

**MANTARDAN (*Agaricus bisporus*) TİROZİN AZ ENZİMİNİN İZOLE
EDİLMESİ VE FENOL GİDERİLMESİNDE KULLANILMASI**

Dilek ÖZÇELİK

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**EKİM 2005
ANKARA**

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	vii
RESİMLERİN LİSTESİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL VE TEORİK BİLGİLER.....	4
2.1. Enzimlerin Genel Özellikleri.....	4
2.2. Oksidoredüktazlar.....	5
2.3. Kültür Mantarı.....	9
2.4. Polifenol Oksidazlar.....	12
2.4.1. Polifenol oksidazların keşfi.....	12
2.4.2. Tirozinaz.....	14
2.5. Enzimlerin İzolasyonu.....	30
2.5.1. Hücrelerin parçalanması.....	31
2.5.2. Hücreler bileşenlerinin ayrılması.....	33
2.5.3. Saflaştırma işlemleri.....	33
2.6. Enzimlerin İmmobilizasyonu.....	36
2.6.1. İmmobilizasyon metotları.....	36
2.7. Tirozinazın İmmobilizasyon Çalışmaları.....	42

	Sayfa
3. KULLANILAN MATERYAL ve METOTLAR.....	46
3.1. Materyaller.....	46
3.2. Enzim İzolasyonu ve Kısmi Olarak Saflaştırma.....	46
3.2.1. Enzim izolasyonu.....	46
3.2.2. Enzim saflaştırma.....	47
3.3. Enzim Aktifliğinin ölçülmesi.....	47
3.3.1. Ham ekstrakt için aktifliğin ölçülmesi.....	48
3.4. Protein Tayini.....	48
3.4.1. Ham ekstrakt için protein tayini.....	48
3.4.2. Protein tayini için biüre reaktifinin hazırlanması.....	49
3.4.3. Protein tayini için kalibrasyon grafiği.....	49
3.5. Tirozinaz Enziminin V_m ve K_m Değerlerinin Tayini.....	50
3.6. Enzim İmmobilizasyonu.....	50
3.7. Serbest Enzim, İmmobilize Enzim Ve Enzimsiz Ortamda (Kontrol Deneyi) Fenol Giderilmesi.....	52
3.8. Sabit Yataklı İmmobilize Enzim Reaktörü Kullanılarak Fenol Giderilmesi.....	53
3.9. Fenol Konsantrasyon Tayini.....	54
4. DENEYSEL SONUÇLAR.....	55
4.1. Mantardan İzole Edilen Tirozinaz Enziminin Özellikleri.....	55
4.2. Tirozinaz Enziminin V_m ve K_m Değerleri.....	56
4.3. İmmobilizasyon Verimi.....	57
4.4. Serbest Enzim, İmmobilize Enzim Ve Enzimsiz Ortamda (Kontrol Deneyinde) Yüzde Fenol Giderme Değerlerinin Karşılaştırılması.....	57
4.5. İmmobilize Enzim Reaktörü Kullanılarak Giderilen Fenol Yüzdesi.....	58

	Sayfa
4.6. İmmobilize Enzim Reaktörünün Kullanım Sayısı.....	59
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	61
KAYNAKLAR.....	62
ÖZGEÇMİŞ.....	65

**MANTARDAN (*Agaricus bisporus*) TİROZİNAZ ENZİMİNİN İZOLE
EDİLMESİ VE FENOL GİDERİLMESİNDE KULLANILMASI**

(Yüksek Lisans Tezi)

Dilek ÖZÇELİK

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Ekim 2005

ÖZET

Bu çalışmada, kültür mantarından (*A. bisporus*) tirozinaz enzimi izole edilmiş ve kısmen saflaştırılmıştır. Elde edilen tirozinaz enziminin Lineweaver – Burk Grafiği yardımıyla V_m ve K_m değerleri tespit edilmiştir. Kısmen saflaştırılan tirozinaz enzimi daha sonra kitosan kürecikleri üzerine glutaraldehit kullanarak immobilize edilmiştir. İmmobilize enzim sabit yataklı reaktörde fenol giderilmesinde kullanılmıştır.

Bilim Kodu :219
Anahtar Kelimeler :Tirozinaz, kitozan, immobilize enzim, fenol uzaklaştırma
Sayfa Adedi :65
Tez Yöneticisi :Prof. Dr. Selma ATEŞ

**ISOLATION OF TYROSİNASE FROM MUSHROOM (*Agaricus bisporus*)
AND UTILIZATION FOR PHENOL REMOVAL**

(M.Sc. Thesis)

Dilek ÖZÇELİK

**GAZİ UNIVERSTY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

October 2005

ABSTRACT

In this study, tyrosinase in mushroom (*A. bisporus*) was isolated and partly purified. V_m and K_m values of the tyrosinase enzyme was determined by the help of Lineweaver – Burk plot. Partly purified tyrosinase was immobilized on chitosan beads using glutaraldehyde. Immobilized enzyme was used for the dephenolization procedure in a plug flow reactor.

Science Code : 219

Key Words : Tyrosinase, chitosan, immobilize enzyme, phenol removal

Page Number: 65

Adviser : Prof. Dr. Selma ATEŞ

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren Hocam Prof. Dr. Selma ATEŞ'e ve tecrübelerinden faydalandığım Arő. Gör. Müge GÖKDERE'e ve laboratuvarında bulunan ultrasantrifüj cihazını kullanmamı sağlayan Yr. Doç. Dr. őule ÇOŐKUN'a teşekkür ederim. Ayrıca manevi destekleriyle beni yalnız bırakmayan çok değerli arkadaşım Esra ÇÖRTENLİOğLU'na, her zaman yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen aileme ve eőime teőekkürü bir borç bilirim.

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Çeşitli araştırmacıların yaptıkları 100 g kültür mantarının (<i>A. bisporus</i>) besin değerleri ile ilgili ortalama analiz sonuçları	11
Çizelge 2.2. 100 g kültür mantarlarının besin değerinin, diğer sebze türlerinin 100 g'nın besin değerleriyle kıyaslanması	11
Çizelge 2.3. Farklı kaynaklardan izole edilmiş tirozinaz enzimini oluşturan alt birimlerin sayısı ve uygulanan ayırma metotları.....	16
Çizelge 2.4. Çeşitli kaynaklardan saflaştırılan tirozinaz enziminin amino asit bileşimi.....	18
Çizelge 2.5. Farklı kaynaklardan elde edilen tirozinaz enziminin farklı substratlar için K_m değerleri.....	24
Çizelge 2.6. Çeşitli kaynaklardan izole edilen tirozinaz enziminin çeşitli substratlar için optimum pH değerleri.....	26
Çizelge 2.7. Farklı kaynaklardan izole edilen tirozinaz enziminin optimum sıcaklık değerleri.....	26
Çizelge 2.8. İzolasyon ve saflaştırma adımları için örnek bir tablo.....	34
Çizelge 2.9. Enzim immobilizasyonunda sıkça kullanılan absorbanslar ve bunların etkileşim türleri.....	38
Çizelge 4.1. Enzim izolasyonu ve saflaştırma basamakları sırasında elde edilen enzimin aktifliği, protein miktarı, spesifik aktivitesi ve saflaştırma faktörü.....	55
Çizelge 4.2. Serbest enzim , immobilize enzim ve enzimsiz ortamda (kontrol deneyi) fenol giderme yüzdeleri.....	58
Çizelge 4.3. İmmobilize enzim reaktörünün farklı akış hızlarındaki yüzde fenol gidermesi.....	59

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Oksidoredüktaz sınıfı enzimlerin katalizledikleri reaksiyon türleri (denklemler 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7).....	5
Şekil 2.2. β -D-glukoz'un oksidasyonu.....	6
Şekil 2.3. Oksidoredüktaz sınıfı enzimlerden bir kısmının reaksiyon mekanizma döngüsü.....	7
Şekil 2.4. Katekolün katekol 1,2-oksijenaz katalizörlüğündeki reaksiyonu.....	8
Şekil 2.5. Bir monofenolün polifenol oksidaz katalizörlüğündeki oksidasyonu.....	8
Şekil 2.6. L-Fenil alaninin fenil alanin hidroksilaz aracılığıyla oksidasyonu.....	9
Şekil 2.7. Tirozinaz enziminin katalizlediği reaksiyonlar ve polimer ürünün oluşumu.....	19
Şekil 2.8. Tirozinazın kresolaz aktivitesi.....	20
Şekil 2.9. Tirozinazın difenol oksidasyonu (A) ve monofenol hidroksilasyonu (B) mekanizması.....	21
Şekil 2.10. Met tirozinaz, oksitirozinaz ve deoksitirozinazın yapıları.....	22
Şekil 2.11. O-difenollerin oksidasyon mekanizması.....	22
Şekil 2.12. Aromatik aminlerin tirozinaz katalizörlüğünde oksidasyonu.....	23
Şekil 2.13. 2-klorofenolün tirozinaz katalizörlüğünde o-kinonklorüre oksidasyonu.....	23
Şekil 2.14. Çeşitli immobilizasyon metodlarının şemaları.....	37
Şekil 2.15. Polisakkaritlerin siyanojen bromür kullanılarak enzimlerin kovalent immobilizasyonu.....	39
Şekil 2.16. Karboksil grubu taşıyan matrislere karbodiimitle kullanılarak enzimlerin kovalent immobilizasyonu.....	40
Şekil 2.17. Aljinat ile enzimlerin immobilizasyonu	41

Şekil	Sayfa
Şekil 3.1. Protein kalibrasyon grafiği.....	49
Şekil 3.2. Tirozinazın çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit kullanılarak kitosan küreciklere kovalent immobilizasyonu	51
Şekil 3.4. Fenol çözeltisi için kalibrasyon grafiği.....	54
Şekil 4.1. Lineweaver – Burk Grafiği.....	56
Şekil 4.2. Kitosanın açık formülü; $1\beta \rightarrow O \rightarrow 4'$	58
Şekil 4.3. Kullanılan immobilize enzim reaktörünün kullanım sayısı ile giderilen fenol yüzdesi arasındaki ilişki.....	60

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

K_m

Enzim sabiti

D

Dalton

I.U

Ünite

V_m

Enzimin maksimum hızı

Kısaltmalar

Açıklama

ABD

Amerika Birleşik Devletleri

HRP

Yaban turbu peroksidazı

CPO

Kloroperoksidaz

LİP

Lignin peroksidaz

PPO

Polifenol oksidaz

İEC

Uluslararası Enzim Komisyonu

THBP

Tetrahidrobiopterin

DHBP

Dihidrobiopterin

PEG

Polietilen glikol

SGE

Nişasta jel elektroforezi

PGE

Poliakrilamit jel elektroforezi

IF

İzoelektrik odaklama

GF

Jel filtrasyonu

SDS

Sodyum dodesil sülfat

MM

Molekül kütlesi

Kısaltmalar

Açıklama

KAT	Enzim saflaştırma derecesi
L-DOPA	3,4 – dihidroksifenilalanin
DICEA	Dietil-ditiyokarbamat
PVP	Polivinilpirolidin

1.GİRİŞ

Reçine, plastik, metal kaplama, boya, kimyasal madde, tekstil, madencilik, ve kağıt endüstrilerinin, kömür dönüşüm tesislerinin, petrol rafinerilerinin ve diğer pek çok endüstriyel çalışma alanlarının atık sularında fenol ve aromatik amin gibi toksik aromatik bileşikler bulunmaktadır. Bunlar pek çok ülkede olduğu gibi ABD’de de kirletici maddelerin önemli kısmını oluştururlar ve sıkı bir şekilde denetlenirler. Çoğu aromatik bileşikler toksiktir ve aromatik bileşikleri içeren atık sular çevreye verilmeden önce bu bileşikler atık sulardan uzaklaştırılmalıdır (1).

Endüstriyel atık sulardan fenollerini uzaklaştırmak için geleneksel metotlardan bazıları; ekstraksiyon, mikrobiyal oksidasyon, aktif karbon üzerine adsorbsiyon, kimyasal oksidasyondur. Bu metotlar etkili olmakla beraber yüksek maliyet, arındırma eksikliği, tehlikeli yan ürünlerin oluşumu ve sınırlı konsantrasyon aralığına uygulanabilmesi gibi dezavantajları vardır. O nedenle daha iyi teknolojiye ihtiyaç duyulmaktadır (2).

Enzimler yüksek seçimli katalizör olduklarından atık sulardaki belirli maddeleri uzaklaştırmak için kullanılmaları düşünülmüştür (3). Bu fikir ilk olarak 1930’lu yıllarda ortaya atılmasına rağmen, atık sulardaki kirliliklerin uzaklaştırılması için enzimlerin kullanılması 1970’li yıllardan sonra gündeme gelmiştir. Çok yavaş olabilecek bir kimyasal reaksiyon, enzimlerin kullanılmasıyla hızlı bir şekilde gerçekleştirilebilir ve kimyasal arıtma işlemleri ile yapılamayan dönüşümler enzimler kullanılarak yapılabilir. Enzimler substratları veya aynı genel gruptaki bileşik türleri için son derece spesifiktir. Bu spesifiklik, enzimlerin hiçbir kimyasal reaktif kullanmadan çok yüksek stokiyometrik verimle hedef kirleticilerin seçimli olarak uzaklaştırmasına izin vermektedir. Enzim spesifikliğı, istenilmeyen veya gereksiz olan ve eğer gerçekleşirse kimyasal tüketiminin artmasından dolayı arıtma maliyetinin de artmasına sebep olacak reaksiyonları engeller; dolayısıyla enzimatik işlemler geleneksel kimyasal işlemlere göre avantajlıdır (4). Mikroorganizmaların direkt kendilerinin kullanıldığı biyolojik arıtım teknikleriyle karşılaştırıldığında, enzimatik arıtımın avantajları olarak şunları göstermek mümkündür: Biyolojik

ataklara dayanıklı bileşiklere uygulanabilmesi; oldukça geniş kirletici konsantrasyonlarında işlem yapılabilmesi; Enzimler geniş pH, sıcaklık ve tuzluluk aralıklarına mikroorganizmalardan daha dayanıklı olması; şok yükleme etkilerinin yokluğu; biyokütlenin yeni ortama uyumundan dolayı oluşabilecek gecikmelerin olmayışı; biyokütle oluşmaması nedeniyle arıtım sonrası ortaya çıkabilecek atık miktarında azalma ve sürecin kolay ve basit olmasıdır (1).

Bazı araştırmacılar yaban turpu peroksidazı (HRP), *Caldariomyces fumago* fungusundan elde edilen kloroperoksidaz (CPO), *Phanerochaete chrysosporium* fungusundan elde edilen lignin peroksidaz (LİP), bazı mikrobiyal kaynaklı lakkaz ve *Agaricus bisporus* mantarından elde edilen Polifenol oksidaz (PPO genellikle tirozinaz olarak bilinir) gibi bazı enzimlerin fenolik kirliliklerin oksidasyonunu katalizleyebildiğini kanıtlamışlardır (3). Bu araştırmacılara göre endüstriyel atık sularındaki fenolik bileşikleri gidermede çeşitli peroksidazlar ve fenol oksidaz grubuna giren enzimler kullanılmaktadır. Her iki gruptaki enzimler de oksidoredüktaz sınıfı enzimlerdir.

Peroksidazlar çeşitli reaksiyonları katalizleyebilirler fakat bütün reaksiyonlarda peroksidazın aktivite gösterebilmesi için hidrojen peroksit gibi bir peroksitin ortamda bulunması gerekir. Hidrojen peroksit ilk olarak enzimi oksitler ve enzimi aktif hale getirir (1). Aktif halde bulunan enzim de oksidasyona uğraması istenen substratı oksitler. Bu oksidasyon sonucunda fenoksi radikalleri oluşur. Bu fenoksi radikalleri daha sonra çözelti içerisindeki diğer fenol molekülleriyle veya diğer aromatik bileşiklerle reaksiyona girerek poliaromatik yapıda ürünler oluştururlar. Orijinal fenol bileşiklerinden farklı olarak bu polimerler suda çözünmezler ve çökerler (4). Daha sonra çöken polimerleri basit filtrasyon yöntemiyle çözülden uzaklaştırmak ve bu durumda atık suları toksik olan ve istenmeyen bileşenlerden arındırmak mümkündür (5). Ancak ekonomik açıdan bakıldığında bu metodun en önemli dezavantajı oksitleyici ajan olarak kullanılan hidrojen peroksidin oldukça pahalı olması ve arıtım sürecinde işlem maliyetini artırmasıdır. Bu dezavantaj göz önüne alınarak peroksidazlara alternatif olarak fenol oksidazların kullanılmasına yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Çalışmaların bu yöne kaymasının başlıca nedeni ise fenol

oksidazların oksidant olarak hidrojen peroksidaz yerine moleküler oksijeni kullanmalarındır. Böylece peroksidazların kullanılmasından doğan ekstra bir arıtım maliyeti ortadan kalkmaktadır (4).

Enzimatik çalışmalar sulu ortamda gerçekleştirildiği için, katalizör olarak kullanılan serbest enzimleri kolayca geri kazanmak mümkün değildir. Ayrıca enzimi geri kazanma işlemi maliyeti arttırmaktadır. Fakat genellikle pahalı olan enzimlerin bir defadan fazla kullanılabilmeleri, uzun süre inaktive olmadan saklanabilmeleri, pH ve ısı kararlılıklarının artması istenir. Enzimlerin özelliklerini bu istenen şartları gerçekleştirecek şekilde değiştirmek için uygun destek materyalleri kullanılarak immobilizasyon teknikleri geliştirilmeye çalışılmaktadır.

Bu çalışmada, tirozinaz enzimi yurdumuzda bolca bulunan ve enzimin en zengin doğal kaynaklarından biri olan mantardan (*A. bisporus*) izole edildi ve kısmi olarak saflaştırıldı. Kısmi olarak saflaştırdığımız serbest enzimin V_{maks} ve K_m değerleri saptandı. Enzim kitosan kürecikler üzerine kovalent bağlanma tekniği ile immobilize edildi. Bu şekilde hazırlanan immobilize enzim sabit yataklı reaktörde fenol giderilmesinde kullanıldı.

2. GENEL VE TEORİK BİLGİLER

2.1. Enzimlerin Genel Özellikleri

Enzimler hücrelerdeki biyokimyasal olayların ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan ve protein yapısında olan biyokimyasal katalizörlerdir.

Enzimler, diğer kimyasal katalizörlerden bir çok açıdan farklıdır. Her şeyden önce katalitik etkinlikleri kimyasal katalizörlerden 10^6 - 10^{16} kat daha fazladır. Enzimler son derece spesifiktirler ve sadece bir substrata veya aynı fonksiyonlu grubu olan substrat serisine karşı etkindirler. Hatta aynı maddenin izomerlerinden sadece birisiyle reaksiyon verebilen çok spesifik enzimler de vardır. Bu yüksek seçicilik sayesinde en basit hücrede bile aynı anda pek çok sayıda biyokimyasal reaksiyon meydana gelir. Hücredeki reaksiyonlarda 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 (6).

Eskiden enzimler gelişigüzel biçimde isimlendirilirlerdi. 1970'lere kadar pek çok enzim incelenmiş, saf kristal formda elde edilen enzimlerin sayısı artmış ve zamanla adlandırmada büyük bir kargaşa ortaya çıkmıştır. Biyokimya Cemiyeti tarafından bir Uluslararası Enzim Komisyonu (IEC) kurulmuştur. Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılmasında uygulanacak kuralları tespit etmek üzere oluşturulan IEC katalizledikleri reaksiyon tipine göre enzimleri altı ana grupta toplamıştır. Bunlar:

1. Oksidoredüktazlar: İndirgenme ve yükseltgenme olayını katalizleyen enzimlerdir. Tirozinaz enzimi oksidoredüktaz sınıfı bir enzimdir.
2. Transferazlar: Fonksiyonel grupların transferinin olduğu reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir.

3. Hidrolazlar: Hidroliz reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.

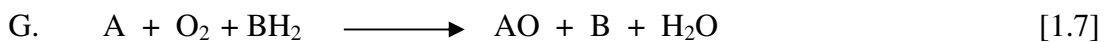
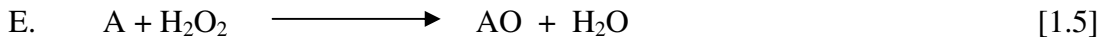
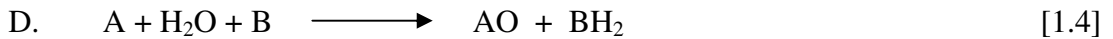
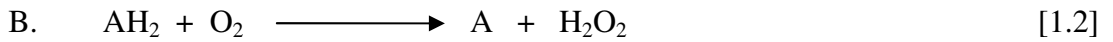
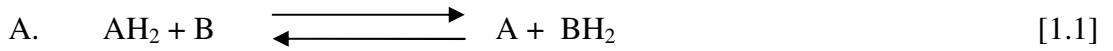
4. Liyazlar: C-C, C-O, C-N gibi gruplar arasında çift bağ oluşturarak substrattan bazı grupların ayrılmasını katalizleyen enzimlerdir, veya tam tersini yaparlar. Bazı grupların çift bağa katılma reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.

5. İzomerazlar: Substratın izomerinin olduğu reaksiyonları katalizleme özelliğine sahip enzimlerdir.

6. Ligazlar (Sentazlar): Bağ oluşumunun gerçekleştiği reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir (6).

2.2. Oksidoredüktazlar

Oksidoredüktazlar substratların indirgenmesini yada yükseltgenmesini katalizleyen enzim sınıfıdır. Bir substratın indirgenmesi veya yükseltgenmesi şekil 2.1.'de gösterildiği gibi çok çeşitli yollardan olabilir. Bunlardaki farklılık; elektron alıcının kaynağı (B, O₂ yada H₂O₂) ve oluşturulan ürünlerdedir (7).

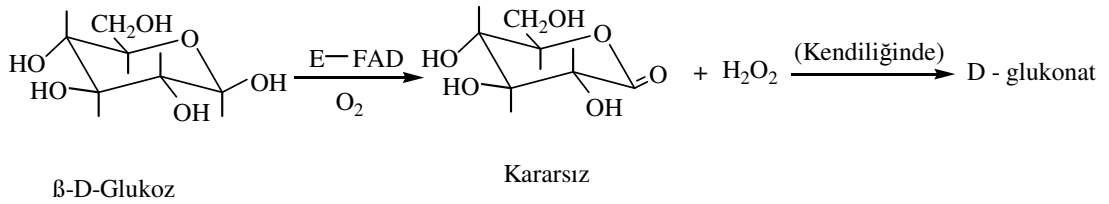


Şekil 2.1. Oksidoredüktaz sınıfı enzimlerin katalizledikleri reaksiyon türleri (denklem 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7)

Oksidoredüktazların çok büyük bir kısmı A tipi reaksiyonları (denklem 1) katalizlerler. Bu reaksiyonlarda enzimler NAD^+ , NADP^+ , ferrisitokrom ve yükseltgenmiş lipoik asit gibi bir B alıcısına hidrojenlerin ve/veya elektronların katılması yoluyla substratın yükseltgenmesini sağlarlar. A tipi reaksiyonları katalizleyen enzimlere “dehidrojenazlar” denir. B ve C tipi reaksiyonlarda da (denklem 2 ve 3) substratın yükseltgenmesi hidrojenin ve/veya elektronların uzaklaştırılması yoluyla yapılır. Ama bu reaksiyonlar A tipi reaksiyonlardan birkaç önemli yönden farklıdır:

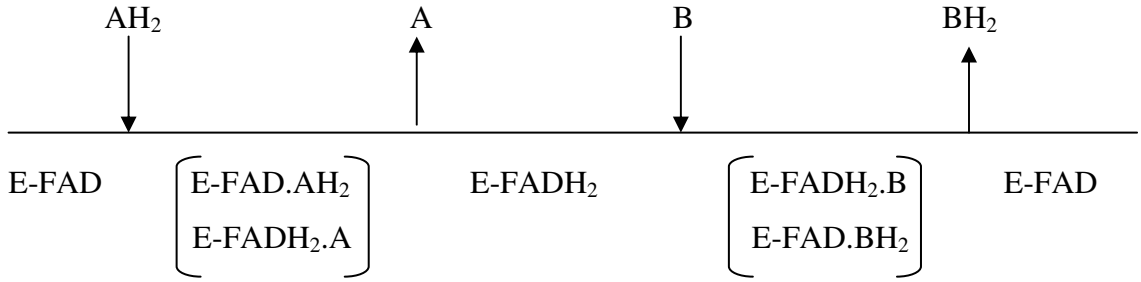
1. B ve C tipi reaksiyonlarda moleküler oksijen kullanılmasından dolayı, bu reaksiyonlar yalnızca aerobik koşullar altında gerçekleşir. A tipi reaksiyonlar ise hem aerobik hem de anaerobik koşullar altında gerçekleşebilir.

2. B ve C tipi reaksiyonlar kofaktörde dahil olmak üzere üç substratlı reaksiyonlardır. B ve C tipi reaksiyonları katalizleyen enzimlere oksidazlar denir. Örneğin şekil 2.2.’de gösterildiği gibi glukoz oksidazın katalizlediği reaksiyonda bütün reaksiyon O_2 , β -D-glukoz ve FAD tarafından gerçekleştirilir. A tipi reaksiyonlarda ise iki substrat (AH_2 ve B) kullanılır.



Şekil 2.2. β -D-glukoz’un oksidasyonu

3. B ve C tipi reaksiyonlarda koenzim olayın döngüsü tamamlandığı zaman yenilenir. Şöyle ki şekil 2.3.’de gösterildiği gibi elektronlar önce FAD’ye aktarılır, FADH_2 oluşur daha sonrada FADH_2 elektronları oksijene aktararak tekrar FAD haline döner. A tipi reaksiyonlarda ise kofaktör tükenmedikçe yenilenme yapılmaz yani ikinci bir enzim sistemi bağlanmadığı sürece kofaktör yenilenmez.



Şekil 2.3. B ve C tipi reaksiyonlarda kofaktörün yenilenmesi

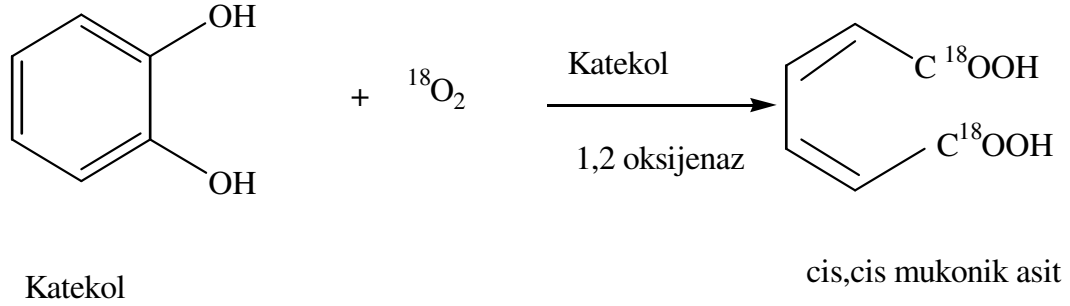
4. Genelde A tipi reaksiyonlar tersinirdir. Oysa B ve C tipi reaksiyonlar tersinmezdir.

4 – 7 denklemlerinin tanımladığı reaksiyonlar substrata bir yada daha çok oksijen atomunun katılması yoluyla substratın yükseltgenmesini sağlarlar. Bu reaksiyonlarda substrata oksijen katılmaktadır. İşaretli H_2^{18}O , $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ yada $^{18}\text{O}_2$ kullanılarak oksijen atomunun nereden geldiği belirlenebilir. D tipi reaksiyonlarda (denklem 4) oksijen sudan gelir ve NAD^+ , NADP^+ yada O_2 gibi başka bir reaktanta (denklemde B olarak gösterilen) gereksinim vardır. E tipi reaksiyonlarda (denklem 5) H_2O_2 'den gelen oksijen substrata katılır. E tipi reaksiyonların tipik enzimleri peroksidaz ve katalazdır.

F ve G tipi reaksiyonlar (denklem 6 ve 7), denklem 1'den 5'e kadar tanımlananlardan oldukça farklıdır. Çünkü O_2 molekülünden gelen oksijen atomu substrata katılır. F tipi reaksiyonlarda O_2 molekülünün her iki atomuda substrata katılır. G tipi reaksiyonlarda ise bir oksijen atomu substrata katılırken diğer oksijen atomu NADH yada NADPH gibi indirgenmiş bir koenzimi yükseltgemek için kullanılır. Koenzimdeki H atomları oksijene aktarılarak su oluşumu sağlanır. Böylece koenzim de yükseltgenmiş şekline (NAD^+ , NADP^+) döner. G tipi reaksiyonda $^{18}\text{O}_2$ kullanımı sonucunda ürün olarak hem A^{18}O hem de H_2^{18}O oluşur.

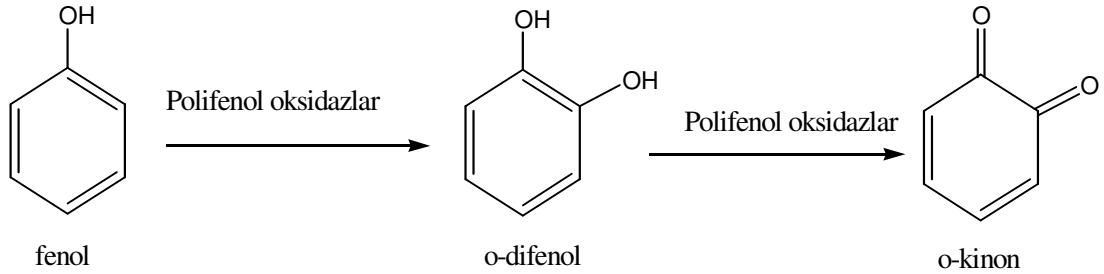
F ve G tipi reaksiyonları katalizleyen enzimlere “oksijenazlar” denir. Oksijenazlar dioksijenazlar (F tipi) ve monooksijenazlar (G tipi) olmak üzere iki alt sınıfa ayrılırlar. Şekil 2.4.'de gösterilen katekol 1,2-oksijenaz [katekol: oksijen

1,2-oksidoredüktaz; EC 1.13.1.1] enzimiyle katalizlenen reaksiyon dioksijenazlara örnektir.



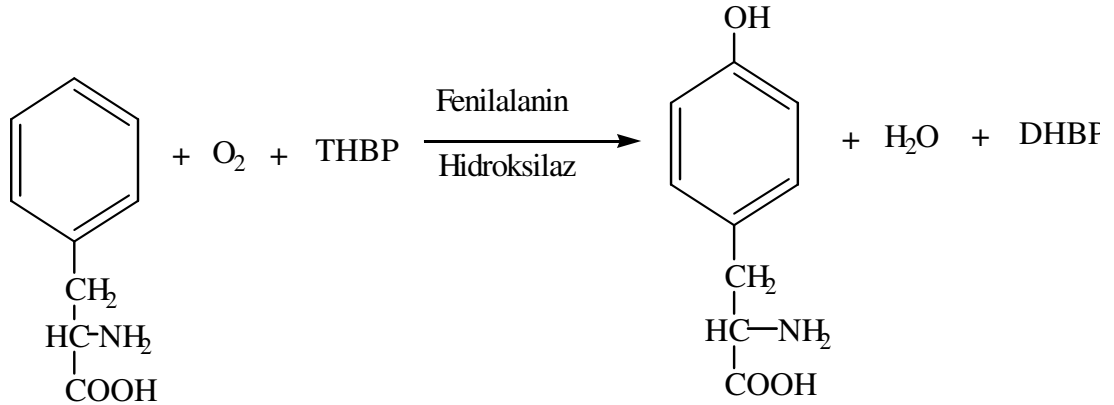
Şekil 2.4. Katekolün katekol 1,2-oksijenaz katalizörlüğündeki reaksiyonu

Monooksijenazlar da kendi aralarında, katalizin olması için BH_2 'nin reaksiyon karışımına eklenmek zorunda olup olmamasına göre iç monooksijenazlar ve dış monooksijenazlar olmak üzere ikiye ayrılırlar. Polifenoloksidazlar iç monooksijenazlara örnektir. Şekil 2.5.'de gösterildiği gibi gerekli olan BH_2 (bir o-difenol) monofenollerin hidroksilasyonu yoluyla sistem içinde üretilir.



Şekil 2.5. Bir monofenolün polifenol oksidaz katalizörlüğündeki oksidasyonu

Diğer taraftan şekil 2.6.'da gösterildiği gibi fenilalanin hidroksilaz da bir dış monooksijenaz örneğidir ve bunun için sisteme tetrahidrobiopterin (THBP) eklenmesi gerekir. Bu madde dihidrobiopterin (DHBP)'e yükseltgenir.



Şekil 2.6. L-Fenil alaninin fenil alanin hidroksilaz aracılığıyla oksidasyonu

2.3. Kültür Mantarları

Doğada kendiliğinden yetişen bir bitki olarak mantarlar çok eski devirlerden beri insan oğlunun dikkatini çekmiş; büyü, zehir, ilaç ve besin maddesi olarak kullanılmışlardır. Doğada yetişen mantarlar yüzünü aşan türüyle büyük bir grubu oluştururlar. Bu kadar geniş bir topluluğun içinde çok değişik özellikler gösteren mantarlar bulunmakta ve çok değişik amaçlarla kullanılmaktadır. Doğal mantarlar yeme açısından zehirli ve zehirsiz olmak üzere iki gruba ayrılır. Zehirli mantarların içinde muskarin, atropin, α – amanitin, β – amanitin, γ – amanitin, niyosiyenin gibi maddeler bulunur.

Sebze olarak yetiştirilen şapkalı mantar türlerinin tümü Basidiomyetes sınıfına girmektedir. Bu türlerin başında *Agaricus bisporus*, *Agaricus bitorquis*, *Agaricus campestris* ile bazı *Pleurotus*, *Volvaria*, *Lentinus*, ve *Flammulina* türleri yer alır. Ülkemizde olduğu gibi dünyada da en çok yetiştirilen tür *Agaricus bisporus*'tur. Ülkemizde ticari mantar yetiştiriciliğinin tümü yine bu tür ile yapılmaktadır.

Agaricus bisporus türü, Agaricales takımı, Agaricaceae familyası, agaricus cinsine girer. Bu durumda kültür mantarının sistematigi aşağıdaki gibidir:

Alem : Plantae
Grup : Thallophyta
Şube : Mycota
Alt Şube : Eumycotina
Sınıf : Basidiomycetes
Alt Sınıf : Homobasidisidiomycetidae
Takım : Agaricales
Familya : Agaricaceae
Cins : Agaricus
Tür : Agaricus bisporus

Sebze olarak yetiştirilen yemeklik mantarlar saprofittirler. Yani besin maddesi gereksinimlerini çürümüş veya çürümekte olan organik maddelerden sağlarlar. Bu nedenle doğada ölü bitki örtüsünün bol bulunduğu ortamlarda; ormanlarda çayır ve meralarda çeşitli artıkların bulunduğu alanlarda görülürler. Yetiştirilmeleri de buna benzer olarak; çürümüş sap, saman, talaş, gübre, yaprak gibi organik maddeler üzerinde gerçekleştirilir (8).

Yenilebilen mantarların et kadar lezzetli olduğu söylenir. Protein yüzdesi açısından bakıldığında ete ulaşamazlar ancak; eti lezzetli kılan bazı maddeler mantarlarda da vardır (8).

Doğada yetişen mantarlar ile kültürü yapılan mantarlar, türlere göre değişen oranlarda besin değerlerine sahiptir. 100 g kültür mantarının ortalama besin değerleri çizelge 2.1 de ve kültür mantarının bileşiminin diğer sebze türlerinin bileşimleriyle karşılaştırılması da çizelge 2.2 de gösterilmektedir (8).

Çizelge 2.1. Çeşitli araştırmacıların yaptıkları 100 g kültür mantarının (*A. bisporus*) besin değerleri ile ilgili ortalama analiz sonuçları

Su	89,15
Protein	4,02
Yağ	0,26
Azotsuz Maddeler	3,75
Selüloz	0,92
Kül	0,97

Çizelge 2.2. 100 g kültür mantarlarının besin değerinin, diğer sebze türlerinin 100 g'nın besin değerleriyle kıyaslanması

Sebzeler	Su	Protein	Karbonhidrat	Yağ
Kültür mantarı (<i>A. bisporus</i>)	91,1	2,4	4,0	0,3
Taze bezelye	74,3	6,7	17,7	0,4
Taze fasulye	88,9	2,4	7,7	0,2
Karnabahar	91,7	2,4	4,9	0,2
Patates	73,8	2,0	19,1	0,1
Kereviz	93,7	1,3	3,7	0,2
Lahana	92,4	1,4	5,3	0,2

100 g taze kültür mantarı yendiğinde ancak 20-40 cal'lik bir enerji vermektedir. Proteinin sindirilme değeri % 70'dir. Mantar besin değeri açısından esas önemini, içerdiği vitaminler ile bazı asidik ve bazik maddelerden alır. A vitamini hemen hemen hiç yokken B kompleks vitaminleri ile C vitamini açısından çok, D vitamini bakımından da oldukça zengindir. Meyve ve sebzelerle kıyaslandığında iyi bir Lizin, Arginin, Histidin ve Treonin kaynağıdır. İnsan için gerekli tüm aminoasitleri içerir.

Yapılan araştırmalara göre mkemmел bir folik asit kaynağı olan *A. bisporus* mantarının kandaki şeker seviyesini düşürdüğü ve kolesterolü azalttığı için kalp ve damar hastalıklarında diyet olarak kullanılabileceği tespit edilmiştir. Mineral madde içeriği açısından da uygun bir besin maddesi olduğu ifade edilmektedir (8).

2.4. Polifenol Oksidazlar

Polifenol oksidazlar (PPO) bakır içeren oksidoredüktazlardır. Substratları fenolik bileşiklerdir. Substratlarını oksijen eşliğinde esmer renkli bileşiklere oksitlemektedirler. Bu olay gıda teknolojisinde ‘‘enzimatik esmerleşme olarak bilinir. Özellikle bitkilerde yaygın olarak bulunan PPO’lar hayvansal dokularda ve kf mantarlarında da bulunmaktadır (9).

Polifenol oksidazlar iki sınıfa ayrılırlar. Tirozinazlar (EC 1.14.18.1) ve lakkazlar (EC 1.10.3.2). Her iki enzim grubu da moleküler oksijen varlığında aktif hale gelirler ve koenzim kullanmazlar (1).

2.4.1. Polifenol oksidaz enzimlerinin keşfi

Schoenbein 1856 yılında, oksijenin oksitleyici ajan olarak kullanılarak bazı bitkilerde aerobik oksidasyonun gerçekleştiğine dikkati çekmesiyle; kimyada ilk olarak oksidazlarla ilgilenilmiştir. Oksidazlar hakkındaki bilgilerimizi geliştirmedeki bir sonraki aşama ise; Yoshida’nın yaptığı çalışmada lak ağacının lateksinde lakkazın varlığını gzlemlemesidir. Bir kaç yıl sonra Bertrand, Yoshida’nın lakkaz üzerine yaptığı çalışmayı geliştirmiş ve bazı mantar türlerinde lakkaz enziminin var olduğunu bulmuştur. Bourquelot ve Bertrand birlikte yaptıkları araştırmada *Russula fortens* ve *R. nigricans* gibi bazı mantar türlerinin ekstraktlarının renginin bekleme sırasında önce kırmızı daha sonra da koyu kahverengi veya siyah olduğunu gözlemlemişlerdir. Bourquelot ve Bertrand *R. nigricans* mantarının ekstraktından kristal halinde bir madde ayırmışlardır. Bu kristal maddenin çözeltisinin mantar ekstraktı ile temas ettirilmesi sonucunda, aerobik oksidasyonun başladığı ve ilk olarak kırmızı renkli çözeltinin ve daha sonra da melanine benzer siyah bir ürün

oluştugu bildirilmiştir. Kristal madde daha sonra Bertrand tarafından tirozin amino asidi olarak tanımlanmıştır. Lakkazın tirozinin üzerinde aktif olmadığı bulunması Bertrand'ı adı "tirozinaz" olan yeni bir oksidazı keşfettiğini anlamasına yol açmıştır. Bertrand tirozinazın p-hidroksifenil etil amin, p-hidroksifenil metil amin, p-hidroksifenil amin, p-hidroksifenil propiyonik asit, p-hidroksifenil asetik asit, p-kresol ve fenol gibi (tirozinden başka) diğer bazı aromatik monohidroksi fenollerin oksidasyonunu katalizlediğini de bulmuştur. Diğer taraftan bu bahsedilen bileşiklerde hidroksi gurubu olmadığına, bu enzim ile herhangi bir oksidasyonun olmadığı bildirilmiştir.

Bu ilk enzim çalışmalarını takip eden sonraki çalışmalarda tirozin üzerine enzimin etkisi ve bitki ve hayvan pigmentasyonu ile ilgili olarak melanin oluşumu incelenmiştir. Bertrand tirozinazın önceden bilinen diğer iki oksidaz enzimi olan lakkaz ve peroksidazdan farklı olarak tirozinin oksidasyonunu katalizlediğini bildirmiştir. Ayrıca biyolojik ürünlerde tirozinin bulunup bulunmadığının belirlenmesinde bu enzimin kullanılabileceği saptanmıştır (10).

Bertrand'ın tirozinaz ve lakkaz ile ilgili yaptığı araştırmaların ardından, polifenol oksidazlar üzerine yapılan çalışmalar oldukça artmıştır. Tirozinaz afinite kromatografisi ile saflaştırılan ilk enzimdir ve oksijeni organik bir molekülün (fenol) yapısına doğrudan katabilme özelliğine sahip enzimler arasında da ilk tanımlanan enzimdir (5).

2.4.2. Tirozinaz

Tirozinaz (EC 1.14.18.1) polifenol oksidaz, monofenol oksidaz, fenolaz veya katekolaz olarak da bilinir. Tirozinaz ismi substrat olarak enzimin tirozin (monohidroksifenilalanin) ve dihidroksifenilalanine karşı spesifikliği nedeniyle verilmiştir (7).

Tirozinaz doğada çok yaygındır. Daha yaygın olarak bitkilerde bulunmasına rağmen, mikroorganizmalarda genellikle de funguslarda ve bazı hayvan organlarında bulunur (11).

Doğada çok yaygın olmasıyla beraber yapılan araştırmalar özellikle mantar, yumru patates, şeftali, elma, muz, avokado, çay yaprakları, kahve tohumları, ve tütün yapraklarında diğer kaynaklardakine göre daha yüksek konsantrasyonlarda olduğunu göstermiştir (12). Ayrıca kayısı, yabani gl, enginar, yabani pirinç, ısıpanak, yonca, buğday, yulaf, bezelye, şekerkamışı yaprağı, bakla yaprakları, fasulye, domates, mısır yaprakları , üzüm, armut, zeytin, gibi meyve ve sebzelerde de tirozinazın olduğu tespit edilmiştir (11,13 - 16). Bu yapılan çalışmalar doğrultusunda tirozinaz enziminin muhtemelen bütün bitkilerde bulunduğu şeklinde bir genellemeye gidilmesi yanlış olmaz.

Bitki hücrelerinde enzimin miktarı ve dağılımı meyve veya bitkilerin türüne , yaşına ve olgunluğuna bağlıdır. Yeşil yapraklarda enzimin büyük bir bölümü kloroplastlardadır. Patates yumrusunun hemen hemen bütün hücresel fraksiyonlarda protein miktarıyla orantılı bir değerde tirozinaz enzimi içerdiği bulunmuştur. Taze elmada ise kloroplast ve mitokondrilerde toplanmıştır. Yine Enzimin zmn kabuğunda zmn özsuyundan veya etli kısmından daha yüksek olduğu bulunmuştur. Tirozinaz enzimi elmanın bütün kısımlarında belirlenmesine rağmen elma ve armudun her ikisinin suyu tirozinaz aktivasyonundan hemen hemen yoksundur ve tirozinaz neredeyse tamamen posada kalmaktadır. Benzer sonuç onaltı şeftali,  kiraz ve üç erik kültüründe de bildirilmiştir. Kloroplast ve mitokondri fraksiyonlarından elde edilen enzimin substrat spesifikliği de farklıdır (11).

Bitkilerdeki tirozinaz içeriği tarımsal tekniklerden de etkilenir (örneğin şeker kamışı yapraklarında aktivite düzeyi, toprak eser element olarak bakır ile muamele edildiğinde artar) (11).

Tirozinaz bitkisel dokularda öncelikle inaktif formlar halinde sentezlenmekte ve zamanla çeşitli etkenlerle, örneğin dokuda doğal olarak bulunan proteazlar veya bir takım solunum metabolitlerince aktif hale getirilmektedirler. İşte bu nedenlerle bitkisel dokularda çoğu zaman bu enzimin bir kısmı inaktif formda, bir kısmı ise aktif formda bulunmaktadır. Örneğin aktif formdaki enzimlerin, inaktif formdakilere oranı; ıspanaklarda 1:2, marullarda 2:1 ve domateslerde 1:1 olduğu halde bazı bakla, fasulye ve bezelye çeşitlerinde tüm tirozinaz enzimlerinin inaktif formda bulunabildiği belirlenmiştir (9).

İnsanlarda dahil olmak üzere hayvansal organizmaların özellikle de deri, saç ve göz pigmentlerinde bulunur (12). Onslow, siyah ırk tavşanların derilerinde; Gessard, mürekkep balığının mürekkep kesesinde; Pinhey, bazı kabuklu hayvanların kanında; Bhagvat ve Richter eklem bacaklıların kanında tirozinaz enzimin var olduğunu bildirmişlerdir. Arnow derinin güneş ışığı ile bronzlaşmasının tirozinaz etkisiyle olduğunu bildirmiştir (10). Tirozinaz böceklerdeki dış iskelet oluşumunda da önemlidir (17).

Tirozinazın moleküler özelliği

Tirozinaz oligomerik yapıya sahip bir enzimdir. Bu yapıyı oluşturan alt birimlerin sayısı enzimin kaynağına göre farklılık gösterir. Çizelge 2.3 de farklı kaynaklardan izole edilen tirozinaz enziminin kaç alt birimden oluştuğu, uygulanan ayırma metotları ile birlikte verilmiştir (11). Mantar (*A. bisporus*) tirozinazının minimum molekül kütlesi ayırma metotlarına göre 26 000 – 32 000 D ve en yüksek aşağı yukarı 120 000 – 128 000 D olmasıyla birlikte genel olarak kabul edilen molekül kütlesi 128 000 D'dur (18).

Çizelge 2.3. Farklı kaynaklardan izole edilmiş tirozinaz enzimini oluşturan alt birimlerin sayısı ve uygulanan ayırma metotları

Enzim Kaynağı	Alt Birimlerin Sayısı ¹	Ayrma 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

Not: PEG = Polietilen glikol; PVP = Plivinilprolidin; 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: Kromotoğrafik basamaktır

Tirozinazın moleküler 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 1 bakır atomu içeren tirozinazın molekül kütlesi 18000 D iken *Streptomyces glaucescens*'den saflaştırılan tirozinazın molekül kütlesi 29000 D olduğu bildirilmiştir (19).

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 (18).

SDS-akrilamit jel elektroforezi ile yapılan çalışmada mantardan elde edilen tirozinazın molekül kütlesi 43000 D olan ağır (H) ve molekül kütlesi 13400 D olan hafif (L) iki tip polipeptit zincirine sahip olduğu ve bunların aminoasit bileşiminin farklı olduğunu göstermiştir. Ekstraktlarda en baskın olan biçim aşağı yukarı 120000 D molekül kütleli L_2H_2 yapısı olmasına rağmen bu yapının kresolaz ve katekolaz aktivitesine sahip olmadığı bunun yanı sıra 69000 D molekül kütleli L_2H yapısının iki bakır atomuna ve her iki aktiviteye de sahip olduğu bildirilmiştir (19).

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. Çeşitli kaynaklardan izole edilen tirozinaz enziminin aminoasit analizlerinden elde edilen bilgiler çizelge 2.4.'de verilmektedir (5).

Çizelge 2.4. Çeşitli kaynaklardan saflaştırılan tirozinaz enziminin amino asit bileşimi

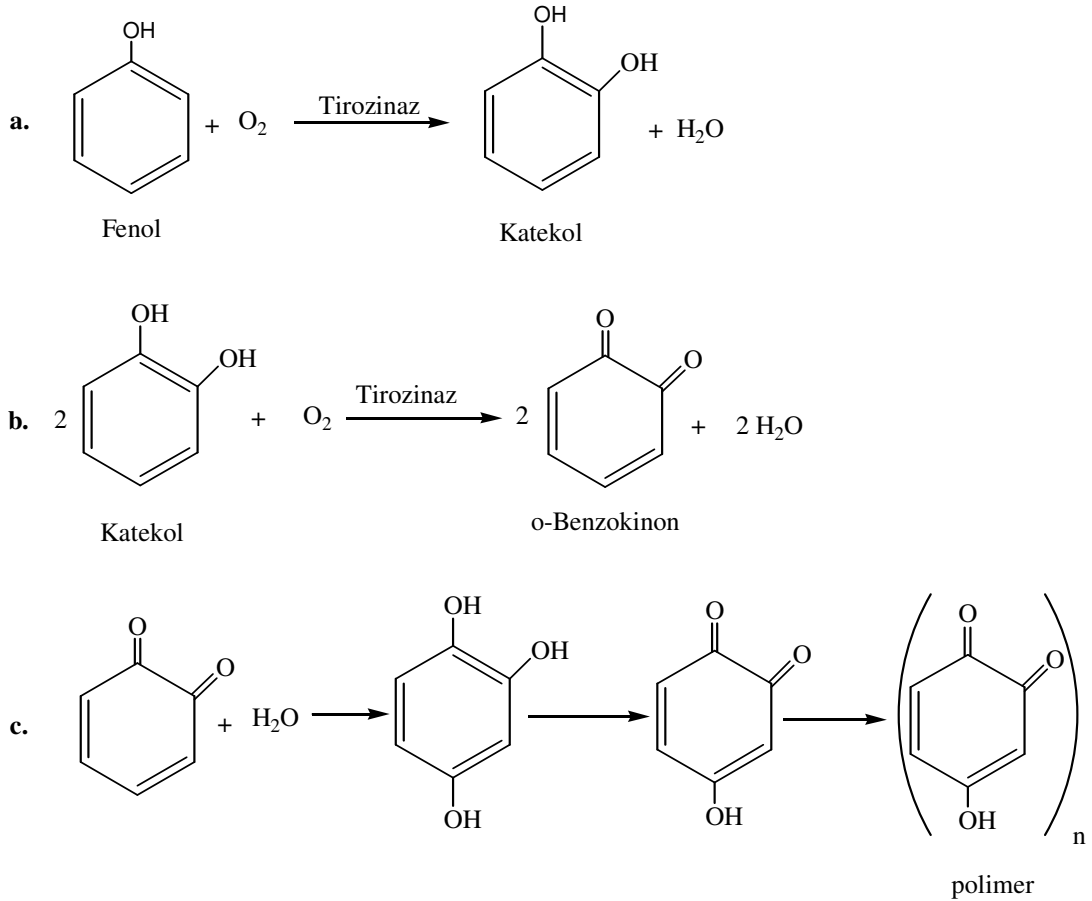
Amino Asit	Mantar %mol		Buğday %mol	Üzüm %mol	Ispanak %mol	Patates %mol	N. <i>crassa</i> %mol	Yer elması %mol
	H	L						
Alanin	6,6	4,3	8,5	8,2	7,1	7,8	8,1	11,0
Arjinin	4,3	4,3	3,9	3,7	3,0	3,9	4,9	2,2
Aspartik asit	12,4	13,7	10,3	12,8	12,6	10,7	10,8	7,1
Sistein	0,5	0,7	1,5	0,1-0,4	2,2	1,4	0,2	1,7
Glutamik asit	11,3	7,9	11,4	9,2	5,5	10,0	8,3	10,2
Glisin	5,5	11,5	9,1	7,2	7,9	8,1	6,2	12,6
Histidin	2,8	1,4	1,8	2,0	2,4	2,0	2,5	0,5
İzolösin	5,1	5,7	3,9	5,6	4,3	5,5	3,2	4,3
Lösin	7,6	6,5	7,3	6,9	9,2	9,1	8,1	8,4
Lizin	4,0	4,3	5,7	5,9	5,5	6,5	4,2	4,8
Metiyonin	2,5	1,4	1,5	-	2,2	2,0	0,7	1,2
Fenilalanin	5,8	5,0	3,9	3,9	5,2	4,6	5,9	4,4
Prolin	8,3	6,5	6,9	8,5	8,6	5,5	7,6	6,0
Serin	5,3	7,9	8,5	7,9	7,3	7,1	10,3	8,4
Treonin	6,1	7,2	5,7	5,9	5,9	5,5	5,4	7,5
Tirozin	4,8	3,6	3,8	5,9	2,5-2,8	3,4-3,6	4,9	2,5
Valin	5,5	6,5	6,1	6,9	7,9	6,8	5,6	7,2
Triptofan	1,5	1,4	1,0	-	0,6	-	2,9	-

Tirozinazın katalizlediği tepkimeler ve öngörülen reaksiyon mekanizmaları

Tirozinaz aktif merkezinde bakır bulunan ve ardışık iki farklı reaksiyonu katalizleyebilen bir enzimdir. Bu reaksiyonlar şekil 2.7.'de gösterilmiştir.

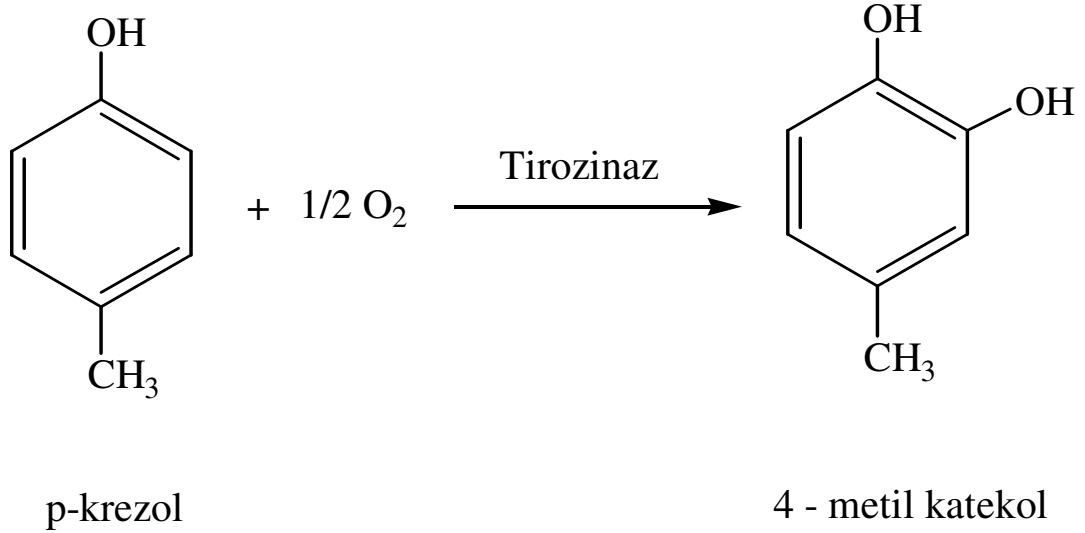
Şekil 2.7.a. monofenollerin moleküler oksijenle o-difenollere hidroksillenmesidir. Şekil 2.7.a reaksiyonunda substrat olarak krezol kullanılması halinde aktiviteye kresolaz aktivitesi denir. Kresolaz aktivitesi şekil 2.8.'deki gibi yazılır.

Şekil 2.7.b. o-difenollerin oksijenle o-kinonlara yükseltgenmesidir. Bu enzimatik aktiviteye de katekolaz aktivitesi denir (7,20).



Şekil 2.7. Tirozinaz enziminin katalizlediği reaksiyonlar ve polimer ürünün oluşumu

Kinonlar çok kararsızdır, şekil 2.7.c.'de gösterildiği gibi reaksiyonlar hızla devam eder ve enzimatik olmayan bir polimerleşme gözlenir.

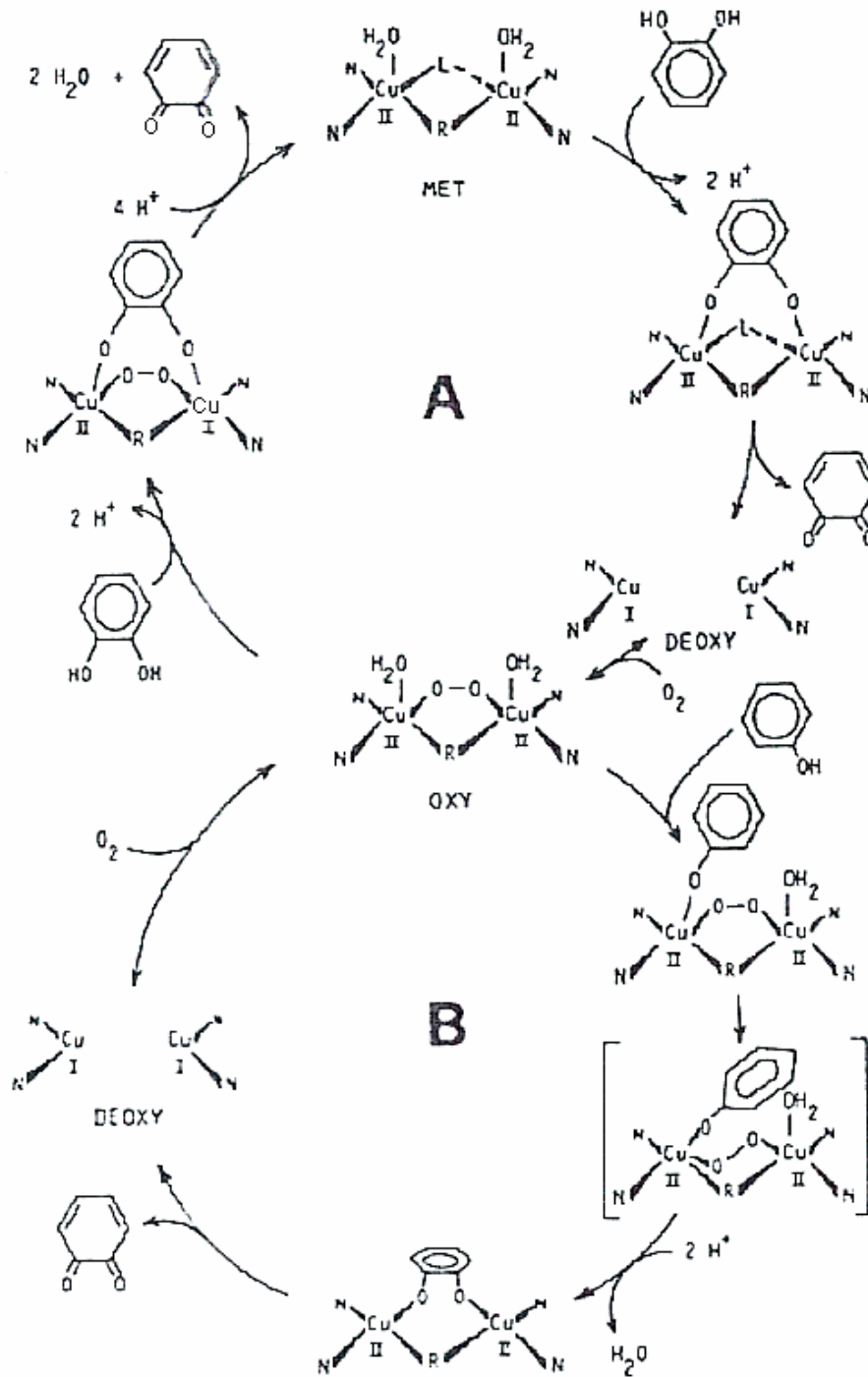


Şekil 2.8. Tirozinazın kresolaz aktivitesi

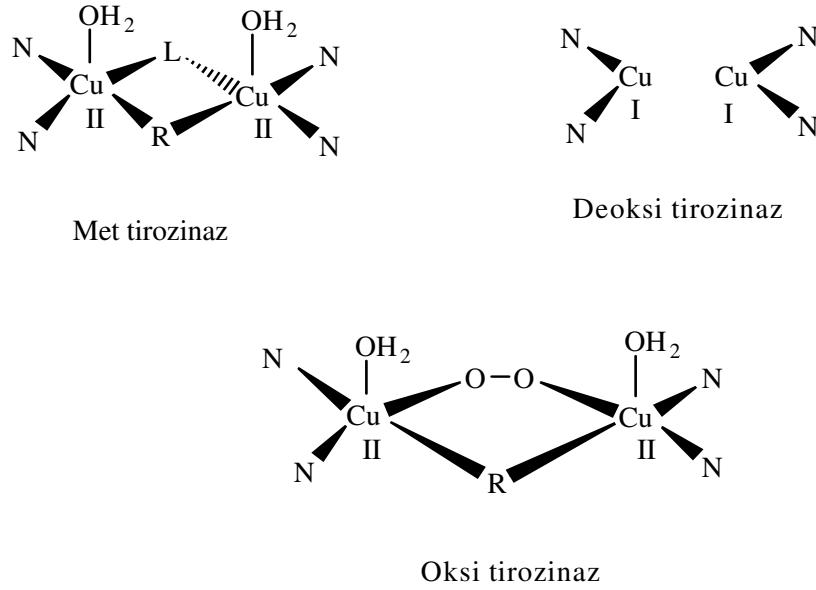
Farklı kaynaklardan izole edilen enzim farklı oranlarda kresolaz ve katekolaz olmak üzere iki aktiviteye sahiptir. Bu oranlar izolasyon ve saflaştırma sırasında veya fiziksel işlemlerle değişebilir ve bazen kresolaz aktivitesi tamamen kaybedilebilir. Çay yaprağı, tütün, hintkirazı, muz, armut ve tatlı kirazdan izole edilen tirozinaz enzimi, kresolaz aktivitelerini kaybederken; patates, elma, şeker pancarı yaprağı, bakla ve mantar gibi çoğu kaynaktan izole edilen tirozinaz enzimi her iki aktiviteye de sahiptir.

Tirozinazın katalizlediği monofenollerin hidroksilasyonu ve difenollerin oksidasyon reaksiyonlarının mekanizmaları üzerine pek çok çalışma yapılmış ve bu mekanizmanın şekil 2.9.'daki gibi olduğu önerilmiştir.

Tirozinaz substratlarıyla reaksiyona girmemiş halde iken %85 met tirozinaz, %15 oksitirozinaz halindedir. Reaksiyon sırasında bunlar deoksi tirozinaz üzerinden birbirlerine dönüşerek katalizör görevlerini yerine getirirler. Şekil 2.10.'da met tirozinaz, oksitirozinaz ve deoksi tirozinazın yapıları gösterilmektedir (5,21,22).

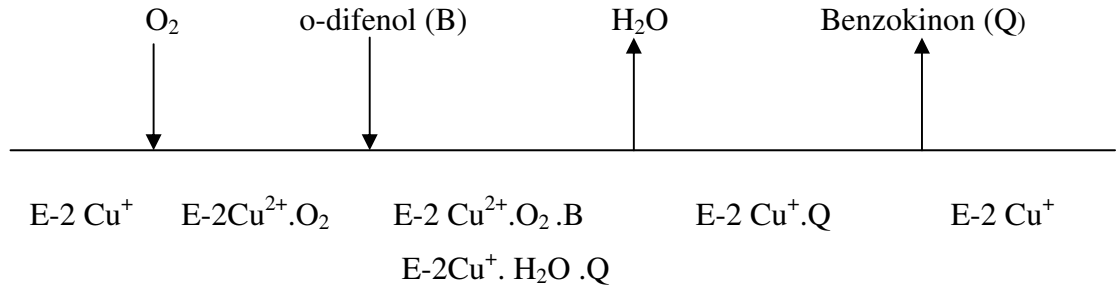


Şekil 2.9. Tirozinazın difenol oksidasyonu (A) ve monofenol hidroksilasyonu (B) mekanizması (23).



Şekil 2.10. Met tirozinaz, oksitirozinaz ve deoksi tirozinazın yapıları

O-difenol ve O_2 'nin enzime bağlanma sırası üzerine yapılan araştırmalar O_2 'nin ilk basamakta bağlandığını göstermiştir. Bu yüzden mekanizmanın şekil 2.11'de gösterildiği gibi sıralı mekanizma şeklinde olduğu düşünülmüştür. Burada B o-difenol ve Q benzokinondur (7).

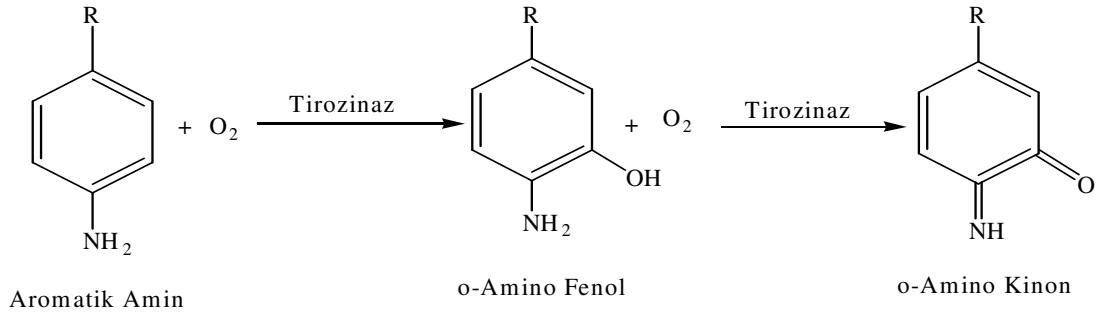


Şekil 2.11. O-difenollerin oksidasyon mekanizması

Tirozinaz enziminin substratları ve katalizleme hızları

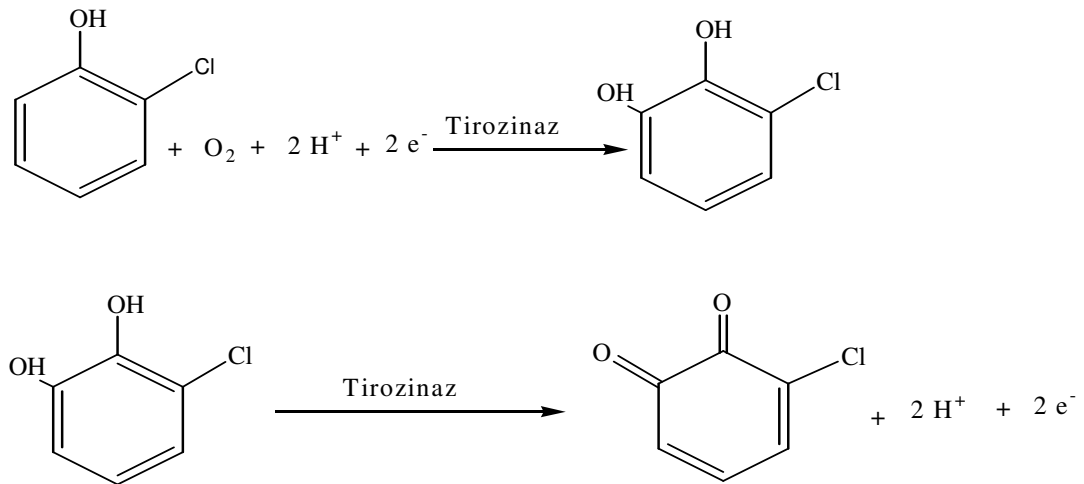
Hayvan dokularından elde edilen tirozinaz, tirozin ve L-DOPA (3,4-dihidroksifenilalanin) üzerine diğerlerine göre daha spesifikken fungus ve yüksek yapılı bitkilerden elde edilen tirozinaz o kadar spesifik değildir. Tirozinazın substratları başta tirozin, katekol ve L-DOPA olmak üzere katehin (3-hidroksi

flavan), sinamik asit esterleri , klorojenik asit, 4-metil katekol, p-kresol, p-hidroksi ve 3,4-dihidroksi fenilpropiyonik asit, kafeik asit ve aromatik aminler sıralanabilir (24). Şekil 2.12.'de bir aromatik aminin oksidasyonu gösterilmektedir.



Şekil 2.12. Aromatik aminlerin tirozinaz katalizörlüğünde oksidasyonu

Tirozinaz ayrıca klorofenollerin de hidroksillenmesi ve daha sonra da oksitlenmesi reaksiyonlarını katalizleyen bir enzimdir. Şekil 2.13.'de klorofenolün oksidasyonu gösterilmektedir. Daha sonra oluşan kinon bileşiği polimerleşecektir. Böylece toksik bir bileşik olan klorofenol polimerleşerek çökecek ve ortamdan basit filtrasyon yöntemleriyle uzaklaştırılabilecektir (20).



Şekil 2.13. 2-klorofenolün tirozinaz katalizörlüğünde o-kinonklorüre oksidasyonu

Substrat spesifikliği ve katalizlenme hızı enzimin elde edildiği kaynağın cinsine yaşına ve enzimin izole edilif şekline göre değişiklik kazanır. Çizelge 2.5.'de farklı kaynaklardan izole edilmiş enzimin K_m değerleri gösterilmektedir (11).

Çizelge 2.5. Farklı kaynaklardan elde edilen tirozinaz enziminin farklı substratlar için K_m değerleri

Substrat	K_m (mmol.l ⁻¹)	Enzim Kaynağı
Klorojenik Asit	1,66	Elma kloroplastı
	16,1	Armut
	1,20	Kayısı
	2,50	zm
	1,40	Patates yumrusu
	2,40; 1,10	şeker kamışı
	0,22	Mantar
zoklorojenik Asit	0,36	Kayısı
Kaffeik Asit	0,63	Elma kloroplastı
	0,50	Kayısı
	5,50	zm
	2,10	Patates yumrusu
	6,00; 8,70	şeker kamışı
(+) – Katehin	1,48	Elma Kloroplastı
	2,10	Armut
	0,74	Kayısı
	1,00	zm
(-) – Epikatehin	0,55	Kayısı
p – Kresol	0,67	Patates
Katekol	4,60	Elma
	20,9	Armut
	120	şeftali
	2,40	Kayısı
	3,06	zm
	0,11	Patates Kabuğu
	4,80	Patates Yumrusu
	1,68	Patlıcan
	2,50; 3,00; 4,00;	Mantar1
	22,0	Mantar2
	4 – Metilkatekol	1,40
L – DOPA	11,8	Patates yumrusu
	2,0	şeker Pancarı

Mono ve dihidroksi fenollerin sübstitüsyon merkezi tirozinazın atak yapabilmesi bakımından önemli bir faktördür. Monofenoller de p-pozisyonunda CH₂'den büyük

bir grup varsa daha kolay hidroksillenebilir ve p-sübstitüe 3,4-dihidroksi fenollerin oksitlenme hızı ise 2,3-dihidroksi fenollerden daha büyüktür. Halkada 3- pozisyonunda bir sübstitüent bulunması muhtemelen sterik engelden dolayı enzimin substrata karşı afinitesini azaltır. Enzimin substrat aktivitesini para pozisyonunda elektron verici bir grubun bağlı olması artırırken, elektron alıcı bir grubun bulunması azaltmaktadır (11).

Optimum pH ve sıcaklık

Tirozinaz enziminin optimum pH'sı enzimin kaynağına ve substrata göre çok geniş bir aralıktır ve genellikle pH 4,0 ile 7,0 arasında farklılıklar göstermektedir. Birkaç kaynaktan elde edilen tirozinaz enzimiyle yapılan araştırmalarda 4,0'ın altındaki pH değerlerinde enzimin inaktif olduğu bildirilmiştir. Patatesten elde edilen tirozinaz enzimi pirogallol ve klorojenik asit için pH 5,0'da inaktif iken, mandalınadan elde edilen tirozinaz enzimi 6,0'ın altındaki pH değerlerinde pirogallolu oksitleyemez. Çizelge 2.6.'da çeşitli kaynaklardan izole edilen tirozinaz enziminin bazı substratlar için optimum pH değerleri gösterilmektedir (11).

Farklı kaynaklardan izole edilen tirozinaz enziminin optimum sıcaklık değerleri de Çizelge 2.7.'de gösterilmektedir (11). Çizelge 2.7.'de gösterilen farklı kaynaklardan izole edilen tirozinaz enziminin optimum sıcaklık değerlerini de dikkate alırsak tirozinaz enziminin optimum sıcaklığı genellikle 25 °C ile 35 °C arasındadır (23).

Tirozinaz enzimi sıcaklığa karşı çok dayanıklı değildir. Dokularda veya çözeltilerde bulunan tirozinaz enzimi kısa süreli 70 °C ile 90 °C arasında bir sıcaklığa maruz kalması katalitik fonksiyonlarında tamamen yada kısmen tahribatlara sebep olmaya yeter. Yine tirozinaz enziminin sıcaklığa dayanıklılığı da optimum pH, optimum sıcaklık ve substrat spesifikliğı gibi enzimin izole edildiğı kaynağına göre de değişir (11).

Çizelge 2.6. Çeşitli kaynaklardan izole edilen tirozinaz enziminin çeşitli substratlar için optimum pH değerleri

Enzim Kaynağı	Optimum pH	Substrat
Şeftali	6,0 – 7,0	Katekol
Kiraz	4,0 4,2 4,5 7,5	4 – Metil katekol Katekol Klorojenik asit Katehin
Üzüm	6,2 6,5 7,0	Klorojenik asit Katekol Katehin, Pirogallol
Mandalina	7,2 – 7,6	Pirogallol
Avokado	5,3 – 6,7	4 – Metil katekol, DOPA
Patates	5,8	Katekol
Patlıcan	5,0 – 6,8	Katekol
Mantar	5,5 – 7,0 6,0 – 7,0	Katekol p-Kresol

Çizelge 2.7. Farklı kaynaklardan izole edilen tirozinaz enziminin optimum sıcaklık değerleri

Enzim kaynağı	Optimum sıcaklık (°C)	Substrat
Kayısı	25	Katekol
Muz	37	Katekol
Elma	25 – 30	Klorojenik asit
Patates	22 15 – 35	Katekol Pirogallol

Tirozinaz enziminin inhibitörleri ve aktivatörleri

Tirozinazın inhibisyonu ile enzimatik kararmanın önlenmesi çoğu kez aynı ve benzer konu gibi ele alınmıştır. Ancak kararma sadece enzimin inaktif olmasıyla değil aynı zamanda reaksiyon için gerekli iki substrattan birinin (O_2 veya fenolik bileşik) uzaklaştırılmasıyla da önlenabilir. Meyve ve sebzelerde çoğu kez enzimatik reaksiyonlara bağlı oluşan kararma istenmeyen bir durumdur. Tirozinaz enziminin kararmaya sebep olacak oksidasyonları katalizlemesini önlemek amacıyla tirozinaz enzimi inhibitörleri hakkında detaylı çalışmalar yapılmış ve bu çalışmalar halen de devam etmektedir.

Siyanür, karbon monoksit, sodyum dietil-ditiyokarbamat (DICEA), askorbik asit, azit ve potasyum metil ksantat gibi metallere kompleks oluşturan ligandlarla tirozinazın prostetik grubunda bulunan bakırın şelat oluşturması sonucu tirozinaz inhibisyonuna uğrar.

Florür, azit ve borat gibi inorganik iyonların da tirozinazı inhibe ettikleri görülmüştür. Bakladan elde edilen tirozinaz enziminde florür yarışmasız inhibitörken, azit karışık tip inhibitördür. Boratın da yarışmalı inhibitör olduğu bulunmuştur. Polivinilpirolidin (PVP) gibi çözünebilir polimerler de tirozinazın yarışmalı inhibitörleridir. PVP gibi çözünür polimerlerle inhibe olan enzim, ortama anyonik deterjan eklenmesi ile tekrardan aktivite gösterebilmektedirler (11).

Mantar tirozinazının hidrojen peroksit, askorbik asit fenil hidrazin, gallik asit ferrosiyenür ve NH_2OH gibi indirgeyici bir ajan ile reaksiyonu enzimin inhibe olmasına neden olur. İndirgeyici ajanların tirozinazın prostetik grubunda bulunan Cu^{2+} 'yi indirgedikleri bulunmuştur (22).

Mantar tirozinazı enzimatik reaksiyon sırasında ortamda herhangi bir inhibitörün bulunmaması durumunda da inaktive olabilmektedir. Bu işlem sırasında enzime bağlı bakır atomu salınır. Son zamanlarda Lerch ve arkadaşları *N. crassa* tirozinazının

inaktivasyonunun; 306. pozisyondaki histidin amino asidinin kaybı ve buna bağlı olarak bir bakır atomunun salınması sonucu oluştuğunu bildirmişlerdir (10,25).

Tirozinaz enzimi katalizlediği reaksiyonlar sonucu meyve veya sebzelerde kararmalara veya meyve sularında bulanıklık oluşturması gibi istenmeyen durumlara neden olur. Bunları engellemek amacı ile gıda endüstrisinde inhibitörler hakkında çokça çalışma yapılmış, bunun yanında tirozinaz enziminin aktivatörleri hakkındaki çalışmalar biraz arka planda kalmıştır.

Sodyum dodesil sülfat (SDS) gibi anyonik deterjanlar, tirozinaz enziminin aktivatörlerinden biridir. Yine üzümde elde edilen tirozinaz için, asidik ortamda veya üre çözeltisi ile kısa süreli temas, enzimin aktifliğini 4 ile 10 kat artırmaktadır. Aktivatörlerin etkileri yine optimum pH, optimum sıcaklık veya substrat spesifikliğindeki gibi izole edilen kaynağa göre değişmektedir. Örneğin ortama Cu^{2+} ilavesi turptan elde edilen tirozinazın aktivasyonunun artırırken, patatesten elde edilen tirozinazı ise etkilemediği gözlenmiştir.

Aktivatörler hakkında fazla çalışmanın olmamasına bağlı olarak, bu aktivatörlerin nasıl çalıştığı hakkında da pek bilgi yoktur. Aktivatörlerin bakır içeren enzim monomerlerinden oligomer oluşturduğu ve böylece enzimi biyolojik aktiflik için gerekli olan polimer yapısına getirdiği düşünülmektedir.

Enzim aktivitesi, suni gübrelerde bulunan eser elementlerden, olgunlaşmaya yardımcı olan maddelerden ve radyasyonlar gibi fiziksel işlemlerden etkilenir. Bu etkiler bitkideki enzim proteininin sentezini artırabilir, doğal inhibitörleri ortamdaki uzaklaştırabilir, substrat yapısını değiştirebilir veya hücre duvarı geçirgenliğini değiştirebilir ve bunlardan dolayı da enzim aktivitesini arttırabilirler (11).

Tirozinazın uygulama alanları

Tirozinaz enzimi gıda, sağlık, kozmetik ve arıtım endüstrilerinde uygulama alanı bulunabilen veya bulabileceği düşünölen bir enzimdir. Tirozinazın özellikle doğada bulunan pek çok bitki ve meyvelerde bulunması, ilk olarak tirozinazın gıda sektöründe dikkat çekmesine sebep olmuştur.

Tirozinazın gıda endüstrisi için önemi

İnsanlar bir gıdayı seçerken onun görünüşüne, lezzetine besinsel değerine ve dokularına dikkat ederler. Tabi ki ilk dikkati çeken görünüşüdür. Bir gıdada doğal rengi dışında bir kararma söz konusu olabilir, dokusunda ve lezzetinde bir bozunma olabilir ve yine meyve sularında yada şarap gibi içeceklerde bulanıklıklar veya çökelmeler oluşabilir. Bunlar da tüketici için istenilmeyen durumlardır ve tüketici bu durumdaki ürünleri tercih etmemektedir. Bu tercih edilmeyen ürünler, gıda sektöründe yüksek maliyete sebep olmaktadır. Bu bahsedilen istenilmeyen durumların oluşmasının sebeplerinden biri de tirozinaz aktivitesidir. Gıda sektörü genellikle bu istenilmeyen durumları ortadan kaldırmak için, tirozinazın inhibisyonu üzerinde çalışmaktadır. Ancak çay, kahve, kakao kuru üzüm, kuru erik, kuru incir gibi ürünlerin görünüm ve lezzet bakımından istenilen duruma gelebilmesi için tirozinaz enziminin aktif olması gereklidir. Bu gibi durumlarda ise yukarıdaki işlemden farklı olarak enzimin inhibe olmaması gereklidir (26).

Tirozinazın fenol giderilmesinde kullanımı

Endüstriyel ve belediyesel atıklarda aromatik bileşikler mevcuttur. Son zamanlarda çevre kirlenmesinin önlenmesi amacıyla toksik olan fenolik bileşikler gibi maddelerin atıklardan arındırıldıktan sonra, çevreye verilmesi için sıkı denetimler yapılmaktadır. Bu denetimler sonucunda daha ekonomik ve uygulanması kolay olabilecek, arıtım yöntemleri araştırılmakta ve enzimlerden yararlanılması düşünülmektedir. Özellikle tirozinazın toksik olan fenolik bileşikleri uzaklaştırmada kullanılabileceğinin ortaya çıkmasıyla bu konu üzerinde daha yoğun çalışmalar

sürdürülmüş ve bilim adamları bu çalışmaların mühendislik alanına taşınmasının gerektiğini bildirmişlerdir.

Araştırmalar sonucunda; Atlow ve arkadaşları endüstriyel atık sularından 0,01 - 1,0 g/L konsantrasyon aralığındaki fenollerin başarıyla çöktürülerek ortamdaki uzaklaştırılabileceğini söylemişlerdir. Ancak Wada ve arkadaşları bu araştırmacılarla uyuşmayan sonuçlar bildirmişlerdir. Wada ve arkadaşları “polifenollerin tirozinazla polimerizasyonundan sonra, herhangi bir çökeleğin oluşmadığını ve çözeltinin renginin, renksizden kahverengiye dönüştüğünü” açıklamışlardır. Wada ve diğer araştırmacılar, tirozinazın saflığının çökeltmenin oluşmasında büyük rol oynadığını düşünmektedirler. Çökeltme gözlenmediğine göre, reaksiyon ürünlerinin ortamdaki alınması için, kitin gibi maddeleri adsorbans olarak kullanmışlardır. Yapılan araştırmalar sonucu, oksidasyon ürünü olan kinonların ve diğer yan ürünlerin adsorplanarak ortamdaki uzaklaştırılması için kitosanın başarıyla kullanılabileceği görülmüştür (24).

2.5. Enzimlerin İzolasyonu

Bir enzimle veya proteinle çalışmak için o enzimin veya proteinin bulunduğu, diğer proteinlerin de olduğu yapıdan ayrılması gerekmektedir.

Enzim izolasyonu ve saflaştırma teknolojisi sürekli bir gelişim içindedir. Bitkisel, hayvansal kaynaklı enzimlerin saflaştırılmasına devam edilmekte ama daha çok mikrobiyal enzim izolasyonu ve saflaştırılması üzerinde durulmaktadır.

Enzimlerin kaynağı, bir doku veya mikrobiyal hücrelerdir. Bu hücrelerdeki enzimleri elde etmek için önce hücreler parçalanır ve “ham ekstrakt” denilen çözelti içinde enzim serbest bırakılır (27).

İzolasyon ve saflaştırma işlemleri üç aşamada olmaktadır:

1. Hücrelerin parçalanması,
2. Hücre bileşenlerinin ayrılması,
3. Saflaştırma işlemi (27).

2.5.1. Hücrelerin parçalanması

Bu işlemde birçok yöntem kullanılabilir. Ama genel olarak hayvansal doku ,bitkisel materyal ve mikroorganizmalarda farklı işlemler uygulanır. Bu basamaklar ise şöyledir:

Hayvansal dokulardan enzim izolasyonu:

- Hangi doku veya organ kullanılacaksa bu organ veya dokular önce iyice kıyılır.
- Doku homojenize edilir.
- Ya doğrudan uygun tampon ile enzim ekstraksiyonu gerçekleştirilir ya da önce aseton kuru tozu elde edilir, sonra bu tozdan ekstraksiyon yapılır.

Bitkisel materyalden enzim izolasyonu:

- Materyal homojenize edilir.
- Sonra gerekli kimyasallarla muamele edilir.

Mikroorganizmalardan enzim izolasyonu:

- Hücre membranının parçalanması veya geçirgenliğinin arttırılması gerekir. Sonra diğer yöntemlerde ki işlemler aynen uygulanır.

Bunun için yapılan işlemler sırasında sıcaklık yükselmesi, pH değişimi veya proteazların serbest hale geçmesi gibi nedenler ile enzim aktivitesinin düşeceği dikkate alınmalıdır (27).

Hücre parçalanması için kullanılan yöntemler kimyasal ve fiziksel yöntemler olmak üzere ikiye ayrılır (27).

Kimyasal yöntemler:

Alkali ile muamele: Mikroorganizma hücreleri pH 11-12'de 20-30 dakikada bekletilir. Böylece hücre membranı parçalanır (27).

Lizozim ve EDTA ile muamele: Lizozim, yumurta akından elde edilip, hücre membranında bulunan mukopeptitlerdeki $\beta(1-4)$ glikozit bağı parçalar. EDTA ise gram(-) bakterilerin membranını parçalar (27).

Deterjanlar ile muamele: Düşük iyon şiddetinde ve uygun pH'da deterjanlar biyolojik membranlardaki lipoproteinleri çözer ve membran geçirgen hale gelir. Ama protein denatürasyonu ve çökmesine neden olacağından enzim üretimi için tercih edilmez (27).

Soğuk şok: Hücre normal sıcaklığından aniden 0°C'ye soğutulur (27).

Osmotik şok: Mikroorganizma, besi ortam içeriklerinden kurtuluncaya kadar uygun tampon ile iyice yıkanıp, sonra %20'lik sakkaroz çözeltisinde yeniden dağıtılır (27).

Fiziksel yöntemler:

Ultrases: İnsan kulağının duyamayacağı yüksek frekanslı ses ile hücre parçalanır (27).

Dondurma ve çözme: Soğuk şok ve osmotik şoka benzer bir etki gösterir. Tek bir uygulama ile sonuç vermezse enzim aktivitesinde düşüşe neden olur çünkü; enzimin yapısını bozar (27).

Katı kırma: Endüstriyel boyutta kullanılan yöntemdir. Hücre ortamına aşındırıcı eklenip, hidrolik basınç uygulanarak hücre parçalanır (27).

Sıvı kırma: Endüstriyel boyutta kullanılabilen en verimli yöntemdir. İki şekilde uygulanabilir (27):

- a. Yüksek basınç homojenizatörü: Yüksek basınç altında bir iğneden hücrelerin geçmeye zorlandığı tekniktir. Yüksek basınçtan çıkan hücre membranı basıncı görünce parçalanır.
- b. Küreli değirmenler: Cam veya alüminyum oksit parçacıklarıyla hücreler mekanik işleme tabi tutulur.

2.5.2. Hücre bileşenlerinin ayrılması

Hücre bileşenlerinin ayrılmasında çöktürme hızlı ve etkili bir yöntemdir. Bunun için nötral tuzlar (setiltriethylamonyumbromür), organik çözücüler (Metanol, Etanol , Aseton) veya bazı polimerler (PEG) kullanılır. Hücre bileşenlerinin ayrılmasında çöktürmeye ilaveten santrifüjleme, filtrasyon, ekstraksiyon gibi yöntemler de kullanılır (27).

2.5.3. Saflaştırma işlemleri

Çoğu saflaştırma işlemlerinde birçok değişik metot enzimi tamamiyle saflandırmada ard arda kullanılmalıdır. Saflaştırma işlemlerinde kromatografi işlemleri ağırlıklı olmak üzere çeşitli yöntemler kullanılır. Bu yöntemler: İyon Değişim Kromatografisi, Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi, Jel Filtrasyon Kromatografisi, Affinite (sterik-seçicilik) Kromatografisi, Ultrafiltrasyon, Elektroforez'dir.

Yöntem seçimi tamamen deneyseldir. Bu konuda literatür taraması yapmak her zaman yararlıdır. Literatürde bir yöntemden bahsedilmemişse, deneyerek uygun

yöntem bulunur. İyi bir saflaştırma için ise birkaç yöntem birlikte ve ard arda yapılmalıdır. Ancak, her bir yöntemden sonra numune miktarı azalacaktır (27).

Saflaştırma işleminde uygun yöntem seçmek için aşağıdaki bilgilere sahip olmalıyız:

- Ürün oluşumu veya substratın harcanmasını belirlemek için bir analitik işlem,
- Enzim, koenzim veya kofaktör isteyen bir enzim mi?
- Substrat konsantrasyonuna enzim aktifliğinin bağılılığı nedir?
- Optimum pH' sı nedir?
- Enzimin kararlı olduğu ve yüksek aktiviteye sahip olduğu sıcaklık aralığı nedir (27).

İzolasyon ve saflaştırma adımlarından sonra sonuçlar, çizelge 2.8.'deki örnek tabloda verildiği gibi toplu olarak gösterilir (27).

Çizelge 2.8. İzolasyon ve saflaştırma adımları için örnek bir tablo

İşlem veya Basamaklar	Fraksiyon hacmi (ml)	Toplam Protein (mg)	Aktivite (ünite)	Spesifik Aktivite (ünite/mg)	Saflaştırma derecesi (KAT)
Hücresel ekstrakt	1400	10000	100000	10	1
Çöktürme	280	3000	96000	32	3,2
İyon-Değişim Kromatografisi	90	400	80000	200	20
Jel Filtrasyon	80	100	60000	600	60
Affinite Kromatografisi	6	3	45000	15000	1500

Enzim aktifliği: Çalışmaların çoğunda çok küçük derişimlerde olduklarından, (enzim derişimleri hücre dışında 10^{-5} - 10^{-8} M aralığında, hücre içinde de 10^{-7} - 10^{-12} M aralığındadır) enzimin gerçek molar derişimi bilinemez. Dolayısıyla mevcut enzim miktarı, enzim aktifliğiyle açıklanır. Enzim aktifliği başlangıç reaksiyon hızıdır. Başlangıç reaksiyon hızı da enzim kendi substratıyla etkileştirilerek, azalan substrat derişiminden ya da oluşan ürün derişiminden gidilerek saptanır.

Enzim aktifliklerini standart hale getirmek için Uluslararası Biyokimya Birliği standart birim tanımlamıştır. Bu birim, ünitedir (I.U). nite, optimum koşullarda (pH, T) 1 dakikada 1 μ mol ürün oluşumunu sağlayan (ya da 1 μ mol substratı dönüşüme uğratan) enzim miktarıdır.

Spesifik aktivite: Proteinin miligramı başına düşen enzim aktifliğidir. Buna göre; spesifik aktivite, enzim saflığının bir lsdr. Spesifik aktivite, enzimin saflaştırılması sırasında artar ve maksimum düzeye gelir. Enzim safken ise sabittir.

Saflaştırma derecesi: Saflaştırılmış kısmın spesifik aktivitesi ham ekstraktın spesifik aktivitesine bölünerek bulunur. Örneğin başlangıca göre ne kadar saflaştığını gösterir.

Çizelge 2.1.'de görüldüğü üzere aktivite azaldığı halde spesifik aktivite artmıştır. Aktivite her basamakta azalır çünkü zeltideki diğer maddeler veya kromatografik maddelerle etkileşimler veya bazı inaktivasyonlardan dolayı kayıplar daima meydana gelir. Toplam protein de azalır çünkü amaç mümkün olduğu kadar spesifik olmayan (istenmeyen) proteini ortamdaki uzaklaştırmaktır.

2.6. Enzimlerin İmmobilizasyonu

Kelime anlamı olarak immobilizasyon, ‘çözünmez hale getirilmiş, tutuklanmış, bağlanmış, hareketi sınırlandırılmış’ demektir. Bilindiği gibi enzimler suda çözünen, spesifik katalizörlerdir. Endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştirildiğinden katalizör olarak kullanılan ve reaksiyon ortamında çözünür olarak bulunan serbest enzimin aktivitesini yitirmeden, kullanıldığı ortamdan geri kazanılması mümkün değildir. Ayrıca ürünün enzimden ayrılması da maliyeti artırmaktadır. Enzimin yeniden kullanılması mümkün olmaz. Bu ise enzimlerin çok spesifik, ama o ölçüde de pahalı katalizörler olmaları nedeniyle maliyeti yükselten önemli bir etmendir (28).

Enzimler, suda çözünmeyen bir matrikse bağlandıklarında, matrikslerin içinde tutulduklarında veya katalitik etkileri kaybolmadan birbirlerine bağlandıklarında immobilize olurlar. İmmobilize enzimlerin özellikleri kullanılan metoda ve matriksin yapısına bağlı olarak değişebilir.

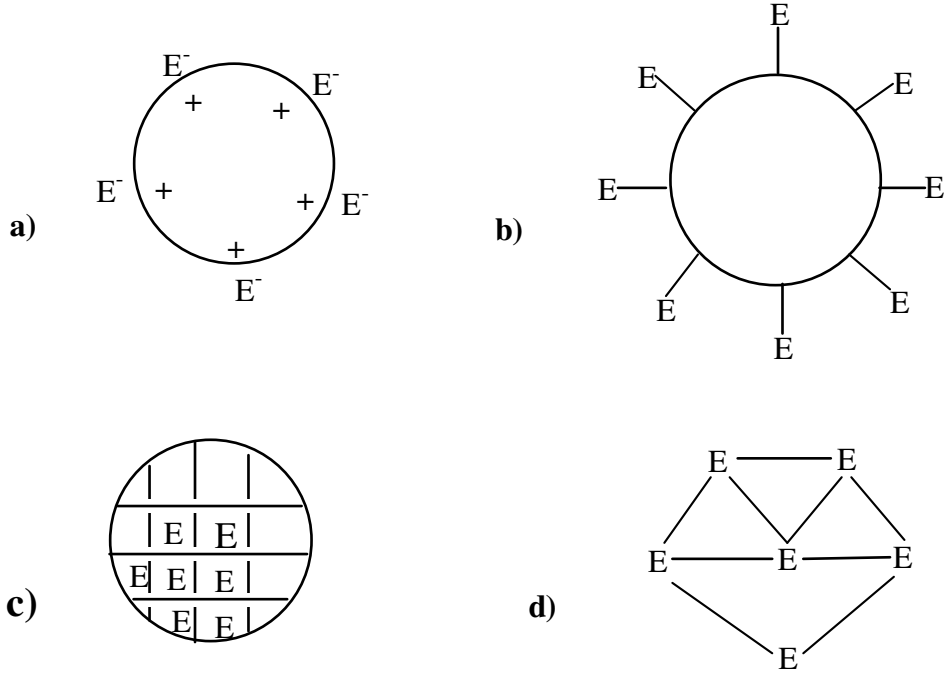
İmmobilize enzimlerin sağladığı bazı avantajlar şunlardır (28):

- Ürünler saf olarak elde edilebilir.
- Enzimler defalarca kullanılabilir.
- Sürekli prosesler gerçekleştirilebilir.
- Üretim maliyeti düşer.

2.6.1. İmmobilizasyon metotları

Pek çok değişik doğal veya sentetik matriksler enzimlerin immobilizasyonunda kullanılmaktadır. Enzimler bu matrikslere aşağıdaki metodlardan biriyle immobilize edilirler. Şekil 2.14.’de bu immobilizasyon metotları şematik olarak gösterilmektedir.

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



Şekil 2.14. Çeşitli immobilizasyon metodlarının şemaları a) Adsorpsiyon b) Kovalent bağlanma c) Hapsetme d) Enzimlerin birbirine bağlanması

Adsorpsiyon

Enzimler değişik matrikslere adsorbe edilebilirler. Adsorbsiyon fiziksel ve iyonik adsorbsiyon olmak üzere iki türdür. Adsorbsiyonda işlem çok basittir. Biyokimyasal materyal (enzim ya da hücre), matriks ile uygun koşullarda (optimum pH ve optimum sıcaklık) karıştırılarak yapılır. Fiziksel adsorpsiyonsa enzim ile matriks arasında van der Waals, hidrojen bağları gibi zayıf etkileşimler, iyonik adsorbsiyonda ise elektrostatik etkileşimler meydana gelir. İyonik adsorbsiyon, fiziksele göre daha etkindir. Bağlanmamış biyolojik materyalin alınması için enzim adsorblanmış materyal, adsorbsiyon işleminden sonra bolca yıkanır.

İyonik bağlanma, enzimlerin bir matrikse özel olarak bağlanmasını sağlar. Enzimlerin optimum aktiviteye sahip oldukları pH'da taşıdıkları net yüke bağlı olarak, negatif veya pozitif yük taşıyan iyon değiştirici reçineler iyonik adsorbsiyonda kullanılmaktadır. Sıkça kullanılan adsorbanlar çizelge 2.9.'de verilmektedir (29,30)

Çizelge 2.9. Enzim immobilizasyonunda sıkça kullanılan adsorbanslar ve bunların etkileşim türleri

Etkileşimler	Adsorban
Fiziksel adsorbsiyon	Aktif karbon, silikajel, alümina, cam, nişasta, kil
İyonik bağlanma	Kasyon değiştiriciler: (Anyonik reçine, - yüklü) CM-sellüloz Dower 50 Amberlite CG-50 Anyon değiştiriciler: (Kasyonik reçine, + yüklü) DEAE-sellüloz DEAE-sephadex Amberlite IR-45

Basit, ucuz ve kısa süren bir yöntem olması, enzimde ve matrikste bir değişikliğin meydana gelmemesi, işlemin tersinir olması ve desorpsiyon sonucu matriksin geri kazanılabilmesi bu metodun avantajlarıdır. Dezavantajı ise, enzimin matrikse zayıf etkileşimlerle bağlanmasından dolayı enzimin sızıntı yaparak ürünü kirletmesidir (28).

Kovalent bağlanma

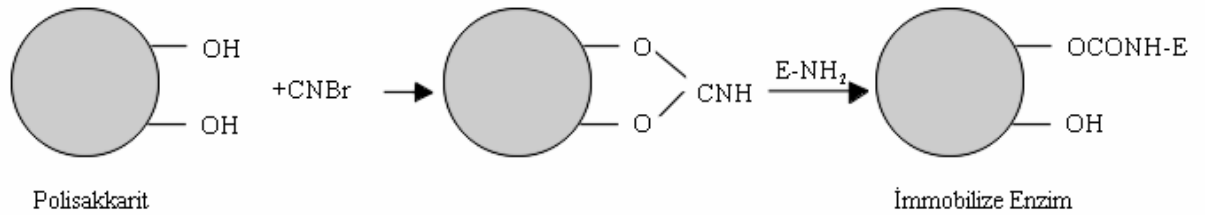
Enzim matrikse kovalent bağlarla bağlanır. Bir enzimin kovalent olarak bir matrikse bağlanmasında kullanılan fonksiyonel gruplar genellikle serbest amino veya karboksil gruplarıdır. Sülfidril, hidroksil veya imidazol grupları da kullanılabilir.

Çok çeşitli matriksler bu amaçla kullanılabilirler. Bunlar çeşitli polimerler, selüloz, poröz cam, kömür ve seramik gibi matrikslerdir.

İmmobilizasyon işlemi iki adımdır. Birinci adımda matriks aktif hale getirilir. İkinci adımda da enzim bağlanır. Aşağıda kovalent bağlanmaya iki örnek verilmiştir (28,29,30).

Siyanojen bromür aktivasyonu:

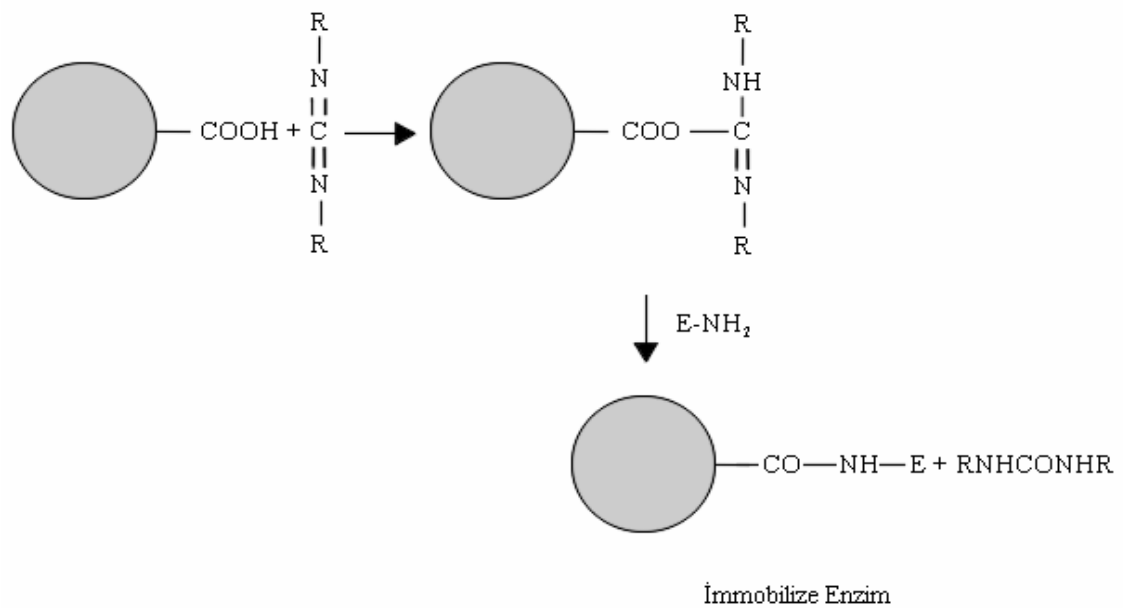
Çeşitli polisakkaritler siyanojen bromür kullanılarak aktif hale getirilirler ve enzimlerin amino gruplarıyla Şekil 2.15.'de gösterildiği şekilde kovalent bağ oluştururlar (28).



Şekil 2.15. Polisakkaritlerin siyanojen bromür kullanılarak enzimlerin kovalent immobilizasyonu

Karbodiimit aktivasyonu:

Karboksil grubu taşıyan matriksler karbodiimitler kullanılarak aktif hale getirilip enzimlerin immobilizasyonunda kullanılabilirler. Bu immobilizasyon şekil 2.16.'de gösterilmektedir (28).



Şekil 2.16. Karboksil grubu taşıyan matrikslere karbodiimitlerin kullanılmasıyla enzimlerin kovalent immobilizasyonu

Hapsetme (entrapment)

Bu yöntemde enzimler jellerin veya polimerlerin içinde tutulurlar. 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 (difüzyonundaki) güçlüğüdür, dolayısıyla difüzyon problemi vardır.

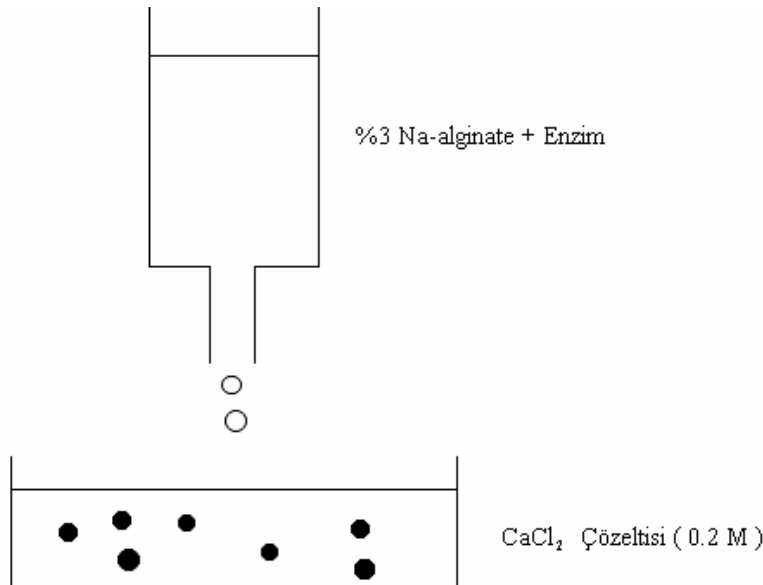
Anlaşılabileceği gibi substratın büyük moleküllü olması halinde yöntem sonuç vermez. Yöntem küçük moleküllü substratlar için uygundur (28,29,30).

Enzimlerin kalsiyum aljinat ile immobilizasyonu

Aljinat deniz yosunlarından elde edilen bir polisakkarittir. α -L-Glukuronik asit ile β -D-Mannuronik asitin $\beta(1\rightarrow3\rightarrow4)$ şeklinde bağlanmasıyla meydana gelmiştir.

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 CaCl_2 çözeltisine damla damla ilave edilir. Sodyum aljinat CaCl_2 ile temas ettiğinde Na-Ca değişimi nedeniyle suda çözünmeyen kalsiyum aljinat kürecikleri meydana gelir. Enzim molekülleri serbest halde bu kürecikler içinde bulunur.

Şekil 2.17’de aljinat ile enzimlerin immobilizasyonu gösterilmiştir. Genellikle %2-3’lük aljinat çözeltileri kullanılır.

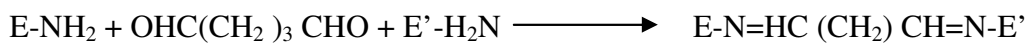


Şekil 2.17. Aljinat ile enzimlerin immobilizasyonu

Zamanla enzim molekülleri bu jellerden dışarı sızarlar. Bu durumu önlemek için çapraz bağlayıcılar (glutaraldehit, heksametilen diamin gibi) kullanılmaktadır (28,29,30).

Enzimlerin birbirine bağlanması

Enzimler iki veya daha fazla fonksiyonel grubu olan çeşitli maddeler kullanılarak birbirlerine kovalent olarak bağlanabilirler. Glutaraldehit bu maksatla sıkça kullanılır. Glutaraldehit ile bir enzim molekülü başka bir enzim molekülüne kovalent olarak aşağıdaki şekilde bağlanır.



Bu metotta destek materyal yoktur. Bu nedenle enzimler birbirleri için matriks olarak kullanılırlar. İşlem sonunda jelatimsi, dayanıksız bir yapı oluşur ve bu nedenle tercih edilmez (28,29,30).

2.7. Tirozinazın İmmobilizasyon Çalışmaları

İmmobilizasyon işlemlerinin avantajlarından yararlanabilmek için, tirozinaz enzimiyle de pek çok immobilizasyon çalışmaları yapılmıştır.

İki kitosan film arasına adsorpsiyonla immobilize edilen tirozinazın aktivitesinin %45 olduğu ileri sürülmektedir. Toksik karışımdan seçici olarak fenollerin uzaklaştırılma performansını görebilmek için; amino grubu içeren kitosan jel film üzerine tirozinaz adsorplanarak, fenollerin o-kinonlara dönüşümünü sağlanmış ve enzim içeren kitosan jelin performansının tirozinaz kitosan oranına bağlı olduğu fikri ileri sürülmüştür (31).

Wada ve arkadaşları Tirozinazı kuvvetli bir asidik katyon değiştirici reçine olan Diaion WK-20 üzerine adsorpsiyonla ve 1-etil-3(3-dimetil-aminopropil) karbodiimid ile çapraz bağlanma ile immobilize ettiklerinde aktivite verimini %16,3

saptamışlardır. İmmobilize tirozinaz 25 °C de 96 saat saklandığında ilk aktivitesini %50 korurken çözümlenür enzim %20 koruyabilmiştir. İmmobilize tirozinazı ve kitosanı birlikte kullanarak 2 saat içinde fenolün %100 oranında uzaklaştırıldığını gözlemişlerdir (32).

Poliakrilamid jel içine hapsedme depolama kararlılığını arttırmaktadır. İmmobilize tirozinaz oda sıcaklığında veya 6 °C'nin üstünde bir sıcaklıkta 13 gün boyunca ilk aktivitesini %43 ile %70 oranında koruyabilmiştir (31). Tirozinazın immobilizasyonu termal kararlılığı artırır. Jelde tutuklanan tirozinazın protein yapıları korunur ve aktivitesinin %80'ninden fazlasını devam ettirir. Oysa serbest haldeki tirozinaz sıcaklığın etkisiyle parçalanır ve aktivitesinin %75 oranında kaybeder. Jelde tutuklanmış tirozinaz toksik aromatik bileşikler farklı derecelerde uzaklaştırmaktadır (24).

Amino(fenil)trimetoksisilan ve HNO₂ gibi diazo bağlayıcı ile poröz cama immobilize edilen tirozinaz sürekli sistemlerde fenol giderilmesinde kullanılmıştır. İmmobilize tirozinaz ilk aktivitesini 3 ay boyunca % 83 oranında korumuştur. Substrat olarak 10⁻⁴M'lık fenol tekrarlanarak kullanıldığında; aktivitede sürekli olarak bir düşüş gözlemlenmiş ve arka arkaya 12 oksidatif döngü gerçekleştirildiğinde ilk aktiviteden %80 oranında bir kayıp olmuştur. 10⁻⁵M'lık örnek fenol çözeltisi kullanıldığında bu etki gözlenmemiştir (31).

Tirozinaz aktifleştirilmiş magnetit partiküller üzerine immobilize edildiğinde %80 oranında immobilize olmuş ve %70 ile %80 arasında da aktivitelerini muhafaza etmiştir. İmmobilize tirozinaz serbest enzimden daha yüksek bir depolama kararlılığı göstermiş (5 °C de 15 günlük bir bekleme süresinde %30 a karşı %90 aktiviteyi korumuştur) ve fenol oksidasyonunu serbest enzimden daha hızlı gerçekleştirmiştir. Bu olay immobilize enzimin ürün inaktivasyonuna karşı daha az duyarlı hale gelmiş olabileceği fikri ile açıklanmıştır. Enzimatik yolla fenol uzaklaştırılması işlemi heksametilendiamin-epiklorohidrin koagülantının kullanılmasıyla daha başarılı olmuştur (31).

Tirozinaz kovalent çapraz bağlanma ile Naylon-66 üzerine immobilize edildiğinde çözünen enzimden 2,2 kat daha fazla benzokinin üretilmiş ve çözünen enzime oranla onda bir oranında inaktive olmuştur. İmmobilize tirozinazın kararlılığını oksijen azaltmıştır. İnaktivasyon oranı 100 kPa oksijen altında 21 kPa oksijen altındakinden 3,6 kat daha hızlı olmuştur. Naylon-66 üzerine kovalent çapraz bağlanmış tirozinazın katekolaz aktivitesi için uygun olduğu görülmüştür (31).

Aljinat jel içine tirozinaz hapsedilerek immobilizasyon yapılmış ve substrat olarak tiaflavin kullanılmıştır. İmmobilize tirozinazın spesifik aktivitesi immobilizasyon işlemi süresince çözünür tirozinazla karşılaştırıldığında %7'lik, K_m değerinde de %40'lık bir azalma olmuştur. Tiaflavinin maksimum verimi reaktör içindeki immobilize tirozinazla 20 -30 dakikalık bir işlem sonunda elde edilmiştir (31).

Tirozinaz bir çeşit kil minerali olan montmorillonite'nin bir kompleksi olan Ca-montmorillonite (Ca-Mte) ya da farklı hidroksialiminyum-montmorillonite ($Al(OH)_x$ -Mte) kompleksleri üzerine immobilize edildiğinde Ca-montmorillonite'nin (Ca-Mte)'nin hidroksialiminyum-montmorillonite ($Al(OH)_x$ -Mte) komplekslerinden daha çok tirozinaz molekülü adsorplandığı bulunmuştur. Yalnız ($Al(OH)_x$ -Mte) kompleksinde $Al(OH)_x$ miktarının artmasıyla tirozinaz adsorpsiyonunun arttığını ve hatta Ca-montmorillonite üzerine adsorplanan enzim miktarının iki katı daha fazla enzim adsorplanabileceği gözlemlenmiştir (32,33).

Tirozinaz hidrofobik polietersülfon kapiler membranlarına ve hidrofilik naylon tabaka membranlarına adsorpsiyonla daha sonra gulutaraldehitle çapraz bağlanarak immobilize edilmiştir. (24).

Mantar tirozinazı aljinat jel, poliakrilamid jel ve jelatin içinde hapsetme yöntemi ile immobilize edilmiştir. Aljinat jel içine hapsetme işleminde kalsiyum aljinat (Ca-aljinat), bakır aljinat (Cu-aljinat) ve baryum aljinat (Ba-aljinat) olmak üzere üç farklı 2 değerlikli katyon içeren aljinatlar kullanılmıştır. Substrat olarak L-DOPA üretimi için tirozin kullanılarak, immobilize tirozinazın aktivitesi ölçüldü ve en yüksek aktivite %67 ile Cu-aljinatta gözlemlenmiştir. İmmobilize tirozinaz 30'ar dakikalık

kullanılma süreleriyle 8 kez kullanılmış ve Ca-aljinata immobilize edilen enzimde 3. kullanımdan sonra ilk aktiviteye göre %25'lik bir artışın gözlenmesine rağmen 5. kullanımdan sonra hiç aktivite göstermemiştir. Ba-aljinata immobilize edilen enzim 7. kullanımda hala ilk aktivitesini %44 oranında korumuştur ancak daha sonraki kullanımda aktivite göstermemiştir. Cu-aljinata immobilize edilen enzim 8 kez kullanılmasına rağmen hala ilk aktivitesini %65 oranında devam ettirmiştir. 21 gün boyunca 20 °C'de 0,1 M pH 7 olan fosfat tamponunda saklanan immobilize enzimler içinde; yine en iyi depolama kararlılığı gösteren ilk aktivitesini % 67 oranında koruyan Cu-aljinat olmuştur. Poliakrilamit jel içine hapsedme yöntemiyle immobilize edilen tirozinazın en yüksek aktivite verimi %57'dir ve 8 kez kullanılmasına rağmen ilk aktivitesini %60 oranında korumuştur. Jelatin jel içine hapsedme yöntemiyle immobilize edilen tirozinazın aktivitesi %88'dir ve 8 kez kullanımdan sonra ilk aktivitesini %30 oranında korumuştur (34).

Tirozinazı immobilize ederek biyosensör olarak kullanılmak üzere çalışmalar da yapılmıştır. Metil meta akrilat ve glisidil meta akrilat'ın reaksiyonu ile hazırlanan polimer üzerine tirozinaz immobilize edildiğinde % 100 verimle ürün elde edilmiştir. İyi bir kararlılık sergileyen biyosensör, tirozinaz – modifiye polimer ve platin elektrot ile hazırlanmıştır. Bir başka tirozinaz biyosensörü Al_2O_3 sol – jel üzerine tirozinaz immobilize edilerek hazırlanmıştır ($Al:H_2O:HCl = 1:100:0,05$). Yeni enzim biyosensörün hassaslığını test etmek için fenol örnekleri üzerinde bazı analizler yapılmış ve bu metotla standart arasında iyi bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Bu yüzden düşük fiyatta güvenilir bir enzim biyosensörü olabileceği bildirilmiştir (31).

3. KULLANILAN MATERYAL ve METODLAR

3.1. Materyaller

Aseton, Fenol, NH₄Ac (Amonyum asetat), HAc (Aasetik asit), NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, NaOH, (NH₄)₂SO₄, Askorbik asit, TCA (Trikloroasetikasit) ve Katekol Merck Firmasından, Kitosan Aldrich Firmasından, Gulutaraldehit Sigma Firmasından temin edildi. Enzim izole etmek amacıyla kullandığımız yemeklik kültür mantarı (*Agaricus bispora*) marketten satın alındı ve Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde *Agaricus bispora* türünde olduğu teyit ettirildi.

Absorbans ölçümleri için Hach model UV/VIS spektrofotometre, pH ölçümleri için Jenco 6173 model pH-metre, kolondan fenol çözeltisinin geçirilmesi için Masterflex Model 7518-00 marka peristaltik pompa, kolonunu sıcaklığını sabit tutmak için Haakecaon – Haakp5 marka sirkülatör, Nüve ST 402 markalı çalkalamalı su banyosu, Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde bulunan Universal 32 R markalı ultrasantrifüj kullanıldı.

3.2. Enzim İzolasyonu Ve Kısmi Olarak Saflaştırma

3.2.1. Enzim izolasyonu

Bir gece önce dondurucuda dondurulan 100 g mantara 125 ml soğuk aseton eklendi ve homojenizatörde 2 dakika karıştırılarak bulamaç haline getirildi. Bu bulamaç Whatman No:1 filtre kağıdından vakumda süzüldü. Filtre kağıdında kalan mantar posası alındı ve üzerine 125 ml soğuk aseton ilave edildi. Homojenizatörde 2 dakika karıştırılarak iyice bulamaç haline getirildikten sonra bu bulamaç Whatman No:1 filtre kağıdından vakum altında tekrar süzüldü. Filtre kağıdında kalan posa alındı ve 90 ml %30'luk (v/v) soğuk aseton içine atıldı. Homojenizatörde 2 dakika karıştırıldı. Bu karışımın hacmi ölçüldü ve ham ekstraktın protein tayini ve enzim aktivite tayini yapıldı (34).

3.2.2. Kısmi enzim saflaştırma

Ham ekstrakt Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde bulunan Universal 32 R markalı ultrasantrifüj kullanılarak 9000 rpm'de 20 dakika 0 °C'de santrifüj edildi. Üstte kalan sıvı kısım alındı. Santrifüjden sonra sıvı kısma 90 ml soğuk aseton damla damla -15 °C'de ilave edildi ve ultrasantrifüjde 9000 rpm'de 20 dakika 0 °C'de santrifüjlendi. Çöken kısım alındı. Çökelek 30 ml pH 7 olan 0,1 M fosfat tamponunda çözüldü. Çözeltiye %10 doyumluğa ulaşacak şekilde katı $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ilave edildi ve 2 saat 4 °C'de bekletildi. Daha sonra ultrasantrifüjde 9000 rpm'de 0 °C'de 30 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan çözelti alındı ve hacmi ölçüldü. Çözeltiye %60 doyumluğa ulaşacak şekilde katı $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ilave edildi. 4 °C'de 2 saat bekletildi ve ultrasantrifüjde 9000 rpm'de 0 °C'de 40 dakika santrifüj edildi. Aynı numune daha sonra 9500 rpm'de 10 dakika daha santrifüj edildi. Çöken kısım alındı. En az hacimde (15 ml) pH 7 olan 0,1 M fosfat tamponunda çözüldü. Bu aşamaya kadar bütün kısmi saflaştırma basamaklarında protein tayini ve aktivasyon tayini yapıldı. Çözelti küçük moleküllü proteinlerin ve tuzların ayrılması için pH 7 olan 0,1 M fosfat tamponuna karşı 4 °C'de 1 saat aralıklarla tampon çözelti değiştirilerek 6 saat boyunca diyaliz edildi. Diyalizden sonra diyaliz torbasında kalan çözeltinin protein tayini ve aktivasyon tayini yapıldı ve daha sonraki işlemlerde tirozinaz enzimi olarak kullanılmak üzere ependorf tüplerine 1'er ml'lik kısımlar halinde alındı. Bunlar derin dondurucuda saklandı (34).

3.3. 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 (I.U) 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 (13).

3.3.1. Ham ekstraktta enzim aktifliği tayini

Ham ekstrakt çözeltileri bulamaç halinde olduğu için aktivasyon tayini yapmaya uygun değildi. Bu bulamaç önce tülbentten süzöldü. Daha sonra süzöntü yine de bulanık olduğu için 3500 rpm de 3 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan sıvı kısım alındı. Bu sıvıdan 0,1 ml alındı ve üzerine 2,9 ml 10 mM'lık katekol çözeltilerinden eklendi. 1 dakika sonra 420 nm de absorbans okundu.

3.4. Protein Tayini

Protein tayini yapılacak çözeltilerden 1 ml alındı. Bunun üzerine 1 ml %10'luk TCA ilave edildi ve proteinler çöktüröldü. Bu çözeltiler 4500 rpm de 3 dakika santrifüj edildi. Çökelek alındı ve 1 ml 1M NaOH'de çözüldü. Çözeltiler üzerine 1,5 ml biüre reaktifleri ilave edildi. Bu çözeltiler 10 dakika 37 °C su banyosunda bekletildi. Daha sonra soğutuldu ve 540 nm de absorbans değeri ölçöldü. Standart albümin çözeltileri ile hazırlanmış olan kalibrasyon grafiğinden protein konsantrasyonu saptandı.

3.4.1. Ham ekstraktta protein tayini

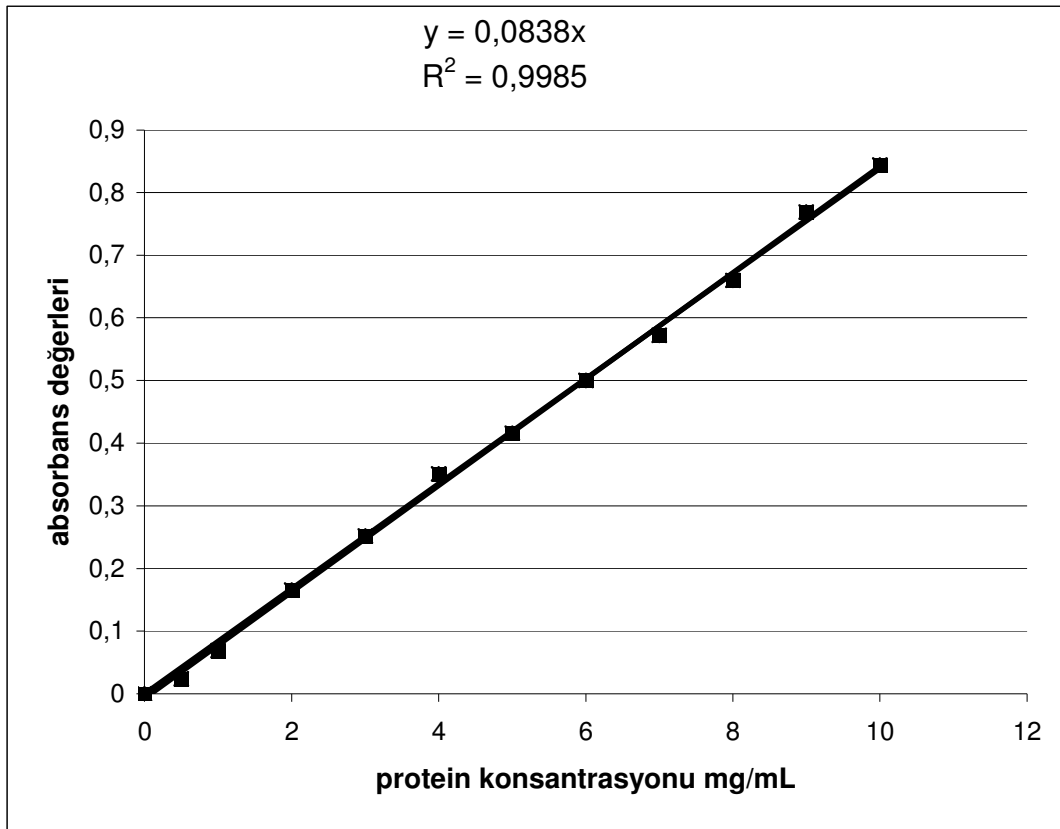
Ham ekstrakt çözeltileri bulamaç halinde olduğu için protein tayini yapmak için uygun değildi. Bu bulamaç önce tülbentten süzöldü. Daha sonra süzöntüden 1 ml alındı. Bunun üzerine 1 ml %10'luk TCA ilave edildi ve proteinler çöktüröldü. Bu çözeltiler 4500 rpm de 3 dakika santrifüj edildi. Çökelek alındı ve 1 ml 1M NaOH'de çözüldü. Çözeltiler üzerine 1,5 ml biüre reaktifleri ilave edildi. Bu çözeltiler 10 dakika 37 °C su banyosunda bekletildi. Daha sonra soğutuldu ve 540 nm de absorbans değeri ölçöldü. Standart albümin çözeltileri ile hazırlanmış olan kalibrasyon grafiğinden protein konsantrasyonu saptandı.

3.4.2. Protein tayini için biüre reaktifinin hazırlanması

3 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve 9 g sodyum potasyum tartarat 500 ml 0,2 M NaOH çözeltisinde çözüldü. Çözelti içerisine 5 g potasyum iyodat eklendi ve çözüldü. Karışımın hacmi 0,2 M NaOH ile 1000 ml'ye tamamlandı .

3.4.3. Protein tayini için kalibrasyon grafiği

10 mg/ml konsantrasyonunda stok albümin çözeltisi hazırlandı. Daha sonra bu stok çözeltiden seyreltme yapılarak 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 9 mg/ml ve 10 mg/ml'lik çözeltiler hazırlandı. Bu çözeltilerden 1'er ml alınıp üzerlerine 1,5 ml biüre reaktifi ilave edildi ve karıştırıldı. Bunlar 10 dakika 37 °C su banyosunda bekletildi. Daha sonra soğutulup 540 nm'de absorbansları ölçüldü ve şekil 3.1.'deki kalibrasyon grafiği çizildi.



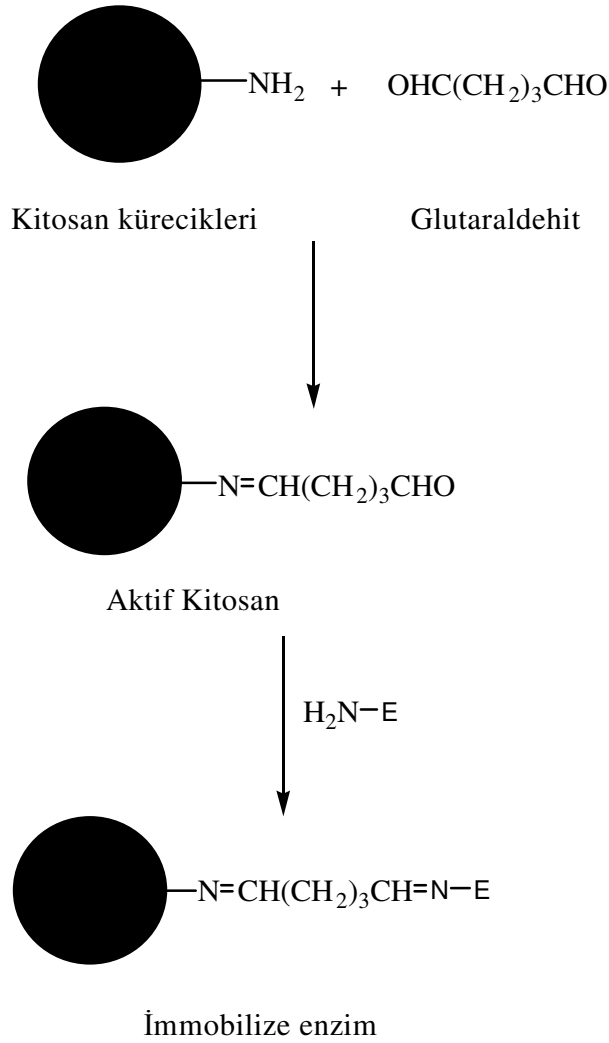
Şekil 3.1 Protein kalibrasyon grafiği

3.5. Tirozinaz Enziminin V_m ve K_m Değerlerinin Tayini

Serbest tirozinaz enziminin V_m ve K_m değerleri Lineweaver – Burk grafiği yardımıyla tayin edildi. Bu işlem için 1 mM, 1,5 mM, 2 mM, 7 mM, 10 mM, 14 mM, 17 mM ve 20 mM'lık katekol çözeltilerinin ($[S_0]$) tirozinaz enzimiyle vermiş olduğu reaksiyon başlangıç hızları saptandı (V_0). $1/V_0$ değerleri $1/[S]$ 'ye karşı grafiğe geçirildi. V_m değeri enzimin tamamının substrata doygun olması halinde elde edilen maksimum hızdır. V_m değeri denemelerdeki enzim derişimine bağılı bir sabittir oysa K_m değeri eğer aynı substrat kullanılmışsa ve aynı kaynaktan izole edilen enzim söz konusu ise enzim derişiminden bağımsız gerçek bir sabittir. K_m substratın hücre içi derişimini yaklaşık olarak belirler. K_m değeri aynı zamanda enzim aktif merkezinin substrata olan ilgisini gösterir.

3.6. Enzim İmmobilizasyonu

0,30 g kitosan 15 ml 0,3 M amonyum asetat çözeltisinde çözüldü. Bu çözelti 10 ml'lik enjektör yardımıyla 30 ml %2'lik (w/v) NaOH çözeltisi içerisine damlatılarak 3 mm çapında küresel tanecikler haline getirildi. %2'lik NaOH içerisnde 30 dakika bekleyen kürecikler önce saf su ile daha sonra da 0,1 M pH 7 olan fosfat tamponunda yıkandı. Bu kürecikler kovalent bağlanma işleminde kullanılabilmeleri için çapraz bağlayıcı ile muamele edildi. Çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit kullanıldı. Bu kürecikler 30 ml %2'lik glutaraldehit çözeltisine kondu ve 25 °C de 25 rpm çalkalamalı su banyosunda 24 saat bekletildi. Kürecikler glutaraldehit çözeltisi içerisinden alındıktan sonra önce saf su ile daha sonrada 0,1 M'lık pH 7 olan fosfat tamponu ile yıkandı. Bu şekilde hazırlanan kürecikler tartıldı ve immobilizasyon işleminde kullanıldı. İmmobilizasyon yöntemi olarak "kovalent bağlanma" yöntemi seçilmiştir. Hazırlanan 12,50 g kitosan kürecikler 25 ml enzim çözeltisine (2600 U/mL) kondu ve 4 °C'de 24 saat bekletildi. Tirozinaz enzimi kovalent bağlanma ile kitosan küreciklere immobilize edilmiş oldu. Reaksiyon şeması şekil 3.2.'de gösterilmektedir.



Şekil 3.2. Tirozinazın çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit kullanılarak kitosan küreciklere kovalent immobilizasyonu

İmmobilize enzim alındı önce saf su ile yıkandı ardından da 0,1 M pH 7 olan fosfat tamponu ile yıkandı ve daha sonra fenol giderme işlemlerinde kullanılmak üzere 0,1 M pH 7 olan fosfat tampona konarak 4 °C'da saklandı.

İmmobilizasyon işleminden sonra çözeltilde kalan serbest enzim aktivasyonuna bakıldı ve immobilizasyon verimi (Yi) aşağıdaki formülle hesaplandı. Yi, % immobilizasyon verimidir.

$$R = \frac{\text{immobilizasyon işleminden sonra çözeltide kalan aktivite}}{\text{serbest enzimin aktivitesi}}$$

$$Y_i = (1 - R) \times 100$$

3.7. Serbest Enzim, İmmobilize Enzim ve Enzimsiz Ortamda (Kontrol Deneyi) Fenol Giderilmesi

Serbest enzim için fenol giderme deneyi yapmak için 3,5 ml 1 mM'lık fenol çözeltisi üzerine 3,5 ml pH 7 olan 0,1 M'lık fosfat tamponu konarak hazırlanan ortama 1 ml tirozinaz enzimi (1630 ünite/ml) ilave edildi. Bu karışım çalkalamalı su banyosunda 2 saat 25 °C de 100 rpm çalkalama hızında bekletildi. Daha sonra bu karışımdaki enzimi denatüre etmek için 15 dak. 100 °C su banyosunda bekletildi. Ortamdaki fenolün kinona oksitlenmesi nedeniyle kırmızı renkli bir çözelti oluştu. Kinonu ortamdan alabilmek için, ortama 0,15 g katı kitosan ilave edildi ve 1,5 saat çalkalamalı su banyosunda 25 °C de 100 rpm çalkalama hızında bekletildi. Çözelti süzüldü ve süzüntüde kalan fenol derişimini bulmak için 270 nm de absorbans okundu. Ortamdaki fenol derişimi okunan absorbans değerine göre fenol kalibrasyon grafiğinden hesaplandı.

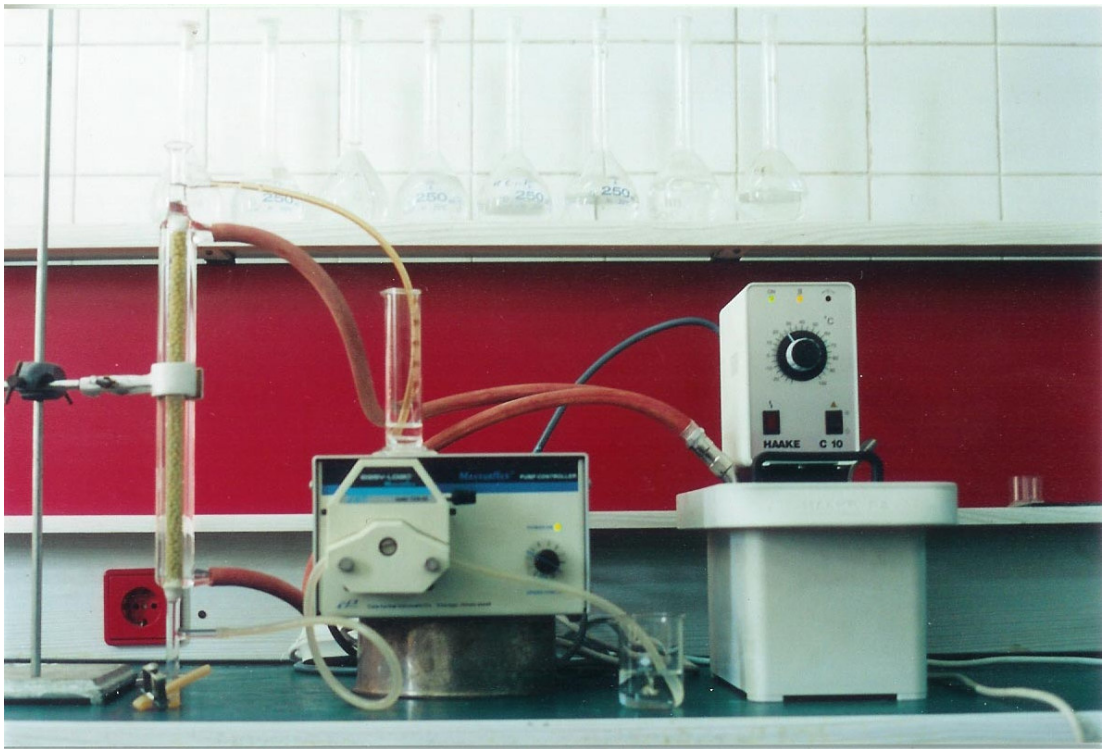
İmmobilize enzim için fenol giderme deneyi yapmak için 3,5 ml 1 mM'lık fenol çözeltisi üzerine, 3,5 ml pH 7 olan 0,1 M'lık fosfat tamponu konarak hazırlanan ortama 0,5 g immobilize enzim (1630 unite/mL enzim içeren) ilave edildi. Bu karışım çalkalamalı su banyosunda 2 saat 25 °C de 100 rpm çalkalama hızında bekletildi. Burada çözeltinin rengi değişmedi ve kitosan kullanılmadı. Çözelti süzüldü ve süzüntüde kalan fenol derişimini bulmak için 270 nm de absorbans okundu. Ortamdaki fenol derişimi okunan absorbans değerine göre fenol kalibrasyon grafiğinden hesaplandı.

Enzimsiz ortamda fenol giderme deneyi yapmak için 3,5 ml 1 mM'lık fenol çözeltisi üzerine, 3,5 ml pH 7 olan 0,1 M'lık fosfat tamponu konarak hazırlanan karışım

çalkalamalı su banyosunda 2 saat 25 °C de 100 rpm çalkalama hızında bekletildi, ortama 0,15 g katı kitosan ilave edildi ve 1,5 saat çalkalamalı su banyosunda 25 °C de 100 rpm çalkalama hızında bekletildi. Çözelti süzüldü ve süzüntüde kalan fenol derişimini bulmak için 270 nm de absorbans okundu. Ortamdaki fenol derişimi okunan absorbans değerine göre fenol kalibrasyon grafiğinden hesaplandı.

3.8. Sabit Yataklı İmmobilize Enzim Reaktörü Kullanılarak Fenol Giderilmesi

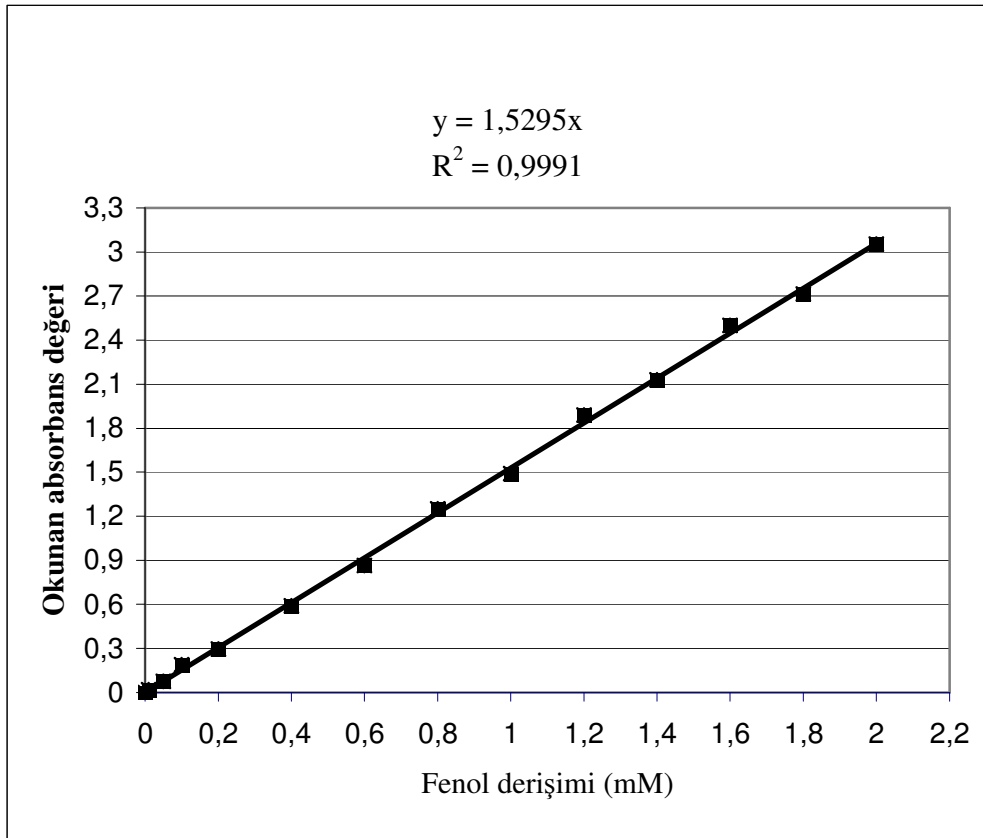
12,5 g immobilize edilmiş enzim 1,1 cm çapında 27,5 cm yüksekliğindeki çift cidarlı kolon sıcaklığı sirkülatör vasıtasıyla kontrol edilebilen kolona dolduruldu. Kolondan peristaltik pompa yardımıyla 2 mM 50 ml'lik fenol çözeltileri farklı akış hızlarında 30 °C'de geçirildi. Kurulan bu düzenek Resim 3.1.'de gösterilmektedir. Reaktörden çıkan fenol çözeltisinin 270 nm dalga boyunda absorbansı okundu ve fenol kalibrasyon grafiğinden fenol derişimi hesaplandı.



Resim 3.1. Sabit yataklı immobilize enzim reaktörü

3.9. Fenol Konsantrasyonu Tayini

Fenol konsantrasyonu tayini için 25 mM'lık stok fenol çözeltisinden seyreltilerek 0,01 ile 2 mM arasında olan standart fenol çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerin en küçük derişimden başlayarak 270 nm de absorbanslar okundu. bu absorbans değerlerine göre Şekil 3.3.'deki kalibrasyon grafiği çizildi. Konsantrasyonu tayin edilecek fenol çözeltisinin absorbansı referansa karşı 270 nm'de okundu ve kalibrasyon grafiğinden konsantrasyona geçildi.



Şekil 3.3. Fenol çözeltisi için kalibrasyon grafiği

4. DENEYSEL SONUÇLAR

4.1. Mantardan İzole Edilen Tirozinaz Enziminin Özellikleri

Bölüm 3.2. de anlatıldığı şekilde mantardan izole edilen ve kısmi olarak saflaştırılan tirozinaz enzimi için Bölüm 3.3. ve 3.4.'de anlatıldığı şekilde enzim aktifliği ve protein tayini yapıldı. Daha sonra Teorik Bilgiler kısmında Bölüm 2.5.'de anlatıldığı gibi spesifik aktivite ve saflaştırma derecesi hesaplandı. Bulunan sonuçlar Çizelge 4.1 de görülmektedir.

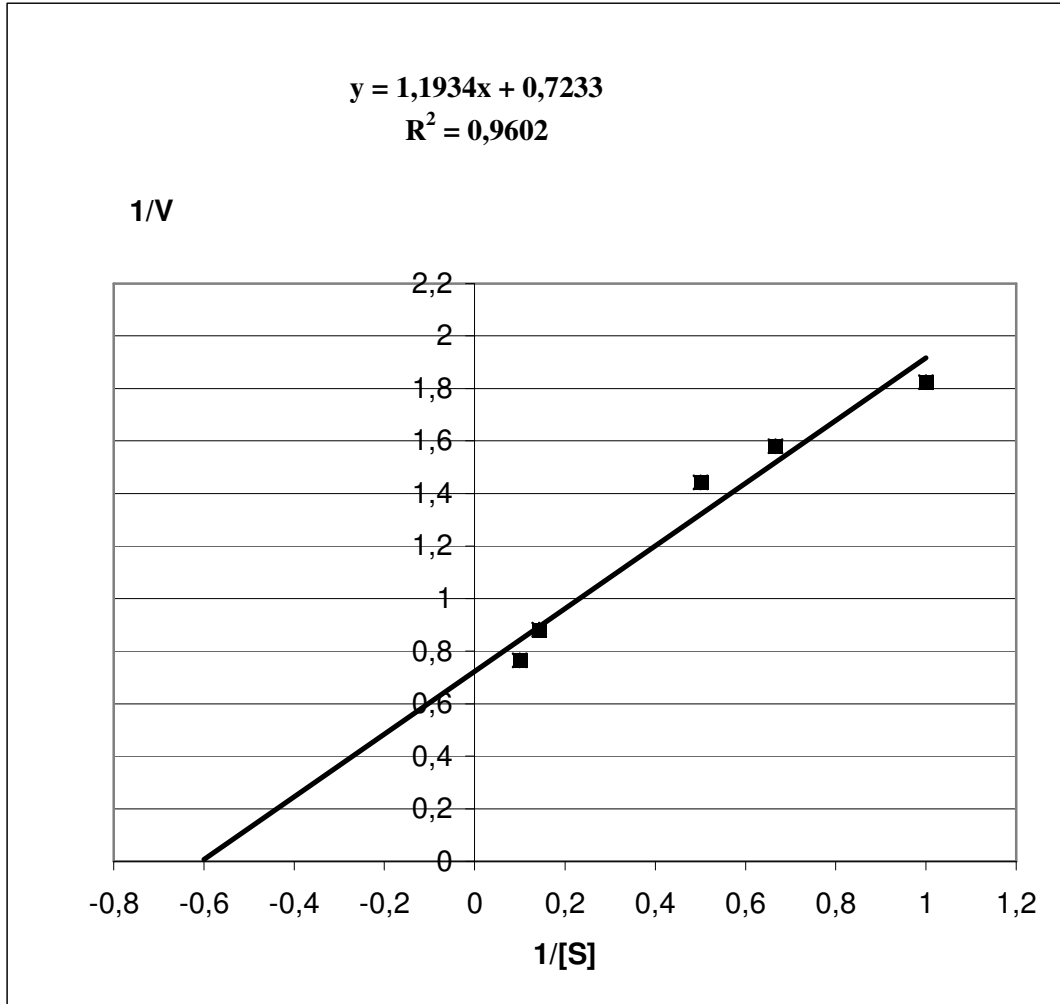
Çizelge 4.1. Enzim izolasyonu ve saflaştırma basamakları sırasında elde edilen enzimin aktifliği, protein miktarı, spesifik aktivitesi ve saflaştırma faktörü

İzolasyon Basamakları	Fraksiyon hacim (ml)	Protein Derişim (mg/ml)	Enzim Derişim (Ünite/ml)	Enzimin spesifik aktivitesi (Ünite/mg protein)	Saflaştırma derecesi (KAT)
Hüresel ekstrakt	100	2,04	4 110	2014,7	1
%30 (v/v) aseton ile çöktürme ve 9000 rpm'de 0°C'de 20 dak. santrifüj	95	1,08	4 020	3722,2	1,9
Soğuk aseton ile çöktürme ve 9000 rpm'de 0°C'de 20 dak. santrifüj	30	1,07	5 050	4719,6	2,3
%10 doyunlukta (NH ₄) ₂ SO ₄ ile çöktürme ve 9000 rpm'de 0°C'de 30 dak. santrifüj	24	1,36	10 850	7977,9	4,0
%60 doyunlukta (NH ₄) ₂ SO ₄ ile çöktürme, 9000 rpm'de 0°C'de 40 dak. santrifüj, 9500 rpm'de 0°C'de 10 dak. daha santrifüj	15	1,32	10 925	8276,5	4,1
Diyaliz	13	0,99	13 000	13131,3	6,5

Buna göre yapılan izolasyon ve saflaştırma işlemleri sonucunda enzimin ham özüte göre 6,5 kat saflaştırılması mümkün olmuştur. İmmobilizasyon işlemi için kullanılan enzim çözeltisinin aktifliği 13000 ünite / mL, protein derişimi 0,99 mg / mL, spesifik aktivite 13131,3 ünite / mg protein olarak bulunmuştur.

4.2. Tirozinaz Enziminin V_m ve K_m Değerleri

Tirozinaz enziminin V_m ve K_m değerlerini bulmak için Bölüm 3.5.'de anlatıldığı şekilde Lineweaver – Burk Grafiğı çizildi. Grafik şekil 4.1.'de görölmektedir.



Şekil 4.1. Lineweaver – Burk Grafiğı

$1/V_m$ 'ı verir. Böylece V_m ve K_m değerleri kolayca bulunabilmektedir. Bu grafiği Bu grafikte doğrunun x eksenini kestiği nokta $-1 / K_m$ 'yi y eksenini kestiği nokta ise kullanarak yapılan hesaplamada K_m değeri 1,645 mM ve V_m değeri 1,379 $\Delta A/dak.$ olarak bulundu.

4.3. İmmobilizasyon Verimi

Serbest enzim aktivitesi = 2600 U/mL

İmmobilizasyon işleminden sonra çözültide kalan enzimin aktivitesi = 450 U/mL

$$R = 450 / 2600$$

$$R = 0,17$$

$$Y_i = (1 - R) \times 100$$

$$Y_i = \% 83$$

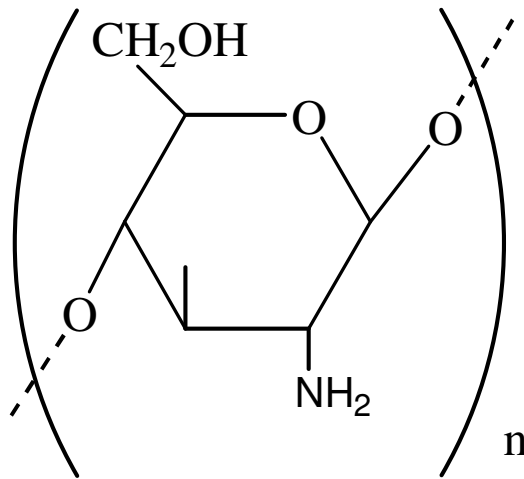
4.4. Serbest Enzim, İmmobilize Enzim ve Enzimsiz Ortamda (Kontrol Deneyinde) Yüzde Fenol Giderme Değerlerinin Karşılaştırılması

Serbest enzim, immobilize enzim ve enzimsiz ortamda yüzde fenol giderme değerlerinin karşılaştırılması için Bölüm 3.12 de yapılan deneylerin sonuçları Çizelge 4.2.'de gösterilmektedir. Serbest enzim ve fenol çözültisi kullanılarak yapılan çalışmada ortamda oluşan kinon kitosan kullanılarak adsorplatıldı. Fenol giderme yüzdesi % 43,11 olarak saptandı. İmmobilize enzim ve fenol çözültisi kullanılarak yapılan çalışmada ise ortamda oluşan kinon doğrudan immobilize enzim küreciklerine bağlandığı için işlem tek basamakta olmuştur (çözültinin rengi beyazdır), kitosan eklenmesine gerek kalmamıştır. Fenol giderme yüzdesi % 40,96 olarak saptanmıştır; bu değer serbest enzim kullanılarak yapılan deneyin sonucuna çok yakındır.

Çizelge 4.2. Serbest enzim, immobilize enzim ve enzimsiz ortamda (kontrol deneyi) fenol giderme yüzdeleri

Çalışma Ortamı	Giderilen Fenol Yüzdesi
Fenol çözeltisi + Kitosan (Kontrol Ortamı)	4,02
Fenol çözeltisi + Serbest enzim + Kitosan	43,11
Fenol çözeltisi + İmmobilize enzim	40,96

Bu deneylerde ortama kitosan eklenmektedir. Kitosan glukozamin polimeridir ve ticari olarak hayvan kabuklarından elde edilir, ucuz ve toksik olmayan bir maddedir. Kitosan yapısı Şekil 4.2.'de gösterilmektedir. Kitosan yapısında bulunana amino grupları nükleofilik özellik gösterdiğinden kinonları bağlayabilir.



Şekil 4.2. Kitosanın açık formülü; $1\beta \rightarrow 4'$

4.5. İmmobilize Enzim Reaktörü Kullanılarak Giderilen Fenol Yüzdesi

İmmobilize edilen enzim sabit yataklı akışkan reaktörde fenol giderme çalışmalarında kullanıldı. Bu amaçla 1 ml/dak, 3,1 ml/dak, 6,1 ml/dak, 10 ml/dak, 12,5 ml/dak. akış hızlarında 50 ml 2 mM'lık fenol çözeltisi immobilize enzim reaktöründen geçirildi. Giderilen fenol yüzdesini hesaplamak için Şekil 3.2.'de verilen fenol kalibrasyon grafiği kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3.'de verilmektedir.

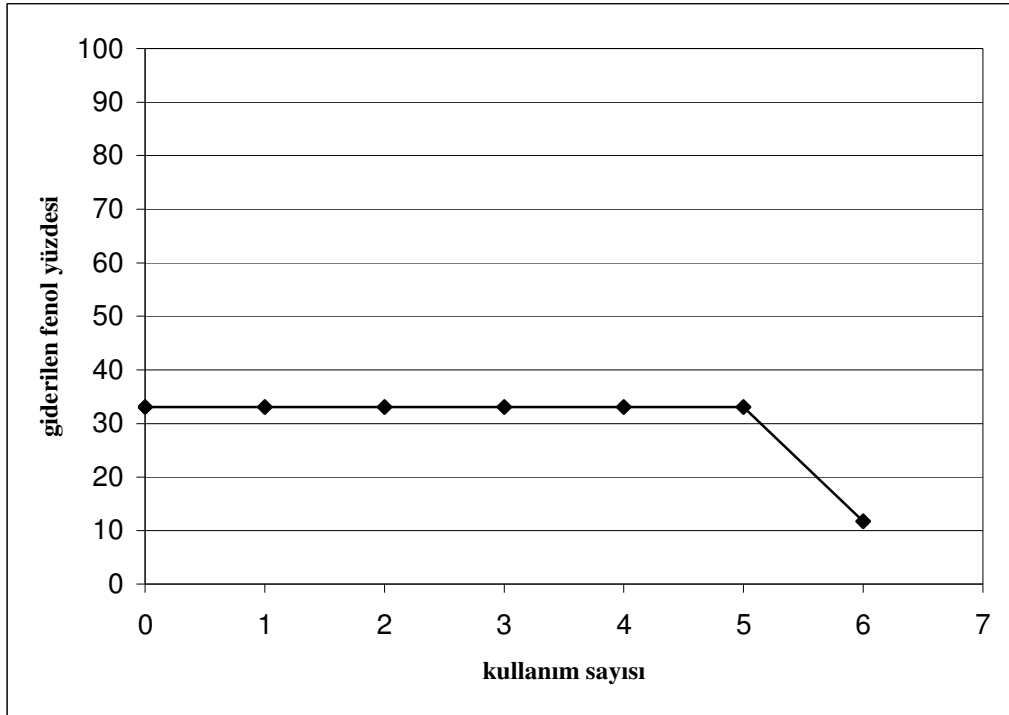
Çizelge 4.3. İmmobilize enzim reaktörünün farklı akış hızlarındaki yüzde fenol gidermesi

Akış hızı (ml/dak.)	Yüzde fenol giderme
1	32,09
3,1	30,23
6,1	36,06
10	34,55
12,5	32,64

En iyi fenol giderme yüzdesi 6 mL / dak. akış hızında saptanmıştır. Reaktörün tekrar kullanım hızını saptamak için de bu akış hızında çalışılmıştır.

4.6. İmmobilize Enzim Reaktörünün Kullanım Sayısı

İmmobilize enzim içeren reaktörün kaç kez kullanılabilceğini saptamak amacıyla 2 mM 50 ml fenol çözeltisi reaktörden 6 mL / dak. akış hızında geçirildi. Her geçirme işlemi sonrasında oluşan kinonları ortamdaki almak için 50 ml 10 mM'lık askorbik asit çözeltisi ve ardından da 50 ml 0,1 M pH 7 olan fosfat tamponu geçirilerek reaktör yıkandı. Kullanım sayısı ve giderilen fenol yüzdesi ilişkisi Şekil 4.3.'de gösterilmektedir. Şekil 4.3'de de görüleceği gibi çalışmamızda kullanılan immobilize enzim reaktörü 5 kez kullanımdan sonra fenol giderme yüzdesi düşmektedir. Çünkü oluşan kinonlar bu basamakta kalmayıp teorik kısımda belirtildiği gibi polimerleşmektedir. Oluşan polimerlerde kitosan küreciklerin renginin koyulaşmasına neden olmaktadır. Ayrıca bu polimerler fenolün enzime ulaşması için bir bariyer oluşturmaktadırlar. Kullanım sayısı arttıkça tanecikler koyulaşmakta fenol giderme yüzdesi de düşmektedir.



Şekil 4.3. Kullanılan immobilize enzim reaktörünün kullanım sayısı ile giderilen fenol yüzdesi arasındaki ilişki

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

1) Tirozinaz enziminin *A. bisporus* mantarından izole edilmesi ve kısmi olarak saflaştırılmasından sonra protein derişimi 0,99 mg/ml, enzim erişimi 13000 ünite/ml, enzim spesifik aktivitesi 13131,3 ünite/mg protein ve saflaştırma derecesi 6,5 olarak bulundu.

2) Çizilen Lineweaver – Burk Grafiği kullanılarak yapılan hesaplamada V_m değerini 1,379 $\Delta A/dak.$ ve K_m değerini 1,645 mM olarak bulundu. Literatür sonuçlarına bakıldığında da mantardan izole edilen tirozinaz enzimi için pH 3,82 – 7,02 aralığında K_m değerleri 0,22 mM ile 2,81 mM aralığında olduğu bildirilmektedir. Buna göre bizim çalışmamız sonucunda elde edilen K_m değeri bu aralığa uygundur (35).

3) İmmobilizasyon işleminin ardından immobilizasyon verimi %83 olarak hesaplandı.

4) İmmobilize enzim ve serbest enzimin fenol giderme oranlarının karşılaştırılması amacıyla yapılan deney sonucunda serbest enzimin %43 oranında fenol giderirken immobilize enzim %40,96 oranında fenol giderdiği sonucu bulunmuştur.

5) Sabit yataklı immobilize enzim reaktöründe farklı akış hızlarında fenol giderme deneyinde ise en iyi akış hızının 6 ml/dak olduğu saptanmıştır.

6) Çalışmamızda kullanılan sabit yataklı immobilize enzim reaktörü 5 kullanımdan sonra fenol giderme yüzdesinde düşüş gözlemlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Karam, J., Nicel, J. A., “Potential applications of enzymes in waste treatment”, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 69: 141 – 153 (1997).
2. Klibanov, A. M., Tu, T. M., Scott, K. P., “Peroxidase catalysed removal of phenols from coal conversion wastewater”, *Science*, 221: 259 – 261 (1983).
3. Aitken, M. D., Massey, I. J., Chen, T. and Heck, P. E., “Characterization of reaction products from the enzyme catalyzed oxidation of phenolic pollutants”, *Wat. Res.*, 28(9): 1879 – 1889 (1994).
4. Aitken, M. D., “Waste treatment applications of enzymes: opportunities and obstacles”, *The Chemical Engineering Journal*, 52: B49 – B58 (1993).
5. Çiçek, H., “Beyaz – çürükçül fungus kültürlerinde tirozinaz enziminin sentezinin taranması ve optimizasyonu”. Yüksek Lisans Tezi, *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara 5-6-7 (2000).
6. Tüzün, C. “Biyokimya üçüncü baskı” *Palme Yayınları*, Ankara, 124 – 125 (1997).
7. Whitaker, J. R., “Principles of enzymology for the food sciences second edition”, *Marcel Dekker, Inc.*, New York, America 517 – 520 (1994).
8. Günay, A., Abak, K., Koçyiğit, A. E., “Mantar yetiştirme IV. Cilt”, *Saypa Kitap Ve Yayın Evi*, Ankara 7 – 10 (Mart 1992).
9. Cemeroğlu, B., Yemenicioğlu, A., Özkan, M., “Meyve ve sebzelerin bileşimi cilt No:24”, *Gıda Teknolojisi Yayınları*, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara, 138 (2001).
10. Nelson, J. M. and Dawson, C. R., “Tyrosinase” *Adv. Enzymol.*, 4: 99 – 152 (1944).
11. Vámos – Vigyázó, L., “Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables”, *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 15: 49 – 127 (1981).
12. Witkop, G. J., “Inherited disorders of pigmentation”, *J. Clin. Dermatol.*, 3(1): 70 – 134 (1985).
13. Oktay, M., Küfrevioğlu, I., Kocaçalışkan, I., and Şakiroğlu, H., “Polyphenoloxidase from Amasya apple”, *Journal of food Science*, 60 (3): 494 – 496 (1995).

14. Arslan, O., Temur, A. and Tozlu, İ., “Polyphenol oxidase from Malatya apricot (*Prunus armeniaca* L.)”, *J. Agric. Food Chem.*, 46 (4): 1239 – 1241 (1998).
15. Zawitowski, J., Biliaderis, C. G. and Murray, E. D., “Isolation and some properties of an acidic fraction of polyphenol oxidase from jerusalem artichoke (*Helianthus Tuberosus* L.)”, *Journal of Food Biochemistry*, 12: 23 – 35 (1998).
16. Owusu – Ansah, Y. J., “Polyphenoloxidase in wild rice (*Zizania palustris*)”, *J. Agric. Food Chem.*, 37: 901 – 904 (1989).
17. Wada, S., Ichikawa, H. and Tatsumi, K., “removal of phenols and aromatic amines from wastewater by a combination treatment with tyrosinase and a coagulant” *Biotech. And Bioeng.*, 45: 304 – 309 (1995).
18. Strothkamp, K. G., Jolley, R. L. and Mason, H. S., “Quaternary structure of mushroom tyrosinase”, *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 70(2): 519 – 524 (1976).
19. Mayer, A. M. and Harel, E., “Polyphenol oxidases in plants”, *Phytochemistry*, 18: 193 – 215 (1979).
20. Dec, J. and Bollag, J. M., “Effect of various factors on dehalogenation of chlorinated phenols anilines during oxidative coupling”, *Environ. Sci. Technol.*, 29: 657 – 663 (1995).
21. Şakiroğlu, H., Küfrevioğlu, Ö. I., Kocaçalışkan, I., Oktay, M. and Onganer, Y., “Purification and characterization of dog-rose (*Rosa dumalis* Rechst.) polyphenol oxidase”, *J. Agric. Food Chem.*, 44: 2982 – 2986 (1996).
22. Andrawis, A. and Kahn V., “Ability of various chemicals to reduce copper and to inactivate mushroom tyrosinase”, *Journal of Food Biochemistry*, 14: 103 – 115 (1990).
23. Günendi, G., “Polifenoloksidaz enziminin mantardan (*Agaricus bisporus*) izole edilmesi ve mikroenkapsilasyon tekniği ile immobilize edilerek özelliklerinin araştırılması” Yüksek Lisans Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 20 (1996).
24. Duran, N., Esposito, E., “Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase – like compounds in wastewater and soil treatment : a review”, *Applied Catalysis B: Environmental*, 28: 83 – 99 (2000).
25. Golan – Goldhirsh, A. and Whitaker, J. R., “ k_{cat} inactivation of mushroom polyphenol oxidase”, *Journal of Molecular Catalysis*, 32: 141 – 147 (1985).

26. Marshall, M. R., Kim, J. and Wei, C., “Enzymatic browning in fruits, vegetables and seafoods”,
<http://www.fao.org/ag/ags/agsi/ENZYMFINAL/Enzymatic%20Browning.html>
(2000).
27. Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M. M., “Principles of Biochemistry Second edition” *Wort Publishers* , New York, 134 – 146 (1993).
28. Bickerstaff, G. F., “Immobilization of Enzymes and cells”, *Humana press*, Totowa, New Jersey (1997).
29. 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).
30. Woodward, J., “Immobilised cells and enzymes”, *Oxford*, England (1985).
31. Duran, N., Rosa, M. A., Alessandro, D., Gianfreda, L., “Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review”, *Enzyme and Microbial Technology*, 31: 907 – 931 (2002).
32. Wada, S., Ichikawa, H. and Tatsumi, K., “Removal of phenols from wastewater by soluble and immobilized tyrosinase”, *Biotechnology and Bioengineering*, 42: 854 – 858 (1993).
33. Naidja, A., Huang, P. M., Bollag, J. –M., “Activity of tyrosinase immobilized on hydroxyaluminum – montmorillonite complexes”, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 115: 305 – 316 (1997).
34. Munjal, N. and Sawhney, S. K., “Stability and properties of mushroom tyrosinase entrapped in alginate, polyacrylamide and gelatin gels”, *Enzyme and Microbial Technology*, 30(5): 613 – 619 (2002).
35. Duckworth, H. W. and Coleman, J. E., “Physical and kinetic properties of mushroom tyrosinase”, *j. Biol. Chem.*, 245 (7): 1613 – 1625 (1970).

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Ankara'nın Gölbaşı ilçesinde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Ankara'da tamamladı. 1998 yılında girdiği Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden 2002 yılında mezun oldu. Aynı yıl Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans'a başladı.