

**TİROSİNAZ ENZİMİNİN BAZI FUNGAL KAYNAKLARDAN
ÜRETİMİ VE AKTİVİTESİNE ETKİLİ PARAMETRELERİN
ARAŞTIRILMASI**

**DETERMINATION OF PARAMETERS AFFECTING
TYROSINASE PRODUCTION AND ACTIVATION FROM
SOME FUNGAL SOURCES**

DARYOUSH MAJIDI

Hacettepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliği'nin
Biyoloji Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

DOKTORA TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2012

Sevgili annem ve babama

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **BIYOLOJİ (BİYOTEKNOLOJİ) ANABİLİM DALI** 'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan (Danışman)

.....
Prof. Dr. Nilüfer AKSÖZ

Üye

.....
Prof. Dr. Emir CANSUNAR

Üye

.....
Prof. Dr. Reyhan ÖNER

Üye

.....
Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR

Üye

.....
Prof. Dr. Güven URAZ

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından 26/06/2012 tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunca/...../..... tarihinde kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Fatma SEVİN DÜZ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TİROSİNAZ ENZİMİNİN BAZI FUNGAL KAYNAKLARDAN ÜRETİMİ VE AKTİVİTESİNE ETKİLİ PARAMETRELERİN ARAŞTIRILMASI

Daryoush Majidi

ÖZ

Bu çalışmada verimli yeni bir alternatif fungal kaynaktan tirosinaz üretimi amaçlandı. İncelenen funguslar arasında *Funalia trogii*'nin en yüksek tirosinaz üreticisi olduğu saptandı ve yüksek enzim üretimi için bazı kültürel parametreler optimize edildi. Üretim ortamındaki karbon ve azot kaynaklarının tirosinaz aktivitesine etkisi incelendiğinde, glukoz ve NaNO₃'ün uygun olduğu saptandı. En yüksek enzim üretimi için kültür ortamının fizyolojik koşulları incelendiğinde (Glukoz-C, NaNO₃-N) 5:1 oranında C:N içeren pH değeri 5 olan enzim üretimi ortamında, 30°C'de, 200 rpm'de 7 gün inkübasyonun uygun olduğu görüldü. Optimize koşullarda elde edilen kaba enzim ekstresi başlangıç koşulları ile kıyaslandığında enzim üretiminde artış gözlemlendi. Üretilen kaba tirosinaz enzimi ekstresi pH, sıcaklık ve günlere göre dayanıklılığı incelendi. Enzimin 73°C'ye kadar dayanıklı olduğu saptandı. Ayrıca -20°C'de saklanmak koşuluyla 100.günde enzimin dayanıklı olduğu sonucu elde edildi. Tirosinaz enziminin reaksiyon ortamındaki pH değişikliklerine dayanıklılığı incelendiğinde pH:3,5-7 arası değerlerde, enzimin dayanıklı olduğu görüldü. Ürettiğimiz kaba enzim ekstresi bentonite immobilize edildi. Tutuklu tirosinaz enziminin günlere göre ve tekrarlı kullanımındaki dayanıklılığı incelendiğinde 8. tekrarlı kullanıma kadar dayanıklı olduğu ayrıca -20°C'de saklanmak koşuluyla 16 günlük ölçümlerde dayanıklı olduğu görüldü.

Anahtar Kelimeler: Bentonit, *Funalia trogii*, Tirosinaz

Danışman: Prof. Dr. Nilüfer AKSÖZ, Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü,
Biyoteknoloji Anabilim Dalı Bölümü,

DETERMINATION OF PARAMETERS AFFECTING TYROSINASE PRODUCTION AND ACTIVATION FROM SOME FUNGAL SOURCES

Daryoush Majidi

ABSTRACT

In this study, the objective was to produce tyrosinase enzyme efficiently from an alternative fungal source. Among the sources investigated, *Funalia troglia* was found to be the most potent tyrosinase producer and some cultural parameters were optimized in order to maximize tyrosinase production. When the effect of the carbon and additional nitrogen sources in the cultural medium on tyrosinase production was investigated, it was observed that glucose and NaNO_3 was suitable. Some physiological conditions were optimized for enzyme production and it was concluded that, incubation for 7 days at 30°C, 200 rpm of tyrosinase production medium containing 5:1 ratio of (Glucose-C, NaNO_3 -N) C:N with pH 5, was suitable. Temperature, pH and by days stabilities of the crude extract of enzyme were studied and it was concluded that crude extract of tyrosinase was stable at 73°C and pH 3,5-7 about 100 days. In the next step, crude extract of tyrosinase enzyme was immobilized onto bentonit. In addition, repeated use and daily stability of the immobilized enzyme was studied. Stabilities of immobilized crude extract of tyrosinase activity at 8. Frequently reaction and until 16. day were determined.

Keywords: Bentonit, *Funalia troglia*, Tyrosinase

Advisor: Prof. Dr. Nilüfer AKSÖZ, Hacettepe University, Department of Biology,
Biyoteknoloji Section

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca öneri ve yardımlarıyla desteğini daima sürdüren değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nilüfer AKSÖZ'e teşekkürü borç bilirim.

Tez çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübeleriyle bana katkıda bulunan Sayın Prof. Dr. Emir CANSUNAR ve Sayın Prof. Dr. Reyhan ÖNER'e teşekkür ederim.

laboratuvar çalışmalarımda büyük yardımı olan değerli arkadaşım Yusuf Doruk ARACAGÖK'e ve başta Neslihan İDİL olmak üzere diğer arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Doktora çalışmalarım süresince bana gereken sabrı gösteren, ilgi ve destekleriyle yokluklarını hissettirmeyen, her an yanımda olan sevgili anne ve babama en derin saygı ve minnetimi sunarım.

Doktora eğitimim süresince 2215 burs programı kapsamında TÜBİTAK-BİDEB tarafından desteklendiğimi bildirir, TÜBİTAK-BİDEB Başkanlığı'na teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZ	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ	1
2.1. Enzimler	3
2.2. Enzimlerin Genel Özellikleri Ve Kimyasal Yapıları	3
2.3. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler	5
2.4. Ortam pH'sı	5
2.5. Sıcaklık	5
2.6. Enzim konsantrasyonu.....	6
2.7. Substrat Konsantrasyonu	6
2.8. Zamanın Etkisi.....	6
2.9. İnhibitör.....	6
2.10. Enzimlerin Sınıflandırılması	7
2.10.1. Oksidoredüktazlar	7
2.10.2. Transferazlar	7
2.10.3. Hidrolazlar	7
2.10.4. Liyazlar	8
2.10.6. İzomerazlar.....	8
2.10.6. Ligazlar	8
2.10.7 Fenol oksidazlar	8
2.11. Enzim Üretiminde Mikrobiyal Kaynaklar	9
2.11.1. Endüstride kullanılan başlıca mikrobiyal kaynaklı enzimler.....	11
2.11.1.1. Proteaz	11
2.11.1.2. Amilaz	11
2.11.1.3. Selülaz	12
2.11.1.4. Ksilanaz	13

2.11.1.5. Lipaz.....	13
2.11.1.6. Tirosinaz	15
2.11.2. Fungal kaynaklı tirosinaz enzimi	16
2.11.3. Tirosinazın moleküler özelliği	16
2.11.4. Tirosinazın katalizlediği tepkimeler ve öngörülen reaksiyon mekanizmaları	17
2.11.5. Tirosinaz enziminin substratları ve katalizleme hızları	19
2.11.6. Tirosinaz enzimimizin optimum pH ve sıcaklık değerleri	19
2.11.7. Tirosinaz enziminin inhibitörleri ve aktivatörleri	20
2.11.8. Tirosinazın uygulama alanları	21
2.11.8.1. Tirosinazın gıda endüstrisi için önemi.....	21
2.11.8.2. Tirosinazın Tıbbi Uygulama Alanları	22
2.11.8.3. Tirosinazın çevre sorunlarının gideriminde kullanım alanları.....	22
2.12. Enzimlerin İmmobilizasyonu	22
2.12.1. İmmobilizasyon metotları	23
2.12.1.1. Adsorpsiyon	23
2.12.1.2. Kovalent bağlanma.....	24
2.12.1.3. Hapsetme	24
2.12.1.4. Enzimlerin birbirine bağlanması.....	25
2.12.2. Tirosinazın immobilizasyon çalışmaları	26
3. LABORATUVAR ÇALIŞMALARI VE YÖNTEMLER.....	28
3.1. Çalışmalarda Kullanılan Mikroorganizmalar.....	28
3.2. Tirosinaz Üretim Ortamının Hazırlanması.....	28
3.3. Enzim Taraması Ve Aktivitesinin Ölçülmesi.....	29
3.3.1. Enzim tarama testleri	29
3.3.2. Tirosinaz aktivitesinin ölçümü.....	29
3.4. Kültürlerde Üremenin Ölçülmesi.....	30
3.5. Enzim Üretimine Etki Eden Fizyolojik Koşulların Saptanması.....	30
3.5.1. Çalkalamalı ve statik inkübasyon şartlarının tirosinaz sentezine etkisinin araştırılması.....	30
3.5.2. Çalkalamalı inkübasyonda çalkalama hızının tirosinaz sentezine etkisinin araştırılması.....	30
3.5.3. Tirosinaz sentezine inkübasyon süresinin etkisi.....	30
3.5.4. Tirosinaz sentezi için uygun sıcaklığın araştırılması.....	31

3.5.5. Tirosinaz sentezi için uygun pH değerinin araştırılması	31
3.5.6. Üreme ortamına ilave edilen azot kaynaklarının tirosinaz enzimi.....	31
üretimine etkisi	31
3.5.7. Üreme ortamında NaNO ₃ miktarının, tirosinaz enzim üretimine etkisi	31
3.5.8. Üreme ortamına ilave edilen karbon kaynaklarının tirosinaz enzim üretimine etkisi	32
3.5.9. Üreme ortamında yer alan glukoz miktarının, tirosinaz enzim üretimine etkisi	32
3.5.10. Üreme ortamına farklı karbon-azot oranlarının tirosinaz enzim üretimine etkisi	32
3.5.11. Başlangıç koşulları ile optimize edilmiş koşulların tirosinaz üretimi açısından karşılaştırılması	33
3.6. Tirosinaz Enziminin Dayanıklılığı	33
3.6.1. Kaba Enzimin sıcaklık dayanıklılığının araştırılması	33
3.6.2. Kaba Enzimin pH dayanıklılığının araştırılması	33
3.6.3. Kaba Enzimin günlere göre aktivite dayanıklılığının araştırılması	33
3.7. İmmobilizasyon Çalışması	34
3.7.1. Bentonit hazırlaması	34
3.7.2. Tirosinaz enzimin tutuklanması	34
3.7.3. Kültürlerde hücre-dışı protein miktarlarının ölçümü	34
3.7.5. Tutuklanan enzimin aktivitesinin dayanıklılığı saptanması	35
3.7.6. Tutuklanan enzimin tekrarlı kullanımındaki aktivitesinin incelenmesi	35
4. SONUÇLAR	36
4.1. Uygun Mikroorganizmanın Seçimi	36
4.2. Üreme Ortamında Üreme Ve Tirosinaz Aktivitesini Etkileyen Uygun Fizyolojik Koşulların Saptanması	38
4.2.1. Çalkalamalı ve statik inkübasyon koşullarının üremeye ve tirosinaz sentezine etkisi	38
4.2.2. Tirosinaz üretimine etkili uygun çalkalama hızı	39
4.2.3. Tirosinaz üretimine etkili uygun inkübasyon süresi	39
4.2.4. Tirosinaz üretimi için uygun inkübasyon sıcaklığı	40
4.2.5. Tirosinaz üretimi için uygun pH değeri	40
4.2.6. Tirosinaz üretimine etkili azot kaynağı	42
4.2.7. Tirosinaz üretimi için uygun NaNO ₃ konsantrasyonu	42
4.2.8. Tirosinaz üretimine etkili uygun karbon kaynağı	44
4.2.9. Tirosinaz üretimi için uygun glukoz konsantrasyonu	45
4.2.10. Tirosinaz verimi açısından en uygun karbon azot oranının saptanması	45

4.2.11. Başlangıç üretim ile optimize edilmiş koşulların karşılaştırılması	48
4.3. Tirosinaz Enziminin Dayanıklılığı	49
4.3.1. Kaba enzimin farklı sıcaklıklardaki dayanıklılığı	49
4.3.2. Kaba enzimin farklı pH'lardaki dayanıklılığı.....	50
4.3.3. Kaba enzimin günlere göre aktivite dayanıklılığı	51
4.4. Bentonite tutuklu tirosinaz enzimi bulguları	51
4.4.1. Tutuklu tirosinaz enziminin dayanıklılık çalışmaları	52
4.4.1.1. Tutuklu tirosinaz'ın günlere göre aktivite dayanıklılığı.....	52
4.4.1.2. Tutuklu tirosinaz'ın tekrarlı kullanımındaki aktivite dayanıklılığı	53
5. TARTIŞMA	54
KAYNAKLAR.....	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Tirosinaz enziminin katalizlediği reaksiyonlar ve polimer ürünün oluşumu.....	18
Şekil 2.2. Tirosinazın kreşolaz aktivitesi.....	18
Sekil 2.3. Aromatik aminlerin tirosinaz katalizörlüğünde oksidasyonu.....	19
Sekil 2.4. Çeşitli immobilizasyon metotlarının semaları.....	25
Şekil 3.1. Trisonaz enzimi ile L-DOPA reaksiyonu sonrasında oluşan renk değişikliği.....	29
Şekil 3.2. Lowry protein tayin metdou standart eğrisi.....	35
Şekil 4.1. Fungusların tirosinaz aktivitesi.....	37
Şekil 4.2. Fungusların üremesi.....	37
Şekil 4.3. Çakalamalı ve statik inkübasyon koşullarının tirosinaz sentezine etkisi.....	38
Şekil 4.4. Çalkalama hızının Tirosinaz üretimine etkisi.....	39
Şekil 4.5. Tirosinaz üretimi için uygun inkübasyon süresinin.....	40
Şekil 4.6. Tirosinaz üretimi için uygun inkübasyon sıcaklığı.....	41
Şekil 4.7. Tirosinaz üretimi ve fungus üremes için uygun pH değeri.....	41
Şekil 4.8. Tirosinaz üretimi için uygun pH değeri.....	42
Şekil 4.9. Tirosinaz üretimi için uygun azot kaynağı.....	43
Şekil 4.10. Tirosinaz üretimi ve <i>F. trogii</i> üremesine etkili NaNO_3 Konsantrasyonu.....	43
Şekil 4.11. Farklı konsantrasyonlarda NaNO_3 içeren ortamlarda tirosinaz aktivitesi.....	44
Şekil 4.12. Tirosinaz üretimi için uygun karbon kaynağı.....	45
Şekil 4.13. Tirosinaz üretimi ve <i>F. trogii</i> üremesine etkili Glukoz konsantrasyonu.....	46
Şekil 4.14. Farklı konsantrasyonlarda Glukoz içeren ortamlarda tirosinaz aktivitesi ve diferansiyel sentez hızı.....	46
Şekil 4.15. Farklı oranlarda karbon ve azot içeren ortamlarda tirosinaz aktivitesi diferensiyel sentez hızı.....	47
Şekil 4.16. Tirosinaz üretimi ve <i>F. trogii</i> üremesine etkili farklı karbon ve azot oranları.....	47
Şekil 4.17. Başlangıç üretim ile optimize edilmiş koşullarında enzim üretimi ve diferansiyel sentez hızının karşılaştırılması.....	48
Şekil 4.18. Başlangıç üretim ile optimize edilmiş koşullarında enzim üretimi ve üremenin karşılaştırılması.....	48

Şekil 4.19. Tirosinaz enziminin farklı sıcaklıklarda dayanıklılığı.....	49
Şekil 4.20. Tirosinaz enziminin pH dayanıklılığı.....	50
Şekil 4.21. Tirosinaz enzimi aktivite dayanıklılığı.....	51
Şekil 4.22. Tutuklu tirosinaz'ın günlere göre aktivite dayanıklılığı.....	52
Şekil 4.23. Tutuklu tirosinaz'ın tekrarlı kullanımındaki dayanıklılığı.....	53

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Enzim immobilizasyonunda sıkça kullanılan absorbanlar ve bunların etkileşim türleri.....	26
Çizelge 4.1. Fungusların tirosinaz aktivitesi.....	36

1. GİRİŞ

Günümüzde sanayileşme ile birlikte doğal ortama yayılan endüstriyel atıkların birikimi büyük sorun teşkil etmektedir. Bu atıkların çevreye verdikleri zararları önlemek amacıyla, yapılan çeşitli bilimsel çalışmalar önem kazanmıştır. Konvansiyonel tipteki atık arıtım teknolojileri fiziko-kimyasal ve mikroorganizmal etkinliğe dayanan biyolojik süreçleri içerir. Konvansiyonel arıtım teknikleriyle kıyaslandığında enzimatik arıtımın potansiyel avantajları şunlar olacaktır; biyolojik ataklara dayanıklı kirleticilere uygulanabilmesi; düşük ve yüksek kirletici konsantrasyonlarında işlev görebilmesi; çok geniş pH, sıcaklık ve tuzluluk aralıklarında çalışabilmesi; biyokitlenin yeni ortama uyumuna bağlı olarak meydana gelebilecek gecikmelerin olmayışı; biyokitle oluşmaması nedeniyle arıtım sonrası ortaya çıkabilecek artık miktarında azalma ve sürecin kontrolünün basit ve kolay olması (Karam 1997).

Endüstriyel atıksulardaki fenollerı gidermede, kullanılan başlıca enzimler peroksidaz ve fenol oksidaz grubuna giren enzimlerdir (Karam 1997). Peroksidazlar oksidoredüktaz sınıfından enzimleri içeren bir grup olup, hidrojen peroksidi oksitleyici olarak kullanmak suretiyle fenollerı okside edebilir. Bu oksidasyon sonucunda fenoksi radikaller ortaya çıkar. Söz konusu fenoksi radikaller daha sonra çözelti içerisindeki diğer fenol molekülleriyle veya aromatik bileşiklerle tepkimeye girerek poliaromatik yapıda polimerler oluştururlar. Orijinal fenol moleküllerinden farklı olarak, bu polimerler suda çözünmeyen bileşiklerdir ve bu nedenle sucul ortamlarda çökerler (Atlow 1984).

Fenol oksidazlar oksidoredüktaz sınıfında yer alan enzimlerin oluşturduğu bir grup olup, fenolik bileşiklerin oksidasyon tepkimelerini katalizlerler. Bu enzim grubu, tirozinaz ve lakkaz tipi fenol oksidazlar olmak üzere başlıca iki gruba ayrılır (Karam 1997). Her iki enzim grubu da aktivite göstermek için moleküler oksijenin varlığına gereksinim duyar. Ayrıca, her iki enzimin de koenzimi yoktur.

Genel olarak polifenol oksidaz, fenolaz ya da kateşolaz olarak da adlandırılan tirozinaz (EC 1.14.18.1) ardışık iki tepkimeyi katalizler (Atlow 1984). Bu tepkimeler sırasıyla; (1) monofenollerin moleküler oksijen varlığında orto difenollere hidroksilasyonları (kresolaz aktivite), (2) oluşan 0-difenollerin o-kinonlar

oluşturmak üzere dehidrojenasyonları (kateşolaz aktivite) şeklinde gerçekleşir. Ardışık tepkimelerin son ürünü olan kinonlar kendiliğinden basit filtrasyon yöntemleriyle atıksulardan kolayca uzaklaştırılabilir suda çözünmeyen polimerik yapılara dönüşürler. Böylece en önemli evre kirleticileri arasında bulunan fenolik bileşikler atıksulardan kolayca uzaklaştırılabilir duruma gelirler (Atlow 1984; Sun 1992). Tirosinaz enzimi oksitleyici ajan olarak oksijeni kullanması nedeniyle, atıksulardan fenol arıtımının maliyetini peroksidazlarla kıyaslandığında azaltmasına karşın, bu enzimin halihazırda şapkalı mantarlardan yüksek maliyetli kimyasal işlemlerle üretiliyor olması, arıtım maliyeti yönünden yine olumsuz bir konum yaratmaktadır. Fermentatif koşularda filamentöz konumdaki funguslardan tirosinaz üretiminin ve bu amaçla kullanımının daha verimli ve ucuz olacağı bir gerçektir.

Bu çalışmada farklı fungus türleri arasından filamentöz üreme sırasında tirosinaz üretimi bakımından en verimli türün saptanması çalkalamalı-şişe fermentasyon tekniği kullanılarak gerçekleştirildi. Tirosinaz enziminin üretimi bakımından yüksek verimlilik gösteren suş saptandı. Enzim retimi için gerekli olan optimum fizyolojik koşullar (optimum pH, sıcaklık, karbon kaynağı, azot kaynağı ve çalkalama hızı ve süresi v.b. gibi) saptandı. Çalışmanın devamında elde edilen yüksek aktiviteye sahip enzim kaynağı tutuklama çalışmalarına dahil edildi ve bu enzimin tutukladıktan sonra dayanıklılık ve tekrarlı kullanımlardaki aktivitesi saptandı. Daha önceden belirtildiği gibi, oksitleyici ajan olarak oksijeni kullanması nedeniyle tirosinaz, arıtımın maliyetini peroksidazlarla kıyaslandığında azaltmasına karşın, hali hazırda şapkalı mantarlardan saflaştırılarak kullanılmasına bağlı olarak oldukça pahalıya mal olmaktadır. Bu nedenle, filamentöz formda üreyen funguslardan elde edilecek tirosinaz enziminin kullanılması, enzimin saflaştırılmasından kaynaklanan maliyet artışının önüne geçebileceği düşünülmektedir. (Mai et al. 2004; Levin et al. 2008).

2. GENEL BİLGİ

2.1. Enzimler

Enzimler, canlı organizmadaki biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen ve protein yapısında olan biyokatalizörlerdir. Metabolizma olarak adlandırdığımız organizmadaki biyokimyasal dönüşümlerin tümünün yürüyebilmesi enzimler sayesinde mümkün olmaktadır. Organizmadaki organik maddelerin yapımı, yıkımı, kas hareketleri ve solunum gibi fizyolojik olaylar enzimler yardımıyla yürümektedir. Enzimler günlük yaşantımızda önemli rolü olan maddeler haline gelmiştir. Bugün enzimlerden; gıda, ilaç ve kimya endüstrisinde, dericilik, boya ve temizlik maddeleri üretimi gibi özel konularda, biyoloji ve biyoteknoloji bilim dallarında, tıp, tarım ve veterinerlik alanlarında yaygın olarak yararlanılmaktadır (Kirk et al. 2002).

2.2. Enzimlerin Genel Özellikleri Ve Kimyasal Yapıları

Enzimler çok etkili ve özellikli katalizörlerdir. Enzimlerin, diğer kimyasal katalizörlere göre birçok üstünlükleri bulunmaktadır. Enzimlerin kimyasal katalizörlerden en önemli farkı spesifik olmalarıdır. Genel olarak enzimler belirli maddeler arasındaki belirli reaksiyonları katalize ederler. Biyokimyasal katalizörler, reaksiyon hızını 10^{20} 'ye kadar artırırken, diğer katalizörler 10^2 – 10^3 kadar arttırabilmektedir. Enzimler yalnızca canlı hücreler tarafından sentezlenir. Bu enzimlerin bir kısmı hücre içinde kalır ve burada fonksiyon gösterir. Bu tip enzimlere “intraselüler” (hücre içi) enzimler denir. Bazı enzimler ise hücre içinde sentezlendikten sonra hücre dışına salınır ve burada fonksiyon gösterir. Bunlara da “ekstraselüler” (hücre dışı) enzimler denir. Bazı enzimler benzer yapıda bir grup substrata etki ederken bazıları tek molekül türü üzerine etki eder. Birbirine çok benzeyen maddeleri, hatta aynı maddenin stereoizomerlerini bile dönüşüme uğratmazlar. Bu yüksek seçicilik sayesinde en basit bir hücrede bile aynı anda binlerce biyokimyasal reaksiyon meydana gelmektedir. Enzim tarafından değişikliğe uğratılan maddelere “substrat” denir. Substratlar enzimde “aktif merkez” denilen özel bir bölgeye bağlanırlar. Polipeptit zincirinin belirli kısımlarının özel katmanları ile oluşan bu aktif merkez, katalitik aktiviteden sorumludur. Enzimlerin tümü protein yapısındadır Enzimler yapısında protein dışında yabancı madde içerip içermemesine göre gruplandırılabilirler:

-Bazı enzimler yalnızca proteinden yani aminoasitlerden oluşmuşlardır. Bu tip enzimlerde protein yapı hem özgülükten hem de katalitik aktiviteden sorumludur. Örnek olarak; amilazlar, pepsin, tripsin, üreaz verilebilir.

-Bazı enzimlerin yapısında proteinin yanı sıra organik veya inorganik maddeler yer almaktadır. Protein yapısında olmayan bu maddelere “kofaktör” adı verilmektedir. Kofaktörü ile birleşmiş ve aktif halde bulunan enzimlere “holoenzim” adı verilmektedir. Holoenzimin protein kısmına ise “apoenzim” denilir. Apoenzimlerin protein yapısındaki aminoasit türleri ve dizilişleri her enzimde farklılık göstermektedir. Bu nedenle enzimin özelliğini ve özgülünü belirleyen kısım apoenzimdir. Apoenzimler tek başlarına aktivite gösteremezler, ancak koenzimle birlikteyken katalitik aktivite kazanırlar. Kofaktörler; inorganik iyonlar ve koenzimler olarak gruplandırılabilirler (De Bolster 1997) .

-Koenzimler; Bazı enzimler tek başlarına da aktivite gösterebilirken büyük bir çoğunluğunun aktivite gösterebilmesi için başka moleküllerle kompleks oluşturması gerekmektedir. Bu maddelere “koenzim”denir. Koenzimler metal iyonları veya vitamin yapısında, veya bu yapıya benzeyen organik moleküller olabilir. Reaksiyon sırasında enzimin aktif merkezine gevşek olarak bağlanırlar ve aktivite sonunda enzim molekülünden ayrılırlar. İnorganik iyonlar ise; kofaktör olarak görev üstlenen katyonlar (Ca^{+2} , Mg^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} , Cu^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} , Na^{+} , K^{+} vb.) ve anyonlar (Cl^{-} , Br^{-} , F^{-} vb.) dır. Enzimler genellikle substratlardan daha büyük moleküllerdir. Enzim molekülü üzerindeki kofaktör ve koenzimlerin yer aldığı, enzim-substrat kompleksinin şekillendiği dar bir bölge aktif merkezi teşkil eder. Enzim molekülü özel bir cep içerir; bu aktif bölge olarak tanımlanır. Aktif taraf substratı bağlayarak enzim-substrat kompleksi oluşturur. Enzim ürün yapısına çevrilir ve sonra üründen enzim ayrılır. Enzim substratı ile birleşerek bir ES kompleksi oluşturmakta, daha sonra da bu ES kompleksinden ürün oluşmakta, enzim ise reaksiyon ortamında tekrar serbest hale geçmektedir (Wagner 1975).

Aktif merkezin bazı özellikleri:

-Aktif merkez enzimin protein kısmında yer alır.

-Aktif merkez belirli çeşit, sayı ve dizilişte aminoasitlerden oluşmuştur.

-Substrat aktif merkeze H-bağları, Van-der Waals ve elektrostatik güçlerle çok zayıf olarak bağlanmaktadır.

-Bazı enzimlerin birden fazla aktif merkezi olabilmektedir.

-Aktif merkez enzimin toplam hacminin çok küçük bir bölümünü oluşturmaktadır (Boyer 2002).

2.3. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler

Enzim aktivitesini etkileyen faktörler şunlardır:

- Ortam pH'sı
- Sıcaklık
- Enzim konsantrasyonu
- Substrat konsantrasyonu
- Zaman
- İnhibitör
- Çeşitli iyonların konsantrasyonu ve özellikleri
- Işık ve diğer fiziksel faktörler

2.4. Ortam pH'sı

Enzimler katalitik etki gösterirken ortamın hidrojen iyonu konsantrasyonuna bağlı olarak aktiviteleri değişmektedir. Bazı enzimler asidik şartlarda daha aktif olmakla beraber, bazıları ise bazik şartlarda aktiftirler. Fakat çoğunlukla enzim aktivitesi nötral ortamlarda en fazla olmaktadır. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH'ya o enzimin optimum pH'sı adı verilir. Enzimatik çalışmalarda pH'yı optimumda sabit tutmak veya en azından hidrojen iyonu konsantrasyonunu elverişli durumda tutmak için tamponlar kullanılır. Optimum pH, kullanılan tamponun cinsine, özel substratın yapısına ve enzimin elde edildiği kaynağa bağlı olarak değişebilir (voet 2004).

2.5. Sıcaklık

Sıcaklık enzimatik reaksiyonları da diğer reaksiyonlarda olduğu gibi hızlandırır. Her 10 °C sıcaklık artmasına karşılık enzimatik reaksiyonun hızı 2 kat kadar artmaktadır. Ancak enzimler protein yapılı olduklarından belli bir sıcaklığın

üzerinde dayanıklılığını yitirerek denatüre olurlar. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığa optimum sıcaklık adı verilir (Jencks 1987).

2.6. Enzim konsantrasyonu

Enzimatik reaksiyonun hızı, enzimin substratına doymun olduğu koşullarda enzim konsantrasyonuna bağlı olarak artmaktadır. Ortamdaki enzim molekülü ne kadar çoksa reaksiyon o kadar hızlı yürür. Enzimin hücrede lokalize olduğu yerde yeterince substrat bulunmadığı için reaksiyon o derece yüksek düzeyde meydana gelmez. Substratın bol olduğu koşullarda enzim konsantrasyonu reaksiyon hızı ile doğru orantılıdır (Aragon and Sols 1991).

2.7. Substrat Konsantrasyonu

Substrat konsantrasyonu reaksiyon hızını belli bir süre lineer olarak artırmaktadır. Enzim substratına karşı doymunluğa ulaştığında reaksiyon hızı değişmeden devam eder. Bu durumda enzim maksimum hız ile çalışıyor demektir. Maksimum hız V_{max} ile gösterilir. Reaksiyon hızının $\frac{1}{2} V_{max}$ değerine ulaştığı zamanki substrat değerine Michaelis-Menten sabiti (K_m) denilmektedir. Enzimin substratına ilgisi ne kadar fazla ise K_m değeri o kadar küçüktür (voet 2004).

2.8. Zamanın Etkisi

Bir enzim reaksiyonun hızı belirli bir zamanda üretilen ürünün miktarı ile belirlenmektedir. Bir enzim tarafından katalize edilen bir reaksiyon sürerken reaksiyonun hızı giderek düşer. Bunun nedeni reaksiyon devam ederken oluşan ürünlerin aralarında birleşerek aksi yönde bir reaksiyon oluşturmaları, enzimin zamanla inaktive olması, reaksiyonu önleyen maddelerin teşekkül etmesi ve substratın tükenmesi gibi faktörlerdir. Bu faktörlerin etkilerinin ortadan kaldırılması için enzim çalışmaları çoğunlukla substratın yaklaşık % 10'unun sarf edildiği reaksiyonun başlangıç aşamasında gerçekleştirilir.

2.9. İnhibitör

İnhibitörler, enzimatik tepkimelerin hızını azaltan maddelerdir. İnhibitörler, substratın enzimin aktif merkezine bağlanıp, enzim-substrat kompleksinin oluşumunu önlerler.

2.10. Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzimler kullandıkları substratın veya katalizledikleri reaksiyon tipine göre adlandırılmaktadır. Enzimin etkilediği substrat ve reaksiyon tipi –az eki getirilerek adlandırılmıştır. Ancak son zamanlarda bu şekilde adlandırılmaları önemini kaybetmiştir. Yeni keşfedilen ve sayıları günden güne artan enzimler Uluslararası Biyokimya Birliği tarafından yeni bir adlandırılmaya ve sınıflandırılmaya tabi tutulmuştur. Buna göre enzim sınıfları aşağıdaki gibidir (Shen 2007):

- Oksidoredüktazlar
- Transferazlar
- Hidrolazlar
- Liyazlar
- İzomerazlar
- Ligazlar

2.10.1. Oksidoredüktazlar

Redoks reaksiyonlarını katalizler. Bu sınıf enzimlerin substratları genellikle elektron ve hidrojen vericidir. Dehidrojenazlar ve redüktazlar bu gruptandır. Oksijen, elektron veya hidrojen alıcısı ise bu durumda oksidazlar olarak isimlendirilirler. Alkol–dehidrojenaz, redüktaz, tirozinaz bu grubun örnekleridir.

2.10.2. Transferazlar

Transferazlar Verici üzerindeki bir fonksiyonel grubun alıcı substrat molekülüne taşınmasını katalizleyen enzimlerdir. Amino-transferazlar, CoA-transferazlar bu grubun örnekleridir.

2.10.3. Hidrolazlar

Ester, glikozid, peptid, C-N, C-C, C-X, P-N, asit anhidrit bağların hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Lipazlar, fosfatazlar bu grubun örnekleridir.

2.10.4. Liyazlar

Liyazlar Çift bağ oluşumunu ve çift bağa katılma reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Dekarboksilazlar, aldolazlar, dehidratazlar bu grubun örnekleridir.

2.10.5. İzomerazlar

Molekölün geometrik veya yapısal çevrilmesini katalizleyen enzimlerdir. Aminoasit rasemazlar, glukozfosfat-izomerazlar, yağ asidi cis-trans izomerazlar, fosfogluktomutazlar bu grubun örnekleridir.

2.10.6. Ligazlar

Ligazlar ATP'nin AMP ve PPI'ye parçalanmasından açığa çıkan enerjiden yararlanarak iki molekülü birbirine bağlayan enzimlerdir. Aminoasitleri aktive eden enzimler, açılCoA – sentetazlar bu grubun örnekleridir.

2.10.7. Fenol oksidazlar

Polifenol oksidazlar (PPO) bakır içeren oksidoredüktazlardır. Substratları fenolik bileşiklerdir. Substratlarını oksijen eşliğinde esmer renkli bileşiklere oksitlemektedirler. Bu olay gıda teknolojisinde “enzimatik esmerleşme olarak bilinir. Özellikle bitkilerde yaygın olarak bulunan PPO'lar hayvansal dokularda ve küf mantarlarında da bulunmaktadır (Yemenicioglu and Cemeroglu 2003). Polifenol oksidazlar iki sınıfa ayrılırlar. Tirosinazlar (EC 1.14.18.1) ve lakkazlar (EC 1.10.3.2). Her iki enzim grubu da moleküler oksijen varlığında aktif hale gelirler ve koenzim kullanmazlar (Karam and Nicell 1997). Schoenbein 1856 yılında, oksijenin oksitleyici ajan olarak kullanılarak bazı bitkilerde aerobik oksidasyonun gerçekleştiğine dikkati çekmesiyle; kimyada ilk olarak oksidazlarla ilgilenilmiştir. Bir kaç yıl sonra Bertrand, Yoshida'nın lakkaz üzerine yaptığı çalışmayı geliştirmiş ve bazı mantar türlerinde lakkaz enziminin var olduğunu bulmuştur. Bourquelot ve Bertrand birlikte yaptıkları araştırmada *Russula fortens* ve *Russula nigricans* gibi bazı mantar türlerinin ekstraktlarının renginin bekleme sırasında önce kırmızı daha sonra da koyu kahverengi veya siyah olduğunu gözlemlemişlerdir. Bourquelot ve Bertrand *R. nigricans* mantarının ekstraktından kristal halinde bir madde ayırmışlardır. Bu kristal maddenin çözeltisinin mantar ekstraktı ile temas ettirilmesi sonucunda, aerobik oksidasyonun başladığı ve ilk olarak kırmızı renkli çözeltinin ve daha sonra da melanine benzer siyah bir ürünün oluştuğu bildirilmiştir. Kristal

madde daha sonra Bertrand tarafından tirozin amino grup asidi olarak tanımlanmıştır. Lakkazın tirozinin üzerinde aktif olmadığı bulunması Bertrand'ı adı "tirosinaz" olan yeni bir oksidazı keşfettiğini anlamasına yol açmıştır. Bertrand tirosinazın p-hidroksifenil etil amin, p-hidroksifenil metil amin, p-hidroksifenil amin, p-hidroksifenil propiyonik asit, p-hidroksifenil asetik asit, p-kresol ve fenol gibi diğer bazı aromatik monohidroksi fenollerin oksidasyonunu katalizlediğini de bulmuştur. Diğer taraftan bu bahsedilen bileşiklerde hidroksi grubu bulunmadığında, bu enzim ile herhangi bir oksidasyonun olmadığı bildirilmiştir. Bu ilk enzim çalışmalarını takip eden sonraki çalışmalarda tirozin üzerine enzimin etkisi ve bitki ve hayvan pigmentasyonu ile ilgili olarak melanin oluşumu incelenmiştir. Bertrand tirosinazın önceden bilinen diğer iki oksidaz enzimi olan lakkaz ve peroksidazdan farklı olarak tirozinin oksidasyonunu katalizlediğini bildirmiştir. Ayrıca biyolojik ürünlerde tirozinin bulunup bulunmadığının belirlenmesinde bu enzimin kullanılabileceği saptanmıştır (Nelson and Dawson 2006). Bertrand'ın tirosinaz ve lakkaz ile ilgili yaptığı araştırmaların ardından, polifenol oksidazlar üzerine yapılan çalışmalar oldukça artmıştır. Tirosinaz afinite kromatografisi ile saflaştırılan ilk enzimdir ve oksijeni organik bir molekülün (fenol) yapısına doğrudan katabilme özelliğine sahip enzimler arasında da ilk tanımlanan enzimdir.

2.11. Enzim Üretiminde Mikrobiyal Kaynaklar

Enzimler, hücrelerde biyokimyasal reaksiyonları katalize eden protein yapısında moleküllerdir. Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere günlük ve ekonomik hayata girmiştir. Her enzim için aktivitelerinin maksimum olduğu pH değerleri vardır. Bu değerlerin üzerinde ve altında aktivite düşer. Bununla beraber bütün enzimlerin pH – aktivite eğrileri aynı şekilde değildir (Bhat 2000). Yüksek sıcaklıklarda biyoteknolojik işlemleri gerçekleştirmek pek çok fayda sağlamaktadır. Sıcaklığın artırılması organik bileşiklerin çözünürlüğü ve biyolojik olarak kullanılabilmek açısından önemli etkilere sahiptir. Sıcaklığın artması beraberinde viskozitenin düşmesini ve organik bileşiklerin difüzyon katsayısının artmasını da beraberinde getirmektedir. Sonuç olarak küçük alanlarda yüksek reaksiyon hızı gerçekleştirilmektedir (Niehaus ve ark. 1999). Enzimler ile katalizlenen reaksiyon 0 – 40 °C arasında reaksiyon hızı yükselir. Fakat 40 °C'de enzim zarar görmeye başlar. Böylece reaksiyon yavaşlar ve 60 °C'de enzim tamamen bozular. 40 °C sıcaklık genellikle enzimler için

optimum ısıdır (Bhat, 2000). Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olmaları, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha istikrarlı ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleridir (Wiseman, 1987). Bu mikroorganizmalar yalnızca enzim üretme yeteneklerine göre değil, mikroorganizmaların toksik ve patojen olmamasına göre de seçilmiştir. Günümüzde endüstride mikrobiyal kaynaklı enzimlerin kullanımı artmıştır (Demain and Solomon 1981).

Ekstremofilik mikroorganizmalar; volkanların yüksek sıcaklıklarında, kutupların düşük sıcaklıklarında, çok düşük ve çok yüksek pH değerlerinde (pH 0-3 veya pH 10-12) veya çok yüksek tuz konsantrasyonlarında (%5-30) yaşamak için adapte olmuşlardır (Niehaus ve ark., 1999). Bu şekilde farklı ekolojik koşullarda yaşayan mikroorganizmalar termofilik, asidofilik, alkalifilik ve halofilik bakteriler şeklinde sınıflandırılmıştır (Zeikus 1979). Buralarda yaşayan termoasidofilik ve alkalifilik bakterilerden elde edilen enzimler aşırı pH ve sıcaklık koşullarına dayanıklı olduğu için endüstriyel alanda yoğun olarak kullanılmaya başlanmıştır (Kindle 1983). Ticari öneme sahip olan enzimlerin çoğu, hidrolazlar şeklinde tanımlanmakta olup, mikrobiyal kökenlidir. Bu enzimlerin çoğu ekstrasellüler olarak bulunur ve yüksek moleküler ağırlığa sahip substratlarla görev yaparlar. Ekstrasellüler enzimler, besiyeri ve hücre duvarının dışı ile bağlantı halinde olan enzimler olarak tanımlanır (Madsen 1973; John 1998). Bugüne kadar 2000'den fazla enzim tanımlanmış ve bunlardan yaklaşık 100 tanesi ticari olarak kullanıma uygun bulunmuştur. Fakat günümüzde bunlardan sadece 18 tanesi endüstriyel amaçla üretilmektedir (Zeman 1985). Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle biyoteknolojinin endüstriyel enzimler ile ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar daha da önem kazanmaktadır. Özellikle son yıllarda stratejik alan şeklinde değerlendirilen rekombinant DNA teknolojisinden yararlanılarak enzim üretimi büyük boyutlara ulaşmış ve kullanımı giderek yaygınlaşmıştır (Gessesse 1998).

2.11.1. Endüstride kullanılan başlıca mikrobiyal kaynaklı enzimler

2.11.1.1. Proteaz

Proteazlar enzimlerin oldukça karmaşık bir grubunu oluştururlar ve oldukça farklı fizikokimyasal ve katalitik özelliklere sahiptirler. Proteaz sentezinin hücresel kontrolünden sorumlu mekanizma henüz tam olarak bilinmemekle beraber alkali proteazların üretimi amino asit veya amonyum gibi hızlı bir şekilde metabolize edilebilen azot kaynakları ile baskılanmaktadır. Diğer ortam bileşenleri küçük şekerler ve mineraller enzim sentezini etkilemektedir. Potansiyel proteaz kullanımı ve maksimum enzim üretimi ile endüstriyel işlemlerin maliyetini düşürmek amaçlanmaktadır (Mabrouk. S.S. and M.S. 1998; Kaur 2001) Alkali proteazlar, bakteri, küf, maya gibi çeşitli kaynaklardan elde edilse de, Alkalifilik Bacillus biyoteknolojide en fazla kullanılan mikroorganizmadır, çünkü çok geniş çeşitli ortamlardan izolasyonu nispeten kolaydır (Singh 2000). Bununla birlikte Bacillus, hem kompleks hem de sentetik besiyeri gelişebilmektedir. Termofilik ve alkalifilik Bacillus tarafından üretilen alkali proteazlar yüksek sıcaklık ve pH'ya dayanıklıdır (Johnvesly 2001); Ayrıca Bacillus türleri post-eksponansiyal ve durgunluk fazlarında da ekstrasellüler proteazlar üretebilmektedir (Mabrouk. S.S. and M.S. 1998; Singh 2000).

2.11.1.2. Amilaz

Karbohidrazların en önemli kaynağını Bacillus oluşturmaktadır. Bir karbohidraz olan α -amilaz enzimi ticari olarak kullanılan ilk enzimdir (Radley 1976) . α -amilaz enzimi, nişasta molekülündeki α -1,4 bağlarını parçalayarak glikoz, maltoz, maltotrioz ve α -limit dekstrinlerin oluşumunu sağlar. Nişasta, çok sayıda glikoz molekülünün farklı şekillerde bağlanmasıyla oluşmuş polisakkarit özellikte bir bileşiktir. Bazı bakteriler ve mantarlar tarafından üretilen α -amilaz, β -amilaz, glikoamilaz ve glikoizomeraz gibi enzimler nişastayı parçalama yeteneğine sahiptirler (Lee 1996). Termostabil α -amilazın uygulama alanı oldukça genişlemiş ve çeşitlenmiştir. Bu enzimler tekstil ve kâğıt endüstrisinde, nişastanın sıvılaştırılmasında, ekmek, glikoz ve früktoz şurupları ve tutkal üretiminde, alkol fermantasyonunda kullanılmaktadırlar (Bailey 1987). Bira, damıtma, fırıncılık ve tekstil endüstrisinde kullanılan, Bacillus ve Aspergillus tarafından üretilen, ayrıca arpa ve buğday maltında da bulunabilen enzimler, amilaz ve endo β -glukanazlardır

(Demain and Solomon 1981) . Tekstil endüstrisinde dokuma sırasında ipliklerin sağlam ve düzgün olması ve kopmaması için iplikler nişasta içeren bir çözelti ile muamele edilmektedirler. Bu işleme haşıllama adı verilir. Kumaş dokunduktan sonra, kumaştaki fazla nişastanın uzaklaştırılması gerekir. Bu işleme de haşıl alma adı verilmektedir. Haşıl alma ajanı olarak da yaygın olarak α -amilaz enzimi kullanılmaktadır (Tarakcioglu 1979). Gıda endüstrisinde, nişastanın α -amilaz enzimi ile hidrolize edilmesi sonucu açığa çıkan ürünler, yaygın şekilde kullanılmaktadır. α -amilaz enzimi ekmekçilikte, ekmeğin bayatlamasını geciktirmesinden ve raf ömrünü uzatmasından (2-3 gün) dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır. Meyve suyu endüstrisinde de uygulama alanı bulan enzim, özellikle elma ve armut sularının berraklaştırılmasında kullanılmaktadır. Meyveler tam olgunlaşmadan toplandığında meyvede hala nişasta bulunduğu için meyve suyunda bulanıklık meydana gelmektedir. Bu sorun, ortama α -amilaz ilave edilerek giderilmektedir (Ekşi 1988).

2.11.1.3. Selüloz

Selüloz, bitki biokütlesinin yaklaşık % 40'ını oluşturmaktadır. Yaklaşık 15000 glikoz biriminin β -1,4- glikozidik bağlar ile linear bir şekilde bağlanması ile oluşur. Selülozun suya karşı yüksek çekiciliği olmasına rağmen, suda hiç çözünmez. Selüloz glikoza, en az üç farklı enzimin sinerjistik çalışması ile hidrolize olabilir. Bu enzimler; endoglukanaz, ekzoglukanaz ve β -glukosidaz'dır (Niehaus et al. 1999). Selülozu hidrolize eden enzimler geniş çapta mantar ve bakterilerden elde edilmektedir. Böyle enzimler çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda kullanılmaktadır. Ticari olarak en çok kullanılan selüloz *Trichoderma sp.* (Teeri et al. 1998) tarafından üretilmektedir. Ayrıca selülozlar *Aspergillus*, *Penicillium*, *Basidiomycetes* ve *Bacillus* suşlarından elde edilmektedir (Tomme et al. 1995; Ito 1997). Deterjanlarda selüloz varlığı renklerin canlanmasına, yumuşamasına ve partikül halindeki toprağın uzaklaşmasına neden olmaktadır. Ayrıca selüloz kot pantolonların biyolojik olarak taşlanması kullanılmaktadır (Niehaus et al. 1999). Selülozın diğer kullanım alanları, selülozik biyokütlenin ve yemlerin besin değerini ve sindirilebilirliğini artırmak, zirai ve endüstriyel atıkların enzimatik sakkarifikasyonudur (Niehaus et al. 1999).

2.11.1.4. Ksilanaz

Bitki hücre duvarları mikroorganizmaların canlı bitki dokusuna geçişini engellemek için bir bariyer meydana getirmektedir (Gamerith 1992). Doğal olarak bulunan lignoselülozik bitki biyokütlesinin içeriğinin % 20-30'unu heterojen polisakkaritler olan ve selülozla ilişkili bir şekilde bulunan hemiselülozik materyaller oluşturur. Biyokütle, dünyanın yakıt ihtiyacını karşılayan ve yeterince kısa bir döngüye sahip olan alternatif doğal kaynaklardır. Ksilan, yüksek bitkilerin hücre duvarının hemiselülozik kısmının temel bileşenidir ve yüksek potansiyelde kullanışlı son ürünlere parçalanabilen ikinci en bol kaynaktır (Yang 1995; Salles 2000). Pek çok bakteri ve mantar ksilanı sindirmek için ksilanaza ihtiyaç duyar. Bu nedenle patojenler ve saprofitler hücre duvarı parçalayan enzimler üretmektedirler (Gamerith 1992; Salles 2000). Çevresel düzenlemeler kâğıt ve kâğıt hamuru endüstrisinde ağartma işleminde klor kullanımını sınırlamıştır (Yang 1995). Pek çok bakteri ve mantarın ksilanaz üretimi için çalışılmış olmasına rağmen bunlardan sadece birkaçı alkalifiliktir. İlk ksilanaz ile ağartma çalışmaları mantar ve mayaların bilinen enzimlerinin kullanımına odaklanmıştır. Ancak bunların aktivite gösterdikleri optimum pH asidiktir. Ağartma işlemi ise güçlü alkali koşullar altında gerçekleştirilmektedir. Bu nedenle alkali koşullar altında enzimatik ağartma işleminde fonksiyon gösterebilmesi, enzim için oldukça önemli bir karakteristiktir (Puchart 1998). Termostabil alkali ksilanazların kullanımı enzimle kâğıt hamuru ağartma için pH ve sıcaklık ayarlamalarını oldukça indirgeyerek önemli derecede teknik ve ekonomik avantaj sağlamıştır. Yüksek miktarlarda bulunurlar. Bu nedenle, ksilanaz atık sudaki ksilan'ı ksiloza dönüştürülmesi için kullanılır. Enzimatik hidrolizin etkili işlemlerinin geliştirilmesi hemiselülozik atıkların muamelesinde yeni umutlar ortaya çıkarmıştır (Wong 2000).

2.11.1.5. Lipaz

Lipazlar, yağlar ve yağ asidi esterlerini hidroliz ederler. Enzim, emülsiyonun yağ-su geçiş fazında katalizi gerçekleştirir ve enzim reaksiyonunun hızı, oluşan yüzey alanına bağlıdır. Lipazlar yağ asitlerinin zincir uzunluğu, doyma derecesi, yağ asidinin pozisyonu ve substrat'ın fiziksel durumuna uygun spesifiklik gösterirler. 4-10 C atomlu yağ asitleri daha uzun C zincirli yağ asitlerinden daha hızlı bir şekilde hidroliz olarak yağın yapısından ayrılır ve serbest hale geçerler (Abbas 2002).

Lipolitik enzimlerin aktivitesi süt endüstrisinde önemlidir. Lipazlar tereyağına aroma kazandırmada, kolata endüstrisinde, kremalarda, karamellerde kullanım alanına sahiptir. Margarinler, fırın ürünleri ve bitkisel ürünler gibi ürünlerde lipazla modifiye edilmiş tereyağı ürünleri aroma geliştirici olarak kullanılmaktadır. Lipazlar bakteri, maya ve kfleri içeren mikrobiyal flora tarafından bol miktarda üretilmektedir. Lipazlar gıda endüstrisinde, biyomedikal uygulamalarda, biyosensörler ve pestisitlerin yapımında, deterjan ve deri sanayiinde, evre yönetiminde, kozmetik ve parfüm sanayiinde uygulama alanları bulmaktadır. Endüstriyel olarak en yaygın kullanılan lipaz üreticisi mikroorganizmalar; *Candida sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Rhizopus sp.*'dir. Son yıllarda biyoteknoloji alanında lipazların kullanımında hızlı bir artış gözlenmektedir. Bu nedenle lipazların aşırı üretimini sağlamak amacıyla yönlü mutasyonlar yardımıyla suş geliştirme çalışmalarına ağrılık verilmiştir. Kıyafetlerimizi kirleten maddelerin başında proteinler, yağlar ve nişasta gelir. Bu lekeleri yüksek sıcaklıkta kimyasal deterjanlar yoluyla gidermek mümkünse de, enzimlerin kullanılması düşük sıcaklıkta ve daha az mekanik enerji ile istenen temizliği sağlar. Ayrıca imen, kan, süt ve ter lekelerini çıkarmakta biyolojik olmayan deterjanlara göre çok daha etkilidir. Deterjanlarda kullanılan enzimlerden proteazlar yumurta, kan gibi lekelerdeki proteinleri parçalar; lipaz yağ lekelerini, amilaz ise nişasta bazlı lekeleri çıkartmakta etkilidir. Çamaşırların yıpranmasıyla oluşan sellz fibriller ise, selülaz enzimi ile parçalanarak çamaşırların daha yumuşak olması ve renklerini koruması sağlanır (Hiol 2000). Lipaz enzimi dericilikte de kullanılan enzimlerden biridir. Bu enzim, yalnız derinin yüzeyindeki değil, içindeki yağları da temizleyerek, deriyi tabaklama ve boyama gibi işlemler için daha uygun hale getirir. Deriler işlenirken bu amaçla bazı proteinler parçalanıp, deriden uzaklaştırılır. Deriye ne derecede esneklik kazandırılacağı ise, derinin kullanılacağı alana bağlıdır. Lipaz enzimi, unda bulunan %1-2 civarındaki lipid (yağ) içeriğine etki etmektedir. Bu enzim içinde kullanım miktarı ve tipi oldukça önemlidir. Örneğin, yüksek miktarlarda kullanımda hamur özellikleri açısından sorunlar yaşanmasına neden olmaktadır. Öte yandan uygun lipaz tipinin seçilmesi de önemlidir. Unlara uygun lipaz tipinin ilavesi; Hamurun işlenebilirliğinde kolaylık, hamur stabilitesinde artış, ekmek içi yumuşaklık, ekmek hacminde artış sağlar.

2.11.1.6. Tirosinaz

Tirosinaz (EC 1.14.18.1) polifenol oksidaz, monofenol oksidaz, fenolaz veya katekolaz olarak da bilinir. Doğada çok yaygın olan tirosinaz, substrat olarak tirozin (monohidroksifenilalanin) ve dihidroksifenilalanine karşı özgülük gösterir. (Wasserman 1995). Tirosinaz doğada çok yaygındır. Daha çok bitkilerde bulunmasına rağmen, mikroorganizmalarda genellikle de funguslarda ve bazı hayvan organlarında bulunur (Vamos-Vigyazo 1981). Yapılan araştırmalar özellikle mantar, yumru patates, şeftali, elma, muz, avokado, çay yaprakları, kahve tohumları ve tütün yapraklarında diğer kaynaklardakine göre daha yüksek konsantrasyonlarda olduğunu göstermiştir (Witkop 1985) . Ayrıca kayısı, yabani gül, enginar, yabani pirinç, ıspanak, yonca, buğday, yulaf, bezelye, şeker kamışı yaprağı, bakla yaprakları, fasulye, domates, mısır yaprakları , üzüm, armut, zeytin, gibi meyve ve sebzelerde de tirosinaz'ın olduğu tespit edilmiştir (Vamos-Vigyazo 1981; Oktay 1995). Bu yapılan çalışmalar doğrultusunda tirosinaz enziminin muhtemelen bütün bitkilerde bulunduğu şeklinde bir genellemeye gidilmesi yanlış olmaz. Bitki hücrelerinde enzimin miktarı ve dağılımı meyve veya bitkilerin türüne, yaşına ve olgunluğuna bağlıdır. Yeşil yapraklarda enzimin büyük bir bölümü kloroplastlardadır. Patates yumrusunun hemen hemen bütün hücrel fraksiyonlarda protein miktarıyla orantılı bir değerde tirosinaz enzimi içerdiği bulunmuştur. Taze elmada ise kloroplast ve mitokondrilerde toplanmıştır. Yine enzimin üzümün kabuğunda üzümün öz suyundan veya etli kısmından daha yüksek olduğu bulunmuştur. Tirosinaz enzimi elmanın bütün kısımlarında belirlenmesine rağmen elma ve armudun her ikisinin suyu tirosinaz aktivasyonundan hemen hemen yoksundur ve tirosinaz neredeyse tamamen posada kalmaktadır. Benzer sonuç on altı şeftali, üç kiraz ve üç erik kültüründe de bildirilmiştir. Kloroplast ve mitokondri fraksiyonlarından elde edilen enzimin substrat spesifikliğı de farklıdır (Vamos-Vigyazo 1981). Bitkilerdeki tirosinaz içeriğı tarımsal tekniklerden de etkilenir (örneğin seker kamışı yapraklarında aktivite düzeyi, toprak eser element olarak bakır ile muamele edildiğinde artar) (Vamos-Vigyazo 1981). Tirosinaz bitkisel dokularda öncelikle inaktif formlar halinde sentezlenmekte ve zamanla çeşitli etkenlerle, örneğin dokuda doğal olarak bulunan proteazlar veya bir takım solunum metabolitlerince aktif hale getirilmektedirler. Bu nedenlerle bitkisel dokularda çoğu zaman bu enzimin bir

kısmı inaktif formda, bir kısmı ise aktif formda bulunmaktadır. Örneğin aktif formdaki enzimlerin, inaktif formdakilere oranı; ıspanaklarda 1:2, marullarda 2:1 ve domateslerde 1:1 olduğu halde bazı bakla, fasulye ve bezelye çeşitlerinde tüm tirosinaz enzimlerinin inaktif formda bulunabildiği belirlenmiştir (Cemeroğlu, B., Yemenicioğlu, A 2001). İnsanlarda dâhil olmak üzere hayvansal organizmaların özellikle de deri, saç ve göz pigmentlerinde bulunur (Witkop 1985). Onslow, siyah ırk tavşanların derilerinde; Gessard, mürekkep balığının mürekkep kesesinde; Pinhey, bazı kabuklu hayvanların kanında; Bhagvat ve Richter eklem bacaklıların kanında tirosinaz enzimin var olduğunu bildirmişlerdir. Arnow derinin güneş ışığı ile bronzlaşmasının tirosinaz etkisiyle olduğunu bildirmiştir (Nelson and Dawson 2006). Tirosinaz böceklerdeki dış iskelet oluşumunda da önemlidir. (Wada et al. 1995).

2.11.2. Fungal kaynaklı tirosinaz enzimi

Tirosinaz enziminin, Funguslarda, spor üretimi ve dayanıklılığı ayrıca virölans faktörlerinde önemli rolü olduğu gösterilmiştir (Kurahashi Y 1998). Fungal kaynaklı, özellikle *Basidiomycete* olan *Agaricus bisporus* tirosinaz üzerinde çalışmalar hız kazanmıştır (Robb DA 1981). Özellikle bu fungusta depolanması sırasında oluşan kararmalar çalışmalara önem kazandırmıştır (Jolivet S 1998). *Neurospora crassa* (Kupper U 1989; Kanda K 1996), *Lentinula edodes* (Kanda K 1996) ve *Aspergillus oryzae* (Nakamura M 2000) fungusları üzerinde yapılan çalışmalar, Tirosinaz enziminin biyokimyasal ve moleküler yapısı hakkında yeni bakış açıları ortaya çıkartmıştır.

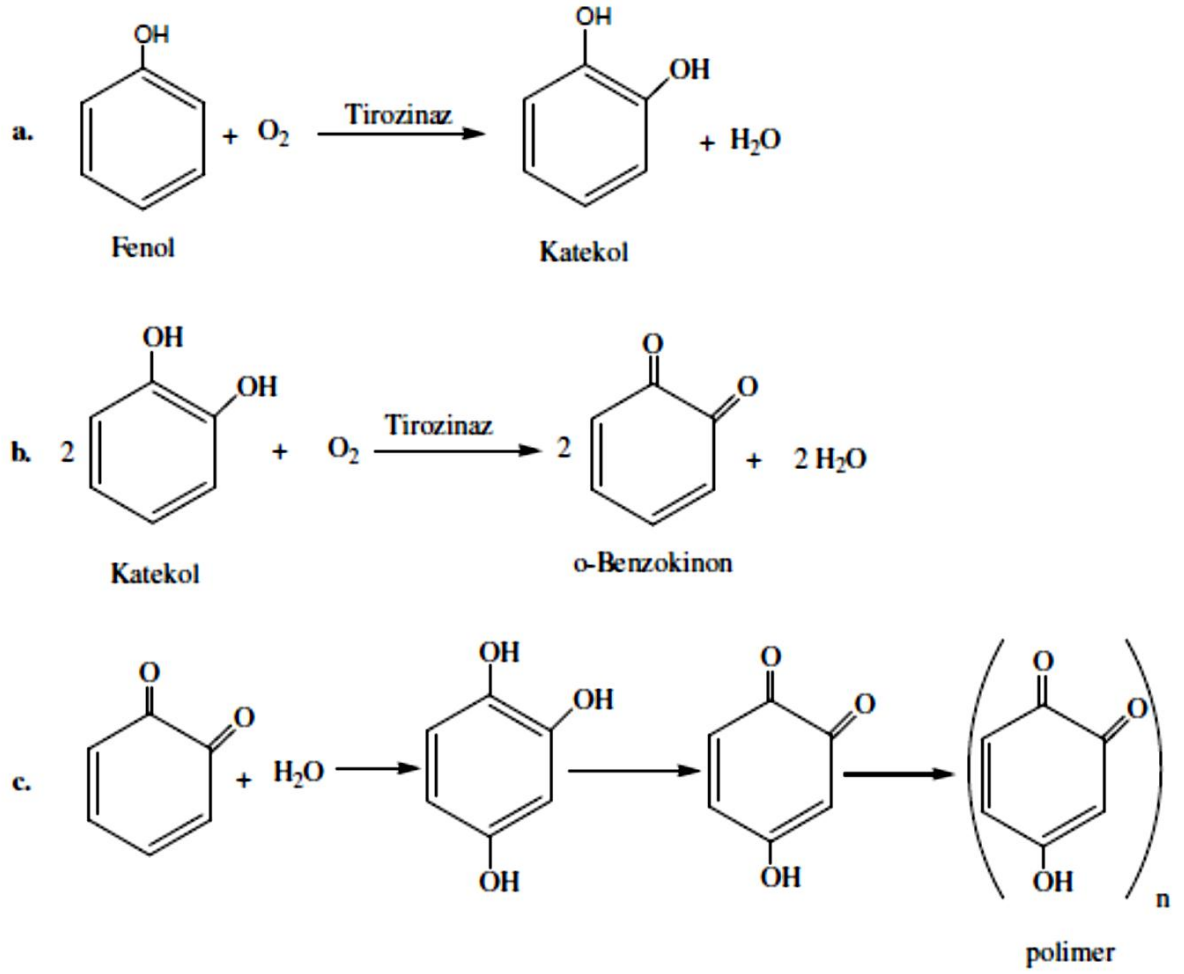
2.11.3. Tirosinazın moleküler özelliği

Tirosinaz oligomerik yapıya sahip bir enzimdir. Bu yapıyı oluşturan alt birimlerin sayısı enzimin kaynağına göre farklılık gösterir. *Agaricus bisporus* tirosinazının molekül ağırlığı ayırma metotlarına göre değişmekle birlikte, minimum 26000 – 32000 D ve en yüksek olarak ise 120000 – 128000 D arasında olarak saptanmış ve genel olarak molekül ağırlığı 128000 D. olarak bildirilmiştir (Strothkamp et al. 1976). Tirosinazın moleküler ağırlığı 30000 D dolaylarında olan ve her biri birer bakır atomu içeren özdeş 4 alt kısımdan oluştuğu ileri sürülmektedir. Bu görüşü destekleyen deneyler Jolley ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (Jolley Jr et al. 1974; Strothkamp et al. 1976). *S.nigrifaciens*'den saflaştırılan her bir molekül

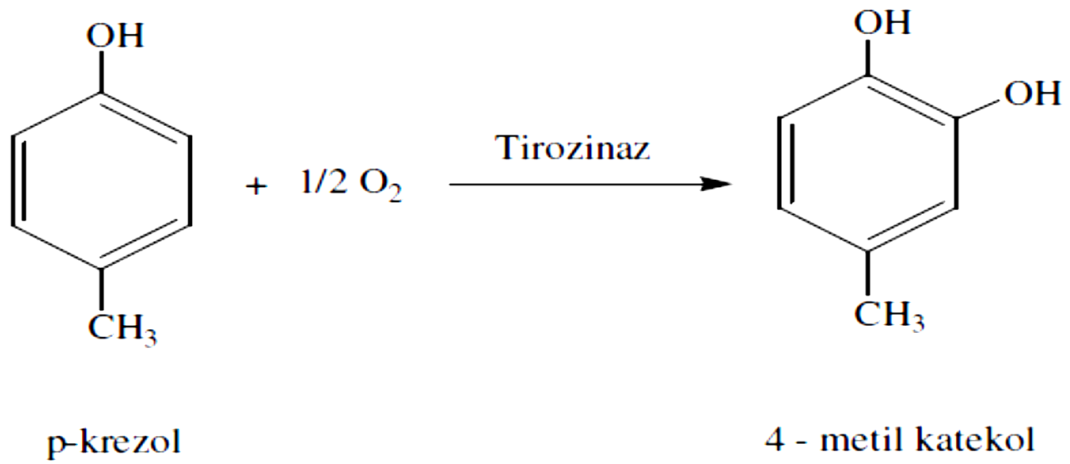
başına 1 bakır atomu içeren tirosinazın molekül ağırlığı 18000 D iken *S. glaucescens*'den saflaştırılan tirosinazın molekül ağırlığı 29000 D olarak bildirilmiştir (Mayer 2006). Araştırmalar fungal kaynaklı tirosinazında bir çift bakır atomu içerdiğini göstermiştir. Aktif merkezdeki bakır atomlarının sayısı mekaniksel ve fonksiyonel önem taşımaktadır (Strothkamp et al. 1976). SDS-akrilamit jel elektroforezi ile yapılan bir çalışmada fungustan elde edilen tirosinazın molekül ağırlığı 43000 D olan ağır (H) ve 13400 D olan hafif (L) iki tip polipeptit zincirine sahip olduğu ve bunların aminoasit bileşiminin farklı olduğu gösterilmiştir. Ekstratlarda biri 120000 D moleküler ağırlığında L2H2 yapısına sahip, diğeri 69000 D moleküler ağırlığında L2H yapısında olan 2 bakır atomlu formu bulunduğu gösterilmiştir. Bu 2 yapıdan L2H2 kreşolaz ve katekolaz aktivitelerine sahip değilken, L2H bu aktiviteleri gösterebilmektedir (Mayer 2006).

2.11.4. Tirosinazın katalizlediği tepkimeler ve öngörülen reaksiyon mekanizmaları

Tirosinaz aktif merkezinde bakır bulunan ve ardışık iki farklı reaksiyonu katalizleyebilen bir enzimdir. Bu reaksiyonlar şekil 2.1.'de gösterilmiştir. Şekil 2.1.a'da monofenollerin moleküler oksijenle O-difenollere hidroksillenmesidir. Şekil 2.1.a'da substrat olarak krezol kullanılması halinde aktiviteye kreşolaz aktivitesi denir. Kreşolaz aktivitesi şekil 2.2.'deki gibi yazılır. Şekil 2.1.b. O-difenollerin oksijenle O-kinonlara yükseltgenmesidir. Bu enzimatik aktiviteye de katekolaz aktivitesi denir (Jerzy Dec 1995; Wasserman 1995). Kinonlar çok kararsızdır, şekil 2.1.c.'de gösterildiği gibi reaksiyonlar hızla devam eder ve enzimatik olmayan bir polimerleşmeye yol açar. Farklı kaynaklardan izole edilen tirosinaz değişik oranlarda olmak üzere her iki aktiviteyi de gösterebilmektedir. Bu oranlar izolasyon ve saflaştırma sırasında veya fiziksel işlemlerle değişebilir ve bazen kreşolaz aktivitesi tamamen kaybedilebilir. Çay yaprağı, tütün, hintkirazı, muz, armut ve tatlı kirazdan izole edilen tirosinaz enzimi, kreşolaz aktivitelerini kaybederken; patates, elma, seker pancarı yaprağı, bakla ve mantar gibi çoğu kaynaktan izole edilen tirosinaz enzimi her iki aktiviteyi gösterir. Tirosinaz substratlarıyla reaksiyona girmemiş halde iken %85 met tirosinaz, %15 oksi tirosinaz halindedir. Reaksiyon sırasında bunlar deoksi tirosinaz üzerinden birbirlerine dönüşerek katalizör görevlerini yerine getirirler (Andrawis and Kahn 1990).



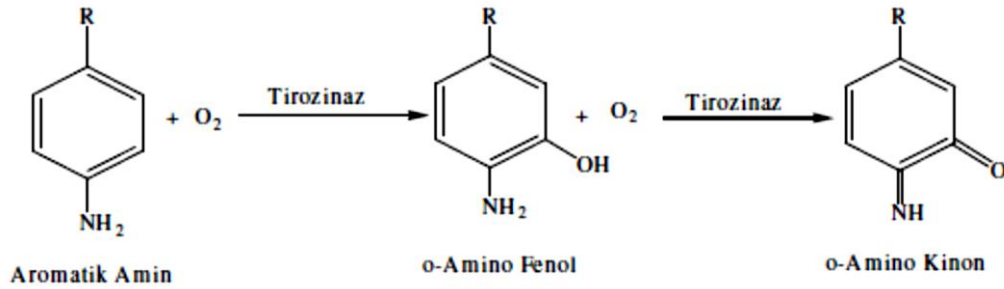
Şekil 2.1. Tirozinaz enziminin katalizlediği reaksiyonlar ve polimer ürünün oluşumu



Şekil 2.2. Tirozinazın kreşolaz aktivitesi

2.11.5. Tirozinaz enziminin substratları ve katalizleme hızları

Tirozinazın substratları başta tirozin, katekol ve L-DOPA olmak üzere katehin (3-hidroksi flavan), sinamik asitsterleri, klorojenik asit, 4-metil katekol, p-kresol, p-hidroksi ve 3,4-dihidroksi fenilpropiyonik asit, kafeik asit ve aromatik aminler olarak sıralanabilir. Bunlardan tirozin ve L-DOPA hayvan kaynaklı tirozinaz için özgül substratlar iken, diğer kaynaklardan elde edilen (fungus ve yüksek yapılı bitkiler) tirozinaz, tüm substratlarını etkileyebilmektedir (Nelson Durán 2000). Şekil 2.3'te bir aromatik aminin tirozinaz ile oksidasyonu gösterilmektedir.



Şekil 2.3. Aromatik aminlerin tirozinaz katalizörlüğünde oksidasyonu

Tirozinaz ayrıca klorofenollerin de hidrosillenmesi ve daha sonra da oksitlenmesi reaksiyonlarını da katalizleyebilir. Oluşan kinon bileşiği ise polimerleşecektir. Böylece toksik bir bileşik olan klorofenol polimerleşerek çökecek ve ortamdan basit filtrasyon yöntemleriyle uzaklaştırılabilecektir (Jerzy Dec 1995).

2.11.6. Tirozinaz enzimimizin optimum pH ve sıcaklık değerleri

Tirozinaz enziminin optimum pH'sı enzimin kaynağına ve substrata göre çok geniş bir aralıktadır ve genellikle pH 4,0 ile 7,0 arasında farklılıklar göstermektedir. Birkaç kaynaktan elde edilen tirozinaz enzimiyle yapılan araştırmalarda pH 4,0'ın altındaki pH değerlerde enzimin inaktif olduğu bildirilmiştir. Patatesten v.s nin oluşturduğu tirozinaz enzimi, substrat olarak pirogallol ve klorojenik asit kullanıldığında pH 5,0'da inaktif iken, mandalınadan elde edilen tirozinaz enzimi 6,0'ın altındaki pH değerlerinde pirogallolu oksitleyememektedir (Vamos-Vigyazo 1981). Tirozinaz enziminin sıcaklığa dayanıklılığı da optimum pH, optimum sıcaklık ve substrat spesifikliğı gibi enzimin izole edildiğı kaynağına göre de değişir. Tirozinaz enzimi sıcaklığa karşı çok dayanıklı değildir. Dokularda veya çözeltilerde bulunan tirozinaz enzimi 70-90 °C'lere kısa bir süre maruz kaldığında katalitik fonksiyonlarını tamamen ya da kısmen kaybetmektedir (Vamos-Vigyazo 1981).

2.11.7. Tirosinaz enziminin inhibitörleri ve aktivatörleri

Tirosinazın inhibisyonu ile enzimatik kararmanın önlenmesi çoğu kez bir arada ele alınmaktadır. Ancak kararma sadece enzimin inaktif olmasıyla değil aynı zamanda reaksiyon için gerekli iki substrattan birinin (O_2 veya fenolik bileşik) uzaklaştırılmasıyla da önlenabilir. Meyve ve sebzelerde çoğu kez enzimatik reaksiyonlara bağlı oluşan kararma istenmeyen bir durumdur. Tirosinaz enziminin kararmaya sebep olacak oksidasyonları katalizlemesini önlemek amacıyla tirosinaz enzimi inhibitörleri hakkında detaylı çalışmalar yapılmış ve bu çalışmalar halen de devam etmektedir. Siyanür, karbon monoksit, sodyum dietil-ditiyokarbamat (DICEA), askorbik asit, azit ve potasyum metil ksantat gibi metallerle kompleks oluşturan ligandlarla tirosinazın prostetik grubunda bulunan bakırın şelat oluşturması sonucu tirosinaz inhibisyona uğrar. Florür, azit ve borat gibi inorganik iyonların da tirosinazı inhibe ettikleri görülmüştür. Bakladan elde edilen tirosinaz enziminde florür yarışmasız inhibitörken, azit karışık tip inhibitördür. Borat'ın da yarışmalı inhibitör olduğu gösterilmiştir. Polivinilpirolidin (PVP) gibi çözünebilir polimerler de tirosinazın yarışmalı inhibitörleridir. PVP gibi çözünür polimerlerle inhibe olan enzim, ortama anyonik deterjan eklenmesi ile tekrar aktivite gösterebilmektedirler (Vamos-Vigyazo 1981). Fungal tirosinazının hidrojen peroksit, askorbik asit, fenil hidrazin, gallik asit, ferrosiyanür ve NH_2OH gibi indirgeyici bir ajan ile reaksiyonu enzimin inhibe olmasına neden olur. İndirgeyici ajanların tirosinazın prostetik grubunda bulunan Cu^{2+} 'yi indirgedikleri bulunmuştur (Andrawis and Kahn 1990). Fungal tirosinazı enzimatik reaksiyon sırasında ortamda herhangi bir inhibitörün bulunmaması durumunda da inaktif olabilmektedir. Bu işlem sırasında enzime bağlı bakır atomu salınır. Son zamanlarda Lerch ve arkadaşları *N. crassa* tirosinazının inaktivasyonunun; 306. pozisyondaki histidin amino asidinin kaybı ve buna bağlı olarak bir bakır atomunun salınması sonucu oluştuğunu bildirmişlerdir (Golan-Goldhirsh and Whitaker 1985; Nelson and Dawson 2006). Tirosinaz enziminin katalizlediği reaksiyonlar sonucu meyve veya sebzelerde kararmalara veya meyve sularında bulanıklık oluşturması gibi istenmeyen durumlara neden olması gıda endüstrisinde inhibitörler hakkında çokça çalışma yapılmasına yol açmıştır. Bunun yanında tirosinaz enziminin aktivatörleri hakkındaki çalışmalar biraz arka planda kalmıştır. Sodyum dodesil sülfat (SDS) gibi anyonik deterjanlar, tirosinaz enziminin aktivatörlerinden biridir.

Yine üzümden elde edilen tirosinaz için, asidik ortamda veya üre çözeltisi ile kısa süreli temas, enzimin aktifliğini 4 ile 10 kat artırmaktadır. Aktivatörlerin etkileri yine optimum pH, optimum sıcaklık veya substrat spesifikliğindeki gibi izole edilen kaynağa göre değişmektedir. Örneğin ortama Cu^{2+} ilavesi turptan elde edilen tirosinazın aktivitesini arttırdığı, patatesten elde edilen tirosinazı ise etkilemediği gözlenmiştir. Aktivatörler hakkında fazla çalışmanın olmamasına bağlı olarak, bu aktivatörlerin nasıl çalıştığı hakkında da pek bilgi yoktur. Aktivatörlerin bakır içeren enzim monomerlerinden oligomer oluşturduğu ve böylece enzimi biyolojik aktiflik için gerekli olan polimer yapısına getirdiği düşünülmektedir. Enzim aktivitesi, suni gübrelerde bulunan eser elementlerden, olgunlaşmaya yardımcı olan maddelerden ve radyasyonlar gibi fiziksel işlemlerden etkilenir. Bu etkiler bitkideki enzim proteininin sentezini artırabilir, doğal inhibitörleri ortamdaki uzaklaştırabilir, substrat yapısını değiştirebilir veya hücre duvarı geçirgenliğini değiştirebilir ve bunlardan dolayı da enzim aktivitesini arttırabilirler (Vamos-Vigyazo 1981).

2.11.8. Tirosinazın uygulama alanları

Tirosinaz enzimi gıda, sağlık, kozmetik ve arıtım endüstrilerinde uygulama alanı bulunabilen bir enzimdir. Tirosinazın özellikle doğada bulunan pek çok bitki ve meyvelerde yer alması, tirosinazın ilk olarak gıda sektöründe dikkat çekmesine sebep olmuştur.

2.11.8.1. Tirosinazın gıda endüstrisi için önemi

İnsanlar bir gıdayı seçerken onun görünüşüne, lezzetine, besinsel değerine ve dokularına dikkat ederler. Bir gıdada doğal rengi dışında bir kararım söz konusu olabilir, dokusunda ve lezzetinde bir bozunma olabilir ve yine meyve sularında ya da şarap gibi içeceklerde bulanıklıklar veya çökelmeler oluşabilir. Bunlar da tüketici için istenilmeyen durumlardır ve tüketici bu durumdaki ürünleri tercih etmemektedir. Bu tercih edilmeyen ürünler, gıda sektöründe yüksek maliyete sebep olmaktadır. Söz konusu istenilmeyen durumların oluşmasının sebeplerinden biri de tirosinaz aktivitesidir. Gıda sektörü genellikle bu durumları ortadan kaldırmak için, tirosinazın inhibisyonu üzerinde çalışmaktadır. Ancak çay, kahve, kakao kuru üzüm, kuru erik, kuru incir gibi ürünlerin görünüm ve lezzet bakımından istenilen duruma gelebilmesi için tirosinaz enziminin aktif olması gereklidir. Bu gibi

durumlarda ise yukarıdaki işlemten farklı olarak enzimin inhibe olmaması gereklidir (Maurice R. Marshall 2000).

2.11.8.2. Tirosinazın Tıbbi Uygulama Alanları

Tirosinaz, melanin oluşumunda görev alması nedeniyle tıbbi alanda da dikkatleri üzerine çekmiştir. Suda çözünmeyen heteropolimer yapıdaki melanin, özellikle kozmetik sanayi tarafından güneşin ultraviyole ışığından korunmak amacıyla üretilir. Ayrıca, ilaç tutuklamada biyopolimer olarak da melaninden yararlanılmaktadır. Tirosinaz enziminin 3,4 dihidroksifenilalanin (L-DOPA) sentezlenir (Rubio et al. 1971; Sugurman 1990). L-DOPA 1967'den beri Parkinson hastalığının tedavisindeki ilaç üretiminde kullanılmaktadır. Günümüzde ise L-DOPA çoğunlukla kimyasal olarak üretilmesine karşın, mikrobiyolojik yolla, tirosinaz hidroksilaz ve tirosinaz üretimi üzerine yoğunlaşmaktadır ancak bu tip üretim daha pahalıdır. Çünkü bir saflaştırma basamağına gereksinim söz konusudur. Bu da maliyeti yükseltmektedir.

2.11.8.3. Tirosinazın çevre sorunlarının gideriminde kullanım alanları

Atık sulardaki fenoller ve aromatik aminleri gidermek için peroksidaz ve hidrojen peroksidin kullanılır. Peroksidaz enzimlerinin çeşitli fenolik bileşikler değişik pH ve sıcaklık koşulları altında arıtma özellikleri bulunmasına karşın, hidrojen peroksidin yüksek maliyeti endüstriyel ölçekte kullanılmasına engel oluşturmaktadır (Nicell 1993). Bu nedenle peroksidazlara alternatif olarak bakterilerde, meyvelerde, sebzelerde, funguslarda ve hayvanlarda oldukça yaygın olarak bulunan ve oksitleyici ajan olarak O_2 'ni kullanan tirosinaz enziminin kullanılması fikri ağırlık kazanmıştır. Atlow ve arkadaşları atık sulardaki fenol ve onun türevlerini immobilize tirosinaz kullanarak okinonlara ve düşük molekül ağırlıklı polimerlere dönüştürmüşlerdir (Atlow et al. 1984). Tirosinaz enziminin oksitleyici ajan olarak oksijeni kullanması bir avantaj olmakla birlikte, şapkaklı mantarlardan saflaştırılan tirosinazın maliyeti oldukça yüksektir. Bu nedenle ucuz enzim üretimi ve saflaştırma yöntemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

2.12. Enzimlerin İmmobilizasyonu

Kelime anlamı olarak immobilizasyon, 'çözünmez hale getirilmiş, tutuklanmış, bağlanmış, hareketi sınırlandırılmış' demektir. Bilindiği gibi enzimler suda çözünen,

spesifik katalizörlerdir. Endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştirildiğinden katalizör olarak kullanılan ve reaksiyon ortamında çözünür olarak bulunan serbest enzimin aktivitesini yitirmeden, kullanıldığı ortamdaki geri kazanılması mümkün değildir. Ayrıca ürünün enzimden ayrılması da maliyeti artırmaktadır. Enzimin yeniden kullanılması mümkün olmaz. Bu ise enzimlerin çok spesifik, ama o ölçüde de pahalı katalizörler olmaları nedeniyle maliyeti yükselten önemli bir etmendir (Bickerstaff 1997). Enzimler, suda çözünmeyen bir matrikse bağlandıklarında, matrikslerin içinde tutulduklarında veya katalitik etkileri kaybolmadan birbirlerine bağlandıklarında immobilize olurlar. Immobilize enzimlerin özellikleri kullanılan yöntem ve matriksin yapısına bağlı olarak değişebilir.

İmmobilize enzimlerin sağladığı bazı avantajlar şunlardır (Bickerstaff 1997) :

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

2.12.1. İmmobilizasyon metotları

Değişik doğal veya sentetik pek çok matriks enzimlerin immobilizasyonunda kullanılmaktadır. Enzimler bu matrikslere aşağıdaki metotlardan biriyle immobilize edilirler (Şekil 2.4).

2.12.1.1. Adsorpsiyon

Enzimler değişik matrikslere adsorbe edilebilirler. Adsorbsiyon fiziksel ve iyonik adsorbsiyon olmak üzere ikiye ayrılır. Adsorbsiyonda işlem çok basittir. Biyokimyasal materyal (enzim ya da hücre), matriks ile uygun koşullarda (optimum pH ve optimum sıcaklık) karıştırılır. Fiziksel adsorpsiyonda enzim ile matriks arasında van der Waals, hidrojen bağları gibi zayıf etkileşimler, iyonik adsorbsiyonda ise elektrostatik etkileşimler meydana gelir. İyonik adsorbsiyon, fiziksele göre daha etkindir. Bağlanmamış biyolojik materyalin uzaklaştırılması için, materyal, adsorbsiyon işleminden sonra bolca yıkanır. İyonik bağlanma, enzimlerin bir matrikse özel olarak bağlanmasını sağlar. Enzimlerin optimum aktiviteye sahip oldukları pH'da taşıdıkları net yüke bağlı olarak, negatif veya pozitif yük taşıyan

iyon değiştirici reğineler iyonik adsorbsiyonda kullanılmaktadır. Sıkça kullanılan adsorbanlar izelge 2.1.'de verilmektedir (Woodward 1985; Syilemez 1996). Adsorbsiyon metodunun basit, ucuz ve kısa süren bir yöntem olması, enzimde ve matrikste bir değişikliğin meydana gelmemesi ve desorpsiyon sonucu matriksin geri kazanılabilmesi bu metodun avantajlarıdır. Dezavantajı ise, enzimin matrikse zayıf etkileşimlerle bağlanmasıdan dolayı enzimin sızıntı yaparak ürünü kirletmesidir (Bickerstaff 1997).

2.12.1.2. Kovalent bağlanma

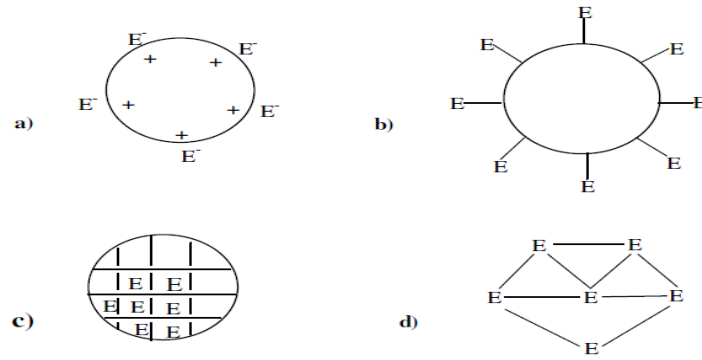
Enzim matrikse kovalent bağlarla bağlanır. Bir enzimin kovalent olarak bir matrikse bağlanmasında kullanılan fonksiyonel gruplar genellikle serbest amino veya karboksil gruplarıdır. Sülfidril, hidroksil veya imidazol grupları da kullanılabilir. Çok çeşitli matriksler bu amaçla kullanılabilirler. Bunlar çeşitli polimerler, selüloz, poröz cam, kömür ve seramik gibi matrikslerdir. Kovalent bağlanma yöntemi iki adımda gerçekleştirilir. Birinci adımda matriks aktif hale getirilir. İkinci adımda da enzim bağlanır. Kovalent bağlanmaya örnek olarak Siyanojen bromür aktivasyonu ve Karbodiimit aktivasyonu verilebilir;Siyanojen bromür aktivasyonu: Çeşitli polisakkaritler siyanojen bromür kullanılarak aktif hale getirilirler ve enzimlerin amino gruplarıyla sekil 2.15.'da gösterildiği seklide kovalent bağ oluştururlar (Bickerstaff 1997), Karbodiimit aktivasyonu: Karboksil grubu taşıyan matriksler karbodiimitler kullanılarak aktif hale getirilip enzimlerin immobilizasyonunda kullanılabilirler.(Bickerstaff 1997) .

2.12.1.3. Hapsetme

Bu yöntemde enzimler jellerin veya polimerlerin içinde tutulurlar. Bu amaçla kalsiyum aljinat gibi polimerler kullanılır. Değişik eşitleri vardır. Polimer matriks içinde immobilizasyon için, enzim çözeltisi polimer çözeltisiyle polimerleşmeden önce karıştırılır. Polimerleşme esnasında enzim molekülleri polimere bağlanmaz ama fiziksel olarak polimerin içinde kalır. Kimyasal bir bağlanma olmaması yöntemin önemli avantajıdır. Yöntemin dezavantajı substratın polimer kılıfı geçerek polimerin boşluklarına yerleşmiş enzim molekülüne ulaşmasındaki güçlüktür, dolayısıyla difüzyon problemi vardır. Anlaşılabileceği gibi substratın büyük moleküllü olması halinde yöntem sonuç vermez. Yöntem küçük moleküllü substratlar için uygundur (Bickerstaff 1997) .

2.12.1.4. Enzimlerin birbirine bağlanması

Enzimler iki veya daha fazla fonksiyonel grubu olan çeşitli maddeler kullanılarak birbirlerine kovalent olarak bağlanabilirler. Glutaraldehit bu maksatla sıkça kullanılır. Glutaraldehit ile diğer iki enzim molekülü kovalent olarak bağlanır. Bu yöntemde destek materyal yoktur. Bu nedenle enzimler birbirleri için matriks olarak kullanılırlar. İşlem sonunda jelatimsi, dayanıksız bir yapı oluşur ve bu nedenle tercih edilmez (Bickerstaff 1997).



Sekil 2.4. Çeşitli immobilizasyon metotlarının semaları

a) Adsorpsiyon, b) Kovalent bağlama, c) Hapsetme, d) Enzimlerin birbirine bağlanması

Çizelge 2.1. Enzim immobilizasyonunda sıkça kullanılan destek materyalleri ve bunların etkileşim türleri (Söylemez 1996)

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

2.12.2. Tirosinazın immobilizasyon çalışmaları

İmmobilizasyon işlemlerinin avantajlarından yararlanabilmek için, tirosinaz enzimiyle pek çok immobilizasyon çalışmaları yapılmıştır. İki kitosan film arasına adsorpsiyonla immobilize edilen tirosinazın aktivitesinin %45 olduğu ileri sürülmektedir. Toksik karışımdan seçici olarak fenollerin uzaklaştırılma performansını görebilmek için; amino grubu içeren kitosan jel film üzerine tirosinaz adsorplanarak, fenollerin o-kinonlara dönüşümünü sağlanmış ve enzim içeren kitosan jelin performansının tirosinaz kitosan oranına bağlı olduğu fikri ileri sürülmüştür (Durán et al. 2002). Wada ve arkadaşları tirosinazı kuvvetli bir asidik katyon değiştirici reçine olan Diaion WK-20 üzerine adsorpsiyonla ve 1-etil-3(3-dimetil-aminopropil) karbodiimid ile çapraz bağlanma ile immobilize ettiklerinde aktivitenin %83.7 kaybettiğini saptamışlardır. İmmobilize tirosinaz 25 °C de 96 saat saklandığında ilk aktivitesini %50 korurken çözünür enzim %20 koruyabilmiştir. Aljinat jel içine tirosinaz hapsedilerek immobilizasyon yapılmış ve substrat olarak tiaflavin kullanılmıştır. immobilize tirosinazın spesifik aktivitesi immobilizasyon işlemi süresince çözünür tirosinazla karşılaştırıldığında %7 aktivitede, Km

değerinde de %40 bir azalma olmuştur. Tiaflavinin ürüne dönüşmesi reaktör içindeki immobilize tirozinazla 20-30 dakikalık bir işlem sonunda elde edilmiştir (Wada et al. 1995) Tirozinaz bir çeşit kil minerali olan montmorillonite'nin bir kompleksi olan Ca-montmorillonite (Ca-Mte) ya da farklı hidroksialiminyum-montmorillonite (Al(OH)x-Mte) kompleksleri üzerine immobilize edildiğinde Ca-montmorillonite'nin (Ca-Mte)'nin hidroksialiminyum-montmorillonite (Al(OH)x-Mte) komplekslerinden daha çok tirozinaz molekülü adsorplandığı bulunmuştur. Yalnız (Al(OH)x-Mte) kompleksinde Al(OH)x miktarının artmasıyla da tirozinaz adsorpsiyonunun arttığını ve hatta Ca-montmorillonite üzerine adsorplanan enzim miktarının iki katı daha fazla enzim adsorplanabileceği gözlemlenmiştir (Wada et al. 1995; Naidja et al. 1997).

3. LABORATUVAR ÇALIŞMALARI VE YÖNTEMLER

3.1. Çalışmalarda Kullanılan Mikroorganizmalar

Tirosinaz üretimi için potent fungus kaynağını saptamak amacıyla Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı stoklarında bulunan fungus kültürlerinden, *Giberella fujikuroi*, *Rhizopus stolonifer*, *Rhizopus arrhizus*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus chrysosporium*, *Pleurotus eryngii*, *Aspergillus niger* ve *Funalia troglia* kullanılmıştır. Fungal stok kültürlerin sürekliliği 20 günlük aralıklarla Potato Dextrose yatık-Agar besiyerlerine yapılan aktarımlarla gerçekleştirildi. Deneylerde kullanılan stok kültür 30°C'de 10 günlük inkübasyonun ardından +4°C'de saklandı. Tirosinaz üretimi amacıyla sıvı besiyerine ekilecek fungusların stok kültürü +4°C'de en fazla 3 gün bekletildikten sonra ekim kaynağı olarak kullanıldı.

3.2. Tirosinaz Üretim Ortamının Hazırlanması

Fungusların tirosinaz üretimini araştırmak ve optimize etmek amacıyla, *N. crassa*'dan tirosinaz üretimi için kullanılan Vogel minimal sıvı besiyeri (Horowitz 1970) içeriğinde bazı değişiklikler yapılarak kullanıldı. Karbon kaynağı olarak Vogel ortamında yer alan sükroz yerine Michel ve arkadaşları tarafından önerilen şekilde glukoz kullanıldı (Michel 1991). Modifiye-Vogel besiyeri şu şekilde hazırlandı: ana-stok çözeltisine (g/100 ml olarak; Na-sitrat: 15, KH₂PO₄: 25, MgSO₄.7 H₂O: 1.0, CaCl₂ H₂O: 0.5) iz-element çözeltisinden (g/100 ml olarak Sitrikasit, 1 H₂O: 2.5, ZnSO₄.7 H₂O:2.5, Fe (NH₄)₂ (SO₄)₂. 6 H₂O: 0.5, CuSO₄.5 H₂O: 0.125, MnSO₄.1 H₂O: 0.025, H₃BO₃: 0.025, H₃P(Mo₃O₁₀). H₂O: 0.025) %1 (V/V) oranında eklenerek elde edilen karışıma daha sonra %2 oranında glukoz eklenip 1N HCl ile pH'sı 4.7'e ayarlandı. Bu şekilde hazırlanıp 250 ml'lik Erlen-Mayer şişelerinde 100 ml hacimde dağıtılan ve daha sonra 1.5 atmosfer basınç altında 110 °C de 25 dakika süreyle otoklavda sterilize edilen modifiye Vogel sıvı-besiyerleri enzim çalışmalarında kullanıldı. Mikroorganizmaların stok kültürleri 10 ml steril distile su ile suspanse edilerek ekim için kullanıldı. Hazırlanan miçelyum suspansiyonundan 2 ml steril koşullarda olmak üzere Vogel besiyeri içeren Erlen-mayer şişelerine ilave edildi (López et al. 2006). 150 rpm'de, 30°C'de 10 günlük süreyle inkübasyondan sonra elde edilen kültürler önce tülbentten sonra Whatman

no:1 kağıdından süzöldü. Filtrat enzim aktivitesi ölçömlerinde enzim kaynağı olarak kullanıldı.

3.3. Enzim Taraması Ve Aktivitesinin Ölçölmesi

3.3.1. Enzim tarama testleri

Tirosinaz enzimi varlığı yönünden bölüm 3.1'de belirtilen fungal költürlerin taraması aşağıda bölüm 3.3.2'de anlatılan aktivite ölçümü tekniğine göre yapılarak, renk veren költürler artı (+) ve renksizler eksi (-) olarak değeriendirilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Trisonaz enzimi ile L-DOPA reaksiyonu sonrasında oluşan renk değışikliğı

3.3.2. Tirosinaz aktivitesinin ölçümü

Tirosinaz aktivitesini taramak için en yaygın yöntem, tirosinaz'ın özgül substratı olan L-DOPA'nın kullanıldığı yöntem olup, enzimin aktivitesini ölçmekte kullanılmaktadır (Sun 1996). Bunun için enzim kaynağının 3 ml'sine, fosfat tamponu (50 mM , pH 7.0) içerisinde hazırlanmış 10 mM L-DOPA çözeltisinden 0.3 ml eklendi. Kör tüpünde test tüplerinden farklı olarak kaynatılarak inaktive edilmiş enzim kaynağı kullanıldı. Tepkime ve kör tüpleri 28'C'de 15 dakika inkübe

edildi ve spektrofotometrede (SHIMADZU® UV-1700 PharmaSpec) 475 nm dalga boyundaki absorbans artışı okundu. Elde edilen deney sonuçları enzim aktivitesi açısından değerlendirildi ve bu değerlendirmede enzim aktivitesi hesaplandı. Bir ünit enzim aktivitesi deney koşullarında 15 dakikada absorbans miktarında 0.001 artışa neden olan enzim miktarı olarak tanımlandı.

3.4. Kültürlerde Üremenin Ölçülmesi

Kültürlerde üreme miktarı hücre kitlesindeki kuru ağırlık cinsinden hesaplandı. Bu işlem filtrasyon yöntemiyle gerçekleştirildi.

3.5. Enzim Üretimine Etki Eden Fizyolojik Koşulların Saptanması

Enzim üretimi açısından seçilen potent suşun tirosinaz üretimini optimize etmek için çeşitli fizyolojik koşulların enzim üretimi üzerine etkileri araştırıldı.

3.5.1. Çalkalamalı ve statik inkübasyon şartlarının tirosinaz sentezine etkisinin araştırılması

Çalkalamalı ve statik inkübasyon koşullarının tirosinaz üretimine etkisinin saptanması için, temel besiyerlerine *F. trogii* iki paralel grup olacak şekilde ekildi. Birinci grup örnekler 150 rpm döngüsel çalkalama hızına sahip inkübatörde (Braun certomat®), diğer grup statik koşulda 30 °C'de, 10 gün üretildiler. Bu süre sonunda tirosinaz aktivitesi ve üreme miktarı saptandı.

3.5.2. Çalkalamalı inkübasyonda çalkalama hızının tirosinaz sentezine etkisinin araştırılması

Çalkalamalı inkübasyonda çalkalama hızının enzim üretimi üzerine ne gibi bir etkide bulunduğunu incelemek amacıyla hazırlanan Vogel besiyerlerine, *F. trogii* ekimi yapıldı. Kültürler 30 °C'de, 10 gün süreyle 4 farklı hızda (r.p.m 100, 150, 200, 250) inkübasyona tabi tutuldu ve inkübasyon sonunda tirosinaz aktivitesi ve üreme miktarı saptandı.

3.5.3. Tirosinaz sentezine inkübasyon süresinin etkisi

Çalışmada kullanılan temel besiyerlerine *F. trogii* ekildi. 30 °C'de, 200 rpm' çalkalamalı inkübatörde üremeye terkedildi. 2-12 günler arasında olmak üzere her 24 saatte bir tirosinaz aktivitesi ve üreme miktarı belirlendi.

3.5.4. Tirosinaz sentezi için uygun sıcaklığın araştırılması

Yapılan çalışmalarda uygun inkübasyon sıcaklığını bulmak için temel besiyeri ortamına *F. trogii* ekildi. Kùltürler 25, 30, 35, 40 ° C'lere ayarlanmış inkübatörlerde 200 rpm hızında çalkalamalı olarak 7 gün üremeye terk edildi. İnkübasyon sonrası üreme, tirosinaz aktivitesi ve üreme miktarı saptandı.

3.5.5. Tirosinaz sentezi için uygun pH değeriinin araştırılması

Enzim sentezlerine pH değeriinin etkinliğini incelemek için, 0,1N HCl ve 0,1N NaOH ile pH 3 ile 9 arasında farklı olarak hazırlanan temel besiyerlerine *F. trogii* ekildi. Ortamlar 30 °C'de, 200 rpm çalkalamalı hızına ayarlanmış inkübatörde 7 gün üretildiler. İnkübasyon sonrası üreme ve tirosinaz aktivitesi belirlendi.

3.5.6. Üreme ortamına ilave edilen azot kaynaklarının tirosinaz enzimi üretimine etkisi

Tirosinaz sentezi ile besiyerindeki en uygun azot kaynağı arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla, temel besiyerinde azot kaynağı olarak kullanılan NH_4NO_3 yerine NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pepton ve maya özütü içeren besiyerleri hazırlandı ve besiyerlerin pH'sı 5'e ayarlandı. Hazırlanan besiyerlerine seçilen potent suşun ekimi yapıldı. Kùltürler daha sonra 30 °C'de, 200 rpm'de 7 gün süreyle inkübasyona kaldırıldılar. İnkübasyon sonunda kùltür ortamlarında tirosinaz aktivitesi ve üreme miktarı ölçüldü.

3.5.7. Üreme ortamında NaNO_3 miktarının, tirosinaz enzim üretimine etkisi

Tirosinaz verimi açısından en uygun azot kaynağı olarak saptanan NaNO_3 'ün, organizma açısından uygun yoğunluğunu belirlemek için, farklı miktarlarda (g/L 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1) NaNO_3 içeren 7 besiyeri hazırlandı ve besiyerleri pH'sı 5'e ayarlandı. Hazırlanan besiyerlerine *F. trogii* ekimi yapıldı. Kùltürler daha sonra 30°C'de, 200 rpm'de 7 gün süreyle inkübasyona kaldırıldılar. İnkübasyon sonunda kùltür ortamlarında tirosinaz aktivitesi ve üreme miktarı ölçüldü.

3.5.8. Üreme ortamına ilave edilen karbon kaynaklarının tirosinaz enzim üretimine etkisi

Mikroorganizmanın tirosinaz sentezi için uygun karbon kaynağını belirlemek amacıyla değişik karbon kaynakları (Ksiloz, Glukoz, Sakkaroz, Fruktoz, Maltoz, Laktoz, Rafinoz, Nişasta) içeren besiyerleri hazırlandı. Ancak temel alınan modifiye Vogel minimal sıvı besiyerinden farklı olarak, bu besiyerlerinde önceki çalışmalarda optimize edilen miktarlarda azot kaynağı (NaNO_3) kullanıldı. Ayrıca, besiyerine glukoz yerine denenecek karbon kaynakları, glukozla aynı miktarda (10 g/L) olmak koşuluyla eklendi ve besiyerlerin pH'sı 5 olarak ayarlandı. Hazırlanan besiyerlerine seçilen *F. troglia* ekimi yapıldı. Kültürler daha sonra 30 °C'de, 200 rpm'de 7 gün süreyle inkübasyona kaldırıldılar. İnkübasyon sonunda kültür ortamlarında tirosinaz aktivitesi ve üreme miktarı ölçüldü.

3.5.9. Üreme ortamında yer alan glukoz miktarının, tirosinaz enzim üretimine etkisi

Tirosinaz verimi açısından en uygun karbon kaynağı olarak saptanan glukoz'un, enzim üretimi açısından uygun yoğunluğunu belirlemek için farklı miktarlarda (g/L olarak: 0, 10, 15, 20 , 25, 30) glukoz içeren 6 besiyeri hazırlandı ve besiyerlerin pH'sı 5 olarak ayarlandı. Ancak, temel alınan modifiye Vogel minimal sıvı besiyerinden farklı olarak, bu besiyerlerinde önceki çalışmalarda optimize edilen miktarda azot kaynağı (NaNO_3) bulunmaktadır. Ekim sonrası kültürler 30 °C'de, 200 rpm'de 7 gün süreyle inkübasyona kaldırıldı. İnkübasyon sonunda kültür ortamlarında tirosinaz aktivitesi ölçüldü.

3.5.10. Üreme ortamına farklı karbon-azot oranlarının tirosinaz enzim üretimine etkisi

Tirosinaz verimi açısından en uygun karbon azot oranını saptamak amacıyla farklı Glukoz- NaNO_3 (g/g 5:1, 5:2, 10:1, 10:2, 20:1, 20:2) oranları içeren 6 besiyeri hazırlandı ve besiyerlerin pH'sı 5'e ayarlandı. Ekim sonrası kültürler 30 °C'de, 200 rpm'de 7 gün süreyle inkübasyona kaldırıldı. İnkübasyon sonunda kültür ortamlarında tirosinaz aktivitesi ve üreme miktarı ölçüldü.

3.5.11. Başlangıç koşulları ile optimize edilmiş koşulların tirosinaz üretimi açısından karşılaştırılması

Tirosinaz verimi açısından optimize edilmiş besiyeri hazırlandı. Ancak, temel alınan Vogel minimal sıvı besiyerinden farklı olarak, karbon ve azot kaynakları optimize koşullara göre eklendi ve besiyeri pH'sı 5'e ayarlandı. Ekim yapıldıktan sonra besiyeri 30°C'de, 200 rpm'de 7 gün inkübasyona kaldırıldı. İnkübasyon sonunda optimize kültür ortamında tirosinaz aktivitesi ölçüldü ve optimize edilmemiş temel Vogel minimal sıvı besiyerinde üretilen potent suşun ürettiği tirosinaz enzimi aktivitesi ile karşılaştırıldı.

3.6. Tirosinaz Enziminin Dayanıklılığı

Optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen modifiye besiyerine *F. troglitii* ekimi yapıldıktan sonra, kültürler 7 gün süreyle inkübasyona terkedildi. İnkübasyon sonunda kültür önce tülbentten sonra Wattman No:1 kağıdı kullanarak süzüldü ve elde edilen filtrat enzim kaynağı olarak dayanıklılık çalışmaları için kullanıldı.

3.6.1. Kaba Enzimin sıcaklık dayanıklılığının araştırılması

Tirosinaz enziminin sıcaklık dayanıklılığı 20, 30, 40, 50, 60, 70 ve 75°C'lerde çalışıldı. Kaba enzim belirtilen sıcaklık derecelerinde 1 saat tutuldu. Daha sonra bu farklı sıcaklıklarda tutulan enzimlerin aktiviteleri saptandı. Enzim aktiviteleri bağıl aktivite (%) olarak hesaplandı.

3.6.2. Kaba Enzimin pH dayanıklılığının araştırılması

Tirosinaz enziminin pH dayanıklılığının belirlenmesi amacıyla 3, 4, 5, 6, 7 ve 8 pH değerleri çalışıldı. Kaba enzim belirtilen pH değerlerinde oda ısısında 1 saat tutuldu. Daha sonra bu farklı pH değerlerindeki kaba enzimlerin aktiviteleri saptandı. Enzim aktiviteleri bağıl aktivite (%) olarak hesaplandı.

3.6.3. Kaba Enzimin günlere göre aktivite dayanıklılığının araştırılması

Günlere göre Kaba enzimin aktivite dayanıklılığının saptanması amacıyla, -20°C'de dondurularak 24 saat boyunca saklanan ve daha sonra oda ısısında çözölen kaba enzim, 25 gün boyunca gün aşırı aktivite ölçömleri yapıldı. Daha sonra kaba enzim 25. günden itibaren 100. güne kadar (75 gün) -20°C'de

saklandı. 100. günde dondurulmuş kaba enzim oda sıcaklığında çözüldükten sonra aktivite ölçümü yapıldı.

3.7. İmmobilizasyon Çalışması

3.7.1. Bentonit hazırlaması

Enzim tutuklaması için literatür taraması ile daha önce tirosinaz tutuklanması için kullanılmamış bir matriks olan bentonit kullanıldı. Sülfürik asitte karıştırıldıktan sonra distile suyla yıkanan Bentonit, 30 °C’de, 5 saat süreyle kurutulmaya bırakıldı (Yeşiloğlu 2004).

3.7.2. Tirosinaz enzimin tutuklanması

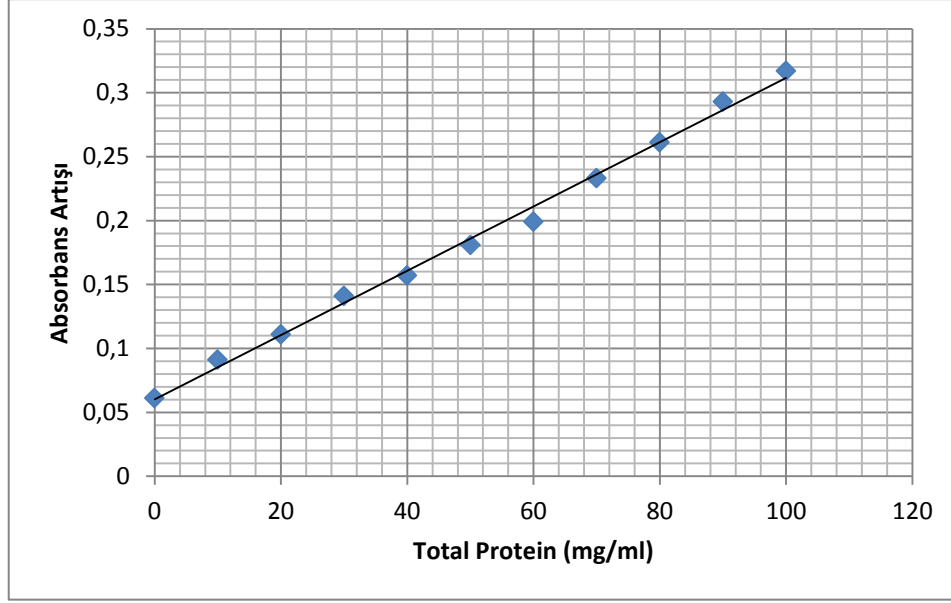
Optimize koşullarda ve Bölüm 3.6’da anlatılan şekilde elde edilen kaba enzim, enzim kaynağı olarak tutuklama çalışmalarında kullanıldı. 1 g Bentonit 5 ml distile suda süspansiyon haline getirildi ve bu süspansiyona 3ml enzim kaynağı eklendi. Bu süspansiyon-enzim karışımı 15 dakika boyunca karıştırıldı.

3.7.3. Kültürlerde hücre-dışı protein miktarlarının ölçümü

Kültürlerde üremeye koşut olarak sentezlenen hücre-dışı protein miktarları Lowry (Lowry 1951) tarafından önerilen yöntem ile ölçüldü. Bu yöntem ile yapılan spektrofotometrik ölçümlerde okunan absorbans değerlerine eşdeğer protein miktarları bovin serum albumin kullanılarak yapılan standart eğriden hesaplandı (Şekil 3.2).

3.7.4. Tutuklanan enzimin aktivitesinin ölçümü

Enzim-Bentonit süspansiyonu önce tülbent sonra Wattman no:1 kağıdı kullanarak süzüldü. Enzim aktivitesi Bölüm 3.3.2’de anlatıldığı gibi ölçüldü. Tepkime tüpüne enzim kaynağı yerine 1 g tutuklu enzim eklendi ve fosfat tamponu (50 mM, pH:7) kullanarak toplam hacim 3 ml’ye tamamlandı. Tepkime tüpü sıcak su banyosunda 28°C’de 15 dakika boyunca inkübe edildikten sonra enzim aktivitesi ölçüldü.



Şekil 3.2. Lowry protein tayin metodu standart eğrisi

3.7.5. Tutuklanan enzimin aktivitesinin dayanıklılığı saptanması

Bentonit üzerine tutuklanan tirosinaz enzimi, dondurularak/çözülerek -20°C'de saklandı. Oda sıcaklığında çözülen tutuklu enzimin aktivitesi 24 saatlik ölçümler şeklinde 20 gün boyunca yapıldı.

3.7.6. Tutuklanan enzimin tekrarlı kullanımındaki aktivitesinin incelenmesi

Tutuklu tirosinaz enzimi aynı şartlar altında her aktivite ölçümü ardından süzülerek, sıvı fazdan ayrıştırıldı ve distile su ile yıkandıktan sonra tekrar reaksiyon ortamına eklenerek kullanıldı. Bu şekilde sekiz tekrar yapıldı.

4. SONUÇLAR

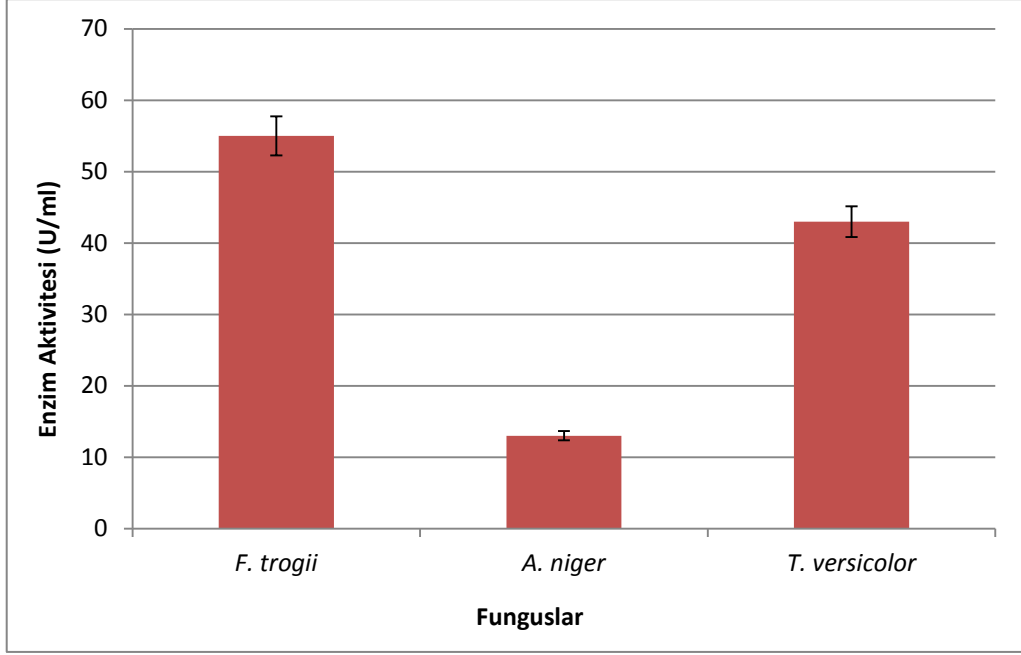
4.1. Uygun Mikroorganizmanın Seçimi

Taranan funguslarda, tirosinaz aktivitesi *F. trogii*, *A. niger* ve *T. versicolor* 'da rastlanmaktadır (Çizelge 4.1). Tirosinaz aktivitesi bulunan fungusların tirosinaz aktiviteleri ve üreme miktarları saptandı. En yüksek tirosinaz aktivitesi gösteren *F. trogii* olarak bulundu (Şekil 4.1). Kullanılan mikroorganizmaların tirosinaz üretim ortamlarında üreme miktarları ölçüldüğünde ise *A. niger*'in diğer funguslardan çok daha yüksek oranda ürediği tespit edildi (Şekil 4.2). çalışmalarda kullanılan funguslar arasında yüksek tirosinaz aktivitesi gösteren *F. trogii* ilerideki çalışmalar için kaynak olarak seçildi.

Çizelge 4.1. Fungusların tirosinaz aktivitesi

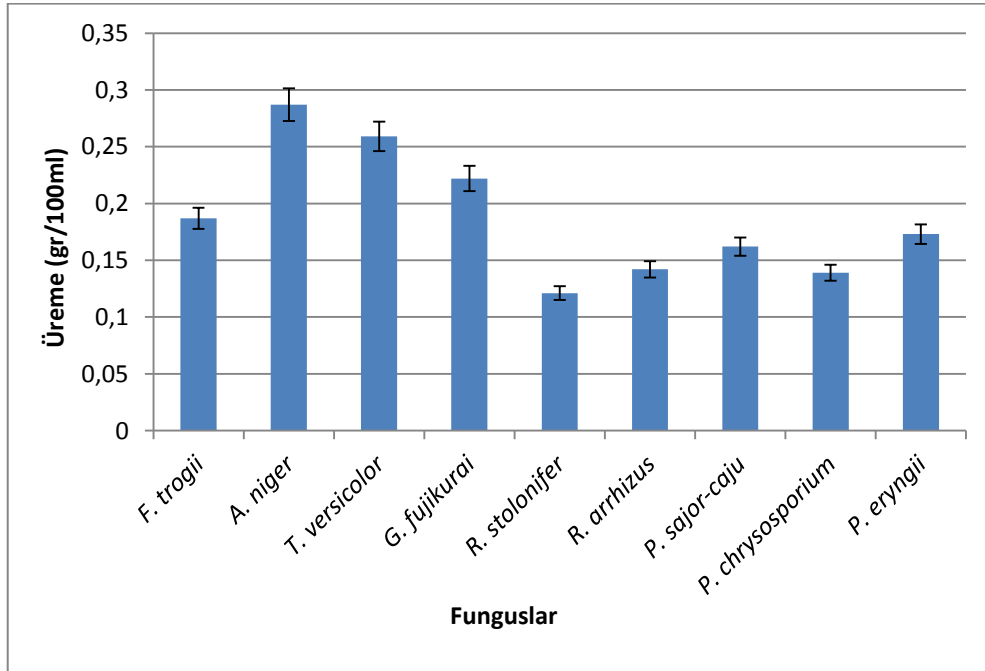
-Üretimler 30°C'de 140 rpm çalkalama hızına ayarlanmış inkübatörde 10 günde gerçekleştirildi. (+) değerler renk değişimi kriterine göre saptandı. Aynı türün çoklu kültürleri arasından tesdüfi seçilen stoklardan yapılmıştır.

Mikroorganizma	Tirosinaz aktivitesi
<i>G. fujikuroi</i>	-
<i>R. stolonifer</i>	-
<i>R. arrhizus</i>	-
<i>T. versicolor</i>	+
<i>P. sajor-caju</i>	-
<i>P. chrysosporium</i>	-
<i>P. eryngii</i>	-
<i>A. niger</i>	+
<i>F. trogii</i>	+



Şekil 4.1. Fungusların tirozinaz aktivitesi

-Deneyler 30 °C'de, 140 rpm'de 10 gün inkübasyonla gerçekleştirildi. Değerler 3 çalışmanın ortalaması olup, şekillerdeki çubuklar standart sapmayı tanımlamaktadır.



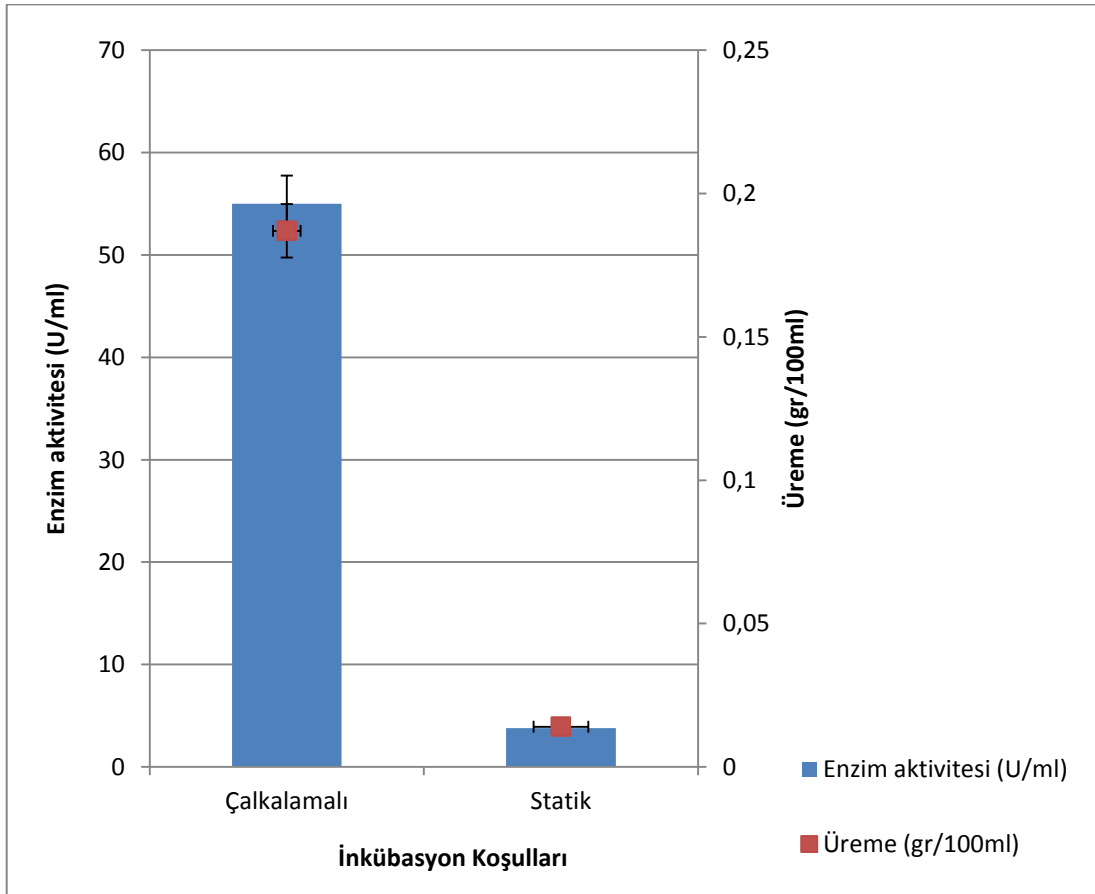
Şekil 4.2. Fungusların üremesi

-Deneyler 30 °C'de, 140 rpm'de 10 gün inkübasyonla gerçekleştirildi. Değerler 3 çalışmanın ortalaması olup, şekillerdeki çubuklar standart sapmayı tanımlamaktadır.

4.2. Üreme Ortamında Üreme Ve Tirozinaz Aktivitesini Etkileyen Uygun Fizyolojik Koşulların Saptanması

4.2.1. Çalkalamalı ve statik inkübasyon koşullarının üremeye ve tirozinaz sentezine etkisi

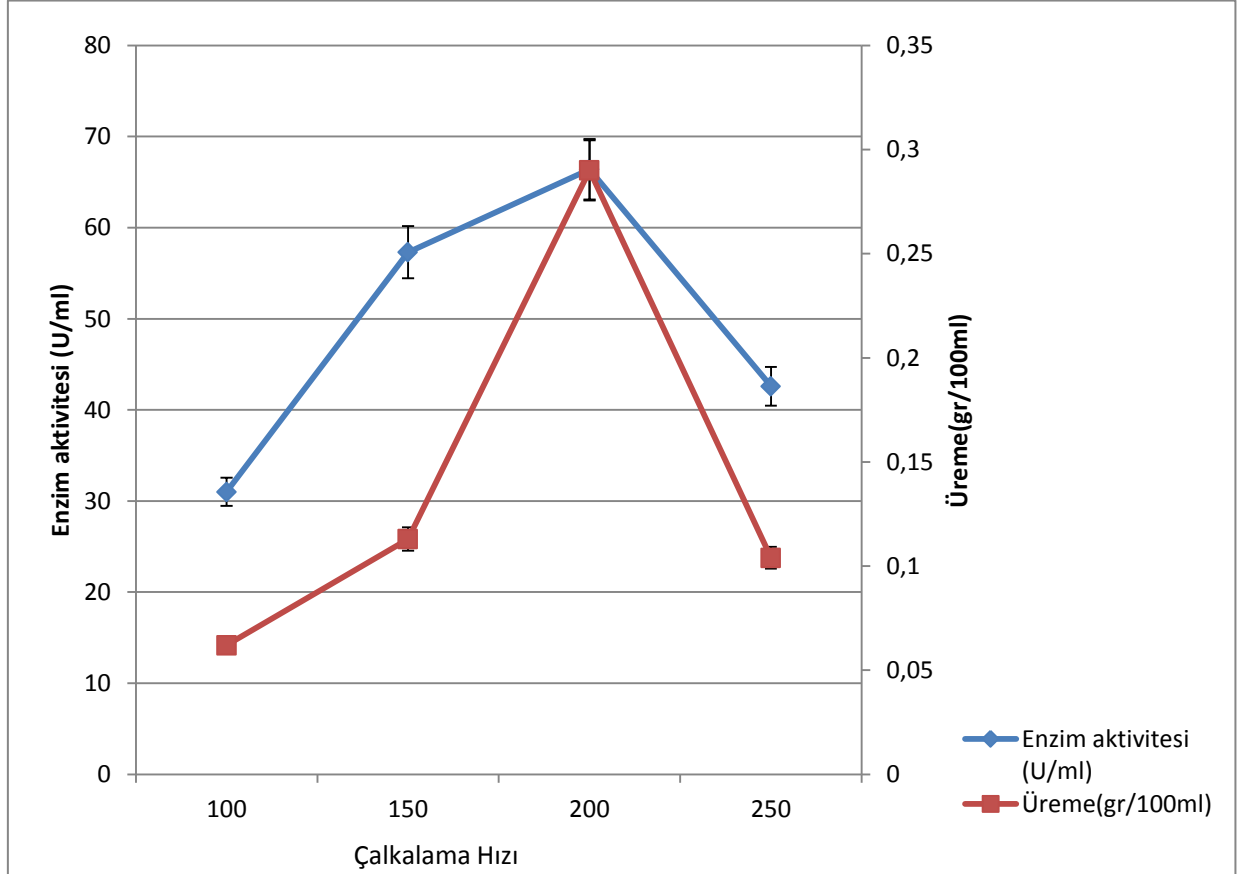
Tirozinaz sentezi ve üreme üzerine statik ve çalkalamalı inkübasyonun etkisini belirlemek için Bölüm 3.5.1’de anlatıldığı gibi yapılan deneylerde, tirozinaz üretiminin çalkalamalı inkübasyon koşulunda daha yüksek olduğu saptandı. Ayrıca çalkalamalı inkübasyon koşullarında üremenin statik koşullardan daha yüksek olduğu da gözlemlendi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Çalkalamalı ve statik inkübasyon koşullarının tirozinaz sentezine etkisi -Deneyler 30 °C’de, statik ya da 140 rpm’de 10 gün inkübasyonla gerçekleştirildi. Değerler 3 çalışmanın ortalaması olup, şekillerdeki çubuklar standart sapmayı tanımlamaktadır.

4.2.2. Tirosinaz üretimine etkili uygun çalkalama hızı

Seçilen mikroorganizmanın (*F. trogii*) tirosinaz üretimi için optimum çalkalama hızını belirlemek amacıyla, gerçekleştirilen deneylerde, en yüksek aktivite ve üreme, 200 rpm hızında çalkalamalı inkübasyonda gözlemlendi (Şekil 4.4).

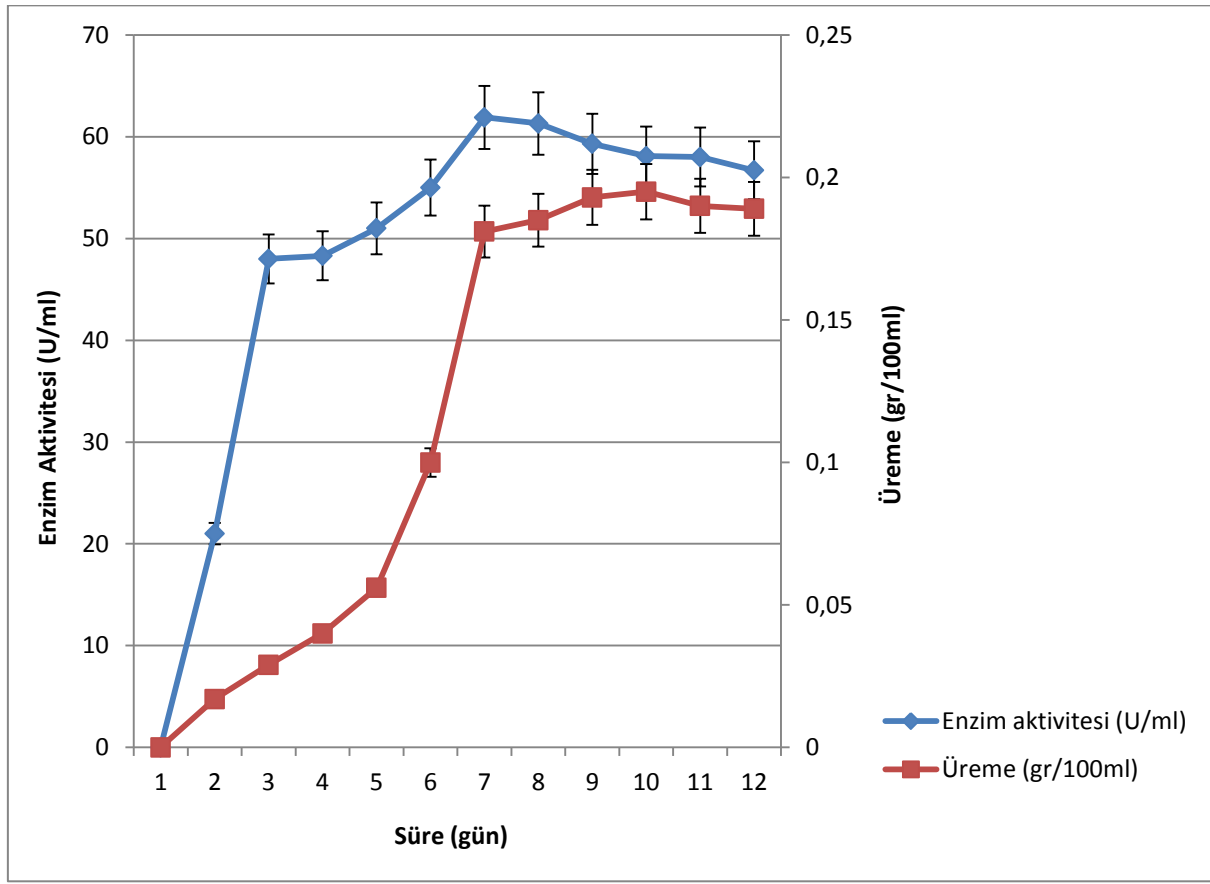


Şekil 4.4. Çalkalama hızının Tirosinaz üretimine etkisi

-Deneyler 30 °C'de, 100, 150, 200, 250 rpm'de 10 gün inkübasyonla gerçekleştirildi. Değerler 3 çalışmanın ortalaması olup, şekillerdeki çubuklar standart sapmayı tanımlamaktadır.

4.2.3. Tirosinaz üretimine etkili uygun inkübasyon süresi

Temel besiyerine ekilen ve 30° C'de 200 rpm çalkalamalı inkübatöre 2-12 gün üretilen *F. trogii* kültürlerinde tirosinaz aktivitesi ve üreme saptandı. Sonuçlara göre en yüksek tirosinaz aktivitesi 7. günde bulundu. (Şekil 4.5). 10. günde ise üremenin yüksek olduğu saptandı.



Şekil 4.5. Tirosinaz üretimi için uygun inkübasyon süresinin

Deneyler 30°C'de, 200 rpm'de 12 gün inkübasyonla gerçekleştirildi. Değerler 3 çalışmanın ortalaması olup, şekillerdeki çubuklar standart sapmayı tanımlamaktadır.

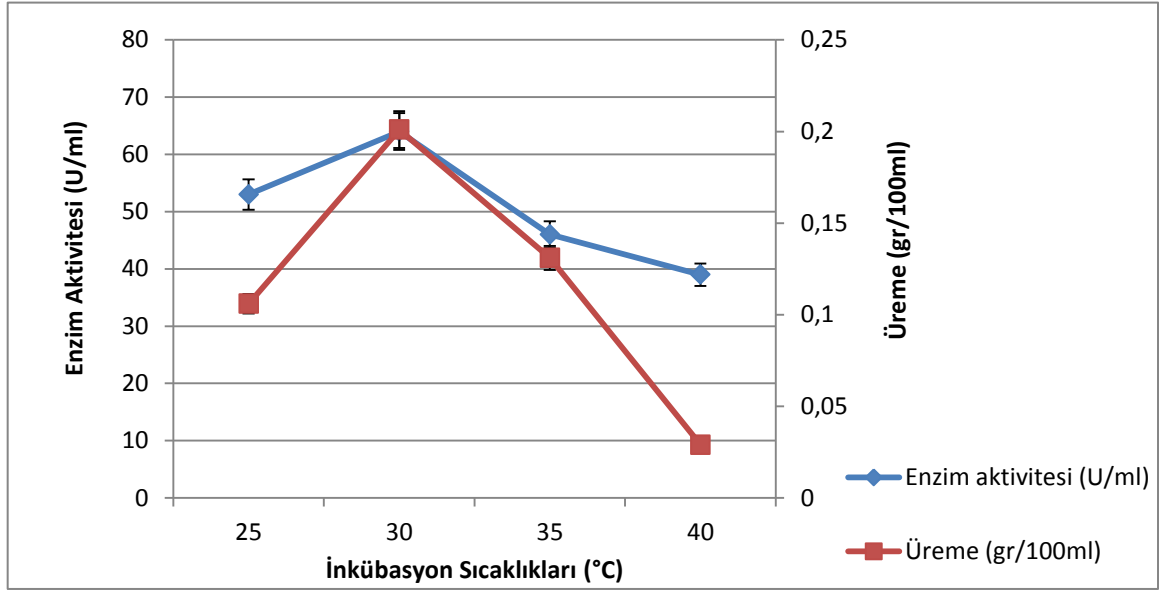
4.2.4. Tirosinaz üretimi için uygun inkübasyon sıcaklığı

İnkübasyon sıcaklığının tirosinaz üretimine etkisini belirlemek amacıyla *F. trogii* 25, 30, 35, 40° C' lerde üretildi. Elde edilen sonuçlara göre 30° C'nin tirosinaz üretimi için en uygun sıcaklık olduğu ayrıca bu sıcaklığın üreme için de optimum sıcaklık olduğu bulundu (Şekil 4.6).

4.2.5. Tirosinaz üretimi için uygun pH değeri

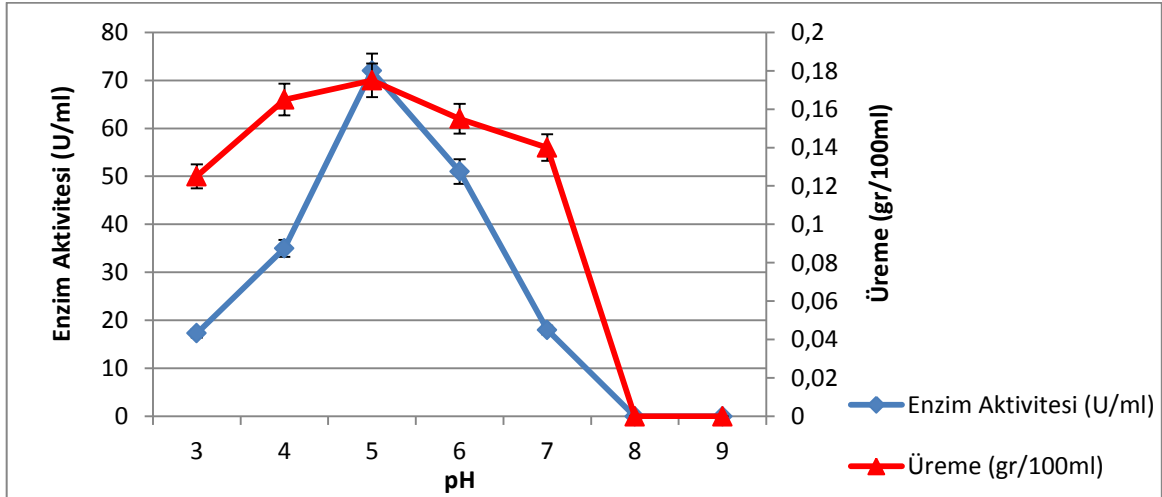
F. trogii tirosinaz üretimi için uygun pH değerinin tespiti amacıyla, 3 ile 9 arasında farklı pH ayarları yapılarak hazırlanan besiyerlerine ekim yapıldı ve 30°C'de 200 rpm çalkalamalı inkübatörde 7 gün üretildi. Şekil 4.7'de görüldüğü gibi tirosinaz sentezi yanısıra üreme içinde optimum pH değerinin 5 olduğu belirlendi. *F. trogii*

kültür ortamında tirosinaz aktivitesi ve diferansiyel sentez hızı ayrıca saptandı (Şekil 4.8).



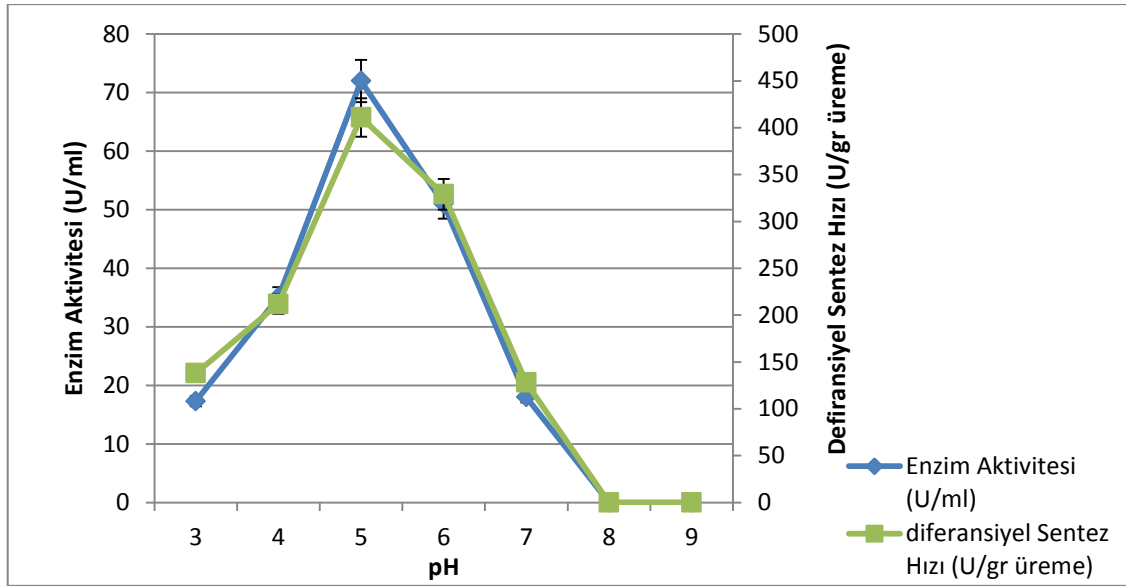
Şekil 4.6. Tirosinaz üretimi için uygun inkübasyon sıcaklığı

-Deneyler 25, 30, 35 ve 40 °C'de, 200 rpm'de 7 gün inkübasyonla gerçekleştirildi. Değerler 3 çalışmanın ortalaması olup, şekillerdeki çubuklar standart sapmayı tanımlamaktadır.



Şekil 4.7. Tirosinaz üretimi ve fungus üremesi için uygun pH değeri

-Besiyeri pH'ları 3,4,5,6,7,8,9 olarak ayarlandı ve ekim yapıldıktan sonra 30 °C'de, 200 rpm'de 7 gün inkübasyona kaldırıldı. Değerler 3 çalışmanın ortalaması olup, şekillerdeki çubuklar standart sapmayı tanımlamaktadır.



Şekil 4.8. Tirosinaz üretimi için uygun pH değeri

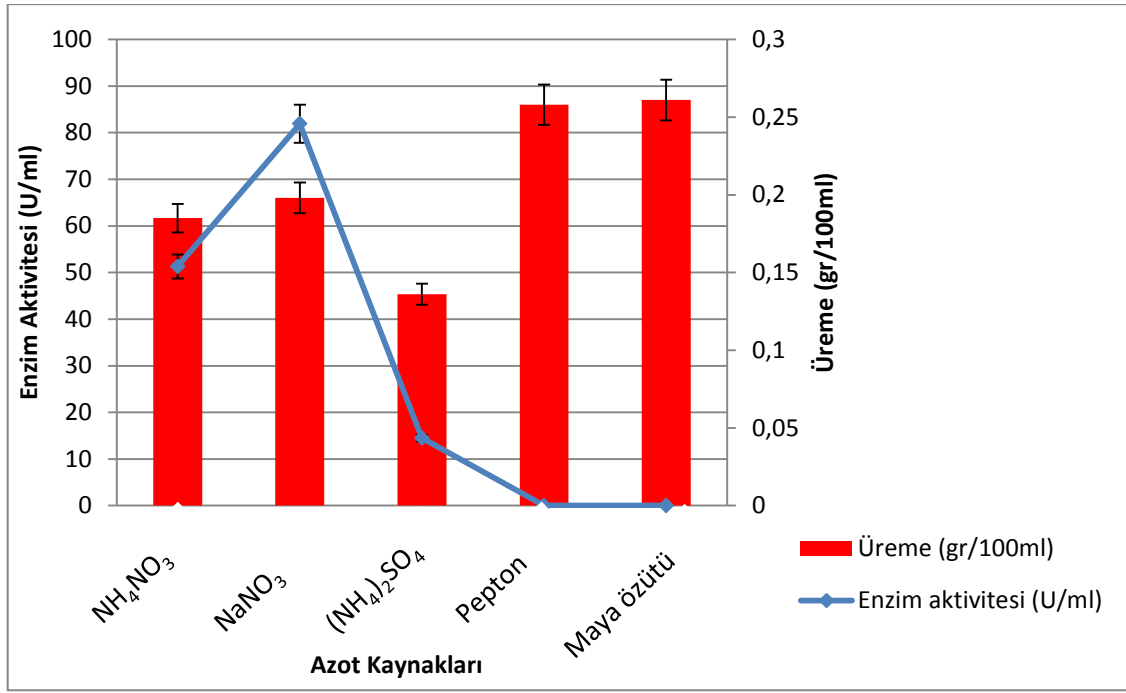
-Besiyeri pH'ları 3,4,5,6,7,8,9 olarak ayarlandı ve ekim yapıldıktan sonra 30 °C'de, 200 rpm'de 7 gün inkübasyona kaldırıldı. Değerler 3 çalışmanın ortalaması olup, şekillerdeki çubuklar standart sapmayı tanımlamaktadır.

4.2.6. Tirosinaz üretimine etkili azot kaynağı

Tirosinaz üretimine farklı azot kaynaklarının etkisini incelemek için, besiyerine NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pepton ve maya özütü ilave edildi ve üretim gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlara göre NaNO_3 içeren ortamda en yüksek tirosinaz üretimi gerçekleştirildi (Şekil 4.9).

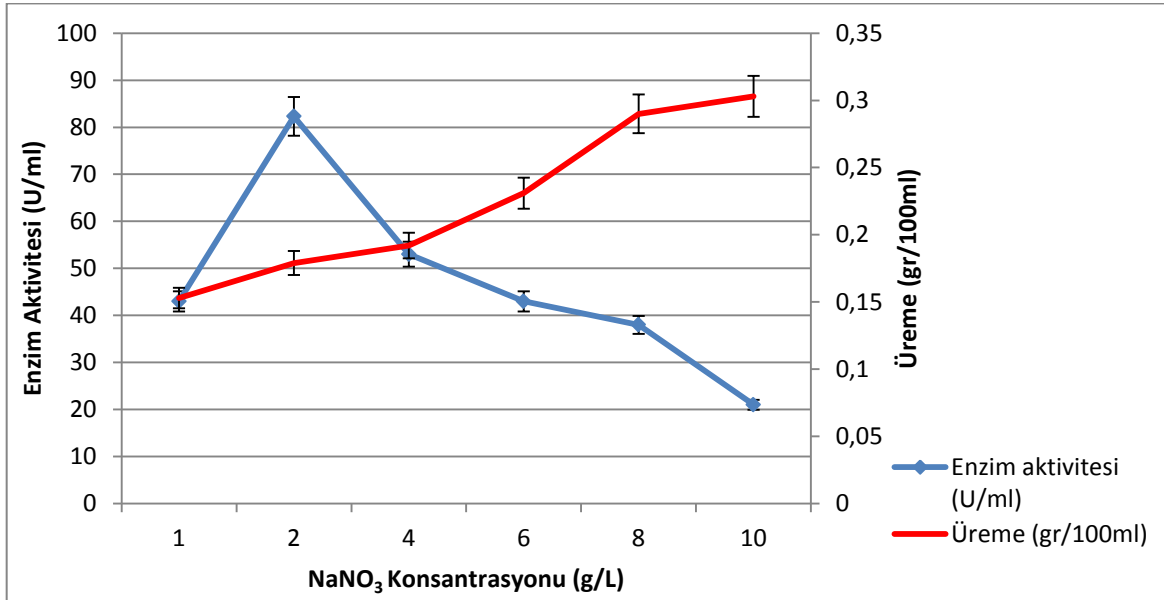
4.2.7. Tirosinaz üretimi için uygun NaNO_3 konsantrasyonu

Bölüm 4.2.6'daki deneyler sonucunda, *F. troglia* tirosinaz üretimi için en uygun azot kaynağı olduğu belirlenen NaNO_3 , besiyerine farklı konsantrasyonlarda eklenmiş ve en yüksek enzim üretiminin hangi konsantrasyonda elde edileceği belirlenmiştir. Şekil 4.10'da görüldüğü gibi tirosinaz sentezi yanısıra üreme içinde optimum NaNO_3 konsantrasyonunun 2 g/L olduğu belirlendi. Kültür ortamında tirosinaz aktivitesi ve diferansiyel sentez hızı ayrıca saptandı (Şekil 4.11).



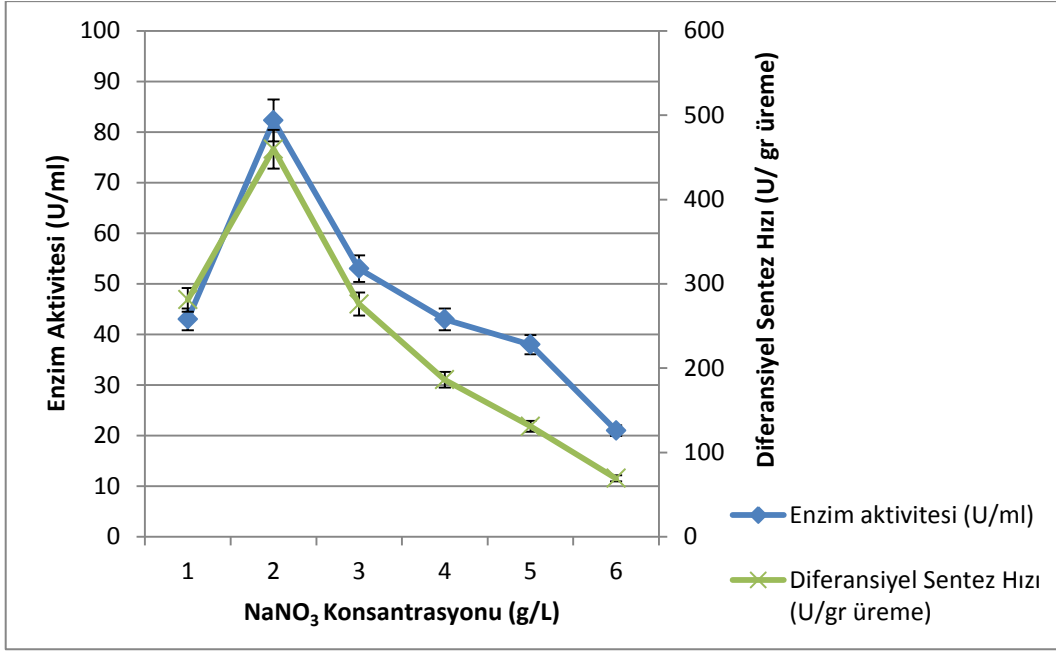
Şekil 4.9. Tirosinaz üretimi için uygun azot kaynağı

-Deneyler 30 °C'de, 200 rpm'de 7 gün inkübasyonla gerçekleştirildi. Değerler 3 çalışmanın ortalaması olup, şekillerdeki çubuklar standart sapmayı tanımlamaktadır.



Şekil 4.10. Tirosinaz üretimi ve *F. troglia* üremesine etkili NaNO_3 konsantrasyonu

Deneyler 30 °C'de, 200 rpm'de 7 gün inkübasyonla gerçekleştirildi. Değerler 3 çalışmanın ortalaması olup, şekillerdeki çubuklar standart sapmayı tanımlamaktadır.

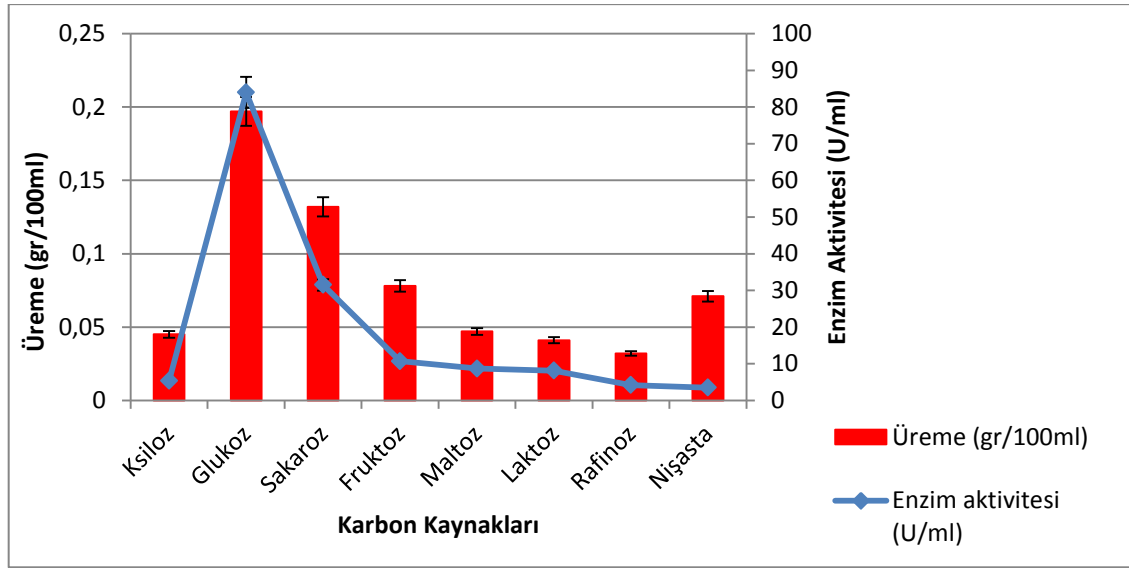


Şekil 4.11. Farklı konsantrasyonlarda NaNO₃ içeren ortamlarda tirosinaz aktivitesi ve diferansiyel sentez hızı

-Deneyler 30 °C'de, 200 rpm'de 7 gün inkübasyonla gerçekleştirildi. Değerler 3 çalışmanın ortalaması olup, şekillerdeki çubuklar standart sapmayı tanımlamaktadır.

4.2.8. Tirosinaz üretimine etkili uygun karbon kaynağı

Tirosinaz üretimi için uygun karbon kaynağını belirlemek amacıyla farklı karbon kaynakları (Ksiloz, Glukoz, Sakkaroz, Fruktöz, Maltoz, Laktoz, Rafinoz, Nişasta) denendi. Gerek üreme ve gerekse enzim sentezi Glukoz içeren ortamda diğer kaynaklara kıyasla daha yüksek olarak saptandı (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Tirosinaz üretimi için uygun karbon kaynağı

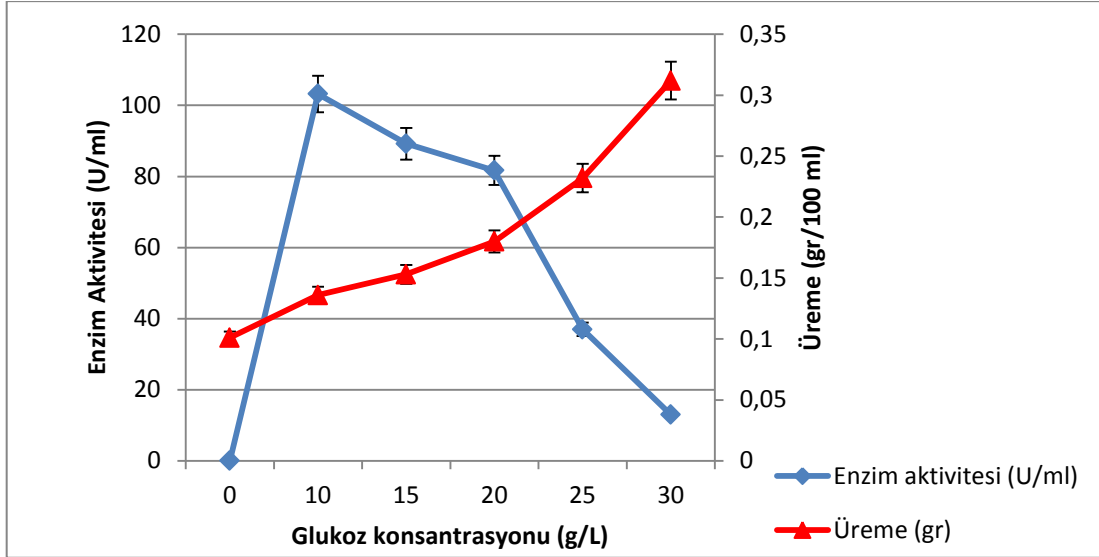
Deneyler 30 °C'de, 200 rpm'de 7 gün inkübasyonla gerçekleştirildi. Değerler 3 çalışmanın ortalaması olup, şekillerdeki çubuklar standart sapmayı tanımlamaktadır.

4.2.9. Tirosinaz üretimi için uygun glukoz konsantrasyonu

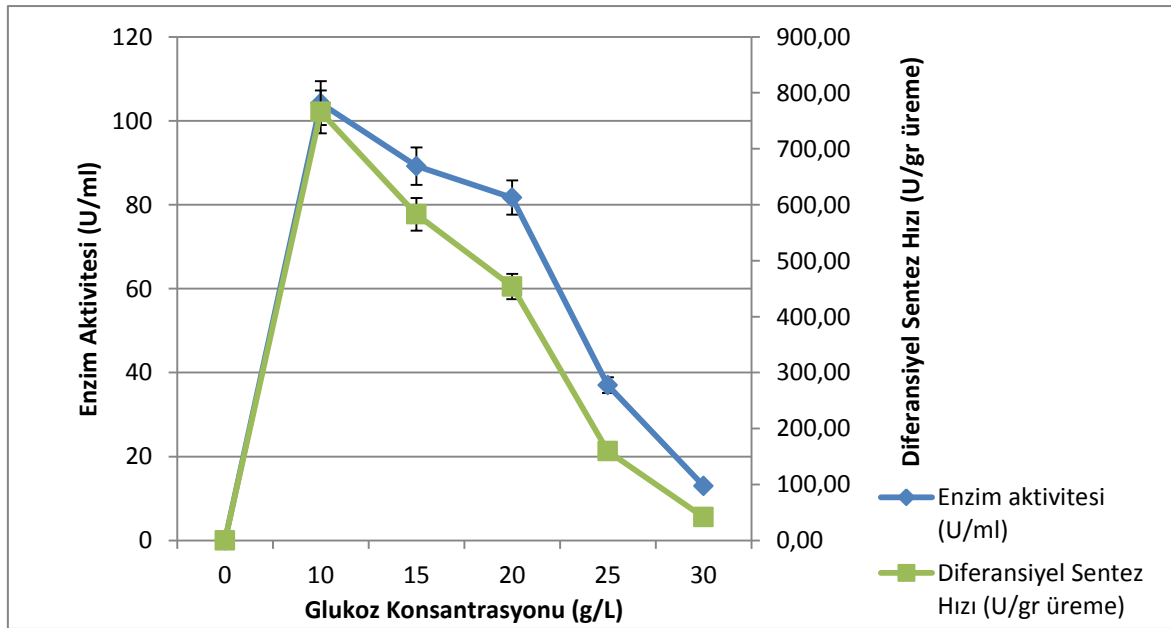
Funalia trogii tirosinaz'ının üretimi için en uygun karbon kaynağı olarak belirlenen glukozun, yüksek enzim verimini hangi konsantrasyonda göstereceğini belirlemek üzere, glukozun değişik konsantrasyonları (0, 10, 15, 20, 25, 30) g/L olarak denendi. Şekil 4.13'te görüldüğü gibi tirosinaz sentezi yanısıra üreme içinde optimum Glukoz konsantrasyonunun 10 g/L olduğu belirlendi. Kültür ortamında tirosinaz aktivitesi ve diferansiyel sentez hızı ayrıca saptandı (Şekil 4.14).

4.2.10. Tirosinaz verimi açısından en uygun karbon azot oranının saptanması

F. trogii fungusunun tirosinaz üretimi için en uygun karbon-azot oranını belirlemek üzere yapılan deneylerde en yüksek tirosinaz aktivitesi (104.5 U/ml), Karbon-Azot oranı 5 olan kültürde gözlenmiştir (Şekil 4.15). Şekil 4.16'ta görüldüğü gibi en yüksek *F. trogii* üremesi Karbon-Azot oranı 20:2 olan kültürde saptandı.

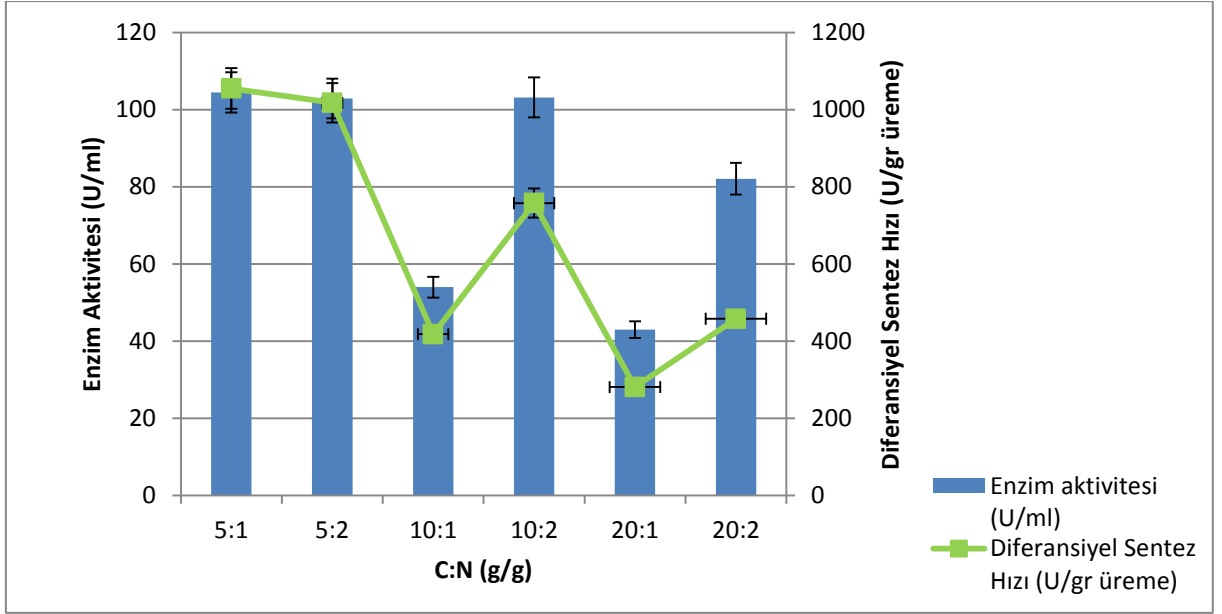


Şekil 4.13. Tirosinaz üretimi ve *F. trogii* üremesine etkili Glukoz konsantrasyonu
 -Deneyler 30 °C'de, 200 rpm'de 7 gün inkübasyonla gerçekleştirildi. Değerler 3 çalışmanın ortalaması olup, şekillerdeki çubuklar standart sapmayı tanımlamaktadır.



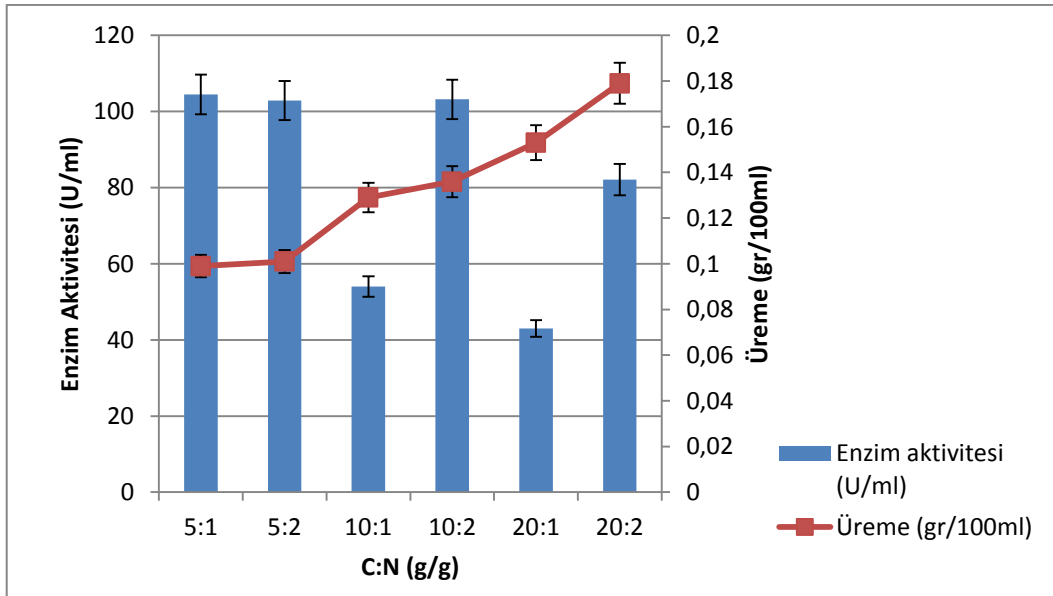
Şekil 4.14. Farklı konsantrasyonlarda Glukoz içeren ortamlarda tirosinaz aktivitesi ve diferansiyel sentez hızı

-Deneyler 30 °C'de, 200 rpm'de 7 gün inkübasyonla gerçekleştirildi. Değerler 3 çalışmanın ortalaması olup, şekillerdeki çubuklar standart sapmayı tanımlamaktadır.



Şekil 4.15. Farklı oranlarda karbon ve azot içeren ortamlarda tirosinaz aktivitesi diferansiyel sentez hızı

-Deneyler 30 °C'de, 200 rpm'de 7 gün inkübasyonla gerçekleştirildi. Değerler 3 çalışmanın ortalaması olup, şekillerdeki çubuklar standart sapmayı tanımlamaktadır.

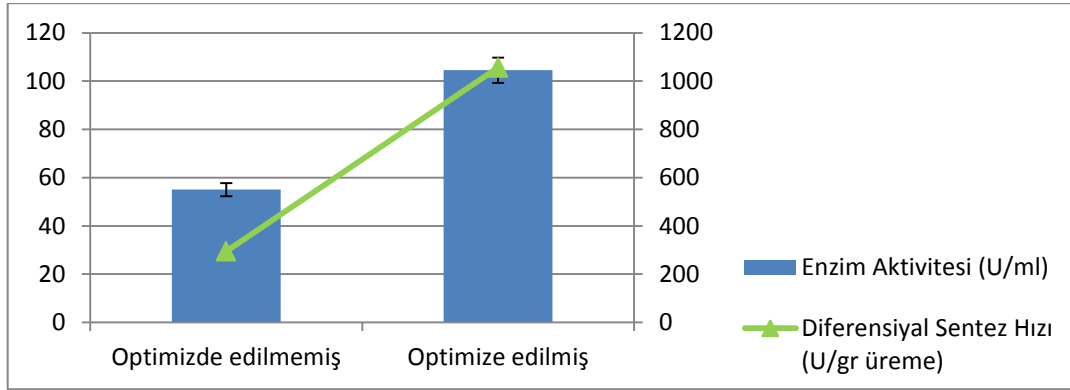


Şekil 4.16. Tirosinaz üretimi ve *F. trogii* üremesine etkili farklı karbon ve azot oranları

-Deneyler 30 °C'de, 200 rpm'de 7 gün inkübasyonla gerçekleştirildi. Değerler 3 çalışmanın ortalaması olup, şekillerdeki çubuklar standart sapmayı tanımlamaktadır.,

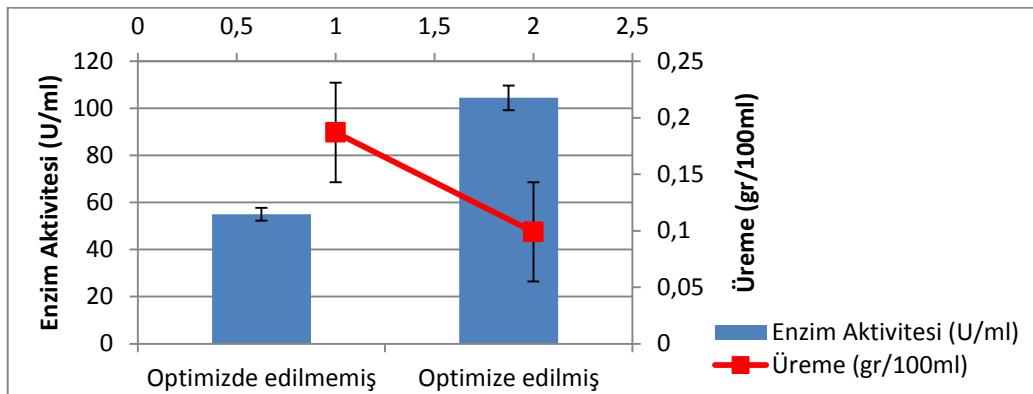
4.2.11. Başlangıç üretim ile optimize edilmiş koşulların karşılaştırılması

Bölüm 3.5'e göre hazırlanan Vogel besiyeri daha sonra üretim koşullarının optimizasyonu amacıyla içerik yönünden modifiye edilmiştir (Bkz 3.5). üretim koşulları optimize edilmemiş Vogel besiyeri ile modifiye koşullarda hazırlanan besiyerinde üreme ve enzim üretimi karşılaştırılmıştır. Bu durumda enzim üretiminin ve deferansiyel sentez hızının arttığı saptanmaktadır (Şekil 4.17). Üremenin ise daha düşük olduğu saptanmıştır (Şekil 4.18).



Şekil 4.17. Başlangıç üretim ile optimize edilmiş koşullarında enzim üretimi ve diferansiyel sentez hızının karşılaştırılması

Değerler 3 çalışmanın ortalaması olup, şekillerdeki çubuklar standart sapmayı tanımlamaktadır.



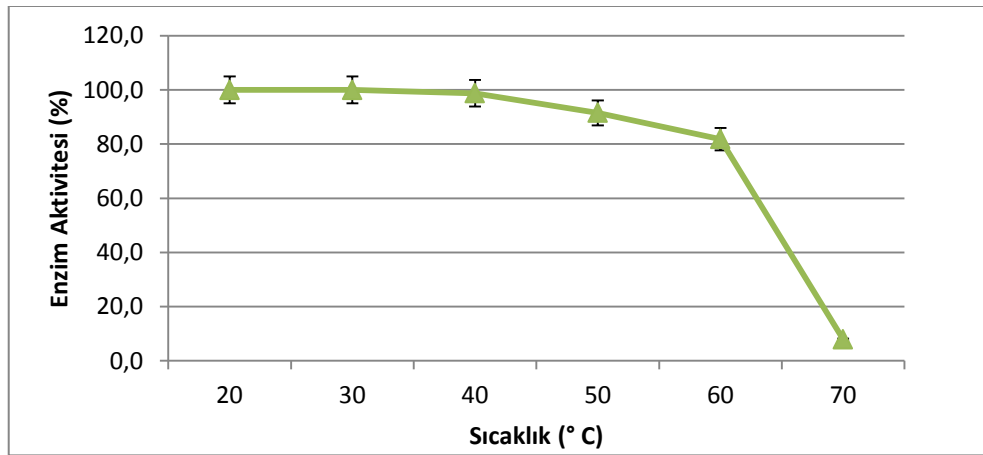
Şekil 4.18. Başlangıç üretim ile optimize edilmiş koşullarında enzim üretimi ve üremenin karşılaştırılması

Değerler 3 çalışmanın ortalaması olup, şekillerdeki çubuklar standart sapmayı tanımlamaktadır.

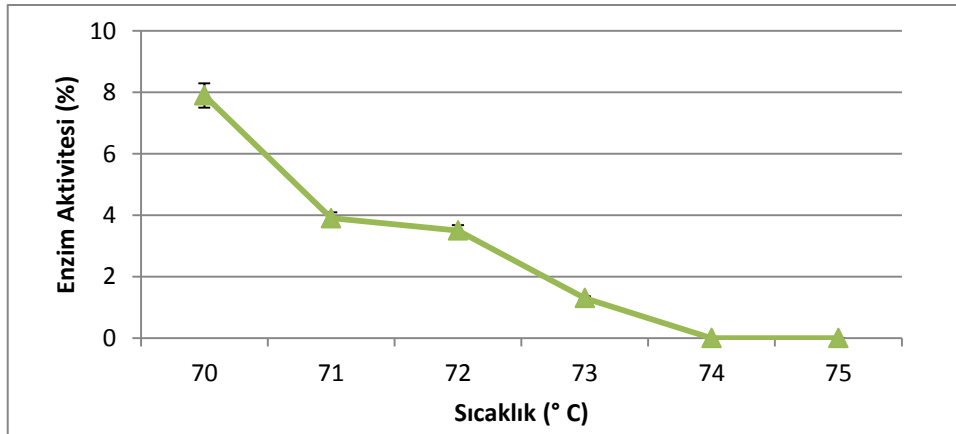
4.3. Tirosinaz Enziminin Dayanıklılığı

4.3.1. Kaba enzimin farklı sıcaklıklardaki dayanıklılığı

Enzimin farklı sıcaklıklarda dayanıklılığının belirlenmesi amacıyla, kaba enzim Bölüm 3.6.1’de anlatılan şekilde 20-75°C’ler arasında değişen sıcaklıklarda 1 saat ön inkübasyona tutuldu ve enzim aktiviteleri ölçüldü. Bağlı aktivite olarak hesaplanan enzim aktiviteleri incelendiğinde, 20-60°C’ler arasındaki sıcaklıklarda enzim aktivitesinin büyük çoğunlukla korunduğu 70°C’de ise düşüş olduğu tespit edildi (Şekil 4.19).



(a)



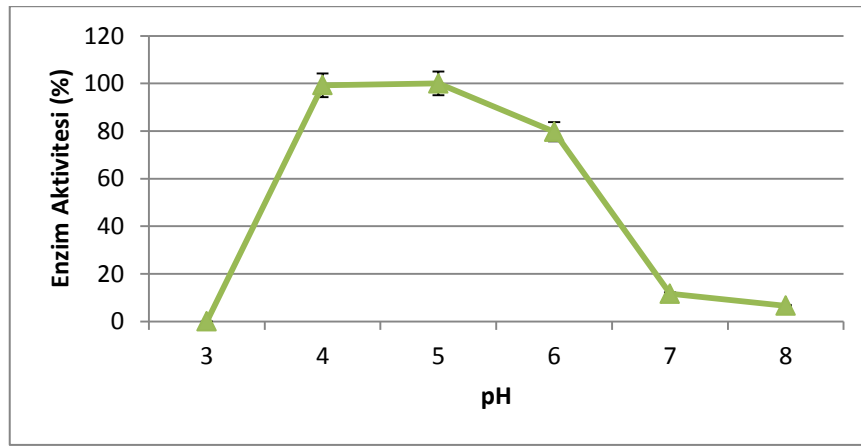
(b)

Şekil 4.19. Tirosinaz enziminin farklı sıcaklıklarda dayanıklılığı

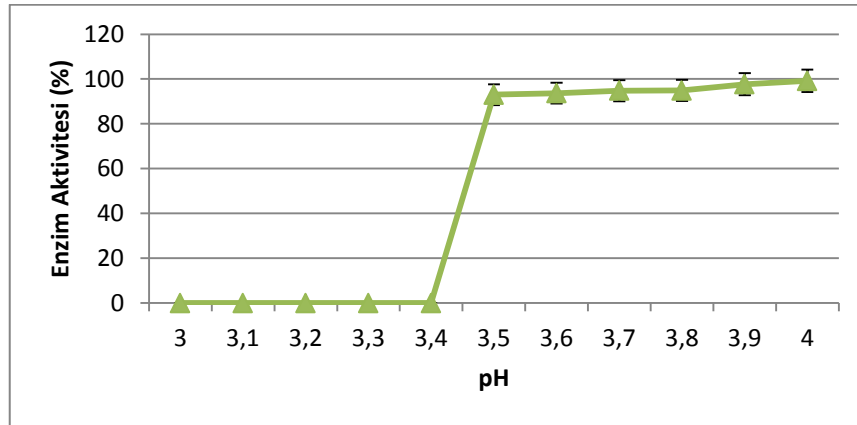
-Bölüm 3.6.1’de anlatıldığı şekilde tirosinaz enzimi farklı sıcaklıklarda 1 saat ön inkübasyona tutuldu ve enzim aktivitesi tayin edildi. Değerler 3 çalışmanın ortalaması olup, şekillerdeki çubuklar standart sapmayı tanımlamaktadır.

4.3.2. Kaba enzimin farklı pH'lardaki dayanıklılığı

Enzimin farklı pH'lardaki dayanıklılığının belirlenmesi amacıyla, kaba enzim Bölüm 3.6.2'de anlatılan şekilde oda sıcaklığında farklı pH'larda 1 saat ön inkübasyona tutuldu ve enzim aktiviteleri ölçüldü. Şekil 4.20.a ve 4.20.b'de görüldüğü gibi aktivitede pH= 3,5-5 arası benzer değerde aktivite saptanmış bu değer pH=6'da %20 civarında olacak şekilde azalmıştır. pH= 7'den itibaren ise aktivite çok düşmektedir. pH= 3.5 öncesinde ise her hangi bir aktivite değeri ölçülmemiştir (Şekil 4.20).



(a)



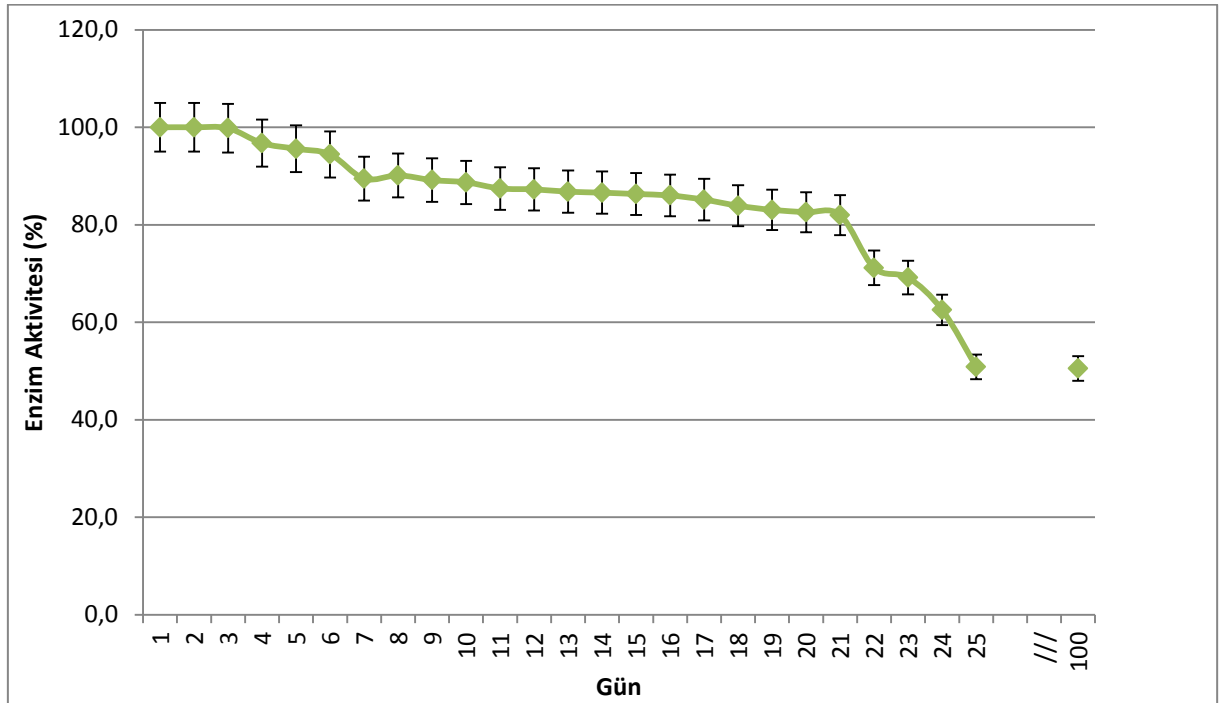
(b)

Şekil 4.20. Tirosinaz enziminin pH dayanıklılığı

-Bölüm 3.6.2'de anlatıldığı şekilde tirosinaz enzimi farklı pH'larda 1 saat ön inkübasyona tutuldu ve enzim aktivitesi tayin edildi. Değerler 3 çalışmanın ortalaması olup, şekillerdeki çubuklar standart sapmayı tanımlamaktadır.

4.3.3. Kaba enzimin günlere göre aktivite dayanıklılığı

Optimize koşullarda elde edilen tirosinaz enziminin aktivitesinin dayanıklılığını saptamak amacıyla yapılan deneylerde, 30 gün boyunca Bölüm 3.5.13'te anlatıldığı gibi yapılan ölçümler sonucunda, enzim aktivitesinin 7. güne kadar yatay bir şekilde seyrettiği gözlemlendi daha sonra yaklaşık %20'lik bir düşüşle 21. güne kadar aktiviteler tespit edildi. 22. günden itibaren hızlı bir düşüş gözlemlendi ve 25. günde %60'lık bir aktivite kaybı gözlemlendi. Daha sonra 25-100 gün arasında (75 gün) donmuş şekilde saklanan örnekte bu süre sonunda hiç aktivite kaybı gözlemlenmedi (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. Tirosinaz enzimi aktivite dayanıklılığı

-Değerler 24 saatlik ölçümlerle elde edildi. Değerler 3 çalışmanın ortalaması olarak verilmiştir. Şekillerdeki çubuklar standart sapmayı tanımlamaktadır.

4.4. Bentonite tutuklu tirosinaz enzimi bulguları

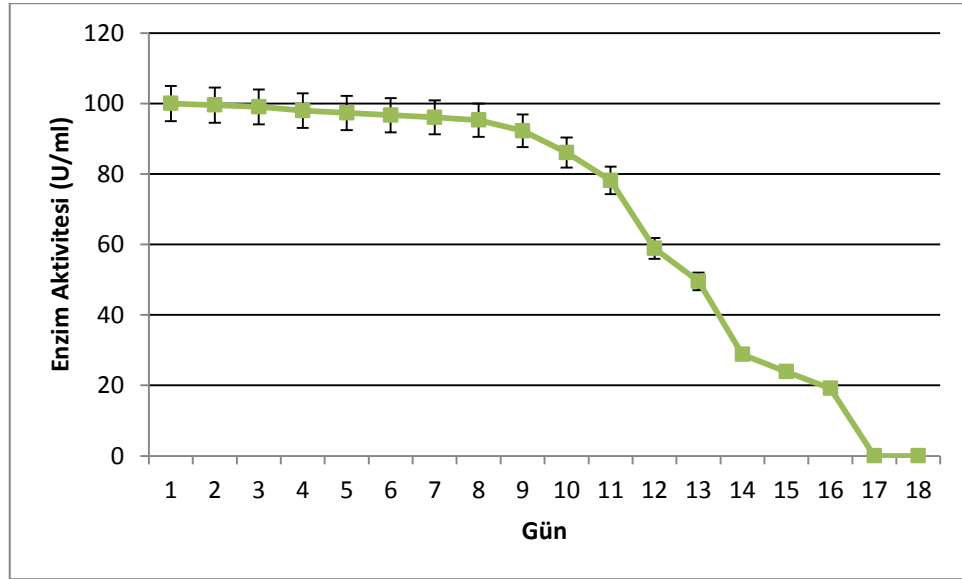
Kaba enzimin tutuklama öncesi Lowry protein tayin metoduna göre total protein içeriği 109.7 mg/ml olarak tayin edildi. Tutuklama sonrası bentonit uzalaştırıldıktan sonra kalan kısımda tekrar protein tayini yapıldı. Bu ikinci tayin sonucu protein

içeriği 65,9 mg/ml olarak saptandı. Bu bulgu kaba enzim ekstresinde mevcut proteinin (109,7 mg/ml) %39,93'ünün tutuklandığını göstermektedir. Tutuklu enzimin aktivitesi 63,2 U/ml olarak hesaplandı.

4.4.1. Tutuklu tirosinaz enziminin dayanıklılık çalışmaları

4.4.1.1. Tutuklu tirosinaz'ın günlere göre aktivite dayanıklılığı

Bölüm 3.7.4'te anlatılan şekilde tutuklanan tirosinaz enzimi, dondurularak/çözülerek - 20° C'de saklandı. Oda sıcaklığında çözülen tutuklu enzimin aktivitesi 24 saatlik ölçümler şeklinde yapıldı. 8. güne kadar enzim aktivitesi yatay bir şekilde seyrederken, 9. günden itibaren hızlı bir aktivite düşüşü saptandı. 17. günden itibaren enzim aktivitesi saptanamadı (Şekil 4.22).

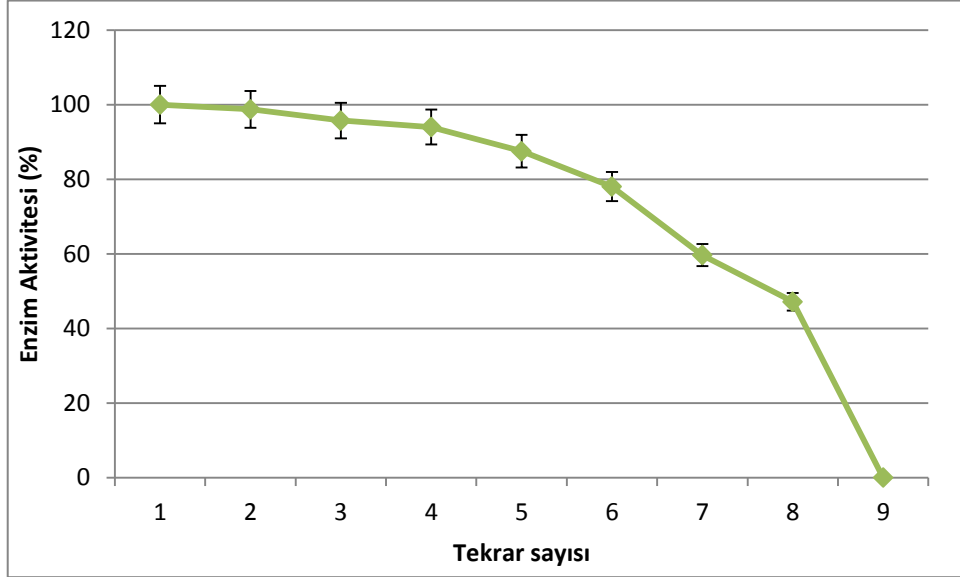


Şekil 4.22. Tutuklu tirosinaz'ın günlere göre aktivite dayanıklılığı

-Değerler 24 saatlik ölçümlerle elde edildi. Değerler 3 çalışmanın ortalaması olarak verilmiştir şekillerdeki çubuklar standart sapmayı tanımlamaktadır.

4.4.1.2. Tutuklu tirosinaz'ın tekrarlı kullanımındaki aktivite dayanıklılığı

Bentonit üzerine tutuklanan tirosinaz enziminin tekrarlı kullanımındaki dayanıklılığını saptamak amacıyla yapılan deneylerde 8. tekrardan sonra enzim aktivitesi saptanamadı. (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. Tutuklu tirosinaz'ın tekrarlı kullanımındaki dayanıklılığı

-Değerler 3 çalışmanın ortalaması olarak verilmiştir. Şekillerdeki çubuklar standart sapmayı tanımlamaktadır.

5. TARTIŞMA

Polifenol oksidaz grubundan olan, Tirosinaz enzimi, doğada yaygın olarak çeşitli organizmalar ve mikroorganizmalarda yer almaktadır. Sübstrat özgüllüğü bulunan ve reaksiyonların sonunda ortaya çıkan aktif grublar bu enzimin; fenolik biyosensörler, L-Dopa üretimi ve fenolik kirleticilerin giderimi gibi çeşitli alanlarda kullanımı önem kazanmıştır (Fairhead and Thöny-Meyer 2012).

Tirosinaz enziminin raf ömrünü uzatmak ve aktivitesini arttırmak amacı güden çalışmalar farklı kaynaklardan elde edilen tirosinaz enzimi kullanılarak devam ettirilmektedir; Bu çalışmalarda farklı fungal, bitkisel veya bakteriyel kaynaklardan elde edilen enzim kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda yüksek aktivite ve dayanıklılık gibi özelliklerin yanısıra, üretim maliyeti ve hızlı eldesi yöntemleri üzerinde çalışmalar da yapılmaktadır. Son yıllarda her ne kadar bakteriyel kaynaklar üzerinde çalışmalar yapıldıysa da, ticari olarak özellikle fungal kaynaklı tirosinaz enzimi henüz önemini korumaktadır (Halaouli et al. 2006). Bakteriyel kaynaklı tirosinaz enzimi üzerinde yapılan çalışmaların uzun yıllar önce başlamıştır. Örneğin *Streptomyces* grubuna ait bazı türlerden, elde edilen tirosinaz, L-tirosinin melanin'e dönüşmesinden sorumlu olmaktadır (Skinner 1938). Bakteriyel kaynaklı tirosinaz enziminin özellikleri üzerinde yapılan çalışmaları bu kaynaklardan elde edilenlerin fungal kaynaklı enzimler kadar yüksek aktivite veya dayanıklılığa sahip olmadıklarını göstermektedir.

Fairhead ve arkadaşları (2010) tarafından yapılan bir çalışmada tirosinaz sentezinin yanısıra, aynı kaynaktan proteolitik aktivitesi olan enzimlerin de üretildiğini bunun da, tirosinaz'ın aktivite kaybına yol açtığını göstermektedir (Fairhead and Thöny-Meyer 2010); Halen devam eden araştırmalar fungal kaynaklı tirosinaz enziminin, uzun raf ömrü, hızlı ve düşük maliyetli eldesi gibi konularda yoğunlaşmaktadır (Seo et al. 2003; Halaouli et al. 2006; Flurkey 2008).

En iyi karakterize edilen tirosinaz enzimi *Agaricus bisporus* ve *Neurospora crassa* funguslarından üretilmiştir (Lerch 1983; Robb 1984). Günümüzde ticari olarak satışa sunulan yüksek aktiviteli tirosinaz enzimi, *Agaricus bisporus* türünden kimyasal yöntemler kullanarak elde edilir. *A. bisporus*'dan elde edilen enzim

memeli hücrelerin sentezlediği tirozinaz yüksek benzerlik gösterdiğinden özellikle melanogenesis çalışmalarında model olarak kullanılmaktadır (Chang 2009). Fungal enzimlerin geniş kullanım yelpazesi çevre sorunları ve gıda endüstrisini de kapsar, örneğin çay yapraklarının fermentasyon sürecinde sık kullanılan enzimlerden birisi fungal kaynaklı tirozinaz enzimidir (Halaouli et al. 2005). Karakterize edilen fungal tirozinazlar genellikle hücre-içi enzimlerdir. İlk hücre-dışı tirozinaz enzimi filamentöz bir fungus türü olan *Trichoderma reesei* türünden elde edilmiştir (Selinheimo et al. 2006).

Çalışmamızda kullanılan filamentöz formda olan funguslar içinde hücre-dışı tirozinaz aktivitesi bulunan *A. niger*, *T. versicolor* ve *F. trogii* fungusları arasında en verimli türün *F. trogii* (Maksimum tirozinaz aktivitesi: 55 U/ml) olduğu saptandı (Şekil 4.1). Organizma üzerine toksik etki göstermesi söz konusu aromatik yapıda fenolik bileşiklerin hücre-dışı ortamlarda tirozinaz gibi fenol oksidazlarla okside edilerek toksik etkilerinin giderilmesi söz konusu olduğundan, bu grup enzimlerin lokalizasyon bakımından hücre-dışı olması beklenen bir özelliktir (Apohan and Yesilada 2005).

Çalışmamızda *F. trogii*'nin tirozinaz veriminin çalkalamalı inkübasyon koşullarında, statik koşullara kıyasla daha yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil 4.3). Beyaz çürükçül funguslar aerobik karakter taşır ayrıca fenol oksidaz grubu enzimlerin aktivitesi için oksijen gerektirir. Çalkalamalı inkübasyon, oksijenlenme, besiyerinin homojen dağılımının artmasına neden olmaktadır (Moreira et al. 1998; Vasconcelos et al. 2000). Çalışmamızda statik inkübasyon koşullarında *F. trogii*'nin oldukça yavaş ve kültür yüzeyinde bir tabaka oluşturarak ürettiği gözlemlendi. Buna karşılık çalkalamalı koşullarda inkübe edilen mikroorganizma, çalkalama süreciyle sağlanan ajitasyona bağlı olarak, hızlı ve besiyeri içinde miçelyum peletleri halinde üremektedir. Tirozinaz sekonder bir metabolit olduğundan üreme safhasının duraksama fazında üretimi maksimuma ulaşır (Park et al. 2008). İnkübasyondaki çalkalama sürecine bağlı olarak üremenin hızlı olması, mikroorganizmanın, sekonder metabolizma için gerekli üreme konumuna daha kısa sürede ulaşmasına dolayısıyla tirozinaz sentezinin artmasına yol açabilecek bir sonuç doğurabilir. Yapılan deneyler sonucunda 200 rpm hızında çalkalamalı inkübasyon koşullarında yüksek tirozinaz verimine ulaştığı gözlemlendi (66.4 U/ ml). 250 rpm hızında ise tirozinaz veriminin daha düşük (42.6 U/ml) olduğu saptandı (Şekil 4.4).

Araştırmacılar yüksek çalkalama hızında yapılan inkübasyon sırasında, üremede oluşan peletlerin parçalandığını ve proteolitik enzimlerin devreye girdiğini dolayısıyla sentezlenen proteinler ve enzimlerin parçalandığını belirtmektedirler (Moreira et al. 1998; Wang et al. 2005). Benzer nedenlerin çalışmamız içinde geçerli olabileceği ileri sürülebilir. Ancak çalışmamızda 250 rpm çalkalama hızında üremenin daha düşük olmasına bağlı olarak enzim aktivitesi de düşük olarak bulunduğundan daha sonraki çalışmalar 200 rpm’de sürdürülmüştür.

İnkübasyon süresinin tirosinaz enzimi sentezi üzerine etkisini saptamak amacıyla yapılan deneylerde en yüksek enzim aktivitesi (61.9 U/ml) 7. günde saptandı. Beyaz-çürükçül fungusların sentezlediği polifenol oksidaz enzimleri ile ilgili yapılan çalışmalarda inkübasyon süresi açısından benzer sonuçlar saptandığı bildirilmektedir (Arora and Gill 2000).

İnkübasyon sıcaklığı ve tirosinaz sentezi arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla yaptığımız çalışmada *F. trogii* için optimum üreme sıcaklığı olan 30 °C’nin aynı zamanda maksimum tirosinaz sentezi (64 U/ml) için de optimum bir sıcaklık olduğu görüldü (Şekil 4.6). Bu konuda yapılan bazı çalışmalarda verimli enzim sentezi için, optimum inkübasyon sıcaklığı 25-30 °C olarak rapor edilmektedir (Thurston 1994; Pointing et al. 2000). 35 ve 40°C’de sürdürülen inkübasyon çalışmalarımızın sonucunda ise daha düşük aktiviteler elde edilmektedir. Yüksek inkübasyon sıcaklığından tirosinaz enziminin aktivitesinin düşüşüne, proteolitik enzimlerin aktivite artışı ve besi ortamındaki proteinlerin denatürasyonunun neden olduğu bazı araştırmacılar tarafından ileri sürülmektedir (Nyanhongo et al. 2002; Birhanli and Yesilada 2010). Ancak bizim çalışmamızda bu nedenlerden daha çok, üreme için 35 ve 40°’lerin uygun olmadığı ve doğal olarak da enzim sentezinin azaldığı gibi bir değerlendirmeye gitmek daha doğru olmaktadır.

Seçilen potent mikroorganizmanın hangi ortam pH’sında en yüksek verimde tirosinaz ürettiğini belirlemek amacıyla yapılan deneylerde en yüksek tirosinaz aktivitesi (72 U/ml) pH’sı 5 olan örnekte tespit edildi. pH’sı 3 olan kültürde en düşük aktivite, pH’sı 8 olan örnekten itibaren ise tirosinaz aktivitesi tespit edilemedi (Şekil 4.7). Kültür ortamı pH’sı fungusun üremesi dolayısıyla enzim sentezini etkileyen önemli faktörlerden birisidir. Beyaz-çürükçül funguslarda, kültür ortamının asidik pH’sı, fenol oksidaz ve ligninolitik enzimlerin sentezini arttırmaktadır.

Trametes türlerinde optimum kültür ortamı pH'sı 4.5 olarak bildirilmiştir (Yup Jang et al. 2002). Benzer bir çalışmada ise *F. trogii* fungusundan elde edilen polifenol oksidaz enzimleri için optimum kültür ortamı pH'sı 4-5 olarak rapor edilmiştir. Tavares ve arkadaşları, beyaz-çürükçül funguslar üzerinde yaptıkları bir çalışmada, pH 4-5 aralığının, fenol oksidaz enzimleri sentezi için uygun olduğunu rapor etmişlerdir (Tavares et al. 2006). pH 4 ve 5 dışında denenen pH'larda ise daha düşük aktivite saptandığı bildirilmektedir (Birhanli and Yesilada 2010). Bunun iki nedeni olabilir: düşük pH'larda, ligninolitik ve fenol oksidaz enzimlerinin sentezi inhibe olur ya da düşük pH'larda enzimlerin 3 boyutlu yapısı değişime uğrar ve bunun sonucunda aktif bölgelerin etkilenmesi ile biyokatalitik reaksiyon gerçekleşmez. Benzer olarak *T. modesta*'nın sentezlediği ligninolitik enzimlerin, 4.5 pH değerinin altındaki pH'larda, asidik proteazlara karşı hassas oldukları saptanmıştır (Jönsson et al. 1997; Nyanhongo et al. 2002).

Çalışmamızda organik azot kaynağı olarak pepton ve maya özütü, inorganik azot kaynağı olarak NaNO_3 , NH_4NO_3 ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kullanıldı. Uygun azot kaynağı belirlenmesi deneyi sonucunda her ne kadar, organik azot kaynakları içeren besi ortamındaki, fungus üremesi yüksek tespit edilmişse de 7 günlük inkübasyon süresince tirozinaz enziminin aktivitesi ölçülememiştir. Pepton ve maya özütünde azot miktarının yüksek olması yanısıra diğer nutrientlerin de bulunması üreme için uygun bir ortam oluşturmakta ancak mikroorganizmanın stres enzimi olarak tirozinaz enziminin üretimi fazına geçiş süresinin daha uzun olmasına yol açmaktadır diğer bir ifade ile enzim sekonder metabolit ürünü olduğundan üremeye devam eden fungus 7. günde sekonder metabolizmaya girmemiştir demektir. Bu durumda 7. günden sonra aktivitenin ölçülmesi mümkün olabilecekte de üretimin uzaması bir maliyet yaratacaktır. Bu ise istenmeyen bir husus olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca 7-günlük standart üretim süresi dışında elde edilen bir verinin kıyaslama için uygun olacağını söylemekte mümkün değildir. İnorganik azot kaynakları ilave edilen enzim üretim ortamları arasında en yüksek aktivite (81.9 U/ml) NaNO_3 içeren kültürde saptandı (Şekil 4.9). Beyaz-çürükçül funguslarda tirozinaz enziminin sekonder bir metabolit olduğu bilinmektedir (Park et al. 2008). Mikroorganizmanın sekonder metabolit üretimi fazına geçişini etkileyen önemli faktörlerden birisi kültür ortamı ve içeriğidir. Ligninolitik enzimlerin sentezi, kültür ortamı azot kaynağı türü ve miktarı ile ilişkilidir; beyaz-çürükçül

funguslarda bu enzim gruplarının üremesi azot kaynağının tükenmesi ile başlar (Keyser et al. 1978). Ligninolitik enzimlerin sentezi için azot kaynağı olarak pepton, maya özütü, sodyumnitrat, amonyumnitrat ve üre sık kullanılan kaynaklar olarak bildirilmiştir (Keyser et al. 1978). Ligninaz dışındaki bazı enzimlerin sentezi üzerinde yapılan çalışmalara bakıldığında, laktaz üretimi için yapılan bazı çalışmalarda üretim ortamlarında azot kaynağı olarak NaNO_3 kullanıldığı görülmektedir (Ismail et al. 1997). Ayrıca *A. pullulans* ile yapılan bir başka çalışmada ise üretim ortamında NaNO_3 kullanıldığında yüksek laktaz aktivitesi elde edilmiştir (Deshpande et al. 1989). sekonder metabolit olan gibberrellic asit üretimi için en uygun azot kaynağı olarak NaNO_3 bildirilmiştir (Basiacik Karakoc and Aksoz 2004). Nutrientlerin tüketilmesi ile birlikte azot kaynağının kısıtlılığı ligninolitik enzimlerin sentezini tetiklediği bildirilmektedir (P Keyser 1978). *T. versicolor* fungusu ile yapılan bir diğer çalışmada düşük azot konsantrasyonunun ligninolitik ve polifenol oksidaz enzimlerin sentezini arttırdığı bildirilmiştir (Leatham 1983). Ayrıca yapılan başka bir çalışma da azot kaynağının kısıtlılığının, mikroorganizmanın duraksama fazında üretilen enzimlerin sentezine indükleyici etki yaptığı bildirilmektedir (Feng 2007). Enzim üretimi üzerinde yapılan diğer bir çalışmada, karbon ve azot regülasyonu yapılarak proteaz enzimlerinin sentezinin inhibisyonu, diğer enzimlerin üretimi için gerekli olduğu ileri sürülmüştür (Ooijkaas et al. 1999; Gomes et al. 2000).

F. trogii tirosinaz üretimi için uygun karbon kaynağının glukoz olduğu saptanmıştır (Şekil 4.12). Ksiloz, Rafinoz ve Nişasta içeren ortamlarda ise az üreme ve dolayısıyla düşük enzim aktivitesi tespit edildi. Sakkaroz içeren üretim ortamında ise her ne kadar üreme miktarı, diğer karbon kaynaklarıyla kıyaslandığında, yüksek saptandıysa da enzim aktivitesinin düşük olduğu gözlemlendi. Tirosinaz enzimi üretimi ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada da tirosinaz enzimi üretimi için uygun karbon kaynağı olarak glukoz bildirilmiştir (Ikram Ul and Ali 2002). Benzer olarak Mikiashvil ve arkadaşları, *T. versicolor* üzerinde yaptıkları bir çalışmada glukoz ve sellobiyoz'un ligninolitik enzimlerin üretiminde en uygun karbon kaynakları olduklarını bildirilmiştir (Mikiashvili et al. 2005). Glukoz *T. pubescens*'den lakkaz enziminin üretiminde de yine uygun karbon kaynağı olarak bildirilmektedir (Galhaup 2002).

Uygun Karbon-azot oranını belirlemek amacıyla yapılan deneyler ve hesaplamalar sonucunda en verimli tirozinaz enzimi (104.5 U/ml) üretimi için, C:N oranı 5:1 olarak saptandı (Şekil 4.16). Enzim üretimi ortamının optimizasyonu ile ilgili olarak yapıla gelmekte olan çalışmalarda genellikle, uygun karbon ve azot kaynağının belirlenmesi değil de daha ziyade karbon-azot oranı çalışmaları ön plana çıkmaktadır (Escamilla et al. 2000). Ligninolitik enzimlerin üretimi için, Irshad ve arkadaşları tarafından uygun karbon-azot oranı çalışmamıza benzer bir şekilde 5:1 olarak bildirilmektedir (Muhammad Irshad 2011). Bir diğer çalışmada fenol oksidaz enzimlerinin verimli üretiminin yine, düşük karbon-azot oranlı kültür ortamlarında gerçekleştiği belirtilmektedir (Monteiro and De Carvalho 1998). Hatta yüksek karbon-azot oranının, ligninolitik enzimlerin üretimini baskıladığı da araştırmacılar tarafından saptanmış bir sonuç olarak karşımıza çıkmaktadır (Pascal Bonnarne 1991). Bunlara ek olarak besi ortamında yer alan aşırı yüksek karbon ve düşük miktarda azot kaynaklarının üretim ortamının dengesini bozarak mikroorganizma üremesi üzerine inhibisyon etkisi yarattığını ileri sürerek olayın açıklamasını yapmaya çalışan araştırmalara da rastlanmaktadır (Muhammad Irshad 2011). Bunun aksine olarak düşük miktarlardaki karbon yanı sıra ortamda yüksek miktarda azot kaynağı bulunduğunda ligninaz enzimi üretiminin önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir (Xiaoping XU 2008).

Çalışmamızda optimize koşullarda elde edilen tirozinaz enziminin aktivitesinin dayanıklılığını saptamak amacıyla yapılan deneylerde, 25 gün boyunca yapılan ölçümler sonucunda, enzim aktivitesinin 7. güne kadar yatay bir şekilde seyrettiği gözlenmiştir, daha sonra yaklaşık %10'luk bir düşüşle 22. güne kadar aktivite tespit edilmektedir (Şekil 4.21). 22. günden itibaren hızlı bir düşüş gözlenmekte ve 25. günde %60'lık bir aktivite kaybı saptanmaktadır. 75 gün boyunca -20°C'de dondurularak saklanan ve 100. günde oda sıcaklığında çözölen enzim kaynağında ise 25. gündeki aktivite ile kıyaslandığında herhangi bir aktivite kaybı gözlenmemektedir. Birhanlı ve arkadaşları lakkaz ile yaptıkları bir çalışmada benzer koşullarda 30 gün sonra enzim aktivitesinde %54'lük bir aktivite kaybı rapor etmişlerdir (Birhanlı and Yesilada 2010). Valaskova ve arkadaşları ise *T. versicolor*'dan elde edilen ligninolitik enzimlerinin aktivisinde %60-65 'lik bir düşüşü 42 günde gözlemlemektedirler. (Valaskova and Baldrian 2006).

Endüstriyel enzimlerin tercih edilebilir olmalarını belirleyen en önemli faktörler yüksek aktivite göstermeleri ve bunun yanı sıra pek çok farklı koşullarda aktivitelerini koruyabilmeleridir. Ürettiğimiz tirosinaz enzimin sıcaklık dayanıklılığın oldukça yüksek olduğu bulundu (Şekil 4.19). Konu ile ilgili yapılan bir çalışmada *A. bisporus*'tan elde edilen tirosinaz enziminin yüksek sıcaklıkta daha düşük stabiliteye sahip olduğu belirtilmiştir (Da-You Xu 2011). Tirosinaz ile ilgili olarak yapılan bir diğer çalışmada ise çalışmamıza paralel olarak bu enzimin termostabil olduğu bildirilmektedir (Aytar 2008).

Tirosinaz enziminin pH dayanıklılığının saptanması deneylerin sonucunda düşük pH'larda yüksek aktivite saptanmışken pH 7 ve üzeri değerlerde düşük aktivite ölçüldü. Bu konu ile ilgili yapılan bir çalışmada 6 ve üzeri pH değerlerinde tirosinazın dayanıklı olmadığı gösterilmektedir (Da-You Xu 2011). Düşük değerlerdeki ortam pH'sının enzimler üzerinde bazik grupların natüralize etmesi, asidik pH'lardaki dayanıklılığına yol açabileceği ileri sürülmektedir (Montoro-García and F. 2010).

Biyoteknolojik sistemlerin endüstriyel kullanımları için immobilizasyon teknolojisi önem taşımaktadır. Endüstriyel süreçlerde kimyasal proseslerin yanında immobilize enzim ve mikroorganizmalar gibi biyolojik katalizör sistemlerinin kullanılmasıyla önemli biyokimyasal dönüşüm reaksiyonları gerçekleştirilmektedir. Örneğin sitrik asit, etanol, laktik asit, ksilanaz, selüloz, Gibberellik asit gibi endüstriyel önemi olan birçok ürünün üretiminde tutuklanmış mikroorganizmalar veya enzimler yaygın olarak kullanılarak, ürün miktarını, verimi ve dayanıklılığı artırma çalışmaları yapılmaktadır (Eikmeier and Rehm, 1987; Kwak and Rhee, 1992; Sakurai et al., 1997; Lusta et al., 2000; Ogbonna et al., 2001, (KARAKOÇ 2004).

Çalışmamızda tirosinaz üretimi optimizasyonu sonucu elde edilen kaba enzim kaynağı tutuklama işlemlerine kullanılmaktadır. Daha önceden belirtildiği gibi, tirosinaz, oksitleyici ajan olarak oksijeni kullanması nedeniyle, çeşitli fenolik bileşiklerinin arıtımında kullanılmaktadır. Bu arıtımın maliyeti peroksidazlarla kıyaslandığında daha düşüktür. Ancak, tirosinazın halen şapkalı mantarlardan saflaştırılarak kullanılmasına bağlı olarak bu proses yine de oldukça pahalıya mal olmaktadır. Bu nedenle, filamentöz formda üreyen funguslardan elde edilecek

kaba tirozinaz enziminin kullanılmasının, enzimin saflaştırılmasından kaynaklanan maliyet artışının önüne geçebileceği düşüncesi ileri sürülmektedir (Mai et al. 2004; Levin et al. 2008). Bu noktadan hareketle Bölüm 3.7.2’de anlatıldığı gibi Bentonit üzerine tutuklama işlemleri gerçekleştirilmiş ve tutuklu tirozinaz enziminin aktivitesinin günlere göre ve tekrarlı kullanımındaki dayanıklılığı saptanmıştır. Tutuklama çalışmalarımız sırasında tutuklu kaba enzim için 24 saatlik ölçümlerde enzim aktivitesinin 8. güne kadar yatay bir şekilde seyrettiği, 9. günden itibaren ise düşüşün saptandığı görülmektedir (Şekil 4.22). 17 günden sonra ise enzim aktivitesi saptanamamıştır. Tutuklu enzimdeki bu aktivite düşüşü ile optimize şartlarda üretilen *F. troglia* tirozinazının (kaba enzim) dayanıklılık deneyi sonuçları (Şekil 4.13) kıyaslandığında, tutuklama ile oluşan aktivitedeki düşüşünün nedeninin tutuklu protein miktarı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bölüm 4.3 de belirtildiği gibi kaba enzimde yer alan protein içeriğinin %39.93’ü tutuklanmaktadır. Bu değer ise, 43.8 mg/ml kaba enzim anlamına gelmektedir. Bu hesaptan gidilirse tutuklanan enzimin bağıl aktivitesi 144 gibi bir değere ulaşır. Ancak tutuklanan enzim aktivitesi ile kaba enzim aktiviteleri üzerinden bir hesap yapıldığında bu kez aktivitenin ancak % 60.4 kadarının korunduğu söylenebilir. Her iki hesaplamada da elde edilen veriler elde ettiğimiz tutuklama ve aktivite değerlerinin endüstriyel ölçekler için geçerli olduğu bilgisini vermektedir (Yeşiloğlu 2004).

İmmobilizasyon çalışmaları arasında kullanılan Bentonit çok ucuz bir matriks olduğu bilinmektedir ve son zamanlarda sık kullanılmaktadır (Yeşiloğlu 2004). Ucuz ve düşük maliyetli olması yanı sıra düşük toksisite potansiyeline sahiptir ayrıca kimyasal reaksiyonlara dahil olma olasılığı çok düşüktür. Öte yandan kovalent olmayan tutuklama prosesleri, düşük maliyetli olma yanı sıra nispeten daha kolay uygulanır olarak bildirilmektedir (M. Reslow 1999). Bentonit üzerinde tutuklanan tirozinaz enziminin tekrarlı kullanımındaki dayanıklılığı incelendiğinde (Şekil 4.23) 9. tekrara kadar aktivitenin ölçülebildiği görülmektedir. Enzimin 8. tekrar kullanımında aktivitesinin %47.2 sini koruduğu saptanmaktadır. 9. ölçümde ise enzim aktivitesi saptanamamıştır. Tutuklu enzimde düşük aktivite saptanmasına karşın Bentonitin ucuz olması ve düşük toksisite potansiyeline sahip olması immobilizasyon çalışmalarında kullanılması için bir avantaj sağlamaktadır. Ayrıca tutuklanmış enzimin defalarca kullanılabilmesi ayrı bir olumlu yön olarak göz önünde

bulundurulmalıdır. Ancak tutuklama ile ilgili başka kaynaklarında da denendiği daha ileri çalışmaların yapılması gereği açıktır.

Sonuç olarak; çalışmamızda denenen filamentöz funguslar arasında, *F. trogii*'nin yüksek verimle tirosinaz üretimi için uygun olduğu düşünce si ileri sürülebilir.

KAYNAKLAR

- Abbas, H., Hiol, A., Deyris, V., Comeau, L. (2002). Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Mucor* sp strain isolated from palm fruit. *Enzyme and microbial technology*, 31, 968- 975.
- Andrawis, A. and V. Kahn (1990). Ability of various chemicals to reduce copper and to inactivate mushroom tyrosinase. *Journal of Food Biochemistry* 14(2): 103-115.
- Apohan, E. and O. Yesilada (2005). Role of white rot fungus *Funalia troglia* in detoxification of textile dyes. *Journal of Basic Microbiology* 45(2): 99-105.
- Aragon, J. and A. Sols (1991). Regulation of enzyme activity in the cell: Effect of enzyme concentration. *The FASEB Journal* 5(14): 2945-2950.
- Arora, D. and K. Gill (2000). Laccase production by some white rot fungi under different nutritional conditions. *Bioresource Technology* 73(3): 283-285.
- Atlow, S. C., Bonadonna-Aparo, L., and Klivanow, A. M., (1984). Dephenolization of industrial wastewaters catalysed by polyphenol oxidase. *Biotechnology and Bioengineering* 26: 599-603.
- Atlow, S. C., L. Bonadonna-Aparo and A. M. Klivanov (1984). Dephenolization of industrial wastewaters catalyzed by polyphenol oxidase. *Biotechnol Bioeng* 26(6): 599-603.
- Aytar, B. S., Bakir, U. (2008). Preparation of cross-linked tyrosinase aggregates. *Process Biochem.* 43, 125–131.
- Bailey S. (1987). *Biochemical Engineering Fundamentals: International Student Edition* Chapter 1-7, p. 39-50.

- Basiacik Karakoc, S. and N. Aksoz (2004). Optimization of carbon-nitrogen ratio for production of gibberellic acid by *pseudomonas* sp. *Pol J Microbiol* 53(2): 117-120.
- Bhat, M. K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnol Adv* 18(5): 355-383.
- Bickerstaff, G. F. (1997). Immobilization of enzymes and cells. Humana press, Totowa, New Jersey
- Birhanli, E. and O. Yesilada (2010). Enhanced production of laccase in repeated-batch cultures of *funalia trogii* and *trametes versicolor*. *Biochemical Engineering Journal* 52(1): 33-37.
- Boyer, R. (2002). Concepts in Biochemistry (2nd ed.). New York, Chichester, Weinheim, Toronto.: John Wiley & Sons, Inc.. pp. 137–8. ISBN 0-470-00379-0.
- Chang, T. (2009). An updated review of tyrosinase inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*. 10(6):2440-2475.
- Da-You Xu, Y., Zhen Yang (2011). Activity and stability of cross-linked tyrosinase aggregates in aqueous and nonaqueous media. *Journal of Biotechnology* 152 , 30–36.
- De Bolster, M. W. G. (1997). Glossary of Terms Used in Bioinorganic Chemistry: Coenzyme, International Union of Pure and Applied Chemistry.
- Demain, A. L. and N. A. Solomon (1981). Industrial microbiology. *Sci Am* 245(3): 67-75.
- Deshpande, M. S., R. L. Deopurkar and V. B. Rale (1989). Beta-galactosidase from *aureobasidium pullulans*. *Letters in Applied Microbiology* 9(1): 21-24.

- Durán, N., A. Rosa, A. D'Annibale and L. Gianfreda (2002).Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: A review. *Enzyme and Microbial Technology* 31(7): 907-931.
- Ekşi, A. (1988).Meyve suyu durultma tekniği. Gıda teknolojisi derneği, yayın no : 9, 127p, ankara.
- Escamilla, E. M., L. Dendooven, I. P. Magana, R. Parra and M. De la Torre (2000).Optimization of gibberellic acid production by immobilized gibberella fujikuroi mycelium in fluidized bioreactors. *J Biotechnol* 76(2-3): 147-155.
- Fairhead, M. and L. Thöny-Meyer (2010).Role of the c-terminal extension in a bacterial tyrosinase. *FEBS Journal* 277(9): 2083-2095.
- Fairhead, M. and L. Thöny-Meyer (2012).Bacterial tyrosinases: Old enzymes with new relevance to biotechnology. *New Biotechnology* 29(2): 183-191.
- Feng, z. (2007).Influence of glucose feeding on the ligninolytic enzyme production of the white-rot fungus phanerochaete chrysosporium. *Front. Environ. Sci. Engin. China*, 1(1): 89–94.
- Flurkey, A., Cooksey, J., Reddy, A., Spoonmore, K., Rescigno, A., Inlow, J., Flurkey, W.H. (2008).Enzyme, protein, carbohydrate, and phenolic contaminants in commercial tyrosinase preparations: Potential problems affecting tyrosinase activity and inhibition studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:4760-4768.
- Galhaup, C., Wagner, H., Hinterstoisser, B., Haltrich, D. (2002). Enhanced production of laccase activity by the wood-degrading basidiomycete trametes pubescens. *Enzyme Microb. Technol.* 30: 529-536.
- Gamerith, G., Groicher, R., Zeilinger, S., Herzog, P., Kubicek, C.P. (1992).Cellulase-poor xylanases produced by trichoderma reesei rutc-30 on hemicellulase substrates. *Appl Microbiol Biotechnol.* 38: 315-322.

- Gessesse, A. (1998).Purification and properties of two thermostable alkaline xylanases from an alkaliphilic bacillus sp. Appl Environ Microbiol 64(9): 3533-3535.
- Golan-Goldhirsh, A. and J. R. Whitaker (1985).Kcat inactivation of mushroom polyphenol oxidase. Journal of Molecular Catalysis 32(2): 141-147.
- Gomes, J., I. Gomes, K. Terler, N. Gubala, G. Ditzelmuller and W. Steiner (2000).Optimisation of culture medium and conditions for alpha-l-arabinofuranosidase production by the extreme thermophilic eubacterium rhodothermus marinus. Enzyme Microb Technol 27(6): 414-422.
- Halaouli, S., M. Asther, K. Kruus, L. Guo, M. Hamdi, J. C. Sigoillot and A. Lomascolo (2005).Characterization of a new tyrosinase from pycnoporus species with high potential for food technological applications. Journal of Applied Microbiology 98(2): 332-343.
- Halaouli, S., M. Asther, J. C. Sigoillot, M. Hamdi and A. Lomascolo (2006).Fungal tyrosinases: New prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications. Journal of Applied Microbiology 100(2): 219-232.
- Hiol, A., Jonzo, M. D., Rugani, N., Druet, D., Sadra, L., Comeau, L.C. (2000).Purification and characterization of an extracellular lipase from thermophilic rhizopus oryzae strain isolated from palm fruit. Enzyme and microbial technology. 26, 421-430.
- Horowitz, N. and Horn G., (1970).Tyrosinase (*neurospora crassa*), methods in enzymology, 17 a , 615-620.
- Ikram Ul, H. and S. Ali (2002).Microbiological transformation of l-tyrosine to 3,4-dihydroxyphenyl l-alanine (l-dopa) by a mutant strain of aspergillus oryzae uv-7. Curr Microbiol 45(2): 88-93.

- Ismail, S. ,S. Mabrouk and R. R. Mahoney (1997).Purification and characterization of β -galactosidase from mucor pusillus. Journal of Food Biochemistry 21(5): 145-162.
- Ito, S. (1997).Alkaline cellulases from alkaliphilic bacillus: Enzymatic properties, genetics, and application to detergents. Extremophiles 1(2): 61-66.
- Jencks, W., N.Y: Dover. ISBN 0-486-65460-5. (1987).Catalysis in chemistry and enzymology. Mineola,
- Jerzy Dec, J.-M. B. (1995).Effect of various factors on dehalogenation of chlorinated phenols and anilines during oxidative coupling. Environ. Sci. Technol 29 657-663.
- John, W., and Sons, I. (1998).Industrial enzymes and their applications. United states of amerika. 454.
- Johnvesly, B., Naik, G.R., (2001).Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic bacillus sp. Jb-99 in a chemically defined medium. Process Biochemistry 37: 139-144.
- Jolivet S, Wichers HJ and Pellon G (1998).Agaricus bisporus browning: A review. Mycol res 102:1459–1483.
- Jolley Jr, R., H. Evans, N. Makino and H. S. Mason (1974).Oxytyrosinase. Journal of Biological Chemistry 249(2): 335-345.
- Jönsson, L., M. Saloheimo and M. Penttilä (1997).Laccase from the white-rot fungus trametes versicolor: Cdna cloning of lcc1 and expression in pichia pastoris. Current Genetics 32(6): 425-430.
- Kanda K, , Ishii S, Enei H, Ejiri SI (1996).Purification and properties of tyrosinase isozymes from the gill of lentinus edodes fruiting body. Biosci biotechnol biochem 60:1273– 1278.

- KARAKOÇ, Ş. B. (2004). Bazı matrikslere tutuklanmış *asperillus niger* den glibberellik asit üretimi. DOKTORA TEZİ Hacettepe Üniversitesi.
- Karam, J. and J. A. Nicell (1997). Potential applications of enzymes in waste treatment. Journal of Chemical Technology & Biotechnology 69(2): 141-153.
- Karam, J., (1997). Potential applications of enzymes in waste treatment. J. Chem. Thec. Biotechnol., 69, 141-153.
- Kaur, S., Vohra, R.M., Kapoor, M., Beg, Q.K., and Hoondal, G.S. (2001). Enhanced production and characterization of a highly thermostable alkaline protease from bacillus sp. World Journal of Microbiology & Biotechnology 17: 125-129.
- Keyser, P., Kirk and J. G. Zeikus (1978). Ligninolytic enzyme system of phanaerochaete chrysosporium: Synthesized in the absence of lignin in response to nitrogen starvation. J Bacteriol 135(3): 790-797.
- Kindle, K. L. (1983). 1983. Characterization and production of thermostable α -amylase. Application. Biochem. Biotechnol 8: 153-170
- Kirk, T. Borchert and C Fuglsang (2002). Industrial enzyme applications. Current Opinion in Biotechnology 13(4): 345-351.
- Kupper U, Travaglini G, Lerch K (1989). Isolation and characterization of the tyrosinase gene from neurospora crassa. J biol chem 264:17250–17258.
- Kurahashi Y, (1998). Carpropamid: A new melanin biosynthesis inhibitor. Pflanzenschutz-nachr bayer 51:245–256
- Leatham, G. (1983). Regulation of ligninolytic activity by nutrient nitrogen in white-rot basidiomycetes. FEMS Microbiology Letters 16: 65-67.
- Lee, B. H. (1996). Fundamentals of biotechnology, vch publishers, USA, 431p.

- Lerch, K. (1983). *Neurospora tyrosinase: Structural, spectroscopic and catalytic properties*. *Molecular and Cellular Biochemistry* 52(2): 125-138.
- Levin, L., C. Herrmann and V. L. Papinutti (2008). Optimization of lignocellulolytic enzyme production by the white-rot fungus *trametes trogii* in solid-state fermentation using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal* 39(1): 207-214.
- López, M., G. Guisado, M. C. Vargas-García, F. Suárez-Estrella and J. Moreno (2006). Decolorization of industrial dyes by ligninolytic microorganisms isolated from composting environment. *Enzyme and Microbial Technology* 40(1): 42-45.
- Lowry, O., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J., Protein measurement with the folin phenol reagent . *J. Biol. Chem.*, 193,265-275 (1951).
- M. Reslow, B. Mattiason (1999). On the importance of the support material for bioorganic synthesis-influence of material partition between solvent. *Enzyme Microb Technol*, 73, pp. 384–391.
- Mabrouk. S., EL-Shayeb, A., Ismail, and A.-F. M.S., A.F. (1998). Optimization of alkaline protease productivity by *bacillus licheniformis* atcc 21415. *Bioresour Technol* 69: 155-159.
- Madsen, G, Norman, B.E., and Slott, S (1973). A new heat-stable bacterial amylase and its use in high-temperature liquefaction. *Starke* 25: 304.
- Mai, C., U. Kues and H. Militz (2004). Biotechnology in the wood industry. *Appl Microbiol Biotechnol* 63(5): 477-494.
- Maurice R. Marshall, J. (2000). Enzymatic browning in fruits, vegetables and seafoods
- Mayer, A. M. (2006). Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. *Phytochemistry* 67(21): 2318-2331.

- Michel, F. jr, M., DASS, B. Grulke, E. A. and Reddy (1991).Role of manganese peroxidase and lignin peroxidase of phanerochaete chrysosporium in the decolorization of kraft bleach plant effluent, appl. Environ. Microbiol., 57(8),2368-2375.
- Mikiashvili, N., V. Elisashvili, S. Wasser and E. Nevo (2005).Carbon and nitrogen sources influence the ligninolytic enzyme activity of *Trametes versicolor*. Biotechnology Letters 27(13): 955-959.
- Monteiro, M. and M. De Carvalho (1998).Pulp bleaching using laccase from *Trametes versicolor* under high temperature and alkaline conditions. Applied Biochemistry and Biotechnology 70-72(1): 983-993.
- Montoro-García, S., Gil-Ortiz, F., Navarro-Fernández, J., Rubio, V. and García-Carmona,. (2010).Improved cross-linked enzyme aggregates for the production of desacetyl-lactam intermediates. Bioresour. Technol. 101, 331–336.
- Moreira, M., C. Palma, G. Feijoo and J. M. Lema (1998).Strategies for the continuous production of ligninolytic enzymes in fixed and fluidised bed bioreactors. Journal of Biotechnology 66(1): 27-39.
- Muhammad Irshad , M. A. (2011).Production and optimization of ligninolytic enzymes by white rot fungus *Schizophyllum commune* ibl-06 in solid state medium banana stalks. African Journal of Biotechnology Vol. 10(79), pp. 18234-18242.
- Naidja, A., M. Huang and J. M. Bollag (1997).Activity of tyrosinase immobilized on hydroxyaluminum-montmorillonite complexes. Journal of Molecular Catalysis A: Chemical 115(2): 305-316.
- Nakamura M, Ohba Y, Yamauchi S, Lee BR, Ichishima E (2000).Identification of copper ligands in *Aspergillus oryzae* tyrosinase by site-directed mutagenesis. Biochem j 350:537–545.

- Nelson Durán, E. E. (2000). Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase – like compounds in wastewater and soil treatment : A review. *Applied Catalysis B: Environmental* 28:: 83-99.
- Nelson, J. M. and C. R. Dawson (2006). Tyrosinase. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*, John Wiley & Sons, Inc.: 99-152.
- Nicell, J. A., Al-Kassim, L., Betra, and Taylor, K.E (1993). 'Wastewater treatment by enzyme catalysed polymerisation and precipitation. *Biodeterioration Abstracts* 7: 1-8.
- Niehaus, F., C. Bertoldo, M. Kahler and G. Antranikian (1999). Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl Microbiol Biotechnol* 51(6): 711-729.
- Nyanhongo, G., Gomes, G. Gübitz, R. Zvauya, J. S. Read and W. Steiner (2002). Production of laccase by a newly isolated strain of *trametes modesta*. *Bioresource Technology* 84(3): 259-263.
- Oktay, M., I. Kocaçalışkan, I. Şakiroğlu, H. (1995). Polyphenoloxidase from amasya apple. *Journal of Food Science* 60(3): 494-496.
- Ooijkaas, L., C. Wilkinson, J. Tramper and R. M. Buitelaar (1999). Medium optimization for spore production of *coniothyrium minitans* using statistically-based experimental designs. *Biotechnol Bioeng* 64(1): 92-100.
- P Keyser, and J G Zeikus (1978). Ligninolytic enzyme system of *phanaerochaete chrysosporium*: Synthesized in the absence of lignin in response to nitrogen starvation. *J Bacteriol.* 135(3): 790-797.
- Park, G., S. Pan and K. A. Borkovich (2008). Mitogen-activated protein kinase cascade required for regulation of development and secondary metabolism in *neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* 7(12): 2113-2122.

- Pascal Bonnarme,. (1991).Regulation of ligninase production in white-rot fungi. Enzymes in biomass conversion, Proceedings of a symposium. Boston, MA. ACS symposium series 460. Am. Chem. Soc. p. 6.
- Pointing, S., Jones and L. L. P. Vrijmoed (2000).Optimization of laccase production by *pycnoporus sanguineus* in submerged liquid culture. *Mycologia* 92(1): 139-144.
- Puchart, V., Katapodis, P., Biely, P., Kremnický, L., Christakopoulos, P., Vrsanska, M., Kekos, D., Macris, B. J., and Bhat, M.K. (1998). Production of xylanases, mannanases, and pectinases by the thermophilic fungus *thermomyces lanuginosus*. *Enzyme and microbial technology* 24: 355-361.
- Radley, J. A. (1976). Production of microbial amylolytic enzymes *Starch Production Technology Chapter 16.*, Applied Science Publisher Ltd., England, p : 295-309.
- Robb, D. A. (1984).Tyrosinase. *Copper Proteins and Copper Enzymes* 2: 207-241.
- Robb DA, G. S. (1981).Polypeptide composition of two fungal tyrosinases. *Phytochemistry* 20:1481–1485.
- Rubio, C. T. Tomasini and S. Montas (1971).Structure and function of small bowel in healthy dominican volunteers. *Gastroenterology* 60(4): 799-&.
- Salles, B. C., Cunha, R.B., Fontes, W., Sousa, M.V., Filho, E.X.F. (2000).Purification and characterization of a new xylanase from *acrophialophora nainiana*. *Journal of biotechnology* . 81 : 199-204.
- Selinheimo, E., M. Saloheimo, E. Ahola, A. Westerholm-Parvinen, N. Kalkkinen, J. Buchert and K. Kruus (2006).Production and characterization of a secreted, c-terminally processed tyrosinase from the filamentous fungus *trichoderma reesei*. *FEBS Journal* 273(18): 4322-4335.

- Seo, S., K. Sharma and N. Sharma (2003).Mushroom tyrosinase: Recent prospects. *Journal of agricultural and food chemistry* 51(10): 2837-2853.
- Shen, H. C., KC (2007).A top-down approach for predicting enzyme functional classes and subclasses. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 364 (1): 53–9.
- Singh, J., Batra, N., Sobti, R.C. (2000).Serine alkaline protease from a newly isolated bacillus sp. *Process Biochemistry* 36: 781-785.
- Skinner, C. E. (1938).The Tyrosinase reaction of the actinomycetes. *J Bacteriol.* 1938 April; 35(4): 415–424.
- Söylemez, Z., Fadıloğlu, S. (1996).Laboratory manual for enzyme purification and immobilization. Gaziantep university faculty of engineering department of food engineering, Gaziantep: 47-52.
- Strothkamp, K., L. Jolley and H. S. Mason (1976).Quaternary structure of mushroom tyrosinase. *Biochem Biophys Res Commun* 70(2): 519-524.
- Sugurman, M. (1990).Prophenoloxidase activation and insect immunity
UCLA symposia on molecular and cellular biology 121: 47-62.
- Sun, W, Tyrosinase-containing chitosan gels: A combined catalyst and sorbent for selective phenol removal. *Biotechnol. Bioeng.*, 51: 79–86. (1996).
- Sun, W. Q., Payne, G. F., Mosa, M., Chu, J.H. and Wallace, K.K., (1992).Tyrosinase reaction/chitosan adsorption for removing phenols from wastewater. *Biotechnology Progress* 8: 178-186.
- Tarakcioglu , Y. (1979).An amylase producing maltotiose from bacillus subtilis. . *Agric. Biol. Chem.* 49(4): 1901-1907.

- Tavares, A. A. Coelho, M. S. Agapito, J. A. Coutinho and A. M. Xavier (2006). Optimization and modeling of laccase production by *trametes versicolor* in a bioreactor using statistical experimental design. *Appl Biochem Biotechnol* 134(3): 233-248.
- Teeri, T., A. Koivula, M. Linder, G. Wohlfahrt, C. Divne and T. A. Jones (1998). *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases: Why so efficient on crystalline cellulose? *Biochem Soc Trans* 26(2): 173-178.
- Thurston, C. F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140(1): 19-26.
- Tomme, P. A. Warren and N. R. Gilkes (1995). Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv Microb Physiol* 37: 1-81.
- Valaskova, V. and P. Baldrian (2006). Estimation of bound and free fractions of lignocellulose-degrading enzymes of wood-rotting fungi *pleurotus ostreatus*, *trametes versicolor* and *piptoporus betulinus*. *Res Microbiol* 157(2): 119-124.
- Vamos-Vigyazo, L. (1981). Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *Crit Rev Food Sci Nutr* 15(1): 49-127.
- Vasconcelos, A. M. Barbosa, R. F. H. Dekker, I. S. Scarminio and M. I. Rezende (2000). Optimization of laccase production by *botryosphaeria* sp. In the presence of veratryl alcohol by the response-surface method. *PROCESS BIOCHEMISTRY* 35(10): 1131-1138.
- Voet, D. (2004). *Biochemistry*, 3rd Edition, John Wiley & Sons, Inc.
- Wada, S., H. Ichikawa and K. Tsumi (1995). Removal of phenols and aromatic amines from wastewater by a combination treatment with tyrosinase and a coagulant. *Biotechnol Bioeng* 45(4): 304-309.

- Wagner, A. L. (1975). Vitamins and Coenzymes. Krieger Pub Co. ISBN 0-88275-258-8.
- Wang, L., D. Ridgway, T. Gu and M. Moo-Young (2005). Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. *Biotechnology Advances* 23(2): 115-129.
- Wasserman, B. P. (1995). Principles of enzymology for the food sciences, 2nd edition. John r. Whitaker, marcel dekker, inc., 270 madison ave., new york, ny 10016. 1994. 648 pages. \$185.00. *Journal of Food Safety* 15(4): 365a-366.
- Wiseman (1987). Handbook of enzymes biotechnology second edition chapter 3 applications of enzymes in industry 274-373.
- Witkop, C. J., Jr. (1985). Inherited disorders of pigmentation. *Clin Dermatol* 3(1): 70-134.
- Wong, K., Y., Richardson, J.D., and Mansfield, S.D., (2000). Enzymatic treatment of mechanical pulp fibers for improving papermaking properties. *Biotechnol. Prg.* 16, 1025-1029.
- Woodward, J. (1985). Immobilised cells and enzymes. Oxford, England.
- Xiaoping XU, X. (2008). Effects of culture conditions on ligninolytic enzymes and protease production by *phanerochaete chrysosporium* in air. *Chinese Acad. Sci. Beijing, China.* 19: 17-25.
- Yang, V., Zhuang, Z., Elegir, G., and Jeffries, TW., (1995). Alkaline-active xylanase produced by an alkaliphilic bacillus sp. Isolated from kraft pulp. *Journal of industrial microbiology.* 15, 434-441.
- Yemenicioglu, A. and B. Cemeroglu (2003). Consistency of polyphenol oxidase (ppo) thermostability in ripening apricots (*prunus armeniaca* L.): Evidence for the presence of thermostable ppo forming and destabilizing mechanisms in apricots. *J Agric Food Chem* 51(8): 2371-2379.

Yeşiloğlu, Y. (2004).Utilization of bentonite as a support material for immobilization of candida rugosa lipase. PROCESS BIOCHEMISTRY 40 (2005) 2155–2159.

Yup Jang, M., W. Ryul Ryu and M. Hwan Cho (2002).Laccase production from repeated batch cultures using free mycelia of trametes sp. Enzyme and Microbial Technology 30(6): 741-746.

Zeikus, J. G. (1979).Enzyme microb. Technol. 1,243.

Zeman, N. W. (1985).Alpha-amylase production using a recombinant DNA organism. Cereal Foods World 30(1): 777-780.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : DARYOUSH MAJIDI

Doğum Yeri : IRAN-Tabriz

Doğum Yılı : 1978

Medeni Hali : Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise: 1992-1996 IRAN-Tabriz Sâdy lises

Lisans: 1996-2003 IRAN-Tabriz Üniversitesi Tıp Fakültesi

Yabancı Dil: İngilizce