

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
2023-YL-004

**TİROZİNAZ ENZİMİNİN POLİAKRİLAMİD-ALLİL
GLİSİDİL ETER TEMELLİ KRİYOJELLERE
İMMOBİLİZASYONU VE UYGULAMALARI**

**Dilek KATI KELEŞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMANLAR
Prof. Dr. Arife Alev KARAGÖZLER
Dr. Öğr. Üyesi Rukiye YAVAŞER BONCOOĞLU

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından FEF-21023 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2023

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, bilgi birikimi ve tecrübesiyle her daim yanımda olan danışman hocam Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER'e, çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen hocalarım Prof. Dr Murat UYGUN ve Prof. Dr. Deniz AKTAŞ UYGUN'a, laboratuvar çalışmalarımda bana önderlik eden, tecrübe ve bilgilerini benden esirgemeyen, güler yüzü, içtenliği ve tüm yoğunluğuna rağmen hoşgörüsü ile hep yanımda olan Dr.Öğr. Üyesi Rukiye YAVAŞER BONCOOĞLU'na teşekkürü bir borç bilirim.

Aynı laboratuvarda birlikte olmaktan çok keyif aldığım ve desteklerini hissettiğim arkadaşlarım Ulviye KİLİMCİ, Sinem EVLİ, Baha ÖNDEŞ'e teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca bu çalışmaya “Tirozinaz Enziminin Poliakrilamid-Allil Glisidil Eter Temelli Kriyojellere İmmobilizasyonu ve Uygulamaları” başlıklı FEF-21023 nolu araştırma projesi olarak maddi destek sağlayan Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne ve olanaklarından yararlandığım Kimya Bölümü'ne teşekkür ederim.

Son olarak bana çalışmalarım ve eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve her zaman yanımda olduklarını hissettiren aileme teşekkürlerimi sunarım.

Dilek KATI KELEŞ

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
RESİMLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Enzim Nedir?.....	1
1.1.1. Enzimlerin Sınıflandırılması	2
1.2. Tirozinaz Enzimi	3
1.2.1. Mantar Tirozinazının Özellikleri	3
1.2.2. Memeli Tirozinaz Enziminin Özellikleri.....	5
1.3. Tirozinaz Enziminin Kullanım Alanları	7
1.3.1. Atık Sulardan Fenolik Bileşik Giderimi İçin Kullanımı	7
1.3.2. Tarım ve Gıda Endüstrisinde Tirozinaz	7
1.3.3. Tıp ve Eczacılıkta Kullanımı	8
1.3.4. Tirozinazın Biyoteknolojide Kullanımı	8
1.4. Tirozinaz Enziminin Substratları.....	9
1.5. Tirozinaz Enziminin İnhibitörleri.....	10
1.6. Fenolik Bileşikler	10

1.7. Fenolik Bileşik Gideriminde Kullanılan Teknolojiler.....	13
1.7.1. Distilasyon.....	13
1.7.2. Ekstraksiyon ve Adsorpsiyon.....	14
1.7.3. Biyodegradasyon.....	14
1.7.4. Kimyasal Oksidasyon.....	15
1.7.5. Elektrokimyasal Oksidasyon.....	15
1.7.6. Enzimatik Yöntem.....	16
1.8. Enzim İmmobilizasyonu.....	18
1.8.1. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri.....	19
1.8.1.1. Kovalent Bağlama.....	20
1.8.1.2. Tutuklama.....	21
1.8.1.3. Çapraz Bağlama.....	21
1.8.1.4. Şelatlama.....	22
1.8.1.5. Adsorpsiyon.....	22
1.8.1.6. Disülfid Bağlama.....	22
1.9. Kriyojeller.....	23
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	26
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	31
3.1. Cihazlar.....	31
3.2. Kimyasallar.....	31
3.3. Yöntem.....	32
3.3.1. Poliakrilamid-Allil Glisidil Eter Kriyojellerin Hazırlanması.....	32
3.3.2. Poliakrilamid-Allil Glisidil Eter Kriyojellerin Karakterizasyonu.....	33
3.3.3. Şişme Analizi.....	34
3.3.4. AAm-AGE Kriyojellere Tirozinaz Enziminin İmmobilizasyonu.....	34
3.4. Protein Tayini.....	34

3.5. Serbest ve İmmobilize Tirozinaz Enzimlerinin Optimum pH'larının L-Tirozin Substratı ile Belirlenmesi	35
3.6. Serbest ve İmmobilize Tirozinaz Enzimlerinin Optimum pH'larının L-Katekol Substratı ile Belirlenmesi	37
3.7. Serbest ve İmmobilize Tirozinazın Optimum Sıcaklıklarının Belirlenmesi	38
3.8. Serbest ve İmmobilize Tirozinaz Aktivitesine Substrat Değişiminin Etkisinin İncelenmesi.....	38
3.9. Serbest ve İmmobilize Tirozinaz Enzimlerinin Isıl Kararlılıklarının Belirlenmesi	39
3.10. İmmobilize Tirozinaz Enzimin İşlemsel Kararlılığının Araştırılması.....	39
3.11. Serbest ve İmmobilize Tirozinazın Depo Kararlılığının İncelenmesi.....	39
3.12. Serbest ve İmmobilize Tirozinazın Fenolik Bileşik Gideriminde Kullanılabilirliğinin İncelenmesi.....	40
4. BULGULAR	42
4.1. Kriyojellerin Karakterizasyonu	42
4.2. Şişme Analizi.....	46
4.3. Protein Tayini	46
4.4. Serbest ve İmmobilize Tirozinaz Aktivitesine pH Etkisi.....	47
4.5. Serbest ve İmmobilize Tirozinaz Aktivitesine Sıcaklık Etkisi.....	48
4.6. Serbest ve İmmobilize Tirozinaz Aktivitesine Substrat Değişiminin Etkisi.....	49
4.7. Serbest ve İmmobilize Tirozinaz Enzimlerinin Isıl Kararlılıkları	49
4.8. İmmobilize Tirozinaz Enziminin İşlemsel Kararlılığı.....	50
4.9. Serbest ve İmmobilize Tirozinaz Enzimlerinin Depo Kararlılıkları	51
4.10. Fenolik Bileşik Giderme Çalışmaları	52
5. TARTIŞMA.....	53
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	60
KAYNAKLAR.....	62
BİLİMSEL ETİK BEYANI.....	74



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AAm	: Akrilamid
AGE	: Allil Glisidil Eter
APS	: Amonyum Persülfat
APTES	: 3-Aminopropiltrioksilan
BPA	: Bisfenol A
BSA	: Sığır Serum Albümin
CaA	: Kalsiyum Alüminasilikat
CLEA	: Çapraz Bağlı Enzim Kümeleri
CLEC	: Çapraz Bağlı Enzim Kristalleri
Con A	: Konkanavalin A
DOPA	: Dihidroksifenilalanin
EDC	: N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-Etilkarbodiimid
EDX	: Enerji Dağılımlı X Işını Analizi
EPA	: Çevre Koruma Ajansı
FTIR	: Fourier Transform Infrared Spektroskopisi
IDA	: İminodiasetik Asit
IgG	: İmmüoglobulin
IUB	: Uluslararası Biyokimya Birliği
kDa	: Kilodalton
MBAAm	: N',N'-Metilenbisakrilamid
MBTH	: 3-Metil-2-Benzotiyazolinon Hidrazon
Mel-NPs	: Melanin Nanopartikül
MOF	: Metal Organik Çerçevesel

NaA	: Sodyum Alüminasilikat
NHS	: N-Hidroksisüksinimid
NPRI	: Ulusal Kirletici Salınım Envanteri
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin
U	: Enzim Ünitesi
UV	: Ultraviyole



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Tirozinaz enziminin katalizlediği monofenollerin kademeli oksidasyon reaksiyonu.	5
Şekil 1.2. İlk iki basamağı tirozinaz enzimi tarafından katalizlenen melanin sentezi reaksiyonu.	6
Şekil 1.3. Tirozinaz enzimin substratları.....	9
Şekil 1.4. Bazı tirozinaz enzimi inhibitörlerinin kimyasal yapıları	10
Şekil 1.5. Bazı temel endüstriler tarafından üretilen fenol örnekleri	13
Şekil 3.1. L-tirozin substratının tirozinaz enzimi tarafından katalizlenen oksidasyon reaksiyonu	35
Şekil 3.2. L-katekol substratının tirozinaz enzimi tarafından katalizlenen oksidasyon reaksiyonu	37
Şekil 3.3. 4-aminoantipirin ile fenolik bileşikler arasında gerçekleşen reaksiyon.....	40
Şekil 4.1. Akrilamid ve allil glisidil eter arasında gerçekleşen reaksiyon	42
Şekil 4.2. Akrilamid (AAM), allil glisidil eter (AGE) ile akrilamid kriyojel (AAM kriyojel) ve akrilamid-allil glisidil eter kriyojelin (AAM-AGE kriyojel) FTIR spektrumları.....	43
Şekil 4.3. Akrilamid-allil glisidil eter kriyojelin (AAM-AGE kriyojel: turuncu) ve tirozinaz immobilize edilmiş akrilamid-allil glisidil eter kriyojelin (siyah) FTIR spektrumları.....	43
Şekil 4.4. Protein tayini için sığır serum albümin (BSA) ile hazırlanmış çalışma grafiği	47
Şekil 4.5. Serbest ve immobilize tirozinaz enzimlerinin aktivitelerine pH etkisi	48
Şekil 4.6. Serbest ve immobilize tirozinaz aktivitesine sıcaklık etkisi	48
Şekil 4.7. Serbest ve immobilize tirozinaz aktivitesine substrat derişiminin etkisi	49
Şekil 4.8. Serbest ve immobilize tirozinaz enzimlerinin 45°C'deki ısıl kararlılıkları	50
Şekil 4.9. Serbest ve immobilize tirozinaz enzimlerinin 25°C'deki ısıl kararlılıkları	50

Şekil 4.10. İmmobilize tirozinaz enziminin işlemsel kararlılığı	51
Şekil 4.11. Serbest ve immobilize tirozinaz enzimlerinin depo kararlılıkları	51
Şekil 4.12. Boş ve tirozinaz immobilize edilmiş AAm-AGE kriyojeller kullanılarak elde edilen fenolik bileşik (fenol, Bisfenol A, <i>p</i> -klorofenol ve <i>p</i> -aminofenol) giderme yüzdeleri	52



RESİMLER DİZİNİ

Resim 1.1. <i>Agaricus bisporus</i> tirozinaz enziminin a) üstten; b) yandan üç boyutlu yapısı	3
Resim 1.2. <i>Agaricus bisporus</i> mantar tirozinaz enziminin aktif bölgesi.	4
Resim 1.3. Tirozinden oksidatif reaksiyonla melanin oluşumu	6
Resim 1.4. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması.....	19
Resim 1.5. Kriyojel oluşum aşamaları	24
Resim 1.6. Agaroz-alginat kriyojelin farklı formlardaki dijital görüntüleri (soldan sağa sırasıyla, levha, disk, monolit ve boncuk).	24
Resim 3.1. AAm-AGE kriyojelin üretim şeması (MBAAm: N,N'-metilenbisakrilamid, AGE: allil glisidil eter, AAm: akrilamid, APS: amonyum persülfat, TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletildiamin).....	33
Resim 3.2. Tirozinaz enzimi bağlı, tirozin substratı geçirilmiş ve temizlenemeyen kriyojel.....	36
Resim 4.1. AAm-AGE kriyojelin SEM fotoğrafları	44
Resim 4.2. Tirozinaz immobilize edilmiş akrilamid-allil glisidil eter kriyojelin SEM fotoğrafları.....	44
Resim 4.3. AAm-AGE kriyojelin EDX haritalama analizi sonucunda elde edilen fotoğrafı	45
Resim 4.4. Tirozinaz immobilize edilmiş AAm-AGE kriyojelin EDX haritalama analizi sonucunda elde edilen fotoğrafı	45
Resim 4.5. Kurutulmuş, şişmiş ve sıkılmış AAm-AGE kriyojel (soldan sağa).....	46

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Enzim Sınıfları	2
Çizelge 1.2. Olası fenol türevleri, kaynaklar, çözünebilirlik, izin verilen derişim ve uygulamaları	12
Çizelge 1.3. Fenolik bileşik giderim yöntemlerinin karşılaştırılması	17



ÖZET

TİROZİN AZ ENZİMİNİN POLİAKRİLAMİD-ALLİL GLİSİDİL ETER TEMELLİ KRIYOJELLERE İMMOBİLİZASYONU VE UYGULAMALARI

Katı Keleş D. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2023.

Amaç: Bu çalışma, tirozinaz enziminin poliakrilamid-allil glisidil eter (AAM-AGE) kriyojelle immobilizasyonu ve immobilize tirozinazın fenolik bileşikler giderme yeteneğinin araştırılması amacıyla yapılmıştır.

Materyal ve Yöntem: AAM-AGE kriyojel serbest radikal polimerizasyonu ile üretilmiş ve AGE'nin epoksi grupları ile fonksiyonelleştirilmiştir. Tirozinaz enzimi epoksi grupları üzerinden kovalent olarak kriyojelle immobilize edilmiştir. Karakterizasyon çalışmaları FTIR, SEM, EDX ve şişme analizleri ile yapılmıştır. Serbest ve immobilize tirozinazın optimum pH, optimum sıcaklık ve kinetik parametreleri belirlenmiş; ısıl, depo ve işlemsel kararlılık çalışmaları yapılmıştır. Immobilize tirozinazın fenol, Bisfenol A, *p*-klorofenol ve *p*-aminofenol bileşiklerini sulu çözeltilerden giderme kapasitesi araştırılmıştır.

Bulgular: AAM-AGE kriyojelin makro gözenekli yapıya sahip olduğu ve tirozinazın başarılı şekilde immobilize edildiği, karakterizasyon çalışmaları ile gösterilmiştir. Serbest ve immobilize tirozinazın, sırasıyla, optimum pH'ları 8.0 ve 6.0; optimum sıcaklıkları 45°C ve 25°C; K_m değerleri ise 0.547 mM ve 0.678 mM olarak belirlenmiştir. Immobilizasyon ile V_{max} 7.8 kat azalmıştır. Serbest ve immobilize tirozinazın ısıl ve depo kararlılıklarının birbirine yakın oldukları saptanmıştır. Immobilize tirozinaz yedi kez kullanımdan sonra başlangıç aktivitesinin %18.1'ini korumuştur. Tirozinaz immobilize edilmiş kriyojellerin fenolik bileşik giderme kapasitesinin %55'in üzerinde olduğu saptanmıştır.

Sonuç: Bu tezde, tirozinaz enziminin AAM-AGE kriyojellere immobilize edildiği ve tirozinaz immobilize edilmiş kriyojellerin fenolik bileşik gideriminde etkili olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Fenolik Bileşik Giderimi, Immobilizasyon, Kriyojel, Tirozinaz.

ABSTRACT

IMMOBILIZATION OF TYROSINASE ENZYME ONTO POLYACRYLAMIDE-ALLYL GLYCIDYL ETHER BASED CRYOGELS AND ITS APPLICATIONS

Katı Keleş D. Aydın Adnan Menderes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Chemistry Program, Master Thesis, Aydın, 2023.

Objective: This study was carried out to investigate the immobilization of tyrosinase enzyme onto polyacrylamide-allyl glycidyl ether (AAM-AGE) cryogels and the ability of immobilized tyrosinase to remove phenolic compounds.

Material and Methods: AAM-AGE cryogel was produced by free radical polymerization and functionalized with the epoxy groups of AGE. Tyrosinase enzyme was covalently immobilized onto cryogels through epoxy groups. Characterization was performed by FTIR, SEM, EDX and swelling analysis. Optimum pH, optimum temperature and kinetic parameters of free and immobilized tyrosinases were determined; thermal, storage and operational stability studies were carried out. The capacity of immobilized tyrosinase to remove phenol, Bisphenol A, *p*-chlorophenol and *p*-aminophenol compounds from aqueous solutions was investigated.

Results: Characterization studies indicated that AAM-AGE cryogel had a macroporous structure and tyrosinase was immobilized successfully. For free and immobilized tyrosinase, optimum pHs were 8.0 and 6.0, optimum temperatures were 45°C and 25°C; K_m values were 0.547 mM and 0.678 mM, respectively. Upon immobilization, V_{max} decreased by 7.8 times. Thermal and storage stabilities of free and immobilized tyrosinase were close to each other. Immobilized tyrosinase retained 18.1% of its initial activity after seven uses. Phenolic compound removal capacities of tyrosinase immobilized cryogels were found to be over 55%.

Conclusion: In this thesis, it was determined that tyrosinase enzyme was immobilized onto AAM-AGE cryogels and tyrosinase immobilized cryogels were effective on phenolic compound removal.

Keywords: Cryogel, Immobilization, Phenolic Compound Removal, Tyrosinase.

1. GİRİŞ

Sanayileşmenin artmasıyla önemli bir çevre kirliliği sorunu haline gelen atık suların yer altı, göl, nehir ve deniz gibi sulara karışarak ekolojik denge ve insan sağlığı açısından tehdit oluşturması kirlilik giderimi için yapılan çalışmaların önem kazanmasına sebep olmuştur. Önemli kirlilik kaynaklarının başında toksik ve kanserojen etki yaratan fenol ve fenol türevleri gelmektedir. Fenolik bileşikler yağ rafinasyonu, petrokimyasal, ilaç, plastik, boya ve ağaç endüstrisi gibi pek çok endüstriyel atıklarda bulunmaktadır. Bu bileşiklerin işlenmeden boşaltımı insan, hayvan ve su sistemleri için ciddi sağlık riski oluşturmaktadır. Fenol, Amerika Çevre Koruma Ajansı (EPA) ve Kanada Ulusal Kirletici Salınım Envanteri (NPRI) tarafından önemli bir kirlilik olarak belirlenmiştir. Ayrıca uluslararası ciddi mevzuatlar ile çevreye duyarlı bir fenol salım limiti belirlenmiştir. Örneğin EPA suyun saflık standardını su içindeki fenol için 1 ppb'den az olarak belirlemiştir.

Atık sulardan fenol giderimi için fiziksel (adsorpsiyon, membran filtrasyonu, koagülasyon), kimyasal (yüksek oksidasyon, ozonlama) ve biyolojik (enzim ve mikroorganizmalar) yöntemlerden yararlanılabilir. Biyolojik yöntemlerden enzimatik olanlar ekonomik olmaları ve daha avantajlı olmaları yönünden tercih edilmektedirler. Tirozinaz, lakkaz ve diğer enzimler kullanım açısından oldukça yaygındır.

1.1. Enzim Nedir?

Enzimler protein yapıda olup, kimyasal reaksiyonları ılımlı koşullar altında katalizleyen büyük molekül ağırlığına sahip organik bileşiklerdir. Yüksek katalitik aktiviteye sahiptirler. Bazı enzimlerin bir dakikada milyonlarca molekülü ürüne dönüştürebildiği bilinmektedir (Gözükara, 2001). Enzimler hücre içinde kataliz görevi yaparlar; ancak uygun koşullarda hücre dışı ortamda da faaliyet gösterebilirler. Bu durum enzimlerin pek çok alanda kullanılabilmesine olanak sağlar. Enzimle katalizlenmiş bir tepkime, enzim ve üzerinde işlem yaptığı molekül (substrat) arasında bir kompleksin oluşmasıyla başlar. Substratlar enzim üzerinde yer alan aktif bölgeye bağlanırlar (Nelson vd., 2013).

Enzimlerle ilgili ilk çalışmalar günümüzden 7000 yıl kadar öncesine uzanmaktadır. İlk uygulama şekerin alkole fermente edilmesiyle başlamış ve günümüzde endüstri, sağlık, gıda gibi pek çok alanda kullanılmaktadır. Enzimlerle yapılan ilk çalışmalar sindirim enzimleri ile ilgilidir ve 1760-1825 yılları arasında gerçekleşmiştir. Enzimler hakkında sistematik çalışmalar 1825 yılında Jön Jacob Berzellius'un canlı organizmadaki maddelerin katalizör aracılığı ile sentezlendiği kanaatine varması ile başlamıştır. Ardından 1926'da James Sumner tarafından üreaz enzimi saflaştırılmış ve kristallendirilmiştir. 1949 yılından itibaren enzim sınıfları keşfedilmiş ve enzim kinetiği çalışılmaya ve formüle edilmeye başlanmıştır.

1.1.1. Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzim sınıflandırılması Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) tarafından oluşturularak 1961'de tanımlanmıştır. Bu sınıflamaya göre her enzim katalizlediği kimyasal reaksiyon türüne bağlı olarak, bir kod numarası ile tanımlanmıştır. Bu kod numarası dört basamak içeren bir EC (Enzim Komisyonu) numarasıdır. Bu sisteme göre başlangıçta altı sınıfa ayrılan enzimler 2018 yılında yapılan bir değişiklikle yedi sınıfa ayrılmaktadır (Concu ve Cordeiro, 2019). Çizelge 1.1'de enzim sınıfları ve katalizledikleri tepkime tipleri gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. Enzim sınıfları (Nelson vd., 2013; Concu ve Cordeiro, 2019)

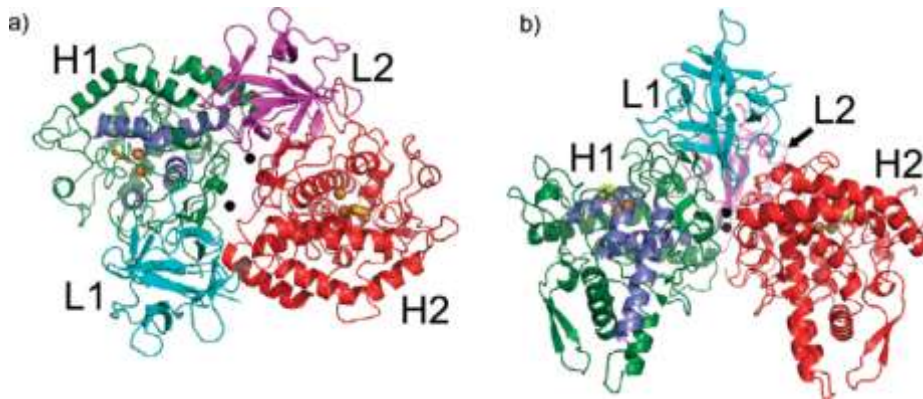
SINIF NUMARASI ve ADI	KATALİZLENEN TEPKİME TİPİ
EC 1: Oksidoredüktazlar	Oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları
EC 2: Transferazlar	Grup aktarım tepkimeleri
EC 3: Hidrolazlar	Hidroliz reaksiyonları
EC 4: Liyazlar	Grupların çift bağlara katılması veya grupların uzaklaşmasıyla çift bağ oluşumu
EC 5: İzomerazlar	İzomerizasyon (Molekül içi grup aktarımı)
EC 6: Ligazlar	Kondenzasyon tepkimeleri ile C-C, C-S, C-O ve C-N bağlarının oluşumu
EC 7: Translokazlar	Membranlardan iyon veya moleküllerin hareketini veya membran içinde ayrılmalarını katalizleyen enzimler

1.2. Tirozinaz Enzimi

Tirozinaz enzimi (EC 1.14.18.1; monofenol monooksijenaz) enzimatik kahverengileşme (kararma) ve melanin oluşumunda önemli bir rol oynayan bitki, hayvan ve çeşitli mikroorganizmalarda geniş ölçüde yer alan, iki bakır atomu içeren bir enzimdir. Uygulamalarda kullanımına bakılırsa mantar ve memeli tirozinazı üzerine çalışmalar yapılmıştır. İmmobilizasyon işlemlerinde ise kaynağın bol bulunduğu mantar tirozinazı daha çok kullanılmaktadır.

1.2.1. Mantar Tirozinazının Özellikleri

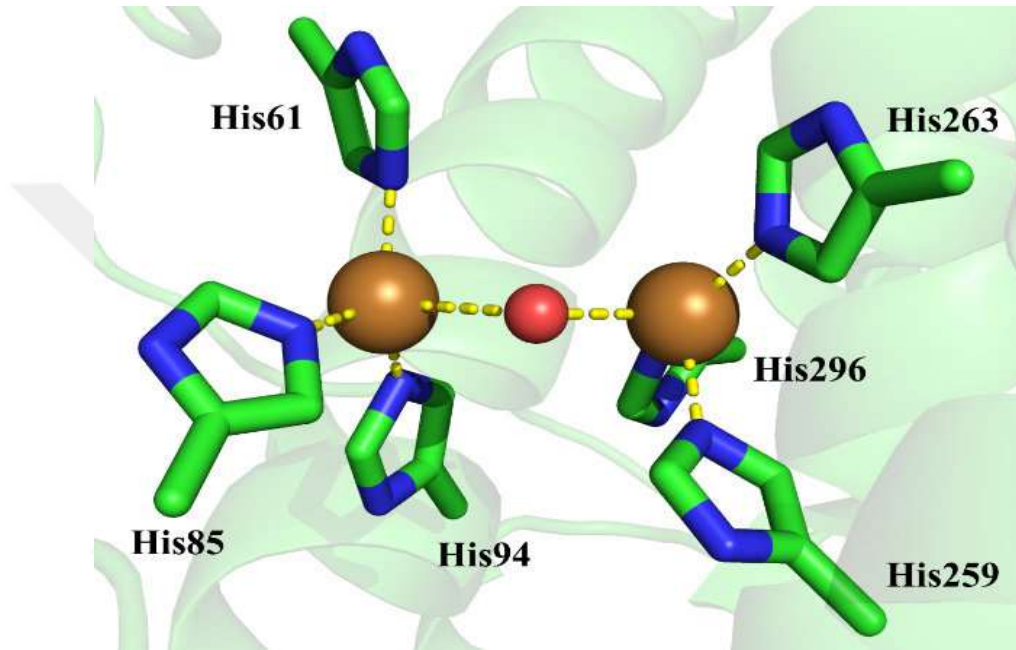
Mantar tirozinaz enzimi ilk kez 1896 yılında Bourquelot ve Bernard tarafından izole edilmiştir (Raper ve Wormall, 1923). Daha sonra bu enzim birçok mantar, bitki, bakteri ve hayvan türlerinden izole edilip saflaştırılmıştır. Enzimin molekül ağırlığı türe bağlı olarak 13.4-128 kDa aralığında değişmektedir (Masum vd., 2019). Mantardan elde edilen tirozinaz enziminin molekül ağırlığı yaklaşık 120 kDa'dur. Genellikle tetramerik yapıda bulunan *Agaricus bisporus* mantarı kaynaklı tirozinaz enzimi, mol kütleleri yaklaşık 43 kDa olan iki ağır alt ünite (H) ve 14 kDa olan iki hafif alt üniteden (L) oluşan bir proteindir (Resim 1.1). Üç domaine sahiptir ve aktif merkezinde altı histidin birimi ile bağlanmış, moleküler oksijen ile etkileşimin gerçekleştiği iki bakır (iyon) bağlanma bölgesi bulundurur. Ayrıca bir disülfid bağı yapıya kararlılık kazandırır (Ismaya vd., 2011; Zolghadri vd., 2019).



Resim 1.1. *Agaricus bisporus* tirozinaz enziminin a) üstten; b) yandan üç boyutlu yapısı (Ismaya vd., 2011)

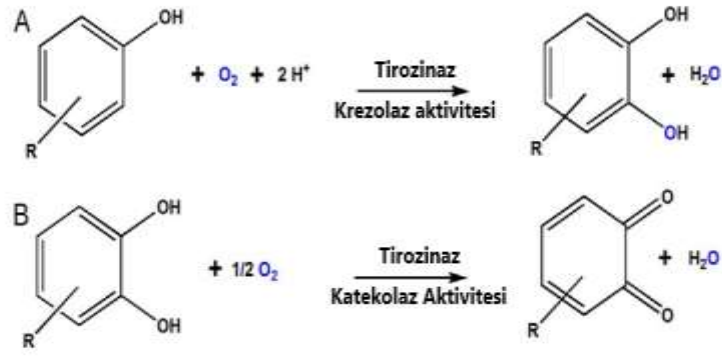
Mantar sap ve şapkalarından izole edilen 43 kDa'luk monomerik aktif bir formun keşfi ile bu proteinin aslında H alt ünitesi olduğu belirlenmiştir (Wichers vd., 1996). Ayrıca yine *Agaricus bisporus* mantarından 2018 yılında spesifik aktivitesi 38000 ünite/mg olan bir tirozinaz izoformu (H alt ünitesi) saflaştırılmıştır (Lopez ve Tejedor, 2018).

Resim 1.2'de *Agaricus bisporus* mantarı tirozinaz enziminin aktif bölgesi gösterilmektedir.



Resim 1.2. *Agaricus bisporus* mantar tirozinaz enziminin aktif bölgesi (Zou vd., 2017). (Karbon atomları yeşil, azot mavi, oksijen kırmızı ve bakır kahverengi ile gösterilmiştir).

Tirozinaz enzimi metabolizmada birbirini takip eden iki temel reaksiyonu katalizlemektedir. Bunlardan ilk reaksiyon, monofenolün *o*-difenole hidroksilasyonu olup monofenolaz ya da krezolaz aktivitesi olarak da bilinir. İkinci reaksiyon ise, *o*-difenolün *o*-kinona oksidasyonu olup sıklıkla *o*-difenolaz ya da katekolaz aktivitesi olarak bilinir. Her iki reaksiyonda da oksidan olarak oksijen kullanılır (Gertzen ve Escobar, 2014). Bu reaksiyonlar sırası ile Şekil 1.1'de gösterilmiştir.

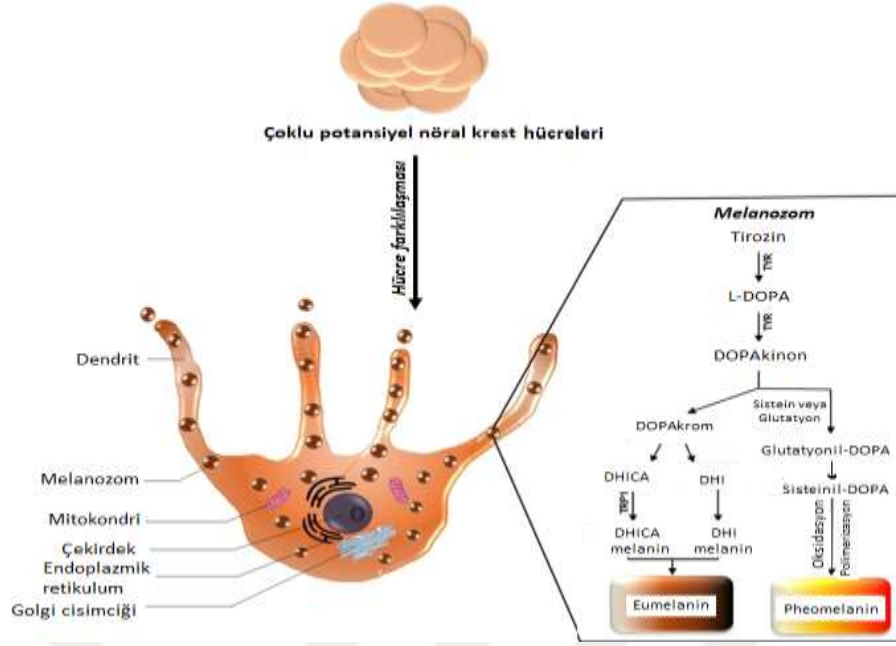


Şekil 1.1. Tirozinaz enziminin katalizlediği monofenollerin kademeli oksidasyon reaksiyonu (Kaintz vd., 2014).

1.2.2. Memeli Tirozinaz Enziminin Özellikleri

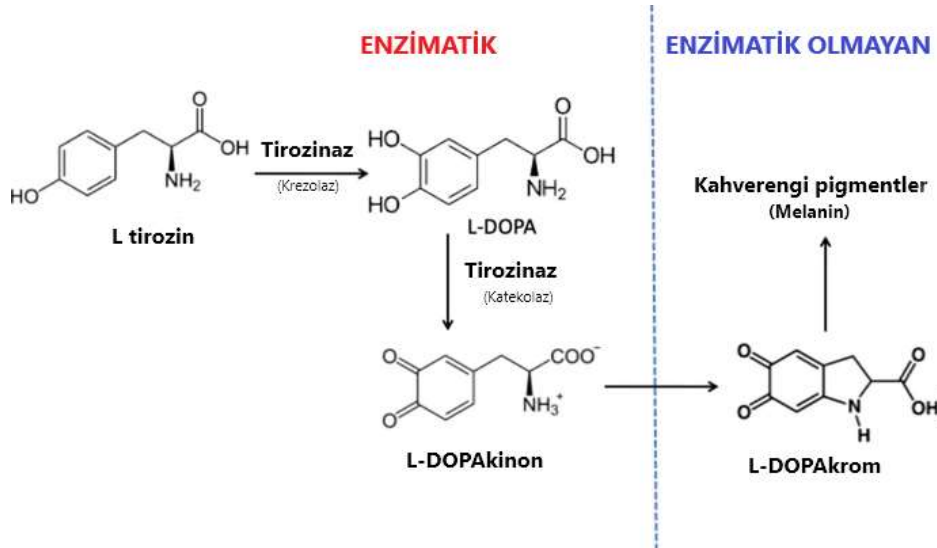
Farklı canlı türlerinde bulunan tirozinazlar, bulunduğu dokular ve hücrelerdeki kimyasal yapısı, üç boyutlu özellikleri ve dağılım açısından çok çeşitlidir. Memeli tirozinazı tek bir zara yayılmış transmembran proteini olarak karakterize edilir. İnsanlarda, enzimin katalitik aktif bölgesi melanozomların içinde yer alır. Proteinin geri kalan kısmı ise melanositin sitoplazmasına yayılmış durumdadır (Obaid vd., 2021).

Melanin memelilerde önemli bir pigment olup saç telleri ve ciltte dağılmıştır ve sitoplazma içinde oluşan serbest radikalleri absorbladığı gibi konakçı hücreyi çeşitli iyonlaştırıcı radyasyon tiplerinden korur. Memelilerde eumelanin (kahverengi veya siyah pigment) ve feomelanin (kırmızı veya sarı pigment) olarak iki melanin türünün bir karışımı bulunur. Melanin oluşumu tirozinin dihidroksifenilalanine dönüştürüldüğü bir seri oksidatif reaksiyonlarla gerçekleşir. Bu durum Resim1.3'de açıklanmaktadır (Fernandes ve Kerkar, 2017).



Resim 1.3. Tirozinden oksidatif reaksiyonla melanin oluşumu (Cho vd., 2020).

Tirozinaz enzimi melanin sentezi sırasında aşağıdaki reaksiyona uygun olarak hidroksifenilalanini önce dihidroksifenilalanin (DOPA)'e, daha sonra da dopakinona dönüştüren ve melanin oluşumuna sebep olan reaksiyonu katalizleyen enzimdir. Reaksiyon mekanizması Şekil 1.2'de gösterilmiştir.



Şekil 1.2. İlk iki basamağı tirozinaz enzimi tarafından katalizlenen melanin sentezi reaksiyonu (Kurpejović vd., 2021).

1.3. Tirozinaz Enziminin Kullanım Alanları

1.3.1. Atık Sulardan Fenolik Bileşik Giderimi İçin Kullanımı

Fenolik bileşikler (yani fenol, alkilli veya halojenli fenoller ve bunların Bisfenol A gibi türevleri), kâğıt, metal, reçine, plastik, pestisit ve ilaç gibi birçok endüstriyel ürünün imalatı sırasında üretilen çevresel kirleticilerdir. Bu zehirli kirleticiler endüstriler tarafından sıklıkla göllere, nehirlere ve okyanuslara büyük miktarlarda boşaltıldıkları için çevremizi ve ekolojiyi olumsuz yönde etkilemektedir. Bu nedenle, endüstriyel atıklardan fenolik kirleticilerin uzaklaştırılması daima kritik bir araştırma konusu olmuştur. Fenolik kirleticileri gidermek için lakkaz, peroksidaz ve tirozinaz gibi enzimlerin kullanımı yaygınlaşmıştır. Tirozinaz enziminin kullanılmasının ardındaki prensip enzimin monofenolleri *o*-difenollere ve takiben *o*-kinonlara dönüştürmesi ve *o*-kinonların da enzimatik olmayan polimerizasyon sonucu sedimentasyon veya filtrasyon ile uzaklaştırılabilecek, çözünür olmayan agregatlarının oluşturulmasıdır (Xu ve Yang, 2013).

1.3.2. Tarım ve Gıda Endüstrisinde Tirozinaz

Tirozinaz meyvelerde, sebzelerde ve hayvanlarda yaygın olarak bulunan bir oksidaz olarak bilinir. Gıda işleme sırasında tirozinaz, raf ömrünü kısaltan ve besleyici ve ticari değerleri azaltan istenmeyen esmerleşmeye neden olur (Shi vd., 2020).

Bitki kaynaklı gıdaların tirozinaz aracılığı ile istenmeyen enzimatik esmerleşmesi, besin kalitesinin düşmesine ve gıda ürünlerinin ekonomik kaybına neden olur. Tirozinaz etkisini önlemek için mevcut geleneksel yöntemlerin yetersizliği, araştırmacıları gıda ve kozmetik için yeni güçlü tirozinaz inhibitörleri aramaya teşvik etmektedir (Parvez vd., 2007).

1.3.3. Tıp ve Eczacılıkta Kullanımı

Tirozinazın tıbbi endüstrideki uygulaması pigmentasyon ve diğer cilt problemlerini önlemede kullanımından dolayı popülerlik kazanmıştır. Tirozinaz enzimini inhibe ederek melanin sentezinin düzenlenmesi, pigmentasyonun önlenmesi için uygulanabilecek bir yöntemdir. Ticari olarak temin edilebilen kozmetiklerin veya cilt rengi açıcı maddelerin çoğu tirozinaz inhibitörlerini içerir. İnhibitörlerin tirozinazı hedef alması, tirozinaz yalnızca melanositler tarafından üretildiğinden, yan etkiler olmaksızın hücrelerde melanogenezi spesifik olarak inhibe edebilir olmasındandır. Cilt rengi açıcı ajanlar olarak iyi bilinen tirozinaz inhibitörleri olarak hidrokinon, arbutin, azelaik asit, L-askorbik asit, ellagic asit, kojik asit örnek verilebilir (Pillaiyar vd., 2017).

Parkinson hastalığı beyinde dopamin üreten bölgedeki hücre kaybı nedeniyle, dopamin eksikliğinden kaynaklanan bir hastalıktır. Bir oksidoredüktaz sınıfı olan tirozinaz enzimi, insan beyinde nöromelanin oluşumunda rol oynamakta ve bu süreçte dopaminin oksidasyonu ile dopakinonları oluşturmaktadır. Dopakinonun aşırı üretildiği durumlarda ise, sinir hasarı ve hücre ölümüne neden olmaktadır. Bu sebeple tirozinaz enziminin dopamin nörotoksitesine yol açarak Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklardan sorumlu olabileceği ileri sürülmektedir (Greggio vd., 2005). Bu nedenle Parkinson hastalarında tirozinaz enzimi inhibitörlerinin kullanılması yapılan çalışmalar sonucunda hız kazanmıştır. Tirozinaz enziminin en iyi bilinen inhibitörlerinden biri olan kojik asit başta olmak üzere çeşitli sentetik inhibitörler geliştirilmiş; ancak bunların toksik etkilerinin bulunması nedeniyle alternatif olarak doğal inhibitörlere yönelik çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır (Gezici ve Koçum, 2021).

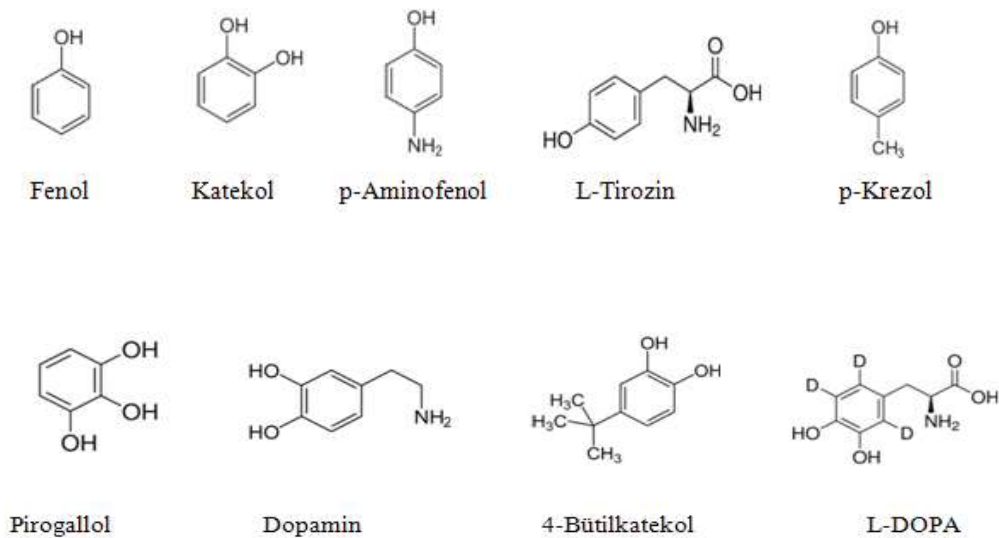
1.3.4. Tirozinazın Biyoteknolojide Kullanımı

Zararlı kimyasalların ve bunların türevlerinin azaltılması günümüzde küresel çevre uğraşlarından biridir. Biyoremediasyon, çevredeki kimyasalların varlığını kontrol etmek için bir strateji olmuştur. Fenol oksidazlar (lakkazlar ve tirozinazlar) dahil olmak üzere enzimler, sular ve toprakta birçok kimyasal kirlenmenin giderilmesinde “yeşil ürünler” olarak giderek daha fazla kullanılmaktadır. Her iki fenoloksidaz da doğada yaygındır ve çok sayıda kimyasalın katalitik eliminasyonu için tek kofaktör olarak kolayca bulunabilen moleküler

oksijeni kullanma yeteneklerinden dolayı cazip biyokatalizörlerdir. Bu katalitik özellik, bu iki biyokatalizöre çok özeldir ve özellikle farmasötikler gibi mikro kirletici kimyasalların ortadan kaldırılması için çevresel uygulamalarda kullanımları mümkündür. Katalitik potansiyellerinden yararlanarak, çevresel uygulamalarda kullanılacak uygun biyokatalizörler üretmek için lakkaz mühendisliğinde dikkate değer ilerlemeler kaydedilmiştir. Benzer şekilde, tirozinazlar, bugüne kadar çok daha az araştırılmış olmalarına rağmen, lakkazlarla katalitik benzerlikleri nedeniyle çevresel uygulamalarda artan bir ilgi kazanmaktadır. Öte yandan tirozinazlar, gıda katkı maddeleri, ilaç sentezi, biyosensör geliştirme vb. gibi biyoteknolojinin diğer çeşitli alanlarındaki uygulamaları için büyük ölçüde incelenmiştir (Ba ve Kumar, 2017).

1.4. Tirozinaz Enziminin Substratları

Funguslar, bakteriler, bitkiler ve hayvanlarda bulunabilen tirozinaz enzimi geniş bir substrat spektrumuna sahiptir. Tirozinazın substratlarından bazıları fenol, katekol, *p*-aminofenol, L-tirozin, 3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA), *p*-krezol, pirogallol, dopamin, 4-bütilkatekol olarak sayılabilir (Min vd.,2019). Bu substratların moleküler yapıları Şekil 1.3'de gösterilmiştir.

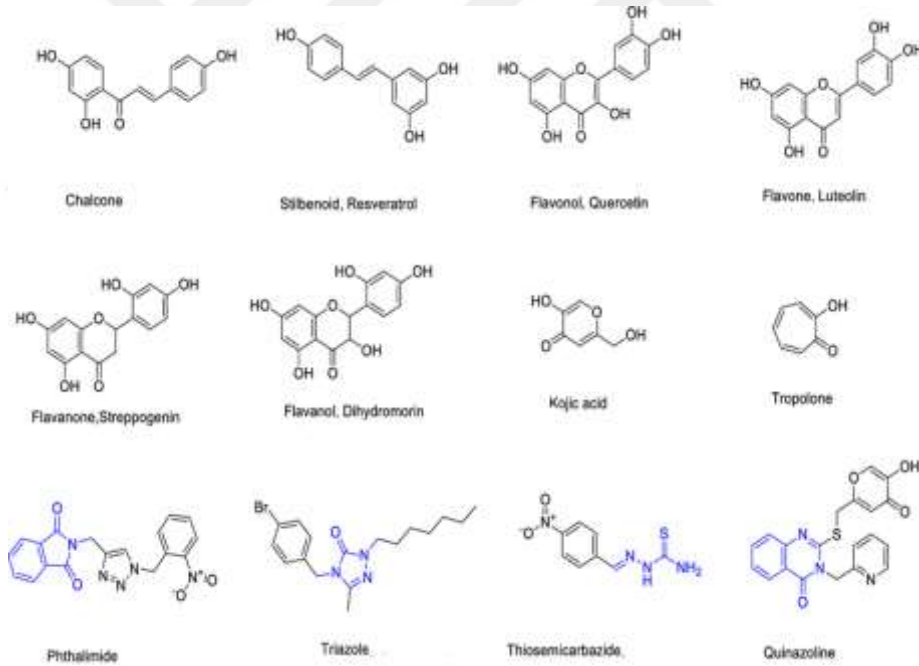


Şekil 1.3. Tirozinaz enzimin substratları

1.5. Tirozinaz Enziminin İnhibitörleri

Cilt beyazlatma maddesi olarak kullanılan bir mantar metaboliti olan kojik asit, en çok çalışılan tirozinaz inhibitörüdür. Popüler beyazlatma ajanı kojik asit, arbutin, hidrokinon ya da tropolon ile birlikte inhibitör geliştirme çalışmalarında kullanılmıştır. Bitkilerden, mantar metabolitlerinden ve deniz yosunundan tirozinaz inhibitörlerini elde etmek için araştırmalar vardır. Polifenoller doğada yaygın olarak bulunur ve tirozinaz inhibitör gruplarının en büyüğüdür. En iyi çalışan polifenoller, flavonlar, flavonoller, flavanonlar, flavanoller, izoflavonoidler, kalkanlar ve kateşinleri içeren yedi ana gruba ayrılabilen flavonoidlerdir (Masum vd., 2019).

Doğal kaynaklarından elde edilen bazı tirozinaz inhibitörlerinin kimyasal yapıları aşağıdaki Şekil 1.4'te gösterilmiştir.



Şekil 1.4. Bazı tirozinaz enzimi inhibitörlerinin kimyasal yapıları (Karimian vd., 2021).

1.6. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler boya, gübre, yüzey aktif madde, patlayıcı, tekstil, plastik gibi çeşitli endüstrilerde yaygın kullanıma sahiptir. Örneğin, polimer endüstrileri, kontrplak

yapıştırıcılar, poliöl ve korozyona dayanıklı polyesterler gibi ısıyla sertleşen polimerler üretimde fenolik bileşikler kullanılır. Fenol ve fenolik bileşik kirleticilerin doğadaki varlığı, endüstri ya da insan faaliyetinden kaynaklı olarak doğal ve kimyasal süreç sebebiyle dünyanın karşılaştığı ortak bir sorundur (Raza vd., 2019). Toksisiteleri ve doğada uzun süre kalabilmeleri nedeniyle 1908'in başlarında araştırmacılar fenolik bileşiklerle ilgili çalışmalara başlamışlardır. Fenolün organik ve serbest radikal türlerinin oluşumu ve hidrofobikliği nedeniyle toksik özelliğini artırmaktadır (Abd Gami vd., 2014).

Bazı fenolik bileşiklerin karakteristikleri, kaynama noktaları, çözünürlük ve pKa değerleri, kirletici kaynakları, uygulamaları, izin verilen derişim sınırları ve etkileri Çizelge 1.2'de yer almaktadır.

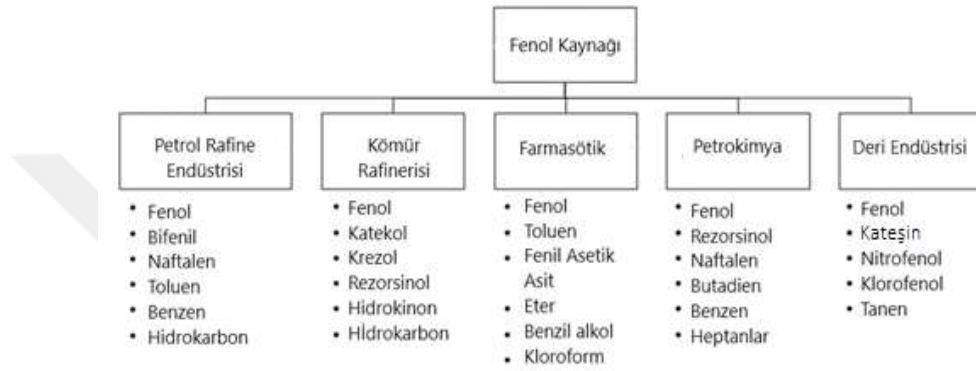


Çizelge 1.2. Olası fenol türevleri, kaynakları, çözünürlük, izin verilen derişim ve uygulamaları (Raza vd., 2019)

Bileşik	Karakteristik özelliği	Kaynama noktası & Erime noktası	Çözünürlük & pKa	Kirletici kaynağı	Uygulamaları	İzin verilen derişim	Etkiler
1	Fenol	Kristal katı, tatlımsı buruk bir koku KN:181.7 °C EN:40.5 °C	8.3g 100mL ⁻¹ pKa:9.95	Yağ rafineri, tekstil, ilaç	Plastikler, polikarbonatlar, deterjanlar, pestisitler	19 mg m ⁻³	Uzun süre maruz kalmada böbrek ve karaciğer etkilenir
2	<i>o</i> -Krezol	Renksiz katı, hoş kokulu KN:191 °C EN:31 °C	31g 100dm ⁻³ pKa:10.316	Tütün	Herbisitler, kas gevşeticiler	22 mg m ⁻³	Düşük seviyelerde zararsız
3	<i>m</i> -Krezol	Renksiz sıvı, kuru, katranımsı koku KN:202.8 °C EN:11 °C	2.35g 100mL ⁻¹ pKa:10.1	Kömür	Pestisitler	22 mg m ⁻³	Ciddi yanıklar
4	<i>p</i> -Krezol	Renksiz katı KN:201.9 °C EN:35.5 °C	2.4 g 100mL ⁻¹ pKa:10.3	Kömürün kavrulması, toluen sülfonasyonu	Antioksidanlar	22 mg m ⁻³	Yutulursa ölümcül
5	Rezorsinol	Beyaz kristal katı, karakteristik koku Sarıdan KN:280 °C EN:109.8 °C	110 g 100mL ⁻¹ pKa:9.15	Reçinelerin erimesi	Antiseptik dezenfektanlar	-	Çevre için tehlikeli
6	Klorofenol	kahverengimsi sıvı, hoş olmayan karbolik koku Renksiz ila soluk sarı sıvı, karakteristik koku KN:174.9 °C EN:9.8 °C	10-50 mg mL ⁻¹ pKa:10.3	Bitkilerden su arıtma	Pestisitler	-	Tahriş edici, yanıklara sebep olur
7	Nonilfenol	Renksiz ila soluk sarı sıvı, karakteristik koku KN:290-300 °C	6 mg mL ⁻¹ pKa:10.31	Fenollerin alkilasyonu	Fenolün alkilasyonu	-	Endokrin bozukluk
8	Nitrofenol	Renksiz ila soluk sarı kristaller, kokusuz KN:279 °C EN:113.8 °C	11600 mg L ⁻³ pKa:7.15	Kumaş fabrikaları	Patlayıcılar	Çok zehirli	Akut sağlık sorunları
9	Bisfenol A	Beyaz ila açık kahverengi pullar, fenolik koku KN:360.5 °C EN:153 °C	120-300ppm pKa:9.6	Plastik endüstri, medikal endüstri	Plastikler	< 1 µg kg ⁻¹	Endokrin bozukluk, kansere sebebiyet

1.7. Fenolik Bileşik Gideriminde Kullanılan Teknolojiler

Bazı endüstriler odun damıtma, kağıt üretimi ve pişirme gibi üretim süreçlerinde fenol ve özellikle kloro-fenol üretirler (Paasivirta vd., 1985; Olaniran ve Igbinosa, 2011). Büyük endüstrilerin atık suyunda bulunan fenol ve onun süstitüe bileşenleri Şekil 1.5'de yer almaktadır (Said vd. 2021).



Şekil 1.5. Bazı temel endüstriler tarafından üretilen fenol örnekleri (Said vd. 2021).

Fenol içeren atık suları doğrudan ya da dolaylı olarak su kaynaklarına boşaltan bu endüstriyel faaliyetler su kirliliğine sebep olmaktadır.

Fenollerin giderimi için, distilasyon, adsorpsiyon ve ekstraksiyon, biyodegradasyon, kimyasal oksidasyon, elektrokimyasal oksidasyon ve enzimatik yollar gibi birçok yöntem vardır. Bu yöntemlerle ilgili düşük verimlilik, yüksek maliyet veya toksisite gibi bir çok sorun da belirlenmiştir (El-Ashtoukhy vd., 2013). Aşağıda bu yöntemler açıklanmıştır.

1.7.1. Distilasyon

Distilasyon teknolojisi fenol gideriminde kullanılan yöntemlerden biridir. Su buharı damıtma ve azeotropik damıtma olarak iki tip distilasyon vardır. Her iki ayırma yöntemi benzerdir ve uçuculuk farkından yararlanarak ayırma yapar. Bu yöntem, arıtma proseslerinde derişimi yüksek (3000 mg/L'den fazla) fenolik bileşikler için uygulanır (Mohammadi vd., 2015).

1.7.2. Ekstraksiyon ve Adsorpsiyon

Fenollerin sudan uzaklaştırılmasına yönelik adsorpsiyon ve ekstraksiyon teknolojileri, eser fenol konsantrasyonlarından yüzde konsantrasyonlarına kadar etkilidirler. Ancak bu teknolojilerde ihtiyaç duyulan adsorban veya özütleyicinin maliyeti göz önüne alınmalıdır. Geleneksel solvent ekstraksiyonu olarak da bilinen sıvı-sıvı ekstraksiyonu, fenolik bileşiklerin işlenmesi için standart, tahribatsız bir işlemdir ve çok çeşitli fenol konsantrasyonlarına uygundur, bazı durumlarda uygun maliyetlidir (Villegas vd., 2016).

Adsorpsiyon işlemi, atık sulardan organik maddelerin uzaklaştırılması için etkilidir. Aktif karbonlar, organik kirleticiler için mükemmel adsorpsiyon yeteneklerinden dolayı en yaygın kullanılan adsorbanlardır. Aktif karbonların yüksek adsorpsiyon kapasiteleri genellikle yüksek yüzey alanı, gözenek hacmi ve gözenekliliği ile ilgilidir. Ayrıca, aktif karbonların adsorpsiyon yetenekleri, aktivasyon yöntemine ve kaynak malzemelerin doğasına büyük ölçüde bağlıdır. Birçok araştırmacı, aktif karbonun, özellikle fenolik bileşikler için, organik bileşiklerin uzaklaştırılması için etkili bir adsorban olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, yüksek başlangıç maliyeti ve maliyetli bir rejenerasyon sistemine duyulan ihtiyaç, onu bir adsorban olarak ekonomik olarak daha az uygulanabilir kılmaktadır. Bu kriterleri göz önünde bulundurarak, düşük maliyetleri ve yerel bulunabilirlikleri nedeniyle, kitosan, zeolitler, kil gibi doğal malzemeler veya uçucu kül, kırmızı çamur, çamurlar ve oksitler gibi endüstriyel işlemlerden kaynaklanan belirli atık ürünler düşük maliyetli adsorbanlar olarak sınıflandırılır (Ahmaruzzaman, 2008).

1.7.3. Biyodegradasyon

Organik bileşiklerin biyolojik olarak parçalanmasında mikrobiyal katalizörlerin kullanımı son yıllarda önemli ölçüde ilerlemiştir. Hemen hemen tüm doğal ortamlarda, özellikle de topraklarda çok sayıda mikroorganizmanın bir arada olduğu bulunmuştur. Birçok doğal ve sentetik organik kimyasal, doğal ortamda kolayca biyolojik olarak parçalanabilir. Malzemelerin biyolojik bozunması, ilk yakınlığı, substrata adsorpsiyona veya fiziksel erişime izin vermeyi, substratları parçalamak için ekstra hücrel enzimlerin salgılanmasını veya taşıma sistemleri yoluyla alımı ve ardından hücre içi metabolizmayı içerir. Organik bileşiklerin biyolojik bozunma etkinliği, organik kirleticinin türünden,

organizmanın doğasından, ilgili enzimden, bozunma mekanizmasından ve etkileyen faktörlerin doğasından etkilenir. Fenolik bileşikler, nispeten düşük konsantrasyonlarda toksik olan tehlikeli kirleticilerdir. Fenol birikimi hem flora hem de fauna için toksisite yaratır. Fenol toksik olduğu ve kirliliğe neden olduğu için ortamdan uzaklaştırılması gerekir (Nair vd., 2008).

Biyolojik bozunma fenol açısından zengin çözeltilerde kullanılan bir yöntemdir. Diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında daha az toksik bir bileşik içinde fenolün taşınması, sürdürülmesi ve tasarlanması için temelde basit bir yöntem olarak karşımıza çıkar. Biyolojik yöntemin avantajlarına rağmen biyolojik bozunma büyük oranda kimyasal bileşiğin yapısına bağlıdır (Said vd., 2021).

1.7.4. Kimyasal Oksidasyon

Kimyasal oksitleyiciler, sulu çözeltideki fenollerin yıkımını sağlar. İlimli koşullarda (sıcaklık ve pH açısından) düşük reaktif ve enerji maliyetlerine sahiptir. Ozon, klor, klor dioksit, kloraminler, ferrat [Fe (VI)] ve permanganat [Mn (VII)] atıksuların oksidatif arıtımında kullanılan en yaygın kimyasallardır. Permanganat ve ferrat, yüksek indirgeme potansiyelleri nedeniyle geniş ölçüde çalışılmış ve kullanılmıştır. Ferrat, geniş bir pH aralığında çeşitli kirleticileri oksitleme yeteneğine sahiptir. Pıhtılaşma/flokülasyon özelliklerine sahip olan ferrik hidroksite indirgenerek daha iyi etkinlik sağlar. Ayrıca, permanganat daha ucuzdur, işlenmesi kolaydır ve stabildir; ilaveten klorlu veya bromlu yan ürünler oluşturmaz (Villegas vd., 2016).

1.7.5. Elektrokimyasal Oksidasyon

Su/atık su arıtımı için elektrokimyasal yöntemler çevresel uyumluluk, çok yönlülük, enerji verimliliği, güvenlik, seçicilik, otomasyona uygunluk ve maliyet etkinliği gibi birçok avantaj sunmakta ve bu nedenle son yıllarda büyük ilgi görmektedir. Örneğin, fenolün elektrokimyasal oksidasyonu, platin katkılı SnO₂, PbO₂, Bi₂O₅ –PbO₅, IrO₂ karbon ve bor katkılı elmas anotlar ile çeşitli araştırmacılar tarafından çalışılmıştır. Bu elektrot malzemeleri arasında elmas elektrotun yanı sıra daha ucuz olan metal oksit elektrotlar da tercih edilmektedir (Yavuz ve Koparal, 2006).

1.7.6. Enzimatik Yöntem

Enzim tarafından katalizlenen kimyasal reaksiyonun hızı, normal reaksiyondan bir milyon kata kadar daha hızlıdır. Bu yüzden fenolün biyobozunması gibi biyokimyasal reaksiyonda enzimler önemlidir. Enzim bazlı prosesler yüksek özgüllükle hareket eder ve hedeflenen bileşiklerin uzaklaştırılmasında oldukça etkilidir. Organik bileşikleri sulu çözeltilerden uzaklaştırmak için enzim bazlı tekniklerin kullanımı ilk olarak Klivanov ve meslektaşları tarafından önerildi ve o zamandan beri sürekli olarak geliştirildi. Peroksidazlar, diğer enzimlerle karşılaştırıldığında fenol polimerizasyonu için en yaygın olarak bildirilen enzimlerdir (Pradeep vd., 2015). Fenol dönüşümünü başlatmak için fenol, H₂O₂'e maruz bırakılmalıdır daha sonra peroksidaz enzimi aynı zamanda polimerize fenolün serbest radikal formuna aromatik fenol bileşiğini okside eder (Wilberg vd., 2002). Su arıtma amacı için kullanılan enzimler bazı katı maddeler üzerinde adsorblanır ve bu prosedür geniş ölçüde ekonomik faydalarından dolayı endüstri ve tarımdaki kirlilik için kullanılmaktadır.

Fenolik bileşik giderme yöntemlerinin karşılaştırılması Çizelge 1.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 1.3. Fenolik bileşik giderim yöntemlerinin karşılaştırılması (Said vd. 2021).

Teknoloji	Fonksiyon	Avantaj	Dezavantaj
Distilasyon	Kaynama noktası kullanılarak sıvı karışımdan fenol ayırma ve yoğunlaştırma	Yüksek fenol geri kazanımı Hızlı ayırma	Yüksek enerji gereksinimi Distilasyon kulesi için büyük alan ihtiyacı
Adsorpsiyon ve ekstraksiyon	Karışabilir sıvı yoluyla katı üzerine adsorplama veya karışabilir sıvılar üzerinden fenol giderimi	Yüksek etkinlik Harcanan sıvı ya da adsorbanın kolayca yenilenmesi	Harcanan sıvı veya adsorbanın imhası için işlem gerektirmesi
Biyodegradasyon	Fenölü mineralize etmek için mikroorganizma kullanılması	Tasarım ve uygulama kolaylığı Toksisitesi yüksek fenölü daha az toksik türe dönüştürme	Havuz ya da tank için büyük alan gereksinimi Düşük fenol konsantrasyonunda uygulama zorluğu
Kimyasal oksidasyon	H ₂ O ₂ ve O ₃ gibi güçlü oksidanlar ve fenol arasında kimyasal bir reaksiyonla başlatılması	Yüksek fenol konsantrasyonu için uygun olması UV ışıkla birleştirildiğinde yüksek etkinlik	UV ışıkla birleştirildiğinde yüksek enerji gereksinimi Enerji ve kimyasalın sürekli temin edilmesinden dolayı maliyet etkisi
Elektrokimyasal oksidasyon	Elektrot yüzeyinde fenol oksidasyonu için elektrik kullanımı	Kimyasal gerektirmez Uygulama kolaylığı	Elektrik enerjisine bağımlı Düzenli elektrot değişimi
Enzimatik yöntem	Enzim aracılığı ile fenölün polimerleştirilmesi	Hızlı işlem Yüksek seçicilik	Reaksiyon koşullarına yüksek bağımlılık Enzim inhibisyonu ihtimali

1.8. Enzim İmmobilizasyonu

Biyokataliz biyokimya, organik kimya, mikrobiyoloji ve moleküler biyoloji uygulamalarını içeren kullanılabilir ve sürdürülebilir bir disiplinler arası teknolojidir. Biyokatalizörlerin ilk kullanımı bir asır kadar önce doğal bileşiklerle başlamıştır. Sonrasında, özellikle yirminci yüzyılın son çeyreğinde mühendislik teknolojilerinin de gelişmesi ile doğal olmayan bileşiklerin de enzimlerin substratı olarak kullanılması mümkün olmuştur. Biyokataliz çalışmalarının gelişimi 1990'larda ileri moleküler biyoloji ve yüksek verimli tarama tekniklerinin gelişmesi sonucu biyokatalizin hızlı ve geniş çaplı uygulamalarının mümkün olması ile devam etmiştir.

Günümüzde, enzim biyokimyasında yeni bir gelişme dönemine girildiği ifade edilmekte ve enzim çalışmalarında ve protein mühendisliğindeki gelişmeler ve biyokataliz işlemlerinin “yeşil kimyaya” uygulanabilme avantajları enzimlerin kullanım alanını gün geçtikçe artırmaktadır.

Enzimin hücre dışında, sağlık veya endüstri alanlarında kullanımı söz konusu olduğunda başarılı uygulamaların anahtarı ‘taşıyıcı’dır. Zira serbest enzimin tekrar kullanımı için çoğu kez enzim geri kazanımının mümkün olmaması veya mümkün olsa bile bu işlemin maliyetinin yüksek, veriminin düşük olması nedeniyle enzimin bir taşıyıcı üzerine immobilize edilmesi zorunlu hale gelir. Böylece kataliz işlemi “homojen”den “heterojen”e evrilir ve enzimin geri kazanımı ve yeniden kullanımı mümkün olabilir (Basso ve Serban, 2019).

İmmobilizasyon herhangi bir şeyi hareketsiz hale getirmek ya da tutturmak anlamına gelir. İmmobilizasyon, 1971 yılında ABD Henniker kentinde yapılan ilk Enzim Mühendisliği Kongresi’nde, “biyokatalizörlerin, enzimlerin ya da hücrelerin, spesifik bir reaksiyonu aktivite kaybı olmadan ve tekrar kullanılabilir bir şekilde katalizlemek üzere, belirli bir bölgede fiziksel olarak tutuklanması” olarak tanımlanmıştır (Katchalski-Katzir ve Kraemer, 2000; Eş vd., 2015).

Enzim immobilizasyonu ise, enzimlerin katalitik aktivitelerini kaybetmeden sürekli ve tekrar kullanımlarını sağlamak üzere, fiziksel veya kimyasal olarak, çözünür olmayan bir destek materyali üzerine tutturulması olarak tanımlanabilir.

İmmobilizasyon işleminde sürecin başarılı bir şekilde devam edebilmesi için etkin olan faktörler:

- İmmobilizasyon yöntemi,

- Enzimin ve substratın moleküler yapısı,
- Destek maddesinin özellikleri,
- İmmobilize enzimin kullanılacağı uygulama alanıdır.

Enzim immobilizasyonu aynı enzimin tekrar tekrar kullanılmasını mümkün kılar. Böylece her enzimatik reaksiyon sonunda olası kayıplar önlenir ve sürekli sistemlerin tasarımı kolaylaşır. İmmobilizasyon sayesinde biyokatalizörlerin kararlılığı genellikle arttığı için immobilize enzimin kullanıldığı süreci kontrol etmek daha kolaydır (Kulkarni 2002; Eş vd., 2015). Her işlem sonrasında, enzim reaksiyon karışımından kolaylıkla uzaklaştırılabilir, bu da biyoproses için kontaminasyondan kaynaklanan olası tehditleri ortadan kaldırır (Eş vd., 2015).

1.8.1. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzim immobilizasyon yöntemleri geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz olarak ikiye ayrılmıştır. Her bir yöntem kendi içerisinde Resim 1.4'te şematik olarak sınıflandırılmıştır. İmmobilizasyon yöntemleri kovalent bağlama, tutuklama, çapraz bağlama, şelatlama, adsorpsiyon ve disülfid bağlama başlıklarında incelenebilir.



Resim 1.4. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması (Taheri-Kafrani vd., 2021).

1.8.1.1. Kovalent Bağlama

Geri dönüşümsüz immobilizasyon yöntemi için en yaygın kullanılan tekniklerden biridir. Taşıyıcılara kovalent bağlama enzim molekülü üzerindeki reaktif gruplar üzerinden gerçekleştirilir. Avantajı enzim ve matriks arasındaki bağların kararlı olması sebebiyle enzim ortama salınmaz. Ancak bağlanmış enzimin yüksek aktivite göstermesi için aktif merkezde rol alan amino asitler bağlanmada yer almamalıdır çünkü enzimin katalitik bölgesindeki amino asitler üzerinden gerçekleşme ihtimali sonucu oluşabilecek aktivite kayıpları kovalent bağlamanın en büyük dezavantajıdır (Brena vd., 2013).

Kovalent bağlanma ile enzimin bir desteğe bağlanmasını sağlayan birkaç reaksiyon dizisi vardır. Bunlar *izo* -üre bağı, diazo bağı, peptit bağı veya alkilasyondur. Enzim molekülleri, enzimin yüzeyindeki amino asitlere ait fonksiyonel gruplar ile katı destek malzemelerinin bir aktif grubu arasındaki Schiff bazı bağlantısı ile hareketsiz hale getirilir (Thangaraj ve Solomon, 2019).

Çoklu kovalent bağlanma, enzimleri immobilize etmek için kullanılan en güçlü kimyasal bağlardan biridir. Proteinin özellikle dış yüzeyinde bulunan amino asitlerin içerdiği serbest fonksiyonel gruplar, enzimler için bağlanma noktaları oluştururlar. En yaygın kovalent bağlar, lizin gibi amino asitler üzerindeki amin gruplarının taşıyıcılar üzerindeki karboksil gruplarıyla reaksiyona girdiği amid bağlarıdır. Karbodiimid gibi reaksiyon aktivatörleri ile N-hidroksisüksinimid (NHS) kullanılarak karboksilik gruplar, kararlı amid bağları oluşturmak üzere aktif esterlere dönüştürülebilirler. Ayrıca, epoksi ve aldehit grupları sıklıkla immobilizasyon için enzimler üzerindeki amin gruplarıyla reaksiyona girerler. Tersine, aspartik asit ve glutamik asit gibi amino asitlerin karboksil grupları taşıyıcılar üzerindeki amin gruplarıyla reaksiyona girerek enzimlerin immobilize olmasını sağlayabilirler. Çoğu durumda, enzim aktivitesi, immobilizasyon sonunda korunabilir ve bazen de arttırılabilir. Çoklu kovalent bağlanmada, enzimler üzerindeki bağlanma noktaları nispeten rastgeledir, bu da enzim yapılarının pozisyonu üzerinde kontrol eksikliği anlamına gelir. Bazı durumlarda, kovalent bağlanma, enzimatik aktiviteyi önemli ölçüde azaltabilen protein yapısında istenmeyen konformasyonel değişikliklere neden olabilir (Jia vd., 2014).

1.8.1.2. Tutuklama

Prensip olarak tutuklama, enzimi belirli bir yerde durmaya zorlamaktır. Bu işlem polimer matriksler içinde gerçekleştirileceği gibi, yarı geçirgen membran içinde mikrokapsülleme ile de gerçekleştirilebilir. Genellikle bir katalizör olan aktif bir tür, bir katı veya jelden oluşan bir malzeme içinde tutulur, böylece katı veya yarı katı matris içinde dağılmış hale gelir. Bu yöntem, izole edilmiş enzimleri hareketsiz, daha kararlı ve ayrıştırılması ve geri dönüştürülmesi daha kolay hale getirmek için kullanılabilir. Bu yöntemin avantajı enzimle doğrudan bir etkileşimin gerekli olmamasıdır. Enzim yapısında minimal değişikliklerin olması diğer bir avantajdır. Kütle transfer sınırlamaları bu yöntemin bir dezavantajı olabilir ve malzeme uygun gözenek boyutu ayrıca matriks özellikleri ile tasarlanmalıdır. Enzim yüksek oranda gözenekli veya çok büyük gözenekleri olan bir malzemeden kolayca sızabilir. Tutuklamanın başarılı olması için substrat ve ürünün serbest difüzyonuna izin veren, fakat enzimin sınırlı hareketine izin veren gözenekli bir malzeme üretilmiş olmalıdır (Imam vd., 2021).

1.8.1.3. Çapraz Bağlama

Bu yöntemde, küçük molekülü çift veya çok fonksiyonlu reaktifler enzim molekülleri arasında bağlar yaparak, sonuçta suda çözünmeyen komplekslerin oluşmasını sağlarlar. Protein yüzeyindeki reaktif $-NH_2$ grupları ile glutaraldehitin reaksiyonu yoluyla protein çapraz bağlama tekniği ilk olarak 1960'larda geliştirilmiştir (Doscher vd., 1963). Bununla birlikte, çapraz bağlı enzimler (CLE'ler) üretmeye yönelik bu yöntemin, düşük aktivite, zayıf yeniden üretilebilirlik, düşük mekanik stabilite ve jelatinimsi CLE'lerin işlenmesindeki zorluklar gibi birkaç dezavantajı vardı. Mekanik kararlılık ve kullanım kolaylığı, enzimin bir jel matrisi içinde veya bir taşıyıcı üzerinde çapraz bağlanmasıyla geliştirilebilir. 1960'ların sonlarında, endüstriyel kullanımda enzim immobilizasyonu için en yaygın kullanılan yöntem haline gelen taşıyıcıya bağlı enzimler önem kazanmıştır. Endüstriyel biyokatalizör olarak çapraz bağlı enzim kristallerinin (CLEC'ler) kullanımına 1992 yılından itibaren başlanmıştır. Fakat CLEC'lerin yüksek saflıkta enzim gerektirmesi nedeniyle çapraz bağlı enzim kümeleri (CLEA'lar) geliştirilmiştir. Bu yöntem ile enzim sulu çözeltiden basit bir şekilde çöktürülerek çapraz bağlı enzim kümeleri elde edilmiştir. Böylece yüksek saflıkta enzim kullanımı gerekliliği ortadan kalkmıştır (Sheldon vd., 2005).

1.8.1.4. Şelatlama

Şelatlama ya da metal bağlama sıkça kullanılan tersinir bir enzim immobilizasyon yöntemidir. Yöntem, yüklü ve polar amino asitlerin (histidin, lizin, fenilalanin, sistein ve tirozin) metal iyonlarına koordine bağlar ile bağlanmasına dayanır. Destek maddesinin yüzeyinde bulunan metal iyonları, kendilerine zayıf bir şekilde bağlı olan ligandlar içerirler. Enzim destek maddesi ile etkileşime girdiğinde, zayıf ligandlar enzim molekülleri ile yer değiştirir. Bağlanma, metal iyonuna daha çok afinite gösteren bir ligandın (EDTA gibi) ortama eklenmesi ile bozulabilir (Krishnamoorthi vd., 2015).

1.8.1.5. Adsorpsiyon

Bu yöntem yüzey aktif, suda çözünmeyen bir adsorbanın enzim ile karıştırılması ve enzimin fazlasının yıkanarak uzaklaştırılması temeline dayanır. Taşıyıcıya bağlamada etken olan kuvvetler van der Waals kuvvetleridir. Enzim immobilizasyonunda adsorpsiyon, ılımlı ve kolay hazırlanma koşulları, düşük maliyet, çapraz bağlayıcılar başta olmak üzere kimyasal katkı maddelerinin yokluğuna rağmen yüksek enzim yüklemesi olmaması ve tekrar kullanım için rejenerasyon gibi belirli avantajlara sahiptir. Adsorpsiyon, özellikle düşük maliyetli enzimler kullanıldığında, büyük ölçekli işlemlerde genellikle kullanılır. Bu yöntem, yeterince güçlü etkileşimler nedeniyle enzim moleküllerini yapısal olarak korur (Thangaraj ve Solomon, 2019).

1.8.1.6. Disülfid Bağlama

Esansiyel olmayan ve serbest kalan tiyol grupları içeren enzimler reaktif disülfid ya da disülfid oksitler üzerinden tiyol-reaktif destek maddelerine immobilize edilebilirler. Tiyol-enzim ve aktifleşmiş katı destek maddesi arasında oluşan bağlar, dithiothreitol gibi düşük mol kütleli bir tiyol molekülünün aşırısı ile koparılabilir. Böylece enzim inaktivasyonu gerçekleşmiş ve destek maddesi tekrar kullanılabilir hale gelmiş olur (Ovsejevi vd., 2013).

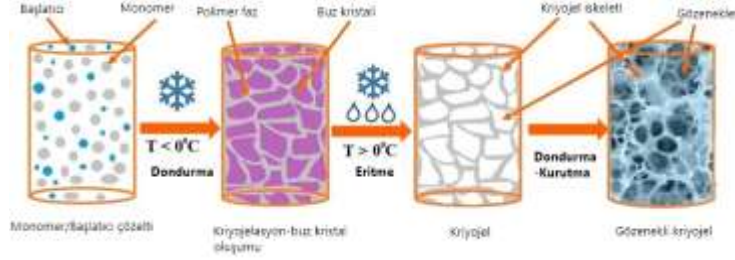
1.9. Kriyojeller

Kriyojeller, polimerizasyon veya çapraz bağlama yoluyla yarı donmuş monomerik veya polimerik yapılardan oluşturulan polimerik malzemelerdir (Ertürk ve Mattiasson, 2014). Kriyojeller, serbest radikal polimerizasyonu, iradyasyon (gama ışınları, elektron demeti, UV radyasyon), kendiliğinden jel oluşumu, kriyo-koşullarda polikondenzasyon reaksiyonu, enzimatik kataliz, metal-polimer koordine bağlar ya da iyonik etkileşimler gibi çeşitli kriyotopik jelleşme teknikleri ile üretilebilir (Baimenov vd., 2020). Dondurma-eritme yöntemi ile üretilen bu üç boyutlu esnek hidrojelatin oluşumu için uygulanan işleme "kriyojelasyon" denir. Kriyojelasyon polimer/monomer/çapraz bağlayıcı ve çözücünün (bağlı çözücü ve serbest çözücü) bulunduğu öncül çözeltinin hazırlanması ile başlatılır (Wolfe vd., 2002). Bağlı çözücü çözünen molekülleri ile güçlü bir etkileşim içerisindedir, bu sayede kriyoderişmenin gerçekleşmesini sağlar. Kriyoderişme yüksek derişimdeki çözünen moleküllerinin minimum miktarda çözücü ile donmamış sıvı mikrofazı oluşturmasıdır. Kriyoderişme polimerizasyon sürecini hızlandırır, donma sonucu önce çözücü kristalleri oluşmaya başlar, donmuş ve donmamış olmak üzere iki faz meydana gelir (Kumar vd., 2010). İyi bir kriyojelasyonda önce çözücü kristallerinin yani donmuş fazın oluşmaya başlaması gerekir. Donmamış faz içerisinde çapraz bağlanma, polimerizasyon/jelleşme gerçekleşir. Bu sırada serbest çözücü molekülleri ise hızlıca donar ve içten bağlı gözenekler oluşturmak üzere birleşerek büyürler. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra uygulanan eritme işlemi ile çözücü kristalleri eritilir ve ortaya "kriyojel" adı verilen birbirine içten bağlı makrogözeneklere sahip olan polimerik bir yapı ortaya çıkar (Shiekh vd., 2021).

Genel olarak kriyojelleşme işlemi şu aşamaları içerir (Memic vd., 2019);

- 1- Buz-kristal oluşumu ile faz ayrımı
- 2- Buz kristalleri arasındaki donmamış fazda konsantre olmuş reaktif türlerin çapraz bağlanması/polimerizasyonu
- 3- Buz kristallerinin açık ve içten bağlı gözenekli polimer ortaya çıkarmak üzere eritilmesi.

Bu adımlar Resim 1.5'te özetlenmiştir.



Resim 1.5. Kriyojel oluşum aşamaları (Ingavle vd., 2018).

Kriyojeller 40-50 yıllık bir teknoloji olmakla birlikte günümüzde biyomedikal ve endüstriyel alanda yaygın kullanım bulmakta ve birbirine içten bağlı gözenekli yapı iskelelerinin geliştirilmesinde yeni bir yaklaşım ortaya koymaktadır. Kullanılacakları uygulamanın gereksinimlerini karşılamak üzere, sentez sırasında ya da sonrasında kriyojellerin fiziksel, kimyasal, mekanik ve biyolojik özelliklerinde değişiklik, modifikasyon, optimizasyon yapılabilmektedir (Shiekh vd., 2021). Monomer türü, reaksiyon süresi, sıcaklık ve öncül moleküllerin oranları değiştirilerek kriyojel özellikleri kontrol edilebilir ve çok çeşitli kriyojel sentezlenebilir. Kullanılacak uygulamaya göre kriyojeller monolitler, çubuklar, levhalar, diskler, küresel partiküller formunda üretilebilirler. Resim 1.6'da farklı şekillerde üretilen kriyojel formları yer almaktadır.



Resim 1.6. Agaroz-alginat kriyojelin farklı formlardaki dijital görüntüleri (soldan sağa sırasıyla, levha, disk, monolit ve boncuk) (Tripathi ve Kumar, 2011).

Geleneksel kromatografik ortamların daha az uygun olduğu ve uygulamanın getirdiği gereksinimleri karşılayamadıkları durumlarda, biyo-ayırma işlemleri için kriyojeller tercih edilebilirler. Yüksek gözeneklilik, yüksek mekanik ve kimyasal kararlılık

kriyojelleri biyomoleküllerin immobilizasyonu için uygun kılar ve bu şekilde çeşitli moleküllerin ayrılması ve saflaştırılmasında onları daha cazip hale getirir (Ertürk ve Mattiasson, 2014).

Kriyojeller tıp, biyoloji, hücre/doku mühendisliği, gıda teknolojisi, çevre gibi birçok alanda uygulama bulmaktadır.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Seetharam vd. (2003) çalışmasında kimyasal olarak modifiye edilmiş sodyum alümino silikat (NaA), kalsiyum alüminosilikat (CaA) ve silika jel üzerine immobilize edilmiş tirozinaz tarafından fenol giderimi araştırılmıştır. Immobilize tirozinazın fenolü dönüştürmesi oranı başlangıç fenol derişimine bağı olarak ~ %15 ile % 60 arasında değışmektedir. NaA ve CaA üzerine immobilize tirozinaz performansında değışiklik olmaksızın tekrar tekrar kullanılabilmiştir. Ancak, pH 8'deki çalışmalarda anlamlı bir şekilde enzim inhibisyonu gerçekleşmesi sonucu fenol giderimi bir platoya ulaşmıştır. Bu inhibisyon geri dönüştürölür olup immobilize enzimi taze substrat çözeltisine koyunca aktivite geri gelmektedir. pH 8'den pH 6.8'e düşürüldüğünde fenol derişimi artmış, enzim inhibisyonu ise azalmıştır.

Peniche vd. (2005) çalışmasında yağda-su sisteminde süspansiyon-çapraz bağlama tekniğı kullanılarak süperparamanyetik kitosan mikrokürelerin hazırlanması çalışılmış ve mikroküreler karakterize edilmiştir. Örnek olarak mikrokürelere tirozinaz immobilize edilmiş ve fenolik bileşik giderimi için kullanılabilirliğı test edilmiştir. Immobilize enzim aktivitesinin % 70'ini korumuştur. On kez kullanımdan sonra enzim fenol oksidasyon aktivitesinin %65'ini korumuştur.

Babac vd. (2006) tarafından yapılan çalışmada poliakrilamid-allil glisidil eter kriyojel yığın polimerizasyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Kriyojel 10-100 µm büyüklüğünde birbirine bağı gözeneklerden oluşan sürekli bir polimerik matriks oluşturmuş ve konkanavalin A (Con A) ile modifiye edilmiştir. Bu kriyojel IgG adsorbsiyonu için kullanılmıştır. İnsan plazmasından IgG saflaştırmada kullanılmış ve IgG adsorbsiyonunda gözle görölür bir kayıp olmadan 10 kez kullanılmıştır.

Demiryas vd. (2007) tarafından boya-afinite kromatografisinde yeni bir durgun faz olarak poli(akrilamid-allil glisidil eter) kriyojelin kullanımı test edilmiştir. Yığın polimerizasyonu ile bir cam balon içinde kriyo-polimerizasyon ile hazırlanan sisteme Cibacron Blue F3GA immobilize edilmiştir. Kriyojelin karakterizasyonu yapılmış ve insan serum albuminin sulu çözeltilerinden adsorpsiyonu /desorpsiyonu araştırılmıştır.

Yao vd. (2007) tarafından yapılan çalışmada akrilamidin radikal kriyokopolimerizasyonu ile hazırlanan gömülü Fe₃O₄ taşıyan poliakrilamid temelli kriyojel yataklarının üretimi ve karakterizasyonu çalışılmıştır. Sığır serum albümini (BSA) model protein olarak kullanılmış ve sentezlenen kriyojelin adsorpsiyon davranışının Langmuir modeline uyduğu saptanmıştır. Farklı hazırlama yöntemleri kullanılarak BSA adsorpsiyon izotermi elde edilmiş ve maksimum adsorpsiyonu sağlayan parametrelerin (işlem koşullarının) kriyojelin kromatografik performansı üzerine etkileri araştırılmıştır. BSA'nın kriyojel içerisindeki ilerleyişi farklı akış hızlarında takip edilmiş, çözelti akış hızının ve gözenek yapısının adsorpsiyon üzerindeki etkili olduğu belirlenmiştir.

Aytar ve Bakir (2008) tarafından yapılan bir çalışmada amonyum sülfat (çöktürücü) ve glutaraldehit (çapraz bağlayıcı) kullanılarak, tirozinaz ile çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA: cross linked enzyme aggregates) oluşturulmuştur. CLEA aktivitesi üzerine çöktürücü ve çapraz bağlayıcı derişimlerinin etkileri incelenmiştir. Yüzde 60'lık amonyum sülfat, %2'lik glutaraldehit kullanılarak pH 7.0'de 3 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırılarak oluşturulan CLEA'ların %100 aktivite geri kazanımı ile üretildiği belirlenmiştir. Serbest enzim ve CLEA'ların optimum pH, optimum sıcaklıkları ve V_{max} değerlerinde dikkate değer bir fark görülmezken, immobilize enzimin substratına karşı ilgisinin yüksek olduğu belirlenmiştir.

Wang vd. (2008) çalışmasında, poliakrilamid kriyojel yataklar 16 mm iç çaplı cam kolonlarda hazırlanmış iminodiasetik asit (IDA) ile eşleştirilmiştir. Kriyojellere Zn²⁺ ve Ni²⁺ yüklenerek özellikleri incelenmiştir. Farklı akış hızı, çözelti pH'sı ve hareketli fazın farklı birleşenlerinin BSA proteininin bu kolonlardaki bağlanma kapasitesine etkisi incelenmiştir. BSA'nın izoelektrik noktası etrafında en çok bağlanmadığı ve imidazol çözeltisi ile en etkin kolondan sökölme gerçekleştiği ayrıca elüsyon işlemine düşük akış hızının katkıda bulunduğu saptanmıştır.

Marin-Zamora vd. (2009) *Agaricus bisporus* mantarından tirozinaz enzimini ekstrakte ederek çapraz bağlı D-sorbitol heksasinnamat ile kaplanmış cam kürelere immobilize etmişlerdir. Immobilize tirozinaz enzimi 4-tert-butil-fenol, 4-metil-fenol, 4-metoksi-fenol, *p*-hidroksifenilpropiyonik asit ve *p*-hidroksifenilasetik asit monofenollerinden *o*-difenollerinin elde edildiği reaksiyonlarda katalizör olarak kullanılmıştır ve reaksiyon verimlerinin %88-96 civarında olduğu hesaplanmıştır.

Dinçer vd. (2012) tirozinaz enzimini kitosan-kil kompozit kürelere immobilize etmişlerdir. İmmobilizasyon veriminin %67 olduğu rapor edilmiştir. Serbest ve immobilize tirozinazın L-katekol substratı ile optimum pH'ları 7.0, optimum sıcaklıkları ise 25°C olarak belirlenmiştir. Serbest ve immobilize enzim -18°C'de depolandığında 30 gün sonunda serbest enzim aktivitesinin %37'sini kaybetmiş, immobilize enzimin aktivitesinde ise dikkate değer bir kayıp görülmemiştir. İmmobilize tirozinaz enzimi birinci kullanımda %100, dördüncü kullanımda %74, yedinci kullanımda ise %43 fenol giderme başarısı sağlamıştır.

Tüzmen vd. (2012) çalışmasında akrilamid (AAm) ve allil glisidil eter (AGE)'in radikal polimerizasyonu ile kriyojel hazırlanmıştır. Cibacron Blue F3GA bu kriyojele kovalent olarak bağlanmıştır ve daha sonra Fe³⁺ iyonları ile şelatlanmıştır. Bu kriyojel adsorpsiyon çalışmalarında kullanılmak üzere pH, başlangıç protein derişimi, akış hızı, sıcaklık ve iyonik şiddet açısından katalaz aktivitesine etkisi incelenmiştir. İmmobilize katalazın K_m değeri serbest enziminkinden düşük, maksimum hızı ise (V_{max}) yüksek bulunmuştur. Enzim çalışmasında kriyojel üstünde tekrarlı olarak adsorbe ve desorbe edilebildiği de saptanmıştır.

Bayramoğlu vd. (2013) çalışmasında asit ve plazma ile muamele edilmiş diatom-biyosilika partikülleri 3-aminopropiltrietoksisilan (APTES) ile muamele edilip glutaraldehit ile aktive edildikten sonra üzerine enzim immobilize edilmiştir. Serbest ve immobilize enzimlerin optimum pH'ları 7.0, optimum sıcaklıkları ise sırasıyla 35°C ve 45°C olarak tespit edilmiştir. İmmobilize tirozinaz on kez kullanıldıktan sonra orijinal aktivitesini %74 olarak korumuştur. Depolama kararlılığı ise 8 haftalık saklama sonrası, başlangıç aktivitesinin %67'sini korumak suretiyle çok iyi bir sonuç olarak yorumlanmıştır.

Donato vd. (2014) çalışmasında bir polimerik membran üzerine immobilize edilen tirozinazın L-Dopa üretimi için kinetik özellikleri araştırılmıştır. Bir karıştırma tank reaktöründeki enzimin kinetik davranışları karşılaştırılmıştır. Michaelis-Menten sabitleri immobilize tirozinazın substrat için daha yüksek afinite gösterdiğini belirlemiştir. (İmmobilize ve serbest enzimler için K_m sırasıyla 1.56 mM ve 2.10 mM olarak ölçülmüştür). pH, termal, depolama ve operasyonel kararlılıklar açısından immobilize enzimin daha üstün olduğunu göstermiştir. Serbest veya immobilize enzim için, pH 7.0 ve 35°C en uygun pH ve sıcaklık olarak ölçülmüştür. Sonuçlar, immobilize tirozinazın farklı endüstriyel süreçlerde kullanılabileceğini göstermiştir.

Saini vd. (2015) çalışmasında melanin nanopartiküllerin (Mel-NPs) sentezi için yeşil kimyasal yol gösterilmiştir. Bunun için poliakrilamid-ko-allil glisidil eterden oluşan monolitik kolon sentezlenerek tirozinaz enziminin immobilizasyonu için modifiye edilmiştir. Tirozinaz immobilizasyonu iki basamakta mümkün olmuştur. Birinci basamakta monolitın yüzeyindeki epoksi grupları önce etilendiamin sonra glutaraldehit ile bağlanmıştır. İkinci basamakta aldehit ile fonksiyonelleştirilen monolit kolon enzim çözeltisi ile muamele edilerek Schiff bazı oluşumu aracılığı ile kovalent bağ oluşturmuştur. Oluşturulan kriyojel ve immobilize enzim süresinin parametreleri incelenir ve sentezlenen Mel-NP lerin antioksidan formulasyonlarında, biyosensörlerde ve ilgili alanlarda kullanım bulabileceği yorumu yapılmıştır.

Abdollahi vd. (2018) siyanurik klorür ile fonksiyonelleştirilmiş Fe₃O₄ manyetik nanopartiküllere tirozinaz enzimini %69 verim ile kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Immobilize enzim atık sulardan fenol giderimi için kullanmıştır. Gerçek atık suda %78 oranında giderim sağlayan nanopartiküllerin etkili ve tekrar kullanılabilir oldukları rapor edilmiştir.

Lasmi vd. (2018) tirozinaz enzimini gözenekli silikon yüzeyine N-etil-N'-(3(dimetilamino)propil) karbodiimid (EDC) ve N-hidroksisüksinimid (NHS) kullanarak enzimin lizin amino asitlerinin amino grupları üzerinden immobilize etmişlerdir. Destek materyali SEM ve FTIR teknikleri ile karakterize edilmiştir. Immobilize tirozinaz aktivitesi pirokatekolün enzimatik oksidasyonu sonucu oluşan kinonların 3-metil-2-benzotiyazolinon hidrazon (MBTH) ile oluşturduğu azo boyar maddelerin spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile belirlenmiştir. Üretilen bu pirokatekol biyosensörünün doğrusal aralığının 1-100 µM, tayin sınırının ise 0.43 µM olduğu saptanmıştır.

Liu vd. (2018) çalışmasında nonkovalent ve kovalent bağlanma yöntemlerinin dezavantajlarını ortadan kaldırmak için fiziksel adsorbsiyon ile kovalent çapraz bağlama yöntemleri birleştirilmiştir. Tirozinaz önce aminli manyetik nanopartiküllere elektrostatik çekim ile immobilize edilmiş sonra glutaraldehite çapraz bağlanmıştır. Immobilize tirozinazın pH ve sıcaklığa dayanıklılığı artmış, optimum pH'ı 7.0; sıcaklığı ise 35°C olarak tespit edilmiştir. Beş kez kullanıldıktan sonra başlangıç aktivitesinin %61.4 ünü korumuştur. +4°C'de depolama kararlılığı 30 gün sonra %73.2 olarak tespit edilmiştir. Immobilize tirozinazın substratlarına daha yüksek biyolojik afinite gösterdiği gözlenmiştir.

Wen vd. (2020) tarafından yapılan bir biyosensör çalışmasında, iki boyutlu bimetalik metal organik çerçeve nanotabakalar (NiZn-MOF NSs) sentezlenmiş ve bu nano tabakalara tirozinaz enzimi immobilize edilmiştir. Camsı karbon elektrot yüzeyi bu malzeme ile modifiye edilmiş, kitosan kullanılarak daha dayanıklı bir kompozit film üretilmiştir. Bu matriks özellikle yüzeyinde bulunan –COOH grupları sayesinde tirozinaz enziminin kimyasal ya da elektrostatik olarak immobilize edilmesini sağlamıştır. Sentezlenen bu materyal fenol tayini için kullanılmış; tayin sınırı 6.5 nM, duyarlılığı 159.3 μM^{-1} olarak rapor edilmiştir.

Zdarta vd. (2020) tarafından yapılan çalışmada polikaprolakton-kitosan kompozit materyali bir elektrospin yöntemi kullanılarak üretimi ve tirozinaz immobilizasyonu için destek maddesi olarak kullanımı anlatılmaktadır. Bu immobilizasyon çeşitli iyonik etkileşimler ve hidrojen bağı oluşumu ile yapılmıştır. SEM görüntüleri alınarak fiberlerin ve enzim deposizyonu morfolojisi incelenmiş ve deneysel verilerin modellerini ve immobilizasyon işleminin optimum koşullarının belirlenmesi için çok değişkenli polinomial regresyon istatistiği kullanmıştır. Optimum koşullar pH 7, sıcaklık 25°C ve işlem süresi 16 saat olarak saptanmıştır. Bu koşullarda immobilizasyon verimi % 93 ve tayin edilen aktivite % 95 olarak saptanmıştır. Sentezlenen sistemin bisfenolün biyodegradasyonunda kullanılabilirliği deneyleri sonucunda 120 dakika sonunda 15-45°C sıcaklık ve 6-9 pH aralığında Bisfenol A'nın %80'den fazlasının giderildiği saptanmıştır. Sistem on kullanımdan sonra bile Bisfenol A'nın %80'ini giderilebilmiştir.

Wei vd. (2022) tarafından yapılan bir çalışmada, *Agaricus bisporus* mantarından elde edilen ham tirozinaz çözeltisi kullanılarak zeolitik imidazolat metal organik çerçevelere (ZIF-8) tirozinaz enzimi immobilize edilmiş ve bu enzim-bağlı bu çerçeveler alginat ile enkapsüle edilmiş ve boncuklar elde edilmiştir. İmmobilize tirozinazı kullanarak farmakolojik açıdan yararları olan katekol temelli L-DOPA, piceatannol ve 3'-hidroksi pterostilben bileşiklerini sırasıyla saatte 0.14, 1.38 ve 1.46 gL^{-1} derişiminde sentezleyebilmişlerdir. Ayrıca immobilize tirozinaz enzimini fenol, *p*-krezol ve *p*-klorofenol gideriminde kullanmışlar ve 2.5 saatte tamamen giderim sağlamışlardır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Cihazlar

Deneyleerde, Beko buzdolabı (970464MBNF), Kern (ABJ220-4NM) marka analitik terazi, Memmert (Beschicung-Loading Model 100-800) etüv, Sigma (3-30 KS) soğutmalı santrifüj cihazı, Hanna (pH 211) pHmetre, Shimadzu (UV-1900i) UV-Vis spektrofotometre, Perkin Elmer (Spectrum Two) ATR-FTIR, Velp (Multistirrer 15) çoklu manyetik karıştırıcı, Ultrasonic (LC30) ultrasonik banyo, GFL (2001/4) saf su cihazı, Isolab (CAPP) otomatik pipetler, LongerPump (BT100-1L) peristaltik pompa, Wisebath su banyosu ve Heidolph Reax Top vorteks kullanıldı.

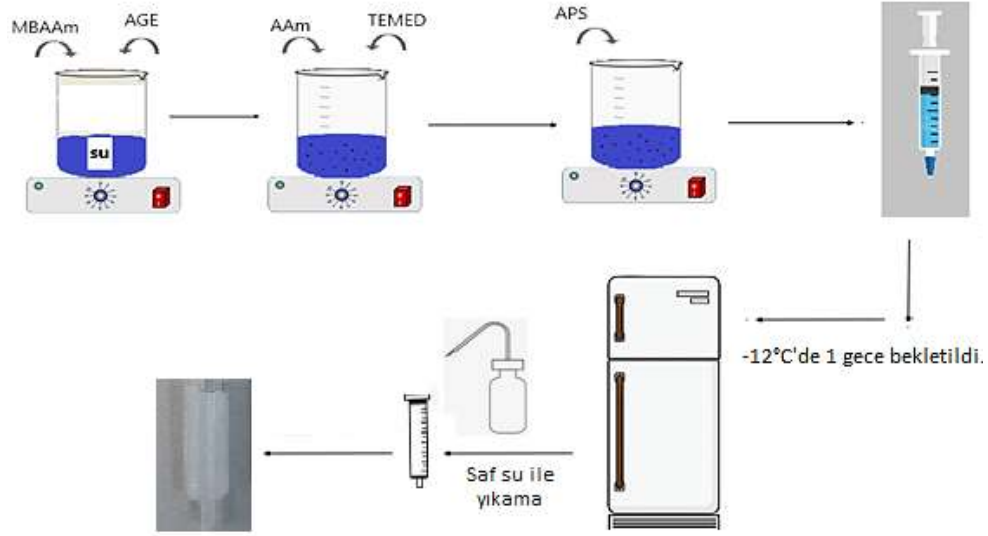
3.2. Kimyasallar

Agaricus bisporus kaynaklı ticari tirozinaz enzimi (T3824), akrilamid (AAM), N,N'-metilenbisakrilamid (MBAAM), allil glisidil eter (AGE), amonyum persülfat (APS), N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED), sodyum hidroksit, L-tirozin, L-katekol, sülfirik asit, sığır serum albümini (BSA), Bradford reaktifi, fenol, Bisfenol A ve 4-aminoantipirin (4-AAP) Sigma (Steinheim, Almanya)'dan; KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , *p*-klorofenol ve *p*-aminofenol Central Drug House (CDH, New Delhi, Hindistan)'dan, sodyum sülfat ve amonyum sülfat Carlo Erba (Ronado, İtalya)'dan, NaHCO_3 Riedel-de Haen (Seelze, Almanya)'dan $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ise Boston USA Chemistry (Massachusetts, ABD)'den temin edildi.

3.3.Yöntem

3.3.1. Poliakrilamid-Allil Glisidil Eter Kriyojellerin Hazırlanması

Poliakrilamid-allil glisidil eter (AAM-AGE) kriyojellerin hazırlanması için monomer olarak kullanılan akrilamid (0.954 g) 5.0 mL saf suda ve çapraz bağlayıcı olarak kullanılan N,N'-metilenbisakrilamid (0.266 g) 10.0 mL saf suda çözüldü. Allil glisidil eterin 0.358 mL'si ayrı bir beherde 5.0 mL saf suda çözüldü. Üç çözelti de buz banyosu kullanılarak +4°C'ye soğutuldu. Soğuyan çözeltiler birbiri ile karıştırıldı. Manyetik karıştırıcı ile sürekli karışır durumda bulunan bu çözeltiye, serbest radikal polimerizasyonunu başlatmak amacıyla önce 20 mg amonyum persülfat (APS), daha sonra reaksiyonu hızlandırmak için katalizör olarak 25 µL N,N,N',N'-tetrametiletildiamin eklendi (Ingavle vd., 2015). Çözelti manyetik karıştırıcıda 500 rpm hızda 20 saniye karıştırıldıktan sonra içerisinden 3.0'er mL alınarak 5.0 mL'lik plastik enjektörlere (5.0 mL hacimli, 0.8 cm çapında) hızlıca aktarıldı. Polimerleşmenin tamamlanması için enjektör içerisindeki polimerizasyon çözeltileri dondurucuda -12°C'de 24 saat bekletildi. Bu süre sonunda kriyojellerin içerdiği buz kristallerini eritmek ve kriyojelleri polimerizasyona katılmayan maddelerden arındırmak için kriyojeller enjektörden çıkarılmadan içinden geçirilmek suretiyle oda sıcaklığındaki yaklaşık 200 mL saf su ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra kriyojeller kullanılıncaya kadar +4°C de saklandı. Kriyojel hazırlama süreci Resim 3.1'de şematize edilmiştir.



Resim 3.1. AAm-AGE kriyojelin üretim şeması (MBAAm: N,N'-metilenbisakrilamid, AGE: allil glisidil eter, AAm: akrilamid, APS: amonyum persülfat, TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletildiamin)

3.3.2. Poliakrilamid-Allil Glisidil Eter Kriyojellerin Karakterizasyonu

Allil glisidil eterin (AGE), akrilamid temelli kriyojelin yapısına katıldığı ATR-FTIR spektrumunun alınması suretiyle kanıtlandı. Bu analiz için ADÜ Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda bulunan ATR-FTIR spektrometresi (Perkin-Elmer Spectrum Two) kullanıldı. Ölçümler için AGE içeren ve içermeyen kriyojeller Bölüm 3.3.1'de anlatıldığı şekilde üretildi. Kriyojeller etüvde 40°C'de kurutuldu ve ezilerek toz hale getirildi. Toz hale getirilen kriyojeller, ATR-FTIR spektrometresine yerleştirildi ve spektrumları alındı.

Üretilen kriyojellerin yüzey morfolojisi ve gözenekliliği hakkında bilgi edinmek için taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve elementel içeriğinin belirlenmesi için enerji dağılımlı X-ışını analiz (EDX) tekniklerinden yararlanılmıştır. Kurutulan kriyojellerin SEM-EDX analizleri ZEISS EVO LS10 marka taramalı elektron mikroskobu kullanılarak yapılmıştır. Selçuk Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir.

3.3.3. Şişme Analizi

AAM-AGE kriyojelin suda şişme özelliğinin incelenmesi için şişmiş kriyojel önce +40°C de 48 saat boyunca kurutuldu ve kuru kriyojelin kütlesi not edildi. Daha sonra kuru kriyojel saf su içerisinde şişmeye bırakıldı. On dakikalık ölçüm süreci boyunca (kriyojelin adsorpladığı su miktarının sabit değere ulaştığı süre) birer dakika aralıklarla su içerisinde çıkarıldı ve tartıldı.

Şişme Derecesi $S = [(m_{\text{şişmişkriyojel}} - m_{\text{kurukriyojel}}) / m_{\text{kurukriyojel}}]$ eşitliğinden hesaplandı.

3.3.4. AAM-AGE Kriyojellere Tirozinaz Enziminin İmmobilizasyonu

Tirozinaz enzimi, AAM-AGE kriyojellere, AGE'nin epoksi grupları ile enzimin –NH₂, –COOH, –SH gibi fonksiyonel grupları arasında gerçekleşebilecek kovalent bağlardan yararlanılarak immobilize edildi. Poliakrilamid-allil glisidil eter temelli kriyojeller peristaltik pompa kullanılarak 50 mM pH 7.0 fosfat tampon çözeltisi ile 2 saat yıkanarak dengelendi. Ticari olarak satın alınan *Agaricus bisporus* mantarı kaynaklı tirozinaz enzimi derişimi 1.0 mg/mL olacak şekilde 50 mM pH 7.0 fosfat tamponunda çözüldü. Enzim çözeltisi derişimi 0.25 mg/mL olacak şekilde 50 mM pH 7.0 fosfat tampon çözeltisi ile seyreltildi ve bu çözeltinin 3.0 mL'si kriyojelden 24 saat boyunca peristaltik pompa yardımıyla geçirildi. Kriyojelden geçmeden önce ve kriyojelden geçtikten sonra enzim çözeltilerindeki protein miktarları Bradford yöntemi ile belirlenerek kriyojele immobilize edilen tirozinaz miktarı hesaplandı.

3.4. Protein Tayini

Çalışma boyunca protein miktar tayini Bradford Yöntemi kullanılarak yapıldı (Bradford, 1976). Bu yöntemde, negatif yükü olan ve proteindeki (+) yüklü gruplara bağlanan bir boya olan Coomassie Brilliant Blue G-250 kullanılmaktadır. Boya, kırmızı ($A_{\text{max}} = 465 \text{ nm}$) ve mavi ($A_{\text{max}} = 595 \text{ nm}$) formlarda bulunur. Kırmızı form çözeltideki haldir, proteine bağlanınca mavi renk oluşur. Reaksiyon oldukça tekrarlanabilir ve hızlıdır.

İki dakika içinde renk oluşur ve bir saat kadar stabil kalır. SDS ve Triton X-100 gibi deterjanların reaksiyonu bozması yöntemin dezavantajıdır. Bradford Yöntemi ile sığır serum albumini (BSA) çalışma grafiği hazırlamak üzere 0.05-0.3 mg/mL derişim aralığında BSA çözeltileri hazırlandı. Her bir BSA çözeltisinden 50 µL alınarak 1.5 mL Bradford çözeltisi ile karıştırıldı ve karışımların absorbansı 595 nm’de ölçüldü.

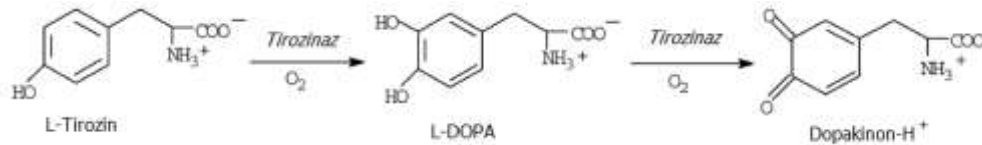
Kriyojele bağlanan tirozinaz miktarı aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

$$Q = [(C_0 - C) V] / m$$

Bu eşitlikte Q, bir gram kriyojel başına bağlanan tirozinaz kütlesini (mg/g); C₀ ve C sırası ile tirozinaz çözeltilerinin kriyojel ile etkileştirilmeden önceki ve sonraki derişimlerini (mg/mL); V, kriyojelden geçirilen enzim çözeltisi hacmini (mL) ve m, deneyde kullanılan kuru kriyojelin kütlesini (g) temsil etmektedir.

3.5. Serbest ve İmmobilize Tirozinaz Enzimlerinin Optimum pH’larının L-Tirozin Substratı ile Belirlenmesi

Tez önerisinde belirtildiği üzere tirozinaz enziminin aktivitesi öncelikle L-tirozin substratı kullanılarak ölçüldü. Bu ölçümler için L-tirozinin dopakinona dönüşümü 280 nm’de 10 dakika boyunca takip edildi (Peniche vd., 2005). Bu reaksiyonun kimyasal denklemi Şekil 3.1’de görülmektedir.



Şekil 3.1. L-tirozin substratının tirozinaz enzimi tarafından katalizlenen oksidasyon reaksiyonu (Seo vd., 2003).

Bu amaçla başlangıçta hazırlanan 1.0 mg/mL’lik tirozinaz enzimi çözeltisi 0.5 mg/mL’ye saf su ile seyreltildi. Analiz için enzim ve substrat çözeltileri 0.1 M pH 4.0-5.0 asetat, pH 6.0, 7.0 ve 8.0 fosfat ve pH 9.0 karbonat tampon çözeltileri kullanılarak hazırlandı ve aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Serbest tirozinaz enziminin L-tirozin substratı ile pH 7.0’de maksimum aktivite gösterdiği saptandı.

İmmobilize tirozinazın optimum pH'sının belirlenmesi için ise tirozinaz immobilize edilmiş üç ayrı kriyojel 5.0'er mL 0.1 M pH 6.0, pH 7.0, pH 8.0 fosfat tamponu çözeltileri ile 30 dakika yıkandı ve dengelendi. Bu pH'lardaki tampon çözeltiler ile 1.0 mM L-tirozin çözeltileri hazırlandı. Kriyojellerden 5.0 mL'lik tirozin çözeltileri 15 dakika boyunca peristaltik pompa yardımıyla geçirildi ve bu süre sonunda toplanan ürün çözeltilerinin absorbanları UV-Vis spektrofotometrede 280 nm'de okundu.

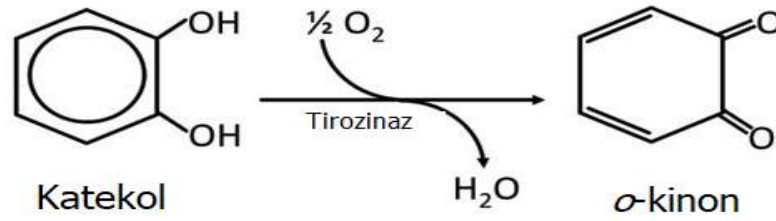
Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, kriyojele bağlanan tirozinaz enziminin L-tirozin substratı ile oluşturduğu ürünün kriyojele tutunduğu, kriyojelden temizlenemediği bu nedenle de substratın enzime ulaşabilirliğini kısıtladığı; bu nedenle kriyojelden tekrar substrat çözeltisi geçirildiğinde aktivite görülmemesine neden olduğu düşünüldü. Bu durum kriyojelin tekrar kullanılabilirliği açısından sorun teşkil edeceği için substratın değiştirilmesine karar verildi ve L-katekol substratı ile tirozinaz aktivitesi deneylerine başlandı. Tirozinaz enziminin L-tirozin substratı ile oluşturduğu ürün sonucu temizlenemeyen kriyojel Resim 3.2'de görülmektedir.



Resim 3.2. Tirozinaz enzimi bağlı, tirozin substratı geçirilmiş ve temizlenemeyen kriyojel

3.6. Serbest ve İmmobilize Tirozinaz Enzimlerinin Optimum pH'larının L-Katekol Substratı ile Belirlenmesi

Serbest ve immobilize tirozinazın aktivitelerine pH etkisinin incelenmesi amacıyla 0.1 mg/mL derişiminde tirozinaz çözeltisi ve 1.0 mM derişiminde L-katekol çözeltileri farklı pH'lardaki (pH 4.0-5.0-6.0-7.0-8.0-9.0) 50 mM tampon çözeltiler kullanılarak hazırlandı. L-katekolün oksidasyonu 25°C'de, 420 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri ile belirlendi (Aytar ve Bakir, 2008). Bir ünite tirozinaz aktivitesi (U) reaksiyon koşullarında dakikada bir mikromol ürün ($\epsilon_{420} = 3450 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) oluşturan enzim miktarı olarak belirlendi. L-katekol substratının tirozinaz enzimi tarafından katalizlenen oksidasyon reaksiyonu Şekil 3.2'de görülmektedir (Ba ve Kumar, 2017).



Şekil 3.2. L-katekol substratının tirozinaz enzimi tarafından katalizlenen oksidasyon reaksiyonu

Serbest tirozinaz aktivitesini ölçmek amacıyla 1.49 mL 1.0 mM L-katekol çözeltisine 10 µL tirozinaz çözeltisi karıştırıldı ve kinetik modda 25°C sıcaklıkta 420 nm'de 2 dakika boyunca absorbans ölçümü yapıldı. İmmobilize tirozinaz aktivitesinin ölçümü için ise farklı pH'larda (pH 4.0-5.0-6.0-7.0-8.0-9.0) hazırlanan 2.0 mL'lik L-katekol çözeltileri 25°C'de 5 dakika boyunca tirozinaz bağlı kriyojellerden geçirildi ve bu süre sonunda kriyojellerden çıkan çözeltilerin absorbansları 420 nm'de UV-Vis spektrofotometrede ölçülerek kaydedildi.

3.7. Serbest ve İmmobilize Tirozinazın Optimum Sıcaklıklarının Belirlenmesi

Serbest tirozinaz enziminin aktivitesine sıcaklığın etkisinin incelenmesi için 50 mM pH 8.0 fosfat tamponunda 1.0 mM L-katekol çözeltileri hazırlandı. Serbest tirozinazın aktivitesi ölçülürken substrat çözeltileri (1.49 mL) çalışılacak sıcaklıkta (5-15-25-35-45-55-65°C) 5 dakika inkübe edildi. Daha sonra üzerine 10 µL enzim çözeltisi eklendi ve kinetik modda 420 nm’de 2 dakika boyunca enzim aktivitesi izlendi.

İmmobilize tirozinaz enziminin aktivitesine sıcaklığın etkisinin incelenmesi için ise 50 mM pH 6.0 fosfat tamponunda 1.0 mM L-katekol çözeltisi hazırlandı. Substrat çözeltileri (2.0 mL) çalışılacak sıcaklığa (5-15-25-35-45-55-65°C) gelene kadar su banyosunda bekletildi. Substrat çözeltileri su banyosundan çıkarılmadan 5 dakika boyunca tirozinaz bağlı kriyojellerden geçirildi. Bu süre sonunda elde edilen ürün çözeltilerinin 420 nm’deki absorbanları ölçüldü.

3.8. Serbest ve İmmobilize Tirozinaz Aktivitesine Substrat Derişiminin Etkisinin İncelenmesi

Serbest ve immobilize tirozinaz enziminin kinetik parametreleri farklı derişimlerde L-katekol substratı kullanılarak belirlenmiştir. Serbest enzim için 50 mM pH 8.0 fosfat tamponunda farklı derişimlerde (0.1-0.5-1.0-1.5-2.0-4.0-6.0-8.0-10.0 mM) substrat çözeltileri hazırlandı ve Bölüm 3.6’da anlatıldığı gibi aktivitesi ölçüldü.

İmmobilize tirozinaz enziminin kinetik parametrelerini belirlemek için ise 50 mM pH 6.0 fosfat tamponunda farklı derişimlerde (0.1-0.5-1.0- 1.5- 2.0- 4.0- 6.0- 8.0-10.0 mM) substrat çözeltileri hazırlandı ve Bölüm 3.6’da anlatıldığı gibi aktivitesi ölçüldü.

Serbest ve immobilize tirozinaz enzimlerinin Michaelis-Menten sabitleri (K_m) ve maksimum hızları (V_{max}) Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk eşitlikleri kullanılarak hesaplandı.

$$V = V_{max} [S] / K_m + [S] \text{ (Michaelis-Menten Eşitliği)}$$

$$1/v = [K_m/V_{max} [S]] + 1/V_{max} \text{ (Lineweaver-Burk Eşitliği)}$$

3.9. Serbest ve İmmobilize Tirozinaz Enzimlerinin Isıl Kararlılıklarının Belirlenmesi

Serbest ve immobilize tirozinaz enzimlerinin ısıl kararlılık deneyleri her iki enzimin optimum sıcaklıkları dikkate alınarak 45°C ve 25°C’de gerçekleştirildi. Serbest tirozinaz enziminin ısıl kararlılığının belirlenmesi amacıyla 50 mM pH 8.0 fosfat tamponunda 0.1 mg/mL derişiminde tirozinaz çözeltileri hazırlandı ve 360 dakika boyunca belirli zaman aralıklarında 1.0 mM L-katekol substratı kullanılarak enzim aktivitesi ölçüldü. İmmobilize tirozinazın ısıl kararlılığının belirlenmesi için ise tirozinaz bağı kriyojel su banyosunda inkübe edildi ve belirli zaman aralıklarında kriyojelden substrat çözeltileri geçirilerek aktivite ölçümleri yapıldı.

3.10. İmmobilize Tirozinaz Enzimin İşlemsel Kararlılığının Araştırılması

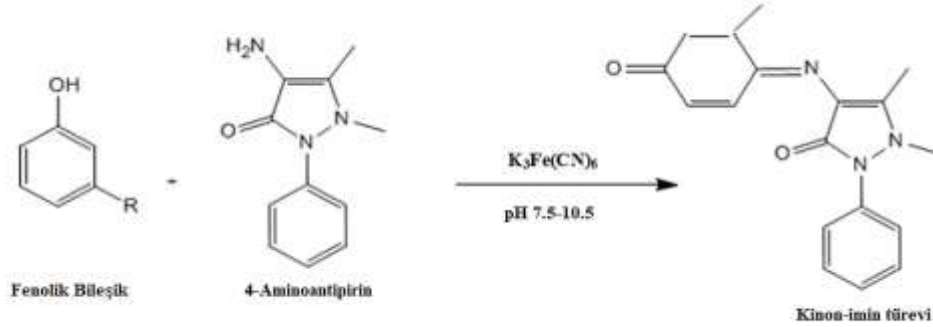
İmmobilize tirozinaz enziminin işlemsel kararlılığının, yani tekrar kullanılabilirliğinin, araştırılması amacıyla L-katekol substratı ile art arda aynı kriyojel kullanılarak aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Her aktivite ölçümünden sonra kriyojel 50 mM pH 6.0 fosfat tamponu ile 15 dakika yıkandı ve tekrar aktivite ölçümü yapıldı.

3.11. Serbest ve İmmobilize Tirozinazın Depo Kararlılığının İncelenmesi

Enzim immobilizasyonunda önemli faktörlerden biri de depo kararlılığı olup enzimin serbest ve immobilize halde aktivitesini uzun süre koruyup korumadığının karşılaştırılmasıdır. Bu amaçla, 50 mM pH 8.0 fosfat tamponunda hazırlanmış 0.1 mg/mL’lik serbest tirozinaz enzimleri ve tirozinaz bağı AAm-AGE kriyojeller 60 gün boyunca +4°C’de bekletildi ve uygun zaman aralıklarında L-katekol substratı kullanılarak aktiviteleri ölçüldü.

3.12. Serbest ve İmmobilize Tirozinazın Fenolik Bileşik Gideriminde Kullanılabilirliğinin İncelenmesi

İmmobilize tirozinazın fenolik bileşik giderme etkinliği model bileşikler olarak seçilen fenol, Bisfenol A, *p*-klorofenol ve *p*-aminofenol kullanılarak araştırıldı. Bu amaçla, tirozinaz bağlı kriyojellerden 90 dakika boyunca 5.0 mL 1.0 mM fenolik bileşik çözeltisi (50 mM fosfat tamponunda, pH 6.0'da) peristaltik pompa ile geçirildi. Başlangıç ve final fenolik bileşik miktarları 4-aminoantipirin (4-AAP) ve $K_3Fe(CN)_6$ kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlendi. Bu yöntemde, ortamda bulunan fenolik bileşik 4-AAP'nin primer amini ile reaksiyona girer ve potasyum ferrisiyanür ile oksitlenerek 510 nm dalga boyunda absorpsiyon yapan kırmızı renkli bir kinon oluşturur (Abdollahi vd., 2018). 4-aminoantipirin ile fenolik bileşikler arasında gerçekleşen reaksiyon Şekil 3.3'te görülmektedir.



Şekil 3.3. 4-aminoantipirin ile fenolik bileşikler arasında gerçekleşen reaksiyon (Fiamegos vd., 2002)

Bu amaçla, 0.1 mL 4-AAP çözeltisi (20 mM, 0.25 M $NaHCO_3$ 'de hazırlanmış) ve 0.1 mL potasyum ferrisiyanür çözeltisi (83.4 mM, 0.25 M $NaHCO_3$ 'de hazırlanmış), 0.8 mL fenolik bileşik çözeltisi (belirli sürelerde kriyojelden çıkan) ile karıştırıldı ve çözeltilerin absorbansları UV-Vis spektrofotometre ile 510 nm'de ölçüldü. Tüm çözeltiler taze olarak hazırlandı. Fenolik bileşik giderimi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

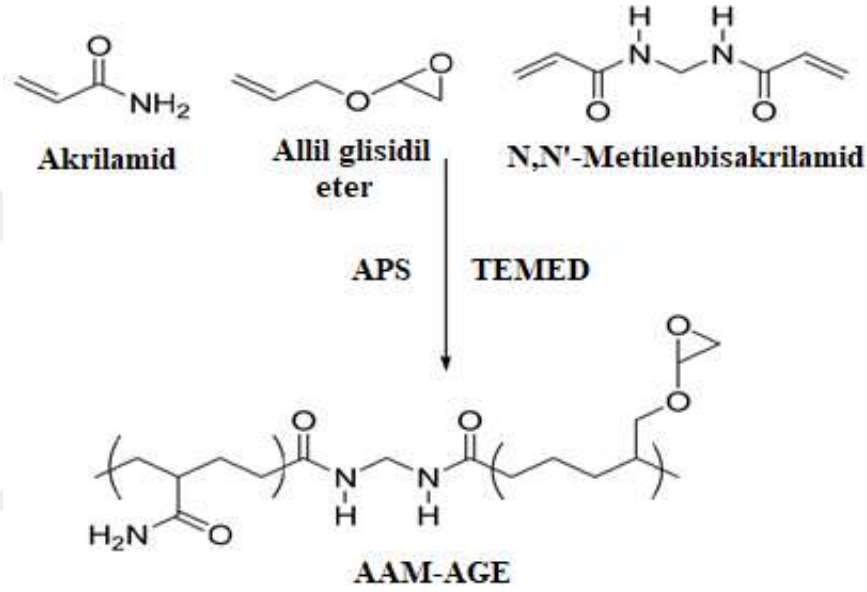
$$\text{Fenolik bileşik giderimi (\%)} = \frac{(P_i - P_r)}{P_i} \times 100$$

Bu eşitlikte P_i ve P_r , sırasıyla, çözeltilerin başlangıç ve son fenol derişimleridir.



4. BULGULAR

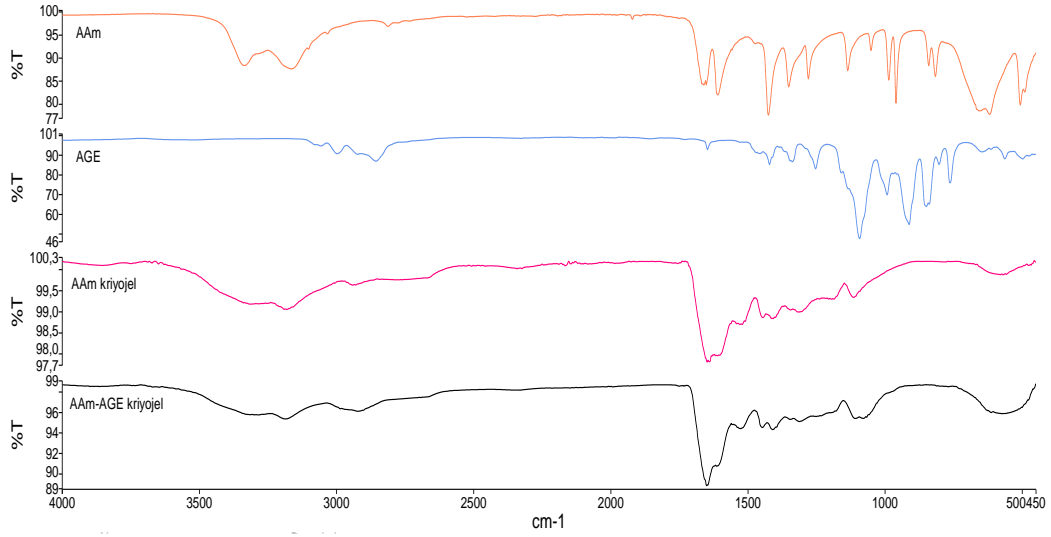
Bu çalışmada akrilamid, N,N'-metilenbisakrilamid ve allil glisidil eter arasında gerçekleşen serbest radikal polimerizasyonu (Şekil 4.1) ile AAm-AGE kriyojeller üretilmiştir.



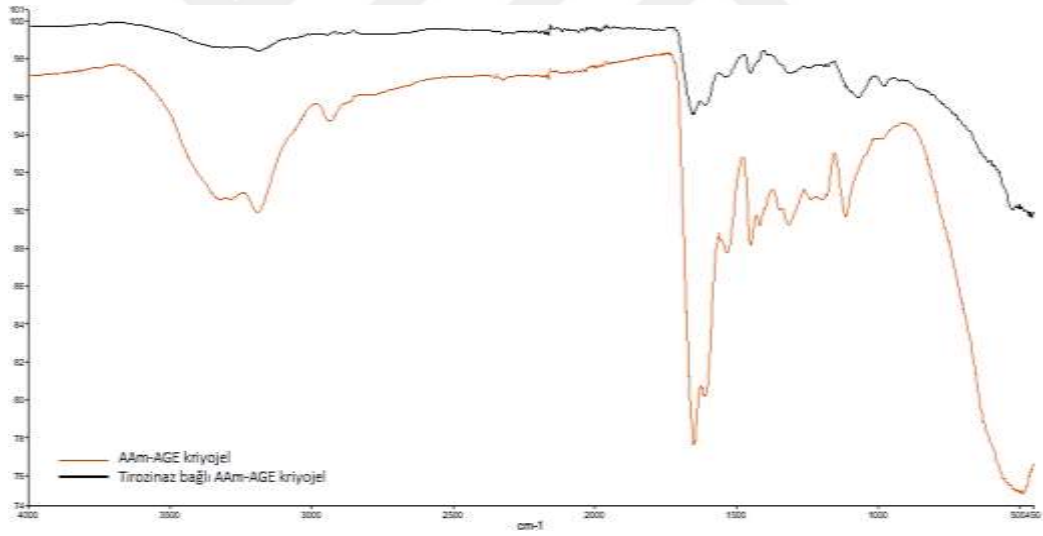
Şekil 4.1. Akrilamid ve allil glisidil eter arasında gerçekleşen reaksiyon (Johnson vd., 2012)

4.1. Kriyojellerin Karakterizasyonu

Akrilamid, allil glisidil eter (AGE), AGE içermeyen akrilamid kriyojel ve poliakrilamid-allil glisidil eter kriyojelin FTIR spektrumları Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Ayrıca poliakrilamid-allil glisidil eter kriyojelin (AAm-AGE kriyojel: turuncu) ve tirozinaz immobilize edilmiş poliakrilamid-allil glisidil eter kriyojelin (siyah) FTIR spektrumları Şekil 4.3'de gösterilmiştir.

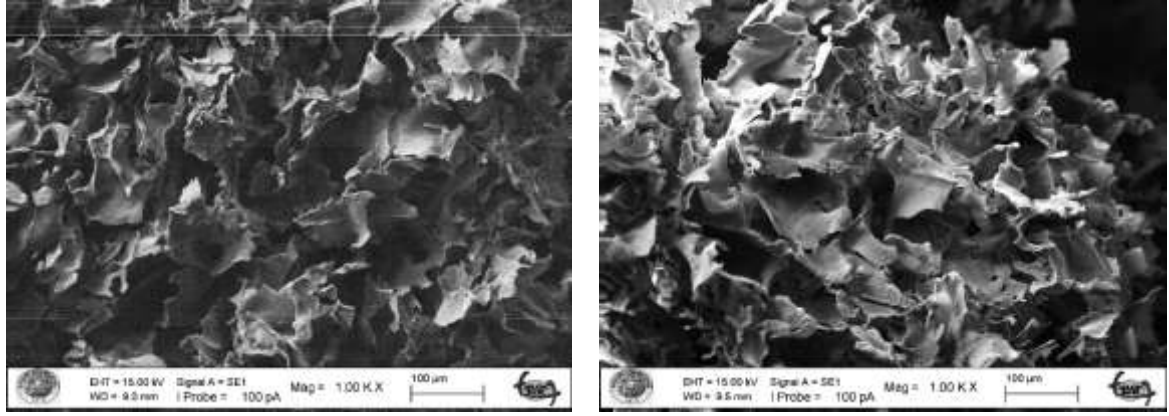


Şekil 4.2. Akrilamid (AAm), allil glisidil eter (AGE) ile akrilamid kriyojel (AAm kriyojel) ve poliakrilamid-allil glisidil eter kriyojelin (AAm-AGE kriyojel) FTIR spektrumları

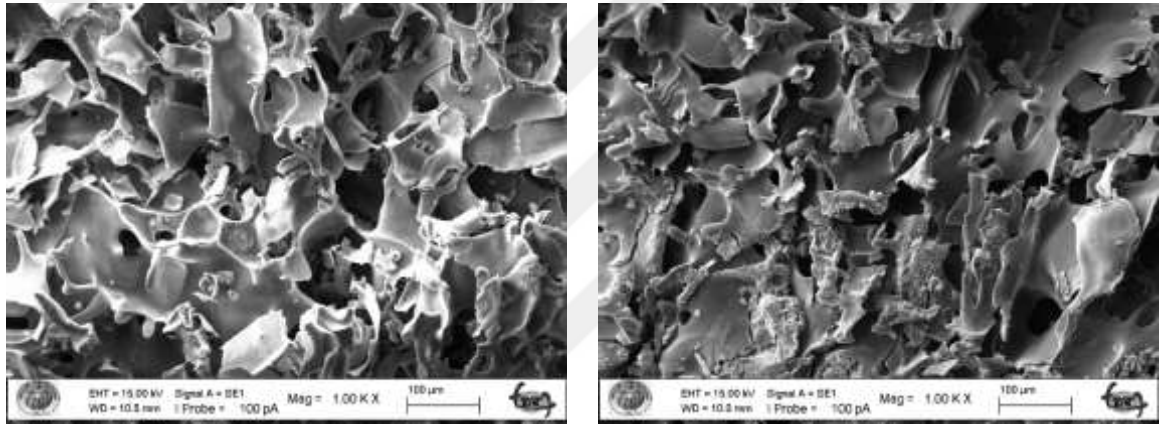


Şekil 4.3. Poliakrilamid-allil glisidil eter kriyojelin (AAm-AGE kriyojel: turuncu) ve tirozinaz immobilize edilmiş poliakrilamid-allil glisidil eter kriyojelin (siyah) FTIR spektrumları

Poliakrilamid-allil glisidil eter kriyojelin SEM fotoğrafları Resim 4.1’de; tirozinaz immobilize edilmiş poliakrilamid-allil glisidil eter kriyojelin SEM fotoğrafları Resim 4.2’de görülmektedir.

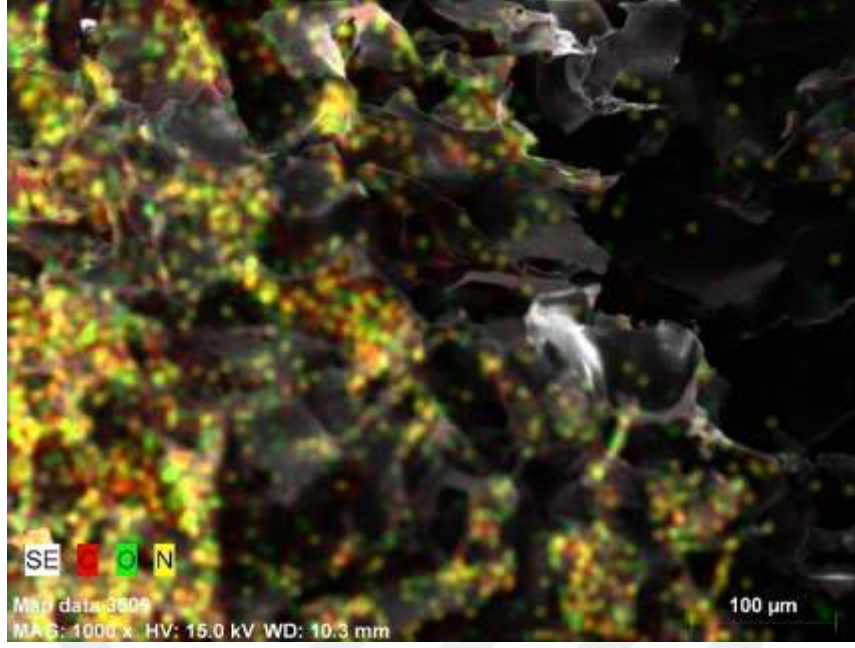


Resim 4.1. AAm-AGE kriyojelin SEM fotoğrafları

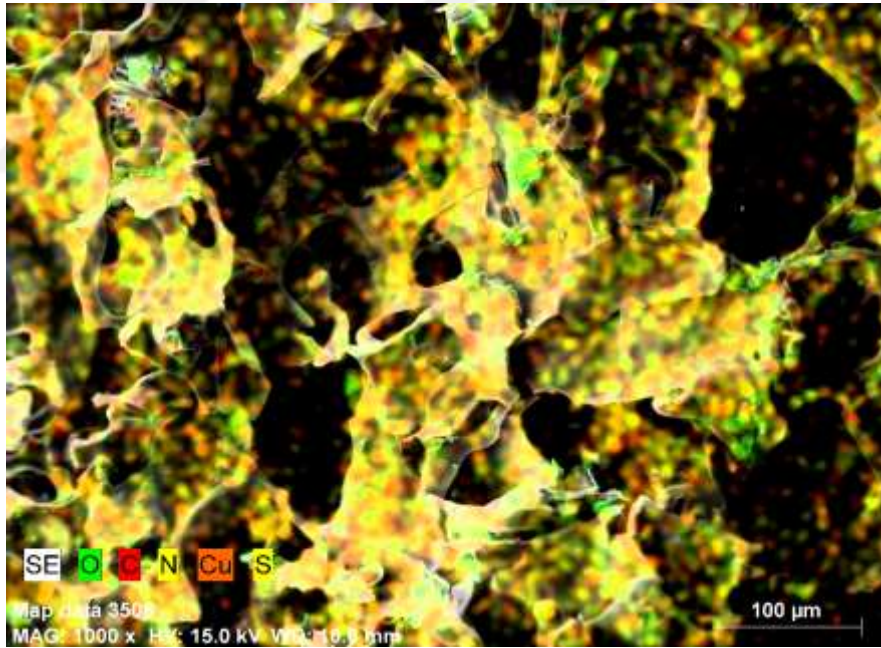


Resim 4.2. Tirozinaz immobilize edilmiş akrilamid-allil glisidil eter kriyojelin SEM fotoğrafları

Poliakrilamid-allil glisidil eter kriyojel ve tirozinaz immobilize edilmiş poliakrilamid-allil glisidil eter kriyojelin EDX haritalama analizi ile elde edilen fotoğrafları sırasıyla Resim 4.3’de ve Resim 4.4’de görülmektedir.



Resim 4.3. AAm-AGE kriyojelin EDX haritalama analizi sonucunda elde edilen fotoğrafı



Resim 4.4. Tirozinaz immobilize edilmiş AAm-AGE kriyojelin EDX haritalama analizi sonucunda elde edilen fotoğrafı

4.2. Şişme Analizi

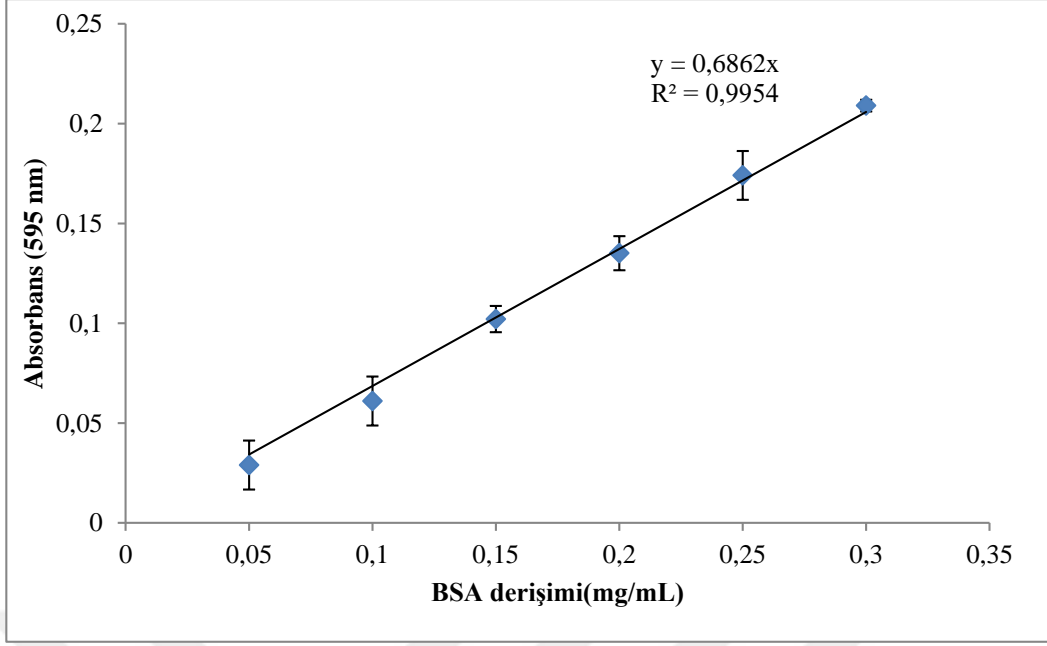
Bu çalışmada üretilen AAm-AGE kriyojelin şişme derecesi 15.35 g H₂O/gram kriyojel olarak hesaplandı ve denge şişme derecesine 3 dakika içerisinde ulaşıldığı tespit edildi. Kurutulmuş, şişmiş ve sıkılmış AAm-AGE kriyojelin fotoğrafları Resim 4.5’de görülmektedir.



Resim 4.5. Kurutulmuş, şişmiş ve sıkılmış AAm-AGE kriyojel (soldan sağa)

4.3. Protein Tayini

Bu çalışmada protein tayini Bradford yöntemi ile yapılmıştır. Bu yöntemle çizilen sığır serum albümin (BSA) standart (çalışma) grafiği aşağıdaki Şekil 4.4’de görülmektedir. Kriyojelden geçirilmeden önce ve geçirildikten sonra enzim çözeltilerindeki protein derişimleri bu grafiğin denkleminde yararlanılarak hesaplanmıştır.

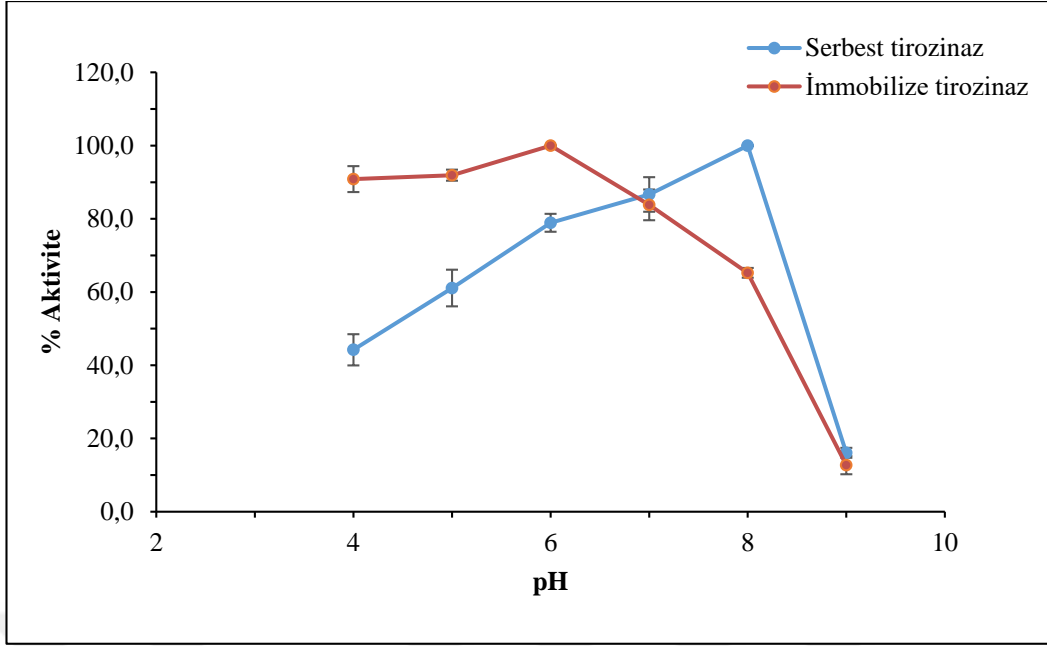


şekil 4.4. Protein tayini için sığır serum albümin (BSA) ile hazırlanmış çalışma grafiği

Buna göre, bir gram kriyojel başına bağlanan tirozinaz miktarı 2.90 ± 0.28 mg olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç %77 oranında immobilizasyon verimi (bağlanma) olduğunu göstermektedir.

4.4. Serbest ve İmmobilize Tirozinaz Aktivitesine pH Etkisi

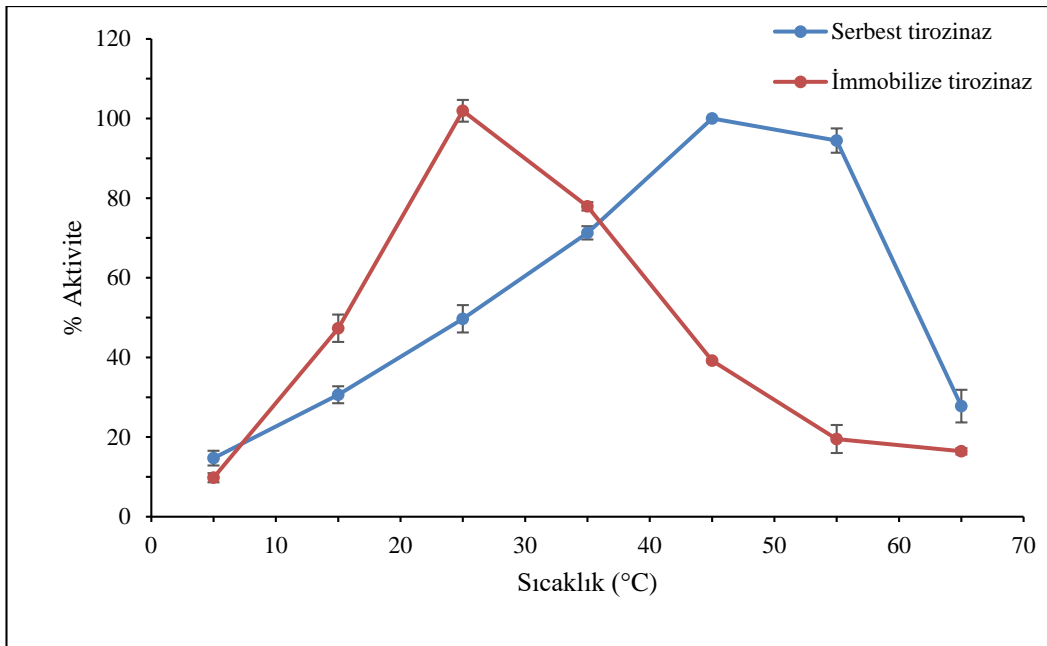
Serbest ve immobilize tirozinaz enzimlerinin aktivitelerinin pH'a bağlı olarak değişimi şekil 4.5'de gösterilmiştir. Serbest tirozinaz enziminin optimum pH'ı 8.0 ve immobilize tirozinaz enziminin optimum pH'ı 6.0 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.5. Serbest ve immobilize tirozinaz enzimlerinin aktivitesine pH etkisi

4.5. Serbest ve İmmobilize Tirozinaz Aktivitesine Sıcaklık Etkisi

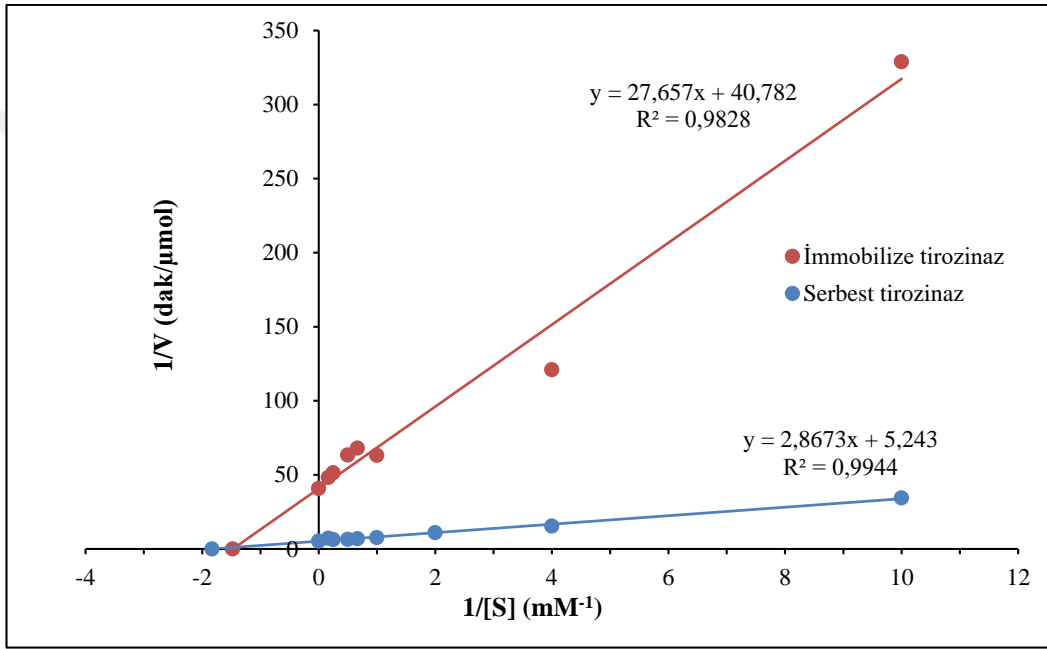
Serbest ve immobilize tirozinaz enzimlerinin aktivitelerinin sıcaklığa bağlı olarak değişimi Şekil 4.6.'da gösterilmiştir. Serbest tirozinaz enziminin optimum sıcaklığı 45°C ve immobilize tirozinaz enziminin optimum sıcaklığı 25°C olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.6. Serbest ve immobilize tirozinaz aktivitesine sıcaklık etkisi

4.6. Serbest ve İmmobilize Tirozinaz Aktivitesine Substrat Derişiminin Etkisi

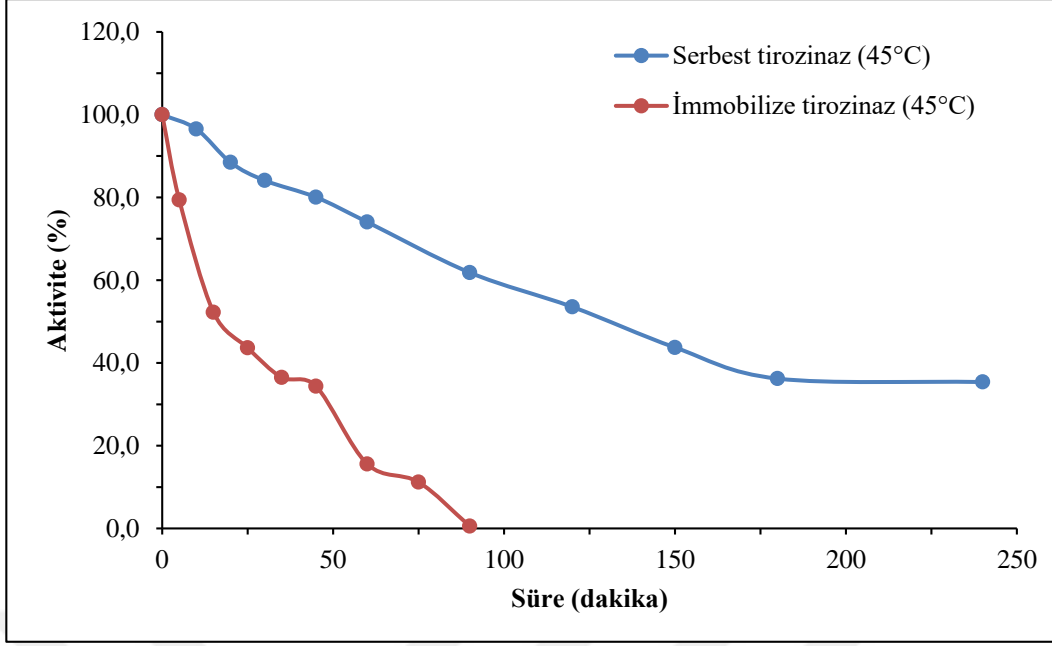
Serbest ve immobilize tirozinaz aktivitesine substrat derişiminin etkisi Şekil 4.7’de gösterilmiştir. Serbest ve immobilize tirozinaz için sırasıyla K_m değerleri 0.547 mM ve 0.678 mM iken; V_{max} değerleri 0.1907 $\mu\text{mol}/\text{dak}$ ve 0.0245 $\mu\text{mol}/\text{dak}$ olarak hesaplanmıştır. İmmobilizasyon ile V_{max} ’da 7.8 katlık bir düşüş görülmektedir. K_m değerinde çok az bir artış olduğu saptanmıştır.



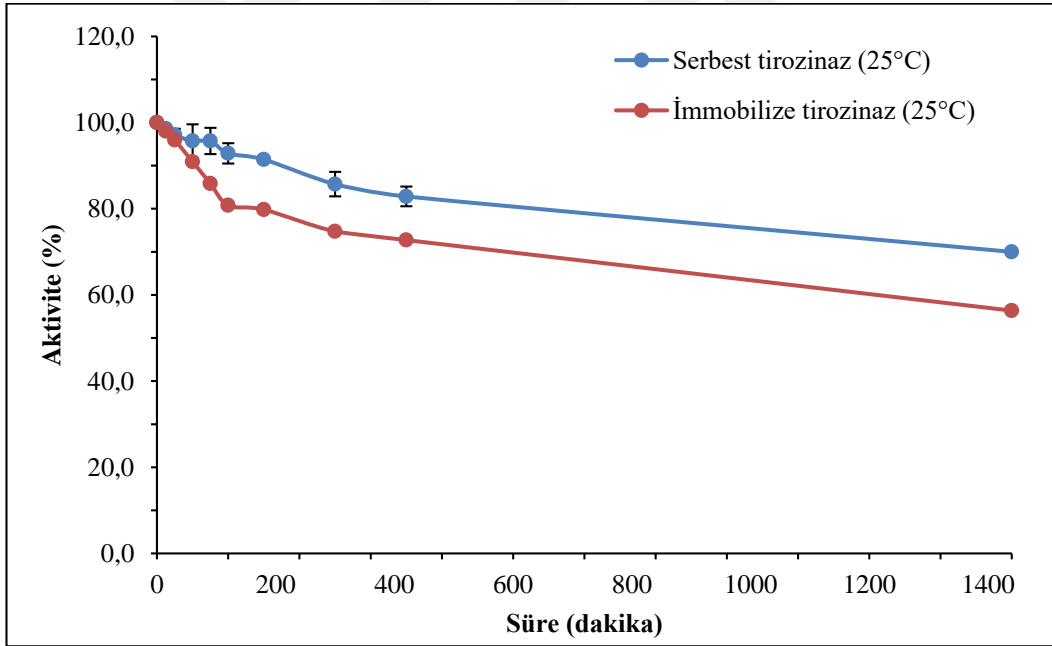
Şekil 4.7. Serbest ve immobilize tirozinaz aktivitesine substrat derişiminin etkisi

4.7. Serbest ve İmmobilize Tirozinaz Enzimlerinin Isıl Kararlılıkları

Serbest ve immobilize tirozinaz enzimlerinin ısıl kararlılıkları, enzimlerin 45°C ve 25°C sıcaklıklarda inkübasyonu sırasında belirli sürelerde ölçülen aktiviteleri ile belirlenmiştir. Isıl kararlılığa ilişkin aktivite profilleri Şekil 4.8 ve Şekil 4.9’da verilmiştir.



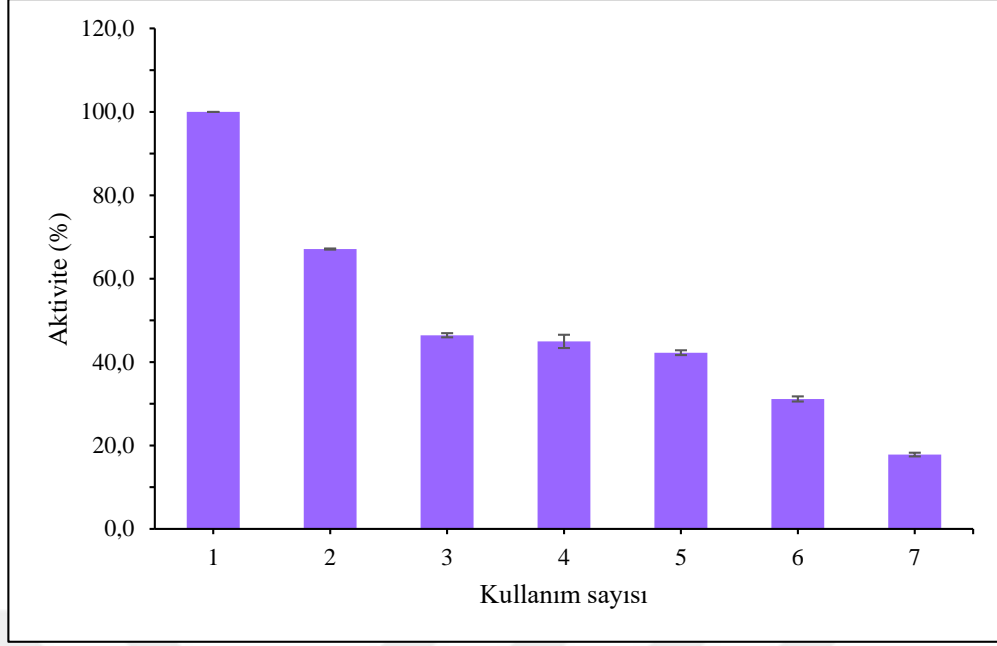
Şekil 4.8. Serbest ve immobilize tirozinaz enzimlerinin 45°C’deki ısıl kararlılıkları



Şekil 4.9. Serbest ve immobilize tirozinaz enzimlerinin 25°C’deki ısıl kararlılıkları

4.8. İmmobilize Tirozinaz Enziminin İşlemsel Kararlılığı

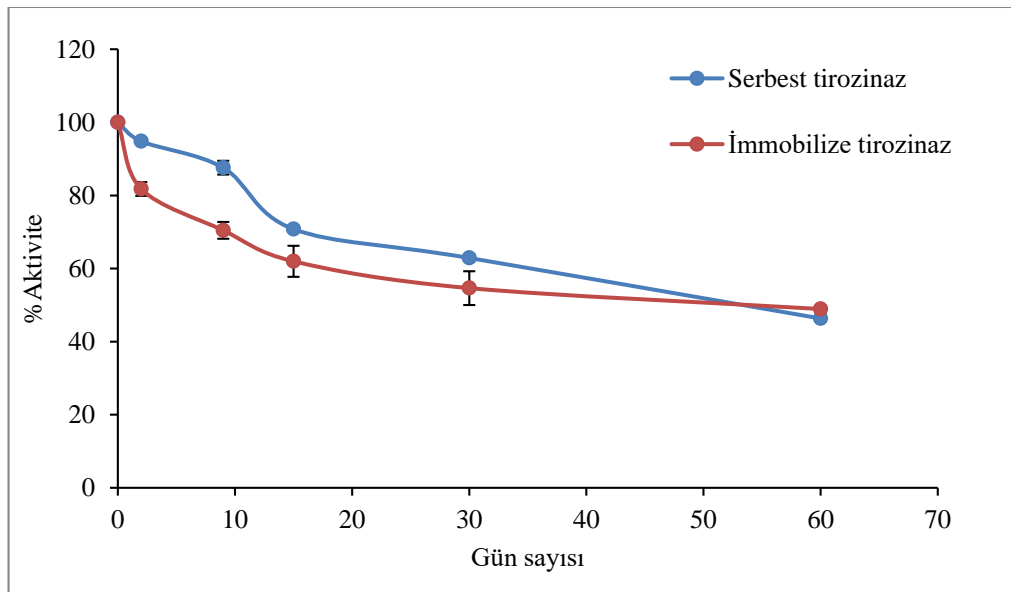
İmmobilize tirozinaz enziminin işlemsel kararlılığına ilişkin elde edilen sonuçlar Şekil 4.10’da gösterilmiştir. İmmobilize tirozinaz art arda yedi kullanımdan sonra başlangıç aktivitesinin %18.1’ini korumuştur.



Şekil 4.10. İmmobilize tirozinaz enziminin işlemsel kararlılığı

4.9. Serbest ve İmmobilize Tirozinaz Enzimlerinin Depo Kararlılıkları

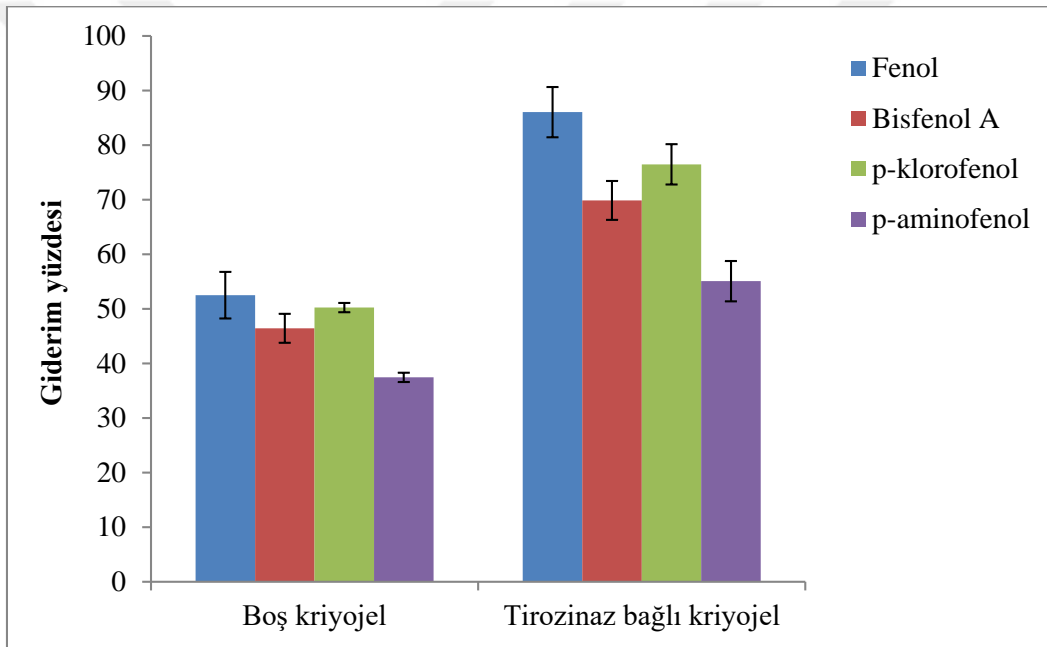
Serbest ve immobilize tirozinaz enzimleri depo kararlılıklarının belirlenmesi amacıyla, 60 gün boyunca +4°C’de muhafaza edildi. Bu süreçte belirli günlerde ölçülen enzim aktiviteleri depolama süresine karşı grafiğe geçirilmiş ve Şekil 4.11’deki depo süresi-% aktivite profilleri elde edilmiştir.



Şekil 4.11. Serbest ve immobilize tirozinaz enzimlerinin depo kararlılıkları

4.10. Fenolik Bileşik Giderme Çalışmaları

Bu çalışmada immobilize tirozinaz enzimi kullanılarak fenol, Bisfenol A, *p*-klorofenol ve *p*-aminofenol bileşiklerinin sulu ortamdan giderilmesi incelenmiştir. Seçilen fenolik bileşiklerin tirozinaz bağlı kriyojelden geçirilmeden önceki ve peristaltik pompa ile sirküle edilerek 90 dakika boyunca geçirildikten sonraki derişimleri 4-aminoantipirin bileşiğı ile fenolik bileşikler arasında gerçekleşen reaksiyondan yararlanılarak belirlenmiştir. Kriyojel ve enzim bağı kriyojelin gerçekleştirdiğı giderim yüzde giderme cinsinden grafiğı geçirilmiş ve sonuçlar Şekil 4.12’de gösterilmiştir.



Şekil 4.12. Boş ve tirozinaz immobilize edilmiş AAm-AGE kriyojeller kullanılarak elde edilen fenolik bileşik (fenol, Bisfenol A, *p*-klorofenol ve *p*-aminofenol) giderme yüzdeleri

Elde edilen sonuçlara göre tirozinaz immobilize edilmiş AAm-AGE kriyojeller ile fenol, Bisfenol A, *p*-klorofenol ve *p*-aminofenol giderim yüzdeleri sırasıyla, %86.1±4.61, %69.9±3.56, %76.5±3.70 ve %55.1±3.15 olarak hesaplanmıştır.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında akrilamid, N,N'-metilenbisakrilamid ve allil glisidil eter arasında gerçekleşen serbest radikal polimerizasyonu ile makrogözenekli kriyojeller üretilmiştir. Yüzeyinde epoksi gruplarına sahip olan bu kriyojel destek maddesine, tirozinaz enzimi kovalent olarak immobilize edilmiştir.

Kriyojeller gibi makrogözenekli polimerik destek maddeleri, büyük moleküller olan enzimlerin gözenekleri arasından difüzyonuna olanak sağlar ve böylece enzim moleküllerinin kriyojel yüzeyindeki epoksi gruplarına doğru olan sirkülasyonunu elverişli hale getirir (Tamayo vd., 2015). Polimerik epoksi destek maddelerine enzim immobilizasyonu iki aşamada gerçekleşir. Enzim önce destek maddesi tarafından adsorplanır, daha sonra enzimin yüzeyinde bulunan amino, tiyol veya hidroksi grupları gibi nükleofilik birimler epoksi grupları ile kovalent olarak etkileşirler (Tamayo vd., 2015).

Bu çalışmada sentezlenen AAm-AGE kriyojelin FTIR spektrumu (Şekil 4.2) incelendiğinde, akrilamidin amid I ve amid II gerilme titreşimleri 1650 ve 1609 cm^{-1} 'de görülmektedir. Ayrıca 3187 cm^{-1} 'de görülen N-H gerilme titreşimi akrilamid monomerinden kaynaklanmaktadır. Kriyojelin yapısında AGE'nin varlığı özellikle 1100 cm^{-1} 'de görülen epoksi gruplarının C-O-C gerilme titreşimleri ile kanıtlanabilir. Şekil 4.3'de boş AAm-AGE kriyojel ile tirozinaz bağlı AAm-AGE kriyojelin FTIR spektrumu gösterilmiştir. Tirozinaz enziminin kriyojele AGE'nin epoksi grupları üzerinden bağlandığı, AGE'ye ait olan ve 1100 cm^{-1} 'de görülen epoksi C-O-C titreşimlerinin şiddetindeki azalma ile açıklanabilir. Ayrıca 2900 cm^{-1} 'de epoksi C-H gerilmesinin tirozinaz bağlı kriyojelin spektrumunda görülmemesi de epoksi gruplarının immobilizasyonda rol aldığını göstermektedir.

AAm-AGE kriyojelin morfolojisi taramalı elektron mikroskopisi (SEM) tekniği ile analiz edilmiştir. Resim 4.1'de analiz sonucu elde edilen mikrograf AAm-AGE kriyojelin birbirine içten bağlı, mikrometre boyutlarında makro gözeneklere ve gözeneksiz polimerik duvarlara sahip olduğunu göstermektedir. Kriyojel-protein etkileşiminin polimerik gözenekli yapısını bozmadığı bu yapı sayesinde protein çözeltilisinin kriyojel içerisinden konvektif akışı, ihmal edilebilir seviyede bir kütle transfer direnci ile gerçekleşebilir.

Boş ve tirozinaz bağı kriojellerin EDX haritalama analizi ile elde edilen ve elementel içeriklerini gösteren fotoğraflar Resim 4.3 ve 4.4'de görülmektedir. Boş kriojelin harita görüntüsü incelendiğinde, kriojelin yapısına katılan AAm, MBAAm ve AGE moleküllerinin içerdikleri C, O ve N elementlerinin varlığı görülmektedir. Tirozinaz enziminin immobilize edildiği kriojelin EDX görüntüsünde C, O ve N elementlerine ek olarak görülen S ve Cu elementleri de tirozinaz enziminin kriojele immobilize olduğunun bir göstergesidir.

AAm-AGE kriojelin şişme derecesi 15.35 g H₂O/gram kriojel olarak hesaplanmıştır. Bayram vd. (2007)'nin klorofenol adsorpsiyonu için AAm-AGE kriojeller ürettiği çalışmada şişme derecesinin 6.84 g H₂O/gram kriojel olduğu bildirilmiştir. Ayrıca sıkılmış kriojelin su içerisine konulduğunda 1-2 saniyede orijinal şekli ve boyutuna ulaştığı tespit edilmiştir. Çalışmamızda sentezlenen kriojelin de benzer davranışlar gösterdiği görülmektedir. Şişme derecesi ölçümü, aslında bir jelin sentezlendiğinin kanıtıdır. Ayrıca şişme derecesi sentezlenen polimerin ilgili çözgen içinde (çoğunlukla su) çözündüğünü fakat şiştiğinin bir göstergesi olarak ölçülür. Jeli oluşturan çapraz bağlar ne kadar kuvvetli ise şişme derecesi o kadar düşüktür, çünkü böyle jellerin gözenekliliği düşük ve buna bağlı olarak da çözgen absorpsiyonu için boşluklar daha küçük olacaktır. Düşük veya yüksek şişme özelliğinden hangisinin iyi olduğu jelin uygulama amacına göre değişir.

Kriojellerin yüzey alanı mikro- ve nanopartiküllere kıyasla daha düşüktür. Buna bağlı olarak da daha az ligand bağlama kapasitesine sahiptirler (Akgönüllü vd., 2020). Ayrıca büyük gözenek boyutları da diğer kromatografik materyallere göre daha düşük bağlama kapasitesine sahip olmalarına neden olmaktadır (Babanejad vd., 2022). Bu çalışmada Bradford protein tayin yöntemi kullanılarak bir gram kriojel başına bağlanan tirozinaz enzimi miktarı 2.90±0.28 mg olarak hesaplanmıştır. Kriojellere enzimlerin immobilize edildiği çalışmalar incelendiğinde, gram kriojel başına immobilize edilen enzim miktarlarının değişken olduğu görülmektedir. Örneğin, Altunbaş vd. (2022) tarafından yapılan çalışmada poli(2-hidroksietil metakrilat-ko-allil glisidil eter) kriojellere katalaz enzimi AGE'nin epoksi grupları üzerinden immobilize edilmiştir. Bu çalışmada immobilizasyon kapasitesinin 48 mg/g kriojel olduğu bildirilmiştir. Bir diğer çalışmada, (poli-hidroksietil metakrilat-glisidil metakrilat) kriojellerin bir gramına 298.7±9.9 mg katalaz enzimi epoksi grupları üzerinden kovalent olarak immobilize edilmiştir (Erol vd., 2019). Stanescu vd. (2012)'nin çalışmasında ise *Trametes pubescens* mantarından saflaştırılan lakkaz enzimi polivinil alkol kriojellere glutaraldehit kullanılarak kovalent olarak bağlanmış ve bir gram kriojel başına 5.2 mg enzim immobilize edilmiştir.

pH, proteinlerin yapılarında yer alan amino asitlerin yan zincirlerinin iyonizasyonunun yanısıra çözünür olmayan destek maddesinin çözelti ortamındaki kimyasını da etkileyen önemli bir unsurdur (Bayramoglu vd., 2013). İyonizasyon özellikle enzimin aktif merkezindeki amino asit birimlerinin yan zincirlerinde gerçekleşirse, aktivite kayıpları daha büyük olabilir (Sunna, 2021). Bu çalışmada serbest ve immobilize tirozinaz enzimlerinin aktiviteleri pH 4.0-9.0 aralığında ölçülmüştür. Serbest tirozinazın optimum pH'ı 8.0 olarak belirlenirken, immobilize tirozinazın optimum pH'ının 6.0 olduğu saptanmıştır. İmmobilizasyon işlemi ile optimum pH'da 2 birimlik bir düşüş gözlenmiştir. Bu durum immobilize enzimin serbest enzime kıyasla daha düşük pH'larda aktivite gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Bu sonuca benzer olarak, Yahşi vd. (2005) tarafından yapılan, mantar tirozinazının kalsiyum aljinat ve poli(akrilamid-ko-akrilik asit) hidrojellere immobilize edildiği çalışmada, her iki destek maddesi ile yapılan deneyler sonucu, serbest enzimin optimum pH'sı 7.0, immobilize enzimin optimum pH'sı ise 5.0 olarak belirlenmiştir. Labus vd. (2011)'in *Agaricus bisporus* tirozinaz enzimini selüloz temelli taşıyıcılara kovalent olarak immobilize ettiği çalışmada da enzimin optimum pH'sının immobilize edildikten sonra daha asidik bölgeye kaydığı bildirilmiştir. Bununla birlikte, serbest ve immobilize tirozinaz enziminin optimum pH'sının aynı olduğu (Dinçer vd., 2012; Abdollahi vd., 2017) ya da enzimin immobilize olduktan sonra optimum pH'sının bazik bölgeye kaydığı (Liu vd., 2018) çalışmalar da literatürde mevcuttur. İmmobilizasyondan sonra meydana gelen bu tür optimum pH değişikliklerinin genellikle enzimin kovalent bağlanması sonucu konformasyonunda meydana gelen değişikliklerden ve immobilizasyon sonucu oluşan mikro çevreden kaynaklandığı bildirilmektedir (Ba vd., 2014).

Enzimatik reaksiyonlarda reaksiyon hızı sıcaklıktan etkilenir. Termofilik enzimler hariç, yüksek sıcaklıklarda enzimlerin denatürasyonu nedeniyle aktivitede düşüş olur. Sıcaklık arttıkça hem aktivasyon hem de denatürasyon aynı anda meydana gelmektedir. Bu çalışmada serbest ve immobilize tirozinaz enziminin optimum sıcaklıkları sırasıyla 45°C ve 25°C olarak belirlenmiştir. İmmobilize tirozinazın sıcaklık-aktivite profili serbest tirozinaza göre daha dardır. Bu durum enzimin kovalent immobilizasyonu sonucu konformasyonel esnekliğinin sınırlanmasından kaynaklanabilir. Bununla birlikte, immobilize enzim serbest enzime kıyasla daha düşük sıcaklıkta maksimum aktivite göstermektedir. Enzimler immobilize olduktan sonra substratı bağlamak üzere uygun bir konformasyon almaktadır ve optimum sıcaklığın düşük olması bu konformasyon için gereken aktivasyon enerjisinin daha düşük olduğu anlamına gelmektedir.

Literatürde serbest ve immobilize tirozinaz enzimlerinin optimum sıcaklıklarının değişken olduğu görülmektedir. Örneğin, Arıca (2000) karboksimetilselüloz hidrojel boncuklara mantar tirozinaz enzimini kovalent olarak immobilize ettiği çalışmasında, serbest enzim ve immobilize enzim için optimum sıcaklık değerlerini sırasıyla 40°C ve 45°C olarak belirlemiştir. Dinçer vd. (2012) ise mantar tirozinaz enzimini kitosan-kil kompozit kürelere immobilize etmiş; bu çalışmada serbest ve immobilize tirozinazın optimum sıcaklıklarını sırasıyla 25-30°C ve 25°C olarak belirlemiştir.

Enzimoloji enzimlerin yapısı, fonksiyonu, regülasyonu ve kinetiği ile ilgilidir (Srinivasan, 2021). Enzim kinetiği ise, enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonların hızını inceler ve katalitik mekanizmayı analiz koşulları ile bağdaştırarak ortaya koyar (Cooney, 2011). Enzim kinetiğinin analizinde sıkça kullanılan yaklaşımlardan biri Michaelis-Menten kinetiğidir. Bu yaklaşım, substrat derişimine bağlı olarak bir enzimatik reaksiyonun ilk hızını ölçmek için kullanılır. Sabit enzim derişiminde, substrat derişim arttıkça reaksiyon hızı da artar ancak enzim substrata doygun hale geldiğinde yani tüm enzim molekülleri substrat ile enzim-substrat kompleksi oluşturduğunda, enzim maksimum hızına (V_{max}) ulaşmış olur ve hız sabit kalır. Michaelis-Menten Eşitliği ile ifade edilen bu model, bir enzimin K_m ve V_{max} değerlerinin hesaplanmasını sağlar. K_m , Michaelis-Menten sabiti olarak adlandırılır. Enzimin maksimum hızının $\frac{1}{2}$ 'sine karşılık gelen substrat derişimi olarak tanımlanır ve bir enzimin substratına karşı olan ilgisi hakkında bilgi verir. K_m ne kadar küçükse, enzimin substratına ilgisi o kadar yüksek olmaktadır. Bu çalışmada serbest ve immobilize tirozinaz için sırasıyla K_m değerlerinin 0.547 mM ve 0.678 mM; V_{max} değerlerinin ise 0.1907 $\mu\text{mol/dak}$ ve 0.0245 $\mu\text{mol/dak}$ olduğu belirlenmiştir. İmmobilizasyondan sonra K_m değeri serbest enzime kıyasla 1.24 kat yükselmiş; dolayısıyla tirozinaz enziminin L-katekol substratına karşı ilgisi azalmıştır. İmmobilize tirozinazın V_{max} 'ının ise serbest tirozinaza göre, 7.8 kat daha düşük olduğu görülmüştür. K_m 'de artış ve V_{max} 'da düşüşün bu çalışmaya benzer olarak değiştiği bir araştırma Yahşi vd. (2005) tarafından yapılmıştır. Tirozinaz enziminin kalsiyum aljinat ve poliakrilamid-ko-akrilik asit hidrojellere immobilize edildiği bu çalışmada, serbest tirozinaz için K_m 0.607 mM, V_{max} 0.0737 M dak^{-1} olarak hesaplanmıştır. Kalsiyum aljinata immobilize edilen tirozinaz için K_m 0.779 mM, V_{max} 0.0117 M dak^{-1} ; poliakrilamid-ko-akrilik asit hidrojellere immobilize edilen tirozinaz için K_m 1.408 mM, V_{max} ise 0.0125 M dak^{-1} olarak hesaplanmıştır. Serbest enzim ile immobilize enzimlerin kinetik davranışlarının farklı olabileceği birkaç nedenle açıklanabilir. İmmobilizasyon, enzim moleküllerinin yapısında

konformasyonel değişikliklere neden olabilir. Enzim immobilize olduktan sonra, serbest halde bulunduğu ortama göre daha farklı bir çevrede bulunur ve bu çevre enzim kinetiğine önemli derecede etki eder. Ayrıca immobilize sistemlerde substrat, çözelti ve destek maddesi arasında dağılmış olarak bulunmaktadır. Dolayısıyla enzime yakın bölgelerdeki substrat konsantrasyonu, enzimin serbest halde bulunduğu çözelti ortamındaki konsantrasyonuna göre daha farklı olmaktadır (Laidler ve Bunting, 1980; Yahşı vd., 2005).

Isıl kararlılık deneyleri serbest ve immobilize tirozinaz enzimlerinin sırasıyla optimum sıcaklıkları olan 45°C ve 25°C sıcaklıklarda yapılmıştır. Bu deneylerde 45°C’de immobilize tirozinaz aktivitesini 90 dakika sonunda tamamen yitirmiş, serbest enzim ise 240 dakika sonunda başlangıç aktivitesinin %35.4’ünü korumuştur. İmmobilize tirozinazın bu sıcaklıkta serbest tirozinaza kıyasla daha düşük ısıl kararlılık göstermesi, optimum sıcaklık sonuçlarından da görüleceği üzere, immobilize tirozinazın 45°C’de aktivitesinin önemli derecede düşmesinden kaynaklanmaktadır. İmmobilize tirozinaz enziminin optimum pH’ı olan 25°C’de yapılan ısıl kararlılık deneylerinde ise immobilize enzim ve serbest enzim birbirleri ile yarışır düzeyde aktivite göstermişlerdir.

Serbest enzim, sulu çözeltide bir kez kullanılabildeği için işlemsel kararlılık ölçümü söz konusu olmamaktadır. Bir katı desteğe immobilize olmuş enzimlerin ise en önemli avantajları hazırlanan enzim immobilize sistemin tekrar tekrar kullanılabilmesidir. Ancak, bu tekrarlar sırasında hazırlanmış olan kriyojel-enzim arasındaki kimyasal ve fiziksel ilişkilerin çeşitli nedenlerle bozulması sonucu tekrar kullanım sayısı arttıkça aktivitede düşüş gözlenmesi beklenen bir durumdur. Al-Najada vd. (2019) substrat ile immobilize enzimin aktif merkezi arasında çok sık gerçekleşen etkileşimlerin aktif merkezin yapısında bozulma ya da deformasyonlara yol açtığını ve bu nedenle enzim aktivitesinde düşüş gözlendiğini rapor etmiştir. Bu çalışmada sentezlenen tirozinaz bağlı kriyojelin yedi kez kullanım sonunda aktivitesini anlamlı bir kısmını kaybettiği Şekil 4.10’da görülmektedir.

Mantar tirozinaz enziminin aljinat, poliakrilamid ve jelatin jeller içerisinde tutuklandığı bir çalışmada 8 kullanımdan sonra jelatin temelli jelde tutuklanan tirozinazın başlangıç aktivitesinin %70’ini kaybettiği belirlenmiştir. Poliakrilamid ve aljinat jeller kullanıldığında ise aktivite kaybının daha az olduğu rapor edilmiştir (Munjal ve Sawhney, 2002).

Enzimlerin kullanılacağı pratik uygulamalar söz konusu olduğunda, uygun bir raf ömrü ve depolama süreci boyunca yeterli enzim aktivitesini sağlamak enzim

immobilizasyonu ile mümkün olabilmektedir (Zhu ve Wei, 2022). Bu çalışmada tirozinaz enziminin immobilize edildiği kriyojeller +4°C'de 60 gün boyunca depolanmış ve belirli günlerde aktiviteleri ölçülmüştür. Altmış gün sonunda serbest tirozinaz başlangıç aktivitesinin %46.4'ünü, immobilize tirozinaz ise %48.9'unu korumuştur. Depolama süreci boyunca serbest enzim ile immobilize enzim arasındaki aktivite farkının çok az olduğu görülmüştür. Agarwal vd. (2016)'nın *Aspergillus niger* PA2 fungal izolatından elde ettikleri tirozinazı kitosan-jelatin biyokompozit filmlere kovalent olarak immobilize ettiği çalışmada da 20 günlük depolama sırasında serbest ve immobilize enzimler birbirine yakın aktivite göstermişlerdir.

Atık suların büyük ölçekli arıtılmasında serbest enzim kullanılması sonucu ortaya çıkan maliyet yüksektir. Serbest enzimlerin geri kazanımı ya da tekrar kullanılabilirliği kısıtlıdır. Enzimler arıtım yapılacak çözelti ortamında serbest formda kullanıldıklarında kararlılıklarında azalma ve ortamda bulunabilecek metal iyonları, tuzlar, şelatlayıcılar ve deterjanlar nedeniyle katalitik aktivitelerinde kayıplar meydana gelebilir. Ayrıca toprak partikülleri ya da organik maddelere bağlanabilmeleri nedeniyle de inaktive olabilirler. Bu nedenlerden dolayı büyük ölçekli ve sürekli sistemlerde serbest enzimlerin kullanımı pratik değildir. Enzimlerin immobilize edilerek kullanılmaları bu sorunlar çözümü getirebilecek bir uygulamadır (Kües, 2015).

Endüstriyel atık sularda fenol derişiminin genellikle 0.5-16 mM arasında olduğu rapor edilmiştir (Nicell vd., 1995). Bu çalışmada 1.0 mM derişimindeki fenolik bileşik çözeltileri kullanılmıştır. Tirozinaz enziminin substrat ve ürün inhibisyonundan olumsuz etkilendiği iyi bilinmektedir (Xu ve Yang, 2013). 2.5 mM'ın üzerindeki fenol derişimlerinde giderim yüzdesinin azaldığını ifade etmişlerdir. Ayrıca yüksek fenol derişimlerinde tirozinaz ile kataliz sonucu oluşan *o*-kinon ürününün aşırı birikiminin enzimin inaktivasyonuna yol açtığı ve bu nedenle, başlangıç fenol derişimi artırıldığında, enzim derişiminin de artırılması gerektiği bildirilmiştir (Xu ve Yang, 2013).

Bu tez çalışmasında immobilize tirozinaz enzimi ile fenolik bileşik giderim deneyleri immobilize tirozinazın optimum pH'ı olarak belirlenen pH 6.0'da yapılmıştır. Xu vd. (2011)'nin tirozinaz CLEA'ları ile yaptıkları fenol giderimi çalışmasında da optimum pH dikkate alınmış ve pH 6.0'da giderim deneyleri yapılmıştır. Bu araştırmacıların bir diğer çalışmasında ise fenol giderimine pH etkisi pH 5.5-8.5 aralığında incelenmiş ve giderimin pH'dan neredeyse bağımsız olduğu sonucuna varılmıştır (Xu ve Yang, 2013). Seetharam ve Saville (2003) ise silika içeren destek maddesine tirozinaz enzimini kovalent olarak immobilize ettikleri araştırmada fenol giderimini pH 6.8 ve pH 8.0'de denemişler ve ilk üç

saat boyunca bir fark gözlememişler ancak 5 saatin sonunda başlangıçtaki fenolün pH 6.8’de %93’ünün, pH 8.0’de ise %75’inin giderildiğini rapor etmişlerdir.

Tirozinaz immobilize edilmiş AAm-AGE kriyojeller ile fenol, Bisfenol A, *p*-klorofenol ve *p*-aminofenol giderim yüzdeleri sırasıyla, %86.1±4.61, %69.9±3.56, %76.5±3.70 ve %55.1±3.15 olarak hesaplanmıştır. Tirozinaz bağlı olmayan AAm-AGE kriyojeller ile kontrol denemeleri yapıldığında, fenol, Bisfenol A, *p*-klorofenol ve *p*-aminofenol giderim yüzdeleri sırasıyla %52.5±4.27, %46.4±2.65, %50.2±0.85 ve %37.5±2.05 olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, hem bu çalışmada üretilen kriyojelin bir filtre görevi görerek giderim sağladığı hem de kriyojele immobilize olmuş tirozinaz enziminin fenolik bileşikler giderdiği ifade edilebilir. Bayramoğlu vd. (2013) tarafından yapılan çalışmada tirozinaz enzimi modifiye diatom biosilika üzerine immobilize edilmiş ve immobilize tirozinaz ile 12 saat sonunda %87 oranında fenol giderimi gerçekleşmiştir. Zarta vd. (2020), tirozinaz enzimini polikaprolaktan-kitosan fiberlere immobilize etmiş ve 25°C’de pH 7’de 90 dakika sonunda 3 mg/L derişimdeki Bisfenol A’nın tamamen giderildiğini saptamışlardır. Ancak fenol derişimi 5 mg/L olduğunda giderim yüzdesi azalmıştır. Yüksek substrat derişimi nedeniyle enzimin yapısının deforme olabileceği kanısına varmışlardır. Tirozinaz enziminin *p*-klorofenölü yüksek oranda giderme yeteneğinin, para-pozisyonundaki elektron donörü olan klorür grubundan kaynaklandığı bildirilmiştir (Xu ve Yang, 2013).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibi özetlenebilir:

Bu tez çalışmasında akrilamid, N,N'-metilenbisakrilamid ve allil glisidil eter kullanılarak serbest radikal polimerizasyonu ile makro gözenekli AAm-AGE kriyojel üretilmiştir. Epoksi grupları barındıran bu kriyojelin bir gramına 2.90 ± 0.28 mg tirozinaz enzimi kovalent olarak immobilize edilmiştir.

Tirozinaz immobilize edilmiş ve boş AAm-AGE kriyojellerin karakterizasyonları FTIR, SEM, EDX analizleri ile gerçekleştirilmiştir. AAm-AGE kriyojelin şişme derecesi 15.35 g H₂O/gram kriyojel olarak hesaplanmıştır.

Serbest tirozinaz enziminin optimum pH'ı 8.0 ve immobilize tirozinaz enziminin optimum pH'ı 6.0 olarak belirlenmiştir.

Serbest tirozinaz enziminin optimum sıcaklığının 45°C , immobilize tirozinaz enziminin optimum sıcaklığının ise 25°C olduğu saptanmıştır.

Serbest ve immobilize tirozinaz için sırasıyla K_m değerleri 0.547 mM ve 0.678 mM iken; V_{max} değerleri 0.1907 $\mu\text{mol/dak}$ ve 0.0245 $\mu\text{mol/dak}$ olarak hesaplanmıştır.

Isıl kararlılık çalışmasında, 45°C 'de immobilize tirozinaz aktivitesini 90 dakika sonunda tamamen yitirmiş, serbest enzim ise 240 dakika sonunda başlangıç aktivitesinin % 35.4 'ünü korumuştur. İmmobilize tirozinaz enziminin optimum pH'ı olan 25°C 'de yapılan ısıl kararlılık deneylerinde ise immobilize enzim ve serbest enzim birbirleri ile yarışır düzeyde aktivite göstermişlerdir.

İmmobilize tirozinaz art arda yedi kullanımdan sonra başlangıç aktivitesinin % 18.1 'ini korumuştur.

Depo kararlılığı çalışmaları immobilize tirozinaz enziminin 60 gün boyunca serbest enzim ile kıyaslanabilir oranda depo kararlılığına sahip olduğunu göstermiştir.

Tirozinaz immobilize edilmiş AAm-AGE kriyojeller ile fenol, Bisfenol A, *p*-klorofenol ve *p*-aminofenol giderim yüzdeleri sırasıyla, % 86.1 ± 4.61 , % 69.9 ± 3.56 , % 76.5 ± 3.70 ve % 55.1 ± 3.15 olarak hesaplanmıştır.

Enzim immobilizasyonu denemeleri serbest enzim modundan immobilize ortamda sabitlenmiş enzim moduna geçerek genellikle enzimin ömrünü uzatmak için yapılan uygulamalardır.

İmmobilizasyon sonunda enzimin kullanım ömrü uzarken molekülün sabitlenmiş olmasından kaynaklanan aktivite azalması genellikle beklenen bir durumdur. Çalışmamızda da immobilize enzim aktivitesinde yaklaşık 8 kat düşme hesaplanmıştır. Bu oran çok değişken olup tirozinaz için literatürde ifade edilen aktivite kayıpları ile kıyaslandığında oldukça düşüktür. Öte yandan tirozinaz enziminin immobilizasyon işlemi sonucu aktivitesinin arttığını rapor eden çalışma sayısı son derece azdır, hatta bu çalışmaya konu olan polimer ortamında yapılmış böyle bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Öte yandan, bu çalışmada elde edilen sonuçlardan en dikkat çeken immobilize enzimin serbest enzime kıyasla ısı ve depo kararlılıklarının beklenenin aksine daha düşük olmasıdır. Enzim immobilizasyonu sonucunda genellikle bu iki özelliğin yükselmesi beklenirken bu durum açıklama ve daha ileri çalışma gerektirmektedir. Bu açıklamalardan bir tanesi deneyler sonucunda gözlenen kriyojelin tekrar kullanımlarında üründen tamamen temizlenmemiş olma olasılığı ve bu nedenle tirozinaz enzimi çalışmalarında sıklıkla rastlanan ürün inhibisyonu gerçekleşmesidir. Bu sonuç daha ileri çalışmaları gerektirmektedir.

KAYNAKLAR

- Abd Gami, A., Shukor, M. Y., Khalil, K. A., Dahalan, F. A., Khalid, A., & Ahmad, S. A. (2014). Phenol and its toxicity. *Journal of Environmental Microbiology and Toxicology*, 2(1), 11-23. doi.org/10.54987/jemat.v2i1.89
- Abdollahi, K., Yazdani, F., Panahi, R., Mokhtarani, B. 2018. Biotransformation of phenol in synthetic wastewater using the functionalized magnetic nano-biocatalyst particles carrying tyrosinase. *3 Biotech*, 8(10), 419. doi.org/10.1007/s13205-018-1445-2
- Ahmaruzzaman, M. (2008). Adsorption of phenolic compounds on low-cost adsorbents: a review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 143(1-2), 48-67. doi.org/10.1016/j.cis.2008.07.002
- Agarwal, P., Dubey, S., Singh, M., & Singh, R. P. (2016). Aspergillus niger PA2 tyrosinase covalently immobilized on a novel eco-friendly bio-composite of chitosan-gelatin and its evaluation for L-DOPA production. *Frontiers in microbiology*, 7, 2088. doi.org/10.3389/fmicb.2016.02088
- Akgönüllü, S., Bakhshpour, M., Neslihan, İ. D. İ. L., Andaç, M., Yavuz, H., Denizli, A. (2020). Versatile polymeric cryogels and their biomedical applications. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 48(2), 99-118. doi.org/10.15671/hjbc.629355
- Al-Najada, A. R., Almulaiky, Y. Q., Aldahri, M., El-Shishtawy, R. M., Mohamed, S. A., Baeshen, M., AL-Farga, A., Abdulaal, W.H., Al-Harbi, S. A. (2019). Immobilisation of α -amylase on activated amidrazone acrylic fabric: a new approach for the enhancement of enzyme stability and reusability. *Scientific Reports*, 9(1), 1-9. doi.org/10.1038/s41598-019-49206-w
- Altunbaş, C., Aslan, A., Kuşat, K., Sahiner, M., Akgöl, S., Sahiner, N. (2022). Synthesis and Characterization of a New Cryogel Matrix for Covalent Immobilization of Catalase. *Gels*, 8(8), 501. doi.org/10.3390/gels8080501
- Aytar, B. S., & Bakir, U. (2008). Preparation of cross-linked tyrosinase aggregates. *Process Biochemistry*, 43(2), 125-131. doi.org/10.1016/j.procbio.2007.11.001

- Ba, S., Haroune, L., Cruz-Morató, C., Jacquet, C., Touahar, I. E., Bellenger, J. P., ... Cabana, H. (2014). Synthesis and characterization of combined cross-linked laccase and tyrosinase aggregates transforming acetaminophen as a model phenolic compound in wastewaters. *Science of the Total Environment*, 487, 748-755. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.10.004
- Ba, S., ve Vinoth Kumar, V. (2017). Recent developments in the use of tyrosinase and laccase in environmental applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(7), 819-832. doi.org/10.1080/07388551.2016.1261081
- Babac, C., Yavuz, H., Galaev, I. Y., Pişkin, E., Denizli, A. (2006). Binding of antibodies to concanavalin A-modified monolithic cryogel. *Reactive and Functional Polymers*, 66(11), 1263-1271. doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2006.03.007
- Babanejad, N., Mfoafo, K., Zhang, E., Omid, Y., Razeghifard, R., Omidian, H. (2022). Applications of cryostructures in the chromatographic separation of biomacromolecules. *Journal of Chromatography A*, 463546. doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463546
- Baimenov, A. (2020). *Macroporous Cryogel Composites For Removal Of Heavy Metals From Aqueous and Biological Media* (Doctoral dissertation, Nazarbayev University School of Engineering and Digital Sciences).
- Basso, A., & Serban, S. (2019). Industrial applications of immobilized enzymes—A review. *Molecular Catalysis*, 479, 110607. doi.org/10.1016/j.mcat.2019.110607
- Bayram, E., Lokman, U. Z. U. N., Türkmen, D., YILMAZ, E., GALAEV, I. Y., Denizli, A., Bektaş, S. (2007). Poly acrylamide-allyl glycidyl ether Cryogel as a Novel Stationary Phase for Chlorophenol Adsorption. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 35(3), 219-231.
- Bayramoglu, G., Akbulut, A., Arica, M. Y. (2013). Immobilization of tyrosinase on modified diatom biosilica: Enzymatic removal of phenolic compounds from aqueous solution. *Journal of Hazardous Materials*, 244, 528-536. doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.10.041
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1-2): 248–254.

- Brena, B., González-Pombo, P., Batista-Viera, F. (2013). Immobilization of enzymes: a literature survey. *Immobilization of Enzymes and Cells*, 15-31. doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7_2
- Cho, K., Ryu, C. S., Jeong, S., Kim, Y. (2020). Potential adverse effect of tyrosinase inhibitors on teleosts: A review. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 228, 108655. doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.108655
- Concu, R., ve Cordeiro, M. N. D. (2019). Alignment-free method to predict enzyme classes and subclasses. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21), 5389. doi.org/10.3390/ijms20215389
- Demiryas, N., Tüzmen, N., Galaev, I. Y., Pişkin, E., Denizli, A. (2007). Poly (acrylamide-allyl glycidyl ether) cryogel as a novel stationary phase in dye-affinity chromatography. *Journal of Applied Polymer Science*, 105(4), 1808-1816. doi.org/10.1002/app.26187
- Dinçer, A., Becerik, S., Aydemir, T. (2012). Immobilization of tyrosinase on chitosan–clay composite beads. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50(3), 815-820. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.11.020
- Donato, L., Algeri, C., Rizzi, A., Giorno, L. (2014). Kinetic study of tyrosinase immobilized on polymeric membrane. *Journal of Membrane Science*, 454, 346-350. doi.org/10.1016/j.memsci.2013.12.029
- Doscher, M. S., ve Richards, F. M. (1963). The activity of an enzyme in the crystalline state: Ribonuclease S. *Journal of Biological Chemistry*, 238(7), 2399-2406. doi.org/10.1016/S0021-9258(19)67984-6
- El-Ashtoukhy, E. S. (2013). Z.; El-Taweel, YA; Abdelwahab, O.; Nassef, EM Treatment of Petrochemical Wastewater Containing Phenolic Compounds by Electrocoagulation Using a Fixed Bed Electrochemical Reactor *Int. J. Electrochem*, 1534-1550.
- Ertürk, G., ve Mattiasson, B. (2014). Cryogels-versatile tools in bioseparation. *Journal of Chromatography A*, 1357, 24-35. doi.org/10.1016/j.chroma.2014.05.055
- Erol, K., Cebeci, B. K., Köse, K., Köse, D. A. (2019). Effect of immobilization on the activity of catalase carried by poly (HEMA-GMA) cryogels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123, 738-743. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.121

- Eş, I., Vieira, J. D. G., Amaral, A. C. (2015). Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(5), 2065-2082. doi.org/10.1007/s00253-015-6390-y
- Fernandes, M. S., ve Kerkar, S. (2017). Microorganisms as a source of tyrosinase inhibitors: a review. *Annals of Microbiology*, 67(4), 343-358. doi.org/10.1007/s13213-017-1261-7
- Fiamegos, Y., Stalikas, C., Pilidis, G. (2002). 4-Aminoantipyrine spectrophotometric method of phenol analysis: Study of the reaction products via liquid chromatography with diode-array and mass spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta*, 467(1-2), 105-114. doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00072-7
- Gertzen, R., ve Escobar, M. A. (2014). Assays of polyphenol oxidase activity in walnut leaf tissue. *Bio-protocol*, 4(16). doi.org/10.21769/BioProtoc.1213
- Gezici, S., ve Koçum, D. (2021). Nörodejeneratif Hastalıkların Tedavisinde Nöroprotektif Ajan Olarak Tıbbi Bitkiler ve Fitokimyasallar. *Türk Doğa ve Fen Dergisi*, 10(2), 325-337. doi.org/10.46810/tdfd.977356
- Gözükara, E.M. (2001) *Biyokimya 1. Cilt* (5b., 426) Nobel Tıp Kitabevi.
- Greggio, E., Bergantino, E., Carter, D., Ahmad, R., Costin, G. E., Hearing, V. J., ... Cookson, M. R. (2005). Tyrosinase exacerbates dopamine toxicity but is not genetically associated with Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 93(1), 246-256. doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03019.x
- Imam, H. T., Marr, P. C., Marr, A. C. (2021). Enzyme entrapment, biocatalyst immobilization without covalent attachment. *Green Chemistry*, 23(14), 4980-5005. doi.org/10.1039/D1GC01852C
- Ingavle, G. C., Baillie, L. W., Zheng, Y., Lis, E. K., Savina, I. N., Howell, C. A., Mikhalovsky, S. V., Sandeman, S. R. (2015). Affinity binding of antibodies to supermacroporous cryogel adsorbents with immobilized protein A for removal of anthrax toxin protective antigen. *Biomaterials*, 50, 140-153. doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.01.039

- Ingavle, G., Baillie, L., Davies, N., Beaton, N., Zheng, Y., Mikhailovsky, S., Sandeman, S. (2018). Bioinspired detoxification of blood: the efficient removal of anthrax toxin protective antigen using an extracorporeal macroporous adsorbent device. *Scientific Reports*, 8(1), 1-11. doi.org/10.1038/s41598-018-25678-0
- Ismaya, W. T., Rozeboom, H. J., Weijn, A., Mes, J. J., Fusetti, F., Wichers, H. J., Dijkstra, B. W. (2011). Crystal structure of *Agaricus bisporus* mushroom tyrosinase: identity of the tetramer subunits and interaction with tropolone. *Biochemistry*, 50(24), 5477-5486. doi.org/10.1021/bi200395t
- Jia, F., Narasimhan, B., Mallapragada, S. (2014). Materials-based strategies for multi-enzyme immobilization and co-localization: a review. *Biotechnology and Bioengineering*, 111(2), 209-222. doi.org/10.1002/bit.25136
- Johnson, W., Makame, Y. M., Mkyula, L. L. (2012). Monolithic Hydrophilic Poly (epoxy-acrylamide) Cryogels: Effect of Monomer Concentration on Cryogel's Pore Structure and Properties. *TaJONAS: Tanzania Journal of Natural and Applied Sciences*, 2(1), 238-250.
- Kaintz, C., Mauracher, S. G., Rompel, A. (2014). Type-3 copper proteins: recent advances on polyphenol oxidases. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 97, 1-35. doi.org/10.1016/bs.apcsb.2014.07.001
- Karimian, S., Kazemi, F., Attarroshan, M., Gholampour, M., Hemmati, S., Sakhteman, A., ... Khoshneviszadeh, M. (2021). Design, synthesis, and biological evaluation of symmetrical azine derivatives as novel tyrosinase inhibitors. *BMC chemistry*, 15(1), 1-11. doi.org/10.1186/s13065-021-00780-z
- Katchalski-Katzir, E., & Kraemer, D. M. (2000). Eupergit C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. *Journal of molecular catalysis B: enzymatic*, 10(1-3), 157-176. doi.org/10.1016/S1381-1177(00)00124-7
- Krishnamoorthi, S., Banerjee, A., Roychoudhury, A. (2015). Immobilized enzyme technology: potentiality and prospects. *J Enzymol Metabol*, 1(1), 010-104.
- Kulkarni G (2002) *Biotechnology and its application in pharmacy*. Jaypee Brothers Publ pp 66.

- Kumar, A., ve Srivastava, A. (2010). Cell separation using cryogel-based affinity chromatography. *Nature Protocols*, 5(11), 1737-1747. doi.org/10.1038/nprot.2010.135
- Kurpejović, E., Wendisch, V. F., Sariyar Akbulut, B. (2021). Tyrosinase-based production of L-DOPA by *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(24), 9103-9111. doi.org/10.1007/s00253-021-11681-5
- Kües, U. (2015). Fungal enzymes for environmental management. *Current Opinion in Biotechnology*, 33, 268-278. doi.org/10.1016/j.copbio.2015.03.006
- Labus, K., Turek, A., Liesiene, J., Bryjak, J. (2011). Efficient *Agaricus bisporus* tyrosinase immobilization on cellulose-based carriers. *Biochemical engineering journal*, 56(3), 232-240. doi.org/10.1016/j.bej.2011.07.003
- Laidler, K. J., ve Bunting, P. S. (1980). [9] The kinetics of immobilized enzyme systems. *Methods in enzymology*, 64, 227-248. doi.org/10.1016/S0076-6879(80)64011-7
- Lasmi, K., Derder, H., Kermad, A., Sam, S., Boukhalfa-Abib, H., Belhousse, S., ... Gabouze, N. (2018). Tyrosinase immobilization on functionalized porous silicon surface for optical monitoring of pyrocatechol. *Applied Surface Science*, 446, 3-9. doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.03.037
- Liu, D. M., Chen, J., ve Shi, Y. P. (2018). Tyrosinase immobilization on aminated magnetic nanoparticles by physical adsorption combined with covalent crosslinking with improved catalytic activity, reusability and storage stability. *Analytica Chimica Acta*, 1006, 90-98. doi.org/10.1016/j.aca.2017.12.022
- Lopez-Tejedor, D., ve Palomo, J. M. (2018). Efficient purification of a highly active H-subunit of tyrosinase from *Agaricus bisporus*. *Protein Expression and Purification*, 145, 64-70. doi.org/10.1016/j.pep.2018.01.001
- Marín-Zamora, M. E., Rojas-Melgarejo, F., García-Cánovas, F., García-Ruiz, P. A. (2009). Production of *o*-diphenols by immobilized mushroom tyrosinase. *Journal of Biotechnology*, 139, 163–168. doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.10.014
- Masum, M. N., Yamauchi, K., Mitsunaga, T. (2019). Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources as skin-lightening agents. *Reviews in Agricultural Science*, 7, 41-58. doi.org/10.7831/ras.7.41

- Memic, A., Colombani, T., Eggermont, L. J., Rezaeeyazdi, M., Steingold, J., Rogers, Z. J., ... Bencherif, S. A. (2019). Latest advances in cryogel technology for biomedical applications. *Advanced Therapeutics*, 2(4), 1800114. doi.org/10.1002/adtp.201800114
- Min, K., Park, G. W., Yoo, Y. J., Lee, J. S. (2019). A perspective on the biotechnological applications of the versatile tyrosinase. *Bioresource Technology*, 289, 121730. doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121730
- Mohammadi, S., Kargari, A., Sanaeepur, H., Abbassian, K., Najafi, A., Mofarrah, E. (2015). Phenol removal from industrial wastewaters: a short review. *Desalination and Water Treatment*, 53(8), 2215-2234. doi.org/10.1080/19443994.2014.883327
- Munjal, N., ve Sawhney, S. K. (2002). Stability and properties of mushroom tyrosinase entrapped in alginate, polyacrylamide and gelatin gels. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(5), 613-619. doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00019-4
- Nair, C. I., Jayachandran, K., Shashidhar, S. (2008). Biodegradation of phenol. *African Journal of Biotechnology*, 7(25).
- Nelson, D.L., Lehninger, A.L., Cox, M.M. (2013). Lehninger biyokimyanın temel ilkeleri. Elçin Y.M. (Ed), Enzimlerin Sınıflandırılması (6b., 185) Palme Yayınevi.
- Nicell, J. A., Saadi, K. W., Buchanan, I. D. (1995). Phenol polymerization and precipitation by horseradish peroxidase enzyme and an additive. *Bioresource Technology*, 54(1), 5-16. doi.org/10.1016/0960-8524(95)00104-2
- Obaid, R. J., Mughal, E. U., Naeem, N., Sadiq, A., Alsantali, R. I., Jassas, R. S., ... Ahmed, S. A. (2021). Natural and synthetic flavonoid derivatives as new potential tyrosinase inhibitors: A systematic review. *RSC Advances*, 11(36), 22159-22198. doi.org/10.1039/D1RA03196A
- Olaniran, A. O., ve Igbinsosa, E. O. (2011). Chlorophenols and other related derivatives of environmental concern: properties, distribution and microbial degradation processes. *Chemosphere*, 83(10),1297-1306. doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.04.009

- Ovsejevi, K., Manta, C., Batista-Viera, F. (2013). Reversible covalent immobilization of enzymes via disulfide bonds. In *Immobilization of Enzymes and Cells, Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, 89–116. Totowa, NJ: Springer, Humana Press. doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7_7
- Paasivirta, J., Heinola, K., Humppi, T., Karjalainen, A., Knuutinen, J., Mäntykoski, K., ... Särkkä, J. (1985). Polychlorinated phenols, guaiacols and catechols in environment. *Chemosphere*, 14(5), 469-491. doi.org/10.1016/0045-6535(85)90241-3
- Parvez, S., Kang, M., Chung, H. S., Bae, H. (2007). Naturally occurring tyrosinase inhibitors: mechanism and applications in skin health, cosmetics and agriculture industries. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 21(9), 805-816. doi.org/10.1002/ptr.2184
- Peniche, H., Osorio, A., Acosta, N., De La Campa, A., Peniche, C. (2005). Preparation and characterization of superparamagnetic chitosan microspheres: Application as a support for the immobilization of tyrosinase. *Journal of Applied Polymer Science*, 98(2), 651-657. doi.org/10.1002/app.22086
- Pillaiyar, T., Manickam, M., Namasivayam, V. (2017). Skin whitening agents: Medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 403-425. doi.org/10.1080/14756366.2016.1256882
- Pradeep, N. V., Anupama, S., Navya, K., Shalini, H. N., Idris, M., Hampannavar, U. S. (2015). Biological removal of phenol from wastewaters: a mini review. *Applied Water Science*, 5(2), 105-112. doi.org/10.1007/s13201-014-0176-8
- Raper, H. S., ve Wormall, A. (1923). The tyrosinase-tyrosine reaction. *Biochemical Journal*, 17(4-5), 454. doi.org/10.1042%2Fbj0170454
- Raza, W., Lee, J., Raza, N., Luo, Y., Kim, K. H., Yang, J. (2019). Removal of phenolic compounds from industrial waste water based on membrane-based technologies. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 71, 1-18. doi.org/10.1016/j.jiec.2018.11.024

- Said, K. A. M., Ismail, A. F., Karim, Z. A., Abdullah, M. S., Hafeez, A. (2021). A review of technologies for the phenolic compounds recovery and phenol removal from wastewater. *Process Safety and Environmental Protection*, 151, 257-289. doi.org/10.1016/j.psep.2021.05.015
- Saini, A. S., Tripathi, A., Melo, J. S. (2015). On-column enzymatic synthesis of melanin nanoparticles using cryogenic poly (AAM-co-AGE) monolith and its free radical scavenging and electro-catalytic properties. *RSC advances*, 5(106), 87206-87215. doi.org/10.1039/C5RA18965A
- Sarı, M., Akgöl, S., Karataş, M., Denizli, A. (2006). Reversible immobilization of catalase by metal chelate affinity interaction on magnetic beads. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 45(9), 3036-3043. doi.org/10.1021/ie0507979
- Seo, S. Y., Sharma, V. K., Sharma, N. (2003). Mushroom tyrosinase: recent prospects. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(10), 2837-2853. doi.org/10.1021/jf020826f
- Seetharam, G. B., Saville, B. A. (2003). Degradation of phenol using tyrosinase immobilized on siliceous supports. *Water Research*, 37(2), 436-440. doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00290-7
- Sheldon, R. A., Schoevaart, R., Van Langen, L. M. (2005). Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization (a review). *Biocatalysis and Biotransformation*, 23(3-4), 141-147. doi.org/10.1080/10242420500183378
- Shi, F., Xie, L., Lin, Q., Tong, C., Fu, Q., Xu, J., ... Shi, S. (2020). Profiling of tyrosinase inhibitors in mango leaves for a sustainable agro-industry. *Food Chemistry*, 312, 126042. doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126042
- Shiekh, P. A., Andrabi, S. M., Singh, A., Majumder, S., Kumar, A. (2021). Designing cryogels through cryostructuring of polymeric matrices for biomedical applications. *European Polymer Journal*, 144, 110234. doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110234

- Stanescu, M. D., Gavrilas, S., Ludwig, R., Haltrich, D., Lozinsky, V. I. (2012). Preparation of immobilized *Trametes pubescens* laccase on a cryogel-type polymeric carrier and application of the biocatalyst to apple juice phenolic compounds oxidation. *European Food Research and Technology*, 234(4), 655-662. doi.org/10.1007/s00217-012-1676-0
- Sunna, Ç. (2021) *Lipaz ve peroksidaz enzimlerinin ko-immobilizasyonu ve endüstriyel atıkların arıtılmasında kullanılmasının araştırılması* Doktora Tezi, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Taheri-Kafrani, A., Kharazmi, S., Nasrollahzadeh, M., Soozanipour, A., Ejeian, F., Etedali, P., ... Varma, R. S. (2021). Recent developments in enzyme immobilization technology for high-throughput processing in food industries. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(19), 3160-3196. doi.org/10.1080/10408398.2020.1793726
- Tamayo, A., Aires-Trapote, A., Rubio, F., Hernaiz, M.J., Rumbero, A., Rubio, J. (2015) Effect of the surface parameters on the interaction of epoxy polymer supports with a lipase enzyme. *Polymer Bulletin*, 72(2):195–218. doi.org/10.1007/s00289-014-1267-2
- Thangaraj, B., ve Solomon, P. R. (2019). Immobilization of lipases—a review. Part I: enzyme immobilization. *ChemBioEng Reviews*, 6(5), 157-166. doi.org/10.1002/cben. 201900016
- Tripathi, A., ve Kumar, A. (2011). Multi-featured macroporous agarose–alginate cryogel: Synthesis and characterization for bioengineering applications. *Macromolecular Bioscience*, 11(1), 22-35. doi.org/10.1002/mabi.201000286
- Tüzmen, N., Kalburcu, T., Denizli, A. (2012). Immobilization of catalase via adsorption onto metal-chelated affinity cryogels. *Process Biochemistry*, 47(1), 26-33. doi.org/10.1016/j.procbio.2011.09.021
- Villegas, L. G. C., Mashhadi, N., Chen, M., Mukherjee, D., Taylor, K. E., Biswas, N. (2016). A short review of techniques for phenol removal from wastewater. *Current Pollution Reports*, 2(3), 157-167. doi.org/10.1007/s40726-016-0035-3

- Wang, F., Guo, C., Liu, H. Z., Liu, C. Z. (2008). Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase by metal affinity adsorption on magnetic chelator particles. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 83(1), 97-104. doi.org/10.1002/jctb.1793
- Wang, L., Shen, S., He, X., Yun, J., Yao, K., Yao, S. J. (2008). Adsorption and elution behaviors of bovine serum albumin in metal-chelated affinity cryogel beds. *Biochemical Engineering Journal*, 42(3), 237-242. doi.org/10.1016/j.bej.2008.07.002
- Wei, C. M., Feng, C. Y., Li, S., Zou, Y., Yang, Z. (2022). Mushroom tyrosinase immobilized in metal–organic frameworks as an excellent catalyst for both catecholic product synthesis and phenolic wastewater treatment. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 97(4), 962-972. doi.org/10.1002/jctb.6984
- Wen, Y., Li, R., Liu, J., Zhang, X., Wang, P., Zhang, X., ... Sun, B. (2020). Promotion effect of Zn on 2D bimetallic NiZn metal organic framework nanosheets for tyrosinase immobilization and ultrasensitive detection of phenol. *Analytica Chimica Acta*, 1127, 131-139. doi.org/10.1016/j.aca.2020.06.062
- Wichers, H. J., Gerritsen, Y. A. M., and Chapelon, C. G. J. (1996) Tyrosinase isoforms from the fruitbodies of *Agaricus bisporus*. *Phytochemistry*, 43, 333–337. doi.org/10.1016/0031-9422(96)00309-3
- Wilberg, K., Assenhaimer, C., Rubio, J. (2002). Removal of aqueous phenol catalysed by a low purity soybean peroxidase. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 77(7), 851-857. doi.org/10.1002/jctb.646
- Wolfe, J., Bryant, G., Koster, K. L. (2002). What is 'unfreezable water', how unfreezable is it and how much is there?. *CryoLetters*, 23(3), 157-166.
- Xu, D. Y., Yang, Y., Yang, Z. (2011). Activity and stability of cross-linked tyrosinase aggregates in aqueous and nonaqueous media. *Journal of Biotechnology*, 152(1-2), 30-36. doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.01.014
- Xu, D. Y.,ve Yang, Z. (2013). Cross-linked tyrosinase aggregates for elimination of phenolic compounds from wastewater. *Chemosphere*, 92(4), 391-398. doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.12.076

- Yahşi, A., Şahin, F., Demirel, G., Tümtürk, H. (2005). Binary immobilization of tyrosinase by using alginate gel beads and poly (acrylamide-co-acrylic acid) hydrogels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 36(4), 253-258. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2005.06.011
- Yakup Arıca, M. (2000). Immobilization of polyphenol oxidase on carboxymethylcellulose hydrogel beads: preparation and characterization. *Polymer international*, 49(7), 775-781. doi.org/10.1002/1097-0126(200007)49:7%3C775::AID-PI454%3E3.0.CO;2-O
- Yao, K., Shen, S., Yun, J., Wang, L., Chen, F., Yu, X. (2007). Protein adsorption in supermacroporous cryogels with embedded nanoparticles. *Biochemical Engineering Journal*, 36(2), 139-146. doi.org/10.1016/j.bej.2007.02.009
- Yavuz, Y., ve Kopal, A. S. (2006). Electrochemical oxidation of phenol in a parallel plate reactor using ruthenium mixed metal oxide electrode. *Journal of Hazardous Materials*, 136(2), 296-302. doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.12.018
- Zdarta, J., Staszak, M., Jankowska, K., Kaźmierczak, K., Degórska, O., Nguyen, L. N., ... Jesionowski, T. (2020). The response surface methodology for optimization of tyrosinase immobilization onto electrospun polycaprolactone–chitosan fibers for use in bisphenol A removal. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 2049-2059. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.081
- Zhu, B., ve Wei, N. (2022). Tyrosinase-functionalized polyhydroxyalkanoate bio-beads as a novel biocatalyst for degradation of bisphenol analogues. *Environment international*, 163, 107225. doi.org/10.1016/j.envint.2022.107225
- Zou, C., Huang, W., Zhao, G., Wan, X., Hu, X., Jin, Y., ... Liu, J. (2017). Determination of the bridging ligand in the active site of tyrosinase. *Molecules*, 22(11), 1836. doi.org/10.3390/molecules22111836
- Zolghadri, S., Bahrami, A., Hassan Khan, M. T., Munoz-Munoz, J., Garcia-Molina, F., Garcia-Canovas, F., Saboury, A. A. (2019). A comprehensive review on tyrosinase inhibitors. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 34(1), 279-309. doi.org/10.1080/14756366.2018.1545767

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİLİMSEL ETİK BEYANI

"TİROZİN AZ ENZİMİNİN POLİAKRİLAMİD-ALLİL GLİSİDİL ETER TEMELLİ KRİYOJELLERE İMMOBİLİZASYONU VE UYGULAMALARI" başlıklı yüksek lisans tezindeki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Dilek KATI KELEŞ

... / ... / ...

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : KATI KELEŞ, Dilek

Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Y. Lisans	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
Lisans	Ege Üniversitesi	2008

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Unvan
2013-Halen	AS ÇİMENTO SAN ve TİC. A.Ş	Kalite Kontrol Şefi
2013	İGSUS OSGB	C sınıfı İş Güvenliği Uzmanı
2012-2013	PLATİN KİMYA A.Ş	Kalite Kontrol Elemanı
2011-2012	AS ÇİMENTO SAN. VE TİC. A.Ş.	Kalite Kontrol Mühendisi