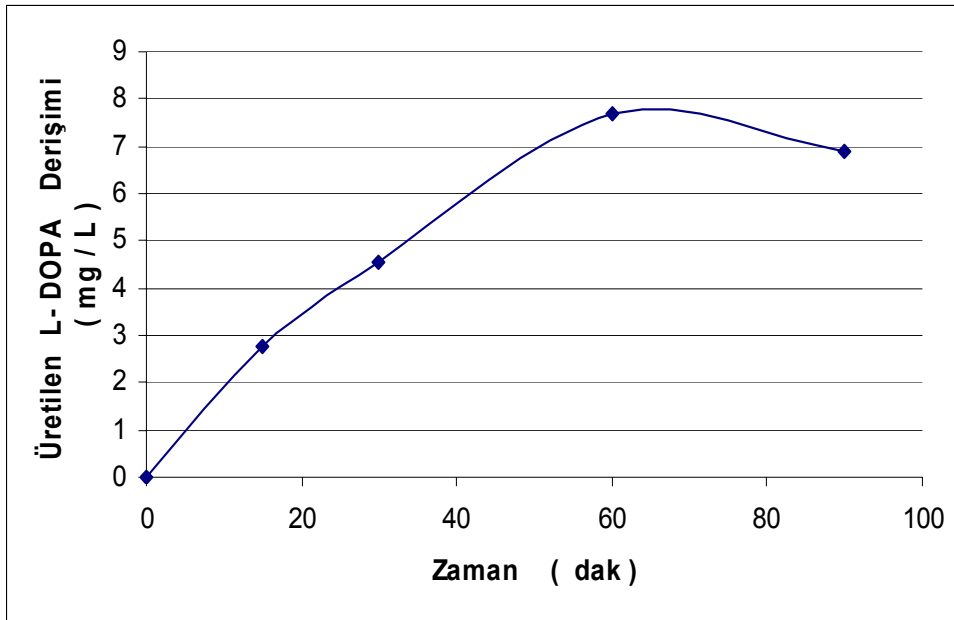


Şekil 4.5. Sabit yataklı reaktörde zamanın L – DOPA üretimine etkisi
(Substrat Derişimi: 2,5 mM, T: 22 ° C, Q: 0,6 mL / dak)

Grafikten de görüldüğü gibi 15 dakika sonra 0,85 mg / L L – DOPA üretilirken; 90 dakika sonra 1,31 mg / L L – DOPA üretilmiştir. O halde 90 dakika sonra bile tepkime devam etmektedir, enzim sızıntısı olmamıştır. Cu-Alginat tanecikler hala dayanıklıdır.

4.1.5. Sabit yataklı reaktörde havalı ortamda L – DOPA üretimi

Bölüm 4.1.4’ de kullanılan reaktör, oksijenin etkisini incelemek amacıyla 1500 mL / dak hava verilerek tekrar kullanıldı. Havanın L – DOPA üretimine etkisi incelendi. Belirli zamanlarda örnekler alındı. Bölüm 3.6’da belirtilen HPLC analiz yöntemi ile kromatogramları alındı. Üretilen L –DOPA derişimleri hesaplandı. Şekil 4.6’da zamana karşı üretilen L – DOPA derişimleri grafiğe geçirildi.

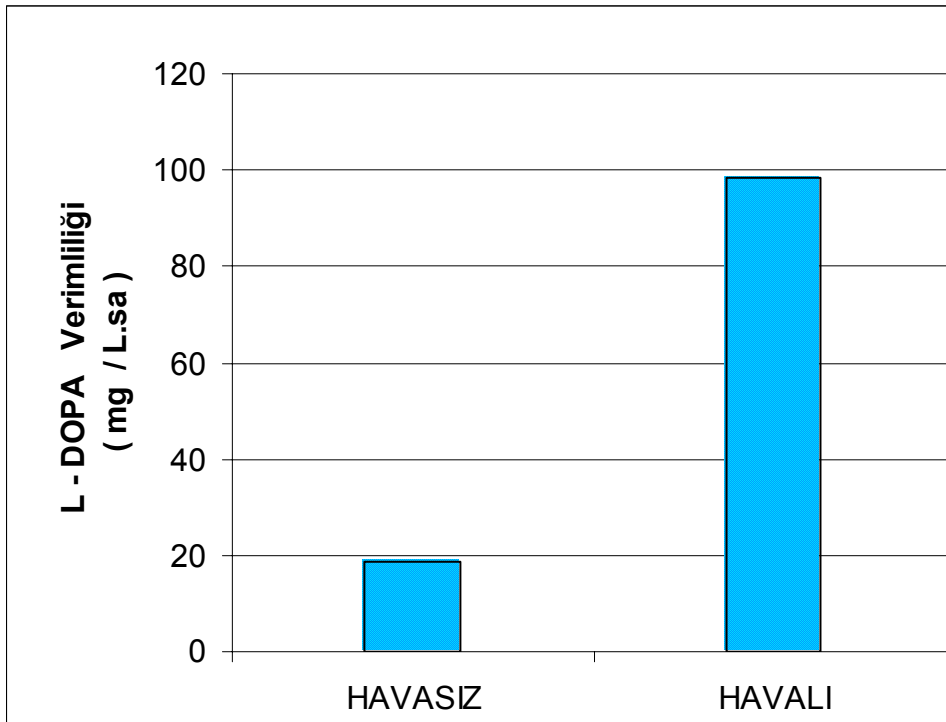


Şekil 4.6. Sabit yataklı reaktörde havalı ortamda L – DOPA derişimleri
(Substrat Derişimi: 2,5 mM, T: 22 ° C, Q: 0,6 mL, Havanın akış hızı: 1500 mL /dak)

Şekil 4.6’ daki grafik de görüldüğü gibi oksijen verilmesi sonucunda L – DOPA üretimi 60. dakika sonunda 7,69 mg / L değerine kadar yükselmiştir. Ancak 60. dakikadan sonra oksijenin etkisiyle DOPA kinon ve melanin oluşumunun artması ve Cu-Alginat jellerinin gözeneklerinin tıkanması nedeniyle derişimde bir azalma gözlenmiştir.

4.1.6. L-DOPA'nın verimliliği

Literatürdeki sonuçlarla karşılaştırma yapabilmek için, 2,5 mM substrat çözeltisi havalı ve havasız ortamda sabit yataklı reaktörden geçirilerek, L-DOPA verimlilikleri hesaplandı. Alınan sonuçlar Şekil 4.7'deki grafikte karşılaştırmalı olarak görülmektedir.



Şekil 4.7. Sabit yataklı reaktörde verimliliğin karşılaştırılması
(Substrat Derişimi: 2,5 mM, T: 22 ° C, Q: 0,6 mL / dak,
Havanın akış hızı: 1500 mL / dak)

Çalışmalardan elde edilen L-DOPA verimliliğinin diğer enzim reaktörleriyle karşılaştırılması Çizelge 4.1'de verilmiştir (35). Sabit yataklı enzim reaktörü kullanılarak yapılan tek bir çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada da enzim poliakrilamit ve gözenekli cam destek üzerine immobilize edilmiştir. Dolayısıyla bizim çalışmamızdan farklı bir immobilizasyon yöntemi kullanmışlardır (33).

Çizelge 4.1. Çeşitli enzim reaktörleri kullanılarak, oluşan L-DOPA verimliliklerinin karşılaştırılması (35).

METOT	L-DOPA VERİMLİLİĞİ (mg / L.sa.)	HACİM (mL)	REFERANS
İmmobilize Tirozinaz (Çalkalamalı erlen)	27,6	20	33
İmmobilize Tirozinaz (Sabit yataklı) reaktör	53,1	15	33
İmmobilize Tirozinaz (Çalkalamalı erlen)	1,7	500	34
İmmobilize Tirozinaz (Çalkalamalı erlen) Uygun olmayan koşullarda	44,8	20	35
İmmobilize Tirozinaz (Çalkalamalı erlen) Uygun koşullarda	54,0	20	35
İmmobilize Tirozinaz (Çalkalamalı erlen)	1,4	50	37

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada serbest ve immobilize Tirozinaz enzimi kullanılarak, L-DOPA üretimi gerçekleştirilmiştir. Bulunan sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- 1) Serbest enzim miktarının L - DOPA üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Enzim miktarı arttıkça, üretilen L - DOPA derişimide doğru orantılı şekilde artmıştır. En yüksek enzim miktarı olan 2 mL tirozinaz enzimi ilavesinde, en yüksek L - DOPA derişimi 9,86 mg / L olarak bulunmuştur.
- 2) Cu - Alginat jeller içine immobilize edilen tirozinaz enzimi kullanılarak, çalkalamalı erlenlerde farklı substrat derişimleri için üretilen L - DOPA derişimleri belirlendi. En yüksek L – DOPA derişimi 16,76 mg / L, 2,5 Mm substrat derişiminde gözlemlendi.
- 3) Sabit yataklı reaktörde, farklı substrat derişimlerinin L - DOPA üretimine etkisi araştırıldı. En yüksek L-DOPA derişimi 1,30 mg / L, 2,5 mM substrat derişiminde gözlemlendi.
- 4) Sabit yataklı reaktörde, üretilen L – DOPA derişiminin zamana bağlı etkisi araştırıldı. 15 dakika sonunda 0,85 mg / L L-DOPA üretilirken, 90 dakika sonra 1,31 mg / L üretilmiştir. Sonunda görülmüştür ki, 90 dakika sonunda Cu-Alginat taneciklerinde herhangi bir bozulma, kararma veya bir enzim sızıntısı olmamıştır.
- 5) Sabit yataklı reaktöre 1500 mL/ dak akış hızı ile hava verilerek, oksijenin L - DOPA üretimine etkisi araştırıldı. 1 saat sonunda 7,69 mg / L L - DOPA üretilmiştir. Ancak oksijenin etkisiyle L - DOPA'nın hızlı bir şekilde, DOPA kinon ve melanine dönüşmesi, Cu - Alginat taneciklerin gözeneklerini tıkaması sebebiyle L-DOPA derişiminde bir azalma gözlemlenmiştir.

- 6) Havalı ve havasız ortamda sabit yataklı reaktörden 2,5 mM derişiminde, substrat çözeltisi geçirilerek üretilen L – DOPA verimlilikleri karşılaştırıldı. Üretilen L- DOPA verimliliğı havasız ortam için 18,73 mg/ L iken, havalı ortam için 98,56 mg / L olarak bulunmuştur.

KAYNAKLAR

1. Tüzün, C. “Biyokimya üçüncü baskı” *Palme Yayınları*, Ankara, 124 – 125 (1997).
2. Park, T. G., Hoffmann, A. S., “Thermal cycling effects on the bioreactor performances of immobilized β - Galactosidase in temperature sensitive hydrogel beads”, *Enzyme Microbial Technology*, 15: 476-556 (1993).
3. Özçelik, D., “Mantardan (*Agaricus bisporus*) tirozinaz enziminin izole edilmesi ve fenol giderilmesinde kullanılması”. Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara,14-17 (2005).
4. Vámos – Vigyázó, L., “Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables”, *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 15: 49 – 127 (1981).
5. Witkop, G. J., “Inherited disorders of pigmentation ”, *J. Clin. Dermatol.*, 3(1): 70 – 134 (1985).
6. Oktay, M., Küfrevioğlu, I., Kocaçalışkan, I., and Şakiroğlu, H., “Polyphenoloxidase from Amasya apple”, *Journal of food Science*, 60 (3): 494 – 496 (1995).
7. Whitaker, J. R., “Polyphenol oxidase. In: Food enzymes: Structure and mechanism”, W. S. Wong, Chapman and Hall, New York, 271-307 (1995).
8. Lerch, K., “Neurospora tyrosinase: Structural, spectroscopic and catalytic activity ”, *Mol. Cell. Biochem.*, 52: 125-138 (1983).
9. Huber, M., Hintermann, G. and Lerch, K., “Primary structure of tyrosinase from *Streptomyces glaucescens*”, *Biochemistry*, 24: 6038-6044 (1985).
10. Ducros, V., Brzozowski, A.M., Wilson, K.S., Brown, S.H., “Crystal structure of the type 2 Cu depleted laccase from *coprinus cinereus* at 2,2°Å resolution”, *Nature Structural Biolog.*, 5: 310-316 (1998).
11. Dec., J. and Bollog. J. M., “Effect of various factors on dehalojenation of chlorinated phenols anilines during oxidative coupling”, *Envirom.Sci. Technol.*, 29: 657-663 (1995).
12. Mayer, A.M.and Harel, E., “ Polyphenol oxidases in plants”, *Phytochemistry*,18: 93-215 (1979).

13. Whitaker, J. R., "Principles of enzymology for the food sciences second edition", **Marcel Dekker, Inc.**, New York, America 517 – 520 (1994).
14. Maryadele, J. O., Patricia E., "The Merck Index: An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals", Thirteenth Edition, 5314 (2001).
15. Bickerstaff, G. F., "Immobilization of Enzymes and cells", **Humana press**, Totowa, New Jersey, (1997).
16. Zaborsky, O., "Immobilized enzymes", **1-3 CRC Press**. Ohio, (1974).
17. Söylemez, Z., Fadiloğlu, S., "Laboratory manual FE 460 enzyme purification and immobilization", **Gaziantep university faculty of engineering department of food engineering**, Gaziantep, 47 – 52 (1996).
18. Woodward, J., "Immobilised cells and enzymes", **Oxford**, İngiltere, (1985).
19. Smidsro, O., Haug, A. "Light scattering study of alginate", **Acta. Chem. Scand.**, 22: 797- 801 (1968).
20. Pekin, B., "Biyokimya Mühendisliği (Biyoteknoloji)", **Ege Üniversitesi Kimya Fakültesi yayınları**, İzmir, No:3, 90-97, 100, 334 (1983).
21. Kösalı, Y. K., "α - hidroksi ketonların enantiyoseçimli olarak biyotransformasyonla üretimi", Yüksek Lisans Tezi, **Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 14-17 (2005).
22. Knowless, W. S., "Asymetric Hydrogenations (Nobel Lecture)" **Angew. Chem Int.Ed.**, 41: 1998-2007 (2002).
23. Bretschneider, H., Hohenlohe - Oehringen, K., "Eine neue synthese des 3-[3,4-Dihydroxy - phenyl - L -alanins (L – DOPA) aus L-Tyrosin", **Helvetica Chimica Acta**, 56: 2857-2860 (1973).
24. Melo, S., Melo, R., Costa, G., "Solubility of L – DOPA in supercritical carbon dioxide: prediction using a cubic equation of state", **J. Supercritical Fluids**, 34: 231-236 (2005).
25. Teixeira, A. A., Rich, E. C., Szabo, N. J., "Water extraction of L-DOPA from Mucuna bean, tropical subtropical agroecosyst", **Food Chem.**, 1: 59 (2003).
26. Siddhuraju, P., Becker, K., "Rapid reversed – phase high performance liquid chromatographic method for the quantification of L-DOPA, non - methylated and methylated tetrahydroisoquinidine compounds from Mucuna beans", **Food Chem.**, 72: 1407 (2002).

27. Park, H., Lee, J. and Kim, H., “ Production of L-DOPA (3,4- Dihydroxyphenyl – L- alanine) from benzene by using a hybrid patway”, ***Biotechnol.Bioeng.***, 58: 339-343 (1998).
28. Shetty, P., Atallah M.T. and Shetty, K., “ Effects of UV treatment on the proline-linked pentose phosphate patway for phenolics and L-DOPA synthesis in dark germinated *Vicia faba*”, ***Process Biochemistry***, 37: 1285-1295 (2002).
29. Kyanagi, T., Katayama, T., Szuki, H. “Effective production of 3,4 - Dihydroxyphenyl- L-alanine (L-DOPA) with *Erwinia herbicola* cells carrying a mutant transcriptions regulatör Tyr R”, ***Journal of Biotechnology***, 115: 303-306 (2005).
30. Hesselink, P. G., Tusscher, J. and Maligne, T. M., “ Kinetic aspects of the bioconversion of L – Tyrosine into L - DOPA by cells of *Mucuna pruriens* L- Entrapped in different matrices”, ***Biotechnology and Bioengineering***, 34: 214-222 (1989).
31. Pras, N., “ *Mucuna pruriens*: Improvement of the biotechnological production of the anti-parkinson drug L-Dopa by plant cell selection”, ***Pharma World Sci.***, 15 (6): 263-268 (1993).
32. Seetharam, G. and Saville B.A., “ L – DOPA production from tyrosinase immobilized on zeolite”, ***Enzyme and Microbial Technology***, 31: 747 -753 (2002).
33. Vilanova, E., Monjan, A., Iborra, J. L., “ Tyrosine hydroxylase activity of immobilized tyrosinase on Enzacryl-AA and CPG- AA supports: stabilization and properties”, ***Biotechnology and Bioengineering***, 26: 1306-1312 (1984).
34. Pialis, P., Hamann, J. and Saville, B., “L-DOPA production from tyrosinase immobilized on Nylon 6,6 ”, ***Biotechnology and Bioengineering***, 51: 141-147 (1996).
35. Carvalha, M.J., “ L – DOPA production by immobilized tyrosinase”, ***Applied Biochemistry and Biotechnology***, 84: 791-800 (2000).
36. 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).
37. Ho, P.Y., Chlou, M. S. and Chao, A.C., “Production of L-DOPA by tyrosinase immobilized on modified polystyrene”, ***Applied Biochemistry and Biotechnology***, 111: 139-152 (2003).

38. Sharma, N. M., Kumar, S. and Sawhney K. S., “A novel method for the immobilization of tyrosinase to enhance stability”, *Biotechnol. Appl. Biochem.*,38: 137-141 (2003).
39. Erdik, E., Obalı, M., “Denel Organik Kimya”, *Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Döner Sermaye İşletmesi yayınları*, Ankara, No:44, 133 (1997).

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Bolu’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Bolu’da tamamladı. 1997 yılında girdiği Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden 2002 yılında mezun oldu. 2003 yılında Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans’a başladı.